

Gallensäuren-induzierte Modulation der Zytomegalievirus Replikation

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Anna-Kathrin Schupp
aus Neuss

Düsseldorf 2014

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. D. Häussinger

Korreferent: Prof. Dr. W. Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 27. 10.2014

Wenn man auf ein Ziel zugeht,
ist es äußerst wichtig,
auf den Weg zu achten.
Denn der Weg lehrt uns am besten,
ans Ziel zu gelangen,
und er bereichert uns,
während wir ihn zurücklegen.

Paulo Coelho

Auszüge dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Tagungsbeiträge:

Dirk Graf (Vortragender), Katrin Haselow, Anna-Kathrin Schupp (Vortrag): Modulation of pro-inflammatory and anti-viral pathways by bile acids. Symposium zum Abschluss des SFB575 und zum Auftakt des SFB974 20-21. April 2012, Düsseldorf, Deutschland

Anna-Kathrin Schupp, Mirko Trilling, Dieter Häussinger, Hartmut Hengel, Dirk Graf (Poster Präsentation): Selective Control of Cytomegalovirus Replication by Hydrophobic Bile Acids in Hepatocytes. 37th Annual Herpesvirus Workshop, 4-9. August 2012, Calgary, Kanada

Anna-Kathrin Schupp, Mirko Trilling, Vu Thuy Khanh Le, Stephanie Rattay, Dieter Häussinger, Hartmut Hengel, Dirk Graf (Vortrag): Sodium-Taurocholate cotransporting Polypeptide dependent Inhibition of Cytomegalovirus Replication by Bile Acids in Hepatocytes. 12. Workshop Pathogenitätsmechanismen und Immunkontrolle viraler Erreger, 9-11. Oktober 2013, Deidesheim, Deutschland

Anna-Kathrin Schupp, Mirko Trilling, Dieter Häussinger, Hartmut Hengel, Dirk Graf (Vortrag und Poster Präsentation): Inhibition of Cytomegalovirus Replication by Bile Acids. 1. International Conference of Collaborative Research Center SFB974 "Liver Damage and Regeneration", 15-16. November 2013, Düsseldorf, Deutschland

Stephanie Rattay, Anna-Kathrin Schupp, Mirko Trilling, Hartmut Hengel, Dirk Graf, Albert Zimmermann (Poster Präsentation): Role of liver-specific signal transduction for systemic MCMV infection. 1. International Conference of Collaborative Research Center SFB974 "Liver Damage and Regeneration", 15-16. November 2013, Düsseldorf, Deutschland

Anna-Kathrin Schupp, Stephanie Rattay, Albert Zimmermann, Dirk Graf (Vortrag): STAT signalling and cytomegalovirus infection in the liver. SFB974 Retreat, 8.-9. März 2014, Trier, Deutschland

Beteiligung an Manuskripten:

Haselow K., Bode JG., Wammers M., Ehling C., Keitel V., Kleinebrecht L, Schupp AK, Häussinger D., Graf D.: Bile acids PKA-dependently induce a switch of the IL-10/IL-12 ratio and reduce proinflammatory capability of human macrophages. J Leukoc Biol 2013;94:1253-1264

Schupp AK., Graf D.: Bile acid-induced modulation of virus replication. In Häussinger D., Sies H. (Editoren): Proceedings of I. International Conference of Collaborative Research Center 974 "Liver Damage and Regeneration" Eur J Med Res 2014;19 (Suppl1):S27

Inhalt

Abkürzungen	1
1. Einleitung	4
<i>1.1. Leber und Gallensäuren.....</i>	<i>4</i>
<i>1.1.1. Aufbau und Funktion der Leber.....</i>	<i>4</i>
<i>1.1.2. Gallensäuren-Synthese.....</i>	<i>6</i>
<i>1.1.3. Enterohepatischer Kreislauf und Gallensäuren-abhängige Signaltransduktion</i>	<i>9</i>
<i>1.1.4. Einfluss von Gallensäuren auf das Immunsystem und die Replikation von Viren</i>	<i>16</i>
<i>1.2. Zytomegalievirus.....</i>	<i>19</i>
<i>1.2.1. Die Familie der Herpesviren.....</i>	<i>19</i>
<i>1.2.2. Das Zytomegalievirus und der virale Replikationszyklus</i>	<i>19</i>
2. Material und Methoden	27
<i>2.1. Material.....</i>	<i>27</i>
<i>2.1.1. Geräte.....</i>	<i>27</i>
<i>2.1.2. Chemikalien.....</i>	<i>28</i>
<i>2.1.3. Verbrauchsmaterialien.....</i>	<i>29</i>
<i>2.1.4. Antikörper.....</i>	<i>30</i>
<i>2.1.5. Zytokine.....</i>	<i>30</i>
<i>2.1.6. Oligonukleotide für quantitative PCR und TaqMan-PCR.....</i>	<i>31</i>
<i>2.1.7. Mäuse/ Knockout Mäuse.....</i>	<i>31</i>
<i>2.1.8. Virusstämme</i>	<i>32</i>
<i>2.2. Virologische Methoden</i>	<i>33</i>
<i>2.2.1. MCMV/ HCMV Infektion</i>	<i>33</i>
<i>2.2.2. Bestimmung von MCMV-Titern</i>	<i>33</i>
<i>2.2.3. Herstellen von MCMV-Virusstocks</i>	<i>34</i>
<i>2.3. Proteinanalytische Methoden</i>	<i>35</i>
<i>2.3.1. Proteinkonzentrationsbestimmung</i>	<i>35</i>
<i>2.3.2. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	<i>36</i>
<i>2.3.3. Western-Blot</i>	<i>38</i>

2.3.4. <i>Luziferase Assay</i>	39
2.3.5. <i>Untersuchung der Gesamtzell-Protein-Neusyntheserate</i>	39
2.4. <i>Zellbiologische Methoden</i>	40
2.4.1. <i>Zellkultur</i>	40
2.4.2. <i>Behandlung von Zellen mit Gallensäuren und anderen Agenzien</i>	41
2.4.3. <i>Zellviabilitätstests</i>	43
2.4.4. <i>Isolation primärer muriner Hepatozyten</i>	43
2.4.5. <i>Präparation von embryonalen murinen Fibroblasten</i>	46
2.5. <i>Molekularbiologische Methoden</i>	46
2.5.1. <i>Reverse Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion</i>	46
2.5.2. <i>TaqMan-PCR</i>	48
2.5.3. <i>Lentivirale Transfektion von Zellen</i>	49
2.6. <i>Infektion von Mäusen mit MCMV unter Gallensäuren-Fütterung</i>	49
2.6.1. <i>Virustitration aus Organen</i>	51
2.7. <i>Bestimmung der Gallensäuren-Konzentrationen in Lebergewebe und Plasma</i>	51
2.8. <i>Software und Statistik</i>	52
3. <i>Fragestellung</i>	53
4. <i>Ergebnisse</i>	54
4.1. <i>Gallensäuren inhibieren die Zytomegalievirus-Replikation in vitro</i>	54
4.2. <i>In vivo Wirkung von Gallensäuren auf die MCMV Replikation</i>	60
4.2.1. <i>Einfluss einer MCMV-Infektion auf die Gallensäuren-Zusammensetzung in Leberhomogenaten und Plasma</i>	63
4.3. <i>Gallensäuren-vermittelte Wirkung auf die HCMV-Replikation</i>	68
4.4. <i>Beteiligung Gallensäuren-abhängiger Signalelemente am antiviralen Effekt</i>	70
4.4.1. <i>Der antivirale Effekt ist abhängig vom Gallensäuren-Import</i>	70
4.4.2. <i>Beteiligung nukleärer Gallensäuren-Rezeptoren am antiviralen Effekt</i>	77
4.4.3. <i>Beteiligung bekannter Gallensäuren-Signalwege am antiviralen Effekt von Gallensäuren</i>	81
4.4.4. <i>Gallensäuren beeinflussen nicht die Zellviabilität</i>	85
4.5. <i>Der antivirale Effekt von Gallensäuren ist unabhängig vom IFN-α/β Signalweg</i>	87

<i>4.6. Einfluss von Gallensäuren auf den Replikationszyklus von MCMV</i>	89
<i>4.7. Einfluss von Gallensäuren auf den Proteinmetabolismus infizierter Hepatozyten</i>	96
5. Diskussion	101
<i>5.1. Antivirale Wirkung von Gallensäuren auf den MCMV Replikationszyklus</i>	<i>105</i>
<i>5.2. Effekte von Gallensäuren auf MCMV in vivo</i>	<i>111</i>
<i>5.3. Einfluss von Gallensäuren auf die HCMV-Infektion</i>	<i>113</i>
<i>5.4. Gallensäuren als potenzielle antivirale Substanzen gegen CMV</i>	<i>114</i>
6. Zusammenfassung	116
7. Summary	117
8. Literatur	118
Danksagung	130
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	132

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
ASBT	apikaler Natrium-abhängiger Gallensäuren-Transporter, <i>apical sodium-dependent bile acid transporter</i>
BSA	bovines Serumalbumin
BSEP	Gallensäuren-Exportpumpe; <i>bile salt export pump</i>
CA	Cholsäure
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAR	nukleärer Rezeptor, <i>constitutive androstane receptor</i>
CD95	Fas-Rezeptor, <i>cluster of differentiation 95</i>
CDC	Chenodeoxycholsäure
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO ₂	Kohlendioxid
CYP7A1	Cholesterol-7 α -Hydroxylase
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor, <i>epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK1/2	Mitogen aktivierte-Kinase, <i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
FCS	fötales Kälberserum
FXR	Farnesoid X Rezeptor
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCDC	Glycochenodeoxycholsäure
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
hpi.	Stunden nach der Infektion
H ₂ O	Wasser
HA	humanes Influenzavirus Hämagglutinin

HCMV	humanes Zytomegalievirus
HHV	humanes Herpesvirus
IE	immediate early; sofort expremierte Gene
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon alpha/beta Rezeptor 1
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilo-Dalton
M	Molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCMV	murines Zytomegalievirus, murines Herpesvirus 1
MDR3	ABC-Transporter, <i>Multidrug resistance protein 3</i>
MEF	embryonale murine Fibroblasten
MIEP	Promotor der Gene <i>ie-1</i> , <i>ie-2</i> und <i>ie-3</i> , <i>major immediate early promoter</i>
Min	Minute
miRNA	MicroRNA
mol/l	Mol pro Liter
mTOR	Ziel des Rapamycins im Säugetier, <i>mammalian target of rapamycin</i>
MTT	3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromid
n.s.	nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
nm	Nanometer
NTCP	Natrium-Taurocholat-Cotransporter
OATP	organischer Anionen-Transporter
p	Signifikanzniveau
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Ketten-Reaktion
PFU	Plaque formende Einheiten
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase

PKA	Proteinkinase A
PXR	nukleärer Rezeptor, Pregnan X Rezeptor
RLU	relative Luziferase Einheiten
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rT-PCR	reverse Transkriptase PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRC	Tyrosinkinase, <i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase</i>
TBST	Tris gepufferte Saline mit Tween
TC	Taurocholsäure
TCDC	Taurochenodeoxycholsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGR-5	G-Protein gekoppelter Gallensäure Rezeptor, <i>G-protein coupled bile acid receptor 1</i>
TLC	Taurolithocholsäure
TLCS	Taurolithocholsäure-3-sulfat
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TUDCA	Tauroursodeoxycholsäure
U	Unit, Einheit für Enzymaktivität
UDCA	Ursodeoxycholsäure
v/v	Volume per Volume
VDR	Vitamin D Rezeptor
w/v	Weight per Volume

1. Einleitung

1.1. Leber und Gallensäuren

1.1.1. Aufbau und Funktion der Leber

Die Leber ist mit 1,5-1,8 kg das größte Organ des Menschen. Ihre Hauptaufgabe ist die Verstoffwechslung und Speicherung von Kohlenhydraten, Proteinen und Lipiden, um den Energiebedarf des Körpers zu decken [1]. Die Leber kann als einziges Organ Glukose zu Glykogen metabolisieren und speichern [2]. Aus diesem Glykogen-Speicher kann die Leber dem Körper in Hungerphasen Glukose zur Verfügung stellen, indem das Glykogen durch Glykogenolyse abgebaut wird [3]. Neben Glykogen speichert die Leber eine Reihe von Vitaminen und Mineralstoffen und synthetisiert alle nicht essentiellen Aminosäuren [4, 5]. Aus den mit der Nahrung aufgenommenen Lipiden werden in der Leber Lipoproteine (*very low density lipoproteins*; VLDL) synthetisiert, die über das Blut zum Fettgewebe transportiert werden [4]. Daneben sorgt die Leber für die Entgiftung des Körpers von Schadstoffen, Medikamenten und Stoffwechselprodukten. Diese werden durch Biotransformation wasserlöslich gemacht und so über den Urin oder mithilfe der Gallenflüssigkeit über den Stuhl ausgeschieden [6]. Die Leber ist auch an der Immunantwort beteiligt, da sie über ihre Blutversorgung vom Darm her mit vielen Pathogenen und deren Stoffwechselprodukten in Kontakt tritt. So gelangt beispielsweise mit dem Blut vom Darm bis zu 1 ng/ml Endotoxin in die Leber [7]. Zum einen besitzt die Leber eine gewisse Toleranz gegenüber diesen Immunogenen, zum anderen ist sie aber auch an der Initiation der angeborenen und erworbenen Immunität beteiligt [8].

Die Leber wird über zwei Wege mit Blut versorgt. Nährstoffreiches Blut aus dem Darm gelangt über die Portalvene (*Vena portae*) in die Leber, während die Versorgung mit

Sauerstoff-reichem Blut über die Leberarterie (*Arteria hepatica propria*) erfolgt [9]. Die Leberlappen *Lobus hepatis dexter* und *Lobus hepatis sinister* bestehen aus den etwa sechseckigen Leberlobuli, in deren Mitte eine Zentralvene liegt. In den Ecken, die als Portalfelder bezeichnet werden, befinden sich jeweils ein Gallengang, eine Leber-Arterie und ein Ast der Portalvene. Zwischen der Zentralvene und den Periportalfeldern liegen Hepatozyten, die von Sinusoiden umgeben sind. Zwischen den Hepatozyten befinden sich die Gallengänge, welche die Galle über den *Ductus hepaticus communis* zur Gallenblase ableiten. Von der Gallenblase (*Vesica biliaris*) aus gelangt die Gallenflüssigkeit über den *Ductus choledochus* in den Darm, wo sie für die Verdauung von Nahrungsbestandteilen benötigt wird [10].

Hepatozyten stellen den Hauptzelltyp der Leber dar, daneben findet man Immunzellen wie Kupffer-Zellen, NK-Lymphozyten und T-Lymphozyten. Weitere Zelltypen der Leber sind Sinusoid-Endothelzellen, Cholangiozyten und Sternzellen [11]. Hepatozyten sind polarisierte Epithelzellen, die mit einer Größe von 20-30 µm zu den größten Zellen des Körpers gehören und mehrere Zellkerne besitzen können [12]. Zwischen den Sinusoid-Endothelzellen, welche die Blutgefäße auskleiden und den Hepatozyten liegt der sogenannte Disse'sche Raum. Durch kleine Lücken im Sinusoid-Endothel findet ein Molekülaustausch zwischen dem Disse'schen Raum und dem Sinusoid statt [13]. Im Disse'schen Raum liegen Sternzellen (Ito-Zellen), die Speicherzellen für Vitamin A und Lipide sind. Diese können unter Stresssignalen beispielsweise nach einer Infektion oder Intoxikation zu Myofibroblasten differenzieren [14]. Diese Myofibroblasten bilden Kollagen und inflammatorische Zytokine, wodurch krankhafte Leberveränderungen wie Fibrose und Zirrhose induziert werden [15]. In den Sinusoiden befinden sich Kupfferzellen (leberständige Makrophagen), die Bakterien und Antigene aus dem Pfortaderblut phagozytieren [16]. Zwischen den Hepatozyten befinden sich Canaliculi (Gallengänge) via derer die Galle in die ableitenden Gallenwege abgeführt wird.

Die Gallengänge sind mit Cholangiozyten ausgekleidet. Welche ebenfalls polarisierte Epithelzellen sind und für die Regulation des Galleflusses sorgen [17] (Abbildung 1).

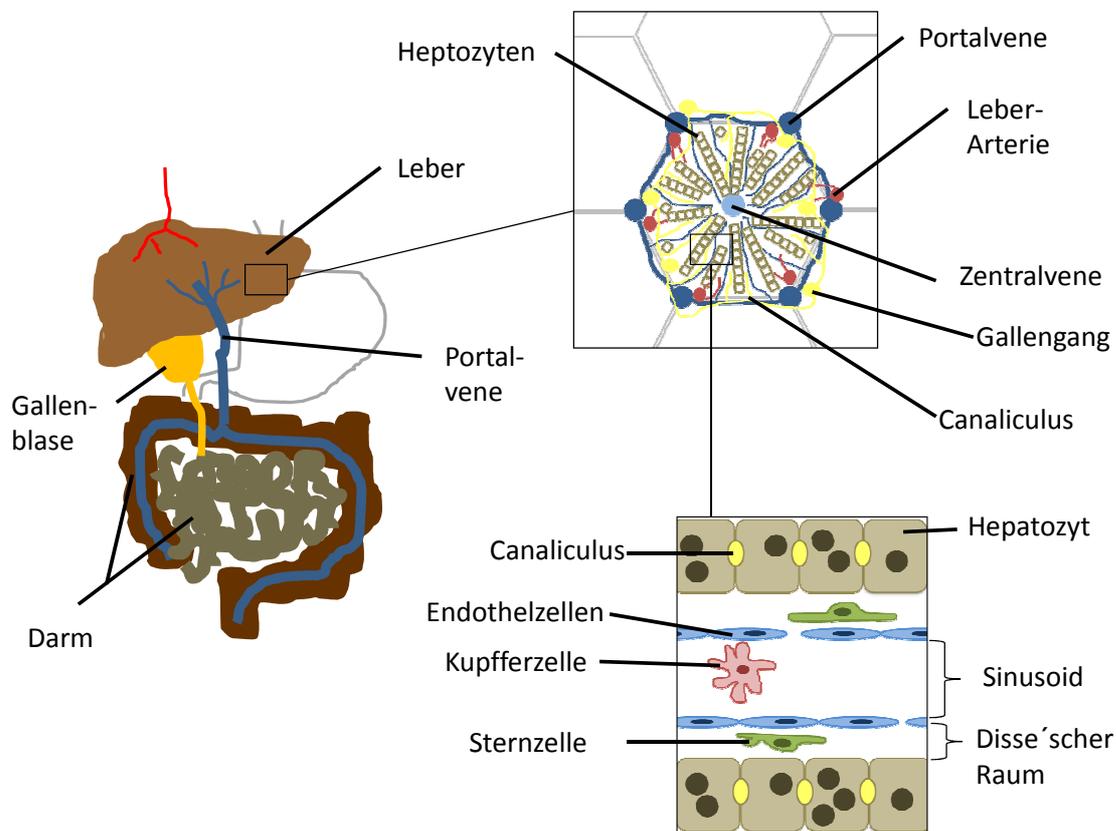


Abbildung 1: Aufbau der Leber.

Die humane Leber besteht aus Leberlappen, die wiederum aus Leberlobuli aufgebaut sind. Diese Leberlobuli haben eine etwa sechseckige Form mit der Zentralvene in der Mitte und Gallengängen, Arterie und Portalvene in den Periportalfeldern. Dazwischen liegen von Sinusoiden umgebene Hepatozyten. Die Sinusoid-Endothelzellen und die Hepatozyten sind voneinander durch den Disse'schen Raum abgegrenzt, in dem Sternzellen angesiedelt sind. Zwischen den Hepatozyten sind Canaliculi ausgebildet, welche die Gallenflüssigkeit abführen. Modifiziert nach: [1, 18, 19]

1.1.2. Gallensäuren-Synthese

Gallensäuren sind amphipathische Moleküle (Abbildung 2), die in den perizentralen Hepatozyten (den Hepatozyten, die der Zentralvene am nächsten sind) aus Cholesterin synthetisiert werden. Die Gallensäuren-Synthese erfolgt über den klassischen und den

alternativen Syntheseweg. An der Gallensäuren-Synthese, die ausschließlich in Hepatozyten stattfindet, sind 17 verschiedene Enzyme beteiligt [20] (Abbildung 3).

R1: Bei Cholsäure ist R1 eine Hydroxygruppe (OH), während Chenodeoxycholsäure an dieser Position ein Wasserstoffatom (H) besitzt.

R2: Bei unkonjugierten Gallensäuren findet man hier eine Hydroxygruppe (OH)

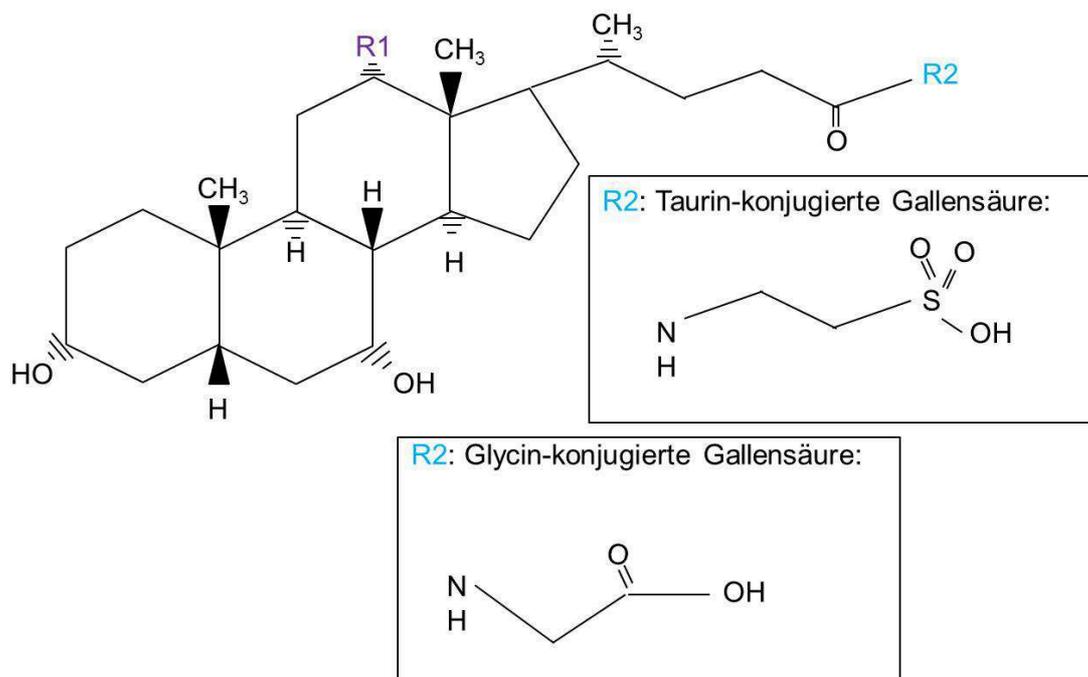


Abbildung 2: Molekularstruktur von Gallensäuren.

Struktur der unkonjugierten primären Gallensäuren Chenodeoxycholsäure (CDC) und Cholsäure (CA), die sich dadurch unterscheiden, dass CA eine Hydroxygruppe mehr besitzt (R1). Bei der Konjugation von CDC und CA zu Taurochenodeoxycholsäure (TCDC) und Taurocholsäure (TC) wird an der Position R2 Taurin angefügt. Bei der Konjugation von CDC und CA zu Glycochenodeoxycholsäure (GCDC) und Glykocholsäure (GC) wird der Rest 2 durch Glycin ersetzt. Modifiziert nach [21]

Beim klassischen Syntheseweg werden im Menschen die beiden primären Gallensäuren Cholsäure (CA) und Chenodeoxycholsäure (CDC) synthetisiert. Über den alternativen Syntheseweg wird nur CDC gebildet [21]. Bei der Maus (*Mus musculus*) wird mit Muricolsäure noch eine weitere primäre Gallensäure gebildet [22]. Bei beiden Synthesewegen wird in einem ersten Schritt Cholesterin durch das Enzym Cholesterin-7 α -Hydroxylase (Cyp7A1) zu 7 α -Hydroxycholesterin oxidiert. Die weitere Synthese erfolgt durch mehrere

enzymatische Modifikationen im endoplasmatischen Retikulum, im Zytosol und den Mitochondrien. Die Endprodukte der Gallensäuren-Synthese sind die an Co-Enzym A gekoppelten primären Gallensäuren CDC und CA [21].

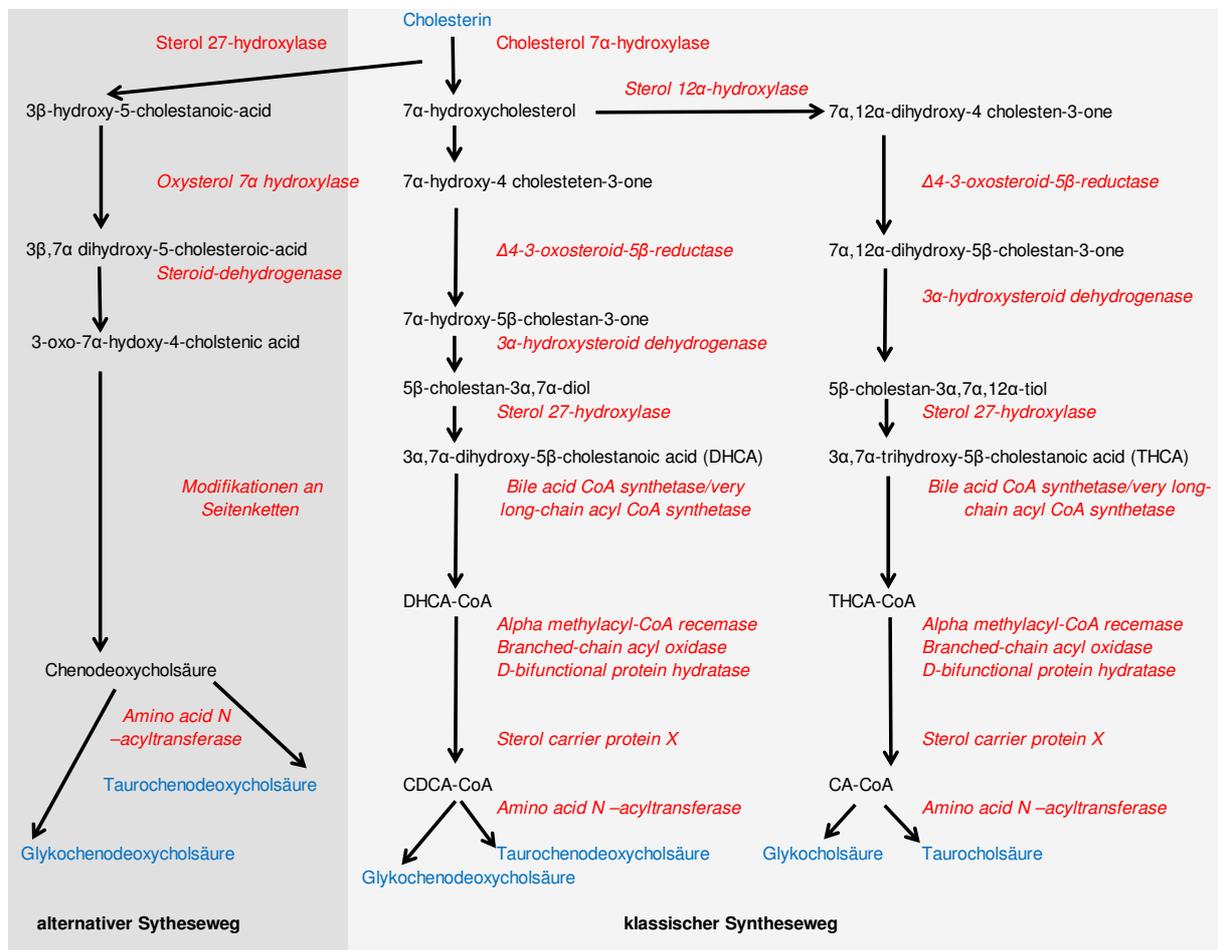


Abbildung 3: Klassischer und alternativer Gallensäuren-Synthese-Weg.

Gallensäuren werden aus Cholesterin synthetisiert, dabei wird in einem 1. Schritt Cholesterin durch das Enzym Cyp7A1 in 7α-Hydroxycholesterin umgewandelt. Als Endprodukte werden beim Menschen CA und CDC gebildet, welche mit Taurin und Glycin konjugiert werden können. Modifiziert nach [21, 23]

In Peroxisomen wird das Co-Enzym A abgespalten, und die primären Gallensäuren werden mit den Aminosäuren Glycin oder Taurin konjugiert [21]. Durch die Konjugation werden sie zu einer impermeablen für die Zellmembran, zum anderen können konjugierte Gallensäuren besser in der Gallenflüssigkeit angereichert werden. Die Konjugation dient außerdem dazu,

einen pH-Wert in der Gallenflüssigkeit zu erreichen, der dem des Darms ähnelt [24]. Daneben sind konjugierte Gallensäuren weniger toxisch und effizienter in der Solubilisierung von Lipiden. Pro Tag wird so beim Menschen ca. 500 mg Cholesterin in Gallensäuren umgewandelt. Dies entspricht 90% des in der Nahrung enthaltenen Cholesterins [20].

Beim Menschen überwiegen hydrophobe Gallensäuren, während bei der Maus eher hydrophile Gallensäuren charakteristisch sind [25]. Die Gallensäuren-Zusammensetzung variiert aber auch abhängig vom Alter und der Ernährung. So findet man bei Säuglingen mehr Taurin-konjugierte Gallensäuren, während beim Erwachsenen Glycin-Konjugate vorherrschen [26]. Neben primären Gallensäuren findet man sekundäre Gallensäuren, wie Lithocholsäure (LCA) oder Deoxycholsäure (DCA), welche durch Modifikationen von primären Gallensäuren durch Bakterien im Darm entstehen [19, 27].

Da Gallensäuren toxisch auf den Organismus wirken können, muss ihre Synthese reguliert werden. Zum einen unterliegt die Gallensäuren-Synthese einem circadianen Rhythmus [28], zum anderen inhibieren Gallensäuren selbst ihre Synthese durch einen negativen Feedbackmechanismus. Dabei aktivieren Gallensäuren den nukleären Farnesoid X Rezeptor (FXR) [29, 30], welcher die Transkription von CYP7A1 unterbindet [31]. Der nach der Nahrungsaufnahme steigende Insulinspiegel wirkt ebenfalls supprimierend auf die Gallensäuren-Synthese. Hohe Cholesterin-Spiegel hingegen scheinen steigernd auf die Gallensäuren-Produktion zu wirken [21].

1.1.3. Enterohepatischer Kreislauf und Gallensäuren-abhängige Signaltransduktion

Die Zirkulation der Gallensäuren zwischen der Leber und dem Darm wird als enterohepatischer Kreislauf bezeichnet (Abbildung 4) [32]. Der Gallensäuren-Pool eines Erwachsenen beträgt etwa 2-3 g, der mehrmals pro Tag im enterohepatischen Kreislauf zirkuliert [24]. Nach der Synthese in den Hepatozyten werden konjugierte Gallensäuren über

die Gallensäuren-Exportpumpe (BSEP) aktiv über die kanalikuläre Membran in die Galle sezerniert [33, 34]. Daneben transportieren Hepatozyten Phospholipide und Bilirubin in die Gallengänge. Bilirubin wird durch den ABC-Transporter *Multidrug resistance-associated protein 2* (MRP2) sezerniert [35]. Phospholipide werden durch den ABC-Transporter *Multidrug resistance receptor 3* (MDR3) in die Galle abgegeben [36]. Daneben werden Cholesterin und Fettsäuren, die weitere Bestandteile der Galle sind, in die Gallengänge transportiert. Hepatozyten und Cholangiozyten geben darüber hinaus Wasser, Salze und Hydrogenkarbonat an die Galle ab, bis die Elektrolytkonzentration der des Blutserums entspricht [4].

Neben ihrer Aufgabe für die Lipidresorption hat die Galle eine wichtige Funktion für die Entgiftung des Körpers. Überschüssiges Cholesterin kann durch die Hepatozyten in die Galle abgegeben und über den Darm ausgeschieden werden. Bilirubin, ein Abbauprodukt des Hämoglobins, wird in der Leber durch Konjugation an Glucuronsäure wasserlöslich gemacht und in die Galle abgegeben [4]. Daneben werden viele Stoffwechselnebenprodukte wie Ammoniak, Medikamente und Gifte über die Galle ausgeschieden. Der Gallefluss wird durch Gallensäuren selbst, Sekretin, Glukagon und Insulin angeregt [37-41].

Nach der Nahrungsaufnahme wird die Galle in den Darm sekretiert. Die Gallensäuren formen im Darm Mizellen mit Lipiden und fettlöslichen Vitaminen aus der Nahrung und fördern so deren Absorption. Daneben sind Gallensäuren an der Aufnahme von Kalzium und Eisen beteiligt [4, 42]. Durch ihre antibakterielle Funktion hemmen Gallensäuren außerdem das Überwachsen des Darms mit Bakterien [43].

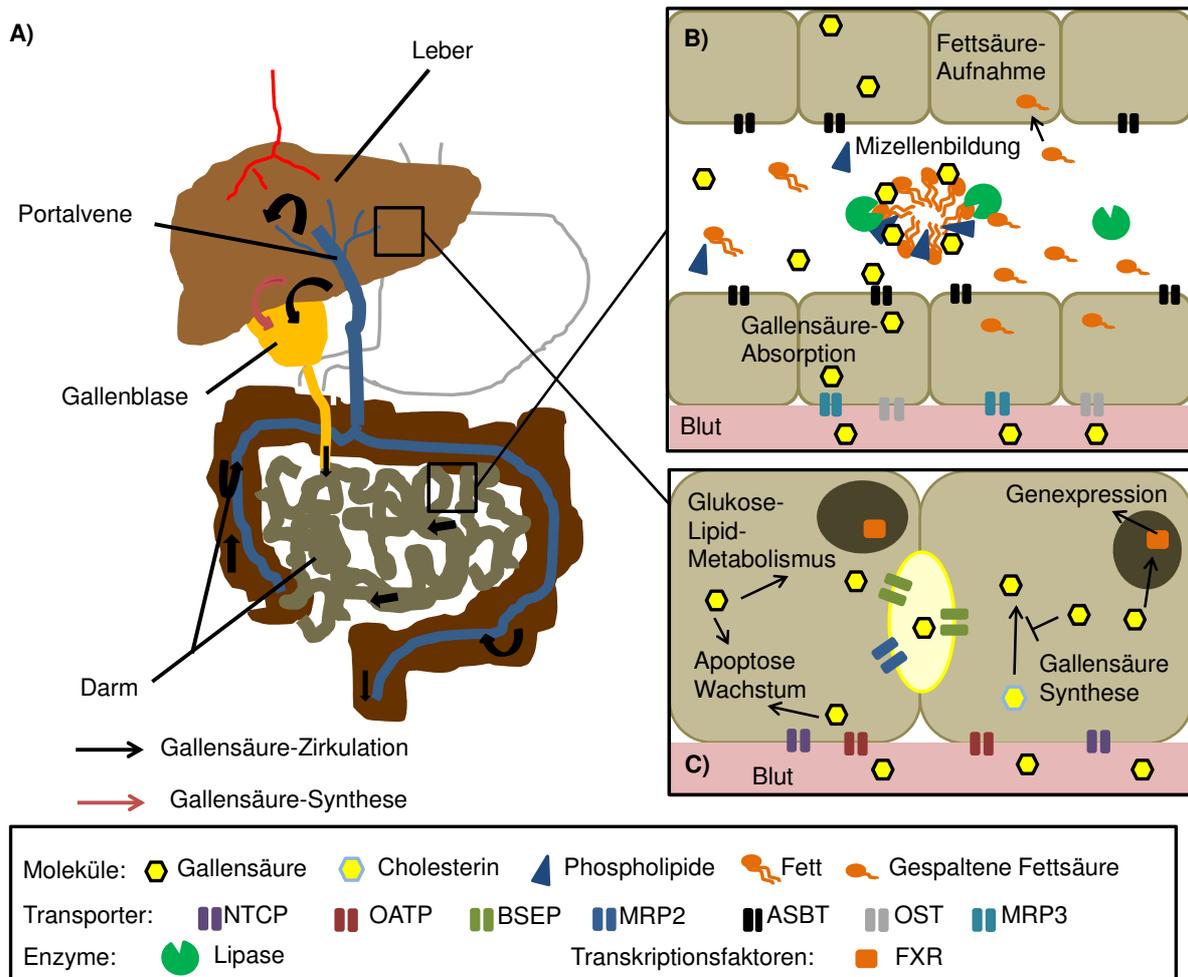


Abbildung 4: Enterohepatischer Kreislauf von Gallensäuren.

(A) Die Gallensäuren werden von den Hepatozyten in die Gallengänge sezerniert und zur Gallenblase transportiert. Nach der Nahrungsaufnahme wird die Galle in den Darm abgegeben. (B) Im Darm bilden Gallensäuren zusammen mit Phospholipiden und den mit der Nahrung aufgenommenen Lipiden Mizellen, an denen Lipasen die Lipide spalten können. Die gespaltenen Fettsäuren werden über die Membran des Darmepithels aufgenommen. Die Darmzellen nehmen die Gallensäuren auf (Import durch den *apical sodium dependent bile acid transporter* (ASBT)) und geben sie an das Blut ab (Export durch den *organic solute transporter* (OST) und das *multidrug resistance associated protein 3* (MRP3)). (C) Über die Pfortader werden die Gallensäuren zurück in die Leber transportiert, wo sie von den Hepatozyten wieder aufgenommen werden. Die Hepatozyten nehmen die Gallensäuren über den Natrium-Taurocholat-Kotransporter (NTCP) und den organischen Anionen-Transporter (OATP) auf. In den Hepatozyten regulieren Gallensäuren eine Vielzahl von Prozessen (u.a. Inhibition der Gallensäuren-Synthese, Steigerung des Gallensäuren-Exports, Veränderungen des Lipid- und Glukose-Metabolismus, Apoptose und Wachstum). Über den Transporter BSEP werden die Gallensäuren wieder in die Galle transportiert. Aus Übersichtsgründen sind in dieser Abbildung die Sinusendothelzellen nicht gezeigt. Modifiziert nach [19, 33, 44]

Im Darm wird ein Teil der Gallensäuren durch intestinale Bakterien in die sekundären Gallensäuren Lithocholsäure (LCA) und Deoxycholsäure (DCA) umgewandelt, indem sie durch bakterielle Enzyme dekonjugiert und dehydroxyliert werden [19, 27]. Durch die Enterozyten des Dünndarms (terminales *Ileum*) werden Gallensäuren aktiv über einen Natrium-abhängigen Gallensäuren-Transporter (*apical sodium-dependent bile acid transporter*, ASBT) aufgenommen [45]. Unkonjugierte Gallensäuren können auch passiv über die Membran diffundieren [21, 24]. 95% der Gallensäuren werden resorbiert, die restlichen 5% werden ausgeschieden und müssen durch Neusynthese ersetzt werden [21]. Der Export der Gallensäuren aus den Enterozyten in das Pfortaderblut erfolgt über den intestinalen Gallensäuren-Transporter *organic solute transporter α/β* (OST α/β) [46] und den ABC-Transporter *multidrug resistance associated protein 3* (MRP3) [47]. Mit dem Pfortaderblut gelangen die Gallensäuren zurück zur Leber. Dabei liegt der Serum-Gallensäuren-Spiegel eines gesunden Menschen bei unter 10 $\mu\text{mol/l}$ [21] und bei Mäusen zwischen 0,4-15 $\mu\text{mol/l}$ [22]. Während des Transportes im Blut sind die Gallensäuren teilweise an Proteine wie Albumin gebunden [24].

Aus dem Blut der Pfortader werden die Gallensäuren durch verschiedene Transporter in die Hepatozyten aufgenommen, wobei während der ersten Zirkulation 50-90% der Gallensäuren resorbiert werden [21, 24]. 80% der Gallensäuren werden zusammen mit Natriumionen aktiv durch den Natrium-Taurocholat-Kotransporter (*sodium-taurocholate cotransporting polypeptide*, NTCP) intrazellulär aufgenommen [21, 48]. Unkonjugierte Gallensäuren können auch durch einen Transporter für organische Anionen (*organic anion transporter*, OATP) in die Zellen transportiert werden [49]. Der Gallensäuren-Transport in die Hepatozyten wird durch die Gallensäuren selbst reguliert. So führen einige Gallensäuren zur Internalisierung des NTCP [50]. Daneben wird die NTCP-Expression durch die Aktivierung

des FXR supprimiert [51]. Intrazellulär binden Gallensäuren wahrscheinlich an bisher noch nicht genauer charakterisierte Gallensäuren-bindende Proteine und steuern eine Reihe von Signalkaskaden [25, 40, 41, 52-60]. Dabei aktivieren Gallensäuren nukleäre Rezeptoren wie den FXR [29, 30], den Vitamin D Rezeptor (VDR) [61], den *constitutive androstane receptor* (CAR) [62] und den Pregnan-X-Rezeptor (PXR) [63].

Der FXR reguliert die Gallensäuren-Synthese, den Gallensäuren-Export und Entgiftungsprozesse der Leber. Aktiviert durch Gallensäuren induziert FXR die Expression der Transporter BSEP [64], MDR3 [65] und *multidrug resistance-associated protein 2* (MRP2) [66, 67], wodurch die Sekretion der Gallebestandteile verstärkt wird. Außerdem reduziert FXR die Neusynthese von Gallensäuren, indem die Expression des Enzyms CYP7A1 inhibiert wird [31, 68]. Der FXR hat darüber hinaus Einfluss auf den Lipid- und Glukose-Metabolismus. Der Vitamin D Rezeptor und der *constitutive androstane receptor* induzieren die Expression des Transporters MDR3 und der Enzyme Sulfotransferase (SULT2A1) und Cytochrom P450 (CYP3A4). Die Sulfotransferase und Cytochrom P450 (CYP3A4) sind an der Sulfatierung und Hydroxylierung von Gallensäuren beteiligt und tragen somit zum Metabolismus und zur Entgiftung von Gallensäuren bei [69]. Darüber hinaus inhibieren der *constitutive androstane receptor* und der Pregnan-X-Rezeptor die Expression von CYP7A1 [70].

Neben nukleären Rezeptoren aktivieren Gallensäuren abhängig von ihrer Konzentration, Konjugation und Polarität eine Reihe von zellulären Signalelementen. So induzieren konjugierte Gallensäuren die Glykogen-Synthese über die Aktivierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren und der Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K) [71] und nehmen somit Einfluss auf den Glukosemetabolismus.

