

Zusammenfassung

Laura Edith Schneider

Interaktion von Orf-Virus mit humanen Keratinozyten und Dermalfibroblasten: abortive Infektion und Inhibition der Expression von Intercellular Adhesion Molecule-1

Institut für Immunologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im Dezember 2018

53 Seiten, 2 Tabellen, 15 Abbildungen, 151 Literaturangaben

Schlüsselwörter: ORFV, Keratinozyten, Dermalfibroblasten, virale Hautinfektion

Einleitung: Orf-Virus (ORFV) ist ein weltweit vorkommendes epitheliotropes Virus, das durch Läsionen in die Haut kleiner Wiederkäuer eindringt, dort repliziert und eine pustulöse Dermatitis verursacht. Jedoch kann ORFV auch den Menschen infizieren und in Personenkreisen mit engem Kontakt zu infizierten Tieren eine lokale Hautentzündung hervorrufen, die allgemein als „Melkerknoten“ bezeichnet wird. In immunkompetenten Individuen bleibt das infizierte Areal für gewöhnlich lokal begrenzt und heilt nach einigen Wochen ohne Narbenbildung ab. Die Erkrankung im Menschen ist zwar durch zahlreiche Fallstudien gut dokumentiert, allerdings sind noch viele Fragen über Läsionsentstehung im Menschen und die Rolle der Hauptzellpopulationen der Haut, Keratinozyten und Dermalfibroblasten, während ORFV-Infektion offen.

Ziele der Untersuchung: Ziel der Studie war es, die ORFV-Infektion menschlicher Hautzellen hinsichtlich des Zelltodes, Virusreplikation und zellulärer Aktivierung zu charakterisieren. Insbesondere sollte die Regulation von Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), wodurch T-Zell-Adhäsion vermittelt wird, während viraler Infektion untersucht werden.

Material und Methoden: Für das *in vitro*-Infektionsmodell wurden primäre humane Keratinozyten und Dermalfibroblasten aus juvenilen Vorhautexplantaten gewonnen. Nach Expansion wurden die isolierten Primärzellen mit ORFV für zwei Stunden inkubiert und nicht-adhärenente Viruspartikel wurden mittels Waschen entfernt. Die Analysen wurden 0, 6, 24, 48, 72 und 96 Stunden nach der Infektion durchgeführt. Die Morphologie der Zellen nach der Infektion wurde mittels Lichtmikroskopie beurteilt und die Anzahl toter Zellen durch Laktat-Dehydrogenase-Bestimmung im Zellkulturüberstand sowie mit durchflusszytometrischen Analysen quantifiziert. Die Viruslast wurde mittels „Tissue culture infective dose 50“ (TCID₅₀) nach der Formel von Spearman und Kärber und die Frequenz infizierter Zellen durch Durchflusszytometrie bestimmt. Die Konzentration der proinflammatorischen Zytokine, Interleukin (IL)-6 und 8 im Zellkulturüberstand wurden mittels Enzyme-linked-immunosorbent-Assay ermittelt. Die Expression von ICAM-1 wurde durchflusszytometrisch analysiert. Die Daten aus dieser

Zusammenfassung

Arbeit stammen aus 3-8 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit je einem Primärzellspender.

Die statistische Auswertung erfolgte bei Normalverteilung mit der einfachen Varianzanalyse mit nachfolgendem Dunnett's Mehrfachvergleich, beim Vergleich von zwei Gruppen mit normalisierten Daten wurde der einfache t-Test angewandt und bei nicht-normalisierten Daten der ungepaarte zweiseitige t-Test. Bei nicht-parametrischen, normalisierten Daten wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Für die Analyse von nicht-parametrischen Daten mehrerer Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's Mehrfachvergleich angewandt. Die Abhängigkeit von Parametern wurde mit der Spearman Korrelation bestimmt.

Ergebnisse: Die lichtmikroskopische Evaluierung von infizierten Keratinozyten und Dermalfibroblasten zeigte Abkuglung nach 6 h und Lockerung des Zellverbandes in Keratinozyten, während sich in Dermalfibroblasten morphologische Veränderungen später darstellten (96 Stunden). Diese Veränderungen waren Folgen des Zelltodes, was sich im Laktat-Dehydrogenase-Test und in der durchflusszytometrischen Analyse zeigte. Zwar konnten beide untersuchten Zellarten Viruspartikel aufnehmen, aber die Replikationsfähigkeit und die Produktion viraler Proteine war begrenzt, was ein Kennzeichen einer abortiven Infektion ist. Weiterhin fand vorrangig in Keratinozyten die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen (Interleukin (IL)-6 und IL-8) statt. Nach Infektion von Keratinozyten- und Dermalfibroblastenkulturen konnte eine erhöhte Expression von ICAM-1 detektiert werden. Dieser Effekt war mit Virus-freiem Überstand infizierter Zellen übertragbar, was auf den Einfluss löslicher Mediatoren auf die ICAM-1-Expression hinweist. Interessanterweise war die ICAM-1-Expression bei Keratinozyten beschränkt auf nicht-infizierte Zellen, auf infizierten Zellen war die Expression von ICAM-1 nicht messbar. Dieses Phänomen zeigte sich auch bei Dermalfibroblasten, wenn die konstitutive ICAM-1-Expression niedrig war. Selbst Inkubation von Keratinozyten mit Interferon- γ , einem starken Stimulus für ICAM-1, konnte die Expression von ICAM-1 auf infizierten Keratinozyten nicht induzieren, was auf eine wirkungsvolle Inhibition von ICAM-1 durch ORFV hindeutet.

Schlussfolgerung: Diese Arbeit beleuchtet die ORFV Infektion im Menschen und identifiziert die Infektion von humanen Keratinozyten und Dermalfibroblasten als abortiv, die bei Keratinozyten mit massivem Zelltod einhergeht. Zusätzlich werden die virusbedingten Effekte hinsichtlich der Regulation von ICAM-1 analysiert, die auf einen neuen, ORFV-induzierten Immunevasionsmechanismus hinweisen.