

ROBERT KOCH INSTITUT



Institut für Biotechnologie

Technische Universität Berlin

Medizinische Biotechnologie

Etablierung eines dreidimensionalen Infektionsmodells für Kuhpockenviren in humaner Haut und Charakterisierung der Infektion

vorgelegt von

Diplom-Ingenieur

Markus Neumann

geb. in Halle/Saale

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. Jens Kurreck
Gutachter: Prof. Dr. Roland Lauster
Gutachter: Dr. Heinz Ellerbrok

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 06.10.2017

Berlin 2017

Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, Markus Neumann, geboren am 26.01.1988, an Eides statt, dass diese Arbeit von mir selbständig und ausschließlich mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt und bisher an keiner anderen Hochschule eingereicht worden ist.

Perleberg, 29.08.2017

Markus Neumann

Danksagung

Für die Bereitstellung des Themas, angeregte Diskussionen und die hervorragende Betreuung möchte ich mich bei Heinz Ellerbrok bedanken. Darüber hinaus geht mein besonderer Dank an meinen Mitstreiter Robert Koban für die ausgezeichnete Zusammenarbeit an ähnlichen Themen, die lebhaften Diskussionen der Ergebnisse und die Hilfsbereitschaft. Ebenso möchte ich mich herzlich bei Marlena Stadtmüller für ihre exzellente Masterarbeit im Rahmen des Projektes und die zahlreichen Erkenntnisse, die mich sehr voran gebracht haben, bedanken. Herzlich danken möchte ich Andreas Nitsche für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Versuchspläne und die Diskussion der Ergebnisse sowie Claus-Thomas Bock als Zweitbetreuer am Institut für das offene Ohr und die zielführenden Treffen. Mein Dank geht an Julia Hinzmann für die praktische Unterstützung in Sachen NGS, sowie Wojtek Dabrowski, Berit Haldemann und Aleksandar Radonic für die Unterstützung in der Auswertung der NGS-Versuche. Herzlich danke ich Michael Laue, Gudrun Holland und Lars Möller für die aufwendige Anfertigung und anregende Diskussion der elektronenmikroskopischen Aufnahmen sowie Kazimierz Madela für die Unterstützung am konfokalen Mikroskop.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen, insbesondere dem Doktorandenbüro Team 013, von ZBS 1 für die Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima.

Für die universitäre Betreuung möchte ich mich ganz herzlich bei Roland Lauster bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich für die tolle Unterstützung bei meiner Familie und Linda bedanken. Ihr habt mir alle sehr geholfen und immer den Rücken freigehalten, sei es durch moralische Unterstützung oder auch beim Kontrollieren auf Rechtschreibung und Grammatik.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Zusammenfassung.....	IX
Summary.....	X
1. Einleitung.....	1
1.1. Dreidimensionale Zellkultur-Modelle.....	1
1.2. Dreidimensionales Hautmodell.....	4
1.2.1. Physiologie der humanen Haut.....	4
1.2.2. Dreidimensionale Modelle der humanen Haut.....	8
1.3. Orthopockenviren.....	12
1.3.1. Struktur, Morphologie und Genomorganisation.....	12
1.3.2. Replikationszyklus und Genexpression.....	14
1.3.3. Interaktion mit der Wirtszelle.....	16
1.3.4. Historie und Bedeutung der Pockenviren für die menschliche Gesundheit.....	17
1.3.5. Bedeutung der Haut bei der Infektion.....	19
1.4. Infektionsstudien in 3D Modellen.....	20
1.4.1. Infektionsstudien in Hautmodellen.....	20
1.5. Ziele der Arbeit.....	22
2. Material und Methoden.....	24
2.1. Materialien.....	24
2.1.1. Geräte.....	24
2.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	25
2.1.3. Reagenzien.....	26
2.1.4. Molekularbiologische Kits.....	28
2.1.5. Enzyme.....	28
2.1.6. Antikörper.....	29
2.1.7. Puffer und Lösungen.....	30
2.1.8. Verwendete Zellen.....	30
2.1.9. Zellkulturmedien.....	31
2.1.10. Nukleinsäuren.....	31
2.1.11. Software.....	33
2.2. Methoden.....	34
2.2.1. Zellkultivierung.....	34
2.2.2. Aufbau und Kultivierung der Hautäquivalente.....	35

2.2.3.	Kommerzielles Hautmodell (MatTek EpiDerm).....	36
2.2.4.	Viren und Virusanzucht	37
2.2.5.	Infektionsversuche in Monolayerkultur	38
2.2.6.	Infektionsversuche in Hautäquivalenten	39
2.2.7.	Extraktion von Nukleinsäuren und Proteinen	40
2.2.8.	RNA-Prozessierung	41
2.2.9.	Quantitative PCR	43
2.2.10.	NGS-basierte Transkriptomanalytik	44
2.2.11.	Proteinanalytik	46
2.2.12.	Bestimmung der Plaque-bildenden Einheiten (PFU).....	48
2.2.13.	Fixierung, Vorbereitung und immunhistochemische Analysen	49
2.2.14.	Transmissionselektronenmikroskopie.....	50
3.	Ergebnisse	51
3.1.	Aufbau des Modells und Methodenoptimierung.....	51
3.2.	Struktur und Differenzierung des Hautmodells	52
3.3.	Etablierung von Hautäquivalenten als 3D-Infektionsmodell	62
3.3.1.	Etablierung von Infektionsbedingungen und Analysemethoden.....	62
3.3.2.	Analyse des Infektionsverlaufes	68
3.3.3.	Virale Genexpression und Morphogenese in 3D- im Vergleich zu 2D-Kultur	73
3.4.	Anwendungen des Infektionsmodells	77
3.4.1.	Untersuchung von pockenviral beeinflussten zellulären Genen und Signalwegen	77
3.4.2.	NGS-basierte Transkriptomanalysen.....	84
3.4.3.	Übertragung und Bestätigung der Transkriptomanalysen.....	96
3.4.4.	Inhibitionsstudien mit Gefitinib.....	114
3.4.5.	Infektionsstudien in einem kommerziell erhältlichen Alternativmodell.....	119
4.	Diskussion.....	121
4.1.	Aufbau des Hautmodells und Differenzierung.....	121
4.2.	Infizierbarkeit des Hautmodells	127
4.3.	Vergleich des Infektionsverlaufs im Hautmodell mit 2D-Kultur.....	134
4.4.	Einfluss der viralen Infektion auf zelluläre Gene.....	137
4.5.	Inhibitionsstudien im Hautmodell.....	144
5.	Fazit und Ausblick.....	147
6.	Literaturverzeichnis.....	150

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Struktur der humanen Epidermis.</i>	5
<i>Abbildung 2: Schematischer Aufbau des humanen Hautmodells in Kulturmodus.</i>	10
<i>Abbildung 3: Vergleich histologischer Präparate aus humaner Haut und benutztem Hautmodell.</i>	11
<i>Abbildung 4: Morphologie von orthopockenviralen Partikeln in elektronenmikroskopischen Aufnahmen.</i>	13
<i>Abbildung 5: Klinische Manifestationen von Kuhpockeninfektionen menschlicher Haut.</i>	19
<i>Abbildung 6: Schematischer Ablauf der Analyse der NGS-Transkriptomdaten.</i>	45
<i>Abbildung 7: Schematische Darstellung des etablierten Kultivierungs- und Analyseprotokolls für die Untersuchung von Virusinfektionen im 3D-Infektionsmodell humaner Hautäquivalente.</i>	51
<i>Abbildung 8: Morphologie von Hautäquivalenten zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten im Vergleich zu 2D-Kultur und Hautexplantat.</i>	53
<i>Abbildung 9: Immunhistochemische Färbung von Keratinozyten-spezifischen Differenzierungsmarkern in Hautäquivalenten und Hautbiopsaten.</i>	56
<i>Abbildung 10: Immunhistochemische Färbung von spezifischen Proteinen der Adhäsion, Proliferation und Basallamina in Hautäquivalenten und Hautbiopsaten.</i>	58
<i>Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung von Claudin-1 in Hautäquivalent und Hautbiopsat.</i> ...	60
<i>Abbildung 12: Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Hautäquivalentpräparates nach neun Tagen Differenzierung.</i>	61
<i>Abbildung 13: Etablierung der Infektionsversuche: Einfluss von Differenzierungszeit und Verletzung auf den Infektionsverlauf.</i>	63
<i>Abbildung 14: Nachweis und Lokalisation infizierter Zellen mittels Immunfluoreszenz-Färbung spezifischer Virusmarker.</i>	64
<i>Abbildung 15: Elektronenmikroskopische Aufnahmen infizierter Hautäquivalentpräparate 48 bzw. 96 h p.i.</i>	66
<i>Abbildung 16: Analyse der infektiösen Partikel in Zellhomogenaten aus Dermis und Epidermis.</i>	68
<i>Abbildung 17: Virale Nukleinsäuren in der Epidermis des Äquivalentes im zeitlichen Verlauf.</i>	69
<i>Abbildung 18: Expression des Virusproteins CPXV168 (A33) im Zeitverlauf.</i>	70
<i>Abbildung 19: Darstellung des Infektionsverlaufes mit CPXV in Hautäquivalenten in der Immunfluoreszenz-Färbung.</i>	71
<i>Abbildung 20: Bestimmung der infektiösen Partikel im Zellkulturüberstand infizierter Hautäquivalente im Zeitverlauf.</i>	73
<i>Abbildung 21: Virale Genexpression im Zeitverlauf im Vergleich zwischen 3D und 2D-Modell.</i>	74
<i>Abbildung 22: Nachweis des CPXV168-Proteins im Western Blot im Vergleich zwischen 2D- und 3D-Infektionsversuchen humaner Keratinozyten.</i>	75
<i>Abbildung 23: Elektronenmikroskopische Aufnahmen extrazellulärer, viraler Partikel aus verschiedenen Infektionsmodellen.</i>	76
<i>Abbildung 24: Untersuchung der Phosphorylierung des EGFR in immunhistochemisch gefärbten Präparaten von 3D- und 2D-Kulturen.</i>	78
<i>Abbildung 25: Expressionskinetik von EGR1 und Ki-67 in epidermalen Keratinozyten im Infektionsverlauf.</i>	80
<i>Abbildung 26: Immunfluoreszenz-Nachweis des Ki-67-Proteins in Keratinozyten während der Infektion.</i>	81
<i>Abbildung 27: Quantifizierung des cPARP-Proteins unter verschiedenen Bedingungen.</i>	82

<i>Abbildung 28: Immunfluoreszenz-Nachweis von freier DNA mittels TUNEL-Assay in Keratinozyten während der Infektion.</i>	83
<i>Abbildung 29: RNA-Qualität und statistische Zuordnung der Reads am Beispiel der Proben der 3D-Kultivierung.</i>	85
<i>Abbildung 30: Vergleich der regulierten Gene zwischen Kontrollen von 3D- und 2D-Kultur zu zwei Zeitpunkten.</i>	87
<i>Abbildung 31: Heatmap einer Auswahl von regulierten Genen nach Infektion mit CPXV.</i>	93
<i>Abbildung 32: Verifikation der Expressionsänderungen bestimmter Zielgene zwischen verschiedenen Gruppen in der qPCR.</i>	96
<i>Abbildung 33: Expressionsmuster von TUBB3 in epidermalen Keratinozyten im Infektionsverlauf.</i>	98
<i>Abbildung 34: Quantifizierung der TUBB3-Proteinexpression in Keratinozyten unter verschiedenen Bedingungen.</i>	99
<i>Abbildung 35: Immunfluoreszenz-Nachweis des TUBB3-Proteins in Keratinozyten während der Infektion.</i>	100
<i>Abbildung 36: Lokalisation des TUBB3-Proteins in der Epidermis eines Hautäquivalentes während der Infektion.</i>	101
<i>Abbildung 37: Expressionsmuster von KRT8 in epidermalen Keratinozyten im Infektionsverlauf.</i>	102
<i>Abbildung 38: Expressionsmuster von NR4A1, FLNC und MEG3 in epidermalen Keratinozyten im Infektionsverlauf.</i>	103
<i>Abbildung 39: Immunfluoreszenz-Nachweis des NR4A1-Proteins in Keratinozyten während der Infektion.</i>	104
<i>Abbildung 40: Expressionsmuster von SNCG in epidermalen Keratinozyten im Infektionsverlauf.</i>	105
<i>Abbildung 41: Nachweis der SNCG-Proteinexpression in infizierten Epidermisäquivalenten.</i>	106
<i>Abbildung 42: Immunfluoreszenz-Nachweis des SNCG-Proteins in Keratinozyten während der Infektion.</i>	106
<i>Abbildung 43: Expressionsmuster von PSCA und KRT13 in epidermalen Keratinozyten im Infektionsverlauf.</i>	107
<i>Abbildung 44: Expressionsmuster von DSC1 in epidermalen Keratinozyten im Infektionsverlauf.</i>	108
<i>Abbildung 45: Quantifizierung der DSC1-Proteinexpression während der Infektion.</i>	109
<i>Abbildung 46: Immunfluoreszenz-Nachweis des DSC1-Proteins in Keratinozyten während der Infektion.</i>	110
<i>Abbildung 47: Expressionsmuster von KRT2 in epidermalen Keratinozyten im Infektionsverlauf.</i>	111
<i>Abbildung 48: Immunfluoreszenz-Nachweis des KRT2-Proteins in epidermalen Keratinozyten.</i>	112
<i>Abbildung 49: Expressionsmuster von PTGS2 und IL24 in epidermalen Keratinozyten im Infektionsverlauf.</i>	113
<i>Abbildung 50: Dosis-Wirkungs-Kurven für die Inhibition von CPXV-Infektionen in 3D- und 2D Kultur von Keratinozyten.</i>	115
<i>Abbildung 51: Nachweis der Infektion und EGFR-Phosphorylierung in infizierten Hautäquivalenten unter Gefitinib-Hemmung.</i>	116
<i>Abbildung 52: Nachweis der Infektion und EGFR-Phosphorylierung in infizierten 2D-Kulturen primärer Keratinozyten unter Gefitinib-Hemmung.</i>	118
<i>Abbildung 53: Nachweis viraler Replikation und Partikel in infizierten Äquivalenten des kommerziellen Epidermismodells EPI-200 (MatTek).</i>	120

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Wichtige Unterschiede und Eigenschaften von 2D- und 3D-Zellkulturen.</i>	1
<i>Tabelle 2: Wichtige Markerproteine der verschiedenen epidermalen Schichten.</i>	6
<i>Tabelle 3: Taxonomische Einteilung und charakteristische Vertreter der Pockenviren.</i>	12
<i>Tabelle 4: Liste der verwendeten Geräte.</i>	24
<i>Tabelle 5: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.</i>	25
<i>Tabelle 6: Liste der verwendeten Reagenzien.</i>	26
<i>Tabelle 7: Liste der verwendeten molekularbiologischen Kits.</i>	28
<i>Tabelle 8: Liste der verwendeten Enzyme.</i>	28
<i>Tabelle 9: Liste der verwendeten Primär-Antikörper.</i>	29
<i>Tabelle 10: Liste der verwendeten Sekundär-Antikörper.</i>	29
<i>Tabelle 11: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen und deren Zusammensetzung.</i>	30
<i>Tabelle 12: Liste der verwendeten Zellen mit zugehörigen Kulturmedien.</i>	30
<i>Tabelle 13: Liste der verwendeten Zellkulturmedien.</i>	31
<i>Tabelle 14: Zusammensetzung des KGM 2 ready Mediums und des Medium für die Airlift Kultivierung der Hautäquivalente.</i>	31
<i>Tabelle 15: Liste der verwendeten Primer und Sonden für qPCRs (humane Gene).</i>	31
<i>Tabelle 16: Liste der verwendeten Primer und Sonden für qPCRs (OPV-spezifische Gene).</i>	32
<i>Tabelle 17: Liste der verwendeten Software.</i>	33
<i>Tabelle 18: Zusammensetzung eines Ansatzes des Mastermixes der cDNA-Synthese.</i>	42
<i>Tabelle 19: Thermoprofil der cDNA-Synthese.</i>	42
<i>Tabelle 20: Reaktionsansatz für eine PCR-Reaktion mit Primern und Sonden.</i>	43
<i>Tabelle 21: Reaktionsansatz für eine PCR-Reaktion mit kommerziellem TaqMan-Assay.</i>	43
<i>Tabelle 22: Thermoprofil der qPCR.</i>	44
<i>Tabelle 23: Liste der mittels NGS-basierter Transkriptomanalyse untersuchten Proben.</i>	84
<i>Tabelle 24: Prozentualer Anteil viraler Reads an der Gesamtanzahl der Reads in den sequenzierten Probenfraktionen.</i>	86
<i>Tabelle 25: Statistische Verteilung regulierter Gene beim Vergleich von 3D-Modell und 2D-Kulturen zu zwei Zeitpunkten.</i>	86
<i>Tabelle 26: Liste überrepräsentierter biologischer Prozesse aus der GO term-Analyse von in 3D hochregulierten Genen (früher Kultivierungszeitpunkt).</i>	87
<i>Tabelle 27: Liste überrepräsentierter biologischer Prozesse aus der GO term-Analyse von in 3D herunterregulierten Genen (früher Kultivierungszeitpunkt).</i>	88
<i>Tabelle 28: Liste differenzierungsassoziierter Gene und deren Regulation zwischen 3D- und 2D-Kulturmodell (früher Zeitpunkt).</i>	89
<i>Tabelle 29: Statistische Verteilung während der Infektion regulierter Gene im 3D-Modell zu zwei Zeitpunkten.</i>	89
<i>Tabelle 30: Liste überrepräsentierter biologischer Prozesse aus der GO term-Analyse von während der Infektion im 3D-Modell hochregulierten, zellulären Genen.</i>	90
<i>Tabelle 31: Liste überrepräsentierter biologischer Prozesse aus der GO term-Analyse von während der Infektion im 3D-Modell herunterregulierten, zellulären Genen.</i>	91
<i>Tabelle 32: Statistische Verteilung regulierter Gene in 2D-Kultur zu vier Zeitpunkten nach Infektion.</i>	91

<i>Tabelle 33: Statistische Verteilung regulierter, viraler Gene beim Vergleich von 3D- und 2D-Modell zu zwei Zeitpunkten.</i>	<i>94</i>
<i>Tabelle 34: Übersicht über die zehn häufigsten viralen Transkripte in Abhängigkeit des Zeitpunktes und Modells.</i>	<i>95</i>
<i>Tabelle 35: Vergleich der genutzten Infektionsmodelle für Kuhpockenviren basierend auf 2D- und 3D-Kultur epidermaler Keratinozyten.</i>	<i>134</i>

Abkürzungsverzeichnis

Gebräuchliche Standardabkürzungen, chemische Formelzeichen und SI-Einheiten sind nicht aufgeführt.

2D	zweidimensionale	EU	Europäische Union
3D	dreidimensionale	EV	<i>extracellular virion</i>
3R	<i>replacement, reduction, refinement</i>	FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
AADAC	Arylamid-Deacetylase	FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Abb.	Abbildung	FDR	<i>false discovery rate</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
ATP	Adenosintriphosphat	FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
B2M	<i>beta 2 microglobulin</i>	FKS	fötales Kälberserum
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>	FLNC	Filamin C
β-ME	beta-Mercaptoethanol	GAG	Glykosaminoglykane
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>	GAPDH	<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
BPE	<i>bovine pituitary extract</i>	GFP	grün fluoreszierendes Protein
BSA	bovines Serumalbumin	GNL	Gelneutralisationslösung
BSS	<i>buffered saline solution</i>	GO	<i>Gene Ontology</i>
CALML5	Calmodulin 5	HÄ	Hautäquivalent
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>	HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>	IC ₅₀	<i>half maximal inhibitory concentration</i>
CEV	<i>cell-associated enveloped virus</i>	ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
CGF	<i>Cowpox virus growth factor</i>	IEV	<i>intracellular enveloped virus</i>
CLS	<i>Cell Lines Service</i>	IFA	<i>immunofluorescence assay</i>
CMC	Carboxy-Methylcellulose	IFN	Interferon
CMLV	<i>Camelpox virus</i>	IgA	Immunglobulin A
COL4A1	<i>collagen IV alpha-1</i>	IGB	Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik
cPARP	<i>cleaved poly ADP-ribose polymerase</i>	IHC	Immunhistochemie
CPE	cytopathischer Effekt	IL	Interleukin
Ct	<i>cycle threshold</i>	IMV	<i>intracellular mature virion</i>
(f) CPXV	<i>(fluorescent) Cowpox virus</i>	inf	infiziert
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>	ITGB1	Integrin beta 1
diff.	differenziert	IV	<i>immature virion</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>	JAK	<i>Janus kinase</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	KGF	<i>keratinocyte growth factor</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>	KGM	<i>keratinocyte growth medium</i>
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat	Ko	Kontrolle
DSC1	Desmocollin 1	KRT	Keratin
DTT	Dithiothreitol	LAMC2	Laminin gamma 2
ECVAM	<i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i>	MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	MEG	<i>maternally expressed gene</i>
EEV	<i>extracellular enveloped virus</i>	MOI	<i>multiplicity of infection</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>	MV	<i>mature virion</i>
(p)EGFR	<i>(phosphorylated) epidermal growth factor receptor</i>	NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
EGR	<i>early growth response</i>	NEAA	<i>non essential amino acids</i>
EM	Elektronenmikroskopie	NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>		

NHDF	normale, humane dermale Fibroblasten	SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
NHEK	normale, humane epidermale Keratinozyten	SNCG	<i>synuclein gamma</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>	SPR	<i>small prolin rich</i>
NR4A1	<i>nuclear receptor subfamily 4 group A member 1</i>	STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
OPV	Orthopockenviren	SV5	<i>simian virus 5</i>
ORF	<i>open reading frame</i>	TBP	<i>TATA-binding protein</i>
QA/QC	<i>quality assurance / quality control</i>	TdT	terminale Desoxynukleotidyl-Transferase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>	TGF	<i>transforming growth factor</i>
PFA	Paraformaldehyd	TNF	Tumornekrosefaktor
PFU	<i>plaque forming units</i>	TUBB3	<i>tubulin beta 3</i>
<i>p.i.</i>	<i>post infectionem</i>	TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
PSCA	<i>prostate stem cell antigen</i>	UV	ultraviolett
PTGS2	<i>prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i>	VACV	Vacciniavirus
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>	VARV	Variolavirus
PVDF	Polyvinylidenfluorid	VIG	Vaccinia-Immunglobulin
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>	VGf	<i>Vaccinia virus growth factor</i>
RIN	<i>RNA integrity number</i>	WB	Western Blot
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>	WGA	<i>wheat germ agglutinin</i>
RKI	Robert Koch-Institut	WHO	<i>World Health Organization</i>
(t/m/r)	<i>(transfer-/messenger-/ribosomal-)</i>	WT	Wildtyp
RNA	<i>ribonucleic acid</i>	WV	<i>wrapped virion</i>
RT	Raumtemperatur	ZBS	Zentrum für Biologische Sicherheit

Zusammenfassung

Heutzutage stehen dreidimensionale Zellkulturmodelle für verschiedenste Anwendungen und Organe, z. B. die Haut, zur Verfügung. Für die Untersuchung viraler Infektionen bietet die Nutzung von 3D-Modellen eine wichtige physiologische Alternative, da die Organoide die Lücke zwischen Studien in klassischer 2D-Zellkultur und im Tiermodell schließen können. Im Rahmen dieser Studie werden die zoonotisch auftretenden Kuhpockenviren, als Vertreter der weitverbreiteten Pockenviren, untersucht. Diese replizieren in der Haut von Patienten und lösen dabei Läsionen aus.

Zum Aufbau des Modells wurde zunächst die Kultivierung differenzierter Hautäquivalente aus primären humanen Keratinozyten und Fibroblasten etabliert. Die Hautäquivalente wurden nach dem Aufbau zur Differenzierung bis zu drei Wochen im *Airlift*-Verfahren kultiviert. Dabei wurden die Proliferation, Apoptose und Zell-Zell-Interaktionen charakterisiert und eine *in vivo*-ähnliche Morphologie und Differenzierung nachgewiesen. Das etablierte 3D-Modell wurde zu einem Infektionsmodell für Kuhpockenviren ausgebaut und zur Untersuchung der viralen Replikation, Virus-Wirts-Interaktionen und zur Testung potenzieller Inhibitoren eingesetzt. Für die Infektion wurden die Äquivalente mit hohen infektiösen Dosen überschichtet und die gebildete Hornschicht mittels Impfnadel verletzt. Die Virusreplikation konnte vor allem in der Epidermis des Äquivalentes und dabei die Primärinfektion hauptsächlich im basalen Bereich nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Infektion in 2D-Kulturen verlief die Replikation langsamer und führte zu geringeren maximalen Virustitern, weil in stark infizierten Äquivalenten noch uninfizierte Bereiche zu finden waren. Darüber hinaus war die Oberflächenstruktur der Virionen in 3D-Kultur gegenüber 2D-Kultur spezifisch modifiziert. Eine Transkriptomanalyse mittels RNA-Sequenzierung lieferte wertvolle, qualitativ hochwertige Daten der Genregulation für kuhpockenvirale Infektionen in 3D-Geweben. So waren insbesondere die Differenzierung, Wundheilung und cytoskelettale Proteine während der Infektion reguliert. Die Regulation konnte für ausgewählte Gene mittels qPCR, Western Blot und immunhistochemischen Analysen verifiziert werden. Dabei konnte insbesondere die Bedeutung des Mikrotubuli-assoziierten Proteins β -3 Tubulin während der Infektion im 3D-Modell belegt werden. Anhand von Dosis-Wirkungs-Kurven konnte die Nutzbarkeit des Modelles für Infektionsstudien dargelegt werden. Dabei zeigte die Infektion im 3D-Modell im Vergleich zum 2D-Modell eine höhere Sensitivität gegenüber dem verwendeten Hemmstoff Gefitinib, welcher sich potenziell auch für eine lokale Anwendung an Patienten im Rahmen eines *Off-Label-Use* eignen könnte.

Das etablierte Infektionsmodell ist so auf verschiedenen Gebieten der Forschung an Kuhpockenviren eine wertvolle, physiologische Ergänzung zu den bestehenden Modellen basierend auf 2D-Zellkultur und Tierversuchen. Das Hautmodell kann in Zukunft auch für andere Viren ein wertvolles Werkzeug zum besseren Verständnis der Pathogenese und zur Entwicklung antiviraler Therapien sein.

Summary

Three-dimensional cell culture models are well-established for different applications and organs, such as human skin. These 3D models can facilitate the examination of viral infections in a more physiological manner, thus bridging the gap between studies in classical 2D culture and animal experiments. Within the scope of this thesis, the zoonotic Cowpox virus was examined, as it replicates in the skin of patients causing characteristic lesions.

To develop the 3D model, cultivation of differentiated skin equivalents composed of primary human keratinocytes and fibroblast was established. For differentiation, equivalents were cultivated in airlift mode for up to three weeks. Proliferation, apoptosis and cell-cell-interaction were characterized. Equivalents showed an *in vivo*-like morphology and differentiation. The established 3D skin model was developed into an infection model for Cowpox virus to examine viral replication, virus-host interactions and potential inhibitors. Infection of equivalents was carried out with high infectious doses via puncturing the outer horny layer with a bifurcated needle to overcome the epidermal barrier. Cowpox virus replication was mainly seen in the epidermal part, whereas primary infection was located in the basal part of the epidermis. Virus replication in 3D was slower compared to 2D culture and yielded less infectious particles due to still remaining uninfected areas in highly infected equivalents. The surface of virus particles was specifically modified in 3D culture. The RNA-Seq-based transcriptome analysis generated high-quality data for examination of the regulation of gene expression by Cowpox virus in this 3D system. Differentiation, wound healing and genes of cytoskeleton proteins were regulated during infection. Gene regulation was confirmed via qPCR analysis, Western Blotting and immunohistochemistry. In particular, the microtubule-associated protein tubulin β -3 was highly regulated during infection especially in skin equivalents. Inhibition studies were carried out with Gefitinib showing higher sensitivity of CPXV infection towards the inhibitor in 3D culture compared to 2D culture. Therefore Gefitinib might be a promising candidate for an off-label use against local CPXV infections in patient skin.

The established infection model has proven to be a valuable, physiological alternative to study Cowpox viruses. This skin model may also be adapted to other viruses to promote the understanding of viral pathogenesis and the development of new antiviral therapies.

1. Einleitung

1.1. Dreidimensionale Zellkultur-Modelle

Dreidimensionale (3D-) Modelle humaner und tierischer Organe und Organsysteme entwickeln sich seit einigen Jahren zu einer Alternative zu klassischen Zellkultursystemen, wie der zweidimensionalen (2D-) Kultivierung von Zellen in Monolayerkultur. Nicht zuletzt durch die Nähe zu natürlichen *in vivo* Gewebestrukturen sind die Versuchszahlen mit dreidimensionalen Modellen exponentiell steigend, was sie zu einem der meistbeachteten neuen Ansätze im Bereich der Biowissenschaften macht [1, 2].

Gegenüber der klassischen, zweidimensionalen Zellkultur auf Kunststoffoberflächen unterscheiden sich die Wachstumsbedingungen und damit einhergehend auch die Biologie und Funktion der Zellen in dreidimensionaler Kultivierung (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Wichtige Unterschiede und Eigenschaften von zweidimensionalen und dreidimensionalen Zellkulturen (adaptiert nach [3])

Kriterium	2D-Kultur	3D-Kultur	Referenz
Zellmorphologie	abgeflachte Zellen, auf Plastikoberfläche ausgebreitet	natürliche Form (oftmals ellipsoid), in Matrix eingelagert	[4-7]
Zell-Zell-Kontakte	Interaktion nur zu wenigen benachbarten Zellen in horizontaler Richtung	physiologische dreidimensionale Interaktionen über spezielle Proteine	[8-10]
Nährstoffversorgung	gleiche Versorgung aller Zellen über Medium mit Nährstoffen	unterschiedliche Verfügbarkeit an Nährstoffen durch veränderte Zugänglichkeit, Ausbildung von Gradienten innerhalb des Modells	[11-13]
Zellstatus	viele Zellen in ähnlichem Status	Zellen in verschiedenen Stadien gleichzeitig vorhanden, wie z. B. proliferierende, ruhende, apoptotische, nekrotische Zellen	[11, 14, 15]
Proliferation	oft schneller als <i>in vivo</i> , u. U. gegenüber Tumoren aber auch eingeschränkt	systemabhängig anders als in 2D, Proliferation kann verstärkt oder reduziert sein	[10, 16, 17]
Genexpression	(teils stark) veränderte Genexpression im Vergleich zur <i>in vivo</i> Situation	Expression stark verändert gegenüber 2D Kulturen, Profile ähnlich der <i>in vivo</i> Situation	[7, 8, 18]
Reaktion auf Stimuli	leicht zugänglich für mechanische Reize und Substanzen, schnelle Reaktion	veränderte Reizaufnahme und Reaktion, höhere Resistenz gegenüber Substanzen	[19-21]
Kultivierungszeit	zellabhängig, bei klassischen Kulturen meistens wenige Tage bis zu einer Woche	längere Kultivierung in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen Zellentstehung und Zelltod möglich	[10, 22]

Schon die morphologische Form unterscheidet sich in beiden Kultursystemen stark. In dreidimensionaler Ausrichtung kultivierte Zellen haben zumeist eine runde bis ellipsoide Form mit 10-30 μm im Durchmesser. Ein Großteil der Zellen hat so vergleichbar zu natürlichen Geweben nur Kontakt zu benachbarten Zellen oder zur extrazellulären Matrix. Im zweidimensionalen, adhärennten Kultursystem sind die Zellen zumeist auf bis zu 3 μm abgeflacht an die Kunststoffoberfläche adhärnt. Somit hat eine Zelle auf jeweils knapp der Hälfte ihrer Fläche Kontakt zu Medium oder der – idealerweise beschichteten – Kunststoffoberfläche und nur zu einem geringen Teil Kontakt zu benachbarten Zellen [5, 23]. Durch diese unterschiedliche Mikroumgebung ist die Nährstoffversorgung in beiden Kulturverfahren ebenso unterschiedlich. Während zweidimensional wachsende Zellen über die gesamte Kultivierungszeit konstant mit den gleichen Mengen an Nährstoffen und Sauerstoff direkt aus dem Medium versorgt werden können, bilden sich durch die veränderte Zugänglichkeit zu Nährstoffen und Sauerstoff in dreidimensionalen Kulturen Gradienten. Diese führen, ähnlich der Situation in Geweben, zu unterschiedlichen Zellstadien und damit oftmals zu unterschiedlichen Zellschichten innerhalb einer Kultur [3, 24]. So können in einer dreidimensionalen Kultur gleichzeitig proliferierende, ruhende, differenzierende und apoptotische Zellen vorhanden sein. Weiterhin kommt es bei längerer Kultivierung zur Ausbildung eines dynamischen Gleichgewichtes zwischen Zellteilung, ruhenden Zellen und Zelltod, was eine Langzeitkultivierung von dreidimensionalen Kulturen in einem *steady state* ermöglicht [22]. Neben Proliferation [16, 17] und spezifischer Differenzierung unterscheidet sich auch die sonstige Genexpression in dreidimensional gewachsenen Zellen deutlich von der in Monolayerkulturen, was bereits mit Transkriptomanalysen mithilfe von Microarrays und RNA-Sequenzierung nachgewiesen werden konnte [18, 25].

Diese Unterschiede beider Kulturformen führen funktional oftmals zu unterschiedlichen Reaktionen auf externe Stimuli. So sind zweidimensional wachsende Zellen oft einfach für mechanische, thermische und chemische Reize und Stimuli zugänglich und zeigen eine schnelle Reaktion. Zellen in dreidimensionaler Kultur haben oftmals eine veränderte Reizaufnahme, was zu einer veränderten Reaktion führt. So konnten zum Beispiel höhere Resistenzen dreidimensional gewachsener Zellen gegen bestimmte Wirkstoffe und UV-Licht gezeigt werden [14, 19].

Aufgrund dieser Vorteile helfen dreidimensionale Kulturverfahren, die *in vivo* Situation besser abzubilden und so die Brücke zwischen klassischer 2D-Zellkultur und *in vivo*-Experimenten zu schließen [8].

Die dreidimensionale Kultivierung weist allerdings zurzeit noch Limitationen auf. So ist die Reproduzierbarkeit eines Ansatzes, durch die zahlreichen Komponenten, Arbeitsschritte und nicht zuletzt durch die Verwendung von *in vivo* gewonnener Matrix, oftmals schlechter als in klassischer 2D-Kultur [10]. Auch die Extraktion der Zellen und ihrer Nukleinsäuren und Proteine aus einem engen Matrixgeflecht stellt eine Herausforderung dar. Für Hochdurchsatzverfahren und die Vergrößerung bzw. Miniaturisierung der Ansätze von 3D-Kulturen sind weitere Forschungsarbeiten nötig [3]. Ebenso ist die Qualitätskontrolle von z. B. Vitalparametern oder per *Live-Cell*-Mikroskopie aufgrund von Matrixeffekten mit höherem Aufwand und Kosten verbunden und oftmals noch nicht so gut etabliert, wie bei 2D-Kulturen [26, 27].

Nichtsdestotrotz hat sich die Verwendung von 3D-Modellen, aufgrund der realitätsgetreuen Nachbildung der Physiologie von Organen und Geweben, in den letzten Jahren mehr und mehr in der Grundlagenforschung und Industrie etabliert.

So gibt es eine Vielzahl verschiedener Ansätze der dreidimensionalen Kultivierung für verschiedene Anwendungen. Als einfache 3D-Modelle können Sphäroide durch Kondensation von Zellen in speziellen adhäsionsverhindernden Platten, in Kultur am hängenden Tropfen oder in rotierenden Gefäßen gewonnen werden [28, 29]. Matrixbasierte Modelle ermöglichen Wachstum und Differenzierung der Zellen, z. B. auf künstlichen Keramikoberflächen oder biologischen Matrixkomponenten wie Kollagen oder Alginate [30-32]. So können Organoide aufgebaut werden, die die *in vivo*-Situation gut nachbilden. Auch die Kultivierung von *in vivo*-Explantaten ist heutzutage möglich [33, 34]. Verschiedene Organoide können in miniaturisierter Form auf einem Chip verbunden werden, wodurch ein Austausch von Nährstoffen und eine Kommunikation zwischen den Zellen wie in einem Organismus ermöglicht werden [35, 36].

Dreidimensionale Modelle wurden mittlerweile für diverse humane Organe etabliert, so z. B. für Leber, Lunge, Niere, Knochen, Herz, Gehirn und die Haut [37-43]. Damit ist es unter anderem möglich, Fragestellungen der Toxikologie, Umweltmedizin, Lebensmittelsicherheit, Infektionsbiologie und Pharmakologie zu bearbeiten.

Vor der Kommerzialisierung neuer pharmazeutischer und kosmetischer Produkte ist heutzutage oftmals eine Reihe von Tests von Nöten, um Reaktionen von Zellen auf bestimmte Substanzen zu ermitteln und um deren Auswirkungen auf den menschlichen Organismus abzuschätzen. Toxizitätsnachweise werden beispielsweise nach *in vitro* Vorversuchen in 2D-Kultur durch intensive Laborversuche mit Tieren geführt, was aus ethischen Gründen und unter Tierschutzaspekten ein Problem darstellt. Beispielsweise ist in der EU für die Testung von Kosmetika die Durchführung von Tierversuchen ebenso verboten wie der Vertrieb tierversuchsgetesteter Kosmetika [44].

Gesetzliche Regularien und das Wachstum des biotechnologisch-medizinischen Sektors führten in den letzten Jahren zu wachsenden Tierversuchszahlen [45, 46]. Dreidimensionale Modelle stellen auf diesem Gebiet eine wertvolle Methode dar, um trotz ansteigendem Bedarf an Experimenten zu aussagekräftigen Daten zu gelangen [45]. Damit wären auch die von Russell und Burch bereits 1959 als 3R („*Replacement, Reduction, Refinement*“)-Regel postulierten Prinzipien zum ethisch korrekten Umgang mit Tierversuchen zu erfüllen [47]. 3D-Modelle könnten somit einen wichtigen Beitrag zur Minimierung der Anzahl an Tierversuchen und zur Verbesserung der Methoden leisten und auf bestimmten Gebieten Tierversuche ersetzen.

Auf dem Gebiet der Infektionsforschung können 3D-Modelle wichtige Ergebnisse liefern, um die Pathogenese und Pathogen-Wirts-Interaktionen sowie die Wirksamkeit und Wirkungsweise von Antinfektiva in einem physiologischen System zu untersuchen, ohne Tierversuche durchzuführen [48-50].

1.2. Dreidimensionales Hautmodell

Eines der speziellen Organe, welche durch die besondere Morphologie und Unterteilung in verschiedene Schichten im Besonderen eine physiologische Nachbildung in dreidimensionalen Modellen zur Durchführung aussagekräftiger Experimente erfordern, ist die humane Haut.

1.2.1. Physiologie der humanen Haut

Die Haut ist ein multifunktionelles Organ und bildet die Abgrenzung des menschlichen Körpers nach außen. Zu den Hauptfunktionen zählen die Reizaufnahme, der Stoffaustausch, die Synthese von Lipiden, Proteinen, Signalmolekülen und Vitamin D, die Regulierung des Wärmehaushaltes und der Schutz des Körpers [51].

Die Haut stellt dabei eine äußerst effektive Barriere- und Schutzschicht gegen physikalische, chemische und auch biologische Einflüsse dar [52]. So dient die komplexe Morphologie mit verschiedensten Zellen sowohl dem Fernhalten von Mikroorganismen und dem Verhindern von Infektionen als auch der Erkennung und Bekämpfung von eingedrungenen Pathogenen mittels Immunzellen [53]. Schädigungen der Haut durch Verletzungen oder genetische Defekte können zu Problemen bei der Pathogenabwehr führen und den Organismus damit belasten.

Um die lebensnotwendigen Funktionen gewährleisten zu können, gliedert sich die Haut in drei unterschiedliche Schichten mit unterschiedlichen Funktionalitäten: die Oberhaut (Epidermis), die Lederhaut (Dermis) und die Unterhaut (Subcutis).

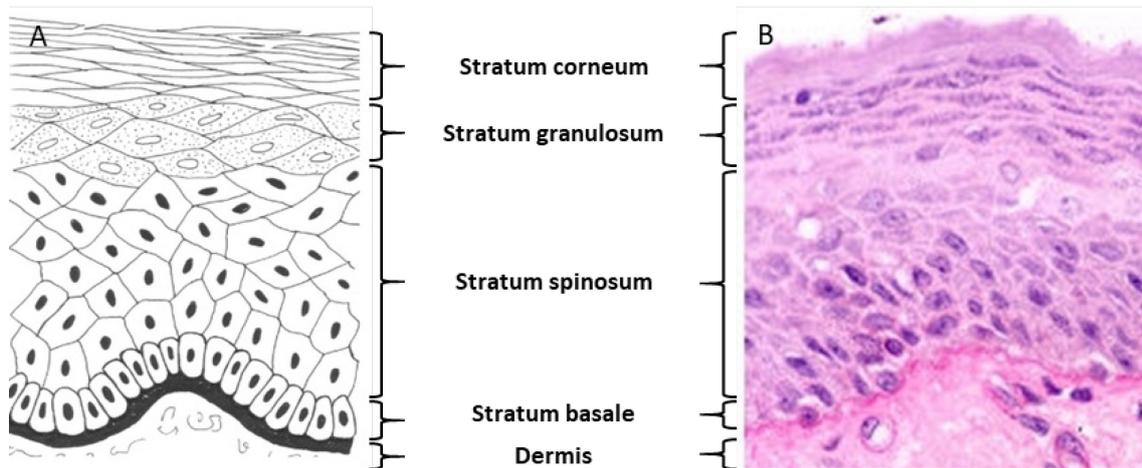


Abbildung 1: Struktur der humanen Epidermis. A: schematische Darstellung der Keratinozytenmorphologie der Epidermis in den verschiedenen Schichten (nach [54]). B: lichtmikroskopische Aufnahme eines Dünnschichtpräparates eines humanen Hautbiopsates (nach [55]). In apikale Richtung ist eine mit der Differenzierung der Keratinozyten einhergehende Morphologieveränderung zu langgestreckten Zellen zu sehen, welche schlussendlich die Hornschicht bilden.

Die Epidermis ist ein Epithelgewebe, welches hauptsächlich aus Keratinozyten und Melanozyten besteht und je nach Körperstelle unterschiedliche Dicken annehmen kann [56]. Neben Keratinozyten und Melanozyten enthält die Epidermis spezielle Sinneszellen für Berührungsreize (Merkel-Zellen) und verschiedene Immunzellen (z. B. Langerhans-Zellen). Die Epidermis gliedert sich in verschiedene Schichten, welche durch Keratinozyten in verschiedenen Morphologien und Differenzierungsstadien charakterisiert werden (siehe Abbildung 1) [54, 57]. Die innerste Basalzellschicht (*Stratum basale*) beheimatet eine bis drei Schichten proliferationskompetenter Keratinozyten und Progenitor-Zellen, welche die oberen Epidermisschichten bei Verletzungen oder Verbrennungen regenerieren können [58]. Außerdem enthält das *Stratum basale* die Merkel-Zellen und die pigmentbildenden Melanozyten, welche essentiell für den Schutz vor UV-Strahlung sind. Die basal eher vertikal ausgedehnten und ausgerichteten Keratinozyten differenzieren in apikale Richtung aus und bilden so die übrigen Epidermisschichten aus. Die basalen Keratinozyten sind über Hemidesmosomen und andere Zell-Matrix-Interaktionen fest in der darunterliegenden Basallamina verankert und können z. B. über Signalmoleküle mit den unterliegenden Fibroblasten wechselwirken [59].

Über der Basalzellschicht liegt die sogenannte Stachelzellschicht (*Stratum spinosum*). Diese wird durch kompakte, rundliche Keratinozyten mit langen Ausläufern für starke Zell-Zell-Kontakte gebildet. Diese, aus zellulären Keratin-Filamenten aufgebauten Desmosomen sind entscheidend für die mechanische Widerstandsfähigkeit der Haut und je nach mechanischer Belastung unterschiedlich stark ausgebildet [60]. Im *Stratum spinosum* sind darüber hinaus Langerhanssche Immunzellen und Makrophagen zu finden. Diese haben eine wichtige Funktion bei der Abwehr von eindringenden Pathogenen, indem sie die Pathogene initial erkennen und die Abwehr durch die angeborene Immunantwort auslösen [61].

Die „Körnerzellschicht“ (*Stratum granulosum*) ist durch eine weitere Differenzierung der Keratinozyten und morphologische Veränderungen gekennzeichnet. Die Zellen besitzen eine horizontal ausgestreckte, abgeflachte Form und bilden sogenannte Keratingranula aus. Außerdem werden verschiedene Proteine und Lipide als lamellare Granula in den extrazellulären Raum sezerniert. Diese bilden eine hydrophobe Barriere und bedingen so die Schutzfunktion der Haut [52].

Mit fortschreitender Differenzierung verlieren die Keratinozyten über Endonukleasen ihre Zellkerne und die meisten Zellorganellen und bilden als leblose, verhornte Korneozyten die Hornschicht (*Stratum corneum*). Diese kann, je nach mechanischer Belastung und Hautareal, unterschiedliche Dicken von bis zu 30 Zellschichten erreichen. Das hauptsächlich aus Keratinen und aus, bei der Spaltung von Profilaggrin entstehenden Aminosäuren, bestehende Netzwerk bietet über die Einlagerung verschiedener Lipide einen effektiven Verdunstungsschutz [62]. In apikale Richtung lösen sich die Zell-Zell-Interaktionen, die Corneodesmosomen, langsam auf. Über den Einschluss von Luft erfolgt schlussendlich die Desquamation oder Ablösung der Zellen im *Stratum disjunctum*, dem apikalen Abschluss des Organs.

Die Differenzierung und schlussendliche Stratifizierung der Zellen der Epidermis ist eine Form des programmierten Zelltodes und dabei von der Apoptose abzugrenzen, von der sie sich morphologisch und biochemisch unterscheidet [63]. Unter anderem werden die zellulären Proteine im Unterschied zur Apoptose nicht phagozytiert, sondern bilden kondensiert die Hornschicht aus. Auch normale Apoptose kann in Reaktion auf Stimuli in der Epidermis ablaufen, allerdings ist diese zumeist auf die Zellen des *Stratum basale* fokussiert [64].

Die epidermalen Schichten können in Schnittpräparaten über die Expression verschiedener Marker identifiziert und charakterisiert werden (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Wichtige Markerproteine der verschiedenen epidermalen Schichten (nach [64, 65])

Schicht	Markerprotein
<i>Stratum corneum</i>	reifes Filaggrin, Loricrin, Trichohyalin, S100A Proteine, SPR-Proteine, Involucrin
<i>Stratum granulosum</i>	Keratine 1; 2; 10, Profilaggrin, Involucrin, Transglutaminase 3, Desmocollin 1
<i>Stratum spinosum</i>	Keratin 10, Transglutaminasen 1; 5
<i>Stratum basale</i>	Keratine 5; 14; 15, Ki-67

Dabei hat jede Zellschicht spezifische Keratine, die wichtige Funktionen beim Aufbau des Cytoskeletts aber auch in der Modulation von Signalwegen und Proteinbiosynthese übernehmen [66]. So bilden Keratine charakteristische Heterodimere aus jeweils einem sauren Typ-I Keratin (KRT 9-20) und einem neutral-basischem Typ-II Keratin (KRT 1-8) [67, 68].

Im *Stratum basale* ist dabei die Paarung KRT14/ KRT5 charakteristisch, während in den suprabasalen Schichten die Paarung KRT10/ KRT1 vorherrscht. Zum Nachweis proliferierender Zellen im *Stratum basale* eignet sich der im Kern lokalisierte Marker Ki-67, wobei im basalen Bereich unter 20 % der Zellen normaler Haut Ki-67 positiv sind [69].

Transglutaminasen sind spezifische, calcium-abhängige Enzyme, welche Querverbindungen zwischen Proteinen herstellen und damit entscheidend am Aufbau der Hornschicht beteiligt sind [70]. Zu den quervernetzten Proteinen gehört unter anderem auch Involucrin. Dieses wird in suprabasalen Zellen beginnend im *Stratum spinosum* exprimiert. Die höchsten Involucrin-Mengen treten im *Stratum granulosum* und nach Quervernetzung mit anderen Proteinen, wie z. B. Loricrin und SPR-Proteinen, im *Stratum corneum* auf [64]. Filaggrin ist ebenso ein Marker für epidermale Differenzierung im finalen Stadium. Es wird als Vorform Pro-Filaggrin im *Stratum granulosum* synthetisiert und in Keratohyalingranula eingelagert. Während der terminalen Differenzierung zur Hornschicht wird das Pro-Filaggrin dephosphoryliert und proteolysiert, sodass reife Filaggrinmonomere entstehen, welche die Aggregation freier Keratinfilamente zu Makrofibrillen der Hornschicht ermöglichen [65].

Die Erneuerung der Epidermis und das Durchlaufen der kompletten Differenzierungsstadien normaler epidermaler Keratinozyten dauert *in vivo* etwa zwei bis vier Wochen [71-73]. Die Homöostase der Haut wird durch die epidermalen Stamm- und Progenitorzellen garantiert. Dabei unterscheidet man verschiedene Typen, welche in verschiedenen Stammzellnischen ansässig sind, z. B. im *Stratum basale* mit Kontakt zu Basallamina oder im Haarfollikel [58, 74, 75]. Hierbei sind verschiedene Modelle zur Teilung der proliferierenden Progenitor-Zellen im *Stratum basale* in der Diskussion, wobei schlussendlich durch Teilungen aus den Progenitor-Zellen differenzierungskompetente Keratinozyten entstehen, welche sich aus der Stammzellnische entfernen und die weitere Differenzierung durchlaufen [75]. Hierbei stellen freie Calcium-Ionen neben anderen Faktoren einen wichtigen Stimulus dar, welcher über verschiedene Mechanismen, wie z. B. der Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Proteasen, zur Differenzierung führt. Über den Querschnitt der Epidermis bildet sich hierbei ein Calcium-Gradient aus, wobei die Calcium-Konzentration vom *Stratum basale* über das *Stratum spinosum* bis zum *Stratum granulosum* ansteigt und dann im *Stratum corneum* wieder absinkt [76-78]. *In vitro*-Experimente zeigen, dass eine hohe Calciumkonzentration über 0,1 mM die Differenzierung und Verhornung von primären Keratinozyten und auch von Keratinozytenzelllinien vorantreibt [78, 79]. Weitere wichtige Faktoren der epidermalen Differenzierung sind Retinoide, Hydrocortison und Wachstumsfaktoren wie EGF, FGF7 oder verschiedene BMPs [80-84]. Dermale Fibroblasten spielen über die Sekretion von Signalmolekülen ebenso eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der Keratinozyten [85].

Unterhalb der Epidermis befindet sich die Basallamina als wichtige Abgrenzung zwischen Epidermis und Dermis. Hierbei handelt es sich um eine spezielle extrazelluläre Matrix, welche von den Epithelzellen und Fibroblasten aufgebaut wird [86]. Die Basallamina sorgt für Stabilität und Integrität des Gewebes und ermöglicht Stoffwechsel und Signalübertragung. Über sogenannte Hemidesmosomen sind basale Keratinozyten und Progenitor-Zellen in der Basallamina verankert und behalten so ihren wichtigen Status, um die weiteren Schichten über Differenzierung zu erneuern [75]. Die Basallamina besteht hauptsächlich aus vernetzten Proteinen wie Kollagen-IV, Lamininen und Nidogenen. Spezielle Glykoproteine der Basallamina wie Fibronectin und Perlecan dienen dabei als Strukturproteine, indem sie über weitere Proteine auch Kontakte zu Zellen der Dermis und Epidermis herstellen [87, 88].

Die unterliegende Dermis oder Lederhaut ist weniger vielschichtig aufgebaut als die Epidermis. Sie besteht hauptsächlich aus Kollagenfasern (80-90 % davon Kollagen-I) und elastischen Fasern, welche von Fibroblasten gebildet werden. Die Fibroblasten befinden sich als lose Einzelzellen inmitten von sezernierter, vernetzter extrazellulärer Matrix. Das eher lose zusammengesetzte *Stratum papillare* bildet die Grenze zur Epidermis, während vor allem die fester zusammengesetzte Netzschrift (*Stratum reticulare*) die Reißfestigkeit und Straffheit der Haut garantiert. Außerdem ist die Dermis mit Kapillaren durchzogen, welche die Blut- und damit Nährstoffversorgung auch für die Epidermis garantieren. Weiterhin finden sich in der Dermis Nervenendungen, Haarfollikel und verschiedenste Immunzellen wie Makrophagen, Mastzellen und Lymphozyten [54, 89].

Als Verbindungsschicht zu den proximalen Strukturen (z. B. der Knochenhaut) schließt die Unterhaut (*Subcutis* oder Hypodermis) an die Dermis an. Die Binde- und Fettgewebsschicht bildet die Auflage der übrigen Hautschichten und enthält neben dem Energiespeicher Fett auch Sinneszellen und Nervenstränge.

1.2.2. Dreidimensionale Modelle der humanen Haut

Für Untersuchungen spezifischer Fragestellungen rund um humane Haut stehen heutzutage verschiedene Modelle zur Verfügung, welche im Laufe der letzten dreißig Jahre etabliert und charakterisiert worden sind [90]. Dabei kann grob zwischen *in vitro* generierten Modellen und Explantaten von humanen Spendern unterschieden werden. Explantate werden dabei zumeist aus Vorhaut oder Bauchhaut der Spender gewonnen, welche in Zellkultur an der Grenzschicht zwischen Medium und umgebender Luft kultiviert werden. Explantate haben den Vorteil, dass sie durch die Entnahme aus Patienten die natürliche Morphologie und alle relevanten Zelltypen besitzen, da sie *in vivo* differenziert worden sind.

Die Nachteile der Explantate bestehen in der Verfügbarkeit von Spendern, der schlechteren Modifizierbarkeit des Aufbaus gegenüber *in vitro* generierten Modellen, spenderabhängigen Unterschieden und einer zumeist verkürzten Kultivierungszeit. Diese kann durch spezielle Kulturverfahren mittlerweile jedoch auf bis zu zweieinhalb Monate verlängert werden [34].

Unter den *in vitro* Hautmodellen wird zwischen Modellen, welche nur die Epidermis abbilden, und Modellen, welche die volle Dicke (*full-thickness*) aus Epidermis und Dermis abbilden, unterschieden. Als epidermale Modelle sind so z. B. EpiDerm™ (MatTek, Ashland, USA), SkinEthic™ (SkinEthic Laboratories, Lyon, FR) und epiCS (CellSystems, Troisdorf, D) kommerziell erhältlich. Als *full-thickness*-Modelle sind z. B. EpiDerm FT™ (MatTek, Ashland, USA) und Phenion® FT (Henkel, Düsseldorf, D) kommerziell verfügbar [90]. Die genannten Modelle sind aus primären Keratinozyten bzw. Keratinozyten und Fibroblasten in Matrix (*full-thickness*) aufgebaut und können relativ einfach in Zellkultureinsätzen mit semipermeablen Membranen in normalen Kulturplatten kultiviert werden. Die Inkorporation weiterer Zelltypen in die Modelle ist möglich und wurde bereits für dendritische Zellen [91, 92], Makrophagen [93] und Melanozyten [94] erfolgreich gezeigt. Über die Inkorporation von Endothelzellen in die Dermis des Äquivalentes ist sogar eine Vaskularisierung möglich [95, 96].

Aufgrund der hohen Komplexität und Diversität der Modelle ergeben sich verschiedenste Anwendungsgebiete, sowohl für die hautassoziierte Grundlagen- als auch für die angewandte Forschung. So lassen sich beispielsweise die epidermale Differenzierung und daran beteiligte Faktoren durch die Nutzung von Hautmodellen untersuchen. Dabei konnte beispielweise unter Nutzung von Hautäquivalenten gezeigt werden, dass Histamin als Entzündungsmediator eine normale Differenzierung von Keratinozyten und damit die Ausbildung einer intakten Hornschicht hemmen kann [97]. Weiterhin finden Hautmodelle in der Wirksamkeits- und Toxizitätstestung verschiedenster Pharmazeutika und Kosmetika breite Anwendung und stellen hier eine alternative Testmethode zu den etablierten Methoden (z. B. auf Basis von Tierversuchen) dar. Es wurden dabei verschiedene hautäquivalentbasierte Tests zur Untersuchung von Ätz- und Reizwirkungen chemischer Substanzen in Hautmodellen entwickelt und gemäß ECVAM Regularien validiert [98-100]. Ein weiteres Forschungsgebiet in der Wirkstofftestung stellt die Verabreichungsform der Arzneimittel und damit verbunden die Aufnahme in die Haut dar [101]. Mit dreidimensionalen Hautmodellen konnte dabei die Art der Applikation (z. B. transdermal) und die Penetration der Haut durch Wirkstoffe getestet werden [102]. In diesem Zusammenhang sind biomedizinische Hilfsmittel wie Nanopartikel auf ihre Hautpenetrationsfähigkeit untersucht worden [103, 104]. Ein weiteres Einsatzgebiet ist die Tumorforschung. Durch die Besiedlung von Hautmodellen mit Tumorzellen konnten spezifische Tumormodelle für weitere Charakterisierungen und die spätere Entwicklung von Therapieansätzen generiert werden, wie am Beispiel vom Plattenepithelzellkarzinom gezeigt werden konnte [105].

Auch auf dem Gebiet der Wundheilungsforschung bieten humane Hautmodelle ein neues Werkzeug, welches zum besseren Verständnis der Wundheilung und zur Entwicklung neuer Wundheilungstherapien beitragen kann [106]. Schlussendlich wird mithilfe von *in vitro* generierten Hautmodellen auch an einem verbesserten Gewebeersatz für Transplantationen gearbeitet, welcher bei schweren Hautschädigungen in Zukunft zum Einsatz kommen könnte [107].

In der vorgelegten Arbeit wurde hauptsächlich mit einem Hautmodell gearbeitet, welches von Frau Prof. Dr. Heike Walles am Fraunhofer-Institut für Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik etabliert wurde [55]. Dieses Hautmodell bildet die humane *Cutis*, also die Oberhaut aus Dermis und Epidermis, ab und stellt damit ein sogenanntes *full-thickness*-Modell dar. Weiterhin enthält es mit den Fibroblasten der Dermis und den Keratinozyten der Epidermis die zwei Hauptzelltypen der jeweiligen Schichten. Melanozyten, Immunzellen oder Endothelzellen für eine Vaskularisierung sind im genutzten Modell nicht vorhanden. Ebenso fehlen Haarfollikel, welche *in natura* unter anderem auch eine Stammzellnische für epidermale Zellen bilden [74].

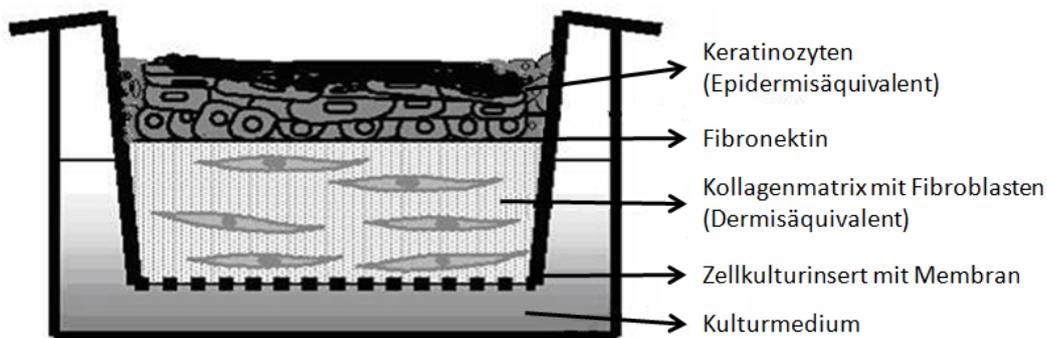


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des humanen Hautmodells in Kulturmodus (Grafik nach [108])

Der schematische Aufbau eines Hautäquivalentes während der Kultivierung ist in Abbildung 2 gezeigt. Die Kultivierung erfolgt in Zellkultureinsätzen mit einer semipermeablen Membran (Porendurchmesser $3\ \mu\text{m}$) an der Unterseite für die Nährstoffversorgung auf $0,47\ \text{cm}^2$ Kultivierungsfläche. Auf dieser Membran im Einsatz erfolgt der schrittweise Aufbau des Äquivalentes. Das untenliegende Dermisäquivalent des Modells wird durch Gelierung einer Kollagen-I-Matrix mit Fibroblasten gewonnen. Kollagen-I wird dabei aus Rattenschwänzen aufgearbeitet. Es ist leicht zu isolieren und kostengünstiger als humanes Kollagen I. Zur Quervernetzung dient wie *in vivo* das Glykosaminoglykan Chondroitin-Sulfat, welches essentiell an der Strukturbildung der extrazellulären Matrix der Dermis beteiligt ist. Darüber hinaus besitzt es eine hohe Wasserbindungskapazität und kann zusammen mit anderen Glykosaminoglykanen inflammatorische Prozesse beeinflussen [109-111]. Eine Schichtung der Dermis in *Stratum reticulare* und *Stratum papillare* wird bei der Herstellung nicht vorgenommen.

Die Abgrenzung der Dermis von der oberhalb liegenden Epidermis wird durch eine Fibronektinschicht realisiert. Diese Schicht übernimmt beim initialen Aufbau die Funktion der Basallamina in natürlicher Haut. Das Glykoprotein Fibronektin vernetzt Kollagenfibrillen der Matrix mit anderen extrazellulären Matrixbestandteilen und zellulären Oberflächen-Liganden wie Integrinen, weshalb dem Protein auch eine wichtige Rolle in Wundheilung und bei viralen Infektionen zukommt [112, 113]. Wichtige Komponenten der komplexen Basallamina wie Kollagen-IV werden im Modell nicht zugesetzt, sodass keine derart starke Abgrenzung beider Hautschichten wie *in vivo* besteht.

Auf der Fibronektinschicht befinden sich primäre Keratinozyten, welche als einziger Zelltyp die Epidermis des Modells aufbauen. Im Laufe der Kultivierung an der Phasengrenze zur umgebenen Luft („*Airlift*-Kultivierung“) unter erhöhtem Ca^{2+} -Gehalt bilden diese Keratinozyten eine ähnliche Schichtung aus, wie *in vivo* entnommene Epidermis (Abbildung 3).

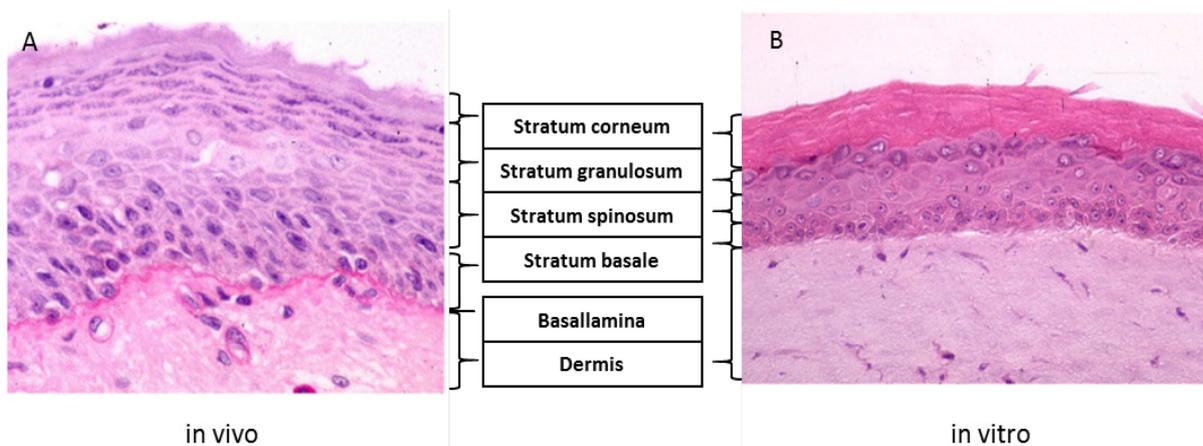


Abbildung 3: Vergleich histologisch geschnittener, gefärbter Präparate. A: humane Haut, B: benutztes Hautmodell (nach [55])

Basal in der Epidermis sind im Modell (B), ähnlich der humanen Haut (A), rundliche bis kubische Zellen zu erkennen, welche den Zellen des *Stratum basale* bzw. mit wachsender Vernetzung in apikale Richtung den des *Stratum spinosum* entsprechen. Oberhalb schließen sich abflachende Zellen mit dichten Keratohyalin granula an, die dem *Stratum granulosum* der Epidermis entsprechen. Die Granularität und Abflachung dieser Zellen sind dabei nicht so stark ausgeprägt, wie in *in vivo* Haut. Dies ist unter anderem auf die geringere mechanische Beanspruchung und die leicht veränderten Differenzierungssignale aufgrund der anderen Zusammensetzung zurückzuführen. Im apikalen Bereich an der Grenze zur Umgebung ist im Modell ebenso wie in der Haut eine Verdichtung von Keratinozyten zu einer geschlossenen, teils verhornenden Schicht zu beobachten.

Das genutzte Hautmodell wurde für verschiedene Anwendungen entwickelt, so zum Beispiel als *in vitro* Tumormodell, für Toxizitätstests, für Penetrationsstudien verschiedener Substanzen und als Modell zur Untersuchung der Wundheilung.

Infektionsstudien wurden mit der fakultativ pathogenen Hefe *Candida albicans* durchgeführt [55].

Für eine Vergleichsstudie wurde das kommerziell erhältliche Modell EpiDerm (EPI-200) der Firma MatTek verwendet. Dieses Modell bildet nur die humane Epidermis ab. Es wird ohne Dermis in einem Zellkultureinsatz kultiviert und bildet dabei eine ähnliche Morphologie aus wie die Epidermis humaner Haut. Das Modell EpiDerm wurde primär zur Untersuchung des Korrosions- und Reizungspotenzials von chemischen Substanzen entwickelt und dafür auch gemäß ECVAM-Regularien validiert [99, 100]. Des Weiteren findet das Modell Anwendung in der Untersuchung von hydratisierenden Cremes, epidermal applizierten Substanzen sowie für Phototoxizitätsstudien. Infektionsstudien in diesem Modell wurden mit verschiedenen Dermatophyten der Gattungen *Trichophyton* und *Microsporum* durchgeführt [114].

1.3. Orthopockenviren

1.3.1. Struktur, Morphologie und Genomorganisation

Die Familie der Pockenviren oder *Poxviridae* umfasst zwei Unterfamilien von behüllten DNA-Viren mit insgesamt 69 Spezies (laut ICTV, Stand 2016) [115, 116].

Tabelle 3 zeigt die taxonomische Einordnung und wichtige Vertreter der Pockenviren.

Während die *Entomopoxvirinae* Insekten wie Käfer und Dipteren infizieren, sind *Chordopoxvirinae* die Pocken der Wirbeltiere. Diese Unterfamilie umfasst neben tierpathogenen Genera wie *Suipoxvirus*, *Avipoxvirus* oder *Capripoxvirus* auch humanpathogene Genera wie *Para-*, *Mollusci* oder *Yatapoxvirus*.

Tabelle 3: Taxonomische Einteilung und charakteristische Vertreter der Pockenviren (nach [117, 118])

Unterfamilie	Genus	Beispiel-Spezies	Human-pathogen
Chordopoxvirinae	<i>Orthopoxvirus</i>	<i>Variola-</i> , <i>Vaccinia-</i> , <i>Affenpocken-</i> , <i>Kamelpocken-*</i> , <i>Kuhpockenvirus</i>	ja
		<i>Ektromelievirus</i>	nein
	<i>Parapoxvirus</i>	<i>Orf-</i> , <i>Pseudokuhpockenvirus</i>	ja
	<i>Molluscipoxvirus</i>	<i>Molluscum-contagiosum-Virus</i>	ja
	<i>Yatapoxvirus</i>	<i>Tanapocken-</i> , <i>Yabapockenvirus</i>	ja
	<i>Avipoxvirus</i>	<i>Hühnerpocken-</i> , <i>Taubenpockenvirus</i>	nein
	<i>Capripoxvirus</i>	<i>Schafpockenvirus</i>	nein
	<i>Leporipoxvirus</i>	<i>Myxomatosevirus</i>	nein
	<i>Suipoxvirus</i>	<i>Schweinepockenvirus</i>	nein
	<i>Crocodylidpoxvirus</i>	<i>Krokodilpockenvirus</i>	nein
	<i>Cervidpoxvirus</i>	<i>Maultierhirschpockenvirus</i>	nein
	<i>Nicht zugeordnet</i>	<i>Eichhörnchenpockenvirus</i>	nein
Entomopoxvirinae	<i>Entomopoxvirus</i> (α , β , γ)	<i>Amsacta moorei</i> <i>Entomopoxvirus</i>	nein

* Zuordnung des Kamelpockenvirus zu zoonotischen, humanpathogenen Vertretern nach [119]

Das Genus *Orthopoxvirus* umfasst mit dem ausgerotteten Variolavirus, aber auch dem Affenpocken-, dem Vaccinia- und dem Kuhpockenvirus jene Pockenviren mit der höchsten Relevanz für die menschliche Gesundheit. Das Variolavirus und das Molluscum-contagiosum-Virus sind dabei humanspezifische Pockenviren, während die weiteren humanpathogenen Vertreter, wie z. B. das in dieser Arbeit untersuchte Kuhpockenvirus, zoonotische Viren mit einem Reservoir in anderen Säugetieren darstellen [117, 120-122].

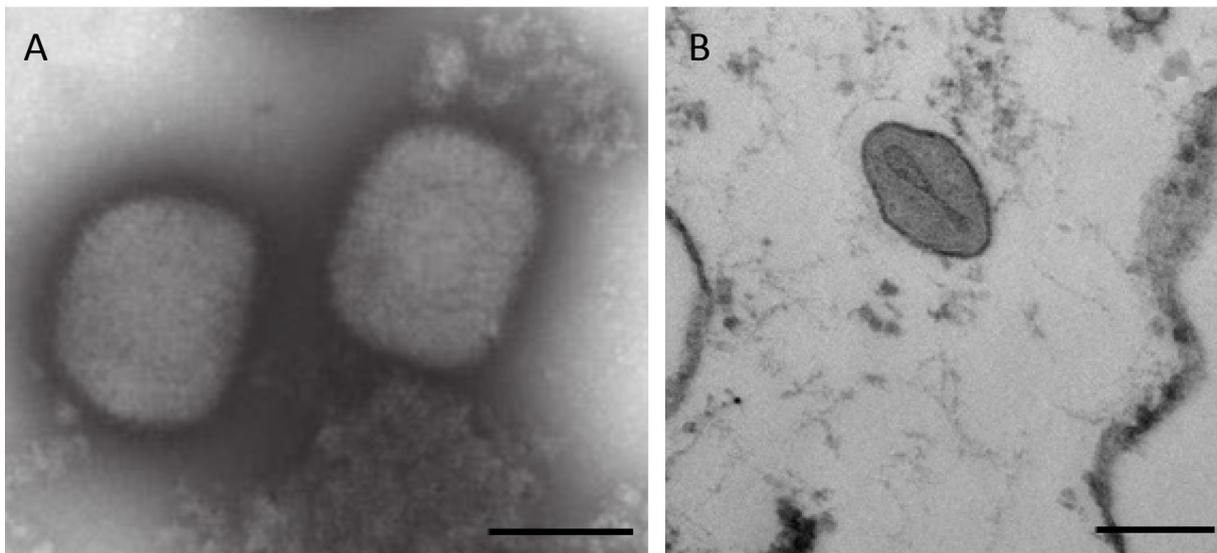


Abbildung 4: Morphologie von orthopockenviralen Partikeln in elektronenmikroskopischen Aufnahmen: A: Aufnahme von VACV mit Negativ-Kontrastierung nach [123]; B: Dünnschnittpräparat des verwendeten CPXV-Isolates dieser Arbeit (Anfertigung durch Gudrun Holland); Maßstabsbalken \cong 200 nm

Alle Pockenviren sind durch eine ovale bis backsteinartige Morphologie charakterisiert (Abbildung 4A) und gehören mit Abmessungen von im Mittel 300 nm Länge und 200 nm Durchmesser zu den größten bekannten Viren, die damit sogar lichtmikroskopisch sichtbar sind [124]. Das lineare, doppelsträngige DNA-Genom befindet sich S-förmig angeordnet und von Enzymen und anderen Proteinen umgeben im hantelförmigen *Viruscore* (Abbildung 4B). Je nach Vertreter besitzt das Genom eine Länge zwischen 130 und 300 kbp, wobei es dabei für 130 bis 260 verschiedene offene Leserahmen (ORFs) auf beiden Strängen codiert [125]. Im zentralen Bereich des Genoms finden sich hochkonservierte Bereiche, deren Gene für essentielle Proteine der Virusreplikation, Assemblierung und Reifung kodieren. Dagegen finden sich in den terminalen Bereichen des Genoms vor allem Gene mit Assoziation zum Wirtstropismus und zur Immunmodulation, welche zur Replikation *in vitro* oftmals nicht essentiell sind [126, 127]. Begrenzt wird das Genom durch sich wiederholende, kurze DNA-Sequenzen, sogenannte *inverted terminal repeats*, welche über die Ausbildung von Haarnadelschleifen die DNA-Stränge kovalent verknüpfen. Die pockenvirale DNA enthält keine Intronsequenzen, weshalb die transkribierte mRNA nicht prozessiert werden muss.

Einzelne Gene werden durch kurze, nicht-kodierende DNA-Sequenzen voneinander getrennt und überlappen in der Regel nicht [120, 128].

Die Replikation von Pockenviren findet mit Hilfe der eigens codierten Proteine des Replikationsapparates im Cytoplasma statt [129]. Im Verlauf der Replikation bilden sich hierbei abgegrenzte Bereiche, sogenannte Virusfabriken, in der Zelle aus.

Eine weitere Besonderheit der Pockenviren sind die unterschiedlichen Formen, welche im Verlauf der Infektion gebildet werden können [118, 130, 131]. Das voll-infektiöse *Mature Virion* (MV) verfügt über eine einfache Lipiddoppelschicht mit eingelagerten Proteinen, welche das *Viruscore* inklusive der zwei flankierenden Lateralkörper umgibt. Das, ebenso intrazellulär, aus dem MV gebildete *Wrapped Virion* (WV auch *Intracellular Enveloped Virus*, IEV) ist dagegen von zwei zusätzlichen Membranen umhüllt, welche von endosomalen Cisternae oder trans-Golgi Membranen stammen. Die extrazellulären Virionen (EVs) hingegen entstehen nach Exocytose durch Fusion der Membranen von Zelle und WV und können entweder membranassoziiert und damit zellgebunden (*Cell-associated Enveloped Virus*, CEV) oder als freies Virion (*Extracellular Enveloped Virus*, EEV) vorliegen.

EVs machen nur etwa 1 % aller gebildeten infektiösen Viruspartikel aus, spielen dabei aber eine wichtige Rolle für die Virulenz und die Ausbreitung des Virus von Zelle zu Zelle innerhalb eines Organs oder Organismus [132-134]. MVs hingegen werden zumeist über Zellyse freigesetzt und sind durch ihre hohe Umweltstabilität vor allem für die Ausbreitung der Infektion von Wirt zu Wirt verantwortlich. Innerhalb eines Organismus sind MVs hingegen im Vergleich zu EVs einfacher durch Antikörper zu neutralisieren [135].

1.3.2. Replikationszyklus und Genexpression

Der Replikationszyklus von Orthopockenviren beginnt mit der Adsorption der infektiösen Partikel an die Oberfläche der Zielzelle. Dabei nutzen MVs und EVs unterschiedliche zelluläre Rezeptoren und Oberflächenmoleküle [136]. Diese umfassen dabei verschiedene Proteine, wie die ubiquitär verbreiteten Glykosaminoglykane (GAG) Heparansulfat und Chondroitinsulfat, aber auch weitere Zelloberflächenmoleküle und Proteine der extrazellulären Matrix wie Laminin [137]. Diese Diversität an verschiedenen Adhäsionsmöglichkeiten ist ein Grund für den breiten Zelltropismus von Orthopockenviren, wobei nicht in allen Zellen eine Replikation und Reifung der Viren stattfindet [138]. Die adhären Partikel werden in einem makropinocytotischen Prozess durch eine Membranausstülpung umschlossen und nach anschließender Membranfusion das *Viruscore* ins Cytoplasma freigesetzt und über Mikrotubuli weiter internalisiert [139]. Neben der Makropinocytose ist auch apoptotische Mimikry für die Internalisierung von Vacciniaviren beschrieben [140].