Gallensäuren haben Einfluss auf die Zellviabilität. Hydrophobe Gallensäuren führen zur Induktion von Fas-Rezeptor (*cluster of differentiation 95*; CD95) Liganden-unabhängiger Apoptose in Hepatozyten. Dabei induzieren Gallensäuren die Synthese reaktiver Sauerstoffspezies, welche direkt oder indirekt zur Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) und der Tyrosin-Proteinkinase YES führen [53, 56]. Dies bewirkt die Translokation und Oligomerisierung des CD95-Rezeptors an der Plasmamembran und führt zur Aktivierung von CD95-abhängigen Signalkaskaden. Daneben führt die Induktion von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidasen durch Gallensäuren zu einer Reduktion des Zellvolumens, wodurch ebenfalls pro-apoptotische Signalelemente aktiviert werden [54, 55].

Eine Reihe von Gallensäuren medieren gleichzeitig sowohl pro- als auch anti-apoptotische Signalwege. So führt Taurochenodeoxycholsäure (TCDC) neben der Phosphorylierung des CD95-Rezeptors auch zur Induktion des PI3K-Signalwegs, welcher die Hepatozyten vor Apoptose schützt [57]. Neben dem pro-apoptotischen JNK1-vermittelten Signalweg aktiviert Deoxycholsäure zusätzlich die durch extrazelluläre Signale regulierte Kinase (ERK) und JNK2. ERK und JNK2 schützen die Zellen vor Apoptose, indem die Expression Apoptose-regulierender Gene induziert wird [72]. Die hydrophile Gallensäure Tauroursodeoxycholsäure (TUDCA) aktiviert PI3K, p38^{MAPK} und ERK und wirkt so toxischen Effekten anderer Gallensäuren entgegen [40, 73]. Dabei reduziert TUDCA die Translokation des CD95-Rezeptors in die Plasmamembran und hemmt die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies [74]. Gleichzeitig wird der Einbau von BSEP in die Zellmembran verstärkt, sodass mehr Gallensäuren in die Canaliculi abgegeben werden [75]. Wegen dieser protektiven Eigenschaften wird UDCA auch therapeutisch bei Cholestase eingesetzt [41, 76].

Für Gallensäuren wurde außerdem ein membranständiger Rezeptor beschrieben [77, 78], der im Gegensatz zu Gallensäuren-Transportern auf einer Vielzahl von Zellen, wie Makrophagen, Monozyten, Plazentazellen, im braunen Fettgewebe und auf Cholangiozyten exprimiert wird [77, 79-83]. Die Bindung von Gallensäuren an den G-Protein gekoppelten Gallensäuren-Rezeptor (TGR-5) führt über die Steigerung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) [77, 82]. Im braunen Fettgewebe führen Gallensäuren über den TGR-5 zu einer Erhöhung des Energieumsatzes und beugen so einer Insulin-Resistenz und Übergewicht vor [79]. In Immunzellen führt der TGR-5 zu einer Repression der Immunantwort [77, 82, 84]. In der Leber schützt die Aktivierung des TGR-5 die Sinusoidendothelzellen und die Cholangiozyten vor toxischen Gallensäuren-Konzentrationen, indem zum einen die Sekretion der Galle in die Gallengänge verstärkt wird und zum anderen anti-apoptische Signalelemente induziert werden [85].

Veränderte Gallensäuren-Zusammensetzungen beziehungsweise eine Erhöhung der Gallensäuren-Konzentration können durch verschiedene pathophysiologische Bedingungen verursacht werden und führen zu einer Leberschädigung. Ist der Gallefluss oder die Sekretion anderer in der Galle enthaltener Stoffe wie Bilirubin, Cholesterin und Phospholipiden gestört, spricht man von einer Cholestase. Dabei wird die Leber hohen Gallensäuren-Konzentrationen ausgesetzt, welche die Leber schädigen [86]. Außerdem wird die Lipid- und Vitamin-Aufnahme im Darm gestört, da die Gallensäuren-Konzentrationen im Darm für deren Resorption zu niedrig sind. Zum anderen steigen die Gallensäuren- und Bilirubin-Konzentrationen im Serum, wodurch ein Ikterus (Gelbsucht) entsteht [11]. Eine Cholestase kann zum einen erblich bedingt sein, beispielsweise durch Mutationen in Genen, die für die Synthese, die Konjugation und den Transport von Gallensäuren und Galle-pflichtigen

Substanzen verantwortlich sind [24, 87]. Zum anderen kann die Sekretion von Gallebestandteilen in den Darm durch Gallensteine oder Tumore gestört sein, wodurch die Galle in die Leber zurückgestaut wird. Dazu kommt es auch, wenn die Gallengänge durch Autoimmunerkrankungen zerstört werden, wie bei der primär biliären Zirrhose oder der primär sklerosierenden Cholangitis. Bei der primär biliären Zirrhose sind davon vor allem die kleinen Gallengänge betroffen [88], während bei der primär sklerosierenden Cholangitis größere intra- und extrahepatische Gallengänge zerstört werden [89]. Eine Cholestase kann auch durch Virusinfektionen der Leber mit dem Zytomegalievirus [90, 91], dem Epstein-Barr-Virus [92], dem Hepatitis B Virus [93, 94] oder dem Hepatitis C Virus [95] verursacht werden.

1.1.4. Einfluss von Gallensäuren auf das Immunsystem und die Replikation von Viren

Gallensäuren können das Immunsystem modulieren. Dabei inhibieren Gallensäuren in Hepatozyten die Interferon (IFN)-abhängige Signaltransduktion, indem sie die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *signal transducers and activators of transcription 1* (STAT-1) unterbinden [96]. Gallensäuren können außerdem den Interleukin-6 Signalweg in Hepatozyten inhibieren, welcher eine entscheidende Rolle bei der Akut-Phase-Antwort hat [97]. Unter cholestatischen Bedingungen werden eine Reihe pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine in der Leber exprimiert, die an der Manifestation der Leberschädigung beteiligt sind [98]. Neben Hepatozyten werden auch Immunzellen durch Gallensäuren beeinflusst. Dendritische Zellen und Makrophagen produzieren in Anwesenheit von Gallensäuren weniger inflammatorische Zytokine [77, 83, 99]. Darüber hinaus führt die Reduktion der Synthese von inflammatorischen Zytokinen durch Gallensäuren bei Makrophagen zur Ausbildung eines regulatorischen Phänotyps [84]. Andererseits werden Gallensäuren-abhängige Signalwege durch das Immunsystem moduliert. So wird

beispielsweise nach der Aktivierung des *Toll-like* Rezeptors 9 (TLR-9) die Expression des nukleären Gallensäuren-Rezeptors FXR in intestinalen Zellen herunterreguliert [100].

Gallensäuren können die Replikation des Hepatitis C Virus (HCV) beeinflussen. Es wird der Familie der *Flaviviridae* zugeordnet und ist ein einzelsträngiges Ribonukleinsäure (RNA)-Virus. Eine chronische Hepatitis C Infektion trägt zur Entwicklung einer Leberzirrhose und von hepatozellulären Karzinomen bei. Patienten mit hohen Serum-Gallensäuren-Spiegeln sprechen schlechter auf eine IFN-Therapie an als Patienten mit normalen Gallensäuren-Spiegeln [101]. Es konnte gezeigt werden, dass die Replikation von Hepatitis C Viren durch unkonjugierte und sekundäre Gallensäuren gesteigert werden kann. Dabei scheint die Virusreplikation durch die Gallensäuren-abhängige Aktivierung des FXR induziert zu werden [102, 103]. Außerdem können Gallensäuren über den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)/ERK Signalweg die Transkriptionsfaktoren *activator protein-1* (AP-1) und *sterol regulatory element* (SRE) aktivieren, wodurch die Hepatozyten zur Proliferation angeregt werden. Da Hepatitis C Viren überwiegend während der Phase der Zellteilung repliziert, fördern Gallensäuren über die Steigerung der Proliferation die Replikation von Hepatitis C [104].

Neben Hepatitis C wird auch die Replikation von Hepatitis B durch Gallensäuren beeinflusst. Die Infektion mit dem Hepatitis B Virus (HBV) führt zu einer akuten oder möglicherweise chronifizierenden Hepatitis, wobei im Rahmen einer chronischen Infektion eine Leberzirrhose und hepatozelluläre Karzinome bedingt werden können. Gallensäuren und FXR-Agonisten führen zu einer Induktion der viralen Genexpression und DNA-Replikation, welche über die Aktivierung des FXR vermittelt wird. Die Induktion der Transkriptionsfaktoren *activator protein-1* (AP-1) und *CCAAT/enhancer-binding-protein* (C/EBP) durch Gallensäuren führt ebenfalls zu einer Steigerung der Virusreplikation [105,

106]. Neben der proviralen Wirkung von Gallensäuren auf das Hepatitis B Virus wurde der Gallensäuren-Transporter NTCP als Rezeptor für Hepatitis B und Hepatitis D beschrieben, über den die Viren an die Zelle anlagern und eindringen können [107, 108].

Neben Hepatitis B und C, werden weitere Viren durch Gallensäuren beeinflusst. So konnte die Gabe von Gallensäuren und FXR-Agonisten die Replikation von Rotaviren im Darmepithel von Mäusen reduzieren. Rotaviren sind RNA-Viren, die vor allem bei Kindern schwere Gastroenteritiden verursachen können [109]. In einem *in vivo* Versuch mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Viruslast im Kot durch die Fütterung von CDC reduziert werden konnte. Rotaviren replizieren am stärksten, wenn die Triglyzerid-Konzentration in den infizierten Zellen hoch ist. Es wird vermutet, dass Gallensäuren die durch Rotaviren-induzierte Akkumulation von Triglyzeriden reduzieren können und so die Virusreplikation inhibieren [110].

Des Weiteren kann die Replikation des Schweine Calicivirus (*porcine enteric calicivirus*, PEC) durch die Gabe von Gallensäuren induziert werden. Beim Schweine Calicivirus handelt es sich um ein nicht umhülltes RNA-Virus. Die Replikation des Schweine Calicivirus wird durch Gallensäuren gesteigert, indem der Interferon-Signalweg unterbrochen wird. Gallensäuren hemmen dabei die Phosphorylierung von STAT-1 und unterbinden dadurch die antivirale Wirkung von Interferon- α (IFN- α) [111].

Eine antivirale Wirkung von Gallensäuren konnte für Influenza A, ein einzelsträngiges RNA-Virus, gezeigt werden. Die hydrophile Gallensäure TUDCA hemmt die Virusreplikation in Epithelzellen der Bronchien, indem die durch das Virus verursachte Stress-Antwort des endoplasmatischen Retikulums vermindert wird [112].

1.2. Zytomegalievirus

1.2.1. Die Familie der Herpesviren

Herpesviren sind umhüllte Viren mit einem linearen DNA-Genom, welche die Eigenschaft haben nach der Infektion im Körper eine lebenslange Latenz aufzubauen, aus der sie immer wieder reaktivieren können. Man unterscheidet zwischen Alpha-, Beta- und Gamma-Herpesviren. Zu den humanen Alpha-Herpesviren gehören Herpes simplex 1 (HSV1/Humanes Herpesvirus 1 (HHV1)), Herpes simplex 2 (HSV2/HHV2) und das Varizella Zoster Virus (VZV/HHV3). Der Gruppe der Beta-Herpesviren werden drei human-pathogene Viren, das Zytomegalievirus (HCMV/HHV5), das Herpesvirus 6 (HHV6, 3-Tagesfieber) und das Herpesvirus 7 (HHV7) zugeordnet. Das Epstein-Barr-Virus (EBV/HHV4) und das humane Herpesvirus 8 (HHV8; Kaposi Sarkom Herpesvirus) hingegen zählen zu den Gamma-Herpesviren [113, 114].

1.2.2. Das Zytomegalievirus und der virale Replikationszyklus

Das 1956 zum ersten Mal isolierte Zytomegalievirus (CMV) ist etwa 200-300 nm groß und besitzt ein ca. 230 kbp großes doppelsträngiges lineares DNA-Genom. Das Genom ist von einem ikosaedrischen Kapsid umschlossen, welches wiederum von einer Membranhülle umgeben ist. Diese Hülle besteht hauptsächlich aus Bestandteilen der Wirts-Zellmembran und viralen Glykoproteinen [114, 115]. Zwischen der Hülle und dem Kapsid liegt das Protein-haltige Tegument. Es beinhaltet etwa die Hälfte der ca. 70 Proteine, die in infektiösen CMV-Partikeln gefunden werden [116]. Daneben finden sich bis zu 70 verschiedene zelluläre Proteine sowie zelluläre und virale mRNAs im Virus-Partikel [117].

Die Infektion mit CMV erfolgt über den Kontakt mit Körperflüssigkeiten wie Speichel, Urin, Sperma, Genitalsekret, Blut und Muttermilch infizierter Personen oder durch

Organ- bzw. Stammzell-Transplantationen [118, 119]. CMV hat einen breiten Zelltropismus und infiziert unter anderem Endothel- und Epithel-Zellen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten, neuronale Zellen, Hepatozyten und Zellen des Immunsystems wie Makrophagen und dendritische Zellen sowie deren Vorläuferzellen (Monozyten) [120-122]. Da HCMV strikt Spezies spezifisch ist, wird das murine Zytomegalievirus (MCMV) häufig als Modelorganismus verwendet, um zelluläre und molekulare Mechanismen der Infektion *in vivo* aufzudecken. Dabei weist MCMV aus genetischen und infektiologischen Gesichtspunkten große Ähnlichkeit zu HCMV auf [123-126]. Schon kurz nach einer MCMV-Infektion kann man eine Virusreplikation in der Leber nachweisen. In einem MCMV-Modell für die Reaktivierung aus der Latenz im Rahmen einer Immunsuppression war die Leber das erste Organ, in dem MCMV nachgewiesen werden konnte [127]. Als Ort der Latenz in der Leber werden die Sinusendothelzellen vermutet [128].

Die Infektion ist in immunkompetenten Patienten meist asymptomatisch oder von geringen Symptomen wie einem zahlenmäßigen Anstieg der Lymphozyten, Fieber, Abgeschlagenheit, Lymphknotenschwellung, Leberschwellung und Gliederschmerzen begleitet [115]. Danach verbleibt das Virus lebenslang latent im Körper und kann periodisch reaktivieren [119]. Schätzungen gehen davon aus, dass 50-90% der Welt-Bevölkerung mit HCMV infiziert sind [118]. In einigen wenigen Fällen führt eine CMV-Infektion selbst bei scheinbar immunkompetenten Personen zu schweren Krankheitsverläufen wie einer Hepatitis, Kolitis, Meningitis, Encephalitis, Myelitis, Lähmungen, hämolytischen Anämien, Thrombosen, Pneumonien und Retinitis [122, 129]. Daneben gibt es Hinweise, dass HCMV an der Progression von malignen Gliomen, Prostatakarzinomen und Kolorektalkarzinomen beteiligt ist [130-132]. Es wird auch vermutet, dass HCMV mit zunehmendem Alter zu einer Schwächung des Immunsystems führt. Im Alter werden immer weniger neue T-Zellen gebildet, wobei nach einer Infektion mit HCMV ein großer Teil der T-Zellen gegen HCMV

gerichtet sind, sodass weniger T-Zellen zur Verfügung stehen, um auf neue Infektionen zu reagieren. So sprechen HCMV-positive ältere Menschen auf Schutz-Impfungen gegen andere Erreger schlechter an und können Infektionen weniger gut kontrollieren [133, 134].

Besonders häufig treten symptomatisch verlaufende Zytomegalievirus-Infektionen bei Säuglingen, deren Immunsystem noch nicht voll entwickelt ist, und bei immunsupprimierten Patienten auf [119]. Nach einer Infektion des Embryos über die Plazenta infizierter Mütter führt die Infektion in etwa 11% der Neugeborenen zu Hörverlusten, Blindheit und schweren Schädigungen des Gehirns. Daneben kommt es zu Hepatitiden und Pneumonien [115, 135, 136]. In den USA werden jährlich ca. 28.000 Kinder mit einer Zytomegalievirus-Infektion geboren. Bei ca. 150 von ihnen führt die Zytomegalievirus-Infektion zum Tod und ca. 5500 Kinder erleiden eine bleibende Behinderung [135]. Des Weiteren wird die bei Neugeborenen auftretende Gallengangsatresie (*biliary atresia*), bei der es zu einer andauernden Entzündung der Gallengänge und Fibrose kommt, mit HCMV in Verbindung gebracht. Dabei werden infolge einer HCMV-Infektion T-Zellen aktiviert, die sich spezifisch gegen die Gallengänge richten [137].

Bei Immundefizienz-Virus (HIV)-positiven Patienten, die keine antiretrovirale Therapie erhalten, kommt es bei bis zu 40% der Erkrankten zu einer HCMV Reaktivierung. Besonders häufig treten Retinitiden und Hepatitiden sowie Entzündungen des Gastrointestinaltraktes, Enzephalopathien und Pneumonien auf. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass eine HCMV-Infektion die Progression der HIV-Krankheit (*acquired immune deficiency syndrome*; AIDS) beschleunigt [115, 138].

HCMV gehört zu den häufigsten Infektionsursachen nach einer Transplantation. Dabei kommt es vor allem zu Infektionen, wenn der Organspender HCMV-positiv der Organempfänger jedoch HCMV-negativ ist. Neben den schon beschriebenen Symptomen

einer HCMV-Infektion begünstigt die Infektion ein Organ-Versagen des Transplantats oder kann langfristige Fehlfunktionen des Organs verursachen [139]. Nach Lebertransplantationen führt eine HCMV-Erkrankung häufig zur Destruktion der Gallengänge [115, 140]. In einer Studie mit Hepatitis C -erkrankten Patienten, die eine Lebertransplantation erhielten, hatten Personen, die an einer HCMV-Infektion erkrankten, ein vierfach erhöhtes Risiko für ein Leberversagen als Patienten, die keine Anzeichen einer akuten HCMV-Infektion zeigten [141].

HCMV wird hauptsächlich mit den Guanosinanalogen Ganciclovir bzw. Valganciclovir therapiert, wobei letzteres eine bessere Bioverfügbarkeit als Ganciclovir besitzt. Ganciclovir wird intrazellulär durch virale und zelluläre Kinase phosphoryliert und führt zum Abbruch der DNA-Replikation von HCMV [142, 143]. Durch Mutationen in der viralen Kinase UL97 treten häufig Ganciclovir Resistenzen auf [144]. Weitere Medikamente gegen Zytomegaloviren sind Cidofovir, Foscarnet und Fomivirsen. Cidofovir ist ein Cytosin analog, das durch zelluläre Kinasen aktiviert wird und zum Abbruch der DNA-Replikation führt, indem es in den wachsenden DNA-Strang eingebaut wird. Das Pyrophosphat analog Foscarnet inhibiert die virale DNA-Polymerase, indem es mit natürlichen Substraten um die Bindung an die Pyrophosphatbindestelle konkurriert [145]. Nachteilig ist das Foscarnet und Cidofovir toxisch auf die Nieren wirken und Cidofovir eine geringe orale Bioverfügbarkeit hat [144]. Fomivirsen ist ein Oligonukleotid, das an einen Bereich einer direkt nach der Infektion exprimierten viralen RNA bindet [122] und somit HCMV zu einem früheren Zeitpunkt im Replikationszyklus inhibiert als andere Medikamente. Eine frühe Inhibition der CMV-Replikation ist wünschenswert, da die direkt nach der Infektion exprimierten Genprodukte (*immediate early* Gene (IE)) von CMV großen Einfluss auf die zelleigene Genexpression nehmen und das Immunsystem modulieren [122, 146]. Für die

Behandlung von HCMV-Infektionen *in utero* bekommen die Mütter HCMV-spezifisches Hyperimmunglobulin, wodurch kongenitale Schäden reduziert werden können [147].

Der virale Replikationszyklus von CMV ist in Abbildung 5 dargestellt. Beim Eintritt des Virus in die Zelle (*Entry*) kommt es zuerst zum sogenannten *tethering*, bei dem das Virus mit seinen Glykoprotein-Komplexen gB [148] und gM/gN [149] mit Heparansulfat-Proteoglykanen [150] der Zelloberfläche in Kontakt tritt. Danach erfolgt die Bindung an einen oder mehrere zelluläre Rezeptoren. Frühe Daten legten nahe, dass der EGFR als *Entry*-Rezeptor genutzt wird [151], neuere Daten konnten dies aber für HCMV jedoch nicht bestätigen [152].

Zurzeit wird der Wachstumsfaktor-Rezeptor *Platelet-derived growth factor receptor* (PDGF-R) als *Entry*-Rezeptor diskutiert [154], daneben kommen auch Integrine infrage [155]. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass je nach Zelltyp, verschiedene *Entry*-Mechanismen von CMV genutzt werden [156]. So werden für Fibroblasten bzw. Endothel- und Epithelzellen verschiedene *Entry*-Prozesse beschrieben. Für das *Entry* in Fibroblasten interagieren Glykoproteine der Virushülle mit zellulären Rezeptoren, wodurch die zelluläre Membran mit dem Virus verschmilzt und das Kapsid, welches vom Tegument umhüllt ist, ins Zytoplasma übergeht. In Endothel- und Epithel-Zellen dagegen ist die pH-Wert abhängige Endozytose für das *Entry* entscheidend. Nach dem *Entry* wird das Kapsid über Mikrotubuli zur Kernpore transportiert, durch welche die virale DNA in den Nukleus aufgenommen wird [116, 157].

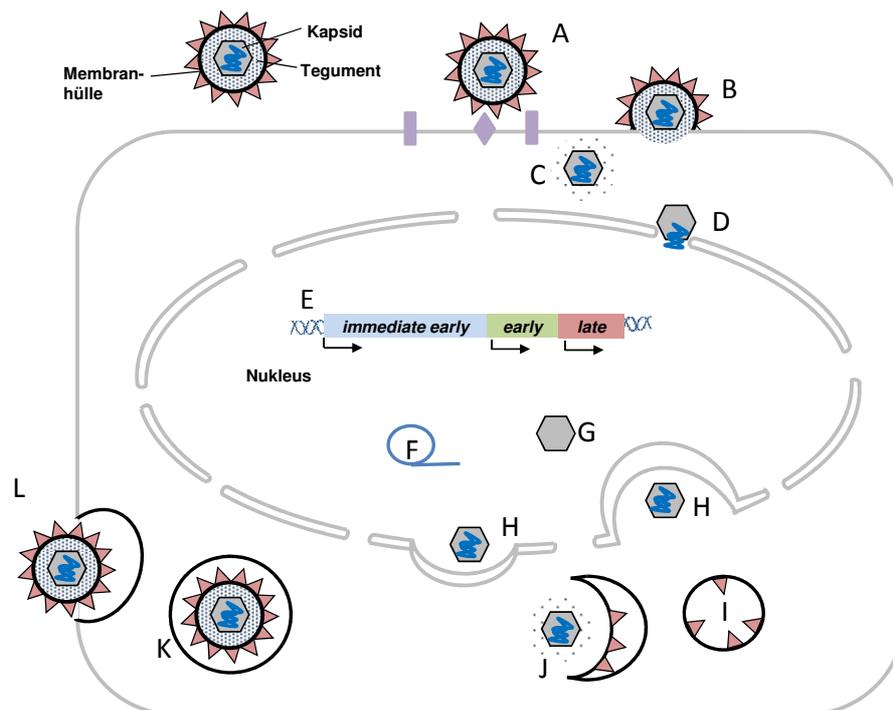


Abbildung 5: Replikationszyklus von CMV.

Der Viruspartikel tritt mit der Zellmembran in Kontakt bis virale Proteine an Integrine und den Entry-Rezeptor binden (A/B). Die Virusmembran verschmilzt mit der Zellmembran und das Tegument wird abgebaut. Danach wird das Kapsid zum Nukleus transportiert und die DNA über die Kernpore aufgenommen (C/D). Im Nukleus startet die *immediate early* Genexpression, welche die *early* Genexpression initiiert (E). Die *early* Genprodukte induzieren die Replikation des viralen Genoms (F). Nach der DNA-Replikation erfolgt die Expression der *late* Gene. Im Nukleus wird das Kapsid zusammengesetzt und nimmt die virale DNA auf (G). Daraufhin wird das Tegument zur inneren Kernmembran transportiert und umgeben von der inneren Kernmembran in den perinukleären Raum aufgenommen. Die Vesikel der inneren Kernmembran verschmelzen mit der äußeren Kernmembran und das Kapsid wird in das Zytoplasma abgegeben (H). Im Zytoplasma wird das Kapsid mit Tegumentproteinen umhüllt und von einer Vesikelmembran (I) umgeben, welche die viralen Membranproteine trägt (J). Das fertige Virus liegt intrazellulär in Vesikeln (K) vor, die mit der Zellemembran verschmelzen, um das Virus freizusetzen (L). Modifiziert nach: [153]

HCMV besitzt mindestens 750 offene Leseraster und kodiert für mehrere MicroRNAs (miRNA) [158, 159]. Direkt nach der Infektion beginnt die Expression der Gene, die als *immediate early* (ie) Gene charakterisiert werden. Dabei sind bei HCMV vor allem IE1-72 und IE2-86 von Bedeutung, deren Expression unter der Kontrolle des *major immediate early promoters* (MIEP) steht und die durch differenzielles Spleißen der gleichen prä-mRNA

entstehen [160]. MCMV besitzt drei *immediate early* Genprodukte IE1-89, IE2 und IE3-88, die unter der Kontrolle des MIEP exprimiert werden. IE3-88 und IE1-89 entstehen ebenfalls durch differenzielles Spleißen, während IE2 das Produkt einer separaten mRNA ist [161]. Die *immediate early* Gene sind entscheidend für den Ablauf des viralen Replikationszyklus und müssen in der Latenzphase streng reguliert werden. Sie modulieren die zelluläre Gen- und Protein-Expression, wodurch die angeborene und adaptive Immunantwort [162] beeinträchtigt wird. Außerdem fungieren die *immediate early* Proteine als Transaktivatoren für virale Promotoren der frühen (*early*) Gene. Die früh (*early*) exprimierten Gene regulieren unter anderem die virale DNA-Replikation. Das virale Genom repliziert über einen sogenannten *rolling circle* Mechanismus, an dem mindestens 11 viral codierte Proteine beteiligt sind [163]. Nach der DNA-Replikation werden die späten (*late*) Gene exprimiert [116], bei denen es sich hauptsächlich um Strukturproteine des Viruspartikels handelt [164].

Nach der späten (*late*) Genexpression werden neue Viruspartikel gebildet. Dieser Prozess ist noch nicht vollständig verstanden und teilweise nur an anderen Herpesviren untersucht worden, weshalb sich der folgende Abschnitt auf Herpesviren allgemein bezieht. Das Kapsid wird autokatalytisch im Zellkern zusammengesetzt [153]. Das HCMV Kapsid besteht aus den Proteinen UL86, UL85, UL46 und UL48,5 [165-167]. Die virale DNA wird mithilfe weiterer viraler Proteine in das Kapsid transportiert. Wie das Kapsid die nukleäre Membran passiert und in welchen Zellkompartimenten das Tegument und die virale Membran an das Kapsid angelagert werden wird kontrovers diskutiert. Im Folgenden wird die *envelopment-deenvelopment-reenvelopment*-Theorie erläutert, welche derzeit am akzeptiertesten ist. Über Aktin-Filamente bewegt sich das Kapsid zur inneren Kernmembran, deren Lamina durch virale Proteine rearrangiert werden, sodass das Kapsid in den perinukleären Raum gelangt [168]. Im perinukleären Raum ist das Kapsid von der inneren

nukleären Membran umgeben. Wahrscheinlich fusioniert die innere nukleäre Membran mit der äußeren nukleären Membran, wodurch das Kapsid ins Zytoplasma gelangt [153, 169]. Im Zytoplasma wird das Kapsid von den Tegumentproteinen umgeben und über zelluläre Motorproteine transportiert. Seine Membranhülle erhält das Virus indem es von Vesikeln des Golgi-Apparates, welche die viralen Membranproteine tragen, umgeben wird. Die fertigen Viruspartikel werden wahrscheinlich durch die Fusion der Vesikelmembran mit der Zellmembran freigesetzt [153]. Vieles spricht dafür, dass die meisten Viruspartikel die Zelle nicht verlassen, sondern direkt in Nachbarzellen übertreten [122].

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Autoklav	Steritec KSG112	Steritec, Kleve, Deutschland
Blottingkammern	Semi-dry-transfer-Horizontalapparat Multipor 2	Pharmacia, Freiburg, Deutschland
Chemilumineszenz Messgerät	Berthold Mithras LB940	Berthold, Bad Wildbad, Deutschland
Elektrophorese Kammern	507-1, Z37	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Film-Entwicklermaschine	Curix60 AGFA	AGFA, Köln, Deutschland
Kamera		Canon, Krefeld, Deutschland
Magnetrührer	RCT Basic	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Mikroskop	ID03	Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop	Eclipse TS100	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
PCR Gerät	Biometra T3000 Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
pH-Meter	Ino-Lab pH Level 1	Wissenschaftlich- technische Werkstätten, Weilheim, Deutschland
Photometer	Ultraspec 2100 pro	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
Power Supply	Electrophoresis Power Supply	Pharmacia Biotech, Karlsruhe, Deutschland
Real Time PCR Gerät	Abbott M2000 RT	Abbott, Illinois, USA
Schüttler	Rollschüttler Assistent RM 5	Karl Hecht, Sondheim, Deutschland
Sterilbank	Anteras	Anthos Mikrosystem, Krefeld, Deutschland
Sterilbank	Herasafe	Thermo Elektron Corporation, Waltham, USA
Thermobad	GFL1083	GFL, Burgwedel, Deutschland
Thermomixer	Compact 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
UV Tisch /Kamerasystem	Intas UV Systeme	Intas, Göttingen, Deutschland
UV/VIS-Spektralphotometer	Nano Drop 2000	Thermo Scientific, Waltham, USA
Waage	BABC200	Satorius, Göttingen, Deutschland
Waage	EP210S	Satorius, Göttingen, Deutschland

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Zellkulturschrank	3111 Forma Scientific CO ₂ Water Jacketed Incubator	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Zellkulturschrank	Heraeus BBP6220	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland
Zentrifuge	Cryofuge 6000 Biofuge 13	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland
Zentrifuge	Centrifuge 5415R 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 1: Verwendete Geräte.

2.1.2. Chemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien stammen von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) oder Merck (Darmstadt, Deutschland). Alle verwendeten Gallensäuren stammen von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland).

8-bromo-cAMP	Jena Bioscience, Jena, Deutschland
Acrylamid 4K-Lösung (30%) Mix 29:1	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Apocynin A	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Bafilomycin A	Alexis Biochemicals, San Diego, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenol Blau	BIO RAD, München, Deutschland
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche, Indianapolis, USA
DMEM/F12 GlutaMax-I Gibco	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dulbeccos-PBS	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Entwicklerlösungen (Tetenal Roenteroll/Superfix)	Tetenal, Norderstedt, Deutschland
Fötale Kälberserum	Biomol, Hamburg, Deutschland
GW4064	Torctis Biosciences, Ellisville, USA
INT747	Biomol, Hamburg, Deutschland
L-Glutamin	Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
LY294002	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
PageRuler™ (Plus Perstained Protein Ladder)	Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland

PD098059	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Penicillin – Streptomycin	Gibco Life Technologies, Karlsruhe Deutschland
PKI	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
PP2	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Rapamycin	Cell Signalling, Danvers, USA
SB203580	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
SP600125	SA Biosciences, Frederick, USA
SU6656	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Taurin	MP Biomedicals, Solon, USA
TRIS Ultra Pure Grade	MP Biomedicals, Solon, USA
Trypsin/EDTA Solution	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Tween 20	Serva, Heidelberg, Deutschland
Wortmannin	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Z-VAD-FMK	RandD Systems, Minneapolis, USA

2.1.3. Verbrauchsmaterialien

1-10µl/1-100µl/ 100-1000µl Pipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg, Deutschland
12-well /6-well Platten	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
15/50ml Falcons	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
5/10/25ml Strippete	Corning incorporated, New York, USA
96-well Platten	Nuclon Surface, Roskilde, Dänemark
DNA Isolation Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Einmalküvetten (Polystyrol/Polystyrene)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Filterpapier	Whatman, Dassel, Deutschland
Hyperfilm	Amersham, Freiburg, Deutschland
One Step RT PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Protran© Nitrocellulose Transfermembran	Whatman, Dassel, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5/2ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

Zellkulturflaschen
Zellschaber

Corning Incorporated, New York, USA
BD, Franklin Lakes, USA

2.1.4. Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Vertrieb
pIE1-pp89 (Croma101)	1:500	Maus	freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Stipan Jonjić, Rijeka, Kroatien
Monoclonal Anti-HA	1:3000	Maus	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
GAPDH	1:50000	Maus	Biodesign, Asbach, Deutschland
Polyclonal anti Mouse Immunoglobulin/HRP	1:10000	Kaninchen	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Latenz-Serum	1:250-1:500	Maus	freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Katrin Ehrhardt, Freiburg, Deutschland
M25	1:10000	Maus	freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Stipan Jonjić, Rijeka, Kroatien
pIE1-pp72	1:25000	Maus	Chemicon, Temecula, USA

Tabelle 2: Verwendete Antikörper.

2.1.5. Zytokine

Zytokine	eingesetzte Konzentration	Vertrieb
Rekombinanter Maus Tumornekrosefaktor-α (TNF)-α	30 ng/ml	PBL, Piscataway, USA
Rekombinantes Maus Interferon (IFN)-α	500 U/ml	PBL, Piscataway, USA
Rekombinantes Maus IFN-γ	500 U/ml	PBL, Piscataway, USA

Tabelle 3: Verwendete Zytokine.

2.1.6. Oligonukleotide für quantitative PCR und TaqMan-PCR

Primer Name	Sequenz 5'-3'
MCMV-M91-277 <i>forward</i>	caaccgcgtcttcaagca
MCMV-M91-342 <i>reverse</i>	aacagctgacctatgacgctgat
MCMV-M91-296 Sonde	cataacgcgctgcagaaggtgcc
Maus β -Aktin <i>forward</i>	gtatcccgggtaacccttctct
Maus β -Aktin <i>reverse</i>	aacggcagaagaaagacaattga
Maus β -Aktin Sonde	ccagcttctcagccacgccttt
MCMV-IE1 <i>forward</i>	gaataaaagagggggtgtggtgta
MCMV-IE1 <i>reverse</i>	cagcaactcatcctatccagacct
MCMV-IE3 <i>forward</i>	cagagcctcatgcacacctgct
MCMV-IE3 <i>reverse</i>	ggaggagaccgtgcatgacaag
Maus <i>gapdh forward</i>	accacagtccatgccatcac
Maus <i>gapdh reverse</i>	tccaccacctggtgctgta

Tabelle 4: Primer für Real Time-PCRs and TaqMan Assays.

2.1.7. Mäuse/ Knockout Mäuse

C57BL/6: männlich; 8-12 Wochen; Tierversuchsanstalt, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

BALB/c: weiblich und männlich; 8-12 Wochen; Tierversuchsanstalt, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

FXR *knockout* Mäuse: FXR^{-/-} C57BL/6; männlich; 8-12 Wochen [170]; Tierversuchsanstalt, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

IFN-Rezeptor *knockout* Mäuse: IFNAR^{-/-} C57BL/6; männlich; 8-12 Wochen [171]; Tierversuchsanstalt, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

2.1.8. Virusstämme

HCMV

Für die Infektion von primären humanen Hepatozyten wurde der HCMV Stamm TB40/E verwendet [172], der freundlicherweise durch Dr. Vu Thuy Khanh Le (Institut für Virologie, Essen) zur Verfügung gestellt wurde. Die Isolation und Infektion der primären humanen Hepatozyten erfolgte im Rahmen des Ethikantrags „Das Verhalten CD133 positiver Knochenmarksstammzellen nach Co-Kultur mit primären Leberzellen“ mit der Studiennummer 2852.

MCMV

Für die Infektion von primären murinen Hepatozyten wurden verschiedene murine Zytomegaloviren verwendet. Für die Fluoreszenz-Aufnahmen (vergleiche Abbildung 9) und die Virustitration (vergleiche Abbildung 10) wurde ein $\Delta m157$ -MCMV:*hMIEP-gfp* Virus verwendet, welches freundlicherweise durch Dr. Vu Thuy Khanh Le (Institut für Virologie, Essen) zur Verfügung gestellt wurde. Für den Nachweis von IE-3 (vergleiche Abbildung 33) wurde ein rekombinantes MCMV Virus verwendet, dessen IE-3 HA (humanes Influenzavirus Hämagglutinin) markiert ist [Rattay *et. al.* Manuskript unpubliziert]. Das MCMV:*hMIEP-CD8-IRES-luziferase* Virus wurde für den Nachweis von 5'Kappe unabhängiger Translation verwendet (vergleiche Abbildung 36) und wurde freundlicherweise von Katrin Ehrhardt (Institut für Virologie, Freiburg) zur Verfügung gestellt. Für alle weiteren Versuche wurde ein $\Delta m157$ -MCMV:*Luziferase* Virus verwendet. Das auf den MCMV Stamm MW97.01 zurückgehende Virus exprimiert statt des Gens *m157* Luziferase (Leuchtkäfer (*Photinus pyralis*)) unter der Kontrolle des *m157* Promotors [125, 173].

2.2. Virologische Methoden

2.2.1. MCMV/ HCMV Infektion

Für die Infektion mit MCMV bzw. HCMV wurde die für die gewünschte Plaque-formende Einheiten (PFU)/Zelle erforderliche Menge Virus berechnet, mit Medium verdünnt und auf die Zellen gegeben. Die Infektion wurde durch Zentrifugation der infizierten Zellen (zweimalige Zentrifugation, 2000 rpm, 15 Minuten (min), 25-28°C) verstärkt [174].

Für die Berechnung der erforderlichen Virusmenge im Experiment wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{\text{PFU} * \text{Anzahl der zu infizierenden Wells} * \text{Zellzahl/Well}}{\text{Titer des Virusstocks}} = \text{benötigte Menge des Virusstocks in ml}$$

2.2.2. Bestimmung von MCMV-Titern

Für die Bestimmung der Virustiter wurden primäre murine Hepatozyten für 24 bzw. 48 Stunden mit $\Delta m157$ -MCMV:*hMIEP-gfp* infiziert. Die Zellkulturüberstände und die Zellen wurden für die Virus-Titration verwendet. Die zu titrierenden Proben wurden bis zur Verwendung auf -80°C gelagert und bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut. Für die MCMV-Titration wurden embryonale murine Fibroblasten (MEF) von BALB/c Mäusen in der dritten Passage verwendet. Diese wurden ein bis zwei Tage vor dem Versuch 90% konfluent in 48-well Platten ausgesät. Jede Probe wurde zweimal titriert. Dazu wurden die Proben in seriellen 1:10 Verdünnungen in das Kulturmedium der MEF gegeben. Die Virusinfektion wurde durch zweimaliges Zentrifugieren (2000 rpm, 15 min, 25-28°C) unterstützt. Nach zwei Stunden wurde das Zellkulturmedium gegen Methylzellulose-haltiges Medium ersetzt, um eine Plaque-Bildung (durch Zell zu Zellverbreitung) zu erzwingen. Nach 48 Stunden wurde die Zahl der Plaques fluoreszenzmikroskopisch bestimmt und die PFU/ml berechnet.

2.2.3. Herstellen von MCMV-Virusstocks

Zur Herstellung von Virusstock wurden MEF konfluent ausgesät und mit $2 \cdot 10^5$ PFU/ml Virus infiziert. Nach drei bis vier Tagen, wenn die Zellen einen zytopathischen Effekt zeigten, wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers abgelöst und zusammen mit dem Zellkulturmedium in einen Zentrifugen-Becher überführt. Die Zentrifugation erfolgte für 20 Minuten bei 4 °C und 6000 rpm (Zentrifuge: Beckman Avanti, Krefeld, Deutschland). Der Überstand wurde abgenommen und bei 4°C gelagert. Das Zellpellet wurde zum Homogenisieren mit etwas Medium in einen Homogenisierer aus Glas (Douncer) überführt. Nach dem Homogenisieren wurde das Homogenat erneut zentrifugiert (4 °C, 20 min, 6000 rpm). Der Überstand wurde mit dem Zellkulturüberstand vereint und erneut zentrifugiert (4°C, drei Stunden, 13000 rpm). Der Überstand wurde so abgenommen, dass das Pellet nicht austrocknen konnte. Das Pellet wurde bei 4°C über Nacht gelagert und danach in Medium homogenisiert. Die Ultra-Zentrifugen-Becher wurden mit Tris-Puffer gefüllt und mit dem Homogenat überschichtet. Danach wurde erneut für 1,5 Stunden bei 20000 U/Minute und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das entstandene Pellet wurde mit 2 ml Tris-Puffer überschichtet und bei 4°C über Nacht gelagert. Am nächsten Tag wurde das Pellet resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Die Titer der Virusstocks wurden durch eine Titration bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.2.).

Tris-Puffer (pH 7,8):

50	mM	Tris (hydroxymethyl) ammoniummethan (pH 7,8)
10	mM	Kaliumchlorid (KCl)
5	mM	Ethylendiamintetraacetat (EDTA)
15	% (w/v)	Saccharose

2.3. Proteinanalytische Methoden

2.3.1. Proteinkonzentrationsbestimmung

Am Ende der Versuche wurden die Zellen, deren Proteine analysiert werden sollten, einmal mit PBS gewaschen und mit RL-Puffer bzw. RIPA+ Puffer lysiert. Die Proteine wurden durch Zentrifugation (14000 g, 5 min, 4°C bei Verwendung von RL-Puffer bzw. 14000 g, 30 min, 4°C bei Verwendung von RIPA+ Puffer) von den anderen Zellbestandteilen und Nukleinsäuren getrennt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bradford [175] im Photometer. Dabei bindet der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 (Biorad Protein Assay) an basische Aminosäuren, wodurch sich sein Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Die Extinktion wurde im Photometer bei $\lambda=595$ nm gemessen. Dazu wurden die Proteinlysate im Verhältnis 1:160:40 mit destilliertem Wasser (H₂O) und Bradford-Reagenz verdünnt. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer BSA-Eichgrade ermittelt.

