

Charakterisierung der Latenz  
des murinen Cytomegalovirus *in vivo*

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Marion Grießl  
geb. in Homburg/Saar

Mainz, Oktober 2013

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2013

Der Erfolg ist jedem sicher, der ihn sich wirklich wünscht. Unterschätze niemals Deine Träume! Du musst einen Pakt mit ihnen schließen. Sie sind die Quelle einer unerschöpflichen Kraft, die Dir erlaubt zu siegen. Hinter dem Hindernis öffnet sich eine ganz neue Freiheit, ein viel weiterer Horizont.

(Tibetische Weisheit)



## Zusammenfassung

Die primäre, produktive Cytomegalovirus (CMV)-Infektion wird im immunkompetenten Patienten effizient durch antivirale CD8<sup>+</sup> T-Zellen kontrolliert. Das virale Genom besitzt jedoch die Fähigkeit, in einem nicht replikativen, Latenz genannten Zustand, in gewissen Zelltypen zu persistieren, ohne dass infektiöse Nachkommenviren produziert werden. Die molekularen Mechanismen, welche der Etablierung und Aufrechterhaltung der Latenz zugrundeliegen, sind noch weitestgehend unbekannt. Es gibt Hinweise darauf, dass zelluläre Verteidigungsmechanismen die Zirkularisierung und Chromatinisierung viraler Genome hervorrufen und dadurch die virale Genexpression größtenteils verhindert wird (Marks & Spector, 1984; Reeves et al., 2006).

Allerdings liegen die Genome nicht in einem komplett inaktiven Zustand vor. Vielmehr konnte für das murine CMV (mCMV) bereits die sporadische Transkription der Gene *ie1* und *ie2* während der Latenz nachgewiesen werden (Kurz et al., 1999; Grzimek et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal eine umfassende *in vivo* Latenz-Analyse zur Charakterisierung der viralen Transkription in einer Kinetik anhand der alle drei kinetischen Klassen repräsentierenden Transkripte *IE1*, *IE3*, *E1*, *m164*, *M105* und *M86* vorgenommen.

Nach Latenz-Etablierung, verifiziert durch Abwesenheit von infektiösem Virus, konnten alle getesteten Transkripte in der Lunge quantifiziert werden. Interessanterweise war die transkriptionelle Aktivität zu keinem Analyse-Zeitpunkt mit der klassischen IE-E-L-Kinetik der produktiven Infektion kompatibel. Stattdessen lag eine stochastische Transkript-Expression vor, deren Aktivität mit voranschreitender Zeit immer weiter abnahm.

Während der Latenz exprimierte Transkripte, die für antigene Peptide kodieren, können infizierte Zellen für das Immunsystem sichtbar machen, was zu einer fortwährenden Restimulation des *memory* T-Zell-pools führen würde. Durch zeitgleiche Analyse der Transkript-Expression, sowie der Frequenzen Epitop-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen während der Latenz (*IE1*, *m164*, *M105*), wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der transkriptionellen Aktivität und der Expansion des *memory* T-Zell-pools untersucht. Die weitere Charakterisierung von Subpopulationen der Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen identifizierte die SLECs (*short-lived-effector cells*; CD127<sup>low</sup> CD62L<sup>low</sup> KLRG1<sup>high</sup>) als die dominante Population in Lunge und Milz während der mCMV-Latenz.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob IE-Genexpression zur Etablierung von Latenz notwendig ist. Mit Hilfe der Rekombinanten mCMV- $\Delta$ ie2-DTR, die die Gensequenz des Diphtherietoxin-Rezeptors (DTR) anstelle des Gens *ie2* trägt, konnten infizierte, DTR exprimierende Zellen durch eine DT-Applikation konditional depletiert werden. Im latent infizierbaren Zelltyp der Leber, den LSECs (*liver sinusoidal endothelial cells*) wurde die virale *Load* durch 90-stündige DT-Applikation nach mCMV- $\Delta$ ie2-DTR Infektion auf das

Level latent infizierter LSECs reduziert. Diese Daten sprechen für die Hypothese eines von Beginn an inaktiven Genoms, das keine IE-Genexpression zur Latenz-Etablierung benötigt. Zusätzlich stellt dieser Ansatz ein neues Tier-Modell zur Latenz-Etablierung dar. Verringerte Wartezeiten bis zur vollständigen Latenz-Etablierung, im Vergleich zum bisherigen Knochenmarktransplantations-Modell, könnten anfallende Tierhaltungskosten erheblich reduzieren und das Voranschreiten der Forschung beschleunigen.

## Summary

Primary, productive cytomegalovirus (CMV) infection is efficiently controlled by antiviral CD8<sup>+</sup> T-cells in the immunocompetent host. The viral genome, however, persists in certain cell types in a silenced state, known as latency, without the production of infectious viral progeny. The molecular events involved in the establishment and maintenance of latency are a mainly unsolved issue in CMV biology. It appears however, that molecular latency results from the cell's intrinsic antiviral defense resulting in rapid circularization and chromatinization of incoming linear viral genomes as well as silencing of viral gene expression (Marks & Spector, 1984; Reeves et al., 2006).

However, the viral genomes are not silenced at all their genetic loci all at once. Limited transcriptional activity, leading to 'transcripts expressed in latency' (TEL), was already verified for the gene-loci of *ie1* and *ie2* (Kurz et al., 1999; Grzimek et al., 2001).

In this context a broad analysis of mCMV latency *in vivo* was conducted in the work presented here. This was achieved by RT-qPCR quantification of a selected set of transcripts including representatives of the three kinetic classes IE (*IE1*, *IE3*), E (*E1*, *m164*, *M105*) and L (*M86-MCP*) in a time course during latency.

Notably, after the establishment of latency defined by absence of infectious virus, at any time analyzed TEL expression was incompatible with the directional IE-E-L path of productive cycle gene expression. Latency was found to be characterized by a progressing viral gene silencing over time that follows stochastic patterns.

Transcripts coding for antigenic peptides might render latently infected cells visible for the immune system, leading to a sustained restimulation and thereby to an expansion, also known as memory inflation, of the memory T-cell-pool. Simultaneous analysis of mCMV gene expression and frequencies of epitope-specific CD8<sup>+</sup> T-cells during latency made it possible to link molecular latency to memory inflation. A further characterization of epitope-specific CD8<sup>+</sup> T-cell-subpopulations identified SLECs (short-lived-effector cells; CD127<sup>low</sup> CD62L<sup>low</sup> KLRG1<sup>high</sup>) as the dominating cell population present in lung and spleen during mCMV-latency.

An additional part of the work presented here, dealt with the question if establishment of latency is preceded by IE gene expression. Mutant virus mCMV- $\Delta$ ie2-DTR expressing the diphtheria toxin receptor (DTR) gene in place of gene *ie2*, allowed conditional depletion of infected cells that express DTR on their surface via DT application.

It was possible to reduce the latent viral load in mCMV- $\Delta$ ie2-DTR infected liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) by a 90h-treatment with DT to the level of latently infected LSECs. These data argue for the hypothesis of gene silencing from the very beginning without any need for IE-gene expression. Furthermore, this approach provides a new animal model to analyze latency, which allows shorter waiting time until latency is established and thereby permits the reduction of animal-housing costs.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	i
Summary.....	iii
Inhaltsverzeichnis .....	iv
Abkürzungsverzeichnis .....	viii
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Klassifizierung der Herpesviren.....	1
1.2 Charakterisierung der Cytomegaloviren .....	2
1.2.1 Morphologie .....	2
1.2.2 Infektionszyklus der akuten Infektion.....	3
1.2.3 Die latente Infektion.....	7
1.2.3.1 Zell- und Organtropismus in der Latenz .....	7
1.2.3.2 Die Rolle der Epigenetik bei der Etablierung von Latenz .....	8
1.2.3.3 Genexpression während der Latenz.....	10
1.2.4 Reaktivierung .....	12
1.4 Die mCMV-Infektion der Maus als Modellsystem der hCMV-Infektion.....	12
1.3 Klinische Aspekte der CMV-Infektion .....	13
1.5 Die Immunkontrolle der CMV-Infektion.....	14
1.5.1 Rolle des adaptiven Immunsystems .....	15
1.6 Antigenpräsentation während der CMV-Infektion .....	17
1.7 Differenzierung der CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	19
1.8 Diphtherietoxin: Struktur und Wirkmechanismus.....	21
1.9 Zielsetzung der Arbeit .....	22
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>24</b>
2.1 Material.....	24
2.1.1 Allgemeine Laborgeräte .....	24
2.1.2 Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien.....	25
2.1.3 Chemikalien und Lösungen.....	27
2.1.4 Zellkulturmedien und Medienzusätze .....	29
2.1.5 Kits.....	29
2.1.6 Enzyme .....	30
2.1.7 Antikörper, <i>Micro-Bead</i> -gekoppelte MACS Antikörper und Dextramere.....	30
2.1.8 Oligonukleotide .....	31
2.1.8.1 Oligonukleotide für qPCR Quantifizierungen .....	31
2.1.8.2 Oligonukleotide für ISH .....	32
2.1.9 Vektorsysteme und Plasmide .....	33
2.2 Methoden.....	33
2.2.1 Virologische Methoden.....	33
2.2.1.1 Verwendete Viren.....	33
2.2.1.2 Rekonstitution von Viren aus BAC Plasmiden .....	34
2.2.1.3 mCMV Produktion .....	35
2.2.1.4 Zentrifugale Infektion von MEF.....	36



2.2.1.5	mCMV Titerbestimmung.....	36
2.2.1.5.1	Virustiter-Bestimmung aus Zellkulturüberständen und Virusstocks.....	37
2.2.1.5.2	Virustiter-Bestimmung aus Organhomogenaten .....	37
2.2.1.6	Bestimmung der viralen Replikationsfähigkeit <i>in vitro</i> .....	38
2.2.2	Tierexperimentelle Methoden .....	38
2.2.2.1	Verwendete Versuchstiere .....	38
2.2.2.2	Immunsuppression.....	38
2.2.2.3	Intraplantare mCMV-Infektion .....	39
2.2.2.4	Intravenöse und intraperitoneale Injektion von DT.....	39
2.2.2.5	Experimentelle Knochenmarktransplantation und mCMV-Infektion .....	39
2.2.2.5.1	Isolierung von Knochenmarkzellen .....	39
2.2.2.5.2	Bestrahlung der Rezipienten, Knochenmarktransplantation und Infektion .....	40
2.2.2.6	Bestimmung der viralen Replikationsfähigkeit <i>in vivo</i> .....	40
2.2.2.7	Leberperfusion zur anschließenden NPLC Isolierung.....	40
2.2.2.8	Organentnahme und Probenkonservierung.....	41
2.2.3	Zellbiologische Methoden.....	41
2.2.3.1	Verwendete Primärzellen .....	41
2.2.3.2	Herstellung von MEF Kulturen.....	42
2.2.3.3	Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen.....	42
2.2.3.4	Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität .....	43
2.2.3.5	NPLC Isolierung via Optiprep Dichtegradient .....	43
2.2.3.6	LSEC Isolierung mittels MACS Separation.....	44
2.2.3.7	Isolierung von Lymphozyten aus Lungengewebe .....	45
2.2.3.8	Isolierung von Lymphozyten aus Milzgewebe .....	46
2.2.3.9	Stimulation von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen mit synthetischen Peptiden .....	46
2.2.3.10	DT-Behandlung infizierter MEF .....	47
2.2.4	Zytofluorometrische Methoden .....	47
2.2.4.1	Funktionsprinzipien des Durchflusszytometers.....	47
2.2.4.2	Fünffach-Färbung zur Charakterisierung von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in der Latenz .....	49
2.2.4.3	Intrazelluläre IFN- $\gamma$ Färbung.....	50
2.2.4.4	Apoptosemessung mittels Annexin V und 7-AAD- bzw. PI-Färbung.....	50
2.2.4.5	Durchflusszytometrie mit anschließender Zell-Sortierung zum Ausschluss apoptotischer Zellen .....	51
2.2.5	Molekularbiologische Methoden: DNA.....	52
2.2.5.1	Isolierung von DNA .....	52
2.2.5.1.2	DNA Isolierung aus Organen.....	52
2.2.5.1.3	DNA Isolierung aus Zellen.....	53
2.2.5.1.4	Isolierung viraler DNA .....	53
2.2.5.1.5	Präzipitation von Nukleinsäuren .....	53
2.2.5.1.6	Reinheits- und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	54
2.2.5.2	PCR .....	54
2.2.5.3	qPCR .....	55
2.2.5.4	Plasmid Standards zur absoluten Quantifizierung .....	57
2.2.5.5	Native Gelelektrophorese von DNA.....	58
2.2.5.6	Gelelution.....	59
2.2.5.7	Reinigung von DNA.....	59
2.2.5.8	Enzymatische Restriktion von Nukleinsäuren .....	59
2.2.5.9	Dephosphorylierung linearer DNA.....	60
2.2.5.10	Verwendeter Bakterienstamm .....	60
2.2.5.11	Bakterienanzucht .....	60
2.2.5.11.1	Flüssigkultur .....	61
2.2.5.11.2	Plattenkultur .....	61
2.2.5.11.3	Dauerkultur.....	61

2.2.5.12	Herstellung elektrokompeter Bakterien.....	62
2.2.5.13	Transformation elektrokompeter Bakterien.....	62
2.2.5.14	Plasmid-DNA Präparation .....	63
2.2.5.14.1	Schnellpräparation von Plasmid-DNA.....	63
2.2.5.14.2	Schnellpräparation von BAC-Plasmid-DNA .....	63
2.2.5.14.3	QIAprep Spin Minipräparation .....	64
2.2.5.14.4	QIAGEN Plasmid Maxipräparation .....	64
2.2.5.14.5	BAC-Plasmid Maxipräparation.....	65
2.2.5.15	Herstellung von DNA Sonden für die In Situ Hybridisierung .....	65
2.2.6	Molekularbiologische Methoden: RNA.....	67
2.2.6.1	Vorbehandlung von Flüssigkeiten und Geräten.....	67
2.2.6.2	Isolierung von Gesamt-RNA.....	67
2.2.6.2.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen.....	67
2.2.6.2.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Organen .....	68
2.2.6.3	Isolierung von mRNA aus Organen und aus Gesamt-RNA .....	68
2.2.6.4	RT-qPCR .....	68
2.2.6.5	Herstellung von <i>in vitro</i> Transkripten .....	70
2.2.6.6	Einstellen der <i>in vitro</i> Transkripte für die RT-qPCR .....	70
2.2.7	Histologische Methoden .....	71
2.2.7.1	Vorbehandlung der Organe und Anfertigung histologischer Schnitte.....	71
2.2.7.2	IE1-spezifische Immunhistochemie (IHC).....	72
2.2.7.3	DTR- und gB-spezifische In-situ Hybridisierung (ISH) .....	73
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>75</b>
3.1	Charakterisierung der transkriptionellen Latenz von mCMV .....	76
3.1.1	Singleplex und Duplex RT-qPCRs zum Nachweis viraler Transkripte .....	76
3.1.2	Bestimmung des Detektionslimits viraler Transkripte für die RT-qPCR.....	79
3.1.3	Identifizierung stochastisch verteilter Transkript-Expressionsmuster während der Latenz .....	81
3.1.4	Einfluss der viralen <i>Load</i> auf die Transkriptexpression.....	88
3.1.5	Berechnung der transkriptionellen Ereignisse während der Latenz .....	88
3.1.6	Einfluss der Transkript-Stabilität auf die quantifizierten Transkripte.....	94
3.1.7	Charakterisierung Epitop-spezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in der Latenz .....	98
3.1.7.1	Detektion von IE1-, m164- und M105-spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in der Latenz .....	98
3.1.7.2	Charakterisierung einzelner Subpopulationen der Epitop-spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	104
3.2	Ist eine IE-Genexpression zur Etablierung von Latenz notwendig? .....	113
3.2.1	Optimierung der repetitiven DT-Applikation <i>in vivo</i> .....	115
3.2.2	DT vermittelt nach mCMV- $\Delta$ ie2-DTR Infektion einen antiviralen Effekt <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	117
3.2.3	Nachweis von mCMV- $\Delta$ ie2-DTR infizierten Leberzellen und der DT-vermittelten Depletion dieser Zellen mittels DTR-spezifischer ISH.....	118
3.2.4	Analyse der Anzahl viraler Genome nach durchflusszytometrischer Sortierung vitaler Zellen <i>in vitro</i> .....	120
3.2.5	Analyse der Anzahl viraler Genome nach durchflusszytometrischer Sortierung vitaler Zellen <i>in vivo</i> .....	122
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>127</b>
4.1	Während der Latenz findet Transkriptexpression auf geringem Level statt.....	128
4.2	Die Transkriptexpression sinkt mit voranschreitender Zeit während der Latenz und ist stochastischer Natur .....	131

4.3	Die stochastische Natur der Transkriptexpression ist nicht durch die Stabilität der Transkripte bedingt .....	134
4.4	Die Verbindung von molekularer Latenz zur `memory inflation´ .....	137
4.5	Der <i>memory</i> -T-Zell- <i>pool</i> wird von CD8 <sup>+</sup> -SLECs dominiert .....	139
4.6	Ist IE-Genexpression zur Latenz-Etablierung notwendig? .....	141
4.6.1	Konditionale Zelldepletion mittels DTR .....	142
4.6.2	<i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Analysen zur Aufklärung der Latenz-Etablierungs-Hypothesen .....	143
4.7	Fazit und Ausblick.....	145
<b>5</b>	<b>Referenzen .....</b>	<b>148</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>174</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>175</b>
	<b>Curriculum vitae .....</b>	<b>176</b>

## Abkürzungsverzeichnis

### A

---

7-AAD.....	7-Amino-Actinomycin D
AIDS.....	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
Ak.....	Antikörper
Amp.....	Ampicillin
AP.....	Alkalische Phosphatase
APC.....	Antigenpräsentierende Zelle
APC.....	Allophycocyanin
ATP.....	Adenosintriphosphat

### B

---

b.....	Base
BAC.....	<i>bacterial artificial chromosome</i>
bp.....	Basenpaare
BSA.....	Bovines Serum Albumin
β-ME.....	β-Mercaptoethanol

### C

---

CaCl <sub>2</sub> .....	Calciumchlorid
Cam.....	Chloramphenicol
CD.....	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA.....	<i>complementary DNA</i>
CI.....	Konfidenz-Intervall
CID.....	<i>cytomegalic inclusion disease</i>
CIP.....	<i>calf intestinal phosphatase</i>
C <sub>T</sub> .....	<i>threshold cycle</i>
CMV.....	Cytomegalovirus
CO <sub>2</sub> .....	Kohlendioxid
Cs.....	Cäsium
CTL.....	Zytotoxische CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten

### D

---

Da.....	Dalton
DAB.....	Diaminobenzidin
DB.....	<i>dense body</i>
DC.....	Dendritische Zelle
DEPC.....	Diethylpyrocarbonat
DIG.....	Digoxigenin
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
dNTP.....	Desoxyribonukleotidtriphosphat

DPEC.....	<i>double-positive-effector cell</i>
dsDNA.....	Doppelstrang DNA
DT.....	Diphtherietoxin
DTR.....	Diphtherietoxin-Rezeptor
dTTP.....	Desoxythymidintriphosphat
dUTP.....	Desoxyuridintriphosphat

**E**


---

E/e.....	<i>early</i>
E.....	Amplifikationseffizienz
EC.....	Endothelzelle
ECD.....	<i>phycoerythrin-Texas Red conjugate (energy coupled dye)</i>
EDTA.....	Ethylendiamintetraessigsäure
EEC.....	<i>early effector cell</i>
EF-2.....	Elongationsfaktor-2
EGFP.....	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ER.....	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr.....	Ethidiumbromid
Ex.....	Exon

**F**


---

FACS.....	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FCS.....	<i>fetal calf serum</i>
FISH.....	Fluoreszenz In Situ Hybridisierung
FITC.....	Fluoresceinisothiocyanat
For.....	<i>forward</i>
FSC.....	<i>forward scatter</i>

**G**


---

gB.....	Glykoprotein B
GBSS.....	<i>Gey's balanced salt solution</i>
Gy.....	Gray

**H**


---

h.....	Stunde
HAT.....	Histon-Acetyltransferase
hCMV.....	humanes Cytomegalovirus
HDAC.....	Histon-Deacetylase
HEPES.....	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub> .....	Demineralisiertes Wasser
HRP.....	<i>horse radish peroxidase</i>
Hz.....	Hertz

**I**


---

i.p.....	intraperitoneal
i.pl.....	intraplantar
i.v.....	intravenös
ICH.....	Immunhistochemie
IE/ie.....	<i>immediate early</i>
Ig.....	Immunglobulin
IFN.....	Interferon
IL.....	Interleukin
ISH.....	In Situ Hybridisierung

**K**


---

KAc.....	Kaliumacetat
Kan.....	Kanamycin
kbp.....	Kilobasenpaare
KCl.....	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	Kaliumdihydrogenphosphat
KM.....	Knochenmark
KMT.....	Knochenmarktransplantation
KMZ.....	Knochenmarkzellen

**L**


---

L/I.....	<i>late</i>
LB.....	Luria-Bertani Medium
LSEC.....	<i>liver sinusoidal endothelial cells</i>

**M**


---

M.....	Molar
MACS.....	<i>magnetic cell sorting</i>
mAK.....	monoklonaler Antikörper
mCMV.....	murines Cytomegalovirus
MCS.....	<i>multiple cloning site</i>
MCP.....	<i>major capsid protein</i>
MEF.....	Murine embryofetale Fibroblasten
MEM.....	<i>Minimum Essential Medium</i>
MgCl <sub>2</sub> .....	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub> .....	Magnesiumsulfat
MHC.....	<i>major histocompatibility complex</i>
MIE.....	<i>major immediate early</i>
MIEPE.....	<i>major immediate early promoter enhancer</i>
mM.....	Millimol

MOI.....	<i>multiplicity of infection</i>
MPN.....	<i>most probable number</i>
MW.....	<i>molecular weight</i>

**N**


---

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .....	Natriumcarbonat
NaAc.....	Natriumacetat
NaCl.....	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO <sub>3</sub> .....	Natriumhydrogencarbonat
NaOH.....	Natriumhydroxid
ND-10.....	<i>neuclear-domain-10</i>
NPLC.....	<i>non parenchymal liver cell</i>
NIEP.....	<i>non-infectious enveloped particle</i>
NK.....	Natürliche Killer-Zelle

**O**


---

OD.....	Optische Dichte
ORF.....	<i>open reading frame</i>

**P**


---

p.a.....	<i>pro analysi</i>
p.I.....	post Infektion
P/S.....	Penicillin/Streptomycin
pAk.....	Polyklonaler Antikörper
PBS.....	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR.....	<i>polymerase chain reaction</i>
PC5.....	Phycoerythrin-Cyanin 5
PC7.....	Phycoerythrin-Cyanin 7
PE.....	Phycoerythrin
PEG.....	Polyethylenglykol
PFA.....	Paraformaldehyd
PFU.....	<i>plaque forming units</i>
PI.....	Propidiumiodid
POD.....	Peroxidase
profAPC.....	professionelle Antigen präsentierende Zelle
PS.....	Phosphatidylserin
PTHrP.....	<i>murine parathyroid hormone-related peptide</i>

**Q**


---

qPCR..... Quantitative *Real Time* PCR

**R**


---

Rev..... *reverse*

ROX..... X-Rhodamin

RT..... Reverse Transkriptase

RT-qPCR..... Quantitative *Real Time* RT-PCR

**S**


---

SCID..... *severe combined immunodeficiency*

SDS..... Natriumdodecylsulfat

SLEC..... *short lived effector cell*

SPF..... *specified pathogen free*

SSC..... *sideward scatter*

ssDNA..... *single stranded DNA*

ssRNA..... *single stranded RNA*

**T**


---

$T_{1/2}$ ..... Halbwertszeit

TAE..... Tris-Acetat-EDTA

TAP..... *transporter associated with antigen presentation*

*Taq*..... *Thermus aquaticus*

TBE..... Tris-Borat-EDTA

TBS..... *Tris buffered saline*

$T_{CM}$ ..... *central-memory cell*

TCR..... *T cell receptor*

*tdy*..... Synonym für *sry* (*Sex-determining region Y*)

$T_{EM}$ ..... *effector-memory cell*

TLR..... *toll-like-receptor*

TNF..... Tumor-Nekrose-Faktor

Tris..... Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

**U**


---

U..... *units*

U/min..... Umdrehungen pro Minute

üN..... über Nacht

UNG..... Uracil DNA Glykosylase



UTP..... Uridintriphosphat  
UV..... Ultraviolette Strahlung

**V**

---

V..... Volt  
VSP..... Virus Standard Puffer  
VZ..... Verdopplungszeit

**W**

---

WT..... Wildtyp

**Z**

---

ZPE..... zytopathische Effekte  
ZVTE..... Zentrale Versuchstiereinrichtung



# 1 Einleitung

## 1.1 Klassifizierung der Herpesviren

Die Cytomegaloviren (CMV) gehören zu den *Herpesviridae*, einer Familie mit sehr komplexen Mitgliedern bezüglich Partikelmorphologie (150-200nm) und Genomgröße (120-230kbp). Der Name Herpes stammt von dem altgriechischen Wort *herpein* (kriechend) und bezeichnet die kriechende Ausbreitung von Hautläsionen, hervorgerufen durch eine Herpes-*Simplex*-Virus-Infektion. Allen Vertretern dieser Familie ist ein doppelsträngiges, lineares DNA-Genom, ein ikosaedrisches Capsid, sowie das Vorhandensein einer Lipidhülle gemein (Plummer, 1967; zur Übersicht: Roizman et al., 1992). Die Produktion von Nachkommenviren mittels lytischer Infektion während der Primärinfektion und die Fähigkeit anschließend latent im Organismus zu verbleiben, ohne dass infektiöse Partikel gebildet werden, sind weitere Charakteristika der *Herpesviridae* (Roizman & Baines, 1991). Aufgrund ihrer Vermehrungseigenschaften, ihrer Pathogenität und ihres Zelltropismus erfolgt die Einteilung in drei Subfamilien (Roizman et al., 1981; allgemeine Übersicht King et al., 2011):

**Tab1.1: Klassifizierung charakteristischer Vertreter der Herpesviren**

Unterfamilie	Genus	Mensch	Tier	Referenz
<i>α-Herpesvirinae</i>	Simplexvirus	Herpes-Simplex-Virus 1 HHV-1 Herpes-Simplex-Virus 2 HHV-2	Bovines Herpesvirus 2  <i>Cercopithecine herpesvirus 1</i>	Gruter, 1924  Schneweis, 1962
	Varicellovirus	Varicella-Zoster-Virus HHV-3	Bovines Herpesvirus 1	Dumas et al., 1980
<i>β-Herpesvirinae</i>	Cytomegalovirus	Humanes Cytomegalovirus HHV-5		Smith, 1956
	Muromegalovirus		Murines Herpesvirus 1 (Murines Cytomegalovirus)	Smith, 1954
	Roseolovirus	HHV-6 HHV-7	Aotines Herpesvirus 1, 3	Lindquister & Pellett, 1991 Frenkel et al., 1990
<i>γ-Herpesvirinae</i>	Lymphocryptovirus	Epstein-Barr-Virus HHV-4	Pongines Herpesvirus 1	Epstein et al., 1965
	Rhadinovirus	HHV-8	Saimirines Herpesvirus 1	Chang et al., 1994

(verändert nach King et al., 2012; Für die humanpathogenen Viren und das murine Cytomegalovirus sind jeweils Referenzen angegeben)

Die  $\alpha$ -Herpesviren zeichnen sich durch kurze Replikationszyklen und ein breites Wirtsspektrum aus. Sie persistieren in den Nervenzellen von Ganglien (*ganglion trigeminale*, *ganglion sacrale*). Die Mitglieder der  $\beta$ -Herpesviren, zu denen auch die Cytomegaloviren gehören, breiten sich aufgrund eines langen Replikationszyklus nur langsam in Zellkultur aus und besitzen eine strikte Speziesspezifität.  $\gamma$ -Herpesviren infizieren hauptsächlich B- und T-Lymphozyten; in diesen Zellen wird auch ihre Latenz etabliert. Einige Vertreter dieser Familie werden mit der Entstehung maligner Krankheiten in Verbindung gebracht, das Epstein-Barr-Virus zum Beispiel mit Morbus Hodgkin, Nasopharynxkarziomen und Burkitt-Lymphomen.

Außerdem ist HHV-8 mit der Entstehung des Karposi-Sarkoms assoziiert. (Pellet & Roizman, 2007).

## 1.2 Charakterisierung der Cytomegaloviren

Das humane Cytomegalovirus (hCMV, HHV-5) und das murine Cytomegalovirus (mCMV) gehören zur Familie der *β-Herpesvirinae*. Isoliert wurde hCMV, früher auch Speicheldrüsenvirus genannt, erstmals in den Laboren von M.G. Smith (1956), W.P. Rowe (1956) und T.H. Weller (1957), mCMV bereits 1954 (Smith et al., 1954). Etwa vier Jahrzehnte später gelang die vollständige Sequenzierung des mCMV-Genoms (Rawlinson et al., 1996). Die Beobachtung der charakteristischen Vergrößerung infizierter Zellen (Cytomegalie), wonach diese Virusfamilie später benannt wurde, und die Bildung von Einschlusskörperchen („Eulenaugenzellen“) wurde bereits 1881 von H. Ribbert beschrieben (Übersicht: Riley, 1997).

### 1.2.1 Morphologie

Die Cytomegaloviren weisen die typische Morphologie der Herpesviren auf. Das Virion hat einen Durchmesser von 150-200nm, im Inneren befindet sich die ~230kbp große dsDNA, die mit Proteinen assoziiert ist; dies gilt sowohl für hCMV (Dolan et al., 2004), als auch für mCMV (Rawlinson et al., 1996; Smith et al., 2008; Cheng et al., 2010). Dieser DNA-Protein-Komplex (ϕ 75nm) ist von einem ikosaedrischen Capsid (ϕ 130nm) umgeben, welches aus 162 Capsomeren besteht, die sich wiederum aus 150 Hexameren und 12 Pentameren zusammensetzen (Butcher et al., 1998a; Chen et al., 1999). Dem Capsid ist das Tegument aufgelagert; letzteres ist wiederum von einer Lipidhülle zellulären Ursprungs umgeben, in die virale Glykoproteine eingelagert sind (Mocarski & Courcelle, 2001).

Das Genom von hCMV kodiert für ~165-200 *open reading frames* (ORFs) (Chee et al., 1990: 189 ORFs; Novotny et al., 2001: >200 ORFs; Dolan et al., 2004: 165 ORFs; Murphy & Shenk, 2008: 173 ORFs). Eine *deep-sequencing*-Analyse demonstrierte allerdings, dass die hCMV Transkription sehr viel komplexer ist und das hCMV Genom aufgrund von alternativem *splicing*, vermutlich eine sehr viel höhere Kodierkapazität besitzt, als angenommen (Gatherer et al., 2011). Für mCMV wurden bisher ~180 ORFs nachgewiesen (Übersicht: Redwood et al., 2013; Rawlinson et al., 1996: ~170 ORFs). Des Weiteren kodieren die CMV-Genome für miRNAs, welche zelluläre und virale Gene regulieren (Übersicht: Hancock et al., 2013). Bis jetzt konnten 21 miRNAs für mCMV (Buck et al. 2007; Dölken et al., 2007) und 42 für hCMV identifiziert werden (Dunn et al., 2005; Grey et al., 2005; Pfeffer et al., 2005; Stark et al., 2011).

Insgesamt wurden für hCMV ~35 verschiedene virale Proteine in den Virionen nachgewiesen (Baldick & Shenk, 1996; Gibson et al., 1996; Mocarski & Courcelle, 2001), für mCMV ~38 (Kattenhorn et al., 2004). Das Capsid von hCMV besteht aus fünf Proteinen: pUL86, pUL85, pUL80, pUL48.5, und pUL46, das von mCMV aus vier Proteinen: pm48.2, pM85, pM86/MCP (*major capsid protein*) und pM46. Neben Tegument-assoziierten Proteinen (20-25 für hCMV, 10 für mCMV) gibt es in der Lipidmembran verankerte virale Glykoproteine. In den Virionen von mCMV wurden folgende vier Glykoproteine nachgewiesen: gB (M55), gO (M74), gH (M75) und gM (M100). In der Hülle von hCMV existieren vier zusätzliche Glykoproteine: gL (UL115), gN (UL73), gp48 (UL4) und UL33. Zusätzlich zu den viralen Proteinen wurden auch zelluläre Proteine in den Virionen entdeckt. Allerdings ist noch nicht geklärt, ob es sich wirklich um Bestandteile der Virionen oder um Verunreinigungen handelt (Übersicht: Caposio et al., 2013).

hCMV-infizierte Zellen generieren drei verschiedene virale Partikelformen. Neben den oben beschriebenen Virionen können *in vitro* zusätzlich *non-infectious enveloped particles* (NIEPs) oder *dense bodies* (DBs) gebildet werden. NIEPs setzen sich aus den gleichen Komponenten wie infektiöse Virionen zusammen, mit Ausnahme der fehlenden DNA (Mokarski & Courcelle, 2001). DBs sind ebenfalls behüllte, zur Zellfusion befähigte DNA-freie Partikel, die vorwiegend aus dem Tegumentprotein pp65 bestehen (Sarov & Abady, 1975; Irmiere & Gibson, 1983). Diese Partikel werden allerdings nur von hCMV produziert, mCMV ist im Gegensatz dazu, zur Bildung von Multi-Capsid-Virionen befähigt (Chong & Mims, 1981; Weiland et al., 1986).

### 1.2.2 Infektionszyklus der akuten Infektion

CMV besitzt einen breiten Wirtszell-Tropismus, unter anderem sind Epithelzellen, Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten, Hepatozyten und neuronale Zellen permissiv für eine CMV-Infektion (Myerson et al., 1984; Ibanez et al., 1991; Sinzger et al., 2000). Des Weiteren zeigen sie eine hohe Spezies-Spezifität; zwar können die Viren in Spezies-fremde Wirtszellen eindringen, im Fall von hCMV und mCMV kommt es sogar zur Expression von *IE1* und *IE2* bzw. *IE1* und *IE3* (Lafemina & Hayward, 1988), jedoch können keine infektiösen Nachkommenviren produziert werden. Die Arbeitsgruppe von W. Brune zeigte, dass mCMV nach Infektion humaner Zellen Apoptose auslöst und somit die Virusreplikation unterbindet (Jurak & Brune, 2006). Auch scheint die Genregion M112/M113, welche für das Protein E1 kodiert, wichtig für die Speziespezifität von mCMV zu sein. Mutationen in dieser Region befähigen mCMV dazu, in humanen Zellen zu replizieren (Schumacher et al., 2010).

### Anlagerung an und Eintritt in die Wirtszelle

Umhüllte Viren können mittels Endozytose oder Fusion mit der Plasmamembran in ihre Wirtszelle eindringen. Die Glykoproteine der hCMV-Lipidhülle, die mit dem Eintritt (*entry*) in die Wirtszelle in Verbindung gebracht werden, sind in vier Gruppen unterteilt: 1. ein gB-Homodimer-Komplex (Britt, 1984; Britt & Auger, 1986), welcher für das *entry* und die Zell-zu-Zell Verbreitung benötigt wird (Isaacson & Compton, 2009); 2. ein gM/gN Heterodimer (Mach et al., 2000), welches vermutlich eine Rolle bei der Anlagerung an die Wirtszelle spielt (Compton, 2004); 3. ein gH/gL/gO Heterotrimer-Komplex (Huber & Compton, 1997, 1998; Li et al., 1997), und 4. ein gH/gL/pUL128/130/131A-Komplex (Ryckman et al., 2008). Die Frage, ob die verschiedenen gH-gL-Komplexe durch Binden unterschiedlicher Rezeptoren jeweils andere Eintrittswege in die Wirtszelle fördern, und ob diese Eintrittswege zwischen verschiedenen Zelltypen variieren ist Inhalt aktueller Forschung. Es konnte gezeigt werden, dass Viren, welche den gH/gL/pUL128/130/131A-Komplex besitzen, Endothelzellen (ECs), Epithelzellen und Leukozyten infizieren können, wohingegen Viren, die lediglich den gH/gL/gO-Komplex auf ihrer Oberfläche tragen, einen diese Zellen ausschließenden, beschränkteren Zelltropismus aufweisen (Übersicht Adler & Sinzger, 2013). Außerdem wird vermutet, dass sich die Viren, abhängig vom Zelltyp der Propagierung, in ihrem Zelltropismus unterscheiden (Roberts et al., 1989; Wang et al., 2008). Untersuchungen mit gO-Deletionsmutanten zeigten sowohl für mCMV (Scrivano et al., 2010), als auch für hCMV (Jiang et al., 2008), dass es zur Akkumulation nackter Capside im Zytoplasma und einer reduzierten Anzahl reifer Virionen in Zellüberständen kommt. Die Zell-zu-Zell-Verbreitung wurde durch das Fehlen von gO allerdings nicht beeinträchtigt. Dies lässt vermuten, dass gO eine Rolle bei der Umhüllung (*envelopment*) der Capside spielt. Die exakte Rolle der einzelnen Glykoproteine ist allerdings noch unklar.

Die CMV-Infektion einer Zelle beginnt mit der Anlagerung des Virions an Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) auf der Zelloberfläche (Compton et al., 1993), wobei diese Bindung sowohl durch gB als auch gM-vermittelt sein kann (Kari & Gehrz, 1992, 1993; Carlson et al., 1997; Compton, 2004). Welcher zelluläre Rezeptor für den Eintritt des Virions in die Wirtszelle verantwortlich ist, wird noch diskutiert. Unter anderem kamen  $\beta_2$ -Mikroglobulin (McKeating et al., 1986), Annexin-II (Wright et al., 1994), CD13 (Söderberg et al., 1993a, b) und EGFR (*epidermal growth factor receptor*) (Wang et al., 2003) in den Fokus der Wissenschaft, allerdings existieren widersprüchliche Publikationen in Bezug auf die genannten Rezeptoren. Zuletzt wurde PDGFR- $\alpha$  (*platelet-derived growth factor receptor- $\alpha$* ) als potentieller *entry*-Rezeptor beschrieben (Soroceanu et al., 2008). Als essentielle Ko-Rezeptoren dienen Integrine, dabei handelt es sich um ubiquitär exprimierte Oberflächen-Rezeptoren, welche nach ihrer Aktivierung den Start verschiedener Signalwege induzieren (Wang et al., 2005b; Übersicht: Fortunato et al., 2000). Nach dem Eintritt in die Wirtszelle

liegen Capsid und Tegument im Zytoplasma vor und es kommt zum Mikrotubuli-vermittelten Transport des Capsids zum Zellkern (Ogawa-Goto et al., 2003).

### Replikation

Bereits kurze Zeit nach Infektion kann das CMV-Genom zirkulär als Episom im Nukleus der Wirtszelle nachgewiesen werden (hCMV: Stinski, 1991; Garber et al., 1993; Roizman, 1996; mCMV: Marks & Spector, 1984). Die Replikation des viralen Genoms beginnt ~16h (mCMV) bzw. 24-36h (hCMV) nach Infektion, erfolgt nach dem *rolling circle* Prinzip und resultiert in miteinander verbundenden, neusynthetisierten Genomen, sogenannten Konkatemeren. Diese werden vor der Verpackung in die Capside in einzelne Genome gespalten (hCMV: Ben-Porat, 1983; McVoy & Adler, 1994; mCMV: Marks & Spector, 1988). Für hCMV wird dieser Prozess durch drei Enzyme katalysiert: den beiden Terminase Untereinheiten pUL56 und pUL89. Erstere erkennt die spezifischen DNA-Bindestellen *pac1* und *pac2* des viralen Genoms (Hwang & Bogner, 2002) und sorgt zusammen mit dem dritten Enzym pUL104, das die Konkatemere in einzelne Genome schneidet (Scheffczik et al., 2002), für die Translokation des Genoms in das Capsid (Dittmer et al., 2005).

### Genexpression

In einer strikt regulierten Kaskade geordnet, verläuft die virale Genexpression in drei aufeinanderfolgenden Phasen. Dabei kommt es zur zellulären Polymerase-II-vermittelten Transkription der den einzelnen Phasen zugeordneten *immediate-early-* (IE), *early-* (E) und *late* (L)-Gene (Honest & Roizman, 1974; Emery & Griffiths, 1990; Mocarski et al., 2006). Direkt nach Eintritt der viralen DNA in den Zellkern startet die IE-Phase, unabhängig von einer *de novo* Synthese viraler Proteine. Die IE-Gene *ie1*, *ie2*, *ie3* von mCMV und *ie1* und *ie2* (entspricht dem *ie3* des mCMV) von hCMV stehen unter Regulation des *major-immediate-early-promoters* (MIEP) und *MIEP-enhancers* (MIEPE). 2h (mCMV) bzw. 4h (hCMV) nach Infektion wird durch die regulatorische Funktion der Proteine IE3 bei mCMV und IE2 bei hCMV die E-Phase eingeleitet (Bühler et al., 1990; Keil et al., 1984). Einige der korrespondierenden E-Genprodukte sorgen für die Initiation der viralen Replikation (Roizman & Batterson, 1986). Abschließend kommt es während der L-Phase hauptsächlich zur Synthese von Strukturproteinen, die für den Zusammenbau (*assembly*) neuer Viruspartikel benötigt werden (Übersicht: Thomas et al., 2013). Dabei stellen Genprodukte der E-Phase, sowohl für hCMV als auch für mCMV, essentielle Transaktivatoren der L-Phase dar (Isomura et al., 2011; Perng et al., 2011).

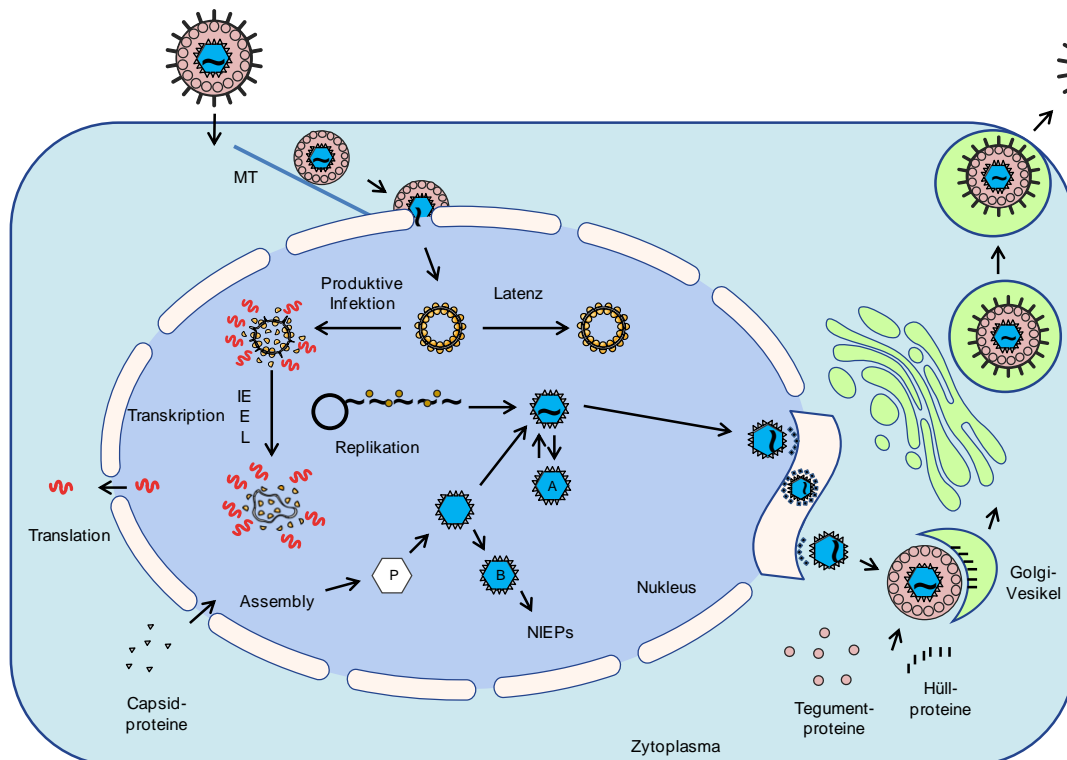
Das Genom von CMV ist sehr komplex und es wird angenommen, dass seine Kodierungskapazität, hervorgerufen durch multiples Transkript-*splicing*, sehr viel größer ist als bisher bekannt (Gatherer et al., 2011; Übersicht: Redwood et al., 2013).

Epigenetische Prozesse spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der viralen Transkription. In den Virionen liegt die virale DNA Histon-frei vor, doch bereits 30min nach

Infektion kommt es im Wirts-Zellkern zur replikationsunabhängigen Bildung von Heterochromatin mit hoher Nukleosomendichte (Nitzsche et al., 2008). Die virale DNA kann kurz nach Infektion in der Nähe von ND10-Strukturen (*nuclear-domain-10*), Orten epigenetischer Regulation, nachgewiesen werden (Maul, 1998; Torok et al., 2009). Eine Komponente der ND10-Strukturen, das Protein hDaxx, sorgt für die Rekrutierung von Histon-Deacetylasen (HDACs), die wiederum zur Bildung von transkriptionell inaktivem Heterochromatin beitragen (Woodhall et al., 2006; Groves et al., 2009). Die Cytomegaloviren haben entsprechend antagonistische Mechanismen entwickelt, um während der produktiven Infektion Genom-Modifikationen zu initiieren, die ein weniger dicht gepacktes, transkriptionell aktives Euchromatin begünstigen (Tavalai & Stamminger, 2011).

### Zusammenbau und Reifung der Virionen

Die Capside der Herpesviren werden im Nukleus zusammengebaut, wobei sich die leeren Procapside zu DNA-haltigen, reifen Capsiden entwickeln. Während dieses Prozesses kommt es zur Bildung von „Nebenprodukten“, den B-Capsiden, welchen der Terminase-Komplex zur Inkorporation der DNA fehlt und aus denen sich die im letzten Kapitel erwähnten NIEPs entwickeln. Außerdem werden A-Capside, bei denen der DNA-Aufnahmeprozess fehlgeschlagen ist, gebildet (Lee et al., 1988) (siehe Abb. 1.1).



### **1.1: Schematische Darstellung des CMV Infektionszyklus**

Nach dem Eintritt in die Wirtszelle, wird das unbehüllte Virus entlang der Mikrotubuli zum Zellkern transportiert und die virale DNA in den Zellkern entlassen. Dort zirkularisiert sie unverzüglich und wird mit Histonproteinen assoziiert. Im Falle der Latenz-Etablierung verweilt die DNA inaktiv im Kern. Während der produktiven Infektion liegt transkriptionell aktives Chromatin vor, der lytische Infektionszyklus kann starten und letztlich werden infektiöse Nachkommen aus der Wirtszelle freigesetzt (siehe Text). (verändert nach Gibson & Bogner, 2013)



Ihre Hülle erhalten die Capside in einem Zwei-Schritt-Prozess. Zunächst erfolgt ein *primary envelopment*, bei dem die Nukleocapside durch die innere Kernmembran in den perinukleären Raum transportiert werden. Nach Fusion der primären Virusmembran mit der äußeren Kernmembran gelangen die wieder „nackten“ Capside anschließend ins Zytoplasma. Im zweiten Schritt (*secondary envelopment*) erhalten die Capside, durch Knospung am Trans-Golgi-Netzwerk, an Golgi-Vesikeln oder an frühen Endosomen, im sogenannten *assembly-compartment* (Sanchez et al., 2000 a, b) eine doppelte Hüllmembran (Das et al., 2007; Das & Pellett, 2011). Während des gesamten Prozesses der Morphogenese werden die Capside vermutlich sequentiell mit Tegument Proteinen und Glykoproteinen assoziiert (Eickmann et al., 2006). Die Fusion mit der Plasmamembran der Zelle führt letztlich zur Freisetzung reifer Virionen mit einfacher Hüllmembran (Übersicht: Gibson & Bogner, 2013). Abbildung 1.1 fasst den gesamten Vorgang vom Eintritt in die Wirtszelle bis zur Produktion reifer Nachkommenviren zusammen. In Zellkultur dauert der komplette Infektionszyklus von mCMV ~24h und der von hCMV ~72h.

### 1.2.3 Die latente Infektion

Nach Kontrolle der Primärinfektion überdauern Genome der Herpesviren in einem nicht-replikativen, Latenz genannten Zustand im Wirt. Die Definition nach Roizman & Sears (1987) besagt, dass die Genome durch externe Stimuli jederzeit reaktivierbar sein müssen und somit infektiöses Virus gebildet werden kann. In Milz und Niere (Pollock & Virgin, 1995), sowie in der Lunge (Kurz et al., 1997) wurden die ersten Nachweise von molekularer Latenz erbracht; darunter versteht man das Vorhandensein von Genexpression, ohne dass infektiöses Virus produziert wird. Die Mechanismen, welche der Etablierung und Aufrechterhaltung der Latenz zugrundeliegen, sind allerdings noch nicht aufgeklärt und stehen im Fokus gegenwärtiger Forschung.

#### 1.2.3.1 Zell- und Organtropismus in der Latenz

Nahezu alle Organe des Wirtes sind Orte der hCMV-Latenz, so konnte virale DNA beispielsweise in Lunge, Leber, Niere, Herz und Pankreas detektiert werden (Koffron et al., 1997). Prominente Orte der zellulären Latenz stellen Zellen der myeloiden Linie dar (Taylor-Wiedeman et al., 1991; Minton et al., 1994; Mendelson et al., 1996; Larsson et al., 1998). Pluripotente CD34<sup>+</sup> Progenitorzellen im Knochenmark (KM) sind die Vorläufer aller Blutzellen (Metcalf, 1989). Sie differenzieren zu pluripotenten myeloiden Progenitorzellen und über Monoblasten weiter zu Pro-Monozyten. Nachdem sie vom KM in den Blutkreislauf übergegangen sind, reifen sie zu Monozyten aus (Katz et al., 1985). Die myeloiden Progenitorzellen sind latent infizierbar, mit ihrer terminalen Differenzierung zu Makrophagen

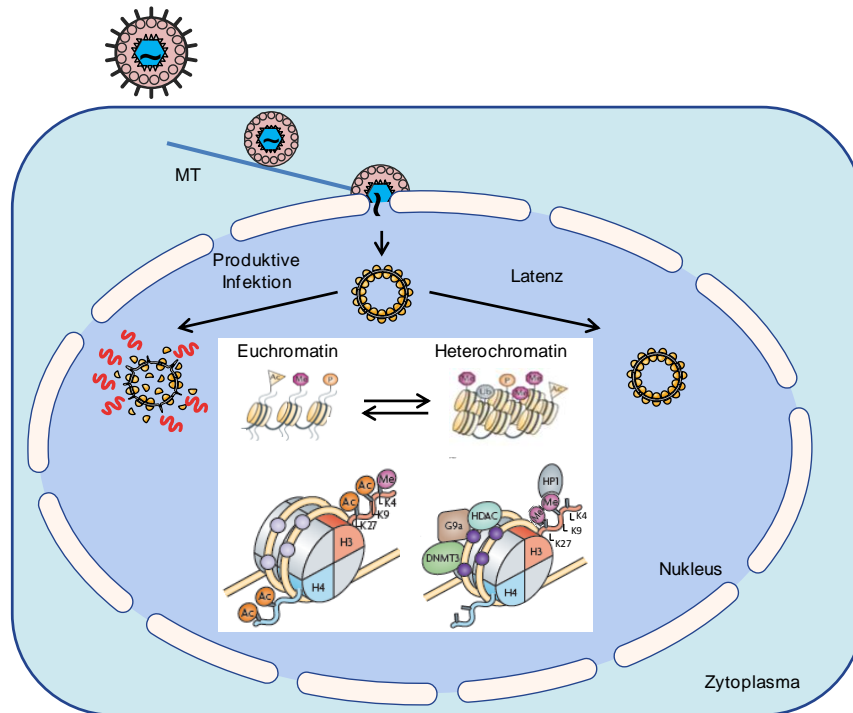
und myeloiden dendritischen Zellen (mDCs) einhergehend, kann es zur CMV-Reaktivierung kommen (Sinclair & Sissons, 2006; Slobedman et al., 2010). Slobedman & Mocarski (1999) zeigten, dass die Frequenz latent infizierter MPBCs (*mobilized peripheral blood cells*) sehr gering ist und virale Genome in einer Kopienzahl vom 2-13 pro Zelle vorliegen. Auch in latent infizierten Makrophagen wurden nur 1-10 virale Genome pro Zelle detektiert (Pollock et al., 1997). Interessanterweise erwiesen sich nicht alle Zellen der myeloiden Linie als Orte der CMV-Latenz; in B- und T-Zellen, sowie in polymorphkernigen Leukozyten konnte keine virale DNA nachgewiesen werden (Taylor-Wiedeman et al., 1991; 1993). Da sich aus den pluripotenten CD34<sup>+</sup> Progenitorzellen im KM auch ECs entwickeln können (Quirici et al., 1991), rückten diese als putative Latenzorte in den Fokus der Wissenschaft (Mercer et al., 1988; Fish et al., 1995; Jarvis & Nelson, 2002). Latent infizierte ECs könnten mit ihrer niedrigen Proliferationsrate (Ortega et al., 1999) und ihrem ubiquitärem Vorkommen, die generalisierte Verbreitung des latent vorliegenden CMV Genoms und die lebenslange Dauer der Latenz erklären.