Die Expression viraler Gene erfolgt kaskadenartig und ist über spezifische Promotorsequenzen vor den Genen streng reguliert. Dabei sind die frühe Genexpression (ca. 0-2 h nach Zelleintritt der Viren), die intermediäre Genexpression (ca. 1-3 h nach Eintritt) und die späte Genexpression (ab 2 h nach Zelleintritt) zu unterscheiden [120]. Die frühe Genexpression beginnt schon im intakten *Viruscore* durch den essentiellen, viralen Transkriptionskomplex und umfasst etwa 50 % aller viraler Gene [141-143]. Die früh exprimierten Gene sind zumeist involviert in die Umgehung der antiviralen Antwort der Wirtszellen, die virale DNA-Replikation und die Steuerung der Transkription der intermediären Gene [120, 144]. Erst anschließend erfolgt die Freisetzung der viralen DNA aus dem *Core* in das Cytoplasma und die Bildung der, für die Replikation charakteristischen, Virusfabriken mit Beginn der DNA-Replikation. Die DNA dient als Matrize sowohl für die Synthese weiterer viraler Genome als auch für die mRNA-Synthese intermediärer und später Gene. Pro Zelle werden bis zu 10.000 Kopien des viralen Genoms synthetisiert, welche aber nur zu maximal 50 % in Partikel verpackt werden [120]. Die intermediär exprimierten Gene kodieren unter anderem für Regulatoren spät exprimierter Gene. Die spät exprimierten Gene umfassen vor allem virale Struktur- und Capsidproteine, aber auch Regulatoren der frühen Genexpression, welche in die Virionen inkorporiert werden.

In 2D-Zellkultur dauert der gesamte Prozess der Virusreplikation je nach verwendeten Zellen, MOI und Virusstamm unterschiedlich lange an, wobei durchschnittlich 12 Stunden bis zur Freisetzung infektiöser Partikel angenommen werden [120].

Die Assemblierung neuer OPV-Partikel erfolgt ebenfalls in abgegrenzten, kondensierten Bereichen des Cytoplasmas. Diese *B-type inclusion bodies* genannten Virusfabriken finden sich bei allen Vertretern der Orthopockenviren. Neben anderen Vertretern können Kuhpockenviren zusätzlich Mikrotubuli-abhängige *A-type inclusion bodies* ausbilden, in denen MVs in einer Matrix aus Proteinen bis zur Freisetzung geschützt werden [145]. Bei der Morphogenese der viralen Partikel lagern sich zunächst Membranfragmente, die dem glatten endoplasmatischen Retikulum entspringen, um die, von Nukleoproteinen umgebene, kondensierte, genomische DNA an. Die Membranstruktur schließt sich zu einem unreifen, sphärischen bis ovalen Partikel, welches dann zum MV heranreift. Diese infektiösen Partikel können entweder über Zellyse freigesetzt oder weiter prozessiert werden. Dazu werden die MVs mit zwei weiteren Membranen umhüllt, die aus Endosomen oder dem trans-Golgi-Apparat stammen [139]. Diese von einer dreifachen Membran umgebenen WVs werden über Mikrotubuli und Aktin-Filamente zur Zellperipherie transportiert, wo sie unter Verlust der äußeren Membran über Exocytose freigesetzt werden [146]. Die nun zweifach membranumhüllten EV-Partikel können zellassoziiert oder frei vorliegen und weitere Zellen in der Umgebung infizieren. Es konnte gezeigt werden, dass Re- und Suprainfektionen effektiv verhindert werden, indem bereits infizierte Zellen extrazelluläre Virionen zurückweisen [147].

1.3.3. Interaktion mit der Wirtszelle

Orthopockenviren interagieren auf verschiedenste Weisen mit den Wirtszellen. Sie können zelluläre Signalwege und die Immunantwort beeinflussen sowie den Stoffwechsel der Wirtszelle regulieren und drosseln.

Orthopockenviren codieren für Proteine, die z. B. die Wirksamkeit und Ausbreitung von Interleukinen, Chemokinen und TNFs über spezifische Interaktionen und kompetitive Antagonisten beeinflussen [125, 148]. Die Expression spezifischer Bindeproteine konnte beispielsweise für IFN- α , IFN- β und IL-1 β gezeigt werden [149, 150]. Des Weiteren kann auch die Induktion verschiedener Apoptosesignalwege über die Unterdrückung von Caspasen, Serpinen, FAS-Liganden oder Proteinkinasen umgangen werden [151].

Neben der Beeinflussung der Immunantwort und der Apoptose infizierter Zellen verfügen Orthopockenviren über weitere Mechanismen, um intrazelluläre Signalkaskaden und die Expression zellulärer Gene so zu beeinflussen, dass Virusreplikation, Weitergabe und die Freisetzung viraler Partikel optimiert werden. So wurden für verschiedene Vertreter der Orthopockenviren mittels Microarray-Analysen hochregulierte zelluläre Transkripte identifiziert, die mit der Inaktivierung des MAPK-Signalweges assoziiert sind. Dadurch können zelluläre Feedback-Mechanismen unterdrückt werden, welche die Virusreplikation stören könnten [152].

Des Weiteren wurden in einer Studie mit Vacciniaviren verschiedene Gene in infizierten Zellen als hochreguliert identifiziert, die für Strukturkomponenten der Zelle codieren (z. B. Claudin-3, Pericentrin). Derartige Golgi-assoziierte, zelluläre Strukturen könnten eine Rolle in der Produktion und Reifung der Virionen spielen [153].

Die Ausbreitung von Kuhpocken- und Vacciniaviren von Zelle zu Zelle wird z. B. durch Expression des viralen Gens CGF bzw. VGF befördert. CGF kann an den zellulären EGFR binden, den Rezeptor phosphorylieren und so die Zelle über die anti-apoptotische und pro-proliferative Wirkung des ausgelösten Signalweges auf eine verstärkte Virusvermehrung programmieren. Die Ausbreitung des Virus von Zelle zu Zelle konnte mit dem Inhibitor Gefitinib durch Inhibition der EGFR-Phosphorylierung spezifisch gehemmt werden [154].

Die Interaktionsstudien von Orthopockenviren mit Wirtszellen wurden zumeist in 2D-Kulturen mit Zelllinien durchgeführt. Für eine höhere physiologische Relevanz der generierten Ergebnisse und die Bestätigung von bisher unaufgeklärten Zusammenhängen ist eine Verwendung von primären Zielzellen der Orthopockenviren, idealerweise in einem dreidimensionalen Aufbau, von großer Bedeutung. Die Identifikation unbekannter Wechselwirkungen zwischen Virus und Wirtszelle kann dabei sowohl zur Erforschung von Pathogenitätsmechanismen als auch zur Entwicklung antiviraler Therapien beitragen.

1.3.4. Historie und Bedeutung der Pockenviren für die menschliche Gesundheit

Der bekannteste Vertreter der Pockenviren ist das ausgerottete Variolavirus (VARV), welches zu den ältesten beschriebenen Infektionskrankheiten des Menschen zählt. Der Erreger könnte vor mehreren zehntausend Jahren als Zoonose aus einem, in Afrika in Nagetieren endemischen, Vorläufervirus entstanden sein, welcher sich von dort weltweit ausbreitete [155]. VARV-Infektionen wurden bereits vor mehr als 3000 Jahren in Ägypten und auch etwas später in Indien und China beschrieben [156]. Im Verlaufe der Geschichte kam es alle vier bis sieben Jahre zu teils schweren Variola-Epidemien mit einer Mortalität von 10 bis zu über 40 % [157]. VARV war sehr leicht über Tröpfcheninfektion zu übertragen, was die Ausbreitung wesentlich begünstigte. Nach einer Inkubationszeit von 7 bis 17 Tagen traten bei VARV-Infizierten erste Krankheitssymptome wie Fieber, Schüttelfrost, Kopf- und Gliederschmerzen auf. Nach Replikation des Virus in den Atemwegen breitete es sich virämisch über Makrophagen und Lymphozyten im lymphatischen System aus. Während einer zweiten virämischen Phase gelangte das Virus unter Auftreten von hohem Fieber auch über die Dermis in die Haut, was die typischen Hauterscheinungen mit der Bildung von Pusteln zur Folge hatte. In schweren Verläufen traten schlussendlich Symptome wie Erblindung, Hirnschädigungen, Lähmungen, Hämorrhagien, Lungenentzündungen bis hin zu Multiorganversagen auf, welche oftmals zum Tod führten [157].

Früh wurde bereits die Immunität von VARV-Infizierten gegen eine Reinfektion erkannt und dieser Umstand bei der Variolation genutzt. Dabei wurde Pockenflüssigkeit aus Wunden subkutan in die Haut eingeritzt, um die Patienten vor den Pocken zu schützen. Aufgrund der Schwere der Nebenwirkungen dieser Verfahren stellte die Nutzung von weniger pathogenen Impfviren, die erstmal durch Edward Jenner im Jahre 1796 beschrieben wurde, eine signifikante Verbesserung dar. Diese Impfviren wurden aus Läsionen am Euter einer Kuh gewonnen und boten durch Kreuzimmunität ebenso Schutz vor VARV-Infektionen bei deutlich geringeren Nebenwirkungen [158]. Von der damaligen Methode leitet sich der gebräuchliche Begriff Vakzination (lat. vacca = Kuh) für eine Impfung ab. Ob für die initialen Versuche Jenners Kuhpockenviren oder die, für die spätere Ausrottungskampagne verwendeten, Vacciniaviren verwendet wurden, welche phylogenetisch näher mit Pferdepocken verwandt sind, ist noch ungeklärt [159]. Im Lauf der Jahrhunderte existierten verschiedene Impfviren, die wiederum verschiedene Virusstämme umfassten. Die Weiterentwicklung der Impfung mündete ab 1958 in eine, von der Weltgesundheitsorganisation WHO ausgerufene, großangelegte Impfkampagne mit dem Ziel, die Pocken auszurotten. Im Jahr 1977 trat schließlich die letzte natürliche Variolainfektion in Somalia auf. Im Jahre 1980 wurden die humanen Pocken schließlich für ausgerottet erklärt [157, 160]. In der Folge wurden die Impfungen aufgrund der Nebenwirkungen (z. B. schwere *Eczema vaccinatum*, Enzephalitis) eingestellt [161, 162]. Da das Variolavirus auf den Menschen als Wirt beschränkt ist, zirkulieren keine Viren mehr in der Natur.

Bis auf die, in den Forschungszentren der CDC (Atlanta, USA) und des „Vector“-Instituts für Virologie und Biotechnologie (Kolzowo, Russland) gelagerten, Isolate wurden alle Bestände an humanen Pockenviren daraufhin vernichtet. Eine Vernichtung der verbliebenen Bestände wird seit vielen Jahren diskutiert [163].

Nichtsdestotrotz gibt es Befürchtungen, dass Variolaviren für terroristische Anschläge eingesetzt werden könnten und die Bevölkerung ohne Impfung nicht geschützt wäre [164]. Potenzielle Risiken stellen nicht vernichtete Lagerbestände dar, die z. B. während des russischen Biowaffenprogramms generiert [165] oder in Laboren unwissentlich gelagert wurden, wie der Fund von replikationskompetenten Variolaviren am NIH in Bethesda, USA im Jahre 2014 zeigt [166]. Dazu kann außerdem die synthetische Herstellung eines Variolavirus aus einem kompletten Genom nicht mehr ausgeschlossen werden, nachdem dieses kürzlich für ein Pferdepockenvirus gelungen ist [167, 168].

Neben dem Variolavirus können auch die zoonotischen Vertreter der Orthopockenviren, wie Affenpocken-, Kuhpocken- und Vacciniavirus, den menschlichen Organismus befallen. Das Affenpockenvirus ist in Teilen West- und Zentralafrikas endemisch, kann über den Kontakt zu infizierten Nagetieren oder den Konsum von *Bushmeat* übertragen werden und schwere Krankheitsverläufe im Menschen auslösen [169].

Kuhpockenviren kommen natürlicherweise in Europa und Asien vor und besitzen im Gegensatz zum, auf den Menschen beschränkten, Variolavirus ein sehr breites Wirtsspektrum. Als natürliches Reservoir gelten vor allem Nagetiere, von welchen die Viren über infizierte Haustiere oder auch direkt auf Menschen übertragen werden können. So besaßen 2 % der untersuchten Katzen Antikörper gegen Orthopockenviren [170]. Die Infektion führt im Tier zu Hautläsionen, über welche sich auch die Halter anstecken können. In immunkompetenten Menschen ist die Infektion mit Kuhpockenviren in der Regel lokal begrenzt, selbstlimitierend und verläuft sehr milde, oftmals unter Ausbildung typischer Hautläsionen (Effloreszenzen). In immunsupprimierten Patienten kann es zu schweren, generalisierten Verläufen kommen. In außergewöhnlichen Fällen kann es auch bei immunkompetenten, zumeist jüngeren Patienten zu schwereren Verläufen kommen. Im Falle einer Patientin in Frankreich manifestierte sich der Krankheitsverlauf in Sekundärinfektionen und einer schweren Chondritis des Ohres [171].

Nach Einstellung der Variola-Impfung könnte es aufgrund der zurückgehenden Immunität in der Bevölkerung in Zukunft auch häufiger zu einer Übertragung von Kuhpockenviren auf den Menschen kommen. Die, in Deutschland beobachteten, steigenden Fallzahlen können allerdings auch mit einer erhöhten Aufmerksamkeit und einem besseren Nachweis erklärt werden. Nichtsdestotrotz sind Orthopockenvirus-Infektionen im Vergleich zu anderen Infektionskrankheiten immer noch sehr selten [170].

Allerdings gibt es Befürchtungen, dass bestimmte, besonders pathogene Vertreter der Affenpocken-, Kuhpocken- oder Vacciniaviren aufgrund ihrer Homologien zukünftig die ökologische Nische der Variolaviren besetzen oder über steigende Fallzahlen zu einem größeren Problem werden [172, 173].

Bisher sind keine Therapeutika für die Behandlung von Pockeninfektionen zugelassen, wenngleich mit Tecovirimat (ST-246) und Cidofovir wirksame Substanzen in Vorversuchen getestet wurden [174-176]. Außerdem könnte eine Antikörperbehandlung (z. B. mit Vaccinia-Immunglobulin VIG) bei schweren Verläufen in Betracht gezogen werden [177]. Weiterhin wird auch an nebenwirkungsärmeren Impfstoffen gegen Orthopockenviren gearbeitet, welche bei größeren Ausbrüchen zum Einsatz kommen könnten [159].

Somit bleibt die Forschung an Orthopockenviren auch nach der Ausrottung der Variolaviren relevant. Die humanpathogenen Vertreter stellen weiterhin potenzielle Gesundheitsgefahren für die Bevölkerung dar, sei es durch Adaptation und Ausbreitung bestimmter Vertreter oder durch gewollte oder ungewollte Freisetzung hochpathogener Viren.

1.3.5. Bedeutung der Haut bei der Infektion

Infektionen mit Orthopockenviren sind zumeist durch eine Beteiligung der Haut gekennzeichnet. Dabei werden zum einen zoonotische Infektionen (z. B. mit Kuhpockenviren) über Hautläsionen infizierter Haus- und Wildtiere durch Kontakt mit humaner Haut weitergeben. Zum anderen bilden sich im Lauf der Infektionen charakteristische Hautveränderungen (Effloreszenzen) aus, die mit der Virusreplikation und der, in der Haut ausgelösten, Immunantwort assoziiert sind. Die Infektionen durch Kuhpockenviren mit den klassischen Symptomen auf der Haut sind zumeist an exponierten Bereichen an Gesicht und Extremitäten zu beobachten, wobei die Infektionen oft selbstlimitierend verlaufen und generalisierte Verläufe mit Beteiligung der gesamten Körperoberfläche und innerer Organe selten sind [178].



Abbildung 5: Klinische Manifestationen von Kuhpockeninfektionen menschlicher Haut: A: Einzelne Pockenläsion in der dritten Krankheitswoche auf dorsaler, linker Hand einer 15-jährigen, immunkompetenten Patientin [179]; B: multiple Läsionen auf dem Arm einer 4-jährigen Patientin mit generalisiertem Infektionsverlauf (7 Tage nach Symptombeginn) [180]; C: nekrotisierende Läsion am Handgelenk einer 17-jährigen Patientin (8 Tage nach Symptombeginn) [181]

Je nach Schwere und Verlauf der Infektion und des Immunstatus des Infizierten werden verschiedene Ausprägungen der Hautläsionen beobachtet (Abbildung 5). In der Regel bildet sich ein eng begrenztes Exanthem (Abb. 5A), welches sich über die Stadien Papel und Vesikel zu einer Pustel entwickelt, die schlussendlich eintrocknet und Narbengewebe ausbildet. Generalisierte Infektionen mit diversen Pusteln über den gesamten Körper und die Extremitäten (Abb. 5B) [180] können aber ebenso auftreten wie stark nekrotisierende Verläufe (Abb. 5C), die auch in Zusammenhang mit bakteriellen Sekundärinfektionen stehen können [181]. Aufgrund der Hautbeteiligung stellt die Untersuchung der Infektion und Pathogenese von Orthopockenviren insbesondere in Hautzellen und komplexeren Modellen einen wichtigen Ansatz dar, um Verlauf, Pathogenese und Therapiemöglichkeiten zu untersuchen.

1.4. Infektionsstudien in 3D Modellen

Aufgrund der beschriebenen biologischen Limitationen von zweidimensionalen Zellkulturen sowie der ethischen und ökonomischen Limitationen von Tiermodellen wurden über die letzten Jahrzehnte auch in der Infektionsforschung Fortschritte in der Anwendung dreidimensionaler Zellkultur-Modelle gemacht. Diese Modelle können die Lücke zwischen den Untersuchungen in klassischen Zellkulturen *in vitro* und *in vivo*-Tiermodellen schließen und zusätzlich durch den Einsatz humaner Zellen wertvolle, humanspezifische Zusatzinformationen liefern, die über die Möglichkeiten des Tiermodells hinausgehen.

1.4.1. Infektionsstudien in Hautmodellen

Zur Erforschung von orthopockenviralen Infektionen des Menschen stehen verschiedene *in vitro* und *in vivo* Modelle zur Verfügung. Klassischerweise werden Orthopockenviren in 2D-Zellkultur von primären Zellen und Zelllinien epithelialen Ursprunges wie HeLa- oder HaCaT-Zellen untersucht [50, 153, 182]. Aufgrund der besseren Übertragbarkeit der Ergebnisse sind verschiedene *in vivo* Modelle für diese Erreger optimiert. So werden Orthopockenvirusinfektionen zum Beispiel in Ratten, Mäusen sowie nicht-humanen Primaten untersucht, um die Wirksamkeit von Hemmstoffen zu eruieren [183].

Die Verwendung von Hautmodellen hat gegenüber Infektionsstudien in klassischen 2D-Kulturen epithelialer Zellen den Vorteil, dass die 3D-Kulturen eine *in vivo*-ähnliche Morphologie und Genexpression besitzen [184] und damit übertragbare Ergebnisse zu Infektionen menschlicher Haut liefern.

In Studien konnte der Tropismus von Vacciniaviren für epidermale Keratinozyten in einem Hautmodell gezeigt werden. Bei den durchgeführten Versuchen kam es durch die Infektion zu einem Verlust der Gewebeintegrität, zur Apoptose und Lyse der befallenen Zellen. Eine Bildung infektiöser Partikel im Modell konnte mittels Plaque-Titrationstest gezeigt werden [50, 185].

Für Kuhpockenviren konnte ebenso die Infizierbarkeit eines kommerziellen Hautmodells gezeigt werden. Beim gewählten Versuchsaufbau konnten allerdings keine Pathogenitätsunterschiede zwischen verschiedenen Virusstämmen nachgewiesen werden, welche *in vivo* unterschiedliche Pathogenitäten aufweisen [186].

Auch Hemmstoffversuche wurden bereits in dreidimensionalen Hautmodellen durchgeführt. So konnte die Wirkung von Tecovirimat (ST-246), eines Inhibitors des Zellaustrittes intakter Partikel, auf verschiedene Vertreter der Orthopockenviren gezeigt werden [174]. Weiterhin konnte auch die Wirksamkeit von Cidofovir-Derivaten, als Vertreter der azyklischen Nukleosidanaloga, auf die Verbreitung von Vaccinia-, Kuhpocken- und Kamelpockeninfektionen in einem 3D-Modell gezeigt werden [187-189].

Diese Ergebnisse und die gute Übertragbarkeit auf bereits vorliegende Daten aus Tiermodellen und von menschlichen Einzelpatienten können in Zukunft dazu beitragen, die Planung von Hemmstoff- und Inhibitionsstudien zu verbessern und so schneller und unter besserer Wahrung des Tierwohles zu neuen therapeutischen Ansätzen zu gelangen [190].

Neben Orthopockenviren wurden auch weitere Viren in 3D-Hautmodellen getestet. So konnte die Infizierbarkeit etwa mit *Herpes simplex*, *Varicella zoster* und verschiedenen Adenoviren gezeigt werden [185]. Weiterhin lieferten Studien mit humanen Papillomaviren wichtige Erkenntnisse, da diese Viren für Replikation und Reifung infektiöser Partikel Keratinozyten in verschiedenen Differenzierungsstadien benötigen [191, 192].

Des Weiteren konnte auch für Zikaviren, als Vertreter der Flaviviren, eine Replikation in einem Kulturmodell mit Hautexplantaten gezeigt werden [193]. Bei der Infektion mit diesen Viren wird in der Klinik oft eine Hautbeteiligung beobachtet. Dies macht Hautmodelle zu einem interessanten Werkzeug, um zu entwickelnde antivirale Therapien zu testen, welche angesichts der schweren Epidemien auf dem amerikanischen Kontinent dringend benötigt werden.

1.5. Ziele der Arbeit

Dreidimensionale Modelle verschiedener Organe und Gewebe stellen eine Weiterentwicklung klassischer Zellkulturversuche in 2D-Kultivierung dar und bieten eine physiologischere Alternative zur Untersuchung von viralen Infektionen.

In Weiterführung der eigenen Diplomarbeit soll ein dreidimensionales Hautmodell aus primären Keratinozyten und Fibroblasten als Infektionsmodell für die Untersuchung virologischer Fragestellungen am Robert Koch-Institut etabliert werden. Dabei sollen die Hautäquivalente einen möglichst physiologischen Differenzierungsstatus aufweisen, was über den Nachweis spezifischer Marker im Hautmodell untersucht und mit Hautbiopsien und Monolayerkulturen verglichen werden soll. Hierfür soll ein spezifisches Protokoll für die Anfertigung von immunhistochemischen Aufnahmen etabliert werden, welches sich auch für die Untersuchung infektiöser Proben eignet.

Mit den hergestellten Hautäquivalenten sollen Infektionsversuche mit Kuhpockenviren durchgeführt werden, welche als zoonotische Erreger in der Regel Infektionen in der Haut von Patienten verursachen. Zur Etablierung des Infektionsmodelles soll das Infektionsprotokoll optimiert und der Infektionsverlauf über den Nachweis viraler Nukleinsäuren, Proteine und Partikel untersucht werden, um eine Virusreplikation im Modell nachzuweisen.

Im Folgenden sollen die Wechselwirkungen des Kuhpockenvirus mit den humanen Zellen in Bezug auf die Ausbreitung des Virus von Zelle zu Zelle und die Regulation zellulärer Genexpression studiert werden. Durch die, bisher nicht in der Literatur beschriebene, Kombination der Infektion in der 3D-Umgebung mit einer Transkriptomanalytik mithilfe von *Next Generation Sequencing* (NGS) sollen neue Zusammenhänge in der Genregulation identifiziert werden, welche mit der Pathogenese und Replikation von Orthopockenviren in der Haut assoziiert sind. Die Assoziation der neu identifizierten Gene mit der Virusinfektion soll mithilfe von qPCR und proteinbiochemischen Methoden verifiziert werden, um festzustellen, ob diese in Zukunft Zielgene für Therapiestrategien darstellen könnten.

Im direkten Vergleich mit Infektionsversuchen in 2D-Kultur sollen so folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Wie verhält sich der Infektionsverlauf mit Kuhpockenviren in 3D-Kultur im Vergleich zur klassischen 2D-Kultur?
2. Ist die virale Genexpression und Morphogenese der Viruspartikel durch die Kultivierungsform beeinflusst und welche Unterschiede gibt es?
3. Welchen Einfluss hat die Kultivierungsform auf Zellproliferation, Apoptose und Signalwege in infizierten Zellen?
4. Gibt es Prozesse und Gene, deren Assoziation mit der orthopockenviralen Infektion vor allem im 3D-Modell zu beobachten ist?

5. Wie wirkt sich die Kultivierungsform auf die Untersuchung der Wirksamkeit von antiviralen Substanzen gegen kuhpockenvirale Infektionen aus?

Durch die Beantwortung von Frage 5 soll die grundsätzliche Eignung des Modells für die Testung antiviraler Substanzen anhand des anti-pockenviralen Wirkstoffes Gefitinib gezeigt werden.

Im Sinne einer nachhaltigen Modellentwicklung soll darüber hinaus ein dreidimensionales, kommerzielles Alternativmodell humaner Epidermis auf seine Anwendbarkeit für Infektionsstudien überprüft werden.

Schlussendlich sollen mithilfe der generierten Erkenntnisse zu den modellspezifischen Vorzügen und Hindernissen zukünftige Anwendungsgebiete und weitergehende Forschungsansätze definiert werden, welche im neu entwickelten Infektionsmodell zukünftig bearbeitet werden können.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

Tabelle 4: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Blotting System Western Blot	TransBlot Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories, München, D
Brutschrank	B 6200	Heraeus, Hanau, D
Brutschrank	CB150	Binder, Tuttlingen, D
Brutschrank	Heracell Vios 160i	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Dispensierpipette	HandyStep manual	Eppendorf, Hamburg, D
Dounce Homogenisator	Kimble Kontes 40 ml	Kimble Chase, Rockwood, USA
Elektronenmikroskop	Tecnai 12 Biotwin	FEI, Hillsboro, USA
Elektrophoresesystem	MiniProtean Tetracell System	Bio-Rad Laboratories, München, D
Feinwaage	RC 210P	Sartorius, Göttingen, D
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M	Carl Zeiss, Oberkochen, D
Fluorometer	Qubit 2.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Nukleinsäurequantifizierung		
Gefriergefäß	Mr. Frosty Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Gel-Dokumentationssystem	ChemIDoc 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		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
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 Industries, Bohemia, USA
Spannungsquelle	EV 231	Consort bvba, Turnhout, BE
Spektrophotometer	NanoDrop 1000 Spectrophotometer	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, D
Thermomixer	Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg, D

Thermoschüttler	Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg, D
Thermozykler	PTC 200	MJ Research, Quebec, CA
Tischzentrifuge	Centrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge	Microcentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, 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	Type 3043	Köttermann, Uetze/Hänigsen, D
Wasserbad	TW 12/20	Julabo, Seelbach, D
Werkbank	HeraSafe KS/KSP	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Zentrifuge	Centrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Material	Bezeichnung/Spezifikation	Hersteller
Chamber Slide	Nunc Lab-Tek II, 8-well	NUNC, Roskilde, DK
Deckgläser	H878, 24x60 mm	Carl Roth, Karlsruhe, D
Einmalpinzetten	Aesculap nach Adson	B. Braun, Melsungen, D
Einmalskalpell	Steril	B. Braun, Melsungen, D
Einmalspritzen	Inkjet 2 ml, 5 ml, 10 ml	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, Darmstadt, D
gegabelte Impfnadel		Precision Medical Products, Denver, USA
Gewebestanze	Biospy Punch, 8 mm	Integra, York, USA
Glasflasche	Duran 100/500/1000 ml	Schott, Mainz, D
hydrophober Fettstift	ImmEdge Barrier Pen	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Inserts für Haut	PC Membran, Porengröße 3 µM, Fläche: 0,47 cm ²	NUNC, Roskilde, DK
Kryoröhrchen	Cryo Tube Vials	NUNC, Roskilde, DK
Mikroschraubkappenröhrchen	2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Mikrotiterplatten	6; 12; 24; 48; 96 Kavitäten (<i>wells</i>)	NUNC, Roskilde, DK
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 B.V. & Co. KG, Braunschweig, D
Parafilm M		Pechiney, Chicago, USA
Petrischalen	60 mm, 100 mm	Greiner, Frickenhausen, D

Pinzetten	wiederverwendbar	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Pipetten	Einweg; 1; 2; 5; 10; 25; 50 ml	TPP, Trasadingen, CH
Pipettenspitzen	ART Tips, Eppendorf Tips	Thermo Fischer Scientific, Dreieich, D; Eppendorf, Hamburg, D
Platten für qPCR	MicroAmp Fast Optical 96-well Reaction Plate	Life Technologies, Darmstadt, D
Probenröhrchen	2,5 ml, PE	Carl Roth, Karlsruhe, D
Proteingele	4–20 % Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gels, 12-well	Bio-Rad Laboratories, München, D
Proteingele	Precise 4-20 % Tris-HEPES Gel, 12-well	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Spitzen Dispenser	Combitips (5; 10ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Zellkulturflaschen	25; 75; 175 cm ² (T25, T75, T175)	NUNC, Roskilde, DK
Zellkulturöffel mit Spatel	smartSpatula (blau)	Investigene, Hercules, USA
Zellschaber	240; 300 mm	TPP, Trasadingen, CH
Zentrifugenröhrchen	15; 50 ml	VWR, Bruchsal, D
Zirkonium-Beads	Durchmesser: 1,44 mm, säuregewaschen	OPS Diagnostics, Lebanon, USA

2.1.3. Reagenzien

Tabelle 6: Liste der verwendeten Reagenzien

Reagenz	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, D
Bleicitrat	Merck, Darmstadt, D
Borax	Sigma-Aldrich, München, D
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Carboxy-Methyl-Cellulose (CMC)	Fluka, Buchs, CH
Chondroitin-Sulfat	Sigma-Aldrich, München, D
Cidofovir	Selleck Chemicals, München, D
Cryo-SFM Gefriermedium	Promocell, Heidelberg, D
Dithiothreitol	Carl Roth, Karlsruhe, D
DMEM	Life Technologies, Darmstadt, D
DMEM (2x)	Life Technologies, Darmstadt, D
DMSO	Serva, Heidelberg, D
Einbettmedium Tissue-Tek O.C.T.	Sakura, Staufen, D
Eisessig	Sigma-Aldrich, München, D
Epon (812)	Serva, Heidelberg, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
Fibronectin-Lösung	Sigma-Aldrich, München, 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
HEPES	Merck, Darmstadt, D
KGM 2 Supplements	Promocell, Heidelberg, D
Kollagen-I-Lösung (10 mg/ml)	Isolation Uni Würzburg/Fraunhofer IGB Florian Groeber, Würzburg, D
L-Glutaminlösung (200 mM)	Life Technologies, Darmstadt, D
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, München, D
Magnesiumchlorid-Lösung	Bioline, Luckenwalde, D
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, D
Naphtalen Blue	PAA, Cölbe, 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
Penicillin/Streptomycin	PAA, Cölbe, D
Probenpuffer (5x Lanemarker)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Propylenoxid	Merck, Darmstadt, D
Proteinmarker PageRuler Prestained	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Proteinmarker SuperSignal	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
Sucrose	Carl Roth, Karlsruhe, D
Tanninsäure	Merck, Darmstadt, D
TGS Running Buffer Page	Bio-Rad Laboratories, München, D
Toluidinblau	Merck, Darmstadt, D
Tris Base	Carl Roth, Karlsruhe, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München, D
Trypanblau-Lösung (0,5 %)	Sigma-Aldrich, München, D
Tween20	Carl Roth, Karlsruhe, D
Uranylacetat	Merck, Darmstadt, D
Weizenkeimagglutinin (WGA, CF594 gekoppelt)	Biotium, Hayward, USA
Western Blot Stripping Puffer Restore PLUS	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D

2.1.4. Molekularbiologische Kits

Tabelle 7: Liste der verwendeten molekularbiologischen Kits

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller
Apoptose-Detektion	In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red	Roche Diagnostics, Mannheim, D
cDNA-Synthese	<i>TaqMan</i> Reverse Transcription Reagents	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
DNA-Verdau	Turbo DNA-free Kit	Ambion, Austin, USA
Herstellung von KGM-2 ready Medium	Keratinocyte Growth Medium 2 SupplementMix	Promocell, Heidelberg, D
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 Library Quantifizierung DNA	High Sensitivity DNA Analysis Kit	Agilent, Santa Clara, USA
NGS Sequenzierungschemie	TruSeq Rapid SBS Kit v1	Illumina, San Diego, USA
Primärzellpassagierung	Detach Kit	Promocell, Heidelberg, D
qPCR	Invitrogen Platinum Taq DNA Polymerase Kit	Life Technologies, Darmstadt, D
RNA, DNA, Protein-Extraktion (3D-Proben)	AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit	QIAGEN, Hilden, D
RNA-Extraktion (2D-Proben)	RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden, D
RNA-Qualitätsbestimmung	total RNA 6000 Pico Kit	Agilent, Santa Clara, USA
RNA-Quantifizierung	Qubit RNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Western Blot Blotting	Trans-Blot Turbo RTA Mini PVDF Transfer Kit	Bio-Rad Laboratories, München, D

2.1.5. Enzyme

Tabelle 8: Liste der verwendeten Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Dispase-Lösung 2 U/ml	BD Biosciences, San Jose, USA
MultiScribe Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Platinum Taq Polymerase	Life Technologies, Darmstadt, D
Proteinase K-Lösung	Macherey-Nagel, Düren, D
rDNase-Lösung	Macherey-Nagel, Düren, D
Trypsin/EDTA	PAA, Cölbe, D

2.1.6. Antikörper

Tabelle 9: Liste der verwendeten Primär-Antikörper

Name	Konz WB*	Konz IHC*	Hersteller
<u>Antikörper gegen zelluläre Targets</u>			
α-aPKC	n.v.	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D
α-Claudin1	n.v.	1:100	Abcam, Cambridge, UK
α-cPARP	1:8000	1:100	Abcam, Cambridge, UK
α-Cyclooxygenase 2 (α-PTGS2)	1:3000	1:100	Abcam, Cambridge, UK
α-Cytokeratin 10	n.v.	1:100	Abcam, Cambridge, UK
α-Cytokeratin 14	n.v.	1:100	Abcam, Cambridge, UK
α-Cytokeratin 2E	1:2500	1:100	Abcam, Cambridge, UK
α-DSC-1	1:1000	1:100	Sigma-Aldrich, München, D
α-EGFR	1:1000	1:100	Abcam, Cambridge, UK
α-EGR1	1:30000	1:50	Abcam, Cambridge, UK
α-Filaggrin	n.v.	1:50	Abcam, Cambridge, UK
α-Integrin β-1	n.v.	1:50	Abcam, Cambridge, UK
α-Involucrin	n.v.	1:100	Abcam, Cambridge, UK
α-Ki-67	n.v.	1:50	Abcam, Cambridge, UK
α-Kollagen-IV	1:1000	1:100	Abcam, Cambridge, UK
α-Laminin	n.v.	1:100	Abcam, Cambridge, UK
α-NR4A1 (NUR77)	1:1000	1:50	Abcam, Cambridge, UK
α-PCNA	1:5000	n.v.	Abcam, Cambridge, UK
α-pEGFR	1:1000	1:100	Abcam, Cambridge, UK
α-PUMA	1:2000	1:100	Abcam, Cambridge, UK
α-Tubulin β3	1:1000	1:100	Abcam, Cambridge, UK
α-β-Aktin	1:5000	n.v.	Cell Signalling, Cambridge, UK
α-γ-Synuclein	1:1000	1:100	Abcam, Cambridge, UK
<u>Antikörper gegen virale Targets</u>			
α-CPXV-A27	1:3000	1:100	Eigenherstellung (Stern, Nitsche)
α-CPXV-A33R	1:5000	1:250	Eigenherstellung (Stern, Nitsche)

*n.v. – Antikörper für jeweilige Methode nicht verwendet.

Tabelle 10: Liste der verwendeten Sekundär-Antikörper

Name	Konz WB	Konz IHC	Hersteller
<u>Antikörper für Western Blot (HRP-gekoppelt)</u>			
α-chicken-IgY-HRP	1:5000		Dianova, Hamburg D
α-mouse-IgG-HRP	1:30000		Abcam, Cambridge, UK
α-rabbit-IgG-HRP	1:7500		Cell Signalling, Cambridge, UK
<u>Antikörper für Immunhistochemie (Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelt)</u>			
α-chicken-FITC		1:500	Dianova, Hamburg, D
α-mouse-AlexaFluor555		1:500	Cell Signalling, Cambridge, UK
α-mouse-AlexaFluor647		1:500	Cell Signalling, Cambridge, UK
α-mouse-FITC		1:500	Dianova, Hamburg, D
α-rabbit-AlexaFluor555		1:500	Cell Signalling, Cambridge, UK
α-rabbit-AlexaFluor647		1:500	Cell Signalling, Cambridge, UK
α-rabbit-FITC		1:500	Dianova, Hamburg, D

2.1.7. Puffer und Lösungen

Tabelle 11: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen (Eigenherstellung RKI) und deren Zusammensetzung

Name	Zusammensetzung
CMC-Lösung	1,6 g CMC in 100 ml Medium für Vero-Zellen
Gelneutralisationslösung	7,5 ml HEPES-Lösung (3 mM); 2,5 ml Chondroitin-Sulfat-Lösung (5 mg/ml); 7,5 ml FKS; 232,5 ml DMEM (2x)
IFA Verdünnungspuffer	2 % BSA, 0,1 % NaN ₃ in PBS-
Klinikfixans	1 % Paraformaldehyd, 2,5 % Glutaraldehyd (in 0,05 M HEPES, pH 7,2)
Naphtalen Blue Black Lösung	1 g Naphtol; 13,6 g Natriumacetat; 60 ml Eisessig ad 1 l ddH ₂ O
Paraformaldehyd-Lösung	4 % Paraformaldehyd in PBS-, pH 7,2
PBS 10x	8,0 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na ₂ HPO ₄ ; 0,24 g KH ₂ PO ₄ ad 0,1 L ddH ₂ O
PBS ohne (PBS⁻)	8,0 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na ₂ HPO ₄ ; 0,24 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l ddH ₂ O; pH 7,2
PBS mit (PBS⁺)	wie „PBS ohne“ mit je 0,1 g CaCl ₂ und MgCl ₂
PBS-T	0,1 % Tween20 in PBS-
Permeabilisierungs-Lösung	0,2 % Triton-X100 in PBS-
Sucrose-Lösung	15 oder 30 % Sucrose in PBS-
TGS Laufpuffer Gele (10x)	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0.1 % SDS ad 1 l ddH ₂ O; pH 8.3
Tris-HCl Lösung	10 oder 1 mM Tris-HCl in ddH ₂ O, pH 9,0
Western Blot Blockpuffer	4 % Milchpulver in PBS-T
WGA Färbelösung	5 µg/ml WGA in IFA-Puffer

2.1.8. Verwendete Zellen

Tabelle 12: Liste der verwendeten Zellen mit zugehörigen Kulturmedien

Zellname*	Ursprung	Kulturmedium ⁺	Herkunft	verw. Passage
primäre Keratinozyten (NHEK)	humane, aus juveniler Vorhaut, gepoolt	KGM-2 ready	Promocell #C-12002	p1-p5
primäre Fibroblasten (NHDF)	human, aus juveniler Vorhaut, Einzelspender	DMEM + 10 % FKS + 2 mM Glutamin + 1 % NEAA	Promocell #C-12350	p1-p5
Zelllinie: Vero E6	Afrikanische Grüne Meerkatze, renale Fibroblasten	DMEM + 10 % FKS + 2 mM Glutamin	ATCC # CRL-1586	p30-p45
Zelllinie: HEp-2	humane Epithelzelllinie, Larynxkarzinom	DMEM + 5 % FKS + 2 mM Glutamin	ATCC # CCL-23	p10-p15
Zelllinie: HaCaT	humane Keratinozyten, spontan transformiert	DMEM + 10 % FKS + 2 mM Glutamin	CLS #300493	p35-p45

* Bei allen Zellen handelte es sich um adhärenz wachsende Zellen.

+ Zusammensetzung der Zusätze in v/v

2.1.9. Zellkulturmedien

Tabelle 13: Liste der verwendeten Zellkulturmedien

Mediumname/Zusammensetzung	Hersteller
Airlift Medium	Promocell, Heidelberg, D
DMEM + 10 % FKS + 2 mM Glutamin	Eigenherstellung
DMEM + 5 % FKS + 2 mM Glutamin	Eigenherstellung
Keratinocyte Growth Medium 2	Promocell, Heidelberg, D
MatTek Maintenance Medium EPI-100-NMM	MatTek, Bratislava, SK

Tabelle 14: Zusammensetzung des KGM 2 ready Mediums und des Medium für die Airlift Kultivierung der Hautäquivalente

Komponente	KGM 2 ready Medium*	Airlift Medium*
BPE	0,4 %	-
EGF	0,125 ng/ml	-
Hydrocortison	0,33 µg/ml	0,33 µg/ml
Insulin	5 µg/ml	5 µg/ml
Epinephrin	0,39 µg/ml	0,39 µg/ml
Transferrin	10 µg/ml	10 µg/ml
CaCl₂	0,06 mM	1,92 mM
Penicillin/Streptomycin	-	1 %

*Grundlage beider Medien ist das KGM 2 Medium von Promocell, zu welchem verschiedene Zusätze (angegeben als Endkonzentration) gegeben wurden.

2.1.10. Nukleinsäuren

Die Primer und Sonden der Assays für die qPCR in Tabelle 15 und Tabelle 16 wurden bezogen von TIB Molbiol, Berlin, D oder Metabion, Planegg, D.

Tabelle 15: Liste der verwendeten Primer und Sonden für qPCRs (humane Gene)

Name*	Sequenz ⁺
MYC F	gCCAgAggAggAACgAgCT
MYC R	gggCCTTTTCATTgTTTTCCA
MYC S	6-FAM-TgCCCTgCgTgACCAgATCC-BHQ-1
TBP F	TTCggAgAgTTCTgggATTgTA
TBP R	TggACTgTTCTTCACTCTTggC
TBP S	6-FAM-CCgTggTTCgTggCTCTCTTATCCTCAT-BHQ-1
GAPDH F	gAAggTgAAggTCggAgTC
GAPDH R	gAAgATggTgATgggATTTC
GAPDH S	6-FAM-CAAgtTCCCgTTCTCAgCCT-BHQ-1
B2M F	AgCgTACTCCAAAgATTCaggTT
B2M R	ATgATgCTgCTTACATgTCTCgAT
B2M S	6-FAM-TCCATCCgACATTgAAgTTgACTTACTg-BHQ-1
Ki-67 F	ggAgAAgCCCCAACCAAAAg
Ki-67 R	TAggACTAggAgCTggAggg
Ki-67 S	6-FAM-TCTggTAATgCACACTCCACCTgTCCTgA-BHQ-1

EGR1 F	AgCAgCACCTTCAACCCTC
EGR1 R	CCAgCACCTTCTCgTTgTTC
EGR1 S	6-FAM-ACgAgCACCTgACCgCAgAgTCTTT-BHQ-1
PUMA F	gACCTCAACgCACAgTACgA
PUMA R	CTgggTAAgggCAggAgTC
PUMA S	6-FAM-CTgCTgCTCCTCTTgTCTCCgCC-BHQ-1
ITGB1 F	TCTgggCTTTACgAggAAg
ITGB1 R	TCTACCAACACgCCCTTCAT
ITGB1 S	6-FAM-gAAggCATCCCTgAAAgTCCCAAgTgTCAT-BHQ-1
LAMC2 F	gAgCCTggCAgAAAgTgAAg
LAMC2 R	CCATTTggCCCCACgTAg
LAMC2 S	6-FAM-TTgggAAACACTAACATTCCTgCCTCA-BHQ-1
COL4A1 F	ATgTgACTgCCATggAgTgA
COL4A1 R	AggTCCTTgCATTCACgAA
COL4A1 S	6-FAM-AAgAggCCTCCCggggTTACAaggT-BHQ-1

*F - Forward-Primer; R - Reverse-Primer; S - Sonde

+ 6-FAM = 6-Caboxylfluorescein, Reporter; BHQ-1: Black Hole Dark Quencher, nicht-fluoreszierender Quencher

Die qPCR-Assays gegen Ki-67, EGR1, PUMA, ITGB1, LAMC2 und COL4A1 wurden innerhalb dieser Arbeit unter Mitarbeit von Robert Koban und Marlena Stadtmüller entwickelt und optimiert.

Tabelle 16: Liste der verwendeten Primer und Sonden für qPCRs (OPV-spezifische Gene, Assays benannt nach Vaccinia-Nomenklatur, CPXV-Nomenklatur in Klammern)

Name*	Sequenz [†]
I7 F (Pox 4 all, CPXV086)	TAATACTTCgATTgCTCATCCAgg
I7 R (Pox 4 all, CPXV086)	ACTTCTCACAAATggATTTgAAAATC
I7 S (Pox 4 all, CPXV086)	6-FAM-TCCTTTACgTgATAAATCAT-MGB
VGF F (CGF)	CggTgACTgTATCCACgCTAgAg
VGF R (CGF)	AgCACAATACCKggAgATgggA
VGF S (CGF)	6-FAM-CTACTAATACTAYATgCTgACATC-MGB
F17 F (CPXV066)	gAACTgTAGAATgYgAAggAAgTAAAgC
F17 R (CPXV066)	gCRAACATATTTTgTAGCAYgTCCg
F17 S (CPXV066)	6-FAM-CCAgATgCgAgAgAAT-MGB
CP77 F (VHR1, CPXV025)	CCgCACgRAATAATgTgTAGTATTgT
CP77 R (VHR1, CPXV025)	AATTAgtATATgTTggAggACATYcAg
CP77 S (VHR1, CPXV025)	6-FAM-CCACTATggAgAAATg-MGB
G8 F (CPXV097)	gTgTTYTACCgHggAgCCGA
G8 R (CPXV097)	ATgAATgACggTTCTACCACAACAT
G8 S (CPXV097)	6-FAM-CCTAATAggCATCAgTTCC-MGB
Crma F (CPXV207)	TgTCAATgAAgAgTATACAgAAgCAgC
Crma R (CPXV207)	TggAgAgCAATATCTACCAACgAA
Crma S (CPXV207)	6-FAM-ACATgCCTAATCACATAgATgAACggA-BHQ-1
CrnC F (CPXV191)	CATTggTTACAgCAgATATACCTACT
CrnC R (CPXV191)	ggTACACTTTACCTTATCAAATgATCC
CrnC S (CPXV191)	6-FAM-CTTggCAAATTCTCCAggTggACACXT-BHQ-1
CrnD F (CPXV221)	ATTggAgATTACTATTCAGTCgTTgAT
CrnD R (CPXV221)	gAATgAggCATAAAgTATACCTTCg

Crmd S (CPXV221)	6-FAM-TCTAgACAACCTAACACCCAC-MGB
B19 F (CPXV212)	CCTATTgAAgACAgTCTTTTATCgC
B19 R (CPXV212)	ATgCCATACTTATCATgAgTACCTAgTT
B19 S (CPXV212)	6-FAM-ATggATAgCCAACCTATACA-MGB

*F - Forward-Primer; R - Reverse-Primer; S – Sonde

+ 6-FAM = 6-Caboxylfluorescein, Reporter; MGB = minor groove binder, nicht-fluoreszierender Quencher; BHQ-1: Black Hole Dark Quencher, nicht-fluoreszierender Quencher

Die Plasmidstandards für die Assays wurden aus PCR-Produkten der Gene über eine Klonierung mittels TA TOPO 2.1 Vektor (Life Technologies, Darmstadt, D) hergestellt und quantifiziert.

Im Zuge der Nachanalyse der Transkriptomdaten wurden kommerzielle *TaqMan*-Assays (Life Technologies, Darmstadt, D) für folgende Targets bezogen:

SNCG, PTGS2, KRT2, KRT8, KRT13, PSCA, CALML5, DSC1, IL24, TUBB3, NR4A1, FLNC, MEG3, EGR1

2.1.11. Software

Tabelle 17: Liste der verwendeten Software

Name	Hersteller
Applied Biosystems 7500 Software v2.3	Life Technologies, Darmstadt, D
AxioVision LE 4.8.2	Carl Zeiss, Oberkochen, D
CIMminer	NIH, Bethesda, USA
ClueGo 2.2.5	INSERM UMRS1138, Paris, FR
Compare two lists	Whitehead Institute, Cambridge, USA
Cytoscape 3.2.1.	Institute of Systems Biology, Seattle, USA
DAVID 6.8	LHRI, Frederick, USA
EndNote Web Edition	Thomson Reuters, New York, USA
Excel 2010	Microsoft, Unterschleißheim, D
Graph Pad Prism 5.04	GraphPad Software, San Diego, USA
iControl	Tecan, Männedorf, CH
Illumina HiSeq Control Software 2.2.	Illumina, San Diego, USA
Image J	NIH, Bethesda, USA
Image Lab 5.2.1	Bio-Rad Laboratories, München, D
Megaview	Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, D
NCBI Blast	NCBI, Bethesda, USA
OligoAnalyzer 3.1	Integrated DNA Technologies, Coralville, USA
Partek Flow	Partek Inc, St.Louis, USA
Powerpoint 2010	Microsoft, Unterschleißheim, D
Stata 14	Stata Corp, College Station, USA
UCSC Genome Bioinformatics	UCSC, Santa Cruz, US
Vennyplot 2.1.0	CNB, Madrid, ES
Word 2010	Microsoft, Unterschleißheim, D
ZEN 2012 (blue edition)	Carl Zeiss, Oberkochen, D

2.2. Methoden

Die, in den aufgeführten Methoden verwendeten, Geräte und Materialien sind im Materialverzeichnis (Tabelle 4 bis Tabelle 17) aufgelistet.

2.2.1. Zellkultivierung

Alle Zellkulturarbeiten wurden an Sicherheitswerkbänken der Klasse II in S2-Laboren durchgeführt. Infektiöses und nicht-infektiöses Material wurden dabei räumlich und zeitlich getrennt bearbeitet. Vor und nach Durchführung der Zellkultur-Arbeiten wurde jeweils die Arbeitsfläche mit Virkon S und/oder Terralin desinfiziert. Zusätzlich wurden eventuell übrig gebliebene Kontaminationsquellen wie Zellen, Viren und DNA nach den Arbeiten durch halbstündige Einwirkung von UV-Licht zerstört.

Die Zellkultivierung erfolgte für alle verwendeten Zellen (siehe Tabelle 12) in einem Feuchtbrutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Die verwendeten Zelllinien wurden vor Erreichen der Konfluenz alle drei bis vier Tage passagiert. Hierzu wurden die adhärennten Zellen, nach dreimaligem Waschen mit PBS⁻, mit Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst, in frischem Medium aufgenommen und bei 300 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in frischem Medium aufgenommen und die Zellen im Verhältnis 1:6 bis 1:10 in neue Zellkulturflaschen eingesät.

Die verwendeten Primärzellen wurden bei 60-70 % Konfluenz jeweils passagiert, wobei die Anzahl der Teilungen vor dem Einsatz in den Infektionsexperimenten acht Teilungen nicht überschreiten durfte. Bei Primärzellen wurde das Medium alle zwei Tage ausgetauscht, um jeweils eine optimale Nährstoffversorgung zu garantieren. Die Passagierung wurde mit dem Detach-Kit von Promocell durchgeführt. Hierbei wurden die primären Zellen in der Kulturflasche einmal mit HEPES-BSS gewaschen und mittels Trypsin-EDTA nach etwa fünf Minuten Inkubation im Feuchtbrutschrank abgelöst. Das Trypsin wurde mithilfe der Trypsin-Neutralisations-Lösung inaktiviert und die Zellen bei 300 g für 5 Minuten abzentrifugiert. Nach Aufnahme in frischem Medium wurden die Zellen jeweils mit einer Dichte von 7.500 bis 10.000 Zellen pro cm² in neue T75-Flaschen umgesetzt.

Zur Zellquantifizierung wurde die Zellzahl jeweils mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt und die Viabilität mittels Trypanblau-Färbung bestimmt, wobei der Anteil viabler Zellen typischerweise über 95 % lag. Neben der morphologischen Überprüfung der Zellen wurde in regelmäßigen Abständen die Kontaminationsfreiheit mittels spezifischer qPCRs auf Mykoplasmen und SV-5 sichergestellt.

Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden die primären Zellen zu Beginn der Arbeiten expandiert und in Flüssigstickstoff gelagert. Hierfür wurde das Zellpellet nach Ablösen von der Flasche und Zentrifugation in Cryo-SFM-Gefriermedium aufgenommen und auf eine Konzentration von 2·10⁶ Zellen pro ml und Kryogefäß (NHEK) bzw. 1·10⁶ Zellen pro ml und Kryogefäß (NHDF) eingestellt.

Die Zellen wurden mithilfe eines Gefriergefäßes graduell auf -80 °C eingefroren und in eine Lagertruhe in der gasförmigen Phase über flüssigem Stickstoff für die weitere Verwendung gelagert.

Für die Herstellung der Hautäquivalente wurden jeweils Zellen derselben Passage verwendet und zunächst expandiert. Für die Verwendung wurden die gefrorenen Zellsuspensionen aus dem Stickstofftank entnommen und für zwei Minuten bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine, mit frischem Medium befüllte und für mindestens 30 Minuten im Brutschrank äquilibrierte, Zellkulturflasche gegeben. Der erste Mediumwechsel erfolgte 24 Stunden nach der Reaktivierung, wobei Rückstände des Gefriermediums entfernt wurden.

2.2.2. Aufbau und Kultivierung der Hautäquivalente

Die Hautäquivalente wurden jeweils aus vorkultivierten primären Fibroblasten und Keratinozyten aufgebaut. Hierzu wurde jeweils ein Aliquot NHEK- bzw. NHDF-Zellen aufgetaut und die Zellen in Zellkulturflaschen für drei bis vier Tage unter zweimaligem Medienwechsel expandiert. Der Aufbau des dreidimensionalen Hautmodells erfolgte von unten nach oben. An Tag eins wurde hierbei die dermale Komponente des Äquivalentes aufgebaut. Während des Aufbaus wurden sämtliche Zutaten auf Eis gelagert.

Für den Aufbau der dermalen Komponente wurden primäre Fibroblasten aus der Zellkulturflasche abgelöst und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in der benötigten Menge Gelneutralisationslösung (GNL) resuspendiert. Pro Hautäquivalent wurden hierbei 50.000 primäre Fibroblasten eingesetzt, wobei eine Zellzahl von $3 \cdot 10^5$ Fibroblasten pro ml GNL eingestellt wurde. Die Kollagen-I-Lösung, welche vom Projektpartner, der Universität Würzburg /Fraunhofer IGB Stuttgart, bezogen wurde, wurde zunächst für 5 min bei 1000 g abzentrifugiert, um Luftblasen zu entfernen. Anschließend wurde die Konzentration mithilfe von 0,1 % Essigsäure auf die Arbeitskonzentration von 6 mg/ml eingestellt. Für die Herstellung der dermalen Komponente wurde daraufhin die Kollagenlösung im Verhältnis 2:1 (333 μl zu 167 μl pro Hautgel) zu den, in GNL gelösten, Fibroblasten gegeben und das Gemisch möglichst luftblasenfrei homogenisiert. Jeweils 500 μl des entstandenen Gemisches wurden anschließend mit einer Dispensierpipette rasch senkrecht in die vorbereiteten Zellkulturinserts gegeben und zum Gelieren für 20-30 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellkulturinserts mit den ausgehärteten Dermisäquivalenten für einen Tag submers in DMEM-Medium mit 10 % FKS, 2 mM Glutamin und 1 % NEAA kultiviert.

Nach 24 Stunden Kultivierung wurde die epidermale Komponente hinzugefügt. Zu diesem Zweck wurde das Medium abgezogen. Das trockene Äquivalent wurde mit 25 μl der Fibronectin-Gebrauchslösung (50 $\mu\text{g/ml}$) benetzt, welche die beiden Schichten des Äquivalents anstelle einer Basallamina trennt.

Nach 30-minütiger Beschichtung mit Fibronectin wurden die Keratinozyten aufgetragen. Hierzu wurden die vorkultivierten NHEK-Zellen trypsiniert, zentrifugiert und gezählt. Pro Äquivalent wurden 100.000 primäre Zellen in 100 µl KGM-2 ready + 5 % FKS (Konzentration: $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml) auf das Dermisäquivalent gegeben und für 45 min im Brutschrank adhärirt. Anschließend erfolgte die Präkultivierung und FKS-Entwöhnung der Äquivalente in einer 24-well-Platte über insgesamt sechs Tage. Hierbei wurde alle zwei Tage das Medium wie folgt gewechselt:

Tag 1 (Tag des Epidermis-Aufbaus) → submers in KGM-2 ready mit 5 % FKS

Tag 3 → submers in KGM-2 ready mit 2 % FKS

Tag 5 → submers in KGM-2 ready mit 0 % FKS

Tag 7 → von Flüssigkeit oberflächlich unbenetzt in *Airlift*-Medium

Nach der Umgewöhnung auf serumfreies Medium erfolgte ab dem siebten Tag die Differenzierung der Äquivalente. Hierfür wurden die Inserts mit den Äquivalenten mit einer sterilen Pinzette in neue Zellkulturplatten mit sechs Kavitäten umgesetzt. Bei der sogenannten *Airlift*-Kultivierung zur Differenzierung erfolgte die Medienversorgung ausschließlich durch die unter dem Hautgel befindliche semipermeable Membran, welche in direktem Kontakt zur Dermis des Äquivalentes steht. Hierfür wurde das Differenzierungsmedium (*Airlift*-Medium) in den Außenraum der Kavität neben dem Insert so eingefüllt, dass der Meniskus des Mediums, am Beginn etwa 3,5 ml, unter der Oberkante des Hautgels lag. Somit war die die epidermale Seite des Äquivalentes nicht von Medium benetzt. Eventuell vorhandene Mediumreste aus der vorherigen Präkultivierung oder Kondenswasser wurden mit einer 100 µl-Pipette jeweils umgehend entfernt.

In diesem *Airlift*-Kulturverfahren wurden die Äquivalente bis zu 21 Tage kultiviert und differenziert, wobei für die Infektionsstudien zumeist Äquivalente nach sieben Tagen Differenzierung verwendet wurden. Der Mediumwechsel der Äquivalente erfolgte alle zwei Tage. Dabei nahm bei die Menge des benötigten Mediums über die Kultivierungszeit ab, da im Laufe der Differenzierungszeit aufgrund von Umbauprozessen und Kollagenkondensation die Hautgele kontinuierlich dünner wurden [194, 195]. Es wurde gewährleistet, dass auch weiterhin die Oberfläche nicht mit Flüssigkeit benetzt wurde.

2.2.3. Kommerzielles Hautmodell (MatTek EpiDerm)

Für vergleichende Experimente und zur Methodenoptimierung wurde ein kommerzielles Hautmodell – EpiDerm EPI-200 – der Firma MatTek, Bratislava, SK verwendet. Dieses Modell besteht nur aus einer Epidermis aus differenzierten Keratinozyten, kultiviert in einem Zellkulturinsert mit einer semipermeablen Membran.

Nach Lieferung wurden die Zellkultureinsätze zunächst umgehend mit einer sterilen Pinzette in Kulturplatten mit sechs Kavitäten gesetzt und mit jeweils 900 µl Epi-100-MM-Medium für den Einsatz in den Versuchen für zwei Tage äquilibriert. Die folgende Kultivierung und Handhabung erfolgte laut mitgelieferten Herstellerprotokollen. Die Infektion erfolgte mit dem in Punkt 2.2.6 dargestellten Verfahren. Die Weiterkultivierung erfolgte jeweils in 900 µl neuem NMM-Medium im Zellkultureinsatz in mitgelieferten Kulturplatten mit 24 Kavitäten. Die Abnahmen für die Durchführung der RNA/DNA-Analytik, sowie der immunhistochemischen und elektronenmikroskopischen Analyse wurden äquivalent zu denen mit dem selbst aufgebauten Modell durchgeführt und sind ab Abschnitt 2.2.7 beschrieben.

2.2.4. Viren und Virusanzucht

Als Orthopockenvirus für die Infektionsversuche wurde das rekombinante Kuhpockenvirus CPVX BACWT (fCPXV) verwendet. Dieses Virus wurde freundlicherweise von Livia Schrick (RKI) aus Originalmaterial von Swaantje Roth und Dr. Karsten Tischer (Institut für Virologie, Freie Universität Berlin, D) zur Verfügung gestellt. Das Virus wurde durch Rekonstitution aus, mit einem speziellen BAC-Plasmid transfizierten, Vero-Zellen gewonnen. Das CPXV-BACWT enthält das gesamte Genom des weiterverbreiteten Kuhpockenvirus-Stammes *Brighton Red (BR)*. Zusätzlich wurde eine mini-F-Sequenz für die Plasmidreplikation in *E. coli* und ein GFP-Gen unter Kontrolle eines späten viralen Promotors in das Virusgenom integriert. Die rekonstituierten Viren enthalten weiterhin das gesamte Genom des Stammes *BR* und sind deshalb hinsichtlich Wachstumseigenschaften und genetischer Stabilität nahezu identisch zum Wildtypvirus [196]. Darüber hinaus erleichtert die rekombinante Expression des GFP-Gens die Nachweisbarkeit von infizierten Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie sogar in einem *Live cell*-Setup.

Vor Beginn der Arbeiten wurde das Virus angezogen und aliquotiert, um in jedem Experiment Aliquots derselben Passage frisch nutzen zu können. Für die Anzucht wurden konfluent gewachsene HEp-2-Zellen in T175-Flaschen mit Viruslösung einer MOI von 0,1 infiziert. Nach vier Tagen Inkubation im Brutschrank und dem Auftreten eines cytopathischen Effekts (CPE) wurden die Zellen per Zellschaber abgelöst, mit Überstand abgenommen und bei 4 °C 5 Minuten bei 1800 g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Tris-HCl-Lösung (10 mM) aufgenommen.

Anschließend wurden die Zellen mittels Dounce-Homogenisator durch mehrmaliges Auf- und Abziehen des Pistills aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden anschließend mittels Zentrifugation bei 500 g für 5 Minuten (4 °C) abgetrennt und in ein 15 ml Zentrifugengefäß gegeben, in welchem im Ultraschallbad eine einminütige Behandlung folgte. Hierdurch werden die freigesetzten Viruspartikel effektiv vereinzelt.

Anschließend wurde die Virussuspension auf ein 36-prozentiges Sucrose-Kissen gegeben und in der Ultrazentrifuge für 80 Minuten bei 32.900 g und 4 °C zentrifugiert, um die Viren zu pelletieren. Das Viruspellet wurde anschließend in 2 ml einer 1 mM Tris-HCl-Lösung aufgenommen und erneut ultraschallbehandelt. Anschließend wurde die Virussuspension aliquotiert und bei -80 °C für die weiteren Experimente gelagert. Der Virustiter wurde mittels Plaque-Neutralisations-Test (siehe 2.2.12) bestimmt und betrug bei der verwendeten Virussuspension $5 \cdot 10^9$ PFU/ml.

2.2.5. Infektionsversuche in Monolayerkultur

Zur Überprüfung der Infizierbarkeit der verwendeten Zellen und zum Vergleich mit den Hautäquivalenten wurden auch in klassischen Monolayerkulturen Infektionsversuche mit dem fluoreszenten Kuhpockenvirusisolat (fCPXV) durchgeführt. Für diese Infektionsversuche wurden jeweils entweder NHEK-, NHDF oder VeroE6- Zellen verwendet.

Für die Versuche mit anschließender Aufarbeitung von Nukleinsäuren und Proteinen wurden die Zellen in Mikrotiterplatten mit jeweils 24 Kavitäten infiziert. Hierfür wurden einen Tag vor Infektion $1,6 \cdot 10^5$ Zellen in 800 µl Medium in eine Kavität eingesät und für einen Tag im Feuchtbrutschrank inkubiert. Tags drauf wurden die Zellen mit Virus in der gewünschten MOI (0,001 - 5) infiziert und mit neuem Medium versorgt. Zwischen 2 h *post infectionem* (*p.i.*) und bis zu fünf Tagen (*p.i.*) wurden Zellen und Überstände geerntet.

Vor der Abnahme der Zellen und Überstände wurden die Platten jeweils fluoreszenz- und lichtmikroskopisch auf Virusreplikation und cytopathische Effekte überprüft und repräsentative Aufnahmen angefertigt. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und für eine spätere Virustitration bzw. Nukleinsäureaufreinigung bei -80 °C eingefroren. Die Zellen wurden für die Nukleinsäureextraktion in 700 µl RLT-Lysis-Puffer (+1 % β-ME) aufgenommen, durch Auf- und Abpipettieren lysiert und anschließend für die Präparation bei -80 °C eingelagert. Für die Proteinproben wurde die Aufnahme der Zellen entsprechend in RIPA-Puffer durchgeführt, wobei die Zellen hierfür mit einem Zellschaber vom Boden gelöst wurden.

Zur Anfertigung von Vergleichspräparaten für die immunhistochemischen Experimente wurden die 2D-Experimente entsprechend auch auf Kammer-Objektträgern, sogenannten *chamber slides*, durchgeführt. Hierfür wurden jeweils $8 \cdot 10^4$ Zellen in 250 µl Medium pro Kavität des Objektträgers mit acht Kammern eingesät und tags drauf mit der gewünschten MOI infiziert. Die Abnahme erfolgte nach der gewünschten Inkubationszeit. Hierfür wurde der Zellkulturüberstand verworfen und die Zellen für 30 Minuten mit 500 µl 4 %-Paraformaldehyd-Lösung je Kavität bei Raumtemperatur fixiert und anschließend für die Lagerung bei 4 °C bis zur immunhistochemischen Färbung mit IFA-Verdünnungspuffer überschichtet.

2.2.6. Infektionsversuche in Hautäquivalenten

Für die Infektionsstudien im 3D-Modell wurden ausschließlich vordifferenzierte Hautäquivalente verwendet. Diese wurden neben der einwöchigen submersen Kultivierung anschließend auch eine bis zwei Wochen in *Airlift*-Kultur unter zweitäglichem Medienwechsel differenziert, um eine hauttypische Morphologie und dreidimensionale Interaktionen zwischen den Zellen zu ermöglichen. In Vorversuchen im Rahmen der eigenen Diplomarbeit und dieser Arbeit wurde festgestellt, dass für die Infektion eine Verletzung der apikalen Epidermisschichten erforderlich ist.

Für die Infektion wurden die Inserts mit den Hautäquivalenten mithilfe einer Pinzette trocken in eine Petrischale umgesetzt. Anschließend wurden 10 µl der Virussuspension auf die epidermale Oberfläche der Hautäquivalente pipettiert. Zur Infektion wurden hochkonzentrierte Virussuspensionen von $1,5 \cdot 10^9$ oder $1,5 \cdot 10^7$ PFU/ml verwendet, was in etwa Verhältnissen von 100:1 bzw. 1:1 von infektiösen Viruspartikeln zur Zahl der für den Modellaufbau eingesetzten Zellen entspricht. Eine genaue MOI kann für diese Art von Versuchen nicht angegeben werden, da die Virussuspension nur lokal begrenzt auf die Zellen einwirkt. In dem Bereich der Viruszugabe ist der Anteil infektiöser Viren pro Zelle deshalb deutlich höher als in Bereichen ohne direkten Kontakt zur aufgetragenen Virussuspension.

Nach dem Auftragen der Virussuspension wurden die Hautäquivalente reproduzierbar verletzt. Hierfür wurde eine sterile, zweizackige Impfnadel verwendet, mit welcher durch fünfzehn gleichmäßig angeordnete Einstiche die Suspension über die gesamte Oberfläche der Hautgele verteilt und eingepft wurde. Für die Kontrollen wurden jeweils 10 µl an entsprechendem Medium auf die Oberfläche der Hautgele gegeben und mit der Impfnadel eingestochen.

Anschließend wurden die infizierten Hautäquivalente in eine Kulturplatte mit 6 Kavitäten überführt und im *Airlift*-Verfahren unter zweitäglichem Medienwechsel weiterkultiviert. Dabei wurde weiterhin die Oberfläche des Hautäquivalents frei von Medium und Kondenswasser gehalten.

Für die Untersuchung von infektiösen Viruspartikeln und viraler DNA im Zellkulturüberstand wurden entsprechend jeweils 500 µl des umgebenden Mediums abgenommen und für die Nutzung im Plaque-Titrationstest bzw. für die DNA-Präparation bei -80°C gelagert. Die Abnahme der Hautäquivalente für die weiteren Untersuchungen wurde je nach Versuchsplan zwischen 4 h und bis zu zehn Tagen *p.i.* durchgeführt. Je nach gewünschter Downstream-Analytik wurde die Abnahme und anschließende Probenaufbereitung und -lagerung angepasst.

Proben für die immunhistochemischen Analysen wurden mit einem schmalen Plastikspatel aus dem Insert entnommen und in einer 24-well-Mikrotiterplatte für mindestens 2 h mit 4 % PFA-Lösung fixiert, sowie über Entwässerung weiter aufgearbeitet (siehe 2.2.13).

Proben der Hautäquivalente für die Elektronenmikroskopie wurden samt Insert in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit etwa 5 ml Klinikfixans gegeben, für zwei Stunden bei Raumtemperatur fixiert und anschließend für die weitere Verwendung bei 4 °C gelagert.

Bei Proben für die Nukleinsäure- und Proteinanalytik wurden Dermis und Epidermis entweder getrennt oder als ein Stück aufgearbeitet. Für letztere Aufarbeitung wurde des Hautäquivalent aus dem Insert entnommen, komplett in ein Mikroschraubkappenröhrchen mit Zirkonium-Beads in 700 µl RLT-Puffer + 1 % β-ME gegeben und anschließend bei -80 °C gelagert.

Da sich eine getrennte Analytik nach Dermis und Epidermis für die spezifischere und gründlichere Untersuchung von viral beeinflussten Prozessen und regulierten Genen im Laufe des Projektes als vorteilhaft erwies, wurde das Trennverfahren neu etabliert und standardmäßig verwendet. Die Dispase-Separation ist dabei der Trennung von Epidermis und Dermis bei der Isolation primärer Zellen entlehnt [197]. Hierfür wurde das Hautäquivalent mithilfe eines Plastikspatels aus dem Insert entnommen und in eine sterile Petrischale gegeben. Anschließend wurde das Hautäquivalent in der Petrischale jeweils viermal mit jeweils 3 ml PBS⁻ so gewaschen, dass die gesamte Fläche von Mediumresten gereinigt wurde. Danach wurden 3 ml Dispase-Lösung (2 U/ml in PBS⁻) in die Petrischale gegeben, sodass das Hautäquivalent komplett bedeckt war, und für 30 Minuten bei 37 °C im Feuchtbrutschrank inkubiert. Während dieser Zeit werden die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen zwischen Fibroblasten und Keratinozyten rund um die Basallamina gelöst. Nach der Inkubation wurde die Dispase-Lösung verworfen und Epidermis und Dermis konnten einfach durch Abziehen der Epidermis mit einer Pinzette getrennt werden. Beide Schichten des Hautäquivalentes wurden daraufhin in separate Mikroschraubkappenröhrchen mit Zirkonium-Beads in 700 µl RLT-Puffer + 1 % β-ME gegeben und für die weitere Prozessierung bei -80 °C eingelagert. Die Güte der Trennung konnte später über Expressionsanalysen des spezifischen Markers Laminin-γ2 überprüft werden. Dieser wird hauptsächlich in epidermalen Keratinozyten exprimiert und kann damit Hinweise auf epidermale Verunreinigungen in Dermis-Präparationen liefern [198].

2.2.7. Extraktion von Nukleinsäuren und Proteinen

Im Verlauf der Versuche wurden verschiedene Extraktionsprotokolle angewendet, getestet und optimiert. Hierbei hat sich für die Nukleinsäure-Extraktion der 2D-Proben die Durchführung mit dem RNeasy-Kit von Qiagen bewährt, während das optimale Aufreinigungsverfahren für die 3D-Proben das Allprep DNA/RNA/Protein-Kit (Qiagen) war.

Die in RLT lysierten und bei -80 °C gelagerten Zellen aus Monolayer-Kulturen (siehe 2.2.5) wurden dabei auf Eis aufgetaut, per Vortex gemixt und anschließend mit 350 µl 70 % Ethanol versetzt auf die RNeasy-Säule gegeben. Die Waschschritte und Elution erfolgten nach Herstellerprotokoll.

Hierbei wurde die Nukleinsäurefraktion, welche sowohl DNA als auch RNA enthält, in 80 µl RNase-freiem-Wasser eluiert und für die weitere Verwendung aliquotiert. 54 µl des Eluats wurden dabei für den anschließenden DNase-Verdau und die cDNA-Synthese (siehe RNA-Prozessierung 2.2.8) eingesetzt. Der verbliebene Teil wurde für die DNA-Analytik in der qPCR eingesetzt (siehe 2.2.9) und dafür bei -20 °C gelagert.

Die, bei -80 °C in Mikroschraubröhrchen mit Zirkonium-Beads gelagerten, Proben der dreidimensionalen Kulturen wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden die Proben im *FastPrep*-Homogenisator drei Mal bei 6 m/s für 20 s homogenisiert, um Dermis und Epidermis vollständig im β-ME-haltigen Puffer zu lysieren. Anschließend wurden die Proben für 3 Minuten bei 8000 g abzentrifugiert, um eventuell noch vorhandene Zelltrümmer abzutrennen. Darauf wurden 350 µl des Homogenates auf die Allprep-DNA-Säule gegeben und weiter laut Herstellerprotokoll verfahren. Dabei wurde zuerst die RNA mithilfe einer RNeasy-Säule aus dem Durchfluss der DNA-Säule gewonnen. Die Elution der RNA erfolgte in 60 µl RNase-freiem Wasser. Mit dem Eluat wurde die Säule ein zweites Mal eluiert. Die extrahierte RNA wurde umgehend auf Eis gelagert.

Nach der RNA-Extraktion wurde im Protokoll mit der Proteinfällung fortgefahren. Hierfür wurde der erste Durchlauf der RNeasy-Säule im Verhältnis 1:1 mit APP-Puffer versetzt und unter gelegentlichem Mixen für etwa 15 Minuten bei Raumtemperatur gehalten. Die gefällten Proteine wurden daraufhin für 10 Minuten bei 21.000 g abzentrifugiert, das Pellet in 500 µl 70 % Ethanol gewaschen, in 100 µl ALO-Puffer (DTT-haltiger Lämmli-Puffer) aufgenommen und bis zur Analytik (siehe 2.2.11) bei -80 °C gelagert.

Während der Inkubationszeit der Proteinextraktion wurde die Aufreinigung der DNA fortgesetzt. Hierfür wurde die Säule nach Herstellerangabe gewaschen und die DNA in 100 µl, auf 70 °C vorgewärmten, EB-Puffer eluiert. Bis zur PCR-Analytik (siehe Abschnitt 2.2.9) wurden die DNA-Proben bei -20 °C gelagert.

2.2.8. RNA-Prozessierung

Die Reste der genomischen DNA in den RNA-Proben wurden mittels DNase-Verdau entfernt. Dies spielt vor allem bei den Monolayer-Proben eine Rolle, da DNA und RNA hierbei gleichzeitig eluiert werden. Bei 3D-Proben werden durch die Allprep-Prozedur mit vorgeschalteter DNA-Säule beide Nukleinsäuren zwar bereits effizient getrennt, nichtsdestotrotz wurden auch diese RNA-Proben nochmals mit DNase verdaut, um hochreine RNA für die weitergehenden Versuche zu erhalten. Der DNase-Verdau wurde mittels Ambion's Turbo DNA-free-Kit durchgeführt. Dabei wurden 54 µl RNA mit 6 µl 10x-Puffer und 1 µl DNase für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend die Reaktion mit 2 µl Stopplösung (3 Minuten mixen bei RT) beendet.

Anschließend wurde die bead-haltige Stopplösung über Zentrifugation (3 min, 16.000 g) abgetrennt und die RNA in neue Reaktionsgefäße überführt.

Die gereinigte RNA wurde daraufhin spektralphotometrisch per Nanodrop-Verfahren aus einer 1,5 µl Probe quantifiziert. Die RNA-Konzentration wurde über die Absorption der Probe bei 260 nm unter Zuhilfenahme folgender Formel bestimmt: $1 OD_{260} = 40 \frac{\mu g}{ml} RNA$

Die Reinheit der Nukleinsäuren wurde als Quotient der Absorption bei 260 und 280 nm ermittelt, welcher bei einer guten Präparation zwischen 1,9 und 2,0 liegen muss. Nach der Quantifizierung wurde die RNA in Vorbereitung auf den Einsatz in der *Real-time*-PCR in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden *TaqMan* Reverse Transcription-Reagenzien eingesetzt.

Für die cDNA-Synthese wurden Oligo-dT-Primer verwendet, welche an die Poly-A-Enden polyadenylierter RNA-Moleküle (z. B. mRNA) selektiv binden. Hierfür wurden 10,3 µl RNA-Lösung mit 1 µl Oligo-dT-Lösung (50 µM) zusammengegeben und für 5 Minuten bei 65°C im Thermocycler hybridisiert. Anschließend wurde bei 4°C im Thermocycler der Mastermix (siehe Tabelle 18) zugegeben und die Amplifikation laut Thermoprofil (siehe Tabelle 19) durchgeführt.

Tabelle 18: Zusammensetzung eines Ansatzes des Mastermixes der cDNA-Synthese

Reagenz	Volumen je Ansatz [µl]
Puffer 10x	2
MgCl ₂ 25 mM	4,4
dNTPs 25 mM	1,6
RNase Inhibitor	0,4
Superscript Reverse Transkriptase	0,3
template RNA + Oligo dT	11,3
Summe	20

Tabelle 19: Thermoprofil der cDNA-Synthese

Temperatur	Zeit [min]
42°C	60
95°C	7
4°C	bis zur Lagerung

Zur Detektion von möglicherweise noch vorhandenen DNA-Resten nach dem Verdau wurde jeweils eine Probe (mit hohem Nukleinsäuregehalt) ohne den Zusatz von reverser Transkriptase mitgeführt. Das jeweilige Volumen wurde durch RNase-freies Wasser aufgefüllt. In allen getesteten Proben dieser Arbeit konnte ein vollständiger DNA-Verdau erreicht werden.