RL-Lysis-Puffer :

20	mM	Tris; pH 7,4
140	mM	Natriumchlorid (NaCl)
10	mM	Natriumfluorid
10	mM	Natriumpyrophosphat × 10 H ₂ O
1	% (v/v)	Triton X-100
1	mM	EDTA
1	mM	Ethylendiamintetraessigsäure (EGTA)
1	mM	Natriumorthovanadat
20	mM	β-Glycerophosphat
1	Tabl.	Complete Protease Inhibitors

RIPA⁺ Puffer:

50	mM	TrisHCl; pH 7,5
150	mM	NaCl
1	% (v/v)	(Octylphenoxy) polyethoxyethanol (IGEPAL)
1	% (w/v)	Na-Deoxycholat
0,1	% (w/v)	Natriumdodecylsulfat (SDS)
1	mM	1,4-Dithio-DL-threit(ol) (DTT)
0,2	mM	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
1	µg/ml	Leupeptin
1	µg/ml	Pepstatin
50	mM	Natriumfluorid
0,1	mM	Na-Vanadat
1	Tabl.	Complete Protease Inhibitors

2.3.2. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine wurden vertikale diskontinuierliche SDS-PAGEs verwendet [176]. Dafür wurden die Proteinlysate 1:1 mit SDS-Probenauftragspuffer verdünnt und durch Aufkochen (5 min, 95°C) denaturiert. Für die SDS-PAGE wurden 30-100 µg Protein verwendet. Die Prozentigkeit der SDS-Gele richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden Proteine.

Polyacrylamid-Sammelgel (5%):

68,4	%	dH ₂ O
17,0	%	30% Acrylamid/ Bisacrylamid
12,5	%	1 M Tris/HCl pH 6,8
1,0	%	10% SDS
1,0	%	10% Ammoniumperoxodisulfat
0,1	%	Tetramethylethylendiamin (TEMED)

Polyacrylamid-Trenngel (10 %):

39,6	%	dH ₂ O
33,3	%	30% Acrylamid/ Bisacrylamid
25,0	%	1,5 M Tris/HCl pH 8,8
1,03	%	10% SDS
1,03	%	10% Ammoniumperoxodisulfat
0,04	%	TEMED

2 × SDS Page Probenpuffer:

220	mM	Tris/HCl pH 6,8
9	% (w/v)	SDS
40	% (v/v)	Glyzerin
0,125	% (w/v)	Bromphenolblau
1	M	1,4-Dithio-DL-threit(ol) (DTT)

Elektrophorese-Puffer:

25	mM	Tris
4	mM	SDS
250	mM	Glycin

2.3.3. Western-Blot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels Western-Blot auf eine Nitrozellulosemembran (Protran Nitrozellulose Transfer Membrane, Schleicher und Schuell, Dassel) übertragen. Hierbei kam die durch Kyhse-Andersen etablierte *Semi-dry* Methode zur Anwendung [177]. Dazu wurden vier in Blotting-Puffer getränkte Filterpapiere (Whatman Ltd., Maidstone, England) auf die Anodenplatte gelegt. Darauf wurde eine vorher in dH₂O und Blotting-Puffer gewaschene Nitrozellulosemembran (Protran, Nitrozellulosemembran, Whatman Ltd., Maidstone, England) platziert. Auf die Membran wurden das Gel und vier weitere in Blotting-Puffer getränkte Filterpapiere gelegt. Den Abschluss bildete die Kathodenplatte. Die Übertragung der Proteine aus dem SDS-Gel auf die Membran erfolgte bei 1 mA/cm² über 1½-2 Stunden. Zur spezifischen Detektion von Proteinen mit Antikörpern wurden unspezifische Bindestellen mit einer 5 % (w/v) BSA-Lösung blockiert (eine Stunde). Danach erfolgte die Detektion des gewünschten Proteins mittels eines spezifischen Primärantikörpers (Tabelle 2) über Nacht bei 4°C. Dazu wurden die Antikörper nach Herstellerangaben in Tris-gepufferter Saline mit Tween (TBST-Puffer) verdünnt. Nach der Inkubation erfolgte ein zweimaliger Waschschrift mit TBST-Puffer, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Der Primärantikörper wurde nun mit Sekundärantikörpern (eine Stunde, RT) detektiert, die an Meerrettichperoxidase konjugiert sind. Nach erneutem Waschen mit TBST-Puffer wurde Western Lightning-ECL (Perkin Elmer, Waltham, USA) auf die Membran gegeben. Das darin enthaltene Luminol wird durch die Meerrettichperoxidase oxidiert, wodurch es zur Chemilumineszenz kommt. Diese wurde mittels ECL-Hyperfilm (Amersham, Freiburg, Deutschland) detektiert [178].

Blotting-Puffer:

40	mM	SDS
10	mM	Glyzin
10	mM	Tris
25	% (v/v)	Methanol

TBST-Puffer:

20	mM	Tris; pH 7,4
150	mM	NaCl
0,1	% (v/v)	Tween 20

2.3.4. Luziferase Assay

Zur Untersuchung der MCMV-Replikation wurde ein MCMV Δ m157Luziferase Virus verwendet, welches Luziferase als Reporter gen besitzt. Das ursprüngliche Luziferase-Protein stammt aus dem nordamerikanischen Glühwürmchen (*Photinus pyralis*) und ist in der Lage, Luziferin in Oxyluciferin zu decarboxylieren, wodurch Licht entsteht [179]. Diese Lichtemission konnte in einem Chemilumineszenz-Messgerät gemessen werden. Als Luziferase-Reagenz wurde ein Luziferase Reporter Gene Assay (*high sensitivity*, Roche, Mannheim, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.3.5. Untersuchung der Gesamtzell-Protein-Neusyntheserate

Zur Bestimmung der Protein-Neusyntheserate wurden primäre murine Hepatozyten mit Gallensäuren vorbehandelt, mit MCMV infiziert und mit 27 μ Ci [35 S]-markiertem Methionin und Cystein (L-Met/L-Cys Easy Taq Express Protein Labelling Mix [35 S], Perkin Elmer,

Massachusetts, USA) sechs Stunden inkubiert. Danach wurden die Proben mit PBS gewaschen und mit RIPA⁺ Puffer (siehe SDS-PAGE) lysiert. Die Proben wurden per SDS-Page (10%) aufgetrennt und das Gel für 45 Minuten in Fixierlösung inkubiert. Dann wurde das Gel mit H₂O gewaschen und auf einem Gelrockner getrocknet. Die radioaktiv markierten Proteine wurden mithilfe eines radiosensitiven Films (Kodak Film Carestream Bio May MR Film High Resolution Radioisotope und Chemiluminescent, Kodak, Stuttgart, Deutschland) sichtbar gemacht. Zur Quantifizierung der radioaktiv markierten Proteine wurde das Gel mittels einer Phospho-Platte (Fujifilm Imaging Plate for Bioimaging Analyser Bas-MS 2040, Stamford, USA) ausgelesen und die Proteinbanden in einem Scanner (Fujifilm FLA3000, Stamford, USA) detektiert.

Fixierlösung:

50	% (v/v)	H ₂ O
40	% (v/v)	Methanol
10	% (v/v)	Essigsäure

2.4. Zellbiologische Methoden

2.4.1. Zellkultur

Alle verwendeten Zellkulturlinien und primären Zellen wurden bei 37°C und 5% Kohlendioxid (CO₂) gehalten. Die Zelllinien wurden regelmäßig umgesetzt. Dazu wurde das Medium (Tabelle 5) abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. NIH/3T3- und NIH/3T3:NTCP-Zellen wurden mit Trypsin/EDTA (0,05%/0,02% [w/v]) abgelöst, während für die Zelllinie MRC-5 Trypsin ohne EDTA verwendet wurde. Die Zellen wurden dann im Verhältnis 1:10 verdünnt und neu ausgesät. Die für die primären Zellen verwendeten Medien sind ebenfalls in Tabelle 5 aufgeführt.

Zelllinie	Medium
NIH/3T3 (murine Fibroblasten-Zelllinie, ATCC #CRL1658)	Dulbecco´s Modified Eagle Medium mit 4,5 g/L Glukose und Pyruvat; 10 % fötales Kälberserum (FCS) (hitzeinaktiviert); 1 % Penicillin/Streptomycin
NIH/3T3:NTCP (NIH/3T3 Zellen stabil transfiziert mit NTCP; freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Constanze Wiek, HNO Klinik, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf)	Dulbecco´s Modified Eagle Medium mit 4,5 g/L Glukose und Pyruvat; 10 % FCS (hitzeinaktiviert); 1 % Penicillin/Streptomycin; 10 mg Puromycin
Primäre murine Hepatozyten	Siehe 2.4.4.
Primäre humane Hepatozyten	Williams Eagle Medium E; 5 % FCS (hitzeinaktiviert); 2 mM L-Glutamin; 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin
Embryonale murine Fibroblasten	Dulbecco´s Modified Eagle Medium; 10% FCS (hitzeinaktiviert); 2 mM L-Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin

Tabelle 5: Verwendete Zelllinien und Primärzellen sowie deren Medien für die Zellkultur.

2.4.2. Behandlung von Zellen mit Gallensäuren und anderen Agenzien

Die Gallensäuren bzw. Agenzien wurden in den angegebenen Konzentrationen zum Zellkulturmedium gegeben. Gelöst wurden die Substanzen in Medium, PBS, H₂O oder Dimethylsulfoxid (DMSO). Da DMSO und Ethanol selbst schon potenziell Effekte auf die Zellen und die Virusinfektion haben können, wurden entsprechende Kontrollen mitgeführt.

Die Agenzien wurden wie folgt verwendet:

Reagenz	Funktion	Konzentration	Lösungsmittel	Inkubationszeit
8-bromo-cAMP	Induktion der PKA	100 μ M	H ₂ O	30 min
Apocynin A	NADPH-Oxidase-Inhibition	300 μ M	DMSO	30 min
Bafilomycin A	Vacuolar-type H ⁺ ATPase Inhibitor	250 nM	PBS	30 min
Betain	Organisches Osmolyt	1/5/10 μ M	Medium	12 h
Calcifediol	Vitamin D Vorläufer	5 μ M	H ₂ O	24 h
Calcitriol	Vitamin D	0,5 μ M	H ₂ O	24 h
CDC	Gallensäure	variabel	H ₂ O	variabel
Cholyl-lysyl-Fluorescein	Gallensäure	variabel	H ₂ O	variabel
Clasto-Lactacystin β lactone	Proteasom-Inhibitor	10 μ M	PBS	30 min
Cycloheximide	Inhibition der Protein-synthese	100 μ M	H ₂ O	15 min
GCDC	Gallensäure	variabel	H ₂ O	variabel
GW4064	FXR Agonist	0,75-5 μ M	DMSO	3 h
IFN-α	Interferon	500 U/ml	H ₂ O	variabel
IFN-γ	Interferon	500 U/ml	H ₂ O	variabel
INT747	FXR Agonist	5/10 μ M	DMSO	30 min
Ly294002	PI3 Kinase-Inhibitor	50 μ M	DMSO	30 min
Irbesartan	NTCP Inhibitor	50 μ M	DMSO	3 h
PD098059	MAPK-Inhibitor	10 μ M	DMSO	30 min
PKI	PKA-Inhibitor	2,3 nM	H ₂ O	30 min
PP2	Src Kinase-Inhibitor	10 μ M	H ₂ O	30 min
SB203580	P38-Inhibitor	10 μ M	DMSO	30 min
SP600125	JNK Kinase-Inhibitor	10 μ M	DMSO	30 min
Su6656	Yes Kinase-Inhibitor	10 μ M	DMSO	30 min
Taurin	Organisches Osmolyt	5 mM	Medium	3 h
TC	Gallensäure	variabel	H ₂ O	variabel

Reagenz	Funktion	Konzentration	Lösungsmittel	Inkubationszeit
TCDC	Gallensäure	variabel	H ₂ O	variabel
TLC	Gallensäure	variabel	H ₂ O	variabel
TLCS	Gallensäure	variabel	H ₂ O	variabel
TUDCA	Gallensäure	variabel	H ₂ O	variabel
Trolox	Inhibition von oxidativem Stress	100/500 µM	Ethanol	12 h
Wortmannin	PI3 Kinase- Inhibitor	50/100 nM	H ₂ O	30 min
Rapamycin	mTOR- Inhibitor	10 nM	DMSO	1 h
Z-VAD-FMK	Genereller Caspase- Inhibitor	50 µM	PBS	30 min

Tabelle 6: Verwendete Agenzien für die Behandlung von Zellen.

2.4.3. Zellviabilitätstests

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurden die Zellen für drei Stunden mit 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) behandelt. Dieser gelbe Farbstoff wird durch die Zellen zu blauem Formazan umgesetzt, indem er unter Beteiligung von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) und NADPH durch Enzyme des endoplasmatischen Retikulums reduziert wird. Das Formazan kann mit Hilfe von DMSO gelöst und photometrisch bei 560 nm bestimmt werden [180].

2.4.4. Isolation primärer muriner Hepatozyten

Die Isolation der primären murinen Hepatozyten erfolgte durch Frau Ursula Kristek im Rahmen der Anzeige mit dem Titel: „Regulation des Gallensalztransportes und der Gallensäure-abhängigen Signaltransduktion in der perfundierten Leber“ (Aktenzeichen: 8.87-51.05.20.10.085) und dem Tierversuchsantrag mit dem Titel: „Einfluss von Gallensäuren und Vitamin D auf die TLR/CMV-medierte hepatozelluläre Immunantwort“ (Aktenzeichen:

84.02.04.2013.A432). 8-12 Wochen alte C57BL/6 Mäuse wurden mit einem Anästhetikum (100 mg/kg Körpergewicht Ketamin und 20 mg/kg Körpergewicht Xylazin) durch eine intraperitoneale Injektion betäubt. Danach erfolgte die Präparation der Leber und die Kanülierung der *Vena portae*. Die *Vena cava* wurde durchtrennt, der Brustraum und das Herz eröffnet, sodass das Tier während des Versuches verstarb. Für die Perfusion der Leber wurde für die ersten vier Minuten Hanks-Lösung 1 und dann für zwei bis drei Minuten die Kollagenase-haltige Hanks-Lösung 2 verwendet. Danach wurde die Leber entnommen und in einer Schale mit Hepatozyten-Medium 1 zerkleinert. Daraufhin wurde das Zell-Medium-Gemisch durch einen 70-µm-Filter gegeben und das Zellpellet zweimal mit Hepatozyten-Medium 1 gewaschen (Zentrifugation bei RT, drei Minuten, 50 rcf). Jeweils $5 \cdot 10^5$ Zellen wurden in Kollagen beschichtete 6-well Platten gegeben. Nach 1½-2 Stunden wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Die weitere Kultivierung erfolgte für 12 Stunden im Hepatozyten-Medium 2, dass drei Stunden vor dem Versuchsstart gegen Hepatozyten-Medium 3 ausgetauscht wurde.

Hanks-Basis-Puffer:

137	mM	NaCl
5	mM	Kaliumchlorid (KCl)
15	mM	Hepes
0,33	mM	Dinatriumhydrogenphosphat
0,44	mM	Kaliumdihydrogenphosphat
pH 7,4		autoklavieren

Hanks-Lösung 1:

		Hanks-Basis-Puffer
2	mM	EGTA
0,1	% (w/v)	Glucose

Hanks-Lösung 2:

		Hanks-Basis-Puffer
0,1	%(w/v)	Glucose
5	mM	Kalziumchlorid (CaCl ₂)
0,05	% (w/v)	Collagenase

Hepatozyten Medium 1:

		Williams Eagle Medium E
10	% (v/v)	FCS (hitzeinaktiviert)
100	nM	Dexamethason
2	mM	L-Glutamin
1	% (v/v)	Penicillin/Streptomycin

Hepatozyten Medium 2:

		Williams Eagle Medium E
100	nM	Dexamethason
2	mM	L-Glutamin
1	% (v/v)	Penicillin/Streptomycin

Hepatozyten Medium 3:

		Williams Eagle Medium E
2	mM	L-Glutamin
1	% (v/v)	Penicillin/Streptomycin

2.4.5. Präparation von embryonalen murinen Fibroblasten

Die Isolation der embryonalen murinen Fibroblasten erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Virologie, Düsseldorf. Alle Maßnahmen am lebenden Tier wurden durch biologisch-technische Assistenten des Instituts für Virologie durchgeführt. 16-17 Tage schwangere Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und die Embryonen steril entnommen. Dazu wurde die Bauchdecke eröffnet und die Gebärmutterstränge entnommen. Die Gebärmutter und die Fruchtblase wurden entfernt und die Embryos wurden in eine Petrischale mit PBS überführt. Der Darm und die Leber der Embryos wurden mit einer Pinzette entfernt. Die Embryos wurden mit einer Schere sehr fein zerschnitten und mehrmals mit PBS gewaschen, um Erythrozyten zu entfernen. Die Zellsuspension wurde in Erlenmeyerkolben überführt. Dazu wurden sterile Glasperlen und 0,625 % (w/v) Trypsin in PBS zugegeben, sodass die Glasperlen vollständig bedeckt waren. Nach 30-minütigem Rühren bei 37°C wurde 20 µg/ml DNase zugesetzt und weitere 30 Minuten gerührt, um die Zellen zu vereinzeln. Die Überstände wurden entfernt und bei 800 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in MEF-Medium gelöst. Danach konnten die Zellen in Zellkulturflaschen ausgesetzt werden. Nach vier Stunden wurde das Medium gegen Neues ersetzt. Für die Versuche wurden MEF in der dritten Passage verwendet.

2.5. Molekularbiologische Methoden

2.5.1. Reverse Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion

In der *reversen Transkriptase-Polymerase Ketten Reaktion* (rT-PCR) wird zuerst RNA durch das Enzym Reverse-Transkriptase zu komplementärer Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben. Die entstandene cDNA wurde dann in einem weiteren Schritt durch das Enzym DNA-Polymerase mittels spezifischer Primer vervielfältigt [181].

Zur semi-quantitativen Bestimmung der RNA-Mengen in infizierten und uninfizierten Hepatozyten wurden die Zellen mit einem β -Mercaptoethanol-haltigen Puffer (Teil des RNeasy Kits) lysiert und die RNA mit einem RNeasy Kit isoliert. Die RNA-Menge wurde in einem UV/VIS-Spektralphotometer bestimmt und jeweils 2 μ g RNA wurden mit DNase (DNase1; RNase free, Roche, Indianapolis, USA) verdaut, um die genomische und virale DNA zu entfernen. Die reverse Transkription erfolgte zusammen mit der PCR unter Verwendung eines One Step RT PCR Kits. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 4 aufgeführt.

PCR Programm:

1: Reverse Transkription (rT):	50°C	30 min
2: Hitzeinaktivierung der rT:	95°C	15 min
3: Denaturierung:	94°C	30 Sek.
4: Anlagerung-Phase (abhängig vom gewünschten Target, mit spezifischen Primern):		
<i>gapdh</i> :	60°C	30 Sek.
<i>ie-1</i> :	58°C	30 Sek.
<i>ie-3</i> :	61°C	30 Sek.
5: DNA Synthese:	72°C	30 Sek.
6: Wiederholung der Schritte 3-5 (Zyklen abhängig vom gewünschten Target: <i>ie-1</i> , <i>ie-3</i> 35 Zyklen, <i>gapdh</i> 30 Zyklen)		
7: DNA Synthese	72°C	10 min

Die entstandenen PCR Produkte wurden in einem Ethidiumbromid-haltigen 1 % (w/v) Agarosegel aufgetrennt und durch UV-Licht visualisiert.

2.5.2. *TaqMan-PCR*

Bei der TaqMan-PCR gibt es neben PCR-Primern noch eine DNA-Sonde, die spezifisch für einen DNA-Bereich zwischen den beiden Primern ist. Die Sonde ist mit zwei Farbstoffen, einem Reporter-Farbstoff (FAM, am 3'Ende) und einem Fänger(Quencher)-Farbstoff (TAMRA, am 5'Ende), gekoppelt. Solange der Fänger-Farbstoff in räumlicher Nähe zum Reporter-Farbstoff ist, kann dieser nicht fluoreszieren, da er seine Energie durch den *Förster-type energy transfer* auf den Fänger-Farbstoff überträgt [182]. Die Sonde bindet während der Anlagerungs-Phase zusammen mit den Primern an die DNA. Die Polymerase synthetisiert neue DNA an das Ende der Primer, bis sie an die Sonde stößt, welche dann durch die 5'Endonuklease Aktivität der Polymerase abgebaut wird. Dadurch wird der Reporter-Farbstoff frei und kann fluoreszieren. Über die Menge der freigesetzten Fluoreszenz kann die Ausgangs-DNA Menge quantifiziert werden.

Für die TaqMan-PCR wurde DNA mithilfe eines DNA-Isolationskits isoliert und die Konzentration in einem UV/VIS Spektralphotometer gemessen. Die DNA wurde nach Herstellerangaben mit TaqMan-PCR Master Mix, Primern und Sonden versetzt (Sequenzen Tabelle 4). Zum Nachweis der CMV DNA wurde ein Bereich des Gens M91 amplifiziert, während die zelluläre DNA über den Genbereich von β -Aktin nachgewiesen wurde. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter Verwendung der $\Delta\Delta$ CT-Methode in Bezug auf die zelluläre DNA. Dabei wird die Menge an viraler DNA in Relation zur Menge der zellulären DNA berechnet, um einen relativen Mengen-Vergleich der viralen DNA vornehmen zu können.

2.5.3. Lentivirale Transfektion von Zellen

Die lentivirale Transfektion dient dazu, Zellen stabil zu transfizieren, indem die lentivirale Integrase die gewünschte DNA-Sequenz in die zelluläre DNA integriert. Dazu wurden HEK293T-Zellen mit mehreren Plasmiden transfiziert. Ein Plasmid trägt die zu übertragende Gen-Sequenz (in diesem Fall die des humanen NTCPs). Die anderen Plasmide tragen Gene, die für virale Hüllproteine und die virale Transkriptase/Integrase codieren. In den HEK293T-Zellen werden Lentiviren zusammengesetzt, die die zu übertragende Gen-Sequenz in Form von RNA, virale Hüllproteine und die virale Transkriptase/Integrase enthalten. Diese Viren können nach der Gewinnung aus dem Überstand andere Zellen infizieren (in diesem Fall NIH/3T3 Zellen). Hierbei wird die RNA in DNA umgeschrieben, welche in die zelluläre DNA integriert wird. Diese Zellen können keine neuen Viruspartikel bilden, da die Gene für die Hüllproteine und die Transkriptase/Integrase fehlen [183]. Bei dem verwendeten puc2CL6IPwo Vektor ist der NTCP mit einem FLAG und dem Farbstoff Cherry konjugiert und wurde von Frau Dr. Claudia Stross (Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Die lentivirale Transfektion wurde von Frau Dr. Constanze Wiek (Hals-Nasen-Ohren-Klinik, Universität Düsseldorf) durchgeführt.

2.6. Infektion von Mäusen mit MCMV unter Gallensäuren-Fütterung

Die Fütterung der Mäuse mit Gallensäuren erfolgte im Rahmen des Tierversuchsantrags: „Einfluss einer murinen Zytomegalievirus (MCMV)-Infektion auf cholestatische Syndrome (Gallensäurefütterung und Gallengangsligatur) und die Leberregeneration nach erweiterter Hemihepatektomie“ mit dem Aktenzeichen 84-02.04.2011A201. Alle Arbeiten am lebenden Tier wurden durch Frau Ursula Kristek durchgeführt. Für die Versuche wurden 8-12 Wochen

alte männliche C57BL/6 Mäuse verwendet. Drei Tage vor der Infektion wurde das Futter der Tiere gegen Gallensäuren-haltiges Futter (0,5% (w/w) CDC SM M-Z, energiereich, 10 mm Mischung Nr.1184, ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland) bzw. Gallensäuren-freies Futter (SM M-Z, energiereich, 10 mm Mischung Nr. 1184, ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland) ausgetauscht. Die Hälfte der Mäuse erhielt Gallensäuren-haltiges Futter, während die andere Hälfte Gallensäuren-freies Futter erhielt. 50% der Mäuse aus den beiden Gruppen wurden mit $\Delta m157:MCMV$ -Luziferase (Infektionsdosis/ PFU: $5 \cdot 10^6$) infiziert. Am dritten, siebten und 14-ten Tag nach der Infektion wurde jeweils ein Teil der Tiere jeder Gruppe durch CO₂ Begasung eingeschläfert, um Blut und Organe (Leber, Speicheldrüse, Milz, Niere, Lunge) zu entnehmen (genaues Schema: Abbildung 6).

Tag		<u>Gruppe 1</u>	<u>Gruppe 2</u>	<u>Gruppe 3</u>	<u>Gruppe 4</u>
		Gallensäuren-freies Futter uninfiziert	Gallensäuren-freies Futter MCMV-infiziert	Gallensäuren-haltiges Futter uninfiziert	Gallensäuren-haltiges Futter MCMV-infiziert
1	Futterwechsel bei	9 Tieren	21 Tieren	12 Tieren	21 Tieren
3	Infektion bei	0 Tieren	21 Tieren	0 Tieren	21 Tieren
6	Organentnahme bei	3 Tieren	7 Tieren	4 Tieren	7 Tieren
10	Organentnahme bei	3 Tieren	7 Tieren	4 Tieren	7 Tieren
17	Organentnahme bei	3 Tieren	7 Tieren	4 Tieren	7 Tieren

Abbildung 6: Übersichtsschema der Tiergruppen für die Infektion mit MCMV unter Gallensäuren-Fütterung.

Männliche C57BL/6 Mäuse wurden in vier Gruppen aufgeteilt. Die Tiere der ersten und zweiten Gruppe erhielten Gallensäuren-freies Futter, während die Tiere der anderen beiden Gruppen Gallensäuren-haltiges Futter bekamen. Die Tiere der zweiten und vierten Gruppe wurden zusätzlich mit MCMV (PFU: $5 \cdot 10^6$) infiziert. An Tag 6, 10 und 17 nach dem Futterwechsel wurde den Tieren wie angegeben die Leber, Milz, Speicheldrüse, Lunge und Niere entnommen.

Um Plasma zu gewinnen, wurde das Blut über eine Herzpunktion entnommen, in EDTA-Röhrchen gegeben, für 20-30 Minuten bei 4°C gelagert und bei 8000 rpm und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Bis zur Analyse der Gallensäuren-Konzentrationen konnte das Plasma bei -80°C gelagert werden. Die Organe wurden zur weiteren Verwendung in flüssigen Stickstoff eingefroren.

2.6.1. Virustitration aus Organen

Die in Versuch 2.6. gewonnenen Mausorgane wurden aufgetaut, gewogen, durch ein Zellsieb (70 µm; BD, Franklin Lakes, USA) gedrückt und in 1,5 ml PBS+5% (v/v) FCS aufgenommen. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 4000 rpm und 4°C für 10 Minuten. Die Überstände wurden abgenommen und erneut zentrifugiert (4000 rpm, 4°C, zwei Minuten). Die nach der zweiten Zentrifugation gewonnenen Überstände konnten dann für die Titration auf MEF-Zellen verwendet werden (siehe 2.2.2).

2.7. Bestimmung der Gallensäuren-Konzentrationen in Lebergewebe und Plasma

Die Gallensäuren-Konzentrationen in Maus-Lebern und Seren wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC) MS/MS Massenspektrometrie detektiert. Zuerst wurden die Leberproben homogenisiert und die Gallensäuren extrahiert und konzentriert (*Chromabond HR-X cartridge*, Macherey Nagel, Düren, Deutschland). Dann wurden die Proben mittels UHPLC (Waters, Milford, Großbritannien) aufgetrennt. Die eigentliche Detektion erfolgte mittels Massenspektrometrie. Dabei werden in einem ersten Massenspektrometer die unkonjugierten Gallensäuren gemessen. Hinter dem ersten Massenspektrometer ist eine Kollisionszelle geschaltet, die die Proben fragmentiert. Diese Fragmente werden dann in einem zweiten Massenspektrometer gemessen, hierbei können

auch konjugierte Gallensäuren bestimmt werden. Die Gallensäuren-Konzentrationen wurden mit Hilfe von Standardkurven bestimmt [184].

In den murinen Lebern und Seren wurden folgende Gallensäuren bestimmt: Cholsäure (CA), Taurocholsäure (TC), Glykocholsäure (GCA), Chenodeoxycholsäure (CDC), Taurochenodeoxycholsäure (TCDC), Glycochenodeoxycholsäure (GCDC), Deoxycholsäure (DCA), Taurodeoxycholsäure (TDCA), Glykodeoxycholsäure (GDCA), Ursodeoxycholsäure (UDCA), Tauroursodeoxycholsäure (TUDCA), Glykoursodeoxycholsäure (GUDCA), Lithocholsäure (LCA), Taurolithocholsäure (TLC), Glykolithocholsäure (GLCA), Hydroxycholsäure (HDCA), Taurohydroxycholsäure (THDCA), Glykohydroxycholsäure (GHDCA), *alpha*-Muricholsäure (α -MCA), *beta*-Muricholsäure (β -MCA), *Omega*-Muricholsäure (ω -MCA), Tauromuricholsäure (T-MCA), Glykomuricholsäure (G-MCA).

2.8. Software und Statistik

Für die Arbeit wurden Microsoft Word, Excel und PowerPoint 2010 verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit IBM SPSS (Version 21/22). Bei geringer Probenzahl und nicht vorhandener Gleichverteilung wurden non-parametrische Tests verwendet. Für abhängige Proben wurde der Wilcoxon-Tests durchgeführt, während für unabhängige Proben der Mann-Whitney-U-Tests verwendet wurde. Die Signifikanzniveaus (p) wurden folgendermaßen gekennzeichnet: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Die Balkendiagramme zeigen jeweils die relativen Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

3. Fragestellung

In der Leber können kurz nach der Infektion mit MCMV hohe Virustiter nachgewiesen werden, daneben ist die Leber eines der Organe, in dem CMV in der Latenzphase im Körper verbleiben kann [121, 128, 185, 186]. So ist MCMV nach einer Reaktivierung aus der Latenz zuerst in der Leber nachweisbar [127]. Gallensäuren werden in der Leber synthetisiert und sind wichtige Signalmoleküle, die in Hepatozyten eine Vielzahl von Signalwegen aktivieren können. Daneben beeinflussen Gallensäuren die Replikation von hepatotropen (Hepatitis C Virus; Hepatitis B Virus) und gastrointestinalen Viren (Rotavirus; Norovirus) [102-106, 110-112]. Aufgrund des Replikationspotenzials von MCMV in der Leber ist es denkbar, dass Gallensäuren auch die Replikation von CMV beeinflussen können. Ziel dieser Arbeit war es einen möglichen Effekt von Gallensäuren auf die CMV Replikation in der Leber zu analysieren und die hieran beteiligten zellulären Signalwege zu identifizieren. Darüber hinaus sollte charakterisiert werden auf welcher Ebene des viralen Replikationszyklus Gallensäuren Einfluss nehmen.

4. Ergebnisse

4.1. Gallensäuren inhibieren die Zytomegalievirus-Replikation in vitro

Das verwendete Δ m157-MCMV:*Luziferase* Virus besitzt ein Luziferase-Gen (von *Photinus pyralis*) als Reporter für die virale Genexpression, welches durch den viralen m157 Promotor kontrolliert wird [173]. Für die Versuche wurden primäre murine Hepatozyten drei Stunden mit Gallensäuren inkubiert und anschließend mit Δ m157-MCMV:*Luziferase* (PFU/Zelle:0,1) infiziert. Die Luziferase-Aktivität wurde 24 Stunden nach der Infektion bestimmt. Die konjugierten Gallensäuren TCDC (25 μ M; p=0,027), TC (25 μ M; p=0,046) und GCDC (25 μ M; p=0,028) konnten die MCMV-abhängige Expression von Luziferase inhibieren (Abbildung 7A), während 25 μ M der unkonjugierten Gallensäure CDC keinen antiviralen Effekt hatte. Auch 25 μ M der sekundären Gallensäuren TUDCA, Tauroolithocholsäure-3-sulfat (TLCS) und Tauroolithocholsäure (TLC) zeigten nach dreistündiger Vorinkubation keinen antiviralen Effekt auf CMV. Daraufhin wurden die Konzentrationen der Gallensäuren variiert. Dabei verstärkte sich der antivirale Effekt von TCDC, GCDC und TC durch die Erhöhung der Gallensäuren-Konzentration nicht weiter. Somit können 25 μ M TCDC, GCDC und TC den maximalen antiviralen Effekt induzieren (Abbildung 7B-D). Die Gabe von höheren Konzentrationen TUDCA, TLC und TLCS hatte keinen inhibitorischen Effekt auf die virusabhängige Luziferase-Aktivität (Abbildung 7 E, F, H). 5 μ M TLC konnte die Virusreplikation um ~17% (p=0,028) steigern, wohingegen höhere TLC Konzentration keinen Effekt auf das Virus zeigten (Abbildung 7 E). Die unkonjugierte Gallensäure CDC vermittelte erst bei einer Konzentration von 100 μ M einen signifikanten antiviralen Effekt auf MCMV (Reduktion um ~34%; p=0,017) (Abbildung 7G). Dieser Effekt wurde nicht weiter verfolgt, da man aufgrund der hohen Konzentration von 100 μ M und der Varianz der Messwerte davon ausgehen kann, dass CDC einen toxischen Effekt auf die primären Hepatozyten entfaltet.

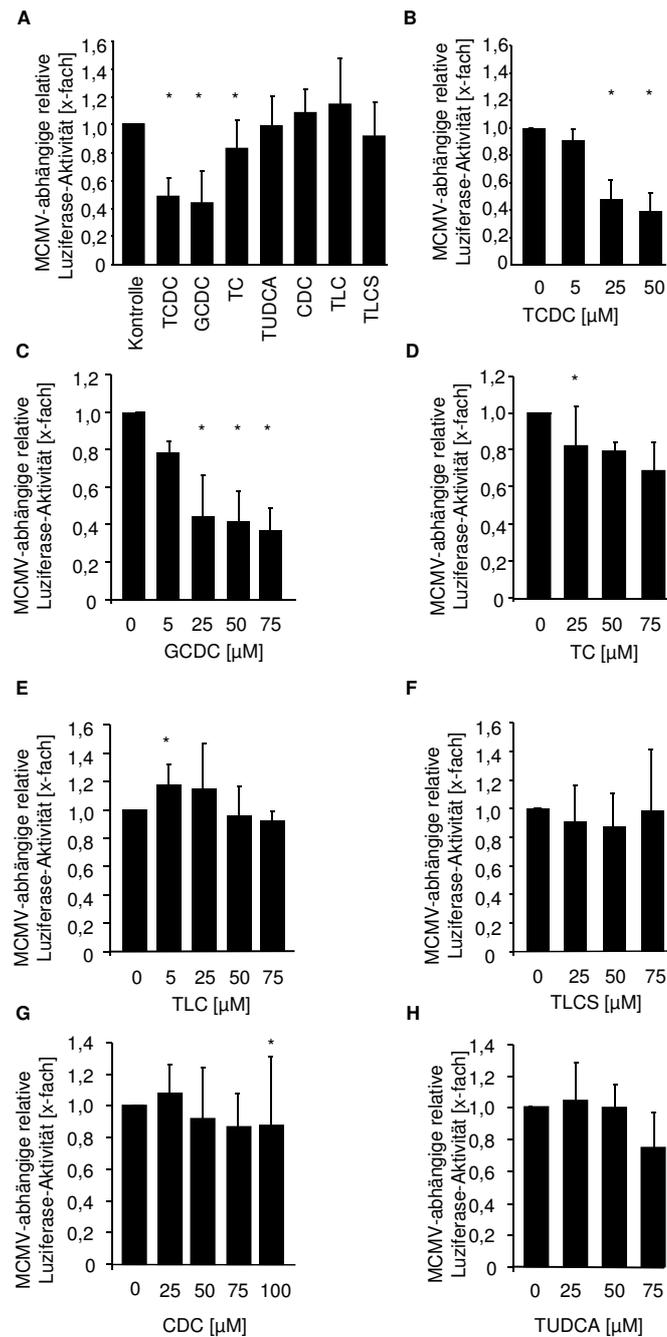


Abbildung 7: Einfluss von verschiedenen Gallensäuren auf die MCMV Replikation.

(A) 25 μM der Gallensäuren TCDC, GCDC, TC, TUDCA, CDC, TLC und TLCS wurden drei Stunden vor der Infektion mit $\Delta\text{m157-MCMV:Luziferase}$ (PFU/Zelle: 0,1) auf murine Hepatozyten gegeben. Die Luziferase-Aktivität wurde 24 Stunden nach der Infektion bestimmt. Verschiedene Konzentrationen TCDC (B), GCDC (C), TC (D), TLC (E), TLCS (F), CDC (G) oder TUDCA (H) wurden für drei Stunden auf murine Hepatozyten gegeben und die Zellen mit $\Delta\text{m157-MCMV:Luziferase}$ (PFU/Zelle: 0,1) infiziert. Die Luziferase-Aktivität wurde wiederum 24 Stunden nach der Infektion bestimmt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Die Wirkung vieler antiviraler Agenzien ist abhängig davon, wie hoch die Infektionsdosis ist. So sprechen Hepatitis C-Patienten mit hoher Virämie schlechter auf eine IFN-Therapie an als Patienten mit geringer Viruslast [187]. Da für die vorangegangenen Versuche relativ geringe Virusmengen von 0,1 PFU/Zelle verwendet wurden, sollte überprüft werden, ob TCDC auch nach Gabe höherer Infektionsdosen die Expression der virusabhängigen Luziferase beeinträchtigen kann. Es zeigte sich, dass die Inhibition der Virus-induzierten Luziferase-Aktivität durch 25 μ M TCDC unabhängig von der Infektionsdosis ist. Die inhibitorische Wirkung der Gallensäure TCDC ist sowohl bei Infektion mit geringen Virusmengen als auch bei hohen Virusmengen identisch (Abbildung 8).

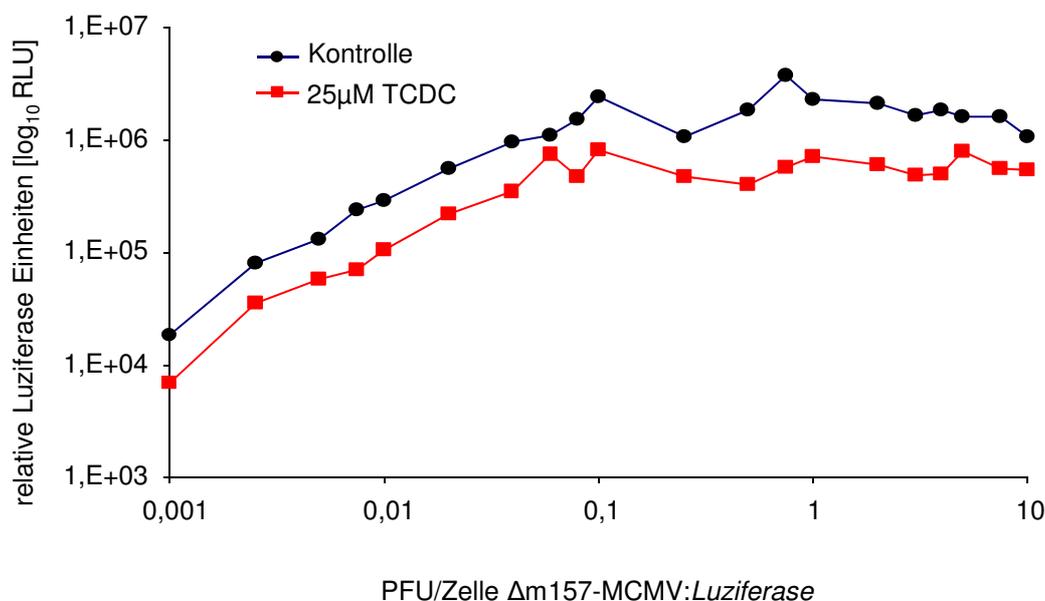


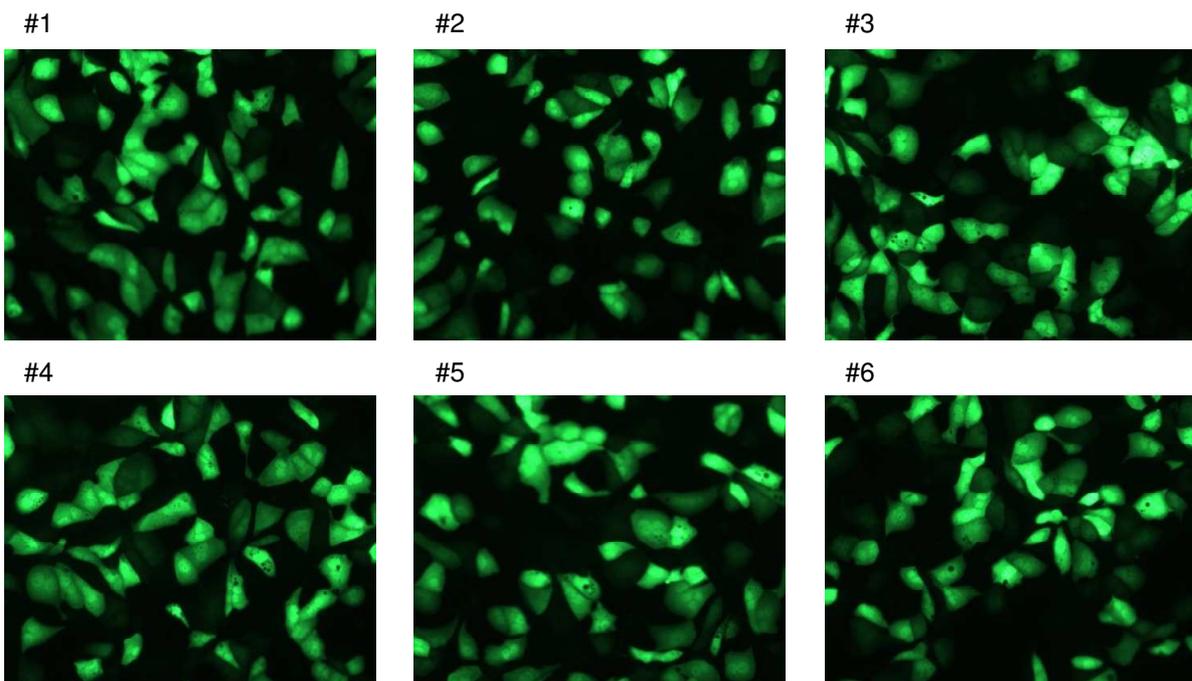
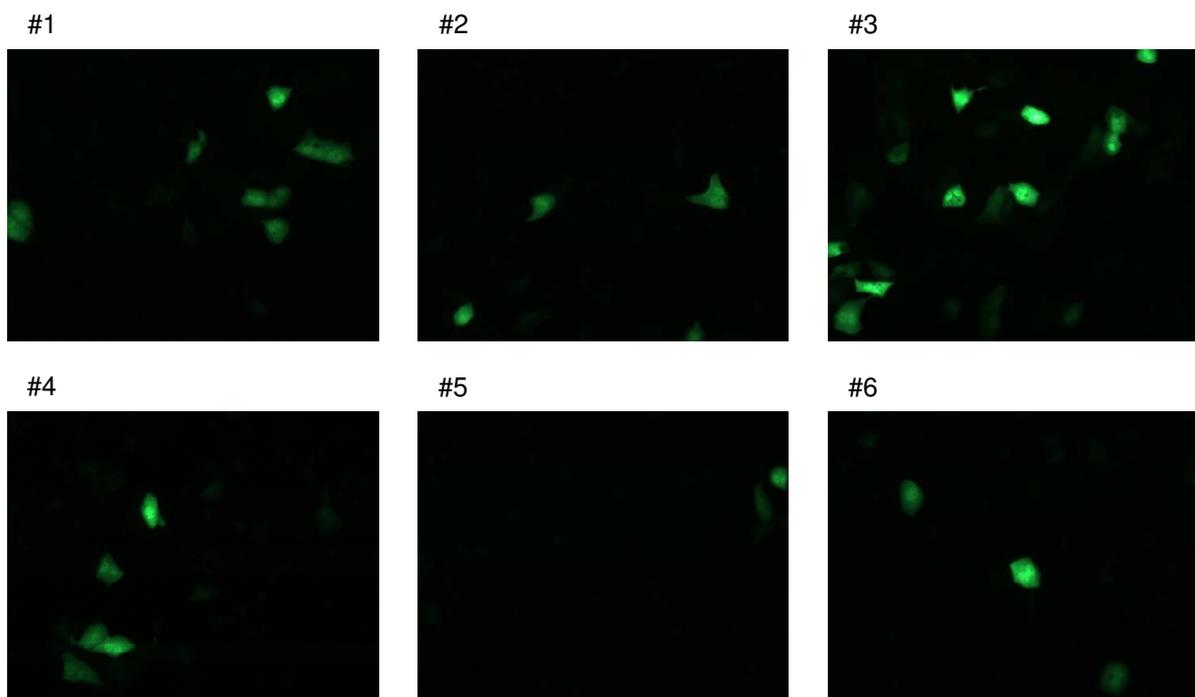
Abbildung 8: Die Wirkung der Gallensäure TCDC auf die MCMV-Replikation ist unabhängig von der Infektionsdosis.