Der Zell- und Organtropismus von mCMV ist dem von hCMV sehr ähnlich. Zum Beispiel erwiesen sich Makrophagen und Knochenmarkzellen (KMZ) als Latenzorte von mCMV (Brautigam et al., 1979; Pollock et al., 1997; Koffron et al., 1998). Da allerdings eine kontinuierliche Reduktion der viralen DNA-Load in Blut und KM nachgewiesen wurde, sollte eher von einer temporären hämatopoetischen Latenz gesprochen werden (Übersicht: Reddehase et al., 2002). Permanente Latenz kann in parenchymalen, stromalen und sinusoidalen Zellen ausgebildet werden (Mercer et al., 1988; Koffron et al., 1998; Pomeroy et al., 1991). Unsere Arbeitsgruppe konnte die sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSECs-*liver sinusoidal endothelial cells*) als Latenzort des mCMV, mit einer Kopienzahl von ~10 Genomen pro infizierter Zelle, identifizieren (Seckert et al., 2009); ähnliche Ergebnisse wurden auch für die ECs der Lunge erbracht (Seckert, nicht publiziert).

### 1.2.3.2 Die Rolle der Epigenetik bei der Etablierung von Latenz

Anders als für andere Herpesviren wurden im Falle von CMV bisher noch keine speziellen, ausschließlich in der Latenz vorkommenden Transkripte gefunden, die für die Etablierung bzw. Aufrechterhaltung des latenten Status notwendig wären. Für EBV sind dies beispielsweise die Transkripte LMP-1/-2 und EBER-1/-2 (Übersicht: Robertson, 2010), HSV-1 exprimiert das Latenz-assoziierte Transkript (LAT), welches während der Latenz die Bildung von transkriptionell inaktivem Heterochromatin fördert und zwar speziell an den Orten des Genoms, die Promotoren lytischer Gene beinhalten (Wang et al., 2005a). Dass virale DNA mit zellulären Histonen assoziiert sein kann, wurde bereits 1975 für Adenoviren (Oudet et al.) und SV-40 (Cremisi et al.) beobachtet, auch hCMV bildet keine Ausnahme (Übersicht: Reeves & Sinclair, 2013). Die strukturelle Untereinheit des Chromatins, das

Nukleosom, besteht aus einem ~200bp DNA Fragment, das um ein Histon-Oktamer gewickelt ist. Letzteres setzt sich wiederum aus zwei H2A-H2B Dimeren und einem H3-H4 Tetramer zusammen. Die aminoterminalen Enden der Histone können einer Vielfalt von Modifikationen unterzogen werden, welche durch Veränderungen der Chromatinstruktur direkten Einfluss auf die Transkriptionsaktivität haben (Übersicht: Bartova et al., 2008).



**Abb. 1.2: Modell der Chromatinbildung während produktiver CMV-Infektion und Latenz**

Während der produktiven Infektion liegt das virale Genom als transkriptionell aktives Euchromatin vor, assoziiert mit Acetylierungen der Lysine H3K9, H3K14, H4K5, H4K8, H4K12, H4K16 und Methylierung der Lysine H3K4. Wird Latenz eingeleitet fungieren HDACs, HP-1 und andere Proteine als Repressoren und propagieren die Bildung transkriptionell inaktiven Heterochromatins, welches mit der Methylierung der Lysine H3K9 und H3K27 in Verbindung gebracht wird. (verändert nach Sparmann & Lohuizen, 2006 und Cedar & Begman, 2009)

Das weniger dicht gepackte Euchromatin ermöglicht den Zugang zur DNA und erlaubt damit die Initiation der Transkription. Es wird mit der Acetylierung der H3-Lysine an Position 9 und 14, der H4-Lysine an Position 5, 8, 12 und 16, sowie der Methylierung der H3-Lysine an Position 4 assoziiert (Kuo & Allis, 1998; Mizzen & Allis, 1998; Lusser, 2002). Im Gegensatz dazu liegt das enger gewundene Heterochromatin transkriptionell inaktiv vor und wird mit der Methylierung der H3-Lysine an Position 9 und 27 in Verbindung gebracht (Khorasanizadeh, 2004). Die Acetylierung der Histone erfolgt durch Proteine der Histon-Acetyltransferase-Familie (HATs) (Eberharter & Becker, 2002), wohingegen die Deacetylierung durch Histon-Deacetylase (HDACs) katalysiert wird (Khochbin et al., 2001). Neben HDACs fungieren auch Daxx, Heterochromatin-Protein-1 (HP-1), Polycomb-Proteine und weitere Faktoren als Repressoren aktiven Chromatins. Die Genregion des MIEP von mCMV besitzt viele potentielle Bindestellen für Aktivatoren bzw. Repressoren der Transkription (Liu et al., 2010).

Untersuchungen des MIEP in Nieren akut infizierter Mäuse konnten zeigen, dass dieser Promoter Histon-Modifikationen aufweist, die mit transkriptionell aktivem Euchromatin assoziiert sind. In der Latenz konnten Modifikationen, die typisch für inaktives Heterochromatin sind, zusammen mit den Repressor-Proteinen HDAC, Daxx und HP-1 an der viralen DNA identifiziert werden (Liu et al. 2008; 2010) (siehe Abb. 1.2). Ähnliche Studien wurden auch für hCMV in CD34<sup>+</sup> Progenitorzellen und CD14<sup>+</sup> Monozyten durchgeführt. Hier war das latente Genom in der Region des MIEP mit methylierten Histonen und HP-1 assoziiert (Reeves et al., 2005). Die Differenzierung dieser Zellen zu DCs resultierte interessanterweise in der Acetylierung der Histone und damit einhergehend in der Entstehung aktiven Euchromatins.

Weitet man die Beobachtungen auf verschiedene Zeitpunkte und Promotoren aus, so lässt sich zeigen, dass die IE-Promotoren zu frühen Zeitpunkten Histon-Modifikationen besitzen, die charakteristisch für transkriptionell aktives Chromatin sind. Die L-Promotoren hingegen zeigen Modifikationen typisch für inaktives Chromatin. Mit fortschreitender Infektion wechseln diese Verhältnisse und ermöglichen jetzt die Transkription der L-Gene. Gleichzeitig kommt es am MIEP bereits zu Chromatin-Veränderungen, die auch in der Latenz nachgewiesen wurden (Reeves et al., 2006; Cuevas-Bennett & Shenk, 2008; Groves et al., 2009).

Neben der Epigenetik stehen weitere Faktoren unter dem Verdacht, an der Latenz-Etablierung beteiligt zu sein. Beispielsweise wird diskutiert, dass die Latenz in CD34<sup>+</sup> Progenitorzellen dadurch ausgelöst wird, dass das vom Tegument stammende Protein pp71, im Gegensatz zu neu synthetisiertem pp71, nicht in den Nukleus transportiert werden kann und daher auch nicht in der Lage ist ND10-Strukturen aufzulösen (Saffert et al., 2010). Des Weiteren wird eine Rolle des Zellzyklus und der Cyklin-abhängigen Kinasen bei der Latenz-Etablierung vermutet (Zydek et al., 2010). Auch latent exprimierte miRNAs, die durch Inaktivierung Histon-modifizierender Enzyme an der epigenetischen Regulation beteiligt sein können, stellen einen interessanten Ansatzpunkt aktueller Forschung dar (Lewis et al., 2005; Weber et al., 2007).

### 1.2.3.3 Genexpression während der Latenz

Obwohl das virale Genom während der Latenz, als transkriptionell inaktives Heterochromatin vorliegt, so scheinen doch Phasen zu existieren, in denen limitierte Genexpression stattfindet und sich das Chromatin zur Transkriptionsinitiation an bestimmten Stellen „öffnet“. Für hCMV wurden in latent infizierbaren Granulozyten-Makrophagen-Progenitorzellen einige *sense* und *antisense* Transkripte der MIE-Region nachgewiesen (Kondo et al., 1994a; 1996), allerdings sind sie für die Latenz-Etablierung nicht essentiell (White et al., 2000) und konnten auch während der lytischen Infektion detektiert werden (Lunetta & Wiedeman, 2000). Der ORF

LUNA, der antiparallel zur UL81-82 Region liegt (Bego et al., 2005), sowie die Genregion US28 (Beisser et al., 2001) kodieren für weitere Transkripte, die in der Latenz exprimiert werden.

Ein Beispiel dafür, dass das *splicing* zwischen lytischer und latenter Infektion differiert, ist die Genregion UL111.5A, welche für zwei Varianten des cmvIL-10, den viralen Homologen von Interleukin 10 (IL-10), kodiert (Kotenko et al., 2000; Jenkins et al., 2004). Den ersten Hinweis auf die immunmodulatorische Fähigkeit eines in der Latenz exprimierten Transkripts lieferten Cheung et al. (2009). Diese Autoren konnten zeigen, dass das cmvIL-10 während der Latenz die Präsentation von MHC-II (*major histocompatibility complex-II*) Molekülen auf infizierten Zellen unterdrückt. Die Genexpression der Region UL138 scheint sogar an der Etablierung von Latenz beteiligt zu sein. So konnten Versuche mit einer UL138-Deletionsmutanten die Induktion einer produktiven Infektion in CD34<sup>+</sup> Progenitorzellen zeigen. Im Gegensatz dazu führte die intakte UL138-Region zur Latenz-Etablierung (Goodrum et al., 2007). Allerdings existieren auch eine Reihe von Publikationen, welche gegenteilig postulieren, dass UL138 nicht essentiell für die Latenz-Etablierung sei (Auswahl: Kondo et al., 1994a; Hahn et al., 1998; White et al., 2000; Cheung et al., 2006). Interessanterweise konnten *in vitro* Studien der hCMV Transkription während der Latenz herausarbeiten, dass die Genexpression hier nicht dem koordinierten IE-E-L-Muster der produktiven Infektion entspricht (Goodrum et al., 2002; 2004; Cheung et al., 2006).

Für mCMV ist sehr viel weniger über die Transkriptionsaktivität während der Latenz bekannt. Als Hauptort der Genexpression während der Latenz gilt die MIE-Region, hier konnten das *splice*-Produkt des *IE1/3* Vorläufer-Transkriptes *IE1* (Exon 1-2-3-4), sowie das Transkript *IE2* detektiert werden (Kurz et al., 1999; Kurz & Reddehase, 1999; Grzimek et al., 2001). Die Deletion des IE1 Proteins bewirkt zwar eine Attenuierung des Virus *in vivo* (Ghazal et al., 2005; Wilhelmi et al., 2008), jedoch ist IE1 nicht für die Etablierung oder Aufrechterhaltung der Latenz nötig (Busche et al., 2009). Das Protein IE2 spielt weder bei der Replikation noch bei der Etablierung von Latenz eine Rolle (Cardin et al., 1995), seine genaue Funktion konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden. IE3 hingegen ist ein essentieller Transaktivator der E-Phase Transkription (Messerle et al., 1992; Angulo et al., 2000). Das *IE3* Transkript, bestehend aus Exon 1-2-3-5 des *IE1/3* Vorläufer-Transkriptes, konnte bisher nicht in der Latenz detektiert werden. Daher scheinen Kontrollpunkte in der Latenz zu existieren, welche das Fortschreiten des Genexpressionsprogrammes durch bisher unbekannte Mechanismen verhindern (Kurz et al., 1999).

#### 1.2.4 Reaktivierung

Die Reaktivierung aus der Latenz, welche in einer produktiven Infektion resultiert, stellt für immunsupprimierte Patienten, beispielsweise nach Stammzell- oder Organtransplantation und für Patienten mit angeborener (*severe combined immunodeficiency*; SCID) oder erworbener (*acquired immunodeficiency syndrome*; AIDS) Immundefizienz, ein hohes Gesundheitsrisiko dar und bedarf daher dringend der Aufklärung. Allerdings sind bis heute nur Hypothesen zum Verständnis der Reaktivierung bekannt. Wie bereits beschrieben spielen Histon-Modifikationen eine große Rolle bei der Definition des Aktivierungszustandes des viralen Genoms. So konnte gezeigt werden, dass nicht-permissive Zellen *in vitro* nach Behandlung mit Trichostatin A, einem HDAC Inhibitor, permissiv für die virale IE-Genexpression wurden (Meier, 2001; Murphy et al., 2002). Die beiden Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B, das durch TNF- $\alpha$  (Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ ) aktiviert werden kann, sowie CREB besitzen einige Bindestellen im MIE-Lokus und werden mit der Reaktivierung von CMV durch entzündliche Prozesse in Verbindung gebracht. Sowohl Versuche mit mCMV als auch klinische Studien mit hCMV konnten die Beteiligung von TNF- $\alpha$  an Reaktivierungsereignissen bestätigen (Docke et al., 1994; Prösch et al., 2002). Im murinen Modell zeigte sich eine Dosis-abhängige Reaktivierung der MIE-Genexpression nach TNF- $\alpha$  Behandlung (Hummel et al., 2001; Simon et al., 2005, 2007). Cook et al. (2006) zeigten in einem mCMV-Sepsis-Modell ebenfalls den Einfluss von TNF- $\alpha$  und IL- $\beta$  auf die Reaktivierung. Auch die LPS-vermittelte Aktivierung von TLR-4 (*toll-like-receptor-4*) führte zur Reaktivierung aus der Latenz.

#### 1.4 Die mCMV-Infektion der Maus als Modellsystem der hCMV-Infektion

*In vivo* Studien von hCMV sind aus offensichtlichen, ethischen Gründen ausgeschlossen; demzufolge kann die CMV-Infektion nur in Tiermodellen untersucht werden. Aufgrund der bereits erwähnten Parallelen von mCMV und hCMV bezüglich Struktur, Genetik und Entwicklung analoger Anpassungsstrategien an den jeweiligen Wirt stellt die Maus ein prädestiniertes Tiermodell dar (Rawlinson et al., 1996; Reddehase, 2002; Holtappels et al., 2006). In unserer Gruppe wird das murine Modell der CMV-Infektion nach syngener Knochenmarktransplantation (KMT) verwendet (Reddehase et al., 1985; Mutter et al., 1988; Übersicht: Reddehase et al., 2002). Obwohl dieses Modell nicht 1:1 die klinische Situation einer hCMV Infektion widerspiegelt, konnten doch grundlegende Erkenntnisse mit Hilfe des Mausmodells gewonnen werden; beispielsweise die Entdeckung der dominanten Rolle des MIE-Lokus bezüglich der Immunantwort (Reddehase & Koszinowski, 1984; Reddehase et al., 1984; 1989), oder die Entwicklung der präventiven Immuntherapie durch adoptiven

Transfer CMV-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Reddehase et al., 1985; Reddehase, 2002; Holtappels et al., 2008).

Auch erwies sich das murine Modell als hilfreich bei der Analyse der viralen Immunevasions-Mechanismen (Übersicht: Reddehase, 2002) und der Entdeckung der *memory Inflation* (Holtappels et al., 2000), sowie deren Verbindung zur Latenz (Seckert et al., 2012). Allgemein konnten wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der viralen Latenz gewonnen werden (Übersicht: Seckert et al., 2013). Das murine Modell konnte auch zur Beschreibung von Effektor-Zell-Populationen beitragen, welche die immunologische Kontrolle der Infektion vermitteln (Übersicht: Holtappels et al., 2006; Simon et al., 2006a).

### 1.3 Klinische Aspekte der CMV-Infektion

Die Seropositivität variiert stark, je nach geographischem und sozioökonomischem Hintergrund. So sind Kinder im Vorschulalter in Südamerika, Ostasien und Indien zu >90% CMV positiv, während gleichaltrige Kinder in Industriestaaten wie Großbritannien und den USA eine Seroprävalenz von lediglich <20% aufweisen (Britt, 2010). Mit fortschreitendem Alter ist ein Anstieg der Durchseuchungsrate nachzuweisen. Die Seroprävalenz der Gesamtbevölkerung in den USA beispielsweise beträgt ~50% (Bate et al., 2010).

Die horizontale Übertragung des Virus erfolgt durch direkten Kontakt mit Körperflüssigkeiten, wie Speichel, Urin, Tränenflüssigkeit, Muttermilch oder Genitalsekrete. Eine weitere Quelle der CMV-Infektion stellt die Transmission mittels Bluttransfusion oder Organtransplantation dar (Mocarski et al., 2007). Eine vertikale Übertragung kann transplazentar oder während der Geburt von der Mutter auf das Kind erfolgen. Außerdem kann es über die Muttermilch zu einer Transmission auf das Neugeborene kommen (Übersicht: Boppana & Britt, 2013; Cannon et al., 2013).

Sowohl Primärinfektionen als auch Reaktivierungsphasen verlaufen in immunkompetenten Personen meist inapparent. Zuweilen entwickelt sich während der Primärinfektion eine Mononukleose mit Symptomen wie Fieber, Müdigkeit, Übelkeit, Kopfschmerzen und Lymphozytose. In immunsupprimierten Patienten hingegen manifestieren sich klinisch relevante Verlaufsformen bis zu einer generalisierten, Gewebe-invasiven CMV-Infektion, die auch zum Tode führen kann. Zu dieser Patientengruppe zählen Personen mit angeborener (SCID) oder erworbener (AIDS) Immundefizienz, Empfänger von allogenen Stammzell- oder Organtransplantaten, sowie Personen, die sich einer Chemotherapie unterziehen müssen, und kongenital infizierte Föten/Embryonen.

Bei hCMV handelt es sich um einen opportunistischen Krankheitserreger immundefizienter AIDS Patienten, die Pathogenität bleibt selbst nach hoch aktiver anti-retroviraler Therapie (HAART) bestehen (Huppmann & Orenstein, 2010). Die hCMV-Erkrankung manifestiert sich hier häufig in einer Chorioretinitis. Auch in der Patientengruppe der immunsupprimierten

Transplantat-Empfängern führen CMV-Infektionen zu schwerwiegenden Komplikationen, mit dem Risiko der Transplantatabstoßung (Rubin, 1990; Kidd et al., 2000). Wichtige Risikofaktoren, die den Krankheitsverlauf beeinflussen, sind der hCMV-Serostatus, der Schweregrad der Immunsuppression und der Histokompatibilitätsstatus von Donor und Rezipient. Bei seropositiven Rezipienten besteht die Gefahr einer Reaktivierung oder Reinfektion mit dem CMV-Stamm des Donors, das höchste Risiko jedoch birgt die Konstellation positiver Spender-negativer Empfänger. In diesem Fall ist der Rezipient, der keine Immunität gegen CMV besitzt, einer Transplantat-vermittelten Primärinfektion ausgesetzt (Humar & Snyderman, 2009). In der frühen Phase nach der Transplantation manifestiert sich die akute Infektion häufig in Ösophagitis, Gastritis, Enteritis, Kolitis, Hepatitis und Pneumonie. Die Abstoßung des Transplantats erfolgt meist erst nach Jahren durch einen chronischen Prozess, der mit fortlaufender Funktionsminderung des transplantierten Organs einhergeht (Tolkoff-Rubin et al., 2001; Potena & Valantine, 2007; Erdbruegger et al., 2011).

Während der Schwangerschaft kann durch eine primäre oder rekurrende CMV-Infektion der Mutter eine kongenitale Infektion erfolgen. Das Krankheitsbild, das durch die kongenitale hCMV-Infektion hervorgerufen wird, ist unter der Bezeichnung *cytomegalic inclusion disease* (CID) zusammengefasst und zeigt, aufgrund der Manifestation im zentralen Nervensystem und in fast allen Organen, vielfältige Symptome: zentrale Hörstörungen bis zu komplettem Hörverlust, Schädigungen des Sehnervs (Optikusatrophy), Mikrozephalie, mentale Retardation, Hepatitis, Hepatosplenomegalie, Pneumonie und Petechien. Die Übertragungswahrscheinlichkeit bei Primärinfektion beträgt 30-40% (Kenneson & Cannon, 2007). Dabei zeigen ~10% der infizierten Neugeborenen schon bei der Geburt Symptome, ~5% davon entwickeln eine typische CID, bei den anderen 5% kommt es zu einem mildereren Verlauf. Die Sterblichkeitsrate der Neugeborenen mit einer symptomatischen kongenitalen Infektion beträgt ~5-10% (Boppana et al., 1992; Übersicht: Boppana & Britt, 2013; Cannon et al., 2013).

## 1.5 Die Immunkontrolle der CMV-Infektion

Sowohl Komponenten des angeborenen (*innate immunity*) als auch des erworbenen (*adaptive immunity*) Immunsystems tragen zur Kontrolle der primären CMV-Infektion bei. Während der frühen Phase der Infektion wird die Immunkontrolle vom angeborenen Immunsystem, hauptsächlich durch natürliche Killer (NK)-Zellen, übernommen (Bukowski et al., 1984; Salazar-Mather et al., 1998; Daniels et al., 2001; Arase et al., 2002). Für eine längerfristige Kontrolle der Infektion ist hingegen die Funktion der erworbenen Immunität unerlässlich (Welsh et al., 1991). CD8<sup>+</sup> T-Zellen spielen die zentrale Rolle hinsichtlich der Termination der produktiven Infektion in den Organen und vermitteln eine dauerhafte



Kontrolle der CMV-Infektion (Übersicht: Reddehase, 2002; Holtappels et al., 2013). In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass der Transfer antiviraler CD8<sup>+</sup> T-Zell-Linien eine auftretende CMV-Erkrankung nach Transplantation kontrollieren kann (Riddell et al., 1992).

Eine Sonderrolle nimmt die Immunkontrolle in der Speicheldrüse ein, da die Infektion in diesem Organ primär durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen kontrolliert wird (Jonjic et al., 1989). Zusätzlich vermitteln CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Aufrechterhaltung der hCMV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort (Fuji et al., 2011) und werden für eine effiziente humorale Immunantwort benötigt (Mach et al., 2013). Antivirale Antikörper sind zwar nicht essentiell für die Kontrolle der primären CMV-Infektion, können allerdings nach Rekurrenz die Dissemination limitieren und gegen sekundäre Infektionen schützen (Jonjic et al., 1994).

### 1.5.1 Rolle des adaptiven Immunsystems

Eine Hauptkomponente des adaptiven Immunsystems bilden die T-Zellen, welche in CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen (T<sub>H</sub>), CD8<sup>+</sup> cytotoxische T-Zellen (CTLs), regulatorische T-Zellen (T<sub>Reg</sub>), NKT-Zellen und  $\gamma\delta$  T-Zellen unterteilt werden. Der T-Zell-Rezeptor (TCR) der letzteren Gruppe ist im Gegensatz zu den TCRs der übrigen Gruppen nicht aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glykoproteinkette zusammengesetzt, sondern aus einer  $\gamma$ - und  $\delta$ -Kette. Neben den T-Zellen gehören die B-Zellen, welche hauptsächlich Antikörper produzieren, zur adaptiven Immunabwehr. Da CD8<sup>+</sup> T-Zellen den größten Beitrag zur Immunkontrolle der CMV-Infektion liefern, wird im Folgenden nur auf diese eingegangen. Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden, durch adoptiven Transfer in immunsupprimierte mCMV-infizierte Mäuse, als die antiviral wirkende Komponente innerhalb der T-Zellen identifiziert (Reddehase et al., 1985). Versuche mit cytotoxischen T-Zell-Linien (CTLL) (Holtappels et al., 2006; Holtappels et al., 2008) und *ex vivo* isolierten Peptid-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Böhm et al., 2008b; Pahl-Seibert et al., 2005) bestätigten dies. Auch im syngenem und allogenen Modell der KMT konnte gezeigt werden, dass rekonstituierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen die akute mCMV-Infektion terminieren und die Inzidenz der Erkrankung verringern (Alterio de Goss et al., 1998; Holtappels et al., 1998; Podlech et al., 1998; Podlech et al., 2000). Klinische Studien konnten vergleichbares für die hCMV-Infektion in KMT-Patienten belegen (Reusser et al., 1991); auch hier reduziert der adoptive Transfer von CD8<sup>+</sup> T-Zellen die Schwere einer CMV-Erkrankung (Riddell et al., 1992; Walter et al., 1995; Cobbold et al., 2005).

T-Zellen werden im Knochenmark erzeugt und wandern von dort in den Thymus aus. Ausgereifte naive T-Zellen verlassen den Thymus, wandern in periphere lymphatische Organe und werden in den Lymphknoten durch professionelle antigenpräsentierende Zellen (profAPCs) Antigen-spezifisch aktiviert (Übersicht: Randolph et al., 2005). Die Aktivierung

der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wird von drei Signalen gesteuert, (1) dem Signal des TCR nach Interaktion mit dem Peptid-beladenen MHC-Komplex, (2) kostimulatorischen Signalen z.B. durch CD28, CD40, 4-1BB, CD27, ICOS, OX40, (3) Signalen von inflammatorischen Cytokinen (besonders IL-12 und IFN- $\gamma$ ) (Mescher et al., 2006; Harty & Badovinac, 2008). Nach ihrer Aktivierung wandern die Effektor-CD8<sup>+</sup> T-Zellen über die efferenten Lymphgefäße zu den peripheren Infektionsorten aus. Dort können sie infizierte Zellen durch die Sezernierung von Perforin und Granzym B abtöten und durch Cytokinproduktion andere Effektor-Zellen rekrutieren.

Während der akuten Phase der Infektion durchlaufen die CD8<sup>+</sup> T-Zellen vier Stadien: die Aktivierung, gefolgt von Expansion, Kontraktion und *memory*-Phase. Nach der Aktivierung erfolgt eine rasche Expansion der Zellen sowie die Effektor-Zell-Differenzierung, mit Verdopplungsraten von bis zu 50.000x (Blattman et al., 2002; Murali-Krishna et al., 1998; Butz & Bevan 1998; Busch et al., 1998). In der Kontraktionsphase sterben 90-95% der Zellen durch Apoptose und nur eine langlebige *memory*-Zell-Population überlebt (Kaech et al., 2002). Im Gegensatz zu Infektionen mit Viren, die vom Immunsystem eliminiert werden, steigen die Frequenzen CMV-spezifischer *memory*-T-Zellen mit der Zeit an. Dieses Phänomen wird '*memory inflation*' genannt und reflektiert vermutlich einen wiederholten *boost* der T-Zell-Antwort aufgrund der transkriptionellen Aktivität des latent vorliegenden Genoms (Holtappels et al., 2000; Karrer et al., 2003; Munks et al., 2006).

**Tab1.2: mCMV-spezifische Peptide des Haplotyps H-2<sup>d</sup>**

ORF	Peptidsequenz	MHC-I	Dominanz in der akuten Infektion	<i>Memory inflation</i>
m04	YGPSLYRRF(F)	D <sup>d</sup>	Subdominant	Nein
m18	SGPSRGRIL	D <sup>d</sup>	Subdominant/Intermediär	Nein
M45	VGPALGRGL	D <sup>d</sup>	Subdominant	Nein
M83	YPSKEPFNF	L <sup>d</sup>	Subdominant	Nein
M84	AYAGLFTPL	K <sup>d</sup>	Subdominant	Nein
M105	TYWPVSDI	K <sup>d</sup>	Dominant	Variabel
m123	YPHFMPNL	L <sup>d</sup>	Dominant	Ja
m145	CYYASRTKL	K <sup>d</sup>	Dominant	Variabel
m164	AGPPRYSRI	D <sup>d</sup>	Dominant	Ja

(verändert nach Holtappels et al., 2013)

Bis jetzt sind 9 mCMV-spezifische Peptide für den Haplotyp H-2<sup>d</sup> (BALB/c) bekannt. In Tabelle 1.2 ist eine Übersicht der mCMV-spezifischen Peptide des Haplotyps H-2<sup>d</sup> dargestellt. Je nach T-Zell-Frequenz werden die Peptide als dominant, intermediär oder subdominant eingestuft. Lediglich die beiden Peptide m123 und m164 dominieren sowohl die akute Phase (~ an Tag 8 *p.i.*) als auch die späte Expansion (Start ~ an Tag 15 *p.i.*) (Holtappels et al., 2002; Seckert et al., 2011). Es ist wichtig darauf hinzuweisen, dass die

Immundominanz nicht mit einem erhöhten protektiven Potential der Peptid-spezifischen T-Zellen korreliert (Holtappels et al., 2004; zur Übersicht: Holtappels et al., 2013). Interessanterweise entwickeln keimfrei gehaltene Mäuse keine *memory inflation* während der CMV-Latenz (Tanaka et al., 2007). Die Autoren vermuten eine Kreuz-Reaktivität, welche den Virus-Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen die gleichzeitige Erkennung von bakteriellen Epitopen ermöglicht.

Auch die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort der hCMV-Infektion ist auf eine bestimmte Anzahl von Epitopen begrenzt (Sylwester et al., 2005). In älteren Personen kann die *memory*-T-Zell-Frequenz sehr hoch werden und für ein einzelnes mCMV-Epitop sogar ~5%-20% aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut betragen (Khan et al., 2002). Im Hinblick auf die Tatsache, dass sich der Thymus mit voranschreitendem Alter zurückbildet und die Neubildung von naiven T-Zellen damit eingeschränkt ist, wird kontrovers diskutiert, ob die oligoklonalen, CMV-spezifischen *memory*-T-Zellen ihre Funktion verlieren können und eine CMV-Infektion zur Immunseneszenz beiträgt (Akbar & Fletcher, 2005; Koch et al., 2006; Moss, 2010) oder nicht (Podlech et al., 2000; Dunne et al., 2002; Wallace et al., 2004; 2011).

## 1.6 Antigenpräsentation während der CMV-Infektion

CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkennen 12-26 Aminosäuren lange Peptide, die an die  $\alpha 1\beta 1$  Binde-Domäne der beiden schweren Ketten ( $\alpha$  und  $\beta$ ) von MHC-II Molekülen gebunden sind. pMHC-II werden hauptsächlich von profAPCs, z.B. DCs präsentiert. CD8<sup>+</sup> T-Zellen hingegen erkennen Peptide einer Länge von 8-10 Aminosäuren. Diese werden von MHC-I Molekülen präsentiert, deren Peptid-Binde-Domäne ( $\alpha 1\alpha 2$  Domäne) lediglich aus der schweren  $\alpha$ -Kette besteht. Komplettiert wird der MHC-I-Komplex, der auf nahezu allen Zellen exprimiert ist, durch die  $\beta_2$ -Mikroglobulin Untereinheit (Übersicht: Rammensee et al., 1993; Rudolph et al., 2006).

Es sind zwei Arten der MHC-I Antigenpräsentation bekannt, die direkte Präsentation und die *cross*-Präsentation. Erstere beschreibt die Präsentation von Peptiden, die aus intrazellulär synthetisierten und prozessierten Proteinen entstehen; hierzu sind die meisten Zellen befähigt. Endozytotisch aktive Zellen, v.a. profAPCs, haben zusätzlich die Möglichkeit, Peptide aus der extrazellulären Umgebung aufzunehmen und über MHC-I Moleküle zu präsentieren; ein Prozess der *cross*-Präsentation genannt wird (Bevan et al., 1976; Staerz et al., 1987; Übersicht: Norbury & Sigal, 2003). Der direkte Präsentationsweg beginnt mit der Degradierung intrazellulärer Proteine durch proteasomale Prozessierung, entweder im konstitutiven Proteasom, das in allen Zelltypen exprimiert ist, oder im Immunoproteasom, das in profAPCs vorliegt und nach IFN-Stimulation auch in nicht-profAPCs gebildet wird (Kloetzel, 2001; Strehl et al., 2005). Die resultierenden antigenen Peptide werden über den

TAP-Transporter (*transporter associated with antigen presentation*) ins ER (*endoplasmatic reticulum*) transferiert, wo sie mit MHC-I Molekülen komplexieren und als pMHC-I Komplex über den Golgi-Apparat durch vesikulären Transport an die Zelloberfläche gelangen (Übersicht: Yewdell, 2001).

Für die *cross*-Präsentation können extrazelluläre Proteine mittels Endozytose aufgenommen und ins Zytoplasma entlassen werden. Die intrazellulären Mechanismen der *cross*-Präsentation sind allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt. Es werden TAP-Transporter abhängige Wege, der direkten Präsentation gleichend, postuliert oder TAP-unabhängige Wege über einen Rücktransport der prozessierten Peptide in Endosomen, die MHC-I Moleküle enthalten (Kleijmeer et al., 2001; MacAry et al., 2001; Basha et al., 2008). Ein weiteres Modell geht von einer ER-Phagosomen-Fusion aus, mit anschließender Translokation der Proteine ins Zytoplasma und der prozessierten Peptide über einen TAP-abhängigen Weg zurück in das Fusionskompartiment (Guermontprez et al., 2003). Nach gegenwärtiger Vorstellung wird das *priming*, also die Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach CMV-Infektion, hauptsächlich durch *cross*-Präsentation eingeleitet (Gold et al., 2002; Böhm et al., 2008a; Snyder et al., 2010; Torti et al., 2011b, Busche et al., 2013). Allerdings existieren kontroverse Meinungen und die Rolle von *cross*- und direkter Präsentation im Bezug auf das *priming* steht im Fokus der gegenwärtigen Forschung.

Die Expansion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen während der *memory*-Phase (*memory inflation*) scheint hingegen auf direkter Antigenpräsentation zu beruhen (Torti et al., 2011a, Seckert et al., 2011, 2013). Seckert et al. (2011) belegten in einem Modell der exklusiven IE1-Epitop-Präsentation durch profAPCs, das Ausbleiben einer *memory inflation*, die demzufolge von der direkten Antigen-Präsentation der Gewebezellen des Rezipienten abhängig ist. Dies eröffnet die Frage, ob die geringfügige transkriptionelle Aktivität während der Viruslatenz zur Peptidpräsentation und damit zur Restimulation der *memory*-Zellen führt. Simon et al., (2006b) zeigten, dass nach Infektion mit einer mCMV-IE1-Peptid-Mutante eine deutlich erhöhte *IE1*-spezifische Transkriptmenge während der Latenz nachweisbar war. Die Effektor-Funktion der IE1-Peptid-spezifischen T-Zellen kontrolliert somit die Transkription während der Latenz, bzw. eliminiert transkriptionell aktive Zellen. Einen direkten Hinweis auf ein in der Latenz produziertes Protein lieferten Versuche mit einem transgenen Diphtherietoxin-Rezeptor, der anstelle des mCMV IE2 Proteins exprimiert wurde. Nach Diphtherietoxin-Applikation in der Latenz konnte eine deutlich reduzierte Anzahl viraler Genome detektiert und damit einhergehend erstmals die erfolgreiche Translation eines während der Latenz exprimierten Transkripts direkt bewiesen werden (Scheller, 2011).

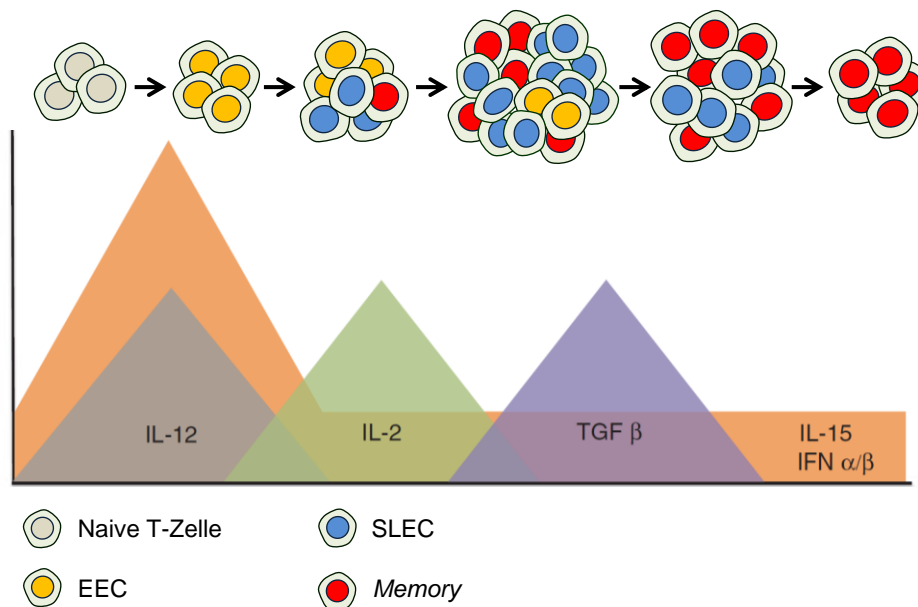
## 1.7 Differenzierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort besteht aus einem heterogenen Zell-*pool*, dessen Aktivierung, Expansion und Differenzierung von verschiedenen Faktoren abhängt. Wie bereits erwähnt, entwickeln sich aus naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Aktivierung Effektor-Zellen und nach überstandener Infektion verbleiben *memory*-Zellen, die bereits während der primären Phase der Infektion gebildet werden (Übersicht: Weninger et al., 2002). Diese *memory*-Zellen wurden ursprünglich in *central-memory T cells* (T<sub>CM</sub>) und *effector-memory T cells* (T<sub>EM</sub>) differenziert (Hamann et al., 1997; Sallusto et al., 1999). T<sub>CM</sub> lokalisieren hauptsächlich in den Lymphknoten, können aufgrund inflammatorischer Signale aber auch in periphere Organe einwandern (Übersicht: Weninger et al., 2002). T<sub>EM</sub> patrouillieren vorrangig in peripherem Gewebe und können nach erneuter Antigenexposition rasch die direkte Zell-Lyse durch Granzym- und Perforin-Expression einleiten (Reinhard et al., 2001; Masopoust et al., 2001). Die Aktivierung der T-Zell-Effektor-Funktionen erfolgt bereits innerhalb von wenigen Stunden, allerdings vergehen mindestens drei Tage bis das Einleiten der Proliferation nachweisbar wird (Whitmire et al., 2008).

In neueren Publikationen werden die CD8<sup>+</sup> T-Zellen anhand der Oberflächenmarker KLRG1, CD62L und CD127 (IL-7R $\alpha$ ) in die Subpopulationen *early-effector cells*-EECs (CD127<sup>low</sup> CD62L<sup>low</sup> KLRG1<sup>low</sup>), *short-lived-effector cells*-SLECs (CD127<sup>low</sup> CD62L<sup>low</sup> KLRG1<sup>high</sup>), *double-positive-effector cells*-DPECs (CD127<sup>high</sup> CD62L<sup>low</sup> KLRG1<sup>high</sup>), T<sub>EM</sub> (CD127<sup>high</sup> CD62L<sup>low</sup> KLRG1<sup>low</sup>) und T<sub>CM</sub> (CD127<sup>high</sup> CD62L<sup>high</sup> KLRG1<sup>low</sup>) unterteilt (Obar & Lefrancois, 2010a; Obar et al., 2011). KLRG1 (*killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1*) ist ein Transmembranprotein mit einem ITIM-Motiv (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*), welches mit E-Cadherin interagiert und die Proliferation und die Cyclinproduktion der Zellen, sowie die Phosphorylierung von Akt, einer am Überleben von Zellen beteiligten Kinase, hemmt (Henson et al., 2009). Desweiteren inhibiert KLRG1 die IL-2 Produktion, so dass durch die Regulation des Rezeptors das Ausmaß und die Dauer der Effektor-Phase beeinflusst wird (Banh et al., 2009). CD62L fungiert als *homing*-Rezeptor, er wird von T<sub>CM</sub> exprimiert und ermöglicht diesen den Eintritt in sekundäre lymphatische Organe (Übersicht: Tedder et al., 1995). CD127 oder IL-7R $\alpha$  ist eine Untereinheit des Interleukin-7 Rezeptors und wird auf T<sub>EM</sub> und T<sub>CM</sub> exprimiert (Kondo et al., 1994b). Das Vorhandensein von CD127 korreliert mit der erhöhten Expression von anti-apoptotischen Molekülen, wie z.B. bcl-2 (Schluns et al., 2000; Kaeche et al., 2003).

Es existieren verschiedene Hypothesen zur Entwicklung der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Populationen: das Modell der asymmetrischen Teilung postuliert die Entwicklung zweier T-Zell-Linien, die langlebige *memory*-Linie und eine kurzlebige Effektor-Linie (Chang et al., 2007). Stemberger et al. (2007) konnten jedoch zeigen, dass eine einzelne naive CD8<sup>+</sup> T-Zelle das Potential birgt, sich sowohl zu Effektor- als auch *memory*-Populationen zu entwickeln; eine spätere

Arbeit bestätigte diese Resultate (Gerlach et al., 2010). Im Modell der linearen Differenzierung von Obar & Lefrancois (2010b) resultiert die Aktivierung naiver T-Zellen in der Ausbildung einer EEC-Population, welche anschließend zu SLECs,  $T_{EM}$  und  $T_{CM}$  ausdifferenziert (siehe Abb. 1.3). Sie vermuten, dass es sich bei den EECs um eine genetisch gesehen durchaus heterogene Population handelt.



### 1.3: Modell der linearen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Differenzierung

Die Aktivierung naiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Anwesenheit hoher IL-12, IL-15 und IFN-α/β Level, führt zur Entwicklung von EECs, aus denen sich entweder *memory*-Populationen oder terminal differenzierte SLECs formieren. IL-2 sorgt dabei nicht nur für die Differenzierung, sondern auch für die Expansion der Population. Mit dem *peak* der Expansionsphase kommt es zur vermehrten Sekretion von TGF-β, das die Apoptose von EECs und SLECs induziert, so dass hauptsächlich *memory*-Zellen verbleiben. (Verändert nach Lefrancois & Obar, 2010)

Bei der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Differenzierung spielt das Cytokin-Milieu ebenfalls eine wichtige Rolle. IL-12 und IFN-α/β fungieren als Wachstumsfaktoren von Effektor-CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Xiao et al., 2009) und unterstützen die Differenzierung zu SLECs (Joshi et al., 2007; Cui et al., 2009). Auch längerfristiger IL-2-Kontakt führt zur Ausbildung einer SLEC-Population. Die SLECs sind terminal differenziert und in ihrer Lebensdauer limitiert (Joshi et al., 2007; Kalia et al., 2010). Sowohl IL-12 als auch IL-2 wirken über die Regulation von Transkriptionsfaktoren wie z.B. T-bet, Eomes, Blimp1, Bcl6 und bewirken die Expansion der Effektor-Zell-Population (Takemoto et al., 2006; Joshi et al., 2007; Pipkin et al., 2010). Zusätzlich reguliert IFN-γ die Proliferation und das Überleben von CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Es begünstigt die IL-12 Produktion und damit die SLEC-Differenzierung (Whitmire et al., 2005; Cui et al., 2009). Das Überleben der SLECs scheint von dem Cytokin IL-15 abhängig zu sein, welches auch die Aufrechterhaltung und Proliferation der *memory*-Populationen unterstützt (Rubinstein et al., 2008). Interessanterweise begünstigt auch eine inflammatorische Umgebung die Entwicklung von

SLECs, während in einer gegensätzlichen Umgebung bevorzugt *memory*-Populationen entstehen (Pham et al., 2009).

Da die CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der latent infizierten Lunge hauptsächlich aus SLECs bestehen, würde dies auch die Expansion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der *memory*-Phase nach CMV-Infektion erklären. Durch die transkriptionelle Aktivität während der Latenz wird vermutlich eine inflammatorische Umgebung hervorgerufen, welche die Differenzierung zu SLECs begünstigt (Seckert et al., 2013).

Die Erkenntnisse zur CD8<sup>+</sup> T-Zell-Differenzierung stehen noch am Anfang. Zusammenfassend ist bekannt, dass die Zusammensetzung des *memory*-T-Zell-pools von der Dauer der Antigen-Exposition, der Antigen-Menge, inflammatorischen Signalen, der Anzahl der Zellen während der Expansions-Phase, der Vorgänger-Frequenz an CD8<sup>+</sup> T-Zellen und der nach Primär-Infektion vergangenen Zeit abhängt.

## 1.8 Diphtherietoxin: Struktur und Wirkmechanismus

Das Diphtherietoxin (DT) eignet sich hervorragend zur Entwicklung von hoch-sensitiven Modellen der konditionalen Zell-Depletion. In diesen Modellen wurden transgene Mäuse generiert, die den Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR) unter Kontrolle von Gewebe-spezifischen Promotoren exprimieren (Saito et al., 2001; Buch et al., 2005; Demircik et al., 2013) oder das aktive DT Fragment direkt in den Zielzellen exprimieren (Brockschnieder et al., 2004; Gheryani et al., 2013).

DT wird als sekretorisches Exotoxin von *Corynebacterium diphtheriae* produziert und besteht aus zwei Komponenten, dem DT-A Fragment und dem DT-B Fragment, welche über eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden sind (Greenfield et al., 1983; Tsuneoka et al., 1993). Die Aufklärung der Kristallstruktur des DT identifizierte drei Domänen: die katalytisch aktive C-Domäne, die dem DT-A entspricht, eine Transmembran(T)-Domäne und die Rezeptorbinde(R)-Domäne, die zusammen das DT-B Fragment bilden (Choe et al., 1992). Für das Toxin sensitive Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche den DTR, welcher in der Lage ist, das DT über dessen R-Domäne zu binden (Uchida et al., 1973; Shen et al., 1994). Der DTR entspricht dem Wachstumsfaktor *precursor form of heparin-binding EGF-like growth factor* (proHB-EGF), der Membran-gebunden als Rezeptor fungiert und nach proteolytischer Spaltung zum löslichen HB-EGF reift (Naglich et al., 1992; Iwamoto et al., 1994).

Die Rezeptor-vermittelte Erkennung des DT, erfolgt von DT-Seite über die in der R-Domäne lokalisierten Aminosäuren (AS) Lys-516 und Phe-530, desweiteren scheinen Tyr-514, Val-523, Asn-524, und Lys-526 entscheidende Modulatoren der Cytotoxizität des DT zu repräsentieren (Shen et al., 1994). Auf der Seite des DTR identifizierten Mitamura et al. (1997) die AS Phe-115, Leu-127 und Glu-141 als essentiell für die DT-Bindung. Im Anschluss an die Bindung des Toxins wird der Rezeptor-Toxin-Komplex durch Rezeptor-

vermittelte Endozytose internalisiert (Morris et al., 1985; Moya et al., 1985). Im Endosom sorgt der niedrige pH für eine Konformationsänderung, wobei das DT über seine T-Domäne in die Endosomen-Membran integriert und das enzymatisch aktive DT-A Fragment ins Zytosol übertritt (Sandvig & Olsnes, 1980; Draper & Simon, 1980). Die eigentliche Toxizität wird vom DT-A vermittelt, indem es durch ADP-Ribosylierung den Elongations-Faktor 2 (EF-2) inhibiert und dadurch die zelluläre Proteinsynthese von Eukaryonten verhindert, was letztlich zum apoptotischen Tod der Zelle führt (Übersicht: Pappenheimer et al., 1977).

Aufgrund unterschiedlicher DTR-Varianten weisen Nagetiere, wie Mäuse und Hamster, eine 100.000fach erhöhte Resistenz gegenüber DT im Vergleich zum Menschen auf (Mekada et al., 1982; Pappenheimer et al., 1982). Diese Tatsache macht Mäuse zu optimalen Modellorganismen für die DT induzierte Depletion spezifischer Zellen. Optimal ist auch die hohe Sensitivität des DT; so reicht bereits ein Molekül des DT-A aus, um eine Zelle erfolgreich zu töten (Yamaizumi et al., 1978). Hinzu kommt die hohe Stabilität des DT-A Fragments. Yamaizumi et al. (1982) zeigten, dass nach 24h noch mehr als 80% des Proteins intakt im Zytoplasma vorliegen, während das DT-B Fragment lediglich eine Halbwertszeit von 2,5-5h aufweist. Allerdings sollte bedacht werden, dass Versuche von Falnes et al. (2000) Hinweise auf eine konzentrationsabhängige Wirkgeschwindigkeit des DT lieferten.

## 1.9 Zielsetzung der Arbeit

Die Mechanismen, die der Etablierung und Aufrechterhaltung der CMV-Latenz zugrundeliegen, sind noch weitestgehend unverstanden. Da Reaktivierungsereignisse in immunsupprimierten Personen häufig zu lebensbedrohlichen Erkrankungen führen, sind die Untersuchung der Etablierung und Aufrechterhaltung von Latenz sowie die Analyse der Reaktivierung von besonderer Wichtigkeit. Im murinen Modell konnte bereits gezeigt werden, dass virale Genome während der Latenz gleichmäßig in der Lunge verteilt sind und die Transkripte *IE1* und *IE2* sporadisch exprimiert werden (Kurz et al., 1999; Kurz & Reddehase, 1999; Grzimek et al., 2001). Diese transkriptionelle Aktivität wird von IE1-Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkannt und reguliert (Simon et al., 2006b), was auf eine Verbindung der molekularen Latenz mit der Expansion der *memory*-T-Zell-Population schließen lässt. Trotz einer nahe am Detektionslimit liegenden Transkriptionsrate während der Latenz war es möglich, ein in der Latenz produziertes Protein nachzuweisen. So führte ein unter Kontrolle des MIEPE exprimiertes *dtr*-Gen zur Expression des DTR auf der Zelloberfläche und die anschließende DT-Applikation zu einer deutlichen Reduktion latenter viraler Genome in der Lunge (Scheller, 2011). Für hCMV wurde bereits eine *in vitro* Studie zur Expressionsanalyse verschiedener Transkripte während der Latenz-Etablierungs-Phase in infizierten CD34<sup>+</sup> Progenitorzellen durchgeführt (Cheung et al., 2006).



Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst die *in vivo* Charakterisierung der viralen Transkription während der mCMV-Latenz. Dies sollte mittels umfangreicher Transkriptionsanalysen zu verschiedenen Zeitpunkten während der Latenz in der Lunge erfolgen. Als Latenz-Modell wurde die mCMV-Infektion nach syngener, experimenteller Knochenmarktransplantation in BALB/cJ Mäusen gewählt. In einer Zeitkinetik erfolgte 4, 6 und 8 Monate *p.i.* die Quantifizierung der Transkripte mittels RT-qPCR. Zur Charakterisierung wurden Vertreter aller drei kinetischen Klassen IE (*IE1*, *IE3*), E (*E1*, *m164*, *M105*) und L (*M86*) gewählt. Außerdem sollte der Einfluss der Transkript-Stabilität auf die Anzahl detektierbarer Transkripte untersucht werden. Während der Kinetik erfolgte zeitgleich die Charakterisierung der immundominanten Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen (*IE1*, *m164* und *M105*), um eine mögliche Verbindung der molekularen Latenz zur immunologischen Kontrolle der Latenz zu erkennen. Eine umfangreiche Charakterisierung einzelner Subpopulationen der Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, sollte Erkenntnisse über die Vorgänge der *memory inflation*-Entstehung liefern.

Außerdem wurden in dieser Arbeit die Mechanismen der Latenz-Etablierung untersucht. Da das mCMV-Genom bereits kurz nach Infektion als zirkuläres Episom im Nukleus der Wirtszelle vorliegt (Marks & Spector, 1984) und mit Histonen assoziiert ist, erfolgt die Latenz-Etablierung vermutlich schon zu sehr frühen Zeitpunkten. Arbeiten mit einer  $\Delta M94$ -mCMV-Mutanten, welche nach Infektion einer Zelle diese nicht mehr verlassen kann, zeigten, dass bereits die erste Infektionsrunde zur Latenz-Etablierung ausreicht und ein Jahr nach Infektion die Anzahl der absolut detektierten, latenten viralen Genome mit den nach WT-mCMV-Infektion quantifizierten Genomzahlen vergleichbar ist (Mohr et al., 2010). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte nun die Frage geklärt werden, ob eine IE-Genexpression der Etablierung von Latenz vorausgeht. Dies wurde mit Hilfe des Modells der konditionalen Zell-Depletion, in welchem latent infizierte Zellen einen DTR exprimieren, analysiert. Hierfür wurde das genetisch veränderte Virus mCMV- $\Delta ie2$ -DTR, welches das *dtr*-Gen unter Kontrolle des *ie2*-Promotors trägt, verwendet. Im Fall eines *silencing* des Genoms vor Beginn der IE-Genexpression käme es nicht zur DTR Expression und nach DT-Applikation auch nicht zur Depletion der latent infizierten Zellen, während eine der Latenz-Etablierung vorangehende IE-Genexpression zur Auslöschung latent infizierter Zellen führen würde.