Die cDNA wurde bis zur Analyse in der qPCR bei -20 °C gelagert.

2.2.9. Quantitative PCR

Zur schnellen und spezifischen Quantifizierung der extrahierten und aufbereiteten Nukleinsäuren wurden quantitative PCRs (qPCRs) durchgeführt. Dieses, aufgrund der *online*-Detektion auch *Real-time* PCR genannte, Verfahren kam dabei sowohl zur Quantifizierung viraler DNA und Transkripte als auch zur Quantifizierung zellulärer DNA und Transkripte zum Einsatz.

Für die Signaldetektion wurden spezifische Sonden im *TaqMan*-Format (5'-Nuklease-Assay) verwendet, wobei das detektierte Signal bei diesem Verfahren durch den Abbau der Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der verwendeten Polymerase und die damit verbundene Trennung von Reporter- und Quencher-Farbstoff entsteht [199].

Die qPCRs wurden mit Hilfe des *TaqMan*-Systems 7500 von Applied Biosystems in passenden 96-*well*-Platten durchgeführt. Der qPCR-Ansatz für eine 25 µl-Reaktion mit klassischem Format (Primer/Sonde) ist exemplarisch in Tabelle 20 gezeigt. Für die kommerziell erworbenen *TaqMan*-Assays zur Nachtestung von regulierten Genen wurde der Ansatz gemäß Tabelle 21 modifiziert. Die qPCRs wurden jeweils nach dem in Tabelle 22 gezeigten Thermoprofil durchgeführt. Die qPCRs wurden für die Proben in der Regel in Doppelbestimmung ausgeführt und der Ansatz bei Auffälligkeiten wiederholt.

Tabelle 20: Reaktionsansatz für eine PCR-Reaktion mit Primern und Sonden

Reagenz	Volumen je Ansatz [µl]
aqua bidest	14,15
Puffer 10x	2,5
MgCl ₂ 50 mM	2
dNTPs 2,5 mM	2
Sense Primer 10 µM	0,75
Antisense Primer 10 µM	0,75
Sonde 10 µM	0,25
Platinum <i>Taq</i> -Polymerase 5 U/µl	0,1
<i>template</i> DNA/cDNA	2,5
Summe	25

Tabelle 21: Reaktionsansatz für eine PCR-Reaktion mit kommerziellem *TaqMan*-Assay (Stocklösung aus Primern und Sonde)

Reagenz	Volumen je Ansatz [µl]
aqua bidest	15,4
Puffer 10x	2,5
MgCl ₂ 50 mM	2
dNTPs 2,5 mM	2
Primer/Sonde-Stock	0,5
Platinum <i>Taq</i> -Polymerase 5U/µl	0,1
<i>template</i> DNA/cDNA	2,5
Summe	25

Tabelle 22: Thermoprofil der qPCR

Temperatur	Zeit [s]	Zyklen
95°C	600	1
95°C	10	} 45
60°C	35*	

* Messung

Die Quantifizierung erfolgte je nach benötigter Auswertungsart entweder absolut oder relativ nach $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Zur absoluten Quantifizierung standen für die verwendeten *inhouse*-Assays humaner Gene (Tabelle 15) und für das virale Target I7L (CPXV086) selbst generierte Plasmidstandards zur Verfügung, welche in einer Verdünnungsreihe von 10^6 bis 10^1 Kopien/ μl eingesetzt worden sind. Über die Erstellung einer Standardgerade durch halblogarithmische Auftragung der Werte wurden die absoluten Kopiezahlen des jeweiligen Gens für die Auswertung ermittelt. Alle Assays zeigten dabei Effizienzen von über 90 %, zumeist sogar über 95 %.

Die relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode kam insbesondere für die Berechnung der *Foldchanges* zellulärer Gene im Infektionsverlauf zum Einsatz [200]. Die Normalisierung erfolgte hierbei auf die vier zellulären Referenzgene MYC, TBP, GAPDH und $\beta 2\text{M}$, welche im jeweiligen Setup (Hautmodell, Infektion mit CPXV) laut Literatur [201, 202] und in der betreuten Masterarbeit von Marlena Stadtmüller eine gute Stabilität zeigten [198].

Für die Berechnung der *Foldchanges* k zwischen Probe und Kontrolle wurde jeweils für alle Proben und durchgeführten PCRs ein Intensitätsschwellenwert (*Threshold*) von 80.000 Einheiten zur Ermittlung des Ct-Wertes angenommen und folgende Formel benutzt:

$$k = 2^{((\text{Ct}_{Pr,X} - \text{Ct}_{Pr,Rg}) - (\text{Ct}_{Ko,X} - \text{Ct}_{Ko,Rg}))}$$

Ct Pr bzw. Ko stellen die Ct-Werte von Probe und Kontrolle vom betrachteten Zielgen (X) bzw. Referenzgen (Rg) dar.

Zur Berechnung der statistischen Signifikanzen der Expressionsänderungen wurde der Student's t-test aus Excel verwendet und auf die jeweiligen ΔCt -Werte der betrachteten Gruppen angewendet.

2.2.10. NGS-basierte Transkriptomanalytik

Zum Zwecke der *open view* Transkriptomanalyse wurden mit repräsentativen Proben RNA-Sequenzierungsläufe durchgeführt. Hierfür wurde im Vorhinein die Qualität und Quantität der verwendeten RNA-Proben über die standardmäßig durchgeführte spektralphotometrische Analyse im Nanodrop-Verfahren hinaus eruiert. Die RNA wurde dazu im Qubit 2.0 unter Verwendung des Qubit RNA HS Assay Kit quantifiziert, wobei die fluorometrische Markierung der RNA etwas genauer ist als im Nanodrop-Verfahren.

Die RNA-Integrität ist ein sehr wichtiges Qualitätskriterium der, vor Start des NGS-Laufes etwa sechs Monate bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten, Proben. Die Qualität wurde mittels Bioanalyzer unter Verwendung des total RNA 6000 Pico Kits (Agilent) über elektrophoretische Auftrennung der markierten RNA-Fragmente geprüft, wobei aus den Elektrophoresedaten zur Integrität ribosomaler RNA automatisch RIN-Werte berechnet wurden, welche Aufschluss über die RNA-Qualität geben. Dabei steht ein RIN-Wert von 10 für die höchste RNA-Integrität, wobei in der Praxis Werte zwischen 8 und 10 für sehr gute RNA-Qualität stehen.

Als Sequenzierungsverfahren wurde eine Illumina-Sequenzierung in Kombination mit einer TrueSeq RNA Library-Präparation laut Standardprotokollen durchgeführt. Die Library wurde nach der Präparation mit dem TrueSeq RNA Sample Preparation Kit v2 von Illumina zunächst mit dem KAPA Library Quantification Kit quantifiziert und die Größe mittels High Sensitivity DNA Analysis Kit im Bioanalyzer bestimmt. Anschließend wurde die cDNA auf eine Konzentration von $12\text{ }\mu\text{M}$ eingestellt, auf den Illumina HiSeq 1500 geladen und dort im *rapid mode* sequenziert. Zur Generierung der Cluster auf dem Chip des Gerätes wurde das TruSeq Rapid PE Cluster Kit – HS genutzt. Die folgende Sequenzierung wurde mit dem HiSeq Rapid SBS Kit – HS im paired-end Verfahren mit $101 + 101$ Basen durchgeführt. Dabei diente 1 % der PhiX Control v3 als Qualitätskontrolle.

Die generierten Daten wurden von Wojtek Dabrowski zunächst aufgrund der verschiedenen Adaptoren nach den einzelnen Proben getrennt und als einzelne Fasta-Dateien je Probe gespeichert. Die Qualitätskontrolle und die weitere Auswertung wurden eigenhändig mit dem Programm Partek Flow durchgeführt (siehe Workflow in Abbildung 6).

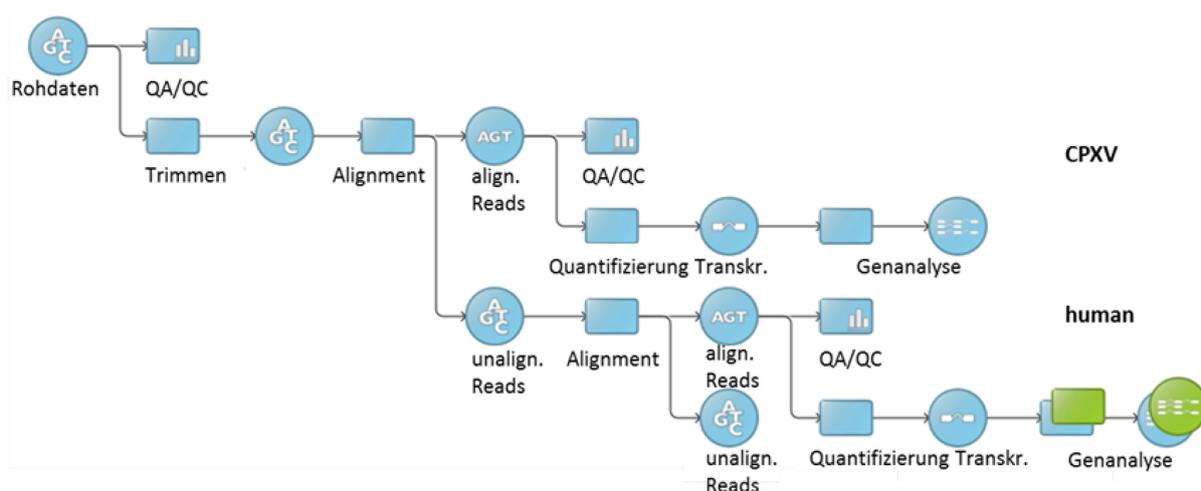


Abbildung 6: Schematischer Ablauf der Analyse der NGS-Transkriptomdaten. Dargestellt ist hierbei der Ablauf im Programm „Partek Flow“ von den unalignierten Rohdaten der Reads bis zu den fertigen Listen der Gene auf Gen- (blau) bzw. Transkriptebene (grün).

Zunächst wurde dabei die Quantität und Qualität der *Reads* eruiert und die Anzahl der zu trimmenden Basen ermittelt. Anschließend wurden die *Reads* getrimmt (8 Basen vom 5'-Ende und 1 Base vom 3'-Ende), sodass mit *Reads* von 92 Basenpaaren Länge weitergearbeitet wurde. Diese wurden zunächst mit Bowtie2 gegen das Referenzgenom des Kuhpockenstammes CPXV *Brighton Red* (AF482758) aligniert. Anschließend erfolgte im Falle eines erwünschten Vergleiches des viralen Transkriptoms von verschiedenen Proben die Quantifizierung auf eine Million *Reads* und die Analyse der Genregulation mittels eines Partek-eigenen Algorithmus zur genspezifischen Analyse. Dieser Algorithmus testet zunächst die statistische Verteilung der *Reads*, wählt ein passendes Model für das individuelle Gen in der gewählten Konfiguration und berechnet schließlich für jedes Gen separat die jeweilige Expressionsänderung zwischen den zwei gewählten Gruppen.

Nach der Auswertung für die viralen *Reads* wurden die, im ersten Schritt gespeicherten, nicht alignierten Reads wiederum eingesetzt, um sie mittels Bowtie2 gegen das humane Genom zu alignieren. Als Referenz diente dabei GRCh37 (hg19) Version 67, RefSeq. Die alignierten *Reads* wurden quantifiziert, normalisiert und schließlich die Expressionsänderung zwischen zwei Gruppen berechnet und als Genliste ausgegeben. Die Analyse wurde jeweils unter Berücksichtigung der Isoformen und ohne Isoformen auf Genebene durchgeführt, wobei in dieser Arbeit nur die Auswertungen ohne Berücksichtigung der Isoformen aufgeführt sind. Diejenigen *Reads*, welche weder auf das humane noch das kuhpockenvirale Genom trafen, wurden stichprobenartig auf mögliche Kontaminationen geprüft.

Aus den Genlisten wurden bestimmte Gene mit spezifischer Bedeutung oder starker Regulation selektiert. Gene wurden dabei als reguliert angesehen, wenn sich die normalisierte Expression zwischen Untersuchungsgruppe und Kontrollgruppe bei einer signifikanten *false discovery rate* (FDR) von unter 0,05 und einer *Read*-Anzahl von mindestens 100 um mehr als das Doppelte nach oben oder unten unterschied. Diese hochregulierten oder herunterregulierten Gene wurden dann weiter mit den genannten Labor-Methoden (qPCR, Western Blotting, Immunhistochemie) geprüft, weiter analysiert und flossen über sogenannte *GO term enrichment* Analysen mittels Cytoscape (ClueGO) [203] oder David 6.8 [204] in die gezeigten Tabellen ein.

2.2.11. Proteinanalytik

Zur Charakterisierung der Differenzierung von Hautäquivalenten, des Infektionsverlaufes und zur funktionellen Bestätigung der Ergebnisse aus den Expressionsuntersuchungen auf Transkriptom-Ebene wurde eine Proteinanalytik mithilfe von SDS-Page und Western Blot durchgeführt.

Hierbei kamen die Extrakte des Hautmodells aus der kombinierten Extraktion (siehe 2.2.7) zum Einsatz. Für die 2D-Proben wurden die RIPA-Lysate (siehe 2.2.5) verwendet.

Die bei -80 °C gelagerten Proteinproben wurden zunächst auf Eis aufgetaut und anschließend für 10 Minuten bei 95 °C denaturiert. Zur weiteren Denaturierung und Entfaltung wurden die Proben daraufhin für zweimal jeweils 30 Sekunden bei 4 °C bei voller Intensität mit Ultraschall behandelt.

Um vergleichbare Mengen Protein für alle Proben zu laden, wurde der Proteingehalt jeweils quantifiziert und auf 20 µg eingesetzte Proteinmenge vorverdünnt. Zur Quantifizierung wurde ein Tryptophan-Fluoreszenz-Assay eingesetzt, bei welchem die Proteine über die spezifische Fluoreszenz der Aminosäure Tryptophan quantifiziert werden. Dieser Assay ist äußerst robust und sensitiv und interferiert nicht mit dem SDS- und Bromphenolblau-haltigen Probenpuffer. Der Tryptophan-Assay wurde in einer weißen Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten durchgeführt. Zur Durchführung wurde eine Tryptophan-Standardgerade zwischen 0,9 und 0,05 µg Tryptophan per Kavität in 200 µl Puffer eingesetzt. Um Effekte des Probenpuffers auszuschließen, wurden die Standardkonzentrationen in einer Lösung aus 5 % ALO-Puffer in Millipore-Wasser angesetzt. Die Proben wurden entsprechend 1:20 in Millipore-Wasser verdünnt eingesetzt. Die anschließende Messung erfolgte im Tecan InfiniteM200 Pro-Plattenlesegerät, wobei die Intensität der Fluoreszenzemission nach Laser-Anregung bei einer Wellenlänge von 295 nm bei einer Wellenlänge von 350 nm gemessen wurde. Diese steht in direktem Verhältnis zur enthaltenen Tryptophan-Menge und wurde anhand der, in der Standardgerade ermittelten, Tryptophan-Menge in den Gesamtproteingehalt umgerechnet. Hierbei wird angenommen, dass Tryptophan 1,19 % des Gesamtaminosäuregehaltes ausmacht [205].

Für die SDS-Page wurden die Proben mit ALO-Puffer verdünnt und auf 20 µg Gesamtprotein pro Geltasche eingestellt. Anschließend wurden die Proben mit 5x konzentriertem Probenpuffer versetzt, für 10 Minuten bei 95 °C erhitzt, per Vortex gemischt und für die SDS-Page eingesetzt. Hierbei werden die denaturierten Proteine anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Für die SDS-Page wurden Polyacrylamid-Fertiggele (Mini-PROTEAN TGX Precast Gels 4-20 %, Biorad) verwendet, im Mini-Protean Tetracell-System (Biorad) eingespannt und die Kammer mit Tris-Glycin-SDS-Laufpuffer befüllt. Pro Geltasche wurden 30 µl Probe geladen. Als Marker wurden 8 µl des PageRulers mit einem Molekulargewichtsbereich von 10 bis 170 kDa oder 2 µl des chemilumineszenten SuperSignal Markers (jeweils ThermoScientific) mit einem Bereich von 20 bis 150 kDa genutzt. Der Lauf dauerte 30 Minuten bei 200 Volt, bis die Farbstofffront gerade bis zum unteren Ende des Gels gelaufen war.

Die Gele wurden für den folgenden Western Blot kurz in Wasser abgespült und in Transferpuffer äquilibriert. Nach 30-sekündiger Methanolaktivierung wurden die PVDF-Membran und die Filterpapiere für 5 Minuten in Transferpuffer äquilibriert und darauffolgend das Blotsandwich aufgebaut. Zum *semi-dry-Blotting* wurde das Trans-Blot-System von Biorad verwendet, wobei das Blotting für Proteine im mittleren Molekulargewichtsbereich für 7 Minuten bei 2,5 A (bis zu 25 Volt) durchgeführt wurde.

Nach Abschluss des Blottings wurde die Membran in Blockpuffer transferiert und für eine Stunde in dem milchpulverhaltigen Puffer geschwenkt, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem, jeweils in der angegebenen Verdünnung (Tabelle 9) in Blockpuffer gelösten, primären Antikörper. Die Inkubation wurde in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen im Rotator entweder für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen in PBS-T wurde ebenso mit dem jeweiligen Detektionsantikörper (siehe Tabelle 10) inkubiert, welcher mit dem Enzym HRP gekoppelt war und somit chemilumineszent zu detektieren war. Anschließend wurde erneut gewaschen und der Blot für 5 Minuten mit 1 ml des Western Dura Substrates (ThermoScientific) inkubiert. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte anschließend im ChemiDoc Imaging System (Biorad) mit Auswertung über das Programm ImageLab.

2.2.12. Bestimmung der Plaque-bildenden Einheiten (PFU)

Zur Quantifizierung des Anteils infektiöser Viruspartikel in Zellkulturüberständen wurde ein Plaque-Titrationstest durchgeführt. Der Test nutzt die Fähigkeit infektiöser Viruspartikel, in einem Monolayer von Zellen einen makroskopisch sichtbaren cytopathischen Effekt hervorzurufen, der durch morphologische Veränderungen und das Absterben der infizierten Zellen ausgelöst wird. Jedes infektiöse Viruspartikel infiziert hierbei anfangs nur eine Zelle. Da die infizierten Zellen mit Carboxy-Methyl-Cellulose überschichtet werden, breitet sich die Infektion nur von Zelle zu Zelle aus und ein infektiöses Viruspartikel verursacht schließlich genau ein Loch im Zellrasen (Plaque).

Nach Färbung der Zellen können die Plaques auch makroskopisch als weiße Flecken von den blau gefärbten, intakten Zellen unterschieden und gezählt werden. Alle auszählbaren Verdünnungsstufen flossen dann in die Berechnung der Anzahl der infektiösen Partikel pro ml (PFU/ml) ein:

$$\frac{PFU}{ml} = n * V * VF$$

n: Anzahl der gezählten Plaques; V: Volumen der Virussuspension; VF: Verdünnungsfaktor.

Zur Durchführung des Plaque-Tests wurden $8 \cdot 10^4$ VeroE6-Zellen in 400 µl Kulturmedium in eine Mikrotiterplatte mit 48 Kavitäten ausgesät. Tags darauf wurden je 200 µl der Virussuspension je nach zu erwartendem Virustiter in dekadischen Verdünnungsstufen im Zwei- bis Dreifachansatz zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden im Feuchtbrutschrank wurden die infizierten Zellen mit 200 µl CMC-Lösung überschichtet und für mindestens weitere vier Tage bei 37 °C inkubiert. Nach Abnahme des Zellkulturüberstandes wurden die Zellen mit 3,7 %iger Formaldehyd-Lösung für mindestens 20 Minuten bei RT fixiert. Anschließend wurde die Formaldehyd-Lösung entfernt und die Zellen für 20 Minuten mit Naphthol-Blue-Black-Lösung gefärbt.

Nach Spülen mit Wasser und anschließender Trocknung wurden die Plaques ausgezählt. Hierbei waren nur Verdünnungsstufen mit weniger als 150 Plaques auszählbar.

2.2.13. Fixierung, Vorbereitung und immunhistochemische Analysen

Die Hautpräparate, welche für die immunhistochemischen Analysen bestimmt waren, wurden nach einem speziellen und mehrfach optimierten Protokoll bearbeitet. Zunächst wurden die Hautäquivalente vorsichtig aus den Kulturschalen gehoben und mittels Kunststoffspatel aus den Inserts entnommen. Während der gesamten Aufbereitung wurde darauf geachtet, die Präparate möglichst geringen Kräften auszusetzen, um sie zerstörungsfrei zu schneiden. Die Hautäquivalente wurden in 4 %-PFA-Lösung für mindestens 2 h bei Raumtemperatur fixiert, um die Gewebestruktur durch Quervernetzung zu erhalten und die biologisch aktiven Bestandteile (Viren, Zellen) zu inaktivieren. Anschließend wurden die fixierten Hautäquivalente mittels 15 % und 30 %-Sucroslösung jeweils einen Tag entwässert, da so die Gewebeintegrität beim Schneidevorgang bestmöglich erhalten werden konnte. Das Absinken der, zuerst oberflächlich schwimmenden, Äquivalente in die Sucroslösung zeigte hierbei an, dass diese ausreichend entwässert worden waren. Anschließend wurden die entwässerten Äquivalente in ein Probengefäß mit luftblasenfreiem TissueTek-Einbettmedium gegeben und 2 h (RT) inkubiert, damit das Einbettmedium das Gewebe durchdringen konnte. Die äquilibrierten Äquivalente wurden anschließend per Pinzette zentriert und im Probengefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zum Anfertigen von Gewebeschnitten wurden die Präparate auf -20 °C temperiert und mittels TissueTek auf den Objektisch in das Kryomikrotom gegeben. Anschließend wurden die Präparate zugeschnitten, sodass sich die Schnittebene für den Beginn der Serienschnitte etwa in der Mitte des Äquivalentes befand. Bei einer Kammertemperatur von -20 °C und -22 °C Messertemperatur wurden anschließend Serienschnitte mit Dicken zwischen 8 und 12 µm angefertigt und je drei Schnitte pro Präparat auf Superfrost Gold Objektträger übertragen. Objektträger mit Schnitten wurden bis zur Färbung bei -20 °C gelagert.

Für die immunhistochemische Färbung wurden die Objektträger bei Raumtemperatur äquilibriert und die Schnitte mit hydrophobem Fettstift umkreist. Nach dreimaligem Waschen in PBS⁻ erfolgte zuerst eine Färbung mit AlexaFluor-594-markiertem Weizenkeimagglutinin (WGA), welches N-Acetylglucosamine und Sialinsäuren auf der Plasmamembran bindet und färbt. Hierfür wurden je 50 µl WGA-Lösung (5 µg/ml) auf die Schnitte gegeben und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach drei Waschschrritten in PBS⁻ wurden die Schnitte für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 0,2 %-Triton-X100-Lösung permeabilisiert und erneut gewaschen. Anschließend folgte die Inkubation mit 50 µl des primären Antikörpers (1 h, 37 °C, feuchte Atmosphäre), welcher laut Tabelle 9 verdünnt in IFA-Puffer eingesetzt wurde.

Anschließend wurde erneut gründlich gewaschen und die Inkubation (1 h, 37 °C, feuchte Atmosphäre) mit dem jeweilig benötigten Sekundärantikörper laut Tabelle 10 durchgeführt. Die Detektionsantikörper waren hierbei FITC, Alexa Fluor-555 oder Alexa Fluor-647 gelabelt, um die Fluoreszenz-Signale der bindenden Primärantikörper später sichtbar zu machen. Nach der Inkubation und anschließenden Waschschritten wurden die Objektträger getrocknet und mit je 15 µl Fluoreszenz-Eindeckelmedium überschichtet. Dieses dient neben der Fluoreszenzkonserierung auch zur Färbung doppelsträngiger DNA mit dem enthaltenen Farbstoff DAPI, der in die Nukleinsäuren interkaliert. Anschließend wurden die Objektträger mit Deckgläsern verschlossen und bis zur Analyse am Fluoreszenzmikroskop bei 4 °C gelagert. Die Färbung der 2D-Präparate auf den Objektträgern erfolgte nach dem identischen Färbeprotokoll wie für die 3D-Schnittpräparate.

Zur Detektion apoptotischer Zellen wurde anstelle der beschriebenen Antikörperfärbung eine TUNEL-Färbung mit dem „*in situ* Cell Death Detection“-Kit (Roche) durchgeführt. Der TUNEL-Assay ist hierbei ein Detektionssystem für den terminalen Schritt der Apoptose, mit welchem die fragmentierte DNA aus den Zellkernen an ihren freien 3'-OH-Enden spezifisch mit dem Enzym TdT gefärbt wird. Hierfür wurde anstelle der Färbung mit dem Primärantikörper mit reinem IFA-Puffer inkubiert und anstelle der Inkubation mit dem Sekundärantikörper mit dem TUNEL-Assay-Reagens gefärbt, welches nach Herstellerprotokoll angesetzt wurde. Nach der einstündigen Inkubation bei 37 °C wurde mit den Waschschritten und dem Eindeckeln nach Protokoll (siehe oben) fortgefahren.

Die Auswertung erfolgte durch Anfertigung repräsentativer Aufnahmen mithilfe des konfokalen Laserscanning-Mikroskops LSM780. Hierfür wurden jeweils infizierte bzw. behandelte Präparate mit denselben Laserintensitäts- und Belichtungseinstellungen untersucht wie die respektiven Kontrollen. Die Auswertung und Bearbeitung der Fotos erfolgte mit Carl Zeiss Zen 2010.

2.2.14. Transmissionselektronenmikroskopie

Zur feinmikroskopischen Untersuchung des Differenzierungsstatus der Hautäquivalente, der Lage und Morphologie der infizierten Zellen sowie der viralen Partikel wurden Präparate angefertigt, welche mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht wurden.

Hierfür wurde das Präparat zum Strukturerehalt mit Klinikfixans fixiert (1 h, RT). Die Probenpräparation und Visualisierung wurde am Fachbereich ZBS 4 des RKI von Gudrun Holland, Lars Möller und Michael Laue gemäß einem Standardprotokoll durchgeführt [206], welches die Einbettung in Epon-Harz, die Markierung von Nukleinsäuren (mit Uranylacetat) und Proteinen (mit Tanninsäure), das Anfertigen von Ultradünnschnitten und die Nach- bzw. Negativkontrastierung umfasste. Die von den Mitarbeitern des Fachgebietes erstellten transmissionselektronischen Aufnahmen fanden nach der Nachbearbeitung Eingang in diese Arbeit.

3. Ergebnisse

3.1. Aufbau des Modells und Methodenoptimierung

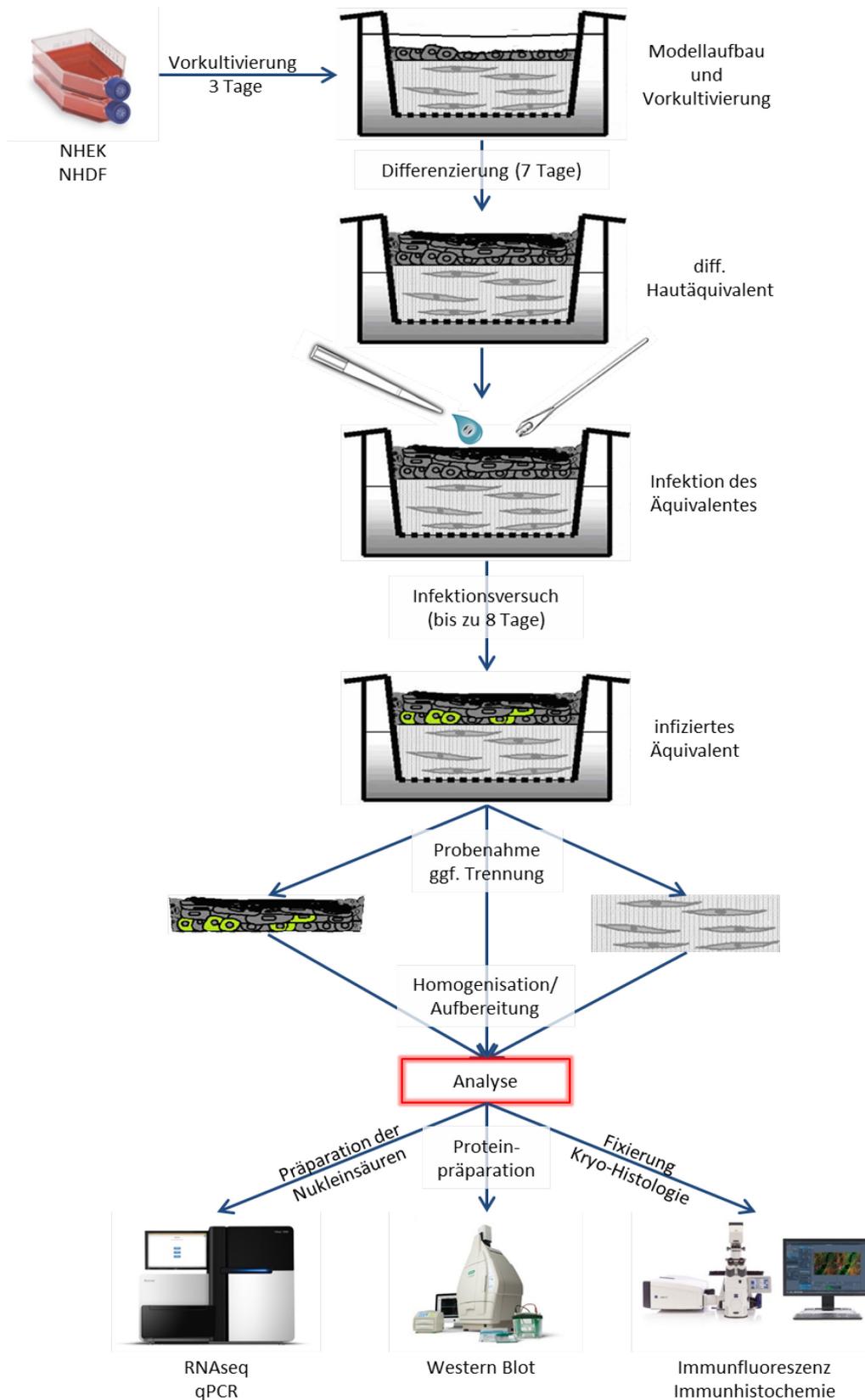


Abbildung 7: Schematische Darstellung des etablierten Kultivierungs- und Analyseprotokolls für die Untersuchung von Virusinfektionen im 3D-Infektionsmodell humaner Hautäquivalente

Zur Untersuchung der viralen Replikation und Pathogenese in einem physiologischen 3D-Modell wurde die Kultivierung und Infektion eines dreidimensionalen Hautäquivalentmodells als Erstes etabliert. Zur Durchführung der Versuche inklusive der anschließenden Analytik wurde zunächst ein Konzept erarbeitet, welches anschließend über verschiedene, in den folgenden Kapiteln beschriebene, Optimierungs- und Implementierungsschritte neuer Methoden verfeinert wurde. Ein empfohlenes Protokoll ist schematisch in Abbildung 7 gezeigt.

Zunächst wurden primäre Keratinozyten (NHEK) und Fibroblasten (NHDF) vorkultiviert und expandiert, wobei eine Kultivierungszeit von drei Tagen die nötige Ausbeute an Zellen für den Zusammenbau des Äquivalentes lieferte. Nach dem Zusammenbau des Äquivalentes wurde dieses laut Protokoll sechs Tage submers kultiviert und von FKS entwöhnt. Anschließend erfolgte die Differenzierung im *Airlift*-Verfahren, wobei sich für die speziellen Infektionsversuche eine vorherige Differenzierungszeit von sieben Tagen vor Infektion als ideal herausstellte. Bei kürzerer Vordifferenzierung war dabei die hauttypische Morphologie nicht ausreichend ausgeprägt, während bei längerer Vordifferenzierungszeit die Proliferation abnahm und keine Langzeitbeobachtung der Infektion über eine weitere Woche sichergestellt werden konnte (Ergebnisse gezeigt in betreuter Masterarbeit von Marlena Stadtmüller [198]). Die Infektion wurde nach Vorversuchen (siehe Abschnitt 3.3.1.) standardmäßig durch die Verletzung mit der Impfnadel durchgeführt, da so der reproduzierbarste und produktivste Infektionsverlauf erreicht werden konnte. Für die Analyse auf Nukleinsäure- und Proteinebene erwies sich im Laufe der Arbeiten eine getrennte Aufarbeitung von dermalen und epidermalen Komponenten als günstig, weshalb ein Trennungprotokoll mittels Dispase etabliert wurde. Für die Extraktion der Nukleinsäuren und Proteine wurde das AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (QIAGEN) etabliert, da dieses hohe Qualität und Reinheit garantierte und gleichzeitig alle Analysen aus einer Extraktion und damit einer Probe gemacht werden konnten. Dies bedeutete eine erhebliche Zeit- und Materialersparnis. Ebenso wurde das Fixierungs- und Schnittprotokoll im Laufe dieser Arbeit etabliert (Abschnitt 2.2.13.), das bei der gewählten Kombination aus Fixierungsreagenz, Fixierungszeit, Entwässerung und Einbettungsprotokoll in Etablierungsversuchen den besten Gewebeerhalt zeigte.

3.2. Struktur und Differenzierung des Hautmodells

Die Hautäquivalente konnten mit dem gewählten Versuchsprotokoll erfolgreich aufgebaut und kultiviert werden. Die restlichen primären Zellen zeigten in der Weiterkultivierung über mindestens sechs weitere Passagen nach Nutzung in der Haut keine morphologischen Veränderungen. Damit sind die vorkultivierten Zellen in ihrer Proliferationskapazität und Viabilität für den Einsatz geeignet.

Über die Zeit der Kultivierung und Differenzierung war ein Einschrumpfen der Äquivalente zu beobachten, wobei sich die Dicke in etwa halbierte und der Durchmesser je nach Entnahmezeitpunkt zwischen anfangs 8 mm und am Ende 5 mm lag.

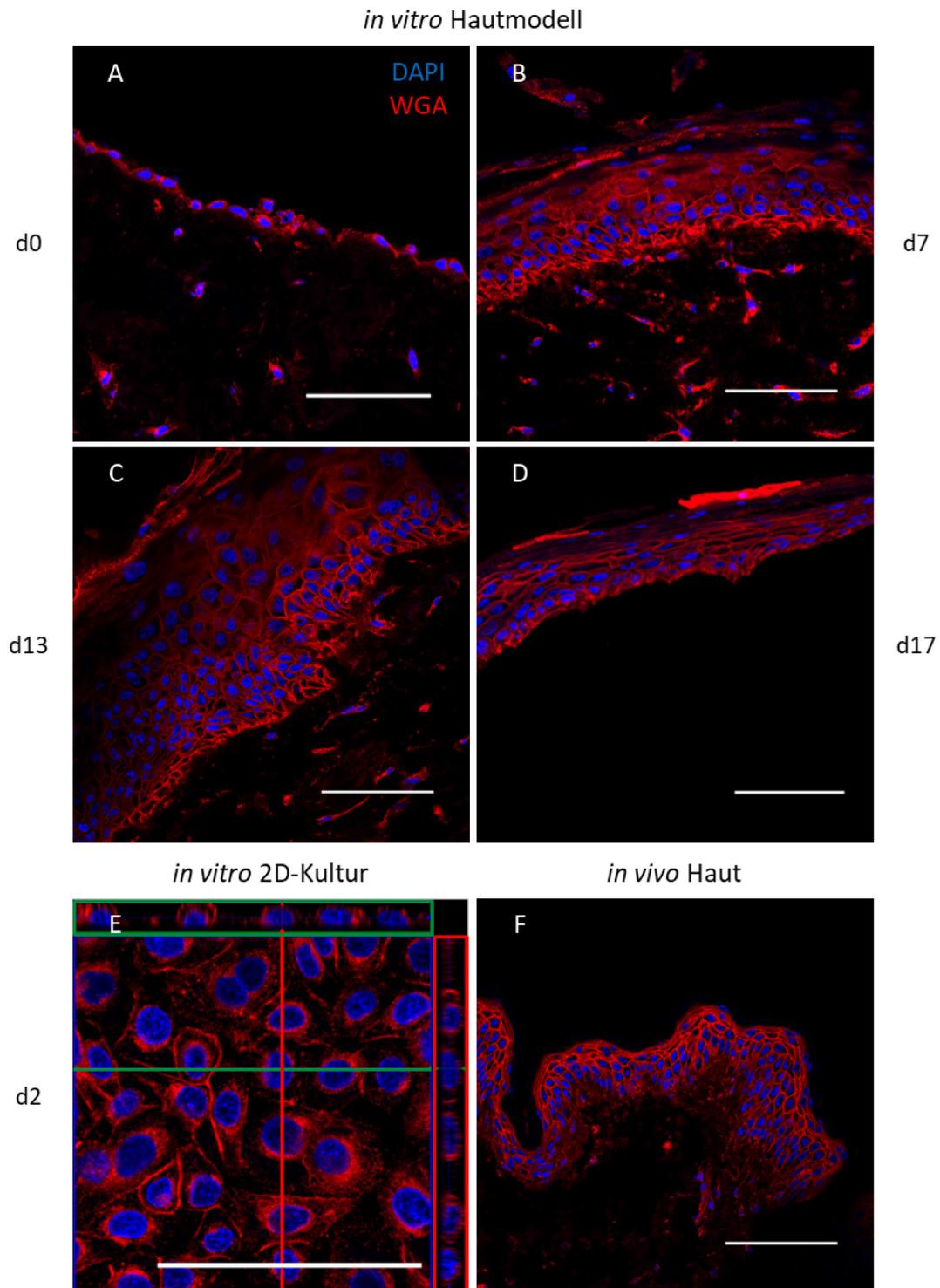


Abbildung 8: Morphologie von Hautäquivalenten zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten im Vergleich zu 2D-Kultur und Hautexplantat. Die Zellmembranen wurden mit WGA gefärbt und die Zellkerne mit DAPI. A: Hautäquivalent (HÄ) am Beginn der Airlift-Kultur. B: HÄ nach sieben Tagen Differenzierung. C: HÄ nach 13 Tagen Differenzierung. D: während der Aufarbeitung abgelöste epidermale Komponente des HÄ nach 17 Tagen Differenzierung. E: 2D-Kultur humaner, primärer Keratinozyten zwei Tage nach Aussaat (Draufsicht und z-Projektion). F: Hautbiopsat. A-D, F – 40x vergrößert; E – 63x vergrößert, Maßstabsbalken \cong 100 μ m

Abbildung 8 illustriert die Morphologie der Hautäquivalente in Schnittpräparaten zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten im Vergleich zu einem humanen Hautbiopsat und einer fixierten 2D-Kultur primärer Keratinozyten zum Zeitpunkt der vollen Konfluenz. Zur Übersichtsfärbung und Morphologiebeurteilung wurden dabei die Zellkerne mit DAPI und die Membran mittels Weizenkeimagglutinin (WGA) gefärbt. Zu Beginn der Differenzierung wuchsen die Keratinozyten einschichtig auf der extrazellulären Matrix mit eingebetteten, vereinzelt Fibroblasten. Nach sieben Tagen Differenzierung hatte sich ein mehrschichtiges Epithel ausgebildet, welches sich aus Zellen unterschiedlicher Morphologie zusammensetzte. So fanden sich im basalen Bereich rundliche bis oval langgestreckte Zellen mit zum Teil vertikal ausgerichteten Kernen. In apikale Richtung flachten die Zellen und deren Kerne ab und die Anzahl der Kerne nahm ab, wobei sich schließlich eine sich zum Teil ablösende Grenzschicht bildete. Diese ähnelte einer Hornschicht aus humaner Haut. Im dermalen Bereich fanden sich über die gesamte Kultivierung vereinzelt Fibroblasten, die in der Membranfärbung eine ovale bis langgestreckte Morphologie aufwiesen.

Grundsätzlich waren Dicke und Schichtanzahl der Epidermis innerhalb eines Äquivalentes teils unterschiedlich. So war die Epidermis oftmals in den Randbereichen des Äquivalentes dünner. Ebenso kam es im mittleren Bereich der Epidermis zu teilweise unterschiedlichen Dicken. Aus diesem Grunde wurde reproduzierbar geschnitten, sodass die Präparate für die Immunfluoreszenz-färbung möglichst aus der Mitte des Äquivalentes stammten und unter den Proben vergleichbar waren.

Nach dreizehn Tagen Differenzierung war die Epidermis im Mittel etwa ähnlich dick und vielschichtig wie nach sieben Tagen. Im basalen Bereich nahm die Größe und vertikale Ausrichtung der Keratinozyten gegenüber den Proben von Tag sieben ab. Im Bereich differenzierter Keratinozyten, z. B. im Äquivalent zum *Stratum granulosum*, nahm die Schichtdicke eher zu. Die Zellen dieser Schicht waren ausladend und relativ lose gepackt. Die abschließende, verhornende Schicht war etwas dicker als nach sieben Tagen Differenzierung, löste sich aber zum Teil ab. In der Dermis waren keine morphologischen Veränderungen zwischen sieben und dreizehn Tagen Differenzierung zu beobachten. Bei einer weiteren Differenzierung ergaben sich nach 17 Tagen bzw. 21 Tagen (nicht gezeigt) weitere Veränderungen. So war die Integrität des Äquivalentes oftmals nicht mehr gegeben, sodass epidermale Komponente und dermale Komponente getrennt vorlagen. Die Epidermis war oftmals dünner als an den vorangehenden Tagen, was mit der Ablösung der obersten, stark differenzierten Schichten zusammenhängen kann. Diese befanden sich abgelöst neben den eigentlichen Präparaten. Des Weiteren änderte sich die Zellmorphologie vor allem in den basalen Bereichen, sodass auch basale Keratinozyten horizontal gestreckter waren und somit andifferenzierten. In den apikalen Schichten waren die Keratinozyten gegenüber den vorherigen Zeitpunkten noch stärker horizontal ausgedehnt und abflachend.

Die dermale Komponente des Hautäquivalentes war morphologisch gegenüber den vorherigen Zeitpunkten kaum verändert. Eine unterschiedliche Schichtung in *Stratum reticulare* und *Stratum papillare* in der Dermis der Äquivalente konnte zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden.

Zum Vergleich des Aufbaus der Äquivalente mit der *in vivo*-Situation wurde ein Schnittpräparat humaner Haut angefertigt. Dabei zeigte sich, dass die Epidermis der differenzierten Hautäquivalente nach sieben und dreizehn Tagen eine ähnliche Anzahl an Schichten besaß wie das Hautpräparat. Die Zellen im Hautpräparat wirkten allerdings dichter gepackt. Im Bereich des *Stratum basale* waren die Zellen und Nuclei morphologisch noch stärker vertikal ausgerichtet als in den 3D-Kulturen. Allerdings war im oberen *Stratum granulosum* des Biopsates keine sehr prominente Abflachung und Akkumulation differenzierender Zellen zu beobachten. Ebenso fehlte im Biopsat eine dicke Hornschicht. Die Dermis des humanen Hautbiopsates war gekennzeichnet von vereinzelt Fibroblasten. Im Unterschied zur Dermis des Hautäquivalentes waren diese aber inhomogener verteilt und bildeten teilweise eng zusammenliegende Verbände von etwa zehn bis vierzig Zellen, wobei zwischen den Zellen und Zellverbänden größere Zwischenräume zu beobachten waren.

Da im Folgenden die Infektionsverläufe und zellulären Regulationsmechanismen vor allem in Keratinozyten untersucht und mit Zellen in der 2D-Kultur verglichen werden sollten, wurden auch diese morphologisch untersucht. Hierzu wurden auf Objektträgern konfluent gewachsene Keratinozyten fixiert und gefärbt. Die Einbettung und das Schneiden der Zellen entfielen im Gegensatz zu den Organoiden. In Abbildung 8E wird sowohl eine Draufsicht als auch eine z-Projektion dargestellt. Die Zellen waren homogen verteilt und zeigten eine rundliche Zell- und Zellkernmorphologie. Die Membranfärbung funktionierte in der 2D-Kultur schlechter als in den Schnitten der Hautäquivalente, sodass eine klare Abgrenzung der Zellen schlecht möglich war. In der Aufnahme des virtuellen Schnittes in z-Richtung war zu beobachten, dass Zellen und Kerne in der 2D-Kultur leicht abgeflacht und an die Oberfläche des Kultivierungsgefäßes adhärirt waren.

Nach Erreichen der maximalen Konfluenz waren die Keratinozyten in 2D-Kultur dicht gedrängt und zeigten zum Teil ein Wachstum in mehreren Schichten, wobei im oberen Bereich oftmals abgekugelte, nicht mehr komplett adhärente Zellen zu beobachten waren. Dies war ein Indiz für das Erreichen der maximalen Kultivierungszeit ohne Umsetzen.

Zur tiefergehenden Untersuchung des Differenzierungsverhaltens der Keratinozyten in 3D-Kultur im Vergleich zu der Differenzierung humaner Haut wurden Immunfärbungen spezieller Differenzierungs-, Proliferations- und Zell-Zell-Interaktionsmarker durchgeführt.

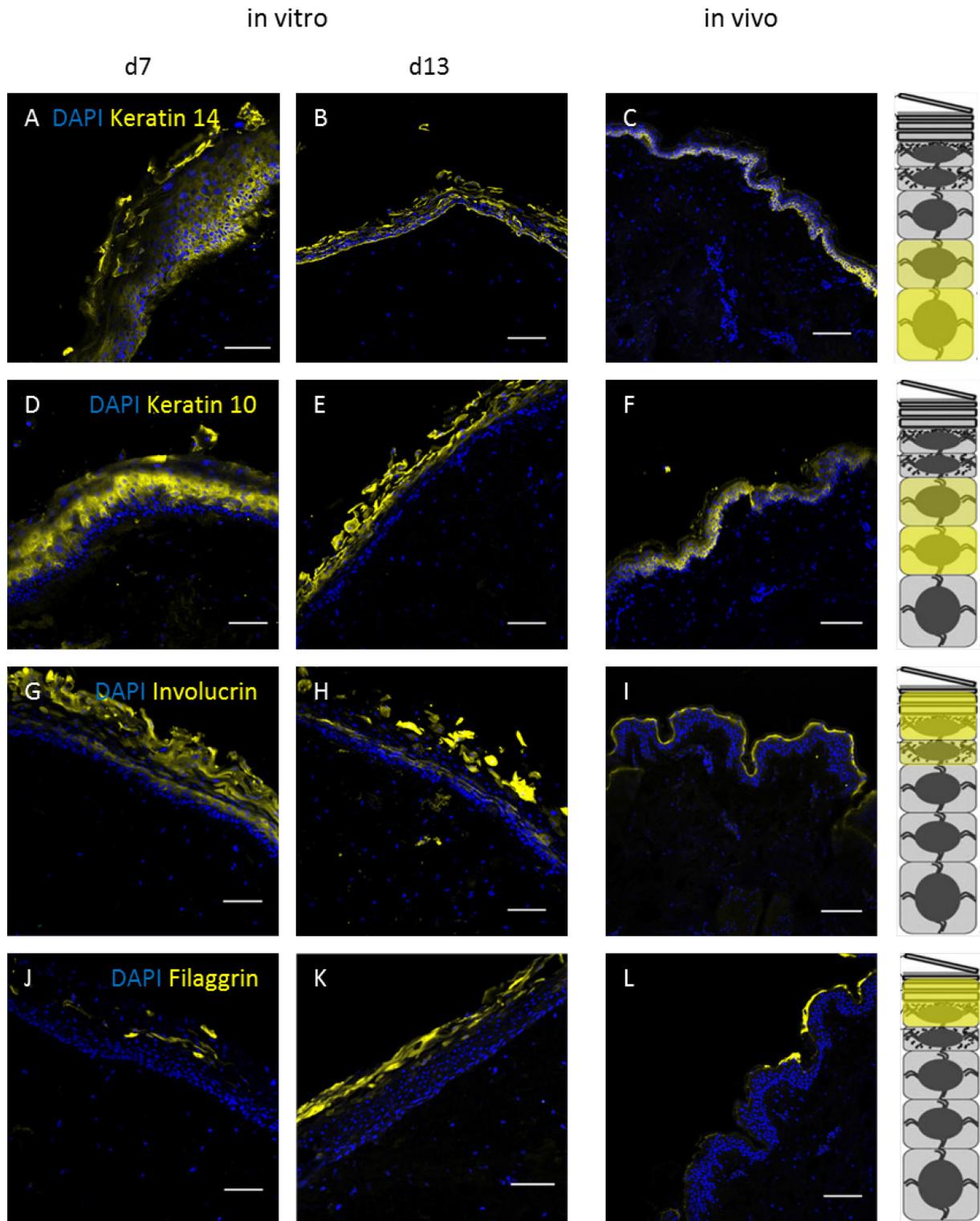


Abbildung 9: Immunhistochemische Färbung von Keratinozyten-spezifischen Differenzierungsmarkern in Hautäquivalenten und Hautbiopsaten. Dargestellt sind in einzelnen Zeilen die Marker Keratin 14 (A - C), Keratin 10 (D - F), Involucrin (G - I) und (reifes) Filaggrin (J - L). Pro Marker und Zeile sind jeweils eine Aufnahme von Hautäquivalenten nach sieben und dreizehn Tagen Differenzierung, eines Hautbiopsates sowie die schematische Verteilung laut Literatur (siehe Abschnitt 1.2.1., Tabelle 2) gezeigt. Maßstabsbalken $\cong 100 \mu\text{m}$

Abbildung 9 zeigt die Immunfärbungen für die speziellen Differenzierungsmarker Keratin 14, Keratin 10, Involucrin und Filaggrin. Hierbei wurden jeweils Präparate aus Hautäquivalenten, welche sieben und dreizehn Tage differenziert waren, mit Schnitten eines humanen Hautbiopsates verglichen.

Keratin 14 war nach sieben Tagen Differenzierung hauptsächlich in den Zellen und Zellzwischenräumen der basalen, epidermalen Schichten zu detektieren, wenngleich sich die Signale zum Teil auch in apikale Bereiche erstreckten. Nach dreizehn Tagen Differenzierung war keine klare Fokussierung der Signale zu erkennen. Im basalen Bereich an der Grenze zur Dermis waren ebenso intensive Keratin 14-Signale zu beobachten wie in den oberen, differenzierenden Bereichen. Im Hautbiopsat dagegen waren die Keratin 14-Signale deutlich fokussierter im *Stratum basale* zu detektieren. Signale in differenzierenden Bereichen oder verhornenden Schichten konnten nicht detektiert werden. Ebenso konnte in keinem der Präparate Keratin 14 spezifisch in der Dermis nachgewiesen werden.

Keratin 10 wurde nach sieben Tagen Differenzierung in einem breiten Bereich differenzierender Keratinozyten, oberhalb der basalen Schicht, detektiert, welche dem *Stratum spinosum* und *granulosum* zuzuordnen waren. Nach dreizehn Tagen befand sich Keratin 10 nicht im basalen Bereich und war eher in den apikalen Schichten zu detektieren, welche teils in Ablösung befindlich waren. In der einzelligen, basalen Schicht des Hautbiopsates wurden ebenfalls keine Keratin 10-Signale detektiert. Dagegen wurde das Keratin im Biopsat ebenso in den Zellen oberhalb des *Stratum basale* nachgewiesen. In der Dermis wurden keine spezifischen Keratin 10-Signale detektiert.

Involucrin wurde nach sieben Tagen Differenzierung im apikalen Bereich der Epidermis detektiert, welcher teils in Ablösung befindlich war und Lufteinschlüsse zeigte. Die Involucrin-Signale nach dreizehn Tagen Differenzierung waren etwas intensiver und noch fokussierter auf die äußerste, sich ablösende Schicht. Im Hautbiopsat konnte eine geschlossene Involucrin-Schicht am apikalen Abschluss der Epidermis nachgewiesen werden, die deutlich dichter und fokussierter war, als die Involucrin-Schichten der Hautäquivalente. In der Dermis der Präparate wurden keine spezifischen Involucrin-Signale beobachtet.

Reifes Filaggrin wurde nach sieben Tagen Differenzierung nur in geringen Mengen in bestimmten apikalen Bereichen des Hautäquivalentes detektiert. Größere Bereiche des Schnittes waren Filaggrin-frei. Nach dreizehn Tagen Differenzierung wurden stärkere Signale im apikalen Bereich nachgewiesen, die auch einen Großteil der Epidermis bedeckten. Teilweise waren Bereiche mit Filaggrin-Signalen abgelöst. Im Hautbiopsat waren Bereiche mit intensiven, apikal fokussierten Signalen ebenso zu beobachten wie Bereiche ohne diese Signale und abgelöste Stücke mit Filaggrin-Signalen. In keiner Probe wurde Filaggrin in der Dermis gefunden.

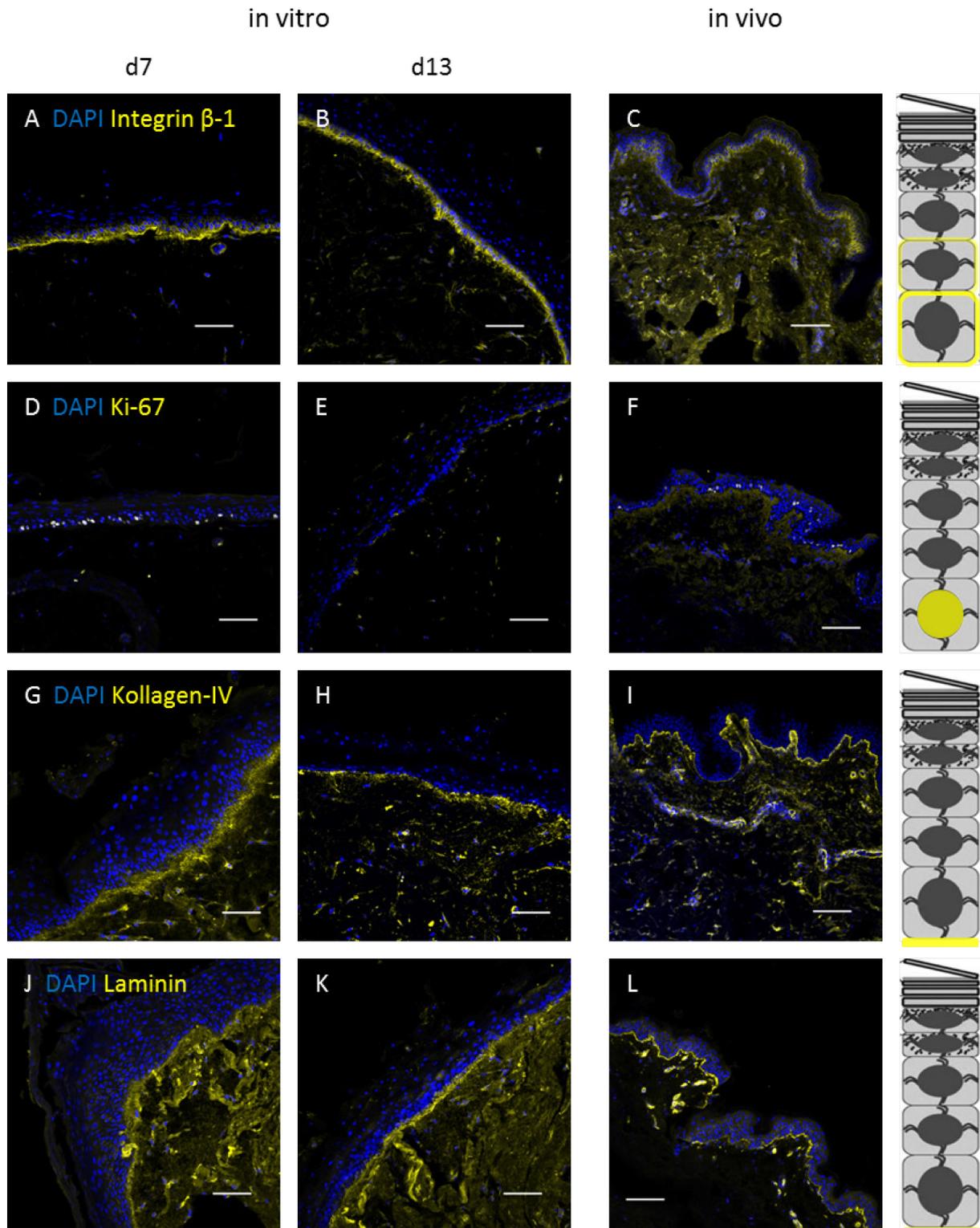


Abbildung 10: Immunhistochemische Färbung von spezifischen Proteinen der Adhäsion, Proliferation und Basallamina in Hautäquivalenten und Hautbiopsaten. Die Marker Integrin β -1 (A - C), Ki-67 (D - F), Kollagen-IV (G - I) und Laminin (J - L) sind in einzelnen Zeilen dargestellt. Pro Marker und Zeile sind jeweils eine Aufnahme von Hautäquivalenten nach sieben und dreizehn Tagen Differenzierung, eines Hautbiopsates sowie die schematische Verteilung laut Literatur gezeigt. Maßstabsbalken \cong 100 μ m

Neben den Differenzierungsmarkern wurden weitere spezifische Proteine zur Charakterisierung der Hautäquivalente immunhistochemisch analysiert, die als Marker für Adhäsion, Proliferation und die Ausbildung einer Basallamina dienen. Abbildung 10 zeigt den Vergleich von Hautäquivalenten nach sieben und dreizehn Tagen Differenzierung mit Schnittfärbungen eines humanen Hautbiopsates auf die Marker Integrin β -1, Ki-67, Kollagen-IV und Laminin.

Das Zelladhäsionsmolekül Integrin β -1 war sowohl sieben Tage als auch dreizehn Tage nach Beginn der Differenzierung in vergleichbarer Verteilung vor allem auf der Oberfläche der basalen Keratinozyten lokalisiert. Hierbei wurden die höchsten Signalstärken an der Trennschicht zur dermalen Komponente detektiert. In differenzierenden, apikalen Keratinozyten und der Dermis waren nur sehr geringe Integrin β -1-Signale zu beobachten. Im Hautbiopsat waren ebenso Zellmembranen basaler Keratinozyten des *Stratum basale* in einer etwas breiteren Schicht als in den Äquivalenten positiv für Integrin β -1. Die Fokussierung zur Grenze beider Schichten war nicht ausgeprägt. In der Dermis wurden stärkere Integrin-Signale detektiert als in den *in vitro* - Kulturen.

Zur Untersuchung der Proliferation wurde Ki-67 analysiert. Nach sieben Tagen Differenzierung zeigten sich Ki-67 positive Zellkerne in der basalen Zellschicht des Äquivalentes. Dabei waren je nach Region etwa 15-20 % der basalen Keratinozyten Ki-67-positiv. Ebenso zeigte ein geringer Anteil dermalen Fibroblasten Ki-67-positive Zellkerne. Nach dreizehn Tagen Differenzierung wurden nur noch sehr vereinzelt Ki-67-positive Zellkerne in basalen Keratinozyten detektiert, während die Zahl Ki-67-positiver Fibroblasten gegenüber Tag sieben unverändert war. Im Hautbiopsat wurden ebenso Ki-67-positive Kerne von Keratinozyten im *Stratum basale* detektiert. Hierbei war ein ähnlicher Anteil an Zellen Ki-67-positiv wie im Hautäquivalent nach sieben Tagen Differenzierung. In der Dermis des Biopsates wurden etwas weniger positive Fibroblasten mit spezifischen Signalen im Kern detektiert als *in vitro*.

Die Verteilung von Kollagen-IV und Laminin wurde untersucht, da diese Proteine eine Rolle in der Formation der Basallamina als Abgrenzung von Dermis und Epidermis spielen. Kollagen-IV wurde nach sieben Tagen Differenzierung in der Dermis des Äquivalentes detektiert, wobei sich eine Schicht an der Grenze zur Epidermis bildete. Diese war nach dreizehn Tagen Differenzierung etwas intensiver und fokussierter ausgeprägt, wobei das Signal nicht durchgehend über die gesamte Breite des Schnittes eine konstante Intensität aufwies. In den Proben des Hautbiopsates hingegen war eine intensiv gefärbte, stark fokussierte Kollagen-IV-Schicht an der Grenze von Epidermis und Dermis zu detektieren, welche deutlicher ausgeprägter war als in den Hautäquivalenten. In der Dermis in Nähe der Fibroblasten wurden ähnliche Kollagen-IV-Signale in allen Proben detektiert, wobei im Biopsat recht starke Signale vor allem in Bereich zusammenliegender Fibroblasten auftraten.

Laminin wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen diverse Laminine gefärbt. In den Hautäquivalenten war eine Lamininfärbung in der gesamten Dermis zu detektieren. Dabei fokussierten sich die Signale insbesondere nach einer Differenzierungszeit von dreizehn Tagen auf den Bereich der Grenze zwischen Epidermis und Dermis. Im Hautbiopsat hingegen wurden starke Signale vor allem fokussiert an der Basallamina detektiert. Des Weiteren waren vor allem Epidermisnahe Fibroblasten Laminin-positiv, wohingegen die gesamte extrazelluläre Matrix in der Dermis deutlich schwächer gefärbt war als in den Hautäquivalenten.

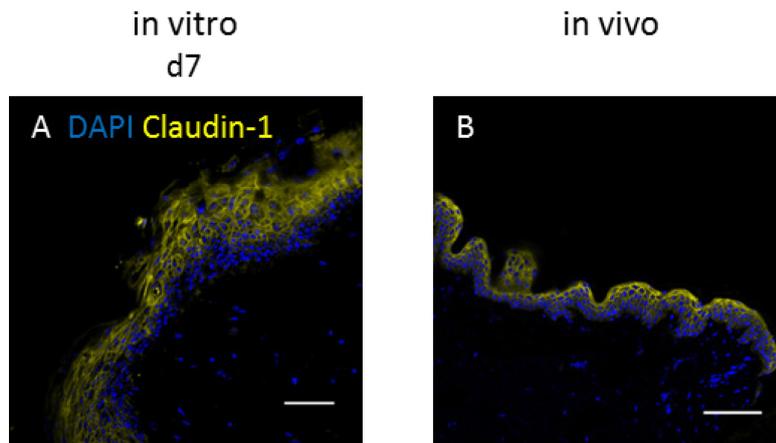


Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung von Claudin-1 in Hautäquivalent (sieben Tage differenziert) und Hautbiopsat. Maßstabsbalken \cong 100 μ m

Weiterhin wurde die Verteilung von Claudin-1 in einem Hautäquivalent nach sieben Tagen Differenzierung untersucht (Abbildung 11). Das Protein der epithelialen Zell-Zell-Adhäsion über *Tight Junctions* wurde vor allem auf der Oberfläche von Keratinozyten des *Stratum spinosum* und *granulosum* sowohl in Hautäquivalent als auch im Hautbiopsat gefunden. Dabei nahmen im Biopsat die Signale in apikale Richtung an Intensität zu.

Die beschriebene Charakterisierung anhand der Immunfluoreszenz-Färbung spezifischer Marker wurde im weiteren Verlauf des Projektes jeweils auch zur Charakterisierung und Qualitätskontrolle der Äquivalente verschiedener Ansätze eingesetzt.

Zur Feincharakterisierung der Zell-Zell-Interaktionen wurden im Rahmen der weiteren Analytik elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt.

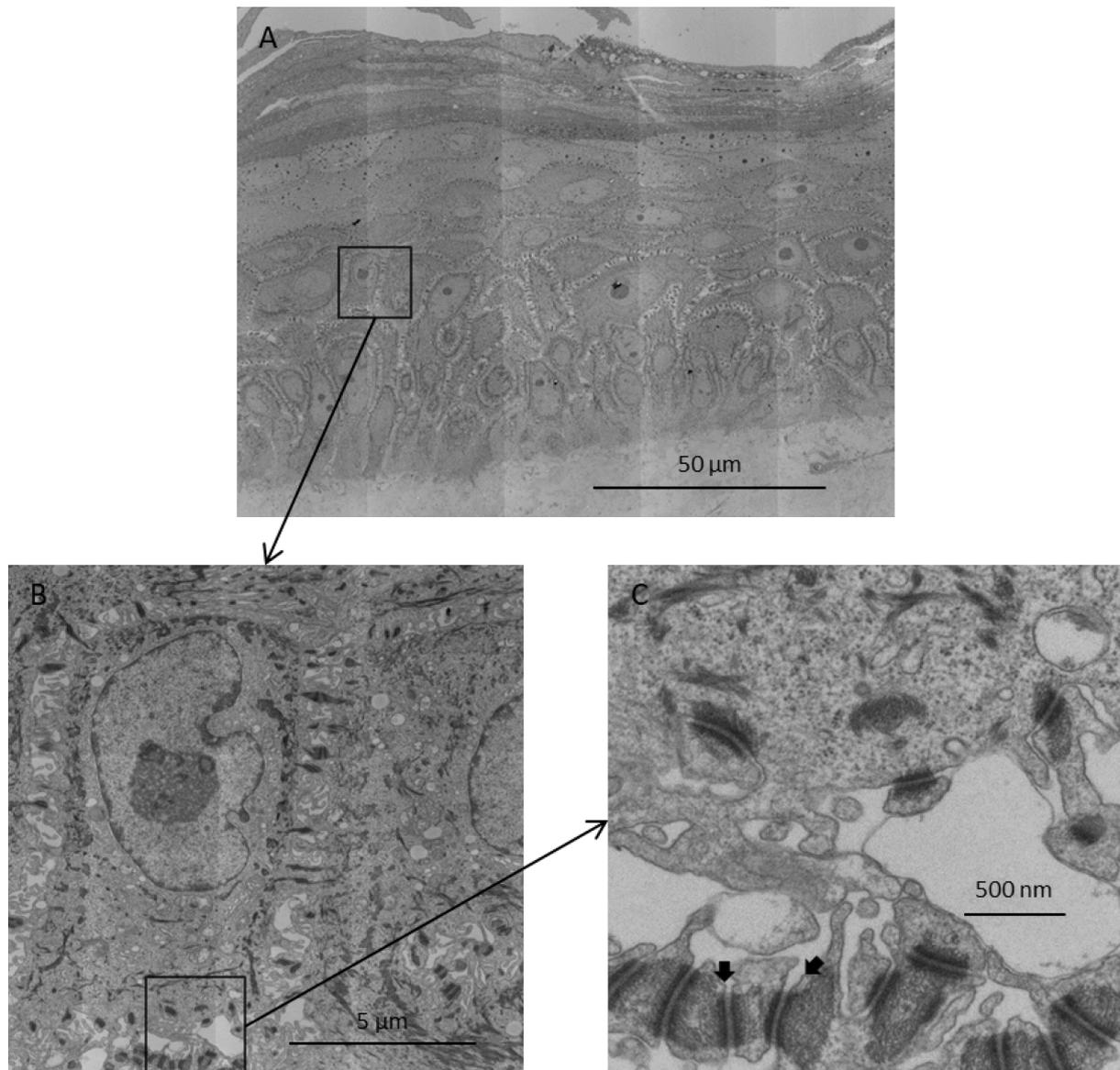


Abbildung 12: Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Hautäquivalentpräparates nach neun Tagen Differenzierung. A: Epidermis in der Gesamtansicht, B: Ausschnitt aus differenzierender Zellschicht (Äquivalent zum *Stratum spinosum*) C: Desmosomen an der Unterseite einer Zelle. Exemplarisch sind zwei Desmosomen in C mit Pfeilen markiert.

Abbildung 12 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme zur Charakterisierung von Zellen und Zell-Zell-Kontakten. Das Äquivalent war zu diesem Zeitpunkt neun Tage differenziert und diente als Kontrollprobe für die Charakterisierung infizierter Hautäquivalente (siehe Abschnitt 3.3.1).

Die Epidermis zeigte Zellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien und Ausrichtungen. So waren die Keratinozyten des *Stratum basale* vertikal ausgerichtet. An der basalen Seite ragten die Zellen in die extrazelluläre Matrix der Dermis hinein, wobei eine physiologische Basallamina nicht vorhanden war. Die Zell-Zell-Kontakte waren durch eine starke, filamentöse Verzahnung gekennzeichnet. In der darüber liegenden Schicht des *Stratum spinosum* war das typische Zusammenziehen zu charakteristischen Stachelzellen mit desmosomalen Ausläufern zu beobachten.

Die Abbildungen B und C illustrieren die Verzahnung einer Stachelzelle über Desmosomen an der basalen Seite.

Die darüber liegende Schicht war von horizontal langgestreckten Keratinozyten gekennzeichnet, deren Verzahnung nicht so prominent hervorstach wie im *Stratum spinosum*. Die Zellen wiesen für das *Stratum granulosum* typische, granuläre Einschlüsse auf. Im apikalen Bereich war das Material elektronendichter und einzelne Zellen und Nuclei waren nicht mehr definierbar. In diesem organellenarmen Bereich, der sich teilweise ablöste, waren Einlagerungen von Fetttröpfchen zu beobachten.

3.3. Etablierung von Hautäquivalenten als 3D-Infektionsmodell

Nachdem die Morphologie und Differenzierung der Hautäquivalente über die Kultivierungszeit anhand der beschriebenen Marker charakterisiert worden waren, wurden die Äquivalente für die Entwicklung eines Infektionsmodells eingesetzt. Als Modellvirus wurde hierfür ein Kuhpockenvirus eingesetzt, da Kuhpockenviren während Infektionen in Patienten in Hautzellen replizieren und dabei Läsionen hervorrufen können. Der eingesetzte rekombinante, GFP-exprimierende Stamm BACWT ermöglichte den einfachen Nachweis der Infektion anhand von Immunfluoreszenz.

3.3.1. Etablierung von Infektionsbedingungen und Analysemethoden

Um die Infizierbarkeit der Hautäquivalente mit Kuhpockenviren zu untersuchen und als Infektionsmodell zu etablieren, wurden die Infektionsbedingungen zunächst in Vorversuchen optimiert (Abbildung 13). Als Differenzierungszeiten wurden sechs und vierzehn Tage untersucht.

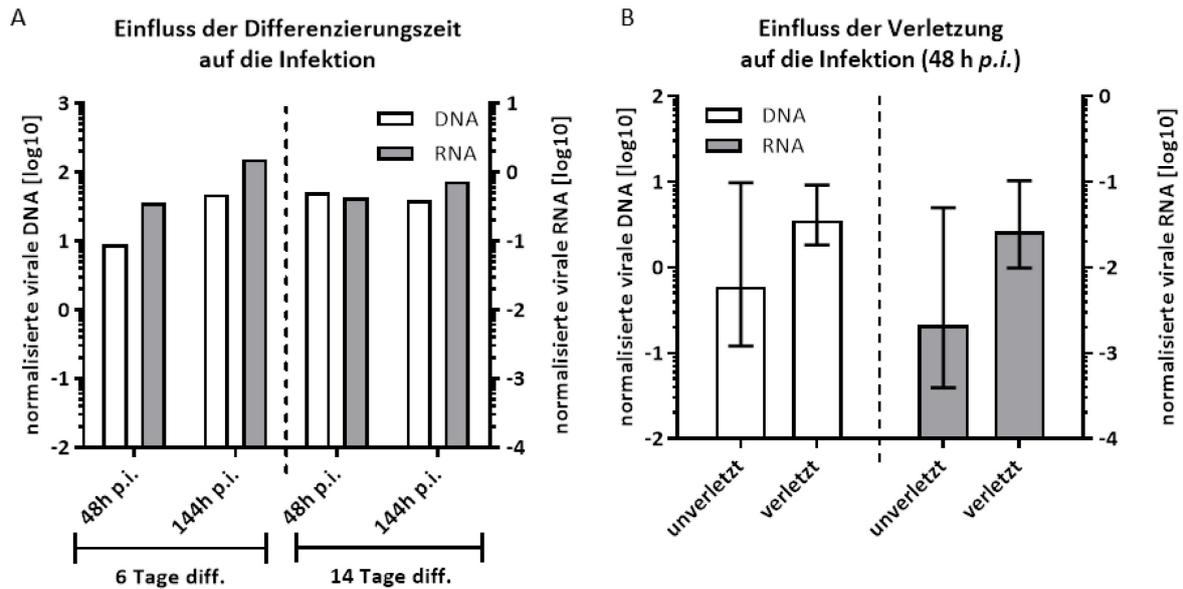
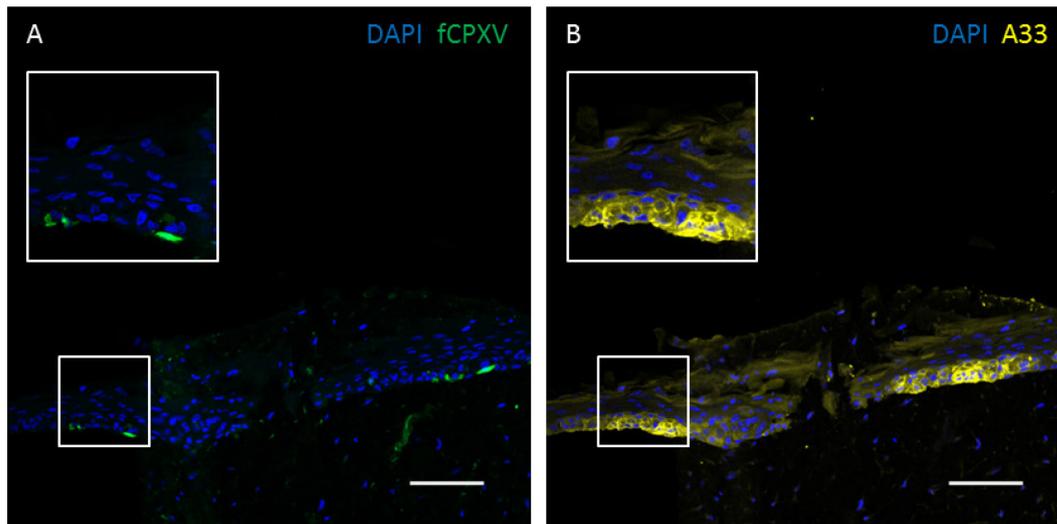


Abbildung 13: Etablierung der Infektionsversuche: Einfluss von Differenzierungszeit (A) und Verletzung (B) auf den Infektionsverlauf. Die Hautäquivalente wurden mit $1,5 \cdot 10^5$ PFU infiziert. Die Balken stellen die Ergebnisse der RNA und DNA-Analytik (Gen CPXV086), normalisiert auf das zelluläre Referenzgen MYC, des ungetrennt extrahierten, gesamten Hautäquivalentes dar. Für den Differenzierungsversuch ($n = 1$) wurden die Äquivalente mittels Verletzung infiziert. Für die Untersuchung der Verletzung ($n = 3$, 95%-Konfidenzintervall gezeigt) wurden die Äquivalente sieben Tage vordifferenziert. Während die Differenzierung keinen signifikanten Einfluss auf den Anteil viraler Nukleinsäuren hatte, waren verletzte Äquivalente deutlich stärker infiziert als unverletzte Äquivalente.

Nach der Differenzierung wurden die Hautäquivalente per Einstich mit $1,5 \cdot 10^5$ PFU inokuliert, für weitere 48 bzw. 144 h *p.i.* inkubiert und der Verlauf der CPXV-Infektion analysiert (Abbildung 13A). Die Hautäquivalente waren nach Verletzung zu beiden Differenzierungszeitpunkten zu infizieren. Dabei gab es in Bezug auf die neugebildeten, viralen Nukleinsäuren des Gens CPXV086 (I7L) in den Lysaten der Hautäquivalente keine signifikanten Mengen-Unterschiede zwischen beiden Zeitpunkten. Zur Überprüfung des Einflusses der Verletzung wurden Hautäquivalente sieben Tage vordifferenziert und mit oder ohne Verletzung durch Einstich mit der Impfnadel infiziert (Abbildung 13B). Nach 48 h *p.i.* erfolgte die Analyse der gebildeten viralen Nukleinsäuren. Der Anteil viraler Nukleinsäuren in den Zellen unterschied sich und lag im Mittel in den mit Verletzung infizierten Äquivalenten etwa eine log-Stufe höher. Des Weiteren war die Abweichung zwischen den Triplikaten, hier indiziert durch die Fehlerbalken des 95%-Konfidenzintervalls, in den ohne Verletzung infizierten Äquivalenten höher als bei den mit Verletzung infizierten Äquivalenten. In diesem Versuch war der Infektionsverlauf mit Verletzung demnach reproduzierbarer als ohne Verletzung.