Primäre murine Hepatozyten wurden mit 25 μ M TCDC inkubiert und nach drei Stunden mit verschiedenen Mengen Δ m157-MCMV:Luziferase (PFU/Zelle: 0,001-10) infiziert. Die Aktivität der virusabhängigen Luziferase wurde 24 Stunden nach der Infektion bestimmt. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von drei unabhängigen Versuchen.

Um eine direkte Wechselwirkung von Gallensäuren mit der Luziferase auszuschließen, wurden primäre Hepatozyten für drei Stunden mit TCDC vorbehandelt und für 24 Stunden

bzw. 48 Stunden mit MCMV:hMIEP-*gfp* infiziert. Die Abbildung 9 zeigt die MCMV-abhängige Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) in Hepatozyten. Es sind jeweils sechs Sichtfelder für unbehandelte Zellen (oberer Teil) und sechs Sichtfelder für Zellen, die mit TCDC vorbehandelt wurden (unterer Teil), gezeigt. Dabei konnte 25 μ M TCDC ebenfalls die virusabhängige Expression des GFPs inhibieren (Abbildung 9), sodass postuliert wird, dass Gallensäuren keinen direkten Einfluss auf die Luziferase-Aktivität haben.

Daraufhin wurde in Titrationsexperimenten die Wirkung von Gallensäuren auf die Virusreplikation untersucht, um zu testen, ob Gallensäuren nur Effekte auf die Expression einzelner viraler Gene haben oder auch die Virusreplikation beeinflussen können. Auch dazu wurden murine Hepatozyten drei Stunden mit TCDC vorbehandelt und für 24 Stunden bzw. 48 Stunden mit MCMV infiziert. Zusätzlich wurden Hepatozyten mit 500 U/ml IFN- α behandelt und ebenfalls infiziert, um die antivirale Wirkung von TCDC mit der von IFN- α zu vergleichen. Die Zellkultur-Überstände der infizierten Hepatozyten wurden 24 Stunden bzw. 48 Stunden nach der Infektion gesammelt und für eine Titration auf embryonalen murinen Fibroblasten verwendet. Die Überstände, die nach 24 Stunden von den Hepatozyten gewonnen wurden, zeigten auf den embryonalen murinen Fibroblasten nur eine geringe Infektiosität, sodass man davon ausgehen kann, dass die Virus-Replikation in Hepatozyten nach 24 Stunden noch nicht abgeschlossen ist. 48 Stunden nach der Infektion enthielten die Zellkultur-Überstände der Hepatozyten größere Mengen infektiöser Viruspartikel. TCDC konnte die Virusreplikation signifikant reduzieren ($p=0,0026$), dagegen hatte die Behandlung mit IFN- α (500 U/ml) keinen signifikanten Einfluss auf die Virusreplikation in den primären

MCMV:hMIEP-*gfp* unbehandeltMCMV:hMIEP-*gfp* 25 μ M TCDC**Abbildung 9: TCDC reduziert die Virus abhängige Expression des GFP.**

Primäre murine Hepatozyten wurden für drei Stunden mit 25 μ M TCDC inkubiert und mit MCMV:hMIEP-*gfp* (PFU/Zelle: 1) infiziert. Die oben gezeigten Fluoreszenzaufnahmen entstanden 48 Stunden nach der Infektion. Es sind jeweils sechs repräsentative Bildausschnitte gezeigt.

murinen Hepatozyten (Abbildung 10). TCDC wirkt somit signifikant stärker auf die Virusreplikation von MCMV als 500 U/ml IFN- α ($p=0,0008$). Dieser Versuch zeigt, dass Gallensäuren nicht nur einzelne virale Genprodukte regulieren, sondern die gesamte Virusreplikation reduzieren können.

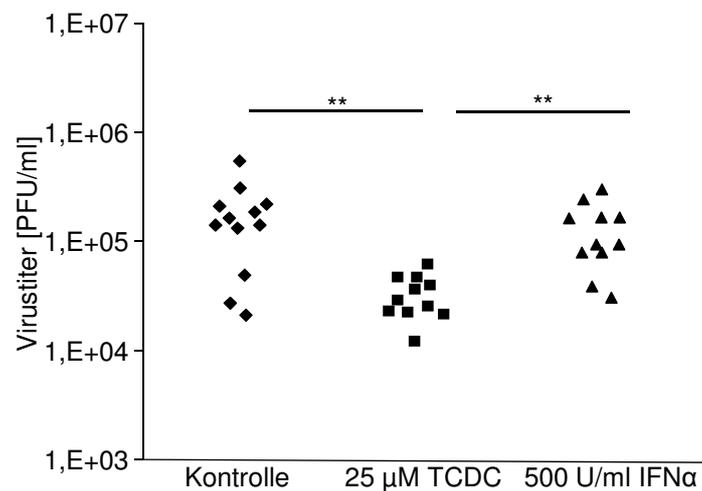


Abbildung 10: TCDC reduziert die MCMV-Replikation in primären murinen Hepatozyten.

Primäre murine Hepatozyten wurden für drei Stunden mit 25 μ M TCDC inkubiert und anschließend mit MCMV:hMIEP-*gfp* infiziert. Die Zellkultur-Überstände dieser Zellen wurden 48 Stunden nach der Infektion für ein Titrationsexperiment verwendet. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von drei unabhängigen Titrationsexperimenten, jeder Punkt repräsentiert den Titer eines Hepatozyten-Zellkultur-Überstandes einer separaten Probe. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, n.s. nicht signifikant

Der Vergleich der Ergebnisse der Titrationsexperimente mit den Ergebnissen der Messung der virusabhängigen Luziferase-Aktivität zeigte, dass mit beiden Messsystemen vergleichbare Ergebnisse erzielt werden konnten. Die Messung der virusabhängigen Luziferase-Aktivität wurde deshalb als Surrogat-Messung für die weiteren Versuche verwendet.

4.2. *In vivo* Wirkung von Gallensäuren auf die MCMV Replikation

Um zu klären, ob Gallensäuren auch *in vivo* eine Wirkung auf MCMV haben, wurden C57BL/6 Mäuse mit CDC-haltigem Futter gefüttert und mit MCMV infiziert. CDC wurde deshalb gewählt, weil es sich um die unkonjugierte Form der Gallensäuren TCDC bzw. GCDC handelt, welche *in vitro* am stärksten antiviral wirkten. Die konjugierten Formen (TCDC/GCDC) zu füttern ist nicht sinnvoll, da die Gallensäuren im Darm der Tiere dekonjugiert werden [188]. Somit würden TCDC oder GCDC zu CDC dekonjugiert werden. In der Leber wird CDC wieder mit Taurin oder Glycin zu TCDC bzw. GCDC konjugiert [21].

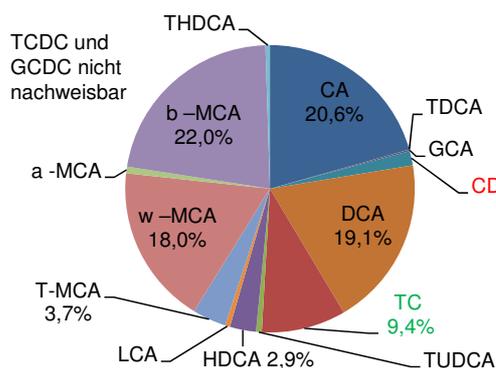
Die Mäuse wurden für den Versuch in vier Gruppen aufgeteilt. Die Tiere der ersten Gruppe erhielten CDC-freies Futter und wurden nicht mit MCMV infiziert. Die Mäuse der zweiten Gruppe erhielten ebenfalls CDC-freies Futter wurden jedoch mit MCMV infiziert. Die Tiere der dritten Gruppe blieben uninfiziert und erhielten CDC-haltiges Futter, während die Mäuse der vierten Gruppe CDC-haltiges Futter bekamen und mit MCMV infiziert wurden. Der Futterwechsel erfolgte drei Tage vor der Infektion mit $\Delta m157$ -MCMV:*Luziferase* (PFU $5 \cdot 10^6$). Um zu bestimmen, ob die Gallensäuren (TCDC, GCDC, TC), die *in vitro* eine antivirale Wirkung auf MCMV zeigten, im Plasma der Tiere in ausreichender Menge vorlagen, wurden die Gallensäuren-Konzentrationen der Tiere in Zusammenarbeit mit Dr. Diran Herebian (Kinderklinik, Universität Düsseldorf) bestimmt. Da die Fütterung mit Gallensäuren drei Tage vor der Infektion mit MCMV begonnen wurde, erfolgte die Bestimmung der Gallensäuren-Konzentrationen an Tag sechs (= Infektionstag drei), an Tag 10 (= Infektionstag sieben) und an Tag 17 (= Infektionstag 14) nach dem Futterwechsel. Die Plasma-Gallensäurenkonzentrationen der Mäuse, die CDC-freies Futter erhielten, lag bei 1-8 $\mu\text{mol/l}$ und wurde durch die MCMV Infektion nicht verändert. Die Fütterung von CDC-haltigem Futter erhöhte die Gallensäure-Gesamtkonzentration auf 9-65

$\mu\text{mol/l}$ in uninfizierten und 67-145 $\mu\text{mol/l}$ in MCMV infizierten Mäusen. Die Gallensäuren-Zusammensetzung von CDC-gefütterten Mäusen weicht stark von den Mäusen ab, die CDC-freies Futter erhielten (Abbildung 11). Das Plasma enthielt vor allem CDC und Gallensäuren, die durch die Konjugation mit Taurin (TCDC) oder Glycin (GCDC) bzw. bakterielle Modifikation (Lithocholsäure (LCA), TLC) aus CDC entstehen.

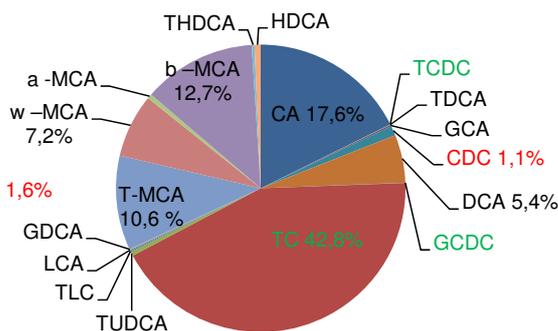
Bei den Tieren, die mit CDC-haltigem Futter gefüttert wurden, war die Konzentrationen der in den *in vitro* Versuchen (Abbildung 7) antiviral wirksamen Gallensäuren TCDC und GCDC zu allen Messzeitpunkten signifikant erhöht, während die TC-Konzentration zu allen Messzeitpunkten signifikant erniedrigt war. Dabei lag die höchste gemessene Plasma-Konzentration (Tag sechs nach Futterwechsel) der *in vitro* antiviral wirkenden Gallensäuren TCDC, GCDC und TC zusammen bei $0,54 \pm 0,66 \mu\text{mol/l}$ und ist somit etwa 46-mal geringer als die in den *in vitro* Versuchen genutzte Konzentration von 25 μM .

Die Virustiter der Tiere wurden in den Lebern, der Milz und den Lungen an Tag drei, sieben und 14 nach der Infektion bestimmt. Vergleicht man die MCMV-Titer in den Lebern der CDC-frei und CDC-gefütterten Mäuse verändern sich die MCMV-Titer über den gesamten Versuchszeitraum nicht signifikant (Abbildung 12). Am siebten Tag der Infektion wiesen die Lungen der CDC-gefütterten Mäuse jedoch geringere Virustiter auf ($p=0,025$), während die Titer an Tag drei und 14 nach der Infektion vergleichbar waren. Nach 14-tägiger Infektion war in den Milzen der CDC-gefütterten Tiere kein Virus mehr zu detektieren, während in den entsprechenden Kontrollen (CDC-freies Futter) noch in den Milzen von fünf Tieren Virus nachgewiesen werden konnte ($p=0,009$). Am dritten und siebten Tag der Infektion waren die Titer in den Milzen der Tiere, die CDC-freies und CDC-haltiges Futter erhielten, jedoch vergleichbar.

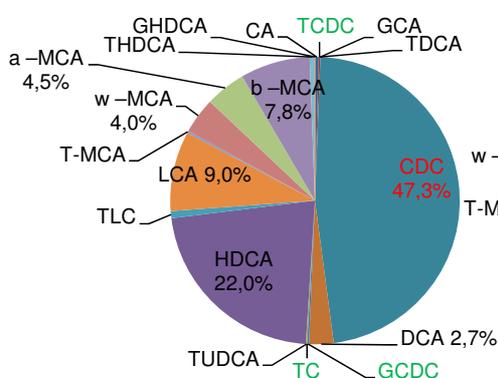
Gruppe 1: uninferiert CDC-freies Futter



Gruppe 2: infiziert CDC-freies Futter



Gruppe 3: uninferiert CDC-haltiges Futter



Gruppe 4: infiziert CDC-haltiges Futter

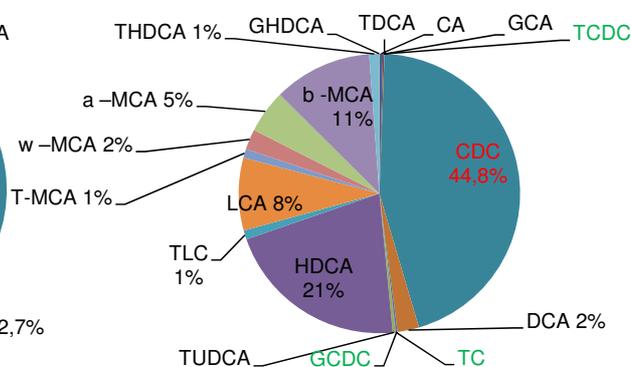


Abbildung 11: Plasma-Gallensäuren-Zusammensetzung CDC- gefütterter bzw. MCMV-infizierter Mäuse am sechsten Tag nach Futterwechsel.

Die Tortendiagramme zeigen die Mittelwerte der Gallensäurenkonzentration von drei verschiedenen Tieren die nicht mit MCMV infiziert wurden und CDC-freies Futter erhielten, vier Tieren die nicht infiziert wurden und CDC-haltiges Futter erhielten bzw. jeweils sieben Tieren die mit MCMV infiziert wurden und die beiden Futtersorten erhielten. Die dem Futter zugesetzte Gallensäure CDC ist in roter Schrift markiert, während die in den *in vitro* Versuchen antiviral wirksamen Gallensäuren TCDC, GCDC und TC in grüner Schrift dargestellt sind. Gallensäuren-Konzentrationen, die weniger als 1% der Gesamtgallensäuren ausmachten, sind nicht als Prozentzahlen aufgeführt. Cholsäure (CA), Glykocholsäure (GCA), Deoxycholsäure (DCA), Taurodeoxycholsäure (TDCA), Glykodeoxycholsäure (GDCA), Lithocholsäure (LCA), Hydroxycholsäure (HDCA), Taurohydroxycholsäure (THDCA), Glykohydroxycholsäure (GHDCG), *alpha*-Muricolsäure (a-MCA), *beta*-Muricolsäure (b-MCA), *Omega*-Muricolsäure (w-MCA), Tauromuricholsäure (T-MCA)

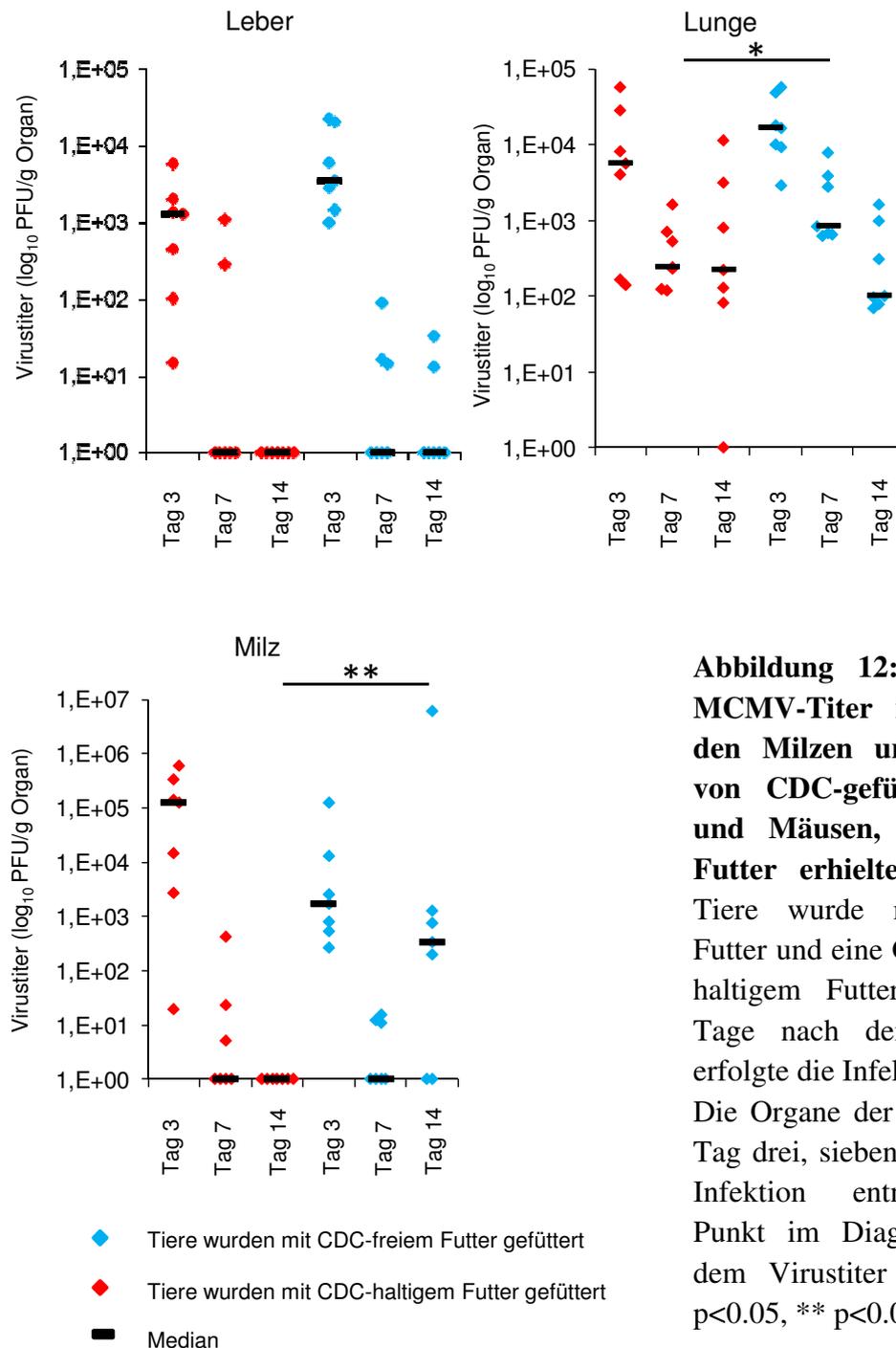


Abbildung 12: Vergleich der MCMV-Titer in den Lebern, den Milzen und den Lungen von CDC-gefütterten Mäusen und Mäusen, die CDC-freies Futter erhielten. Eine Gruppe Tiere wurde mit CDC-freiem Futter und eine Gruppe mit CDC-haltigem Futter gefüttert. Drei Tage nach dem Futterwechsel erfolgte die Infektion mit MCMV. Die Organe der Tiere wurden an Tag drei, sieben und 14 nach der Infektion entnommen. Jeder Punkt im Diagramm entspricht dem Virustiter eines Tieres. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

4.2.1. Einfluss einer MCMV-Infektion auf die Gallensäuren-Zusammensetzung in

Leberhomogenaten und Plasma

In Zusammenarbeit mit Dr. Diran Herebian (Kinderklinik, Universität Düsseldorf) wurde die Gallensäuren-Zusammensetzung in den Lebern uninfizierter- und MCMV-infizierter

C57BL/6 Mäusen (drei Tage nach der Infektion) bestimmt. Die MCMV-Infektion führte tendenziell zu einer Reduktion der Gesamtkonzentration an Gallensäuren, wobei diese Reduktion nicht signifikant war. Die Gesamtmenge der unkonjugierten Gallensäuren war in den Lebern infizierter Tiere signifikant reduziert ($p=0,009$), während die Summe der Taurin- bzw. Glycin-Konjugate nicht signifikant verändert war. In den Lebern infizierter Mäuse konnten signifikant reduzierte Mengen der unkonjugierten Gallensäuren UDCA ($p=0,047$), Deoxycholsäure (DCA; $p=0,028$) und der konjugierten Gallensäure Taurodeoxycholsäure (TDCA; $p=0,028$) gemessen werden (Abbildung 13).

Im Plasma von MCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen, welches am Tag drei, sieben und 14 nach der Infektion mit MCMV untersucht wurde, waren die Gesamt-Gallensäuren-Spiegel ($1-8 \mu\text{mol/l}$) über den gesamten untersuchten Zeitraum durch MCMV unverändert. Zu jedem untersuchten Zeitpunkt wurden die Gallensäuren-Spiegel von drei uninfizierten und sieben infizierten Mäusen untersucht. Drei Tage nach der Infektion, wenn die Virustiter in der Leber am höchsten sind (vergleiche Abbildung 12), war die Konzentration folgender konjugierter Gallensäuren statistisch signifikant erhöht: TCDC, GCDC, Taurodeoxycholsäure (TDCA), Glykodeoxycholsäure (GDCA), Taurohydroxycholsäure (THDCA) und TLC (Tabelle 7). Die Gesamtmenge der Glycin-konjugierten Gallensäuren war am dritten Tag nach der Infektion ebenfalls signifikant erhöht (von $\sim 7 \text{ nmol/l}$ in uninfizierten zu $\sim 69 \text{ nmol/l}$ in MCMV-infizierten Mäusen $p=0,04$).

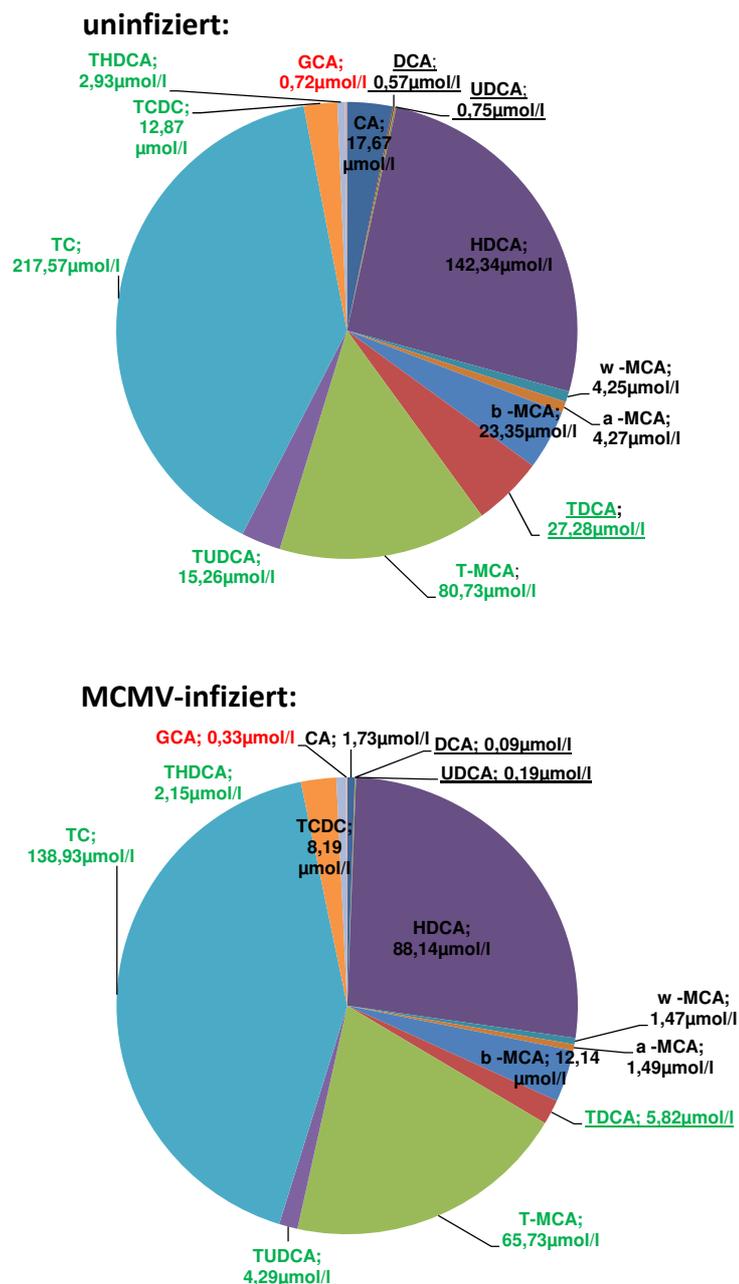


Abbildung 13: Gallensäuren-Zusammensetzung in Leberhomogenaten.

Gallensäuren-Spiegel in den Lebern uninfizierter Mäuse und für drei Tage mit MCMV infizierter Mäuse. Unkonjugierte Gallensäuren sind in der Schriftfarbe schwarz, Taurin-Konjugate grün und Glycin-Konjugate rot gekennzeichnet. Signifikant veränderte Gallensäuren sind unterstrichen, Gallensäuren deren Konzentrationen unter $0,5 \mu\text{mol/l}$ lagen sind nicht dargestellt. Die Gallensäuren-Konzentrationen wurden von jeweils fünf Mäusen bestimmt. Im Diagramm sind die Mittelwerte der Gallensäuren-Konzentrationen dargestellt. Glykocholsäure (GCA), Deoxycholsäure (DCA), Taurodeoxycholsäure (TDCA), Hydroxycholsäure (HDCA), Taurohydroxycholsäure (THDCA), *alpha*-Muricholsäure (a-MCA), *beta*-Muricholsäure (b-MCA), *Omega*-Muricholsäure (w-MCA), Tauromuricholsäure (T-MCA)

Gallensäure	Gallensäuren-Konzentration [nmol/l] in uninfizierten Tieren	Gallensäuren-Konzentration [nmol/l] in MCMV-infizierten Tieren	Signifikanz
TCDC	nicht messbar	~8	p=0,03
GCDC	nicht messbar	~8	p=0,03
TDCA	~1	~17	p=0,04
GDCA	nicht messbar	~17	p=0,03
THDCA	~22	~86	p=0,049
TLC	nicht messbar	~33	p=0,003

Tabelle 7: Plasma-Gallensäuren-Spiegel nach dreitägiger MCMV Infektion.

Drei Tage nach der Infektion mit MCMV sind in Mäusen (Daten von sieben Tieren) die Plasma-Gallensäuren-Spiegel von TCDC, GCDC, Taurodeoxycholsäure (TDCA), Glykocodeoxycholsäure (GDCA), Taurohydroxycholsäure (THDCA) und TLC im Vergleich zu uninfizierten Mäusen (Daten von drei Tieren) erhöht.

Sieben Tage nach der Infektion waren im Vergleich zur uninfizierten Kontrolle die Menge an Glycinkonjugaten (p=0,02) und der Gallensäuren Taurodeoxycholsäure (TDCA), TLC und Glykocodeoxycholsäure (GDCA) erhöht (Tabelle 8).

Gallensäure	Gallensäuren-Konzentration [nmol/l] in uninfizierten Tieren	Gallensäuren-Konzentration [nmol/l] in MCMV-infizierten Tieren	Signifikanz
TDCA	~2	~4	p=0,02
TLC	nicht messbar	~5	p=0,002
GDCA	nicht messbar	~4	p=0,002

Tabelle 8: Plasma-Gallensäuren-Spiegel nach siebentägiger MCMV Infektion.

Am siebten Tag nach der Infektion mit MCMV sind die Plasma-Gallensäuren-Spiegel von Taurodeoxycholsäure (TDCA), TLC und Glykocodeoxycholsäure (GDCA) infizierter Mäuse (Daten von sieben Tieren) im Vergleich zu uninfizierten Mäusen (Daten von 3 Tieren) signifikant erhöht.

Nach 14-tägiger Infektion waren die Gallensäuren Lithocholsäure (LCA), TLC, Glykodeoxycholsäure (GDCA), Taurodeoxycholsäure (TDCA) und TCDC im Plasma erhöht. Auch hier fanden sich wieder mehr Glycin-konjugierte Gallensäuren (~4 vs. ~11 nmol/l, $p=0,014$) als im Plasma uninfizierter Mäuse (Tabelle 9).

Gallensäure	Gallensäuren-Konzentration [nmol/l] in uninfizierten Tieren	Gallensäuren-Konzentration [nmol/l] in MCMV-infizierten Tieren	Signifikanz
TDCA	nicht messbar	~4	$p=0,002$
TLC	nicht messbar	~5	$p=0,006$
GDCA	nicht messbar	~4	$p=0,002$
LCA	~5	~7	$p=0,044$
TCDC	nicht messbar	~2	$p=0,029$

Tabelle 9: Plasma-Gallensäuren-Spiegel nach 14-tägiger MCMV Infektion.

In 14 Tage lang infizierten Mäusen (Daten von sieben Tieren) sind die Gallensäuren-Spiegel von Taurodeoxycholsäure (TDCA), TLC, Glykodeoxycholsäure (GDCA), Lithocholsäure (LCA) und TCDC im Plasma im Vergleich zu uninfizierten Mäusen (Daten von drei Tieren) erhöht.

Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass die MCMV-Infektion Einfluss auf die Gallensäuren-Zusammensetzung nimmt. Dabei fällt auf, dass vor allem die Menge der Glycin-konjugierten Gallensäuren in Plasma zunimmt und vermehrt sekundäre Gallensäuren wie TLC, LCA und Taurohydroxycholsäure (THDCA) auftreten. Auffällig ist, dass nur die Konzentration von Taurodeoxycholsäure (TDCA) in der Leber und im Plasma signifikant verändert ist. Die Taurodeoxycholsäure (TDCA)-Konzentration in den Lebern infizierten Mäusen nimmt ab während die Plasma-Konzentration zunimmt. Somit scheint mehr Taurodeoxycholsäure (TDCA) im Plasma zu verbleiben.

4.3. Gallensäuren-vermittelte Wirkung auf die HCMV-Replikation

Mit Hilfe von primären humanen Hepatozyten wurde versucht den antiviralen Effekt von Gallensäuren auf HCMV zu übertragen. Wegen der strengen Speziespezifität von CMV können Effekte von HCMV nur in humanen Zellen untersucht werden. Dazu wurden primäre humane Hepatozyten verwendet, die bei Tumoroperationen gewonnen wurden. Die Zellen wurden mit Gallensäuren vorbehandelt und nach drei Stunden mit HCMV-TB40E infiziert. Insgesamt konnten primäre Hepatozyten von vier Patienten untersucht werden. Als Maß für die Virusreplikation wurde die Expression des *immediate early* Proteins pIE1-pp72 untersucht.

Bei einem Patienten konnten 25 μM und 50 μM TCDC die Expression des *immediate early* Proteins pIE1-pp72 über einen Zeitraum von 120 Stunden nach der Infektion reduzieren (Abbildung 14A). In Hepatozyten eines weiteren Patienten hatte TCDC keinen Einfluss auf die Expression von pIE1-pp72. Nach 24-stündiger Infektion konnten jedoch 25 μM CDC, 25 μM TLC und 25 μM TC die Expression von pIE1-pp72 reduzieren (Abbildung 14B). Die Hepatozyten einer dritten Präparation konnten nicht erfolgreich infiziert werden, während in den Hepatozyten des letzten Patienten 25 μM und 50 μM TCDC nicht in der Lage waren das *immediate early* Protein pIE1-pp72 zu reduzieren.

Aufgrund der geringen Stichprobengröße und wegen mangelnder Verfügbarkeit der Hepatozyten konnte nicht abschließend geklärt werden, ob Gallensäuren auch einen antiviralen Effekt auf HCMV haben. Dabei ist zu bedenken, dass der CMV Infektionsstatus der Patienten unbekannt ist und eine bestehende Infektion einen Einfluss auf den antiviralen Effekt von Gallensäuren haben könnte. Des Weiteren werden die Hepatozyten bei Tumoroperationen aus dem Tumor-umschließenden Gewebe gewonnen. Dabei ist unklar, ob

diese Hepatozyten in Hinsicht auf die Expression von Gallensäuren-Signalelementen identisch zu normalen Hepatozyten sind.

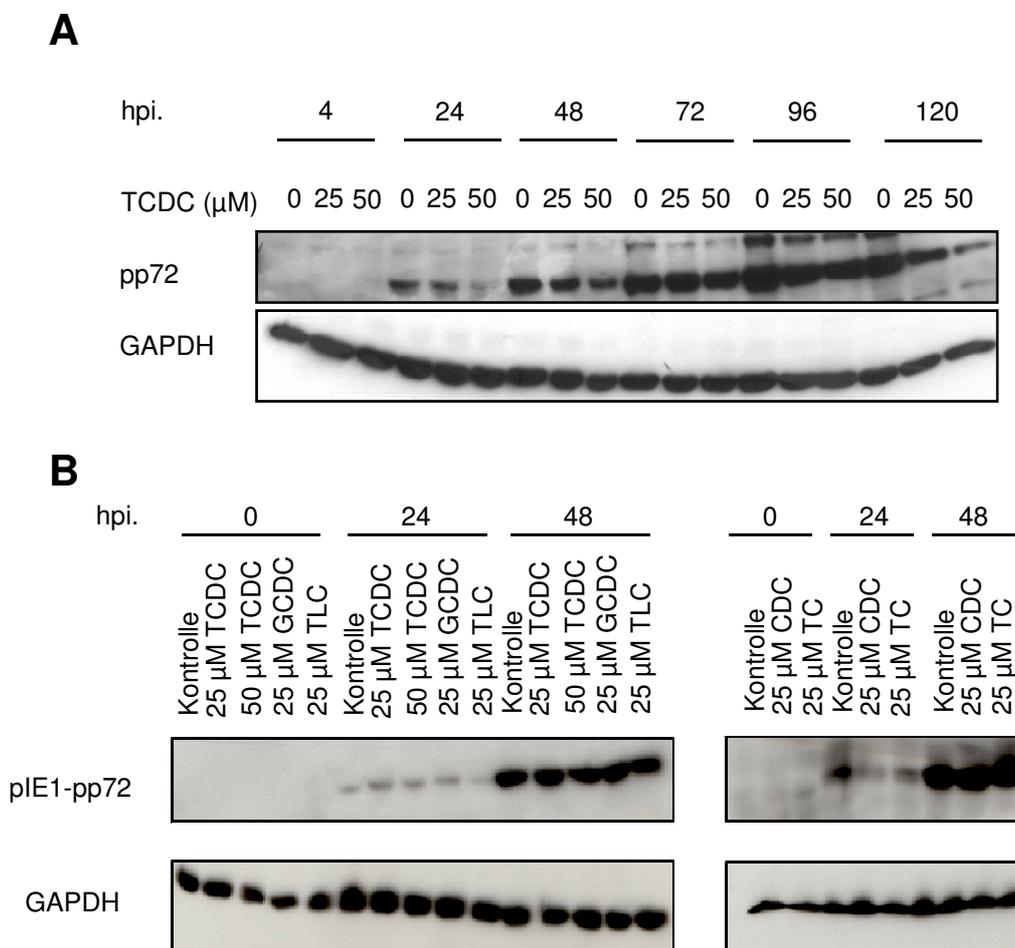


Abbildung 14: Infektion von primären humanen Hepatozyten mit HCMV TB40E.

(A) Primäre humane Hepatozyten eines Patienten wurden mit 25/50 μM TCDC für drei Stunden vorbehandelt und mit TB40E (PFU/Zelle:0,5) über 120 Stunden infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und das pIE1-pp72 Protein im Western-Blot nachgewiesen. (B) Primäre humane Hepatozyten eines weiteren Patienten wurden mit TCDC, GCDC, TLC, CDC oder TC in den angegebenen Konzentrationen für drei Stunden inkubiert und mit TB40E (PFU/Zelle:1) für 24 und 48 Stunden infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und pIE1-pp72 im Western-Blot nachgewiesen. Aufgrund der Probenzahl wurden die Proben auf 2 verschiedene Gele aufgetragen, die im Bereich B separat dargestellt sind.

4.4. Beteiligung Gallensäuren-abhängiger Signalelemente am antiviralen Effekt

4.4.1. Der antivirale Effekt ist abhängig vom Gallensäuren-Import

Um den antiviralen Effekt von Gallensäuren genauer zu charakterisieren, wurde untersucht, ob Gallensäuren-Transporter, Gallensäuren-Rezeptoren, nukleäre Rezeptoren und bekannte Signalelemente, die an Gallensäuren-Signalwegen beteiligt sind, für die Vermittlung des antiviralen Effekts auf MCMV benötigt werden. Die Gallensäuren-Transporter NTCP und ASBT werden nur in der Leber und im Darm exprimiert [189]. Der Gallensäuren-Rezeptor TGR-5 hingegen wird auf einer ganzen Reihe von Zellen, unter anderem Makrophagen [84] und Sinusoid-Endothel Zellen [82], exprimiert. Der Gallensäuren-Import in Hepatozyten erfolgt durch den NTCP, den OATP1 und den OATP4 [21].

Obwohl der TGR-5 in Hepatozyten höchstwahrscheinlich nicht exprimiert wird [82], ist es denkbar, dass Gallensäuren weitere G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktivieren. Dies würde zur Produktion von cAMP in Hepatozyten und Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) führen. Eine 30-minütige Inkubation von primären murinen Hepatozyten mit 100 μM cAMP vor der Infektion mit MCMV führte zu einer Inhibition der MCMV abhängigen Luziferase-Aktivität (Abbildung 15). Dieser Effekt bleibt auch bestehen, wenn die PI3K oder die PKA durch spezifische Inhibitoren (Ly294002 und Wortmannin für PI3K bzw. PKI zur Inhibition von PKA) blockiert wird. Ly294002 selber reduziert die MCMV-abhängige Luziferase-Aktivität deutlich.

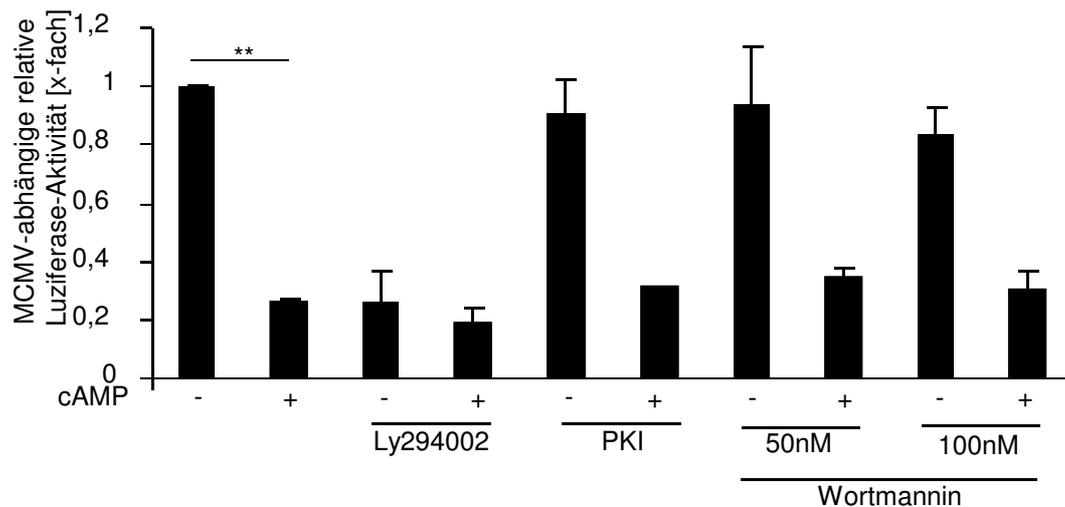


Abbildung 15: cAMP inhibiert die Virusreplikation in primären murinen Hepatozyten.