Die Aufklärung der Hypothesen erfolgte mittels *in vitro* und *in vivo* Studien, um den Einfluss der DT-Applikation auf die Zahl viraler Genome zu bestimmen. Aus *in vitro* infizierten MEF bzw. isolierten LSECs der *in vivo* Studien wurden die vitalen Zellen im FACS selektioniert und die Anzahl der viralen Genome mittels qPCR bestimmt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Allgemeine Laborgeräte

Tab. 2.1: Allgemeine Laborgeräte

Gerät	Typ/Hersteller
Brutschrank (Bakterien)	B6, B12 (Heraeus, Hanau)
Brutschrank (Zellen)	Hera Cell 240 (Heraeus, Hanau)
Durchflusszytometer	Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, Krefeld) FACSria III (BD Bioscience, Heidelberg)
Elektroporator	Gene Pulser™ (BioRad, München)
Flüssigstickstofftank	(Messer, Griesheim)
Gel-Dokumentationsanlage	Digit Store (INTAS, Göttingen)
Heizplatte/Magnetrührer	IKA Combimag RET (Janke & Kunkel, Staufen)
Heizplatte	(MEDAX GmbH & Co.KG, Neumünster)
MACS Multi Stand	(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
Midi MACS Magnete	(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
µMACS Separator	(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
Mikroskope	
Fluoreszenzmikroskop	Axiophot (Carl Zeiss GmbH, Jena)
Invertmikroskope	Olympus CKX31 (Olympus, Hamburg) DM IL (Leica, Wetzlar)
Zählmikroskop Zellen	Nikon SE (Nikon, Düsseldorf)
Mikrotom	RM 2255 (Leica, Wetzlar)
Mikrowelle	(Privileg, Fürth)
Multidispenser	(Eppendorf, Hamburg) (Gilson, Villies Le Bel, France)
Multikanalpipetten	(Socorex, Schweiz), (Abimed, Langenfeld)
Paraffin-Einbettgerät	Histotap plus (Leica, Wetzlar)
Paraffin-Streckbad	(MEDAX GmbH & Co.KG, Neumünster)
Paraffin-Wärmeschrank	(Binder GmbH, Tuttlingen)
Peristaltikpumpe	Reglo Digital (Ismatec, Wertheim-Mondfeld)
pH-Meter	pH211 (HANNA Instruments, Kehl am Rhein)
Photometer	NanoDrop ND-1000 (PEQLAB, Erlangen) Ultrospec III (Pharmacia, Erlangen)
Pipetten	(Eppendorf, Hamburg) (Gilson, Villies Le Bel, France) Rainin (Mettler Toledo, Oakland, CA, USA)
Pipettiergerät	Pipetboy (INTEGRA Biosciences, Fernwald)
<i>Power Supplies</i>	EPS 301, EPS 600 (Pharmacia, Erlangen)
<i>Real Time</i> Gerät	ABI 7500 <i>Real Time</i> PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)
Schüttelinkubator (Bakterien)	Certomat MaxQ 4000 (Labotec, Wiesbaden) Certomat R (Labotec, Wiesbaden)
Schüttelwasserbad	OLS 200 (Grant, VWR, Wien)
Schüttler	ST 5 CAT (neoLab, Heidelberg) Standard Analog Shaker (VWR, Darmstadt)
Schwingmühle	MM300 (Kurt Retsch GmbH&Co.KG, Haan)
Stratalinker	FluoLink (Bachofer, Reutlingen)

Sicherheitswerkbänke	HERA safe HS 12/2 und HS 15/2 (Heraeus, Hanau) Template Tamer Captair bio (Erlab, Köln)
<i>Thermocycler</i>	GeneAmp PCR System 9700, 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)
Thermoschüttler	Thermomixer comfort und 5436 (Eppendorf, Hamburg)
UV-Transilluminatoren	UV Star (Biometra, Jena) (Vetter GmbH, Wiesbaden)
Vollschutz- Kleintierbestrahlungsanlage	Typ OB 58-BA (Buchler, Braunschweig)
<i>Vortexer</i>	Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, USA) IKA VF 2 (Janke & Kunkel, Staufen)
Waagen	BP 61 (Sartorius, Göttingen) Kern 572 (Kern, Albstadt) UW2200HV (SHIMADZU, Duisburg)
Wasserbad	(GFL, Burgwedel)
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer 0,1mm (Roth, Karlsruhe)
Zentrifugen	
Minizentrifugen	C-1200 (National Labnet Co., Woodbridge, NJ, USA) sprout™ (Kisker-biotech, Steinfurt)
Standzentrifuge	Sorvall RC 5C (Sorvall, Langenselbold)
Tischzentrifugen	5417 (Eppendorf, Hamburg) 5417C (Eppendorf, Hamburg) 5417R (Eppendorf, Hamburg) 5424 (Eppendorf, Hamburg) Labofuge 200 (Heraeus, Hanau) Labofuge 400 R (Heraeus, Hanau) Megafuge 2.0 (Heraeus, Hanau) Multifuge 3 S-R (Heraeus, Hanau)
Ultrazentrifuge	Sorvall Combi Plus (Sorvall, Langenselbold)

### 2.1.2 Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien

Tab. 2.2: Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien

Material	Typ/Hersteller
Einfrierröhrchen	1,8ml <i>CryoTube</i> (Nunc International, Dänemark; Nr. 375418)
Einmal-Plastikpipetten	5ml (Greiner Bio-One, Nürtingen; Nr. 606180) 10ml (Greiner Bio-One, Nürtingen; Nr. 607180) 25ml (Greiner Bio-One, Nürtingen; Nr. 760180)
Einmal-Spritzen	1ml (Braun, Melsungen; Nr. 9166017V) 2ml (Braun, Melsungen; Nr. 4606027V) 50ml (Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 308500)
Einweg-Plastikschalen	100/20mm (Greiner Bio-One, Nürtingen; Nr. 664102)
Elektroporationsküvetten	0,1cm Spaltbreite (PeqLab, Erlangen; Nr. 71-2010-LE) 0,2cm Spaltbreite (PeqLab, Erlangen; Nr. 71-2020-LE)
FACS-Röhrchen	12x75mm (Beckman Coulter, Monheim; Nr. 2523749)
Filterspitzen	Rainin 10µl (Mettler Toledo, Oakland; Nr. GPL10F) Rainin 200µl (Mettler Toledo, Oakland; Nr. GPL200F) Rainin 1000µl (Mettler Toledo, Oakland; Nr. GPL1000F) 20µl (Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 70.760.213)

	200µl (Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 70.760.211) 1000µl (Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 70.762.211)
Kanülen	0,4×12mm (Braun, Melsungen) 0,45×12mm (Braun, Melsungen)
MACS Säulen	LS <i>Columns</i> (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach; Nr. 130-042-401)
Mahlkugeln für MM300	3mm rostfreier Stahl (Wälzlager Vertrieb Wiesbaden GmbH, Mainz-Kastel)
Nylonmembran	(Roche, Mannheim; Nr. 11417240001)
Reaktionsgefäße	1,5ml (Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 72.690) 2ml <i>Safe Seal</i> (Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 72.695)
Reaktionsgefäße (steril)	0,5ml (Biozym, Hessisch Oldendorf; Nr. 710051) 1,5ml (Biozym, Hessisch Oldendorf; Nr. 710052) 2ml (Biozym, Hessisch Oldendorf; Nr. 710053)
Reaktionsgefäße (PCR)	0,5ml <i>Safe Lock</i> (Eppendorf, Hamburg; Nr. 35325) PCR Streifen 1x8 Gefäße 0,2ml (Greiner Bio-One, Nürtingen; Nr. 673210) Strip Cap für 8 Gefäße, Flachdeckel (Greiner Bio-One, Nürtingen; Nr. 373250)
Röntgenfilme	<i>Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film</i> (Roche, Mannheim; Nr. 11666657001)
Skalpelle	(Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen; Nr. BA211 und BA221)
Sterilfilter	150ml Easy Flow <sup>TM</sup> Filter 0,22µm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 357107) 250ml Stericup Express plus 0.22µm (Millipore GmbH, Schwalbach; Nr. SCGPU02RE) 500ml Stericup Express plus 0.22µm (Millipore GmbH, Schwalbach; Nr. SCGPU05RE)
Zellkulturplatten	6-well Flachbodenplatten (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353046) 24-well Flachbodenplatten (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353047) 48-well Flachbodenplatten (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353078)
Zellkulturschalen	60/15mm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353004) 100/20mm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353003) 150/25mm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353025)
Zellnylonsiebe	40µm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 352340) 100µm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 352360)
Zentrifugenröhrchen	15ml Spitzboden Polypropylen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 352096) 50ml Spitzboden Polypropylen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353070) 36ml (Sorvall, Newtown, USA; Nr. 03141)
Zellschaber	25cm (Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 83.1830)

### 2.1.3 Chemikalien und Lösungen

Alle aufgelisteten Chemikalien und Lösungen wurden in p.a. Qualität bezogen.

**Tab. 2.3:** Chemikalien und Lösungen

Chemikalie	Hersteller
Aceton	Appllichem, Darmstadt; Nr. A1582,2500PE
Actinomycin D	Sigma-Aldrich, Steinheim; Nr. A1410
Agarose (LE)	Biozym, Hessisch Oldendorf; Nr. 840004
Ammonium-Nickel (II)-Sulfat (NiSO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim; Nr. 09885
Ampicillin (Amp)	Roth, Karlsruhe; Nr. K029.1
Bacto Agar	BD Biosciences, Heidelberg; Nr. 214010
Bacto tryptone	OXOID LTD, Hampshire, England; Nr. CM0129
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva, Heidelberg; Nr. 11920.02
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe; Nr. 5239.2
ChipHybe Hybridisierungspuffer	Ventana, Tucson, Arizona, USA; Nr. 760-103
Chloramphenicol (Cam)	Roth, Karlsruhe; Nr. 3886.2
CSPD-Lösung (25mM)	Roche, Mannheim; Nr. 11655884001
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Fermentas, St. Leon-Rot; Nr. 120192
3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB)	Sigma-Aldrich, Steinheim; Nr. D 5637
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe; Nr. K028.1
DIG-dUTP (1mM)	Roche, Mannheim; Nr. 11093088910
D(+)-Glucose Monohydrat	Roth, Karlsruhe; Nr.6780.1
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt; Nr. 1.02951.1000
Diphtherietoxin	Sigma-Aldrich, Steinheim; Nr. D0564-1MG
DNA-Längenstandards: 1kb DNA <i>ladder</i> 100bp DNA <i>ladder</i> 50bp DNA <i>ladder</i>	Invitrogen, Karlsruhe; Nr. 15615-016 NEB, Frankfurt am Main; Nr. N3231L NEB, Frankfurt am Main; Nr. N3236L
Entellan	Merck KGaA, Darmstadt; Nr. 1.07960
Erythrozyten-Lysepuffer	Sigma-Aldrich, Steinheim; Nr. R7757
Ethanol 100% (v/v)	Appllichem, Darmstadt; Nr. A1613
Ethidiumbromid (EtBr)	Roth, Karlsruhe; Nr. 2218.1
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Roth, Karlsruhe; Nr. 3619.1
Ficoll-LSM <i>Lymphocyte Separation Medium</i>	PAA Laboratories, Cölbe; Nr. J15-004
Fluorescein-dUTP (1mM)	Roche, Mannheim; Nr. 11373242910
Formaldehyd säurefrei 37% (v/v)	Merck KGaA, Darmstadt; Nr. K31602203302
Glycerin 86%	Roth, Karlsruhe; Nr. 7533.3
Glycin	Roth, Karlsruhe; Nr. 3908.2
Hämatoxylin	Waldeck GmbH & Co. KG, Division Chroma, Münster; Nr. 2E010
Heparin	ratiopharm GmbH, Ulm; Heparin-Natrium 2500
HEPES	Roth, Karlsruhe; Nr. 91054
Hoechst 33342	Life Technologies, Darmstadt; Nr. H1399
Isopropanol	Hedinger, Stuttgart; Nr. 0704103
Kaliumacetat (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> KO <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe; Nr. 4986.1
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe; Nr. 6781.1

Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck KGaA, Darmstadt; Nr. 4873
Kanamycin (Kan)	Roth, Karlsruhe; Nr. T832.2
L-Glutamin 100x	Gibco Invitrogen, Karlsruhe; Nr. 25030-024
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	Roth, Karlsruhe; Nr. 2189.1
Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ )	Roth, Karlsruhe; Nr. 0261.1
2-Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME)	Roth, Karlsruhe; Nr. 42271
Methanol	Roth, Karlsruhe; Nr. 8388.5
Methylcellulose	VWR, Darmstadt; Nr. 25499.182
Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	Roth, Karlsruhe; Nr. 8563.1
Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )	Roth, Karlsruhe; Nr. 4360.2
Natriumcitrat ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ )	Roth, Karlsruhe; Nr. 3580.1
Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ )	Roth, Karlsruhe; Nr. 2370.1
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Roth, Karlsruhe; Nr. 6885.1
Natriumhydroxid ( $\text{NaOH}$ )	Roth, Karlsruhe; Nr. P031.1
Natriumhypochlorit ( $\text{NaClO}$ )	Applichem, Darmstadt; Nr. 7681-52-9
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe; Nr. 4360.1
OptiPrep <sup>TM</sup>	PROGEN, Heidelberg; Nr. 1114542
PBS	Gibco, Life Technologies, Darmstadt; Nr. 14190-094
Paraffin	Vogel Histo-Comp, Gießen; Nr. V0-5-1002
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt; Nr. 4005
Paramount	BIOCYC, Luckenwalde; Nr. BP-167H
PolyFect	Qiagen, Hilden; Nr. 301107
RNase-ExitusPlus	Applichem, Darmstadt; Nr. A7153
Saccharose ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ )	Roth, Karlsruhe; Nr. 4621.1
Salzsäure 25% (v/v) ( $\text{HCl}$ )	Applichem, Darmstadt; Nr. A1434
Staurosporin	Sigma-Aldrich, Steinheim; Nr. S5921
TaqMan Universal PCR Master Mix, no UNG	Applied Biosystems, Darmstadt; Nr. 4324018
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe; Nr. 4360.2
Trypanblau	Biochrom, Berlin; Nr. L6323
Türks-Lösung	Merck, Darmstadt; Nr. 1.09277
Wasserstoffperoxid 30% (v/v) ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	Rotipuran, Roth, Karlsruhe; Nr. 8070.1
X-Rhodamin (ROX)	TIB Molbiol, Berlin
Xylol	Merck, Darmstadt KGaA; Nr. 1.08685.2500
<i>Yeast extract Servabacter</i>	Serva, Heidelberg; Nr. 24540

### 2.1.4 Zellkulturmedien und Medienzusätze

Die Zellkulturmedien wurden von Gibco (Life Technologies, Darmstadt) bezogen und, wenn notwendig, mit den unten aufgelisteten Zusätzen versetzt. Das in den Medien enthaltene Phenolrot fungierte als pH-Indikator, bei pH 7,4 hat es eine hellrote Farbe, welche nach Absinken des pH-Wertes über Orange zu Gelb wechselt.

**Tab. 2.4:** Zellkulturmedien und Medienzusätze

Zellkulturmedien	
DMEM	1x +GlutaMAX ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> ) Nr. 61965-026,
MEM+	MEM 1x +GlutaMAX ( <i>Minimum Essential Medium 1x</i> ): Nr. 41090-028 FCS 10% (v/v) Penicillin 100U/ml Streptomycin 0.1mg/ml
MEM-	MEM 1x +GlutaMAX ( <i>Minimum Essential Medium 1x</i> ): Nr. 41090-028 ohne Zusätze
MEM 10x,	ohne Glutamin ( <i>Minimum Essential Medium 10x</i> ): Nr. 21430-020
Medienzusätze	
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Life Technologies, Darmstadt; Nr. 15140-122
FCS	PAA Laboratories, Cölbe; Nr. A15-151/B15-001

### 2.1.5 Kits

**Tab. 2.5:** Kits

Kit	Hersteller
<i>AllPrep DNA/RNA Mini Kit</i>	QIAGEN, Hilden; Nr. 74134
<i>Annexin V-FITC/7-AAD Kit</i>	Beckman Coulter, Krefeld; Nr. IM3614
<i>Cytofix/Cytoperm Plus Kit</i>	BD Biosciences, Heidelberg; Nr. 555028
<i>DIG Wash and Block Buffer Set</i>	Roche, Mannheim; Nr. 11585762001
<i>DNeasy Blood and Tissue Kit</i>	QIAGEN, Hilden; Nr. 69506
<i>High Pure Viral Nucleic Acid Kit</i>	Roche, Mannheim; Nr. 11858874001
<i>µMACS mRNA Isolation Kit</i> – Small Scale	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach; Nr.130-075-201
<i>MEGAscript SP6 Kit</i>	Ambion, Woodward; Nr. 1330
<i>MinElute PCR Purification Kit</i>	QIAGEN, Hilden; Nr. 28006
Neufuchsin Kit	DakoCytomation, Hamburg; Nr. K0624
NucleoBond® PC 500	MACHEREY-NAGEL, Düren; Nr. 740.574.25
<i>One Step RT-PCR Kit</i>	QIAGEN, Hilden; Nr. 210212
Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden; Nr. 12163
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden; Nr. 12163
QIAGEN Plasmid Mini Kit	QIAGEN, Hilden; Nr. 12125
<i>QIAshredder</i>	QIAGEN, Hilden; Nr. 79656
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	QIAGEN, Hilden; Nr. 28704
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	QIAGEN, Hilden; Nr. 28104
<i>RNeasy Mini Kit</i>	QIAGEN, Hilden; Nr. 74104
VECTASTAIN Elite ABC-Kit standard	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA; Nr. PK-6100

### 2.1.6 Enzyme

Alle enzymatischen Reaktionen wurden unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt.

**Tab. 2.6:** Enzyme

Enzym	Hersteller
DNase I	Roche, Mannheim; Nr. 11284932001
DNase I (RNase frei)	QIAGEN, Hilden; Nr. 79254
HotStar HiFidelity Polymerase Kit	QIAGEN, Hilden; Nr. 202602
HotStar Taq DNA Polymerase	QIAGEN, Hilden; Nr. 203205
Kollagenase A	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; Nr. 10103586/001
Pepsin	Sigma-Aldrich, Steinheim; Nr. P-7000
Proteinase K	QIAGEN, Hilden; Nr. 19133
Restriktionsendonukleasen	NEB, Frankfurt am Main Fermentas, St.Leon-Rot
RNase A	QIAGEN, Hilden; Nr. 19101
Taq DNA Polymerase	QIAGEN, Hilden; Nr. 201205
Trypsin/EDTA 10x	Gibco, Life Technologies, Darmstadt; Nr. 15400054

### 2.1.7 Antikörper, *Micro-Bead*-gekoppelte MACS Antikörper und Dextramere

**Tab. 2.7:** Antikörper, *Micro-Bead*-gekoppelte MACS Antikörper und Dextramere

Antikörper	Typ/Klon	Spezies	Verdünnung/ Konzentration	Bezugsquelle
$\alpha$ -CD16/CD32 (FcyIII/II Rezeptor)	mAK/ 2.4G2	Ratte	1 $\mu$ g/10 <sup>6</sup> Zellen	BD Pharmingen™, Heidelberg; Nr. 553140
$\alpha$ -DIG-AP	pAK	Schaf	1:200	Roche, Mannheim; Nr. 11093274910
$\alpha$ -DIG-POD	pAK	Schaf	1:200; 1:25 (ISH)	Roche, Mannheim; Nr. 11207733910
$\alpha$ -Fluorescein-AP	pAK	Schaf	1:200	Roche, Mannheim; Nr. 11426338910
$\alpha$ -IE1	mAK/ CROMA 101	Maus	1:250	Prof. S. Jonjić, University of Rijeka
$\alpha$ -Maus IFN- $\gamma$ -FITC	mAK/ XMG1.2	Ratte	0,25 $\mu$ g/10 <sup>6</sup> Zellen	BD Pharmingen™, Heidelberg; Nr. 554411
$\alpha$ -Maus-CD8a-ECD	mAK/ 53-6.7	Ratte	0,25 $\mu$ g/10 <sup>6</sup> Zellen	Beckman Coulter, Krefeld; Nr. A88606
$\alpha$ -Maus-CD62L-PE- Cy7	mAK/ MEL14	Ratte	0,1 $\mu$ g/10 <sup>6</sup> Zellen	Beckman Coulter, Krefeld; Nr. 731715
$\alpha$ -Maus-CD127-PE- Cy5	mAK/ A7R34	Ratte	0,3 $\mu$ g/10 <sup>6</sup> Zellen	eBioscience, Frankfurt; Nr. 15-1271
$\alpha$ -Maus-(Fab)-Biotin	pAK	Ziege	1:200	Sigma, Deisenhofen; Nr. B0529
$\alpha$ -Maus-H-2K <sup>d</sup> -PE	mAK/ SF1-1.1	Maus	0,4 $\mu$ g/5x10 <sup>5</sup> Zellen	BD Pharmingen™, Heidelberg; Nr. 553566
$\alpha$ -Maus-KLRG1- FITC	mAK/ 2F1	Gold- hamster	0,2 $\mu$ g/10 <sup>6</sup> Zellen	eBioscience, Frankfurt; Nr. 11-5893-82



Normal-Serum Ziege	pAK	Ziege	1:10	Invitrogen Life Technologies, Darmstadt; Nr. PCN5000
-----------------------	-----	-------	------	--

MACS-Antikörper	Typ/Klon	Spezies	Verdünnung/ Konzentration	Bezugsquelle
CD146 (LSEC) <i>Micro-Beads</i>	mAK/ ME-9F1	Ratte	10µl/10 <sup>7</sup> Zellen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach; Nr. 130-092-007

Dextramere	Typ/Klon	Spezies	Verdünnung/ Konzentration	Bezugsquelle
AGPPRYSRI (m164 Peptid)-PE	H-2D <sup>d</sup>	Maus	10µl/10 <sup>6</sup> Zellen	Immudex, Kopenhagen, DK; Lot-Nr. 20120917- GS8
SIINFEKL- Peptid-PE	H-2K <sup>b</sup>	Maus	10µl/10 <sup>6</sup> Zellen	Immudex, Kopenhagen, DK; Lot-Nr. 20120106- KB7
TYWPVVSDI (M105 Peptid)-PE	H-2K <sup>d</sup>	Maus	10µl/10 <sup>6</sup> Zellen	Immudex, Kopenhagen, DK; Lot-Nr. 20120723- TJ12
YPHFMPNL (IE1 Peptid)-PE	H-2L <sup>d</sup>	Maus	10µl/10 <sup>6</sup> Zellen	Immudex, Kopenhagen, DK; Lot-Nr. 20120723- TJ11

### 2.1.8 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma biomers.net GmbH bezogen. Die Positionsangaben für mCMV-Sequenzen erfolgten nach Rawlinson et al., 1996 (*GenBank Accession No.*: NC\_004065), bei allen anderen Sequenzen ist die jeweilige *GenBank Accession No.* angegeben (Altschul et al., 1990). *Primer* und Sonden wurden in sterilem Tris-Puffer (pH 8,0) gelöst und auf eine Konzentration von 10µM eingestellt.

#### 2.1.8.1 Oligonukleotide für qPCR Quantifizierungen

Name	Position	Sequenz
β-actin_For1 β-actin_Rev1 β-actin_P1	n809-830 n896-873 n833-852	5'-GAC GGC CAG GTC ATC ACT ATT G-3' 5'-CAC AGG ATT CCA TAC CCA AGA AGG-3' 5'-[6-FAM]AAC GAG CGG TTC CGA TGC CC [BHQ1a~6FAM]-3' Amplifikatgröße: RNA: 88bp <i>GenBank Accession No.</i> : NM_007393
E1_Intron1_For1 E1_Intron2_Rev1	Ex 1: n163878- 163889 Ex 2: n163983- 163992 Ex 3: n164496- 164486 Ex2: n164159- 164151	5'-TCG AAG AGG AAT GTT CTC CAC G-3' 5'-TTG TTG TCC TCC ATC GCT GA-3'

E1_Taq_P2	n164004-164025	5'-[6-FAM]AGC CCA AGC GCC AGA AGA CCC A [TAMRA~6-FAM]-3' Amplifikatgröße: RNA: 200bp
gB_Taq_For1 gB_Taq_Rev1 gB_Taq_P1	n83137-83156 n83227-83207 n83175-83200	5'-CTA GCT GTT TTA ACG CGC GG-3' 5'-GGT AAG GCG TGG ACT AGC GAT-3' 5'-[6-FAM]TGC TCG GTG TAG GTC CTC TCC AAG CC[TAMRA~6-FAM]-3' Amplifikatgröße: DNA: 91bp; RNA: 91bp
IE1_Taq_For1  IE1_Taq_Rev1 IE1_Taq_P1	n181184-181210  n181438-181421 Ex 4: n181239-181249 Ex 3: n181372-181385	5'-TGG CTG ATT GAT AGT TCT GTT TTA TCA-3' 5'-CTC ATG GAC CGC ATC GCT-3' 5'-[FAM]AAC GCT CCT CAC TGC AGC ATG CTT G[BHQ1a~6FAM]-3' Amplifikatgröße: DNA: 255bp; RNA: 134bp
IE3_Taq_For2 IE3_Taq_Rev2 IE3_Taq_P1	n181463-181441 n179497-179478 Ex 5: n179499-179517 Ex 3: n181372-181379	5'-TGA TCC CAC TGA GGA AGA GAA GA-3' 5'-GAG GCC GCT GCT GTA ACA AT-3' 5'-[6-FAM]TCT ATG TTC ATC TCG GGT CCT GCA GCA[BHQ1a~6FAM]-3' Amplifikatgröße: DNA: 1986bp; RNA: 132bp
M86_Taq_For1 M86_Taq_Rev1 M86_P1	n125977-125994 n126041-126023 n125996-126020	5'-GGT CGT GGG CAG CTG GTT-3' 5'-CCT ACA GCA CGG CGG AGA A-3' 5'-[6-FAM]TCG GCC GTG TCC ACC AGT TTG ATC T[BHQ1a~6FAM]-3' Amplifikatgröße: DNA: 65bp; RNA: 65bp
M105_Taq_For1 M105_Taq_Rev1 M105_P1	n153252-153274 n153363-153343 n153302-153323	5'-CCA GGT ATC GGA TCA TGC AGA AG-3' 5'-TGG GAC TCG ATC TCG CAG TTC-3' 5'-[6-FAM]ACC CGG CTC GTC ACC TAC AAC AGG A[BHQ1a~6FAM]-3' Amplifikatgröße: DNA: 112bp; RNA 112bp
m164_Taq_For1 m164_Taq_Rev1 m164_P1	n222585-222606 n222678-222660 n222610-222629	5'-CAA CTG ACA GTC GCA GCT CTT C-3' 5'-CGG CGG TAA CCT GCT ATC C-3' 5'-[6-FAM]CCG GTT GAA CTG CGC GCC AC [TAMRA~6-FAM]-3' Amplifikatgröße: DNA: 94bp; RNA: 94bp
PTHrP_Taq_For1 PTHrP_Taq_Rev1 PTHrP_Taq_P1	n155-174 n255-236 n177-197	5'-CAA GGG CAA GTC CAT CCA AG-3' 5'-GGG ACA CCT CCG AGG TAG CT-3' 5'-[6-FAM]TTG CGC CGC CGT TTC TTC CTC [TAMRA~6-FAM]-3' Amplifikatgröße : DNA: 101bp; <i>GenBank Accession No.:</i> M60056

### 2.1.8.2 Oligonukleotide für ISH

Name	Position	Sequenz
DTR_For1 DTR_Rev1	n60-76 n-667-646	5'-TGA AGC TGC TGC CGT CG-3' 5'-GCC CAA CTT CAC TTT CTC TTC G-3' Sondengröße: 608bp, mit DIG markiert <i>GenBank Accession No.:</i> M93012
M55/gB_For1 M55/gB_Rev1	n84250-84269 n 85790-85771	5'-GCA CGT CGT AGG TAA ATT GC-3' 5'-TCG CTC CTC GAG CTG GTA CG-3' Sondengröße: 1541bp, mit Fluorescein markiert

### 2.1.9 Vektorsysteme und Plasmide

Das Plasmid pDrive\_gB\_PTHrP\_TDY (6337bp) (Simon et al., 2005) wurde als Standard zur absoluten Quantifizierung in die qPCR eingesetzt, um die Anzahl viraler Genome und die Zellzahl von Proben zu bestimmen. Es enthält Sequenzen der Gene *M55/gB* (*Glykoprotein B von mCMV*), *PTHrP* (*Parathyroid hormone-related protein*) und *TDY* (auch SRY = *Sex determining region of Y-Gen*).

Mit dem Plasmid pDrive\_gB\_PTHrP\_BAC (7115bp) (Lemmermann, et al., 2010) konnte die Deletion von *bacterial artificial chromosome* (BAC) -Sequenzen neu generierter Viren verifiziert werden. Es enthält Sequenzen des BAC-Vektors sowie der Gene *M55/gB* und *PTHrP*.

Zur Herstellung von *in vitro* Transkripten wurde der pSP64 Poly(A) Vektor (3030bp) von Promega verwendet.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Virologische Methoden

#### 2.2.1.1 Verwendete Viren

##### mCMV-WT-BAC (MW97.01)

Dieses chimäre, rekombinante Virus wurde aus dem Genom des Laborstammes ATCC VR-1399 (Smith, 1954) und Sequenzteilen (*HindIII*-E-Fragment) des mCMV-Laborstammes K181 generiert. Nach Klonierung des gesamten mCMV-Genoms in ein BAC-Plasmid und anschließender Transfektion in murine embryonale Fibroblasten konnte das rekombinante Virus MW97.01 aus Zellkulturüberstand isoliert werden (Messerle et al., 1997; Wagner et al., 1999). MW97.01 zeigte *in vivo* keine Unterschiede seiner biologischen Eigenschaften im Vergleich zu mCMV-WT-Smith (Wagner et al., 1999). MW97.01 wurde unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von U. H. Koszinowski, Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Mikrobiologie in München, zur Verfügung gestellt.

##### mCMV-Δie2-DTR

Dieses Virus basiert auf mCMV-WT-BAC, enthält jedoch zusätzlich ein für den *simian* Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR) kodierendes Gen. Das *dtr*-Gen steht unter Kontrolle des *ie2*-Promotors, da es an Position n184270-n184315 (WT, *GenBank Accession No.* NC 004065) mittels Zwei-Schritt BAC-Mutagenese in das mCMV-Genom kloniert wurde. Dabei wurden 46bp von Exon 1 des *ie2*-Gens deletiert, an deren Stelle sich das *dtr*-Gen mit darauffolgendem *Stop-Codon* befindet (Scheller, 2011).

### 2.2.1.2 Rekonstitution von Viren aus BAC Plasmiden

<u>Transfektions-Reagenz:</u>	PolyFect (QIAGEN)	
<u>Medium:</u>	1x MEM (+ mit Zusätzen) 1x MEM (- ohne Zusätze)	
<u>Methylcellulose-Medium:</u>	Methylcellulose	8,8g
	H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	360ml
	Autoklavieren und üN bei 4°C rühren, vor Gebrauch zugeben:	
	MEM 10x	40ml
	L-Glutamin	5ml
	P/S	5ml
	FCS	20ml
	pH-Wert mit NaHCO <sub>3</sub> auf 7,5 einstellen, bei 4°C lagern	

MEF wurden auf 6-well Zellkulturplatten bis zu einer Konfluenz von ~70% in MEM+ kultiviert, anschließend erfolgte die Transfektion der BAC-DNA zur Rekonstitution der Viren. Dazu wurden 2,5; 5; 10; 15 oder 20µl BAC-DNA (siehe 2.2.5.12.2) mit MEM- auf ein Gesamtvolumen von 100µl aufgefüllt, mit jeweils 10µl PolyFect versetzt und für 10min bei 23°C inkubiert. Die positiv geladenen Amino-Gruppen der Dendrimer-Moleküle des PolyFect Reagenz konnten mit den negativ geladenen Phosphat-Gruppen der DNA interagieren und kompakte Strukturen bilden, welche später mittels Endozytose in die Zellen aufgenommen wurden. Dabei puffert das Reagenz den endosomalen pH-Wert, was die Stabilität des PolyFect-DNA Komplexes und dessen Transport zum Zellkern ermöglicht. Bevor die Transfektionsansätze mit 600µl MEM+ versehen und auf die Zellen gegeben wurden mussten letztere 1x mit PBS gewaschen und mit 1,5ml neuem Kulturmedium versetzt werden. Anschließend erfolgte eine Inkubation von mindestens 7h bei 37°C, danach wurde das Transfektionsmedium durch 3ml frisches MEM+ ersetzt. Sobald die meisten Zellen cytopathische Effekte (CPE) zeigten, was nach etwa 7-9 Tagen der Fall war, wurden die Überstände gesammelt, bei 800xg für 10min zentrifugiert und die resultierenden Überstände bei -70°C gelagert. Um BAC-Vektor freie Viren zu erhalten, erfolgte die Passagierung der Viren über sechs Runden auf MEF. In der ersten Passage wurden konfluent gewachsene MEF auf 6-well Platten mit 1ml Virusüberstand, in der 2.-5. Passage mit 1µl Überstand der vorherigen Passage + 999µl MEM+ für 30min bei ~23°C infiziert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2ml Kulturmedium und die Zellen wurden bei 37°C inkubiert bis ~80% einen CPE zeigten. Zur Plaque-Aufreinigung wurden konfluente MEF mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (1µl sowie 1µl einer 1:10 Verdünnung) des Überstandes aus Passage fünf infiziert und mit 2ml Methylcellulose-Medium überdeckt. 4 Tage nach Infektion wurden einzelne Plaques gepickt und zur klonalen Vermehrung der Virus-Population verwendet. Die Überprüfung auf BAC-Freiheit erfolgte mittels qPCR aus aufgereinigter, viraler DNA. Als

BAC-frei wurde eine Anzahl von weniger als 100 BAC-Sequenzen pro  $1 \times 10^6$  Virusgenomen definiert.

Für detailliertere Angaben siehe Lemmermann et al., 2010.

### 2.2.1.3 mCMV Produktion

<u>Virus Standard Puffer (VSP):</u>	Tris	50mM
	EDTAx2H <sub>2</sub> O	5mM
	KCl	12mM
	ad H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	
	pH-Wert mit HCl auf 7,8 einstellen, autoklavieren, bei 4°C lagern	
<u>VSP mit 15% (w/v) Saccharose:</u>	Saccharose	15g
	VSP	ad 100ml
	frisch ansetzen, sterilfiltrieren, bei 4°C lagern	
<u>Medium:</u>	1x MEM+	

Zur mCMV Produktion wurden ~50 Zellkulturschalen (150mm), welche fast konfluente MEF enthielten, mit  $1 \times 10^5$  PFU aufgereinigtem Virus pro Schale oder 60µl Virusüberstand einer durchlysierten Kultur infiziert. Dabei wurde das Kulturmedium der 150mm Schalen entfernt, das entsprechende Virus in einem Volumen von je 5ml MEM+ pro Schale zugegeben und zur Infektion für 30min bei 23°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20ml Kulturmedium pro Schale. Nach einer Inkubationszeit von 4-5 Tagen bei 37°C, konnten bei ~80% der Zellen cytopathische Effekte unter dem Mikroskop beobachtet werden. Mit einem Zellschaber wurden noch adhärenente Zellen vom Boden der Kulturschalen abgelöst und die Virussuspension wurde in 500ml-Zentrifugenbechern gesammelt. Alle weiteren Schritte fanden bei 4°C statt. Um die Zellen zu pelletieren, erfolgte eine Zentrifugation bei 6.400xg für 20min. Der Überstand wurde in 250ml-Zentrifugenröhrchen transferiert, das Pellet in 10ml MEM+ resuspendiert, in einem *dounce*-Homogenisator homogenisiert und in 50ml Röhrchen zentrifugiert (20min, 3.600xg). Anschließend wurden diese Überstände mit den bereits vorhandenen vereinigt. Um die Viruspartikel zu pelletieren, erfolgte eine Zentrifugation der Überstände bei 26.000xg für 3h. Während der folgenden üN-Inkubation bei 4°C wurden die Pellets zum Schutz vor Austrocknung mit etwas Medium bedeckt und am nächsten Tag im übrigen Medium resuspendiert, homogenisiert und auf ein 4°C kaltes VSP/Saccharose-Kissen in einem Puffer/Virus-Verhältnis von 10:1 geladen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 1h bei 53.000xg, das Pellet wurde mit 2ml bis 4ml Saccharose/VSP überschichtet und für 4h auf Eis inkubiert. Mit einer Pasteur-Pipette wurde das Pellet danach vorsichtig resuspendiert, abermals homogenisiert und in Aliquots zu 20µl, 50µl und 100µl bei -70°C weggefroren. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Virustiters der

Viruspräparation (siehe 2.2.1.5). Die Virusstocks können bis zu dreimal ohne Verlust der Infektiosität aufgetaut und wieder weggefroren werden.

Für detailliertere Angaben siehe Podlech et al. 2002 und Lemmermann et al., 2010.

#### 2.2.1.4 Zentrifugale Infektion von MEF

Methylcellulose-Medium: (2.2.1.2)

Medium: 1x MEM+

In der Virologie wird die Infektion durch die *multiplicity of infection* (MOI), dem Verhältnis von infektiösem Agens zu den Zielzellen angegeben. Durch Zentrifugation kann die Infektion permissiver Zellen um den Faktor 20 verstärkt werden (Podlech et al., 2002).

$$\text{MOI} / 20 (\cup \text{ Infektion}) = \text{PFU/Zelle}$$

wobei:  $\text{MOI} = V_{\text{Virus}} \times K_{\text{Virus}} / V_{\text{Zellen}} \times K_{\text{Zellen}}$

K: Konzentration, V: Volumen

Die auf Zellkultur-Platten oder Schalen ausgesäten MEF wurden vor der Infektion 1x mit PBS gewaschen, mit Viruslösung in Kulturmedium überschichtet und bei 760xg zunächst für 10min zentrifugiert. Nach Drehen der Platten oder Schalen um 180°, um eine gleichmäßige Verteilung der Virussuspension zu erreichen, erfolgte eine weitere Zentrifugation für 20min bei 760xg. Abschließend wurden die Zellen entweder mit Methylcellulose-Medium überschichtet oder mit Medium supplementiert.

Benötigte Virusmenge:

$$\text{ml Virus} = \frac{\text{PFU/Zelle} \times V_{\text{Zellen}} [\text{ml}] \times K_{\text{Zellen}} [\text{Zellen/ml}]}{K_{\text{Virus}} [\text{PFU/ml}]}$$

K: Konzentration, V: Volumen, PFU: *plaque forming unit*

#### 2.2.1.5 mCMV Titerbestimmung

Methylcellulose-Medium: (2.2.1.2)

Medium: 1x MEM+

Der Virustiter von mCMV wird in PFU angegeben. Ein PFU ist laut Definition die Virusmenge, die nötig ist, um einen einzelnen Plaque in einem *Monolayer* permissiver Zellen zu erzeugen. Von einer lytisch infizierten Zelle aus kommt es ausschließlich zur radialen Infektion der Nachbarzellen und es entsteht ein „Loch“ im Zellrasen. Durch die Zugabe von Methylcellulose-Medium wird die Infektion weiterer Zellen, welche nicht in der direkten Nachbarschaft des Plaques liegen unterbunden (siehe auch Podlech et al., 2002).

### 2.2.1.5.1 Virustiter-Bestimmung aus Zellkulturüberständen und Virusstocks

Zur Virustiter-Bestimmung wurden MEF in 48-*well* Zellkulturplatten ausgesät. Von den Zellkulturüberständen bzw. Virusstocks wurden  $\log_{10}$  Verdünnungen in Kulturmedium angelegt. Die Titrationsen erfolgten auf Eis mit vorgekühltem Medium. Nach Abnahme des Kulturmediums wurden jeweils 100 $\mu$ l der einzelnen Verdünnungsstufen in ein *well* der Zellkulturplatte (als Triplikate) gegeben. Um die Zell-Adsorption und -Penetration des Virus zu gewährleisten, wurde die Platte für 1h bei 37°C inkubiert, bevor die Überschichtung des Zellrasens mit 500 $\mu$ l Methylcellulose-Medium erfolgte. Nach einer Inkubation von 4 Tagen bei 37°C konnten die Plaques unter dem Invertmikroskop gezählt und der Virustiter wie folgt berechnet werden, wobei der Mittelwert der Triplikate bestimmt wurde (Reddehase et al., 1985):

$$\text{Virustiter (PFU/ml)} = P \times V \times 10$$

P: Plaquezahl; V: Verdünnungsfaktor

### 2.2.1.5.2 Virustiter-Bestimmung aus Organhomogenaten

Die Organe infizierter BALB/cJ Mäuse wurden präpariert und in Reaktionsgefäße mit 1ml Kulturmedium gegeben. Bis zur Analyse erfolgte die Lagerung der Organe bei -70°C. Zur Bestimmung des Virustiters wurden sie langsam im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und anschließend zur Homogenisierung mit dem Stempel einer 2ml-Spritze über ein steriles Metallsieb gerieben. Die Organsuspension wurde in 2ml Medium aufgenommen und über 6  $\log_{10}$  Verdünnungsstufen in einem Volumen von jeweils 1ml titriert. Pro *well* einer 48-*well* Platte wurden 100 $\mu$ l jeder Verdünnungsstufe (als Duplikat) auf einen *Monolayer* MEF pipettiert und zentrifugal infiziert (siehe 2.2.1.4). Anschließend erfolgte die Überschichtung der Zellen mit 500 $\mu$ l Methylcellulose-Medium und nach 4 tägiger Inkubation bei 37°C wurden die Plaques ausgezählt (siehe 2.2.1.5.1).

Allerdings muss man beachten, dass der Titer auf das 2ml Organhomogenat bezogen wird.

$$\text{Virustiter (PFU/Organ)} = P \times V \times 20$$

P: Plaquezahl; V: Verdünnungsfaktor

### 2.2.1.6 Bestimmung der viralen Replikationsfähigkeit *in vitro*

DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)

Methylcellulose-Medium: (2.2.1.2)

Medium: 1x MEM+

Um einen Phänotyp der eingeführten Mutation ausschließen zu können, müssen neu generierte Virusmutanten charakterisiert und ihre Replikationsfähigkeit *in vitro* und *in vivo* (siehe 2.2.2.6) im Vergleich zu mCMV-WT-BAC untersucht werden. Dazu erfolgte die Infektion konfluent gewachsener MEF mit einer MOI von 0,4 und in einem Volumen von 3ml Kulturmedium pro 6-well der Zellkulturplatte (siehe 2.2.1.4). In einem Zeitraum von 0h bis 72h nach Infektion erfolgte die Probenentnahme zur Bestimmung des Virustiters (2.2.1.5.1, aus 500µl Überstand) und der Menge viraler Genome (2.2.5.3, aus Zellpellets). Um die Anzahl viraler Genome mittels *M55/gB*-spezifischer qPCR, normalisiert auf das zelluläre Gen *pthrp*, zu bestimmen, wurde die DNA aus den pelletierten Zellen isoliert (siehe 2.2.5.1.3). Für detailliertere Angaben siehe Lemmermann et al., 2010.

## 2.2.2 Tierexperimentelle Methoden

### 2.2.2.1 Verwendete Versuchstiere

Alle Versuchstiere wurden in der zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter SPF- Bedingungen (specified pathogen free) gezüchtet und gehalten. Für die Versuche wurden ausschließlich 8-10 Wochen alte (Ausnahme: KM-Spender 3-6 Monate alt), weibliche Mäuse des Inzuchtstammes BALB/cJ mit dem Haplotyp H-2<sup>d</sup>, welche die MHC-Klasse-I Moleküle H2-K<sup>d</sup>, H2-L<sup>d</sup> und H2-D<sup>d</sup> sowie die MHC-Klasse-II Moleküle I-A<sup>d</sup> und I-E<sup>d</sup> exprimieren, verwendet. Die tierexperimentellen Arbeiten erfolgten mit Genehmigung der Bezirksregierung Rheinhessen-Pfalz (Nummer G09-1-004).

### 2.2.2.2 Immunsuppression

In einer Kleintierbestrahlungsanlage, welche zwei <sup>137</sup>Cs Quellen enthält, wurden die Versuchstiere mit einer Dosis von 6,5Gy subletal bestrahlt. Die Bestrahlungszeit musste monatlich entsprechend der Halbwertszeit von <sup>137</sup>Cs ( $T_{1/2} = 30,17$  Jahre) angepasst werden. Die  $\gamma$ -Bestrahlung bewirkt durch Auslöschung von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen eine Aplasie des Knochenmarks (Mutter et al., 1988).



### 2.2.2.3 Intraplantare mCMV-Infektion

Eine Virussuspension mit einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  PFU in 50  $\mu$ l PBS wurde, unter Verwendung einer 1ml Spritze sowie einer Kanüle der Dicke 0,4x12mm, intraplantar (*i.pl.*) in die Hinterpfote injiziert. Bei immunsupprimierten Tieren konnten nach 7 Tagen lokale Schwellungen und deutliche Hämorrhagien am Ort der Infektion beobachtet werden.

### 2.2.2.4 Intravenöse und intraperitoneale Injektion von DT

Mit dem Ziel der Apoptoseinduktion von Zellen, welche nach Infektion mit mCMV- $\Delta$ ie2-DTR den DTR an der Oberfläche exprimieren, wurde den Mäusen Diphtherietoxin (DT) injiziert. Dies erfolgte intravenös (*i.v.*) über die laterale Schwanzvene bzw. intraperitoneal (*i.p.*) in einem Abstand von 16h. Das DT wurde mit Konzentrationen von 10, 20 oder 30ng/g Maus in einem Volumen von 500  $\mu$ l 3x, 5x oder 6x repetitiv verabreicht. Gelagert wurde es bei -70°C in einer Konzentration von 1mg/ml und vor Gebrauch mit der gewünschten Endkonzentration in PBS angesetzt.

### 2.2.2.5 Experimentelle Knochenmarktransplantation und mCMV-Infektion

Die experimentelle Knochenmarktransplantation (KMT) ist ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Pathogenese nach mCMV Infektion (Koszinowski et al. 1990; Reddehase et al., 1991). Dabei wird das hämatopoetische System der Rezipientenmäuse durch Bestrahlung zerstört und nach Transplantation von Knochenmarkzellen (KMZ) aus Donortieren wieder rekonstituiert.

#### 2.2.2.5.1 Isolierung von Knochenmarkzellen

1x PBS + 2% FCS (v/v)

EtOH 70% (v/v)

Als KMZ Spender wurden 3-6 Monate alte BALB/cJ Weibchen verwendet. Die Tiere wurden mit CO<sub>2</sub> begast, einer zervikalen Dislokation unterzogen und zur Desinfektion in 70% (v/v) EtOH getaucht. Nach Entfernen der Hinterbeine durch Abtrennen des Femurknochens von der Hüftgelenkpfanne, wurden Femur und Tibia freipräpariert und in PBS +2% FCS (v/v) gesammelt. Die Epiphysen wurden abgeschnitten und die Markhöhlen der Knochen mit PBS + 2% FCS (v/v) unter Zuhilfenahme einer 0,4x12mm Kanüle gespült. Anschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen des gesammelten KMs in PBS, zentrifugiert wurde jeweils für 10min bei 300xg. Die Zellen wurden über ein Nylonsieb (100 $\mu$ m) filtriert, gezählt und auf  $1 \times 10^7$  KMZ/ml eingestellt. Zu erwarten war eine Zellzahl von  $1-3 \times 10^7$  KMZ pro Maus.

### 2.2.2.5.2 Bestrahlung der Rezipienten, Knochenmarktransplantation und Infektion

Empfängermäuse wurden durch Bestrahlung mit einer Dosis von 6,5Gy immunsupprimiert (siehe 2.2.2.2) und bekamen die isolierten KMZ in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen in 500µl PBS *i.v.* verabreicht. Anschließend wurden die Mäuse *i.pl.* mit mCMV infiziert (siehe 2.2.2.3).

### 2.2.2.6 Bestimmung der viralen Replikationsfähigkeit *in vivo*

Um die Replikationsfähigkeit von Virusmutanten in den Organen infizierter Tiere zu untersuchen, wurden BALB/cJ Mäuse durch Bestrahlung immunsupprimiert und mit  $2 \times 10^5$  PFU des entsprechenden Virus *i.pl.* infiziert (siehe 2.2.2.3). Die Organe wurden nach Entnahme an Tag 2, 4, 6, 8 und 10 *post infection (p.i.)* bei  $-70^\circ\text{C}$  konserviert. Anschließend erfolgte die Ermittlung der Virustiter aus Organhomogenaten (siehe 2.2.1.5.2). Des Weiteren wurde die Menge infizierter Leberzellen durch IE1-spezifische Immunhistochemie (IHC) (siehe 2.2.7.2) und die Anzahl viraler Genome mittels *M55/gB*-spezifischer qPCR, normalisiert auf das zelluläre Gen *pthrp*, bestimmt (siehe 2.2.5.3).

### 2.2.2.7 Leberperfusion zur anschließenden NPLC Isolierung

GBSS Puffer:

Substanz	MW g/mol	Stocklösung	Einwaage	Konzentration	Ansatz 5l
NaCl	58,44	4M	234g/l	137mM	171,5ml
KCl	74,56	1M	74,6g/l	5mM	25ml
CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	147,02	1M	14,7g/100ml	1,6mM	8ml
MgCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O	203,3	1M	20,3g/100ml	0,9mM	4,5ml
MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	246,48	1M	24,7g/100ml	0,3mM	1,5ml
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	136,09	1M	13,6g/100ml	0,3mM	1ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	177,99	0,25M	44,5g/l	0,2mM	34ml
NaHCO <sub>3</sub>	84,01	0,5M	42g/l	1,7mM	27ml
D(+) Glucose Monohydrat	198,17		1,09g/l	5,5mM	5,45g
Hepes	238,31		11,9g/l	50mM	59,5g
pH 7,4 einstellen, H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub> ad 5l, steril filtrieren, bei 4°C lagern					

Perfusionspuffer: GBSS + 0,05% Kollagenase A (25mg/ml Stocklösung)

EtOH 70% (v/v)

Zur Leberperfusion wurden die Tiere mit CO<sub>2</sub> begast und in 70% EtOH (v/v) desinfiziert. Der Bauchraum wurde lateral eröffnet und durch Beiseiteschieben des Darmes ein freier Zugang zur *Vena portae* sowie zur *Vena cava caudalis* ermöglicht. Nach Punktion der *Vena portae* mit einer Kanüle (0,45x12mm), die an einen Schlauch angeschlossen mit einer Peristaltikpumpe verbunden war, wurde die Leber mit Perfusionspuffer für ~20s bei einer

Durchflussgeschwindigkeit von 5ml/min perfundiert. Gleichzeitiges Eröffnen der *Vena cava caudalis* ermöglichte das Abfließen des Perfusionspuffers, wobei darauf zu achten war, dass sich keine Luftblasen im System befanden, was bei der Perfusion zu Stenosen in der Leber führen könnte. Nach Entnahme wurde die Leber bis zur weiteren Verwendung in GBSS gelagert.

### 2.2.2.8 Organentnahme und Probenkonservierung

Nach zervikaler Dislokation oder CO<sub>2</sub> Begasung wurde den Tieren je nach Fragestellung die Speicheldrüse, Lunge, Leber und Milz entnommen und bis zum weiteren Gebrauch bei -70°C gelagert. Erfolgte die Bestimmung des Virustiters, wurden die Organe in 1ml Kulturmedium überführt. Für die Quantifizierung viraler Genome bzw. Transkripte wurden die Organe nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lunge wurde vor der Entnahme zur Entfernung intravasaler Blutzellen mit Heparin gespült. Zur histologischen Färbung von Leberschnitten wurden die Organe üN in Formalinlösung inkubiert (siehe 2.2.7.1).