Zur Charakterisierung der Lage und Ausbreitung der Infektion wurden immunhistochemisch gefärbte Schnitte auf virale Proteine untersucht. Hierfür wurde sowohl die GFP-Fluoreszenz des rekombinanten Virus genutzt als auch mit einem spezifischen Antikörper gegen das virale Hüllprotein CPXV168 (A33) gefärbt.

infiziertes Hautäquivalent 18 h *p.i.* (hohe infektiöse Dosis)



infiziertes Hautäquivalent 96 h *p.i.* (niedrige infektiöse Dosis)

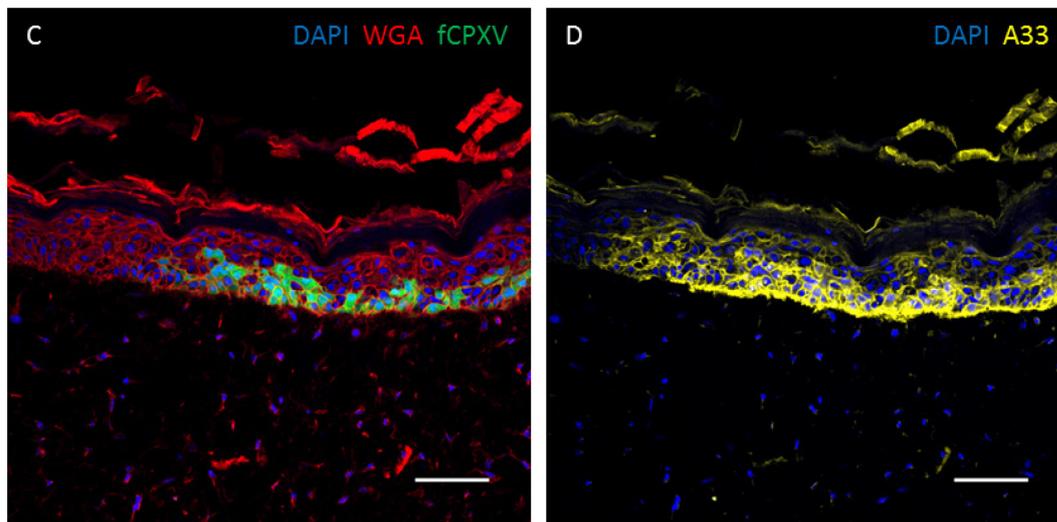


Abbildung 14: Nachweis und Lokalisation infizierter Zellen mittels Immunfluoreszenz-Färbung spezifischer Virusmarker. A und B: Hautäquivalent 18 h *p.i.*, infiziert mit $1,5 \cdot 10^7$ PFU des fCPXV, DAPI / GFP (A), DAPI / CPXV168 (A33) (B), C und D: Hautäquivalent 96 h *p.i.*, infiziert mit $1,5 \cdot 10^5$ PFU des fCPXV, DAPI / WGA / GFP (C), DAPI / CPXV168 (A33) (D). Fluoreszierende, CPXV168-positive Bereiche konnten an beiden Infektionszeitpunkten nachgewiesen werden. Maßstabsbalken $\cong 100 \mu\text{m}$.

Abbildung 14 zeigt Bilder der Schnitte aus Hautäquivalenten, welche nach sieben Tagen Differenzierung durch Verletzung mit verschiedenen infektiösen Dosen infiziert wurden, um die Infektion in Abhängigkeit der Infektionszeit zu charakterisieren.

Die Teilabbildungen A und B zeigen ein Hautäquivalent 18 h *p.i.* mit einer hohen Dosis von $1,5 \cdot 10^7$ PFU. Diese wurde eingesetzt, um eine stärkere Primärinfektion der Zellen zu ermöglichen. Vereinzelt waren in der basalen Schicht der Epidermis dieses Präparates GFP-positive Keratinozyten zu detektieren.

In der Färbung auf das Protein CPXV168 (VACV-Homolog: A33) waren im Vergleich dazu breitere Bereiche an Zellen gefärbt, die sich ebenso vorrangig im basalen Bereich der Epidermis befanden. Diese infizierten Bereiche waren hauptsächlich in der Nähe von Einstichstellen (im Bild zentral in der Epidermis) lokalisiert. In der Dermis konnten keine spezifisch gefärbten, infizierten Zellen gefunden werden.

Die Teilabbildungen C und D zeigen ein Hautäquivalent 96 *p.i.*, welches mit einer im Vergleich 100-mal geringeren infektiösen Dosis von $1,5 \cdot 10^5$ PFU infiziert wurde. In der Probe konnten basal-epidermal breite infizierte Bereiche GFP- und CPXV168-positiver Zellen detektiert werden. Die infizierten Zellen erstreckten sich dabei nicht nur über die unterste, basale Schicht. Infiziert waren dabei auch in apikale Richtung ausdifferenzierende Zellen, wie in der Co-Färbung mit Weizenkeimagglutinin (WGA) gezeigt werden konnte (Abbildung 14C). In der spezifischen CPXV168-Antikörperfärbung wurden erneut etwas breitere, infizierte Bereiche detektiert als auf Grundlage der GFP-Fluoreszenz. Zu diesem Zeitpunkt 96 h nach der per Einstich gesetzten Infektion konnten die Infektionsfoki nicht mehr eindeutig den verletzten Stellen mit Wundverschluss zugeordnet werden. In der dermalen Komponente des Äquivalentes wurden in den repräsentativ ausgewählten Proben keine infizierten Bereiche detektiert, die spezifische GFP- oder CPXV168-Signale trugen.

Für den Nachweis viraler Partikel in den Zellen der epidermalen Keratinozyten wurden Hautäquivalente mit $1,5 \cdot 10^5$ PFU des CPXV infiziert. Nach 48 bzw. 96 h *p.i.* wurden dann transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Äquivalente angefertigt.

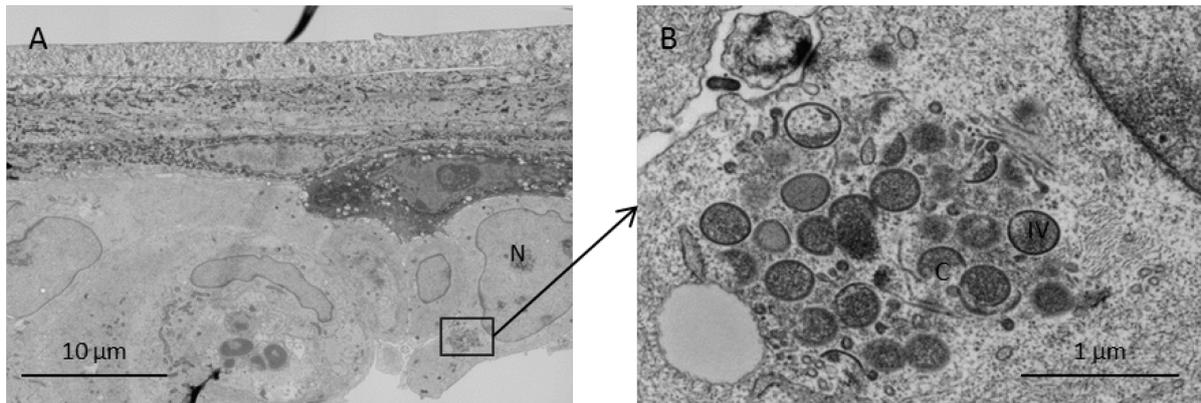
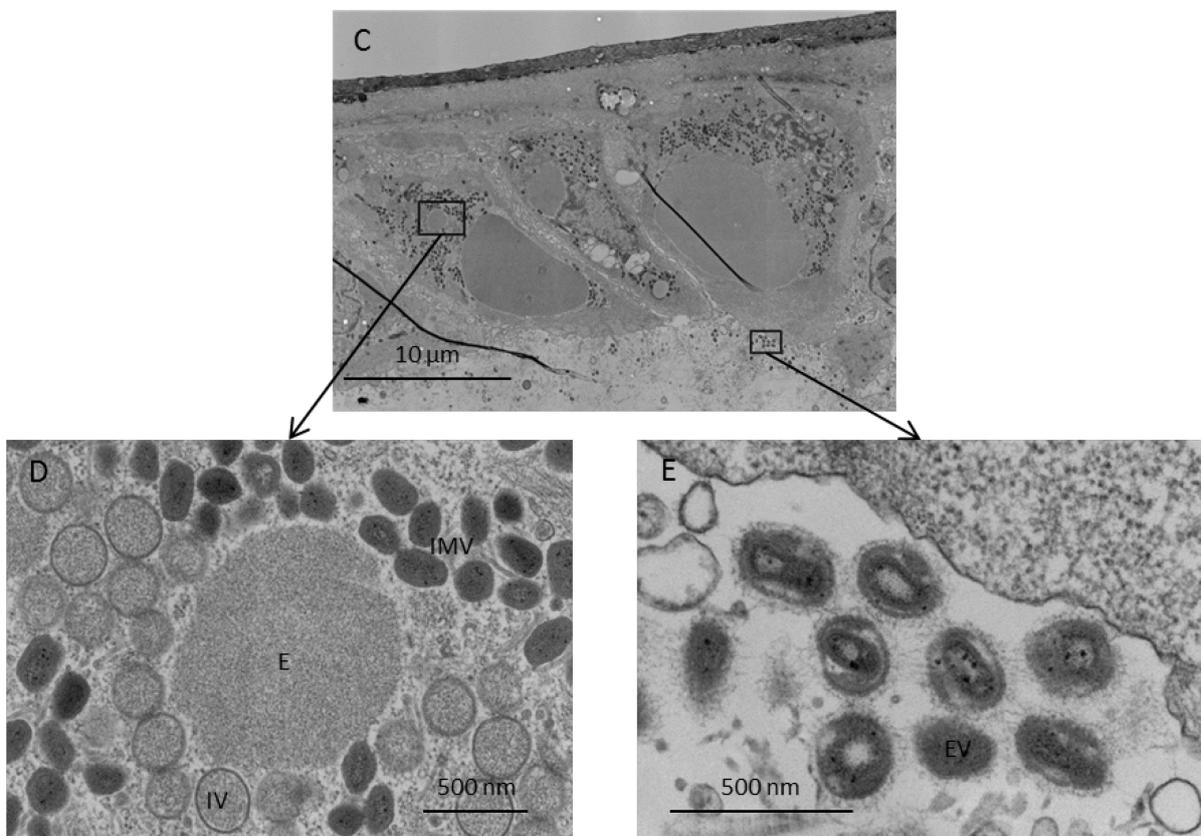
Hautäquivalent 48 h *p.i.*Hautäquivalent 96 h *p.i.*

Abbildung 15: Elektronenmikroskopische Aufnahmen infizierter Hautäquivalentpräparate 48 bzw. 96 h *p.i.* Die Äquivalente wurden initial mit $1,5 \cdot 10^5$ PFU infiziert. A: Übersichtsbild eines Hautäquivalentes 48 h *p.i.*, N: Nukleus, B: Detail einer frühen Virusfabrik mit beginnenden Membraneinschlüssen (*Crescent*, C) und unreifen Virionen (*immature virions*, IV), C: Übersichtsbild eines Hautäquivalentes 96 h *p.i.*, D: Detail einer Virusfabrik um einen typischen Einschluss (E) mit IVs und intrazellulären, reifen Virionen (*intracellular mature virions*, IMV), E: reife extrazelluläre Viren (*extracellular virions*, EV) an der Grenze zwischen Epidermis und Dermis.

Abbildung 15 zeigt die elektronenmikroskopischen Bilder zum Nachweis viraler Partikel in epidermalen Keratinozyten. Nach einer Infektionszeit von 48 h mit CPXV wurden nur vereinzelt im Epithel Virionen gefunden.

Der Nachweis einer Virusfabrik konnte in einem polygonalen, basalen Keratinozyten erbracht werden. In dieser Virusfabrik wurden sich zusammenlagernde, sichelförmige Membranbestandteile (*crescents*) ebenso beobachtet wie unreife Virionen (*immature virions*) verschiedener Reifungsstadien. In der Virusfabrik wurden tubuläre Strukturen beobachtet. In dieser Probe konnten insgesamt nur sehr vereinzelt reife, extrazelluläre Virionen beobachtet werden (Bild nicht gezeigt).

Nach einer Kultivierungszeit von 96 h *p.i.* wurden deutlich mehr positive Zellen detektiert, die jeweils auch mehr Virionen enthielten. Abbildung 15C zeigt drei, nebeneinander liegende, infizierte Keratinozyten in einer dünnen epidermalen Schicht. Die typischen Zell-Zell-Kontakte durch z. B. Desmosomen (siehe Kontrolle Abbildung 12) waren schwächer ausgeprägt. In den Zellen wurden große Virusfabriken mit pockenviralen Partikeln unterschiedlicher Reifegrade detektiert. Diese lagerten sich oftmals um zentrale, vermutlich proteinreiche Einschlüsse an (Abbildung 15D). Zwischen den Viruspartikeln traten gelegentlich tubuläre Strukturen auf. Im Vergleich zu der Probe 48 h *p.i.* enthielt die Einzelzelle deutlich mehr Virionen, welche einen höheren Reifegrad aufwiesen. So konnten fertige *mature virions* detektiert werden. Außerhalb der Zellen kam es vor allem an der Grenze zur extrazellulären Matrix der Dermis zur Anreicherung extrazellulärer Viren (Abbildung 15E), welche zumeist durch einen typischen Saum charakterisiert waren. Dieser könnte aus Glykoproteinen bestehen (Michael Laue, persönliche Mitteilung). Des Weiteren konnten vereinzelt auch extrazelluläre Virionen zwischen den Zellen beobachtet werden. Dabei konnte durch den bedeckenden Glykoproteinsaum nicht klar nachgewiesen werden konnte, ob diese mehr als eine *Core*-umschließende Membran besaßen, wie für *external enveloped virions* (EEV) typisch.

Nach dem elektronenmikroskopischen Nachweis der viralen Replikation und reifer, neugebildeter Partikel wurde die Infektiosität der gebildeten Partikel im Äquivalent untersucht. Hierzu wurden - nach Trennung von Dermis und Epidermis - die Bestandteile in Zellkulturmedium homogenisiert und das Lysat für einen Plaque-Test eingesetzt. Proben aus Äquivalenten 48 h *p.i.* wurden hierbei ins Verhältnis zu den, in den Äquivalenten nach sofortiger Aufarbeitung verbleibenden, infektiösen Partikeln des Inokulats gesetzt (Abbildung 16).

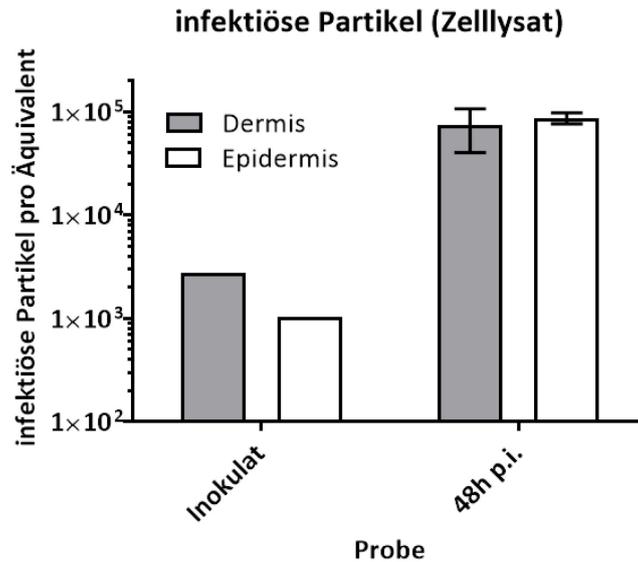


Abbildung 16: Analyse der infektiösen Partikel in Zellhomogenaten aus Dermis und Epidermis. Die Hautäquivalente wurden initial mit $1,5 \cdot 10^5$ PFU infiziert. Die Analyse der infektiösen Partikel erfolgte zum Zeitpunkt 0 h (Inokulat) und 48 h nach Infektion aus Dermis und Epidermis der Hautäquivalente. Die Menge an infektiösen Partikeln stieg in dem Zeitraum um ein bis zwei log-Stufen an.

Dabei konnte eine Anreicherung infektiöser, viraler Partikel in Dermis und Epidermis nachgewiesen werden. So waren nach der Inkubationszeit von 48 h etwa 100-mal mehr infektiöse virale Partikel in den Homogenaten der Epidermis zu finden als im Inokulat. In der Dermis war der Anstieg etwa 20-fach. Es konnte somit auch bei relativ geringer Infektionszeit von zwei Tagen und einer initial geringen infektiösen Dosis gezeigt werden, dass in den Hautäquivalenten infektiöse Partikel gebildet werden.

3.3.2. Analyse des Infektionsverlaufes

Zur genauen Charakterisierung des Infektionsverlaufes im etablierten Modell wurden Infektionskinetiken analysiert.

Hierfür wurde, wie auch im späteren Verlauf, mit für sieben Tagen differenzierten Äquivalenten gearbeitet. Diese besaßen eine, der natürlichen Haut entsprechende, Morphologie und waren auch proliferationskompetent, sodass sie während der Infektion weiter kultiviert werden konnten. Die Virusreplikation konnte über einen Zeitraum von bis zu acht weiteren Tagen untersucht werden, während dem die Hautäquivalente ihren typischen Aufbau weitgehend beibehielten. Die Analysen erfolgten primär in der Epidermis und den dortigen Keratinozyten, da diese in den Etablierungsversuchen in erster Linie Ort der Virusreplikation waren.

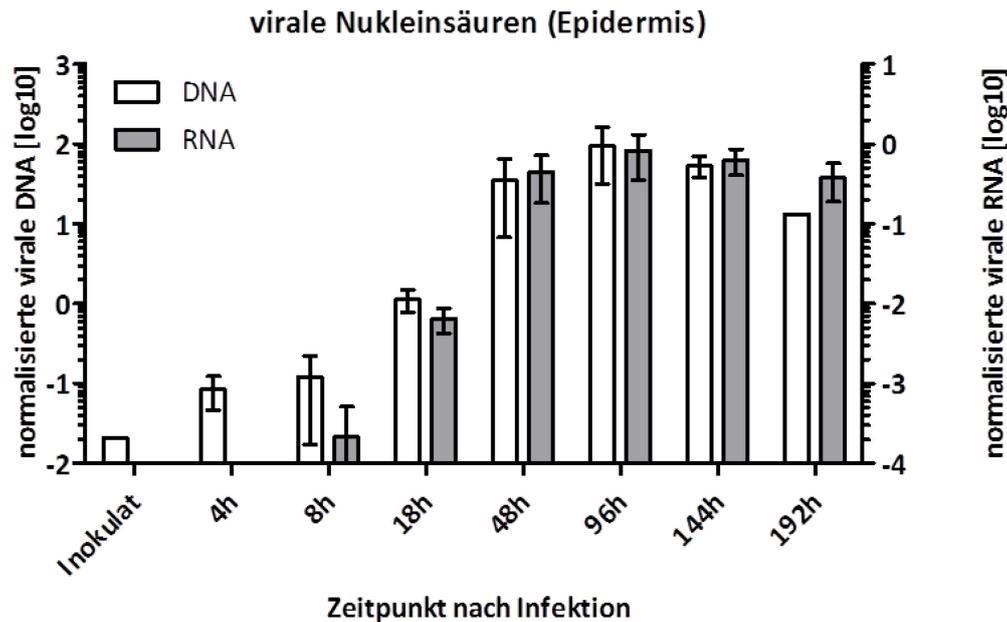


Abbildung 17: Virale Nukleinsäuren in der Epidermis des Äquivalentes im zeitlichen Verlauf. Die Menge an genomischer, viraler DNA (ermittelt im Gen CPXV086) wurde dabei auf die genomische DNA des zellulären Gens MYC normalisiert. Die exprimierte virale RNA des spät exprimierten Gens CPXV086 wurde auf die Expression des zellulären Referenzgens MYC normalisiert. Die Hautäquivalente wurden mit $1,5 \cdot 10^5$ PFU infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen ($n = 3$). Ein Anstieg viraler Nukleinsäuren in Epidermisäquivalenten konnte bis zum Zeitpunkt 96 h *p.i.* beobachtet werden. Danach ging der Anteil viraler Nukleinsäuren leicht zurück.

Abbildung 17 zeigt den zeitlichen Verlauf der Expression viraler Nukleinsäuren in der Epidermis nach Infektion der Hautäquivalente mit CPXV. Schon vier Stunden nach Inokulation war ein Anstieg viraler DNA gegenüber der, nach 0 Stunden extrahierten, Inokulationsprobe zu detektieren. 18 Stunden nach Infektion war das Verhältnis der Kopien viraler DNA zu zellulärer, genomischer DNA bereits 1:1. Dieses stieg im weiteren Verlauf an und erreichte ein Maximum 96 Stunden *p.i.*, wobei an diesem Zeitpunkt etwa 100 Kopien viraler, genomischer DNA im Verhältnis zu zellulärer, genomischer DNA in der Epidermis gefunden wurden. Dieses Verhältnis nahm dann leicht bis zum Endpunkt 192 Stunden *p.i.* ab. Die virale Genexpression wurde in dieser Kinetik auf Basis der RNA des Gens CPXV086 (17L) untersucht, welches spät während des viralen Replikationszyklus exprimiert wird. Die Expression wurde dabei auf die RNA des zellulären Referenzgens MYC normalisiert.

Vier Stunden *p.i.* wurde in der Epidermis keine virale RNA des Gens CPXV086 gefunden. Nach acht Stunden wurden geringe RNA-Mengen des Zielgens detektiert. Nach 18 Stunden Infektion waren schon etwa zwanzigmal mehr virale RNA-Moleküle pro RNA-Molekül des Referenzgens vorhanden als nach acht Stunden. Dieser Wert stieg weiter an und erreichte ein Maximum 48 h *p.i.*, als maximal eine Kopie des viralen Transkriptes pro Kopie des Referenzgens detektiert wurde. Diese Expression nahm bis zum Zeitpunkt 192 h *p.i.* leicht ab. Am Endpunkt dieser Kinetik war der Anteil viraler Transkripte etwa dreimal geringer als am Maximum.

Die Unterschiede zwischen einzelnen Proben einer Fraktion, die hier als Standardabweichung dargestellt sind, waren zum Teil relativ groß. Vor allem an den frühen Zeitpunkten bis 8 h *p.i.* zeigten sich in den epidermalen Äquivalenten größere Unterschiede im Gehalt viraler Nukleinsäuren innerhalb der Proben eines untersuchten Zeitpunktes.

Neben der viralen DNA-Replikation und RNA-Transkription wurde die Bildung des viralen Proteins CPXV168 mittels Western Blot untersucht.

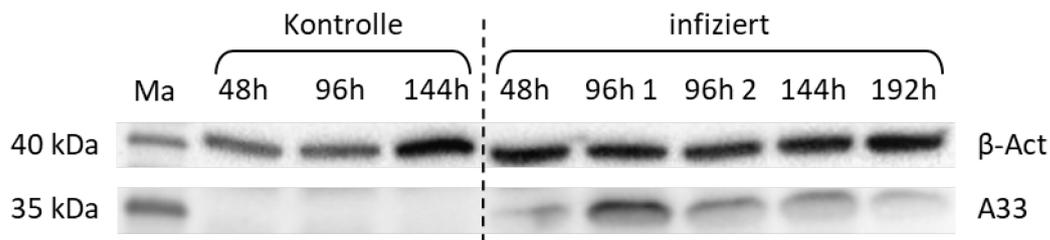


Abbildung 18: Expression des Virusproteins CPXV168 (A33) im Zeitverlauf. Das Protein wurde mit einem Antikörper gegen A33R (Homolog aus VACV) im Western Blot detektiert und ist hier in Relation zur Ladekontrolle β -Aktin gezeigt. Die Proteinproben wurden aus der Epidermis von Hautäquivalenten generiert, welche mit einer Dosis von $1,5 \cdot 10^5$ PFU pro Hautäquivalent infiziert wurden. Am Zeitpunkt 96 h *p.i.* (stärksten virale Replikation auf Nukleinsäureebene) wurden biologische Duplikate untersucht. Ma – Markerbanden. Die maximale Menge an Virusprotein konnte 96 h *p.i.* nachgewiesen werden.

In Abbildung 18 ist der zeitliche Verlauf der Expression des CPXV168 (A33)-Proteins in Relation zur Ladekontrolle β -Aktin gezeigt. Nach einer Infektionszeit von 48 h wurden geringe Mengen des viralen Proteins in der Epidermis detektiert. Am Zeitpunkt 96 h *p.i.* nahm die Menge viralen Proteins gegenüber 48 h zu. Im weiteren Verlauf der Kultivierung nahm die Menge an detektiertem CPXV168-Protein wieder ab. In den mock-infizierten Kontrollen wurde kein virales Protein gefunden.

Zur Charakterisierung der Lage der Infektion und der jeweilig beteiligten Zellen wurde der Infektionsverlauf in immunhistochemisch gefärbten Schnitten der Hautäquivalente dieser Kinetik untersucht.

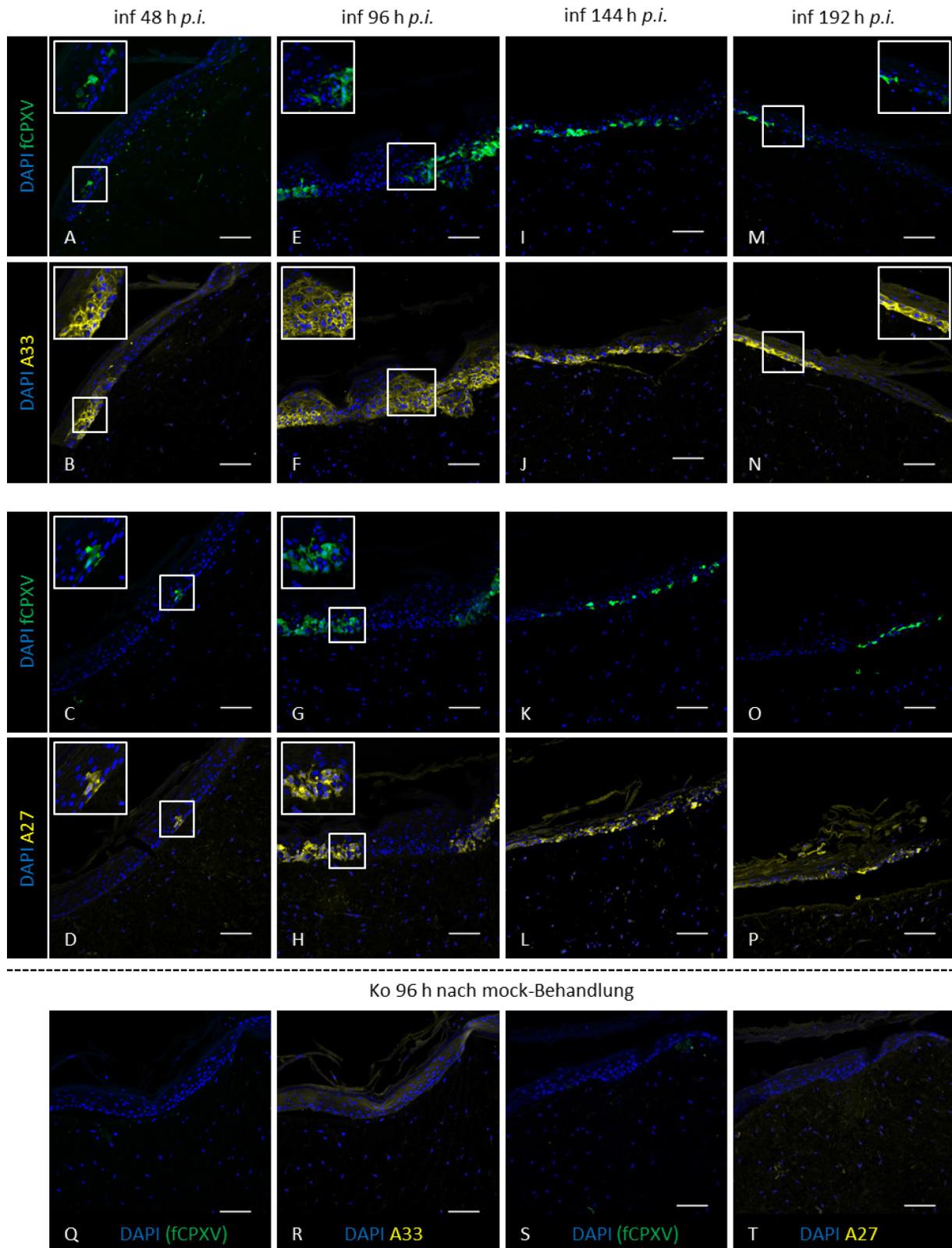


Abbildung 19: Darstellung des Infektionsverlaufes mit CPXV in Hautäquivalenten in der Immunfluoreszenz-Färbung. A-P: infiziert, A-D: 48 h *p.i.* E-H: 96 h *p.i.*, I-L: 144 h *p.i.*, M-P: 192 h *p.i.*, Q-T: Kontrolle 96 h nach Einstich. Je Zeitpunkt sind jeweils die Färbungen mit den Antikörpern gegen die Proteine CPXV168 (A33) und CPXV162 (A27) sowie die jeweiligen korrespondierenden Darstellungen der Virusfluoreszenz dargestellt. Die Nuclei wurden mit DAPI gefärbt. Die maximalen GFP - und Virusproteinsignale konnten nach 96 h Infektion detektiert werden. Maßstabsbalken \cong 100 μ m.

Abbildung 19 zeigt den Verlauf der Virusinfektion anhand von Immunfluoreszenz-Färbungen auf Schnitten der Hautäquivalente zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion. 48 h nach Infektion waren nur vereinzelte Zellen in der basalen und suprabasalen Schicht positiv für GFP, welches unter Kontrolle eines späten viralen Promotors in infizierten Zellen exprimiert wird. Die, mit dem α -A33-Antikörper gegen das früh im Replikationszyklus exprimierte Virusprotein CPXV168 gefärbten, Schnitte 48 h *p.i.* zeigten größere positive Bereiche. Diese Bereiche waren um die GFP-positiven Zellen herum angeordnet. Das Signal der mit dem α -A27-Antikörper gegen das spät exprimierte Protein CPXV162 gefärbten Schnitte erstreckte sich hingegen über dieselben Zellen wie die detektierte GFP-Fluoreszenz. Vereinzelt wurden Signale in der Dermis detektiert, wobei diese nicht einzelnen Zellen zugeordnet werden konnten und somit auch unspezifisch sein können.

Nach einer Kultivierungszeit von 96 h *p.i.* waren die Zellen in deutlich breiteren, zusammenhängenden Bereichen infiziert und somit GFP-positiv. Die Infektionsfoki waren wiederum in der basalen Epidermis verortet, wobei auch Zellen aus den differenzierten Schichten GFP- bzw. Antikörper-positiv waren (Abbildung 19G). Erneut waren breitere Bereiche CPXV168-positiv als GFP-positiv, während die Bereiche im Vergleich von CPXV162 und GFP ähnlich groß waren. Für alle nachgewiesenen Proteine gab es innerhalb der Epidermis Bereiche, in denen keine Signale detektiert wurden. Somit war nicht die komplette Epidermis des Präparates 96 h *p.i.* infiziert. In der Dermis waren weiterhin nur vereinzelte, nicht klar abzugrenzende Fluoreszenzsignale zu beobachten. Eine Ausbreitung oder Akkumulation gegenüber der Probe 48 h *p.i.* konnte nicht beobachtet werden.

Im Präparat 144 h *p.i.* war die Epidermis dünner, wirkte teils zerstört oder war abgelöst. Über das gesamte Präparat waren vor allem basale Zellen infiziert und damit GFP- und Antikörper-positiv. Weiterhin war auch ein Teil der Zellen nicht infiziert. Gegenüber dem vorherigen Zeitpunkt konnte keine Zunahme der Signale beobachtet werden. In der Dermis konnten keine Infektionsherde ausgemacht werden.

Im Präparat 192 h *p.i.* war der Anteil der fluoreszierenden Bereiche und Zellen etwas geringer als zu den zwei Zeitpunkten zuvor. Es konnten Bereiche in der dünnen, sich ablösenden Epidermis beobachtet werden, die weder GFP- noch CPXV168-positiv waren. Darüber hinaus breitete sich die Infektion zu diesem Zeitpunkt weiterhin aus, wie der Anteil von frisch infizierten, CPXV168-positiven, GFP-negativen Zellen (Abbildung 19M und N) zeigte.

In der verletzten Mock-Kontrolle, 96 h nach Behandlung, wurden keine spezifischen Signale von virusinfizierten Zellen detektiert.

Zur Vervollständigung der Analytik der Virusinfektion wurden nachfolgend die infektiösen Partikel im Zellkulturüberstand mittels Plaque-Test bestimmt.

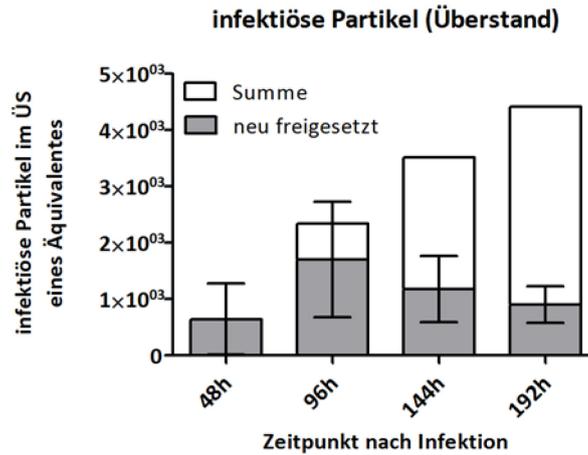


Abbildung 20: Bestimmung der infektiösen Partikel im Zellkulturüberstand infizierter Hautäquivalente im Zeitverlauf. In grau dargestellt ist hierbei der Anteil neu in das, zweitäglich komplett gewechselte, Medium freigesetzter infektiöser Viruspartikel. In weiß dargestellt ist die Summe der freigesetzten Partikel insgesamt über die Kultivierungszeit. Der Fehlerbalken repräsentiert die Standardabweichung der Neufreisetzung an infektiösen Partikeln ($n \geq 4$). Über die Kultivierungszeit stieg die Anzahl infektiöser Partikel im Überstand an. Die größte Freisetzung erfolgte im Zeitraum zwischen 48 und 96 h *p.i.*.

Abbildung 20 zeigt die Freisetzung infektiöser Partikel ins Zellkulturmedium über die Kultivierungszeit. Die Summe der freigesetzten Partikel pro Äquivalent stieg über die Kultivierungszeit auf bis zu $5 \cdot 10^3$ PFU/Äquivalent an, was etwa 30-fach unter der initial aufgebrauchten Infektionsdosis von $1,5 \cdot 10^5$ PFU/Äquivalent liegt. Die stärkste Freisetzung erfolgte in der Kultivierungsperiode zwischen 48 und 96 h *p.i.*. Die hohen Standardabweichungen an den frühen Zeitpunkten resultierten aus einer teils stark unterschiedlichen Freisetzung der infektiösen Partikel innerhalb der untersuchten Gruppe.

Alles in allem wurden die stärkste virale DNA-Replikation, Transkription, Proteinexpression und Freisetzung viraler Partikel nach 96 h *p.i.* detektiert, wobei die Ausbreitung der Infektion im Hautmodell etwas abgeschwächt auch noch weitere 96 h *p.i.* voranschritt.

3.3.3. Virale Genexpression und Morphogenese in 3D- im Vergleich zu 2D-Kultur

Nach Etablierung des Infektionsmodelles wurde dieses genutzt, um verschiedene virologische Fragestellungen zu adressieren, welche insbesondere in dreidimensionalen Geweben von Relevanz sind. Dabei wurden die Ergebnisse der Versuche im Hautmodell jeweils mit Vergleichsstudien in 2D-Kulturen abgeglichen, um Eigenschaften aber auch Vor- und Nachteile des Modells und spezifische Anwendungsbereiche und Fragestellungen für das 3D-Infektionsmodell herauszuarbeiten.

Zur genauen Charakterisierung der Virusreplikation und Virusgenese in beiden Modellen wurden vergleichende Untersuchungen durchgeführt. Zunächst wurde die Expression von zwei viralen Genen in beiden Modellen verglichen.

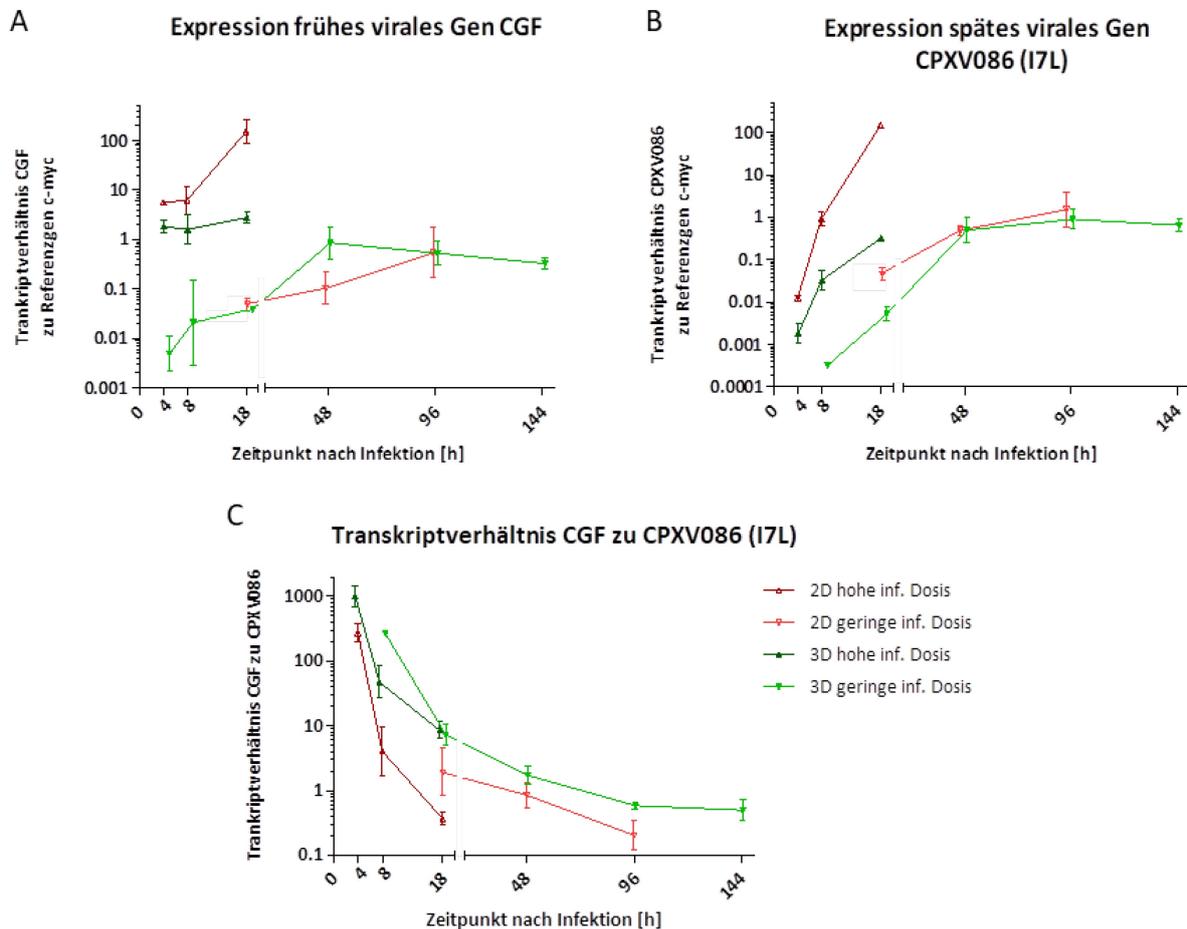


Abbildung 21: Virale Genexpression im Zeitverlauf im Vergleich zwischen 3D und 2D-Modell. Hierbei wurden die Transkripte der Gene CGF (VGF) und CPXV086 (I7L) im Zeitverlauf in Keratinozyten zwischen Epidermis und 2D-Kultur verglichen. Die hohe infektiöse Dosis entspricht 100 Viren / Zelle (3D) bzw. einer MOI von 5 (2D). Die geringe infektiöse Dosis entspricht 1 Virus / Zelle (3D) bzw. einer MOI von 0,01 (2D). A, B: Die Expression der viralen Gene CGF (A) und CPXV086 (B) wurde relativ zum Referenzgen MYC dargestellt. C: Transkriptverhältnis CGF zu CPXV086. Die relative Expression des Gens CGF (bezogen auf CPXV086) war im 3D-Modell zu allen Zeitpunkten höher als im 2D-Modell.

Abbildung 21 zeigt die Expression der pockenviralen Gene CGF (VGF) und CPXV086 (I7L) als virale Transkripte im zeitlichen Verlauf, referenziert auf die Expression des MYC-Gens. Das, früh während des pockenviralen Replikationszyklus exprimierte, Gen CGF zeigte in Keratinozyten aus 2D Kultur mit hoher infektiöser Dosis eine starke Expression nach 4 und 8 h Infektion und einen Anstieg auf ein Maximum 18 h *p.i.*. In der Epidermis der 3D-Kultur war die Expression an den frühen Zeitpunkten mit der hohen infektiösen Dosis relativ konstant und lag etwa eine log-Stufe unter der Expression in 2D-Kultur. Während der längeren Kultivierung mit geringer infektiöser Dosis war im 3D-Modell ein Anstieg der CGF-Expression bis 48 h *p.i.* - mit leichtem Rückgang bis 144 h *p.i.* - zu verzeichnen. Die Expression des späten Gens CPXV086 stieg in allen untersuchten Kinetiken über die Zeit an.

Insbesondere an den frühen Zeitpunkten mit hoher infektiöser Dosis war in beiden Kulturmodellen ein starker Anstieg der CPXV086-Transkriptmenge zu beobachten. Das Maximum der CPXV086-Expression im 3D-Modell lag, wie bereits beschrieben, am Zeitpunkt 96 h *p.i.*

Ein Unterschied beider Kultivierungsarten wurde beim Vergleich des Transkriptverhältnisses von CGF zu CPXV086 deutlich. Zu allen Zeitpunkten war die CGF-Expression in 3D-Kultur, normalisiert auf die CPXV086-Expression, höher als in 2D-Kultur. Generell nahm das Expressionsverhältnis des frühen Markers CGF zum späten Marker CPXV086 in allen Kultivierungsarten und Kinetiken über die Zeit ab. Zum Zeitpunkt 4 h *p.i.* mit einer geringen infektiösen Dosis konnte in 3D-Kultur keine Expression des späten Gens CPXV086 detektiert werden.

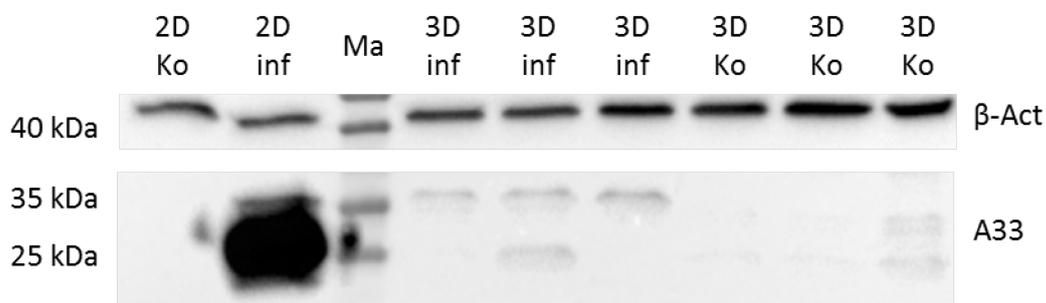


Abbildung 22: Nachweis des CPXV168-Proteins (VACV Homolog A33) im Western Blot im Vergleich zwischen 2D- und 3D-Infektionsversuchen humaner Keratinozyten. Die Proben wurden 18 h nach Infektion mit einer hohen infektiösen Dosis von 100 Viren / Zelle (3D; n = 3) bzw. MOI von 5 (2D, n = 1) entnommen. Die Auftragung erfolgte auf demselben Gel bei gleicher Belichtungszeit des Blots. Die 3D-Proben wurde in Triplikaten aufgetragen. Als Ladekontrolle diente β-Aktin. Inf – infiziert, Ko – Kontrolle, Ma – Markerbanden. In der Probe aus 2D-Kultur wurde deutlich mehr Virusprotein detektiert. Des Weiteren befand sich die Hauptbande in der infizierten Probe aus 2D-Kultur bei einem um etwa 10 kDa geringeren Molekulargewicht.

Zum Vergleich der viralen Proteinmenge zwischen beiden Kultivierungsarten wurde das virale Oberflächenprotein CPXV168 (VACV-Homolog: A33) im Western Blot untersucht. Abbildung 22 zeigt den Nachweis des Proteins in Proben 18 h *p.i.* mit einer jeweils hohen infektiösen Dosis. In 2D-Kultur konnte bei gleicher Belichtungszeit eine deutlich höhere Menge an CPXV168 nachgewiesen werden. Dabei zeigte die Ladekontrolle β-Aktin eine ähnliche Bandenintensität. Des Weiteren betrug das Molekulargewicht der Hauptbande des CPXV168-Proteins in 2D-Kultur etwa 25 kDa, während die CPXV168-Bande in 3D-Kultur bei ca. 35 kDa lag. Bei 35 kDa konnte in 2D-Kultur eine schwache Nebenbande detektiert werden. In den 3D-Proben konnte z.T. eine Nebenbande bei 25 kDa detektiert werden, wobei diese nicht spezifisch für infizierte Proben war und teils auch in den Kontrollen gefunden wurde. Der Expressions- und Molekulargewichtsunterschied des CPXV168-Proteins zwischen 3D- und 2D-Kultur konnte in Proben eines späten Zeitpunktes mit einer geringen infektiösen Dosis bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Morphologie pockenviraler Partikel (EM)

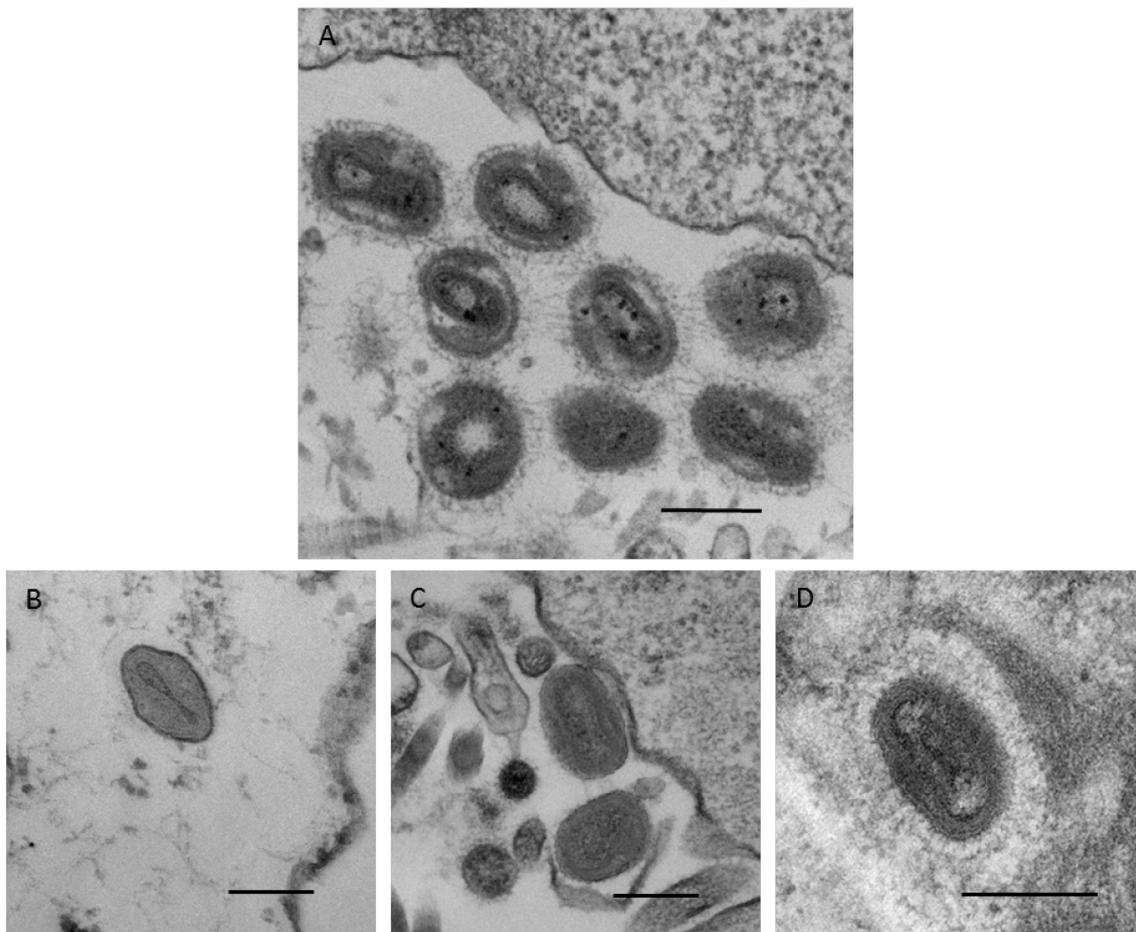


Abbildung 23: Elektronenmikroskopische Aufnahmen extrazellulärer, viraler Partikel aus verschiedenen Infektionsmodellen. A: CPXV-Partikel nahe der Dermis-Epidermis-Grenze des 3D-Hautmodells, B: CPXV-Partikel aus Virusanzucht in Hep-2-Zellen in 2D-Kultur, C: Partikel aus einem Infektionsversuch in einem 3D-Perikardmodell epidermaler Keratinozyten (zur Verfügung gestellt von Robert Koban), D: CPXV-Partikel aus Hautbiopsat einer Patientenprobe (zur Verfügung gestellt von Gudrun Holland). Bei A - C wurde mit demselben Virusisolat (fCPXV BACWT dieser Arbeit) gearbeitet, während die Probe aus D aus einer zoonotischen Infektion eines Patienten *in vivo* entnommen wurde. Die Aufarbeitung erfolgte nach vergleichbaren Protokollen. Um die Partikel aus 3D-Hautäquivalenten konnte ein charakteristischer Saum, vermutlich aus Glykoproteinen, detektiert werden, welcher in den anderen Proben nicht oder nicht klar zu sehen war. Maßstabsbalken \triangleq 200 nm.

Ein weiterer Unterschied der Kultivierungsverfahren wurde durch den Vergleich der extrazellulären CPXV-Partikel in elektronenmikroskopischen Untersuchungen offengelegt (Abbildung 23). Die extrazellulären, an der Grenzschicht zwischen Dermis und Epidermis befindlichen Virionen aus den Hautäquivalenten zeigten in verschiedenen Proben und Untersuchungen einen charakteristischen Oberflächensaum, welcher vermutlich aus Glykoproteinen zusammengesetzt ist. Dieses Phänomen konnte bei der Untersuchung des verwendeten Virusstocks aus der Virusanzucht in 2D-Kultur nicht beobachtet werden. Auch in Proben aus primären Keratinozyten, welche aus einem matrixbasierten 3D-Modell (Perikard) stammen, wurde kaum Oberflächensaum gefunden (Robert Koban, persönliche Mitteilung).

In einer Patientenprobe aus einer *in vivo* Infektion mit Kuhpockenviren konnte kein klares Ergebnis in Bezug auf die Oberflächenstruktur abgeleitet werden. Zum Teil war ein oberflächlicher Saum auf den Partikeln vorhanden, wobei es Unterschiede in der Beprobungsdurchführung zur 3D-Kultivierung *in vitro* gab und es sich um andere Virusstämme handelte (Gudrun Holland, persönliche Mitteilung).

3.4. Anwendungen des Infektionsmodells

Nach der Charakterisierung des 3D-Hautmodells und der Etablierung als Infektionsmodell wurde dieses genutzt, um spezifische Fragestellungen der orthopockenviralen Infektionsforschung zu bearbeiten und damit die Anwendbarkeit des Modells auf diesem Gebiet zu zeigen.

3.4.1. Untersuchung von pockenviral beeinflussten zellulären Genen und Signalwegen

Ein Beispiel für einen zellulären Signalweg, der durch die Infektion mit CPXV beeinflusst wird, ist der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)-Signalweg [207]. EGFR als zellulärer Rezeptor wird durch die Bindung des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) stimuliert, was zur Phosphorylierung des Rezeptors an verschiedenen Tyrosin-Resten führt (zu pEGFR). Durch diese Phosphorylierung wird eine weitergehende Signalkaskade ausgelöst [208].

Als Antagonist von EGF kann auch das viral exprimierte Protein CGF (VACV-Homolog: VGF) an den EGFR binden und die Phosphorylierung bedingen, um die weitere Signalkaskade, die unter anderem Zellproliferation fördert und Apoptose hemmt, auszulösen [207]. Die Rezeptorphosphorylierung wurde aus diesem Grund an immunhistochemisch gefärbten Schnitten im 3D-Modell untersucht und mit der EGFR-Phosphorylierung in 2D-Kultur humaner, primärer Keratinozyten verglichen (Abbildung 24).

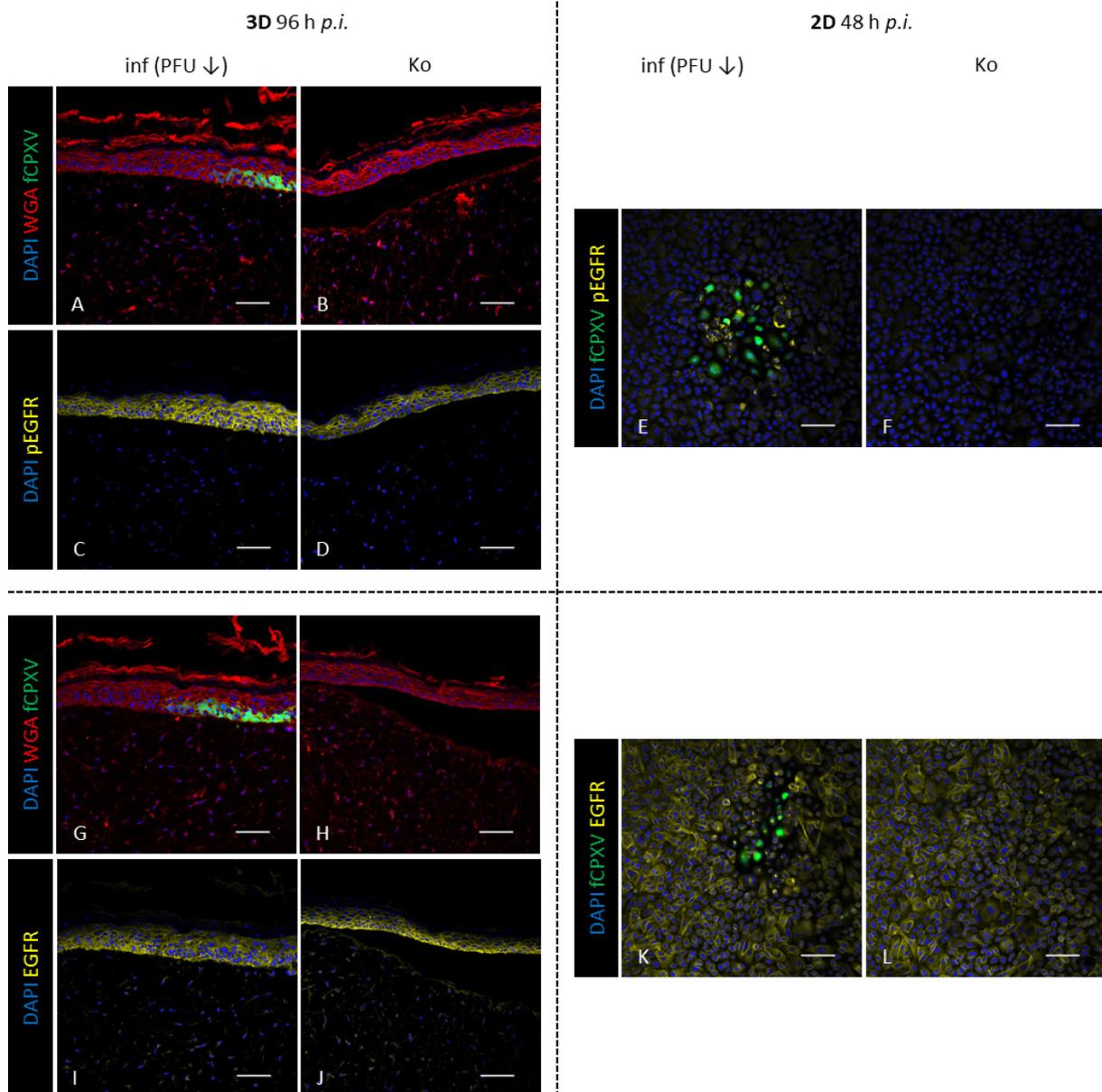


Abbildung 24: Untersuchung der Phosphorylierung des EGFR in immunhistochemisch gefärbten Präparaten von 3D- und 2D-Kulturen. Hierbei wurden die Zeitpunkte 96 h p.i. (3D) und 48 h p.i. (2D) verglichen, welche jeweils mit geringer infektiöser Dosis (1 Virus/Zelle bzw. MOI = 0,01) infiziert wurden (A, C, E, G, I, K). Dargestellt sind die spezifische Färbung auf pEGFR (C-F) und EGFR (I-L). Für die 3D-Schnitte ist jeweils zusätzlich ein Bild des Infektionsstatus (A, B, G, H) gezeigt, während bei den 2D-Proben jeweils das GFP-Signal des fluoreszenten CPXV-Isolates im Multikanalbild inkludiert wurde. In 3D- und vor allem 2D-Kultur war infektionsabhängig ein deutlicher Anstieg der pEGFR-Signale ohne offensichtliche Änderung der EGFR-Signale zu detektieren. Maßstabsbalken $\cong 100 \mu\text{m}$.

Für die Untersuchung der EGFR-Phosphorylierung wurden stark infizierte Proben der Zeitpunkte 96 h p.i. (1 Virus/Zelle, 3D) und 48 h p.i. (MOI = 0,01, 2D) untersucht. In 3D-Kultur war in den Kontrollen eine Expression des EGFR in der gesamten Epidermis zu detektieren, welche die stärksten Signale in der basalen Region zeigte. In der gesamten Epidermis war ebenso in der mock-infizierten, verletzten Kontrolle eine Phosphorylierung des EGFR zu diesem Zeitpunkt zu detektieren. Die stärksten Signale waren hier hingegen etwas weiter apikal, im *Stratum spinosum* und *granulosum*, zu detektieren, obwohl sich in diesem Bereich nicht die höchste Rezeptordichte befand.

Während die Gesamtexpression des Rezeptors nach Infektion nicht geändert wurde und auch in infizierten Bereichen gleich blieb, waren stärkere pEGFR-Signale in der Epidermis infizierter Hautäquivalente zu beobachten. Die verstärkte Phosphorylierung des Rezeptors erfolgte dabei in Bereichen von etwa 10-20 Zellen in horizontaler Richtung direkt neben infizierten Zellen.

In korrespondierenden 2D-Proben von Keratinozyten konnte eine EGFR-Proteinexpression auf der Oberfläche der Zellen nachgewiesen werden. Diese war während der Infektion im Mittel unverändert, wobei es durch die Morphologieänderung infizierter Keratinozyten teilweise zu einem Zusammenziehen von Zellen und Signalen kam. Die Rezeptorphosphorylierung uninfizierter Keratinozyten in 2D-Kultur fehlte fast komplett und war damit deutlich schwächer als in den Kontrollen aus 3D-Kultur. Bei Infektion mit CPXV wurden deutliche Signale des phosphorylierten Rezeptors in infizierten Zellen und benachbarten Zellen in einem engen, plaqueähnlichen Bereich detektiert.

Diese Beobachtungen der EGFR-Phosphorylierung bei Infektion und deren Unterschiede zwischen 2D- und 3D-Kultivierung dienten als Ausgangspunkt für die Durchführung des Hemmstoffversuches mit Gefitinib (siehe Kapitel 3.4.4).

Zur weiteren Charakterisierung des Infektionsmodells auf die zelluläre Genregulation im Vergleich zur 2D-Kultur wurde die Transkription ausgewählter Gene mittels qPCR untersucht. Hierzu zählt der Transkriptionsfaktor EGR1, welcher schon während CPXV-Infektionen in 2D-Kulturen als hochreguliert beschrieben worden ist [152, 209], und der Proliferationsmarker Ki-67.

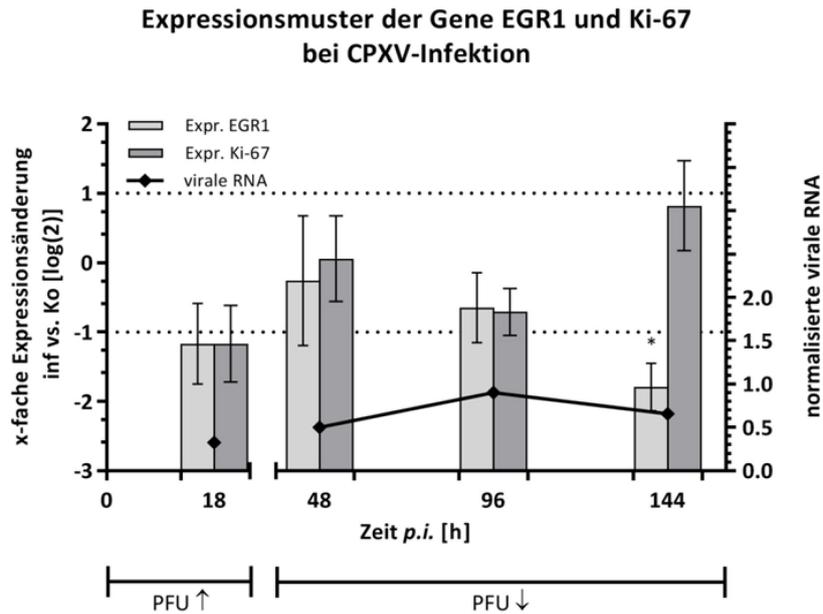


Abbildung 25: Expressionskinetik von EGR1 und Ki-67 in epidermalen Keratinozyten (3D-Modell) im Infektionsverlauf. Dargestellt ist die Expressionsänderung zwischen infizierten Proben und Kontrollen (je biologische Triplikate) referenziert auf die vier Referenzgene MYC, GAPDH, TBP und B2M. Zur Veranschaulichung des Infektionsstatus dient die normalisierte, virale mRNA-Expression (CPXV086) der infizierten Proben. Der Marker EGR1 war nur nach 144 h *p.i.* signifikant herunterreguliert, ansonsten unreguliert. Ki-67 war in allen untersuchten Proben nicht signifikant reguliert.

Abbildung 25 zeigt die Regulation der Transkription von EGR1 und Ki-67 im Zeitverlauf in Keratinozyten aus der Epidermis der Hautäquivalente. Für EGR1 konnte in keiner der Proben eine Hochregulation gezeigt werden. Nach 144 h der Infektion war die EGR1-mRNA-Expression infizierter Proben gegenüber den Kontrollen signifikant um etwa Faktor 4 herunterreguliert. Für Ki-67 konnte zu keinem der Zeitpunkte eine signifikante, mehr als zweifache Expressionsänderung zwischen infizierter Epidermis und Kontrollepidermis gezeigt werden. Das Fehlen einer Regulation auf mRNA-Ebene für die Gesamtkultur bedeutet allerdings nicht zwingend, dass diese Proteine für die virale Infektion in einzelnen Zellen nicht von Relevanz sind.

Um den Proliferationsmarker Ki-67 auf seine Bedeutung weiter zu analysieren und dabei die Lokalisation der Ki-67 positiven Zellen in Bezug auf die Infektion zu ergründen, wurde der Marker in immunhistochemisch gefärbten Schnitten untersucht (Abbildung 26).

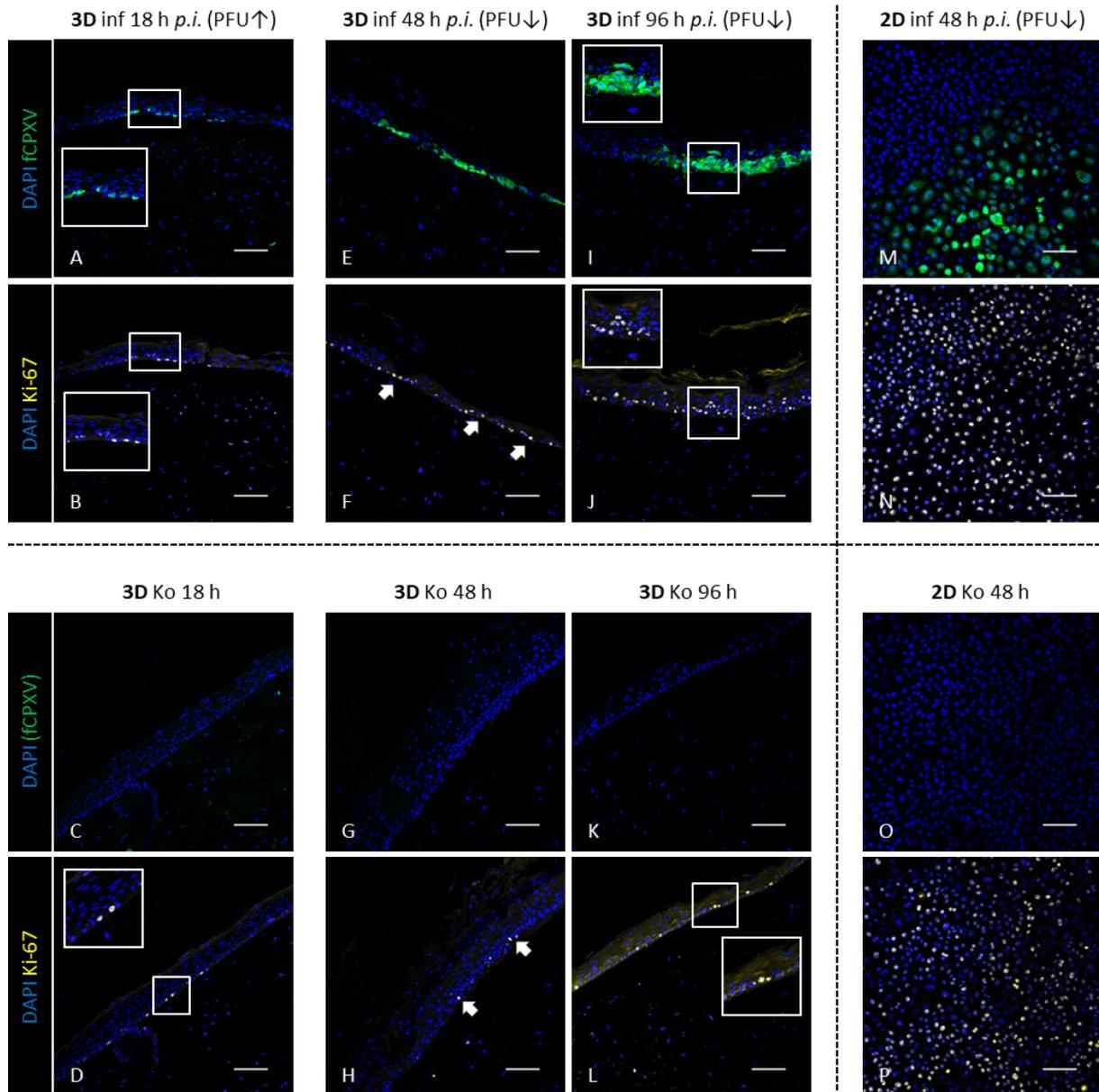


Abbildung 26: Immunfluoreszenz-Nachweis des Ki-67-Proteins in Keratinozyten während der Infektion. Hierbei wurden Proben zu den Zeitpunkten 18 h *p.i.* (A-D), 48 h *p.i.* (E-H) und 96 h *p.i.* (I-L) aus Hautäquivalenten bzw. zum Zeitpunkt 48 h *p.i.* (M-P) in 2D-Kultur betrachtet. Die Pfeile zeigen Ki-67-positive Zellen, sofern nicht vergrößert dargestellt. Ki-67-positive Zellen waren in infizierten 3D-Kulturen zumeist auch GFP-positiv und damit infiziert. Maßstabsbalken $\cong 100 \mu\text{m}$

In infizierten Proben und Kontrollen aus Hautäquivalenten waren je nach Kultivierungszeit gleichermaßen etwa 10-20 % der Nuclei der Zellen Ki-67-positiv. Ki-67-positive Zellen waren aber deutlich häufiger infiziert. Insbesondere an den frühen Kultivierungszeitpunkten 18 und 48 h *p.i.* waren die Kerne fast aller infizierter, GFP-positiver Zellen auch Ki-67-positiv. In 2D-Kultur waren in der Kontrollprobe deutlich über 50 % der Zellkerne Ki-67-positiv. In infizierten Zellen aus 2D-Kultur konnte keine deutliche Änderung der Signalintensität oder -lokalisation gegenüber den Kontrollen beobachtet werden.

Neben der Proliferation wurde auch die Apoptose in infizierten Hautäquivalenten untersucht, da auch diese durch die Infektion mit Kuhpockenviren moduliert werden kann [151]. Hierzu wurde die Spaltung der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP zu cPARP) im Western Blot analysiert.

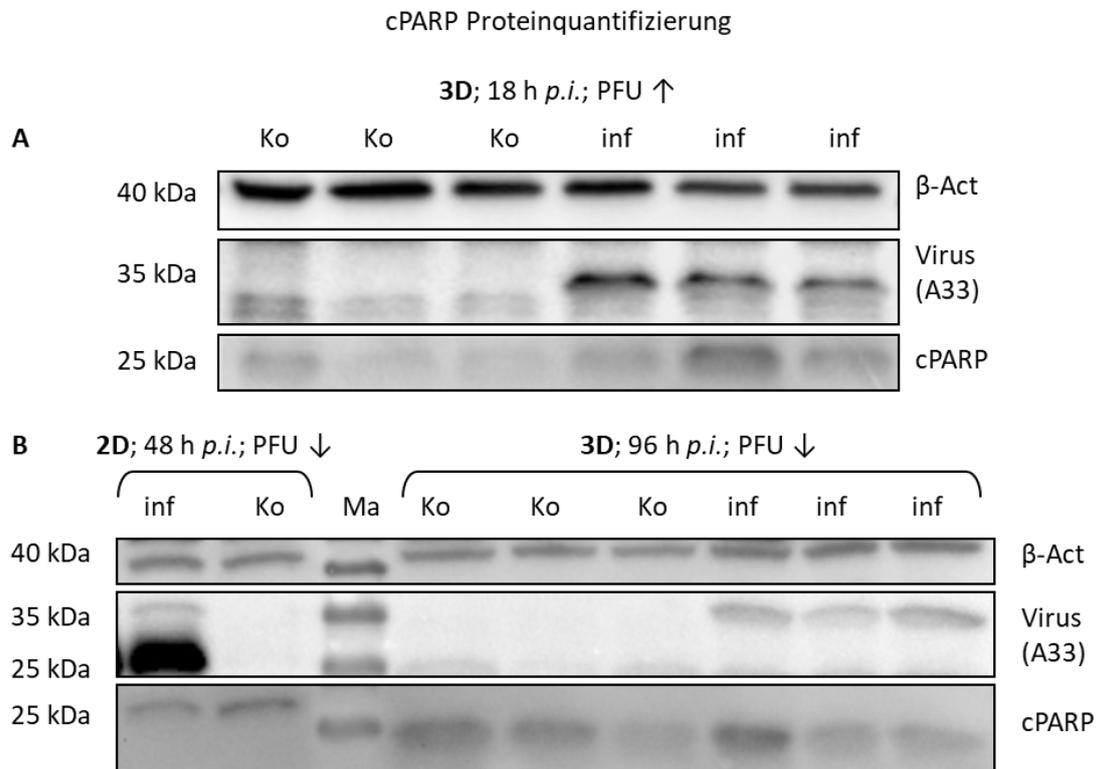


Abbildung 27: Quantifizierung des cPARP-Proteins unter verschiedenen Bedingungen. Dargestellt sind hierbei jeweils die Bandenmuster aus dem Western Blot der Proteine aus Keratinozyten für cPARP, die Ladekontrolle β-Aktin und Virusprotein (CPXV168/A33). A: Bandenmuster von infizierten Proben (inf) und Kontrolle (Ko) aus epidermalen Keratinozyten (3D) 18 h *p.i.* mit einer hohen infektiösen Dosis. B: Bandenmuster für inf und Ko aus Keratinozyten aus 2D bzw. 3D Kultur 48 bzw. 96 h *p.i.* mit einer geringen infektiösen Dosis. Ma – Markerbanden. Die 3D-Proben wurden in biologischen Triplikaten aufgetragen. Das cPARP-Protein wurde nur als schwache Bande in den Proben detektiert, wobei keine deutlichen Unterschiede zwischen infizierten Proben und Kontrollen auftraten.

Dabei konnten zu beiden untersuchten Zeitpunkten nach Infektion im 3D-Modell nur geringe Mengen an cPARP detektiert werden. Während 18 h *p.i.* die Signale an cPARP in den infizierten Proben im Mittel leicht stärker waren als in den Kontrollen, war dieser Unterschied nach 96 h Inkubationszeit und in 2D-Kultur nicht sichtbar. Eine starke, infektionsbedingte Hochregulation der cPARP-assoziierten Apoptose konnte insgesamt nicht nachgewiesen werden. Weiterhin wurde die Gen- und Proteinexpression des Apoptose-assoziierten Proteins PUMA via qPCR, Western Blot und Immunhistochemie untersucht (Daten nicht gezeigt). Auch bei diesem Protein konnte keine Regulation zwischen infizierten und nicht-infizierten Proben in 3D-Kultur beobachtet werden.

Als weiterer Marker für die Apoptose diente die freie DNA apoptotischer Zellen, welche immunhistochemisch mittels TUNEL-Assay nachgewiesen wurde.

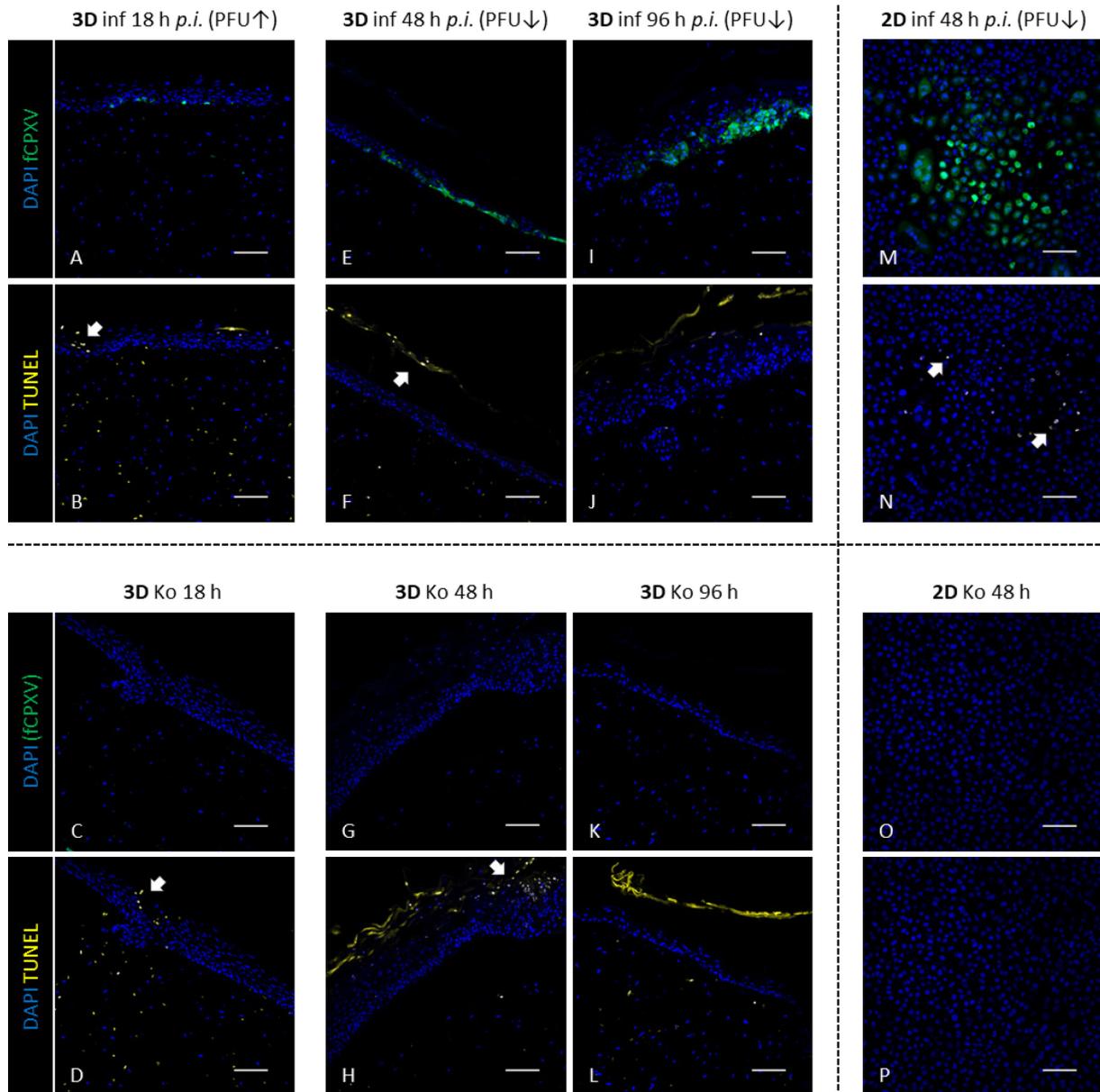


Abbildung 28: Immunfluoreszenz-Nachweis von freier DNA mittels TUNEL-Assay in Keratinozyten während der Infektion. Betrachtet wurden Proben zu den Zeitpunkten 18 h *p.i.* (A-D), 48 h *p.i.* (E-H) und 96 h *p.i.* (I-L) aus Hautäquivalenten bzw. zum Zeitpunkt 48 h *p.i.* (M-P) in 2D-Kultur. Die Pfeile zeigen TUNEL-positive Bereiche. TUNEL-Signale traten vor allem in der Hornschicht der Epidermis, nahe Einstichstellen und in der Dermis auf. In 2D-Kultur fanden sich die vereinzelt Signale in infizierten Bereichen. Maßstabsbalken $\cong 100 \mu\text{m}$

Abbildung 28 zeigt die Analyse freier DNA als Endpunkt der Apoptose mittels TUNEL-Assay. TUNEL-positive Bereiche fanden sich zumeist in der Dermis und der Hornschicht der Hautäquivalente, sofern diese vorhanden war. Des Weiteren konnten vor allem zu frühen Zeitpunkten nach Infektion und nach Verletzung sowohl in Kontrollen als auch in infizierten Hautäquivalenten TUNEL-Signale nahe den verletzten Stellen des Einstiches lokalisiert werden. Eine direkte Assoziation mit infizierten, GFP-positiven Zellen war zu keiner Zeit zu finden. Die GFP-positiven Zellen waren in 3D-Kultur immer TUNEL-negativ.