Die Inhibitoren Ly294002 [50 μ M], PKI [2,3nM] und Wortmannin [50 bzw. 100nM] wurden 30 Minuten vorinkubiert, bevor für weitere 30 Minuten cAMP [100 μ M] zu den primären Hepatozyten gegeben wurde. Die Zellen wurden mit MCMV (PFU/Zelle: 0,1) infiziert und die Luziferase-Aktivität nach 24 Stunden bestimmt. Für die kombinatorische Gabe von cAMP und den Inhibitoren konnten nur zwei unabhängige Versuche durchgeführt werden, sodass keine Statistik berechnet werden konnte. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s. nicht signifikant

Daraufhin wurde untersucht, ob TCDC in der Lage ist in primären murinen Hepatozyten cAMP zu induzieren. Die Inkubation von 25 μ M TCDC für drei Stunden führte jedoch nicht zu einem Anstieg des cAMP Levels in den Hepatozyten (unpublizierte Befunde von Dr. Katrin Haselow), sodass cAMP und TCDC unabhängig voneinander die Replikation von MCMV beeinflussen können. Daneben ist auch der antivirale Effekt von TCDC PKA-unabhängig, wie in Experimenten in Anwesenheit eines PKA-Inhibitors gezeigt werden konnte (Abbildung 16). Aufgrund dieser Ergebnisse erscheint eine Beteiligung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren am antiviralen Effekt von Gallensäuren unwahrscheinlich.

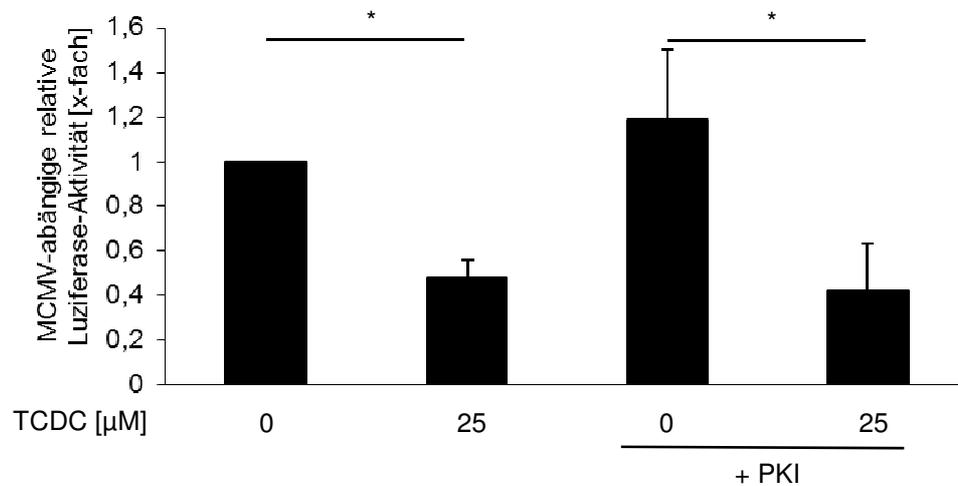


Abbildung 16: Der antivirale Effekt von TCDC ist unabhängig von der PKA.

Primäre murine Hepatozyten wurden mit dem PKA-Inhibitor PKI (2,3 nM) für 30 Minuten inkubiert und dann für weitere drei Stunden mit 25 µM TCDC behandelt, bevor sie mit MCMV (PFU/Zelle: 0,1) infiziert wurden. Die relative Luziferase-Aktivität wurde 24 Stunden nach der Infektion gemessen. * p<0.05, ** p<0.01, n.s. nicht signifikant

Um zu testen, ob Gallensäuren in die Hepatozyten transportiert werden müssen, um den antiviralen Effekt zu vermitteln, wurden Fibroblasten untersucht, die keine Gallensäuren-Transporter exprimieren [190]. Dazu wurden murine NIH/3T3-Zellen und MEF mit 25 µM TCDC für drei Stunden inkubiert und mit Δ m157-MCMV:*Luziferase* infiziert. Die Expression von Luziferase als Marker für die virale Genexpression wurde nach 24 Stunden gemessen. Dabei zeigte die Gabe von Gallensäuren in beiden Zelltypen keinen Effekt auf die Expression von Luziferase (Abbildung 17). Daraus kann gefolgert werden, dass Gallensäuren in diesen beiden Fibroblasten-Zelltypen keinen antiviralen Effekt haben und somit der Import von Gallensäuren möglicherweise eine entscheidende Rolle für den antiviralen Effekt von Gallensäuren spielt. Darüber hinaus ist es auch möglich, dass Gallensäuren in Hepatozyten

spezifische Signalelemente aktivieren, die in den Fibroblasten-Zelllinien nicht exprimiert werden.

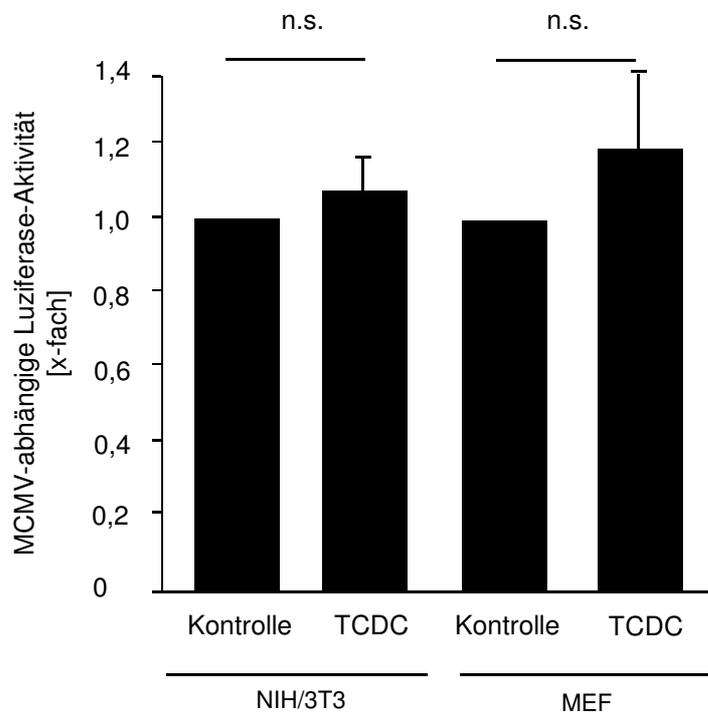


Abbildung 17: Gallensäuren haben keinen Effekt auf die MCMV-Replikation in NIH/3T3 und MEF-Zellen.

NIH/3T3 und MEF-Zellen wurden drei Stunden mit 25 μ M TCDC vorbehandelt und dann mit Δ m157-MCMV:Luziferase (PFU/Zelle: 0,1) infiziert. Die virusabhängige Luziferase-Aktivität wurde nach 24 Stunden bestimmt. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s. nicht signifikant

In den vorhergegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Gallensäure TUDCA keinen antiviralen Effekt auf MCMV vermittelt (Abbildung 7). Da TUDCA und TCDC beide durch Gallensäuren-Transporter in die Zelle importiert werden müssen [50, 191], sollten TUDCA und TCDC um den Transport in die Hepatozyten konkurrieren. Wenn der antivirale Effekt von TCDC abhängig vom Import in die Zelle ist, müsste TUDCA in der Lage sein den antiviralen Effekt von TCDC aufzuheben. Primäre murine Hepatozyten wurden deshalb mit einer Kombination aus TCDC und aufsteigenden Konzentration TUDCA behandelt (Abbildung 18A). Nach drei Stunden wurden die Zellen mit Δ m157-MCMV:Luziferase

infiziert. Die antivirale Wirkung von TCDC auf MCMV wurde umso schwächer, je mehr TUDCA zugegeben wurde. Die Koinkubation von 75 μ M TUDCA mit 25 μ M TCDC führte schließlich zur Aufhebung des antiviralen Effekts (Abbildung 18A). Eine längere Kulturdauer von primären Hepatozyten führt dazu, dass diese die Fähigkeit für den Transport von Gallensäuren verlieren, da die Expression der Gallensäuren-Transporter herunterreguliert wird [192]. In über vier Tage kultivierten Hepatozyten konnte eine drei-stündige Vorinkubation mit TCDC keinen antiviralen Effekt mehr auf MCMV induzieren (Abbildung 18B), während der antivirale Effekt in Zellen, die nur einen Tag kultiviert wurden, durch Gallensäuren induziert werden konnte.

Der NTCP transportiert bis zu 80% der Gallensäuren, die in Hepatozyten aufgenommen werden [79]. Primäre murine Hepatozyten wurden mit Gallensäuren inkubiert und gleichzeitig mit dem NTCP-Inhibitor Irbesartan [193] behandelt, bevor sie mit MCMV infiziert wurden. Dabei konnte Irbesartan den antiviralen Effekt von TCDC vollständig aufheben (Abbildung 18C). Diese Daten belegen, dass der antivirale Effekt von TCDC auf MCMV in primären murinen Hepatozyten abhängig von der Expression und der Aktivität des Gallensäuren-Importers NTCP ist.

Um zu testen, ob die alleinige Anwesenheit von NTCP ausreicht, um den antiviralen Effekt von TCDC zu induzieren, wurden die nicht Gallensäuren-responsiblen NIH/3T3-Zellen lentiviral mit dem Gallensäuren-Transporter NTCP transfiziert. Um die Funktionalität des Gallensäuren-Transports in den NIH/3T3-hNTCP-Zellen zu testen, wurde die Internalisierung einer fluoreszierenden Gallensäure untersucht. Eine mikroskopische Analyse zeigte, dass die NIH/3T3-hNTCP-Zellen die fluoreszierende Gallensäure Cholyl-lysyl-Fluorescein (CLF) transportieren konnten (Abbildung 19A). Daraufhin wurden die NIH/3T3-hNTCP-Zellen mit 25 μ M TCDC behandelt, was zum Absterben der Zellen führte.

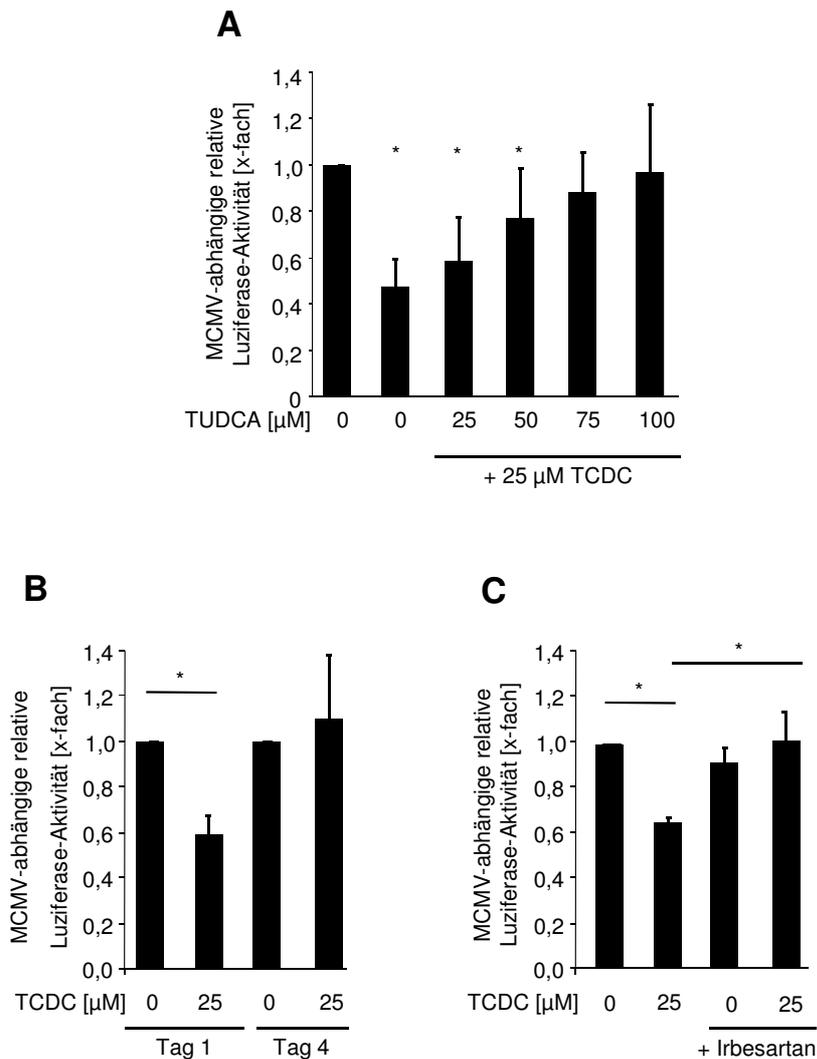


Abbildung 18: NTCP abhängiger TCDC-Import ist entscheidend für die Inhibition von MCMV durch Gallensäuren.

(A) 25 μM TCDC und steigende Konzentrationen TUDCA (25-100 μM) wurden in Kombination zu primären murinen Hepatozyten gegeben. Die Infektion mit $\Delta\text{m157-MCMV:Luziferase}$ (PFU/Zelle: 0,1) erfolgte drei Stunden später. Die Luziferase-Aktivität wurde 24 Stunden nach der Infektion bestimmt. (B) Primäre murine Hepatozyten wurden einen Tag oder vier Tage nach der Präparation mit 25 μM TCDC behandelt und nach drei Stunden mit $\Delta\text{m157-MCMV:Luziferase}$ (PFU/Zelle: 0,1) infiziert. Die Luziferase-Aktivität wurde jeweils 24 Stunden später gemessen. (C) Primäre murine Hepatozyten wurden für drei Stunden mit dem NTCP Inhibitor Irbesartan (50 μM) und mit 25 μM TCDC behandelt, bevor sie für weitere 24 Stunden mit $\Delta\text{m157-MCMV:Luziferase}$ (PFU/Zelle: 0,1) infiziert wurden. Die Zellen wurden lysiert und die Luziferase-Aktivität bestimmt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

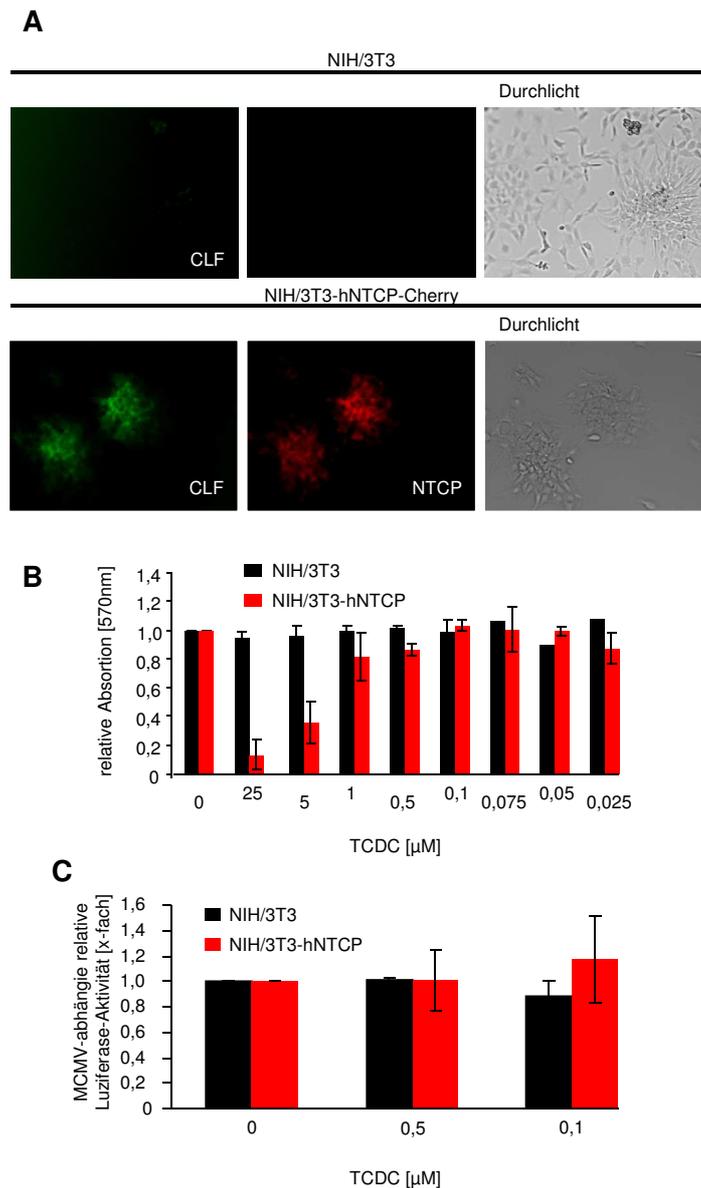


Abbildung 19: Lentivirale Transfektion von NIH/3T3-Zellen mit hNTCP – Gallensäuretransport und Toxizität.

NIH/3T3 Zellen wurden mit hNTCP lentiviral transfiziert. (A) NIH/3T3-hNTCP Zellen können die fluoreszierende Gallensäure Cholyl-lysyl-Fluorescein (grün, linkes Bild) transportieren. Der Gallensäuren-Transporter NTCP wurde über einen Cherry-markierten Tag (rot, mittleres Bild) lokalisiert. Durchlichtaufnahme der NIH/3T3-Zellen (rechtes Bild). (B) MTT-Assay von NIH/3T3-hNTCP-Zellen im Vergleich zu NIH/3T3-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen TCDC. (C) TCDC-Konzentrationen, die im MTT-Assay keine Zeichen von Toxizität zeigten, wurden verwendet, um NIH/3T3-hNTCP-Zellen und NIH/3T3-Zellen drei Stunden vor der Infektion mit $\Delta m157$ -MCMV:*Luziferase* (PFU/Zelle:0,1) zu behandeln. Die Luciferase Aktivität wurde 24 Stunden nach der Infektion bestimmt.

Die Gallensäuren-Konzentrationen, die in einem MTT-Assay keinen Effekt auf die Zellviabilität zeigten, wurden hinsichtlich ihres antiviralen Potenzials untersucht (Abbildung 19B/C). Dazu wurden 0,5 bzw. 0,1 μM TCDC drei Stunden vor der Infektion zu den NIH/3T3-hNTCP-Zellen gegeben. Diese Gallensäuren-Konzentrationen (0,5 bzw. 0,1 μM) konnten die MCMV-abhängige Expression von Luziferase nicht beeinflussen (Abbildung 19C). Somit sind entweder die von NIH/3T3-Zellen tolerierten Gallensäuren-Konzentrationen zu gering, um einen antiviralen Effekt auf MCMV zu induzieren oder die alleinige Expression des NTCP reicht nicht aus, um den antiviralen Effekt von Gallensäuren zu vermitteln, da noch weitere Hepatozyten-spezifische Signalelemente benötigt werden.

4.4.2. Beteiligung nukleärer Gallensäuren-Rezeptoren am antiviralen Effekt

Gallensäuren können eine Reihe nukleärer Rezeptoren wie den FXR, den Vitamin D Rezeptor, den Pregnan-X-Rezeptor oder den *constitutive androstane receptor* aktivieren und darüber die Genexpression modulieren [21, 79, 170, 194]. Der FXR hat Einfluss auf die Gallensäuren-Synthese, den Gallensäuren-Export, den Metabolismus und Entgiftungsprozesse der Leber. Daneben ist der FXR für die Wirkung von Gallensäuren auf die Replikation von Hepatitis C Viren, Hepatitis B Viren und Rotaviren essenziell [102, 105, 111]. Deshalb wurde untersucht, ob der FXR auch eine entscheidende Rolle für die Gallensäuren-vermittelte Inhibition der MCMV-Replikation spielt. Dazu wurden primäre murine Hepatozyten mit TCDC oder dem FXR-Agonisten GW4064 drei Stunden vor der Infektion inkubiert und anschließend mit $\Delta\text{m157-MCMV:Luziferase}$ infiziert. Zur Detektion der Virusreplikation wurde die virusabhängige Luziferase-Aktivität bestimmt. Dabei konnte 3 und 5 μM GW4064 überraschenderweise die Virusreplikation steigern (3 μM : $p=0,008$; 5 μM : $p=0,012$)

(Abbildung 20A). Ein weiterer FXR-Agonist INT747, der ebenfalls drei Stunden vor der Infektion zu den primären Hepatozyten gegeben wurde, hatte dagegen keinen Einfluss auf die MCMV-abhängige Expression von Luziferase (Abbildung 20B). Die gemeinsame Gabe von GW4064 und TCDC führte konzentrationsabhängig zu einer Inhibition der proviralen Wirkung von GW4064 durch TCDC (Abbildung 20C). Somit wirkt TCDC unabhängig vom FXR inhibitorisch auf die MCMV-Replikation. Um eine Beteiligung des FXR an der antiviralen Wirkung von TCDC vollständig auszuschließen, wurde der inhibitorische Effekt in FXR^{-/-} Hepatozyten analysiert. Diese wurden ebenfalls für drei Stunden mit TCDC (25 µM) bzw. GW4064 (5 µM) vorbehandelt, bevor sie mit Δ m157-MCMV:*Luziferase* infiziert wurden.

Die Gabe von 25 µM TCDC führte in den FXR^{-/-}-Hepatozyten wie in Wildtyp-Hepatozyten zu einer Inhibition der Luziferase-Aktivität ($p=0,008$), sodass eine essenzielle Beteiligung des FXR an der Inhibition der Virusreplikation durch Gallensäuren auszuschließen ist (Abbildung 20D). Darüber hinaus hatte GW4064 auch in den FXR^{-/-}-Hepatozyten eine steigernde Wirkung auf die virusabhängige Luziferase-Aktivität ($p=0,002$). Daraus kann geschlossen werden, dass GW4064 neben der Induktion des FXR noch weitere zelluläre Effekte auslösen kann.

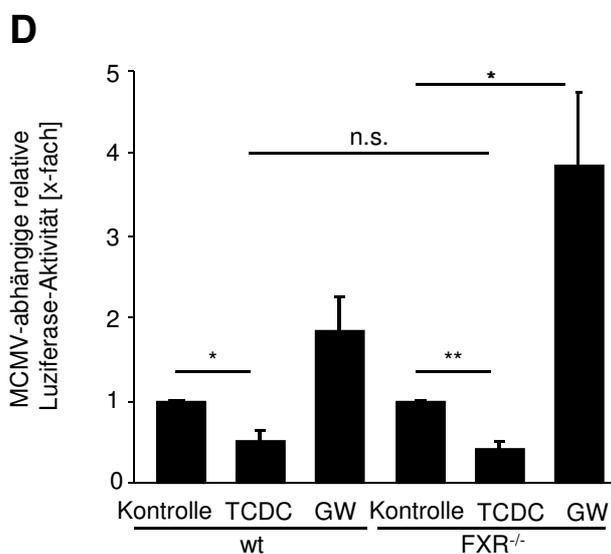
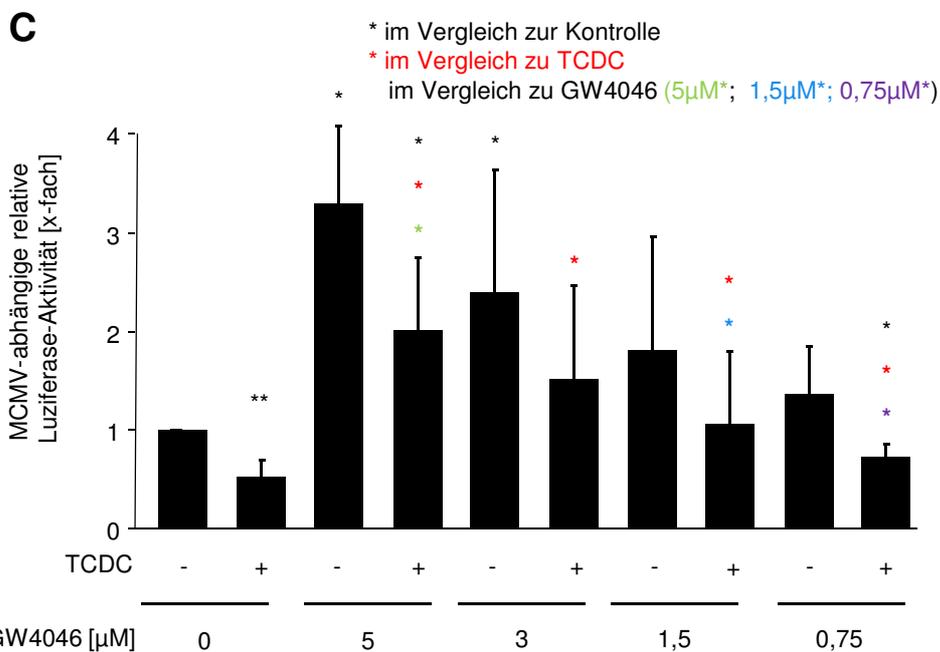
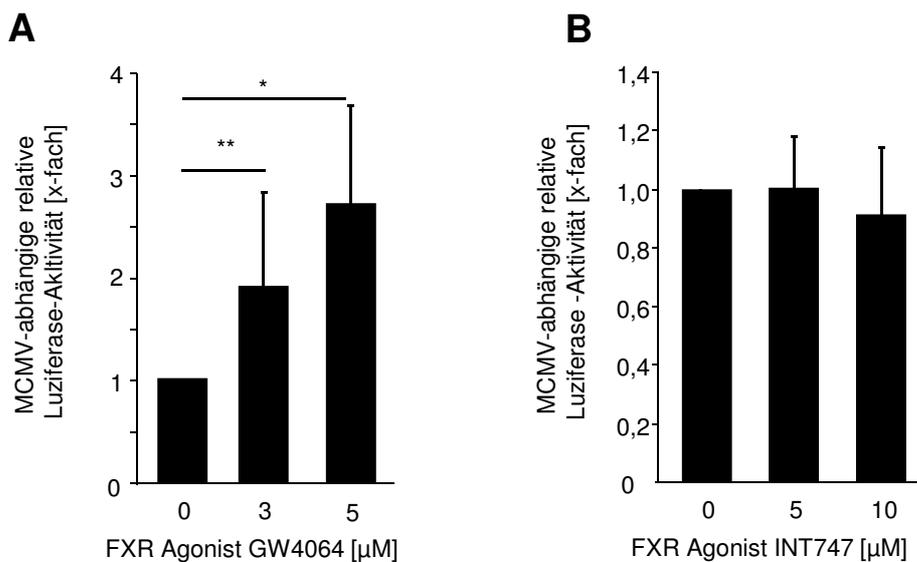


Abbildung 20: Die Wirkung von TCDC auf MCMV ist unabhängig vom FXR. Die Gabe von TCDC, GW4064 und INT747 erfolgte bei allen Versuchen drei Stunden vor der Infektion der primären Hepatozyten mit Δ m157-MCMV:Luziferase (PFU/Zelle: 0,1). Die virusabhängige Luziferase-Aktivität wurde 24 hpi. gemessen. (A/B) Wirkung der FXR-Agonisten GW4064 und INT747 auf die MCMV-abhängige Luziferase-Expression. (C) TCDC hebt den proviralen Effekt von GW4064 teilweise auf. (D) Effekte von TCDC und GW (GW4064) in FXR^{-/-} Hepatozyten. * p<0.05, ** p<0.01, n.s. nicht signifikant

Ein weiterer nukleärer Rezeptor für Gallensäuren, insbesondere für LCA, ist der Vitamin D Rezeptor [21, 194]. Da Vitamin D über den Vitamin D Rezeptor die Immunität der Zelle beeinflussen kann [195], wurde die Beteiligung des Vitamin D Rezeptor am antiviralen Effekt von Gallensäuren untersucht. Die Aktivierung des Vitamin D Rezeptor durch Calcifediol (0,5 μ M; Vitamin D) führte nicht zu einer Reduktion der MCMV-abhängigen Expression von Luziferase (Abbildung 21).

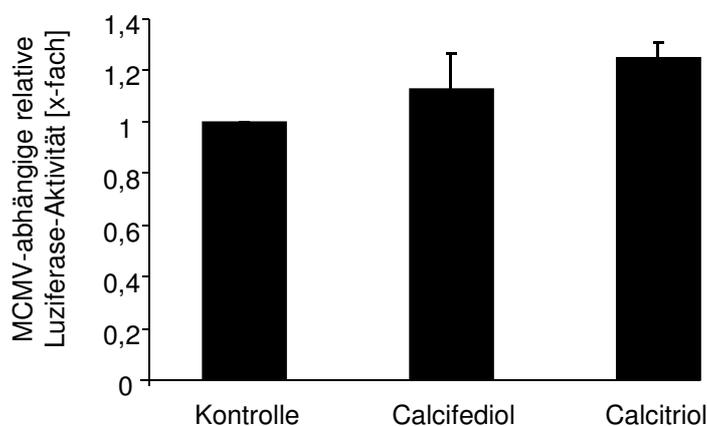


Abbildung 21: Vitamin D hat keinen antiviralen Effekt auf MCMV in primären murinen Hepatozyten.

Primäre murine Hepatozyten wurden mit Vitamin D (Calcitriol; 0,5 μ M) und seinem Vorläufer (Calcifediol; 5 μ M) für 24 Stunden inkubiert und mit Δ m157-MCMV:Luziferase (PFU/Zelle: 0,1) infiziert. Die virusabhängige Luziferase-Aktivität wurde nach 24 Stunden gemessen.

Des Weiteren waren die Lithocholsäure-Derivate TLC und TLCS, die Liganden für den Vitamin D Rezeptor sind, nicht in der Lage, die MCMV-Replikation zu reduzieren (Abbildung 7), sodass man davon ausgehen kann, dass der Vitamin D Rezeptor für den antiviralen Effekt von TCDC keine essentielle Bedeutung besitzt.

4.4.3. Beteiligung bekannter Gallensäuren-Signalwege am antiviralen Effekt von Gallensäuren

Pro-apoptotische Gallensäuren (TLCS, GCDC) können in Hepatozyten den Zelltod durch eine Apoptose auslösen. Die beteiligten Signalwege sind in großen Teilen charakterisiert und wurden in der Einleitung beschrieben. Die Induktion von proapoptotischen Signalelementen durch Gallensäuren kann Einfluss auf die Virusreplikation nehmen. So unterstützen Gallensäuren die Replikation von Hepatitis C Viren über die Aktivierung des EGFR/ERK Signalwegs [104].

Ob die Inhibition der MCMV-abhängigen Luziferase-Aktivität über einen der bekannten Signalwege reguliert wird, wurde mit verschiedenen pharmakologischen Inhibitoren untersucht. Dazu wurden die primären Hepatozyten für 30 Minuten mit dem jeweiligen Inhibitor vorinkubiert, dann mit 25 μM TCDC behandelt und nach drei Stunden mit MCMV infiziert. Mit Hilfe des YES-Kinase-Inhibitors SU6656 (10 μM) konnte gezeigt werden, dass der antivirale Effekt von TCDC auf MCMV unabhängig von der Aktivierung von YES-Kinasen ist. Die Beteiligung von weiteren Kinasen der SRC-Familie wurde mit dem SRC-Kinase-Inhibitor PP2 (10 μM) untersucht, der die inhibitorische Wirkung von TCDC auf MCMV nicht aufheben konnte (Abbildung 22). Die Induktion von NADPH-Oxidasen durch TCDC wurde mittels Apocynin A (300 μM) inhibiert, welches aber keinen Einfluss auf die antivirale Wirkung von TCDC auf MCMV hatte (Abbildung 22). Der antivirale Effekt von TCDC scheint ebenfalls unabhängig von der Aktivierung der JNK zu sein, da der pharmakologische JNK-Inhibitor SP600125 (10 μM) den antiviralen Effekt nicht aufzuheben konnte (Abbildung 22).

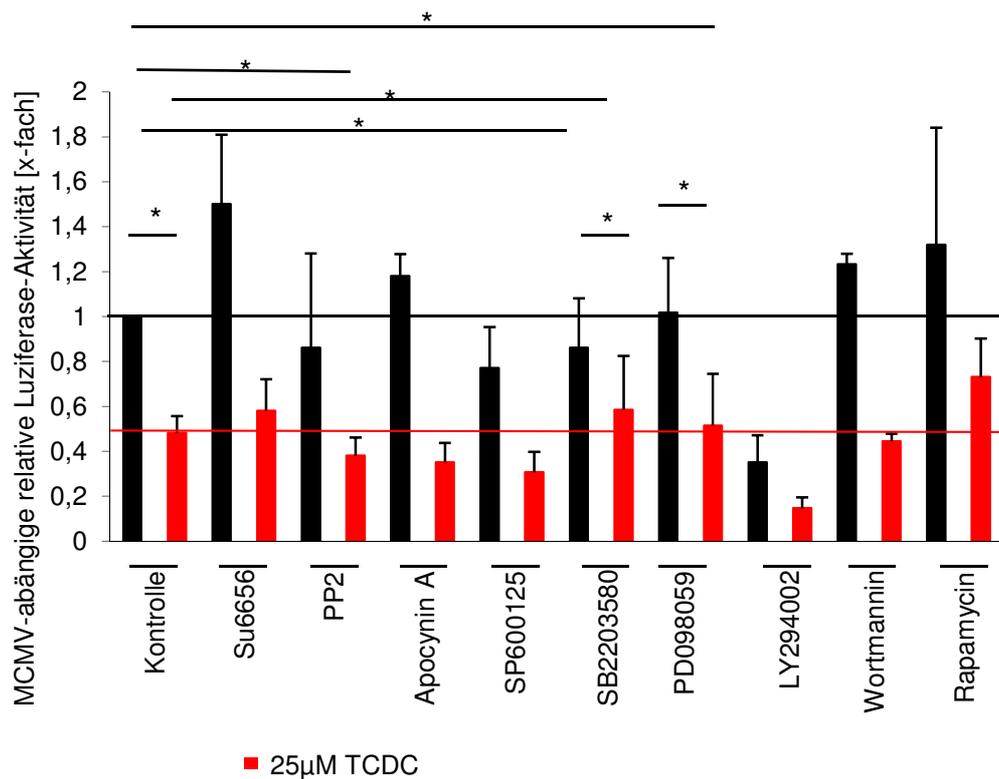


Abbildung 22: Einfluss pharmakologischer Inhibitoren auf die antivirale Wirkung von Gallensäuren auf MCMV.

Primäre murine Hepatozyten wurden mit den Inhibitoren Su6656 (10 μM), PP2 (10 μM), Apocynin A (300 μM), SP600125 (10 μM), SB203580 (10 μM), PD098059 (10 μM), Ly294002 (50 μM), Wortmannin (50 nM) und Rapamycin (10 nM) 30 Minuten vorinkubiert, anschließend für drei Stunden mit TCDC (25 μM) behandelt und mit MCMV infiziert. Die Luziferase-Aktivität wurde nach 24 Stunden bestimmt. * p<0.05, ** p<0.01, n.s. nicht signifikant

Neben JNK werden weitere Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAPK) wie p38^{MAPK} und ERK1/2 durch Gallensäuren aktiviert, wodurch anti-apoptotische Mechanismen aktivieren werden. Die Vorinkubation mit SB203580 (10 μM) als selektivem p38^{MAPK}-Inhibitor oder PD098059 (10 μM) als ERK-Inhibitor konnte den antiviralen Effekt von TCDC auf MCMV nicht aufheben.

Eine weitere Kinase, die durch Gallensäuren induziert werden kann, ist die PI3-Kinase [71]. Die PI3-Kinase-Inhibitoren LY294002 (50 μ M) und Wortmannin (50/100 nM) konnten die antivirale Wirkung von TCDC auf MCMV nicht aufheben, wobei LY294002 allein die Virusreplikation stark inhibieren konnte (Abbildung 22).

Gallensäuren können über den FXR die Gluconeogenese inhibieren, indem mTOR (Ziel des Rapamycins im Säugetier, *mammalian target of rapamycin*) aktiviert wird [196]. Rapamycin (10 μ M), ein Inhibitor der mTOR und p70S6Kinase Aktivierung, konnte den antiviralen Effekt von Gallensäuren nicht aufheben, sodass mTOR bzw. p70S6Kinase nicht an der Regulation von MCMV durch TCDC beteiligt zu sein scheint (Abbildung 22).

Die durch Gallensäuren verursachte Zellschädigung kann durch organische Osmolyte und Antioxidantien wie Betain, Taurin oder Trolox zum Teil revertiert werden. Deshalb wurde versucht die Wirkung von Gallensäuren auf MCMV mit Betain, Trolox oder Taurin zu kompensieren. Die Vorinkubation von primären murinen Hepatozyten mit Betain (1/5/10 mM), Taurin (5 mM) oder Trolox (100/500 μ M) konnte den antiviralen Effekt von TCDC auf MCMV nicht aufheben (Abbildung 23).

Eine immunologische Antwort auf die Infektion mit CMV ist die Induktion der Autophagie in den infizierten Zellen [197], daneben können Gallensäuren selbst eine Autophagie vermitteln [198]. Um zu testen, ob die antivirale Wirkung von TCDC auf MCMV durch eine Autophagie vermittelt wird, wurden Hepatozyten mit Bafilomycin A (250 nM) behandelt. Bafilomycin A ist ein Inhibitor der vaskulären H^+ -ATPase, welche essentiell für die Autophagie ist [199]. In Anwesenheit von Bafilomycin A konnte die antivirale Funktion von TCDC auf MCMV nicht aufgelöst werden, sodass die Autophagie für den antiviralen Effekt keine wichtige Rolle zu spielen scheint (Abbildung 24).

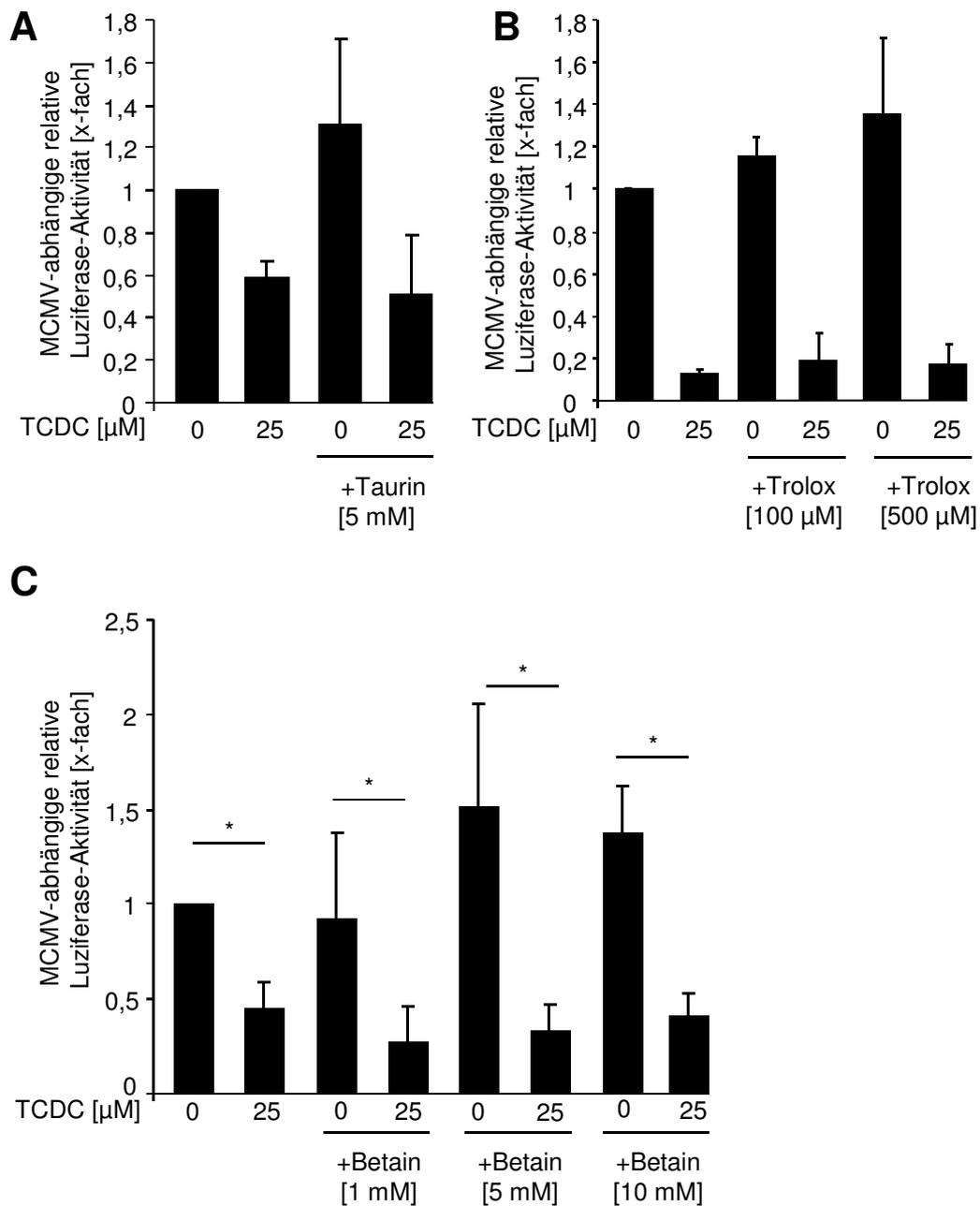


Abbildung 23: Osmolyte und Antioxidantien können den antiviralen Effekt von TCDC nicht aufheben.

Primäre murine Hepatozyten wurden für drei Stunden mit Taurin (A) oder über Nacht mit Trolox (B) bzw. Betain (C) in den angegebenen Konzentrationen behandelt, bevor die Zellen für drei Stunden mit TCDC (25 μM) inkubiert und mit MCMV infiziert wurden. Die Luziferase-Aktivität wurde 24 Stunden nach der Infektion bestimmt. Die Versuche mit Taurin und Trolox wurden nur zweimal unabhängig voneinander durchgeführt, sodass keine Statistik berechnet werden konnte. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s. nicht signifikant

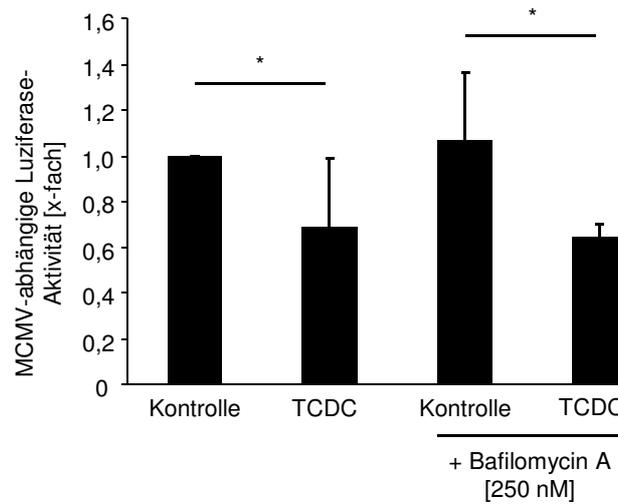


Abbildung 24: Bafilomycin A kann den antiviralen Effekt von Gallensäuren nicht aufheben.