### 2.2.3 Zellbiologische Methoden

Um Kontaminationen der Zell- und Gewebekulturen mit Pilzen und Bakterien zu verhindern, wurden alle Arbeiten unter einer sterilen Werkbank und mit sterilen Glas- und Plastikgeräten durchgeführt. Die Zellen wurden in CO<sub>2</sub>-Inkubatoren bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einer gesättigten Wasserdampf-atmosphäre (95% (v/v) relative Luftfeuchte) kultiviert. Dies ermöglichte die Aufrechterhaltung des pH-Wertes der CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-gepufferten Medien.

#### 2.2.3.1 Verwendete Primärzellen

##### **Murine embryonale Fibroblasten (MEF):**

Kulturmedium: 1x MEM+

Diese primären, adhärenen Zellen wurden aus 14-17 Tage alten Embryonen des Mausstammes BALB/cJ hergestellt. Sie sind permissiv für eine mCMV-Infektion und wurden für alle Zellkulturversuche verwendet. Virusinfektionen erfolgten stets mit Zellen der dritten Passage.

### 2.2.3.2 Herstellung von MEF Kulturen

<u>Einfriermedium:</u>	FCS 90% (v/v)	
	DMSO 10% (v/v)	
<u>Trypsin/EDTA pH 6,4:</u>	Trypsin	1,25g
	EDTAx2H <sub>2</sub> O	1,25g
	PBS	ad 1l
	pH-Wert mit NaOH auf 6,4 einstellen, steril filtrieren, bei 4°C lagern	
<u>Kulturmedium:</u>	1x MEM+	

#### 1x Trypsin/EDTA

Embryonen im Alter von 14-17 Tagen wurden einer trächtigen BALB/cJ Maus entnommen, in eine Petrischale auf Eis überführt und von inneren Organen, Augenanlagen sowie dem Gehirn befreit. Das mittels Schere oder Skalpell zerkleinerte Gewebe wurde in 15ml PBS + 15ml Trypsin/EDTA aufgenommen und in einem mit Glasperlen (Ø 1-2mm) gefüllten Erlenmeyerkolben dreimal für je 30min durch Rühren dissoziiert. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten erfolgte die Zugabe von jeweils 15ml Trypsin/EDTA und 15ml PBS. Anschließend wurden die Zellen nach Filtration über ein Metallsieb mittels Zentrifugation bei 300xg für 10min pelletiert. Nach einem weiteren Waschschrift in 50ml Kulturmedium erfolgte die Resuspension des Pellets in 10ml Medium, bevor die Zellen über ein Nylonsieb (100µm) gegeben und gezählt wurden. Die so gewonnen Primärzellen wurden in beschichteten Zellkulturschalen (150mm) mit einer Dichte von  $2\text{-}3 \times 10^7$  Zellen ausgesät und bei 37°C kultiviert (Passage 0). Am nächsten Tag erfolgte ein dreimaliges Waschen der Zellen mit PBS, um nicht adhärenente Zellen zu entfernen. Nach 2-4 Tagen Inkubation in Kulturmedium bei 37°C hatte sich ein konfluenten Zellrasen gebildet und im Anschluss an zwei weitere Waschschriffe, wurden die Zellen mittels 3ml 1x Trypsin/EDTA pro Kulturschale von deren Boden abgelöst. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde Medium zugegeben und bei 300xg für 5min zentrifugiert, anschließend konnte das Pellet in Einfriermedium aufgenommen werden. Pro 150mm Zellkulturschale wurden 4 Aliquots á 1ml Zellsuspension hergestellt (Passage 1), die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff (siehe 2.2.3.3). Eines dieser Aliquots wurde bei Gebrauch aufgetaut und auf 3-4 100mm Schalen gesplittet (Passage 2). Für Versuche wurden ausschließlich Zellen der 3. Passage verwendet (siehe auch Podlech et al., 2002).

### 2.2.3.3 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

<u>Einfriermedium:</u>	FCS 90% (v/v)
	DMSO 10% (v/v)

Zur langfristigen Lagerung erfolgte die Kryokonservierung der Zellen bei -196°C in flüssigem Stickstoff. 1ml Aliquots enthielten eine Zellzahl von  $\sim 5 \times 10^6$  in Einfriermedium, welches durch

seine hygroskopischen Eigenschaften die Bildung von zellschädigenden Eiskristallen verhinderte. Ein langsames Einfrieren der Zellen erfolgte durch eine Lagerung der Aliquots bei -70°C für 1-2 Tage, bevor diese in den Stickstoff-Tank überführt wurden. Im Gegensatz dazu erfolgte ein schnelles Auftauen der Zellen zur Rekultivierung in einem Wasserbad bei 37°C, anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und auf beschichteten Zellkulturschalen ausgesät.

#### 2.2.3.4 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde Trypanblau, ein saurer Farbstoff, welcher als Anion sehr leicht an Proteine binden kann, verwendet. Aufgrund der Membran-Durchlässigkeit toter Zellen, dringt Trypanblau in diese ein und es kommt zur Färbung des Zytoplasmas. Die Zellmembran lebender Zellen hingegen ist für ca. 5-10min undurchlässig für den Farbstoff.

Türks-Lösung färbt alle kernhaltigen Zellen ein und kann zur Unterscheidung zwischen Lymphozyten und Erythrozyten verwendet werden.

Zellsuspensionen wurden in geeigneter Verdünnung mit dem gewünschten Farbstoff angesetzt und in eine Neubauer Zählkammer (Kammertiefe 0,1mm) pipettiert. Dabei wurden 4 Großquadrate, bestehend aus jeweils 16 Kleinquadraten ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = N/n \times V \times 10^4$$

N: Anzahl gezählter Zellen

n: Anzahl der gezählten Großquadrate

V: Verdünnungsfaktor

10<sup>4</sup>: Kammerfaktor

#### 2.2.3.5 NPLC Isolierung via Optiprep Dichtegradient

GBSS-Puffer: (2.2.2.7)

OptiPrep™ Arbeitslösung 30% (w/v) in GBSS (Stocklösung 60% (w/v))

<u>Dissoziations-Lösung:</u>	GBSS-Puffer		20ml
	Kollagenase A (25mg/ml)	0,05%	400µl
	DNase (10mg/ml)	1000-2000U	100µl

Zur Isolierung der nichtparenchymalen Leberzellen (NPLC: *non parenchymal liver cells*) wurde die Leber nach Perfusion (siehe 2.2.2.7) in eine Petrischale überführt und die Gallenblase sowie Bindegewebe entfernt. Um die Dissoziation des Gewebes zu ermöglichen wurde die Leber mit zwei Pinzetten ausgestrichen und in einem Erlenmeyerkolben mit 20ml

Dissoziations-Lösung für 45 min bei 150 U/min und 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Dieser Schritt ermöglichte auch die Zerstörung der Hepatozyten. Die Aufnahme eines *pool* von bis zu 6 (3) Lebern erfolgte in 2x40ml (40ml) Dissoziations-Lösung. Anschließend wurde die Suspension über ein steriles Metallsieb gegeben und durch ein 100µm Nylonsieb filtriert, wobei für eine Leber ein 50ml Gefäß ausreichend war, ein *pool* von bis zu 6 (3) Lebern wurde auf 4 (2) Gefäße mit der entsprechenden Anzahl an Nylonsieben verteilt. Es folgten 2 Waschschriffe mit GBSS für 10min bei 400xg. Mittels OptiPrep™ Dichtegradient konnten die NPLC in der Interphase angereichert und isoliert werden. Dazu wurde das Zellpellet in 3ml GBSS aufgenommen und 4ml OptiPrep™ (Endkonzentration: ~17% (w/v)) Arbeitslösung dazugegeben. Die Aufnahme des Zellpellets eines Leberpools von 6 (3) Lebern erfolgte in 20ml (10ml) GBSS und 8ml (4ml) OptiPrep™ Stocklösung. Jeweils 7ml der Ansätze wurden in ein 15ml Falcon pipettiert und, um das Austrocknen der Zellen zu vermeiden, mit 2ml GBSS überschichtet. Dieser Schritt musste sehr vorsichtig von statten gehen, um das Aufwirbeln des Gradienten zu verhindern. Nach der Dichtegradientenzentrifugation für 15min bei 400xg ohne Bremse wurde die NPLC-haltige Interphase, zwischen OptiPrep™ Lösung und GBSS, abgenommen, über ein 40µm Nylonsieb filtriert und in einem Volumen von 10ml aufgenommen. Aus einer Leber konnten auf diese Weise ungefähr  $5 \times 10^6$ - $2 \times 10^7$  NPLCs isoliert werden.

### 2.2.3.6 LSEC Isolierung mittels MACS Separation

5x MACS Puffer:      EDTA                      10mM  
                                 BSA                              2,5% (w/v)  
                                 PBS                                ad 500ml  
                                 steril filtrieren, bei 4°C lagern  
                                 Gebrauchslösung: 1x MACS Puffer in PBS

Die magnetische Zellseparation (MACS: *Magnetic Cell Separation*) basiert auf der Verwendung paramagnetischer Partikel (*Micro-Beads*), welche an den Fc-Teil spezifischer monoklonaler Antikörper gekoppelt sind. *Micro-Beads* (Ø 50nm) besitzen das Potenzial magnetische Eigenschaften zu entwickeln, wenn sie in einem magnetischen Feld platziert werden. Nach Binden der *Bead*-gekoppelten Antikörper an Zellepitope werden die Zellen auf eine Säule gegeben und im Magnetfeld einer Separationsvorrichtung zurückgehalten. Ungebundene, unmarkierte Zellen durchlaufen die Säule, während die gebundenen Zellen außerhalb des Magnetfelds durch Spülen der Säule mit Druck eluiert werden (positive Selektion).

Zur Isolierung von sinusoidalen Leber-Endothelzellen (LSECs- *liver sinusoidal endothelial cells*) wurden CD146<sup>+</sup> *Micro-Beads* verwendet. Bei CD146 handelt es sich um ein Transmembran-Glykoprotein, welches als Zelladhäsionsmolekül fungiert und in der Maus

bevorzugt auf Endothelzellen (ECs) verschiedener Organe und Blutgefäße, aber nicht auf lymphatischem Endothel exprimiert wird (Schrage et al., 2008).

Nach dem Zählen der NPLC wurden diese einmal mit 50ml 1x MACS Puffer gewaschen, für 10min bei 400xg zentrifugiert und zur Separation mittels LS-Säulen (Kapazität:  $2 \times 10^9$  Gesamtzellen) in 90µl 1x MACS Puffer/ $1 \times 10^7$  Zellen und 10µl *Beads*/ $1 \times 10^7$  Zellen aufgenommen. Die Aufreinigung der LSEC erfolgte nach dem Protokoll der Firma Miltenyi ([http://www.miltenyibiotec.com/download/datasheets\\_en/358/MiltenyiBiotec\\_DataSheet\\_CD146-%28LSEC%29-MicroBeads,-mouse\\_130-092-007.pdf](http://www.miltenyibiotec.com/download/datasheets_en/358/MiltenyiBiotec_DataSheet_CD146-%28LSEC%29-MicroBeads,-mouse_130-092-007.pdf)). Anschließend wurden die Zellen gezählt (erwartete Zellzahl aus einer Leber:  $2,5 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  LSEC), bei 400xg für 10min pelletiert und bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.2.3.7 Isolierung von Lymphozyten aus Lungengewebe

Heparin (10U/ml) 0,2% (v/v) in PBS

Kulturmedium: DMEM+10% FCS

Kollagenase A (25mg/ml)

DNase I (3mg/ml)

Ficoll

EtOH 70% (v/v)

Die Mäuse wurden mit  $\text{CO}_2$  begast, in 70% (v/v) EtOH desinfiziert und fixiert. Nach Öffnen von Bauchraum und Thorax, erfolgte eine Lungenspülung mit Heparin/PBS zur Entfernung intravasaler Blutzellen. Dazu wurden *Vena* und *Arteria subclavia*, *Aorta abdominalis* und *Vena cava inferior* eröffnet, der rechte Ventrikel mit einer Kanüle punktiert und die Lunge mit PBS/Heparinlösung mit Hilfe der Peristaltikpumpe gespült. Die Durchflussrate der Spüllösung wurde auf 5ml/min eingestellt. Dabei konnte eine deutliche Volumenzunahme und Weißfärbung der Lunge wahrgenommen werden. Befreit von Tracheen und Bronchien wurde das Lungengewebe mit einer Schere zerkleinert und in einem Erlenmeyerkolben mit 15 ml Kulturmedium + 1ml Kollagenase A (Endkonzentration 1,6mg/ml) + 300µl DNase I (Endkonzentration 0,06mg/ml) für 1h bei  $37^\circ\text{C}$  in einem Schüttelwasserbad (150U/min) dissoziiert. Anschließend erfolgte die Filtration der Suspension über ein steriles Metallsieb, und die Zellen wurden bei 700xg für 7min zentrifugiert. Nach Trennen von Pellet und Überstand, wurde der Überstand ein weiteres Mal zentrifugiert (700xg, 7min). Danach erfolgte die Resuspension der beiden resultierenden Pellets in 16ml Kulturmedium, sowie die Filtration des Ansatzes über ein  $100\mu\text{M}$  Nylonsieb. Die Lymphozyten konnten mit Hilfe eines Ficoll-Dichtegradienten von Erythrozyten, Granulozyten und übrigen Zellen getrennt werden. Dazu erfolgte die Überschichtung von jeweils 8ml Zellsuspension mit 4ml Ficoll, gefolgt von

einer Zentrifugation für 30min bei 750xg. Die lymphozytenhaltige Interphase wurde abgenommen, mit 20ml Kulturmedium gewaschen (700xg, 7min) und je nach Größe des Pellets in 2-3ml Medium aufgenommen. Nach dem Zählen der Lymphozyten, wurden diese auf  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt und zur zytofluorometrischen Analyse gefärbt (siehe 2.2.4.2).

### 2.2.3.8 Isolierung von Lymphozyten aus Milzgewebe

1x MACS Puffer: (siehe 2.2.3.6)

#### Erythrozyten-Lysepuffer

Die Milz wurde entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in Kulturmedium gelagert, dieses wurde anschließend verworfen und die Organe über ein steriles Metallsieb gerieben. Es folgte ein Waschschrift in 50ml 1x MACS Puffer (400xg, 5min). Zur Lyse der Erythrozyten erfolgte die Resuspension des Pellets in 10ml Lysepuffer, dies geschah unter gelegentlichem Schütteln für 1min bei 23°C. Nach einem weiteren Wachschrift in 50ml 1x MACS Puffer (400g, 5min), wurde das entstandene Pellet in 3-4ml 1x MACS Puffer aufgenommen und über ein 40µm Nylonsieb filtriert. Zur zytofluorometrischen Analyse (siehe 2.2.4.2) wurden die Zellen gezählt und auf  $2 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt.

### 2.2.3.9 Stimulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit synthetischen Peptiden

Cytofix/Cytoperm Plus Kit (enthält Brefeldin A (*GolgiPlug*))

Medium: 1x MEM+

mCMV-spezifische Peptide:

ORF	Peptidsequenz (Position im Protein)	MHC-I Restriktion	Referenz
M105	<sup>207</sup> TYWPVVSDI <sup>215</sup>	K <sup>d</sup>	Holtappels et al., 2008
m123	<sup>168</sup> YPHFMPNL <sup>179</sup>	L <sup>d</sup>	Reddehase et al., 1989

Die Peptide wurden von der Firma JPT Peptide Technologies GmbH bezogen. Die Lagerung der Peptid-Lyophilisate erfolgte bei -70°C, die der Peptid-Stammlösungen ( $10^{-3}/10^{-4}$ M) bei -20°C.

Isolierte Lymphozyten aus Lungen- und Milzgewebe latent infizierter BALB/cJ Mäuse (siehe 2.2.3.7 und 2.2.3.7) wurden in Kulturmedium auf eine Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/130µl Medium eingestellt. Anschließend erfolgte die Ko-Kultivierung mit antigenem Peptid, dazu wurden  $10^{-5}$ M Peptid/20µl PBS (Endkonzentration  $10^{-6}$ M) sowie 50µl BrefeldinA (Verdünnung 1:1000) zugegeben und die Ansätze 5h bei 37°C inkubiert. Währenddessen kommt es zu einer Peptid-vermittelten Stimulation der Peptid-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, woraufhin diese



IFN- $\gamma$  produzieren. Der Zusatz von BrefeldinA bewirkt die Akkumulation von Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum (ER), indem es den Transport zwischen Golgi-Apparat und ER blockiert.

#### 2.2.3.10 DT-Behandlung infizierter MEF

Das DT wurde, wie unter 2.2.2.4 beschrieben, gelagert und mit einer Endkonzentration von 100ng/ml direkt nach der zentrifugalen Infektion auf die Zellen gegeben. MEF, welche mit einer DTR-Virusmutante infiziert wurden und nach IE-Genexpression den DTR auf der Oberfläche exprimieren, sind suszeptibel für DT, es kommt zur Hemmung der Proteinbiosynthese und letztlich zur Induktion von Apoptose.

### 2.2.4 Zytofluorometrische Methoden

Zur zytofluorometrischen Zellanalyse wurde ein Cytomics FC 500 Durchflusszytometer der Firma Beckman Coulter verwendet. Dieses System ist mit 2 Lasern ausgestattet (blau 488nm und rot 633nm) und durch die Menge entsprechender Filter in der Lage, bis zu 5 Fluoreszenzfarbstoffe (Emission: 525nm, 575nm, 620nm, 675/695nm und 755nm) gleichzeitig zu detektieren. Die Separation von Zellen mittels FACS Aria III von BD Biosciences wurde in der FACS Core Facility des IMB (*Institute of Molecular Biology*) Mainz durchgeführt.

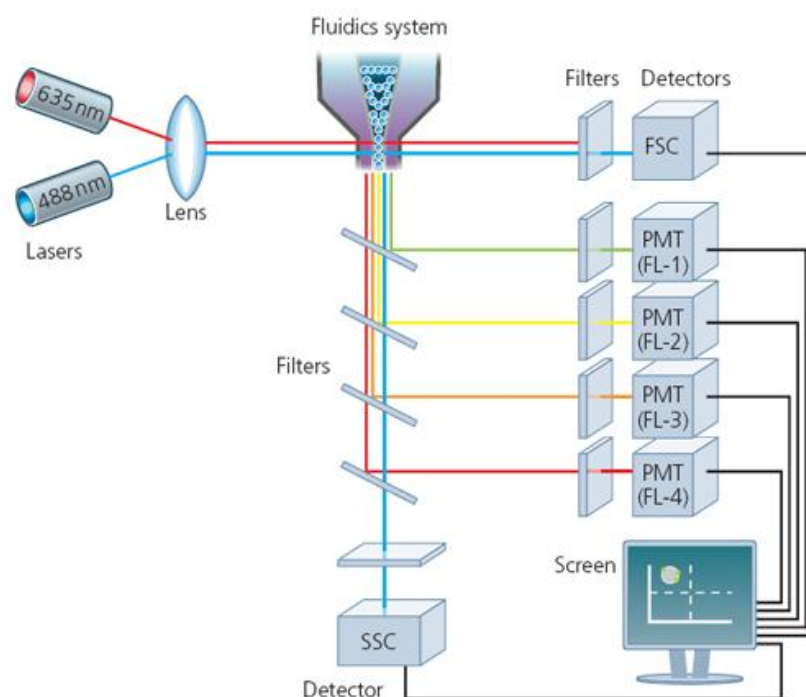
#### 2.2.4.1 Funktionsprinzipien des Durchflusszytometers

Unter Durchflusszytometrie versteht man den Prozess der Messung physikalischer und molekularer Charakteristika von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Zur Analyse nutzt das System die Prinzipien des entstehenden Streulichtes der Zellen, wenn sie einzeln eine elektrische Spannung oder einen Lichtstrahl passieren, sowie die Emission von optischen Signalen zellgebundener Fluorochrome. Eine bestimmte Form der Durchflusszytometrie, auch FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) genannt, wird nicht nur zur Analyse sondern zusätzlich für die Separation verschieden markierter Zellen in unterschiedliche Reaktionsgefäße verwendet. Während der Messung werden die Zellen aus dem Probenröhrchen in eine Kapillare gesaugt, in einer Hüllflüssigkeit verdünnt und über Luftdruck in den Mikrokanal einer hochpräzisen Messküvette geleitet. Diese hydrodynamische Fokussierung erlaubt es Einzelzellen, den Laser zu passieren (Haynes, 1988). Im Moment des Durchtrittes wird die Lichtstreuung in einem Winkel von 90° als Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) sowie die Streuung in einem engen Winkel (2°-10°) als Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) gemessen. Der FSC ist ein Maß für die Größe

der Zellen, über den SSC erhält man Angaben zur Granularität der Zellen. Neben der Definition zellmorphologischer Eigenschaften können unter Verwendung fluorchromkonjugierter Antikörper spezifische Oberflächenantigene von Zellen detektiert werden. Der Einsatz verschiedener Fluorochrome erlaubt dabei den Nachweis mehrerer Antigene gleichzeitig. Durch Laserlicht angeregte Fluorochrome emittieren Photonen einer bestimmten Wellenlänge. Farbteilerspigel und Bandpassfilter sorgen für die optische Trennung der Emissionsspektren und die unterschiedlichen Lichtsignale werden über Photomultiplier (PMT) in elektrische Signale umgewandelt (siehe Abb. 2.1). In dieser Arbeit wurden die Detektoren wie folgt nummeriert und zur Messung der angegebenen Fluorochrome verwendet:

FL-1: FITC; FL-2: PE; FL-3: APC; FL-4: Cy5; FL-5: Cy7.

Neben fluoreszenzkonjugierten kamen auch DNA-interkalierende Farbstoffe wie z.B. Propidiumiodid (PI) zum Einsatz. Im Falle von spektralen Überlappungen der Emissionsspektren von Fluorochromen wurde das Fluoreszenzsignal der Überlappung, durch elektronische Kompensation vom Gesamt-Fluoreszenzsignal subtrahiert. Die Auswertung der Daten erfolgte unter Zuhilfenahme des Analyse-Software CXP oder Kaluza.



**Abb. 2.1: Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers**

(<http://www.abdserotec.com/resources/flow-cytometry-ebook/principles-of-the-flow-cytometer/signal-processing.html>).

### 2.2.4.2 Fünffach-Färbung zur Charakterisierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Latenz

#### 1x MACS-Puffer: (2.2.3.6)

Zur Charakterisierung Peptid-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen während der Viruslatenz wurden, mit mCMV-WT-BAC infizierte, BALB/cJ Mäuse verwendet (siehe 2.2.2.5). Die Analyse von Milz- und Lungenzellen, aufgereinigt wie unter 2.2.3.7 und 2.2.3.8 beschrieben, fand in den Monaten 4, 6 und 8 nach KMT statt. In der Durchflusszytometrie kam stets ein *pool* von 5 Milzen sowie ein *pool* der linken Lungenhälften von 5 Tieren zum Einsatz. Die Proben wurden zur Charakterisierung Peptid-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit folgenden Antikörpern gefärbt: CD8-FITC, KLRG1-PE, Dextramer-APC, CD127-PC5, CD62L-PC7. Bei den verwendeten Dextrameren handelt es sich um, an ein Dextran-Rückgrat gebundene, MHC Moleküle in Kombination mit Fluorochromen, welche zur Detektion Antigen-spezifischer T-Zellen mittels Durchflusszytometrie genutzt werden. Peptid-beladene MHC-Moleküle bilden einen MHC-Peptid-Komplex, welcher von spezifischen T-Zell-Rezeptoren erkannt wird (Rötzschke et al., 1990). Dies erlaubt die Detektion, Isolierung und Quantifizierung der spezifischen T-Zell-Populationen. Das Dextran-Polymer-Rückgrat stabilisiert sowohl die MHC-Peptid-Komplexe sowie die Fluorochrome und führt zu genaueren Resultaten als der Einsatz von Tetrameren.

#### Färbeprotokoll:

Eine Reduktion unspezifischer, Fc-Rezeptor-vermittelter Bindungen wurde durch Inkubation (10min, 4°C, dunkel) der zu färbenden Zellen ( $1 \times 10^6$  Lungenzellen bzw.  $2 \times 10^6$  Milzzellen) mit einem CD16/CD32-FcγIII/II-Rezeptor-Antikörper erreicht. Dazu wurden pro Probenröhrchen 1μl des Blockierungsantikörpers in 49μl 1x MACS-Puffer auf ein Zellvolumen von 100μl gegeben. Nach einem Waschschrift in 1x MACS-Puffer (250xg, 5min), erfolgte die Resuspension des Pellets zur Dextramerfärbung mit 10μl der spezifischen MHC-Peptid-Komplex-Lösung. Der Ansatz wurde bei 20°C für 10 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen mit dem unten angegeben Antikörpermix versetzt und für 20min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Bevor die durchflusszytometrische Messung erfolgte, wurden die Zellen abermals in 1x MACS-Puffer gewaschen, bei 250xg für 5min zentrifugiert und in 500μl 1x MACS-Puffer aufgenommen.

Antikörperfärbung	1x
CD127 FITC	1 μl
KLRG1-PE	1μl
CD8a-ECD	0,8μl
CD62L-PECy7	1μl
1x MACS-Puffer	46,2μl

### 2.2.4.3 Intrazelluläre IFN- $\gamma$ Färbung

1x MACS-Puffer: (2.2.3.6)

Cytofix/Cytoperm Plus Kit

Zunächst erfolgte die Färbung der Oberflächenmoleküle anhand des in 2.2.4.2 beschriebenen Protokolls, allerdings wurden hier nur der Antikörper CD8 $\alpha$ -ECD sowie die IE1- und M105-spezifischen Dextramere verwendet. Anschließend wurden die Zellen in 1x MACS-Puffer gewaschen (250xg, 5min) und zur Permeabilisierung in 200 $\mu$ l *Cytofix/Cytoperm* aufgenommen. Nach 20 minütiger Inkubation bei 4°C, erfolgte ein Waschschriff mit 1ml *PermWash*-Puffer (250xg, 5min) und die intrazelluläre Färbung mit dem IFN- $\gamma$ -FITC Antikörper (0,25  $\mu$ g/10<sup>6</sup> Zellen, 20min, 4°C). Bevor die durchflusszytometrische Messung erfolgte, wurden die Zellen erneut in 1ml *PermWash*-Puffer gewaschen (250xg, 5min) und in 700 $\mu$ l 1x MACS-Puffer aufgenommen.

### 2.2.4.4 Apoptosemessung mittels Annexin V und 7-AAD- bzw. PI-Färbung

Annexin V/-AAD Kit von Beckman Coulter

Annexin V/PI Kit von eBioscience

Apoptose ist, im Gegensatz zur Nekrose, eine Form des programmierten Zelltods und wird als Folge externer oder interner Trigger von der Zelle selbst aktiv durchgeführt (physiologischer Untergang der Zellen). Nekrose hingegen kann durch Gifte, Bakterien und andere schädigende Einflüsse ausgelöst werden, die Zellen schwellen an und die Plasmamembran wird zerstört (pathologischer Untergang der Zellen). Die Hauptcharakteristika der Apoptose sind Reduktion des Zellvolumens, Chromatin-Kondensation, DNA-Fragmentierung und Bildung membranumgebener, apoptotischer Körperchen (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1984). Ein weiteres frühes Ereignis, welches während der Apoptose auftritt, ist die Translokation des membranständigen Phospholipids Phosphatidylserin (PS) von der inneren zur äußeren Seite der Plasmamembran (Martin et al., 1995). Dieses Phänomen wird bei der Analyse apoptotischer Zellen in der Durchflusszytometrie genutzt. Annexin V, ein Ca<sup>2+</sup>-abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität zu PS wird zu diesem Zweck mit einem Fluorochrom gekoppelt (Koopman et al., 1994; Vermes et al. 1995). Aufgrund der zerstörten Membranintegrität ist das PS nekrotischer Zellen ebenfalls für Annexin V zugänglich. Daher ist eine weitere Färbung mit einem DNA interkalierenden Farbstoff (PI, 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD)), welcher nicht membrangängig ist, von Nöten. Apoptotische Zellen sind demzufolge Annexin V<sup>+</sup> PI/7-AAD<sup>-</sup>, nekrotische Zellen Annexin V<sup>+</sup> PI/7-AAD<sup>+</sup>.

*In vitro:*

Auf 6-well Zellkulturplatten konfluent gewachsene MEF wurden mit einer MOI von 4 mit der Virusmutante mCMV- $\Delta$ ie2-DTR infiziert (siehe 2.2.1.4). Anschließend wurde DT, wie unter 2.2.3.9 beschrieben, dazugegeben. Die Analyse erfolgte nach 48h, dazu wurden die Zellen trypsiniert, in Medium aufgenommen, bei 500xg für 5min pelletiert und gefärbt (siehe unten).

Annexin V/7-AAD Kit von Beckman Coulter:

Alle Schritte erfolgten unter Verwendung 4°C kalter Lösungen. Die Zellen wurden in PBS aufgenommen, nach der Bestimmung der Zellzahl schloss sich ein Waschschriff mit 1x Binde-Puffer (500xg, 5min) und die Aufnahme des Pellets in 100 $\mu$ l 1x Binde-Puffer an. 2,5-5x10<sup>6</sup> Zellen wurden mit 10 $\mu$ l  $\alpha$ -Annexin V-FITC-AK und 20 $\mu$ l 7-AAD für 15min bei 4°C in Dunkeln gefärbt. Nach Zugabe von 400 $\mu$ l 1x Binde-Puffer fand die Analyse im Durchflusszytometer innerhalb von 30min statt.

*In vivo:*

BALB/cJ Mäuse wurden durch Bestrahlung mit einer Dosis von 6,5Gy immunsupprimiert und mit mCMV- $\Delta$ ie2-DTR (1x10<sup>5</sup> PFU in 500 $\mu$ l PBS) *i.v.* infiziert. Die Injektion von 30ng DT/g Maus erfolgte 6x, beginnend bei -6h vor Infektion in einem Intervall von 16h (siehe 2.2.2.4). Anschließend wurde den Tieren die Leber entnommen, um daraus die LSECs zu isolieren (siehe 2.2.2.7, 2.2.3.5 und 2.2.3.6).

Annexin V/PI Kit von eBioscience:

Bis zur Zugabe der Fluorophore waren alle Schritte identisch zu jenen im oben beschriebenen Kit. Hier wurden 1-3x10<sup>7</sup> Zellen mit 15 $\mu$ l  $\alpha$ -Annexin V-APC-AK in einem Volumen von 500 $\mu$ l 1x Binde-Puffer für 10-15min bei 23°C gefärbt. Danach wurden die Zellen in 1x Binde-Puffer gewaschen (500xg, 5min) und anschließend in 200 $\mu$ l desselben aufgenommen. Nach Zugabe von 5 $\mu$ l PI erfolgte unverzüglich die Analyse.

#### **2.2.4.5 Durchflusszytometrie mit anschließender Zell-Sortierung zum Ausschluss apoptotischer Zellen**

Die Separation der, wie unter 2.2.4.4 beschrieben, infizierten und gefärbten Zellen erfolgte in der FACS Core Facility des IMB (*institute of molecular biology*) in Mainz mittels eines FACSAria III von BD Biosciences. Die vitalen Annexin V<sup>-</sup> PI/7-AAD<sup>-</sup> Zellen wurden von den toten Zellen getrennt. Bis zur weiteren Analyse erfolgte die Lagerung der Probenpellets bei -70°C.

## 2.2.5 Molekularbiologische Methoden: DNA

### 2.2.5.1 Isolierung von DNA

Zur Isolierung viraler DNA wurde das *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* von Roche verwendet. Es basiert auf der spezifischen Bindung von Nukleinsäuren an die Oberfläche einer Glasfaser-Membran unter Anwesenheit chaotroper Salze (Vogelstein & Gillespie, 1979). DNA aus Organen und Zellpellets wurde mit Hilfe des *DNeasy Blood and Tissue Kits* von Qiagen isoliert, hier wird eine Silica-Membran zum Binden der DNA eingesetzt. Nach dem spezifischen Bindeprozess an die jeweilige Membran kann die Nukleinsäure durch Waschschriffe von Salzen, Proteinen sowie anderen Verunreinigungen befreit und in einem Puffer mit geringem Salzgehalt eluiert werden.

#### 2.2.5.1.2 DNA Isolierung aus Organen

*DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen)

EtOH 100% (v/v)

*AllPrep DNA/RNA Kit* (Qiagen)

Bevor die DNA isoliert werden konnte, mussten die Organe zuerst lysiert und homogenisiert werden, was mit Hilfe der Schwingmühle MM300 geschah. Nach dem Wiegen der Organstücke wurden jeweils 180µl ATL-Puffer pro 10mg Milz bzw. pro 25mg der übrigen Organe sowie 2 Stahlkugeln (Ø 3mm) zugegeben und der gesamte Ansatz in 2ml Reaktionsgefäßen bei 30 Hertz für 5min lysiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20µl Proteinase K pro 10mg Milz bzw. pro 25mg aller anderen Organe, sowie die Lyse des Gewebes durch üN Inkubation bei 56°C unter Schütteln. Am nächsten Tag wurden 200µl der Suspension zur DNA-Isolierung verwendet, diese fand dem Versuchsprotokoll von Qiagen ab Schritt 3 folgend statt, die Elutionsmenge betrug 100µl: [http://www.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000641&r=955AnimalTissues\(Spin-Column Protocol\)](http://www.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000641&r=955AnimalTissues(Spin-Column Protocol)).

War eine gleichzeitige Isolierung von DNA und RNA aus demselben Gewebe von Interesse, wurde das *AllPrep DNA/RNA Kit* von Qiagen verwendet (siehe 2.2.6.2.2). Die Aufreinigung fand nach den Angaben des Versuchsprotokolls der Firma statt: <http://www.qiagen.com/products/rnastabilizationpurification/rnadnasystem/allprepdnarnaminikit.aspx#Tabs=t2>.

### 2.2.5.1.3 DNA Isolierung aus Zellen

#### DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen)

#### EtOH 100% (v/v)

Die DNA Isolierung aus Zellen wurde mit Hilfe des *DNeasy Blood and Tissue Kits* komplett nach dem Versuchsprotokoll von Qiagen durchgeführt, die Elutionsmenge betrug je nach Zellpellet 30-100µl: <http://www.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000641&r=955> *Animal Blood (Spin-Column Protocol)*.

### 2.2.5.1.4 Isolierung viraler DNA

#### High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche)

Virale DNA wurde aus 200µl Virusüberstand oder 20µl Virusstock in 180µl Binde-Puffer isoliert. Um die Viruslyse zu gewährleisten, erfolgte die Zugabe von jeweils 50µl Proteinase K und 3,2µl PolyA<sup>+</sup> RNA. Dieser Ansatz wurde anschließend mit 200µl Binde-Puffer versehen und für 10min bei 72°C inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden nach Versuchsprotokoll der Firma Roche durchgeführt, das Elutionsvolumen betrug je nach Ausgangsmaterial 30-100µl: [https://www.roche-applied-science.com/PROD\\_INF/MANUALS/napi\\_man/pdf/chapter%202/page%2087-91.pdf](https://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS/napi_man/pdf/chapter%202/page%2087-91.pdf)

### 2.2.5.1.5 Präzipitation von Nukleinsäuren

#### EtOH 100% (v/v)

#### EtOH 70% (v/v)

Natriumacetat (3M):      NaAcx3H<sub>2</sub>O      40,824g  
    H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub>      ad 100ml  
    pH-Wert mit Eisessig auf 5,2 einstellen, autoklavieren

Tris-Puffer (10mM):      Tris                      1,211g  
    H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub>              ad 1l  
    pH-Wert mit HCl auf 8,0 einstellen, autoklavieren

Durch Zugabe von monovalenten Kationen und Alkohol können Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen ausgefällt werden (Eickbush & Moudrianakis, 1978). Bezogen auf das Volumen der zu fällenden Nukleinsäure wurden 1/10 Volumen Natriumacetat und die 2,5x Menge Ethanol (100% (v/v)) als Fällungsreagenzien verwendet. Die Proben wurden bei -20°C üN oder bei -70°C für 3-4h gefällt, wobei die niedrigere Temperatur ein schnelleres Fällen bewirkt. Jedoch besteht dadurch die Gefahr, dass Salze mit ausfallen, was vor allem für geringere DNA-Mengen kritisch ist. Anschließend konnte die Nukleinsäure bei 20.000xg und 4°C für 30min pelletiert, mit 200µl 70% Ethanol (v/v) gewaschen (20.000xg, 4°C, 10min)

und für 15min bei 23°C getrocknet werden. Das Pellet wurde in einem geeigneten Volumen Tris-Puffer aufgenommen.

#### 2.2.5.1.6 Reinheits- und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA und RNA Proben wurde standardmäßig mit Hilfe eines Photometers (Nanodrop-1000) bei 260nm spektrophotometrisch gemessen. Das Gerät hat einen spektralen Bereich von 220-750nm und einen minimalen Messbereich von 2-3,7ng/μl für dsDNA, sowie 2-3ng/μl für RNA. Da das Absorptionsverhalten von Nukleinsäuren in nichtgepufferten Lösungen stark variiert (Wilfinger et al., 1997), wurden die Proben stets in Tris gepuffertem Wasser aufgenommen. Der Konzentrationsberechnung wurden folgende Werte zugrunde gelegt:

Extinktion<sub>260nm</sub> = 1       $\triangleq$  50μg/ml bei dsDNA  
                                      40μg/ml bei ssRNA  
                                      33μg/ml bei ssDNA

Das Messen der Reinheit von Nukleinsäuren in Hinblick auf Proteinkontaminationen wird durch zusätzliches Ermitteln der Extinktion bei 280nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) gewährleistet. Proben mit einem Quotienten von  $E_{260}/E_{280}$  1,8-2,0 für DNA bzw. 2,0 für RNA werden allgemein hin als „rein“ bezeichnet (Sambrook et al., 1989; Manchester, 1996). Die Genauigkeit dieser Messmethode wird jedoch hinterfragt (Bustin & Nolan, 2004). Des Weiteren muss beachtet werden, dass keinerlei Information über die Integrität der Nukleinsäure gegeben wird, hierfür können Chip-Technologien, wie z.B. Experion von Bio-Rad herangezogen werden.

#### 2.2.5.2 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine der wichtigsten Methoden der modernen Molekularbiologie, sie wurde 1987 von Mullis & Falloona entwickelt und von Saiki et al. 1989 optimiert. Durch Einsatz des Enzyms DNA-Polymerase können während der PCR selektiv bestimmte Sequenzabschnitte einer DNA amplifiziert werden. Dazu werden Sequenz-spezifische Oligonukleotide (*Primer*) verwendet, welche die Enden der zu amplifizierenden Sequenz definieren. Ein PCR-Zyklus beginnt mit der Denaturierung des DNA-Doppelstranges, dies geschieht bei 94-95°C, wobei die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden DNA-Strängen aufgebrochen werden. Durch Reduzierung der Temperatur, abhängig von *Primer*-Sequenz und -Länge, können die Oligonukleotide an die einzelsträngige DNA binden (*Annealing*). Im Anschluss an die Hybridisierung erfolgt die Elongation, katalysiert durch die DNA-Polymerase werden bei 72°C DNA-Doppelstränge neu



synthetisiert. Da es in jedem Zyklus optimaler Weise zur Verdopplung der Moleküle kommt, können theoretisch bei  $n$  Zyklen  $2^n$  Moleküle entstehen. Das Design der *Primer* erfolgte mit Hilfe der Programme PrimerExpress 2.0, BeaconDesigner (<http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1>) oder OligoArchitect™ (<http://www.OligoArchitect.com/Login.jsp>). Es musste darauf geachtet werden, dass die *Primer* eine Länge von mindestens 17 Basen haben, ihre Spezifität gewährleistet ist (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) und es nicht zur Bildung von *Primer*-Dimeren kommt. Im Falle einer quantitativen *Real Time* PCR (qPCR), musste darauf geachtet werden, dass die zu amplifizierende Sequenz möglichst kurz ist und ihre Sekundärstruktur überprüft wurde (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>).

#### Standard HiFidelity PCR Ansatz:

Komponenten	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
5x HotStar HiFidelity PCR Buffer	10µl	1x, 0,3µM dNTPs
<i>Primer-For</i> (10µM)	2,5µl	0,5µM
<i>Primer-Rev</i> (10µM)	2,5µl	0,5µM
HotStar HiFidelity DNA Polymerase (2,5 units/µl)	1µl	2,5 U
H <sub>2</sub> O <sub>reinst.</sub>	variabel	
<i>Template</i> DNA	variabel	0,1-50ng Plasmid DNA
Gesamtvolumen	50µl	

#### Standard HiFidelity PCR Profil:

Schritt	Zeit	Temperatur	Bemerkung
Initialer Aktivierungsschritt	5min	95°C	
3-Schritt <i>Cycling</i>			Zyklenzahl 30-45
Denaturierung	15s	94°C	
<i>Annealing</i>	1min	50-68°C	Abhängig von <i>Primer</i> -Sequenz
Elongation	1min	72°C	Für PCR-Produkte ≤ 2kb
Abschließende Elongation	10min	72°C	
Ende	∞	4°C	

### 2.2.5.3 qPCR

Die quantitative *Real Time* PCR (qPCR) beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, ermöglicht aber zusätzlich die Quantifizierung der Amplifikate während dem Ablauf der PCR (allgemeiner Überblick: Bustin, 2004), hier sind also Aussagen über die Ausgangskonzentration der DNA-Matrize möglich. Allgemein kann man die PCR in drei Phasen unterteilen, die frühe „Hintergrundphase“, die exponentielle Wachstumsphase und die Plateauphase, wobei die konventionelle PCR lediglich die Plateauphase sichtbar macht. In der qPCR erfolgt die Quantifizierung der Amplifikate in der exponentiellen Wachstumsphase mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen. Ein Anstieg des

Fluoreszenzsignals korreliert dabei direkt mit der eingesetzten Menge an spezifischer Matrize, die Amplifikation kann also folgendermaßen beschrieben werden:

$$N = N_0 \times (E_{\text{const}})^n$$

E: PCR Effizienz; von 1 = keine Amplifikation bis 2 = Verdopplung (100% Effizienz)

N: Anzahl der amplifizierten Moleküle

$N_0$ : Initiale Menge an Molekülen

n: Anzahl der Zyklen

Zur Detektion werden entweder nicht-Sequenz-spezifische Fluorochrome, welche mit dsDNA interkalieren (SYBR-Green) oder Sequenz-spezifische Sonden eingesetzt, wie z.B. TaqMan-Sonden, Hybridisierungs-Sonden, *Molecular Beacons* oder *Scorpion-Primer*. In dieser Arbeit wurden ausschließlich TaqMan-Sonden verwendet (siehe 2.1.8.2), diese tragen an ihrem 5'-Ende einen Reporter-Farbstoff und am 3'-Ende einen *quencher*. Befinden sich Reporter und *quencher* in unmittelbarer Nähe kann die emittierte Fluoreszenz des angeregten Reporter-Farbstoffes vom *quencher* aufgenommen werden und es kommt zur Fluoreszenzlöschung (*dark-quencher*) bzw. zur Änderung der Wellenlänge, was die Detektion der Fluoreszenz im Filter des Reporter-Fluorophors verhindert. Während der Elongationsphase der PCR wird die Sonde durch die 5'→3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase abgebaut (Holland et al., 1991), was zur räumlichen Trennung von Reporter und *quencher* führt und die Detektion der Reporter-Fluoreszenz ermöglicht. Die Analysen erfolgten mit Hilfe des TaqMan 7500 *Real Time* PCR Gerätes von Applied Biosystems. Dieses Gerät besitzt 5 Filter, mit denen beispielsweise die folgenden, häufig verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe detektiert werden können: Filter 1: Fam, SYBR-Green; Filter 2: Joe, HEX; Filter 3: TAMRA; Filter 4: ROX; Filter 5: Cy-5. Der Farbstoff ROX wurde als passive Referenz eingesetzt, um die Reportersignale der einzelnen Ansätze zu normalisieren, er war bereits im verwendeten *Master Mix* enthalten.

#### Singleplex qPCR Ansatz:

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
2x TaqMan® Universal PCR Master Mix, ohne AmpErase® UNG mit AmpliTaq Gold®DNA Polymerase	10µl	1x
Primer-For (10µM)	2µl	1µM
Primer-Rev (10µM)	2µl	1µM
Sonde (10µM)	0,5µl	0,25µM
H <sub>2</sub> O <sub>reinst.</sub>	variabel	
Template DNA	variabel	≤ 1µg
Gesamtvolumen	20µl	

In einer Duplex-Reaktion wurden die beiden *Primer*-Paare jeweils 0,4µM eingesetzt, die Sonden 0,25µM.

qPCR Profil:

Schritt	Zeit	Temperatur	Bemerkung
Initialer Aktivierungsschritt	10min	95°C	
2-Schritt <i>Cycling</i>			Zyklenzahl 50
Denaturierung	15s	94°C	
<i>Annealing</i> /Elongation	1min	60°C	Daten Akquisition

Für genauere Information siehe: [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_042996.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042996.pdf).

#### 2.2.5.4 Plasmid Standards zur absoluten Quantifizierung

Für die absolute Quantifizierung wurden Plasmide einer definierten Teilchenzahl über mehrere Stufen  $\log_{10}$  titriert und in die qPCR eingesetzt. Zuvor wurden die Plasmide (siehe 2.1.9) zunächst linearisiert (siehe 2.2.5.8), über ein Agarosegel aufgereinigt (siehe 2.2.5.6) und die DNA-Konzentration bestimmt (siehe 2.2.5. 1.6), anschließend erfolgte die Berechnung der Teilchenzahl mit folgender Formel:

$$\text{Teilchenzahl [Plasmide}/\mu\text{l}] = \frac{6 \times 10^{23} \text{ [Kopien/mol]} \times \text{DNA-Konzentration [g}/\mu\text{l}]}{\text{MW [g/mol]}}$$

MW für dsDNA: Plasmidgröße [bp] x 660 Dalton/bp

Teilsequenzen der Plasmide wurden in der qPCR amplifiziert dabei ermöglichte der Einsatz verschiedener Titrationsstufen die Generierung von Standardkurven. Anhand dieser konnten unbekannte Proben quantifiziert werden. Die Berechnung der Effizienz der PCR erfolgte anhand der Steigung (m) der Standardkurve nach folgender Rechnung:

$$\text{Effizienz} = 10^{(-1/m)} - 1$$

Eine Effizienz von 100% entspricht einer Steigung von -3,32. Eine zufriedenstellende Reaktion sollte eine Effizienz von 80%-100% (Steigung -3,9 bis -3,32) vorweisen.

### 2.2.5.5 Native Gelelektrophorese von DNA

50xTAE-Puffer:	Tris	400mM
	EDTAx2H <sub>2</sub> O	10mM
	ad H <sub>2</sub> O demin.	
	pH-Wert mit Eisessig auf 8,0 einstellen, autoklavieren	
	Gebrauchslösung: 1x TAE in H <sub>2</sub> O demin.	
10xTBE-Puffer:	Tris	450mM
	EDTAx2H <sub>2</sub> O	10mM
	Borsäure	450mM
	ad H <sub>2</sub> O demin.	
	pH-Wert mit Eisessig auf 8,3 einstellen, autoklavieren	
	Gebrauchslösung: 1x TBE in H <sub>2</sub> O demin.	
10xProbenpuffer:	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
	Saccharose	40% (w/v)

In Agarosegelen werden DNA Fragmente nach ihren Molekulargewichten elektrophoretisch aufgetrennt. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, Größenabschätzungen von DNA Fragmenten, Konzentrationsbestimmungen, Reinigung von linearen DNA Fragmenten nach PCR oder Restriktion, Intaktheitsüberprüfungen oder präparative Aufreinigungen von Nukleinsäuren durchzuführen. Je nach Größe der DNA Fragmente wurden Agarosekonzentrationen von 1-3% in 1xTAE Puffer verwendet und Gele einer Größe von 10x6,5cm, 20x10cm oder 20x20cm gegossen. Restringierte BAC-Plasmide mit Fragmentgrößen von 1-30kbp wurden in 0,7%igen Gelen (20x25cm) bei 4°C üN aufgetrennt (Gel-Herstellung siehe Gassen & Schimpf, 2002), dabei kam 1xTBE als Laufpuffer zum Einsatz, da dieser eine höhere Pufferkapazität im Vergleich zu TAE Puffer hat. Durch Aufkochen konnte die entsprechende Agarosemenge in dem jeweiligen 1x Puffer gelöst und nach Abkühlen unter Zusatz von Ethidiumbromid (Endkonzentration 1µg/ml) in einen Elektrophoreseschlitten gegossen werden. Ethidiumbromid ist ein DNA interkalierendes Reagenz, welches unter UV-Licht fluoresziert und somit die DNA sichtbar machen kann. Um das Einsinken der Nukleinsäuren in die Geltaschen zu ermöglichen, wurden die Proben vor dem Auftragen mit Probenpuffer (1/10 Volumen) versetzt. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte in Elektrophoresekammern, gefüllt mit dem jeweiligen 1x Puffer, bei einer Spannung von 0,5-5 V/cm Elektrodenabstand je nach Fragment- bzw. Gelgröße. Zur Beurteilung der Fragmentgrößen wurde zusätzlich ein entsprechender DNA Größenmarker aufgetragen. Abschließend fand die Dokumentation der Gele mit Hilfe einer Sofortbildkamera oder einer CCD Videokamera statt.

### 2.2.5.6 Gelelution

#### QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)

Für die Elution von DNA aus Agarosegelen wurde das *QIAquick Gel Extraction Kit* von Qiagen verwendet. Es beruht auf dem Prinzip der Absorption von DNA an eine Silicamembran unter Hochsalzbedingungen. Die DNA wurde im Anschluss an zwei Waschstufen unter Niedrigsalz-Bedingungen in einem Volumen von 30-50µl 10mM Tris Puffer eluiert. Die Extraktion erfolgte nach dem Versuchsprotokoll der Firma Qiagen: <http://www.qiagen.com/products/dnacleanup/gelpcrsicleanupsystems/qiaquickgelextractionkit.aspx#Tabs=t2>.

### 2.2.5.7 Reinigung von DNA

#### High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)

Die Reinigung von DNA z.B. nach PCR oder Restriktionsenzymverdau wurde mit Hilfe des *High Pure PCR Product Purification Kit* von Roche durchgeführt. Dieses *Kit* macht sich die Tatsache zunutze, dass DNA in Anwesenheit chaotroper Salze an eine Glasfasermembran bindet und durch Waschen von kontaminierenden Molekülen, wie z.B. Oligonukleotiden und Proteinen befreit werden kann. Die DNA wurde unter Niedrigsalzbedingungen in einem Volumen von 50-100µl 10mM Tris Puffer eluiert. Die Durchführung erfolgte nach dem Versuchsprotokoll der Firma Roche: [https://www.roche-applied-science.com/PROD\\_INF/MANUALS/napi\\_man/pdf/chapter%202/page%2040-46.pdf](https://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS/napi_man/pdf/chapter%202/page%2040-46.pdf).

### 2.2.5.8 Enzymatische Restriktion von Nukleinsäuren

Restriktionsenzyme wurden, zum Zwecke der DNA Manipulation, zur Insertion von Genen, Genfragmenten bzw. DNA in Plasmidvektoren verwendet. Für analytische Zwecke kamen standardmäßig 0,2-1,5µg Plasmid-DNA und eine Enzymmenge von 5-20U in einem 10-20µl Ansatz zum Einsatz. Die Restriktion fand für die Dauer von 2-16h in einem für die Aktivität des Enzyms geeigneten Puffer und einer Temperatur, bei welcher das jeweilige Enzymspezifische Aktivitätsoptimum erreicht wurde, statt. Mehrfachrestriktionen waren bei übereinstimmenden Reaktionsbedingungen möglich. Präparative DNA Restriktionen verlangten den Verdau größerer Mengen Nukleinsäure (5-20µg) und erfolgten stets ün.

#### Standard-Restriktionsansatz:

10xReaktionspuffer	2µl
Restriktionsenzym(e)	xµl
DNA	yµl
H <sub>2</sub> O <sub>reinst.</sub>	ad 20µl

Der Erfolg des enzymatischen Verdauens wurde durch Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese (siehe 2.2.5.5) überprüft. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung der DNA (siehe 2.2.5.6 oder 2.2.5.7).

### 2.2.5.9 Dephosphorylierung linearer DNA

Da, Vektoren nach Linearisierung mittels enzymatischer Restriktion wieder religieren können, wurden die terminalen Phosphatgruppen am 5'-Ende der DNA dephosphoryliert. Dazu kam eine alkalische Phosphatase (CIP: *calf intestinal alkaline phosphatase*) zum Einsatz. Wurden Enzyme der Firma NEB zur Restriktion verwendet, konnte die CIP direkt zugegeben werden, andernfalls mussten die Ansätze wie in 2.2.5.7 beschrieben, gereinigt werden. Nach einstündiger Inkubation mit 0,5U Enzym pro  $\mu\text{g}$  DNA bei 37°C, wurde der Ansatz zur Entfernung des Enzyms über ein präparatives Agarosegel gereinigt (siehe 2.2.5.5 und 2.2.5.6).