In 2D-Kultur primärer Keratinozyten waren ohne Infektion keine TUNEL-Signale zu detektieren. Bei infizierten Präparaten waren vereinzelt fokussierte Signale in GFP-positiven, plaqueähnlichen Bereichen zu detektieren, wenngleich nicht alle stark GFP-positiven Zellen ein TUNEL-Signal trugen.

Da die in dieser Voruntersuchung analysierten spezifischen Prozesse keine signifikante infektionsabhängige Regulation in der 3D-Kultur zeigten, wurde eine breitere Untersuchung der Genregulation mit NGS-basierter Transkriptomanalyse durchgeführt.

3.4.2. NGS-basierte Transkriptomanalysen

Zur umfassenderen Untersuchung der Regulation von Genen zwischen Zellen in 2D- und 3D-Kultur mit oder ohne Infektion wurden Transkriptomanalysen mithilfe von RNA-Sequenzierung durchgeführt. Hierfür wurden repräsentative Proben ausgewählt, die RNA aufgearbeitet und nach Qualitätskontrolle analysiert. In zwei Illumina-Läufen wurden verschiedene Proben humaner Keratinozyten aus 2D-Kultur bzw. in separierter Epidermis aus 3D-Hautäquivalenten untersucht (Tabelle 23). Je Zeitpunkt wurden für die infizierten Proben und die Kontrollen jeweils biologische Triplikate untersucht.

Tabelle 23: Liste der mittels NGS-basierter Transkriptomanalyse untersuchten Proben

Kultivierung	Infektiöse Dosis	Zeitpunkt	Kontrolle
3D Epidermis	100 Viren/Zelle	18 h <i>p.i.</i>	mock-infiziert 18 h (7 Tage Vordifferenzierung)
3D Epidermis	1 Virus/Zelle	96 h <i>p.i.</i>	mock-infiziert 96 h (7 Tage Vordifferenzierung)
2D NHEK	MOI = 5	4 h <i>p.i.</i>	mock-infiziert 4 h (1 Tag Vorkultivierung)
2D NHEK	MOI = 5	8 h <i>p.i.</i>	mock-infiziert 4 h (1 Tag Vorkultivierung)
2D NHEK	MOI = 1	18 h <i>p.i.</i>	mock-infiziert 18 h (1 Tag Vorkultivierung)
2D NHEK	MOI = 0,01	48 h <i>p.i.</i>	mock-infiziert 48 h (1 Tag Vorkultivierung)

Hierbei sind frühe Zeitpunkte der Infektion mit hoher Infektionsdosis (bis 18h *p.i.*), an denen die Zellen zum Großteil durch Primärinfektion infiziert worden sind und spätere Zeitpunkte mit niedriger Infektionsdosis, an denen sich die Infektion in der Kultur bereits von Zelle zu Zelle ausbreiten konnte, zu unterscheiden.

RNA Qualität und quantitative Zuordnung der Reads

Im Vorfeld der detaillierten Analyse auf Genebene erfolgten die Bestimmung der Qualität der RNA-Präparation und der gewonnenen Sequenzdaten sowie die statistische Auswertung der Zuordnung der Reads zu Proben und Referenzsequenzen. Diese Voruntersuchungen zur Qualitätssicherung sind in Abbildung 29 exemplarisch für die epidermalen Proben 96 h *p.i.* gezeigt.

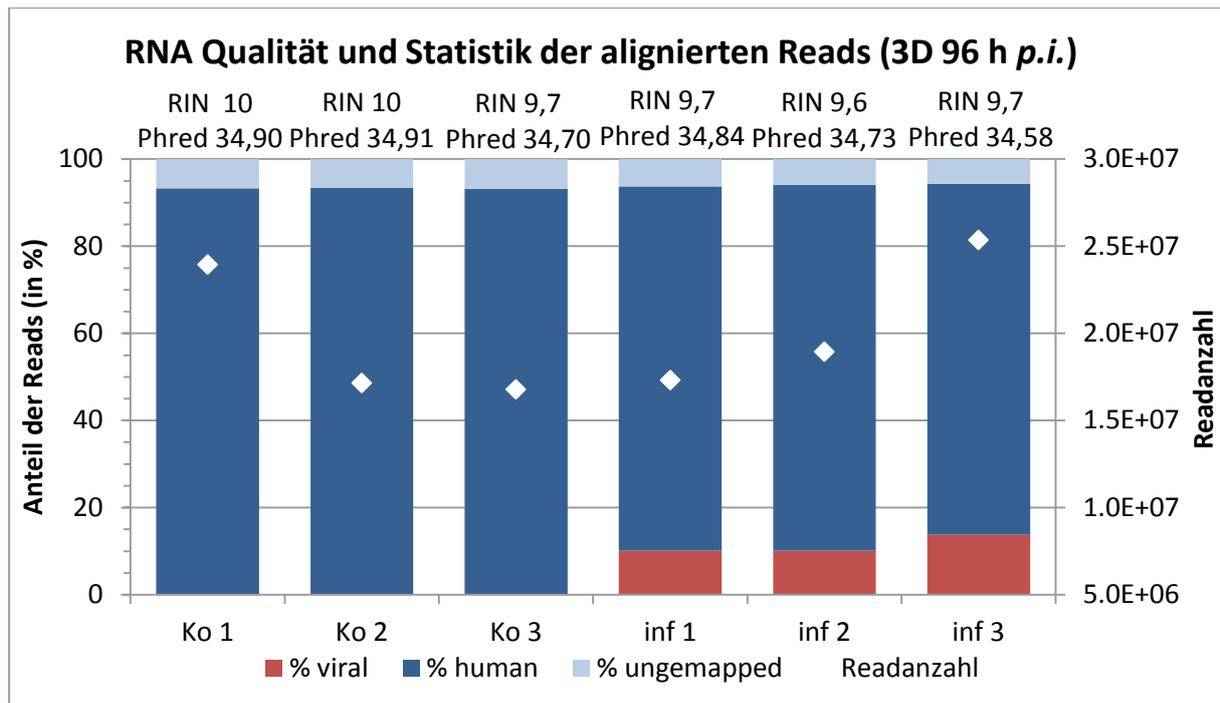


Abbildung 29: RNA-Qualität und statistische Zuordnung der Reads am Beispiel der Proben der 3D-Kultivierung, 96 h *p.i.* RIN gibt die RNA-Integritätsnummer an (maximaler Wert für maximale Integrität ist 10). Der Phred-Wert beschreibt den Sequenzierfehler (Phred 30 \cong 0,1% Fehler; Phred 40 \cong 0,01% Fehler)

Alle untersuchten Proben der Triplikate der Kontrollen bzw. infizierten Proben in diesem Setup zeigten RIN-Werte zwischen 9,6 und 10. Die Phred-Scores der generierten Reads lagen zwischen 34,58 und 34,90. Für die anderen Kultivierungsbedingungen ergab sich ein ähnliches Bild, wenngleich die RIN-Werte bei infizierten 2D-Proben mit bis zu 8,5 etwas niedriger waren. Dies war jedoch immer noch eine sehr gute Qualitätsstufe und für die nachfolgende Sequenzierung geeignet.

Pro Epidermisprobe (96 h *p.i.*) wurden jeweils über 15 bis zu über 25 Mio Reads generiert. Dabei wurden bei den Kontrollen etwa 94 % der Reads dem humanen Referenzgenom zugeordnet und nur 6 % konnten nicht aligniert werden. Bei den infizierten Proben wurden etwa 11 % der Reads dem viralen Genom zugeordnet, 6 % blieben nicht-aligniert und die restlichen 83 % waren humanen Ursprunges. Unter den nicht-alignierten Reads konnten über eine Nachanalyse keine spezifischen Organismen als überrepräsentiert identifiziert werden, die auf eine mögliche Kontamination der Proben (z. B. mit anderen Viren oder Bakterien) hindeuteten. Ein Großteil dieser nicht-alignierten Reads bestand aus humanen und pockenviralen Sequenzen mit einer geringeren Übereinstimmung zur Referenzsequenz, welche durch das gewählte Minimum der Identitätsübereinstimmung mit der Referenz nicht zugeordnet werden konnten.

Für die weiteren Kultivierungszeiten und die 2D-Proben wurden ebenso jeweils über 10 Mio Reads pro Probe generiert. Der Anteil von viralen Reads an der Gesamtzahl ist in Tabelle 24 zusammengefasst.

Tabelle 24: Prozentualer Anteil viraler *Reads* an der Gesamtanzahl der *Reads* in den sequenzierten Probenfraktionen

Probe	CPXV <i>Reads</i>
3D 18 h <i>p.i.</i> , 100 Viren pro Zelle	4.21 ± 0.33 %
3D 96 h <i>p.i.</i> , 1 Virus pro Zelle	11.12 ± 2.1 %
2D 4 h <i>p.i.</i> , MOI = 5	10.44 ± 0.54 %
2D 8 h <i>p.i.</i> , MOI = 5	58.53 ± 0.94 %
2D 18 h <i>p.i.</i> , MOI = 1	63.79 ± 1.47 %
2D 48 h <i>p.i.</i> , MOI = 0,01	10.16 ± 2.25 %

Der Anteil viraler *Reads* differierte stark zwischen den einzelnen untersuchten Kultivierungsbedingungen. So waren in der 2D-Kultur an den Zeitpunkten 8 h und 18 h *p.i.* mit hohen MOIs etwa 60 % der *Reads* kuhpockenviralen Ursprunges, während am Zeitpunkt 4 h *p.i.* und mit einer geringen MOI nach 48 h nur etwa 10 % virale *Reads* waren. Im 3D-Modell waren am Zeitpunkt 18 h *p.i.* 4 % der *Reads* viralen Ursprunges und 11 % am Zeitpunkt 96 h *p.i.*. Die Variation des Anteils in den Triplikaten nahm bei beiden Kultivierungsverfahren mit längerer Kultivierungszeit zu und betrug bei den späten Kultivierungszeitpunkten etwas über 2 %.

Vergleich der Regulation zellulärer Gene zwischen den Kontrollen in 3D- und 2D-Kultur

Um zunächst die modellspezifischen Unterschiede ohne Infektion zu identifizieren, wurde die zelluläre Genexpression zwischen beiden Modellen anhand der verschiedenen Kontrollen verglichen. Hierbei wurden Kontrollen zu einem frühen und einem späten Zeitpunkt in den verschiedenen Modellen ins Verhältnis gesetzt. Der frühe Zeitpunkt in der 2D-Kultivierung der primären Keratinozyten bei einem Tag Vorkultivierung liegt bei 18 h nach Mediumwechsel und Mock-Infektion und der späte Zeitpunkt 48 h nach Mock-Infektion. Im 3D-Setup wurden die Epidermis-Proben nach einwöchiger Differenzierung 18 h (früh) und 96 h (spät) nach Mock-Infektion und damit Verletzung mit der Impfnadel eingesetzt. Tabelle 25 zeigt die statistische Verteilung signifikant regulierter Gene in beiden Vergleichen. Als signifikant reguliert wurden hierbei Gene definiert, bei welchen in Summe aller betrachteten Triplikate mehr als 100 *Reads* detektiert wurden, eine signifikante *false discovery rate* (FDR) zwischen den betrachteten Gruppen von unter 0,05 vorlag und eine mindestens zweifache Expressionsänderung auftrat.

Tabelle 25: Statistische Verteilung regulierter Gene beim Vergleich von 3D-Modell und 2D-Kulturen zu zwei Zeitpunkten

Kriterium	früh	spät
Gene mit mehr als 100 <i>Reads</i>	12796 (100 %)	12758 (100 %)
Signifikant hochreguliert 3D vs. 2D	1600 (12,5 %)	1385 (10,9 %)
Signifikant herunterreguliert 3D vs. 2D	4367 (34,1 %)	2133 (16,7 %)

Im Vergleich der frühen Zeitpunkte zwischen den zwei Kulturverfahren waren insgesamt 46,6 % der Gene reguliert. Davon zeigten 12,5 % der Gene eine Hochregulation im Hautmodell und 34,1 % eine Herunterregulation. Am späten Zeitpunkt waren 27,6 % der Gene reguliert, wobei 10,9 % im 3D-Modell hoch- und 16,7 % herunterreguliert waren.

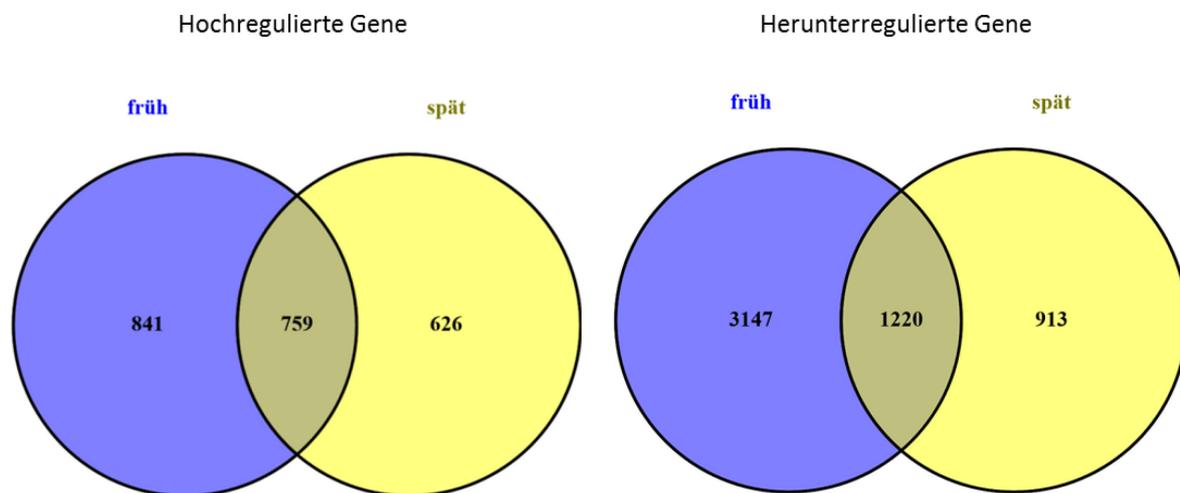


Abbildung 30: Vergleich der regulierten Gene zwischen Kontrollen von 3D- und 2D-Kultur zu zwei Zeitpunkten

Zum Vergleich der beiden Zeitpunkte wurden die gleich und unterschiedlich regulierten Gene ermittelt (Abbildung 30). Insgesamt 1979 Gene waren in beiden betrachteten Vergleichen zwischen 3D- und 2D-Kultur unabhängig von der Kultivierungszeit gleich reguliert.

Zur Untersuchung des biologischen Kontextes der regulierten Gene wurden *GO term*-Analysen der regulierten Gene durchgeführt, um überproportional repräsentierte zelluläre Prozesse zu identifizieren, welche sich zwischen den beiden Kultivierungsarten unterschieden.

Tabelle 26: Liste überrepräsentierter biologischer Prozesse aus der *GO term*-Analyse von in 3D hochregulierten Genen (früher Kultivierungszeitpunkt)

Biologischer Prozess	Korrigierter p-Wert	Beispielgene
Entwicklung / Differenzierung der Epidermis	$4,3 \cdot 10^{-36}$	FLG; LOR; IVL; KRT1; KRT2; KRT10; LCE1A bis LCE2D; TGM1,3 und 5; TCHH; SPRRs
Regulation der Zellproliferation	$2,2 \cdot 10^{-8}$	KGF; FOXO1; VEGFA1; SOX4; SOX7; JUN
Reaktion auf Stress	$5 \cdot 10^{-8}$	IL20RA; IL1R1; DEF103A und B
Lipid Metabolismus	$3,8 \cdot 10^{-7}$	GBA; LIPH; LIPK; LIPN; PTGS2
Zell-Zell-Kontakt	$4 \cdot 10^{-7}$	CLDN1; CLDN17; PPL; OCLN; PCDH1
Wundverschluss	$1,6 \cdot 10^{-6}$	CTGF; S100A7; S100A8; CCLs 5,20,22
Regulation der Apoptose	$2,1 \cdot 10^{-5}$	DAPK1; DAPK2; MCL1; DDIT3
Aufbau des Desmosoms	$4,8 \cdot 10^{-5}$	DSC1; DSC2; DSG1; DSG3; EVPL
Reaktion auf Hypoxie	$4 \cdot 10^{-4}$	HIF1A; HIF3A; HMOX1
Bindung von Wachstumsfaktoren	$4,9 \cdot 10^{-4}$	IL1R1; IL1R2; IL6R; CD36
Abwehrreaktion (von Pathogenen)	$1,92 \cdot 10^{-3}$	CD55; CD86; CXCL8; CXCR2; DEFB1; RNASE7

Tabelle 26 zeigt signifikant überrepräsentierte biologische Prozesse unter den hochregulierten Genen im Vergleich von 3D- und 2D-Kultur am frühen Zeitpunkt, sortiert nach berechneter Signifikanz. Vor allem die Entwicklung und Differenzierung der Epidermis war im 3D-Modell signifikant hochreguliert (siehe auch Tabelle 28). Auch die Regulation der Zellproliferation war stark von der Kultivierungsmethode abhängig, was sich an den hochregulierten Genen der Wachstumsfaktoren KGF und VEGFA zeigte. Zusätzlich waren Gene der Stressreaktion wie IL1R1, des Lipid-Metabolismus, der Zell-Zell-Kontakte, z. B. Occludin und Claudin, und des Desmosoms, z. B. Desmocolline und Desmogleine, im 3D-Modell hochreguliert. Weiterhin konnte eine Regulation von Wundverschluss-assoziierten Genen wie CTGF oder verschiedenen Chemokinen sowie die Hochregulation von Hypoxie-assoziierten Faktoren gezeigt werden. Außerdem waren Gene hochreguliert, welche in die Abwehrreaktion gegenüber Pathogenen involviert sind, wie z. B. CD55 oder CXCR2.

Weitere Unterschiede zwischen 2D- und 3D-Kultivierung wurden durch die Ergebnisse der Untersuchung überrepräsentierter Prozesse deutlich, die in 3D gegenüber 2D herunterreguliert waren (Tabelle 27).

Tabelle 27: Liste überrepräsentierter biologischer Prozesse aus der *GO term*-Analyse von in 3D herunterregulierten Genen (früher Kultivierungszeitpunkt)

Biologischer Prozess	Korrigierter p-Wert	Beispielgene
mitotischer Zellzyklus	$2,1 \cdot 10^{-37}$	Ki-67; CDK1; CDK2; CDK4; BCL2; NEK8
DNA Replikation	$1,5 \cdot 10^{-31}$	ORC 1-3; GINS 1-4; MCM 2-10
ncRNA Prozessierung	$2,1 \cdot 10^{-25}$	EXOSC 1-10; POP5
mitochondriale Matrixproteine	$8 \cdot 10^{-21}$	FDXR; PDPR; verschiedene MRPS-Proteine
mikrotubuläres Cytoskelett	$4,3 \cdot 10^{-20}$	AKT1; EML4; TBCB; TBCD; TUBB; TUBB3
tRNA-Metabolismus	$5,1 \cdot 10^{-13}$	TRMT1; TRMT11; KARS; LARS2; SARS2
Translation	$1,7 \cdot 10^{-12}$	RPSA; RPS15; RPS16; EIF2B1; EIF5A

Hierbei war vor allem der mitotische Zellzyklus mit den Cyclin-abhängigen Kinasen und Ki-67 in 3D-Kultur herunterreguliert. Ebenso waren die Prozesse der DNA-Replikation, der Prozessierung nicht-kodierender RNAs, der Translation sowie des tRNA-Metabolismus deutlich herunterreguliert. Auch waren die Expression von mitochondrialen Matrixproteinen wie FDXR und Proteinen des Cytoskeletts wie Aktin-1 und verschiedenen Tubulinen in 3D-Kultur gegenüber 2D Kultur herunterreguliert.

Die *GO term*-Analyse des späten Vergleichszeitpunktes der nicht-infizierten Proben bestätigte diese Ergebnisse.

Im Vergleich der Kontrollen der beiden 3D-Versuche konnte gezeigt werden, dass in die Differenzierung von Keratinozyten involvierte Gene am späten Zeitpunkt gegenüber dem frühen Zeitpunkt hochreguliert waren. Dahingegen nahmen die Proliferation und DNA-Replikation mit der Kultivierung der Hautäquivalente ab (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 28: Liste differenzierungsassoziierter Gene und deren Regulation zwischen 3D- und 2D-Kulturmodell (früher Zeitpunkt)

Gen	Reads	FDR	Foldchange
Loricrin	6.999	$2,1 \cdot 10^{-5}$	784
Filaggrin	122.697	$4,3 \cdot 10^{-124}$	324
TGM 5	526	$3,4 \cdot 10^{-2}$	313
Keratin 1	88.295	$4,7 \cdot 10^{-97}$	292
Keratin 10	254.073	$2,6 \cdot 10^{-109}$	81
TGM 3	311	$2,6 \cdot 10^{-7}$	63
Trichohyalin	1.150	$2 \cdot 10^{-43}$	33
Involucrin	50.109	$1,3 \cdot 10^{-259}$	11
Keratin 5	1.347.695	$1,4 \cdot 10^{-59}$	-2
Keratin 14	618.071	$6,7 \cdot 10^{-34}$	-3
Ki-67	19.934	$5 \cdot 10^{-96}$	-8
Survivin	5.455	$2,6 \cdot 10^{-82}$	-15

Tabelle 28 zeigt wichtige Differenzierungsmarker humaner Haut und deren Regulation im Vergleich zwischen 3D-Modell und 2D-Kultur. Typische Marker wie Loricrin, Filaggrin, Transglutaminasen und die Keratine 1 und 10 waren sehr stark hochreguliert, Loricrin dabei sogar um Faktor 784. Auch Trichohyalin und Involucrin waren in 3D-Kultur hochreguliert. Dahingehend waren die Keratine 5 und 14 in 3D-Kultur leicht herunterreguliert. Ebenso waren der Proliferationsmarker Ki-67 und das Apoptose-hemmende Protein Survivin in 3D-Kultur deutlich schwächer exprimiert als in 2D-Kultur.

Nach der vergleichenden Analyse beider Modelle und der damit verbundenen Feincharakterisierung der Keratinozyten der Epidermis des Hautmodells wurde anschließend die Regulation der Genexpression durch die Infektion mit CPXV untersucht.

Regulation der zellulären Genexpression in 3D-Kultur nach Infektion mit CPXV

Zur Untersuchung der während der Infektion regulierten Gene im Hautmodell wurde die Expression zellulärer Gene zwischen infizierten Proben und Kontrollen (in Triplikaten) an den Zeitpunkten 18 h *p.i.* (früh) und 96 h *p.i.* (spät) verglichen. Dabei wurden zur Infektion der Hautäquivalente für den frühen Analysezeitpunkt 100 Viren pro eingesetzte Zelle verwendet, für den späten Zeitpunkt 1 Virus pro Zelle. Tabelle 29 zeigt die statistische Verteilung der regulierten Gene zu beiden Zeitpunkten.

Tabelle 29: Statistische Verteilung während der Infektion regulierter Gene im 3D-Modell zu zwei Zeitpunkten

Kriterium	früh	spät
Gene mit mehr als 100 Reads	11409	12364
Signifikant hochreguliert inf vs. Ko	357 (3,1 %)	279 (2,3 %)
Signifikant herunterreguliert inf vs. Ko	77 (0,7 %)	195 (1,6 %)

Zu beiden Zeitpunkten waren knapp 4 % der zellulären Gene mit summiert mehr als 100 *Reads* durch die Infektion reguliert, davon zum frühen Zeitpunkt 3,1 % hoch und 0,7 % herunter. Zum späten Zeitpunkt waren 2,3 % der Transkripte hoch- und 1,6 % herunterreguliert. Zur Feincharakterisierung der beeinflussten biologischen Prozesse wurde eine *GO term*-Analyse der hoch- und herunterregulierten Gene durchgeführt.

Tabelle 30: Liste überrepräsentierter biologischer Prozesse aus der *GO term*-Analyse von während der Infektion im 3D-Modell hochregulierten, zellulären Genen

Biologischer Prozess	Korrigierter p-Wert	Beispielgene
früher Zeitpunkt (18 h <i>p.i.</i>)		
Regulation von Zell-Ausläufern (cytoskelettal)	$1,8 \cdot 10^{-3}$	CDH4; PC; PLXNB1; PLXNB3; TUBB3
Zell-Zell-Adhärenzverbindung	$6,3 \cdot 10^{-3}$	DBN1; EVPL; PKP3; PLEC
Elongation der Translation	$1,1 \cdot 10^{-2}$	RPL8; RPL35; RPL36; RPS9; RPS15; RPS19
Aufbau Golgi-Apparat	$3,7 \cdot 10^{-2}$	CHPF; CHPF2; GGA1; VAMP5
später Zeitpunkt (96 h <i>p.i.</i>)		
Aktivität als Wachstumsfaktor	$3,3 \cdot 10^{-5}$	CSF1; CSF3; FGF2; IL11
positive Regulation der Zell-Kommunikation	$7,4 \cdot 10^{-5}$	AKAP12; CLCF1; GRM4; OXTR
negative Regulation der Apoptose	$7,4 \cdot 10^{-5}$	CLCF1; CLU; NGFR; SOCS2
Inflammation	$2,9 \cdot 10^{-3}$	CCR7; CXCL3; IL6; IL23A; MC1R
positive Regulation des JAK-STAT-Signalweges	$9,1 \cdot 10^{-3}$	CLCF1; IL6; IL20; LIF
Regulation von Zell-Ausläufern (cytoskelettal)	$1,8 \cdot 10^{-2}$	KALRN; MAP1B; TUBB3

Tabelle 30 zeigt die überrepräsentierten biologischen Prozesse aus der *GO term*-Analyse hochregulierter Gene im 3D-Modell. Durch die Infektion wurde an beiden Zeitpunkten die Regulation von Zell-Ausläufern hochreguliert. Des Weiteren wurden am frühen Zeitpunkt die Zell-Zell-Adhärenz, die Elongation der Translation und der Aufbau des Golgi-Apparates hochreguliert. Am späten Zeitpunkt nach Infektion wurden insbesondere Wachstumsfaktoren und Regulatoren der Zell-Kommunikation hochreguliert. Des Weiteren wurden anti-apoptotische und inflammatorische Gene, sowie Regulatoren des JAK-STAT-Signalweges hochreguliert.

Zu den am stärksten durch die Infektion hochregulierten Genen zählten FLNC und NR4A1. FLNC war 18 h *p.i.* in den infizierten Probe gegenüber der Kontrolle 36-fach hochreguliert, 96 h *p.i.* 176-fach. NR4A1 war 18 h *p.i.* in den infizierten Proben 25-fach hochreguliert, 96 h *p.i.* 99-fach. Weiterhin war das Gen TUBB3 während der Infektion nach 18 h 7-fach hochreguliert, nach 96 h 14-fach. Weitere während der Infektion hochregulierte Gene umfassten auch Zytokine wie IL6, IL11, CSF3 und CLCF1. Des Weiteren waren Keratine wie KRT8, KRT19 und KRT34 und nicht-codierende RNAs wie MEG3 und MEG9 durch die Infektion hochreguliert.

Tabelle 31: Liste überrepräsentierter biologischer Prozesse aus der *GO term*-Analyse von während der Infektion im 3D-Modell herunterregulierten, zellulären Genen

Biologischer Prozess	Korrigierter p-Wert	Beispielgene
früher Zeitpunkt (18 h <i>p.i.</i>)		
Entwicklung/Differenzierung der Epidermis	$6,7 \cdot 10^{-4}$	KRT1; KRT2; KRT10; TGM3
Regulation der Inflammation	$1,6 \cdot 10^{-2}$	ADRB2; PTGER3, PTGS2
Aufbau des Desmosoms	$4,9 \cdot 10^{-2}$	DSC1; DSG1
später Zeitpunkt (96 h <i>p.i.</i>)		
Entwicklung/Differenzierung der Epidermis	$5,6 \cdot 10^{-23}$	FLG; KRT10; LCE1A bis LCE1F; LOR; TCHH
Wundheilung	$7,4 \cdot 10^{-5}$	COL3A1; COL5A1; IL20RA; IL22RA1
Lipid-Metabolismus	$5,6 \cdot 10^{-3}$	ACAD8; GBA; LIPM; STS

Tabelle 31 zeigt die überrepräsentierten biologischen Prozesse aus der *GO term*-Analyse herunterregulierter Gene. An beiden untersuchten Zeitpunkten war die Differenzierung der Epidermis signifikant durch die Infektion herunterreguliert. Ebenso waren am frühen Zeitpunkt nach Infektion die Inflammation und der Aufbau der Desmosomen herunterreguliert. Am späten Zeitpunkt nach Infektion waren darüber hinaus Gene der Wundheilung und des Lipid-Metabolismus signifikant herunterreguliert.

Die detektierte Expressionsänderung der herunterregulierten Gene fiel schwächer aus als bei den hochregulierten Genen. So waren die Gene PTGS2 und KRT2 nach 18 h *p.i.* mit 12 und 10-fach am stärksten herunterreguliert. Beim Abnahmezeitpunkt 96 h *p.i.* waren die Kollagene COL6A1 und COL1A2 jeweils etwa 7-fach und damit am stärksten herunterreguliert.

Unter den zu beiden Zeitpunkten herunterregulierten Genen befanden sich die Keratine 10 und 77, AADAC, DSC1 und CD36.

Vergleich der zellulären Genexpression zwischen 3D- und 2D-Kultur nach Infektion mit CPXV

Um die Regulation der zellulären Genexpression durch die Infektion in beiden Modellen zu vergleichen und modellspezifische Unterschiede herauszuarbeiten, wurden die Expressionsanalysen ebenso mit infizierten Keratinozyten aus 2D-Kultur durchgeführt. Tabelle 32 zeigt die statistische Verteilung der regulierten Gene zu vier Zeitpunkten.

Tabelle 32: Statistische Verteilung regulierter Gene in 2D-Kultur zu vier Zeitpunkten nach Infektion

Kriterium	4 h; MOI 5	8 h; MOI 5	18 h; MOI 1	48 h; MOI 0,01
Gene >100 Reads	11938	11938	11526	11937
Signifikant hochreg.	369 (3,1 %)	746 (6,2 %)	806 (7 %)	345 (2,9 %)
Signifikant herunterreg.	455 (3,8 %)	1847 (15,5 %)	2788 (24,2 %)	949 (8 %)

Gegenüber den Versuchen in 3D-Kultur mit etwa 4 % regulierten Genen, waren in 2D-Kultur deutlich mehr Gene reguliert. So waren 4 h *p.i.* 6,9 % der zellulären Gene reguliert. Zum Zeitpunkt 8 h *p.i.* waren es bereits 21,7 % der Gene und 18 h *p.i.* 31,2 % der Gene. Am späten Zeitpunkt nach 48 h mit einer niedrigen MOI von 0,01 waren 10,9 % der Gene signifikant reguliert. Darüber hinaus war auffällig, dass insbesondere bei den drei späteren Zeitpunkten die Anzahl herunterregulierter Gene deutlich über der Anzahl hochregulierter Gene lag. Dieses Phänomen war bei den 3D-Kulturen nicht zu beobachten. Hier überwogen insbesondere am frühen Zeitpunkt die hochregulierten Gene. Auch von den regulierten Genen der 2D-Kultur wurden überrepräsentierte Prozesse mittels *GO term* Analysen untersucht. An den frühen Zeitpunkten bis 18 h *p.i.* waren insbesondere die Transkription und Proliferation hochreguliert, während die Regulation der Apoptose und der zelluläre Nukleinsäurestoffwechsel (tRNA, rRNA) unter den herunterregulierten Prozessen waren. Am späten Zeitpunkt 48 h *p.i.* wurden insbesondere Gene der Mitose und Gene des mikrotubulären Cytoskeletts durch die Infektion hochreguliert. Unter den herunterregulierten Genen zu diesem Zeitpunkt waren Gene der epidermalen Differenzierung und der GTPase vermittelten Signaltransduktion. Auch Gene des Desmosoms wurden durch die Infektion an diesem Zeitpunkt herunterreguliert. Zur Illustration der am stärksten durch die Infektion regulierten Gene im Vergleich aller Versuchsbedingungen wurde eine *Heatmap* erstellt (Abbildung 31). Diese umfasst in den einzelnen Kultivierungsbedingungen besonders stark und signifikant regulierte Gene.

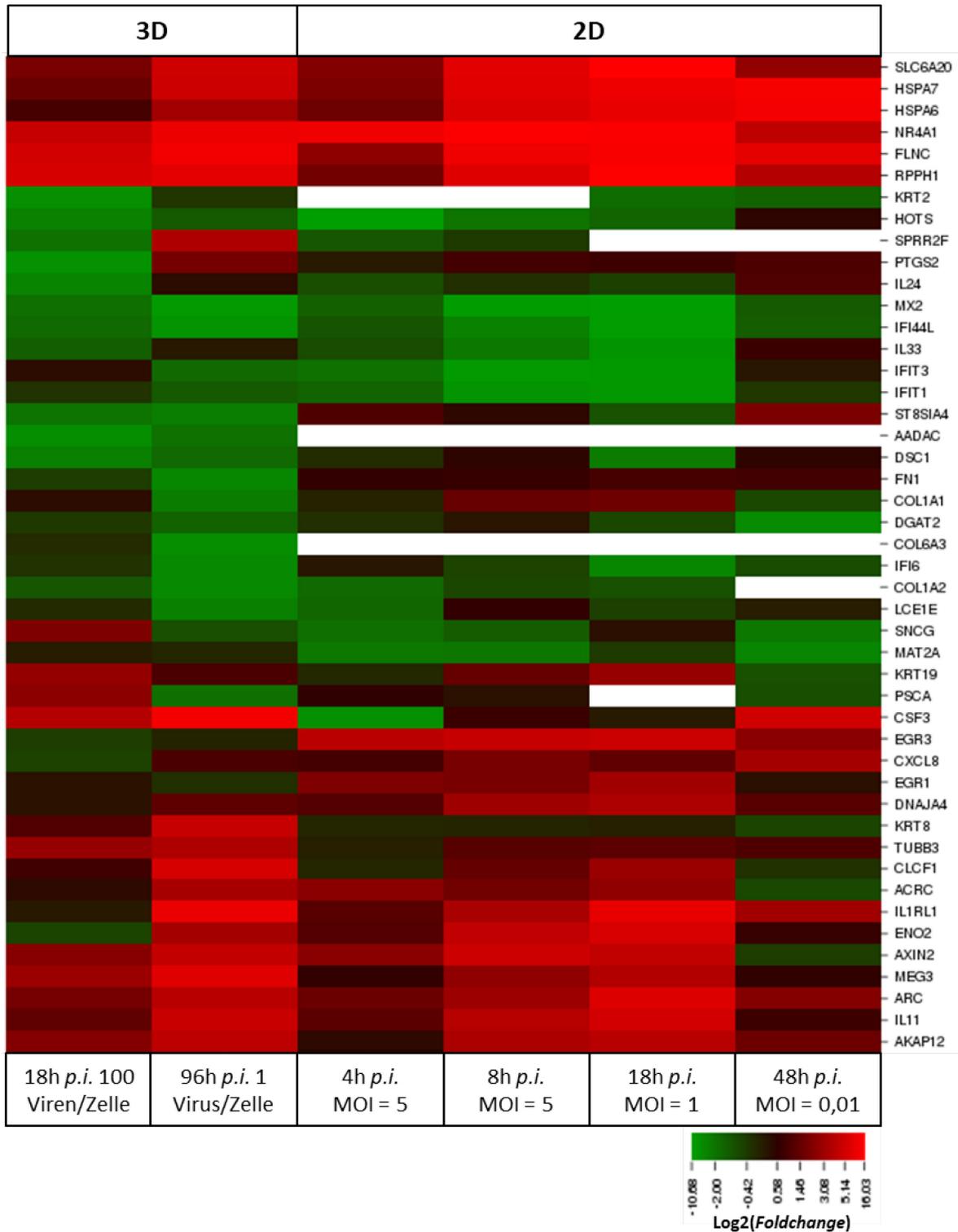


Abbildung 31: Heatmap einer Auswahl von regulierten Genen nach Infektion mit CPXV. Als Datengrundlage dienen die Expressionsänderungen (*Foldchanges*) zwischen infizierten Proben und Kontrollen, welche farbcodiert als log₂ aufgetragen sind. Rot kennzeichnet dabei eine Hochregulation des Gens während der Infektion und grün eine Herunterregulation. Schwarz kennzeichnet unregulierte Gene ($-1 < \log_2(\text{Foldchange}) < 1$) und weiß Gene, bei denen im untersuchten Kontext keine Expression in der RNA-Sequenzierung nachgewiesen werden konnte (< 10 Reads). Verschiedene Gene waren modell- oder zeitpunktspezifisch reguliert, während manche Vertreter wie NR4A1 in allen untersuchten Bedingungen reguliert waren.

Hierbei konnten die regulierten Gene in bestimmte Gruppen unterteilt werden. Einige Gene waren unter allen untersuchten Versuchsbedingungen durch die Infektion mit CPXV hochreguliert. Hierzu zählen unter anderem NR4A1, FLNC und MEG3. Ein weiterer Teil der Gene war unter allen untersuchten Versuchsbedingungen herunterreguliert, z. B. MX2, IFIT1, IFI44L und MAT2A. Ein weiterer Teil der Gene war im 3D-Modell hoch- und im 2D-Modell herunterreguliert, wie z. B. KRT8 oder SNCG. Weiterhin waren Gene wie EGR1 und EGR3 in 2D-Kulturen durch die Infektion hochreguliert, im 3D-Modell aber nicht. Für die Gene AADAC und COL6A3 konnte die Herunterregulation nur im 3D-Modell gezeigt werden, da diese Gene in den 2D-Kulturen nicht exprimiert wurden. Des Weiteren konnten mit TUBB3, CSF3, DSC1 und PTGS2 Gene identifiziert werden, die im 3D-Modell deutlich stärker reguliert waren als im 2D-Kulturmodell.

Aus den beschriebenen Genen wurden für die weiteren Nachanalysen mittels qPCR und auf Proteinebene Vertreter ausgewählt, welche bei der Infektion besondere große oder zwischen 3D- und 2D-Kultur unterschiedliche Expressionsänderungen zeigten. Die Nachanalyse dient zur Bestätigung der gewonnenen Erkenntnisse aus der Transkriptomanalyse mittels unabhängiger Verfahren und zur Bestätigung der Expression auch auf Proteinebene und nicht nur auf Transkriptebene.

Vergleich der Expression viraler Transkripte zwischen 3D- und 2D-Kultur

Da die Kultivierungsbedingungen sowohl die Morphologie als auch das Wachstumsverhalten und die zelluläre Genexpression stark beeinflussen, ist zu erwarten, dass auch die Expression viraler Gene von den Kultivierungsbedingungen beeinflusst wird. Deshalb wurde, neben dem Vergleich der Expression zellulärer Gene zwischen beiden Modellen und verschiedenen Zeitpunkten, auch die Expression viraler Transkripte verglichen. Für die Berechnung der *Foldchanges* regulierter Gene wurden hier jeweils die infizierten Proben zu den verschiedenen Zeitpunkten verglichen. Tabelle 33 zeigt die Unterschiede in der Expression der viralen Gene zwischen 3D-Kultur und 2D-Kultur zu einem frühen Zeitpunkt (18 h *p.i.*) und zu einem späten Zeitpunkt (48 h *p.i.* in 2D- und 96 h *p.i.* in 3D-Kultur).

Tabelle 33: Statistische Verteilung regulierter, viraler Gene beim Vergleich von 3D- und 2D-Modell zu zwei Zeitpunkten

Kriterium	früh	spät
Pockenvirale Gene	229 (100 %)	229 (100 %)
Signifikant hochreguliert 3D vs. 2D	65 (28,4 %)	6 (2,6 %)
Signifikant herunterreguliert 3D vs. 2D	65 (28,4 %)	8 (3,4 %)

An beiden verglichenen Zeitpunkten wurden alle 229 annotierten, kuhpockenviralen Transkripte in den Proben nachgewiesen. Von diesen waren im Vergleich zwischen 3D- und 2D-Kultur zu einem frühen Zeitpunkt jeweils 28,4 % der Gene hoch- oder herunterreguliert.

Zu einem späten Untersuchungszeitpunkt mit jeweils einer geringen Dosis an Impfvirus waren 2,6 % der kuhpockenviralen Transkripte in epidermalen Keratinozyten gegenüber 2D-Kultur hochreguliert, 3,4 % herunterreguliert. Aus den regulierten Genen konnten insgesamt fünf Gene extrahiert werden, welche in beiden untersuchten Bedingungen modell-spezifisch reguliert waren. Die Expression der Transkripte für CGF (VGF), CPXV010, CPXV187 (VACV-Homolog A49) waren jeweils in 3D- gegenüber 2D-Kulturen signifikant hochreguliert. Die Transkripte CPXV125 (homolog D8) und CPXV170 waren jeweils in 3D- gegenüber 2D-Kultur signifikant herunterreguliert. Die absoluten Expressionsänderungen zwischen 3D- und 2D-Kultur dabei waren für CGF mit jeweils etwa vierfach am höchsten. Die vier weiteren genannten Transkripte waren jeweils schwächer reguliert.

Zum Vergleich der relativen Abundanz eines Transkriptes wurde für die jeweiligen Bedingungen die Anzahl der *Reads* eines viralen Transkriptes relativ zur Größe des Transkriptes berechnet. Die zehn zum jeweiligen Zeitpunkt häufigsten Transkripte sind in Tabelle 34 mit Zuordnung des kuhpockenviralen Expressionszeitpunktes zusammengefasst (nach Xu et al. [143]).

Tabelle 34: Übersicht über die zehn häufigsten viralen Transkripte in Abhängigkeit des Zeitpunktes und Modells mit farblicher Codierung* des Expressionszeitpunktes

3D 18h p.i.	3D 96h p.i.	2D 4h p.i.	2D 8h p.i.	2D 18h p.i.	2D 48h p.i.
CPXV040	CPXV078	CPXV040	CPXV013	CPXV078	CPXV082
CPXV048	CPXV082	CPXV059	CPXV078	CPXV067	CPXV202
CPXV049	CPXV202	CPXV069	CPXV067	CPXV151	CPXV219
CPXV069	CPXV219	CPXV082	CPXV151	ati	CPXV067
CPXV082	ati	CPXV114	CPXV080	CPXV131	ati
CPXV114	CPXV131	CPXV189	CPXV131	CPXV135	CPXV080
CPXV202	CPXV135	CPXV197	CPXV135	CPXV144	CPXV131
CPXV207	CPXV144	CPXV202	CPXV144	CPXV149	CPXV135
CPXV219	CPXV142	CPXV207	CPXV142	CPXV142	CPXV144
CPXV142	CPXV143	CPXV219	CPXV143	CPXV143	CPXV142

*frühe Expression; konstante Expression (früh/spät); intermediäre Expression; späte Expression

In 3D-Kultur waren 18 h *p.i.* neun der zehn häufigsten Transkripte als früh exprimiert definiert. 96 h *p.i.* waren vier der zehn häufigsten Transkripte früh, vier intermediär und zwei spät exprimierten Genen zugeordnet. In 2D-Kultur entstammten alle zehn häufigsten Transkripte 4 h *p.i.* früh exprimierten Genen. Dahingegen war die Mehrzahl der häufigsten Gene 8, 18 und 48 h *p.i.* als intermediär oder spät definiert. Allerdings waren zum Zeitpunkt 48 h *p.i.* auch noch drei früh exprimierte Gene unter den zehn Häufigsten.

Zu den früh exprimierten, abundanten Transkripten zählten hierbei beispielsweise Immunmodulatoren wie CPXV069, CPXV202 und CPXV219. Zu den spät exprimierten, abundanten Transkripten zählten zum Beispiel CPXV135, CPXV142, CPXV143 und CPXV144, die für Strukturproteine des *Viruscores* codieren.

3.4.3. Übertragung und Bestätigung der Transkriptomanalysen

Zur Bestätigung der, während der NGS-basierten Transkriptomanalyse ermittelten, Expressionsänderungen mithilfe eines unabhängigen, etablierten Verfahrens, wurden qPCRs ausgewählter regulierter Gene durchgeführt. Für diese *TaqMan*-PCRs wurden kommerziell vertriebene, genspezifische Assays verwendet. Des Weiteren wurden für spezielle Zielgene, welche insbesondere in 3D-Kultur für die Infektion von Bedeutung sind, Bestätigungsversuche auf Proteinebene mittels Western Blot und immunhistochemischen Färbungen durchgeführt. Damit kann überprüft werden, ob sich die unterschiedliche Expression eines Gens als Transkript auch auf den Proteingehalt des betreffenden Proteins in der Zelle auswirkt.

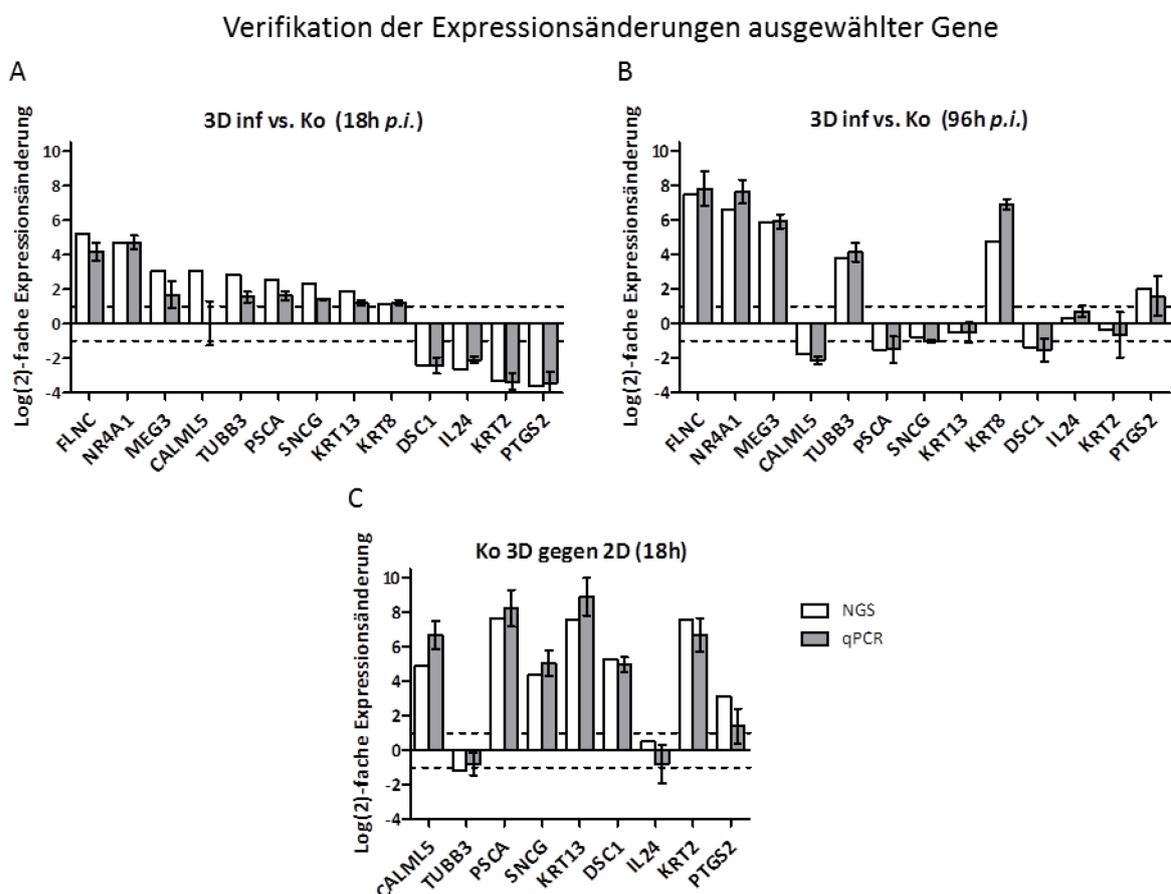


Abbildung 32: Verifikation der Expressionsänderungen bestimmter Zielgene zwischen verschiedenen Gruppen in der qPCR. A – infizierte Proben bezogen auf Kontrollen (18 h *p.i.*); B – infizierte Proben bezogen auf Kontrollen (96 h *p.i.*); C – 3D-Kontrollen bezogen auf 2D-Kontrollen (18 h). Die Normalisierung der Expression erfolgte in der qPCR auf die vier Referenzgene MYC, GAPDH, TBP und β 2M. Je Gruppe wurden biologische Triplikate verglichen. Für die Änderungen auf qPCR-Ebene sind 95 %-Konfidenzintervalle aufgetragen. Die gestrichelten Linien zeigen eine zweifache Expressionsänderung zwischen den Gruppen an. Die Ergebnisse der Expressionsänderungen aus der Transkriptomanalyse und der qPCR korrelierten bis auf wenige Ausnahmen (z. B. CALML5 in A) sehr gut.

Abbildung 32 zeigt die Verifikationsexperimente zur Bestätigung der Expressionsänderungen der NGS-basierten Transkriptomanalyse mittels qPCR.

Hierzu wurden zwei Infektionsbedingungen (18 h *p.i.* 100 PFU/Zelle und 96 h *p.i.* 1 PFU/Zelle) in der Epidermis des 3D-Modells betrachtet. Des Weiteren wurden die mock-infizierten Proben der Keratinozyten in 3D- und 2D-Kultur zum Zeitpunkt 18 h betrachtet.

Im Wesentlichen gab es eine sehr gute Übereinstimmung der Genregulation zwischen beiden Analysemethoden. Bei hoch-, herunter- und unregulierten Genen konnten gleichermaßen die Tendenzen aus der Transkriptomanalyse mittels qPCR in allen verglichenen Gruppen verifiziert werden.

Einzig bei CALML5 in den 3D-Proben 18 h *p.i.* konnte die Regulationstendenz aus der Transkriptionsanalyse nicht per qPCR bestätigt werden. Bei dem Vergleich nach 96 h *p.i.* konnte die leichte CALML5-Herunterregulation dagegen ebenso bestätigt werden, wie die Hochregulation in den 3D Kontrollen im Vergleich zur 2D-Kultur. Diese fiel in der qPCR allerdings etwas stärker aus als in der NGS-basierten Transkriptomanalyse.

Innerhalb der jeweilig untersuchten Triplikate waren die Unterschiede gering. Die 95 %-Konfidenzintervalle der Regulation erstreckten sich unterhalb von Faktor 2 nach oben und unten, was einem Ct-Wert-Unterschied von 1 in der qPCR entsprach. Die Breite des Konfidenzintervalles stieg bei stark regulierten (z. B. FLNC) bzw. gering exprimierten Proben (z. B. PSCA) etwas an.

Nachdem damit die Plausibilität der Methoden und die richtige Wahl der Normalisierungsmethode (z. B. die Referenzgenauswahl) gezeigt werden konnte, wurden bestimmte regulierte Gene mithilfe von qPCR-Expressionskinetiken, Western Blot-Analysen und Immunfluoreszenzfärbung weiter charakterisiert.

β -3 Tubulin (TUBB3)

Das Gen TUBB3 zeigte in der Transkriptomanalyse eine minimal achtfache Hochregulation in infizierten Epidermis-Proben. In 2D-Kultur zeigten infizierte Keratinozyten nur eine geringe, maximal zweifache Hochregulation des Gens. Im Vergleich beider Kultivierungsarten war TUBB3 ähnlich stark exprimiert. Zur weiteren Charakterisierung wurde die TUBB3-Expression in epidermalen Keratinozyten per qPCR im Zeitverlauf untersucht (Abbildung 33).

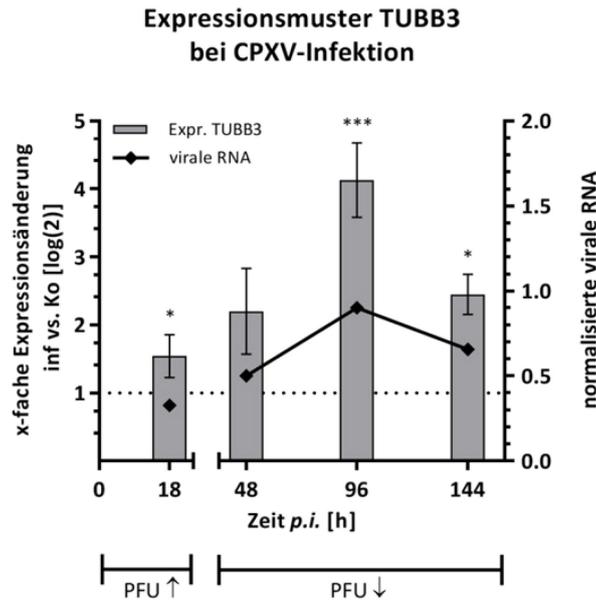


Abbildung 33: Expressionsmuster von TUBB3 in epidermalen Keratinozyten (3D-Modell) im Infektionsverlauf. Hierbei ist die Änderung der Expression im Unterschied zwischen infizierten Proben und Kontrollen (je biologische Triplikate), normalisiert auf die vier Referenzgene, dargestellt. Zur Veranschaulichung des Infektionsstatus dient die normalisierte virale mRNA-Expression (CPXV086) der infizierten Proben. Die Expressionsänderung von TUBB3 korrelierte mit der Expression viraler mRNA und war am Zeitpunkt 96 h *p.i.* mit 18-fach maximal sowie hoch signifikant.

Dabei korrelierte die Expressionsänderung von TUBB3 zwischen infizierten Proben und mock-infizierten Kontrollen desselben Zeitpunktes mit dem Gehalt viraler mRNA (Gen CPXV086). So stellte die etwa 18-fache TUBB3-Hochregulation am Zeitpunkt 96 h *p.i.* das Maximum dar und nahm 144 h *p.i.* in Korrelation zum Anteil viraler mRNA wieder ab. In den Proben von Keratinozyten aus 2D-Kultur (Daten nicht gezeigt) konnte maximal eine zweifache Hochregulation von TUBB3 während der Infektion gezeigt werden (18h *p.i.*, MOI = 5).

Zur Bestätigung der Expression auf Proteinebene wurde der TUBB3-Proteingehalt der Proben mittels Western Blot quantifiziert (Abbildung 34).

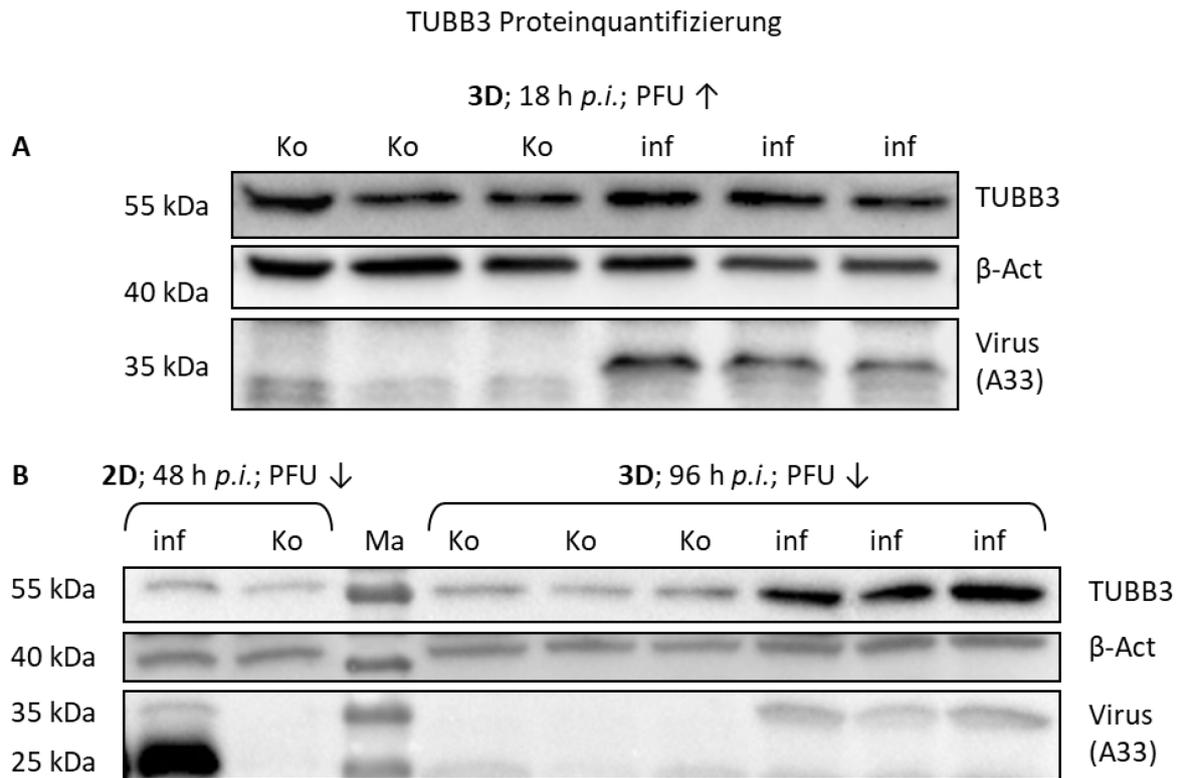


Abbildung 34: Quantifizierung der TUBB3-Proteinexpression in Keratinozyten unter verschiedenen Bedingungen. Hierbei sind jeweils die Bandenmuster von TUBB3, der Ladekontrolle β -Aktin und des Virusproteins CPXV168 (A33) aus dem Western Blot dargestellt. Die 3D-Proben wurden in biologischen Triplikaten aufgetragen. A: Bandenmuster von infizierten Proben (inf) und Kontrolle (Ko) aus epidermalen Keratinozyten (3D) 18 h *p.i.* mit einer hohen infektiösen Dosis. B: Bandenmuster für inf und Ko aus Keratinozyten aus 2D bzw. 3D Kultur 48 bzw. 96 h *p.i.* mit einer geringen infektiösen Dosis. Ein starker Anstieg der TUBB3-Menge während der Infektion konnte zum Zeitpunkt 96 h *p.i.* in epidermalen Keratinozyten nachgewiesen werden. Ma - Markerbanden

Während nach 18 h *p.i.* mit einer hohen infektiösen Dosis noch keine signifikante Steigerung der TUBB3-Menge gezeigt werden konnte, war nach 96 h (geringe infektiöse Dosis) eine deutliche Steigerung der TUBB3-Menge in infizierten Präparaten aus epidermalen Keratinozyten zu beobachten. In den Proben aus 2D-Kultur der Keratinozyten konnte am Vergleichszeitpunkt 48 h *p.i.* höchstens eine minimale Steigerung der TUBB3-Expression gezeigt werden, wenngleich die Menge an Virusprotein CPXV168 deutlich höher war als bei den vergleichbaren 3D-Proben. Hierbei zeigte sich erneut der in Kapitel 3.3.3. beschriebene Unterschied in der Bandengröße von CPXV168 zwischen 2D- und 3D-Kultur.

Zur genauen Lokalisierung des TUBB3-Proteins wurden Schnittpräparate immunhistochemisch gefärbt und untersucht (Abbildung 35).

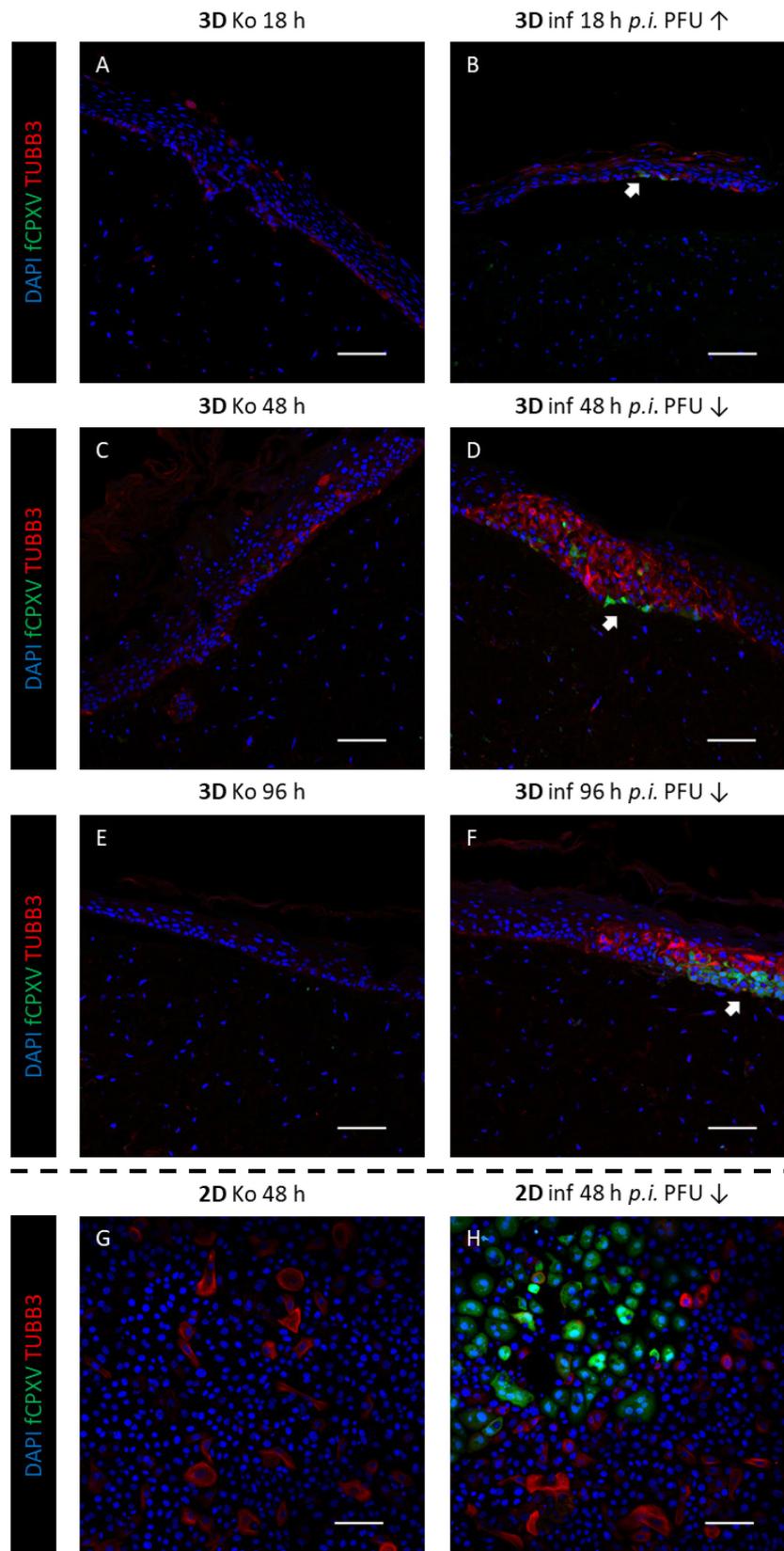


Abbildung 35: Immunfluoreszenz-Nachweis des TUBB3-Proteins in Keratinozyten während der Infektion. Hierfür wurden Proben zu den Zeitpunkten 18 h *p.i.* (A, B), 48 h *p.i.* (C, D) und 96 h *p.i.* (E, F) aus Hautäquivalenten bzw. zum Zeitpunkt 48 h *p.i.* in 2D-Kultur (G, H) betrachtet. Die Pfeile zeigen auf infizierte Bereiche (grün fluoreszierend). Starke TUBB3-Signale konnten in Infektionsnähe nach 48 und 96 h in 3D-Kultur detektiert werden. Maßstabsbalken $\cong 100 \mu\text{m}$

In den Kontrollen der humanen Hautäquivalente wurden zu allen Zeitpunkten nur geringe TUBB3-Signale in wenigen Zellen detektiert. Zum Zeitpunkt 18 h *p.i.* mit einer hohen infektiösen Dosis wurde keine starke Signalsteigerung und damit Steigerung des TUBB3-Proteingehaltes detektiert. In Proben 48 h bzw. 96 h *p.i.* konnten deutlich erhöhte TUBB3-Signale in den Proben der infizierten Hautäquivalente detektiert werden. Die TUBB3-Signale befanden sich in unmittelbarer Umgebung der infizierten Zellen. In den zugehörigen 2D-Proben des vergleichbaren Zeitpunktes wurden auch in der Kontrolle TUBB3-Signale detektiert, welche sich unregelmäßig verteilt auf der Oberfläche mancher Zellen befanden. In der infizierten 2D-Probe konnte keine unmittelbare Assoziation der TUBB3-Signale mit infizierten Zellen oder den benachbarten Zellen nachgewiesen werden. Die TUBB3-positiven-Zellen waren weiterhin unregelmäßig ohne spezifische Foki über die Kultur verteilt. Zur Abklärung der genauen Lage und des Zusammenhanges zur Infektion wurden Detailaufnahmen des stark infizierten Hautäquivalentes (96 h *p.i.*) untersucht (Abbildung 36).

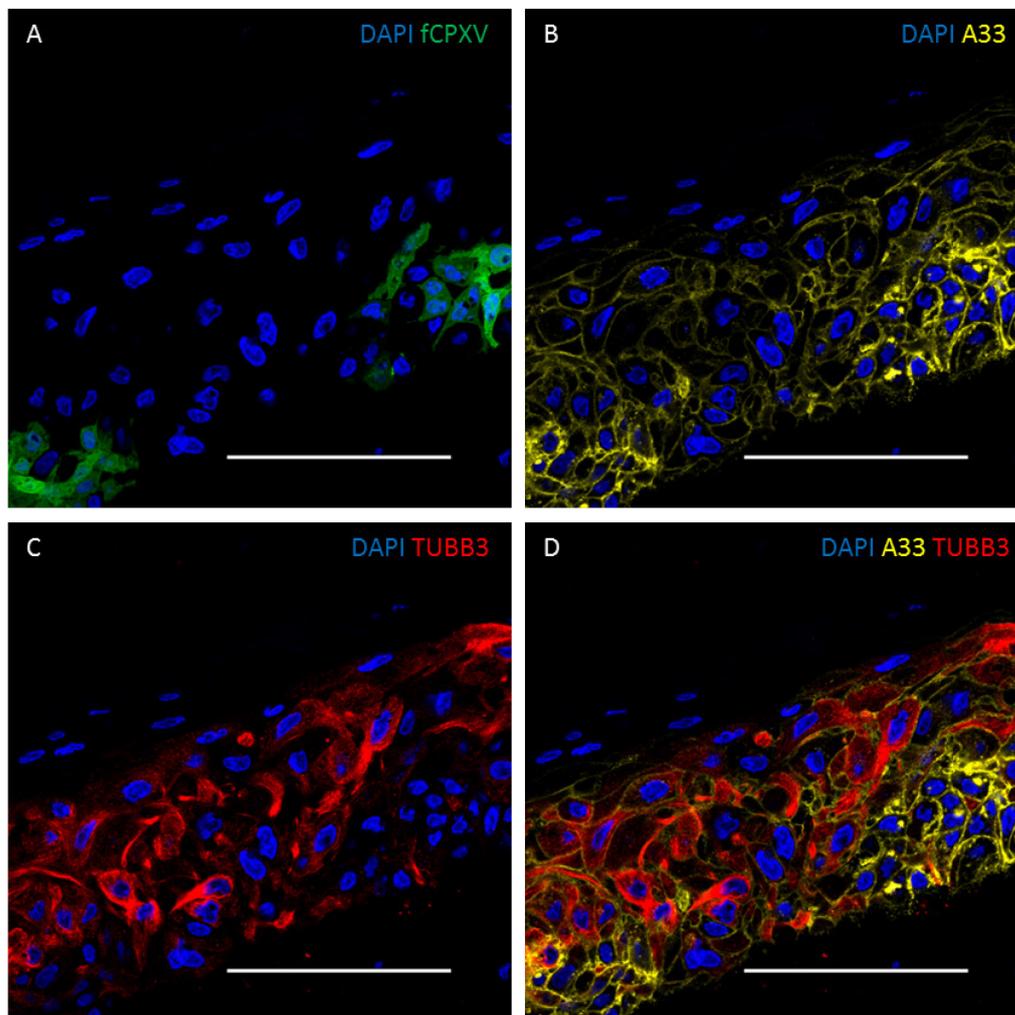


Abbildung 36: Lokalisation des TUBB3-Proteins in der Epidermis eines Hautäquivalentes während der Infektion. Das Präparat vom Zeitpunkt 96 h *p.i.* wurde mit folgenden Färbungen untersucht: A: GFP-Fluoreszenz des Virus, B: CPXV168 (A33), C: TUBB3, D: *Merge* TUBB3 / CPXV168. TUBB3 trat in fibrillenartigen Strukturen auf, welche nicht in stark infizierten Zellen, aber in benachbarten Bereichen mit schwachen CPXV168-Signalen lokalisiert waren. Maßstabsbalken \cong 100 μ m

TUBB3 wurde hierbei als intrazelluläre, fibrillenartige Struktur um den Zellkern bis zur Zelloberfläche reichend detektiert. In stark infizierten, GFP-positiven Zellen wurden geringe oder keine TUBB3-Signale detektiert, wohingegen die stärksten Signale in dazu benachbarten Zellen detektiert wurden. Diese Nachbarzellen waren an der Oberfläche leicht positiv für das virale Antigen CPXV168 (A33), wenn auch nicht so stark, wie die stark infizierten, TUBB3-negativen Zellen.

Keratin 8 (KRT8)

Das Gen Keratin 8 (KRT8) zeigte ebenso wie TUBB3 in der Transkriptomanalyse eine Hochregulation (max. 96 h *p.i.* Faktor 27) in infizierten Epidermis-Proben gegenüber den Kontrollen, aber nicht in 2D-Kultur. Allerdings war KRT8 im Vergleich beider Kultivierungsarten in Kontrollen der 2D-Kultur gegenüber 3D-Kultur schon bis zu 30-fach hochreguliert. Zur weiteren Charakterisierung wurde die KRT8-Expression in epidermalen Keratinozyten per qPCR im Zeitverlauf untersucht (Abbildung 37).

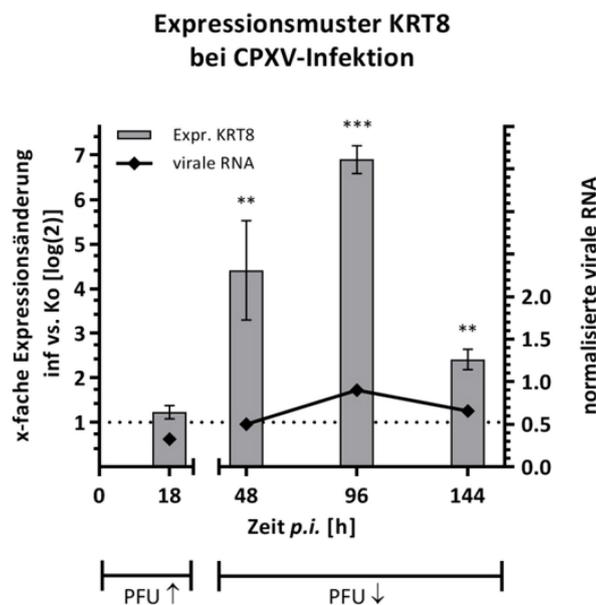


Abbildung 37: Expressionsmuster von KRT8 in epidermalen Keratinozyten (3D-Modell) im Infektionsverlauf. Dargestellt ist hierbei die Änderung der Expression im Unterschied zwischen infizierten Proben und Kontrollen (je biologische Triplikate) normalisiert auf vier Referenzgene. Zur Veranschaulichung des Infektionsstatus dient die normalisierte virale mRNA-Expression (CPXV 086) der infizierten Proben. Die Expressionsänderung von KRT8 korrelierte mit der Expression viraler mRNA und war am Zeitpunkt 96 h *p.i.* mit 120-fach maximal sowie hoch signifikant.

Ebenso wie die, im vorherigen Abschnitt betrachtete, Expression von TUBB3 stieg auch die RNA-Expression des Gens KRT8 bis zum Zeitpunkt 96 h *p.i.* korrelierend zur viralen mRNA-Menge (Target CPXV086) an. Zum frühen Infektionszeitpunkt 18 h war nur eine leichte, nicht signifikante Expressionssteigerung zu detektieren.

Nach 48 h betrug diese Hochregulation etwa Faktor 21 und nach 96 h etwa 120. Damit war die KRT8-Expression zu diesem Zeitpunkt ebenso maximal wie der Gehalt viraler mRNA (CPXV086).

Nukleärer Rezeptor 4A1 (NR4A1), Filamin-C (FLNC) und MEG3 *non-coding* RNA

Die Gene für NR4A1, FLNC und die nicht-codierende RNA MEG3 waren in den infizierten Proben unabhängig von der Kultivierungsart in den Transkriptomanalysen am stärksten hochreguliert. Zur Nachanalyse der Regulation im 3D-Modell in Abhängigkeit vom Infektionsstatus wurden qPCR-Analysen durchgeführt. Die Kinetiken zum Verlauf der Expression der drei Gene sind in Abbildung 38 gezeigt.

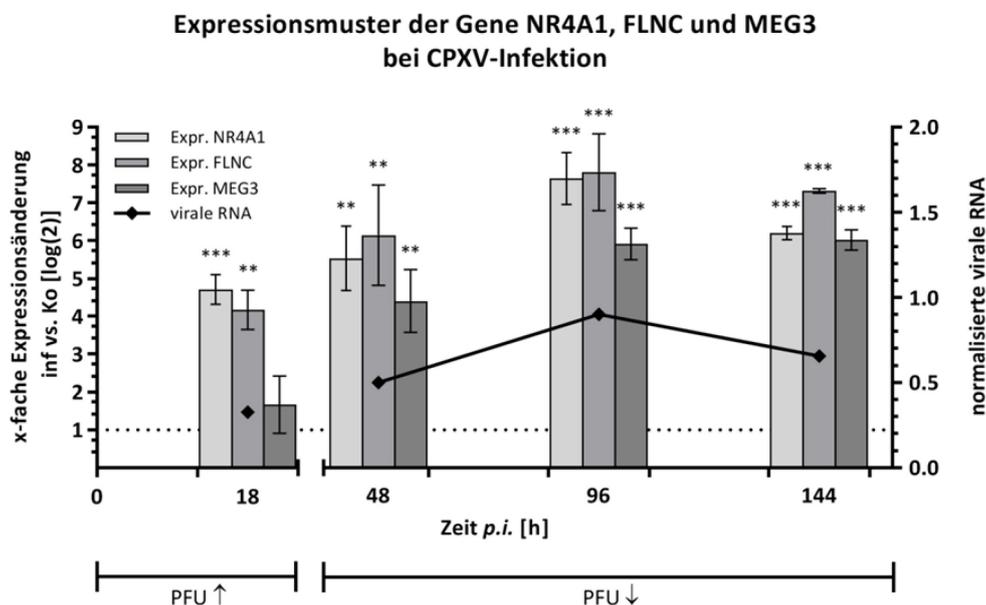


Abbildung 38: Expressionsmuster von NR4A1, FLNC und MEG3 in epidermalen Keratinozyten (3D-Modell) im Infektionsverlauf. Dargestellt ist die Änderung der Expression zwischen infizierten Proben und Kontrollen (je biologische Triplikate) normalisiert auf vier Referenzgene. Zur Veranschaulichung des Infektionsstatus dient die normalisierte virale mRNA-Expression (CPXV 086) der infizierten Proben. Die Expression der vorliegenden Gene war zu allen analysierten Zeitpunkten in infizierten Proben gegenüber den respektiven Kontrollen deutlich gesteigert.

Für die Gene FLNC und NR4A1 konnte eine infektionsabhängige Steigerung der Genexpression zu jedem Zeitpunkt mit einer hohen Signifikanz nachgewiesen werden. Das Maximum lag dabei am Zeitpunkt der maximalen viralen RNA-Expression 96 h *p.i.* mit einer 225- (FLNC) bzw. 200-fachen (NR4A1) Hochregulation. Für MEG3 konnte am frühen Zeitpunkt (18 h *p.i.*, hohe infektiöse Dosis) nur eine geringe dreifache Hochregulation gezeigt werden, welche dann bis auf Faktor 64 (144 h *p.i.*) anstieg.

Exemplarisch wurde das Protein NR4A1 für weitere Nachanalysen ausgewählt.

Das Protein konnte im Western Blot trotz Nutzung verschiedener mono- und polyklonaler Antikörper in keiner der untersuchten Proben aus 2D- oder 3D-Kultur detektiert werden (Daten nicht gezeigt). In immunhistochemischen Färbungen von Schnitten von 3D-Kulturen und fixierten Zellen aus 2D-Kultur konnte das Protein hingegen detektiert werden (Abbildung 39).