Primäre murine Hepatozyten wurden für 30 Minuten mit dem Inhibitor Bafilomycin A vorinkubiert und dann für drei Stunden mit TCDC [25 μ M] behandelt. Daraufhin erfolgte die Infektion mit MCMV. Die Luziferase-Aktivität wurde 24 Stunden nach der Infektion bestimmt. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s. nicht signifikant

4.4.4. Gallensäuren beeinflussen nicht die Zellviabilität

Hohe Gallensäuren-Konzentrationen können die Zellviabilität beeinflussen und zu einer Apoptose bzw. Nekrose führen [53, 54, 56, 57, 60, 200-202]. Aufgrund dessen wurde getestet, ob die antivirale Wirkung von Gallensäuren durch eine Veränderung der Zellviabilität hervorgerufen wurde. Dazu wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Die Inkubation von primären murinen Hepatozyten mit TCDC für 48 Stunden führte zu keiner signifikanten Veränderung der Zellviabilität (Abbildung 25).

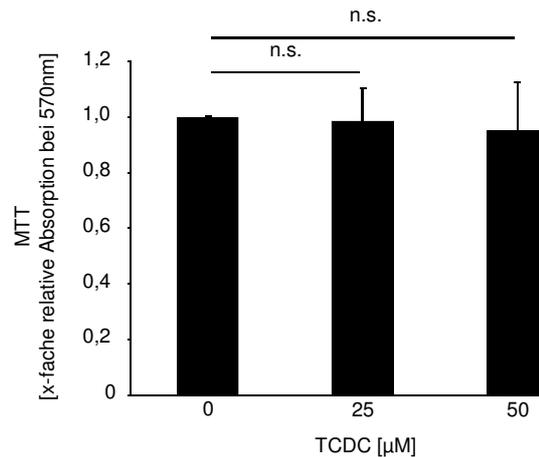


Abbildung 25: Die verwendeten Gallensäuren-Konzentrationen beeinflussen nicht die Zellviabilität von primären murinen Hepatozyten.

Primäre murine Hepatozyten wurden für 48 Stunden mit TCDC inkubiert, bevor ein MTT-Assay durchgeführt wurde. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s. nicht signifikant

Um zu untersuchen, ob Gallensäuren in primären Hepatozyten über die Aktivierung von Caspasen antiviral wirken, wurden Hepatozyten mit dem Pan-Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK (50 μM) vorbehandelt, mit TCDC (25 μM) inkubiert und MCMV infiziert. Der Z-VAD-FMK Inhibitor verhindert die Aktivierung von Pro-Caspasen. Die Anwesenheit des Pan-Caspase Inhibitors veränderte den antiviralen Effekt von TCDC auf MCMV nicht. Somit ist der durch Gallensäuren-vermittelte inhibitorische Effekt auf MCMV unabhängig von einer Caspase-vermittelten Apoptose (Abbildung 26). Die Funktionalität des Pan-Caspase Inhibitors wurde getestet, indem in primären murinen Hepatozyten durch die Gabe von Cycloheximid (CHX) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) eine Apoptose induziert wurde. Dies war in Anwesenheit des Inhibitors Z-VAD-FMK (50 μM) nicht möglich (Abbildung 26, mikroskopische Darstellung auf der rechten Seite). Zusammenfassend ist die antivirale Wirkung von Gallensäuren auf MCMV nicht über eine Verminderung der Zellviabilität oder eine vermehrte Apoptose bedingt.

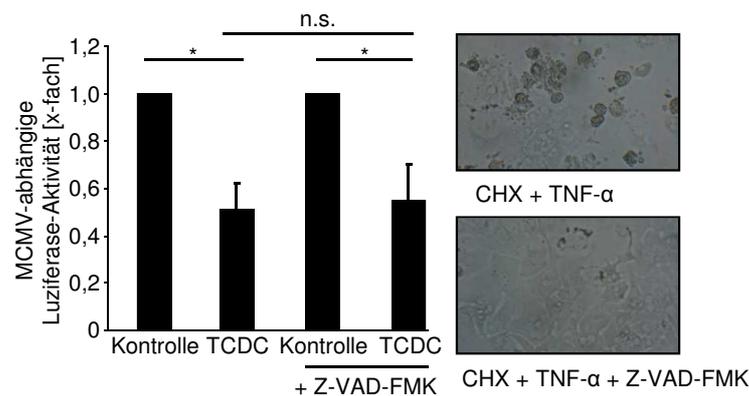


Abbildung 26: Die Gallensäuren-induzierte Apoptose ist nicht an der Inhibition der MCMV-Replikation beteiligt.

Primäre murine Hepatozyten wurden für 30 Minuten mit dem Pan-Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK (50 μ M) inkubiert, bevor 25 μ M TCDC für drei weitere Stunden zugegeben wurde. Danach wurden die Zellen mit Δ m157-MCMV:*Luziferase* (PFU: 0,1) infiziert. Die Messung der Luziferase-Aktivität erfolgte 24 Stunden nach der Infektion. Als Kontrolle für die Funktionalität des Pan-Caspase Inhibitors wurde in primäre murine Hepatozyten mittels Cycloheximid (CHX) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) eine Apoptose induziert, welche durch Z-VAD-FMK aufgehoben werden konnte. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s. nicht signifikant

4.5. Der antivirale Effekt von Gallensäuren ist unabhängig vom IFN- α/β Signalweg

Typ-I-Interferone sind wichtige antivirale Faktoren des angeborenen Immunsystems, deren Induktion zur Expression antiviraler Gene und zur Aktivierung der adaptiven Immunantwort führt [203, 204]. Die Replikation von MCMV und HCMV kann durch Interferone beeinflusst werden. Beide Viren exprimieren Proteine, welche die IFN-abhängige Immunantwort negativ regulieren, um ihre Replikation zu unterstützen [205]. Gallensäuren führen in Hepatozyten zu einer Inhibition der IFN- α/β -abhängigen Signaltransduktion [96]. Darum sollte getestet werden, ob auch der inhibitorische Effekt von Gallensäuren auf MCMV durch eine Modulation des IFN-Signalwegs bedingt ist. Die Behandlung von primären murinen Hepatozyten mit 500 U/ml IFN- α 24 Stunden vor der Infektion mit Δ m157-MCMV:*Luziferase* führte zu keiner Reduktion der MCMV-abhängigen Luziferase-Aktivität.

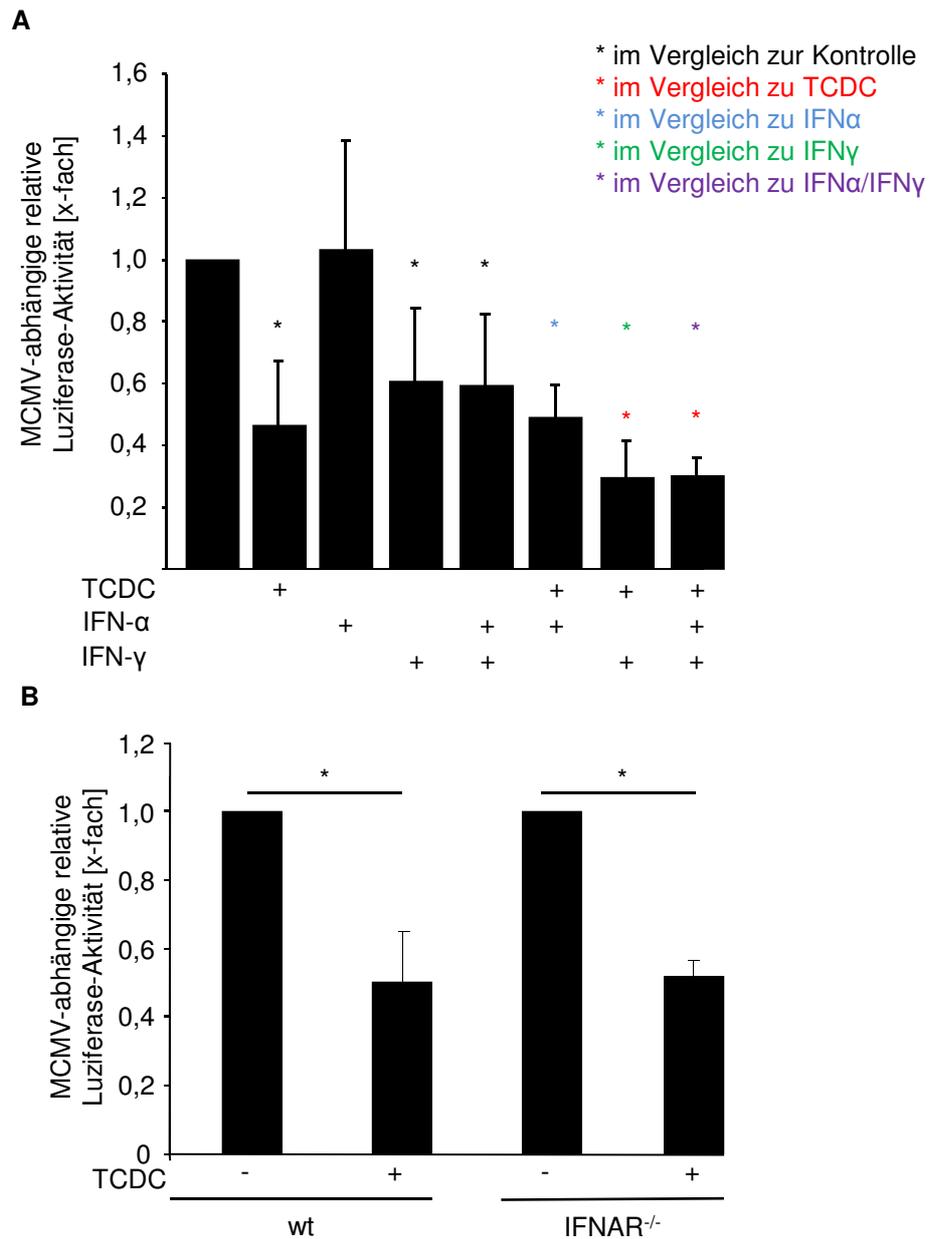


Abbildung 27: Der antivirale Effekt von Gallensäuren ist unabhängig vom IFN- α Signalweg.

(A) Primäre murine Hepatozyten wurden für 24 Stunden mit 500 U/ml IFN- α , IFN- γ und wo angezeigt, zusätzlich mit 25 μ M TCDC für drei Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Δ m157-MCMV:*Luziferase* (PFU/Zelle:0,1) infiziert und die Luziferase-Aktivität nach 24 Stunden gemessen. (B) Primäre Hepatozyten von IFNAR^{-/-} oder Wildtyp Mäusen wurden für drei Stunden mit 25 μ M TCDC behandelt und mit Δ m157-MCMV:*Luziferase* (PFU/Zelle:0,1) für 24 Stunden infiziert, bevor die virusabhängige Luziferase-Aktivität bestimmt wurde. * p<0.05, ** p<0.01, n.s. nicht signifikant

500 U IFN- γ dagegen führen unter den gleichen Versuchsbedingungen zu einer Inhibition der Virusreplikation ($p=0,028$). Die kombinierte Gabe von IFN- α und IFN- γ bedingt eine ähnlich starke Inhibition der Virusreplikation wie IFN- γ allein ($p=0,046$). Wurde zusätzlich zu IFN- α oder IFN- γ Gallensäuren zu den Zellen gegeben, führte dies zu einer weiteren signifikanten Reduktion der virusabhängigen Luziferase-Expression (Abbildung 27A). Um eine Beteiligung des TypI-IFN-Signalweg gänzlich auszuschließen, wurden primäre murine Hepatozyten von IFN-Rezeptor-1 (IFNAR1)^{-/-} defizienten Mäusen mit Gallensäuren behandelt und mit $\Delta m157$ -MCMV:*Luziferase* infiziert. Dabei zeigten Gallensäuren den gleichen inhibitorischen Effekt auf die virusabhängige Luziferase-Aktivität wie in Wildtyp Hepatozyten (Abbildung 27B). Es kann demnach ausgeschlossen werden, dass der Typ-I-Interferonsignalweg an der Inhibition der Virusreplikation durch Gallensäuren in primären murinen Hepatozyten beteiligt ist.

4.6. Einfluss von Gallensäuren auf den Replikationszyklus von MCMV

Um zu charakterisieren, auf welcher Ebene des Replikationszyklus MCMV durch Gallensäuren inhibiert wird, wurden die einzelnen Phasen des viralen Replikationszyklus genauer untersucht. Gallensäuren können aufgrund ihrer amphipathischen Eigenschaften in höheren Konzentrationen als Detergenzien wirken. Da die Infektiosität behüllter Viren von der Integrität des Partikels abhängt, wurde untersucht, ob die verwendete Gallensäure TCDC in einer Konzentration von 25 μ M eine schädigende Wirkung auf den Viruspartikel entfaltet. $\Delta m157$ -MCMV:*Luziferase* Virus wurde mit Gallensäuren bei 37°C inkubiert und zur Infektion von NIH/3T3 und MEF Zellen verwendet (Abbildung 28). NIH/3T3 und MEF Zellen wurden benutzt, da Gallensäuren in diesen Zellen keinen antiviralen Effekt auf MCMV vermitteln können (Abbildung 17). Die Inkubation des Virus mit Gallensäuren führte zu keiner Veränderung der Infektiosität im Vergleich zu Viren, die ohne Gallensäuren unter den

gleichen Bedingungen inkubiert wurden, sodass ein direkter, inhibitorischer Effekt der Gallensäuren auf das Virus unwahrscheinlich ist.

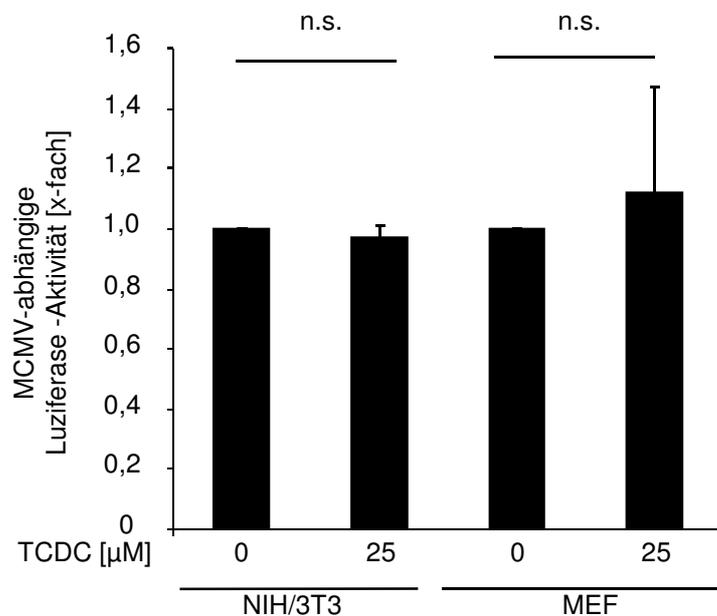


Abbildung 28: Gallensäuren wirken nicht als Detergenz auf den Viruspartikel.

Viruspartikel ($\Delta m157$ -MCMV:*Luziferase*) wurden für drei Stunden mit 25 μ M TCDC bei 37°C inkubiert und dann zur Infektion von NIH/3T3 oder MEF Zellen verwendet. Nach 24 Stunden wurden die Zellen lysiert und die virusabhängige Luziferase-Aktivität bestimmt. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s. nicht signifikant

Die Infektion der Zelle beginnt mit dem Anheften des Viruspartikels an die Zellmembran und dem Eintreten (Entry) des Virus in die Zelle. Der Entry-Prozess wurde mittels TaqMan-PCR untersucht. Dabei wurde gemessen, wie viel virale DNA in Anwesenheit von Gallensäuren in die Zellen aufgenommen wird. Dazu wurden primäre murine Hepatozyten für drei Stunden mit 25 μ M TCDC vorbehandelt und anschließend mit MCMV infiziert. Nach zwei Stunden, einem Zeitpunkt zudem im Replikationszyklus noch keine *de novo* DNA-Synthese stattfindet, wurde die virale und zelluläre DNA isoliert. Die Anwesenheit von Gallensäuren führte zu keiner Reduktion der Virus-DNA Menge innerhalb der infizierten Zellen (Abbildung 29) zu

diesem frühen Zeitpunkt der Infektion, sodass das Entry des Virus unbeeinflusst zu sein scheint.

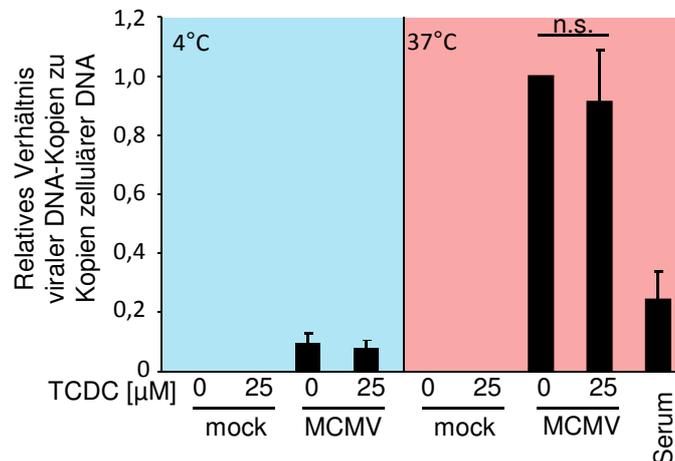


Abbildung 29: Gallensäuren beeinflussen nicht das Entry von MCMV.

Primäre murine Hepatozyten wurden für drei Stunden mit 25 μM TCDC vorinkubiert, mit Δm157-MCMV:*Luziferase* (PFU/Zelle:1) infiziert und für zwei Stunden bei 4°C bzw. 37°C inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt findet im MCMV-Replikationszyklus noch keine de novo DNA-Synthese statt, sodass die gemessene DNA als Surrogat für aufgenommene Viruspartikel gemessen wird. Danach wurden gebundene Viruspartikel durch Waschen mit Trypsin/EDTA entfernt und die DNA (virale sowie zelluläre) wurde isoliert. Der spezifische DNA-Nachweis erfolgte mittels TaqMan-PCR. Die Infektion bei 4°C diente als Kontrolle für die Aufnahme von Viruspartikeln in die Zelle, da bei 4°C MCMV Partikel nur an die Zellen binden, nicht aber in die Zellen eindringen können. Um zu zeigen, dass man eine Inhibition der Aufnahme von Viruspartikeln mit diesem System messen kann, wurden Zellen mit Virus infiziert, das zuvor mit Latenz-Serum von MCMV-infizierten Mäusen inkubiert wurde. * p<0.05, ** p<0.01, n.s. nicht signifikant

Da es denkbar wäre, dass Gallensäuren das Anhaften der Viren an die Zelle nicht unterbinden, wohl aber die Aufnahme des Virus in die Zelle und dieser Unterschied nicht durch die TaqMan-PCR detektiert werden könnte, wurden die Hepatozyten mit Trypsin/EDTA gewaschen, um gebundene, nicht integrierte Viruspartikel zu entfernen. Um die Effizienz

dieses Waschschrilles zu testen, wurde eine Infektion bei 4°C durchgeführt, bei der die Viren nur an die Zelle binden können, jedoch nicht aufgenommen werden. Die Infektion bei 4°C führte zu einer starken Reduktion der detektierten viralen DNA, sodass man davon ausgehen kann, dass in der TaqMan-PCR hauptsächlich DNA intrazellulärer Viruspartikel detektiert wurden.

Um inhibitorische Prozesse auf das Entry mit diesem Verfahren zu messen, wurde Latenz-Serum zu den Viren gegeben, welches eine stark neutralisierende Wirkung auf das Entry von MCMV zeigte (Abbildung 29). Bei Latenz-Serum handelt es sich um Serum infizierter Mäuse, in denen das Virus in die Latenz Phase übergegangen ist. Das Serum dieser Tiere enthält neutralisierende Antikörper gegen MCMV. Die Inkubation der Viruspartikel mit Latenz-Serum führte zu einer starken Reduktion der intrazellulären viralen DNA-Menge.

Die Wirkung von TCDC auf die Virusreplikation ist abhängig vom Zeitpunkt, zu dem die Gallensäuren zu den primären Hepatozyten gegeben werden. Der größte inhibitorische Effekt wurde erreicht, wenn die Hepatozyten fünf oder drei Stunden mit Gallensäuren vorinkubiert wurden. Aber auch der Beginn der TCDC-Inkubation fünf Stunden nach der Infektion führte noch zu einer Inhibition der virusabhängigen Luziferase-Aktivität, welche jedoch geringer ausfiel als bei entsprechender Vorinkubation (Abbildung 30A). Dass Gallensäuren auch bei Gabe fünf Stunden nach der Infektion noch eine Wirkung entfalten, zeigt ebenfalls, dass eine Wirkung von Gallensäuren auf das Entry unwahrscheinlich ist, da man in infizierten Zellen schon nach sechs Stunden virale Genprodukte nachweisen kann und

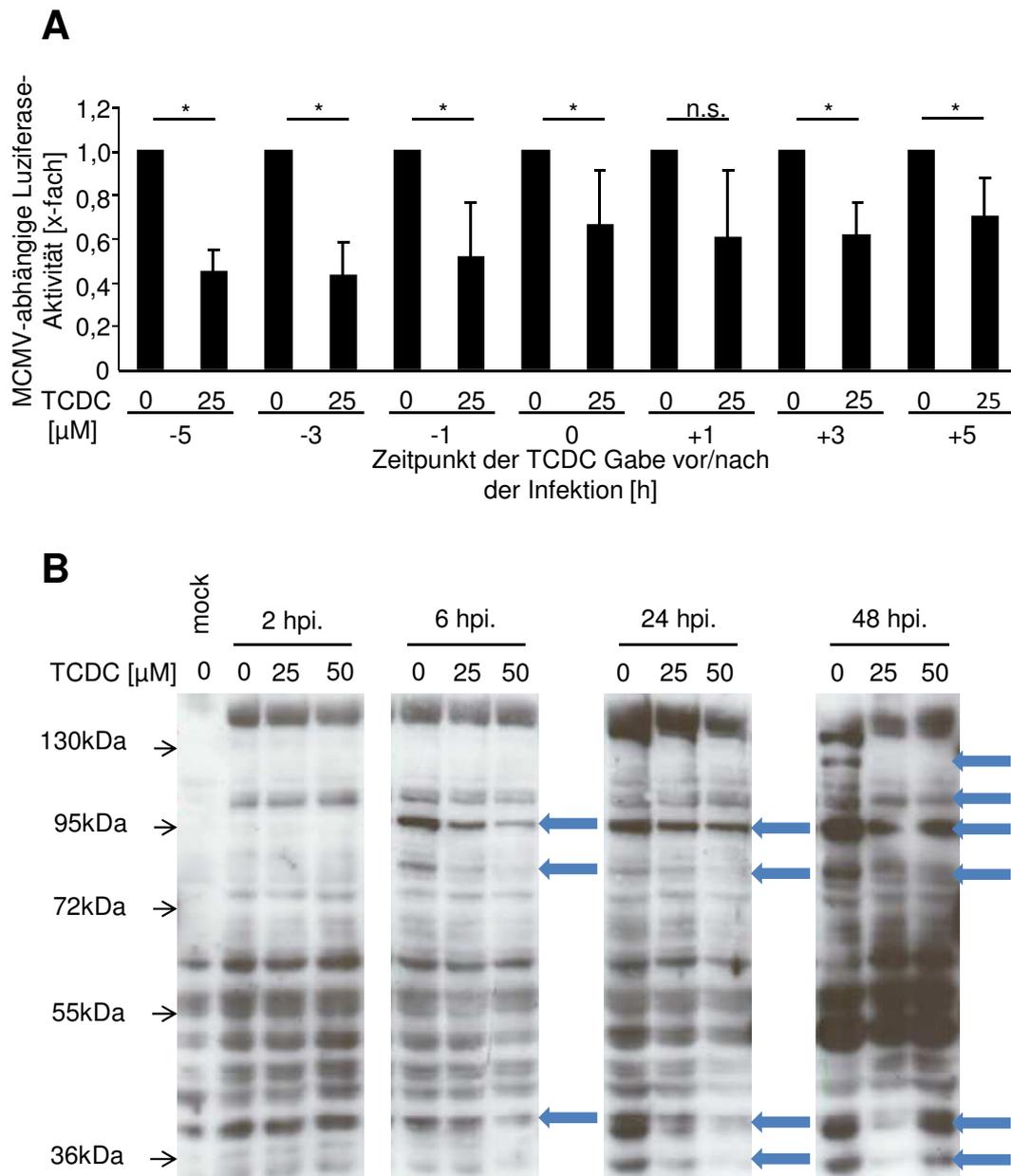


Abbildung 30: Gallensäuren inhibieren MCMV in einer frühen Phase der Replikation.

(A) 25 μM TCDC wurden zu verschiedenen Zeitpunkten von fünf Stunden vor bis fünf Stunden nach der Infektion mit MCMV (PFU/Zelle: 0,1) zu den primären murinen Hepatozyten gegeben. Die virusabhängige Luziferase-Aktivität wurde nach 24 Stunden bestimmt. (B) Primäre murine Hepatozyten wurden mit TCDC für drei Stunden inkubiert und mit MCMV infiziert (PFU/Zelle: 0,1). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und die viralen Proteine mit Latenz-Serum infizierter Mäuse im Western-Blot nachgewiesen. Die blauen Pfeile markieren die durch TCDC reduzierten viralen Proteine. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s. nicht signifikant

somit der Entry Prozess abgeschlossen sein sollte (vergl. Abbildung 30B). Die Detektion viraler Proteine mittels Latenz-Serum im Western-Blot zeigt schon sechs Stunden nach der Virusinfektion einen Effekt von Gallensäuren auf virale Proteine (Abbildung 30B). Daraus kann man schließen, dass die Inhibition der MCMV-Replikation durch Gallensäuren zu einem frühen Zeitpunkt im viralen Replikationszyklus stattfindet.

Daneben wurde das 130 kDa große virale Tegument Protein M25 mittels spezifischer Antikörper detektiert, welches in der späten Phase der Genexpression exprimiert wird [206]. Im Western-Blot konnte gezeigt werden, dass die Expression von M25 durch die Anwesenheit von TCDC inhibiert werden konnte (Abbildung 31).

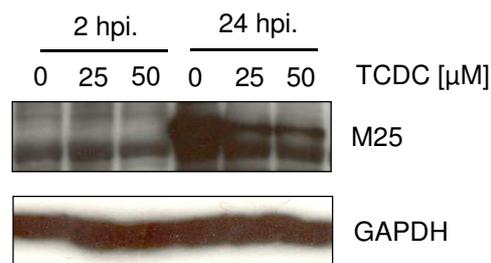


Abbildung 31: Expression des Tegument Proteins M25 im Western-Blot.

Primäre murine Hepatozyten wurden für drei Stunden mit TCDC vorinkubiert und anschließend mit MCMV (PFU/Zelle: 5) infiziert. Das virale Protein M25 und die endogene Kontrolle Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurden mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Daraufhin wurde die Expression der *immediate early* (IE) Gene untersucht. Die Produkte dieses Genbereiches stehen unter der Kontrolle des MIEP und sind die ersten Proteine, die während der MCMV-Infektion exprimiert werden. Dabei konnte im Western-Blot gezeigt werden, dass die Expression des pIE1-pp89 Proteins durch die Gabe von 25 μ M TCDC in primären murinen Hepatozyten reduziert werden konnte. Die Untersuchung der *ie1* und *ie3* mRNA-Mengen zum gleichen Zeitpunkt zeigte jedoch keine Reduktion der *ie* mRNA.

Tendenziell scheint die Gabe von Gallensäuren die mRNA Menge eher zu steigern (Abbildung 32). Auch diese Ergebnisse sind koinzident mit dem Ergebnis der TaqMan-PCR, dass der Eintritt-Prozess von MCMV durch Gallensäuren nicht beeinflusst wird, da im Falle einer Regulation des Eintritt-Prozesses die *ie* mRNA reduziert sein müsste.

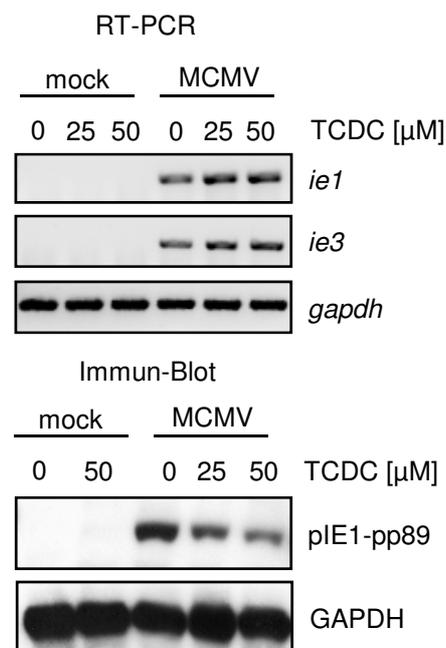


Abbildung 32: Nachweis von IE1 und IE3 auf RNA und Proteinebene.

Primäre Hepatozyten wurden für drei Stunden mit TCDC vorinkubiert, bevor sie mit MCMV (PFU/Zelle: 1) infiziert wurden. Nach sechs Stunden wurden die Zellen lysiert. Aus den Lysaten wurden entweder RNAs oder Proteine isoliert. Die RNAs wurden mittels one-step rT-PCR in cDNA umgeschrieben und mit spezifischen Primern amplifiziert. Die Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels spezifischer Antikörper für pIE1-pp89 und GAPDH detektiert.

Da der Verlust von pIE1-pp89 für den viralen Replikationszyklus *in vitro* nicht nachteilig ist [207], wurde das als essentiell beschriebene virale Protein IE3 untersucht. pIE1-pp89 und pIE3 sind Produkte der gleichen prä-mRNA, die durch differenzielles Spleißen entstehen. Weil kein spezifischer Antikörper für pIE3 zur Verfügung steht, wurde ein IE3-HA-MCMV Virus verwendet, dessen *IE3*-Gen eine HA-Markierung besitzt, die mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden kann. Gallensäuren konnten auch die Expression des HA-

markierten pIE3 Proteins in primären Hepatozyten reduzieren (Abbildung 33). Primäre Hepatozyten wurden für drei Stunden mit 25 μ M TCDC behandelt und mit MCMV infiziert. Die Zellen wurden 6-48 Stunden nach der Infektion lysiert und die Virusproteine pIE1-pp89 und pIE3 im Westernblot detektiert.

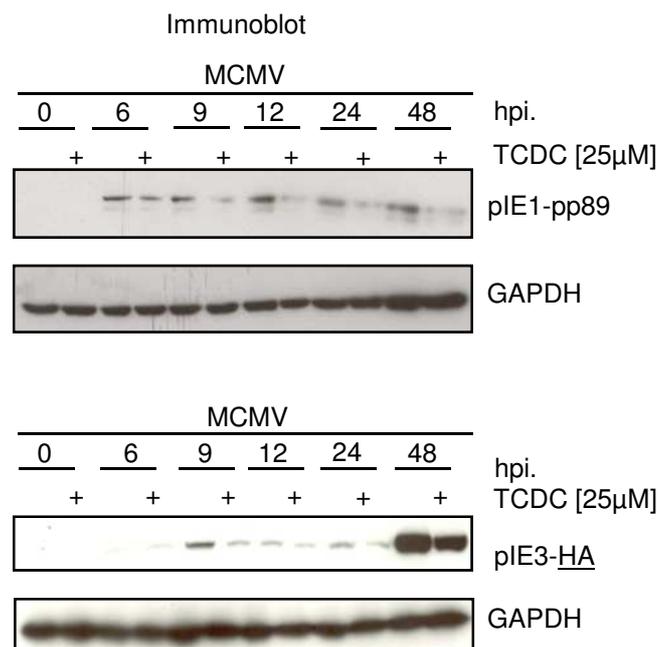


Abbildung 33: Zeitkinetik für die Proteine pIE1-pp89 und pIE3.

Primäre murine Hepatozyten wurden für drei Stunden mit TCDC vorbehandelt und danach mit MCMV (PFU/Zelle 0.1) infiziert, bevor sie zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert wurden. pIE1-pp89 und GAPDH wurden mit spezifischen Antikörpern, pIE3-HA mit einem HA-spezifischen Antikörper detektiert.

4.7. Einfluss von Gallensäuren auf den Proteinmetabolismus infizierter Hepatozyten

Wie im vorigen Abschnitt beschrieben, können Gallensäuren die Expression der IE-Proteine pIE1-pp89 und pIE3 negativ regulieren. Da die Transkription der IE-Gene in Anwesenheit von Gallensäuren unbeeinflusst ist, muss die Translation der *ie*-Genprodukte vermindert sein oder es kommt zu einer vermehrten Degradation der IE-Proteine. Die Proteintranslation

wurde mittels [³⁵S]-Inkorporation untersucht. Dazu wurden primäre Hepatozyten mit 25 µM TCDC für drei Stunden inkubiert und mit MCMV infiziert. Direkt nach der Infektion wurde [³⁵S]-markiertes L-Cystein und L-Methionin zu den Zellen gegeben. Nach sechs Stunden wurde die Menge der radioaktiv markierten Proteine bestimmt. Die Gabe von 25 µM TCDC reduziert die Proteinmenge in uninfizierten Zellen leicht (81,9±14%; p=0,01). Die Infektion mit MCMV in Anwesenheit von Gallensäuren führt zu einer weiteren Reduzierung der Proteinmenge (61,8±13%; p=0,002) (Abbildung 34A/B). Als Kontrolle diente Cycloheximid (CHX), welches in der Lage ist den Einbau von radioaktiven Aminosäuren vollständig zu inhibieren (p=0,012). Die Daten deuten darauf hin, dass Gallensäuren die MCMV Replikation inhibieren, indem sie die zelluläre Protein-Neusyntheserate reduzieren oder Proteine vermehrt degradiert werden.

Gallensäuren sind in der Lage den proteasomalen Abbau von Proteinen negativ und positiv zu beeinflussen. So kann beispielsweise DCA die proteasomale Degradation von p53 verstärken [208], wohingegen die proteasomale Degradation des nukleären Rezeptors *small heterodimer partner* (SHP) durch Gallensäuren inhibiert wird [209]. Um zu überprüfen, ob TCDC den proteasomalen Abbau von viralen Proteinen beeinflusst, wurde Clasto-Lactacystin-β-Lactone (10 µM) ein irreversibler Proteasom-Inhibitor, verwendet. Dieser wurde 30 Minuten vor der Behandlung der primären Hepatozyten mit 25 µM TCDC auf die Zellen gegeben. Nach drei Stunden Gallensäuren-Inkubation wurden die Zellen mit MCMV infiziert. Die Wirkung von TCDC auf MCMV ist jedoch unabhängig von proteasomaler Degradation, da der inhibitorische Effekt von Gallensäuren auch in Anwesenheit von Clasto-Lactacystin-β-Lactone vermittelt werden konnte (Abbildung 35).

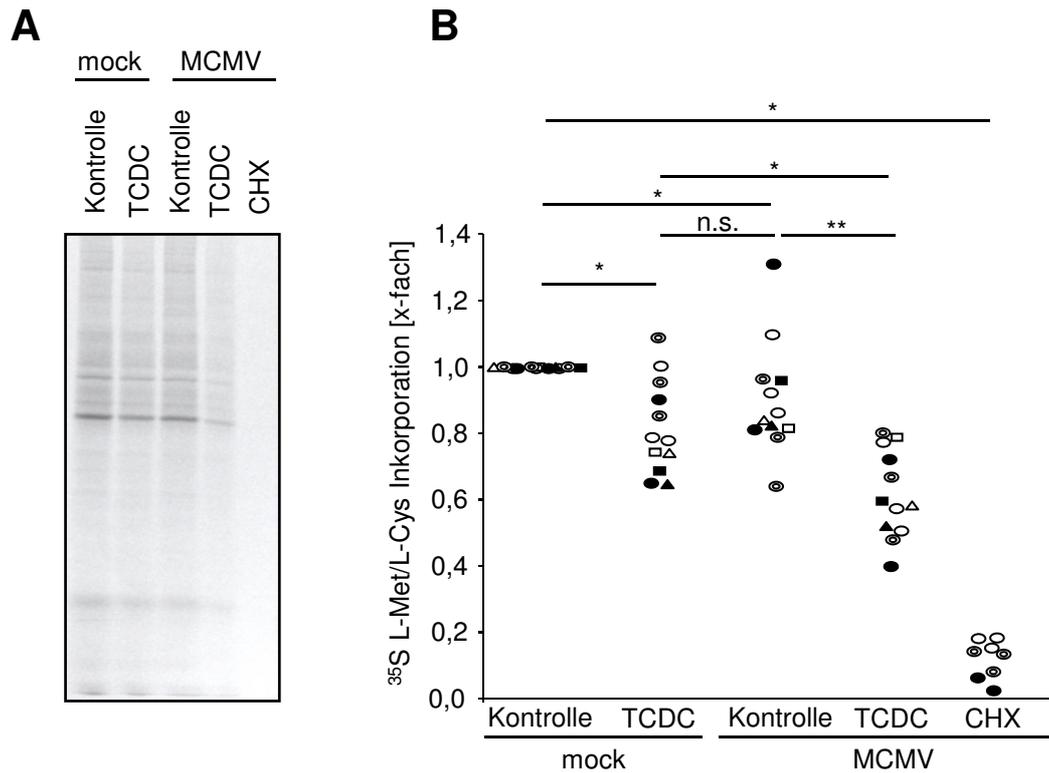


Abbildung 34: Detektion der Protein-Neusynthese in primären murinen Hepatozyten nach Gallensäuren-Behandlung und MCMV-Infektion.

(A) Primäre murine Hepatozyten wurden für drei Stunden mit 25 μ M TCDC inkubiert und mit MCMV infiziert. Direkt nach dem Zentrifugieren wurde [35 S] L-Methionin/L-Cystein zu den Zellen gegeben. Nach sechs Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und lysiert. Die Proteine wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden durch Autoradiografie sichtbar gemacht. (B) Die Menge der in die Proteine inkorporierten Radioaktivität wurde über die ganze Laufbreite detektiert. Jeder Punkt im Diagramm steht für eine Messung, gleiche Symbole zeigen an, dass die Versuche parallel durchgeführt wurden, die Einzel-Daten stammen jedoch aus verschiedenen Hepatozyten Präparationen. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s. nicht signifikant

Damit ist der antivirale Effekt von Gallensäuren unabhängig von der proteasomalen Degradation und die Gallensäuren scheinen auf die Translation zu wirken. Als ein möglicher Regulationsmechanismus wäre es denkbar, dass Gallensäuren die Struktur von mRNAs verändern und so die Translation unterbinden. mRNAs schützen sich vor Exonukleasen, indem ihre Enden 5'Kappen und 3'Polyadenylierungen besitzen.

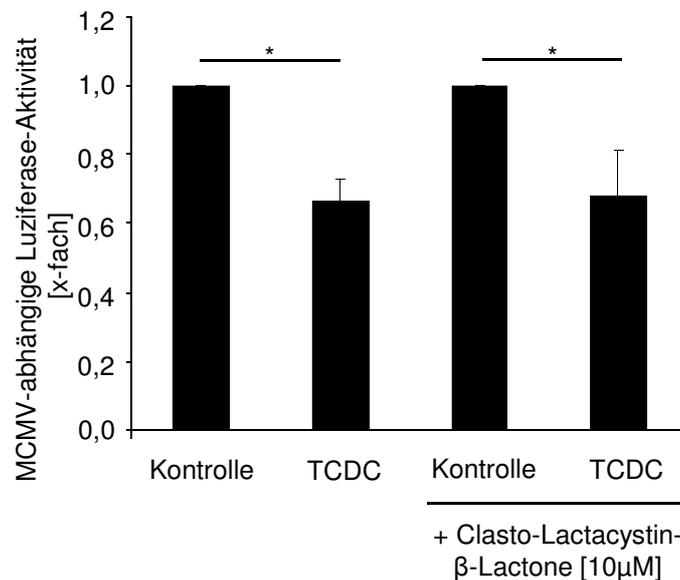


Abbildung 35: Die Aktivität des Proteasoms ist für die antivirale Wirkung von Gallensäuren nicht essenziell.

Primäre murine Hepatozyten wurden für 30 Minuten mit dem Proteasom-Inhibitor Clasto-Lactacystin-β-Lactone inkubiert, bevor 25 μM TCDC zugegeben wurde. Nach drei Stunden wurden die Zellen mit MCMV infiziert und die virusabhängige Luziferase-Aktivität nach 24h bestimmt* p<0.05, ** p<0.01, n.s. nicht signifikant

Beide Elemente sind auch an der Initiation der Translation beteiligt. Nur mRNAs, die eine interne Ribosomen-Bindestelle (*IRES*) besitzen, können ohne 5'Kappenstruktur translatiert werden. Um zu untersuchen, ob der antivirale Effekt von Gallensäuren auf MCMV über eine Regulation der 5'Kappe induziert wird, wurde ein MCMV:hMIEP-*CD8-IRES-Luziferase* Virus verwendet, das eine Luziferase mRNA transkribiert, die eine interne Ribosomen-Bindestelle besitzt. Die primären Hepatozyten wurden drei Stunden mit 25 μM TCDC behandelt, bevor sie mit MCMV:hMIEP-*CD8-IRES-Luziferase* infiziert wurden. Die Luziferase-Expression wurde sechs und 24 Stunden nach der Infektion mittels eines spezifischen Antikörpers im Western-Blot nachgewiesen. Die Luziferase-Expression dieses Virus konnte ebenfalls durch Gallensäuren reguliert werden, sodass davon auszugehen ist,

dass keine Regulation auf Ebene der 5'Kappe der mRNA stattfindet, die den antiviralen Effekt von Gallensäuren auf MCMV vermitteln könnte (Abbildung 36).

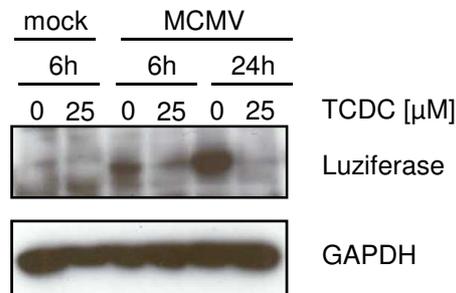


Abbildung 36: Der antivirale Effekt von Gallensäuren ist unabhängig von der 5'Kappenstruktur der mRNA.

Primäre murine Hepatozyten wurden mit einem MCMV:hMIEP-*CD8-IRES-Luziferase* Virus (PFU/Zelle: 1) infiziert, nachdem sie mit 25 μ M TCDC für drei Stunden vorbehandelt wurden. Die Expression von Luziferase wurde nach sechs bzw. 24 Stunden im Western-Blot nachgewiesen.

Gallensäuren reduzieren in Anwesenheit von MCMV die Menge viraler und zellulärer Proteine, wodurch die Virusreplikation in primären murinen Hepatozyten reduziert wird. Diese Reduktion der Proteinmenge kommt nicht durch vermehrte proteasomale Degradation der Proteine zustande. Mögliche durch Gallensäuren induzierte, regulatorische Mechanismen könnten die mRNA Prozessierung, den mRNA Transport oder die Translation beeinflussen.