### 2.2.5.10 Verwendeter Bakterienstamm

#### DH10B (Invitrogen):

Genotyp: F- mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 recA1  
endA1 araD139  $\Delta$ (ara, leu)7697 galU galK $\lambda$ <sup>-</sup> rpsL nupG

### 2.2.5.11 Bakterienanzucht

Mit Hilfe von, auf Plasmiden vorhandenen Antibiotika-Resistenzgenen ist eine Selektion der Bakterien, welche ein solches Plasmid enthalten, möglich. Es wurden folgende Antibiotika verwendet:

#### Antibiotika-Stammlösungen:

Ampicillin (Amp): 100mg/ml (1:1.000 in H<sub>2</sub>O<sub>reinst.</sub>, 100 $\mu\text{g}$ /ml)

Chloramphenicol (Cam): 34mg/ml (1:2.000 in Ethanol (100% (v/v), 17 $\mu\text{g}$ /ml)

Kanamycin (Kan): 10mg/ml (1:400 in H<sub>2</sub>O<sub>reinst.</sub>, 25 $\mu\text{g}$ /ml)

Lösungen sterilfiltrieren, aliquotieren und bei -20°C lagern.

Antibiotikazugabe nach Autoklavieren des Mediums.

### 2.2.5.11.1 Flüssigkultur

<u>LB Medium:</u>	NaCl	10g
	Bacto Trypton	10g
	Hefeextrakt	5g
	H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	ad 1l
	pH-Wert mit NaOH auf 7,0 einstellen, autoklavieren	

Ausgehend von einer einzelnen Plattenkolonie wurden Flüssigkulturen in LB-Medium angesetzt, 2-5ml für *high-copy* Plasmide bzw. 10ml für *low-copy* Plasmide. Dazu wurde die Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in ein Kulturröhrchen mit Medium, welches mit einem entsprechenden Antibiotikum versetzt war, überführt. Die Anzucht fand bei 37°C unter Schütteln mit 250 U/min üN statt. Wurde ein größeres Volumen (>10ml) Bakterienkultur benötigt, erfolgte das Ansetzen einer 5ml Vorkultur. Nach 5-8h Inkubation bei 37°C wurde die Hauptkultur mit 1/1.000 Volumen der Vorkultur angeimpft.

### 2.2.5.11.2 Plattenkultur

<u>LB-Agar:</u>	NaCl	10g
	Bacto Trypton	10g
	Hefeextrakt	5g
	Bacto Agar	15g
	H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	ad 1l
	pH-Wert mit NaOH auf 7,0 einstellen, autoklavieren	

Um Bakterien über einen begrenzten Zeitraum (~2 Wochen) zu lagern, Transformanden zu selektionieren oder Flüssigkulturen anzuimpfen, erfolgte die Anlage von Plattenkulturen. Der LB-Agar wurde durch Aufkochen verflüssigt, auf 40-45°C abgekühlt, mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und in sterile Einweg-Plastikschalen gegossen. Die Platten konnten nach der Polymerisierung für mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden. Je nach Anwendung wurden die Kulturen mit einem Drigalski-Spatel flächig ausplattiert oder es wurde ein Verdünnungsausstrich mit einer Impföse angelegt.

### 2.2.5.11.3 Dauerkultur

Dauerkulturen dienen zur langen stabilen Lagerung von Bakterienklonen. Eine frische Flüssigkultur (500µl) wurde mit 86%igem Glycerin (500µl) versetzt, gemischt und bei -70°C aufbewahrt.

### 2.2.5.12 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Glycerin 10% (v/v): vorgekühlt auf 4°C

LB-Medium: (2.2.5.12.1)

Antibiotikum: (2.2.5.12)

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurde eine Einzelkolonie einer Plattenkultur gepickt und in 10ml LB-Medium, welches, wenn nötig, mit einem Antibiotikum versetzt war, unter Schütteln (250U/min) bei entsprechender Temperatur kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden 1000ml LB-Medium (benötigtes Antibiotikum enthaltend) mit der Vorkultur überimpft (1:100) und die Bakterien bis zum Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,5-0,7 unter Schütteln bei entsprechender Temperatur wachsen gelassen. Anschließend erfolgte das Pelletieren der Bakterien in 250ml Zentrifugenbehältern für 15min bei 4.000xg und 4°C. Alle weiteren Schritte erfolgten mit vorgekühlter Glycerinlösung und kalten Pipettenspitzen auf Eis. Die Bakterienpellets wurden dreimal in Glycerin gewaschen (4.000xg, 15min), wobei der 1. und 2. Waschschrift in 1000ml, der 3. nur noch in 500ml Glycerin erfolgte. Anschließend wurden die Pellets vereinigt, in 50ml Glycerin aufgenommen und abermals zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde in 3-4ml Glycerinlösung aufgenommen, in Aliquots á 50µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

### 2.2.5.13 Transformation elektrokompetenter Bakterien

LB-Medium: (2.2.5.12.1)

LB-Platten: (2.2.5.12.2)

Antibiotikum: (2.2.5.12)

Die elektrokompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und 50µl davon mit 1-2µl Ligationsansatz bzw. 1-5ng Plasmid DNA in einer Elektroporationsküvette ( $\emptyset$  0,2cm) vermischt. Erfolgte die Transformation von BAC-Plasmiden, wurde eine Küvette mit einem Durchmesser von 0,1cm verwendet und es wurden 1-3µl BAC-DNA zugegeben. Außerdem sollten sowohl DNA als auch Zellen möglichst frisch präpariert sein. Nach ein-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien bei 2,5kV, 400Ω und 25mF perforiert, bei BAC-Plasmiden erfolgte die Elektrotransformation bei 1,75kV, 400Ω und 25mF (Protokoll modifiziert nach Swaminathan & Sharan, 2004). Anschließend wurden die Bakterien in 1ml LB-Medium aufgenommen, für 60min bei entsprechender Temperatur unter Schütteln inkubiert und auf einer LB-Platte mit Antibiotikum ausgestrichen.



### 2.2.5.14 Plasmid-DNA Präparation

#### 2.2.5.14.1 Schnellpräparation von Plasmid-DNA

70% Ethanol (v/v)

Isopropanol

Puffer I: Tris 50mM  
Na<sub>2</sub>EDTAx2H<sub>2</sub>O 10mM  
H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> ad 1l  
pH-Wert mit HCl auf 8,0 einstellen, autoklavieren,  
danach 100mg RNase zugeben, bei 4°C lagern

Puffer II: NaOH 200mM  
SDS 1% (v/v)  
H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> ad 100ml  
autoklavieren, bei RT lagern

Puffer III: KAc 3M  
H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> ad 1l  
pH-Wert auf 5,5 einstellen, autoklavieren, bei 4°C lagern

Mit dieser Methode wurde überprüft, ob transformierte Bakterienkolonien das gewünschte Klonierungsprodukt enthielten. Einzelkolonien des ausplattierten Transformationsansatzes wurden in 2-5ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum üN bei der jeweils optimalen Temperatur kultiviert. Am darauffolgenden Tag erfolgte das Pelletieren von 1,5ml der Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 6.000xg und 4°C für 1min. Aus der übriggebliebenen Bakterienkultur wurden Dauerkulturen angelegt (siehe 2.2.5.12.3), um später auf eine Kolonie mit gewünschter Plasmid-DNA zurückgreifen zu können. Das Pellet wurde in 100µl Puffer I resuspendiert, zur alkalischen Lyse mit 200µl Puffer II vorsichtig gemischt und nach 5min Inkubation bei 23°C mit 150µl Puffer III versetzt. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Inkubation auf Eis, währenddessen SDS, chromosomale DNA und Proteinbestandteile ausfielen. Diese wurden durch Zentrifugieren (20.000xg, 4°C, 15min) präzipitiert, die im Überstand befindliche DNA konnte mittels Zugabe von 400µl Isopropanol gefällt und bei 20.000xg für 30min bei 4°C pelletiert werden. Bevor die DNA in 20-50µl 10mM Tris resuspendiert wurde, musste sie mit 250µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen und für 10min bei 23°C getrocknet werden. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

#### 2.2.5.14.2 Schnellpräparation von BAC-Plasmid-DNA

Die Schnellpräparation von BAC-Plasmid-DNA fand gemäß der unter 2.2.5.15.1 beschriebenen Methode statt, allerdings mussten einige Änderungen vorgenommen werden. Da es sich bei BAC-Plasmiden um sehr große *low-copy* Plasmide handelt (in diesem Fall mit einer Größe von ~240kbp), wurde zur Vermeidung von Scherkräften auf vortexen verzichtet

und es wurden abgeschnittene Pipettenspitzen verwendet. Die Modifizierungen bestanden zum einen darin, dass eine größere Menge LB-Medium (10ml) mit einer Einzelkolonie angeimpft werden musste. Zum anderen wurden jeweils 250µl Puffer I, 350µl Puffer II und 350µl Puffer III, sowie 700µl Isopropanol und 1ml 70% (v/v) Ethanol verwendet. Außerdem erfolgte die Lagerung von BAC-DNA bei 4°C.

#### **2.2.5.14.3 QIAprep Spin Minipräparation**

Sollte der Reinheitsgrad der DNA besonders hoch sein, z.B. für Anwendungen wie Transformationen oder zur Herstellung von Plasmid-DNA Standards für die qPCR, war eine Säulenaufreinigung die Methode erster Wahl. Dazu wurde das QIAGEN Plasmid Mini Kit verwendet, es beruht ebenso wie die Plasmid-Schnellpräparation auf dem Prinzip der alkalischen Lyse, allerdings schließt sich hier die Reinigung über eine Silica-Gel-Matrix an. Die DNA adsorbiert dabei an die Silica-Membran und durch unterschiedliche Salzbedingungen ist es möglich, genomische DNA, RNA, Proteine und Zellbruchstücke auszuwaschen. Es wurde nach dem Versuchsprotokoll der Firma Qiagen vorgegangen: <http://www.qiagen.com/products/plasmid/qiagenplasmidpurificationsystem/qiagenplasmidminikit.aspx#Tabs=t2>.

#### **2.2.5.14.4 QIAGEN Plasmid Maxipräparation**

Zur Aufreinigung größerer Plasmidmengen wurde das QIAGEN Plasmid Maxi Kit verwendet. Auch dieses Protokoll beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse, allerdings erfolgt die Bindung der Plasmid-DNA anschließend unter Niedrigsalz- und Niedrig-pH-Bedingungen an eine Anionenaustauscher-Säule. Bei mittlerer Salzkonzentration ist es möglich, zelluläre Bruchstücke, Proteine, RNA und andere niedermolekulare Verunreinigungen auszuwaschen. Die gereinigte Plasmid-DNA wird unter Hochsalzbedingungen eluiert und zur Entsalzung mit Isopropanol gefällt.

Es erfolgte die Anlage einer 5ml Vorkultur mit entsprechendem Antibiotikum, mit welcher die Hauptkultur (150ml selektives LB-Medium für *high-copy* Plasmide bzw. 500ml für *low-copy* Plasmide) in einem Verhältnis von 1:1.000 angeimpft und bei entsprechender Temperatur unter Schütteln (250U/min) üN kultiviert wurde. Die Elution der DNA erfolgte in 10mM Tris-Puffer. Es wurde nach dem Versuchsprotokoll der Firma Qiagen vorgegangen: [http://stanxterm.aecom.yu.edu/wiki/data/Product\\_manuals\\_attach/qiagenmidimaxi.pdf](http://stanxterm.aecom.yu.edu/wiki/data/Product_manuals_attach/qiagenmidimaxi.pdf).

#### 2.2.5.14.5 BAC-Plasmid Maxipräparation

Um hochreine BAC-DNA aufzureinigen, wurde das Nucleobond Kit PC 500 von Macherey & Nagel verwendet. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in 500ml LB-Medium mit selektivem Antibiotikum durch Zugabe einer Vorkultur im Verhältnis 1:500 bei entsprechender Temperatur üN. Das durch Zentrifugation für 10min bei 5.000xg und 4°C entstandene Pellet wurde, wie im Firmenprotokoll beschrieben, weiterbehandelt, wobei das Lysat über einen Faltenfilter geklärt wurde. Die isolierte DNA wurde in 250µl 10mM Tris-Puffer aufgenommen und bei 4°C gelagert. Versuchsprotokoll: [http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure\\_Bio/Protocols/Plasmid %20DNA%20Purification /UM\\_pDNA\\_NuBo.pdf](http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/UM_pDNA_NuBo.pdf).

#### 2.2.5.15 Herstellung von DNA Sonden für die In Situ Hybridisierung

DIG-dUTP (Roche)

Fluorescein-dUTP (Roche)

DIG Wash and Block Buffer Set (Roche)

Um virale Genome virusinfizierter Zellen nachzuweisen wurden spezifische Sonden hergestellt. Die DTR-Sonde erkennt die Gensequenz des DTR, spezifisch für mCMV- $\Delta$ ie2-DTR, die gB-Sonde die Gensequenz, welche für das Oberflächenglykoprotein gB kodiert. Die nicht-radioaktive Markierung der Sonden, für DTR mit Digoxigenin sowie gB mit Fluorescein erfolgte mittels PCR, dabei wurden die Sonden über ihre ganze Länge markiert (Feinberg & Vogelstein, 1983; Raap et al., 1991; Schmitz et al. 1991). Während der PCR können DIG-dUTP (Deoxyuridintriphosphat) und Fluorescein-dUTP neben dTTP (Deoxythymidintriphosphat) als Substrat für die Taq-Polymerase dienen und in den DNA-Strang eingebaut werden. Auf diese Art und Weise findet der Einbau der Marker mit sehr hoher Effizienz statt. Es wurde eine *Touchdown* PCR in Anlehnung an die Herstellerprotokolle (Roche:[https://elabdoc.roche.com/LFR\\_PublicDocs/ras/11093088910\\_en\\_10.pdf](https://elabdoc.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/11093088910_en_10.pdf); [https://e-labdoc.roche.com/LFR\\_PublicDocs/ras/11373242910\\_en\\_16.pdf](https://e-labdoc.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/11373242910_en_16.pdf)) nach folgendem Schema unter Verwendung der unter 2.1.8.4 angegeben *Primer* durchgeführt.

PCR-Ansatz:

Komponente	1x Ansatz	Endkonzentration
5x HotStar HiFidelity PCR Puffer (5x)	10µl	1x 0,3µM dNTPs
DIG-dUTP (1mM)/Fluorescein-dUTP (1mM)	1,5µl/3,3µl	30µM/66µM
dTTP (10mM)	0,85µl/0,65µl	170µM/130µM
dATP (10mM)	1µl	200µM
dCTP (10mM)	1µl	200µM
dGTP (10mM)	1µl	200µM
DTR_For1 (10µM)/ Flox_For1 (10µM)	2,5µl	0,5µM
DTR_Rev1 (10µM)/ Flox_Rev1 (10µM)	2,5µl	0,5µM
HotStar HiFidelity DNA Polymerase (2,5 units/µl)	1µl	2,5 U
H <sub>2</sub> O <sub>reinst.</sub>	27,65µM/26, 05µl	-
Template DNA (20pg)	1µl	20pg
Gesamtvolumen	50µl	-

PCR-Profil:

Schritt	Zeit	Temperatur	Bemerkung
Initialer Aktivierungsschritt	15min	95°C	
Denaturierung	30s	95°C	
Annealing	2min	65-49°C (-1°C/Zyklus)	Zyklenzahl 17
Extension	1min	72°C	
Denaturierung	30s	95°C	
Annealing	2min	49°C	Zyklenzahl 12
Extension	1min	72°C	

Die Sonden wurden über ein Gel aufgereinigt (siehe 2.2.5.6) und die Überprüfung der Markierungseffizienz erfolgte mittels *Dot-Blot*. Dazu wurden definierte Mengen der Sonden über fünf Stufen  $\log_{10}$  titriert und 1µl davon auf eine Nylonmembran aufgetragen. Das dauerhafte Fixieren der DNA an die Membran (*crosslinking*) erfolgte durch Bestrahlung mit UV-Licht (0,15J/cm<sup>2</sup>). Die Detektion mittels  $\alpha$ -DIG-AP bzw.  $\alpha$ -Fluorescein-AP (jeweils 1:10.000 in Blockierungslösung) und CSPD-Detektionslösung wurde nach dem Versuchsprotokoll des DIG *Wash and Block Buffer Sets* der Firma Roche ([https://e-labdoc.roche.com/LFR\\_PublicDocs/ras/11585762001\\_en\\_10.pdf](https://e-labdoc.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/11585762001_en_10.pdf)) durchgeführt.

## 2.2.6 Molekularbiologische Methoden: RNA

### 2.2.6.1 Vorbehandlung von Flüssigkeiten und Geräten

Ribonukleasen (RNasen) sind sehr aktive und stabile Enzyme, welche RNA zerstören und daher ein großes Problem darstellen. Durch Benutzung von Handschuhen, gereinigten oder sterilen Geräten und vorbehandelten Lösungen wurde versucht, diesem aus dem Weg zu gehen. Zur Reinigung von Geräten und Oberflächen wurde RNase-ExitusPlus Lösung verwendet, Lösungen wurden generell mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandeltem, RNase-freiem Wasser (0,2% DEPC in H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> üN rühren, anschließend autoklavieren) hergestellt.

### 2.2.6.2 Isolierung von Gesamt-RNA

RNeasy Mini Kit (QIAGEN)

AllPrep DNA/RNA Kit (QIAGEN)

RNase freie DNase (QIAGEN)

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte unter Verwendung des *RNeasy Mini Kits* (Isolierung aus Zellen) oder des *AllPrep DNA/RNA Kits* (Isolierung aus Organen) von QIAGEN. Diese *Kits* basieren auf der selektiven Bindung von bis zu 100µg RNA (>200 Basen) an eine Silica-Gel-Matrix unter Hochsalz-Bedingungen. Die Proben wurden zunächst in einem denaturierenden, Guanidin-Thiocyanat-haltigen Puffer lysiert und homogenisiert, um RNasen zu inaktivieren und die Isolierung intakter RNA zu gewährleisten. Nach Binden der RNA an die Silica-Membran wurden kontaminierende Substanzen ausgewaschen und zur Eliminierung von DNA erfolgte ein DNase Verdau (siehe *RNeasy Mini Handbuch* S.69-70; <http://www.qiagen.com/products/rnastabilizationpurification/rneasysystem/rneasymini.aspx#Tabs=t2>). Die Elution der RNA erfolgte in 30-60µl RNase-freiem Wasser und die Lagerung bei -70°C.

#### 2.2.6.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte unter Verwendung des *RNeasy Mini Kits*. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und in 350µl RLT Puffer (+ β-ME) aufgenommen. Alle weiteren Schritte erfolgten nach dem in 2.2.6.2 angegebenen Herstellerprotokoll.

### 2.2.6.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Organen

Die Präparation von Gesamt-RNA aus Organen erfolgte mit Hilfe des *AllPrep DNA/RNA Kits* von Qiagen nach dem Versuchsprotokoll der Firma: <http://www.qiagen.com/products/rnastabilizationpurification/rnadnasystem/allprepdnarnaminikit.aspx#Tabs=t2>. Das Homogenisieren von 20-30mg Gewebe fand unter Zugabe von 600µl RLT Plus Puffer und 2 Stahlkugeln (Ø 3mm) pro Ansatz, in der Schwingmühle MM300 bei 30Hz für 8min, statt. Nachdem das Lysat über eine *AllPrep spin column* gegeben wurde, befand sich die DNA gebunden an der Silica-Membran der Säule und die RNA konnte aus dem Durchfluss aufgereinigt werden.

### 2.2.6.3 Isolierung von mRNA aus Organen und aus Gesamt-RNA

#### *µMACS mRNA Isolation Kit (Miltenyi)*

Für Genexpressionsanalysen mittels RT-qPCR wird besonders reine mRNA benötigt, welche lediglich 1-5% der Gesamt-RNA ausmacht. Daher erfolgte die direkte Isolierung von mRNA aus Organen oder aus Gesamt-RNA mit Hilfe des *µMACS mRNA Isolation Kit* von Miltenyi. Es handelt sich um eine sehr sensitive Methode, dadurch wird es möglich aus der isolierten mRNA im Anschluss geringe Transkriptmengen zu detektieren und auch mit kleinen Probenmengen Genexpressionsanalysen durchzuführen. Die Methode basiert auf der MACS Technologie, die Kernkomponente stellen superparamagnetische Oligo(dT) *Micro-Beads* dar, welche mit den Adenosinresten am 3'-Ende der mRNA hybridisieren. Die so markierte mRNA kann dann mittels magnetischer Separation über *µColumns* in einem MACS Separator isoliert werden. Ausgehend von einer Menge von maximal  $1 \times 10^7$  Zellen, 30mg Gewebe oder 200µg Gesamt-RNA konnten 1-10µg mRNA gewonnen werden. Zur Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNA wurden 25µl der Gesamt-RNA eingesetzt und nach dem Herstellerprotokoll vorgegangen ([http://www.miltenyibiotec.com/download/datasheets\\_en/97/DS130\\_075\\_101\\_2\\_201\\_090\\_276\\_7.pdf](http://www.miltenyibiotec.com/download/datasheets_en/97/DS130_075_101_2_201_090_276_7.pdf)). Das Organgewebe wurde zunächst mit 1ml Lysis/Binding Puffer und 2 Stahlkugeln (Ø 3mm) in der Schwingmühle für 8min bei 30Hz homogenisiert. Zur Entfernung von genomischer DNA erfolgte eine DNase Behandlung (siehe Versuchsprotokoll S. 25-26).

### 2.2.6.4 RT-qPCR

Die Reverse-Transkriptase quantitative *Real Time* PCR (RT-qPCR) dient der Quantifizierung von RNA, sie vereint die Methoden der Reversen Transkription von RNA in cDNA mit der qPCR (allgemeiner Überblick: Bustin, 2000; Derveaux et al., 2010). In dieser Arbeit wurde das *OneStep RT-PCR Kit* von Qiagen verwendet (<http://www.qiagen.com/products/pcr/qiagenreversetranscriptases/onesteprtprcr.aspx#Tabs=t2>), es erlaubt den Ablauf beider

Methoden als Ein-Schritt-Reaktion. Der enthaltene Enzym-Mix aus *Omniscript* und *Sensiscript* Reverser Transkriptase ermöglicht eine hoch effiziente und spezifische Reverse Transkription von RNA in einem Bereich von 1pg-2µg, wobei das *Omniscript* Enzym auf Ansätze mit einem RNA-Gehalt von >50ng optimiert ist, die *Sensiscript* Reverse Transkriptase bevorzugt Mengen <50ng. Mit Sequenz-spezifischen *Primern* wird die eingesetzte RNA in cDNA umgeschrieben, dies erübrigt den Einsatz unspezifischer *Random-hexamer-Primer* oder *Oligo-d(T)-Primer*. Während der nachfolgenden Aktivierung der HotStarTaq-DNA-Polymerase (15min, 95°C) kommt es zur simultanen Inaktivierung der Reversen Transkriptasen. Um DNA Kontaminationen ausschließen zu können, wurden alle Ansätze zusätzlich ohne Reverse Transkriptase Enzyme lediglich unter Verwendung der HotStarTaq-DNA-Polymerase amplifiziert.

#### Singleplex RT-qPCR Ansatz:

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
5x QIAGEN <i>OneStep</i> RT-PCR Puffer	5µl	1x, 2,5mM MgCl <sub>2</sub>
dNTP Mix (10mM je dNTP)	1,67µl	0,67mM
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,5µl	1,5mM
<i>Primer-For</i> (10µM)	1,5µl	0,6µM
<i>Primer-Rev</i> (10µM)	1,5µl	0,6µM
Sonde (10µM)	0,66µl	0,26µM
ROX (10µM)	0,33µl	0,13µM
QIAGEN <i>OneStep</i> RT-PCR Enzym Mix	1µl	
H <sub>2</sub> O <sub>RNAse frei</sub>	variabel	
<i>Template</i> RNA	variabel	≤ 1µg
Gesamtvolumen	25µl	

#### Singleplex RT-qPCR Ansatz ohne RT:

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
10x PCR Puffer	2,5µl	1x, 1,5mM MgCl <sub>2</sub>
dNTP Mix (10mM je dNTP)	1,67µl	0,67mM
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2,5µl	2,5mM
<i>Primer-For</i> (10µM)	1,5µl	0,6µM
<i>Primer-Rev</i> (10µM)	1,5µl	0,6µM
Sonde (10µM)	0,66µl	0,26µM
ROX (10µM)	0,33µl	0,13µM
HotStarTaq Polymerase	1µl	
H <sub>2</sub> O <sub>RNAse frei</sub>	variabel	
<i>Template</i> RNA	variabel	≤ 1µg
Gesamtvolumen	25µl	

In einer Duplex-Reaktion blieben die Konzentrationen der beiden *Primer*-Paare, sowie der Sonden im Vergleich zur *Singleplex*-Reaktion unverändert.

RT-qPCR Profil:

Schritt	Zeit	Temperatur	Bemerkung
Reverse Transkription	30min	50°C	
Initialer PCR Aktivierungsschritt	15min	95°C	
2-Schritt <i>Cycling</i>			Zyklenzahl 50
Denaturierung	15s	94°C	
<i>Annealing/Extension</i>	1min	60°C	Daten Akquisition

**2.2.6.5 Herstellung von *in vitro* Transkripten**

Zur absoluten Quantifizierung wurden *in vitro* Transkripte als Standards für die RT-qPCR eingesetzt. Ein Vektor mit der gewünschten Matrizen-DNA (10µg) wurde linearisiert, über Gelelektion aufgereinigt (siehe 2.2.5.6) und in 20µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die *in vitro* Transkription erfolgte mit Hilfe des *MEGAscript Kit* von Ambion, dabei wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

Komponente	1x Ansatz
ATP Lösung	2µl
CTP Lösung	2µl
GTP Lösung	2µl
UTP Lösung	2µl
10x Puffer	2µl
Enzym Mix	2µl
linearisierte DNA	1µg
H <sub>2</sub> O <sub>RNase frei</sub>	ad 20µl

Nach Inkubation für 2h bei 37°C erfolgte die Zugabe von 1µl DNase I und der Ansatz wurde weitere 15min bei 37°C inkubiert. Anschließend konnte die RNA über das *RNeasy Mini Kit* (siehe 2.2.6.2) aufgereinigt und in 60µl eluiert werden.

Versuchsprotokoll: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/1330MF.pdf>

**2.2.6.6 Einstellen der *in vitro* Transkripte für die RT-qPCR**

Die Transkriptmenge wurde nach Herstellung (siehe 2.2.6.5), Aufreinigung (siehe 2.2.6.2) und Konzentrationsmessung (siehe 2.2.5.1.6) der *in vitro* Transkripte folgendermaßen berechnet und eingestellt:

$$\text{Teilchenmenge [Transkripte/}\mu\text{l]} = \frac{6 \times 10^{23} \text{ [Kopien /mol]} \times \text{RNA-Konzentration [g/}\mu\text{l]}}{\text{MW [g/mol]}}$$

MW für ssRNA: Größe *in vitro* Transkript [b] x 340 Dalton/b



## 2.2.7 Histologische Methoden

In dieser Arbeit wurde eine immunhistochemische Methode zur Färbung des viralen Proteins IE1 angewandt, um Virus-infizierte Leberzellen zu quantifizieren. Des Weiteren sollte die Virusmutante mCMV- $\Delta$ ie2-DTR, sowie mCMV-WT-BAC über spezifische Sonden, mittels ISH in histologischen Leberschnitten detektiert werden.

### 2.2.7.1 Vorbehandlung der Organe und Anfertigung histologischer Schnitte

<u>4% Formalin (gepuffert):</u>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	66mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×H <sub>2</sub> O	84mM
	Formalin 37% (v/v)	140ml
	H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	ad 1l
	pH-Wert mit NaOH auf 7,4 einstellen	

Isopropanol (20%, 40%, 60%, 80%, 90%, 100% (v/v))

Xylol

Paraffin

Nach der Organentnahme erfolgte die Fixierung der Lebern in 4% Formalin bei 23°C für ~18h. Am nächsten Tag wurden sie nach 2h Waschen in Leitungswasser in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Um einer osmotisch bedingten Zellschädigung vorzubeugen, geschah dies in kleinen Schritten für jeweils 45min in 20%, 40%, 60%, 80%, 90%, 2x 100% (v/v) Isopropanol und 1x18h in 100% (v/v) Isopropanol. Anschließend erfolgte eine dreimalige Inkubation in Xylol für jeweils 1h gefolgt von dem Transfer in 2 Paraffinbäder (Nr. 1 für 4h bei 55°C und Nr.2 für 18h bei 55°C). Danach wurden die Organe in Paraffin eingebettet und bei -20°C gelagert.

Aus -20°C kalten Paraffinblöcken wurden am Mikrotom 2 $\mu$ M dicke Schnitte angefertigt und in einem Kaltwasserbad (20°C) aufgefangen. Nach Strecken der Serienschnitte im Warmwasserbad (40°C) wurden sie auf silanisierte Objektträger aufgezogen und  $\text{üN}$  bei 37°C getrocknet.

Vor der immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte deparaffiniert und rehydriert. Dies erfolgte durch eine Inkubation in Xylol (3x5min) und in einer absteigenden Alkoholreihe: 2x3min in 100% (v/v) Isopropanol und jeweils 3min in 90%, 80%, 70% und 50% (v/v) Isopropanol.

### 2.2.7.2 IE1-spezifische Immunhistochemie (IHC)

<u>Trypsin:</u>	NaCl	137mM
	KCl	2,7mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,5mM
	EDTA	3,4mM
	H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	ad 1l
	pH-Wert mit NaOH auf 7,4 einstellen, autoklavieren, 1,25g Trypsin zugeben, bei 4°C lagern	

#### 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v) in Methanol

<u>1xTBS-Puffer:</u>	Tris	100mM
	NaCl	150mM
	H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	ad 1l
	pH-Wert mit HCl auf 7,4 einstellen	

#### VECTASTAIN Elite ABC-Kit (Vector Laboratories)

<u>Substrat:</u>	DAB (Sigma)	10mg
	NiSO <sub>4</sub> (Fluka)	75mg
in 50ml Tris-HCl (50mM, pH 7,5) lösen, 17µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% (v/v) zugeben		

#### Entellan

Die IHC ermöglicht den Nachweis spezifischer Antigene in Organschnitten und kam zur Bestimmung der viralen Replikationsfähigkeit *in vivo* (siehe 2.2.2.6) zum Einsatz. Dazu wurde das virale Protein IE1 angefärbt, seine Expression beginnt 2h *p.i.*, während der späten L-Phase des Replikationszyklus akkumuliert es im Nukleus.

Im Anschluss an das unter 2.2.7.1 beschriebene Verfahren wurden die Schnitte zur Permeabilisierung mit Trypsin behandelt (15min, 37°C). Nach einem Waschschrift in H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> (3min), erfolgte die Inaktivierung der endogenen Peroxidase mit 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v) in Methanol (30min, 20°C). Die Möglichkeit unspezifischer Antikörperbindungen wurde durch Blockieren mit Kaninchenserum 1:10 (v/v) in TBS für 20min bei 23°C verhindert. Der IE1-spezifische Antikörper CROMA 101 wurde 1:250 in TBS (v/v) verdünnt und der Gewebeschnitt 1h bei 4°C mit der Antikörperlösung inkubiert. Nach 2x Waschen in TBS für 3min fand am nächsten Tag die Inkubation mit dem Sekundärantikörper α-Maus-(Fab)-Biotin (1:200 in TBS (v/v)) für 30min bei 23°C statt. Als Isotypkontrolle erfolgte die Inkubation der Schnitte alleine mit dem Sekundärantikörper. Anschließend wurde die Reaktionslösung des VECTASTAIN Elite ABC-Kit (Vector Laboratories) nach Versuchsprotokoll (<http://www.vectorlabs.com/data/protocols/PK-6100.pdf>) angesetzt und die Schnitte für 30min bei 23°C darin inkubiert. Die ABC-Systeme basieren auf der Interaktion von Avidin mit einem biotinylierten Sekundärantikörper. Avidin bindet zusätzlich eine biotinylierte Meerrettichperoxidase, welche das Substrat DAB in einer Farbreaktion umsetzen kann. Nach dreimaligem Waschen in TBS für 10min erfolgte die Inkubation der Schnitte mit dem

Substrat, bis eine schwarze Farbreaktion sichtbar war. Überflüssiges Substrat wurde mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$  ausgewaschen (3x 1min), die Gegenfärbung der Schnitte erfolgte für 5s in Hämatoxylin. Nach ausspülen überschüssiger Farbe mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$  folgte eine aufsteigende Alkoholreihe (je 30s 20%, 40%, 60%, 80%, 90%, 2x 100% (v/v) Isopropanol) und die getrockneten Präparate wurden in Entellan mit einem Deckglaschen eingebettet.

### 2.2.7.3 DTR- und gB-spezifische In-situ Hybridisierung (ISH)

Pepsin-Lösung:      HCl 25% (v/v)              1750 $\mu$ l  
                                $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$                       ad 60ml  
                               150 $\mu$ l Pepsin (Endkonz. 0,5mg/ml) zugeben

0,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (v/v) in Methanol

Isopropanol (20%, 40%, 60%, 80%, 90%, 100% (v/v))

ChipHybe Hybridisierungspuffer (Ventana)

20xSSC:              NaCl                              3M  
                               Natriumcitrat                  0,3mg  
                                $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$                       ad 1l

Normal-Serum Ziege (10% (v/v))

1xTBS-Puffer:      Tris                              100mM  
                               NaCl                              150mM  
                                $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$                       ad 1l  
                               pH-Wert mit HCl auf 7,4 einstellen

Substrat:            DAB (Sigma)                  10mg  
                                $\text{NiSO}_4$  (Fluka)                  75mg  
                               in 50ml Tris-HCl (50mM, pH 7,5) lösen, 17 $\mu$ l  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% (v/v) zugeben

Neufuchsin Kit

Paramount

Die ISH ermöglichte den Nachweis viraler Genome durch spezifische Sonden, welche eine bestimmte Gensequenz des Genoms erkennen können. Der Einsatz von gB- und DTR-spezifischen Sonden ermöglichte die Unterscheidung zwischen den Genomen der beiden Viren mCMV-WT-BAC und mCMV- $\Delta$ ie2-DTR in infizierten Zellen histologischer Leberschnitte. Im Anschluss an das unter 2.2.7.1 beschriebene Verfahren wurden die Schnitte zur Permeabilisierung für 25min mit Pepsin-Lösung (Endkonz. 0,5mg/ml) bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschrift in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$  (3min), erfolgte die Inaktivierung der endogenen Peroxidase mit 0,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (v/v) in Methanol (30min, 20°C). Gefolgt von einem weiteren Waschschrift in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$  (3min) wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 30s 20%, 40%, 60%, 80%, 90%, 2x 100% (v/v) Isopropanol) dehydriert und anschließend trocken gelassen. Zur Hybridisierung wurden die Sonden in

Hybridisierungspuffer angesetzt (1:15, 1µl Sonde plus 14µl Puffer) und jeweils 10µl davon auf einen Schnitt gegeben. Nach Luftblasen-freiem Abdecken des Ansatzes mit Deckgläschen und Kleber, um das Verdunsten der Flüssigkeit zu verhindern, erfolgte die Denaturierung der DNA-Stränge bei 95°C für 6min. Anschließend wurden die Objektträger üN bei 50°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten die Posthybridisierungs-Waschschritte zunächst 2x in 2xSSC bei 23°C für 5min, dann jeweils 1x in 1xSSC und 0,5xSSC für 5min bei 23°C, nach einem warmen Waschschritt in 50°C heißem 0,1xSSC für 20min wurde nochmals in 0,1xSSC bei 23°C für 5min gewaschen und die Schnitte in 1xTBS-Puffer für 10min gespült. Die Doppelfärbung erfolgte mit den Antikörpern α-Fluorescein-AP (1:200 in 1xTBS-Puffer) bzw. α-DIG-POD (1:25 in 1xTBS-Puffer) für 30min bei 23°C, unspezifische Bindungen wurden durch die gleichzeitige Zugabe von 10% Ziegen-Normal-Serum blockiert. Als Isotypkontrolle erfolgte die Inkubation der Schnitte alleine mit dem Antikörper ohne vorherige Hybridisierung. Nach 3x Waschen in TBS für 5min wurden die Schnitte durch Zugabe der Substrate (Fuchsin, DAB) und deren Umsetzung in Farbstoffe mittels Phosphatase bzw. Peroxidase gefärbt. Die Herstellung der Fuchsin-Lösung erfolgte nach Herstellerprotokoll (<http://www.dako.com/de/download.pdf?objectid=112778003>), jeweils 100µl davon wurden auf einen Schnitt gegeben und dieser für 15-45min in einer feuchten Kammer inkubiert. Das Enzym alkalische Phosphatase setzt dabei das Substrat Fuchsin in einen roten Farbstoff um. Nach einem Waschschritt für 20min in 1xTBS erfolgte die Färbung mittels Peroxidase, dazu wurden 100µl der DAB-Lösung auf die Schnitte pipettiert und diese für 10-15min in einer feuchten Kammer inkubiert. Überflüssiges Substrat wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> ausgewaschen (3x 1min), die Gegenfärbung der Schnitte erfolgte für 5s in Hämalaun/Hämatoxylin. Nach ausspülen überschüssiger Farbe mit H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> folgte eine aufsteigende Alkoholreihe (je 30s 20%, 40%, 60%, 80%, 90%, 2x 100% (v/v) Isopropanol) und die getrockneten Präparate wurden in Paramount mit einem Deckgläschen eingebettet.

### 3 Ergebnisse

Sowohl Leber als auch Lunge sind Orte der mCMV Pathogenese, Latenz und Reaktivierung. Für die Leber konnte gezeigt werden, dass die sinusoidalen Leber-Endothelzellen (LSECs) den Hauptort der zellulären Latenz darstellen (Seckert et al., 2009). Auch für die Lunge gibt es Hinweise darauf, dass sich die mCMV Latenz in Endothelzellen (ECs) manifestiert (Seckert, unveröffentlicht). Infiltrierende, antivirale CD8<sup>+</sup> T-Zellen terminieren die akute Infektion in den Organen (Podlech et al., 2000), allerdings verbleiben latente virale Genome lebenslang im Organismus.

Nach der Definition von Roizman & Sears (1987) versteht man unter molekularer Latenz das Vorhandensein eines replikativ inaktiven Genoms, welches allerdings transkriptionell aktiv sein kann. In unserer Gruppe wurde diese transkriptionelle Aktivität während der mCMV Latenz in Lungengewebe bereits mehrfach nachgewiesen (Kurz et al. 1999 a, b; Grzimek et al., 2001; Simon et al., 2006b). In den zitierten Arbeiten war dies allerdings nur zu einem definierten Zeitpunkt in der Latenz möglich (*point prevalence*), es wird jedoch vermutet, dass diese Aktivität während des gesamten Zeitraumes der Latenz nachweisbar ist (*period prevalence*).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Genexpression während der Latenz im BALB/cJ Modellsystem der mCMV-Infektion nach experimenteller KMT zum ersten Mal in einer Zeitkinetik anhand von ausgewählten Transkripten der drei kinetischen Klassen IE (*IE1*, *IE3*), E (*E1*, *m164*, *M105*) und L (*M86*) in Lungengewebe charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden für die genannten Transkripte spezifische, hochempfindliche RT-qPCRs etabliert. Die gewonnenen Ergebnisse ermöglichten zum ersten Mal die Darstellung von Genexpressionsmustern zu verschiedenen Zeitpunkten (Monat 4, 6, 8 nach KMT) in der Latenz. Um auszuschließen, dass die entstandenen Transkript-Expressionsmuster auf divergierende Transkriptstabilitäten zurückzuführen sind, wurde zusätzlich die Stabilität der Transkripte bestimmt.

Die Anreicherung von Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen während der Latenz (*memory inflation*) legt nahe, dass es, ausgelöst durch die virale Genexpression, zu einer Peptid-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-vermittelten immunologischen Kontrolle in der Latenz kommt. Simon et al. (2006b) konnten dies für die Kontrolle der IE-Genexpression durch IE1-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigen. In der vorliegenden Arbeit wurde zeitgleich zur Transkriptbestimmung die Zahl der IE1-, m164- und M105-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Kinetik (Monat 4, 5, 6, 8 nach KMT) ermittelt. Parallel dazu erfolgte erstmals die Charakterisierung einzelner CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen, sowie die Untersuchung des Zusammenhanges zwischen IFN- $\gamma$  und dieser Subpopulationen.

Des Weiteren sollte die Frage geklärt werden, ob die IE-Genexpression für die Etablierung von Latenz notwendig ist. Dazu wurde das bereits etablierte Modell der Diphtherietoxin-

vermittelten Zelldepletion nach Infektion mit der Rekombinanten mCMV- $\Delta$ ie2-DTR verwendet (Scheller, 2011).

### 3.1 Charakterisierung der transkriptionellen Latenz von mCMV

Wie bereits erwähnt wurde die transkriptionelle Latenz im BALB/cJ Modellsystem der mCMV-Infektion nach experimenteller KMT im Lungengewebe in einer Kinetik untersucht. Hierfür wurden zunächst spezifische RT-qPCRs etabliert, sowie ihre Detektionsgrenzen definiert. Die RT-qPCRs dienen dem Nachweis der viralen Transkripte *IE1*, *IE3*, *m164*, *M105* und *M86* aus Lungenstücken zu den Zeitpunkten 4, 6 und 8 Monate *post* KMT.

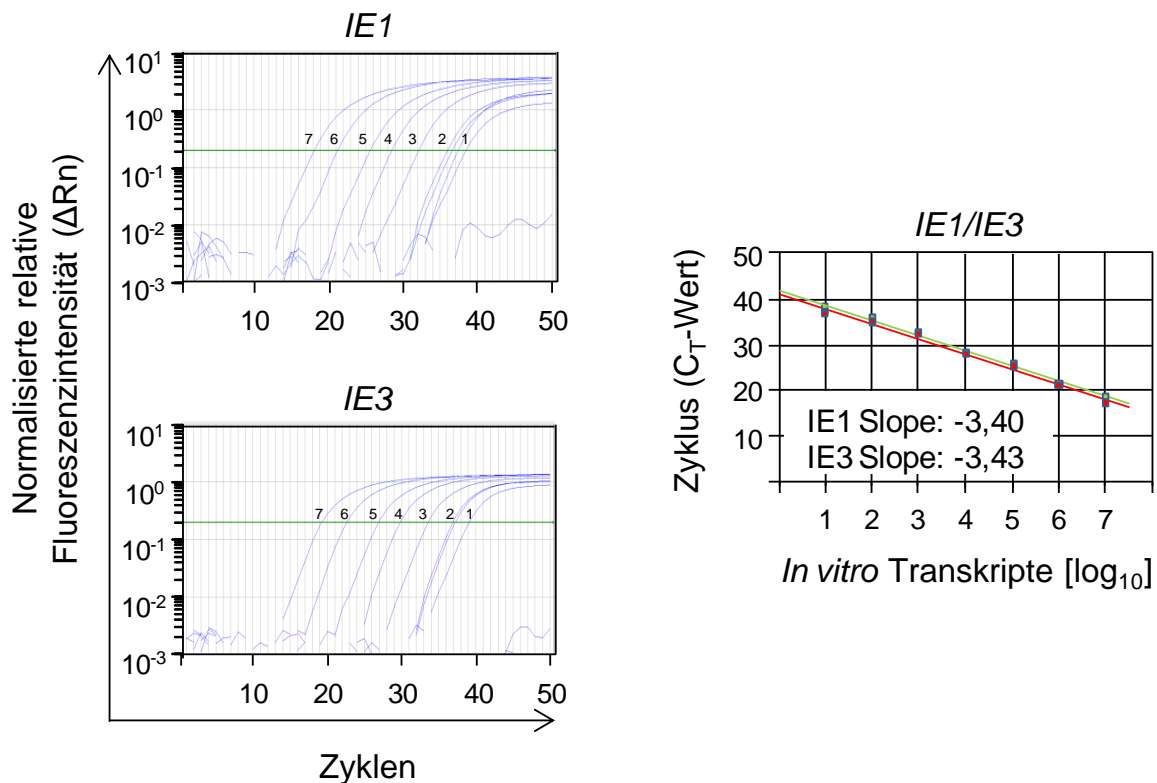
#### 3.1.1 Singleplex und Duplex RT-qPCRs zum Nachweis viraler Transkripte

Zur absoluten Quantifizierung wurden *in vitro* Transkripte verwendet, um entsprechende Standardkurven zu generieren. Die *in vitro* Transkripte mussten, nach Herstellung aus linearisierten Plasmiden mittels *in vitro* Transkription (2.2.6.5), auf eine definierte Teilchenzahl eingestellt werden (2.2.6.6). Alle *in vitro* Transkript-Standards wurden in  $\log_{10}$ -Stufen von  $10^7$  bis  $10^1$  in RNase-freien Reaktionsgefäßen titriert, wobei ab der Verdünnungsstufe  $10^3$  die Zugabe von  $2\mu\text{g}$  Poly-A<sup>+</sup> RNA erfolgte, um unspezifische Bindungen der *in vitro* Transkripte an die Gefäßwand zu verhindern. In allen Ansätzen wurden die Standards von  $10^7$  bis  $10^3$  einzeln und die  $10^2$  sowie  $10^1$  Titrationsstufen als Duplikate in die RT-qPCR eingesetzt.

Für die Detektion von *IE1/IE3*, *E1*, *m164*, *M86* und  $\beta$ -*Actin* wurden bereits publizierte *Primer* und TaqMan Sonden verwendet: *IE1/IE3*, *M86*: Seckert et al., 2009; *E1*: Simon et al., 2006b; *m164*: Übersicht: Lemmermann et al., 2010;  $\beta$ -*Actin*: Wilhelmi et al., 2008. Die Ermittlung der spezifischen Sequenzen von *Primern* und Sonde für das *M105* Transkript erfolgte mit dem Programm Primer Express 2.0. Alle verwendeten Sonden waren mit dem Reporter FAM markiert mit Ausnahme der Cy5 markierten Sonde für *IE3*, so dass *IE1* und *IE3* in einer Duplex-RT-qPCR quantifiziert werden konnten. Um die Überlappung der Reporterfluoreszenzen mit den Eigenfluoreszenzen der *quencher* zu verhindern, kamen in der Duplex RT-qPCR *black hole quencher* ohne Eigenfluoreszenz zum Einsatz (Wilson & Johansson, 2003).

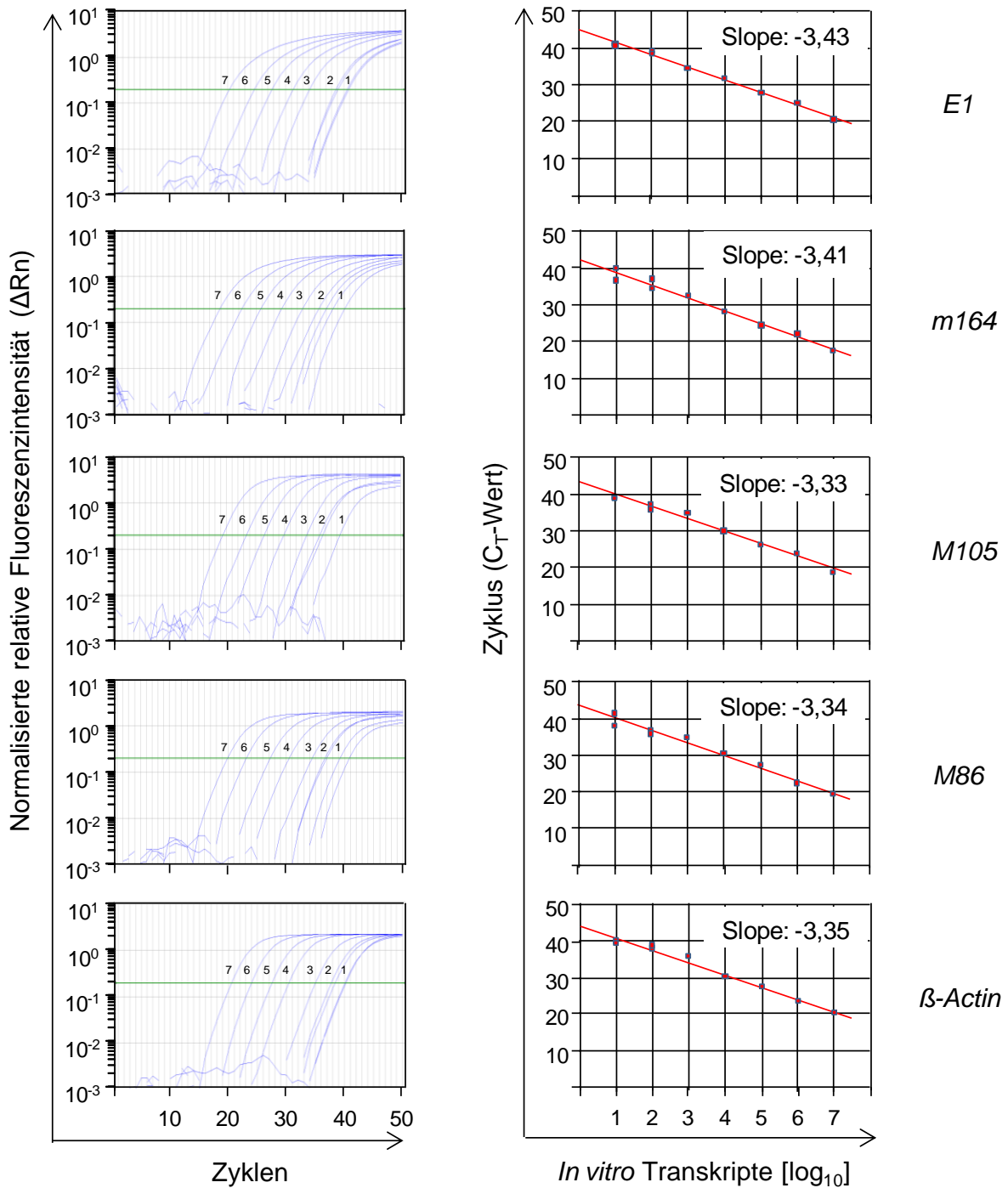
Die Amplifikationskurven der Standards sollen unter optimalen Bedingungen parallel ansteigen und bei  $\log_{10}$ -Titrationsen den gleichen Abstand zueinander zeigen. Idealerweise beträgt der Abstand zweier Stufen in der exponentiellen Phase der PCR 3,33 Zyklen. Dieser Abstand beschreibt die exakte Verdoppelung des PCR Produktes je Zyklus ( $2^{3,33} = 10$ ).

Zur Auswertung wurde durch den exponentiellen Anstieg der Amplifikationskurven der Schwellenwert (*threshold*) gelegt; dieser reflektiert einen statistisch signifikanten Signalanstieg im Vergleich zum Hintergrundsignal (*baseline*). Die Schnittpunkte des *thresholds* mit den titrierten *in vitro* Transkript-Standards definieren die  $C_T$ -Werte (Abb.3.1, linke Spalte), eine Auftragung der  $C_T$ -Werte gegen die Kopienzahl des jeweiligen Plasmid-Standards resultiert in der dazugehörigen Standardkurve (Abb. 3.1, rechte Spalte).



**Abb. 3.1: Amplifikationsprofile und Standardkurven der Duplex-RT-qPCR für *IE1* und *IE3***

Die *in vitro* Transkript-Standards für *IE1* und *IE3* wurden in einer Kopienzahl von  $10^7$  bis  $10^1$  Teilchen titriert (markiert durch Exponenten), wobei die Standards von  $10^7$  bis  $10^3$  Teilchen einzeln und die  $10^2$  sowie  $10^1$  Titrationen als Duplikate eingesetzt wurden. Zur Quantifizierung in einer Duplex-RT-qPCR wurden Sonden ( $0,25\mu\text{M}$ ) mit folgenden Markierungen verwendet: *IE1*-FAM und *IE3*-Cy5. In den Amplifikationsprofilen (linke Spalte) ist die normalisierte relative Fluoreszenzintensität ( $\Delta R_n$ ) auf der y-Achse aufgetragen. Diese stellt den Quotienten aus den Fluoreszenzen des Reporters und des passiven Referenzfarbstoffs ROX dar, letzterer definiert das Hintergrundsignal (*baseline*). Die horizontale grüne Linie bezeichnet den *threshold*, der die Definition der  $C_T$ -Werte erlaubt, also der Schnittpunkte des *thresholds* mit den titrierten *in vitro* Transkript-Standards. In der rechten Spalte sind die korrespondierenden Standardkurven für *IE1* grün und für *IE3* rot dargestellt. Die jeweiligen  $C_T$ -Werte sind gegen die korrespondierende Kopienzahl des Plasmid-Standards aufgetragen. Anhand der resultierenden Steigung (*slope*) erfolgte die Berechnung der Amplifikationseffizienz (E) (siehe Text).