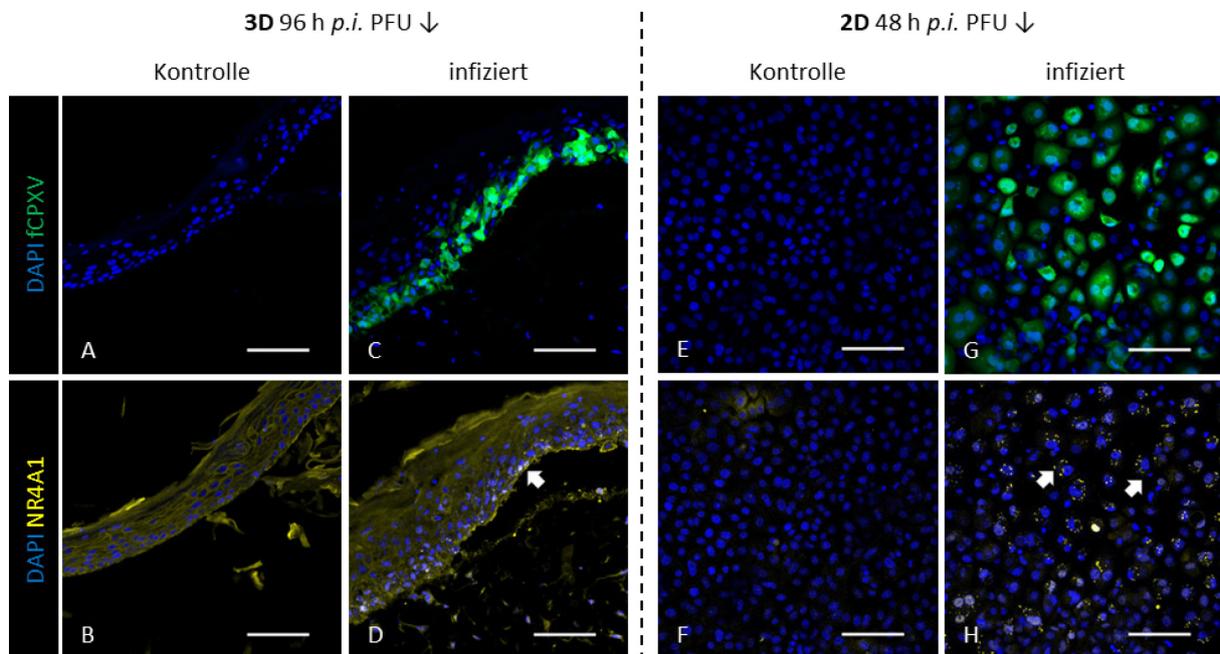


Abbildung 39: Immunfluoreszenz-Nachweis des NR4A1-Proteins in Keratinozyten während der Infektion. Betrachtet wurden Proben zu den Zeitpunkten 96 h *p.i.* (3D, A-D) und 48 h *p.i.* (2D, E-H). In 3D-Kultur waren schwache NR4A1-Signale in infizierten Bereichen zu erkennen (siehe Pfeil), während in 2D-Kultur klare, von den Kontrollen abzugrenzende, NR4A1-positive Foki (siehe Pfeile) in infizierten Zellen zu detektieren waren. Maßstabsbalken \cong 100 μ m

In der Epidermis der 3D-Hautäquivalente war das Protein NR4A1 schwierig und nur bei hohen Belichtungsintensitäten zu detektieren. Während in der Kontrolle keine spezifischen Spots zu erkennen waren, zeigten einige stark infizierte, GFP-positive Zellen NR4A1-Signale nahe den Zellkernen (mit Pfeil markiert). Im 2D-Infektionsversuch war ein klarer Unterschied zwischen Kontrollen und infizierten Zellen zu beobachten. Während in 2D-Kultur keine spezifischen NR4A1-Signale in den mock-infizierten Kontrollen detektiert werden konnten, zeigten die infizierten Zellen kleine Foki NR4A1-positiver Bereiche. Pro Zelle traten etwa zwei bis fünf solcher Foki in der Nähe des Zellkernes auf. Diese beschränkten sich vorrangig auf stark infizierte, stark GFP-positive Zellen.

γ -Synuclein (SNCG)

Das Gen γ -Synuclein (SNCG) zeigte in der NGS-basierten Transkriptomanalyse früh eine fünffache Hochregulation (hohe infektiöse Dosis 18 h *p.i.*), sowie gegenläufig spät eine zweifache Herunterregulation (niedrige infektiöse Dosis 96 h *p.i.*) in den infizierten Epidermis-Proben.

In 2D-Kultur war das Gen 20-fach geringer exprimiert und lag dabei unterhalb der Auswertungsgrenze von 10 Reads pro Probe. Zur Charakterisierung und Bestätigung dieser Befunde wurde die SNCG-Expression in epidermalen Keratinozyten per qPCR im Zeitverlauf untersucht.

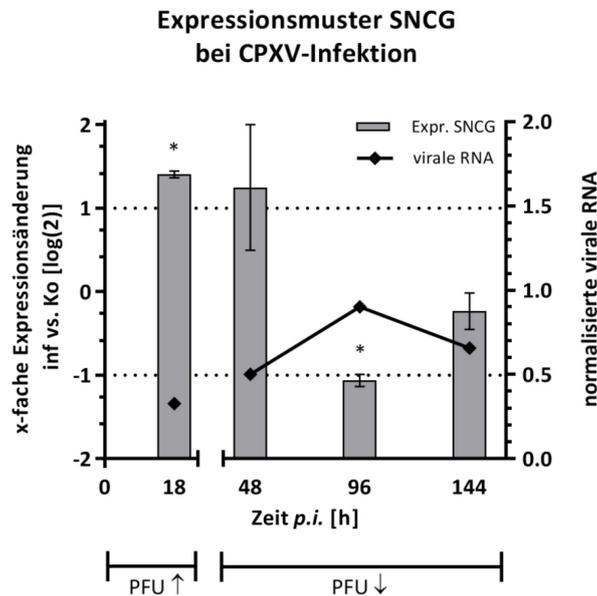


Abbildung 40: Expressionsmuster von SNCG in epidermalen Keratinozyten (3D-Modell) im Infektionsverlauf. Dargestellt ist die Änderung der Expression im Unterschied zwischen infizierten Proben und Kontrollen (je biologische Triplikate) normalisiert auf vier Referenzgene. Zur Veranschaulichung des Infektionsstatus dient die normalisierte virale mRNA-Expression (CPXV 086) der infizierten Proben. Am frühen Zeitpunkt 18 h *p.i.* war das Gen SNCG signifikant, etwa dreifach hochreguliert, am Zeitpunkt 48 h *p.i.* signifikant, zweifach herunterreguliert.

Die Expressionsergebnisse aus der NGS-basierten Analytik konnten für SNCG bestätigt werden (Abbildung 40). Eine signifikante Regulation konnte mit Faktor drei hochreguliert (18 h *p.i.*, hohe infektiöse Dosis) und Faktor zwei herunterreguliert (96 h *p.i.*, geringe infektiöse Dosis) bestätigt werden. Zu den zwei weiteren untersuchten Zeitpunkten war das Gen nicht signifikant reguliert. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse auf Proteinebene wurde die Proteinexpression von SNCG mittels Western Blot analysiert (Abbildung 41).

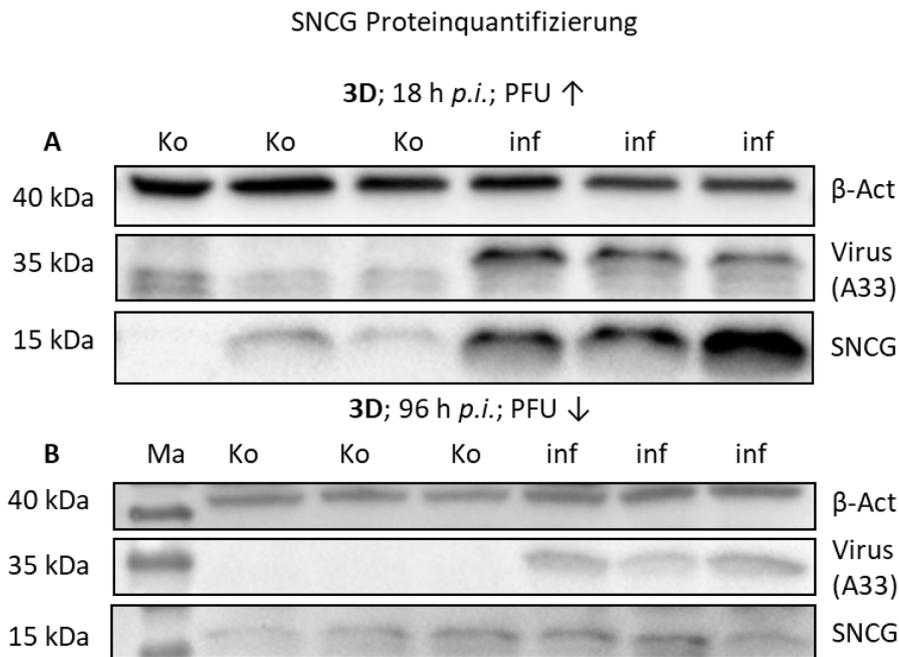


Abbildung 41: Nachweis der SNCG-Proteinexpression in infizierten Epidermisäquivalenten. Dargestellt sind jeweils die Bandenmuster aus dem Western Blot des SNCG-Proteins, der Ladekontrolle β -Aktin und des Virusproteins CPXV168 (A33). Die Proben wurden in biologischen Triplikaten aufgetragen A: Bandenmuster von infizierten Proben (inf) und Kontrolle (Ko) aus epidermalen Keratinozyten (3D) 18 h *p.i.* mit einer hohen infektiösen Dosis. B: Bandenmuster für inf und Ko 96 h *p.i.* mit einer geringen infektiösen Dosis. Ma – Markerbanden. Ein starker Anstieg der SNCG-Menge während der Infektion konnte zum Zeitpunkt 18 h *p.i.* in epidermalen Keratinozyten nachgewiesen werden.

Zum frühen Zeitpunkt 18 h *p.i.* mit einer hohen infektiösen Dosis zeigte sich eine starke Steigerung der SNCG-Menge in den infizierten Proben. Zum späten Zeitpunkt hingegen bestanden keine starken Unterschiede in der Proteinmenge zwischen den Kontrollen und den infizierten Proben. In den Proben aus der 2D-Kultivierung konnte am Vergleichszeitpunkt 48 h *p.i.* keine SNCG-Proteinexpression in infizierten Proben oder Kontrollen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Zur Untersuchung der Lokalisierung wurde der Marker SNCG weiterhin auf Schnitten immunhistochemisch analysiert (Abbildung 42).

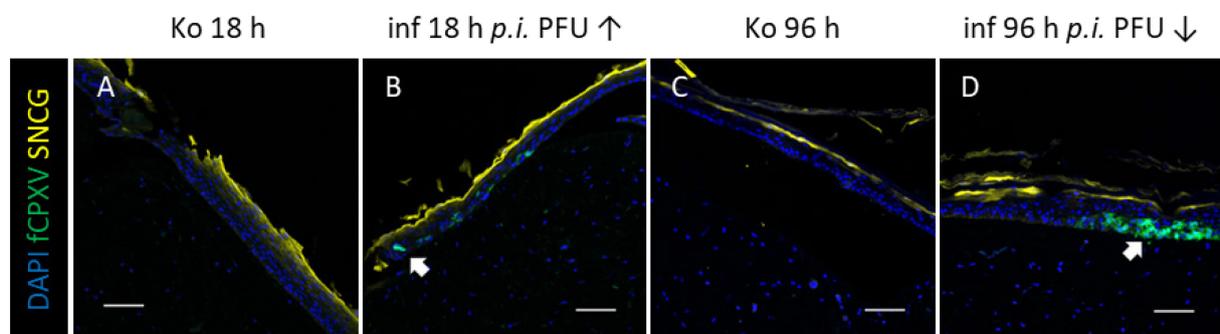


Abbildung 42: Immunfluoreszenz-Nachweis des SNCG-Proteins in Keratinozyten während der Infektion. Es wurden Proben zu den Zeitpunkten 18 h *p.i.* (A: Kontrolle, B infiziert) und 96 h *p.i.* (C: Kontrolle, D: infiziert) aus Hautäquivalenten gefärbt. Die Pfeile zeigen auf infizierte Bereiche (grün fluoreszierend). Starke SNCG-Signale konnten in der apikalen Schicht der Epidermis detektiert werden, deren teils unterschiedliche Signalstärke nicht mit der Infektion unmittelbar unterhalb der SNCG-Schicht in Zusammenhang stand. Maßstabsbalken \cong 100 μ m

Das SNCG-Protein war an der apikalen Seite der Epidermis in der beginnenden Hornschicht bzw. im *Stratum granulosum* lokalisiert. Die Verteilung war relativ gleichmäßig über die Epidermis. Eine infektionsabhängige Verstärkung des Signales über bestimmten, GFP-positiven Regionen konnte am Zeitpunkt 18 h *p.i.* nicht beobachtet werden. Einige Bereiche der Proben waren hingegen von schwächeren Signalen gekennzeichnet, so z. B. in der Kontrolle nach 96 h (Abbildung 42C) bzw. über dem infizierten Bereich (96 h *p.i.*, Abbildung 42D). Durch die ebenso ungleiche Signalverteilung in der zugehörigen Kontrolle konnte aber an diesem Zeitpunkt keine signifikante Herunterregulation von SNCG auf Proteinebene gezeigt werden.

Prostata Stammzell-Antigen (PSCA) und Keratin 13 (KRT13)

Die Gene PSCA (Faktor 6) und KRT13 (Faktor 3) zeigten ebenso wie SNCG in der Transkriptomanalyse eine leichte Hochregulation 18 h *p.i.* in infizierten Epidermis-Proben. Am späten untersuchten Zeitpunkt (96 h *p.i.*) waren beide Gene leicht herunterreguliert. Im Vergleich beider Kultivierungsarten waren beide Gene in den mock-infizierten Proben der 3D-Kultur gegenüber der 2D-Kultur mehr als 100-fach hochreguliert. In der Transkriptomanalytik der 2D-Kultur waren beide Gene bei geringen *Read*-Zahlen (< 50 *Reads* pro Probe) während der Infektion unreguliert. Zur feineren Charakterisierung wurden beide Gene im Zeitverlauf mittels qPCR analysiert.

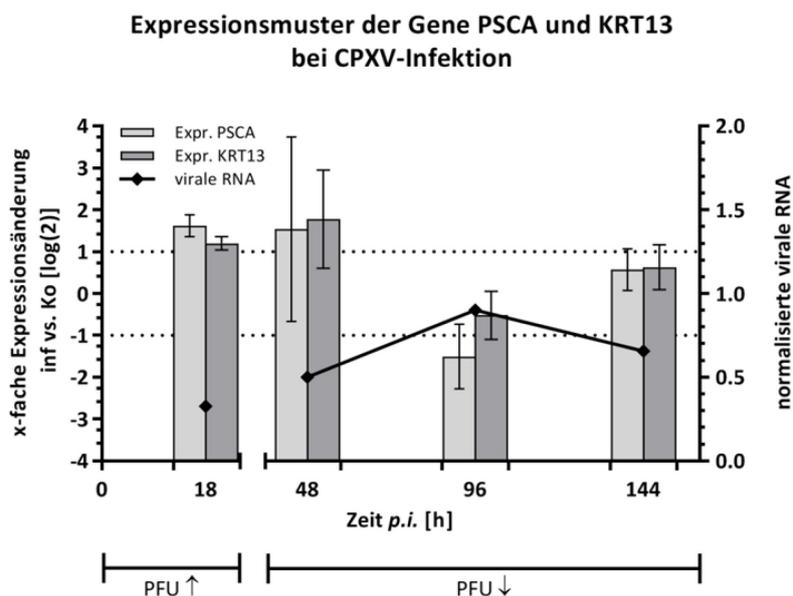


Abbildung 43: Expressionsmuster von PSCA und KRT13 in epidermalen Keratinozyten (3D-Modell) im Infektionsverlauf. Dargestellt ist die Änderung der Expression zwischen infizierten Proben und Kontrollen (je biologische Triplikate) normalisiert auf vier Referenzgene. Zur Veranschaulichung des Infektionsstatus dient die normalisierte virale mRNA-Expression (CPXV 086) der infizierten Proben. Es zeigte sich ein ähnlicher Verlauf der Expression beider Gene wie bei SNCG, wengleich die Regulation hier nicht statistisch signifikant war.

Abbildung 43 zeigt die Expression von PSCA und KRT13 im Zeitverlauf. Zu keinem Zeitpunkt konnte eine signifikante Regulation detektiert werden, wobei in der Tendenz am frühen Zeitpunkt (18 h *p.i.*) die Gene in den infizierten Proben leicht hochreguliert waren und am Zeitpunkt der maximalen viralen RNA-Replikation (96 h *p.i.*) gegenüber den Kontrollen eher herunterreguliert waren.

Desmocollin-1 (DSC1)

Das desmosomale Zell-Zell-Interaktionsprotein Desmocollin-1 (DSC1) zeigte in der NGS-basierten Transkriptomanalyse infizierter Epidermis-Proben früh eine fünffache Herunterregulation (hohe infektiöse Dosis, 18 h *p.i.*), sowie spät bei der höchsten viralen RNA-Menge eine dreifache Herunterregulation (niedrige infektiöse Dosis 96 h *p.i.*). In mock-infizierten Kontrollen aus der 2D-Kultivierung war das Gen etwa 70-200-fach geringer exprimiert als in den Kontrollen aus 3D-Kultur. In Keratinozyten aus 2D-Kultur zeigte sich 18 h *p.i.* eine fünffache Herunterregulation von DSC1 bei der Infektion mit einer hohen MOI von 1. Zur Charakterisierung wurde die DSC1-Expression in epidermalen Keratinozyten aus der 3D-Kultur per qPCR im Zeitverlauf untersucht (Abbildung 44).

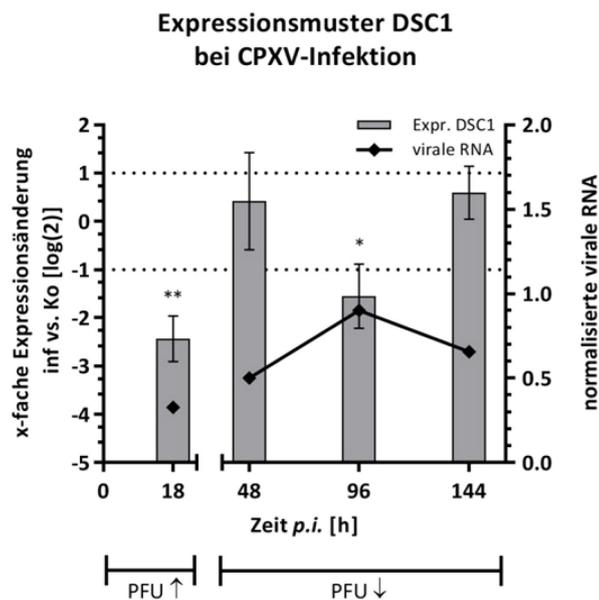


Abbildung 44: Expressionsmuster von DSC1 in epidermalen Keratinozyten (3D-Modell) im Infektionsverlauf. Dargestellt ist die Änderung der Expression im Unterschied zwischen infizierten Proben und Kontrollen (je biologische Triplikate) normalisiert auf vier Referenzgene. Zur Veranschaulichung des Infektionsstatus dient die normalisierte virale mRNA-Expression (CPXV 086) der infizierten Proben. Am frühen Zeitpunkt 18 h *p.i.* war das Gen DSC1 signifikant, etwa fünffach herunterreguliert, am Zeitpunkt 48 h *p.i.* signifikant, dreifach herunterreguliert.

Die Expressionsergebnisse aus der NGS-basierten Analytik konnten für DSC1 bestätigt werden. Eine signifikante Regulation konnte mit Faktor fünf (18 h *p.i.*) und Faktor drei herunterreguliert (96 h *p.i.*) bestätigt werden.

Zu den zwei weiteren Zeitpunkten war das Gen DSC1 nicht signifikant reguliert. Als Bestätigung wurde die Proteinexpression von DSC1 mittels Western Blot analysiert (Abbildung 45).

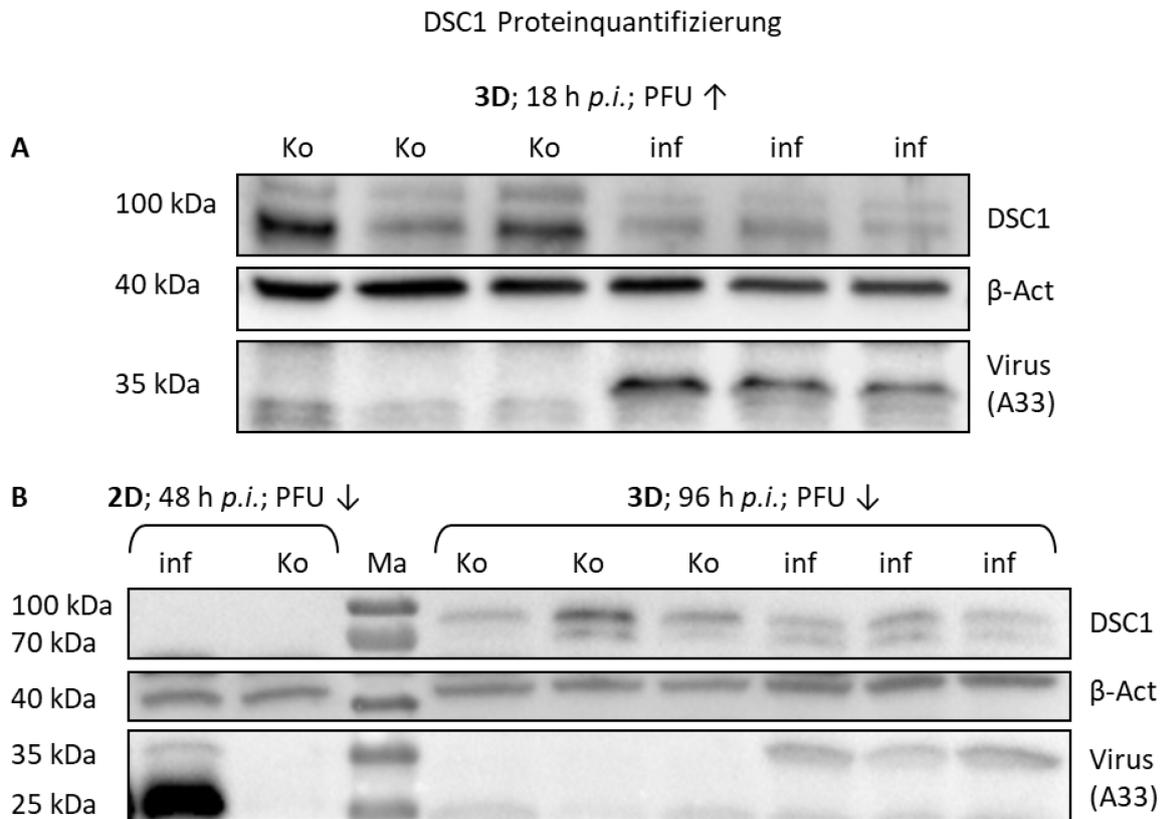


Abbildung 45: Quantifizierung der DSC1-Proteinexpression während der Infektion in Keratinozyten. Dargestellt sind jeweils die Bandenmuster aus dem Western Blot des DSC1-Proteins, der Ladekontrolle β-Aktin und des Virusproteins CPXV168 (A33). Die 3D-Proben wurden in biologischen Triplikaten aufgetragen. Ma – Markerbanden. A: Bandenmuster von infizierten Proben (inf) und Kontrolle (Ko) aus epidermalen Keratinozyten (3D) 18 h *p.i.* mit einer hohen infektiösen Dosis. B: Bandenmuster für inf und Ko aus Keratinozyten aus 2D bzw. 3D Kultur 48 bzw. 96 h *p.i.* mit einer geringen infektiösen Dosis. Eine geringere DSC1-Menge während der Infektion konnte zum Zeitpunkt 18 h *p.i.* in epidermalen Keratinozyten nachgewiesen werden. In Keratinozyten aus 2D-Kultur konnte kein DSC1-Protein nachgewiesen werden.

Am frühen Zeitpunkt 18 h *p.i.* mit einer hohen infektiösen Dosis zeigte sich eine leichte, aber deutlich erkennbare Abnahme der DSC1-Menge in den infizierten Proben gegenüber den Kontrollen. Am späten Zeitpunkt hingegen konnten keine Unterschiede in den Proteinmengen zwischen Kontrollen und infizierten Proben bemerkt werden. In den Proben aus 2D-Kultur der Keratinozyten konnte am Vergleichszeitpunkt 48 h *p.i.* keine DSC1-Proteinexpression in Kontrollen und infizierten Präparaten im Western Blot nachgewiesen werden.

Zur Analyse der Lokalisierung wurde der Marker DSC1 auf Schnitten immunhistochemisch gefärbt und analysiert (Abbildung 46).

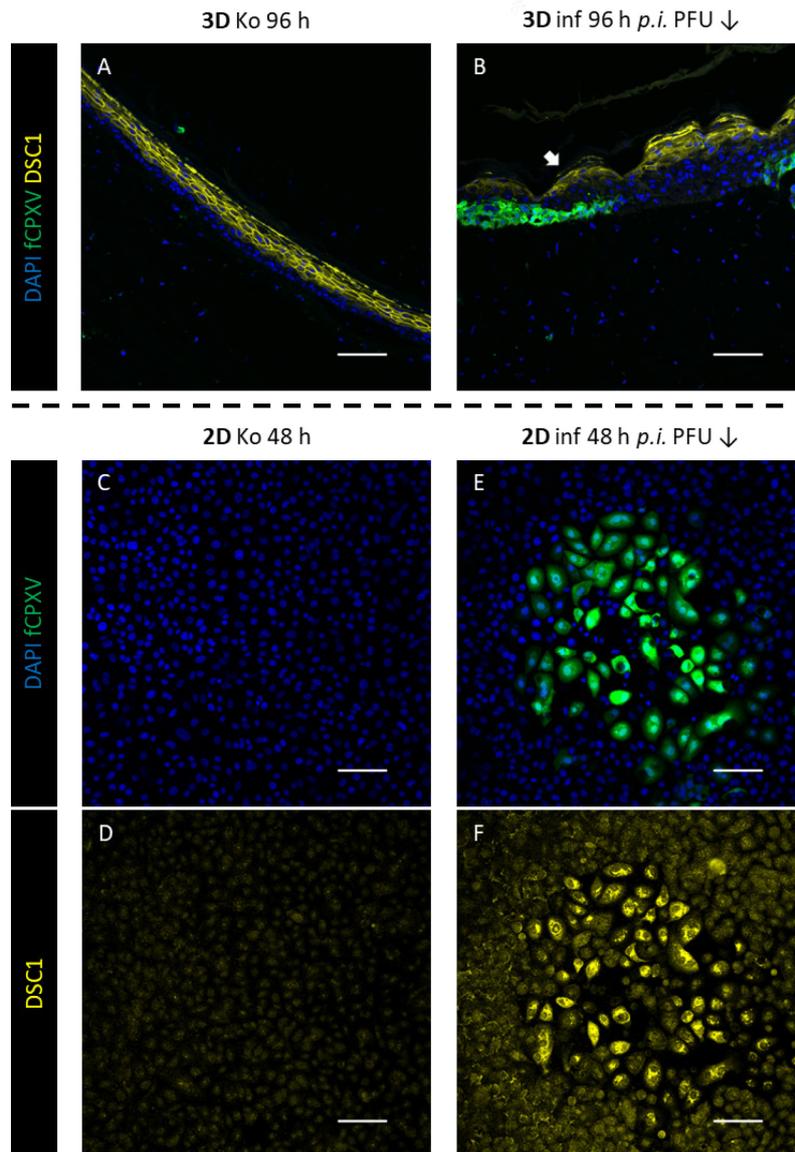


Abbildung 46: Immunfluoreszenz-Nachweis des DSC1-Proteins in Keratinozyten während der Infektion. Betrachtet wurden Proben zu den Zeitpunkten 96 h *p.i.* (A, B) aus Hautäquivalenten bzw. zum Zeitpunkt 48 h *p.i.* in 2D-Kultur (C-F). Der Pfeil in B zeigt auf die Epidermis über einem infizierten Bereich (grün fluoreszierend). Starke DSC1-Signale konnten im *Stratum spinosum* und *granulosum* der 3D-Kultur detektiert werden. Diese waren über infizierten Bereichen leicht geringer ausgeprägt. In 2D-Kultur wurden DSC1-Signale in infizierten Zellen nahe den Zellkernen detektiert. Maßstabsbalken $\cong 100 \mu\text{m}$

Die DSC1-Proteinexpression des 3D-Kontrollpräparates war auf die differenzierenden Schichten des *Stratum spinosum* und *Stratum granulosum* fokussiert. In der infizierten Probe 96 h *p.i.* konnte eine Abnahme der DSC1-haltigen Schicht über den infizierten Zellen detektiert werden, wobei DSC1-positive Zellen über nicht-infizierten Zellen weiterhin detektiert wurden. In 2D-Kultur konnte eine klare Steigerung der DSC1-Signale während der Infektion detektiert werden. So waren in den Kontrollen nur sehr schwach positive Zellen zu detektieren, während in infizierten Zellen 48 h *p.i.* fokussierte, intensive DSC1-Signale zu beobachten waren. Diese befanden sich im Cytoplasma infizierter Zellen und waren nicht auf die Zelloberfläche fokussiert, wie in den Proben aus 3D-Kultur.

Keratin 2 (KRT2)

Keratin 2 zählte ebenso zu den während der Infektion herunterregulierten Genen. Das Keratin aus differenzierenden Schichten des Epithels zeigte am frühen Zeitpunkt 18 h *p.i.* (hohe infektiöse Dosis) in der Transkriptomanalytik einen zehnfachen Expressionsrückgang in epidermalen Keratinozyten. Im Vergleich mit den Keratinozyten aus 2D- Kultur war das Keratin in den mock-infizierten Kontrollen der 3D-Kultur etwa 60-100-fach hochreguliert. In 2D-Kultur konnte während der Infektion zu verschiedenen Zeitpunkten eine signifikante, zweifache Herunterregulation in der Transkriptomanalytik nachgewiesen werden. Zur Bestätigung und genauen Charakterisierung wurde die KRT2-Expression in epidermalen Keratinozyten per qPCR im Zeitverlauf untersucht (Abbildung 47).

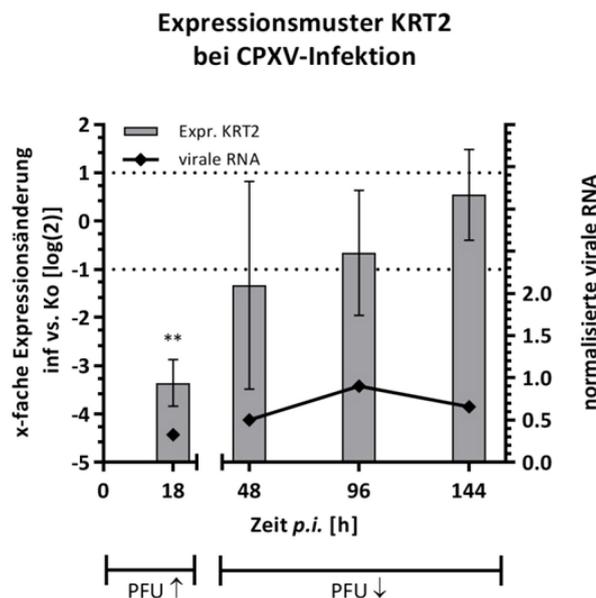


Abbildung 47: Expressionsmuster von KRT2 in epidermalen Keratinozyten (3D-Modell) im Infektionsverlauf. Dargestellt ist die Änderung der Expression im Unterschied zwischen infizierten Proben und Kontrollen (je biologische Triplikate) normalisiert auf vier Referenzgene. Zur Veranschaulichung des Infektionsstatus dient die normalisierte virale mRNA-Expression (CPXV 086) der infizierten Proben. Am frühen Zeitpunkt 18 h *p.i.* war das Gen KRT2 signifikant, etwa zehnfach herunterreguliert. An den übrigen Zeitpunkten konnte unter leichtem Expressionsanstieg keine signifikante Regulation zwischen infizierten Proben und Kontrollen nachgewiesen werden.

Nur am frühen Zeitpunkt 18 h *p.i.* konnte eine signifikante, zehnfache Herunterregulation der KRT2-mRNA-Expression detektiert werden. Zu den folgenden Zeitpunkten bei Infektion mit einer geringeren infektiösen Dosis war keine Regulation von KRT2 zu beobachten, wobei die Expressionsänderungen zwischen infizierten Proben und Kontrollen über die Kultivierungszeit bei hoher Schwankungsbreite leicht anstiegen.

Zur Untersuchung der Proteinexpression von KRT2 in Abhängigkeit von der Infektion und der Lokalisation des Proteins wurden Schnittpräparate immunhistochemisch gefärbt und analysiert (Abbildung 48).

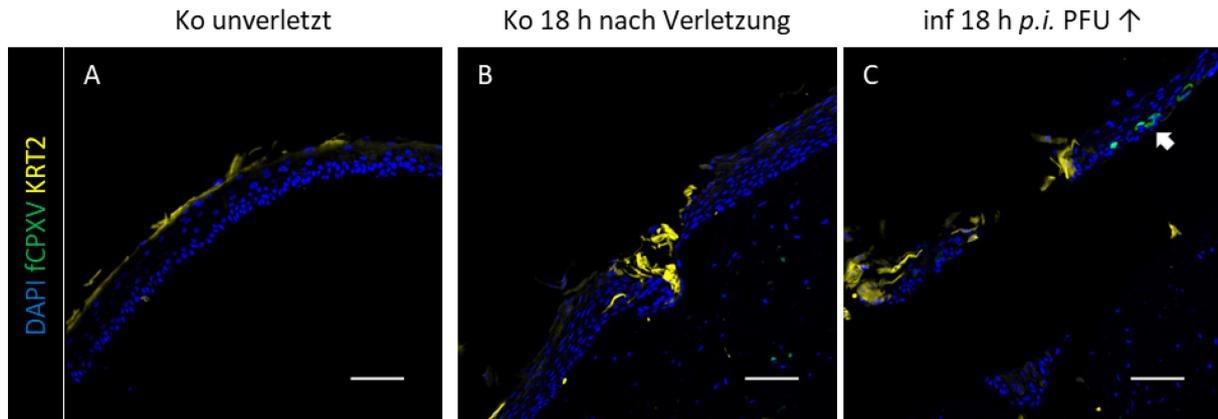


Abbildung 48: Immunfluoreszenz-Nachweis des KRT2-Proteins in epidermalen Keratinozyten. Es wurden Proben zu den Zeitpunkten 0 h (A: Kontrolle, unverletzt) und 18 h *p.i.* (B: Kontrolle, C: infiziert, jeweils verletzt) aus Hautäquivalenten gefärbt. Der Pfeil zeigt auf infizierte Zellen. Starke KRT2-Signale konnten in der apikalen Schicht der Epidermis in der Nähe von Einstichstellen detektiert werden. Maßstabsbalken $\cong 100 \mu\text{m}$

Das Protein KRT2 war in der unverletzten Hautprobe an der apikalen Seite der Epidermis in der beginnenden Hornschicht bzw. im *Stratum granulosum* lokalisiert. Die zugehörigen Signale waren allerdings deutlich schwächer als in den verletzten Präparaten 18 h nach Verletzung. In diesen Präparaten zeigte sich eine Anreicherung des Proteins nahe den Einstichstellen aus der Verletzung, welche durch wundverschlussartige Veränderungen bzw. eine nicht durchgängig zusammenhängende Epidermis gekennzeichnet waren. In Abhängigkeit von der Infektion konnte keine signifikante Reduzierung der KRT2-Signale detektiert werden. Vielmehr gab es einige Wunden mit starken und einige mit schwächeren KRT2-Signalen an den Rändern, die sowohl in den infizierten Proben als auch in den verletzten Kontrollen vorkamen. Eine genaue Quantifizierung im Vergleich beider Proben war deshalb nicht möglich. Auch im Western Blot (Daten nicht gezeigt), konnte keine Expressionsänderung zwischen infizierten Proben und Kontrollproben nachgewiesen werden.

Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2 (PTGS2 auch COX2) und Interleukin 24 (IL24)

Die Proteine PTGS2 und IL24 sind unter anderem in die Inflammation (z. B. während der Wundheilung) involviert. Beide Gene wurden während der Transkriptomanalyse am frühen Zeitpunkt (18 h *p.i.*) als herunterreguliert detektiert. Dabei war PTGS2 in infizierten Äquivalenten um Faktor zehn und IL24 um Faktor sechs herunterreguliert. Am späten Zeitpunkt (96 h *p.i.*) war IL24 unreguliert und PTGS2 vierfach, signifikant hochreguliert. Im Vergleich beider Kultivierungsarten waren beide Gene in den Kontrollen der 3D-Kultur gegenüber denen der 2D-Kultur ähnlich exprimiert. In 2D-Kultur waren beide Gene in der Transkriptomanalytik nach Infektion 48 h *p.i.* zweifach hochreguliert, ansonsten unreguliert. Zur Charakterisierung der Expression in 3D-Kultur wurden beide Gene im Zeitverlauf mittels qPCR analysiert (Abbildung 49).

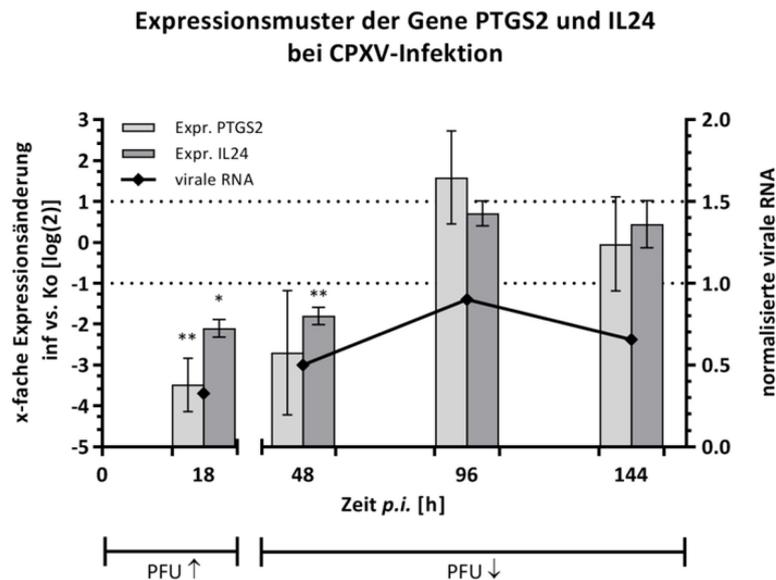


Abbildung 49: Expressionsmuster von PTGS2 und IL24 in epidermalen Keratinozyten (3D-Modell) im Infektionsverlauf. Dargestellt ist die Änderung der Expression im Unterschied zwischen infizierten Proben und Kontrollen (je biologische Triplikate) normalisiert auf vier Referenzgene. Zur Veranschaulichung des Infektionsstatus dient die normalisierte virale mRNA-Expression (CPXV 086) der infizierten Proben. Es zeigte sich ein ähnlicher Verlauf der Expression beider Gene. An den frühen Zeitpunkten war die Expression von PTGS2 und IL24 jeweils herunterreguliert und stieg jeweils bis auf Maximum am Zeitpunkt 96 h *p.i.* an.

Beide Gene zeigten ein ähnliches Expressionsmuster im Zeitverlauf. Am frühen Zeitpunkt 18 h *p.i.* war PTGS2 in infizierten Proben signifikant etwa um Faktor zehn herunterreguliert, IL24 etwa um Faktor fünf. 48 h *p.i.* war weiterhin eine Herunterregulation der Gene zu beobachten, welche für IL24 auch hoch signifikant war. Zu den späteren Zeitpunkten war keine signifikante Regulation beider Gene zu detektieren, wenn auch die Expression in den infizierten Proben leicht höher war als in den Kontrollen und damit gegenüber den früheren Zeitpunkten anstieg.

In Zusammenfassung aller nachanalytierten Proben war eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen aus der NGS-basierten Transkriptomanalyse und den qPCR-Nachanalysen zu beobachten. Die nachanalytierten Gene zeigten eine genspezifische, infektionsabhängige Regulation im zeitlichen Verlauf. Für einige Gene konnte die Regulation auch auf Proteinebene mittels Western Blot und immunhistochemischen Färbungen nachgewiesen und diese Proteine in ihrer Lokalisation näher bestimmt werden.

3.4.4. Inhibitionsstudien mit Gefitinib

Ein weiteres wichtiges Feld der Infektionsforschung stellt die Erforschung neuer Therapieansätze gegen Viren dar. Da die Kultivierung von Zellen in diesem 3D-Modell sowohl einen starken Einfluss auf die Zellmorphologie, die Zell-Zell-Kontakte und die Proteinexpression als auch auf den Verlauf der Infektion mit CPXV zeigte, ist zu erwarten, dass auch die Wirkung von antiviralen Substanzen abhängig vom zellulären Kontext unterschiedlich verlaufen kann. Die Verwendung des 3D-Modells könnte dabei die Durchführung der Inhibitionsversuche in einem physiologischeren Aufbau ermöglichen und biologisch relevantere Daten liefern. In den Versuchen dieser Doktorarbeit wurde deshalb die Anwendbarkeit des etablierten Hautmodells für Inhibitionsstudien an CPXV-Infektionen untersucht. Nach erfolgreichen Vorversuchen mit Cidofovir (Daten nicht gezeigt) konzentrierten sich die Versuche auf die Substanz Gefitinib, welche insbesondere in die Ausbreitung des Virus von Zelle zu Zelle und die Modulation der Wirtszellen eingreift. Gefitinib kann an die, vom Virus über die Expression von CGF stimulierten, EGF-Rezeptoren binden und so die Phosphorylierung und die weitere Signalkaskade verhindern. In 2D-Kultur von Zelllinien konnte bereits die Wirksamkeit des Hemmstoffes gegenüber Infektionen mit Orthopockenviren gezeigt werden [154]. Für infizierte 3D-Kulturen konnte eine Hochregulation der CGF-Transkripte gegenüber 2D-Kultur während der Infektion zu allen verglichenen Zeitpunkten gezeigt werden (siehe 3.3.3).

In den Hemmstoffversuchen wurde der inhibitorische Effekt verschiedener Gefitinib-Konzentrationen auf die virale DNA-Replikation und RNA-Transkription im Vergleich von 3D- und 2D-Kultur in humanen Keratinozyten aus der Epidermis infizierter Hautäquivalente bzw. infizierter 2D-Kulturen aus Zellkulturplatten untersucht. Hierfür wurden die Kulturen mit einer geringen infektiösen Dosis (3D: 1 Virus/Zelle; 2D: MOI 0,01) infiziert und nach sofortigem Behandlungsstart in Gefitinib-haltigem Medium für 144 h *p.i.* (3D) oder 48 h *p.i.* weiterkultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage.

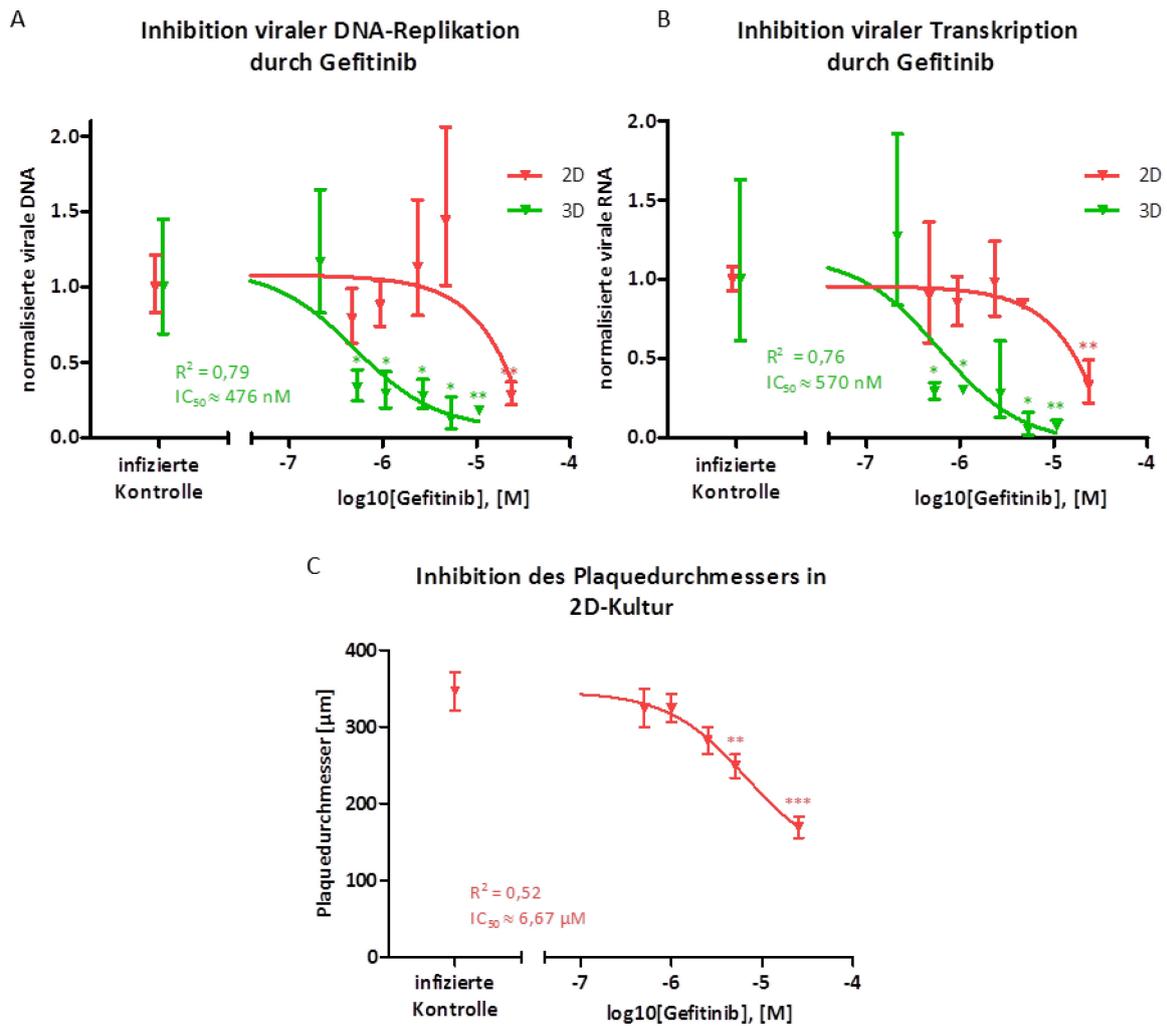


Abbildung 50: Dosis-Wirkungs-Kurven für die Inhibition von CPXV-Infektionen in 3D- und 2D-Kultur von Keratinozyten. Hierfür wurde eine geringe infektiöse Dosis von 1 Virus / Zelle (3D) oder eine MOI von 0,01 (2D) zur Infektion eingesetzt. Die Behandlung erfolgte direkt nach der Infektion für eine Kultivierungszeit von 144 h *p.i.* (3D) bzw. 48 h *p.i.* (2D). Anschließend wurden die Proben analysiert. A: Einfluss von Gefitinib auf die virale DNA-Replikation, normalisiert auf das zelluläre Referenzgen MYC und unbehandelte, infizierte Kontrollproben (n = 3). B: Einfluss von Gefitinib auf die virale Transkription (Gen CPXV086) normalisiert auf die Expression der zellulären Referenzgene MYC, GAPDH und TBP und unbehandelte, infizierte Proben (n = 3). C: Einfluss von Gefitinib auf den Durchmesser viral verursachter Zellschädigungen (Plaques) in 2D-Kultur. Die Vermessung zufällig ausgewählter Plaques erfolgte mittels der Bildbearbeitungssoftware ZEN (n = 10). Die Approximation der Kurven und Berechnung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism. Für 2D-Kulturen konnte keine IC_{50} für DNA-Replikation und Transkription ermittelt werden. Der inhibitorische Effekt auf die virale DNA-Replikation und Transkription trat in 3D-Kultur bei geringeren Konzentrationen auf als in 2D-Kultur. Die IC_{50} in 2D-Kultur war minimal zehnfach höher als in 3D-Kultur.

Abbildung 50 zeigt die Dosis-Wirkungs-Kurven für die Inhibitionsversuche mit Gefitinib in 3D- und 2D-Kultur humaner Keratinozyten auf Basis viraler DNA-Replikation, viraler Transkription und dem Durchmesser der viral verursachten Plaques in 2D-Kultur. In allen Versuchen war eine Hemmung der Infektion nachzuweisen. In den Infektionsversuchen in 3D-Kultur konnte eine signifikante Inhibition der viralen Nukleinsäure-Menge durch Gefitinib bereits bei einer Konzentration von 500 nM im Medium nachgewiesen werden, wobei die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC_{50}) bei 476 (DNA-Replikation) bzw. 570 nM (Transkription) lag.

In 2D-Kultur hingegen konnte eine signifikante Inhibition der CPXV-DNA-Replikation und Transkription erst bei einer Gefitinib-Konzentration von 25 mM erreicht werden. Eine Berechnung der IC_{50} war nicht möglich, da aufgrund cytotoxischer Effekte in 2D-Kultur keine größeren Konzentrationen als 25 mM appliziert wurden. Bezogen auf die Größe des Plaquesdurchmessers konnte ein signifikanter inhibitorischer Effekt in 2D-Kultur bei einer Konzentration von 5 mM gezeigt werden. Die IC_{50} betrug für die Inhibierung des Plaquesdurchmessers in der 2D-Kultur 6,67 μ M und lag damit etwa zehnfach höher als die in 3D-Kultur für virale DNA-Replikation und Transkription.

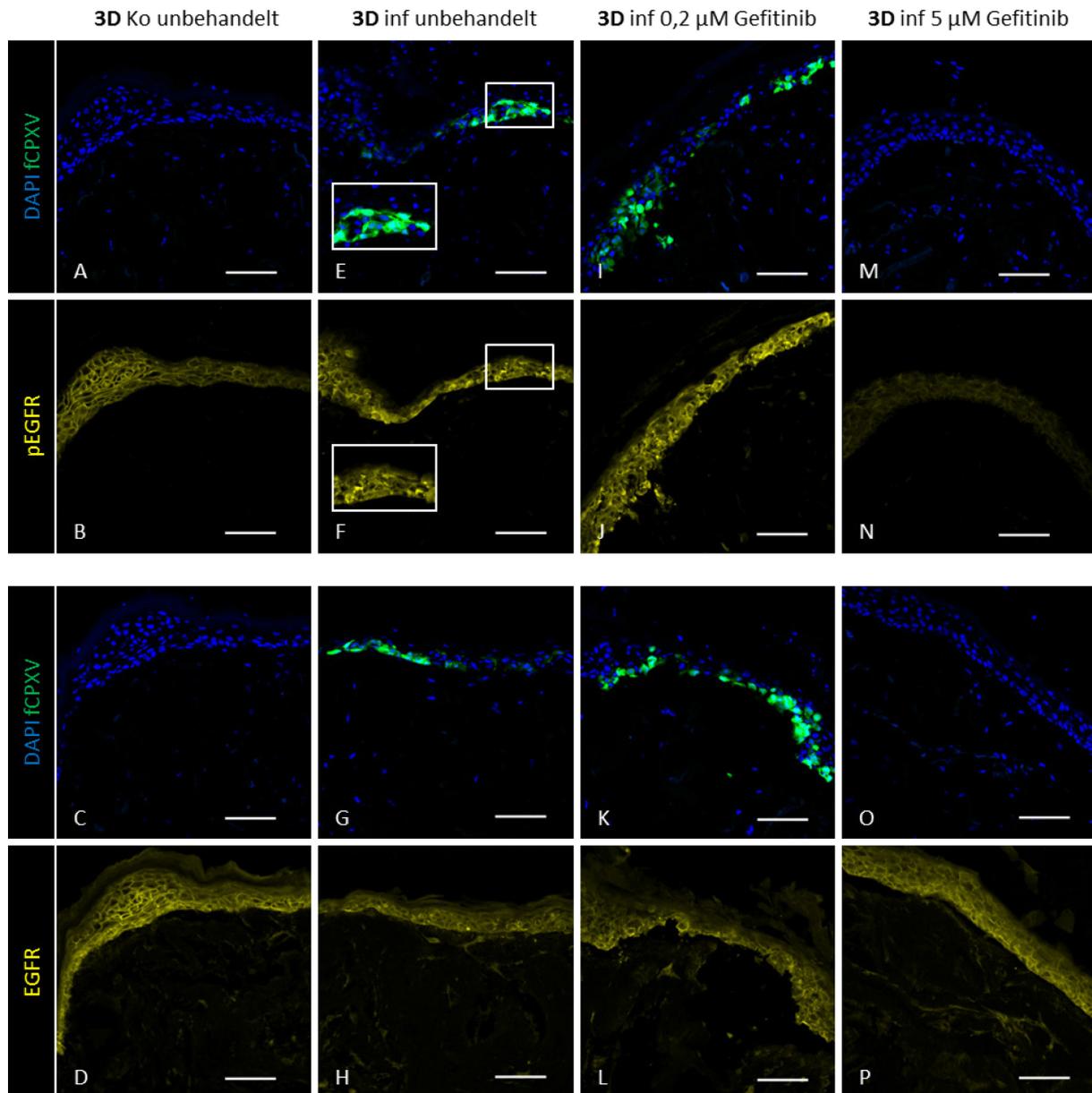


Abbildung 51: Nachweis der Infektion und EGFR-Phosphorylierung in infizierten Hautäquivalenten unter Gefitinib-Hemmung. Dabei wurden Proben zum Zeitpunkt 144 h *p.i.* infiziert mit 1 Virus / Zelle betrachtet. A-D: unbehandelte, mock-infizierte Kontrollen. E-H: unbehandelte, infizierte Kontrollen. I-L: infizierte Äquivalente unter Behandlung mit 0,2 μ M Gefitinib. M-P: infizierte Äquivalente unter Behandlung mit 5 μ M Gefitinib. Pro Probe ist jeweils die Verteilung des pEGFR in Abhängigkeit von der Infektion und die Verteilung des unphosphorylierten Rezeptors gezeigt. In der infizierten, mittels 5 μ M Gefitinib behandelten Probe waren keine Rezeptorphosphorylierung und auch keine Infektion zu detektieren. Maßstabsbalken \cong 100 μ m

Zur detaillierteren Überprüfung des Hemmeffektes wurden immunhistochemische Analysen zur Detektion infizierter Zellen sowie der Verteilung und Phosphorylierung des EGFR in beiden Kulturformen durchgeführt.

Abbildung 51 zeigt Immunfluoreszenz-Aufnahmen aus Proben des Hemmstoffversuches mit Gefitinib in humanen Hautäquivalenten. In infizierten Proben, welche mit Medium ohne Gefitinib oder einer Konzentration von 0,2 μM Gefitinib behandelt worden waren, wurden breite infizierte, grün fluoreszierende Bereiche detektiert. Dahingegen gab es in der mit 5 μM Gefitinib behandelten, infizierten Probe keine derartigen Bereiche. Die Phosphorylierung des EGFR war in den infizierten Proben ohne oder mit 0,2 μM Gefitinib behandelt gegenüber der unbehandelten, mock-infizierten Kontrolle nicht herunterreguliert.

In Nachbarschaft infizierter Bereiche traten teilweise verstärkte pEGFR-Signale auf. In der mit 5 μM Gefitinib behandelten Probe hingegen konnten keine pEGFR-Signale detektiert werden. Die Expression des unphosphorylierten Rezeptors EGFR war in allen Proben unverändert und durch die Infektion unbeeinflusst. In den stark infizierten Proben war allerdings nach 144 h *p.i.* schon eine deutliche Schädigung der dünneren Epidermis zu beobachten, sodass in diesen Proben auch der Bereich des gleichmäßig über den Querschnitt der Epidermis verteilten EGFR eine geringere vertikale Dicke als in der mock-infizierten Kontrolle bzw. der mit 5 μM Gefitinib behandelten Probe aufwies.

Nachdem der Einfluss von Gefitinib sowohl auf die Menge infizierter Zellen als auch auf die EGFR-Phosphorylierung in 3D-Kultur gezeigt werden konnte, wurde diese Untersuchung auch in fixierten Präparaten von infizierten, behandelten 2D-Kulturen durchgeführt. Die Präparate auf Inkubations-Objektträgern wurden dabei mit einer MOI von 0,01 infiziert und jeweils für 48 h *p.i.* unter Zugabe der gewünschten Konzentration Gefitinib inkubiert, um die Ausbreitung der Infektion hinreichend lange untersuchen zu können.

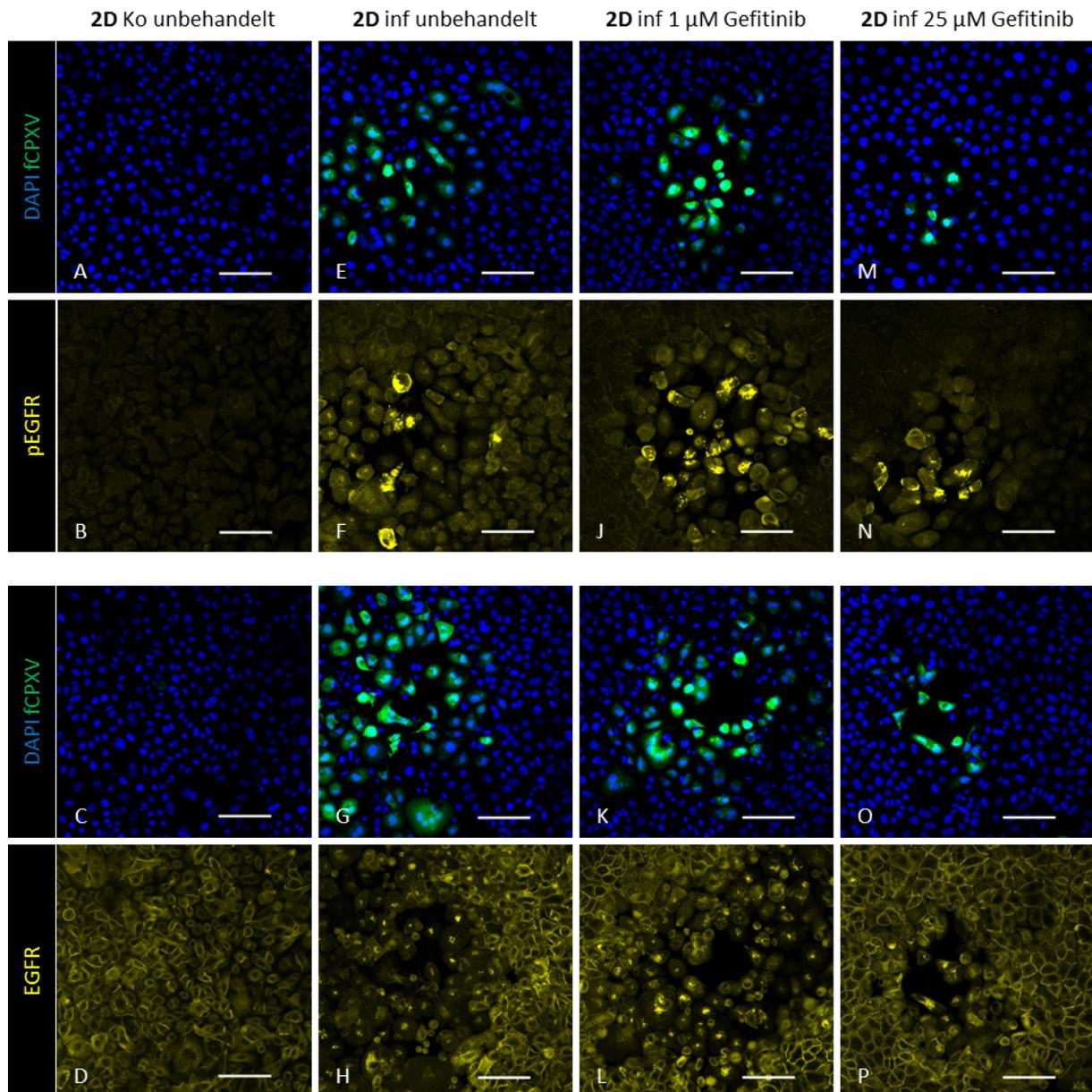


Abbildung 52: Nachweis der Infektion und EGFR-Phosphorylierung in infizierten 2D-Kulturen primärer Keratinozyten unter Gefitinib-Hemmung. Hierfür wurden Proben zum Zeitpunkt 48 h *p.i.* betrachtet, die mit einer MOI von 0,01 infiziert worden waren. A-D: unbehandelte, mock-infizierte Kontrollen. E-H: unbehandelte, infizierte Kontrollen. I-L: infizierte Proben unter Behandlung mit 1 μM Gefitinib. M-P: infizierte Äquivalente unter Behandlung mit 25 μM Gefitinib. Pro Probe wurde jeweils die Verteilung des pEGFR in Abhängigkeit der Infektion ebenso gezeigt wie die Verteilung des unphosphorylierten Rezeptors. In der infizierten, mit 25 μM Gefitinib behandelten Probe waren die infizierten Bereiche (Plaques) deutlich kleiner, wobei die EGFR-Phosphorylierung in infizierten Zellen durch die Gefitinib-Behandlung unbeeinflusst war. Maßstabsbalken \cong 100 μm

Abbildung 52 zeigt Immunfluoreszenz-Aufnahmen aus Proben des Hemmstoffversuches mit Gefitinib in 2D-Kultur primärer, humaner Keratinozyten. In der infizierten, unbehandelten Probe waren größere, infizierte Bereiche (Plaques) zu detektieren, welche sich zwischen nicht-infizierten, GFP-negativen Zellen befanden.

Von den infizierten und den dazu benachbarten Zellen waren einige stark pEGFR-positiv, wenn auch nicht alle infizierten Zellen positiv für die Rezeptor-Phosphorylierung waren. In den mock-infizierten Kontrollen hingegen konnte keine Rezeptor-Phosphorylierung nachgewiesen werden.

Die Expression des unphosphorylierten Rezeptors war in allen Proben ähnlich stark, wobei durch cytopathische Effekte die EGFR-Signale in stark infizierten Bereichen zumeist in konzentrierten Foki auf den deutlich kleineren Zellen auftraten und dadurch intensiver erschienen.

Bei der mit 1 μ M Gefitinib behandelten Probe konnten keine Unterschiede in Plaquezahl, Durchmesser, EGFR-Expression oder -Phosphorylierung gegenüber der infizierten, unbehandelten Probe festgestellt werden.

Bei Behandlung infizierter Kulturen mit 25 μ M Gefitinib war die Größe der infizierten Bereiche gegenüber den unbehandelten Infektionskontrollen deutlich reduziert (siehe auch Abbildung 50C). Dagegen war die absolute Anzahl der Plaques nicht beeinflusst. Dabei nahm allerdings die Anzahl infizierter Zellen innerhalb eines Plaques ab. Weiterhin konnte eine starke EGFR-Phosphorylierung mancher infizierter und dazu benachbarter Zellen detektiert werden, welche durch die Gefitinib-Behandlung in der Intensität nicht beeinflusst war. Lediglich die absolute Menge an pEGFR-positiven Zellen nahm korrelierend zur Abnahme infizierter Zellen ab.

3.4.5. Infektionsstudien in einem kommerziell erhältlichen Alternativmodell

In einem Versuch dieser Arbeit sollte im Sinne einer nachhaltigen, einfachen und reproduzierbaren Etablierung von 3D-Modellen in der Virologie auch die Anwendbarkeit eines kommerziellen Hautmodells für die Infektionsforschung getestet werden. Hierbei wurde das Modell EPI-200 der Firma MatTek für Infektionsversuche verwendet. Dieses wurde, vergleichbar mit den Versuchen mit dem Vollhaut-Modell aus Epidermis und Dermis, mit einer infektiösen Dosis von $1,5 \cdot 10^5$ PFU / Äquivalent (niedrige Dosis) nach Verletzung der Oberfläche durch 15 Einstiche infiziert. Anschließend wurden die Kulturen für 48 bzw. 144 h *p.i.* unter zweitäglichem Mediumwechsel weiterkultiviert, um die Infektionsausbreitung zu ermöglichen. Nach der Inkubationszeit erfolgten die Abnahme und Analyse der viralen Nukleinsäuren aus dem gesamten Epidermisäquivalent oder die Anfertigung von Dünnschnittpräparaten zum elektronenmikroskopischen Nachweis von Virusfabriken und viralen Partikeln in den Zellen. Abbildung 53 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Analyse der Virusinfektion.

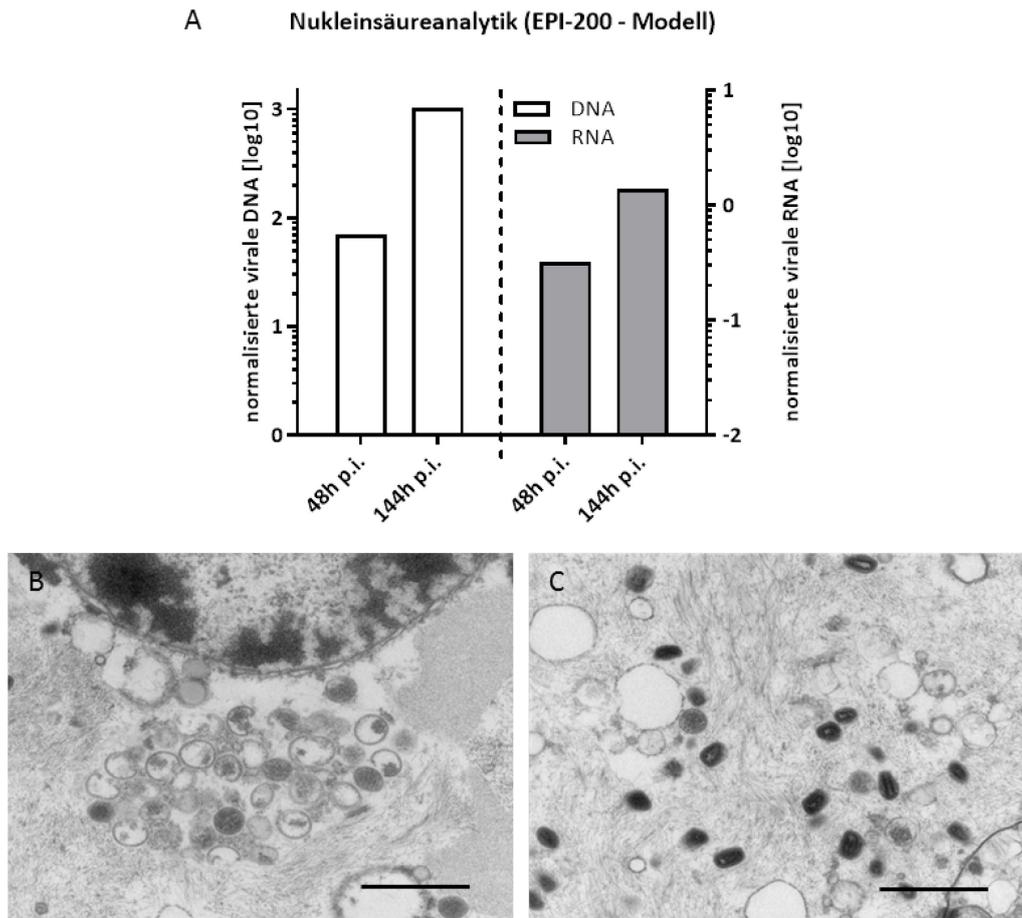


Abbildung 53: Nachweis viraler Replikation und Partikel in infizierten Äquivalenten des kommerziellen Epidermismodells EPI-200 (MatTek). A: Virale DNA und RNA (CPXV086) im Epidermismodell referenziert auf das Gen MYC bzw. die Expression des Referenzgens MYC. B: Bereich einer Virusfabrik in einem infizierten Keratinozyten 144 h *p.i.* C: Bereich mit reifen, extrazellulären Virionen zwischen den Zellen 144 h *p.i.*. Eine produktive Infektion konnte auf Basis von viralen Nukleinsäuren, Virusfabriken und reifen Virionen nachgewiesen werden. Maßstabsbalken jeweils $\cong 1 \mu\text{m}$

Auch in den Keratinozyten dieses kommerziellen Epidermismodells wurde eine produktive Infektion nachgewiesen. Die viralen Nukleinsäuren stiegen referenziert auf das Gen MYC im Kulturverlauf bis zum Zeitpunkt 144 h *p.i.* an und lagen mit einem Verhältnis von 1 zu 100 bis 1 zu 1000 (DNA) bzw. etwa 1 zu 1 (RNA) in einem ähnlichen Bereich wie der Anteil viraler Nukleinsäuren im Vollhaut-Modells (siehe Etablierung, Abbildung 13). In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten des Weiteren sowohl Virusfabriken mit unreifen Virionen und *crescents* (Abbildung 53B) als auch reife, extrazelluläre Virionen (Abbildung 53C) detektiert werden. Diese extrazellulären Virionen zeigten dabei keinen Saum aus Glykoproteinen (vgl. Abbildung 23) wie die Virionen des Hautmodells aus Epidermis und Dermis.

Alles in allem eignete sich dieses kommerzielle Hautmodell in Kombination mit dem gewählten Infektions- und Kultivierungsprotokoll ebenso für die Untersuchung einer produktiven Infektion wie das selbst etablierte *full-thickness*-Hautmodell.

4. Diskussion

Die Erforschung von, spontan aus der Fauna auf den Menschen übertragenen, zoonotischen Viren stellt heutzutage einen wichtige Aspekt der *Public Health*-Forschung dar, um Krankheiten der Bevölkerung vorzubeugen [210]. Das Kuhpockenvirus ist ein Beispiel für einen zoonotischen, humanpathogenen Vertreter aus der Gattung der Orthopockenviren [120]. Zur Untersuchung der kuhpockenviralen Replikation, Pathogenese, Virus-Wirtszell-Interaktionen und zur Charakterisierung möglicher therapeutischer Substanzen gegen die Infektion werden verschiedene *in vitro* und *in vivo* Kultursysteme und Modelle eingesetzt. Orthopockenviren und im Speziellen Kuhpockenviren können Infektionen in menschlicher Haut auslösen und verursachen dabei hauptsächlich lokal begrenzte Hautläsionen in immunkompetenten, sowie auch schwere generalisierte Verläufe in immunsupprimierten, Individuen [178]. Aufgrund des Tropismus für die Haut sind Hautzellen wie Fibroblasten oder Keratinozyten wichtige Zielzellen für die Erforschung der viralen Pathogenese des Kuhpockenvirus.

Hierbei ähneln vor allem in differenzierten, *in vitro* Gewebekultursystemen kultivierte Hautzellen im Aufbau der humanen Haut, weshalb Infektionen realitätsnäher untersucht werden können als in klassischer 2D-Zellkultur [50]. Durch die Nutzung gut charakterisierter und qualitativ hochwertiger Hautäquivalente könnten so neue Erkenntnisse zur kuhpockenviralen Replikation und Pathogenese gewonnen werden, um ohne die Nutzung von Tiermodellen das Verhalten der Viren in Patienten besser beschreiben zu können. Somit könnten diese Modelle dabei helfen, die Zahl der Tierversuche in der virologischen Forschung zu reduzieren. Ein vollständiger Ersatz der Tierversuche scheint nach derzeitigem Stand aber noch nicht möglich, da bisher beispielweise das Immunsystem eines Organismus nicht mit kompletter Funktionalität in biologischen Modellen abgebildet werden kann [211]. Nichtsdestotrotz bieten dreidimensionale Modelle eine wichtige, realitätsnähere Alternative zu klassischen 2D-Kulturen und ermöglichen die Untersuchung biologischer Prozesse in organähnlichen Systemen. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit ein dreidimensionales, differenziertes Infektionsmodell aus primären Hautzellen aufgebaut, charakterisiert und auf die Anwendbarkeit für spezifische Fragestellungen der Virologie untersucht.

4.1. Aufbau des Hautmodells und Differenzierung

Zum Aufbau des Hautmodells wurde die Kultivierung primärer Keratinozyten und Fibroblasten erfolgreich etabliert. Dabei besaßen die Zellen nach dem Einsatz im Hautmodell noch eine Teilungskapazität von mindestens zehn Teilungen und waren in der Lage, ein dichtes Epithel auszubilden.

Das vom Projektpartner etablierte Protokoll zum Aufbau des humanen Hautmodells aus Epidermis und Dermis (*full-thickness*) wurde für den Aufbau der organotypischen 3D-Kultur genutzt [55]. Nach der Generierung wurden die Hautäquivalente sechs Tagen vorkultiviert, wobei FKS entzogen wurde. Diese Umstellung auf definiertes Medium mit spezieller Komposition an Wachstumsfaktoren begünstigt die reproduzierbare Differenzierung, welche durch die wechselnde Protein-Zusammensetzung des Naturproduktes FKS nicht gewährleistet werden kann [212, 213]. Im Verlauf der Differenzierung im *Airlift*-Verfahren konnte eine Änderung der Morphologie mit Ausprägung einer differenzierten Epithelschicht beobachtet werden.

Morphologische Beurteilung der Hautäquivalente in Vergleich zu *in vivo* Haut

Zur morphologischen Beurteilung der Hautäquivalente wurde ein Protokoll aus Paraformaldehyd - Fixierung, Kryoschnitten und Immunfluoreszenzfärbung etabliert. Dieses zeigte eine gute Gewebeintegrität, war einfach durchzuführen und ermöglichte aufgrund der zweistündigen PFA-Fixierung auch die Inaktivierung infizierter Präparate im weiteren Verlauf.

Morphologisch entwickelte sich die epidermale Komponente von einer einschichtigen, konfluenten Keratinozytenschicht am Beginn der Differenzierung innerhalb von sieben Tagen zu einem Epithel aus fünf bis zehn Schichten. Die Zellmorphologie der Keratinozyten zeigte im Hautmodell je nach Schicht dabei charakteristische Merkmale, wie sie auch in epidermalen Keratinozyten aus *in vivo* Haut zu finden sind. Im basalen Grenzbereich zur dermalen Komponente fanden sich kubische bis prismatische Zellen, die ebenso im *Stratum basale* und *Stratum spinosum* zu finden sind [57]. In apikale Richtung kam es zu einem Abflachen der Zellen und ihrer Kerne, vergleichbar mit dem *Stratum granulosum* humaner Haut [57]. Im apikalen Bereich wurde die Anzahl an detektierten Nuclei oft geringer. Am Abschluss des Äquivalentes befand sich eine Glykosaminoglykan-reiche Schicht, welche sich teilweise ablöste. Nach 13 Tagen Differenzierung war die epidermale Schicht des Äquivalentes etwas dicker, während sie im weiteren Zeitverlauf in der Dicke wieder abnahm. Dies kann in der Ablösung bestimmter apikaler Bestandteile während der Aufarbeitung begründet sein. Im dermalen Bereich des Äquivalentes konnten zu allen Zeitpunkten vereinzelt liegende Fibroblasten detektiert werden, wie sie auch für *in vivo* gewonnene Dermis typisch sind [57].

Zum Vergleich mit dem 3D-Modell wurde die Morphologie eines Biopsates aus humaner Bauchhaut untersucht. Hierbei wurde gezeigt, dass, ähnlich wie im Hautmodell, die Epidermis aus etwa 5-10 Zellschichten bestand. Die Zellen erschienen dabei dichter gepackt als im Modell und zeigten starke Glykosaminoglykan-Signale an der apikalen Grenzschicht, wobei die kernfreie, hornsichtartige Komponente oftmals dichter aber dünner war als im Hautmodell.

Diese Unterschiede zwischen 3D-Modell und *in vivo* Haut sind vor allem in der Zellzusammensetzung, Nährstoffversorgung und mechanischen Beanspruchung begründet. So besteht die *Cutis* natürlicher Haut neben Keratinozyten und Fibroblasten auch aus Melanozyten, Immunzellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen sowie den Merkel-Sinneszellen [53]. Komplexere Hautmodelle umfassen heutzutage schon Melanozyten oder auch Immunzellen [91-94]. Dabei stellen vor allem die Migration der dendritischen Immunzellen aus dem Modell ins umgebene Medium und die eingeschränkte Möglichkeit der Reifung, wie im lymphatischen System des Organismus, eine Herausforderung für die Entwicklung immunkompetenter Hautäquivalente dar [43, 101]. Die Nährstoffversorgung der Haut wird über feine Kapillaren sichergestellt, die die Dermis durchziehen. Dabei ist die Versorgung mit Nährstoffen, Zytokinen und Hormonen umfassender als im 3D-Modell, in dem das definierte *Airlift*-Medium nur einen kleinen Ausschnitt der natürlichen Mikroumgebung abbildet. Ein Schritt zur Inkorporation von Kapillaren kann die Inklusion von Endothelzellen sein, mit welchen im Hautmodell schon die Bildung von Kapillaren erreicht wurde [214]. Diese könnten zukünftig über spezielle Mikrofluidik-Ansätze auch mit einem kontinuierlichen Strom aus Nährstoffen versorgt werden [13]. Die mechanische Beanspruchung der humanen Haut spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Differenzierung. Durch Abtragung der obersten Schichten und kleinere Verletzungen werden die Proliferation und Differenzierung angeregt und durch Scherkräfte die Zell-Zell-Interaktionen gestärkt [215, 216]. Zur Verbesserung des Hautmodelles kann deshalb auch ein Kultivierungssystem gewählt werden, welches mechanische Beanspruchungen auf die kultivierten Äquivalente ausübt und dadurch eine noch natürlichere Interaktion ermöglicht. Dies geht allerdings mit einer erhöhten Komplexität der Kultivierung einher [217], wie sie für die Etablierung eines einfachen Infektionsmodelles differenzierter Keratinozyten nicht unbedingt benötigt wird.