5. Diskussion

Gallensäuren werden in Hepatozyten synthetisiert, gelangen nach der Sekretion durch die Hepatozyten über die Gallengänge in die Gallenblase und werden bei Nahrungsaufnahme in den Darm abgegeben. Dort sind sie an der Spaltung und Aufnahme von Nahrungslipiden beteiligt. Sie werden dann durch das Darmepithel im terminalen Ileum resorbiert und gelangen über die Blutbahn zurück zur Leber, wodurch der sogenannte enterohepatische Kreislauf abgeschlossen wird. Neben ihrer Funktion bei der Fettverdauung können Gallensäuren als Signalmoleküle fungieren und eine Vielzahl zellulärer Prozesse steuern. Darüber hinaus können Gallensäuren Einfluss auf die Replikation gastrointestinaler und hepatotroper Viren nehmen [102-106, 110]. Nach einer CMV-Infektion können in der Leber hohe CMV-Titer gemessen werden und in immungeschwächten Personen kann eine Infektion zu einer Hepatitis führen [121, 186]. Darüber hinaus sind die Sinusoid-Endothelzellen Orte der Latenz für MCMV [128], und eine erneute Virusreplikation nach einer Latenzphase kann in der Maus zuerst in der Leber nachgewiesen werden [127]. Aufgrund des möglichen Kontaktes von CMV mit Gallensäuren sollte im Rahmen dieser Arbeit ein möglicher Effekt von Gallensäuren auf die CMV-Replikation untersucht werden. Für die Versuche wurde ein rekombinantes MCMV verwendet, das Luziferase als Reportergen exprimiert [173]. Die konjugierten Gallensäuren TCDC, GCDC und TC konnten die MCMV-abhängige Luziferase-Aktivität signifikant reduzieren (Abbildung 7). Darüber hinaus war nicht nur die Expression einzelner viraler und Reporter-Gene (wie Luziferase und GFP) durch Gallensäuren reduziert, sondern die gesamte Virusreplikation (Abbildung 10). Somit konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass Gallensäuren die MCMV-Replikation in Hepatozyten inhibieren können.

Gallensäuren-Transporter werden nur in wenigen Zelltypen wie Hepatozyten, Cholangiozyten und im Darmepithel exprimiert. Dabei wird die Gallensäuren-Aufnahme in

Hepatozyten vornehmlich von NTCP übernommen [21], während im Darmepithel und Cholangiozyten der ASBT der vorherrschende Gallensäuren-Importer ist [21, 32]. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass der antivirale Effekt von Gallensäuren vom Import der Gallensäuren, via des NTCP in Hepatozyten abhängig ist (Abbildung 18). Es ist wahrscheinlich, dass Gallensäuren auch in anderen Zellen der Leber und des Darmepithels, wo Gallensäuretransporter exprimiert werden, einen antiviralen Effekt haben. Aufgrund dieser Ergebnisse sollte getestet werden, ob die alleinige Anwesenheit des Importers NTCP den antiviralen Effekt von Gallensäuren vermitteln kann. Konjugierte Gallensäuren haben in Fibroblasten keine antivirale Wirkung auf MCMV (Abbildung 17), noch beeinflussen sie deren Zellviabilität (Abbildung 19B). Die Überexpression von NTCP in NIH/3T3 Zellen führte schon nach Gabe geringer Gallensäuren-Konzentrationen zum Absterben der Zellen (Abbildung 19B). Die minimalen Gallensäuren-Konzentrationen, die von den NIH/3T3-NTCP Zellen toleriert wurden, hatten weder in Hepatozyten noch den NIH/3T3-NTCP Zellen einen antiviralen Effekt auf MCMV (Abbildung 19C). Da die Zellviabilität Einfluss auf die Virusreplikation nimmt, könnten sich in diesem System potenzielle antivirale Effekte durch Gallensäuren und Effekte durch die Reduktion der Zellviabilität überlagern. Somit konnte die Frage, ob der alleinige Import von Gallensäuren genügt oder ob noch weitere eventuell Hepatozyten-spezifische Elemente benötigt werden, um den antiviralen Effekt auf andere Zellen zu übertragen, in diesem System nicht klar beantwortet werden.

Um der Frage nach der Beteiligung weiterer Gallensäuren verantwortlichen Elemente weiter nachzugehen, wurden bekannte Gallensäuren-abhängige Signalwege untersucht. Dabei aktivieren Gallensäuren eine Reihe nukleärer Rezeptoren und Signalwege, die den antiviralen Effekt auf MCMV vermitteln könnten. Gallensäuren aktivieren nukleäre Rezeptoren wie den

FXR, den Vitamin D Rezeptor, den Pregnan-X-Rezeptor oder den *constitutive androstane receptor* [21, 79, 170, 194] mit unterschiedlicher Affinität.

Der FXR wird durch eine Reihe von Gallensäuren aktiviert, wobei CDC die FXR-abhängige Genexpression am stärksten beeinflusst [30, 210]. Die meisten beschriebenen Gallensäuren-abhängigen Änderungen der Genexpression, wie beispielsweise die Reduktion der Gallensäuren-Synthese, werden über den FXR vermittelt [211]. Der FXR ist darüber hinaus laut Literatur an der Gallensäuren-abhängigen Regulation der Virus-Replikation beteiligt. So wird die Replikation von Hepatitis B [105] und Hepatitis C Viren [102] durch die Aktivierung des FXR verstärkt, während Gallensäuren FXR abhängig die Rotavirus-Replikation inhibieren können [110]. Der antivirale Effekt von Gallensäuren auf MCMV ist, im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Effekten durch Gallensäuren auf Viren, unabhängig von der Aktivierung des FXR (Abbildung 20). Somit scheinen Gallensäuren über verschiedene Mechanismen Einfluss auf die Replikation verschiedener Viren nehmen zu können. Für den Vitamin D Rezeptor [61], den Pregnan-X-Rezeptor [63, 212] und den *constitutive androstane receptor* [213] wurde bisher nur eine Aktivierung durch Lithocholsäure nachgewiesen. Da TLC keine antivirale Wirkung auf MCMV hat (Abbildung 7E), ist eine Beteiligung dieser nukleären Rezeptoren am antiviralen Effekt von Gallensäuren unwahrscheinlich. Vitamin D kann jedoch eine antivirale Wirkung auf Hepatitis C Viren über den Vitamin D Rezeptor [214] vermitteln und die Immunantwort beeinflussen [215]. Deshalb wurde Vitamin D auf eine potentielle antivirale Wirkung gegen MCMV untersucht. Calcitriol (Vitamin D) hatte keinen Effekt auf MCMV (Abbildung 21). Somit ist der antivirale Effekt von Gallensäuren unabhängig von der Aktivierung der Gallensäuren-responsiblen nukleären Rezeptoren FXR, *constitutive androstane receptor*, Vitamin D Rezeptor und Pregnan-X-Rezeptor.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass konjugierte Gallensäuren wie TCDC, GCDC und TC die zytomegalovirale Proteinmenge signifikant reduzieren. Dagegen haben die hydrophile Gallensäure TUCDA, die sekundären Gallensäuren TLC und TLCS und die unkonjugierte Gallensäure CDC keinen Einfluss auf die Replikation von CMV. Dass einige Gallensäuren die MCMV-Replikation inhibieren können und andere nicht, ist nicht verwunderlich, da Gallensäuren ein großes Spektrum an zellulären Signalwegen regulieren können. Gallensäuren modulieren Signalwege, wie p38^{MAPK} [216, 217], JNK1 [72, 211, 218], PI3-Kinase [71], Src-Kinase Familie [56], CD95 [57, 58], NADPH-Oxidasen [55, 57] und EGFR/ERK [59, 60, 104]. Dabei nehmen sie Einfluss auf die Gallensäuren-Synthese [20], den Glukose- und Lipid-Metabolismus [219, 220], Entzündungsprozesse [83, 96, 99, 100, 221], die Leberregeneration [222], Apoptose [55, 57] und die Entwicklung von Leberkarzinomen [223-225]. Dabei können spezifische Gallensäuren einige Signalelemente entweder gar nicht oder nur schwächer regulieren als andere Gallensäuren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reihe von pharmakologischen Inhibitoren verwendet, um den antiviralen Effekt von Gallensäuren zu untersuchen. Obwohl eine Reihe der Inhibitoren einen Effekt auf die MCMV-Replikation *per se* hatten, konnte keiner der Inhibitoren den antiviralen Effekt von TCDC aufheben bzw. signifikant reduzieren (Abbildung 22). Somit scheint keiner der bisher bekannten Gallensäuren-induzierten Signalwege an der Regulation der MCMV-Replikation beteiligt zu sein.

Ein wichtiges Element der angeborenen Virusabwehr ist das IFN-System. Dabei werden Typ I-Interferone (IFN- α /IFN- β) durch virusinfizierte Zellen produziert, während IFN- γ (Typ II-IFN) von Immunzellen (T-Zellen, natürliche Killerzellen) sezerniert wird [226]. Typ III-IFN wird hingegen durch periphere mononukleäre Blutzellen sekretiert [227]. Das IFN-System wird durch eine CMV-Infektion aktiviert und durch eine Reihe viraler

Genprodukte inhibiert [205]. Gallensäuren können die IFN- α -vermittelte Signaltransduktion ebenfalls beeinflussen [96], sodass es möglich schien, dass Gallensäuren MCMV über eine Regulation des IFN-Signalwegs beeinflussen können. Die Inkubation von primären murinen Hepatozyten mit IFN- α hatte keinen Einfluss auf die MCMV-Replikation (Abbildung 10/Abbildung 27A). Für Fibroblasten ist bekannt, dass die antivirale Wirkung von IFN- α durch das virale Protein M27 aufgehoben wird, indem das am IFN-Signalweg beteiligte Jak-Stat-Signal inhibiert wird [173, 228]. Darüber hinaus zeigten Experimente in IFNAR-defizienten Hepatozyten, dass der antivirale Effekt von Gallensäuren unabhängig vom Typ I-IFN-Signalweg ist (Abbildung 27B). IFN- γ dagegen konnte die MCMV-Replikation inhibieren, wobei eine gleichzeitige Inkubation von IFN- γ und TCDC den antiviralen Effekt von IFN- γ verstärkte. Eine Beteiligung von IFN- γ am antiviralen Effekt von TCDC ist nicht auszuschließen, jedoch unwahrscheinlich, da IFN- γ bei einer CMV-Infektion erst zu einem späteren Zeitpunkt (ca. 36 Stunden nach der Infektion) [229] gebildet wird, TCDC hingegen wirkt schon nach sechs Stunden auf MCMV (Abbildungen 30, 32 und 33). Das Gallensäuren über die Induktion von IFN- λ wirken ist ebenfalls unwahrscheinlich, da IFN- λ zwar auf die IE-Expression wirkt [227], murine Hepatozyten aber keine IFN- λ Rezeptoren exprimieren [230]. Somit ist der antivirale Effekt von Gallensäuren auf MCMV in primären Hepatozyten unabhängig von der Induktion bekannter Gallensäuren-induzierter Rezeptoren, Gallensäuren-aktivierter nukleärer Rezeptoren und dem IFN-Signalweg.

5.1. Antivirale Wirkung von Gallensäuren auf den MCMV Replikationszyklus

Eine CMV-Infektion beginnt mit der Anbindung des Viruspartikels an Rezeptoren der Wirtszellmembran. Das Virion wird daraufhin in die Zelle aufgenommen, wobei die Membranhülle mit der Zellmembran verschmilzt. Im Zytoplasma wird das Tegument abgebaut und das Kapsid wird zum Nukleus transportiert. Die virale DNA gelangt in den Kern, wo die virale

Genexpression und DNA-Replikation stattfindet. Die gebildete virale DNA wird an der Kernmembran in Kapside verpackt, die im Zytoplasma mit einem Tegument umgeben werden. Die virale Membranhülle erhält CMV in zellulären Vesikeln, in denen es zur Zellmembran gebracht wird. Die Vesikel verschmelzen mit der Zellmembran, wodurch CMV freigesetzt wird [231].

Der Entry-Prozess und die Transkription der *immediate early* Gene von MCMV ist in Hepatozyten von Gallensäuren unbeeinflusst, während die *immediate early* Proteinexpression reduziert sind (Abbildung 29 und Abbildung 32), sodass Gallensäuren einen Schritt zwischen der Transkription und der Translation oder die Translation selbst hemmen. In MCMV-infizierten und Gallensäuren-behandelten Zellen ist nicht nur die Expression viraler, sondern auch zellulärer Proteine reduziert (Abbildung 34). Daraus kann man schließen, dass Gallensäuren nicht ein MCMV-spezifisches Signalelement modulieren, sondern Einfluss auf einen globaleren Regulationsmechanismus haben, der auch den Protein-Metabolismus der Zelle betrifft. Da MCMV für die Protein-Synthese auf zelluläre Proteine angewiesen ist, kommen Effekte auf das mRNA-Processing, die Translation oder Protein-Degradation für die Regulation von MCMV durch Gallensäuren infrage.

Das mRNA-Processing findet im Nukleus und zum Teil noch während der Transkription statt. Dabei erhält die mRNA ein 5'Kappe (5'Cap; 7-Methylguanosin), wird am 3'Ende polyadenyliert und Intronsequenzen werden durch Spleißen entfernt. Nur mRNAs, die ein 7-Methylguanosin besitzen, werden gespleißt, aus dem Kern transportiert und translatiert. Daneben schützen das 7-Methylguanosin sowie die Polyadenylierung mRNAs vor der Degradation durch Exonukleasen [232, 233]. Neben dem Schutz vor Degradation hat die Polyadenylierung der mRNA auch regulatorische Funktionen. Dass die Inhibition von MCMV durch Gallensäuren über eine Reduzierung der 7-Methylguanosin-Bindung zustande

kommt, ist unwahrscheinlich. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Gallensäuren auch die Expression eines Luziferasegens, das eine interne Ribosomen-Bindestelle besitzt, reguliert (Abbildung 36). Diese mRNAs können auch translatiert werden, wenn sie kein 7-Methylguanosin besitzen [232]. Eine Regulation der Polyadenylierung durch Gallensäuren ist generell denkbar. Dabei könnten zum einen die Proteine, die für die Polyadenylierung zuständig sind (*cleavage stimulation factor*, *poly A polymerase*, *poly A – binding protein nuclear 1*) [234], durch Gallensäuren reguliert werden. Zum anderen könnten die mRNAs durch Gallensäuren-modulierte Signalelemente im Zytoplasma deadenyliert werden. Eine Deadenylierung der mRNA im Zytoplasma ist abhängig von Signalsequenzen in der mRNA [233]. Aufgrund der Vielzahl der durch Gallensäuren-regulierten viralen und zellulären Proteine ist es unwahrscheinlich, dass alle zugehörigen mRNAs der regulierten Proteine das gleiche Signalelement tragen. Gallensäuren könnten somit eher auf die Polyadenylierung als auf die Deadenylierung Einfluss haben.

Beim Spleißen werden Spleißstellen im Intron vom Spleißosom erkannt und das Intron aus der mRNA entfernt. Das Spleißosom besteht aus fünf kleinen im Nukleus lokalisierten Ribonukleoprotein-Partikeln und bis zu 100 weiteren Core-Proteinen [235]. Eine Veränderung der Zusammensetzung der Core-Proteine führt zu alternativem Spleißen und ist abhängig vom Zelltyp, der Differenzierung und der zellulären Umgebung [236]. Alternatives Spleißen wird über eine Reihe von Mechanismen ausgelöst. So kann die Expression von Spleißfaktoren verändert sein, indem diese vermehrt degradiert werden oder ihre zelluläre Lokalisation verändern. Daneben spielt auch die Transkriptionsgeschwindigkeit eine Rolle für die Intron-Erkennung. All diese Faktoren führen zu einer Änderung der Interaktionspartner im Spleißosom und haben Einfluss auf zellulären Funktionen [237]. Für eine Reihe von MCMV- [126] und HCMV-abhängiger [159] Genprodukte wurden Spleißvarianten beschrieben und

HCMV reguliert die Aktivität von Spleißfaktoren [238, 239]. Somit erscheint es möglich, dass die MCMV-Replikation über die Regulation des Spleißens durch Gallensäuren beeinträchtigt werden könnte. Trotzdem ist eine Gallensäuren-vermittelte Regulation der MCMV-Replikation durch Regulation von Spleißprozessen unwahrscheinlich, da auch die viral exprimierten Genprodukte Luziferase (Abbildung 7) und GFP (Abbildung 9) durch Gallensäuren reguliert werden können, die beide als Reportergene in die virale DNA kloniert wurden. Dafür wurde die Intron-lose cDNA-Sequenz der beiden Reportergene verwendet, sodass kein Spleißvorgang stattfindet, wenn die beiden Gene exprimiert werden. Würden Gallensäuren die Virusreplikation von MCMV über eine Regulation des Spleißens modulieren, sollte die Expression der beiden Reportergene unverändert sein.

Die gespleißten mRNAs werden aus dem Nukleus transportiert. Dazu binden eine Reihe von Exportproteinen an die mit der mRNA assoziierten Ribonukleoproteine. Die Exportproteine interagieren mit dem Kernporen-Komplex, durch den die mRNAs aktiv transportiert werden. Im Zytoplasma werden die Ribonukleoproteine durch Zytoplasma-spezifische RNA-bindende Proteine ersetzt [240, 241]. Viele virale mRNAs werden nicht gespleißt, sodass Viren Proteine exprimieren, die für die Rekrutierung von Transportfaktoren an die ungespleißte mRNA sorgen [242]. So exprimiert HCMV die Proteine pUL69 und UL84, welche an mRNA binden und zelluläre Exportfaktoren rekrutieren [243, 244]. Gallensäuren vermittelte Veränderungen des mRNA-Exportes sind bisher nicht bekannt, wären aufgrund der Vielfalt der an Gallensäuren-Signalwegen und mRNA-Exports beteiligten Proteine jedoch durchaus vorstellbar.

Die Translation kann auf verschiedenen Ebenen reguliert werden und wird in eine Initiations-, eine Elongations- und Terminationsphase unterteilt [245]. Generell ist eine Translationskontrolle in allen drei Phasen denkbar, bisher sind aber hauptsächlich

regulatorische Mechanismen für die Initiationsphase beschrieben [245]. Zum einen tragen mRNAs selbst verschiedene regulatorische Elemente wie 7-Methylguanosin, interne Ribosomen-Bindestellen, *upstream open reading frames* (uORFs) und 3' Polyadenylierung, zum anderen wird die Proteinsynthese durch die Regulation von Translations-Initiationsfaktoren beeinflusst [246]. Einige Translation-Initiationsfaktoren können durch Kinasen mittels Phosphorylierung sowie Dephosphorylierung aktiviert bzw. deaktiviert werden [245, 247, 248]. Daneben können mikro-RNAs (miRNAs) an mRNAs binden und deren Translation blockieren [249]. Durch die Regulation von Translations-Initiationsfaktoren kann die Translation hauptsächlich global reguliert werden, während regulatorische Proteine die spezifische mRNA-Sequenzen binden oder miRNAs nur einzelne oder eine Gruppe von mRNAs betreffen [245]. Da die Regulation der Proteine durch Gallensäuren in MCMV infizierten Hepatozyten eine Vielzahl von Proteinen betrifft (zelluläre Proteine (Abbildung 34), viral codierte Luziferase (Abbildung 7), viral codiertes GFP (Abbildung 9), virale Proteine (Abbildungen 30, 31 und 33)), ist eine Regulation der Translation durch die Bindung eines spezifischen Proteins oder einer miRNA eher unwahrscheinlich. Es ist wahrscheinlicher, dass Gallensäuren allgemeine Translations-Initiationsfaktoren beeinflussen können, und so den antiviralen Effekt auf MCMV vermitteln.

Proteine können auf verschiedenen Wegen degradiert werden. Zum einen werden Proteine unspezifisch in Lysosomen abgebaut, zum anderen werden Proteine spezifisch im Proteasom degradiert [250]. Dass der antivirale Effekt von Gallensäuren auf MCMV durch einen lysosomalen Proteinabbau vermittelt wird, ist zweifelhaft, da hauptsächlich Membran-assoziierte Proteine und körperfremde Proteine durch Lysosomen degradiert werden [251]. Durch Gallensäuren wird aber, wie der Einbau von radioaktiv markierten Aminosäuren zeigt, auch die Menge einer ganzen Reihe von zellulären Proteinen reduziert (Abbildung 34). Die

Reduktion der Proteinmenge in Gallensäuren-behandelten MCMV-infizierten Zellen durch das Proteasom ist wahrscheinlicher. Der Einsatz eines Proteasom-Inhibitors konnte den antiviralen Effekt von TCDC auf MCMV jedoch nicht reversieren, sodass der antivirale Effekt von Gallensäuren aller Wahrscheinlichkeit nach nicht durch einen Proteinabbau bewerkstelligt wird (Abbildung 35). Somit bleibt die Möglichkeit, dass Gallensäuren die mRNA-Prozessierung, den mRNA-Transport oder die Translation in MCMV-infizierten Hepatozyten beeinflussen (Abbildung 37).

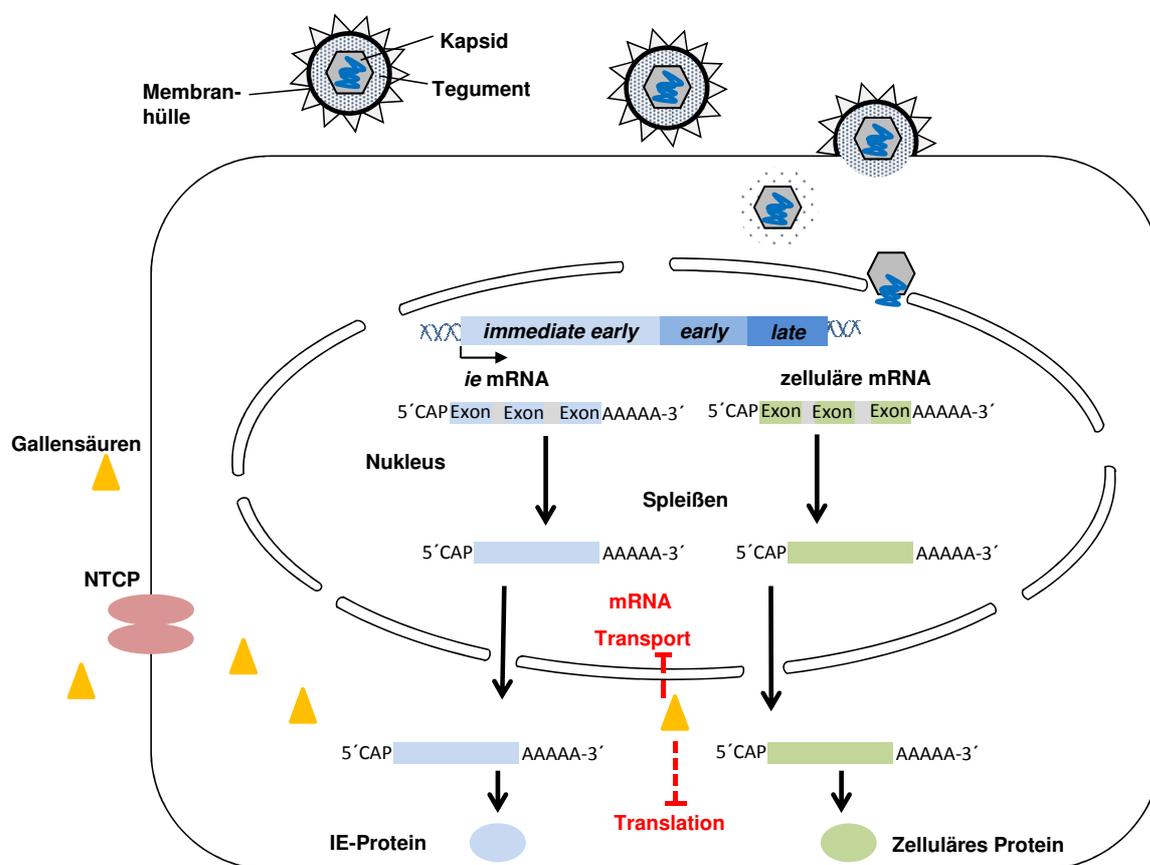


Abbildung 37: Schematische Darstellung des antiviralen Effektes von Gallensäuren auf MCMV.

Das Virus Entry und die *immediate early* Transkription sind von Gallensäuren unbeeinflusst, während die *immediate early* Proteinexpression reduziert ist. Darüber hinaus sind auch die Mengen zellulärer Proteine reduziert. Gallensäuren haben einen post-transkriptionalen Effekt auf die Virusreplikation, der über eine Regulation des mRNA-Transports oder der Translation induziert werden könnte. Der antivirale Effekt von Gallensäuren auf MCMV ist abhängig vom Gallensäuren-Transport durch NTCP.

5.2. Effekte von Gallensäuren auf MCMV *in vivo*

Um den Effekt von Gallensäuren auf die MCMV-Replikation zu untersuchen, wurden Mäuse mit CDC-haltigem Futter gefüttert und mit MCMV infiziert. CDC wurde gewählt, weil es sich um die unkonjugierte Form von TCDC und GCDC handelt, die *in vitro* gegen MCMV wirksam waren (Abbildung 7). Die konjugierten Formen wurden nicht verwendet, da Gallensäuren im Darm der Mäuse durch Bakterien dekonjugiert werden, sodass aus TCDC bzw. GCDC wieder CDC entsteht. In der Leber wird CDC mit Taurin und Glycin konjugiert und zu α -Muricholsäure und β -Muricholsäure umgesetzt [252]. Die CDC-Fütterung erhöhte die Plasma-Gesamt-Gallensäuren von ca. $8\mu\text{Mol/l}$ auf bis zu $145\mu\text{Mol/l}$. Die Konzentrationen der *in vitro* wirksamen Gallensäuren TCDC und GCDC waren im Plasma CDC-gefütterter Mäuse zu allen Messzeitpunkten erhöht (Abbildung 11). Die erreichten Konzentrationen von TC, TCDC und GCDC zusammen waren jedoch um das 46-Fache niedriger als die *in vitro* verwendeten antiviral-wirksamen Gallensäuren-Konzentrationen (Abbildungen 7 und 11). Des Weiteren waren die Spiegel der primären Gallensäuren α -Muricholsäure und β -Muricholsäure erhöht, was damit erklärbar ist, dass in Mäusen CDC in diese beiden Muricholsäuren umgesetzt wird [252]. Daneben waren auch die sekundären Gallensäuren (Hydroxycholsäure (HDCA), Taurohydroxycholsäure (THDCA), Glykohydroxycholsäure (GHDCA), TLC, Lithocholsäure (LCA)), die durch bakterielle Modifikation aus CDC, α -Muricholsäure und β -Muricholsäure gebildet werden [253, 254], erhöht. Da Gallensäuren ihrer eigenen Synthese inhibieren können [25, 255], wird durch den Überschuss an CDC, weniger CA gebildet, sodass TC, welches *in vitro* eine antivirale Wirkung hatte (Abbildung 7), und Glykocholsäure (GCA) in ihrer Menge reduziert sind.

Die Virusreplikation in der Leber wird durch die Fütterung von CDC-haltigem Futter nicht signifikant beeinflusst. Es scheint jedoch einen Trend dahin zu geben, dass am dritten

Tag nach der Infektion die Lebern dieser Mäuse etwas weniger Virus enthielten (Abbildung 12). Die fehlende Regulation der MCMV-Replikation durch Gallensäuren in der Leber hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass zwar die Gesamt-Gallensäure-Menge im Plasma stark erhöht war, die *in vitro* antiviral wirkenden Gallensäuren TCDC, GCDC und TC aber nicht in ausreichender Menge vorlagen. Die Gallensäuren-Fütterung führte aber am siebten Tag der Infektion zu einer signifikant geringeren Viruslast in der Lunge, während am 14. Tag die Titer in der Milz signifikant reduziert waren (Abbildung 12). Wie diese Arbeit zeigt, ist für den antiviralen Effekt von Gallensäuren der Transport in die Zelle, in Hepatozyten durch NTCP, notwendig. Der Gallensäuretransporter NTCP wird nur in der Leber exprimiert, während weitere Gallensäuretransporter wie der ASBT im Darm und in der Niere zu finden ist [256]. Dagegen konnten OATPs, welche unkonjugierte und konjugierte Gallensäuren transportieren können, in der Lunge und der Milz auf mRNA Ebene nachgewiesen werden [257-260]. Da die meisten OATPs nur eine geringe Affinität zu Gallensäuren haben, spielt der Gallensäuren-Transport durch OATP in der Lunge und in der Milz unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlich keine Rolle [261]. Durch die Gallensäuren-Fütterung sind die Gesamt-Gallensäuren im Plasma jedoch stark erhöht, sodass es zur vermehrten Gallensäuren-Aufnahme in die Parenchymzellen von Lunge und Milz unabhängig vom Gallensäuretransporter NTCP kommen könnte, was möglicherweise die MCMV Replikation in Lunge und Milz beeinflusst.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die Gallensäuren-Fütterung nicht zur Induktion antiviraler Prozesse in der Leber führt, weil dazu wahrscheinlich die Gallensäuren-Spiegel der antiviral wirkenden Gallensäuren TCDC, GCDC und TC zu niedrig waren. Darüber hinaus scheinen Gallensäuren aber möglicherweise einen antiviralen Effekt in Milz und Lunge zu vermitteln, der durch Transporterproteine wie ASBT bzw. OATP vermittelt

sein könnte. Dass es einen antiviralen Effekt in Milz und Lunge gibt, nicht aber in der Leber, hängt möglicherweise damit zusammen, dass die Leber ständig mit Gallensäuren in Kontakt kommt, sodass Signalelemente möglicherweise erst durch höhere Gallensäuren-Konzentrationen aktiviert werden als in Zellen, die unter physiologischen Bedingungen keinen Kontakt mit Gallensäuren haben.

Die Infektion mit MCMV hat selbst einen Einfluss auf die Gallensäuren-Zusammensetzung. So fanden sich im Plasma zu allen untersuchten Zeitpunkten signifikant mehr Glycinkonjugate als in uninfizierten Tieren. Primäre Gallensäuren werden, je nach Verfügbarkeit der Aminosäuren, mit Taurin oder mit Glycin konjugiert [262]. Eine HCMV-Infektion führt zur Reduktion der intrazellulären Taurin Konzentration [263, 264]. Die größere Menge an Glycin-konjugierten Gallensäuren lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass durch die Infektion weniger Taurin für die Gallensäuren-Konjugation zur Verfügung steht.

5.3. Einfluss von Gallensäuren auf die HCMV-Infektion

Eine wichtige Frage ist, ob der antivirale Effekt von Gallensäuren auf HCMV übertragbar ist. Insgesamt konnten primäre Hepatozyten von vier Patienten untersucht werden, die während Tumoroperationen gewonnen wurden. Dabei waren die Hepatozyten einmal nicht effizient mit HCMV infizierbar und einmal hatten Gallensäuren keinen Effekt auf die Replikation von HCMV. In den anderen beiden Hepatozyten-Präparationen konnten Gallensäuren die HCMV *immediate early* Expression von pIE1-pp72 inhibieren. Dabei waren einmal 25 und 50 μM TCDC wirksam, während in den Hepatozyten der anderen Präparation TCDC keine Wirkung hatte, pIE1-pp72 jedoch durch 25 μM CDC, 25 μM TC und 25 μM TLC reduziert werden konnte (Abbildung 14). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Gallensäuren auch die

Replikation von HCMV beeinflussen könnten, dabei ist jedoch zu beachten, dass es sich um eine sehr kleine Stichproben-Menge handelt und die gewonnenen Hepatozyten eventuell aufgrund ihrer Herkunft aus Tumoroperationen nicht die Funktionalität gesunder Hepatozyten besitzen. So ist es denkbar, dass die Expression des Gallensäuretransporters NTCP im tumornahen Gewebe verändert sein könnte, sodass Gallensäuren in diesem Fall keinen antiviralen Effekt haben, da sie nicht in die Zelle transportiert wurden.

5.4. Gallensäuren als potenzielle antivirale Substanzen gegen CMV

Die gewonnenen Ergebnisse könnten dazu dienen neue antivirale Medikamente gegen CMV zu entwickeln, deren Struktur und Funktion sich von Gallensäuren ableiten. Von besonderer Bedeutung ist dabei, dass Gallensäuren schon auf die *immediate early* Genexpression wirken. Eine Hemmung auf Ebene der *immediate early* Genexpression ist wünschenswert, da die *immediate early* Genprodukte die Immunität und die zelleigene Genexpression stark modulieren [122, 123, 146]. Die bisher verwendeten CMV-Medikamente Ganciclovir, Foscarnet und Cidofovir wirken alle erst zu späteren Phasen der Virusreplikation, da sie die virale DNA-Synthese stören oder auf die virale DNA-Polymerase wirken [144, 146, 265, 266]. Das einzige Medikament (Fomivirsen), das auf die *immediate early* Genexpression wirkt, in dem es an die *ie2* mRNA bindet, ist in Europa nicht erhältlich [265]. Daneben haben alle CMV-Medikamente eine Reihe von Nebenwirkungen, wobei besonders häufig Nierenschädigungen auftreten [267-269]. Gallensäuren sollten kaum Nebenwirkungen haben, da sie natürlicherweise im Körper vorkommen. Ähnliche Symptome wie bei Cholestase, bei der es zur Schädigung der Leber durch einen Rückstau der Galle in die Leber kommt [270], wäre bei einer Gallensäuren-Therapie nicht zu erwarten, da die Gallensäuren über den enterohepatischen Kreislauf die Leber verlassen und mit dem Stuhl ausgeschieden werden können [52]. Ein weiterer Nachteil der aktuellen CMV-Medikamente ist ihre schlechte orale

Verfügbarkeit [265]. Die orale Verfügbarkeit von Gallensäuren ist gut, da sie im Darm aufgenommen und über den enterohepatischen Kreislauf zur Leber transportiert werden [188]. Ein Nachteil einer möglichen Therapie mit Gallensäuren ist, dass sie nur auf Zellen, die Gallensäure-Transporter exprimieren, wirksam wäre. Die Inhibition der MCMV-Replikation wurde in Hepatozyten gezeigt, eine Wirkung auf Ileozyten wäre anzunehmen, da Gallensäuren in Darm nicht nur transportiert werden, sondern auch dort als Signalmoleküle wirken [271]. Pharmakologische Modifikationen der Gallensäuren unter Erhaltung ihrer antiviralen Funktion, durch die sie auch in andere Zellen aufgenommen werden, können eine interessante Therapieoption darstellen.

6. Zusammenfassung

Gallensäuren beeinflussen das Immunsystem und die Replikation von hepatotropen und gastrointestinalen Viren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung von Gallensäuren auf das Zytomegalievirus (CMV) untersucht, welches in der Leber repliziert und unter Immunsuppression zu einer Hepatitis führen kann.

Konjugierte primäre Gallensäuren wie Taurochenodeoxycholsäure (TCDC), Glycochenodeoxycholsäure (GCDC) und Taurocholsäure (TC) können die Replikation des murinen Zytomegalievirus (MCMV) in murinen Hepatozyten reduzieren. Unkonjugierte oder sekundäre Gallensäuren haben hingegen keinen Einfluss auf die Virusreplikation. Die antivirale Wirkung der Gallensäuren ist abhängig vom Gallensäuren-Import durch *sodium-taurocholate cotransporting polypeptide* (NTCP). Nukleäre Gallensäuren-Rezeptoren wie der Farnesoid X Rezeptor und der Vitamin D Rezeptor, sowie andere bekannte Gallensäuren-spezifische Signalwege sind nicht am antiviralen Effekt von Gallensäuren beteiligt. Die genauere Betrachtung des viralen Replikationszyklus ergab, dass Gallensäuren keinen Einfluss auf den viralen Entry-Prozess haben. Während die Transkription der ersten durch MCMV-exprimierten Gene normal verläuft, ist deren Proteinexpression in Anwesenheit von Gallensäuren reduziert. Eine Untersuchung der Protein-Neusynthese zeigte, dass die Menge viraler und zellulärer Proteine in MCMV infizierten murinen Hepatozyten durch Gallensäuren reduziert wird.

Die vorliegenden Ergebnisse könnten als Ansatz dazu dienen, potentere Medikamente gegen CMV zu entwickeln, deren Struktur und Funktion sich von Gallensäuren ableitet. Dabei ist von besonderer Bedeutung, dass Gallensäuren schon die Proteinexpression der ersten MCMV Genprodukte inhibieren können, da die meisten heutigen Medikamente erst zu späteren Phasen der Virusreplikation wirken, die frühen Genprodukte jedoch wichtige Funktionen für die Virusreplikation und die Immunmodulation erfüllen.

7. Summary

Bile acids modulate the immune system and the replication of hepatic and gastrointestinal viruses. This study focuses on the impact of bile acids on cytomegalovirus replication. Cytomegaloviruses (CMV) replicate in the liver and can induce hepatitis under immune compromised conditions.

Primary conjugated bile acids as taurochenodeoxycholic acid (TCDC), glycochenodeoxycholic acid (GCDC) and taurocholic acid (TC) reduce the replication of mouse cytomegalovirus (MCMV) in murine hepatocytes, while unconjugated and secondary bile acids have no antiviral effects. The antiviral potency of bile acids was dependent on bile acids transport by sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). Nuclear bile acid receptors as the farnesoid X receptor and the vitamin D receptor as well as known bile acid specific signal pathways are not essential for the antiviral effect of bile acids on MCMV. An explicated analysis of the viral replication cycle showed that the entry process is unaffected by bile acid. While the transcription of the immediate early genes is normal the correspondent protein expression is reduced by bile acids. Measurements of protein synthesis showed that viral and cellular protein translation is reduced in infected bile acids treated cells.

The results of this study could be used to design improved drugs against CMV infection, which are related to the bile acid structure and function. It is of great interest that bile acids affect the expression of the immediate early genes, because these genes that are not targeted by the most known CMV treatments, but these genes have a major impact on viral replication and modulate the immune system.

8. Literatur

1. Zorn, A.M., *Liver development*, in *StemBook2008*: Cambridge (MA).
2. Wilcox, G., *Insulin and insulin resistance*. Clin Biochem Rev, 2005. **26**(2): p. 19-39.
3. Jiang, G. and B.B. Zhang, *Glucagon and regulation of glucose metabolism*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **284**(4): p. E671-8.
4. Dettmer, U., et al., *mediscript Kurzlehrbuch Biochemie*. 1. ed2013, München: Elsevier GmbH.
5. Gropper, S.S., J.L. Smith, and J.L. Groff, *Advanced nutrition and human metabolism*. 4. ed2005: Wadsworth.
6. Asha, S. and M. Vidyavathi, *Role of human liver microsomes in in vitro metabolism of drugs-a review*. Appl Biochem Biotechnol, 2010. **160**(6): p. 1699-722.
7. Bode, J.G., et al., *Hepatic acute phase proteins - Regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF-kappaB-dependent signaling*. Eur J Cell Biol, 2012. **91**(6-7): p. 496-505.
8. Bogdanos, D.P., B. Gao, and M.E. Gershwin, *Liver immunology*. Compr Physiol, 2013. **3**(2): p. 567-98.
9. Saxena, R., N.D. Theise, and J.M. Crawford, *Microanatomy of the human liver-exploring the hidden interfaces*. Hepatology, 1999. **30**(6): p. 1339-46.
10. Ishibashi, H., et al., *Liver architecture, cell function, and disease*. Semin Immunopathol, 2009. **31**(3): p. 399-409.
11. Piper, W., *Innere Medizin2007*, Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
12. Ramadori, G. and B. Saile, *Hepatocytes*, in *Signaling Pathways in Liver Diseases*, J.-F. Dufour and P.-A. Clavien, Editors. 2010: Berlin.
13. Braet, F. and E. Wisse, *Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review*. Comp Hepatol, 2002. **1**(1): p. 1.
14. Hinz, B., et al., *The myofibroblast: one function, multiple origins*. Am J Pathol, 2007. **170**(6): p. 1807-16.
15. Winau, F., et al., *Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses*. Immunity, 2007. **26**(1): p. 117-29.
16. Naito, M., et al., *Differentiation and function of Kupffer cells*. Med Electron Microsc, 2004. **37**(1): p. 16-28.
17. Leite, M. and M. Nathanson, *Signaling Pathways in Biliary Epithelial Cells*, in *Signal Pathways in Liver Disease*, J.-F. Dufour and P.-A. Clavien, Editors. 2010, Springer Verlag: Berlin.
18. Jacobs, F., E. Wisse, and B. De Geest, *The role of liver sinusoidal cells in hepatocyte-directed gene transfer*. Am J Pathol, 2010. **176**(1): p. 14-21.
19. Ridlon, J.M., D.J. Kang, and P.B. Hylemon, *Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria*. J Lipid Res, 2006. **47**(2): p. 241-59.
20. Russell, D.W., *The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis*. Annu Rev Biochem, 2003. **72**: p. 137-74.
21. Monte, M.J., et al., *Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(7): p. 804-16.
22. Alnouti, Y., I.L. Csanaky, and C.D. Klaassen, *Quantitative-profiling of bile acids and their conjugates in mouse liver, bile, plasma, and urine using LC-MS/MS*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008. **873**(2): p. 209-17.
23. Sundaram, S.S., et al., *Mechanisms of disease: Inborn errors of bile acid synthesis*. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2008. **5**(8): p. 456-68.
24. Hofmann, A.F., *The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease*. Arch Intern Med, 1999. **159**(22): p. 2647-58.
25. Chiang, J.Y., *Bile acids: regulation of synthesis*. J Lipid Res, 2009. **50**(10): p. 1955-66.