**Abb. 3.2: Amplifikationsprofile und Standardkurven der Singleplex-RT-qPCRs für *E1*, *m164*, *M105*, *M86* und  $\beta$ -Actin**

Die *in vitro* Transkript-Standards wurden in einer Kopienzahl von  $10^7$  bis  $10^1$  titriert (markiert durch Exponenten), wobei die Standards von  $10^7$  bis  $10^3$  einzeln und die  $10^2$  sowie  $10^1$  Titrationsen als Duplikate eingesetzt wurden. Zur Quantifizierung wurden Sonden ( $0,25\mu\text{M}$ ) mit FAM Markierungen verwendet. In den Amplifikationsprofilen (linke Spalte) ist die normalisierte relative Fluoreszenzintensität ( $\Delta R_n$ ) gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen. Mit Hilfe des *thresholds* konnten die  $C_T$ -Werte definiert werden. In der rechten Spalte sind die zugehörigen Standardkurven dargestellt. Die jeweiligen  $C_T$ -Werte sind gegen die korrespondierende Kopienzahl des Plasmid-Standards aufgetragen. Anhand der resultierenden Steigung (*slope*) erfolgte die Berechnung der Amplifikationseffizienz (E) (siehe Text).

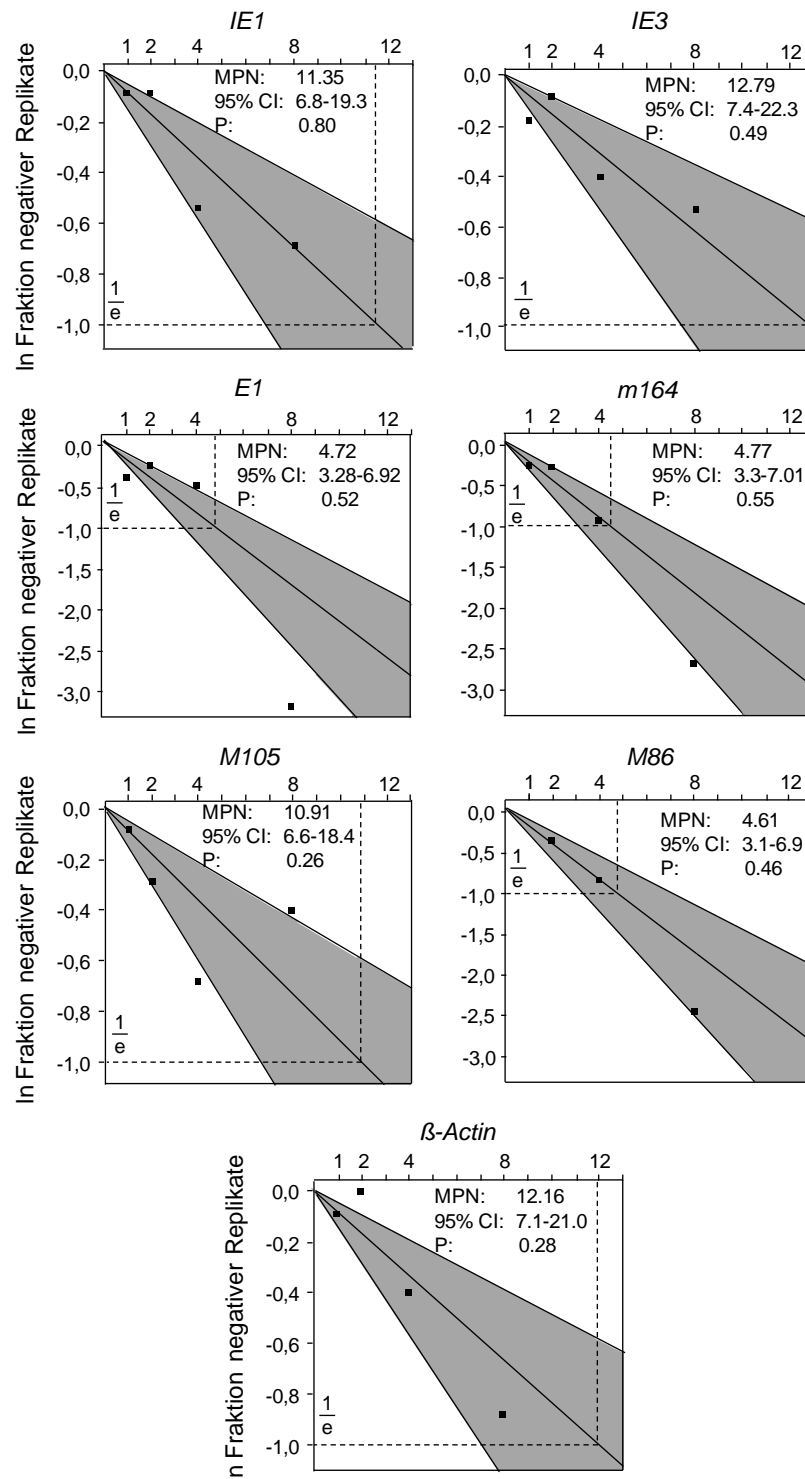


Anhand der Steigung (*slope*) der Standardkurven wurden die korrespondierenden Amplifikationseffizienzen (E) mit folgender Formel berechnet:  $E = (10^{(-1/slope)}) - 1$ . Als akzeptabel gelten Effizienzen von 80%-110% (entspricht einer *slope* von 3,9-3,0) (*qPCR Technical Guide*, Sigma: <http://www.sigmaldrich.com/life-science/molecular-biology/pcr/quantitative-pcr/qpcrtechnical-guide.html>). Um die Vergleichbarkeit der einzelnen RT-qPCRs zu gewährleisten, sollten die Abweichungen der jeweiligen Amplifikationseffizienzen ( $\Delta E$ ) nicht mehr als 5% betragen (*Roche Molecular Biochemicals, Technical Note No. LC 10/2000*). Außerdem ist darauf zu achten, dass der Korrelationskoeffizient ( $R^2$ ), der als Maß für die Genauigkeit der Standardtitration dient und die Linearität der Standardkurve reflektiert, nicht  $\leq 0,985$  ist ( $R^2$  nicht in den Abbildungen gezeigt).

Die Amplifikationsprofile der *in vitro* Transkript-Standards für *IE1/IE3* sind in Abbildung 3.1, die der übrigen Transkripte in Abbildung 3.2, jeweils in der linken Spalte dargestellt. Man kann deutlich erkennen, dass die Amplifikationen über 7  $\log_{10}$ -Stufen gleichmäßig titrierten und die exponentiellen Anstiege nahezu parallel verliefen. Die zugehörigen Standardkurven sind jeweils in der rechten Spalte der Abbildungen 3.1 und 3.2 dargestellt, zusätzlich ist die jeweilige *slope* angegeben. Die Berechnung der Amplifikationseffizienzen ergab für *IE1*: 96,8%, *IE3*: 95,7%, *E1*: 95,7%, *m164*: 96,5%, *M105*: 99,7%, *M86*: 99,3% und  *$\beta$ -Actin*: 98,8%. Da  $\Delta E \leq 5\%$  sein sollte, wurde das Verhältnis der größten zur geringsten Amplifikationseffizienz  $E = 99,7\% : E = 95,7\%$  ermittelt, es betrug 4%; demnach wurde die Forderung  $\Delta E \leq 5\%$  erfüllt. Die *in vitro* Transkripte erfüllten also alle Anforderungen einer guten Standardkurve und konnten im Folgenden zur Quantifizierung der jeweiligen Transkripte eingesetzt werden.

### 3.1.2 Bestimmung des Detektionslimits viraler Transkripte für die RT-qPCR

Für die *IE1/IE3*-, *E1*-, *m164*-, *M105*-, *M86*- und  *$\beta$ -Actin*-spezifischen RT-qPCRs wurde im Folgenden das Detektionslimit bestimmt. Die Bestimmung dieser Sensitivitätsgrenzen erfolgte mittels *limiting dilution* (Finney, 1952; Fazekas de St. Groth, 1982; Taswell, 1987). Dazu wurden die *in vitro* Transkript-Standards  $\log_2$  von 4 bis 0,5 Transkripte/ $\mu$ l titriert, so dass sich rechnerisch in einem 2 $\mu$ l Ansatz eine Transkriptanzahl von 8, 4, 2, bzw. 1 befand. Diese Titrationen wurden in jeweils 12 Replikaten in die RT-qPCR eingesetzt. Mit Hilfe der ELDA-Software (<http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda/>; Hu & Smyth, 2009) erfolgte anhand der Informationen über die Transkriptanzahl, Replikatanzahl, und Anteil negativer Replikate, die Kalkulation der In-linearen Regression nach der *maximum likelihood* Methode (Fisher, 1922).



**Abb. 3.3: Sensitivitätsbestimmung der IE1-/IE3-, E1-, m164-, M105-, M86- und  $\beta$ -Actin-spezifischen RT-qPCRs**

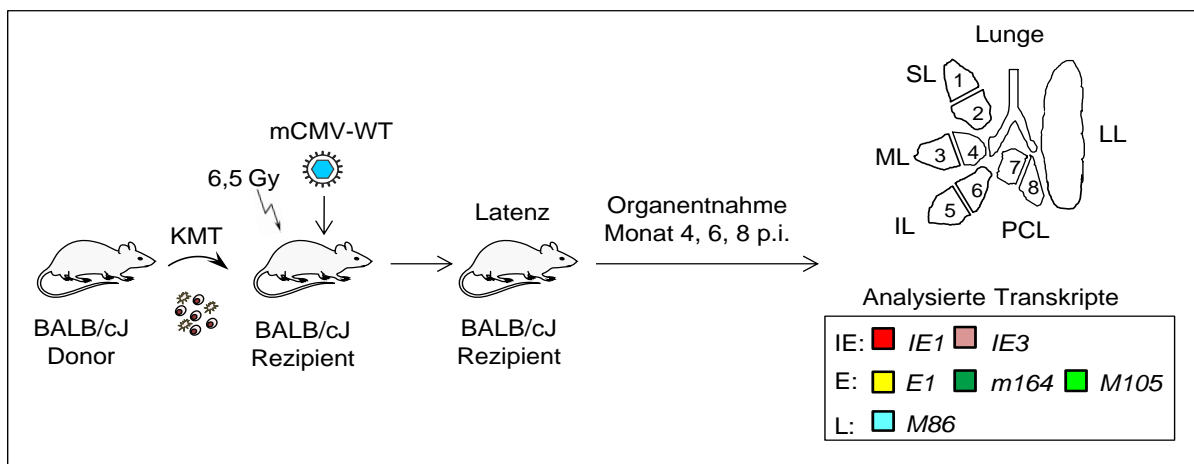
Die jeweiligen *in vitro* Transkripte wurden  $\log_2$  von 4 bis 0,5 Transkripte/ $\mu$ l titriert und in 12 Replikaten zu jeweils 2  $\mu$ l in die RT-qPCR eingesetzt (entspricht einer Transkriptmenge von 8, 4, 2 und 1 Transkripten). Die Anzahl negativer Replikate wurde in die *limiting dilution* Analyse eingesetzt (siehe Text) und ermöglichte die Berechnung der *most probable number* (MPN), der benötigten Teilchenzahl, um eine Detektion zu gewährleisten. Die dargestellten Regressionsgeraden wurden nach der *maximum likelihood* Methode kalkuliert. Die Berechnung der MPN erfolgte aus dem Schnittpunkt von  $\ln 1/e$  und der Geraden (gestrichelte Linie) basierend auf der Poisson-Verteilung. Das 95% Konfidenzintervall (CI) ist grau hinterlegt. P definiert den Wahrscheinlichkeitswert, als Maß für die Anpassungsgüte des statistischen Modells.

Für alle getesteten *in vitro* Transkripte sind in Abbildung 3.3 die berechneten Regressionsgeraden mit ihren 95% Konfidenz-Intervallen (CI; grau hinterlegt) dargestellt. Basierend auf der Poisson-Verteilung erfolgte die Berechnung der *most probable number* (MPN), die der minimal detektierbaren Teilchenzahl entspricht.

Für *IE1* lag die MPN bei 11,35 Teilchen mit einem 95% Konfidenz-Intervall von 6,8-19,3, *IE3* erreichte eine Nachweis-Sensitivität von 12,79 Kopien mit einem Intervall von 7,4-22,3. Das Detektionslimit von *E1* lag bei 4,72 Teilchen (CI: 3,28-6,92), für *m164* betrug es 4,77 (CI: 3,3-7,01) und für *M105* 10,91 (6,6-18,4). *M86* und  $\beta$ -*Actin* erreichten Nachweis-Sensitivitäten von 4,61 (CI: 3,1-6,9) bzw. 12,16 Teilchen (CI: 7,1-21,0). Insgesamt lagen die Detektionslimits der jeweiligen RT-qPCRs in Bereichen von 5-13 Kopien.

### 3.1.3 Identifizierung stochastisch verteilter Transkript-Expressionsmuster während der Latenz

Nach Etablierung der entsprechenden RT-qPCRs sollten nun die viralen Transkripte in latent infizierten Lungen quantifiziert werden. Die Etablierung der Viruslatenz erfolgte in dem in Abbildung 3.4 dargestellten Modell der syngenen KMT, welches das Erreichen einer besonders hohen viralen DNA-Load in der Latenz durch temporäre Immunsuppression ermöglicht.



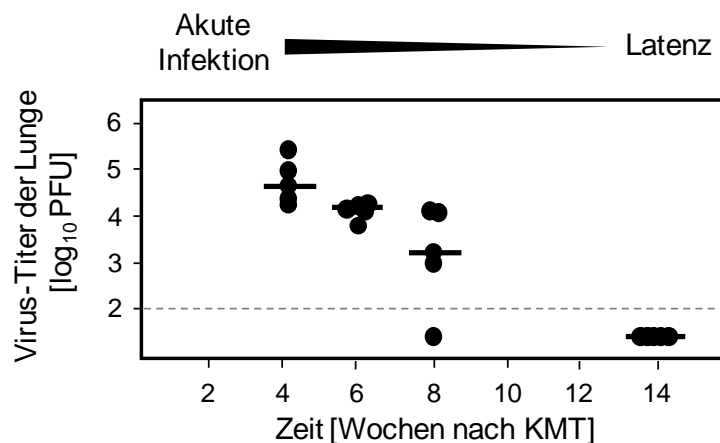
**Abb. 3.4: Modell der KMT zur Etablierung von mCMV Latenz für die Analyse von Transkript-Expressionsmustern**

Die Rezipienten wurden durch Bestrahlung mit einer Dosis von 6,5 Gray (Gy) immunsupprimiert und erhielten zur Rekonstitution des Immunsystems KMZ ( $5 \times 10^6$  Zellen/Maus, *i.v.*) der Donor-Tiere. Die mCMV-WT-BAC Infektion erfolgte mit einer Dosis von  $2 \times 10^5$  PFU *i.pl.* Nach Etablierung von Latenz wurden je 5 Tieren zu den Zeitpunkten 4 und 6 Monate *p.i.*, bzw. 4 Tieren zum Zeitpunkt 8 Monate *p.i.* die Lungen entnommen, wobei der superiore (SL), mediale (ML) und inferiore Lobus (IL) der rechten Lungenhälfte, sowie der post-cavale Lobus (PCL) in insgesamt acht Stücke geteilt wurden. Aus diesen Stücken erfolgte die Aufreinigung von PolyA<sup>+</sup> RNA und die Analyse der gezeigten Transkripte. Der Lobus der linken Lungenhälfte kam in einer durchflusszytometrischen Analyse zur Charakterisierung Epitop-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen zur Verwendung (siehe 3.1.6).

Hierfür wurden BALB/cJ Rezipienten durch  $\gamma$ -Bestrahlung (6,5 Gray) immunsupprimiert und mit  $5 \times 10^6$  Knochenmarkzellen (KMZ) rekonstituiert. Anschließend erfolgte die Infektion *i.pl.* mit  $2 \times 10^5$  PFU mCMV-WT-BAC.

Nach KMT erfolgt die Kontrolle der akuten Infektion hauptsächlich durch Gewebeinfiltrierende, rekonstituierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Podlech et al., 1998) und nur zu einem geringeren Anteil durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen und NK-Zellen. Zunächst ist die Kontrolle der produktiven Infektion im KM und später in den weiteren Zielorganen nachweisbar, wobei dies in der Milz früher als in der Lunge und dort wiederum früher als in der Speicheldrüse sichtbar ist (Übersicht: Reddehase et al., 2002).

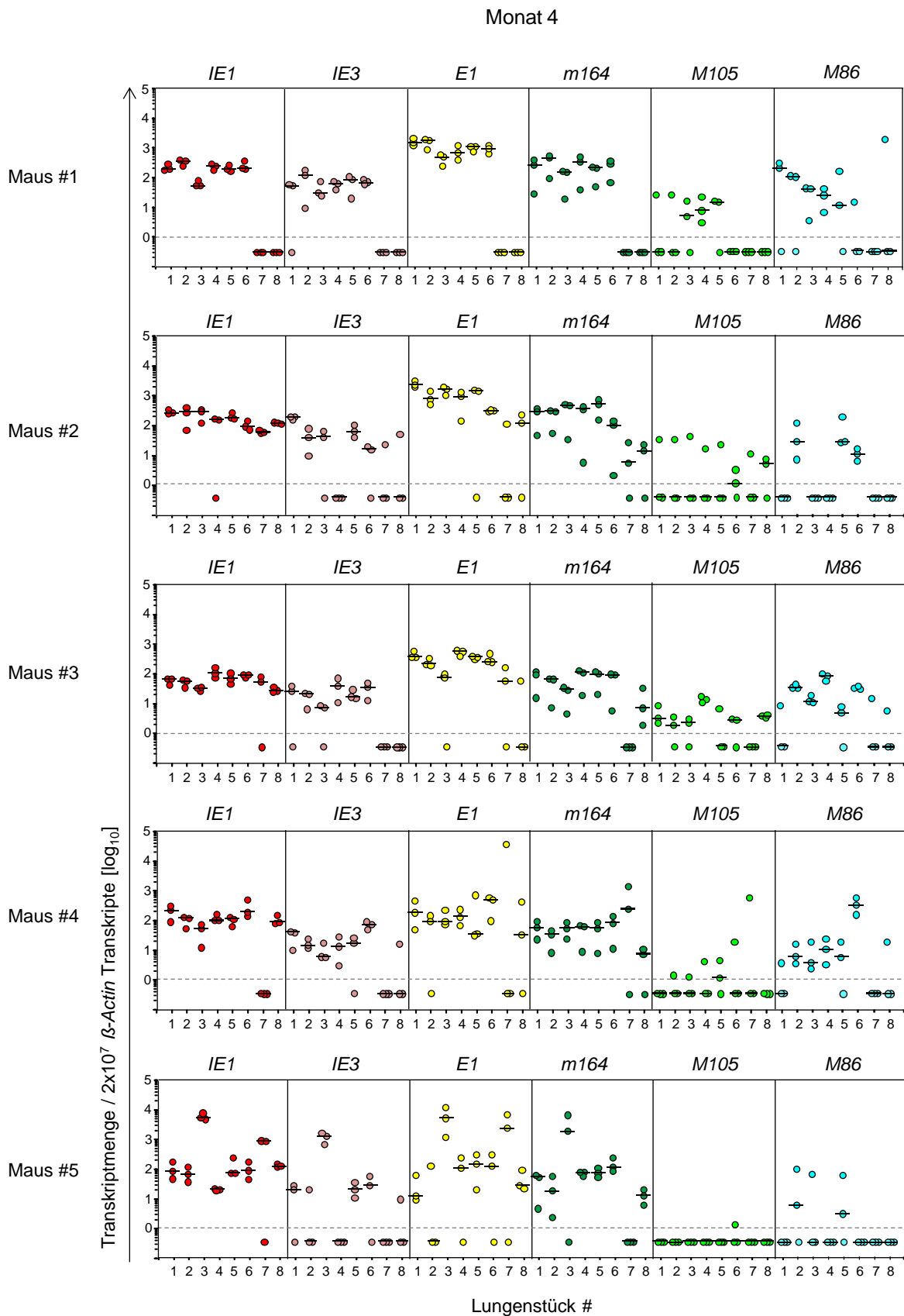
Um die Kontrolle der Infektion zu verfolgen wurden die Virustiter von Lungenhomogenaten aus jeweils 5 Tieren zu den Zeitpunkten 4, 6, 8 und 14 Wochen nach KMT bestimmt. Wie in Abbildung 3.5 deutlich zu erkennen ist, war in der Lunge bereits 14 Wochen nach KMT keine produktive Infektion mehr nachweisbar. Dies bedeutet, dass ab diesem Zeitpunkt von einer Beendigung der produktiven Infektion und vollständigen mCMV-Latenz-Etablierung in der Lunge gesprochen werden kann.



**Abb. 3.5: Nachweis von mCMV-Latenz durch Rückgang der produktiven Infektion in der Lunge**

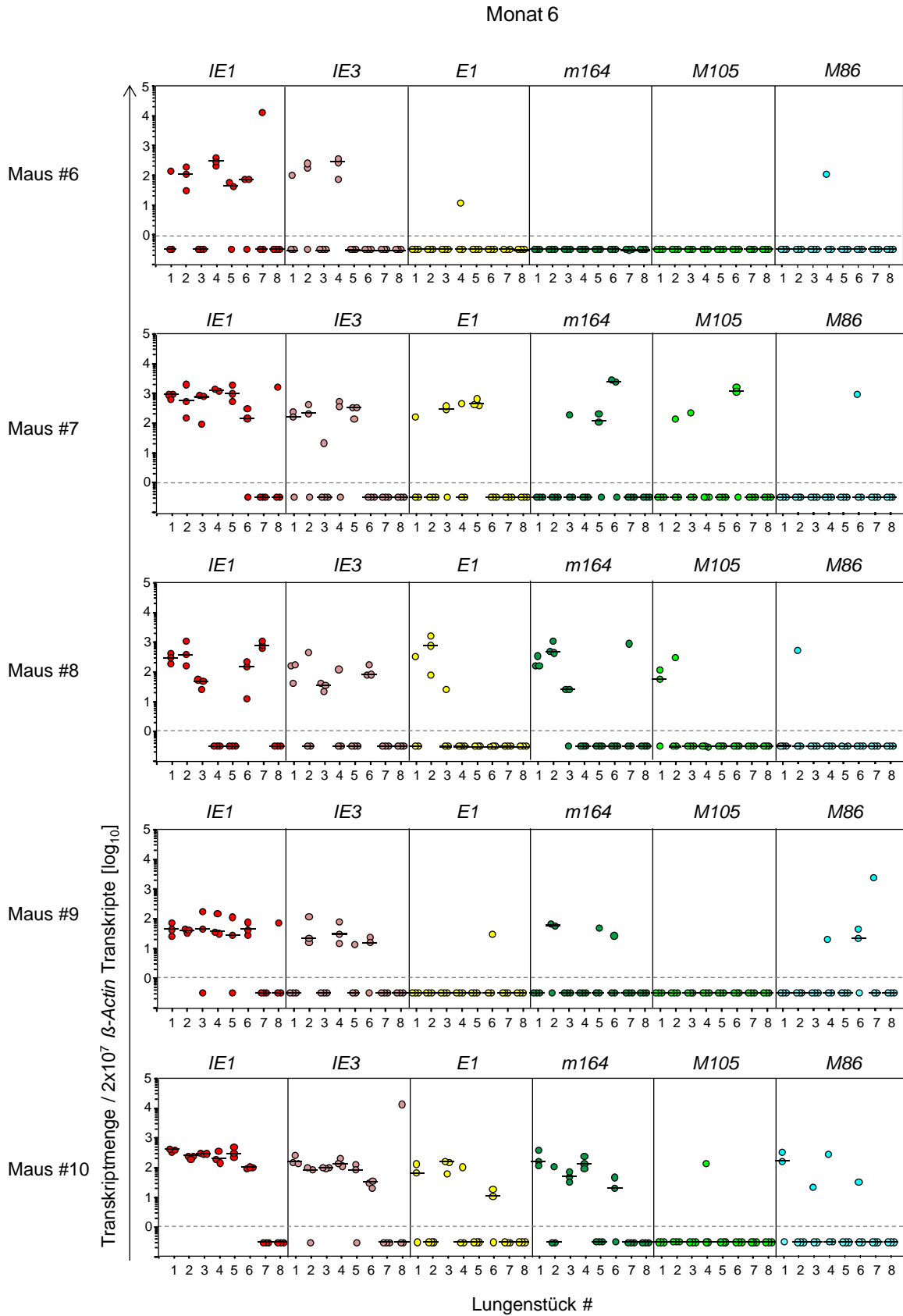
Die Virustiter der Lunge wurden für jeweils 5 Mäuse zu den angegebenen Zeitpunkten im Plaque-Assay bestimmt. Die horizontalen Balken repräsentieren die Mediane, die gestrichelte Linie stellt das Detektionslimit dar.

Für die Analyse der viralen Transkript-Expressionsmuster wurden die Zeitpunkte 4, 6 und 8 Monate nach KMT gewählt. Zu jedem Zeitpunkt wurden die Lungen von jeweils 5 Tieren entnommen. Der superiore (SL), mediale (ML) und inferiore Lobus (IL) der rechten Lungenhälfte, sowie der post-cavale Lobus (PCL) wurden in insgesamt acht Stücke geteilt. Eine ähnliche Unterteilung der Lunge in mehrere Stücke kam bereits bei Kurz et al. (1999) zum Einsatz; hier konnte gezeigt werden, dass die latenten viralen Genome annähernd gleichmäßig in der Lunge verteilt sind.



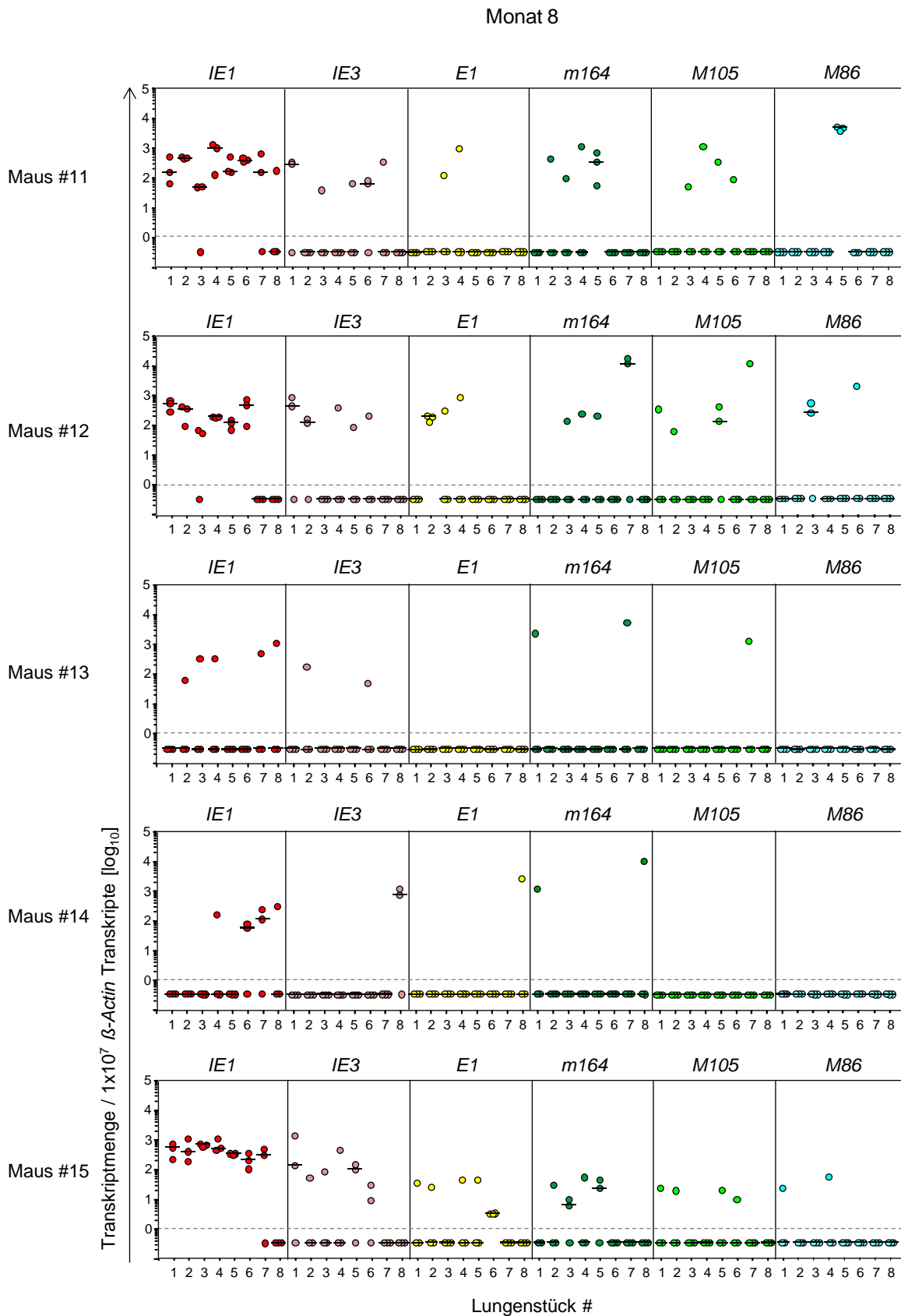
**Abb. 3.6: Virale Transkriptanalyse latent infizierter Lungenstücke-Monat 4**

Dargestellt ist die detektierte Transkriptzahl der jeweiligen Lungenstücke 1 bis 8 von 5 Mäusen für *IE1*, *IE3*, *E1*, *m164*, *M105* und *M86*, normiert auf  $2 \times 10^7$   $\beta$ -Actin Transkripte. Pro Lungenstück wurde 1/25 ( $3 \mu\text{l}$ ) der aufgereinigten PolyA<sup>+</sup> RNA in die spezifische RT-qPCR eingesetzt; es wurden jeweils Triplikate quantifiziert. Die horizontalen Balken repräsentieren die Mediane.



**Abb. 3.7: Virale Transkriptanalyse latent infizierter Lungenstücke -Monat 6**

Dargestellt ist die detektierte Transkriptzahl der jeweiligen Lungenstücke 1 bis 8 von 5 Mäusen für *IE1*, *IE3*, *E1*, *m164*, *M105* und *M86*, normiert auf  $2 \times 10^7$   $\beta$ -Actin Transkripte. Pro Lungenstück wurde 1/25 (3 $\mu$ l) der aufgereinigten PolyA<sup>+</sup> RNA in die spezifische RT-qPCR eingesetzt; es wurden jeweils Triplikate quantifiziert. Die horizontalen Balken repräsentieren die Mediane.



**Abb. 3.8: Virale Transkriptanalyse latent infizierter Lungenstücke -Monat 8**

Dargestellt ist die detektierte Transkriptzahl der jeweiligen Lungenstücke 1 bis 8 von 5 Mäusen für *IE1*, *IE3*, *E1*, *m164*, *M105* und *M86*, normiert auf  $2 \times 10^7$   $\beta$ -Actin Transkripte. Pro Lungenstück wurde 1/25 ( $3 \mu\text{l}$ ) der aufgereinigten PolyA<sup>+</sup> RNA in die spezifische RT-qPCR eingesetzt; es wurden jeweils Triplikate quantifiziert. Die horizontalen Balken repräsentieren die Mediane.

In der hier vorliegenden Arbeit diente die Stückelung dem Nachweis von Genexpressions-Mustern in jedem einzelnen Lungenstück. Ungleiche Muster wären ein Hinweis auf differenzielle, virale Genexpression einzelner Lungenstücke und damit einzelner Zellen und/oder einzelner Genome. Für die Transkriptanalyse wurde aus den Lungenstücken PolyA<sup>+</sup> RNA isoliert und mittels RT-qPCR erfolgte die Quantifizierung von Transkripten der drei kinetischen Klassen IE (*IE1*, *IE3*), E (*E1*, *m164*, *M105*), L (*M86*). Jeweils 1/25 der, aus den Stücken aufgereinigten, PolyA<sup>+</sup> RNA wurde in Triplikaten in die spezifische RT-qPCR eingesetzt.

Zur Kontrolle und für eine Normierung wurde zusätzlich für jedes Lungenstück das zelluläre Transkript *β-Actin* quantifiziert. Dieses sollte in allen Stücken, unter der Voraussetzung einer erfolgreichen PolyA<sup>+</sup> Aufreinigung in vergleichbaren Mengen vorhanden sein. Es konnten in allen Lungenstücken *β-Actin* Transkripte nachgewiesen werden, ihre Zahl lag im Mittel bei 10<sup>6</sup> bis 10<sup>7</sup> Transkripten, mit Schwankungen von ~10<sup>5</sup> bis ~10<sup>8</sup> (nicht gezeigt).

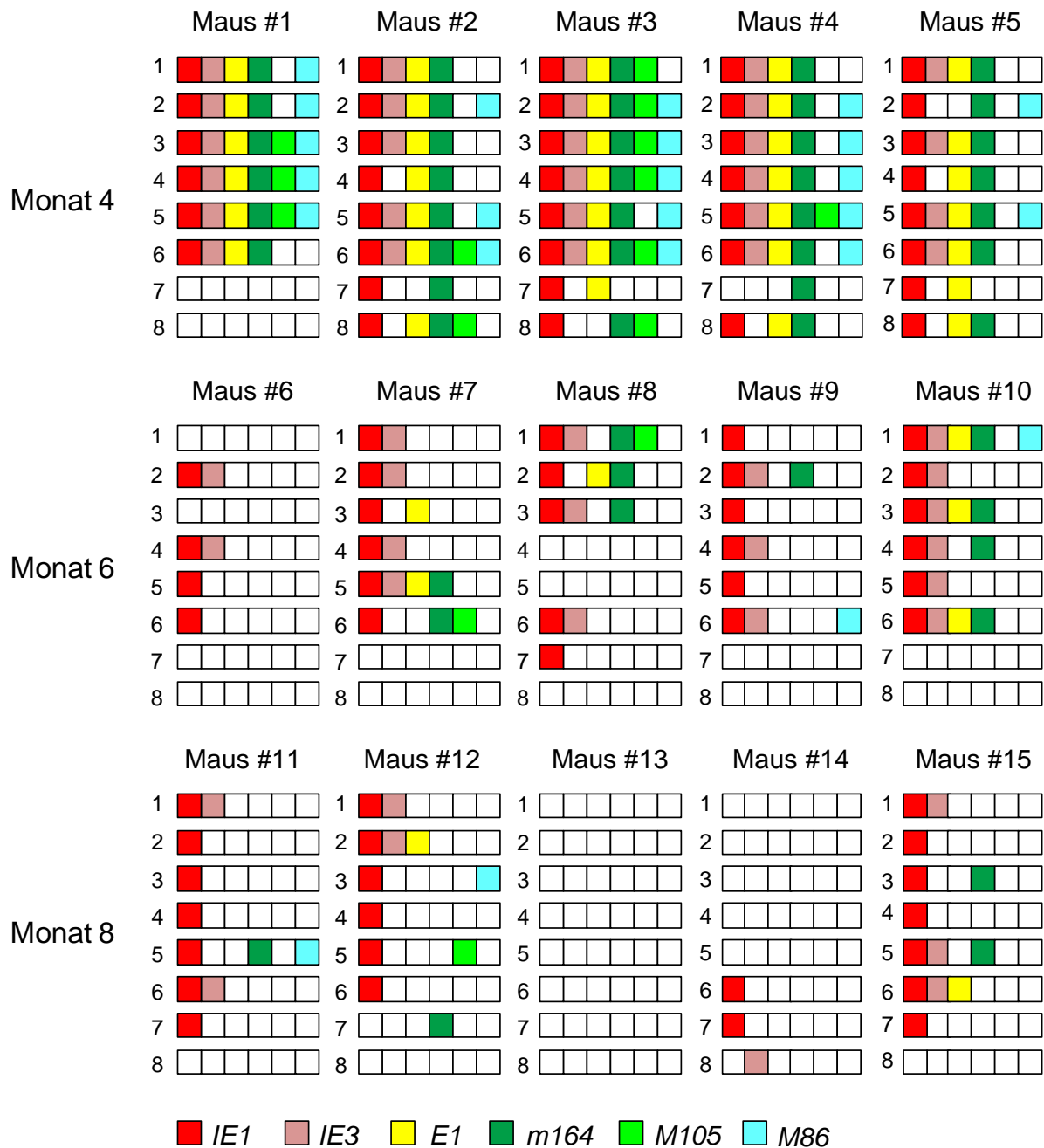
Um die Vergleichbarkeit der Transkriptmengen verschiedener Lungenstücke zu gewährleisten, wurde die quantifizierte Menge viraler Transkripte auf eine Anzahl von 2x10<sup>7</sup> zelluläre *β-Actin* Transkripte mit Hilfe folgender Formel normiert:

$$\text{normierte Anzahl viraler Transkripte} = \frac{\text{virale Transkripte} \times (2 \times 10^7)}{\beta\text{-Actin Transkripte}}$$

Die Ergebnisse der Transkriptanalysen sind in den Abbildungen 3.6 bis 3.8 dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass die Menge der viralen Transkripte zu allen Zeitpunkten im Mittel 100 Transkripte/2x10<sup>7</sup> zellulären Transkripten betrug, wobei die meisten Werte in einem Bereich von 10-1.000 Transkripten lagen. Vergleicht man die einzelnen Monate miteinander, ist über die Zeit ein Rückgang der Transkriptmengen und damit einhergehend ein Anstieg der Transkript-negativen Lungenstücke, also eine niedriger werdende Transkriptionsaktivität, zu beobachten.

Zur besseren Übersicht wurde anhand der detektierten Triplikate ein binäres Muster der viralen Transkription abgebildet. Hierzu wurden die jeweiligen Lungenstücke als positiv oder negativ für das entsprechende Transkript bewertet. Positive und negative Stücke wurden nach folgender Regel definiert: Ein Stück galt als negativ, sobald zwei der Triplikate negativ waren. Ein positives Stück musste hingegen mindestens zwei positive Triplikate aufweisen. Das dadurch entstandene Muster der viralen Transkription ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Dieses verdeutlicht die stochastische Verteilung der Expressionsmuster und ermöglicht zugleich das direkte Erkennen der über die Zeit abnehmenden Ereignisse der viralen Transkriptexpression.





**Abb. 3.9: Muster der viralen Transkription in der Latenz**

Zur Übersicht der viralen Transkriptanalyse latenter Lungenstücke wurde ein Expressionsmuster generiert. Ein Stück galt als negativ, sobald 2 der gemessenen Triplikate negativ waren. Ein Stück wurde positiv bewertet, sobald mindestens zwei Replikate positiv waren. In der Legende ist der Farbcode für die jeweiligen Transkripte dargestellt.

In der produktiven Infektion und nach Reaktivierung folgt die Transkriptexpression der IE-E-L Kinetik (Honest & Roizman, 1974; Emery & Griffiths, 1990; Mocarski et al., 2006), dies scheint jedoch für die sporadische Genexpression während der Latenz nicht zu gelten. So konnten zu allen untersuchten Zeitpunkten Lücken im Expressionsmuster beobachtet werden. Beispielsweise konnten E- oder L-Transkripte auch ohne das Vorhandensein von IE-Transkripten nachgewiesen werden; in Stück 7 der Maus Nr. 4 und in Stück 7 der Maus

Nr. 12. Zusätzlich gab es Fälle mit IE- und L-Expression ohne E-Expression; in Stück 6 der Maus Nr.9 und in Stück 3 der Maus Nr.12. Allgemein ist zu sagen, dass die Muster in der Latenz stochastisch verteilt waren und nicht mit dem typischen Muster einer produktiven Infektion übereinstimmten.

Interessanterweise konnten in der vorliegenden Arbeit auch *IE3* Transkripte in der Latenz nachgewiesen werden, was in gewissem Widerspruch zu der Publikation von Kurz et al. (1999) steht. Diese Arbeit entstand jedoch in einer Zeit zu der nur semiquantitative Analysen möglich waren. Außerdem untersuchten die Autoren nur einen sehr späten Zeitpunkt der Latenz, zu dem auch die *IE1*-Transkription bereits fast erloschen war.

Insgesamt waren in den hier gezeigten Versuchen 37 von 40 getesteten Lungenstücken an Monat 4 positiv für das *IE1* Transkript. Mit voranschreitender Zeit konnte eine Reduktion der positiven Stücke auf 27 an Monat 6 und auf 22 an Monat 8 beobachtet werden. Für *IE3* wurden 27 positive Lungenstücke an Monat 4, 18 an Monat 6 und 8 an Monat 8 nachgewiesen. Ähnliche Daten konnten auch für *E1*: 34-6-2 positive Stücke und *m164*: 36-10-4 für die Monate 4-6-8 erhoben werden. Die Transkripte *M105* und *M86* waren etwas seltener vertreten: *M105*: 12-2-1; *M86*: 20-2-2 positive Stücke in den Monaten 4-6-8.

Zusammenfassung: In den Lungen mCMV-infizierter BALB/cJ Mäuse war bereits 14 Wochen nach KMT die akute Infektion beendet und Latenz etabliert. Während der Latenz konnte zu den Zeitpunkten 4, 6 und 8 Monate nach KMT ein stochastisches Expressionsmuster der viralen Transkripte *IE1*, *IE3*, *E1*, *m164*, *M105* und *M86* nachgewiesen werden. Dieses Muster stimmte nicht mit dem typischen IE-E-L-Muster der produktiven Infektion und Reaktivierung überein.

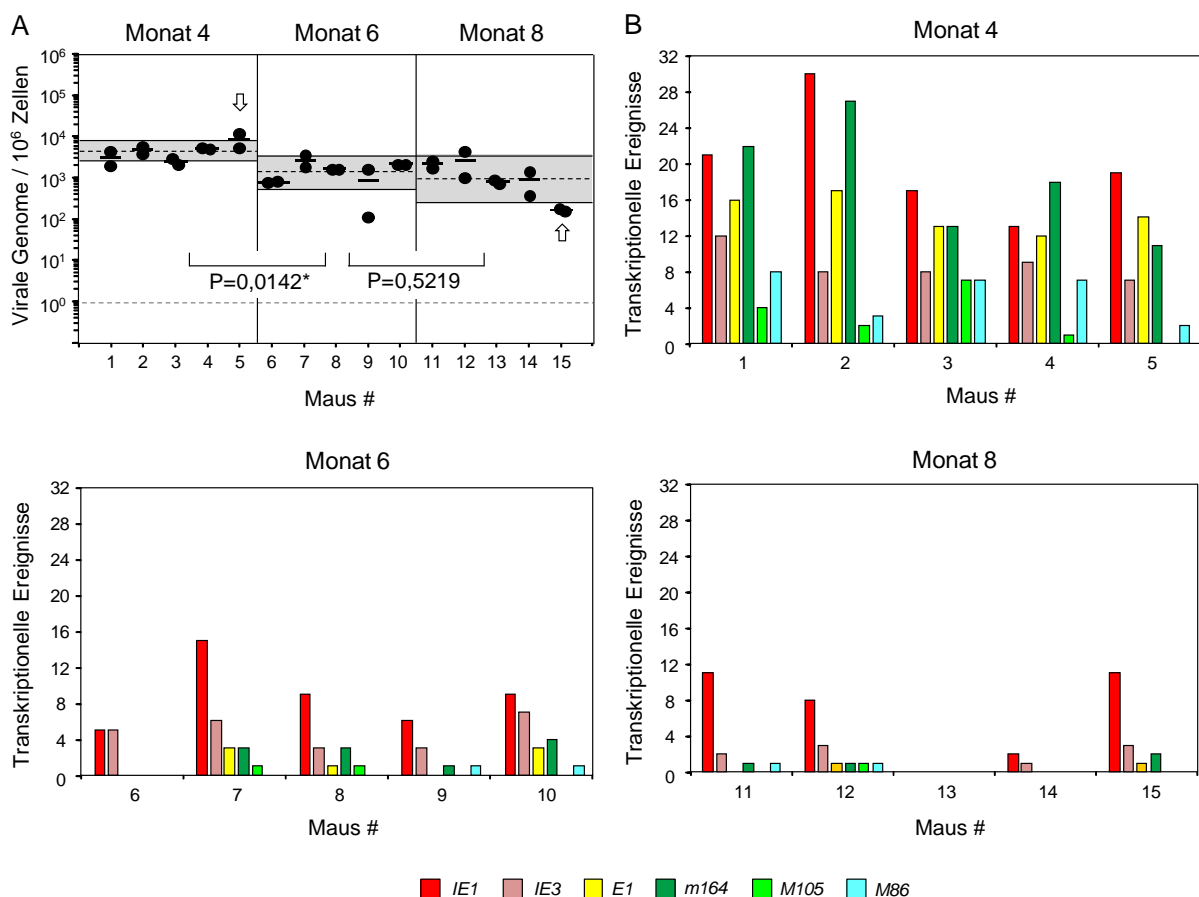
### 3.1.4 Einfluss der viralen *Load* auf die Transkriptexpression

Es stellte sich nun die Frage, ob die beobachtete Abnahme der viralen Transkriptexpression von der latenten viralen DNA-*Load* beeinflusst wird. Daher wurde aus den Lungenstücken Nr. 7 und 8 jeder Maus zu jedem Zeitpunkt neben der RNA auch virale DNA aufgereinigt (siehe 2.2.5.1.2) und zur Bestimmung der viralen *Load* herangezogen. Mittels *gB*- und *pThrp*-spezifischer qPCR wurde die Anzahl der viralen Genome über *gB* determiniert und anhand des zellulären Gens *pThrp* auf  $1 \times 10^6$  Zellen normiert. Infektiöses Virus war zwar bereits 14 Wochen nach KMT nicht mehr nachweisbar (Abb. 3.5), latente virale Genome konnten allerdings in einer Größenordnung von mehreren tausend Kopien pro Lunge weiterhin nachgewiesen werden (Abb. 3.10 A).

Zwischen Monat 4 und 6 war eine signifikante Abnahme der viralen *Load* zu beobachten (P-Wert = 0,01 im t-Test; Zweistichproben-t-Test mit logarithmisch normalverteilten Werten). Dem gegenüber war der Rückgang der *Load* zwischen Monat 6 und 8 nicht signifikant

(P-Wert = 0,52). Folglich konnte eine Abnahme der viralen *Load* nur den Rückgang der Transkriptexpression zwischen Monat 4 und 6 beeinflussen, während der weitere Rückgang der Transkriptexpression zwischen Monat 6 und 8 nicht durch die *Load* bedingt war.

In Abbildung 3.10 B sind die transkriptionellen Ereignisse pro Maus dargestellt. Wie die Berechnung dieser Ereignisse erfolgte ist im folgenden Kapitel erklärt. Durch die direkte Gegenüberstellung von viraler *Load* und transkriptioneller Ereignisse wurde deutlich, dass eine Betrachtung einzelner Mäuse gegen eine Korrelation von *Load* und Transkriptionseignissen sprach. Zum Beispiel war Maus Nr. 5 an Monat 4 nicht diejenige mit der höchsten transkriptionellen Aktivität, obwohl sie die höchste *Load* besaß. Umgekehrt war die Maus Nr. 15 mit der niedrigsten *Load* nicht diejenige mit der geringsten Anzahl an transkriptionellen Ereignissen.



**Abb. 3.10: Anzahl der viralen Genome und der Transkriptmenge während der Latenz**

(A) Die DNA aus den Lungenstücken Nr. 7 und 8 diente als *template* für *gB*- und *pThrp*-spezifische qPCRs. Die Zahl der viralen Genome wurde auf  $1 \times 10^6$  Zellen normiert. Die schwarzen Balken repräsentieren die Mediane der quantifizierten Stücke. Die gestrichelte Linie repräsentiert das arithmetische Mittel, das 95% Konfidenz-Intervall ist grau hinterlegt. Ein P-Wert von  $P < 0,05$  (t-Test; Zweistichproben-t-Test mit logarithmisch normalverteilten Werten) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied, gekennzeichnet durch (\*). (B) Die Darstellung der transkriptionellen Ereignisse pro Maus an den Monaten 4, 6 und 8 nach KMT erlaubte einen direkten Vergleich zur Anzahl der viralen Genome derselben Maus.

Zusammenfassung: Die transkriptionelle Aktivität verringerte sich im Laufe der Latenz. Zwischen Monat 4 und 6 koinzidierte diese Abnahme mit einem Rückgang der viralen *Load*. Die weitere Abnahme der Transkriptmenge zwischen Monat 6 und 8 konnte jedoch nicht durch einen fortschreitenden Rückgang der viralen Genome erklärt werden.

### 3.1.5 Berechnung der transkriptionellen Ereignisse während der Latenz

Mit Hilfe der in Abbildung 3.9 dargestellten Expressionsmuster der viralen Transkription in latenten Lungenstücken konnte deutlich gezeigt werden, dass die transkriptionelle Aktivität während der Latenz stochastischer Natur ist. Es ist allerdings nicht möglich zu definieren, ob die quantifizierten Transkripte von der Aktivität einer latent-infizierten Zelle oder von mehreren latent-infizierten Zellen stammen.

Die Poisson-Verteilungsfunktion ermöglicht eine mathematische Abschätzung der Zahl transkriptioneller Ereignisse, wobei auch hier nicht geklärt werden kann, ob ein Ereignis das Resultat einer einzelnen Zelle oder einer Gruppe von Zellen ist. Negative Stücke enthalten keine Ereignisse, im Gegensatz zu positiven Stücken, welche mindestens ein Ereignis aufweisen müssen, jedoch auch mehrere beinhalten können.

Zunächst wurde der Poisson-Verteilungsparameter  $\lambda$  mit der Formel  $\lambda = -\ln F(0)$  berechnet. Bei  $F(0)$  handelt es sich um die Fraktion negativer Stücke, pro Anzahl der insgesamt getesteten Stücke. Die Fraktionen mit  $n = 0, 1, 2, 3, \dots$  Ereignissen wurden mit Hilfe der Formel  $F(n) = \lambda/n \times F(n-1)$  berechnet. Die Poisson-Verteilungsfunktion zur Kalkulation der transkriptionellen Ereignisse wurde bereits von Kurz et al. (1999), Kurz & Reddehase (1999) und Grzimek et al. (2001) publiziert.

In Tab. 3.1 ist eine Übersicht der Ereignisse für alle getesteten Transkripte zu den jeweiligen Monaten dargestellt. Für *IE1* waren beispielsweise 3 von 40 getesteten Lungenstücken an Monat 4 negativ. Daraus ergab sich  $\lambda = -\ln F(3/40) = 2,59$ . Aus der Tabelle kann abgelesen werden, dass es für *IE1* an Monat 4 drei Stücke mit 0 Ereignissen, 8 Stücke mit 1 Ereignis usw. gab. In der Summe kamen in 37 *IE1* positiven Stücken 100 transkriptionelle Ereignisse vor.

**Tab. 3.1: Berechnung der transkriptionellen Ereignisse in latent infizierten Lungenstücken**

Die Poisson-Verteilungsfunktion  $F(n) = \lambda/n \times F(n-1)$  erlaubte eine Abschätzung der Anzahl transkriptioneller Ereignisse für die einzelnen Lungenstücke. Für den Poisson-Verteilungsparameter  $\lambda$  gilt:  $\lambda = -\ln F(0)$ , wobei  $F(0)$  die Fraktion negativer Stücke pro Anzahl der insgesamt getesteten Stücke ist. In der ersten Spalte sind die Ereignisse pro Stück dargestellt. Für die getesteten Transkripte kann die Anzahl der Stücke mit jeweils 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 bzw. 7 Ereignissen abgelesen werden, sowie die Summe der Ereignisse. Insgesamt wurden pro Monat jeweils 40 Lungenstücke untersucht. In der grau hinterlegten Zeile ist die zugehörige Gesamtzahl der transkriptionellen Ereignisse zu sehen.