Kultivierungszeit

Eine Limitation des *in vitro* Modells ergibt sich in der Kultivierungszeit. Im hier genutzten, statischen Modell ohne ständigen Mediumumlauf durch Pumpen, war die Gesamtkultivierungszeit auf etwa drei bis vier Wochen beschränkt. Nach einer Woche Vorkultivierung waren somit bis zu drei Wochen Kultivierung und Differenzierung im *Airlift*-Verfahren mit zweitäglichem Mediumwechsel möglich. Über die Kultivierungszeit war makroskopisch die Hautalterung durch eine für dieses Modell typische, fortschreitende Kontraktion der Äquivalente im Zellkultureinsatz zu beobachten, wie sie auch in verschiedenen Quellen beschrieben ist [218, 219]. Dieser Prozess wird hauptsächlich durch den Umbau der extrazellulären Matrix durch die Fibroblasten im dermalen Bereich verursacht, welche das Kollagen-I aus Rattenschwänzen proteolytisch spalten und degradieren können, aber auch humanes Kollagen-I neu bilden [194].

Eine Inhibition des Umbaus und damit der Kontraktion könnte im Modell durch den Zusatz von Matrixmetalloprotease-Inhibitoren, insbesondere von Kollagenase-Inhibitoren wie Ilomastat, erreicht werden [220]. Weiterhin könnten auch nicht-enzymatische Modifizierungen der Kollagene durch Glykation ein Grund der Kontraktion sein. Diese treten im Menschen beispielsweise bei Diäten oder einer Diabetes auf [221]. Darüber hinaus ist ein Flüssigkeitsverlust der Hautäquivalente während der Differenzierung denkbar. Im Modell kann nur ein, im Vergleich zu *in vivo* Haut, relativ schlechter Verdunstungsschutz aufgebaut werden, weil u. a. wichtige Substanzen wie Hyaluronsäure nicht in physiologischem Maße vorhanden sind und für Langzeitkultivierung in die dermale Matrix zugesetzt werden müssten [218]. Das Erreichen der maximalen Kultivierungszeit konnte in Gewebeschnitten durch Veränderungen in der Morphologie und der Expression bestimmter Marker wie Ki-67 beobachtet werden.

Nach 13 Tagen Differenzierung zeigten sich in Gewebeschnitten Ablöseeffekte der äußeren Schichten und es kam zu einem Verlust der Integrität. Des Weiteren war die epidermale Schicht nach langer Differenzierung in der Tendenz dünner als zuvor und die basalen Zellen lagen lose in der umgebenen Matrix. Sie zeigten oft schon im basalen Bereich eine differenzierungsspezifische Abflachung. Eine Ursache hierfür kann die begrenzte Teilungskapazität der primären Zellen sein, die mit 20–50 Teilungen angegeben wird [222]. So waren am Beginn der Differenzierung und zu einem frühen Zeitpunkt (z. B. nach sieben Tagen) etwa 15-20 % der Zellen positiv für den Proliferationsmarker Ki-67. Dies entspricht in etwa dem Anteil Ki-67 positiver Zellen in humaner *in vivo* Haut im eigenen Versuch sowie in der Literatur [69]. Somit scheinen die Proliferation der Zellen und die Differenzierung in Richtung der apikalen Epidermisschichten an diesem Zeitpunkt ein physiologisches Gleichgewicht zu bilden, wobei durch die fehlende mechanische Belastung kein Abtrag der ausdifferenzierten, verhornenden und unbelebten Zellen erfolgt. Im Verlauf der weiteren Kultivierung nahm die Proliferationskompetenz der Zellen ab, sodass nach zwei Wochen Differenzierung unter 5 % der Zellen positiv für den Proliferationsmarker Ki-67 waren. Ab diesem Zeitpunkt konnten auch vereinzelt apoptotische Zellen per TUNEL-Endpunkt-Assay nachgewiesen werden, welche in der untersuchten humanen Haut nicht vorkamen, da die Differenzierung zu unbelebten Corneozyten nicht als Form der Apoptose angesehen werden kann [223]. Die Proliferationszeit der Keratinozyten, die die Kultivierungszeit von drei bis vier Wochen bedingt, entspricht der physiologischen Zeit der Hauterneuerung und Differenzierung einzelner Keratinozyten *in vivo* [224]. Damit ist auch die Zeitspanne für einen sinnvollen Einsatz der Hautäquivalente in Infektionsversuchen vorgegeben.

Eine weitergehende Kultivierung komplexerer Äquivalente kann in anderen Kultursystemen unter anderem mit kontinuierlichem Mediumfluss [225], einer *Subcutis*, oder unter Nutzung von Stammzellen, z. B. aus Haarfollikeln gewonnen, erreicht werden [226].

Aufgrund der beschränkten Kultivierungszeit des Modelles von drei bis vier Wochen wurde für den Großteil der Infektionsexperimente eine Kultivierungszeit von einer Woche Differenzierung und einer Woche Untersuchung der Infektion gewählt, was mit der Vorkultivierung einer Gesamtkultivierungszeit von drei Wochen entspricht.

Expression von Markern der Differenzierung, Adhäsion und Zell-Zell-Kontakte

Zur näheren Charakterisierung der Epidermis im Zeitraum, der für die Infektionsexperimente vorgesehen war, wurden spezielle epidermale Marker untersucht. Dabei zeigte sich eine gute Übereinstimmung der distinkten Markerexpression in Hautäquivalenten und *in vivo* Haut. So wurde Keratin 14 in Hautäquivalenten ebenso wie in humaner Haut vorrangig basal detektiert, während Keratin 10 wie erwartet in den differenzierenden Schichten des *Stratum spinosum* und *St. granulosum* gefunden wurde. Als Marker des oberen *St. granulosum* und *St. corneum* konnten auch Involucrin und Filaggrin in den Hautäquivalenten immunhistochemisch nachgewiesen werden und zeigten eine ähnliche Lokalisation wie in humanen Hautproben. Die Expression dieser beiden Proteine war nach zwei Wochen Differenzierung deutlich stärker als nach einer Woche, was zum einen das Fortschreiten der Differenzierung zeigt. Zum anderen wird deutlich, dass die Äquivalente nach einer Woche Differenzierung noch nicht voll ausdifferenziert waren.

Im basalen Bereich der Epidermis konnte zudem das Zelladhäsionsmolekül Integrin β -1 in einer der *in vivo* Haut entsprechenden Lokalisation nachgewiesen werden. Dieses Integrin verzahnt als Oberflächenmolekül die basalen Zellen der Epidermis über deren Aktinfilamente mit der extrazellulären Matrix und vermittelt damit wie *in vivo* polarisiert den Austausch beider Schichten [227]. An der Grenzschicht zwischen Epidermis und Dermis wurden des Weiteren die Basallamina-Marker Kollagen-IV und Laminine detektiert. Nachdem beim Aufbau des Modells ursprünglich nur Fibronectin beide Schichten trennte, konnte im Kultivierungsverlauf eine Anreicherung dieser Proteine an der Grenzschicht gezeigt werden. Die Synthese konnte in erster Linie in Fibroblasten der Dermis lokalisiert werden. Dies konnte auch in anderen Studien gezeigt werden [228, 229]. Die Fokussierung der Signale beider Proteine war allerdings bei weitem nicht so stark auf die Basallamina beschränkt wie in humaner Haut. Auch konnte elektronenmikroskopisch zu einem späten Zeitpunkt keine vollständig intakte Basallamina nachgewiesen werden. In natürlicher Haut hingegen sind Dermis und Epidermis deutlich fester verbunden, sodass sie nur durch stärkere und längere Behandlung mit Reagenzien wie Dispasen, Trypsin, Thermolysin, Natriumbromid oder Hitze voneinander getrennt werden können [230]. Die unzureichende Basallamina-Synthese könnte ein Grund für die leichte Trennung beider Komponenten sowohl beim Schneiden als auch durch die etablierte halbstündige Dispase-Behandlung sein.

Diese wurde etabliert, um in späteren Experimenten die epidermale und dermale Komponente des Äquivalentes getrennt voneinander analysieren zu können und so die infizierten Zellen besser einzugrenzen.

Im Gegensatz zum unvollständigen Basallaminaaufbau im etablierten Modell konnte in anderen *in vitro* Systemen der Aufbau einer funktionierenden Basallamina gezeigt werden [88], beispielsweise auf Basis von Chitosan als Substrat [231]. Allerdings ist der Aufbau und die Synthese sehr komplex und dauert deshalb *in vivo* und auch *in vitro* zumeist länger als drei Wochen, was die untersuchte Differenzierungszeit dieses Hautmodells übersteigt [228, 232].

Hingegen war die Verzahnung der Zellen in den differenzierenden Zellschichten durchaus mit *in vivo* Proben zu vergleichen. Es konnte so eine gerichtete Expression von Claudin-1 als Protein der *Tight Junctions* als verschließende Verbindung in den eng verzahnten Bereichen im und oberhalb des *Stratum spinosum* nachgewiesen werden, wie sie auch in humaner Haut typisch ist [233]. Diese Beobachtung wurde durch die Detektion von Desmosomen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen abgerundet, welche als haftende Verbindungen die Zellen mechanisch verbinden und das Epithel zusammenhalten [60]. Die Desmosomen waren trotz der im Vergleich zur humanen Haut geringen mechanischen Belastung stark ausgeprägt. Dies zeigt die physiologische Ausbildung des Zellverbandes in diesem Modell.

Weitere Evidenz für eine Differenzierung der Keratinozyten und die Abgrenzung zu 2D-Kulturen konnte während des Vergleiches epidermalen Keratinozyten aus 2D- und 3D-Kultur in der Transkriptomanalytik gewonnen werden. Hierbei waren im 3D-Modell neben den beschriebenen Markern Involucrin, Filaggrin und Keratin-10 auch weitere Differenzierungsmarker wie Loricrin, Transglutaminasen, Trichohyalin, SPR-Proteine und die Keratine 1 und 2 in ihrer Expression stark hochreguliert. Hingegen waren hauptsächlich von basalen, undifferenzierten Keratinozyten, exprimierte Gene wie Keratin 5 und 14 sowie Ki-67 in 2D-Kultur stärker exprimiert als in 3D-Kultur.

Generell waren im Transkriptom-Vergleich beider Modelle 20 - 35 % aller humanen Gene je nach Zeitpunkt differenziell reguliert. Dies macht den großen Unterschied zwischen beiden Modellen deutlich und rechtfertigt das 3D-Modell als unabhängigen Ansatz zur Bestimmung von Virus-Wirts-Interaktionen.

Die im Transkriptom-Vergleich zwischen 2D- und 3D-Kultur unterschiedlich regulierten Prozesse verifizieren nicht nur die Differenzierung der Hautäquivalente, sondern zeigen auch die Plausibilität der Auswertemethode. So waren neben den Genen der epidermalen Differenzierung auch die der Bildung von Zell-Zell-Kontakten und des Desmosom-Aufbaus in 3D-Kultur hochreguliert. Diese Unterschiede waren aufgrund der unterschiedlichen Morphologie beider Kulturformen zu erwarten.

Daher sollten auch die weiter beobachteten, hochregulierten Prozesse, wie die Abwehr von Pathogenen oder die Apoptoseregulation, eine biologische Relevanz haben.

Hingegen waren in Kontrollen der 3D-Kultivierung insbesondere Gene des mitotischen Zellzyklus, der Translation, der DNA-Replikation und des tRNA-Metabolismus gegenüber der 2D-Kultivierung herunterreguliert. Dies wurde ebenso von anderen Arbeitsgruppen beim Vergleich der Kulturmodelle herausgefunden und unterstreicht den im Vergleich zum 3D-Modell hyperproliferativen Status der Zellen in 2D-Kultur [234, 235].

Es ist festzustellen, dass die Kultivierung von differenzierten Hautäquivalenten erfolgreich etabliert werden konnte. Die Äquivalente zeigten sowohl in der Morphologie als auch in der Gen- und Proteinexpression eine hohe Übereinstimmung mit *in vivo* Proben und Literaturdaten und unterschieden sich stark von klassischer 2D-Kultur. Die ermittelten, regulierten Prozesse umfassten die spezifischen Unterschiede zwischen Zellen in 3D- und 2D-Kultur, wie in Tabelle 1 gezeigt [3].

Trotz einiger Limitationen und eines, gegenüber humaner Haut, vereinfachten Aufbaus entsprach das etablierte Modell in Qualität und Komplexität den Anforderungen und kam deshalb für die Durchführung von Experimenten zur besseren Charakterisierung von Kuhpockenviralen Infektionen zum Einsatz.

4.2. Infizierbarkeit des Hautmodells

Nach erfolgreicher Etablierung der Kultivierung der Hautäquivalente aus primären Zellen wurden Infektionsversuche durchgeführt. Hierfür wurde ein rekombinantes, fluoreszierendes Kuhpockenvirus benutzt, welches neben dem GFP-Gen unter Kontrolle eines späten viralen Promotors das komplette Genom des Referenzstammes *Brighton Red* umfasst und sich in der Replikationsfähigkeit und Pathogenität von diesem Referenzstamm nicht unterscheidet [196]. Aufgrund der genetischen Modifikation wird der Nachweis infizierter Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie vereinfacht. Beim Stamm *Brighton Red* handelt es sich um ein Isolat, das ursprünglich aus lokalen Läsionen an der Hand eines Melkers in Brighton / England im Jahre 1937 isoliert wurde [236]. Es weist hohe genetische Übereinstimmungen mit humanpathogenen Stämmen auf, welche in den 90er- und 2000er-Jahren im Vereinigten Königreich und Frankreich zirkulierten [237, 238]. Mittlerweile zirkulieren auch stärker virulente Kuhpockenvirusisolate [238]. Eine Veränderung und Zellkulturadaptation des Stammes *Brighton Red* innerhalb der 80 Jahre seit Isolation ist darüber hinaus wahrscheinlich [239].

Das verwendete rekombinante Kuhpockenvirus CPXV BACWT (fCPXV) infizierte Zellen humaner Hautäquivalente. Es zeigte dabei eine produktive Virusreplikation und die Bildung neuer infektiöser Partikel, wie über den Nachweis viraler Nukleinsäuren, Viruspartikel und Infektiosität gezeigt wurde.

Makroskopisch konnten in den Versuchen keine Effloreszenzen oder Läsionen auf infizierten Hautäquivalenten beobachtet werden, wie sie für zoonotische Infektionen in Menschen typisch sind. Diese Hautveränderungen werden wesentlich von der Immunantwort auf die Infektion verursacht, indem durch einwandernde Immunzellen eine Entzündung hervorgerufen wird [240]. Durch das Fehlen von Immunzellen im Modell ist eine derartige Reaktion in Hautäquivalenten nicht möglich.

Infektionsprotokoll des neuen Modells

Zur Etablierung eines robusten Infektionsprotokolls wurden zunächst in Optimierungsschritten verschiedene Parameter und deren Einfluss auf die Infektion untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die oberflächliche Verletzung der Hautäquivalente im Modell aus Primärzellen einen großen Einfluss auf die Ausbildung und Stärke der Primärinfektion und damit auch auf den weiteren Verlauf hatte. Hierzu wurden die Hautäquivalente nach oberflächlicher Applikation von 10 µl Inokulat durch 15 reproduzierbar gesetzte Stiche mit einer gegabelten Impfnadel verletzt. Dieses Vorgehen ist dem Einritzen der Vakzine in die Haut der Impflinge während der Eradikationskampagne entlehnt [157]. Mit Verletzung infizierte Hautäquivalente zeigten 48 Stunden nach Infektion nicht nur um mindestens zehnfach höhere virale Nukleinsäuremengen als mit gleicher Anzahl infektiöser Partikel ohne Verletzung infizierte Hautäquivalente, sondern sie waren auch reproduzierbarer infiziert. In der Gruppe der ohne Verletzung infizierten Hautäquivalente zeigten einzelne Äquivalente jeweils keine oder nur eine sehr schwache virale DNA- und RNA-Replikation. Diese Ergebnisse sind mit der im vorherigen Kapitel gezeigten Ausbildung einer differenzierten Epidermis mit Hornschicht zu erklären. Diese schützt die Hautäquivalente wie auch *in vivo* Haut vor eindringenden Pathogenen wie dem applizierten Virus [241]. Nur bei Schädigungen der Hautoberfläche, wie sie in humanen Infektionen z. B. durch das Kratzen eines Haustieres verursacht werden können, können die Kuhpockenviren die epidermale Barriere überwinden. Dass auch ohne Verletzung der Äquivalente eine geringe Replikationsrate viraler Nukleinsäuren gezeigt werden konnte, deutet zum einem darauf hin, dass die Bildung der Hornschicht an Tag 7 der Differenzierung noch nicht komplett abgeschlossen ist. Zum anderen könnten Viren ohne Nutzung einer Impfnadel die Barriere über zufällig, z. B. während des Umsetzens, entstandene Mikroverletzungen überwinden, was die Variabilität innerhalb der Gruppe der ohne Verletzung infizierten Äquivalente erklären könnte. Neben der Hornschicht übernehmen in humaner Haut Immunzellen wie Makrophagen oder IgA-Antikörper zusätzlich zur Hornschicht die Erstabwehr von Pathogenen [52, 242]. Dies ist im genutzten Hautmodell nicht der Fall.

Interessanterweise hatte die Verlängerung der Differenzierungszeit der Hautäquivalente auf zwei Wochen im durchgeführten Vorversuch keinen signifikanten Einfluss auf die virale Replikation bei Infektion mit Verletzung.

Nach einer weiteren Woche Differenzierung konnte in den Kontrollen eine dickere und Filaggrinreichere Hornschicht nachgewiesen werden, welche einen besseren Schutz vor Pathogenen bieten sollte. Diese wird allerdings durch die Verletzung überwunden und stellt deshalb kein stärkeres Hindernis für die Viren dar. Neben der Ausprägung der Hornschicht kann sich allerdings auch die Proliferationskapazität und die Zugänglichkeit der Zellen ändern, was sich ebenso auf die virale Replikation auswirken kann, wie es im Modell mit HaCaT-Zellen im Rahmen der eigenen Diplomarbeit der Fall war. In den Versuchen dieser Doktorarbeit konnte dieser Effekt für die Hautäquivalente aus Primärzellen an den gewählten Differenzierungszeitpunkten nicht bestätigt werden. Nichtsdestotrotz stellt die Differenzierungszeit einen wichtigen Parameter bei der Etablierung eines Infektionsmodells dar, insbesondere wenn Viren verwendet werden, welche nur in proliferierenden oder in differenzierenden Zellen assemblieren. So ist für humane Papillomaviren ein differenziertes Epithel für die Bildung reifer, infektiöser Partikel essentiell [191, 192].

Ein weiterer wichtiger Faktor für den Infektionsverlauf ist die initial benutzte Dosis infektiöser Viren im Inokulat. In den durchgeführten Versuchen wurde mit hohen infektiösen Dosen von $1,5 \cdot 10^5$ und $1,5 \cdot 10^7$ PFU pro Hautäquivalent gearbeitet. Dies entspricht einem Anteil von einem bzw. hundert Viren pro am Anfang der Kultivierung eingesetzter Zelle. Eine genaue Berechnung der MOI ist in diesem Modell im Gegensatz zur 2D-Kultur zum einen nicht möglich, da die genaue Anzahl der Zielzellen unbekannt ist. Zum anderen ist die Anzahl viraler Partikel lokal an der Einstichstelle sehr hoch, während an von Inokulat und Verletzung fernen Stellen des Äquivalentes keine Partikel vorhanden sein können. Daher lassen sich die Verhältnisse an der Einstichstelle und in deren naher Umgebung bezüglich des Verhältnisses infektiöser Partikel zu Zellen nur grob schätzen. Es zeigte sich allerdings in Vorversuchen, dass bei der Applikation von geringeren infektiösen Dosen, z. B. 1.500 PFU, pro Hautäquivalent keine produktive und reproduzierbare Infektion möglich war. Deshalb wurden in den weiteren Versuchen nur die zwei hohen Dosen benutzt.

Das etablierte und zur Infektion genutzte Protokoll unterscheidet sich in Teilen gegenüber bisherigen Versuchen mit Orthopockenviren in Hautmodellen. So wurden für die Infektion eines 3D-Hautmodelles in Hemmstoffversuchen mit Tecovirimat und Cidofovir deutlich geringe infektiöse Dosen von 500 bis 1000 PFU eingesetzt und die Äquivalente ohne Verletzung durch einfaches Aufpipettieren von 100 μ l Virussuspension von CPXV, VACV oder CMLV infiziert [174, 185]. Der Nachweis einer permissiven Infektion mit diesen niedrigeren infektiösen Dosen kombiniert mit dem Verzicht auf eine Verletzung deutet auf einen anderen Differenzierungsstatus der genutzten Hautäquivalente, insbesondere in Bezug auf die epidermale Barriere, hin. In einer aktuellen Studie mit einem kommerziellen Modell hingegen wurde mit einer vergleichbaren infektiösen Dosis von 10^5 infektiösen Einheiten gearbeitet und die Hautoberfläche durch Ritzung, vermutlich mit einem Skalpell, verletzt [186].

Die Nutzung eines Skalpell hat den Vorteil, dass diese durch die einmalige Anwendung im Gegensatz zu 15 Einstichen in Einstichtiefe und Lokalisierung auf dem Äquivalent reproduzierbar ist. Hingegen ist so nur ein kleinerer Bereich infiziert, von welchem ausgehend das Virus auf die benachbarten Zellen übertragen werden kann. Bei der Nutzung von mehreren Einstichstellen hingegen können die Virussuspension homogener über das Hautäquivalent verteilt und verschiedene Infektionsfoki gesetzt werden. Alternativ wäre noch ein Einspritzen geringer Mengen Inokulat über eine Kanüle denkbar, welche vergleichbar mit der Impfnadel an verschiedenen Stellen definiert eingesetzt werden könnte. Darüber hinaus wäre die Automatisierung der Verletzung ein wichtiger Fortschritt zur definierten, reproduzierbareren Inokulation. Es gibt aus der Wundheilungsforschung bereits Ansätze für eine automatisierte Verletzung von Hautmodellen [243], welche allerdings für das komplexere, infektiöse Arbeiten in Bezug auf Dekontamination pathogener Erreger höherer Sicherheitsstufen und Vermeidung von Kreuzkontaminationen angepasst werden müssten.

Weiterhin sind eine Begrenzung des Inokulatvolumens und damit eine hochtitrige Virussuspension essentiell für diese Art von Versuchen. Die Differenzierung und der Gewebeerhalt der Hautäquivalente hängen nämlich maßgeblich von der Kultivierung mit trockener Epidermisoberfläche an der Luft ab. Deshalb wurde in den hier beschriebenen Versuchen mit 10 µl Inokulat gearbeitet.

Infektionsverlauf und virale Morphogenese

Nach Etablierung des Infektionsprotokolls wurden der Infektionsverlauf und die virale Morphogenese im 3D-Modell detaillierter charakterisiert.

Für den Nachweis der Virusinfektion auf verschiedenen Ebenen wurde ein Extraktionsprotokoll für RNA, DNA und Proteine mit dem AllPrep-Kit von Qiagen etabliert, das die Aufarbeitung aus einem Äquivalent und damit eine breitere Analytik bei geringerem Materialeinsatz ermöglichte. Die dermale und epidermale Komponente des Äquivalentes wurden per Dispase-Behandlung vor der Extraktion getrennt, um diese separat analysieren zu können und das Infektionsgeschehen beider Schichten zu vergleichen. Außerdem wurde dadurch eine mögliche Interferenz [244] von dermalen Kollagenfasern mit der säulenbasierten Aufreinigung vermieden.

Die Virusreplikation konnte in einem Anstieg der viralen Genomäquivalente nach Inokulation im Zeitverlauf nachgewiesen werden. Durch die Aufarbeitung von Hautäquivalenten direkt nach Inokulation konnte zunächst auf Ebene genomischer, viraler DNA gezeigt werden, dass nur ein Bruchteil der für die Infektion zugegebenen Viruspartikel in den Zellen des Hautäquivalentes verblieb. So konnten unter 1 % der zugegebenen viralen Genomäquivalente in den epidermalen Keratinozyten des Hautäquivalentes wiedergefunden werden.

Die geringe Wiederfindungsrate könnte im Verbleiben von Inokulationslösung auf der Oberfläche, der Abgabe ins umgebene Zellkulturmedium und der schlechten Zugänglichkeit der Zellen für die Partikel begründet sein.

Im Vergleich zu den detektierten viralen DNA-Werten direkt nach Inokulation stieg die virale DNA-Menge bis zum Zeitpunkt der maximalen Viruslast auf das etwa 1.000 bis 10.000-fache an. Die maximalen DNA-Mengen wurde in der epidermalen Komponente nach vier Tagen *p.i.* mit einer infektiösen Dosis von $1,5 \cdot 10^5$ gefunden. Interessanterweise nahm die virale DNA-Menge nach diesem Zeitpunkt wieder leicht ab, was in der Ablösung stark infizierter Bereiche an den späteren Zeitpunkten durch epitheliale Desintegration begründet sein könnte. Dies konnte auch in verschiedenen Studien gezeigt werden [185, 238]. Die genaue Anzahl an DNA-Kopien, welche pro Zelle produziert werden, ist in diesem Modell schwer zu kalkulieren. Unter der auf IHC-Ergebnissen basierenden Annahme, dass zum Zeitpunkt der maximalen DNA-Menge nur etwa 20 - 30 % der Zellen infiziert sind, lassen sich pro infiziertem Keratinozyten etwa 100 - 1.000 virale Genomäquivalente errechnen. Allerdings haben dabei die Zellen an diesem Zeitpunkt keinen homogenen Infektionsstatus und können damit individuell auch mehr oder weniger Genomäquivalente tragen. In 2D-Kultur konnten pro infizierter Zelle bis zu 10.000 Kopien viraler DNA nachgewiesen werden [120]. In der dermalen Komponente des Äquivalentes konnte ebenfalls virale DNA nachgewiesen werden, wenn auch je nach Zeitpunkt etwa 10- bis 100-fach weniger (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der, in der geringeren Zelldichte begründeten, etwa 10-fach geringeren Menge an zellulärer DNA unterschied sich das normalisierte Verhältnis an pockenviraler DNA pro Zelle nicht deutlich von dem in der Epidermis.

Die virale Transkription wurde auf Grundlage polyadenylierter, viraler mRNA [245] im Zeitverlauf untersucht. Nachdem im Inokulat direkt nach der Infektion und vier Stunden nach Infektion keine virale RNA (spätes Gen CPXV086) detektiert wurde, waren an den folgenden Zeitpunkten virale Transkripte mit einem Maximum wiederum an Tag vier *p.i.* nachzuweisen. Zu diesem Zeitpunkt wurde etwa eine Kopie des viralen Gens CPXV086 pro Transkript des zellulären Referenzgens MYC gefunden, wobei dieser Wert in stark infizierten Zellen wiederum deutlich höher sein dürfte. Der Rückgang der viralen Transkription korreliert zu den späteren Zeitpunkten gut mit den vorher diskutierten Werten für die DNA-Replikation.

Der Verlauf der Synthese viraler Nukleinsäuren war auch auf Proteinebene in Western Blot und immunhistochemischen Färbungen zu bestätigen. Die maximale Proteinmenge im Western Blot wurde auf Basis des CPXV168-Proteins (VACV-Homolog: A33) wiederum nach vier Tagen *p.i.* nachgewiesen. Das Protein CPXV168 wird früh während der Infektion exprimiert [143], übernimmt eine Chaperon-Funktion bei der Formation der viralen Membran und wird in diese während der Formation der IEVs integriert [246].

Die frühe Expression des Proteins konnte in der Immunfluoreszenz-Färbung bestätigt werden. Hierbei waren deutlich größere Bereiche CPXV168-positiv, als es für das unter Kontrolle eines späten viralen Promotors stehende GFP des rekombinanten Isolates der Fall war. Oftmals wurde das CPXV168-Protein auf der Oberfläche von frisch infizierten Zellen detektiert, was zum einen auf oberflächlich andockende Viruspartikel an diesen Zellen hinweisen kann. Zum anderen könnte diese Lokalisation durch eine spezifische Präsentation von (Teil-)Antigenen von der Wirtszelle verursacht sein, wie sie für das A33-Protein bereits in Zusammenhang mit der Vermeidung von Suprainfektionen zu einem frühen Zeitpunkt nach Infektion beschrieben wurde [147, 247].

Für das ebenso in der Immunfluoreszenz-Färbung gefärbte späte Virusprotein CPXV162 (VACV-Homolog A27) [143] hingegen war die Expression deckungsgleich mit der des spät exprimierten GFP. Das CPXV162-Protein kann Heparan-Sulfat binden, vermittelt die Verpackung von MVs und ist essentiell für deren Austritt aus der infizierten Zelle [248], weswegen es erst spät exprimiert wird.

Mittels Immunfluoreszenzfärbung konnte die Infektion im Hautäquivalent klar lokalisiert werden. Insbesondere an den frühen Zeitpunkten nach Infektion waren die infizierten Zellen im basalen Bereich der Epidermis zu beobachten. In der Dermis und in differenzierten Bereichen der Epidermis konnten hingegen nur höchst vereinzelt infizierte Zellen detektiert werden. Dies könnte mit der Präferenz der Viren für replizierende Zellen, wie sie im *Stratum basale* primär vorkommen, zu tun haben. Diese wird im Punkt Proliferation in Abschnitt 4.4. diskutiert. Jedoch war die Replikation der Viren vier Tage *p.i.* auch in den differenzierten Schichten der Epidermis nachzuweisen. Orthopockenviren sind nämlich in ihrer Replikation aufgrund der eigenen Transkriptionsmaschinerie und der Fähigkeit über Proteine wie CGF die Zellproliferation anzuregen nicht auf proliferierende Zellen beschränkt und können auch ruhende Zellen infizieren [125].

In der Dermis des Äquivalentes hingegen liegen die Zellen vereinzelt in einem dichten Kollagengeflecht, was zum einen die Zugänglichkeit der Viren zu den Fibroblasten erschwert. Zum anderen ist in dieser Schicht der Übergang der Viren von einer infizierten Zelle zur benachbarten Zelle deutlich erschwert. Dies macht große infizierte Bereiche in der Dermis unwahrscheinlicher.

Der primäre Infektionsnachweis in epidermalen Keratinozyten zeigt wiederum die Notwendigkeit der Trennung beider Schichten des Modells auf. Dadurch kann die Dermis mit einem geringeren Anteil infizierter Zellen von der Epidermis getrennt werden. Die nachgewiesenen pockenviralen DNA-Äquivalente in der Dermis stammen vermutlich entweder von extrazellulären Virionen, wie sie in der Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden konnten, oder von nicht vollständig getrennten Epidermisfragmenten, die an der Dermisfraktion verblieben. Zur Kontrolle der Trennung für nachfolgende Projekte wurde deshalb innerhalb einer, im Rahmen dieser Arbeit betreuten, Masterarbeit ein spezifischer Assay auf Basis des epidermalen Markers Laminin 5 etabliert.

Mit diesem Assay gegen die Epidermis-spezifische $\gamma 2$ -Untereinheit des Proteins können verbliebene Epidermisfragmente an der Dermis spezifisch nachgewiesen werden [198, 249, 250].

Die Lokalisation der infizierten Zellen und die produktive Virusreplikation konnten mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigt werden. In diesen wurden die infizierten Zellen vorwiegend in der basalen Keratinozytenschicht der Epidermis detektiert. Hierbei konnten in den Zellen Virusfabriken mit Viruspartikeln in unterschiedlichen Reifegraden nachgewiesen werden, wie sie für Pockenviren typisch sind [251]. In den Proben eines frühen Zeitpunktes zwei Tage nach Infektion waren dabei fast ausschließlich unreife Partikel- sogenannte *Crescents* - zu erkennen, während am späteren Zeitpunkt nach vier Tagen Infektion auch reife Partikel in den Virusfabriken detektiert wurden. Es konnte somit ein Fortschreiten der Virusmorphogenese gezeigt werden. Die Virusfabriken waren oftmals um elektronendichte Bereiche angeordnet, in denen vermutlich in Partikel zu verpackende Nukleinsäuren und Proteine angereichert werden. In einigen Bereichen konnten charakteristische, tubuläre Strukturen aus dem Cytoskelett nachgewiesen werden, welche für die Ausschleusung der Viren von Bedeutung sind und die Ausbreitung von Zelle zu Zelle unterstützen [252]. Darüber hinaus konnten insbesondere am späteren untersuchten Zeitpunkt auch reife extrazelluläre Viren (EVs) detektiert werden, welche sich zwischen den Zellen und insbesondere an der Grenze zur Dermis befanden. Diese trugen einen charakteristischen Saum aus Glykoproteinen (siehe Abschnitt 4.3), konnten aber nicht zweifelsfrei als doppelt-umhüllte EEVs definiert werden. Dies kann an der geringen Stabilität der äußeren Membran der Pockenviren liegen [253]. In der Dermis konnten neben den reifen, zellfreien Partikeln, welche die DNA-Signale in der Analytik ausgelöst haben könnten, keine infizierten Zellen nachgewiesen werden.

Die Infektiosität der gebildeten Partikel konnte sowohl in Zellhomogenaten als auch im Überstand nachgewiesen werden. Dabei war ein Anstieg der Zahl infektiöser Partikel bereits zum frühesten Untersuchungszeitpunkt nach zwei Tagen *p.i.* zu beobachten. In 2D-Kultur werden infektiöse Partikel innerhalb von 18-24 h gebildet und aus den Zellen geschleust [120]. Die Freisetzung infektiöser Partikel ins Medium war korrelierend mit den bereits diskutierten Nukleinsäure- und Proteindaten vier Tage nach Infektion am stärksten, wobei auch zu den folgenden Zeitpunkten noch neue infektiöse Partikel ins Medium freigesetzt wurden. Dabei war die Freisetzung von Probe zu Probe teils sehr verschieden. Dies kann an der unterschiedlichen Dicke der Äquivalente oder dem Kontakt von infizierten Bereichen zum Medium liegen. Die Viren im Überstand stammen vermutlich in erster Linie aus infizierten Zellen mit direktem Kontakt zum Medium. Hier ist eine direkte Freisetzung der Partikel in das Medium leichter möglich, da beispielsweise eine Diffusion der Virionen durch die Dermis bis an die Unterseite des dermalen Äquivalentes ins Medium in der Elektronenmikroskopie nicht beobachtet werden konnte.

Alles in allem war die komplette Infektionskette in Hautäquivalenten zu beobachten. Das generierte Hautmodell eignet sich somit für die Untersuchung einer produktiven Infektion mit Kuhpockenviren.

4.3. Vergleich des Infektionsverlaufs im Hautmodell mit 2D-Kultur

Obleich die Kuhpockenviren im Hautmodell wie in 2D-Kultur replizieren und alle Schritte in der Virusgenese in beiden Modellen durchlaufen werden, zeigten sich einige modellspezifische Unterschiede. Tabelle 35 zeigt den Vergleich beider Infektionsmodelle für Kuhpockenviren.

Tabelle 35: Vergleich der genutzten Infektionsmodelle für Kuhpockenviren basierend auf 2D- und 3D-Kultur epidermaler Keratinozyten

Kriterium	2D Kultivierung	3D Kultivierung
infektiöse Dosis für Infektion	0,01 bis 5 Viren / Zelle (MOI)	1 bis 100 Viren / Zelle
virale DNA (pro Zelle)	bis zu 10.000 Genomäquivalente	100 - 1.000 Genomäquivalente
virale RNA	bis zu 100 pro Kopie MYC-Referenzgen	bis zu 5 pro Kopie MYC-Referenzgen
gebildete infektiöse Partikel	hohe Menge viraler Partikel im Überstand	geringere Menge viraler Partikel im Überstand, Verbleib in Gewebe
Infektionsverlauf	Infektion und Lyse aller Zellen je nach MOI nach drei bis vier Tagen	auch nach langer Kultivierung nicht-infizierte Zellen, Virusfreisetzung über zehn Tage, Lyse der Zellen verzögert
hochregulierte virale Gene	CPXV125 (D8), CPXV170	CGF (VGF), CPXV010, CPXV187 (A49)
Morphologie reifer, extrazellulärer Partikel	zumeist einfach behüllte <i>mature virions</i> (MVs) mit glatter Oberfläche	extrazelluläre Virionen (EVs) mit charakteristischem Saum

Im 3D-Modell wurden deutlich höhere infektiöse Dosen eingesetzt, als für Versuche in 2D-Kultur üblich und etabliert. Dabei ist die Infektionsdosis durch die lokale Verletzung in 3D-Kultur sogar am Ort der primären Infektion noch höher als der theoretisch berechnete Wert, der alle im Hautäquivalent vorhandenen Zellen einbezieht. Trotzdem war die Zahl viraler Genomäquivalente und Transkripte pro Zelle zum Zeitpunkt der maximalen Infektion mindestens zehnfach geringer als in 2D-Kultur. Dies liegt vor allem daran, dass im Gegensatz zur vollständig infizierten 2D-Kultur in 3D-Kultur nicht alle Zellen zu infizieren waren. Des Weiteren lief die Replikation der Viren und die Bildung viraler Partikel im dreidimensionalen Modell zeitlich verzögert ab, wobei pro Zelle mutmaßlich auch weniger virale Nukleinsäuren und Partikel gebildet wurden, wie auch elektronenmikroskopische Untersuchungen suggerierten.

Die Weitergabe des Virus erfolgt im dreidimensionalen Gewebe fast ausschließlich von Zelle zu Zelle, was an den im Vergleich zur 2D-Kultur geringen Werten infektiöser Partikel im Überstand zu erkennen war.

Dieser Effekt spiegelte sich auch in einer geringer ausgeprägten Zellyse und Desintegration stark infizierter Zellen innerhalb des Gewebes, im Gegensatz zum starken cytopathischen Effekt in der 2D-Kultur, wider.

Für Orthopockenviren sind unterschiedliche Arten infektiöser Partikel beschrieben, welche für die Ausbreitung der Infektion verantwortlich sind. Während in 2D-Zellkultur vorrangig einfach umhüllte MVs durch Zellyse mit sichtbarem cytopathischen Effekt ins Medium freigesetzt werden und neue Zellen infizieren, werden im 3D-Gewebe vorrangig zweifach umhüllte EVs nach kontrollierter Exocytose über Aktinfilamente zu benachbarten nicht-infizierten Zellen transportiert. Im Organismus übernimmt die Freisetzung von stabilen MVs über Zellyse die Funktion der Infektion entlegener Körperregionen über den Blutstrom und der Weitergabe des Virus von Wirt zu Wirt. Die labilen EVs bedingen hingegen primär die Verbreitung des Virus innerhalb eines Gewebes [132-134]. Eine gewebeähnlichere Infektionsausbreitung sollte daher in diesem 3D-Modell besonders gut zu untersuchen sein, da die MVs bei der Virusweitergabe gegenüber 2D-Kulturen eine deutliche kleinere Rolle spielen.

Die virale Genexpression in beiden Modellen zeigte wiederum Unterschiede im zeitlichen Verlauf. So waren zum Zeitpunkt 18 h *p.i.* mit einer hohen infektiösen Dosis die am stärksten exprimierten Virusgene im 3D-Modell noch früh exprimierte Gene, während in 2D-Kultur der Großteil viraler Transkripte schon aus intermediär und spät exprimierten Genen bestand. Darüber hinaus war im 3D-Modell zu jedem Zeitpunkt eine Überlagerung von früh, intermediär und spät exprimierten Genen zu beobachten, was sich durch eine Mischung aus Zellen in unterschiedlichen Infektionsstadien erklären lässt. So waren zu jedem Zeitpunkt auch uninfizierte Zellen in der Kultur vorhanden, über die sich die Infektion, analog zu natürlichen Geweben, weiter ausbreitete. Deshalb waren in 3D-Kultur zu einem definierten Zeitpunkt frisch infizierte Zellen ebenso vorhanden wie stark infizierte Zellen am Ende des viralen Replikationszyklus. In 2D-Proben hingegen wiesen insbesondere bei hohen MOIs alle Zellen synchronisiert einen ähnlichen Status auf. Dies mag mit der einfacheren Zugänglichkeit der Zellen in 2D-Kultur für das Inokulat während der Primärinfektion zu tun haben, die sich vermutlich durch den festeren Zellverband in 3D-Kultur schon ganz am Anfang des Infektionsexperimentes unterscheidet, sodass ein Teil der Zellen in 3D-Kultur erst deutlich nach Inokulatzugabe infiziert werden kann.

Beim Quervergleich aller Bedingungen und Infektionszeiten zeigten sich allerdings nur fünf Unterschiede in der viralen Genexpression, welche rein modellbedingt verursacht wurden. Auffällig war hier vor allem das virale Gen CGF (VACV: VGF), welches in allen Quervergleichen in 3D-Kultur stärker exprimiert war als in 2D-Kultur. Bei diesem viralen EGF-Homolog handelt es sich um ein Protein, das über die spezifische Bindung an den zellulären EGF-Rezeptor die Proliferation von Zellen einleiten und Apoptose verhindern kann [207, 254].

Dies könnte vor allem bei der Weitergabe des Virus von Zelle zu Zelle ein wichtiger Signalprozess sein, der deshalb in 3D-Kultur präferiert für die Virusweitergabe genutzt wird und auch als Ansatzpunkt für die Hemmstoffversuche mit Gefitinib (siehe Abschnitt 4.5) diene.

Weiterhin war die Expression des Gens CPXV010 (VACV-Homolog: N2L) in den untersuchten 3D-Proben in allen Vergleichen zu 2D-Proben hochreguliert. Das Homolog aus Vacciniaviren wurde als nukleärer IRF3-Inhibitor beschrieben, welcher die angeborene Immunantwort moduliert [255]. Ebenso wurde für das weiterhin in 3D hochregulierte Gen CPXV187 (VACV-Homolog A49R) eine inhibitorische Wirkung auf das Immunsystem in Form einer Hemmung von NF- κ B gezeigt [256]. Weitere immunmodulatorische Gene waren zwischen beiden Infektionsmodellen hingegen unreguliert, was nicht zuletzt durch das Fehlen der Immunzellen verursacht sein dürfte. In 2D-Kultur waren einzig das virale Membranprotein CPXV125 (VACV: D8 [257]) und das bisher in seiner Funktion unerforschte CPXV170 in allen Vergleichen zu 3D hochreguliert.

Ein deutlicher Unterschied beider Modelle ergab sich hingegen bei der Partikelbeschaffenheit der produzierten Viruspartikel. So konnte in den infizierten Hautäquivalenten von verschiedenen Ansätzen ein charakteristischer Saum aus vermutlich Glykoproteinen (Michael Laue, persönliche Mitteilung) auf der Oberfläche viraler Partikel in der Elektronenmikroskopie detektiert werden. Dieser trat in Partikeln verschiedener 2D-Kultivierungen und des genutzten Inokulats nicht auf. Interessanterweise wurde der Partikel-Saum auch nicht in infizierten Bereichen anderer 3D-Modelle von Keratinozyten ohne dermale Komponente auf Basis einer Trägermatrix (z. B. Perikard oder MatTek EPI-200) detektiert. In humanen Hautbiopsaten von Infektionsherden hingegen zeigte sich ein leichter Saum, welcher allerdings dort auch durch bindende Antikörper verursacht sein könnte. Die Ähnlichkeit zwischen 3D-Infektionsmodell und den Patientenproben suggeriert allerdings eine wirklichkeitsgetreue Abbildung des natürlichen Infektionsgeschehens. Die weitere Charakterisierung dieses Saumes könnte Aufschluss über die Konsistenz, eventuelle Herkunft, sowie die Bedeutung für die Infektion bringen. Eine spezifische Färbung über Lektine könnte das Vorhandensein von Glykoproteinen bestätigen und möglicherweise die Art der Glykosilierung bestimmen. Des Weiteren könnte überprüft werden, ob die Kohlenhydrate auf der Virusoberfläche hauptsächlich aus dermalen Matrix oder Fibroblasten stammen, wie die bisher generierten Daten suggerieren. Ein mögliches virales Protein, welches die Glykosilierung trägt, könnte CPXV168 (VACV: A33) sein. Dieses zeigte im Western Blot aller Proben eine charakteristische Bandenverschiebung von etwa 25 auf 35 kDa in 3D-Kultur gegenüber 2D-Kultur. Das Protein besitzt laut eigenen *in silico*-Analysen zwölf verschiedene putative N- und O-Glykosilierungsstellen, welche die Bandenverschiebung erklären könnten. In 3D-Kultur könnte das veränderte Glykosilierungsmuster auf der Virusoberfläche die Infektion neuer Wirtszellen, z. B. über verbesserte Adhäsion, begünstigen, was in 2D-Kultur aufgrund der einfacheren Zugänglichkeit nicht unbedingt notwendig ist.

Ein Nachweis unterschiedlicher Glykosilierungsmuster im Modellvergleich für dieses und weitere Proteine könnte über den Einsatz massenspektrometrischer Verfahren geführt werden, wobei die benötigten Proteinmengen und –reinheiten für die Aufarbeitung aus dem 3D-Modell derzeit noch eine Herausforderung darstellen können.

4.4. Einfluss der viralen Infektion auf zelluläre Gene

Neben den unterschiedlichen Verläufen der Infektion auf viraler Ebene im Vergleich beider Modelle, bietet das etablierte 3D-Modell auch neue Einsichten in die Interaktionen zwischen Virus und Wirtszelle auf Ebene der Regulation zellulärer Gene und Prozesse.

Eine Limitation ist dabei der unterschiedliche Infektionsstatus der aufgearbeiteten Zellen beider Modelle. In 2D-Experimenten wird zur Vermeidung von Inhomogenitäten oftmals mit hohen MOIs und geringen Infektionszeiten gearbeitet [142, 152]. In den 3D-Experimenten wurde hingegen mit möglichst stark infizierten Proben nach längeren Infektionszeiten gearbeitet. Trotzdem waren in 2D-Kultur bis zu 60 % der transkribierten RNAs viralen Ursprungs, während in 3D-Kultur der Anteil nur bis zu 10 % ausmachte. Dabei waren die Zellen in 3D-Kultur in ihrem Infektionsstatus recht inhomogen von nicht-infizierten Zellen über frisch infizierte Zellen bis zu Zellen mit reifen Partikeln. Diese Unterschiede machen die Detektion von schwächer regulierten Genen und Genen, die nur sehr kurzzeitig im Infektionsverlauf reguliert werden, deutlich schwieriger und unwahrscheinlicher.

Im Vorversuch im 3D-Modell konnte deshalb beispielsweise für den Transkriptionsfaktor EGR-1, welcher als Mitogen agiert, im Gegensatz zu verschiedenen Studien [152, 209] und eigenen Daten aus dem 2D-Modell primärer Keratinozyten keine signifikante Hochregulation der Genexpression durch die Infektion nachgewiesen werden. Dies kann zum einen an der geringeren Anzahl infizierter Zellen aber auch an der Überlagerung von Wundverschluss und Infektion im 3D-Modell liegen. EGR1 ist nämlich ein essentieller Faktor für die frühe Wundheilung [258], die durch die Verletzung der Äquivalente zur effizienten Infektion ausgelöst wird. Somit könnte EGR1 auch in den mock-infizierten, verletzten Kontrollen aktiviert werden, was das Signal der infektionsbedingten Hochregulation maskiert (siehe auch [198]).

Aufgrund der aufgezeigten Unterschiede der beiden Modelle und der Limitation einer zielgerichteten Expressionsanalyse wurde mit ausgewählten Proben infizierter epidermaler Keratinozyten aus 3D-Kultur eine umfassende Transkriptomanalytik auf Basis von RNA-Sequenzierung durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit denen aus 2D-Kulturen von primären Keratinozyten verglichen. Dies ist zurzeit die einzige Studie, welche (pockenvirale) Infektionsversuche in einem dreidimensionalen Hautmodell mit einer umfassenden Transkriptomanalyse kombiniert.

Hierbei waren im 3D-Modell zu den untersuchten Zeitpunkten etwa 4 % der zellulären Gene reguliert. Das war deutlich weniger als in 2D-Kontrollproben mit 7-30 % differenziell regulierten Genen. Hierzu mag einerseits die oben beschriebene geringere Zahl der infizierten Zellen im Verhältnis zum Hintergrund nicht infizierter Zellen beigetragen haben. Andererseits konnten auch Gene beobachtet werden, welche in mock-infizierten Kontrollen zwischen 3D- und 2D-Kultur schon stark reguliert waren, sodass deren Expression durch das Virus nur noch schwach beeinflusst wurde. Für einige Gene (z. B. FOS, CXCL8, EGR1) scheinen die Orthopockenviren in 2D-Kultur die Expression so zu regulieren, dass diese auf die Ebene der Expression von nicht-infizierten 3D-Kulturen gebracht wurde und somit näher den *in vivo* Bedingungen angepasst ist.

Die Ergebnisse aus der NGS-basierten Transkriptomanalyse korrelierten gut mit den Daten der Nachanalyse ausgewählter Gene in der qPCR. Dies konnte auch in vergleichbaren Studien gezeigt werden [259, 260]. Für bestimmte Gene konnte in der qPCR-Analytik keine statistische Signifikanz der Regulation gezeigt werden (z. B. KRT13, PSCA), was an der geringen Expressionsänderung von Faktor 2 liegen könnte, welche in der qPCR einer äußerst geringen Änderung von nur einem Ct-Wert entspricht. Die gute Korrelation von RNA-Sequenzierung und qPCR zeigt die passende Auswahl der Auswertemethode wie dem Alignierungs- und Quantifizierungsablauf für die Transkriptomanalyse und die Stabilität der vier zellulären Referenzgene MYC, GAPDH, TBP und B2M für die qPCR. Diese waren sowohl für den Vergleich innerhalb eines Modelles während der Infektion als auch für intra-Modell-Vergleiche anwendbar. Einige regulierte Gene wurden auf Proteinebene mithilfe von Western Blots und immunhistochemischen Färbungen erfolgreich verifiziert. Dies unterstreicht die biologische Relevanz dieser Genregulation. Die Auswahl der Gene für die Nachanalysen konzentrierte sich vor allem auf solche, die ausschließlich im 3D-Modell infektionsabhängig reguliert waren, aber nicht oder nur schwach in 2D-Kultur. Außerdem wurden einige interessante Gene detektiert, welche in allen Kulturformen und zu allen Zeitpunkten stark reguliert waren (z. B. FLNC, NR4A1, MEG3) und bisher nicht im Zusammenhang mit kuhpockenviral regulierter Genexpression beschrieben wurden.

Wesentlich durch die Virusinfektion beeinflusst waren in 3D-Kultur laut den durchgeführten *GO term*-Analysen die Zelldifferenzierung, die Proliferation, das Cytoskelett, die Zell-Zell-Adhärenz und Zell-Kommunikation, die Inflammation und Wundheilung sowie der Lipid-Metabolismus.

Differenzierung

Während der Infektion mit CPXV waren Gene der Differenzierung epidermaler Keratinozyten, beispielweise die Keratine 1 und 10, Filaggrin und Loricrin, zu verschiedenen Zeitpunkten herunterreguliert. Für ihre Replikation sind Orthopockenviren auf proliferierende Zellen angewiesen, während die Differenzierung von Zellen die Replikation hemmen kann.

Die Störung der Differenzierung humaner Zellen durch Orthopockenviren ist ein Mechanismus, der die Virusreplikation verstärkt. So wurde im Mausmodell und in Patienten gezeigt, dass eine physiologische Expression von Filaggrin die Ausbreitung des Virus behindert, wohingegen Defekte im Filaggrin-Gen die Virusreplikation und damit z. B. die *Eczema vaccinatum* als Nebenwirkung der Pockenimpfung verstärken [261-263]. Eine Beeinflussung der Expression verschiedener Differenzierungsgene durch die Infektion konnte auch in Proben eines Patienten mit einer Molluscum-contagiosum-Infektion gezeigt werden [264].

Proliferation

Obleich Pockenviren eine eigene Transkriptionsmaschinerie mitbringen und damit auch potenziell in ruhenden Zellen replizieren könnten, begünstigt doch die Proliferation der Wirtszelle die Virusreplikation. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass T-Zellen im Ruhezustand nicht mit VACV infizierbar sind, wohingegen im aktivierten Zustand mit Expression eines spezifischen Rezeptors eine Infektion der Zellen möglich ist [265].

Insbesondere am frühen Zeitpunkt 18 h *p.i.* waren zelluläre Gene für Transkription und Translation in den infizierten Proben hochreguliert. Auch auf Proteinebene konnte gezeigt werden, dass infizierte Zellen oftmals positiv für den Proliferationsmarker Ki-67 waren, obwohl eine Hochregulation der Expression von Ki-67 auf Transkriptebene nicht gezeigt werden konnte. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die Expressionsänderung zu gering ist oder sich nur auf den frisch infizierten Teil der Zellen beschränkt. Weiterhin könnte die Abundanz von Ki-67 nicht direkt von den Kuhpockenviren beeinflusst werden, sondern lediglich bevorzugt Ki-67-positive Zellen infiziert werden. Es ist allerdings auch bekannt, dass Orthopockenviren in Tiermodellen die Proliferation von Hautzellen aktiv anregen können, sodass es zu einer schnelleren Erneuerung des Gewebes kommt [266].

Die Stimulation der Proliferation konnte über die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors gezeigt werden. Hierbei waren vor allem Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu infizierten Zellen pEGFR-positiv. Pockenviren können über das Protein CGF (VACV-Homolog: VGF) insbesondere in 3D-Umgebung spezifisch den vom Rezeptor gesteuerten MAPK-ERK-Signalweg aktivieren [267]. Dadurch werden die benachbarten Zellen aktiviert und auf die bevorstehende Produktion viraler Partikel programmiert [209, 254]. Die Hochregulation von CGF konnte im 3D-Hautmodell ebenso gezeigt werden (siehe Abschnitt 4.3.) und bedingte im späteren Hemmstoffversuch wesentlich die Wirksamkeit von Gefitinib (siehe Abschnitt 4.5.).

Cytoskelett

Sowohl bei der primären Infektion neuer Zellen über Macropinocytose, der anschließenden Internalisierung als auch bei der Freisetzung viraler Partikel an die Zelloberfläche über Exocytose spielt das Cytoskelett aus Mikrotubuli und Aktinfilamenten eine wichtige Rolle. Orthopockenviren besitzen verschiedenste Mechanismen, um dieses für ihre Zwecke umzumodellieren und damit die Virusausbreitung zu optimieren [134, 268]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit β -3 Tubulin ein bisher nicht beschriebenes Protein charakterisiert werden, welches für die pockenvirale Replikation im Hautmodell von Bedeutung ist. In infizierten 3D-Proben war das Protein gegenüber den Kontrollen sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene hochreguliert. Als Bestandteil der Mikrotubuli ist TUBB3 vor allem in Neuronen in Zusammenhang mit neuronalen Erkrankungen beschrieben [269]. Es konnte gezeigt werden, dass TUBB3-reiche Mikrotubuli dynamischer sind als TUBB3-arme [270]. Dies könnte für die Infektionsausbreitung von Vorteil sein. In der Haut konnte TUBB3 als Marker für die Alterung beschrieben werden [271]. Insbesondere in Melanozyten scheint das Tubulin eine Rolle zu spielen und könnte dabei die Weitergabe von Melanosomen an Keratinozyten vermitteln [272]. Es wäre möglich, dass das Virus gezielt diesen zellulären Weitergabemechanismus für die Verbreitung nutzt. Die Hochregulation der TUBB3-Expression könnte über den K-Ras-Signalweg als Teil des bereits diskutierten MAPK-ERK-Signalweges erfolgen, wie in Tumorpatienten gezeigt werden konnte [273]. Der Signalweg kann ebenso von Pockenviren, z. B. über die Sekretion von CGF, stimuliert werden. Zur weiteren, funktionellen Charakterisierung im Kontext kuhpockenviraler Infektionen könnten Studien mit TUBB3-*Knockout*-Zellen, idealerweise im 3D-Modell, anschließen. Hierbei könnte der Einfluss einer Herunterregulation von TUBB3 auf die pockenvirale Infektion untersucht werden. Des Weiteren könnten TUBB3- oder Mikrotubuli-inhibierende Substanzen wie Podophyllotoxin [274], Docetaxel [275], Nocodazol oder Colchicin [276] getestet werden, welche in einem *Off-Label-Use* anti-pockenvirale Aktivität zeigen könnten und somit eventuell die Liste der Hemmstoffe gegen die Infektion erweitern könnten.

Neben TUBB3 war auch Filamin-C unter den während der Infektion stark hochregulierten Genen. Die Filamine sind für die Quervernetzung von Aktinfilamenten im Cytoplasma zuständig und verankern Membranproteine im Aktin-Cytoskelett [277]. Die verstärkte Expression des Gens während der Infektion trat sowohl in 2D- als auch in 3D-Kultur epidermaler Keratinozyten auf und ist so bisher nicht beschrieben. FLNC könnte, wie TUBB3 oder das ebenso stark hochregulierte XIRP1, am Umbau des Cytoskeletts zur verstärkten Virusreplikation entscheidend beteiligt sein.

Neben den Proteinen der Mikrotubuli und der Aktinfilamente waren auch Proteine des Keratinnetzwerks der Haut während der Infektion reguliert.

Keratin 8 ist ein Beispiel für ein Gen, das ausschließlich im 3D-Modell während der Infektion stark hochreguliert war. Dahingegen war es in 2D-Kultur nicht reguliert. Keratin 8 spielt in Kombination mit Keratin 18 eine Rolle in der Erhaltung zellulärer Strukturintegrität und ist ebenso in die Signaltransduktion und die Differenzierung involviert [278].

Ein weiterhin während der Infektion distinkt reguliertes, cytoskelettales Protein war γ -Synuclein. Die SNCG-Gen- und Proteinexpression war in 2D-Kultur sehr schwach und unterhalb der Detektionsgrenze. In 3D-Kultur hingegen zeigte sich im Verlauf der Infektion zum frühen Zeitpunkt eine deutliche Hochregulation von SNCG und anschließend eine leichte Herunterregulation zum späten Zeitpunkt. Das Protein konnte innerhalb der Epidermis in der verhornenden obersten Schicht des *Stratum granulosum* lokalisiert werden und somit als möglicher Differenzierungsmarker charakterisiert werden. SNCG ist zwar primär in Zusammenhang mit Neuronen und deren Filamenten beschrieben, könnte in der Haut aber auch an der Modellierung des Keratin-Netzwerkes beteiligt sein [279]. So könnte es zu einem frühen Zeitpunkt nach Infektion vom Virus zur Modellierung des Netzwerkes zum Zwecke der viralen Replikation hochreguliert werden, während am späteren Zeitpunkt die Modellierung unterdrückt werden könnte, um eine Interferenz der Keratine mit reifen Viren zu unterbinden. Darüber hinaus könnte SNCG auch in die schon beschriebene virale Beeinflussung des MAPK-ERK-Signalweges involviert sein [280], um die Apoptose infizierter Zellen zu unterdrücken und so die Virusreplikation zu unterstützen. Auch in den Versuchen dieser Arbeit konnte keine Induktion der Apoptose durch die Infektion in 3D-Kultur nachgewiesen werden. Die Rolle des SNCG-Proteins für die Infektion mit Orthopockenviren könnte in Patientenproben und in *Knockout*-Versuchen näher charakterisiert werden.

Zell-Zell-Adhärenz

Neben dem Einfluss auf das Cytoskelett und Keratinnetzwerk einzelner Zellen zeigten sich während der Infektion auch Einflüsse des Virus auf die Zell-Zell-Kontakte und deren Kommunikation. So waren die Gene für Desmocollin-1 und Desmoglein-1 insbesondere am frühen Zeitpunkt nach Infektion herunterreguliert, was für DSC1 auch auf Proteinebene bestätigt werden konnte. Das Protein ist insbesondere am Aufbau der, elektronenmikroskopisch nachgewiesenen und während der Infektion weniger prominent aufgetretenen, Desmosomen beteiligt und vermittelt die engen Zell-Zell-Kontakte, die die Widerstandsfähigkeit des Epithels bedingen [281]. Das Virus könnte sowohl im Zuge der Hemmung gerichteter Differenzierung als auch zum Zwecke der einfacheren Verbreitung in weniger widerstandsfähigen Zellen diese Interaktionen inhibieren. Interessanterweise konnte in 2D-Kultur zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion eine Rekrutierung von DSC1 in infizierte Bereiche innerhalb der Zelle immunhistochemisch nachgewiesen werden.

Da im Western Blot aufgrund der zu geringen DSC1-Mengen keine Quantifizierung vorgenommen werden konnte und in der qPCR und Transkriptomanalyse keine Regulation von DSC1 während der Infektion detektiert werden konnte, könnte es sich hierbei um ein Färbeartefakt handeln. Über die Nutzung eines anderen Antikörpers mit einer anderen Bindungsdomäne könnte geklärt werden, ob DSC1 in 2D-Kultur wirklich zu Virusfabriken rekrutiert wird oder ob es sich etwa um die unspezifische Färbung eines viralen Moleküls mit einem homologen Sequenzabschnitt handelt.

Zell-Zell-Kommunikation und –Signalweitergabe

Die Infektion mit CPXV beeinflusste die zelluläre Kommunikation. So war der JAK-STAT-Signalweg in stark infizierten 3D-Kulturen und in 2D-Kultur während der Infektion gegenüber den mock-infizierten Kontrollen positiv reguliert. Die Induktion dieses Signalweges ist für verschiedene Viren, darunter auch Orthopockenviren, beschrieben und erfolgt über die Freisetzung von Interferonen [282]. Da die Signalkaskade zu einer Expression von Genen führen kann, die zelluläre Immunität oder Apoptose bewirken, haben die Viren verschiedene Strategien entwickelt, den Signalweg zu umgehen. Bei Orthopockenviren geschieht dies beispielweise über die Sekretion von Interferon-*Decoy*-Rezeptoren oder die Blockierung der STAT-Phosphorylierung im späteren Signalweg [283], um so eine Inflammation und Immunantwort zu umgehen. Auch in den 3D-Versuchen dieser Arbeit konnte keine durch die Infektion induzierte Apoptose der Zellen auf Ebene von cPARP, PUMA und freier DNA mittels TUNEL-Assay nachgewiesen werden. Dies könnte ein weiteres Indiz für die in der Literatur beschriebene Umgehung der Apoptose-Signalwege durch Kuhpockenviren sein [151].

Ein wichtiges Oberflächenmolekül, welches der Zell-Zell-Kommunikation dient, ist Integrin β -1. Für diesen Adhäsionsrezeptor konnte zwar keine Änderung der Expression gezeigt werden, allerdings wurde das Molekül in 3D-Kultur deutlich stärker und polarisiert in basalen Keratinozyten exprimiert. Da VACV Integrin β -1 und die dadurch vermittelte Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges für den Zelleintritt benötigt [284], könnte die gerichtete Expression dieses Moleküls im 3D-Modell auch die beschriebene Präferenz der Viren für die Nutzung basaler Keratinozyten zur primären Infektion bedingen. Weitergehende Tests mit spezifischen Integrin-Inhibitoren wie Obtustatin oder RGDS-Peptiden [285, 286] könnten die Funktion des Integrins im 3D-Modell weiter klären und eventuell einen weiteren interessanten Ansatz zur Entwicklung neuer Therapien bieten.

Inflammation und Wundverschluss

Die Infektion mit CPXV hatte im 3D-Modell auch Auswirkungen auf Inflammation und Wundverschluss.

Dabei überlagert sich in diesem Modell das von der Infektion verursachte inflammatorische Signal mit jenem, was durch die Verletzung des Epithels mit anschließender Wundheilung verursacht wird. Durch die nötige Verletzung der Oberfläche wird an den Einstichstellen ein Wundverschlussverhalten induziert, welches in immunhistochemischen Färbungen nachgewiesen werden konnte. Diese Reaktion unterstreicht nochmals das gewebeartige Verhalten der Zellen in den Äquivalenten.

Um die ausschließlich durch die Infektion verursachten Veränderungen in den Wirtszellen zu identifizieren, wurden auch die Kontrollproben mittels 15 Stichen reproduzierbar verletzt. Somit konnten auch Interaktionen zwischen Virus sowie Inflammation und Wundheilung untersucht werden, wie sie physiologisch bei Infektionen über Hautverletzungen auftreten.

Ein Beispiel für ein durch die Infektion in epidermalen Keratinozyten stimuliertes, sowohl pro- als auch anti-inflammatorisches, Zytokin ist Interleukin-6. Das Zytokin war in 2D- und 3D-Kultur der Keratinozyten während der Infektion hochreguliert und ist in die Reaktion in der akuten Phase der Inflammation viraler Infektionen als B-Zell stimulierender Faktor involviert [287].

Als Regulator in inflammatorischen Prozessen und während der Apoptose dient das in allen untersuchten Infektionsbedingungen jeweils mit am stärksten hochregulierte Gen NR4A1 (NUR77). Dieser nukleäre Rezeptor ist als Transkriptionsfaktor insbesondere in Makrophagen wesentlich am Schicksal der betreffenden Zellen beteiligt, wobei NR4A1 sowohl pro- als auch anti-apoptotisch wirken kann [288]. Damit könnte auch NR4A1 an der Modulation der Apoptose durch Kuhpockenviren beteiligt sein. Insbesondere in 2D-Kultur konnte eine Rekrutierung des Proteins zu mutmaßlichen Virusfabriken gezeigt werden, wo es weiterhin auch die virale Replikation oder Genexpression unterstützen könnte. Detailliertere Versuche in 2D- und 3D-Kultur könnten genaueren Aufschluss zur Funktion des Proteins während der Infektion geben.

Interessanterweise konnten mit den Genen MEG3 und MEG9 auch zwei nicht-codierende RNAs als während der Infektion reguliert identifiziert werden. MEG3 kann das Tumorsuppressorgen p53 aktivieren und über TGF- β 1 stimulierte Zellproliferation in einer möglichen Feedbackschleife hemmen und apoptotisch wirken [289, 290]. Die starke Expression von MEG3 könnte dabei ein Versuch des Virus sein, die Immunantwort über TGF- β 1 zu unterdrücken. Dies wurde bereits vorher für VACV-infizierte Keratinozyten beschrieben [291].

Mit dem Wundverschluss direkt assoziierte Gene waren hingegen insbesondere an den frühen Zeitpunkten in infizierten Proben herunterreguliert. So war das Gen für PTGS2 kurz nach dem Einstich in infizierten Proben gegenüber mock-infizierten Proben stark herunterreguliert, was eine verzögerte Wundheilung während der Infektion bedingen könnte. Die Induktion von PTGS2 spielt eine zentrale Rolle bei der frühen Wundheilung, wie in Hautverletzungen im Rattenmodell nachgewiesen werden konnte [292].

Auch Interleukin-24, welches als Zytokin in der Wundheilung die TGF- α -induzierte Proliferation und Migration von Keratinozyten spezifisch hemmen kann und so zur Inflammation beiträgt [293], war an den frühen Zeitpunkten herunterreguliert. Ein am Wundverschluss beteiligtes Keratin könnte Keratin 2 sein, dessen Expression am frühen Expressionszeitpunkt im 3D-Modell herunterreguliert war. Dieses Keratin konnte in den verletzten Epithelien direkt an den neu entstandenen Rissstellen detektiert werden, wo es durch die aktivierten Zellen sezerniert wird. Für Läsionen und Tumoren konnte die Regulation der Keratin 2-Expression bereits gezeigt werden [294].

Die Herunterregulation der Wundheilungsgene in den infizierten Zellen verlangsamt die Wundheilung, was die Gefahr von bakteriellen Sekundärinfektionen, wie sie in Patienten vorkommen [295], erhöhen könnte. Der langsamere Heilungsverlauf könnte zu einem längerfristigen Wundheilungsprozess unter Proliferation von Zellen und Inhibition der normalen Differenzierung führen. Die wiederum könnte die Verbreitung des Virus im Zellverband fördern, wie an den relativ ungeordneten, infizierten Zellbereichen ohne klare Differenzierung in den Proben der späteren Infektionszeitpunkte zu sehen war.

Lipid-Metabolismus

Der Lipid-Metabolismus war ebenso während der Infektion im 3D-Modell reguliert. Neben der beschriebenen Prostaglandin-Synthase PTGS2 waren auch Gene wie die Arylamid-Deacetylase AADAC oder die Fettsäure-Translokase CD36 durch die Infektion distinkt reguliert. Kuhpockenviren benötigen diverse Lipide zum Partikelbau und umgeben sich insbesondere für die Zell-Zell-Weitergabe im Gewebe mit bis zu drei Lipidschichten [296]. Für die Replikation benötigt z. B. VACV eine spezifische Fettsäurezusammensetzung, welche unter anderem in *De-novo*-Synthesen gebildet werden [297].

Darum ist zu erwarten, dass Pockenviren den Fettstoffwechsel so manipulieren können, dass der Aufbau viraler Partikel gefördert wird. Dies macht den Lipid-Metabolismus in zukünftigen Versuchen zu einem interessanten Zielprozess zur detaillierteren Erforschung der Pathogenese und zur Hemmstoffentwicklung in physiologischen 3D-Modellen.

4.5. Inhibitionsstudien im Hautmodell

Als *Proof of Concept* wurde das etablierte Hautmodell benutzt, um Hemmstoffstudien mit Kuhpockenviren durchzuführen. Der Inhibitor Cidofovir zeigte im Modell dabei eine gute Wirksamkeit gegen die virale Infektion (Daten nicht gezeigt). Dies wurde bereits vorher in der Literatur für 3D-Hautmodelle mit VACV gezeigt [185].

Die Virusinfektion unterscheidet sich im Modell gegenüber der 2D-Kultur vor allem durch die verstärkte Weitergabe des Virus innerhalb des Zellverbandes des Gewebes ohne Beteiligung des umliegenden Zellkulturmediums. Weiterhin wurde bei der Analyse der regulierten Gene gezeigt, dass die EGFR-Phosphorylierung als Rezeptor des MAPK-ERK-Signalweges in 3D-Kultur mutmaßlich auch über die verstärkte Sekretion des viralen EGF-Homologs CGF hochreguliert wird.

Zur Inhibition dieses Signalweges wurde die Substanz Gefitinib eingesetzt, welche spezifisch und selektiv die ATP-Bindestelle des EGFR bindet und damit den Signalweg inhibiert. Gefitinib zeigte in HeLa-Zellen in 2D-Kultur bereits einen inhibierenden Effekt auf die Infektion mit CPXV [154]. Der inhibierende Effekt konnte auch im Rahmen dieser Doktorarbeit für Keratinozyten in 2D- und 3D-Kultur gezeigt werden. Dabei zeigte der Inhibitor in 3D-Kultur eine um mindestens Faktor 10 geringere IC_{50} als in 2D-Kultur. Die Infektion konnte also in epidermalen Keratinozyten des 3D-Modells mit deutlich geringeren Konzentrationen an Gefitinib inhibiert werden. Des Weiteren lag die wirksame Hemmstoffkonzentration im 3D-Modell auch deutlicher unter der Konzentration von etwa 25 μ M, ab welcher cytotoxische Effekte wie eine Herunterregulation der Expression zellulärer Referenzgene und des Proliferationsmarkers Ki-67 beobachtet wurden [154, 298]. Somit konnte gezeigt werden, dass die Infektion in den 3D-Hautäquivalenten spezifischer und damit mit geringeren Konzentrationen an Gefitinib inhibiert werden kann. Dies ist deshalb bemerkenswert, weil sich laut Literatur Zellen in 3D-Modellen oftmals als widerstandsfähiger gegen den Einfluss inhibitorischer Substanzen erwiesen als die einfacher zugänglichen Zellen in 2D-Kultur [19, 21]. In einem Perikard-basierten 3D-Modell konnte ebenso die höhere Spezifität und Sensitivität der Infektion mit CPXV gegenüber Gefitinib gezeigt werden [298].

Ein Grund der höheren Wirksamkeit in 3D-Kultur könnte in der Wirkungsweise des Hemmstoffes Gefitinib liegen. Die Substanz blockiert über die Anlagerung an den zellulären EGFR-Rezeptor spezifisch die anti-apoptotische, proliferative Wirkung des MAPK-ERK-Signalweges [299]. Dieser wird von den Viren zur Stimulation der neu zu infizierenden Zellen benötigt und deshalb über das virale EGF-Homolog CGF so initiiert, dass die Zellen in einen proliferativen, die Virusreplikation begünstigenden Zustand gebracht werden [300]. In 3D-Kultur wurde deshalb deutlich mehr CGF transkribiert als in 2D-Kultur. Die Zellen in 2D-Kultur sind *per se* deutlich proliferativer, wodurch das Virus vermutlich keine zusätzliche Stimulation der Zellen für die Infektion benötigt, wie in 3D-Kultur. Des Weiteren unterschied sich die Phosphorylierung des EGFR in beiden Zellkultursystemen grundlegend. Während in den mock-infizierten Kontrollen in 3D-Kultur stärkere pEGFR-Signale zu finden waren, konnte in mock-infizierten Zellen aus 2D-Kultur keine vergleichbare Stimulation gezeigt werden. Ein Faktor für diesen Umstand mag die, für die Infektion in 3D-Kultur nötige, Verletzung der Hautäquivalente sein, durch welche ebenso die Proliferation von Zellen (z. B. über den EGFR) während des Wundverschlusses angeregt werden kann [301].

Auch in den infizierten Proben unter Gefitinib-Hemmung unterschied sich die Phosphorylierung. Während in 3D-Kultur die Phosphorylierung konzentrationsabhängig nahezu komplett inhibiert wurde und keine Infektion mehr nachweisbar war, zeigten Zellen in 2D-Kultur auch unter hochkonzentrierter Gefitinib-Behandlung in den noch vorhandenen infizierten Bereichen eine starke Rezeptor-Phosphorylierung. Die infizierten Zellen scheinen also trotz des Einsatzes von Gefitinib nicht an der EGFR-Phosphorylierung gehindert zu werden, was an anderen Stimulationsmechanismen oder einer autokrinen Rezeptorphosphorylierung einmal infizierter Zellen in 2D-Kultur liegen könnte. Die Primärinfektion von Zellen aus dem Inokulat scheint in 2D-Kultur nicht beeinflusst zu sein. Dies konnte an der konstanten Anzahl an Plaques gezeigt werden, deren Durchmesser aber kleiner wurde.

Gefitinib wurde in beiden Versuchen mit Beginn der Infektion eingesetzt und nicht prospektiv, wie in anderen Medikamentenstudien üblich. Die schnelle, gute Wirksamkeit im gewebeähnlichen Modell suggeriert, dass Gefitinib schon früh die virale Replikation inhibiert und eventuell über die Herunterregulation der Proliferation in die, in 3D-Kultur verlängerte, Primärinfektion eingreifen kann.

Aufgrund dieser schnellen Wirksamkeit könnte sich die Substanz deshalb auch zur Anwendung am Patienten eignen. Bisher zur Verfügung stehende experimentelle Inhibitoren pockenviraler Infektionen wie Cidofovir oder Tecovirimat zeigen in Patienten nach Applikation Nachteile, wie eine geringe Aufnahme in die Zellen oder das Entstehen von resistenten Mutanten [302, 303]. Darüber hinaus sind für Cidofovir Nebenwirkungen, wie eine starke Nephrotoxizität, bekannt [304].

Gefitinib ist für die Behandlung von Tumoren bereits von der FDA zugelassen. Es könnte möglicherweise in so geringen Dosen zur Behandlung von orthopockenviralen Infektionen eingesetzt werden, dass für Patienten nur geringe Nebenwirkungen zu erwarten sind. Außerdem hätte Gefitinib den Vorteil, dass es durch die gezeigte leichte Diffusion über die Haut lokal begrenzt, z. B. über die Applikation als Creme, eingesetzt werden könnte. Dadurch könnten die oftmals selbstlimitierenden Läsionen zoonotischer Pockenvirusinfektionen effektiv am Ort der Virusinfektion bekämpft werden, ohne systemische Nebenwirkungen zu induzieren. Zur Bestätigung der Wirksamkeit auch im Gesamtorganismus könnten Tierversuche und klinische Studien mit Gefitinib angeschlossen werden, wobei durch den *Off-Label*-Charakter der Substanz kostenintensive Schritte zur Aufdeckung von möglichen Nebenwirkungen wegfallen könnten und der Zulassungsprozess verkürzt werden könnte.

In diesem Pilotversuch konnte die Nutzbarkeit des etablierten Infektionsmodells für die Hemmstoffforschung gezeigt werden. Weiterhin konnte die, gegenüber 2D-Zellkultur bessere, Wirksamkeit der Substanz Gefitinib in einem physiologisch relevanteren Modell gezeigt werden. Dies rechtfertigt die Nutzung komplexer Modelle, die in Zukunft zu einer Verbesserung, Verringerung und eventuell zum teilweisen Ersatz von Tierversuchen, wie in der 3R-Regel postuliert, führen kann.

5. Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein Infektionsmodell für Kuhpockenviren auf Basis humaner Hautäquivalente erfolgreich etabliert und mittels eines breiten etablierten Methodenspektrums getestet. Der Infektionsverlauf und der Einfluss der Infektion auf die Wirtszellen unterschieden sich dabei im 3D-Modell gegenüber Infektionsversuchen in 2D-Kultur. Das etablierte Infektionsmodell lieferte dabei wertvolle Mehrinformationen für die Erforschung von Kuhpockenviren. Durch die Differenzierung der Keratinozyten und die Bildung einer funktionierenden Hornschicht waren die Hautäquivalente erst mit höheren infektiösen Dosen zu infizieren, wobei die Infektion auch deutlich länger als in 2D-Kultur andauerte und damit den physiologischen Infektionsverlauf in der Haut von Patienten besser abbildete als klassische 2D-Kulturen.

Durch die Integration weiterer Zelltypen ins Modell wären sogar noch breitere Analysen zu Wirtszelltropismus und Pathogenese möglich. Es wäre so möglich, das Hautmodell durch die Integration von dendritischen Zellen, Makrophagen oder Melanozyten noch wirklichkeitsgetreuer aufzubauen. Eine Vaskularisierung oder die Integration von Stammzellen könnte zukünftig eine längere Kultivierungszeit und eine bessere Erneuerung der Äquivalente ermöglichen. Die kurze Kultivierungszeit ist neben der begrenzten Reproduzierbarkeit eine der Limitationen des jetzigen Aufbaus. Mit der Einführung von Hochdurchsatzverfahren zur Generierung von reproduzierbar hergestellten 3D-Modellen dürfte das Interesse für die Nutzung auch in der Infektionsforschung zunehmen. Die Anwendbarkeit solcher Modelle konnte exemplarisch während dieser Arbeit anhand des differenzierten Epidermis-Modells der Firma MatTek gezeigt werden. Dieses lieferte in Infektionsversuchen ähnliche Ergebnisse wie das selbst aufgebaute *full-thickness*-Modell und war durch die leichtere Zugänglichkeit der basalen Zellen über das Medium potenziell reproduzierbarer über das Zellkulturmedium ohne Verletzung der Hornschicht zu infizieren.

In dieser Arbeit wurde mit einem rekombinanten, vom Isolat *Brighton Red* abgeleiteten Virus gearbeitet. Es wurden aber bereits andere Isolate von Kuhpocken-, Vaccinia- und Kamelpockenviren auf Hautmodellen getestet [174]. Auch für die Testung anderer Viren könnte das Hautmodell interessant sein. So wurde in eigenen Vorversuchen in diesem Modell die Replikationsfähigkeit von Zikaviren als Vertreter der Flaviviren untersucht. Die Viren, die neben schweren Embryoschädigungen auch Entzündungen auf der Haut hervorrufen können [305], zeigten dabei einen Tropismus insbesondere für dermale Fibroblasten und unterschieden sich damit von Kuhpockenviren, die vor allem basale Keratinozyten befielen. Das Modell eignet sich also auch für die Ermittlung der Zielzellen viraler Infektionen der Haut.

Die neue Kombination des dreidimensionalen Infektionsmodelles mit NGS-basierter Transkriptomanalytik ermöglichte neue Einsichten in die Virus-Wirts-Interaktionen und die Pathogenese von Kuhpockenviren. Dabei unterschied sich die zelluläre Antwort im 3D-Modell in einigen Punkten entscheidend von der in vergleichbarer 2D-Kultur. Insbesondere in Bezug auf die Zell-Zell-Weitergabe der Viren, die Modellierung von Cytoskelett und extrazellulärer Matrix, den Einfluss auf Wundheilung und Differenzierung sowie potenzielle Interaktionen mit dem Immunsystem, konnten mit Hilfe der durchgeführten Analytik im 3D-Modell neue Forschungsansätze gefunden werden. Hierbei stellt das Protein Tubulin β -3, dessen distinktes Expressionsprofil während der Infektion mit verschiedensten Methoden belegt werden konnte, im Besonderen ein interessantes Zielgen zur weiteren Analyse dar. Die Rolle von TUBB3 im Infektionsgeschehen könnte anhand von Inhibitionsstudien und *Knockdown*-Experimenten näher charakterisiert werden.

Des Weiteren könnten nach Etablierung passender Protokolle auch umfassende, vergleichende Untersuchungen auf Proteom-Ebene vorgenommen werden, um die Ergebnisse der Transkriptomanalysen zu vervollständigen und weitere mögliche, kuhpockenvirale Regulationsmechanismen zu identifizieren. Die Proteom-Analysen könnten auch helfen, die gefundenen, modellspezifischen Modifikationen viraler Proteine besser zu charakterisieren, um so die Viruspartikel auf molekularer Ebene besser beschreiben zu können und Rückschlüsse zur Situation *in vivo* schließen zu können. Dies scheint ausschließlich anhand von Versuchen in 2D-Kultur nicht möglich.

Für die Durchführung spezieller Analysen in infizierten Zellen des 3D-Gewebes wären die spezifische Isolation einzelner Zellen oder infizierter Bereiche sehr von Vorteil, da durch die bisher etablierte Aufarbeitung der gesamten Epidermis nicht-infizierte Zellen in die Analytik miteinbezogen werden müssen. Hierfür sind eventuell Methoden der Mikrodissektion anwendbar [306], wobei für potenziell infektiöse Proben spezielle Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden müssten. Des Weiteren könnte die Fluoreszenz infizierter, epithelialer Zellen nach Aufschluss und Vereinzelung genutzt werden, um diese per Durchflusszytometrie (FACS) zu selektieren. Dabei müsste auf die Integrität und Viabilität der Zellen geachtet werden [307], welche insbesondere bei stark infizierten Zellen durch die Enzym-Behandlung verloren gehen könnte.

Das Hautmodell ist darüber hinaus auch für Entwicklung und Charakterisierung neuer antiviraler Substanzen, zum Beispiel anhand von modellspezifisch-regulierten Prozessen, geeignet. So konnte für den Inhibitor Gefitinib, der den insbesondere im dreidimensionalen Gewebe zur Transmission des Virus von Zelle zu Zelle benötigten EGFR-Signalweg inhibiert, eine gute Wirksamkeit gezeigt werden. Interessanterweise konnte im 3D-Modell eine höhere Sensitivität der Infektion gegenüber Gefitinib gezeigt werden als in 2D-Versuchen.

Mithilfe des Hautmodelles konnte neben der Anwendbarkeit auch die mögliche Dosierung des Hemmstoffes eingegrenzt werden, welcher zum Beispiel im *Off-Label-Use* als lokal einzusetzende Creme gegen Orthopockenvirus-Infektionen getestet und validiert werden könnte. Der ermittelte Konzentrationsbereich könnte dabei wertvolle Zusatzinformationen für die Planung von Tierversuchen liefern, wie sie in 2D-Kultur nicht ermittelt werden können.

Mit β -3 Tubulin und Integrin β -1 wurden im 3D-Modell bereits interessante Zielproteine gefunden, welche für die Testung weiterer potenzieller Inhibitoren orthopockenviraler Infektionen geeignet sein könnten.

Generell ist mit 3D-Modellen beim jetzigen Forschungsstand zwar kein kompletter Verzicht auf Tierversuche zu erreichen, allerdings könnten Tierversuche durch verbesserte Vorergebnisse von *in vitro* Studien zu mindestens reduziert und in ihrer Durchführung durch bessere Kenntnis von Wirkstoffkonzentrationen und Nebenwirkungen im Vorhinein verbessert werden. Dies würde zwei der drei Forderungen der 3R-Regel abdecken.

Das etablierte Infektionsmodell humaner Hautäquivalente konnte neue Einsichten in die Replikation, Pathogenese und mögliche Inhibition von Kuhpockenviren liefern und erweitert so das Spektrum der Methoden in der Erforschung dieser humanpathogenen viralen Erreger.

6. Literaturverzeichnis

- [1] A. Abbott, "Cell culture: Biology's new dimension," *Nature*, vol. 424, no. 6951, pp. 870-872, Aug 21 2003.
- [2] M. Ravi, V. Paramesh, S. R. Kaviya, E. Anuradha, and F. D. P. Solomon, "3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 230, no. 1, pp. 16-26, Jan 2015.
- [3] R. Edmondson, J. J. Broglie, A. F. Adcock, and L. J. Yang, "Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors," *Assay and Drug Development Technologies*, vol. 12, no. 4, pp. 207-218, May 2014.
- [4] B. M. Baker and C. S. Chen, "Deconstructing the third dimension - how 3D culture microenvironments alter cellular cues," *Journal of Cell Science*, vol. 125, no. 13, pp. 3015-3024, Jul 1 2012.
- [5] A. R. Harris, L. Peter, J. Bellis, B. Baum, A. J. Kabla, and G. T. Charras, "Characterizing the mechanics of cultured cell monolayers," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, no. 41, pp. 16449-16454, Oct 9 2012.
- [6] K. M. Hakkinen, J. S. Harunaga, A. D. Doyle, and K. M. Yamada, "Direct Comparisons of the Morphology, Migration, Cell Adhesions, and Actin Cytoskeleton of Fibroblasts in Four Different Three-Dimensional Extracellular Matrices," *Tissue Engineering Part A*, vol. 17, no. 5-6, pp. 713-724, Mar 2011.
- [7] K. M. Yamada and E. Cukierman, "Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D," *Cell*, vol. 130, no. 4, pp. 601-610, Aug 24 2007.
- [8] F. Pampaloni, E. G. Reynaud, and E. H. K. Stelzer, "The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 8, no. 10, pp. 839-845, Oct 2007.
- [9] E. Cukierman, R. Pankov, D. R. Stevens, and K. M. Yamada, "Taking cell-matrix adhesions to the third dimension," *Science*, vol. 294, no. 5547, pp. 1708-1712, Nov 2001.
- [10] D. Antoni, H. Burckel, E. Josset, and G. Noel, "Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 16, no. 3, pp. 5517-5527, Mar 2015.
- [11] J. B. Kim, "Three-dimensional tissue culture models in cancer biology," *Seminars in Cancer Biology*, vol. 15, no. 5, pp. 365-377, Oct 2005.
- [12] T. Spitters *et al.*, "Glucose Gradients Influence Zonal Matrix Deposition in 3D Cartilage Constructs," *Tissue Engineering Part A*, vol. 20, no. 23-24, pp. 3270-3278, Dec 2014.
- [13] V. van Duinen, S. J. Trietsch, J. Joore, P. Vulto, and T. Hankemeier, "Microfluidic 3D cell culture: from tools to tissue models," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 35, pp. 118-126, Dec 2015.
- [14] Y. Imamura *et al.*, "Comparison of 2D-and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer," *Oncology Reports*, vol. 33, no. 4, pp. 1837-1843, Apr 2015.
- [15] P. Moreno-Layseca and C. H. Streuli, "Signalling pathways linking integrins with cell cycle progression," *Matrix Biology*, vol. 34, pp. 144-153, Feb 2014.
- [16] K. W. Ng, D. T. W. Leong, and D. W. Hutmacher, "The challenge to measure cell proliferation in two and three dimensions," *Tissue Engineering*, vol. 11, no. 1-2, pp. 182-191, Jan 2005.
- [17] K. E. Sung, X. J. Su, E. Berthier, C. Pehlke, A. Friedl, and D. J. Beebe, "Understanding the Impact of 2D and 3D Fibroblast Cultures on In Vitro Breast Cancer Models," *Plos One*, vol. 8, no. 10, Oct 2013.
- [18] A. C. Luca *et al.*, "Impact of the 3D Microenvironment on Phenotype, Gene Expression, and EGFR Inhibition of Colorectal Cancer Cell Lines," *Plos One*, vol. 8, no. 3, Mar 2013.
- [19] T. Sun, S. Jackson, J. W. Haycock, and S. MacNeil, "Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents," *Journal of Biotechnology*, vol. 122, no. 3, pp. 372-381, Apr 2006.

- [20] Y. H. Li *et al.*, "An approach to quantifying 3D responses of cells to extreme strain," *Scientific Reports*, vol. 6, Feb 2016.
- [21] X. Xu, M. C. Farach-Carson, and X. Q. Jia, "Three-dimensional in vitro tumor models for cancer research and drug evaluation," *Biotechnology Advances*, vol. 32, no. 7, pp. 1256-1268, Nov 2014.
- [22] K. Wrzesinski *et al.*, "The Cultural Divide: Exponential Growth in Classical 2D and Metabolic Equilibrium in 3D Environments," *Plos One*, vol. 9, no. 9, Sep 2014.
- [23] N. Gupta, J. R. Liu, B. Patel, D. E. Solomon, B. Vaidya, and V. Gupta, "Microfluidics-based 3D cell culture models: Utility in novel drug discovery and delivery research," *Bioengineering & Translational Medicine*, vol. 1, no. 1, pp. 63–81, Mar 2016.
- [24] G. Mehta, A. Y. Hsiao, M. Ingram, G. D. Luker, and S. Takayama, "Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy," *Journal of Controlled Release*, vol. 164, no. 2, pp. 192-204, Dec 2012.
- [25] N. Gomez-Roman, K. Stevenson, L. Gilmour, G. Hamilton, and A. J. Chalmers, "A novel 3D human glioblastoma cell culture system for modeling drug and radiation responses," in *Neuro Oncol/England*: Oxford University Press, 2016.
- [26] K. E. Sung *et al.*, "Control of 3-dimensional collagen matrix polymerization for reproducible human mammary fibroblast cell culture in microfluidic devices," *Biomaterials*, vol. 30, no. 27, pp. 4833-4841, Sep 2009.
- [27] B. W. Graf and S. A. Boppart, "Imaging and Analysis of Three-Dimensional Cell Culture Models," *Methods Mol Biol*, vol. 591, pp. 211-27, 2010.
- [28] M. Zanoni *et al.*, "3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained," *Scientific Reports*, vol. 6, Jan 2016.
- [29] J. W. Haycock, "3D cell culture: a review of current approaches and techniques," *Methods Mol Biol*, vol. 695, pp. 1-15, 2011.
- [30] U. Ritz, H. Gotz, A. Baranowski, F. Heid, P. M. Rommens, and A. Hofmann, "Influence of different calcium phosphate ceramics on growth and differentiation of cells in osteoblast-endothelial co-cultures," *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, Jun 13 2016.
- [31] K. Wolf *et al.*, "Collagen-based cell migration models in vitro and in vivo," *Seminars in Cell & Developmental Biology*, vol. 20, no. 8, pp. 931-941, Oct 2009.
- [32] L. Moller, A. Krause, J. Dahlmann, I. Gruh, A. Kirschning, and G. Drager, "Preparation and evaluation of hydrogel-composites from methacrylated hyaluronic acid, alginate, and gelatin for tissue engineering," *International Journal of Artificial Organs*, vol. 34, no. 2, pp. 93-102, Feb 2011.
- [33] B. Nicholas *et al.*, "A Novel Lung Explant Model for the Ex Vivo Study of Efficacy and Mechanisms of Anti-Influenza Drugs," *Journal of Immunology*, vol. 194, no. 12, pp. 6144-6154, Jun 15 2015.
- [34] M. A. Cipriani Frade *et al.*, "Prolonged viability of human organotypic skin explant in culture method (hOSEC)," *Anais Brasileiros De Dermatologia*, vol. 90, no. 3, pp. 347-350, May-Jun 2015.
- [35] M. Baker, "A living system on a chip," *Nature*, vol. 471, no. 7340, pp. 661-665, Mar 31 2011.
- [36] E.-M. Materne *et al.*, "The Multi-organ Chip - A Microfluidic Platform for Long-term Multi-tissue Coculture," *Journal of Visualized Experiments*, no. 98, Apr 2015.
- [37] R. Chang, K. Emami, H. Wu, and W. Sun, "Biofabrication of a three-dimensional liver micro-organ as an in vitro drug metabolism model," *Biofabrication*, vol. 2, no. 4, Dec 2010.
- [38] J. E. Nichols, J. A. Niles, S. P. Vega, L. B. Argueta, A. Eastaway, and J. Cortiella, "Modeling the lung: Design and development of tissue engineered macro- and micro-physiologic lung models for research use," *Experimental Biology and Medicine*, vol. 239, no. 9, pp. 1135-1169, Sep 2014.
- [39] B. Subramanian, D. Rudym, C. Cannizzaro, R. Perrone, J. Zhou, and D. L. Kaplan, "Tissue-Engineered Three-Dimensional In Vitro Models for Normal and Diseased Kidney," *Tissue Engineering Part A*, vol. 16, no. 9, pp. 2821-2831, Sep 2010.

- [40] V. I. Sikavitsas, G. N. Bancroft, and A. G. Mikos, "Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 62, no. 1, pp. 136-148, Oct 2002.
- [41] R. K. Birla, G. H. Borschel, R. G. Dennis, and D. L. Brown, "Myocardial engineering in vivo: Formation and characterization of contractile, vascularized three-dimensional cardiac tissue," *Tissue Engineering*, vol. 11, no. 5-6, pp. 803-813, May 2005.
- [42] T.-Y. Cheng, M.-H. Chen, W.-H. Chang, M.-Y. Huang, and T.-W. Wang, "Neural stem cells encapsulated in a functionalized self-assembling peptide hydrogel for brain tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 34, no. 8, pp. 2005-2016, Mar 2013.
- [43] F. Groeber, M. Holeiter, M. Hampel, S. Hinderer, and K. Schenke-Layland, "Skin tissue engineering - In vivo and in vitro applications," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 63, no. 4-5, pp. 352-366, Apr 30 2011.
- [44] S. Adler *et al.*, "Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010," *Archives of Toxicology*, vol. 85, no. 5, pp. 367-485, May 2011.
- [45] M. Liebsch *et al.*, "Alternatives to animal testing: current status and future perspectives," *Archives of Toxicology*, vol. 85, no. 8, pp. 841-858, Aug 2011.
- [46] J. Goodman, A. Chandna, and K. Roe, "Trends in animal use at US research facilities," *Journal of Medical Ethics*, vol. 41, no. 7, pp. 567-569, Jul 2015.
- [47] P. Flecknell, "Replacement, reduction and refinement," *Altex-Alternatives to Animal Experimentation*, Article; Proceedings Paper vol. 19, no. 2, pp. 73-78, 2002.
- [48] C. A. Nickerson, E. G. Richter, and C. M. Ott, "Studying host-pathogen interactions in 3-D: Organotypic models for infectious disease and drug development," *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, vol. 2, no. 1, pp. 26-31, Mar 2007.
- [49] J. Barrila *et al.*, "Organotypic 3D cell culture models: using the rotating wall vessel to study host-pathogen interactions," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 8, no. 11, pp. 791-801, Nov 2010.
- [50] G. Andrei, "Three-dimensional culture models for human viral diseases and antiviral drug development," *Antiviral Research*, vol. 71, no. 2-3, pp. 96-107, Sep 2006.
- [51] C. M. Chuong *et al.*, "What is the 'true' function of skin? Viewpoint 1," *Experimental Dermatology*, vol. 11, no. 2, pp. 159-163, Apr 2002.
- [52] E. Proksch, J. M. Brandner, and J. M. Jensen, "The skin: an indispensable barrier," *Experimental Dermatology*, vol. 17, no. 12, pp. 1063-1072, Dec 2008.
- [53] R. L. Gallo and L. V. Hooper, "Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine," *Nature Reviews Immunology*, vol. 12, no. 7, pp. 503-516, Jul 2012.
- [54] R. R. Wickett and M. O. Visscher, "Structure and function of the epidermal barrier," *American Journal of Infection Control*, vol. 34, no. 10, pp. S98-S110, Dec 2006.
- [55] H. Mertsching, M. Weimer, S. Kersen, and H. Brunner, "Human skin equivalent as an alternative to animal testing," *GMS Krankenhaushygiene interdisziplinär*, vol. 3, no. 1, p. 11, 2008.
- [56] J. Sandby-Moller, T. Poulsen, and H. C. Wulf, "Epidermal thickness at different body sites: Relationship to age, gender, pigmentation, blood content, skin type and smoking habits," *Acta Dermato-Venereologica*, vol. 83, no. 6, pp. 410-413, Nov 2003.
- [57] A. Haake, G. A. Scott, and K. A. Holbrook, "Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis," *The biology of the skin*, vol. 2001, pp. 19-45, 2001.
- [58] C. Blanpain and E. Fuchs, "Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 10, no. 3, pp. 207-U67, Mar 2009.
- [59] S. Werner, T. Krieg, and H. Smola, "Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 127, no. 5, pp. 998-1008, May 2007.
- [60] S. Peltonen, L. Raiko, and J. Peltonen, "Desmosomes in developing human epidermis," *Dermatology research and practice*, vol. 2010, pp. 698761-698761, 2010.

- [61] W. R. Heath and F. R. Carbone, "The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells," *Nature Immunology*, vol. 14, no. 10, pp. 978-985, Oct 2013.
- [62] K. R. Feingold and P. M. Elias, "Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier," *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1841, no. 3, pp. 280-294, Mar 2014.
- [63] S. Lippens, E. Hoste, P. Vandenabeele, P. Agostinis, and W. Declercq, "Cell death in the skin," *Apoptosis*, vol. 14, no. 4, pp. 549-569, Apr 2009.
- [64] E. Candi, R. Schmidt, and G. Melino, "The cornified envelope: A model of cell death in the skin," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 6, no. 4, pp. 328-340, Apr 2005.
- [65] A. Sandilands, C. Sutherland, A. D. Irvine, and W. H. I. McLean, "Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease," *Journal of Cell Science*, vol. 122, no. 9, pp. 1285-1294, May 2009.
- [66] L. H. Gu and P. A. Coulombe, "Keratin function in skin epithelia: a broadening palette with surprising shades," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 19, no. 1, pp. 13-23, Feb 2007.
- [67] R. Eichner, T. T. Sun, and U. Aebi, "The Role of Keratin Subfamilies and Keratin Pairs in the Formation of Human Epidermal Intermediate Filaments," *Journal of Cell Biology*, vol. 102, no. 5, pp. 1767-1777, May 1986.
- [68] R. Moll, M. Divo, and L. Langbein, "The human keratins: biology and pathology," *Histochemistry and Cell Biology*, vol. 129, no. 6, pp. 705-733, Jun 2008.
- [69] M. Heenen, S. Thiriar, J. C. Noel, and P. Galand, "Ki-67 immunostaining of normal human epidermis: comparison with 3H-thymidine labelling and PCNA immunostaining," *Dermatology*, vol. 197, no. 2, pp. 123-6, 1998.
- [70] K. Hitomi, "Transglutaminases in skin epidermis," *European Journal of Dermatology*, vol. 15, no. 5, pp. 313-319, Sep-Oct 2005.
- [71] E. Fuchs and S. Raghavan, "Getting under the skin of epidermal morphogenesis," *Nature Reviews Genetics*, vol. 3, no. 3, pp. 199-209, Mar 2002.
- [72] J. A. Segre, "Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 116, no. 5, pp. 1150-1158, May 2006.
- [73] E. Fuchs, "Scratching the surface of skin development," *Nature*, vol. 445, no. 7130, pp. 834-842, Feb 2007.
- [74] G. Solanas and S. A. Benitah, "Regenerating the skin: a task for the heterogeneous stem cell pool and surrounding niche," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 14, no. 11, pp. 737-748, Nov 2013.
- [75] Y. C. Hsu, L. S. Li, and E. Fuchs, "Emerging interactions between skin stem cells and their niches," *Nature Medicine*, vol. 20, no. 8, pp. 847-856, Aug 2014.
- [76] D. C. Blaydon and D. P. Kelsell, "Defective channels lead to an impaired skin barrier," *Journal of Cell Science*, vol. 127, no. 20, pp. 4343-4350, Oct 2014.
- [77] P. Ovaere, S. Lippens, P. Vandenabeele, and W. Declercq, "The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 34, no. 9, pp. 453-463, Sep 2009.
- [78] C. L. Tu, Y. Oda, L. Komuves, and D. D. Bikle, "The role of the calcium-sensing receptor in epidermal differentiation," *Cell Calcium*, vol. 35, no. 3, pp. 265-273, Mar 2004.
- [79] L. Micallef *et al.*, "Effects of extracellular calcium on the growth-differentiation switch in immortalized keratinocyte HaCaT cells compared with normal human keratinocytes," *Experimental Dermatology*, vol. 18, no. 2, pp. 143-151, Feb 2009.
- [80] R. L. Eckert and E. A. Rorke, "Molecular biology of keratinocyte differentiation," *Environmental Health Perspectives*, vol. 80, pp. 109-116, Mar 1989.
- [81] J. Jean, J. Soucy, and R. Pouliot, "Effects of Retinoic Acid on Keratinocyte Proliferation and Differentiation in a Psoriatic Skin Model," *Tissue Engineering Part A*, vol. 17, no. 13-14, pp. 1859-1868, Jul 2011.

- [82] M. Ponec and J. Boonstra, "Effects of retinoids and hydrocortisone on keratinocyte differentiation, epidermal growth factor binding and lipid metabolism," *Dermatologica*, vol. 175 Suppl 1, pp. 67-72, 1987.
- [83] S. Gibbs, A. N. S. Pinto, S. Murli, M. Huber, D. Hohl, and M. Ponec, "Epidermal growth factor and keratinocyte growth factor differentially regulate epidermal migration, growth, and differentiation," *Wound Repair and Regeneration*, vol. 8, no. 3, pp. 192-203, May-Jun 2000.
- [84] V. A. Botchkarev and A. A. Sharov, "BMP signaling in the control of skin development and hair follicle growth," *Differentiation*, vol. 72, no. 9-10, pp. 512-526, Dec 2004.
- [85] A. El Ghalbzouri, E. Lamme, and M. Ponec, "Crucial role of fibroblasts in regulating epidermal morphogenesis," *Cell and Tissue Research*, vol. 310, no. 2, pp. 189-199, Nov 2002.
- [86] M. P. Marinkovich, D. R. Keene, C. S. Rimbberg, and R. E. Burgeson, "Cellular origin of the dermal-epidermal basement membrane," *Developmental Dynamics*, vol. 197, no. 4, pp. 255-267, Aug 1993.
- [87] R. A. Briggaman, "Biochemical composition of the epidermal-dermal junction and other basement-membrane," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 78, no. 1, pp. 1-6, 1982.
- [88] D. Breitkreutz, I. Koxholt, K. Thiemann, and R. Nischt, "Skin Basement Membrane: The Foundation of Epidermal Integrity-BM Functions and Diverse Roles of Bridging Molecules Nidogen and Perlecan," *Biomed Research International*, 2013.
- [89] K. A. Holbrook and L. T. Smith, "Morphology and Chemical Composition of Connective Tissue: Structure of the Skin and Tendon," in *Connective Tissue and Its Heritable Disorders*: John Wiley & Sons, 2003, pp. 19-39.
- [90] B. De Wever, D. Petersohn, and K. R. Mewes, "Overview of human three-dimensional (3D) skin models used for dermal toxicity assessment," *H&PC today*, vol. 8, no. 1, pp. 18-22, 2013.
- [91] J. Fransson, L. C. Heffler, M. T. Linder, and A. Scheynius, "Culture of human epidermal Langerhans cells in a skin equivalent," *British Journal of Dermatology*, vol. 139, no. 4, pp. 598-604, Oct 1998.
- [92] I. J. Kosten, S. W. Spiekstra, T. D. de Gruijl, and S. Gibbs, "MUTZ-3 derived Langerhans cells in human skin equivalents show differential migration and phenotypic plasticity after allergen or irritant exposure," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 287, no. 1, pp. 35-42, Aug 2015.
- [93] N. Linde, C. M. Gutschalk, C. Hoffmann, D. Yilmaz, and M. M. Mueller, "Integrating Macrophages into Organotypic Co-Cultures: A 3D In Vitro Model to Study Tumor-Associated Macrophages," *Plos One*, vol. 7, no. 7, Jul 2012.
- [94] C. Duval, C. Chagnoleau, F. Pouradier, P. Sextius, E. Condom, and F. Bernerd, "Human Skin Model Containing Melanocytes: Essential Role of Keratinocyte Growth Factor for Constitutive Pigmentation-Functional Response to alpha-Melanocyte Stimulating Hormone and Forskolin," *Tissue Engineering Part C-Methods*, vol. 18, no. 12, pp. 947-957, Dec 2012.
- [95] J. S. Schechner *et al.*, "Engraftment of a vascularized human skin equivalent," *Faseb Journal*, vol. 17, no. 15, pp. 2250-2256, Dec 2003.
- [96] F. Groeber *et al.*, "A First Vascularized Skin Equivalent as an Alternative to Animal Experimentation," *Altex-Alternatives to Animal Experimentation*, vol. 33, no. 4, pp. 415-422, 2016.
- [97] M. Gschwandtner *et al.*, "Histamine suppresses epidermal keratinocyte differentiation and impairs skin barrier function in a human skin model," *Allergy*, vol. 68, no. 1, pp. 37-47, Jan 2013.
- [98] H. Kandarova *et al.*, "Assessment of the human epidermis model SkinEthic RHE for in vitro skin corrosion testing of chemicals according to new OECD TG 431," *Toxicology in Vitro*, vol. 20, no. 5, pp. 547-559, Aug 2006.
- [99] M. B. d'Yvoire *et al.*, "ECVAM and New Technologies for Toxicity Testing," *New Technologies for Toxicity Testing*, vol. 745, pp. 154-180, 2012.
- [100] D. A. Kidd, M. Johnson, and J. Clements, "Development of an in vitro corrosion/irritation prediction assay using the EpiDerm (TM) skin model," *Toxicology in Vitro*, vol. 21, no. 7, pp. 1292-1297, Oct 2007.

- [101] S. H. Mathes, H. Ruffner, and U. Graf-Hausner, "The use of skin models in drug development," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 69, pp. 81-102, Apr 2014.
- [102] M. Van Gele, B. Geusens, L. Brochez, R. Speeckaert, and J. Lambert, "Three-dimensional skin models as tools for transdermal drug delivery: challenges and limitations," *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 8, no. 6, pp. 705-720, Jun 2011.
- [103] O. Lee *et al.*, "A quantitative study of nanoparticle skin penetration with interactive segmentation," *Medical & Biological Engineering & Computing*, vol. 54, no. 10, pp. 1469-1479, Oct 2016.
- [104] G. E. Flaten, Z. Palac, A. Engesland, J. Filipovic-Grcic, Z. Vanic, and N. Skalko-Basnet, "In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 75, pp. 10-24, Jul 2015.
- [105] E. Brauchle, H. Johannsen, S. Nolan, S. Thude, and K. Schenke-Layland, "Design and analysis of a squamous cell carcinoma in vitro model system," *Biomaterials*, vol. 34, no. 30, pp. 7401-7407, Oct 2013.
- [106] Y. Xie *et al.*, "Development of a Three-Dimensional Human Skin Equivalent Wound Model for Investigating Novel Wound Healing Therapies," *Tissue Engineering Part C-Methods*, vol. 16, no. 5, pp. 1111-1123, Oct 2010.
- [107] R. V. Shevchenko, S. L. James, and S. E. James, "A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction," *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 7, no. 43, pp. 229-258, Feb 2010.
- [108] H. Stark, A. Szabowski, N. Fusenig, and N. Maas-Szabowski, "Organotypic cocultures as skin equivalents: a complex and sophisticated in vitro system," *Biol Proced Online*, vol. 6, no. 1, pp. 55-60, 2004.
- [109] T. W. Wang, H. C. Wu, Y. C. Huang, J. S. Sun, and F. H. Lin, "Biomimetic bilayered gelatin-chondroitin 6 sulfate-hyaluronic acid biopolymer as a scaffold for skin equivalent tissue engineering," *Artificial Organs*, vol. 30, no. 3, pp. 141-149, Mar 2006.
- [110] J. M. Waller and H. I. Maibach, "Age and skin structure and function, a quantitative approach (II): protein, glycosaminoglycan, water, and lipid content and structure," *Skin Research and Technology*, vol. 12, no. 3, pp. 145-154, Aug 2006.
- [111] J. Rachmilewitz and M. L. Tykocinski, "Differential effects of chondroitin sulfates A and B on monocyte and B-cell activation: Evidence for B-cell activation via a CD44-dependent pathway," *Blood*, vol. 92, no. 1, pp. 223-229, Jul 1 1998.
- [112] H. Brotchie and D. Wakefield, "Fibronectin: structure, function and significance in wound healing," *The Australasian journal of dermatology*, vol. 31, no. 1, pp. 47-56, 1990.
- [113] R. Pankov and K. M. Yamada, "Fibronectin at a glance," *Journal of Cell Science*, vol. 115, no. 20, pp. 3861-3863, Oct 2002.
- [114] R. R. Achterman *et al.*, "Dermatophytes Activate Skin Keratinocytes via Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling and Induce Immune Responses," *Infection and Immunity*, vol. 83, no. 4, pp. 1705-1714, Apr 2015.
- [115] M. J. Adams *et al.*, "Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2016)," *Archives of Virology*, vol. 161, no. 10, pp. 2921-2949, Oct 2016.
- [116] P. Simmonds *et al.*, "Consensus statement: Virus taxonomy in the age of metagenomics," *Nature reviews. Microbiology*, vol. 15, no. 3, pp. 161-168, Mar 2017.
- [117] S. Lewis-Jones, "Zoonotic poxvirus infections in humans," *Current Opinion in Infectious Diseases*, vol. 17, no. 2, pp. 81-89, Apr 2004.
- [118] S. Modrow, D. Falke, U. Truyen, and H. Schätzl, "Pockenviren," in *Molekulare Virologie: Spektrum Akademischer Verlag*, 2010, pp. 610-630.
- [119] B. C. Bera *et al.*, "Zoonotic cases of camelpox infection in India," *Veterinary Microbiology*, vol. 152, no. 1-2, pp. 29-38, Aug 2011.
- [120] B. Moss, "Poxviridae: the viruses and their replication," in *Fields Virology*, B. Fields, D. Knipe, and P. Howley, Eds. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- [121] F. Fenner, R. Wittek, and K. R. Dumbell, *The orthopoxviruses*. Academic Press, 1989, p. 432.

- [122] M. M. Stanford, G. McFadden, G. Karupiah, and G. Chaudhri, "Immunopathogenesis of poxvirus infections: forecasting the impending storm," *Immunology and Cell Biology*, vol. 85, no. 2, pp. 93-102, Feb-Mar 2007.
- [123] M. Laue and N. Bannert, "Detection limit of negative staining electron microscopy for the diagnosis of bioterrorism-related micro-organisms," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 109, no. 4, pp. 1159-1168, Oct 2010.
- [124] J. Horsington, L. Turnbull, C. B. Whitchurch, and T. P. Newsome, "Sub-viral imaging of vaccinia virus using super-resolution microscopy," *Journal of Virological Methods*, vol. 186, no. 1-2, pp. 132-136, Dec 2012.
- [125] B. T. Seet *et al.*, "Poxviruses and immune evasion," *Annual Review of Immunology*, vol. 21, pp. 377-423, 2003.
- [126] S. N. Shchelkunov *et al.*, "The genomic sequence analysis of the left and right species-specific terminal region of a cowpox virus strain reveals unique sequences and a cluster of intact ORFs for immunomodulatory and host range proteins," *Virology*, vol. 243, no. 2, pp. 432-460, Apr 10 1998.
- [127] C. Upton, S. Slack, A. L. Hunter, A. Ehlers, and R. L. Roper, "Poxvirus orthologous clusters: toward defining the minimum essential poxvirus genome," *Journal of Virology*, vol. 77, no. 13, pp. 7590-7600, Jul 2003.
- [128] R. Wittek, "Organization and expression of the poxvirus genome," *Experientia*, vol. 38, no. 3, pp. 285-297, 1982.
- [129] B. Schramm and J. K. Locker, "Cytoplasmic organization of POXvirus DNA replication," *Traffic*, vol. 6, no. 10, pp. 839-846, Oct 2005.
- [130] R. M. L. Buller and G. J. Palumbo, "Poxvirus pathogenesis," *Microbiological Reviews*, vol. 55, no. 1, pp. 80-122, Mar 1991.
- [131] D. J. Pickup, "Extracellular Virions: The Advance Guard of Poxvirus Infections," *Plos Pathogens*, vol. 11, no. 7, Jul 2015.
- [132] L. G. Payne, "The existence of an envelope on extracellular cowpox virus and its antigenic relationship to the vaccinia envelope," *Archives of Virology*, vol. 90, no. 1-2, pp. 125-133, 1986.
- [133] R. L. Roper, E. J. Wolffe, A. Weisberg, and B. Moss, "The envelope protein encoded by the A33R gene is required for formation of actin-containing microvilli and efficient cell-to-cell spread of vaccinia virus," *Journal of Virology*, vol. 72, no. 5, pp. 4192-4204, May 1998.
- [134] B. Moss, "Poxvirus Cell Entry: How Many Proteins Does it Take?," *Viruses*, vol. 4, no. 5, pp. 688-707, May 2012.
- [135] G. L. Smith and M. Law, "The exit of Vaccinia virus from infected cells," *Virus Research*, vol. 106, no. 2, pp. 189-197, Dec 2004.
- [136] A. Vanderplassen and G. L. Smith, "A novel virus binding assay using confocal microscopy: Demonstration that the intracellular and extracellular vaccinia virions bind to different cellular receptors," *Journal of Virology*, vol. 71, no. 5, pp. 4032-4041, May 1997.
- [137] F. I. Schmidt, C. K. E. Bleck, and J. Mercer, "Poxvirus host cell entry," *Current Opinion in Virology*, vol. 2, no. 1, pp. 20-27, Feb 2012.
- [138] B. Moss, "Poxvirus entry and membrane fusion," *Virology*, vol. 344, no. 1, pp. 48-54, Jan 5 2006.
- [139] K. L. Roberts and G. L. Smith, "Vaccinia virus morphogenesis and dissemination," *Trends in Microbiology*, vol. 16, no. 10, pp. 472-479, Oct 2008.
- [140] J. Mercer and A. Helenius, "Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells," *Science*, vol. 320, no. 5875, pp. 531-535, Apr 25 2008.
- [141] S. S. Broyles and B. S. Fesler, "Vaccinia virus gene encoding a component of the viral early transcription factor," *Journal of Virology*, vol. 64, no. 4, pp. 1523-1529, Apr 1990.
- [142] Z. Yang, D. P. Bruno, C. A. Martens, S. F. Porcella, and B. Moss, "Simultaneous high-resolution analysis of vaccinia virus and host cell transcriptomes by deep RNA sequencing," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 25, pp. 11513-11518, Jun 22 2010.

- [143] Z. Xu, D. Zikos, N. Osterrieder, and B. K. Tischer, "Generation of a Complete Single-Gene Knockout Bacterial Artificial Chromosome Library of Cowpox Virus and Identification of Its Essential Genes," *Journal of Virology*, vol. 88, no. 1, pp. 490-502, Jan 2014.
- [144] K. H. Rubins *et al.*, "Comparative Analysis of Viral Gene Expression Programs during Poxvirus Infection: A Transcriptional Map of the Vaccinia and Monkeypox Genomes," *Plos One*, vol. 3, no. 7, Jul 9 2008.
- [145] A. R. Howard and B. Moss, "Formation of Orthopoxvirus Cytoplasmic A-Type Inclusion Bodies and Embedding of Virions Are Dynamic Processes Requiring Microtubules," *Journal of Virology*, vol. 86, no. 10, pp. 5905-5914, May 2012.
- [146] G. L. Smith, A. Vanderplassen, and M. Law, "The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus," *Journal of General Virology*, vol. 83, pp. 2915-2931, Dec 2002.
- [147] V. Doceul, M. Hollinshead, L. van der Linden, and G. L. Smith, "Repulsion of Superinfecting Virions: A Mechanism for Rapid Virus Spread," *Science*, vol. 327, no. 5967, pp. 873-876, Feb 12 2010.
- [148] S. H. Nazarian and G. McFadden, "Immune evasion by poxviruses," *Future Virology*, vol. 1, no. 1, pp. 123-132, Jan 2006.
- [149] V. P. Smith and A. Alcamí, "Inhibition of interferons by ectromelia virus," *Journal of Virology*, vol. 76, no. 3, pp. 1124-1134, Feb 2002.
- [150] M. K. Spriggs *et al.*, "Vaccinia and cowpox viruses encode a novel secreted interleukin-1-binding protein," *Cell*, vol. 71, no. 1, pp. 145-152, Oct 2 1992.
- [151] G. McFadden and M. Barry, "How poxviruses oppose apoptosis," *Seminars in Virology*, vol. 8, no. 5, pp. 429-442, Apr 1998.
- [152] D. Bourquain, 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," *Virology Journal*, vol. 10, no. 61, 2013.
- [153] S. Guerra, L. A. Lopez-Fernandez, A. Pascual-Montano, M. Munoz, K. Harshman, and M. Esteban, "Cellular gene expression survey of vaccinia virus infection of human HeLa cells," *Journal of Virology*, vol. 77, no. 11, pp. 6493-6506, Jun 2003.
- [154] S. Langhammer, R. Koban, C. Yue, and H. Ellerbrok, "Inhibition of poxvirus spreading by the anti-tumor drug Gefitinib (Iressa (TM))," *Antiviral Research*, vol. 89, no. 1, pp. 64-70, Jan 2011.
- [155] Y. Li, D. S. Carroll, S. N. Gardner, M. C. Walsh, E. A. Vitalis, and I. K. Damon, "On the origin of smallpox: Correlating variola phylogenics with historical smallpox records," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 40, pp. 15787-15792, Oct 2007.
- [156] D. G. Diven, "An overview of poxviruses," *Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 44, no. 1, pp. 1-14, Jan 2001.
- [157] F. Fenner, D. A. Henderson, I. Arita, Z. Jezek, and I. D. Ladnyi, *Smallpox and its eradication* (History of international public health, no. 6). Geneva: World Health Organization, 1988, pp. XVI, 1460 S.
- [158] S. Riedel, "Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination," *Proceedings (by Baylor University Medical Center)*, vol. 18, no. 1, pp. 21-5, Jan 2005.
- [159] L. Sanchez-Sampedro, B. Perdiguero, E. Mejias-Perez, J. Garcia-Arriaza, M. Di Pilato, and M. Esteban, "The Evolution of Poxvirus Vaccines," *Viruses*, vol. 7, no. 4, pp. 1726-1803, Apr 2015.
- [160] N. Barquet and P. Domingo, "Smallpox: The triumph over the most terrible of the ministers of death," *Annals of Internal Medicine*, vol. 127, no. 8, pp. 635-642, Oct 15 1997.
- [161] M. A. Sauri, "Responses to smallpox vaccine," *New England Journal of Medicine*, vol. 347, no. 9, pp. 689-689, Aug 29 2002.
- [162] J. Cono, C. G. Casey, D. M. Bell, and P. Centers for Disease Control and, "Smallpox vaccination and adverse reactions. Guidance for clinicians," *Morbidity and mortality weekly report*, vol. 52, no. RR-4, pp. 1-28, Feb 2003.
- [163] R. S. Weinstein, "Should Remaining Stockpiles of Smallpox Virus (Variola) Be Destroyed?," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 17, no. 4, pp. 681-683, Apr 2011.

- [164] R. Thomssen, "Pocken als bioterroristische Bedrohung," *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, vol. 46, no. 11, pp. 965-975, 2003.
- [165] J. B. Tucker, "Breaking the deadlock over destruction of the smallpox virus stocks," *Biosecurity and Bioterrorism-Biodefense Strategy Practice and Science*, vol. 9, no. 1, pp. 55-67, Mar 2011.
- [166] S. Reardon, "'Forgotten' NIH smallpox virus languishes on death row," *Nature*, vol. 514, no. 7524, pp. 544-544, Oct 30 2014.
- [167] G. McFadden, "Killing a Killer: What Next for Smallpox?," *Plos Pathogens*, vol. 6, no. 1, Jan 2010.
- [168] K. Kupferschmidt, "How Canadian researchers reconstituted an extinct poxvirus for \$100,000 using mail-order DNA," *Scienceinsider*, Jul 2017.
- [169] A. M. McCollum and I. K. Damon, "Human Monkeypox," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 58, no. 2, pp. 260-267, Jan 2014.
- [170] G. Pauli and A. Nitsche, "Infektionen mit Kuhpockenviren in Deutschland – eine Übersicht," *Epidemiologisches Bulletin des Robert Koch-Instituts*, no. 10, 2007.
- [171] A. Elsendoorn *et al.*, "Severe ear chondritis due to cowpox virus transmitted by a pet rat," *Journal of Infection*, vol. 63, no. 5, pp. 391-393, Nov 2011.
- [172] S. Parker, A. Nuara, R. M. L. Buller, and D. A. Schultz, "Human monkeypox: an emerging zoonotic disease," *Future Microbiology*, vol. 2, no. 1, pp. 17-34, Feb 2007.
- [173] S. N. Shchelkunov, "An Increasing Danger of Zoonotic Orthopoxvirus Infections," *Plos Pathogens*, vol. 9, no. 12, Dec 2013.
- [174] S. Duraffour *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*, Article vol. 12, no. 8, pp. 1205-1216, 2007.
- [175] E. M. Mucker *et al.*, "Efficacy of Tecovirimat (ST-246) in Nonhuman Primates Infected with Variola Virus (Smallpox)," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 57, no. 12, pp. 6246-6253, Dec 2013.
- [176] G. Andrei and R. Snoeck, "Cidofovir Activity against Poxvirus Infections," *Viruses*, vol. 2, no. 12, pp. 2803-2830, Dec 2010.
- [177] S. Parker, L. Handley, and R. M. Buller, "Therapeutic and prophylactic drugs to treat orthopoxvirus infections," *Future Virology*, vol. 3, no. 6, pp. 595-612, Nov 2008.
- [178] D. Baxby, M. Bennett, and B. Getty, "Human cowpox 1969-93 - a review based on 54 cases," *British Journal of Dermatology*, vol. 131, no. 5, pp. 598-607, Nov 1994.
- [179] K. Switaj, P. Kajfasz, A. Kurth, and A. Nitsche, "Cowpox after a cat scratch - case report from Poland," *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, vol. 22, no. 3, pp. 456-458, 2015.
- [180] P. M. Pelkonen *et al.*, "Cowpox with severe generalized eruption, Finland," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 9, no. 11, pp. 1458-1461, Nov 2003.
- [181] M. Zijlstra, A. Osterhaus, and J. Heidema, "A necrotising ulcer after rescuing a kitten," *BMJ Case Rep*, vol. 2013, Sep 02 2013.
- [182] K. M. Sperling, A. Schwantes, C. Staib, B. S. Schnierle, and G. Sutter, "The Orthopoxvirus 68-Kilodalton Ankyrin-Like Protein Is Essential for DNA Replication and Complete Gene Expression of Modified Vaccinia Virus Ankara in Nonpermissive Human and Murine Cells," *Journal of Virology*, vol. 83, no. 12, pp. 6029-6038, Jun 2009.
- [183] D. F. Smee, "Orthopoxvirus inhibitors that are active in animal models: an update from 2008 to 2012," *Future Virology*, vol. 8, no. 9, pp. 891-901, Sep 2013.
- [184] A. Gazel *et al.*, "Transcriptional profiling of epidermal keratinocytes: Comparison of genes expressed in skin, cultured keratinocytes, and reconstituted epidermis, using large DNA microarrays," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 121, no. 6, pp. 1459-1468, Dec 2003.
- [185] G. Andrei, S. Duraffour, J. Van den Oord, and R. Snoeck, "Epithelial raft cultures for investigations of virus growth, pathogenesis and efficacy of antiviral agents," *Antiviral Research*, vol. 85, no. 3, pp. 431-449, Mar 2010.

- [186] A. Tamosiunaite *et al.*, "Histopathological and Immunohistochemical Studies of Cowpox Virus Replication in a Three-Dimensional Skin Model," *Journal of Comparative Pathology*, vol. 155, no. 1, pp. 55-61, Jul 2016.
- [187] S. Duraffour *et al.*, "Activities of several classes of acyclic nucleoside phosphonates against camelpox virus replication in different cell culture models," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Article vol. 51, no. 12, pp. 4410-4419, Dec 2007.
- [188] I. Lebeau *et al.*, "Activities of alkoxvalkyl esters of cidofovir (CDV), cyclic CDV, and (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)adenine against orthopoxviruses in cell monolayers and in organotypic cultures," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 50, no. 7, pp. 2525-2529, Jul 2006.
- [189] R. Snoeck, A. Holy, C. Dewolf-Peeters, J. Van Den Oord, E. De Clercq, and G. Andrei, "Antivaccinia activities of acyclic nucleoside phosphonate derivatives in epithelial cells and organotypic cultures," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Article vol. 46, no. 11, pp. 3356-3361, Nov 2002.
- [190] N. Alepee *et al.*, "State-of-the-Art of 3D Cultures (Organs-on-a-Chip) in Safety Testing and Pathophysiology," *Altex-Alternatives to Animal Experimentation*, vol. 31, no. 4, pp. 441-477, 2014.
- [191] E. J. Ryndock, J. Biryukov, and C. Meyers, "Replication of human papillomavirus in culture," *Methods Mol Biol*, vol. 1249, pp. 39-52, 2015.
- [192] M. J. Conway and C. Meyers, "Replication and Assembly of Human Papillomaviruses," *Journal of Dental Research*, vol. 88, no. 4, pp. 307-317, Apr 2009.
- [193] R. Hamel *et al.*, "Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells," *Journal of Virology*, vol. 89, no. 17, pp. 8880-8896, Sep 2015.
- [194] S. Rhee, "Fibroblasts in three dimensional matrices: cell migration and matrix remodeling," *Experimental and Molecular Medicine*, Review vol. 41, no. 12, pp. 858-865, Dec 2009.
- [195] S. Amano *et al.*, "Importance of balance between extracellular matrix synthesis and degradation in basement membrane formation," *Experimental Cell Research*, vol. 271, no. 2, pp. 249-262, Dec 2001.
- [196] S. J. Roth, D. Hoeper, M. Beer, S. Feineis, B. K. Tischer, and N. Osterrieder, "Recovery of infectious virus from full-length cowpox virus (CPXV) DNA cloned as a bacterial artificial chromosome (BAC)," *Veterinary Research*, vol. 42, Jan 11 2011.
- [197] Y. Poumay, I. H. Roland, M. Leclercqsmekens, and R. Leloup, "Basal Detachment of the Epidermis Using Dispase: Tissue Spatial Organization and Fate of Integrin $\alpha 6\beta 4$ and Hemidesmosome," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 102, no. 1, pp. 111-117, Jan 1994.
- [198] M. Stadtmüller, "Characterization of an *in vitro* skin model for infection studies using markers of differentiation, proliferation and apoptosis," master thesis, TU Berlin, Berlin, 2016.
- [199] M. Arya, I. S. Shergill, M. Williamson, L. Gommersall, N. Arya, and H. R. H. Patel, "Basic principles of real-time quantitative PCR," *Expert Review of Molecular Diagnostics*, vol. 5, no. 2, pp. 209-219, Mar 2005.
- [200] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402-408, Dec 2001.
- [201] A. Radonic, S. Thulke, H. G. Bae, M. A. Muller, W. Siegert, and A. Nitsche, "Reference gene selection for quantitative real-time PCR analysis in virus infected cells: SARS corona virus, Yellow fever virus, Human Herpesvirus-6, Camelpox virus and Cytomegalovirus infections," *Virology Journal*, vol. 2, 2005.
- [202] A. Turabelidze, S. J. Guo, and L. A. DiPietro, "Importance of housekeeping gene selection for accurate reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction in a wound healing model," *Wound Repair and Regeneration*, vol. 18, no. 5, pp. 460-466, Sep-Oct 2010.
- [203] G. Bindea *et al.*, "ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks," *Bioinformatics*, vol. 25, no. 8, pp. 1091-1093, Apr 2009.

- [204] D. W. Huang *et al.*, "The DAVID Gene Functional Classification Tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists," *Genome Biology*, vol. 8, no. 9, 2007.
- [205] J. R. Wisniewski and F. Z. Gaugaz, "Fast and Sensitive Total Protein and Peptide Assays for Proteomic Analysis," *Analytical Chemistry*, vol. 87, no. 8, pp. 4110-4116, Apr 2015.
- [206] M. Laue, "Electron Microscopy of Viruses," in *Electron Microscopy of Model Systems*, vol. 96: Elsevier Academic Press Inc, 2010, pp. 1-20.
- [207] A. Postigo, M. C. Martin, M. P. Dodding, and M. Way, "Vaccinia-induced epidermal growth factor receptor-MEK signalling and the anti-apoptotic protein F1L synergize to suppress cell death during infection," *Cellular Microbiology*, vol. 11, no. 8, pp. 1208-1218, Aug 2009.
- [208] M. Scaltriti and J. Baselga, "The epidermal growth factor receptor pathway: A model for targeted therapy," *Clinical Cancer Research*, vol. 12, no. 18, pp. 5268-5272, Sep 2006.
- [209] P. N. G. Silva *et al.*, "Differential role played by the MEK/ERK/EGR-1 pathway in orthopoxviruses vaccinia and cowpox biology," *Biochemical Journal*, vol. 398, pp. 83-95, Aug 15 2006.
- [210] P. P. Pastoret, M. Bennett, B. Brochier, and A. J. Akakpo, "Animals, public health and the example of cowpox," *Revue Scientifique Et Technique De L Office International Des Epizooties*, vol. 19, no. 1, pp. 23-32, Apr 2000.
- [211] A. Dongari-Bagtzoglou and H. Kashleva, "Development of a highly reproducible three-dimensional organotypic model of the oral mucosa," *Nature Protocols*, vol. 1, no. 4, pp. 2012-2018, 2006.
- [212] X. Y. Zheng, H. Baker, W. S. Hancock, F. Fawaz, M. McCaman, and E. Pungor, "Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs," *Biotechnology Progress*, vol. 22, no. 5, pp. 1294-1300, Oct 2006.
- [213] J. van der Valk *et al.*, "Optimization of chemically defined cell culture media - Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods," *Toxicology in Vitro*, vol. 24, no. 4, pp. 1053-1063, Jun 2010.
- [214] A. F. Black, V. Hudon, O. Damour, L. Germain, and F. A. Auger, "A novel approach for studying angiogenesis: A human skin equivalent with a capillary-like network," *Cell Biology and Toxicology*, vol. 15, no. 2, pp. 81-90, 1999.
- [215] G. Pietramaggiore *et al.*, "Tensile forces stimulate vascular remodeling and epidermal cell proliferation in living skin," *Annals of Surgery*, vol. 246, no. 5, pp. 896-902, Nov 2007.
- [216] J. D. Urschel, P. G. Scott, and H. T. G. Williams, "The effect of mechanical stress on soft and hard tissue repair; a review," *British Journal of Plastic Surgery*, vol. 41, no. 2, pp. 182-186, Mar 1988.
- [217] M. H. Jung, S. M. Jung, and H. S. Shin, "Co-stimulation of HaCaT keratinization with mechanical stress and air-exposure using a novel 3D culture device," *Scientific Reports*, vol. 6, Sep 2016.
- [218] J. J. Stark *et al.*, "Epidermal homeostasis in long-term scaffold-enforced skin equivalents," *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, vol. 11, no. 1, pp. 93-105, Sep 2006.
- [219] C. A. Harrison and S. MacNeil, "The mechanism of skin graft contraction: An update on current research and potential future therapies," *Burns*, vol. 34, no. 2, pp. 153-163, Mar 2008.
- [220] J. T. Daniels *et al.*, "Matrix metalloproteinase inhibition modulates fibroblast-mediated matrix contraction and collagen production in vitro," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 44, no. 3, pp. 1104-1110, Mar 2003.
- [221] H. Pigeon and D. Asselineau, "An in vitro approach to the chronological aging of skin by glycation of the collagen - The biological effect of glycation on the reconstructed skin model," *Maillard Reaction: Chemistry at the Interface of Nutrition, Aging, and Disease*, vol. 1043, pp. 529-532, 2005.

- [222] J. G. Rheinwald and H. Green, "Serial Cultivation of Strains of Human Epidermal Keratinocytes: The Formation of Keratinizing Colonies from Single Cells," *Cell*, vol. 6, no. 3, pp. 331-344, 1975.
- [223] A. Gandarillas, L. A. Goldsmith, S. Gschmeissner, I. M. Leigh, and F. M. Watt, "Evidence that apoptosis and terminal differentiation of epidermal keratinocytes are distinct processes," *Experimental Dermatology*, vol. 8, no. 1, pp. 71-79, Feb 1999.
- [224] M. T. Martin, A. Vulin, and J. H. Hendrye, "Human epidermal stem cells: Role in adverse skin reactions and carcinogenesis from radiation," *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, vol. 770, pp. 349-368, Oct-Dec 2016.
- [225] B. Atac *et al.*, "Skin and hair on-a-chip: in vitro skin models versus ex vivo tissue maintenance with dynamic perfusion," *Lab on a Chip*, vol. 13, no. 18, pp. 3555-3561, 2013.
- [226] A. D. Metcalfe and M. W. J. Ferguson, "Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration," *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 4, no. 14, pp. 413-437, Jun 22 2007.
- [227] E. Fuchs, J. Dowling, J. Segre, S. H. Lo, and Q. C. Yu, "Integrators of epidermal growth and differentiation: distinct functions for beta 1 and beta 4 integrins," *Current Opinion in Genetics & Development*, vol. 7, no. 5, pp. 672-682, Oct 1997.
- [228] H. Smola, H. J. Stark, G. Thiekotter, N. Mirancea, T. Krieg, and N. E. Fusenig, "Dynamics of basement membrane formation by keratinocyte-fibroblast interactions in organotypic skin culture," *Experimental Cell Research*, vol. 239, no. 2, pp. 399-410, Mar 15 1998.
- [229] A. El Ghalbzouri, M. F. Jonkman, R. Dijkman, and M. Ponc, "Basement membrane reconstruction in human skin equivalents is regulated by fibroblasts and/or exogenously activated keratinocytes," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 124, no. 1, pp. 79-86, Jan 2005.
- [230] R. Marks, "Tissue and Fluids: Sampling Techniques," in *Pharmacology of the Skin II: Methods, Absorption, Metabolism and Toxicity, Drugs and Diseases*, D. J. Atherton, Ed.: Springer Science & Business Media, 2012, pp. 14-15.
- [231] A. Mieremet, M. Rietveld, S. Absalah, J. van Smeden, J. A. Bouwstra, and A. El Ghalbzouri, "Improved epidermal barrier formation in human skin models by chitosan modulated dermal matrices," *Plos One*, vol. 12, no. 3, Mar 23 2017.
- [232] K. Boehnke, N. Mirancea, A. Pavesio, N. E. Fusenig, P. Boukamp, and H.-J. Stark, "Effects of fibroblasts and microenvironment on epidermal regeneration and tissue function in long-term skin equivalents," *European Journal of Cell Biology*, vol. 86, no. 11-12, pp. 731-746, Dec 2007.
- [233] S. Peltonen, J. Riehoainen, K. Pummi, and J. Peltonen, "Tight junction components occludin, ZO-1, and claudin-1,-4 and-5 in active and healing psoriasis," *British Journal of Dermatology*, vol. 156, no. 3, pp. 466-472, Mar 2007.
- [234] V. Harma *et al.*, "A Comprehensive Panel of Three-Dimensional Models for Studies of Prostate Cancer Growth, Invasion and Drug Responses," *Plos One*, vol. 5, no. 5, May 3 2010.
- [235] A. Birgersdotter, R. Sandberg, and I. Ernberg, "Gene expression perturbation in vitro - A growing case for three-dimensional (3D) culture systems," *Seminars in Cancer Biology*, vol. 15, no. 5, pp. 405-412, Oct 2005.
- [236] A. Downie, "A study of the lesions produced experimentally by cowpox virus," *The Journal of Pathology*, vol. 48, no. 2, pp. 361-379, 1939.
- [237] D. S. Carroll *et al.*, "Chasing Jenner's Vaccine: Revisiting Cowpox Virus Classification," *Plos One*, vol. 6, no. 8, Aug 8 2011.
- [238] D. Hoffmann *et al.*, "Out of the Reservoir: Phenotypic and Genotypic Characterization of a Novel Cowpox Virus Isolated from a Common Vole," *Journal of Virology*, vol. 89, no. 21, pp. 10959-10969, Nov 2015.
- [239] S. L. Haller, C. Peng, G. McFadden, and S. Rothenburg, "Poxviruses and the evolution of host range and virulence," *Infection Genetics and Evolution*, vol. 21, pp. 15-40, Jan 2014.
- [240] X. Tan, S. Chun, J. Pablo, P. Felgner, X. Liang, and D. H. Davies, "Failure of the Smallpox Vaccine To Develop a Skin Lesion in Vaccinia Virus-Naive Individuals Is Related to Differences

- in Antibody Profiles before Vaccination, Not After," *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 19, no. 3, pp. 418-428, Mar 2012.
- [241] P. M. Elias, "Stratum corneum defensive functions: An integrated view," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 125, no. 2, pp. 183-200, Aug 2005.
- [242] A. Toshitani, S. Imayama, Y. Shimozone, T. Yoshinaga, M. Furue, and Y. Hori, "Reduced amount of secretory component of IgA secretion in tears of patients with atopic dermatitis," *Journal of Dermatological Science*, vol. 19, no. 2, pp. 134-138, Feb 1999.
- [243] A. Rossi, A. Appelt-Menzel, S. Kurdyn, H. Walles, and F. Groeber, "Generation of a Three-dimensional Full Thickness Skin Equivalent and Automated Wounding," *Jove-Journal of Visualized Experiments*, no. 96, Feb 2015.
- [244] L. M. Wang and J. P. Stegemann, "Extraction of high quality RNA from polysaccharide matrices using cetyltrimethylammonium bromide," *Biomaterials*, vol. 31, no. 7, pp. 1612-1618, Mar 2010.
- [245] B. Moss, "Regulation of Vaccinia Virus Transcription," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 59, pp. 661-688, 1990.
- [246] E. J. Wolffe, A. S. Weisberg, and B. Moss, "The vaccinia virus A33R protein provides a chaperone function for viral membrane localization and tyrosine phosphorylation of the A36R protein," *Journal of Virology*, vol. 75, no. 1, pp. 303-310, Jan 2001.
- [247] V. Doceul, M. Hollinshead, A. Breiman, K. Laval, and G. L. Smith, "Protein B5 is required on extracellular enveloped vaccinia virus for repulsion of superinfecting virions," *Journal of General Virology*, vol. 93, pp. 1876-1886, Sep 2012.
- [248] T. H. Chang *et al.*, "Crystal Structure of Vaccinia Viral A27 Protein Reveals a Novel Structure Critical for Its Function and Complex Formation with A26 Protein," *Plos Pathogens*, vol. 9, no. 8, Aug 2013.
- [249] J. S. Lee *et al.*, "Comparison of Gene Expression Profiles between Keratinocytes, Melanocytes and Fibroblasts," *Annals of Dermatology*, vol. 25, no. 1, pp. 36-45, Feb 2013.
- [250] H. Mizushima *et al.*, "Wide distribution of laminin-5 gamma 2 chain in basement membranes of various human tissues," *Hormone Research*, vol. 50, pp. 7-14, 1998.
- [251] G. Griffiths, N. Roos, S. Schleich, and J. K. Locker, "Structure and assembly of intracellular mature vaccinia virus: Thin-section analyses," *Journal of Virology*, vol. 75, no. 22, pp. 11056-11070, Nov 2001.
- [252] M. Hollinshead *et al.*, "Vaccinia virus utilizes microtubules for movement to the cell surface," *Journal of Cell Biology*, vol. 154, no. 2, pp. 389-402, Jul 23 2001.
- [253] A. Vanderplasschen, E. Mathew, M. Hollinshead, R. B. Sim, and G. L. Smith, "Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement because of incorporation of host complement control proteins into its envelope," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 13, pp. 7544-7549, Jun 23 1998.
- [254] A. A. Andrade *et al.*, "The vaccinia virus-stimulated mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway is required for virus multiplication," *Biochemical Journal*, vol. 381, pp. 437-446, Jul 2004.
- [255] B. J. Ferguson *et al.*, "Vaccinia virus protein N2 is a nuclear IRF3 inhibitor that promotes virulence," *Journal of General Virology*, vol. 94, pp. 2070-2081, Sep 2013.
- [256] S. Neidel, C. M. de Motes, D. S. Mansur, P. Strnadova, G. L. Smith, and S. C. Graham, "Vaccinia Virus Protein A49 Is an Unexpected Member of the B-cell Lymphoma (Bcl)-2 Protein Family," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 290, no. 10, pp. 5991-6002, Mar 6 2015.
- [257] E. G. Niles and J. Seto, "Vaccinia virus gene D8 encodes a virion transmembrane protein," *Journal of Virology*, vol. 62, no. 10, pp. 3772-3778, Oct 1988.
- [258] M. Wu *et al.*, "Essential Roles for Early Growth Response Transcription Factor Egr-1 in Tissue Fibrosis and Wound Healing," *American Journal of Pathology*, vol. 175, no. 3, pp. 1041-1055, Sep 2009.
- [259] Z. Wang, M. Gerstein, and M. Snyder, "RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics," *Nature Reviews Genetics*, vol. 10, no. 1, pp. 57-63, Jan 2009.

- [260] C. Wang *et al.*, "The concordance between RNA-seq and microarray data depends on chemical treatment and transcript abundance," *Nature Biotechnology*, vol. 32, no. 9, pp. 926-932, Sep 2014.
- [261] M. K. Oyoshi, J. Beaupre, N. Venturelli, C. N. Lewis, Y. Lwakura, and R. S. Geha, "Filaggrin deficiency promotes the dissemination of cutaneously inoculated vaccinia virus," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 135, no. 6, pp. 1511-U188, Jun 2015.
- [262] Y. He, I. Sultana, K. Takeda, and J. L. Reed, "Cutaneous Deficiency of Filaggrin and STAT3 Exacerbates Vaccinia Disease In Vivo," *Plos One*, vol. 12, no. 1, Jan 12 2017.
- [263] J. L. Reed, D. E. Scott, and M. Bray, "Eczema Vaccinatum," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 54, no. 6, pp. 832-840, Mar 15 2012.
- [264] L. Molina and R. Romiti, "Molluscum contagiosum on tattoo," *Anais Brasileiros De Dermatologia*, vol. 86, no. 2, pp. 352-354, Mar-Apr 2011.
- [265] A. Chahroudi, R. Chavan, N. Koyzr, E. K. Waller, G. Silvestri, and M. B. Feinberg, "Vaccinia virus tropism for primary hematolymphoid cells is determined by restricted expression of a unique virus receptor," *Journal of Virology*, vol. 79, no. 16, pp. 10397-10407, Aug 2005.
- [266] P. Quinn, B. Markey, F. Leonard, E. FitzPatrick, S. Fanning, and P. Hartigan, "The role of microbial pathogens in diseases of the integumentary system," in *Veterinary Microbiology and Microbial Disease* 2nd ed.: John Wiley & Sons, 2011, p. 834.
- [267] P. D. Vermeer, J. McHugh, T. Rokhlina, D. W. Vermeer, J. Zabner, and M. J. Welsh, "Vaccinia virus entry, exit, and interaction with differentiated human airway epithelia," *Journal of Virology*, vol. 81, no. 18, pp. 9891-9899, Sep 2007.
- [268] B. M. Ward, "The taking of the cytoskeleton one two three: How viruses utilize the cytoskeleton during egress," *Virology*, vol. 411, no. 2, pp. 244-250, Mar 15 2011.
- [269] M. A. Tischfield *et al.*, "Human TUBB3 Mutations Perturb Microtubule Dynamics, Kinesin Interactions, and Axon Guidance," *Cell*, vol. 140, no. 1, pp. 74-87, Jan 8 2010.
- [270] D. Panda, H. P. Miller, A. Banerjee, R. F. Luduena, and L. Wilson, "Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 24, pp. 11358-11362, Nov 22 1994.
- [271] S. G. Lehmann, S. Bourgoin-Voillard, M. Seve, and W. Rachidi, "Tubulin Beta-3 Chain as a New Candidate Protein Biomarker of Human Skin Aging: A Preliminary Study," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017.
- [272] H. Ando *et al.*, "Melanosomes Are Transferred from Melanocytes to Keratinocytes through the Processes of Packaging, Release, Uptake, and Dispersion," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 132, no. 4, pp. 1222-1229, Apr 2012.
- [273] G. Levallet *et al.*, "High TUBB3 Expression, an Independent Prognostic Marker in Patients with Early Non-Small Cell Lung Cancer Treated by Preoperative Chemotherapy, Is Regulated by K-Ras Signaling Pathway," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 11, no. 5, pp. 1203-1213, May 2012.
- [274] I. Sadeghi, M. Behmanesh, N. A. Chashmi, M. Sharifi, and B. M. Soltani, "6-Methoxy Podophyllotoxin Induces Apoptosis via Inhibition of TUBB3 and TOP2A Gene Expressions in 5637 and K562 Cancer Cell Lines," *Cell Journal*, vol. 17, no. 3, pp. 502-509, 2015.
- [275] B. Ramaswamy and S. Puhalla, "Docetaxel: A tubulin-stabilizing agent approved for the management of several solid tumors," *Drugs of Today*, vol. 42, no. 4, pp. 265-279, Apr 2006.
- [276] A. L. Blajeski, V. A. Phan, T. J. Kottke, and S. H. Kaufmann, "G(1) and G(2) cell-cycle arrest following microtubule depolymerization in human breast cancer cells," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 110, no. 1, pp. 91-99, Jul 2002.
- [277] A. van der Flier and A. Sonnenberg, "Structural and functional aspects of filamins," *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, vol. 1538, no. 2-3, pp. 99-117, Apr 23 2001.
- [278] D. A. Toivola, N. O. Ku, E. Z. Resurreccion, D. R. Nelson, T. L. Wright, and M. B. Omary, "Keratin 8 and 18 hyperphosphorylation is a marker of progression of human liver disease," *Hepatology*, vol. 40, no. 2, pp. 459-466, Aug 2004.

- [279] N. N. Ninkina, E. M. Privalova, L. G. P. Pinon, A. M. Davies, and V. L. Buchman, "Developmentally regulated expression of persyn, a member of the synuclein family, in skin," *Experimental Cell Research*, vol. 246, no. 2, pp. 308-311, Feb 1 1999.
- [280] Z. Z. Pan, W. Bruening, B. I. Giasson, V. M. Y. Lee, and A. K. Godwin, "gamma-Synuclein promotes cancer cell survival and inhibits stress- and chemotherapy drug-induced apoptosis by modulating MAPK pathways," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 38, pp. 35050-35060, Sep 20 2002.
- [281] X. Cheng *et al.*, "Assessment of splice variant-specific functions of desmocollin 1 in the skin," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 24, no. 1, pp. 154-163, Jan 2004.
- [282] C. M. Ahmed and H. M. Johnson, "The role of a non-canonical JAK-STAT pathway in IFN therapy of poxvirus infection and multiple sclerosis: An example of Occam's Broom?," *Jak-Stat*, vol. 2, no. 4, pp. e26227-e26227, Oct 1 2013.
- [283] S. B. Fleming, "Viral Inhibition of the IFN-Induced JAK/STAT Signalling Pathway: Development of Live Attenuated Vaccines by Mutation of Viral-Encoded IFN-Antagonists," *Vaccines*, vol. 4, no. 3, Sep 2016.
- [284] R. Izmailyan *et al.*, "Integrin beta 1 Mediates Vaccinia Virus Entry through Activation of PI3K/Akt Signaling," *Journal of Virology*, vol. 86, no. 12, pp. 6677-6687, Jun 2012.
- [285] J. B. Smith, R. D. G. Theakston, A. L. J. Coelho, C. Barja-Fidalgo, J. J. Calvete, and C. Marcinkiewicz, "Characterization of a monomeric disintegrin, ocellatusin, present in the venom of the Nigerian carpet viper, *Echis ocellatus*," *Febs Letters*, vol. 512, no. 1-3, pp. 111-115, Feb 13 2002.
- [286] M. C. Brown, I. Staniszewska, L. Del Valle, G. P. Tuszyński, and C. Marcinkiewicz, "Angiostatic activity of obtustatin as alpha 1 beta 1 integrin inhibitor in experimental melanoma growth," *International Journal of Cancer*, vol. 123, no. 9, pp. 2195-2203, Nov 1 2008.
- [287] S. Akira and T. Kishimoto, "IL-6 and NF-IL6 in Acute-Phase Response and Viral Infection," *Immunological Reviews*, vol. 127, pp. 25-50, Jun 1992.
- [288] J. Bouzas-Rodriguez *et al.*, "The Nuclear Receptor NR4A1 Induces a Form of Cell Death Dependent on Autophagy in Mammalian Cells," *Plos One*, vol. 7, no. 10, Oct 5 2012.
- [289] X. Zhang *et al.*, "Maternally Expressed Gene 3 (MEG3) Noncoding Ribonucleic Acid: Isoform Structure, Expression, and Functions," *Endocrinology*, vol. 151, no. 3, pp. 939-947, Mar 2010.
- [290] T. Mondal *et al.*, "MEG3 long noncoding RNA regulates the TGF-beta pathway genes through formation of RNA-DNA triplex structures," *Nature Communications*, vol. 6, Jul 2015.
- [291] L. Z. Liu, Z. Xu, R. C. Fuhlbrigge, V. Pena-Cruz, J. Lieberman, and T. S. Kupper, "Vaccinia virus induces strong immunoregulatory cytokine production in healthy human epidermal keratinocytes: a novel strategy for immune evasion," *Journal of Virology*, vol. 79, no. 12, pp. 7363-7370, Jun 2005.
- [292] A. Futagami, M. Ishizaki, Y. Fukuda, S. Kawana, and N. Yamanaka, "Wound healing involves induction of cyclooxygenase-2 expression in rat skin," *Laboratory Investigation*, Article vol. 82, no. 11, pp. 1503-1513, Nov 2002.
- [293] N. J. Poindexter *et al.*, "IL-24 is expressed during wound repair and inhibits TGF alpha-induced migration and proliferation of keratinocytes," *Experimental Dermatology*, vol. 19, no. 8, pp. 714-722, Aug 2010.
- [294] B. K. Bloor *et al.*, "Expression of keratin K2e in cutaneous and oral lesions - Association with keratinocyte activation, proliferation, and keratinization," *American Journal of Pathology*, vol. 162, no. 3, pp. 963-975, Mar 2003.
- [295] S. Vogel, M. Sardy, K. Glos, H. C. Korting, T. Ruzicka, and A. Wollenberg, "The Munich Outbreak of Cutaneous Cowpox Infection: Transmission by Infected Pet Rats," *Acta Dermato-Venereologica*, vol. 92, no. 2, pp. 126-131, 2012.
- [296] J. P. Laliberte and B. Moss, "Lipid Membranes in Poxvirus Replication," *Viruses-Basel*, vol. 2, no. 4, pp. 972-986, Apr 2010.
- [297] M. D. Greseth and P. Traktman, "De novo Fatty Acid Biosynthesis Contributes Significantly to Establishment of a Bioenergetically Favorable Environment for Vaccinia Virus Infection," *Plos Pathogens*, vol. 10, no. 3, Mar 2014.

- [298] R. Koban *et al.*, "A novel three-dimensional cell culture method enhances antiviral drug screening in primary human cells," *submitted for publication*, 2017.
- [299] A. E. Wakeling *et al.*, "ZD1839 (Iressa): An orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy," *Cancer Research*, vol. 62, no. 20, pp. 5749-5754, Oct 15 2002.
- [300] F. G. da Fonseca, R. L. A. Silva, J. T. Marques, P. C. P. Ferreira, and E. G. Kroon, "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*, vol. 18, no. 2, pp. 151-160, Apr 1999.
- [301] S. K. Repertinger, E. Campagnaro, J. Fuhrman, T. El-Abaseri, S. H. Yuspa, and L. A. Hansen, "EGFR enhances early healing after cutaneous incisional wounding," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 123, no. 5, pp. 982-989, Nov 2004.
- [302] R. S. Kornbluth, D. F. Smee, R. W. Sidwell, V. Snarsky, D. H. Evans, and K. Y. Hostetler, "Mutations in the E9L polymerase gene of cidofovir-resistant vaccinia virus strain WR are associated with the drug resistance phenotype," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 50, no. 12, pp. 4038-4043, Dec 2006.
- [303] L. K. Dropulic and J. I. Cohen, "Update on New Antivirals Under Development for the Treatment of Double-Stranded DNA Virus Infections," *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, vol. 88, no. 5, pp. 610-619, Nov 2010.
- [304] J. P. Lalezari *et al.*, "Intravenous cidofovir for peripheral cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS - A randomized, controlled trial," *Annals of Internal Medicine*, vol. 126, no. 4, Feb 1997.
- [305] B. Farahnik, K. Beroukhim, C. M. Blattner, and J. Young, III, "Cutaneous manifestations of the Zika virus," *Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 74, no. 6, pp. 1286-1287, Jun 2016.
- [306] N. S. Agar, G. M. Halliday, R. S. Barnetson, and A. M. Jones, "A novel technique for the examination of skin biopsies by laser capture microdissection," *Journal of Cutaneous Pathology*, vol. 30, no. 4, pp. 265-270, Apr 2003.
- [307] A. Gragnani, M. Z. Ipolito, C. S. Sobral, M. K. C. Brunialti, R. Salomao, and L. M. Ferreira, "Flow cytometry of human primary epidermal and follicular keratinocytes," *Eplasty*, vol. 8, pp. e14-e14, Feb 2008.