26. Solaas, K., et al., *Subcellular organization of bile acid amidation in human liver: a key issue in regulating the biosynthesis of bile salts*. J Lipid Res, 2000. **41**(7): p. 1154-62.
27. Begley, M., C.G. Gahan, and C. Hill, *The interaction between bacteria and bile*. FEMS Microbiol Rev, 2005. **29**(4): p. 625-51.
28. Ma, K., et al., *Circadian dysregulation disrupts bile acid homeostasis*. PLoS One, 2009. **4**(8): p. e6843.
29. Makishima, M., et al., *Identification of a nuclear receptor for bile acids*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1362-5.
30. Parks, D.J., et al., *Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1365-8.
31. Goodwin, B., et al., *A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis*. Mol Cell, 2000. **6**(3): p. 517-26.
32. Hofmann, A.F. and L.R. Hagey, *Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(16): p. 2461-83.
33. Thomas, C., et al., *Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(8): p. 678-93.
34. Strautnieks, S.S., et al., *A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis*. Nat Genet, 1998. **20**(3): p. 233-8.
35. Yamada, T., et al., *Impaired expression of hepatic multidrug resistance protein 2 is associated with posthepatectomy hyperbilirubinemia in patients with biliary cancer*. Langenbecks Arch Surg, 2005. **390**(5): p. 421-9.
36. Smit, J.J., et al., *Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease*. Cell, 1993. **75**(3): p. 451-62.
37. Graf, J. and D. Haussinger, *Ion transport in hepatocytes: mechanisms and correlations to cell volume, hormone actions and metabolism*. J Hepatol, 1996. **24 Suppl 1**: p. 53-77.
38. Haussinger, D., et al., *Cell volume and bile acid excretion*. Biochem J, 1992. **288 (Pt 2)**: p. 681-9.
39. Alpini, G., et al., *Secretin activation of the apical Na⁺-dependent bile acid transporter is associated with cholehepatic shunting in rats*. Hepatology, 2005. **41**(5): p. 1037-45.
40. Haussinger, D., et al., *Involvement of integrins and Src in tauroursodeoxycholate-induced and swelling-induced choleresis*. Gastroenterology, 2003. **124**(5): p. 1476-87.
41. Kurz, A.K., et al., *Tauroursodesoxycholate-induced choleresis involves p38(MAPK) activation and translocation of the bile salt export pump in rats*. Gastroenterology, 2001. **121**(2): p. 407-19.
42. Thompson, G.R., R.K. Ockner, and K.J. Isselbacher, *Effect of mixed micellar lipid on the absorption of cholesterol and vitamin D₃ into lymph*. J Clin Invest, 1969. **48**(1): p. 87-95.
43. Hofmann, A.F. and L. Eckmann, *How bile acids confer gut mucosal protection against bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(12): p. 4333-4.
44. Shi, Y. and P. Burn, *Lipid metabolic enzymes: emerging drug targets for the treatment of obesity*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(8): p. 695-710.
45. Dawson, P.A., et al., *Targeted deletion of the ileal bile acid transporter eliminates enterohepatic cycling of bile acids in mice*. J Biol Chem, 2003. **278**(36): p. 33920-7.
46. Ballatori, N., et al., *OST alpha-OST beta: a key membrane transporter of bile acids and conjugated steroids*. Front Biosci (Landmark Ed), 2009. **14**: p. 2829-44.
47. Denk, G.U., et al., *Multidrug resistance-associated protein 4 is up-regulated in liver but down-regulated in kidney in obstructive cholestasis in the rat*. J Hepatol, 2004. **40**(4): p. 585-91.
48. Hagenbuch, B., et al., *Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransport system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(23): p. 10629-33.
49. Zwicker, B.L. and L.B. Agellon, *Transport and biological activities of bile acids*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**(7): p. 1389-98.

50. Muhlfeld, S., et al., *Short-term feedback regulation of bile salt uptake by bile salts in rodent liver*. Hepatology, 2012. **56**(6): p. 2387-97.
51. Denson, L.A., et al., *The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp*. Gastroenterology, 2001. **121**(1): p. 140-7.
52. Gonzalez, F.J., *Nuclear receptor control of enterohepatic circulation*. Compr Physiol, 2012. **2**(4): p. 2811-28.
53. Graf, D., et al., *Taurolithocholic acid-3 sulfate induces CD95 trafficking and apoptosis in a c-Jun N-terminal kinase-dependent manner*. Gastroenterology, 2002. **122**(5): p. 1411-27.
54. Becker, S., et al., *Hydrophobic bile salts induce hepatocyte shrinkage via NADPH oxidase activation*. Cell Physiol Biochem, 2007. **19**(1-4): p. 89-98.
55. Reinehr, R., et al., *Bile salt-induced apoptosis involves NADPH oxidase isoform activation*. Gastroenterology, 2005. **129**(6): p. 2009-31.
56. Reinehr, R., et al., *Involvement of the Src family kinase yes in bile salt-induced apoptosis*. Gastroenterology, 2004. **127**(5): p. 1540-57.
57. Reinehr, R., D. Graf, and D. Haussinger, *Bile salt-induced hepatocyte apoptosis involves epidermal growth factor receptor-dependent CD95 tyrosine phosphorylation*. Gastroenterology, 2003. **125**(3): p. 839-53.
58. Reinehr, R. and D. Haussinger, *Inhibition of bile salt-induced apoptosis by cyclic AMP involves serine/threonine phosphorylation of CD95*. Gastroenterology, 2004. **126**(1): p. 249-62.
59. Schliess, F., et al., *Mitogen-activated protein kinases mediate the stimulation of bile acid secretion by tauroursodeoxycholate in rat liver*. Gastroenterology, 1997. **113**(4): p. 1306-14.
60. Sommerfeld, A., R. Reinehr, and D. Haussinger, *Bile acid-induced epidermal growth factor receptor activation in quiescent rat hepatic stellate cells can trigger both proliferation and apoptosis*. J Biol Chem, 2009. **284**(33): p. 22173-83.
61. Makishima, M., et al., *Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor*. Science, 2002. **296**(5571): p. 1313-6.
62. Guo, G.L., et al., *Complementary roles of farnesoid X receptor, pregnane X receptor, and constitutive androstane receptor in protection against bile acid toxicity*. J Biol Chem, 2003. **278**(46): p. 45062-71.
63. Staudinger, J.L., et al., *The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3369-74.
64. Ananthanarayanan, M., et al., *Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor*. J Biol Chem, 2001. **276**(31): p. 28857-65.
65. Huang, L., et al., *Farnesoid X receptor activates transcription of the phospholipid pump MDR3*. J Biol Chem, 2003. **278**(51): p. 51085-90.
66. Kast, H.R., et al., *Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor*. J Biol Chem, 2002. **277**(4): p. 2908-15.
67. Kamisako, T., et al., *Transport of monoglucuronosyl and bisglucuronosyl bilirubin by recombinant human and rat multidrug resistance protein 2*. Hepatology, 1999. **30**(2): p. 485-90.
68. Stroup, D., M. Crestani, and J.Y. Chiang, *Identification of a bile acid response element in the cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene CYP7A*. Am J Physiol, 1997. **273**(2 Pt 1): p. G508-17.
69. Zollner, G., et al., *Role of nuclear receptors in the adaptive response to bile acids and cholestasis: pathogenetic and therapeutic considerations*. Mol Pharm, 2006. **3**(3): p. 231-51.
70. Owsley, E. and J.Y. Chiang, *Guggulsterone antagonizes farnesoid X receptor induction of bile salt export pump but activates pregnane X receptor to inhibit cholesterol 7alpha-hydroxylase gene*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **304**(1): p. 191-5.
71. Fang, Y., et al., *Conjugated bile acids regulate hepatocyte glycogen synthase activity in vitro and in vivo via Galphai signaling*. Mol Pharmacol, 2007. **71**(4): p. 1122-8.

72. Qiao, L., et al., *Bile acid regulation of C/EBPbeta, CREB, and c-Jun function, via the extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase pathways, modulates the apoptotic response of hepatocytes.* Mol Cell Biol, 2003. **23**(9): p. 3052-66.
73. Kurz, A.K., et al., *Phosphoinositide 3-kinase-dependent Ras activation by taurooursodesoxycholate in rat liver.* Biochem J, 2000. **350 Pt 1**: p. 207-13.
74. Graf, D., et al., *Prevention of bile acid-induced apoptosis by betaine in rat liver.* Hepatology, 2002. **36**(4 Pt 1): p. 829-39.
75. Dombrowski, F., B. Stieger, and U. Beuers, *Tauroursodeoxycholic acid inserts the bile salt export pump into canalicular membranes of cholestatic rat liver.* Lab Invest, 2006. **86**(2): p. 166-74.
76. Crosignani, A., et al., *Tauroursodeoxycholic acid for treatment of primary biliary cirrhosis. A dose-response study.* Dig Dis Sci, 1996. **41**(4): p. 809-15.
77. Kawamata, Y., et al., *A G protein-coupled receptor responsive to bile acids.* J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9435-40.
78. Maruyama, T., et al., *Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR).* Biochem Biophys Res Commun, 2002. **298**(5): p. 714-9.
79. Keitel, V., R. Kubitz, and D. Haussinger, *Endocrine and paracrine role of bile acids.* World J Gastroenterol, 2008. **14**(37): p. 5620-9.
80. Keitel, V. and D. Haussinger, *TGR5 in cholangiocytes.* Curr Opin Gastroenterol, 2013. **29**(3): p. 299-304.
81. Keitel, V., et al., *The membrane-bound bile acid receptor TGR5 is localized in the epithelium of human gallbladders.* Hepatology, 2009. **50**(3): p. 861-70.
82. Keitel, V., et al., *The G-protein coupled bile salt receptor TGR5 is expressed in liver sinusoidal endothelial cells.* Hepatology, 2007. **45**(3): p. 695-704.
83. Keitel, V., et al., *Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupffer cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2008. **372**(1): p. 78-84.
84. Haselow, K., et al., *Bile acids PKA-dependently induce a switch of the IL-10/IL-12 ratio and reduce proinflammatory capability of human macrophages.* J Leukoc Biol, 2013. **94**(6): p. 1253-64.
85. Keitel, V. and D. Haussinger, *Perspective: TGR5 (Gpbar-1) in liver physiology and disease.* Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2012. **36**(5): p. 412-9.
86. Hirschfield, G.M., E.J. Heathcote, and M.E. Gershwin, *Pathogenesis of cholestatic liver disease and therapeutic approaches.* Gastroenterology, 2010. **139**(5): p. 1481-96.
87. Kubitz, R., et al., *The bile salt export pump (BSEP) in health and disease.* Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2012. **36**(6): p. 536-53.
88. Selmi, C., et al., *Primary biliary cirrhosis.* Lancet, 2011. **377**(9777): p. 1600-9.
89. Silveira, M.G. and K.D. Lindor, *Primary sclerosing cholangitis.* Can J Gastroenterol, 2008. **22**(8): p. 689-98.
90. Hu, Y., et al., *Clinical study on treatment of infantile cytomegalovirus hepatitis with integrated Chinese and Western medicine.* Chin J Integr Med, 2012. **18**(2): p. 100-5.
91. Ozkan, T.B., et al., *Antiviral therapy in neonatal cholestatic cytomegalovirus hepatitis.* BMC Gastroenterol, 2007. **7**: p. 9.
92. Shaukat, A., et al., *Epstein-Barr virus induced hepatitis: An important cause of cholestasis.* Hepatol Res, 2005. **33**(1): p. 24-6.
93. Jung, S., et al., *Four cases of hepatitis B virus-related fibrosing cholestatic hepatitis treated with lamivudine.* J Gastroenterol Hepatol, 2002. **17**(3): p. 345-50.
94. Rigopoulou, E.I., et al., *Primary biliary cirrhosis in HBV and HCV patients: Clinical characteristics and outcome.* World J Hepatol, 2013. **5**(10): p. 577-83.
95. Rosenberg, P.M., et al., *Rapidly progressive fibrosing cholestatic hepatitis--hepatitis C virus in HIV coinfection.* Am J Gastroenterol, 2002. **97**(2): p. 478-83.

96. Graf, D., et al., *Inhibition of interferon-alpha-induced signaling by hyperosmolarity and hydrophobic bile acids*. Biol Chem, 2010. **391**(10): p. 1175-87.
97. Graf, D., et al., *Bile acids inhibit interleukin-6 signaling via gp130 receptor-dependent and -independent pathways in rat liver*. Hepatology, 2006. **44**(5): p. 1206-17.
98. Allen, K., H. Jaeschke, and B.L. Copple, *Bile acids induce inflammatory genes in hepatocytes: a novel mechanism of inflammation during obstructive cholestasis*. Am J Pathol, 2011. **178**(1): p. 175-86.
99. Ichikawa, R., et al., *Bile acids induce monocyte differentiation toward interleukin-12 hypo-producing dendritic cells via a TGR5-dependent pathway*. Immunology, 2012. **136**(2): p. 153-62.
100. Renga, B., et al., *The Bile Acid Sensor FXR Is Required for Immune-Regulatory Activities of TLR-9 in Intestinal Inflammation*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54472.
101. Chhatwal, P., et al., *Bile acids specifically increase hepatitis C virus RNA-replication*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e36029.
102. Scholtes, C., et al., *Enhancement of genotype 1 hepatitis C virus replication by bile acids through FXR*. J Hepatol, 2008. **48**(2): p. 192-9.
103. Chang, K.O. and D.W. George, *Bile acids promote the expression of hepatitis C virus in replicon-harboring cells*. J Virol, 2007. **81**(18): p. 9633-40.
104. Patton, J.B., D. George, and K.O. Chang, *Bile acids promote HCV replication through the EGFR/ERK pathway in replicon-harboring cells*. Intervirology, 2011. **54**(6): p. 339-48.
105. Ramiere, C., et al., *Transactivation of the hepatitis B virus core promoter by the nuclear receptor FXRalpha*. J Virol, 2008. **82**(21): p. 10832-40.
106. Kim, H.Y., et al., *Bile acids increase hepatitis B virus gene expression and inhibit interferon-alpha activity*. FEBS J, 2010. **277**(13): p. 2791-802.
107. Yan, H., et al., *Molecular determinants restricting mouse sodium taurocholate cotransporting polypeptide for viral entry of Hepatitis B and D virus*. J Virol, 2013.
108. Yan, H., et al., *Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus*. elife, 2012. **1**: p. e00049.
109. Karsten, C., et al., *Incidence and risk factors for community-acquired acute gastroenteritis in north-west Germany in 2004*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009. **28**(8): p. 935-43.
110. Kim, Y. and K.O. Chang, *Inhibitory effects of bile acids and synthetic farnesoid X receptor agonists on rotavirus replication*. J Virol, 2011. **85**(23): p. 12570-7.
111. Chang, K.O., et al., *Bile acids are essential for porcine enteric calicivirus replication in association with down-regulation of signal transducer and activator of transcription 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(23): p. 8733-8.
112. Hassan, I.H., et al., *Influenza A viral replication is blocked by inhibition of the inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) stress pathway*. J Biol Chem, 2012. **287**(7): p. 4679-89.
113. Shukla, D. and P.G. Spear, *Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry*. J Clin Invest, 2001. **108**(4): p. 503-10.
114. Doerr, H.W. and W.H. Gerlich, *Medizinische Virologie*. 2 ed2010, Stuttgart: Thieme.
115. Crough, T. and R. Khanna, *Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside*. Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(1): p. 76-98, Table of Contents.
116. Kalejta, R.F., *Tegument proteins of human cytomegalovirus*. Microbiol Mol Biol Rev, 2008. **72**(2): p. 249-65, table of contents.
117. Varnum, S.M., et al., *Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome*. J Virol, 2004. **78**(20): p. 10960-6.
118. Arbeitskreis Blut, U.B.B.K., *Human Cytomegalovirus (HCMV) – Revised*. Transfus Med Hemother, 2010. **37**: p. 365-375.

119. [Human cytomegalovirus (HCMV). Position of the Blood Working Group of the Federal Ministry of Health]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2010. **53**(9): p. 973-83.
120. Varani, S. and M.P. Landini, *Cytomegalovirus-induced immunopathology and its clinical consequences*. Herpesviridae, 2011. **2**(1): p. 6.
121. Sinzger, C., et al., *Hepatocytes are permissive for human cytomegalovirus infection in human liver cell culture and In vivo*. J Infect Dis, 1999. **180**(4): p. 976-86.
122. Mercorelli, B., et al., *Early inhibitors of human cytomegalovirus: state-of-art and therapeutic perspectives*. Pharmacol Ther, 2011. **131**(3): p. 309-29.
123. Maul, G.G. and D. Negorev, *Differences between mouse and human cytomegalovirus interactions with their respective hosts at immediate early times of the replication cycle*. Med Microbiol Immunol, 2008. **197**(2): p. 241-9.
124. Brune, W., H. Hengel, and U.H. Koszinowski, *A mouse model for cytomegalovirus infection*. Curr Protoc Immunol, 2001. **Chapter 19**: p. Unit 19 7.
125. Messerle, M., et al., *Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(26): p. 14759-63.
126. Scalzo, A.A., et al., *The interplay between host and viral factors in shaping the outcome of cytomegalovirus infection*. Immunol Cell Biol, 2007. **85**(1): p. 46-54.
127. Shanley, J.D., et al., *Pathogenesis of reactivated latent murine cytomegalovirus infection*. Am J Pathol, 1979. **95**(1): p. 67-80.
128. Seckert, C.K., et al., *Liver sinusoidal endothelial cells are a site of murine cytomegalovirus latency and reactivation*. J Virol, 2009. **83**(17): p. 8869-84.
129. Rafailidis, P.I., et al., *Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review*. Virol J, 2008. **5**: p. 47.
130. Casavant, N.C., et al., *Potential role for p53 in the permissive life cycle of human cytomegalovirus*. J Virol, 2006. **80**(17): p. 8390-401.
131. Michaelis, M., H.W. Doerr, and J. Cinatl, *The story of human cytomegalovirus and cancer: increasing evidence and open questions*. Neoplasia, 2009. **11**(1): p. 1-9.
132. Tafvizi, F. and Z.T. Fard, *Detection of Human Cytomegalovirus in patients with Colorectal Cancer by Nested-PCR*. Asian Pac J Cancer Prev, 2014. **15**(3): p. 1453-7.
133. Cicin-Sain, L., et al., *Cytomegalovirus infection impairs immune responses and accentuates T-cell pool changes observed in mice with aging*. PLoS Pathog, 2012. **8**(8): p. e1002849.
134. Karrer, U., et al., *Memory inflation: continuous accumulation of antiviral CD8+ T cells over time*. J Immunol, 2003. **170**(4): p. 2022-9.
135. Kenneson, A. and M.J. Cannon, *Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection*. Rev Med Virol, 2007. **17**(4): p. 253-76.
136. Ludwig, A. and H. Hengel, *Epidemiological impact and disease burden of congenital cytomegalovirus infection in Europe*. Euro Surveill, 2009. **14**(9): p. 26-32.
137. Brindley, S.M., et al., *Cytomegalovirus-specific T-cell reactivity in biliary atresia at the time of diagnosis is associated with deficits in regulatory T cells*. Hepatology, 2012. **55**(4): p. 1130-8.
138. Griffiths, P.D., *CMV as a cofactor enhancing progression of AIDS*. J Clin Virol, 2006. **35**(4): p. 489-92.
139. Manuel, O., et al., *Impact of Antiviral Preventive Strategies on the Incidence and Outcomes of Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Recipients*. Am J Transplant, 2013.
140. Arnold, J.C., et al., *Cytomegalovirus infection persists in the liver graft in the vanishing bile duct syndrome*. Hepatology, 1992. **16**(2): p. 285-92.
141. Lee, S.O. and R.R. Razonable, *Current concepts on cytomegalovirus infection after liver transplantation*. World J Hepatol, 2010. **2**(9): p. 325-36.

142. Biron, K.K., et al., *Metabolic activation of the nucleoside analog 9-[(2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy)methyl]guanine in human diploid fibroblasts infected with human cytomegalovirus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(8): p. 2473-7.
143. Sullivan, V., et al., *A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells*. Nature, 1992. **358**(6382): p. 162-4.
144. Prichard, M.N. and E.R. Kern, *The search for new therapies for human cytomegalovirus infections*. Virus Res, 2011. **157**(2): p. 212-21.
145. Biron, K.K., *Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases*. Antiviral Res, 2006. **71**(2-3): p. 154-63.
146. Scholz, M., H.W. Doerr, and J. Cinatl, *Inhibition of cytomegalovirus immediate early gene expression: a therapeutic option?* Antiviral Res, 2001. **49**(3): p. 129-45.
147. Nigro, G., et al., *Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection*. N Engl J Med, 2005. **353**(13): p. 1350-62.
148. Isaacson, M.K. and T. Compton, *Human cytomegalovirus glycoprotein B is required for virus entry and cell-to-cell spread but not for virion attachment, assembly, or egress*. J Virol, 2009. **83**(8): p. 3891-903.
149. Kari, B. and R. Gehrz, *Structure, composition and heparin binding properties of a human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II*. J Gen Virol, 1993. **74** (Pt 2): p. 255-64.
150. Compton, T., D.M. Nowlin, and N.R. Cooper, *Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate*. Virology, 1993. **193**(2): p. 834-41.
151. Wang, X., et al., *Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus*. Nature, 2003. **424**(6947): p. 456-61.
152. Isaacson, M.K., A.L. Feire, and T. Compton, *Epidermal growth factor receptor is not required for human cytomegalovirus entry or signaling*. J Virol, 2007. **81**(12): p. 6241-7.
153. Mettenleiter, T.C., B.G. Klupp, and H. Granzow, *Herpesvirus assembly: an update*. Virus Res, 2009. **143**(2): p. 222-34.
154. Soroceanu, L., A. Akhavan, and C.S. Cobbs, *Platelet-derived growth factor-alpha receptor activation is required for human cytomegalovirus infection*. Nature, 2008. **455**(7211): p. 391-5.
155. Feire, A.L., H. Koss, and T. Compton, *Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(43): p. 15470-5.
156. Feire, A.L., et al., *The glycoprotein B disintegrin-like domain binds beta 1 integrin to mediate cytomegalovirus entry*. J Virol, 2010. **84**(19): p. 10026-37.
157. Ogawa-Goto, K., et al., *Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid*. J Virol, 2003. **77**(15): p. 8541-7.
158. Dolken, L., S. Pfeffer, and U.H. Koszinowski, *Cytomegalovirus microRNAs*. Virus Genes, 2009. **38**(3): p. 355-64.
159. Stern-Ginossar, N., et al., *Decoding human cytomegalovirus*. Science, 2012. **338**(6110): p. 1088-93.
160. Awasthi, S., J.A. Isler, and J.C. Alwine, *Analysis of splice variants of the immediate-early 1 region of human cytomegalovirus*. J Virol, 2004. **78**(15): p. 8191-200.
161. Busche, A., et al., *Phenotypes of major immediate-early gene mutants of mouse cytomegalovirus*. Med Microbiol Immunol, 2008. **197**(2): p. 233-40.
162. Paulus, C. and M. Nevels, *The human cytomegalovirus major immediate-early proteins as antagonists of intrinsic and innate antiviral host responses*. Viruses, 2009. **1**(3): p. 760-79.
163. Alvisi, G., et al., *The flexible loop of the human cytomegalovirus DNA polymerase processivity factor ppUL44 is required for efficient DNA binding and replication in cells*. J Virol, 2009. **83**(18): p. 9567-76.

164. Fehr, A.R. and D. Yu, *Human cytomegalovirus early protein pUL21a promotes efficient viral DNA synthesis and the late accumulation of immediate-early transcripts*. J Virol, 2011. **85**(2): p. 663-74.
165. Chee, M., et al., *Identification of the major capsid protein gene of human cytomegalovirus*. J Virol, 1989. **63**(3): p. 1345-53.
166. Gibson, W., M.K. Baxter, and K.S. Clopper, *Cytomegalovirus "missing" capsid protein identified as heat-aggregable product of human cytomegalovirus UL46*. J Virol, 1996. **70**(11): p. 7454-61.
167. Gibson, W., et al., *Human cytomegalovirus (HCMV) smallest capsid protein identified as product of short open reading frame located between HCMV UL48 and UL49*. J Virol, 1996. **70**(8): p. 5680-3.
168. Mettenleiter, T.C., B.G. Klupp, and H. Granzow, *Herpesvirus assembly: a tale of two membranes*. Curr Opin Microbiol, 2006. **9**(4): p. 423-9.
169. Mettenleiter, T.C., *Herpesvirus assembly and egress*. J Virol, 2002. **76**(4): p. 1537-47.
170. Sinal, C.J., et al., *Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis*. Cell, 2000. **102**(6): p. 731-44.
171. Muller, U., et al., *Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense*. Science, 1994. **264**(5167): p. 1918-21.
172. Sinzger, C., et al., *Cloning and sequencing of a highly productive, endotheliotropic virus strain derived from human cytomegalovirus TB40/E*. J Gen Virol, 2008. **89**(Pt 2): p. 359-68.
173. Trilling, M., et al., *Identification of DNA-damage DNA-binding protein 1 as a conditional essential factor for cytomegalovirus replication in interferon-gamma-stimulated cells*. PLoS Pathog, 2011. **7**(6): p. e1002069.
174. Osborn, J.E. and D.L. Walker, *Enhancement of infectivity of murine cytomegalovirus in vitro by centrifugal inoculation*. J Virol, 1968. **2**(9): p. 853-8.
175. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
176. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
177. Kyhse-Andersen, J., *Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose*. J Biochem Biophys Methods, 1984. **10**(3-4): p. 203-9.
178. Thorpe, G.H., et al., *Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in luminescence-monitored enzyme immunoassays*. Clin Chem, 1985. **31**(8): p. 1335-41.
179. de Wet, J.R., et al., *Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(2): p. 725-37.
180. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
181. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods Enzymol, 1987. **155**: p. 335-50.
182. Kutuyavin, I.V., *New approach to real-time nucleic acids detection: folding polymerase chain reaction amplicons into a secondary structure to improve cleavage of Forster resonance energy transfer probes in 5'-nuclease assays*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(5): p. e29.
183. Matrai, J., M.K. Chuah, and T. VandenDriessche, *Recent advances in lentiviral vector development and applications*. Mol Ther, 2010. **18**(3): p. 477-90.
184. Mayatepek, E. and D. Herebian, *analysis of bile acids by tandem mass spektrometry, in hepatobiliary transport in health and disease*, D. Haussinger, V. Keitel, and R. Kubitz, Editors. 2012, Walter De Gruyter GmbH co. KG: Berlin/Boston. p. 277-287.

185. Seehofer, D., et al., *CMV hepatitis after liver transplantation: incidence, clinical course, and long-term follow-up*. Liver Transpl, 2002. **8**(12): p. 1138-46.
186. Sacher, T., et al., *The major virus-producing cell type during murine cytomegalovirus infection, the hepatocyte, is not the source of virus dissemination in the host*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(4): p. 263-72.
187. Yuki, N., et al., *Pretreatment viral load and response to prolonged interferon-alpha course for chronic hepatitis C*. J Hepatol, 1995. **22**(4): p. 457-63.
188. Hofmann, A.F., *The enterohepatic circulation of bile acids in mammals: form and functions*. Front Biosci, 2009. **14**: p. 2584-98.
189. Alrefai, W.A. and R.K. Gill, *Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications*. Pharm Res, 2007. **24**(10): p. 1803-23.
190. Hilgendorf, C., et al., *Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines*. Drug Metab Dispos, 2007. **35**(8): p. 1333-40.
191. Glasova, H., et al., *Tauroursodeoxycholic acid mobilizes alpha-PKC after uptake in human HepG2 hepatoma cells*. Eur J Clin Invest, 2002. **32**(6): p. 437-42.
192. Tchapanian, E.H., et al., *Effect of culture time on the basal expression levels of drug transporters in sandwich-cultured primary rat hepatocytes*. Drug Metab Dispos, 2011. **39**(12): p. 2387-94.
193. Dong, Z., S. Ekins, and J.E. Polli, *Structure-activity relationship for FDA approved drugs as inhibitors of the human sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)*. Mol Pharm, 2013. **10**(3): p. 1008-19.
194. Zollner, G. and M. Trauner, *Nuclear receptors as therapeutic targets in cholestatic liver diseases*. Br J Pharmacol, 2009. **156**(1): p. 7-27.
195. Hewison, M., *An update on vitamin D and human immunity*. Clin Endocrinol (Oxf), 2012. **76**(3): p. 315-25.
196. Cai, K. and M.B. Sewer, *Diacylglycerol kinase theta couples farnesoid X receptor-dependent bile acid signalling to Akt activation and glucose homeostasis in hepatocytes*. Biochem J, 2013. **455**(1): p. 131.
197. McFarlane, S., et al., *Early induction of autophagy in human fibroblasts after infection with human cytomegalovirus or herpes simplex virus 1*. J Virol, 2011. **85**(9): p. 4212-21.
198. Payne, C.M., et al., *Deoxycholate, an endogenous cytotoxin/genotoxin, induces the autophagic stress-survival pathway: implications for colon carcinogenesis*. J Toxicol, 2009. **2009**: p. 785907.
199. Nishi, T. and M. Forgac, *The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(2): p. 94-103.
200. Lefebvre, P., et al., *Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation*. Physiol Rev, 2009. **89**(1): p. 147-91.
201. Reinehr, R., et al., *Endosomal acidification and activation of NADPH oxidase isoforms are upstream events in hyperosmolarity-induced hepatocyte apoptosis*. J Biol Chem, 2006. **281**(32): p. 23150-66.
202. Reinehr, R., et al., *Hyperosmolarity triggers CD95 membrane trafficking and sensitizes rat hepatocytes toward CD95L-induced apoptosis*. Hepatology, 2002. **36**(3): p. 602-14.
203. Unterholzner, L., *The interferon response to intracellular DNA: Why so many receptors?* Immunobiology, 2013.
204. Holm, C.K., et al., *Virus-cell fusion as a trigger of innate immunity dependent on the adaptor STING*. Nat Immunol, 2012. **13**(8): p. 737-43.
205. Trilling, M., V.T. Le, and H. Hengel, *Interplay between CMVs and interferon signaling: implications for pathogenesis and therapeutic intervention*. Future Microbiol, 2012. **7**(11): p. 1269-82.

206. Wu, C.A., et al., *The murine cytomegalovirus M25 open reading frame encodes a component of the tegument*. *Virology*, 1999. **262**(2): p. 265-76.
207. Ghazal, P., et al., *Elimination of ie1 significantly attenuates murine cytomegalovirus virulence but does not alter replicative capacity in cell culture*. *J Virol*, 2005. **79**(11): p. 7182-94.
208. Qiao, D., et al., *Deoxycholic acid suppresses p53 by stimulating proteasome-mediated p53 protein degradation*. *Carcinogenesis*, 2001. **22**(6): p. 957-64.
209. Miao, J., et al., *Bile acid signaling pathways increase stability of Small Heterodimer Partner (SHP) by inhibiting ubiquitin-proteasomal degradation*. *Genes Dev*, 2009. **23**(8): p. 986-96.
210. Matsubara, T., F. Li, and F.J. Gonzalez, *FXR signaling in the enterohepatic system*. *Mol Cell Endocrinol*, 2013. **368**(1-2): p. 17-29.
211. Li, T., A. Jahan, and J.Y. Chiang, *Bile acids and cytokines inhibit the human cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene via the JNK/c-jun pathway in human liver cells*. *Hepatology*, 2006. **43**(6): p. 1202-10.
212. Owen, B.M., et al., *Intestinal detoxification limits the activation of hepatic pregnane X receptor by lithocholic acid*. *Drug Metab Dispos*, 2010. **38**(1): p. 143-9.
213. Zhang, J., et al., *The constitutive androstane receptor and pregnane X receptor function coordinately to prevent bile acid-induced hepatotoxicity*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(47): p. 49517-22.
214. Gal-Tanamy, M., et al., *Vitamin D: an innate antiviral agent suppressing hepatitis C virus in human hepatocytes*. *Hepatology*, 2011. **54**(5): p. 1570-9.
215. Beard, J.A., A. Bearden, and R. Striker, *Vitamin D and the anti-viral state*. *J Clin Virol*, 2011. **50**(3): p. 194-200.
216. Nonaka, M., et al., *Cytoprotective effect of tauroursodeoxycholate on hepatocyte apoptosis induced by peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008. **23**(7 Pt 2): p. e198-206.
217. Hirano, F., M. Haneda, and I. Makino, *Chenodeoxycholic acid and taurochenodeoxycholic acid induce anti-apoptotic cIAP-1 expression in human hepatocytes*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2006. **21**(12): p. 1807-13.
218. Higuchi, H., et al., *Bile acids up-regulate death receptor 5/TRAIL-receptor 2 expression via a c-Jun N-terminal kinase-dependent pathway involving Sp1*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(1): p. 51-60.
219. Watanabe, M., et al., *Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c*. *J Clin Invest*, 2004. **113**(10): p. 1408-18.
220. Yamagata, K., et al., *Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via small heterodimer partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and Foxo1*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(22): p. 23158-65.
221. Graf, D., et al., *Caspase-mediated cleavage of the signal-transducing IL-6 receptor subunit gp130*. *Arch Biochem Biophys*, 2008. **477**(2): p. 330-8.
222. Huang, W., et al., *Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration*. *Science*, 2006. **312**(5771): p. 233-6.
223. Dai, J., et al., *Impact of bile acids on the growth of human cholangiocarcinoma via FXR*. *J Hematol Oncol*, 2011. **4**: p. 41.
224. Kim, I., et al., *Spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor-null mice*. *Carcinogenesis*, 2007. **28**(5): p. 940-6.
225. Bernstein, H., et al., *Bile acids as endogenous etiologic agents in gastrointestinal cancer*. *World J Gastroenterol*, 2009. **15**(27): p. 3329-40.
226. Janeway, C.A., et al., *Immunologie*, 2002, Spektrum: Heidelberg.
227. Brand, S., et al., *IL-28A and IL-29 mediate antiproliferative and antiviral signals in intestinal epithelial cells and murine CMV infection increases colonic IL-28A expression*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005. **289**(5): p. G960-8.

228. Zimmermann, A., et al., *A cytomegaloviral protein reveals a dual role for STAT2 in IFN- $\{\gamma\}$ signaling and antiviral responses*. J Exp Med, 2005. **201**(10): p. 1543-53.
229. Marshall, E.E. and A.P. Geballe, *Multifaceted evasion of the interferon response by cytomegalovirus*. J Interferon Cytokine Res, 2009. **29**(9): p. 609-19.
230. Hermant, P., et al., *Human but not mouse hepatocytes respond to interferon-lambda in vivo*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e87906.
231. Tomtishen, J.P., 3rd, *Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28)*. Virol J, 2012. **9**: p. 22.
232. Cowling, V.H. and M.D. Cole, *Myc Regulation of mRNA Cap Methylation*. Genes Cancer, 2010. **1**(6): p. 576-579.
233. Weill, L., et al., *Translational control by changes in poly(A) tail length: recycling mRNAs*. Nat Struct Mol Biol, 2012. **19**(6): p. 577-85.
234. Zhang, X., A. Virtanen, and F.E. Kleiman, *To polyadenylate or to deadenylate: that is the question*. Cell Cycle, 2010. **9**(22): p. 4437-49.
235. Wang, Z. and C.B. Burge, *Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code*. RNA, 2008. **14**(5): p. 802-13.
236. McManus, C.J. and B.R. Graveley, *RNA structure and the mechanisms of alternative splicing*. Curr Opin Genet Dev, 2011. **21**(4): p. 373-9.
237. Heyd, F. and K.W. Lynch, *Degrade, move, regroup: signaling control of splicing proteins*. Trends Biochem Sci, 2011. **36**(8): p. 397-404.
238. Adair, R., et al., *Alteration of cellular RNA splicing and polyadenylation machineries during productive human cytomegalovirus infection*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 12): p. 3541-53.
239. Gaddy, C.E., et al., *Regulation of the subcellular distribution of key cellular RNA-processing factors during permissive human cytomegalovirus infection*. J Gen Virol, 2010. **91**(Pt 6): p. 1547-59.
240. Kohler, A. and E. Hurt, *Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(10): p. 761-73.
241. Carmody, S.R. and S.R. Wenthe, *mRNA nuclear export at a glance*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 12): p. 1933-7.
242. Schumann, S., et al., *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57 protein: exploiting all stages of viral mRNA processing*. Viruses, 2013. **5**(8): p. 1901-23.
243. Toth, Z., P. Lischka, and T. Stamminger, *RNA-binding of the human cytomegalovirus transactivator protein UL69, mediated by arginine-rich motifs, is not required for nuclear export of unspliced RNA*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(4): p. 1237-49.
244. Gao, Y., et al., *Nucleocytoplasmic shuttling of human cytomegalovirus UL84 is essential for virus growth*. J Virol, 2010. **84**(17): p. 8484-94.
245. Gebauer, F. and M.W. Hentze, *Molecular mechanisms of translational control*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(10): p. 827-35.
246. Sonenberg, N. and A.G. Hinnebusch, *Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets*. Cell, 2009. **136**(4): p. 731-45.
247. Marintchev, A., et al., *Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation*. Cell, 2009. **136**(3): p. 447-60.
248. Topisirovic, I., et al., *Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2011. **2**(2): p. 277-98.
249. Fabian, M.R., N. Sonenberg, and W. Filipowicz, *Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs*. Annu Rev Biochem, 2010. **79**: p. 351-79.
250. Sorokin, A.V., E.R. Kim, and L.P. Ovchinnikov, *Proteasome system of protein degradation and processing*. Biochemistry (Mosc), 2009. **74**(13): p. 1411-42.

251. Ciechanover, A., *Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2006: p. 1-12, 505-6.
252. Zhang, Y.K., G.L. Guo, and C.D. Klaassen, *Diurnal variations of mouse plasma and hepatic bile acid concentrations as well as expression of biosynthetic enzymes and transporters*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e16683.
253. Eysen, H.J., G. De Pauw, and J. Van Eldere, *Formation of hyodeoxycholic acid from muricholic acid and hyocholic acid by an unidentified gram-positive rod termed HDCA-1 isolated from rat intestinal microflora*. Appl Environ Microbiol, 1999. **65**(7): p. 3158-63.
254. Hofmann, A.F., *Detoxification of lithocholic acid, a toxic bile acid: relevance to drug hepatotoxicity*. Drug Metab Rev, 2004. **36**(3-4): p. 703-22.
255. Song, K.H., et al., *Bile acids activate fibroblast growth factor 19 signaling in human hepatocytes to inhibit cholesterol 7alpha-hydroxylase gene expression*. Hepatology, 2009. **49**(1): p. 297-305.
256. Dawson, P.A., T. Lan, and A. Rao, *Bile acid transporters*. J Lipid Res, 2009. **50**(12): p. 2340-57.
257. Schuster, V.L., *Prostaglandin transport*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002. **68-69**: p. 633-47.
258. Adachi, H., et al., *Molecular characterization of human and rat organic anion transporter OATP-D*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. **285**(6): p. F1188-97.
259. Cheng, X., et al., *Tissue distribution and ontogeny of mouse organic anion transporting polypeptides (Oatps)*. Drug Metab Dispos, 2005. **33**(7): p. 1062-73.
260. Walters, H.C., et al., *Expression, transport properties, and chromosomal location of organic anion transporter subtype 3*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. **279**(6): p. G1188-200.
261. Hagenbuch, B. and P.J. Meier, *The superfamily of organic anion transporting polypeptides*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1609**(1): p. 1-18.
262. Hardison, W.G., *Hepatic taurine concentration and dietary taurine as regulators of bile acid conjugation with taurine*. Gastroenterology, 1978. **75**(1): p. 71-5.
263. Munger, J., et al., *Dynamics of the cellular metabolome during human cytomegalovirus infection*. PLoS Pathog, 2006. **2**(12): p. e132.
264. Vastag, L., et al., *Divergent effects of human cytomegalovirus and herpes simplex virus-1 on cellular metabolism*. PLoS Pathog, 2011. **7**(7): p. e1002124.
265. Schreiber, A., et al., *Antiviral treatment of cytomegalovirus infection and resistant strains*. Expert Opin Pharmacother, 2009. **10**(2): p. 191-209.
266. De Clercq, E., *Selective anti-herpesvirus agents*. Antivir Chem Chemother, 2013.
267. Dos Santos Mde, F., et al., *Nephrotoxicity of acyclovir and ganciclovir in rats: evaluation of glomerular hemodynamics*. J Am Soc Nephrol, 1997. **8**(3): p. 361-7.
268. Deray, G., et al., *Foscarnet nephrotoxicity: mechanism, incidence and prevention*. Am J Nephrol, 1989. **9**(4): p. 316-21.
269. Jacobsen, T. and N. Sifontis, *Drug interactions and toxicities associated with the antiviral management of cytomegalovirus infection*. Am J Health Syst Pharm, 2010. **67**(17): p. 1417-25.
270. Woolbright, B.L. and H. Jaeschke, *Novel insight into mechanisms of cholestatic liver injury*. World J Gastroenterol, 2012. **18**(36): p. 4985-93.
271. Martinez-Augustin, O. and F. Sanchez de Medina, *Intestinal bile acid physiology and pathophysiology*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(37): p. 5630-40.

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich herzlich bei Herrn Professor Dieter Häussinger, für die Überlassung des spannenden Themas und der Möglichkeit unter diesen hervorragenden Bedingungen in seiner Klinik arbeiten zu können, bedanken.

Ein besonderer Dank gibt Herrn Professor William Martin für die Übernahme der Zweitgutachterrolle dieser Arbeit.

Herrn Professor Hartmut Hengel danke ich für die Möglichkeit, einen großen Teil der experimentellen Arbeit in seinem Institut anfertigen zu dürfen. Ferner danke ich ihm auch für seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn PD Dr. Dirk Graf, danke ich für die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit und für seine beständige Diskussionsbereitschaft.

Für die Hilfe in allen virologischen Fragen und die Möglichkeit mal kurz vorbei zu schauen und die Ergebnisse zu besprechen, gibt mein besonderer Dank Herrn Professor Mirko Trilling.

Ein besonderer Dank gilt meiner "Hepatozyten-Fee" Ursula Kristek.

Für jegliche Art von Rat und Tat danke ich Dr. Katrin Haselow und Dr. Marianne Wammers.

Frau Dr. Khanh Le, Frau Dr. Stephanie Rattay und Katrin Ehrhardt danke ich für die Überlassung ihrer Virusmutanten und Stocks. Herrn Dr. Herebian danke ich für die Bestimmung der Gallensäurespiegel im Plasma und in den Leberproben. Für die lentivirale Transfektion und Überlassung des NTCP-Konstrukts danke ich Frau Dr. Constanze Wiek und Frau Dr. Claudia Stross.

Für eine schöne Zeit im Labor danke ich Annette, Carola, Janine, Katrin, Laura, Nathalie, Marianne und Stefanie im Gastrolabor und Albert, Alex, Anja, Anne, Benny, Cosima, Katrin, Khanh, Mirko, Sebastian, Stef und Stephanie auf der virologischen Seite.

Außerdem danke ich Frau Dr. Sandra Berger für die Hilfe und die gute Organisation des Graduiertenkollegs.

Ich danke all meinen Freunden für ihren Zuspruch und die Unterstützung in allen Lebenslagen. Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Bei meinen Eltern Sibille und Ferdinand Schupp, meinen Großeltern Maria und Peter Hilgers, meinem Großonkel Addi Steinwartz und meinem Freund Jörg Neikes für ihre Zeit, unendliche Liebe und all ihre Unterstützung.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Neuss, den