Monat 4		IE1		IE3		E1		m164		M105		M86	
Ereignisse/Stück	Stücke	Ereignisse	Stücke	Ereignisse	Stücke	Ereignisse	Stücke	Ereignisse	Stücke	Ereignisse	Stücke	Ereignisse	Stücke
☐	3	0	13	0	6	0	4	0	28	0	20	0	0
●	8	8	15	15	12	12	9	9	10	10	14	10	14
◐	10	20	8	16	11	22	11	22	2	4	5	10	10
◑	9	27	3	9	7	21	8	24	0	0	1	3	3
◒	6	24	1	4	3	12	5	20	0	0	0	0	0
◓	3	15	0	0	1	5	2	10	0	0	0	0	0
◔	1	6	0	0	0	0	1	6	0	0	0	0	0
◕	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Summe	40	100	40	44	40	72	40	91	40	14	40	27	27

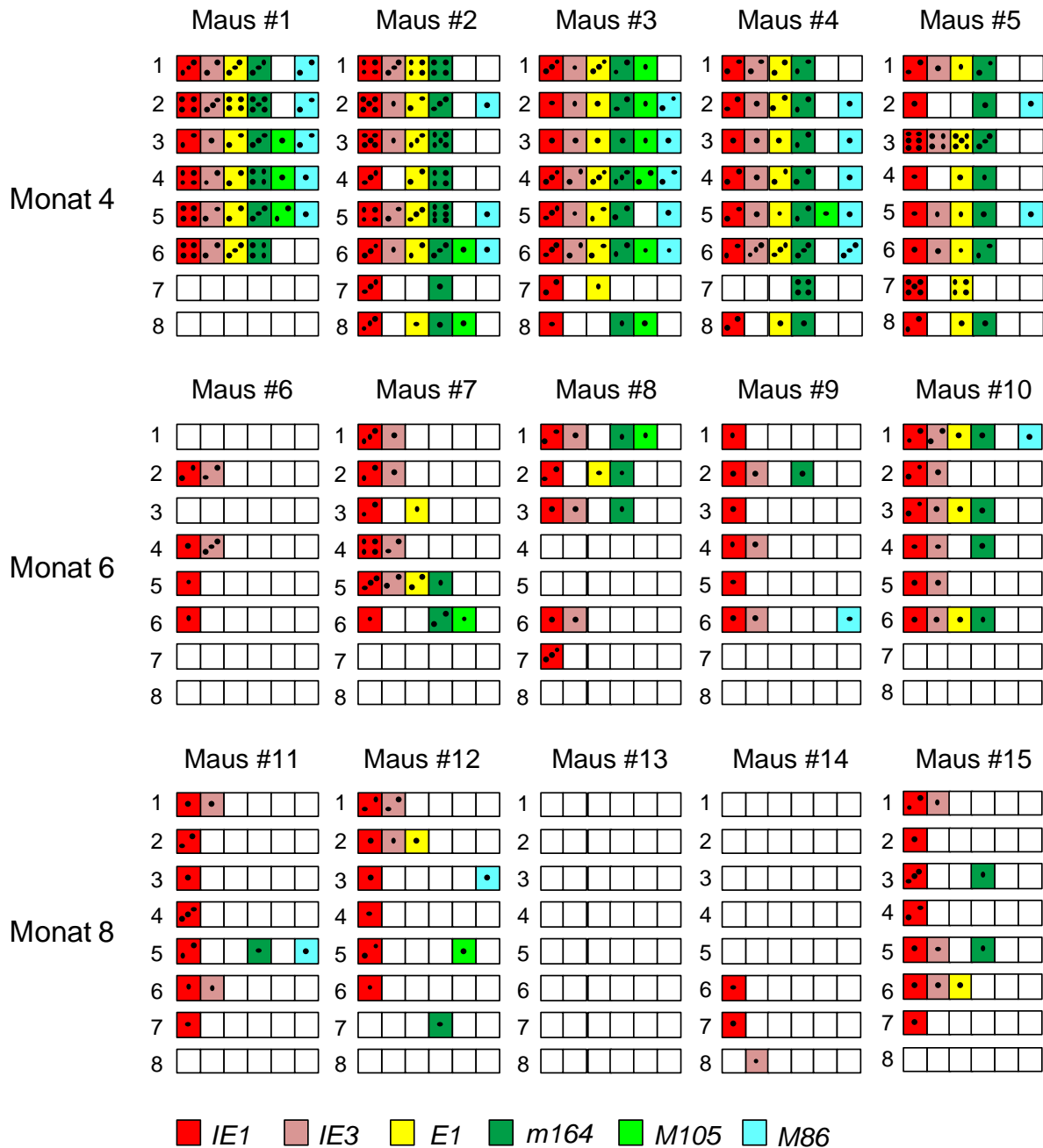
  

Monat 6		IE1		IE3		E1		m164		M105		M86	
Ereignisse/Stück	Stücke	Ereignisse	Stücke	Ereignisse	Stücke	Ereignisse	Stücke	Ereignisse	Stücke	Ereignisse	Stücke	Ereignisse	Stücke
☐	13	0	22	0	34	0	30	0	38	0	38	0	0
●	15	15	13	13	5	5	9	9	2	2	2	2	2
◐	8	16	4	8	1	2	1	2	0	0	0	0	0
◑	3	9	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
◒	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Summe	40	44	40	24	40	7	40	11	40	2	40	2	2

Monat 8		IE1		IE3		E1		m164		M105		M86	
Ereignisse/Stück	Stücke	Ereignisse	Stücke	Ereignisse	Stücke	Ereignisse	Stücke	Ereignisse	Stücke	Ereignisse	Stücke	Ereignisse	Stücke
☐	18	0	32	0	38	0	36	0	39	0	38	0	0
●	14	14	7	7	2	2	4	4	1	1	2	2	2
◐	6	12	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
◑	2	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Summe	40	32	40	9	40	2	40	4	40	1	40	2	2

Die jeweils berechnete Zahl der transkriptionellen Ereignisse wurde in das Muster der viralen Transkription eingefügt (Abb. 3.11); dabei erfolgte die Zuordnung der Ereignis-Häufigkeit zu einzelnen Lungenstücken anhand der quantifizierten Transkriptmengen der jeweiligen Stücke.



**Abb. 3.11: Muster der viralen Transkription mit den zugehörigen transkriptionellen Ereignissen**  
In das Expressionsmuster aus Abbildung 3.9 wurde die Zahl der berechneten transkriptionellen Ereignisse aus Tabelle 3.1 eingefügt (schwarze Punkte). Die Zuordnung der Ereignis-Häufigkeit zu den jeweiligen Lungenstücken erfolgte anhand der quantifizierten Transkriptmengen der einzelnen Stücke.

Aus Abbildung 3.11 geht hervor, dass es während fortschreitender Latenz nicht nur zu einem Rückgang der Transkriptexpression kam, sondern auch zu einer Reduktion der transkriptionellen Ereignisse. Eine höhere Transkriptmenge muss nicht unbedingt mit einer größeren Anzahl an Ereignissen korrelieren. Es könnte sein, dass wenige transkriptionell aktive Genome eine sehr hohe Anzahl an Transkripten produzieren, was einer geringeren Menge von Ereignissen gleich käme. Da es jedoch sehr wahrscheinlich ist, dass die Anwesenheit hoher Transkriptmengen zugleich die Existenz mehrerer transkriptioneller Ereignisse bzw. mehrerer transkriptionell aktiver Genome bedeutet, wurde dieses Modell der Auswertung zugrundegelegt.

Die Quantifizierung der viralen Genome ergab im Mittel 1.000-6.000 Genome/ $1 \times 10^6$  Zellen (Abb. 3.10 A). Da die Lunge einer Maus aus  $\sim 6-8 \times 10^7$  Zellen besteht befänden sich folglich 60.000-480.000 Genome in einer Lunge. Geht man davon aus, dass eine Zelle etwa 10 Genome enthält (LSEC: Seckert et al. 2009; Lunge: Scheller, 2011), könnte man in einer Lunge 6.000-48.000 latent infizierte Zellen nachweisen. Die folgende Kalkulation soll die transkriptionelle Aktivität in der gesamten Lunge während der Latenz verdeutlichen: Basierend auf der Zahl von 60.000-480.000 Genomen pro Lunge und einer Kopienzahl von  $\sim 10$  pro Zelle, ergibt sich für *IE1* mit  $\sim 40$  transkriptionellen Ereignissen in einer berechneten Durchschnitts-Lunge an Monat 4, dass 1 Zelle von  $\sim 150-1.200$  latent infizierten Zellen dieses Transkript zu diesem Zeitpunkt exprimiert. Dies entspricht  $\sim 0,67-0,08\%$  aller latent infizierten Zellen einer Lunge.

Zusammenfassung: Die Poisson-Verteilungsfunktion  $F(n) = \lambda^n \times F(n-1)$  erlaubte eine Abschätzung der Anzahl an transkriptionellen Ereignissen für einzelne Lungenstücke. Die Reduktion der transkriptionellen Ereignisse über die Zeit, ermöglichte eine deutlichere Darstellung der mit fortschreitender Latenz abnehmenden Transkriptexpression. Die theoretische Berechnung der Transkriptexpression zum Zeitpunkt 4 Monate nach KMT ergab für das sehr häufig nachgewiesene Transkript *IE1* eine Aktivität von  $\sim 0,67-0,08\%$  aller latent infizierten Zellen einer Lunge.

### 3.1.6 Einfluss der Transkript-Stabilität auf die quantifizierten Transkripte

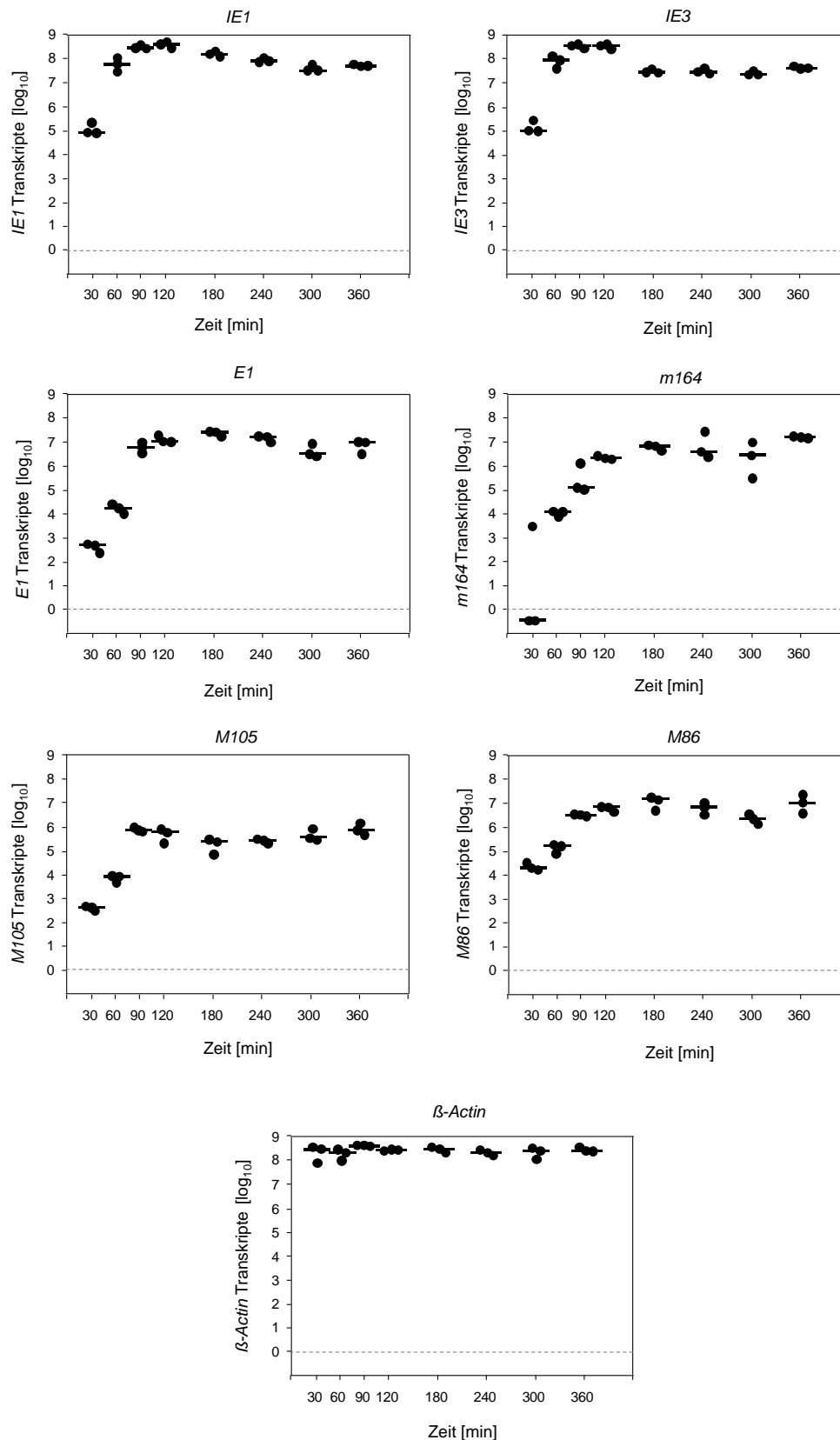
In einer Zelle wird die Konzentration eines Transkripts sowohl von seiner Syntheserate als auch von seiner Zerfallsrate definiert (Ross, 1995). Die mittlere Halbwertszeit von Transkripten prokaryontischer Zellen beträgt 20-30min (Bernstein et al., 2002), während für eukaryontische Zellen im Durchschnitt eine Zeit von 10h für den Abbau von 50% der mRNA beschrieben wird (Yang et al., 2003). Es wird angenommen, dass die spezifische Stabilität einer mRNA mit ihrer physiologischen Funktion in Verbindung steht. So sind für die mRNAs der meisten *housekeeping*-Gene in Eukaryonten lange Halbwertszeiten beschrieben. Bei mRNAs mit sehr kurzer Halbwertszeit handelt es sich meist um Transkripte regulatorischer Gene, deren Proteine nur für kurze Zeit in der Zelle benötigt werden, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, Zell-Zyklus Regulatoren und Wachstums- oder Differenzierungs-Faktoren (Yang et al., 2003; Raghavan & Bohjanen, 2004).

Um die Stabilität der viralen Transkripte *IE1*, *IE3*, *E1*, *m164*, *M105* und *M86*, sowie den Einfluss dieser Stabilität auf die quantifizierten Transkripte zu ermitteln, wurden die entsprechenden Halbwertszeiten *in vitro* bestimmt. Zunächst wurde in einer Kinetik die Transkriptsynthese in infizierten murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) zur Detektion des Plateau-Levels der jeweiligen Transkripte bestimmt. Dazu wurden die MEF mit mCMV-WT-BAC zentrifugal infiziert (MOI 4) und die Menge der viralen Transkripte *IE1*, *IE3*, *E1*, *m164*, *M105* und *M86*, sowie des zellulären Transkripts  *$\beta$ -Actin* zu den Zeitpunkten 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 und 360min *p.i.*, mittels RT-qPCR quantifiziert. Das Ende der 30 minütigen Zentrifugation definierte dabei den Zeitpunkt 0min *p.i.*

Wie in Abbildung 3.12 deutlich zu erkennen ist, kam es für alle getesteten viralen Transkripte zunächst zu einem raschen Anstieg der Transkriptmenge, bevor sich ein Plateau bildete, das für *IE1* und *IE3* nach 60min, für *E1*, *M105* und *M86* nach 90min und für *m164* nach 120min erreicht war. Die Transkriptmengen der viralen RNAs unterschieden sich untereinander sowohl in ihrem Start-Level 30min *p.i.* als auch in der Höhe der erreichten Plateaus.

Ausgehend von  $\sim 1 \times 10^5$  Transkripten 30min *p.i.* erreichten die Vertreter der IE-Klasse (*IE1* und *IE3*) ein Plateaulevel von  $\sim 1 \times 10^8$  Transkripten, was eine Erhöhung von  $\sim 3 \log_{10}$ -Stufen bedeutete. Ähnliche Anstiege der Transkriptmengen waren auch für die übrigen Transkripte nachweisbar: *M86* 30min *p.i.*:  $\sim 2 \times 10^4$ , Plateau:  $\sim 7 \times 10^6$ , Anstieg:  $\sim 2,5 \log_{10}$ -Stufen; *M105* 30min *p.i.*:  $\sim 4 \times 10^2$ , Plateau:  $\sim 5 \times 10^5$ , Anstieg:  $\sim 3 \log_{10}$ -Stufen; *E1* 30min *p.i.*:  $\sim 5 \times 10^2$ ; Plateau:  $\sim 1 \times 10^7$ , Anstieg:  $\sim 3,5 \log_{10}$ -Stufen. Die Werte für *m164* zum Zeitpunkt 30min *p.i.* sind mit Vorbehalt zu betrachten, da hier die gemessene DNA Kontamination in zwei Fällen höher als die gemessene Transkriptmenge war; das Plateau lag im Mittel jedoch bei  $\sim 7 \times 10^6$  Transkripten. Die Transkriptmengen des zellulären Gens  *$\beta$ -actin* waren wie zu erwarten konstant und lagen über den gesamten Zeitraum der Messung bei  $\sim 3 \times 10^8$  Transkripten.





**Abb. 3.12: Menge viraler Transkripte in mCMV-WT-BAC infizierten MEF**

Die Menge der viralen Transkripte *IE1*, *IE3*, *E1*, *m164*, *M105*, *M86*, sowie des zellulären Transkripts *β-Actin* wurde mittels RT-qPCR verfolgt. Die zentrifugale Infektion von MEF erfolgte mit mCMV-WT-BAC (MOI = 4). Zu den Zeitpunkten 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 und 360min *p.i.* wurde die Gesamt-RNA der Zellen isoliert. In der spezifischen RT-qPCR kamen jeweils 1/20 (3μl) der gesamten RNA zum Einsatz und für jeden Zeitpunkt wurden Triplikate quantifiziert, die Balken repräsentieren die Mediane.

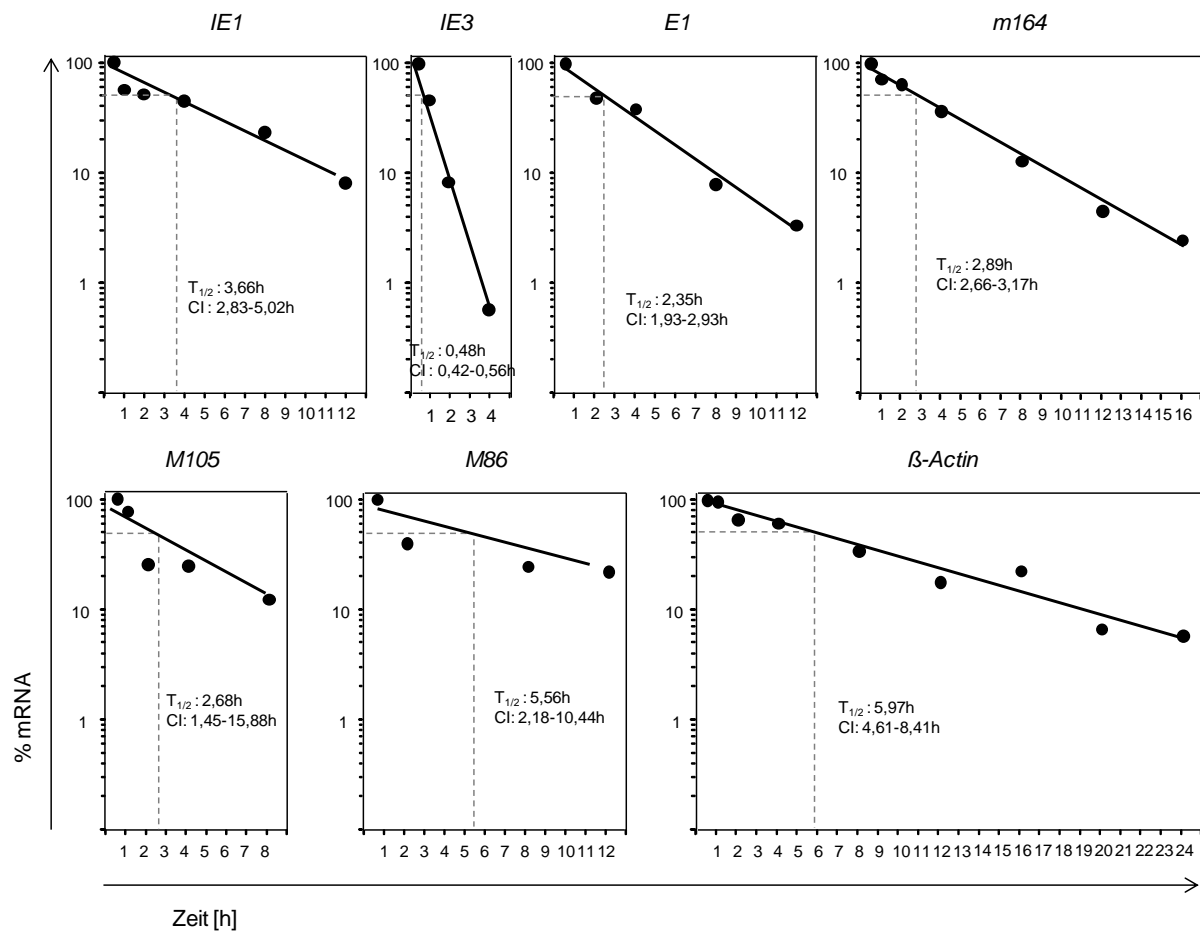
Im Gegensatz zur Kinetik der viralen Transkriptsynthese wurde zur Messung der Transkript-Halbwertszeiten die Transkription nach Erreichen des Plateau-Levels durch Actinomycin D (Act-D) geblockt und anschließend der RNA-Abbau über die Zeit verfolgt. Act-D konkurriert mit dem Transkriptions-Initiations-Komplex um die gleiche DNA-Bindestelle und verhindert damit die RNA-Polymerase-vermittelte Elongation der RNA (Sobell, 1985). Für diesen Versuch wurden MEF mit mCMV-WT-BAC zentrifugal infiziert (MOI = 4) und die Transkription nach Erreichen des jeweiligen Transkript-Plateau-Levels durch Act-D-Gabe (5µg/ml) blockiert. Mittels spezifischer RT-qPCR wurden die viralen Transkripte *IE1*, *IE3*, *E1*, *m164*, *M105* und *M86*, sowie das zelluläre Transkript *β-Actin* zu den Zeitpunkten ½h, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 16, 20h und 24h nach Act-D-Gabe aus aufgereinigter mRNA quantifiziert.

In Abbildung 3.13 ist der verbleibende prozentuale Anteil der entsprechenden mRNAs über die Zeit dargestellt. Der erste Wert nach 0,5 Stunden wurde als 100% definiert, während die einzelnen Werte den Mittelwert von 4 Messungen aus 2 unabhängigen Experimenten repräsentieren. Mit Hilfe der Steigung (x) der Regressionsgeraden wurden die Halbwertszeiten und deren 95% Konfidenz-Intervalle unter Verwendung der Formel  $T_{1/2} = \log 2/x$  berechnet. Für das zelluläre Kontroll-Transkript *β-Actin* wurde eine Halbwertszeit von ~6h bestimmt.

Während für *β-Actin* der Abbau über 24 Stunden verfolgt werden konnte, erreichten die viralen Transkripte ein Plateau, nach dem keine weitere Abnahme der mRNA mehr nachgewiesen werden konnte. Zur Berechnung der Halbwertszeit wurden daher nur jene Zeitpunkte einbezogen, an denen einen Rückgang der mRNA gemessen werden konnte. Die viralen Transkripte *IE1* (3,65h), *E1* (2,35h), *m164* (2,89h) und *M105* (2,68h) zeigten vergleichbare Stabilitäten mit Halbwertszeiten zwischen 2-4h, *M86* war mit einer Halbwertszeit von 5,56h geringfügig stabiler. Unter Betrachtung der Konfidenz-Grenzen besitzen diese Transkripte eine mit den Transkripten des housekeeping-Gens *β-actin* vergleichbare Stabilität. Lediglich *IE3* wies eine sehr viel niedrigere Halbwertszeit von 0,48h auf, die den Halbwertszeiten instabilerer Transkripte von regulatorischen Genen gleicht.

Bei der Betrachtung des Act-D-vermittelten Arrests der Transkription muss allerdings eine mögliche Beeinflussung der Transkriptstabilität durch zellulären Stress beachtet werden. Hierdurch kann eine erhebliche Stabilisierung individueller Transkripte ausgelöst werden (Bhattacharyya et al., 2006).

Die Entstehung des Transkript-Expressionsusters während der Latenz war jedoch nicht von den unterschiedlichen Halbwertszeiten der Transkripte beeinflusst, da die instabilen *IE3*-Transkripte nicht die geringste Messfrequenz aufwiesen und das vermeintlich stabilste Transkript *M86* nicht am Häufigsten vertreten war.



**Abb. 3.13: Halbwertszeiten viraler Transkripte in mCMV-WT-BAC infizierten MEF**

Die Stabilität der Transkripte *IE1*, *IE3*, *E1*, *m164*, *M105* und *M86* wurde in mCMV-WT-BAC infizierten MEF (MOI 4) bestimmt. Nach Erreichen des jeweiligen Transkript-Plateau-Levels wurde die Transkription durch Act-D (5  $\mu$ g/ml) geblockt und der mRNA-Abbau gemessen. In einer spezifischen RT-qPCR wurde jeweils 1/25 (3  $\mu$ l) der mRNA-Proben quantifiziert, dargestellt ist der prozentuale Anteil an mRNA, normiert auf den ersten Messwert nach 0,5h. Die einzelnen Punkte repräsentieren den Mittelwert von 4 Messungen aus 2 unabhängigen Experimenten. Die Halbwertszeiten und ihre 95% Konfidenz-Intervalle (CI) wurden mit Hilfe der Steigung (x) der Regressionsgeraden (schwarze Geraden) berechnet ( $T_{1/2} = -\log 2/x$ ).

**Zusammenfassung:** Durch die Messung der Transkriptsynthese in mCMV-WT-BAC infizierten MEF konnten sowohl IE- (60min *p.i.*) als auch E- und L- (90-120min *p.i.*) Transkripte bereits kurz nach Infektion in der Zelle nachgewiesen werden. Die Halbwertszeiten der viralen Transkripte *IE1* (3,65h), *E1* (2,35h), *m164* (2,89h) und *M105* (2,68h) ~2-4h, *M86* (5,56h) waren unter Beachtung der Konfidenz-Grenzen vergleichbar mit dem zellulären *housekeeping*-Gen  *$\beta$ -Actin* (5,97h). Alleine *IE3* mit einer Halbwertszeit von 0,48h glich den sehr viel instabileren Transkripten regulatorischer Gene. Es konnte somit gezeigt werden, dass das gemessene Transkript-Expressionsmuster während der Latenz nicht auf unterschiedliche Stabilitäten der Transkripte zurückzuführen ist.

### 3.1.7 Charakterisierung Epitop-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Latenz

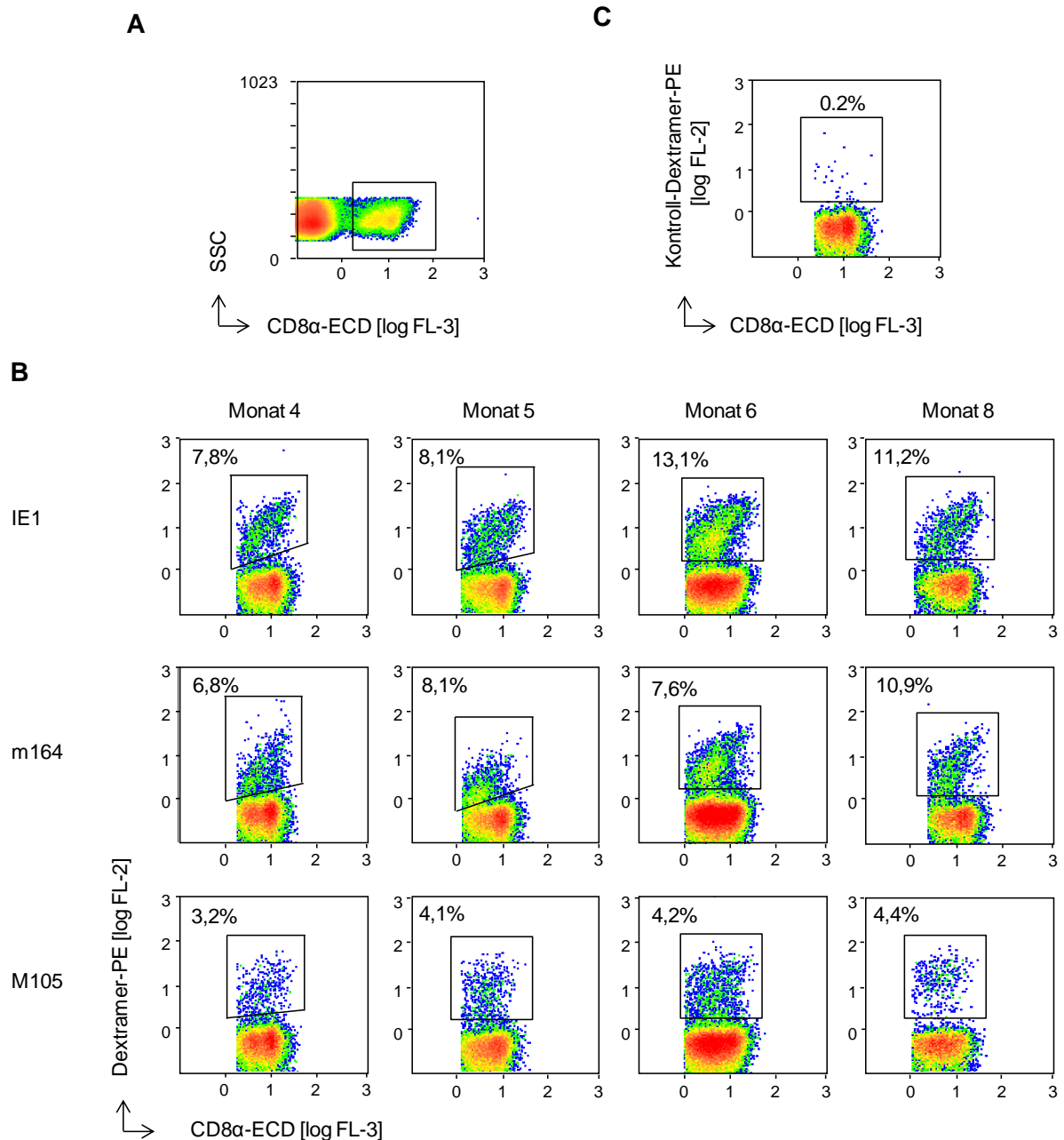
In den bisherigen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass die mCMV-Latenz durch ein stochastisches Muster der Transkriptexpression charakterisiert ist, es herrscht also ein dynamisches Öffnen und Schließen der Leseraster viraler Gene. Die proteasomale Prozessierung viraler Proteine, resultierend aus der Genexpression während der Latenz, führt zur Präsentation antigener Peptide und ihrer Erkennung durch spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Simon et al. 2006b). Aufgrund der niedrigen transkriptionellen Aktivität während der Latenz und der daraus folgenden geringen Translationswahrscheinlichkeit war es bisher nicht möglich, entsprechende virale Proteine zu detektieren.

Es ist bekannt, dass Epitop-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen das Risiko einer Rekurrenz vermindern können (Steffens et al., 1998). Ausführlichere Analysen zeigten, dass die Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen die Latenz im Lungengewebe kontrollieren, indem sie eine transkriptionelle Reaktivierung in latent infizierten Zellen erkennen und terminieren (Simon et al., 2006b).

Bisher wurden für den Haplotyp H-2<sup>d</sup> (BALB/cJ) 9 antigene mCMV Peptide identifiziert (Übersicht: Holtappels et al., 2013). Je nach Frequenz der gegen diese Epitope gerichteten CD8<sup>+</sup> T-Zellen werden die zugehörigen Peptide als immundominant, intermediär oder subdominant definiert. Um eine mögliche Verbindung zwischen molekularer Latenz und Immunkontrolle zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit die gegen die Epitope der immundominanten Peptide IE1, m164 und M105 gerichteten spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in einer Kinetik parallel zur Anzahl viraler Transkripte während der Latenz detektiert und ihre jeweiligen Subpopulationen charakterisiert.

#### 3.1.7.1 Detektion von IE1-, m164- und M105-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Latenz

Parallel zur Kinetik der Transkriptquantifizierung sollten an den Zeitpunkten 4, 5, 6 und 8 Monate *p.i.* die in der Lunge befindlichen, Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen der immundominanten Peptide IE1, m164 und M105 analysiert werden. Dazu wurden die Lymphozyten aus dem Lungengewebe isoliert (siehe 2.2.3.7). Wie bereits oben beschrieben (Abb. 3.4) wurden pro Zeitpunkt die linken Lungenhälften von 5 Mäusen aufgearbeitet. Zur Charakterisierung mittels zytofluorometrischer Analyse wurden die Lymphozyten mit PE konjugierten und mit IE1, m164 oder M105 beladenen MHC-I Multimeren (Dextrameren), sowie mit den Antikörpern  $\alpha$ -CD8-ECD,  $\alpha$ -CD127-PC5,  $\alpha$ -KLRG1-FITC und  $\alpha$ -CD62L-PC7 gefärbt (siehe 2.2.4.2). Die Antikörper  $\alpha$ -CD127,  $\alpha$ -KLRG1 und  $\alpha$ -CD62L waren erst für die Identifizierung der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen von Bedeutung (3.1.6.2).



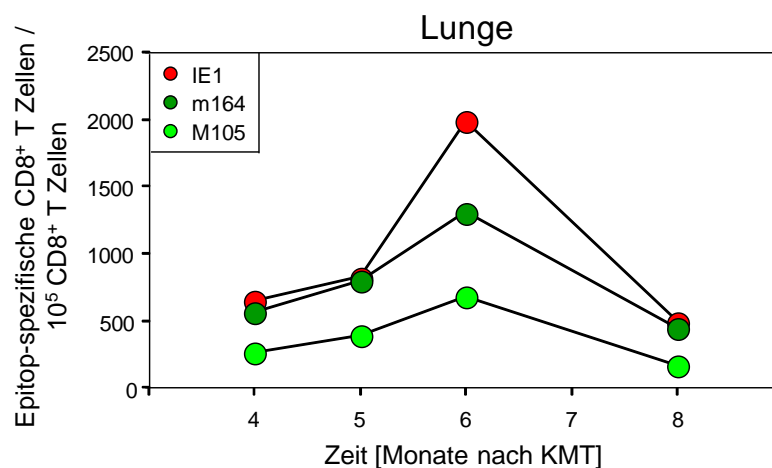
### Abb. 3.14: Detektion IE1-, m164- und M105-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Lunge

Isolierte Lymphozyten latent infizierter Lungen wurden zur zytofluorometrischen Identifizierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wie unter 2.2.4.2 beschrieben gefärbt. (A) Zunächst wurde auf alle CD8<sup>+</sup> T-Zellen fokussiert. (B) Die zusätzliche IE1-, m164- oder M105-Peptid-spezifische Dextramer-Färbung ermöglichte die Analyse der Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Lunge zu den Zeitpunkten 4, 5, 6 und 8 Monate nach KMT. (C) Als Kontrolle wurden die Lymphozyten mit K<sup>b</sup>-SIINFELK Dextrameren, gefärbt. Diese Dextramere binden nicht an CD8<sup>+</sup> T-Zellen von BALB/cJ Mäusen (Haplotyp H-2<sup>d</sup>). Dargestellt sind jeweils *color density plots*, wobei rot für die höchste und blau für die niedrigste Zellzahl steht. In den *plots* ist der prozentuale Anteil der jeweiligen Regionen angegeben. SSC: *side scatter*; FL: Fluoreszenz, logarithmisch dargestellt.

In Abbildung 3.14 A ist beispielhaft die Lymphozyten-Population der Lunge dargestellt. Nachdem auf die CD8<sup>+</sup> T-Zellen fokussiert wurde, erfolgte eine weitere Fokussierung auf IE1-, m164- und M105-Epitop-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 13.4 B). Die spezifische Bindung der Dextramere wurde in einem Kontrollansatz deutlich. Das Kontroll-Dextramer K<sup>b</sup>-SIINFEKL bindet im BALB/cJ Mausmodell (Haplotyp H-2<sup>d</sup>) nicht an CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 3.14 C). Es war lediglich ein als Hintergrund definierter Anteil von 0,2% der Zellen Dextramer-positiv.

In der Analyse wurde deutlich, dass die Frequenzen IE1- und m164-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen während der Latenz in der Lunge zunahm. Für m164 stieg die Frequenz der CD8<sup>+</sup> T-Zellen von 6,8% an Monat 4 auf 10,9% an Monat 8, auch wenn es zwischen Monat 5 und 6 nicht zu einer Zunahme sondern eher zu einer geringfügigen Abnahme der Frequenzen kam. Der Anteil IE1-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen expandierte zwischen Monat 4 und 6 von 7,8% auf 13,1%. An Monat 8 kam es mit 11,2% zu einem leichten Rückgang der Frequenz IE1-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die Beobachtung, dass einige Epitop-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit zunehmender Zeit während der mCMV-Latenz in ihrer Anzahl zunehmen ist nicht neu (Übersicht: Holtappels et al., 2013; IE1: Holtappels et al., 2000; m164: Holtappels et al., 2002; Karrer et al., 2003;), sie erregte in den letzten Jahren große Aufmerksamkeit und das Phänomen wurde unter der Bezeichnung *memory inflation* bekannt.

Trotz Immundominanz des M105-Peptids während der akuten Phase der Infektion war für die M105-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen während der Latenz keine große Veränderung der Frequenzen zu beobachten. Sie blieben für den Zeitraum von 4 bis 8 Monaten *p.i.* auf einem Level von 3-4%, dieses Ergebnis bestätigte die Daten von Holtappels et al. 2013.

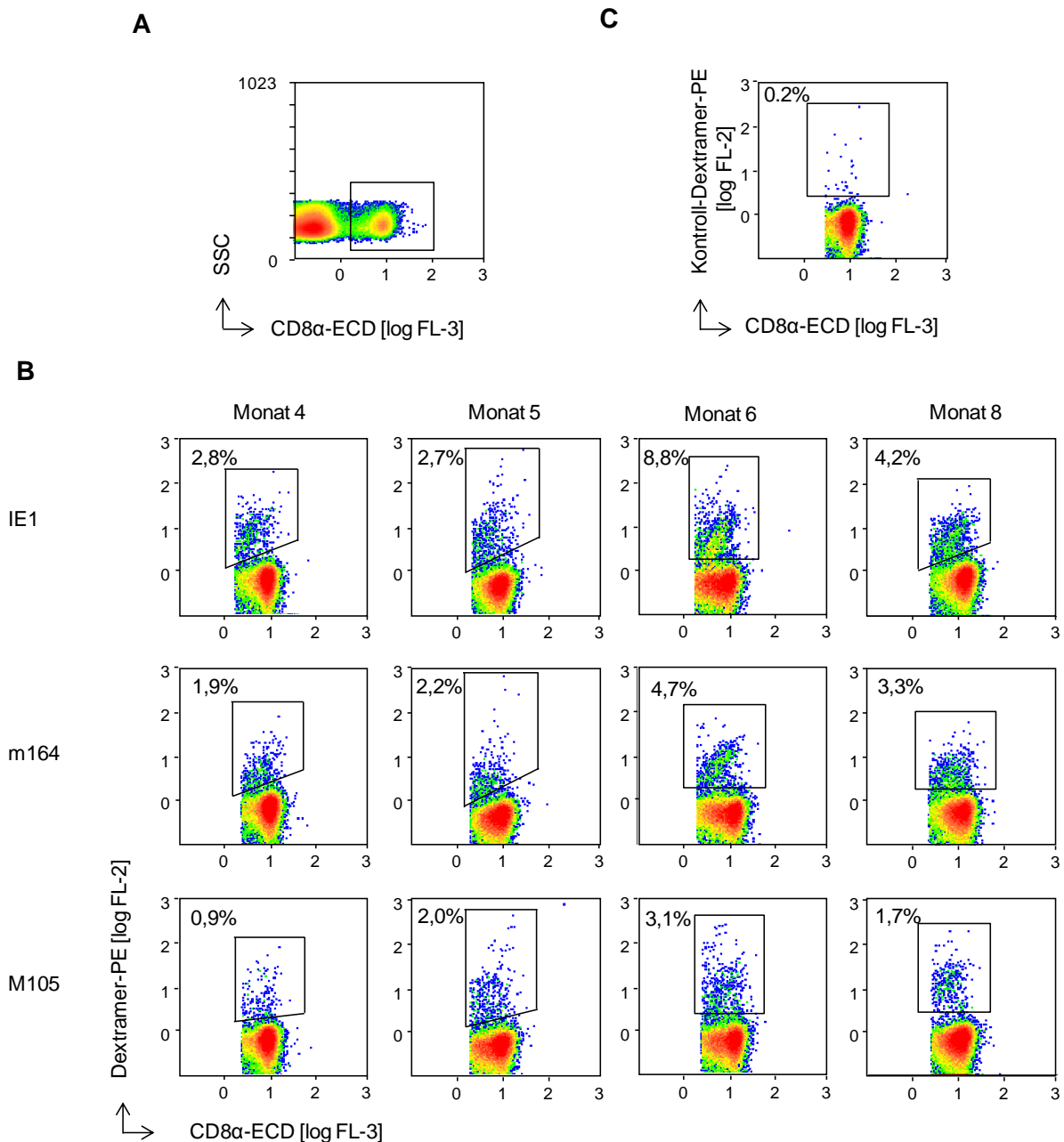


**Abb. 3.15: Normierung der Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Lunge**

Die in Abb. 3.14 gezeigten Frequenzen der Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Lunge zu den Zeitpunkten 4, 5, 6 und 8 Monate nach KMT wurden auf  $1 \times 10^5$  gesamt-CD8<sup>+</sup> T-Zellen normiert.

Normierte man diese gemessenen Frequenzen an Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Lunge auf  $1 \times 10^5$  gesamt-CD8<sup>+</sup> T-Zellen, so war deutlich zu erkennen, dass es zwischen Monat 4 und 6 für alle Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen (IE1, m164 und M105) zu einem

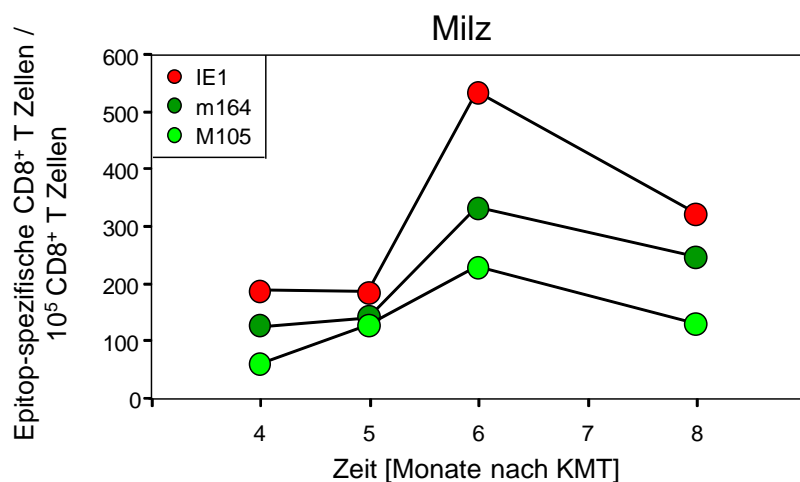
Anstieg kam (Abb. 3.15). Für M105 war diese Zunahme zwar nur gering, aber nachweisbar. Die größte Erhöhung der Anzahl Epitop-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen war für IE1 zu beobachten, m164 zeigte einen mittleren Anstieg. An Monat 8 kam es zur Abnahme aller Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und zwar unterhalb des an Monat 4 gemessenen Levels.



**Abb. 3.16: Detektion IE1-, m164- und M105-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz**

Analyse der Lymphozyten latent infizierter Milzen analog zur Lunge (Abb. 3.14). (A) Zunächst wurde auf alle CD8<sup>+</sup> T-Zellen fokussiert. (B) Die zusätzliche IE1-, m164- oder M105-Peptid-spezifische Dextramer-Färbung ermöglichte die Analyse der Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz zu den Zeitpunkten 4, 5, 6 und 8 Monate nach KMT. (C) Als Kontrolle wurden die Lymphozyten mit K<sup>b</sup>-SIINFEKL Dextrameren, gefärbt. Dargestellt sind jeweils *color density plots*, wobei rot für die höchste und blau für die niedrigste Zellzahl steht. In den *plots* ist der prozentuale Anteil der jeweiligen Regionen angegeben. SSC: *side scatter*, FL: Fluoreszenz, logarithmisch dargestellt.

Zusätzlich zur Lunge wurden die Frequenzen der Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch in der Milz analysiert, einem sekundären lymphatischen Organ, in welchem die Differenzierung und Replikation von T- und B-Lymphozyten stattfindet. Die aufgereinigten Lymphozyten aus 5 Milzen pro Monat (2.2.3.8) wurden analog zu den Lymphozyten der Lunge gefärbt (2.2.4.2) und zytofluorometrisch analysiert. In Abbildung 3.16 A ist analog zu Abbildung 3.14 die Fokussierung auf die CD8<sup>+</sup> T-Zellen der Milz dargestellt. Die Färbung mit dem Kontroll-Dextramer K<sup>b</sup>-SIINFEKL zeigte auch in der Milz lediglich einen Hintergrund von 0,2% (Abb. 3.16 C). Wie in Abbildung 3.16 B deutlich zu erkennen ist, waren die Frequenzen der IE1-, m164- und M105-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz niedriger als in der Lunge. Das Phänomen der *'memory inflation'* war hier, anders als in der Lunge, für alle drei analysierten Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu beobachten. Die IE1-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen expandierten zwischen Monat 4 und 6 von 2,8% auf 8,8%, für m164 kam es zu einem Anstieg von 1,9% auf 4,7% und für M105 von 0,9% auf 3,1%. Zwischen Monat 6 und 8 war für alle Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine Abnahme der Frequenz zu beobachten.



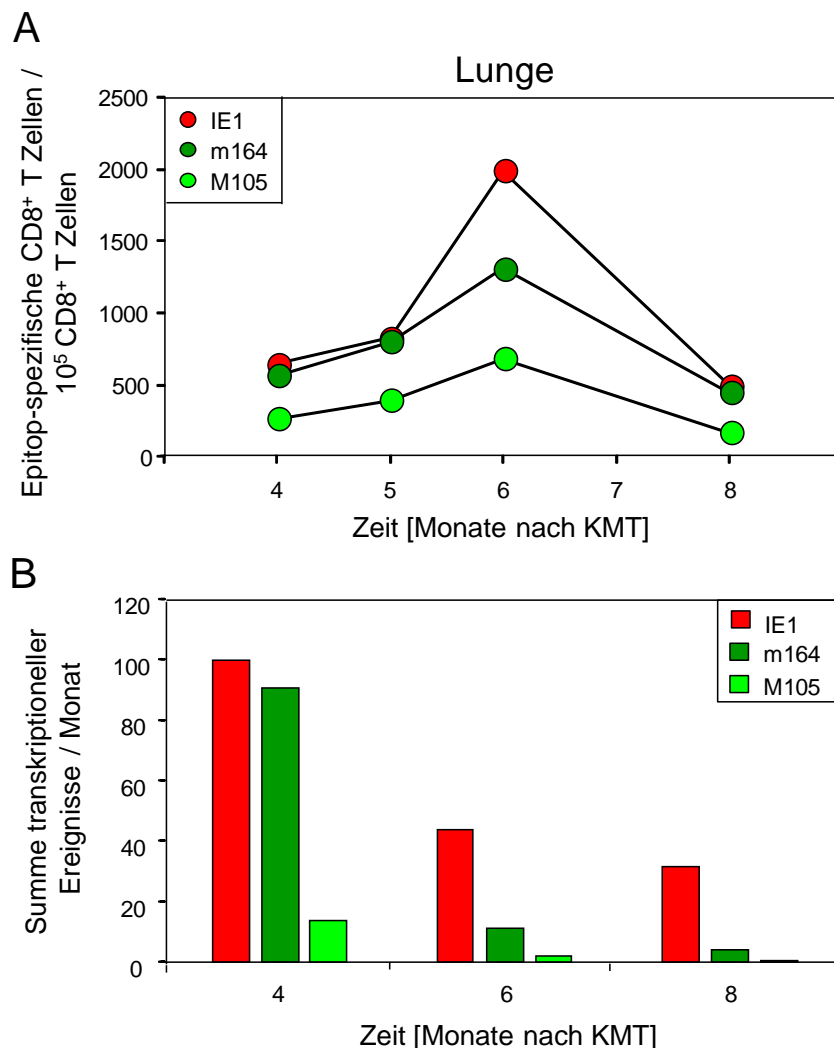
**Abb. 3.17: Normierung der Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz**

Die in Abb. 3.16 gezeigten Frequenzen der Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz zu den Zeitpunkten 4, 5, 6 und 8 Monate nach KMT wurden auf  $1 \times 10^5$  gesamt-CD8<sup>+</sup> T-Zellen normiert.

Auch in der Milz war nach Normierung der Frequenzen Epitop-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf  $1 \times 10^5$  gesamt-CD8<sup>+</sup> T-Zellen ein Anstieg aller gemessenen Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen zwischen Monat 4 und 6 zu beobachten (Abb. 3.17). Die Hierarchie der Zunahme folgte dem gleichen Muster, das bereits in der Lunge sichtbar war: IE1 > m164 > M105. An Monat 8 kam es auch in der Milz zu einer Abnahme aller Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, allerdings nicht unterhalb des Levels, welches an Monat 4 gemessen wurde. Insgesamt war der Anstieg der Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz sehr viel niedriger als in der Lunge. Beispielsweise betrug die Zahl IE1-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen pro  $1 \times 10^5$  gesamt-CD8<sup>+</sup> T-Zellen an Monat 6 in der Lunge ~2000, wohingegen es in der Milz lediglich ~550 Zellen waren.



Durch gleichzeitige Analyse der Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und der Transkriptexpression für *IE1*, *m164* und *M105* im Zeitverlauf sollte eine mögliche Verbindung zwischen Immunkontrolle und molekularer Latenz untersucht werden.



**Abb. 3.18: Gegenüberstellung der Anzahl transkriptioneller Ereignisse und der Frequenzen Epitop-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der latent infizierten Lunge**

(A) Wiederholung der Abb. 3.15. Dargestellt ist die Anzahl der Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen pro  $1 \times 10^5$  gesamt-CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu den Analysezeitpunkten 4, 5, 6 und 8 Monate nach KMT für *IE1*, *m164* und *M105*. (B) Im Vergleich dazu wurde die Summe der transkriptionellen Ereignisse aus 40 analysierten Lungenstücken von 5 Mäusen pro Monat für *IE1*, *m164* und *M105* berechnet. Die Transkripte wurden nur zu den Zeitpunkten 4, 6 und 8 Monate nach KMT analysiert.

Da die Transkriptexpression in der Präsentation antigener Peptide und ihrer Erkennung durch spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen resultiert, kann ein Zusammenhang zwischen der transkriptionellen Aktivität und der Anzahl spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen erwartet werden. In Abbildung 3.18 ist die Summe der transkriptionellen Ereignisse aus 40 analysierten Lungenstücken pro Zeitpunkt im direkten Vergleich zur Anzahl der Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen pro  $10^5$  CD8<sup>+</sup> T-Zellen für *IE1*, *m164* und *M105* dargestellt. Die Betrachtung der Werte für die einzelnen Monate verdeutlichte, dass durchaus eine gewisse Korrelation

bestand. Die Menge der transkriptionellen Ereignisse für *M105* war stets am geringsten, einhergehend mit den niedrigsten Werten Epitop-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen, umgekehrt dominierte *IE1* sowohl die Transkriptionereignisse als auch die Epitop-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zell-Anzahl. Betrachtet man die Monate 4, 6 und 8, so könnte man sagen, dass die hohe Anzahl transkriptioneller Ereignisse an Monat 4 zeitversetzt für eine steigende Menge Epitop-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen an Monat 6 im Vergleich zu Monat 4 führte. Die geringer werdende Anzahl transkriptioneller Ereignisse an Monat 6 wiederum wäre dann für niedrigere Mengen Epitop-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen an Monat 8 verantwortlich.

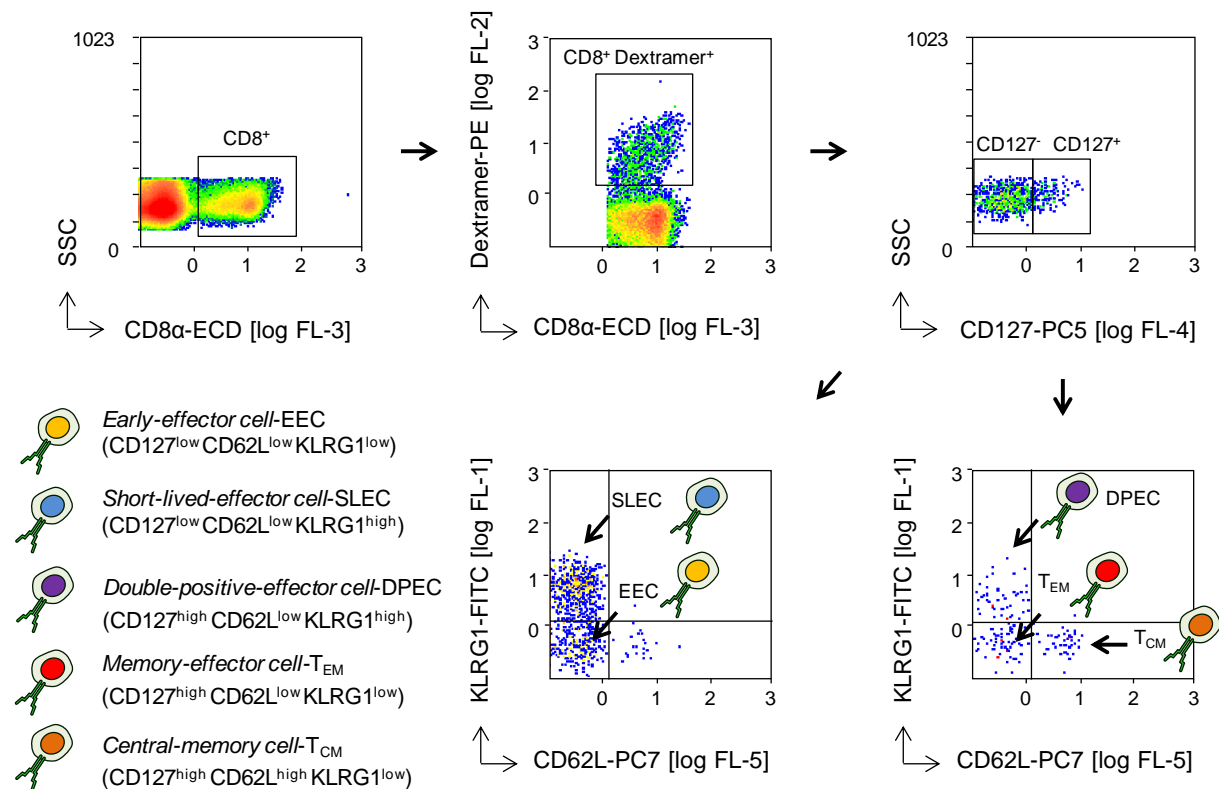
Allerdings muss man beachten, dass es zwischen stochastischer Genexpression und Immunkontrolle noch mehrere Zwischenschritte gibt und der triviale Vergleich zwischen Transkriptmenge und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Frequenz nur Hinweise geben kann. Folgende Aspekte spielen in diesem Prozess eine große Rolle: die Avidität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die Affinität zwischen Peptid und MHC-Molekül, die Effizienz der proteasomalen Prozessierung und der Translation, die Stabilität der Transkripte, sowie die Stärke der jeweiligen Promotoren.

Zusammenfassung: In Lunge und Milz konnte für *IE1* und *m164* das Phänomen der *memory inflation* verifiziert werden. Für das immunodominante Epitop *M105* zeigte sich lediglich in der Milz ein leichter Anstieg. Bei Betrachtung der normierten Zahlen der Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen pro  $1 \times 10^5$  gesamt-CD8<sup>+</sup> T-Zellen hingegen waren für alle Epitope sowohl in der Lunge als auch in der Milz zwischen Monat 4 und 6 Anstiege der Zellzahl zu beobachten. Die direkte Gegenüberstellung der transkriptionellen Ereignisse und der Anzahl Epitop-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen lieferte einen Hinweis auf einen möglichen, direkten Einfluss der Transkriptexpression auf die Immunkontrolle.

### 3.1.7.2 Charakterisierung einzelner Subpopulationen der Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen

In der Literatur wird die T-Zell-Antwort in 4 Phasen unterteilt: Aktivierung, Expansion, Kontraktion und *memory*. In Folge eines primären antigenen Kontaktes kommt es zur Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, diese expandieren zunächst, allerdings gehen 90-95% der Zellen während der Kontraktionsphase in Apoptose. Letztlich bleibt eine geringe Menge langlebiger *memory*-Zellen zurück (Kaech et al., 2002).

Dieser *memory*-Zell-Pool kann in lymphatischem und nicht-lymphatischem Gewebe nachgewiesen werden und birgt das Potential bei sekundärem antigenen Kontakt erneut Effektor-Zellen hervorzubringen (Sallusto et al., 1999; Masopust et al., 2001). Die Differenzierung von Effektor- und *memory*-CD8<sup>+</sup> T-Zellen und die Rolle antigenener Stimulation, Ko-Stimulation, sowie inflammatorischer Cytokine bei diesem Prozess steht noch immer im Fokus wissenschaftlicher Diskussionen (Übersicht: Lefrancois & Obar 2010).

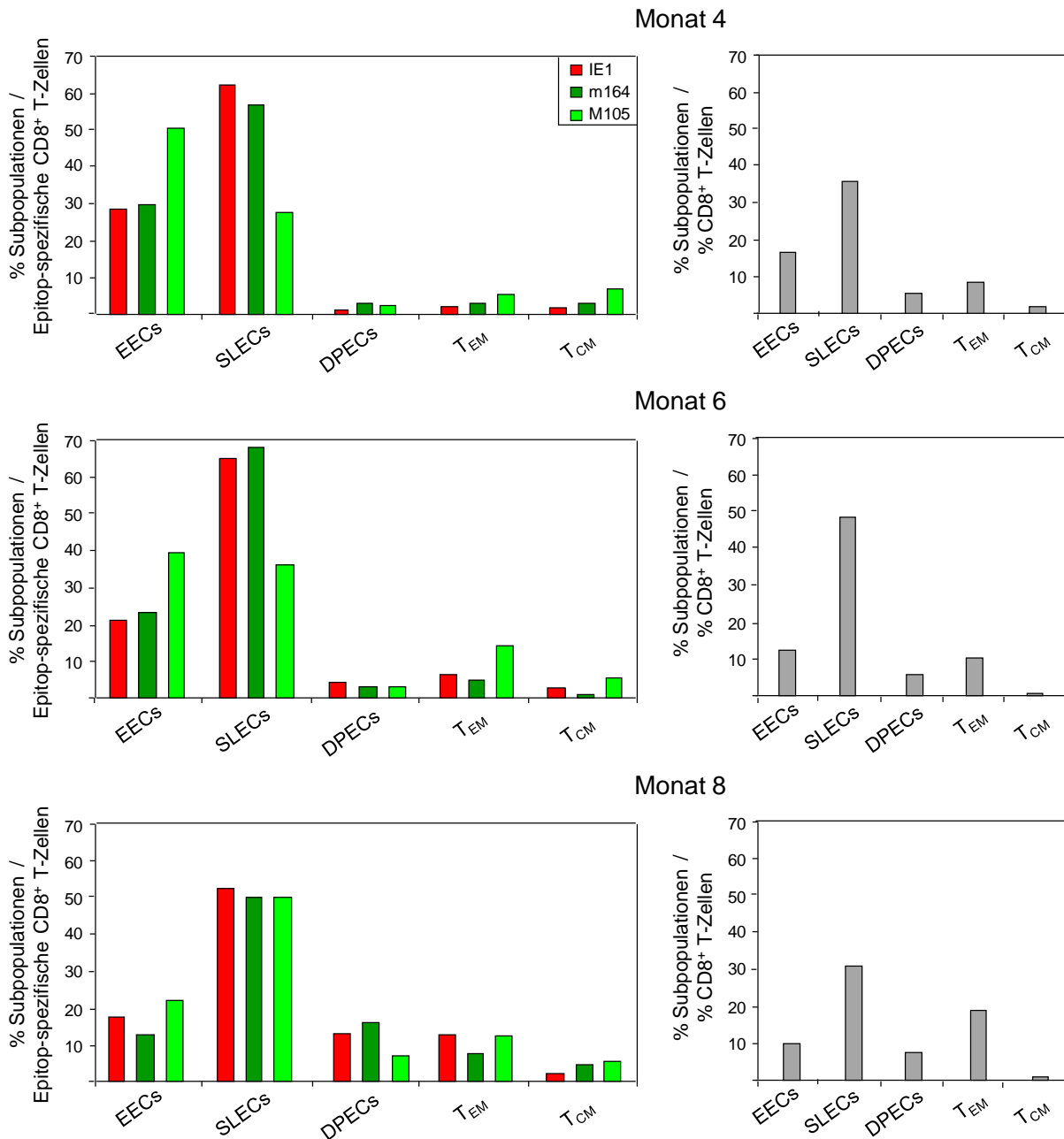


**Abb. 3.19: Strategie zur Charakterisierung der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen**

Der Identifizierung von CD8<sup>+</sup> Lymphozyten folgte die Charakterisierung der Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Eine weitere Phänotypisierung der Lymphozyten durch die Marker CD127, CD62L, sowie KLRG1 ermöglichte die Unterteilung in *early-effector cells* (EECs), *short-lived-effector cells* (SLECs), *double-positive-effector cells*-DPECs (CD127<sup>high</sup> CD62L<sup>low</sup> KLRG1<sup>high</sup>), *effector-memory cells* (T<sub>EM</sub>) und *central-memory cells* (T<sub>CM</sub>) nach Obar & Lefrancois (2010a) und Obar et al. (2011).

Obar & Lefrancois (2010a) und Obar et al. (2011) beschreiben eine Phänotypisierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen anhand der Oberflächenmarker CD127, CD62L sowie KLRG1, woraus sie folgende CD8<sup>+</sup> T-Zell-Populationen herleiten: *early-effector cells*-EECs (CD127<sup>low</sup> CD62L<sup>low</sup> KLRG1<sup>low</sup>), *short-lived-effector cells*-SLECs (CD127<sup>low</sup> CD62L<sup>low</sup> KLRG1<sup>high</sup>), *double-positive-effector cells*-DPECs (CD127<sup>high</sup> CD62L<sup>low</sup> KLRG1<sup>high</sup>), *effector-memory cells*-T<sub>EM</sub> (CD127<sup>high</sup> CD62L<sup>low</sup> KLRG1<sup>low</sup>) und *central-memory cells*-T<sub>CM</sub> (CD127<sup>high</sup> CD62L<sup>high</sup> KLRG1<sup>low</sup>). KLRG1 (*Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1*) ist ein Transmembranprotein mit einem ITIM-Motiv (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*), welches nicht nur auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen sondern auch auf Mastzellen, NK-Zellen und basophilen Granulozyten exprimiert wird (Butcher et al., 1998b). CD62L oder L-Selektin gehört zur Familie der Selektine und wird vornehmlich auf Lymphozyten exprimiert. Es fungiert als *homing*-Rezeptor und spielt eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit ECs. Nach Aktivierung der Lymphozyten wird der Rezeptor nicht mehr exprimiert (Übersicht: Tedder et al., 1995). CD127 oder IL-7Rα ist eine Untereinheit des Interleukin-7 Rezeptors und wird auf T<sub>EM</sub> und T<sub>CM</sub> exprimiert (Kondo et al., 1994b), allerdings wird IL-7Rα vermutlich nicht zur Entwicklung von *memory*-Zellen benötigt (Klonowski et al., 2006).

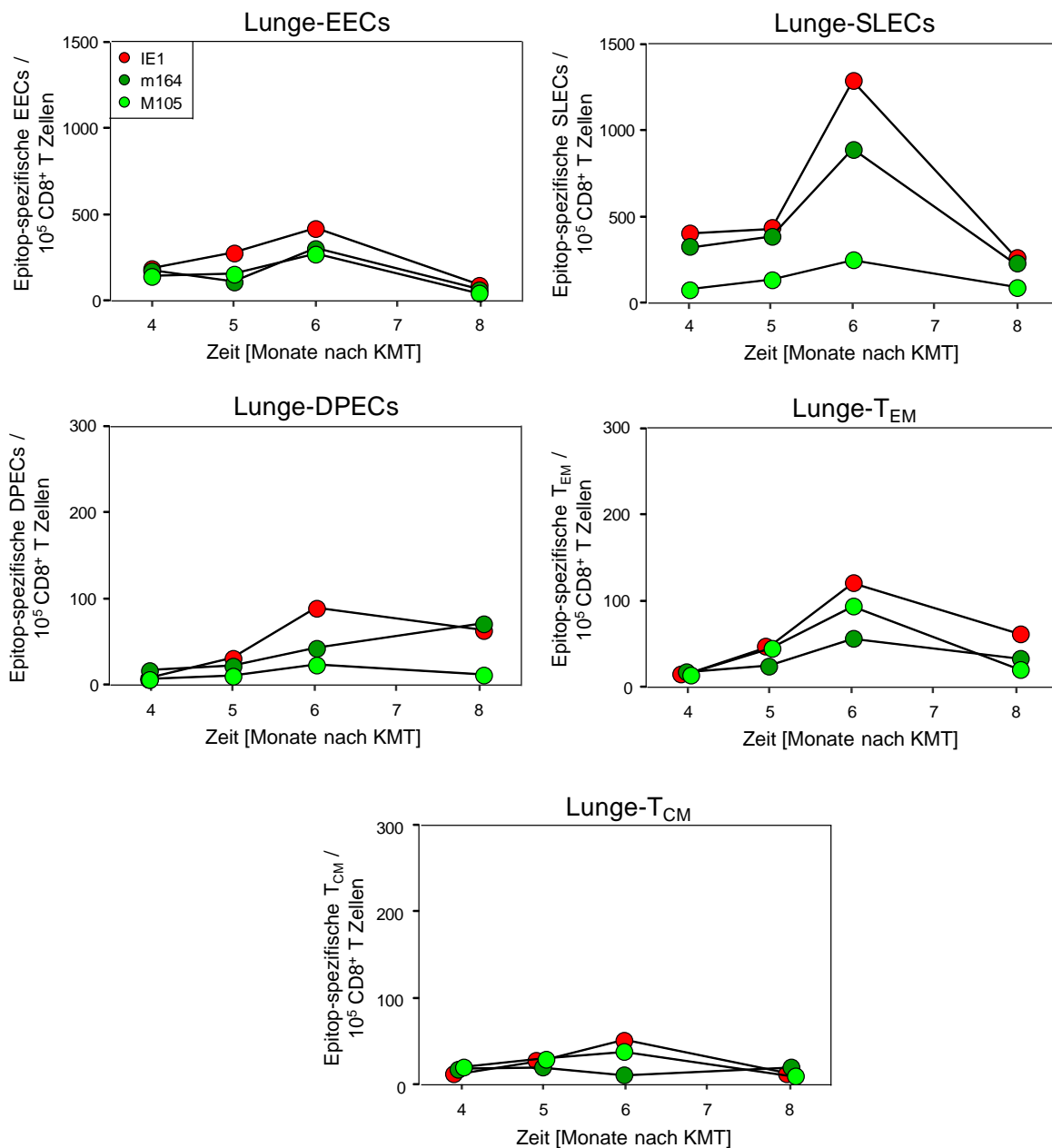
Anhand dieser Marker wurden in der vorliegenden Arbeit die Subpopulationen der IE1-, m164- und M105-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen von latent infizierten BALB/cJ Mäusen in Lunge und Milz zytofluorometrisch analysiert. In Abbildung 3.19 ist die Strategie zur Charakterisierung der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen anhand von *color density plots* dargestellt und zusätzlich ist eine Marker-Übersicht der Subpopulationen Epitop-spezifischer-CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegeben.



**Abb. 3.20: Charakterisierung der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen in der latent infizierten Lunge**

In der linken Spalte ist der prozentuale Anteil der jeweiligen Subpopulationen innerhalb der IE1-, m164- oder M105-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt. Die Differenzierung erfolgte anhand der folgenden Markerkombinationen: EECs (CD127<sup>low</sup> CD62L<sup>low</sup> KLRG1<sup>low</sup>), SLECs (CD127<sup>low</sup> CD62L<sup>low</sup> KLRG1<sup>high</sup>), DPECs (CD127<sup>high</sup> CD62L<sup>low</sup> KLRG1<sup>high</sup>), T<sub>EM</sub> (CD127<sup>high</sup> CD62L<sup>low</sup> KLRG1<sup>low</sup>), T<sub>CM</sub> (CD127<sup>high</sup> CD62L<sup>high</sup> KLRG1<sup>low</sup>) zu den Zeitpunkten 4, 6 und 8 Monate *p.i.* Die Diagramme rechts zeigen die prozentuale Verteilung der Subpopulationen in der Gesamtheit der CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

Wie bereits beschrieben (siehe 3.1.7.1) wurden zu jedem Zeitpunkt die Lymphozyten von 5 linken Lungenhälften bzw. 5 Milzen aufgereinigt und im Anschluss an die Antikörperfärbung zytofluorometrisch analysiert. Die Charakterisierung der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen in der latent infizierten Lunge zu den Zeitpunkten 4, 6 und 8 Monate *p.i.* ist in Abbildung 3.20 gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die SLECs in der Lunge mit ~30-50% der CD8<sup>+</sup> T-Zellen die dominante Population darstellten, gefolgt von den T<sub>EM</sub> mit ~10-20%, den EECs mit ~10-15% und den DPECs mit ~5-8%; den geringsten Anteil machten die T<sub>CM</sub> mit < 3% aus (Abb. 3.20, rechte Spalte).



**Abb. 3.21: Normierung der Subpopulationen Epitop-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Lunge**  
Die in Abb. 3.20 gezeigten Frequenzen der Subpopulationen Epitop-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Lunge zu den Zeitpunkten 4, 6 und 8 Monate nach KMT wurden auf  $1 \times 10^5$  gesamt-CD8<sup>+</sup> T-Zellen normiert.

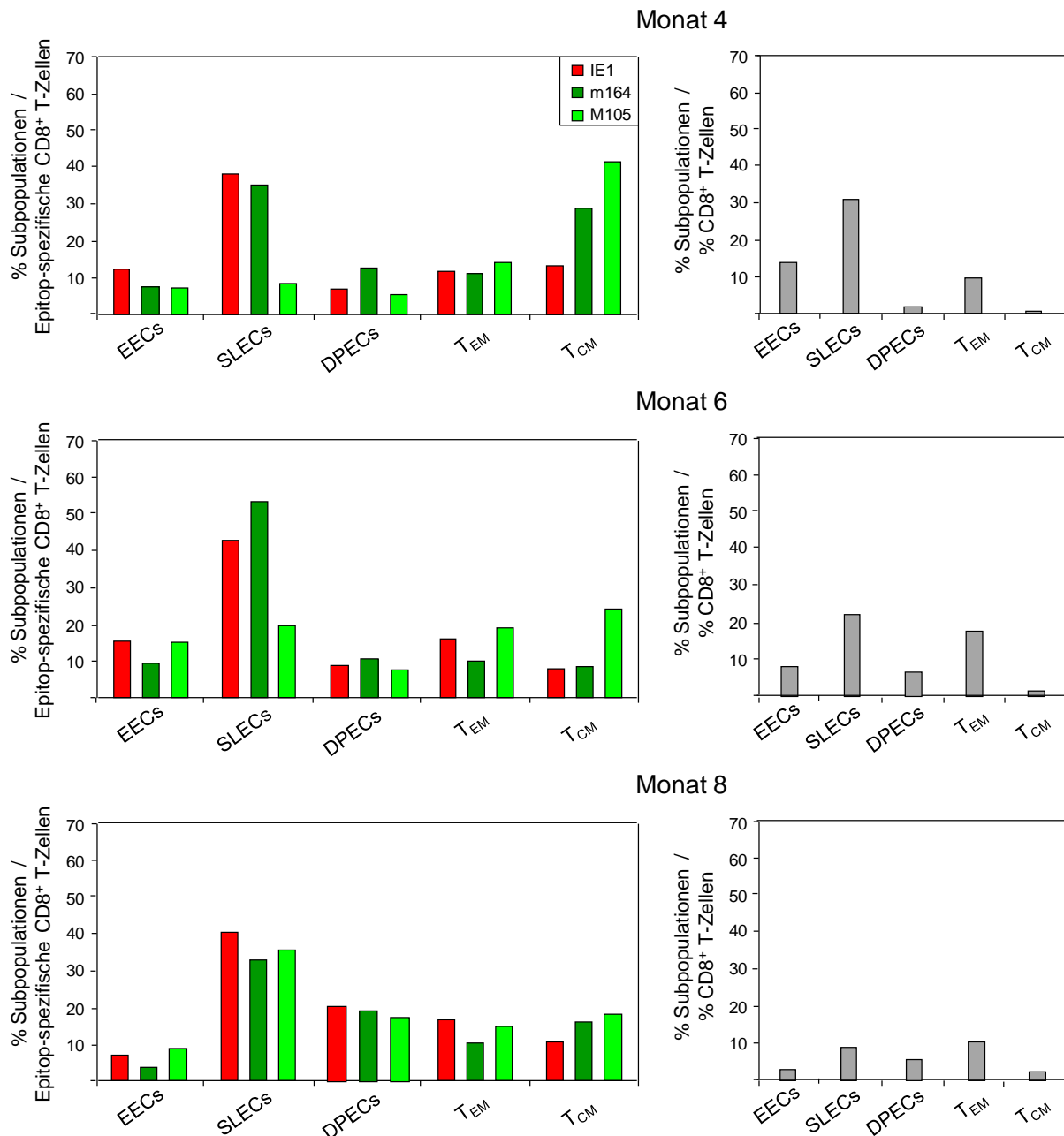
Eine ähnliche Verteilung der Subpopulationen war auch für die Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu beobachten (Abb. 3.20, linke Spalte). Lediglich bei den M105-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen an den Monaten 4 und 6 dominierten die EECs statt der SLECs. Die SLECs machten ~40-50% der Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus, gefolgt von den EECs ~20-30% (Ausnahme M105) und T<sub>EM</sub> ~3-15%, sowie den T<sub>CM</sub> mit <10%. Den geringsten Anteil machten die DPECs aus mit ~3% an Monat 4 und 6. An Monat 8 kam es allerdings zu einem Anstieg der DPECs auf ~10-15%, vergleichbar mit den T<sub>EM</sub>. Interessanterweise konnte für die M105-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen an den Monaten 4 und 6 zwar ein geringerer Anteil an SLECs nachgewiesen werden, dafür allerdings eine größere Menge EECs.

Die Normierung der Frequenzen der Subpopulationen Epitop-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Lunge auf  $1 \times 10^5$  gesamt-CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 3.21), zeigte deutlich, dass die SLECs die Hauptpopulation aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen ausmacht, welche für die Zunahme der Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen zwischen Monat 4 und 6 in der latent infizierten Lunge verantwortlich sind. Auch die EECs zeigten einen Anstieg, der allerdings sehr viel geringer war. Die Anstiege der DPECs, T<sub>EM</sub> und T<sub>CM</sub> waren im Vergleich kaum nennenswert, jedoch sollte erwähnt werden, dass die M105-spezifischen DPECs im Gegenteil zu den übrigen Populationen an Monat 8 weiter zunahm. Demzufolge sind die *memory*-Zellen, wie der Begriff *'memory inflation'* vermuten lässt, nicht für den Anstieg der CD8<sup>+</sup> T-Zellen während der Latenz verantwortlich.

Neben den CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen der Lunge wurden diese auch in der Milz analysiert. Wie in Abbildung 3.22 zu erkennen ist, waren auch hier die SLECs die dominierende Subpopulation unter allen Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, jedoch waren auch wesentlich mehr DEPCs, T<sub>EM</sub> und T<sub>CM</sub> nachweisbar. Der Anteil der M105-spezifischen T<sub>CM</sub> übertraf an Monat 4 sogar den Anteil der SLECs, an Monat 6 waren beide Populationen gleich stark vertreten. Der Anteil der DEPCs betrug unter den Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen an den Monaten 4 und 6 ~10% und stieg an Monat 8 auf ~20% an. Die EECs verhielten sich gegenteilig und nahmen zwischen Monat 6 und 8 ab. Für die Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der latent infizierten Milz ergab sich folgende Hierarchie (Ausnahme M105, Monat 4 und 6): SLECs (~30-50%) > T<sub>EM</sub> (~10-20%), T<sub>CM</sub> (~5-30%) und DPECs (~10-20%) > EECs ~5-15%.

Betrachtet man die Verteilung der Subpopulationen in der Gesamtheit der CD8<sup>+</sup> T-Zellen der Milz so dominierten an Monat 4 zunächst die SLECs mit einem Anteil von ~30%, mit fortschreitender Zeit nahm der Anteil der SLECs jedoch ab und der Anteil der T<sub>EM</sub> erhöhte sich. Die EECs nahmen von ~13% an Monat 4 auf ~3% an Monat 8 ab. Der Anteil der DEPCs stieg gegenteilig von ~2% an Monat 4 auf ~5% an den Monaten 6 und 8 an. Die T<sub>CM</sub>

machten zu allen Zeitpunkten < 3% aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus. Allgemein kann man sagen, dass in der Milz, wie erwartet, mehr Epitop-spezifische T<sub>EM</sub> und T<sub>CM</sub> nachgewiesen wurden.

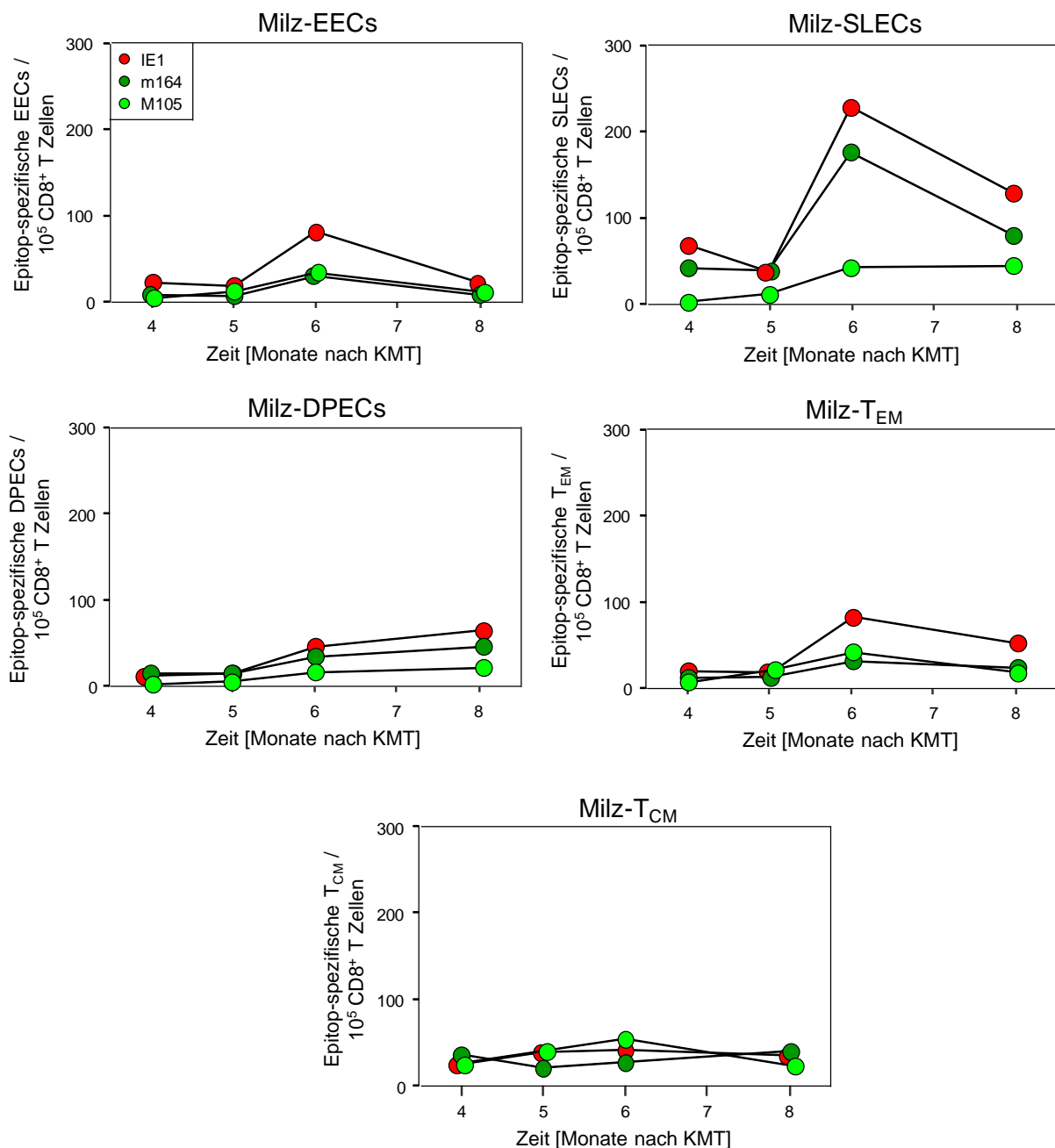


**Abb. 3.22: Charakterisierung der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen in der latent infizierten Milz**

In der linken Spalte ist der prozentuale Anteil der jeweiligen Subpopulationen innerhalb der IE1-, m164- oder M105-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt. Die Differenzierung erfolgte anhand der folgenden Markerkombinationen: EECs (CD127<sup>low</sup> CD62L<sup>low</sup> KLRG1<sup>low</sup>), SLECs (CD127<sup>low</sup> CD62L<sup>low</sup> KLRG1<sup>high</sup>), DPECs (CD127<sup>high</sup> CD62L<sup>low</sup> KLRG1<sup>high</sup>), T<sub>EM</sub> (CD127<sup>high</sup> CD62L<sup>low</sup> KLRG1<sup>low</sup>), T<sub>CM</sub> (CD127<sup>high</sup> CD62L<sup>high</sup> KLRG1<sup>low</sup>) zu den Zeitpunkten 4, 6 und 8 Monate *p.i.* Die Diagramme rechts zeigen die prozentuale Verteilung der Subpopulationen in der Gesamtheit der CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

Auch nach Normierung der Frequenzen der Subpopulationen Epitop-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz auf  $1 \times 10^5$  gesamt-CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 3.23), wurde deutlich, dass die SLECs die Hauptpopulation aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen ausmachen, welche für die Zunahme der Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen an Monat 6 in der latent infizierten Milz verantwortlich

sind. EECs und  $T_{EM}$  trugen in der Milz zu etwa gleichen sehr viel geringeren Anteilen zum Anstieg der Epitop-spezifischen  $CD8^+$  T-Zellen bei. Damit sind auch in der Milz die SLECs hauptsächlich für die *memory inflation* verantwortlich. Die DPECs zeigten in der Milz einen interessanten Phänotyp. Im Gegensatz zu den übrigen Subpopulation, die nach 8 Monaten im Vergleich zu Monat 6 wieder abnahmen, kam es für die DPECs zu einem fortwährenden Anstieg zwischen den Monaten 5 und 8.



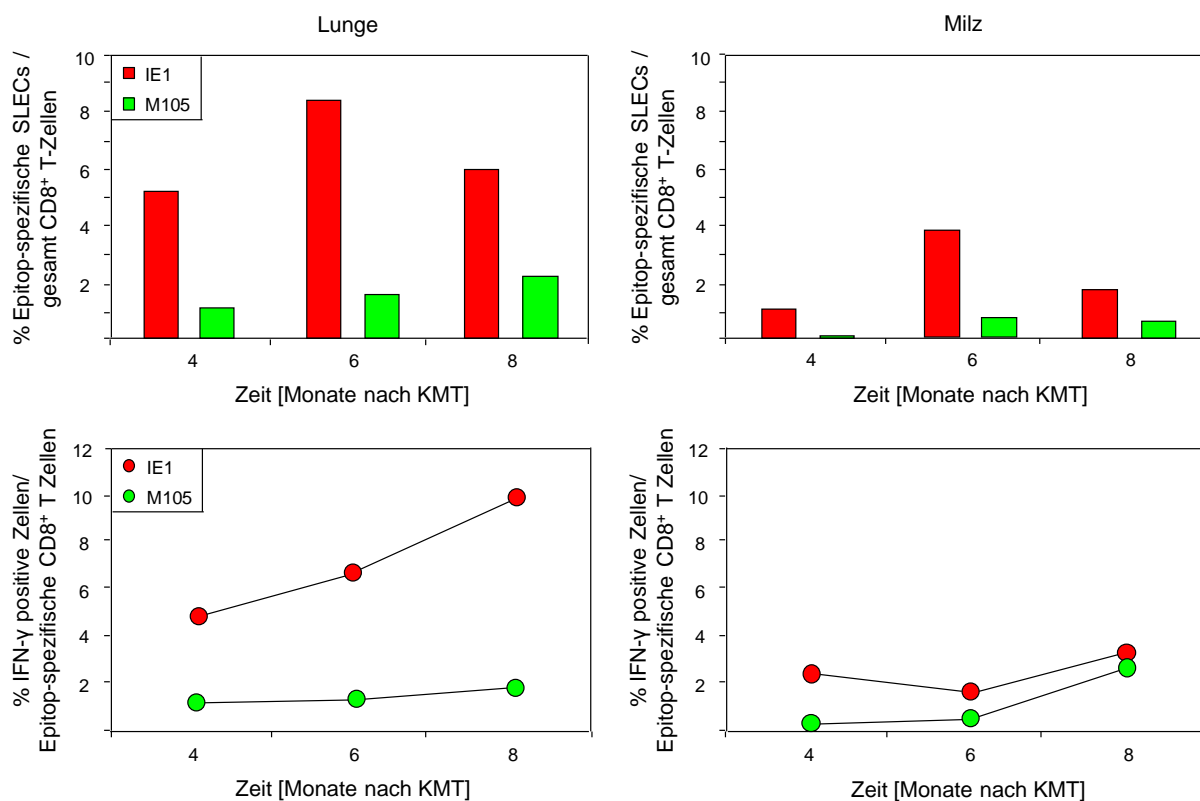
**Abb. 3.23: Normierung der Subpopulationen Epitop-spezifischer  $CD8^+$  T-Zellen in der Milz**

Die in Abb. 3.22 gezeigten Frequenzen der Subpopulationen Epitop-spezifischer  $CD8^+$  T-Zellen in der Milz zu den Zeitpunkten 4, 6 und 8 Monate nach KMT wurden auf  $1 \times 10^5$  gesamt- $CD8^+$  T-Zellen normiert.



Besonders im Falle der M105-spezifischen  $CD8^+$  T-Zellen der Lunge an den Monaten 4 und 6 *p.i.* wurde bei einem geringeren Anteil an SLECs im Vergleich zu Monat 8, ein gleichzeitiger Anstieg der EECs beobachtet. Dieses Phänomen sollte genauer untersucht werden.

Da bereits bekannt war, dass  $IFN-\gamma$  die Differenzierung von  $CD8^+$  T-Zellen zu SLECs (Cui et al., 2009) und die Expansion der SLECs fördert (Whitmire et al., 2005), sollte in einem weiteren Versuch die Detektion  $IFN-\gamma^+$  Epitop-spezifischer  $CD8^+$  T-Zellen erfolgen. Zu den Zeitpunkten 4, 6 und 8 Monate *p.i.* wurden aufgereinigte Lymphozyten aus Lunge und Milz mit Hilfe synthetischer Peptide (IE1 und M105) zur  $IFN-\gamma$ -Produktion stimuliert (siehe 2.2.3.9) und dieses intrazellulär nachgewiesen (siehe 2.2.4.3).



**Abb. 3.24: Detektion des intrazellulären  $IFN-\gamma$  Epitop-spezifischer  $CD8^+$  T-Zellen in Lunge und Milz**

Die  $CD8^+$  T-Zellen wurden mittels synthetischen Peptiden zur  $IFN-\gamma$ -Produktion stimuliert. Die Akkumulation von  $IFN-\gamma$  in der Zelle wurde durch BrefeldinA erreicht und ermöglichte die zytofluorometrische Detektion des intrazellulären  $IFN-\gamma$ . In der unteren Spalte ist jeweils der prozentuale Anteil  $IFN-\gamma^+$  Zellen pro IE1- und M105-spezifischer  $CD8^+$  T-Zellen zu den Zeitpunkten 4, 6 und 8 Monate nach KMT dargestellt. Im Vergleich dazu zeigt die obere Spalte den prozentualen Anteil IE1- und M105-spezifischer SLECs zu den gleichen Zeitpunkten. In der linken Spalte sind die Daten für die Lunge, in der rechten Spalte die Daten für die Milz zu sehen.

In Abbildung 3.24 sind der prozentuale Anteil der Epitop-spezifischen SLECs (obere Reihe) und die Menge der IFN- $\gamma$  produzierenden Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen (untere Reihe) dargestellt. Insgesamt war der Anteil an IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz niedriger als in der Lunge, genauso verhielt es sich für den Anteil an Epitop-spezifischen SLECs. Zwar waren sowohl die Frequenz der IE1-spezifischen SLECs als auch die Frequenz der IE1-spezifischen IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Milz und Lunge stets höher als die Frequenzen für M105, allerdings konnte kein direkter Zusammenhang zwischen IFN- $\gamma$  und SLECs nachgewiesen werden.

Zusammenfassung: Die Charakterisierung der Subpopulationen Epitop-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der latent infizierten Lunge ergab für alle analysierten Zeitpunkte (4, 6 und 8 Monate *p.i.*) folgende Hierarchie: SLECs (~40-50%) > EECs (~20-30%) > T<sub>EM</sub> (~3-15%) > T<sub>CM</sub> (<10%) > DPEC (~3% Monat 4 und 6; Ausnahme Monat 8: ~10-15%). Eine weitere Ausnahme bildeten die M105-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen an den Monaten 4 und 6, hier dominierten die EECs statt der SLECs. Vor allem für M105 konnte beobachtet werden, dass eine geringere Menge an SLECs stets mit einer größeren Anzahl EECs einherging.

Die Analyse der Milz lieferte folgende Hierarchie der Subpopulationen Epitop-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen: SLECs (~30-50%) > T<sub>EM</sub> und T<sub>CM</sub> (~10-20% bzw. ~5-30%) > EECs ~5-15% > DPECs (~2-5%). Auch hier bildete M105 wieder eine Ausnahme, in Monat 4 übertrafen die M105-spezifischen T<sub>CM</sub> den Anteil der SLECs, in Monat 6 waren beide Populationen gleich stark vertreten. Wie zu erwarten konnte in der Milz eine größere Menge *memory*-Zellen detektiert werden.

Auch nach Normierung der Frequenzen der Subpopulationen Epitop-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf  $1 \times 10^5$  gesamt-CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Milz und Lunge verdeutlichte, dass die SLECs die Hauptpopulation aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen ausmachen, welche für die Zunahme der Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der latent infizierten Lunge und Milz verantwortlich sind. Demzufolge sind die SLECs und nicht die *memory*-Zellen, wie der Begriff '*memory inflation*' vermuten lässt, für den Anstieg der CD8<sup>+</sup> T-Zellen während der Latenz verantwortlich.

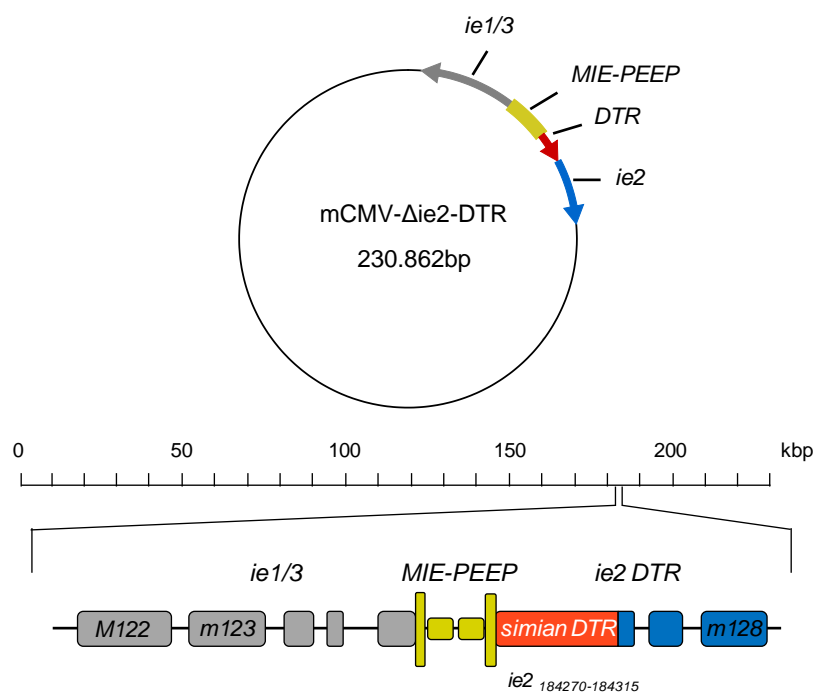
Einen Interessanten Phänotyp zeigten die DPECs in der Milz und die M105-spezifischen DPECs in der Lunge; zwischen Monat 5 und 8 war ein fortwährender Anstieg dieser Zellen zu beobachten.

Zwischen IFN- $\gamma$  und SLECs konnte kein direkter Zusammenhang nachgewiesen werden. Demzufolge handelt es sich bei den SLECs nicht um die IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zell-Population.

### 3.2 Ist eine IE-Genexpression zur Etablierung von Latenz notwendig?

Im zweiten Teil dieser Arbeit lag der Fokus auf der Latenz-Etablierung. Da das mCMV-Genom bereits kurz nach Infektion als zirkuläres Episom im Nukleus der Wirtszelle vorliegt (Marks & Spector, 1984) und mit Histonen assoziiert ist, erfolgt die Latenz-Etablierung vermutlich schon zu sehr frühen Zeitpunkten. Bevan et al. (1996) zeigten, dass Virus-Replikation nicht notwendig ist, um Latenz zu etablieren. Auch Arbeiten mit einer  $\Delta M94$ -mCMV-Mutanten, welche nach Infektion einer Zelle diese nicht mehr verlassen kann, zeigten, dass bereits die erste Infektionsrunde zur Latenz-Etablierung ausreicht (Mohr et al., 2010).

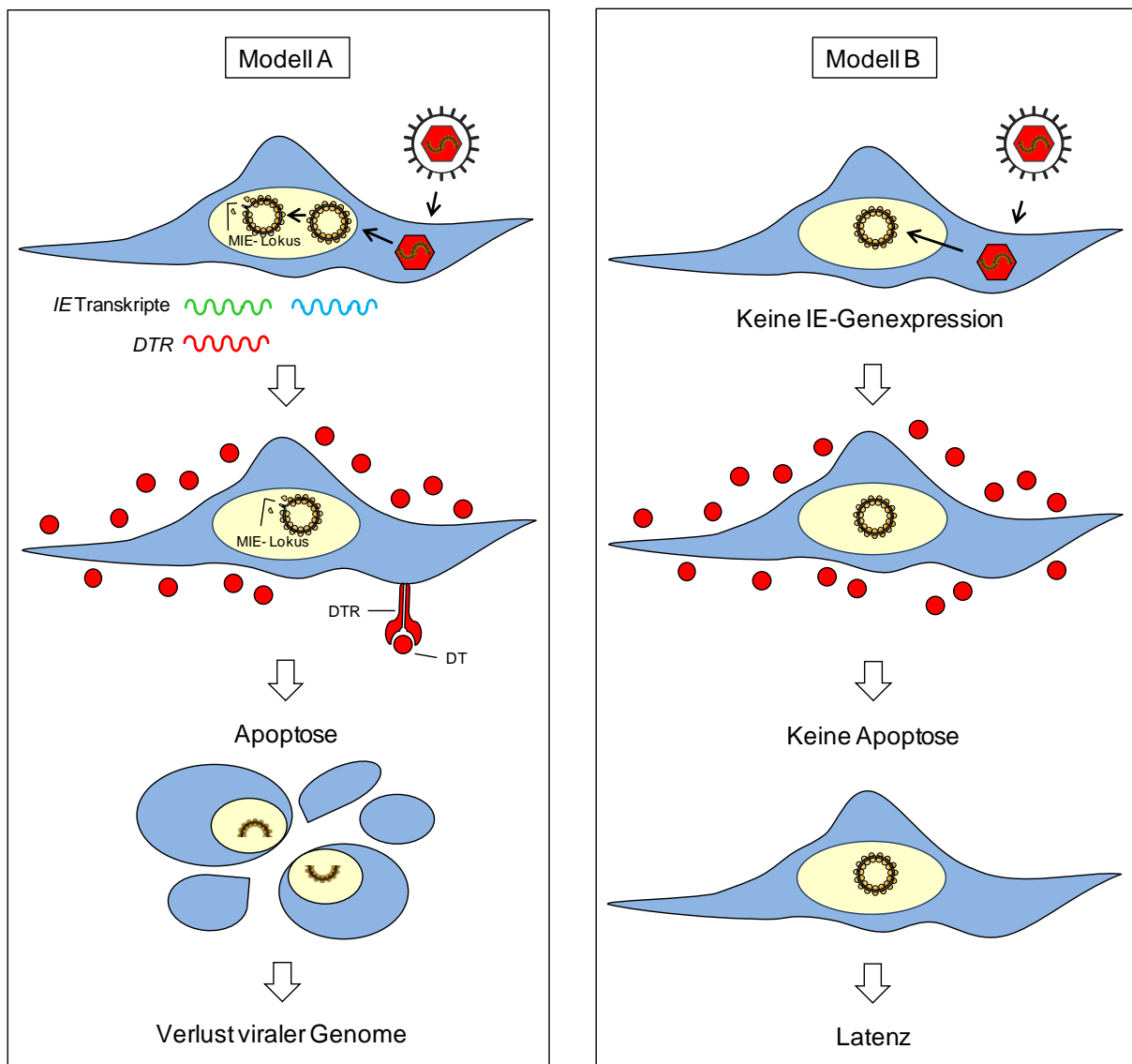
In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob eine IE-Genexpression der Etablierung von Latenz vorausgeht. Hierbei kam das bereits etablierte Modell der Diphtherietoxin (DT)-vermittelten Zelldepletion zum Einsatz (Scheller, 2011). Das rekombinante Virus mCMV- $\Delta ie2$ -DTR kodiert für den *simian* Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR), der nach Infektion auf der Oberfläche von mCMV- $\Delta ie2$ -DTR infizierten Zellen exprimiert wird. Eine DT-Applikation induziert in der Folge die Depletion dieser Zellen. Für die Frage, ob Genexpression zur Etablierung der Latenz notwendig ist, bietet sich dieses Modellsystem an, da das *dtr*-Gen unter Kontrolle des *ie2*-Promotors steht, so dass es nach IE-Genexpression zur Präsentation des DTR kommt. In Abbildung 3.25 ist die schematische Darstellung der verwendeten Virusrekombinante mCMV- $\Delta ie2$ -DTR gezeigt.



**Abb. 3.25: Schematische Darstellung der Virusrekombinante mCMV- $\Delta ie2$ -DTR**

Dieses Virus basiert auf mCMV-WT-BAC und enthält zusätzlich ein für den *simian* DTR kodierendes Gen, welches unter Kontrolle des *ie2*-Promotors steht. Bei der Insertion des *dtr*-Gens mit darauffolgendem Stop-Codon in das Exon 1 des *ie2*-Gens wurden 46bp von Exon 1 deletiert (Scheller, 2011). Folglich kann nur DTR transkribiert werden und kein IE2.

Mit Hilfe dieser Rekombinante sollte versucht werden, zwischen zwei Hypothesen der Latenz-Etablierung zu unterscheiden: Zum einen könnte das Genom von Anfang an inaktiv vorliegen, so dass kein DTR exprimiert wird und die Zelle DT-resistent bleibt. Oder aber es kommt zur IE-Genexpression und die DT-Applikation ermöglicht folglich die konditionale Depletion aller Zellen, die den DTR auf ihrer Oberfläche exprimieren (Abb. 3.26). Zur Überprüfung der Hypothesen sollte die Genom-Load im latent infizierten Zelltyp der Leber, den LSECs, nach akuter Infektion mit und ohne DT-Applikation bestimmt werden. In Folge einer IE-Genexpression wäre nach DT-Applikation kein Genom mehr nachweisbar, während in Zellen mit inaktiven Genomen virale DNA quantifizierbar wäre.



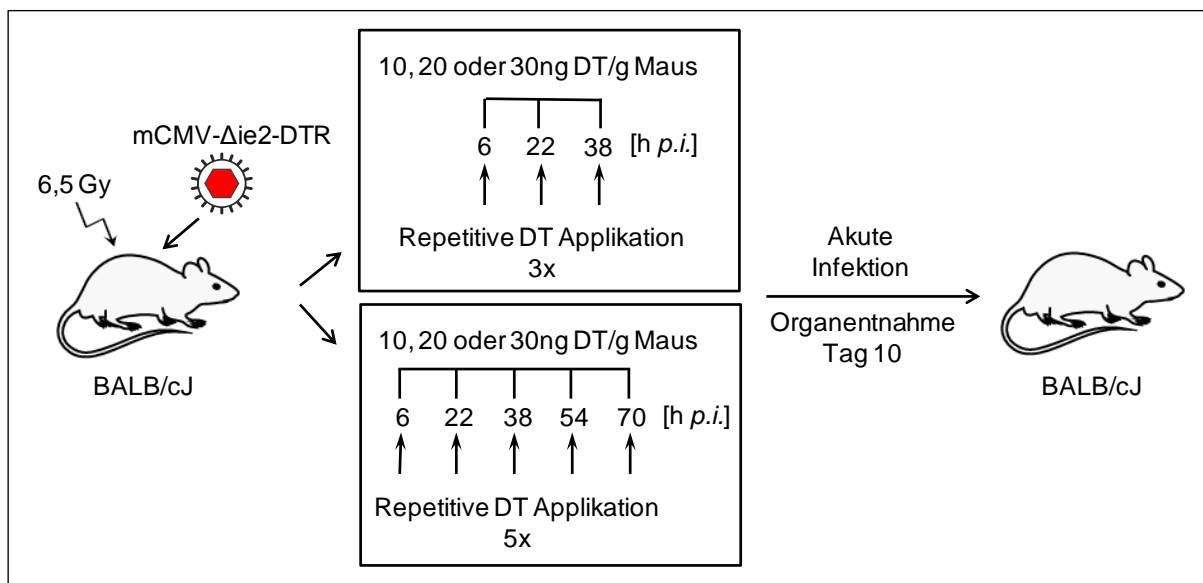
**Abb. 3.26: Modell zur Untersuchung der mCMV-Latenz-Etablierung**

Es kommen zwei mögliche Modelle der Latenz-Etablierung in Frage: in Modell A wird von vorhergehender IE-Genexpression ausgegangen, während das Genom in Modell B von Anfang an inaktiv ist. Trifft Modell A zu käme es aufgrund der Zelldepletion zum Verlust der viralen Genome.

### 3.2.1 Optimierung der repetitiven DT-Applikation *in vivo*

Da das Modell der Zelldpletion bereits etabliert war, und die Funktionalität des DTR sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, sowie der optimale Zeitrahmen zur DT-Applikation bereits bestimmt werden konnte (Scheller, 2011), erfolgte im Rahmen dieser Arbeit lediglich eine weitere Optimierung der DT-Konzentration zur *in vivo* Applikation. Es war bekannt, dass eine dreimalige *i.v.* DT-Applikation von 50ng/g Körpergewicht zum Tod der Versuchstiere führt, aber eine fünfmalige DT-Gabe von 10ng/g Körpergewicht toleriert wird. Zur weiteren Optimierung der DT-Konzentration wurde nun die repetitive Applikation von DT, entweder 3x oder 5x, mit einer Konzentration von 20 und 30ng/g Körpergewicht im Vergleich zu 10ng/g Maus untersucht (siehe Modell Abb. 3.27).

Hierfür wurden immunsupprimierte BALB/cJ Mäuse mit mCMV- $\Delta$ ie2-DTR *i.pl.* infiziert und wie beschrieben mit DT behandelt. Die erste Applikation erfolgte 6h *p.i.*, alle weiteren Applikationen in einem Abstand von 16h. Nach 10 Tagen wurden in Speicheldrüse und Lunge die Virustiter bestimmt (siehe 2.2.1.5.2). Aus der Leber wurde zusätzlich mittels IE1-spezifischer IHC die Anzahl infizierter Zellen ermittelt (siehe 2.2.7.2).

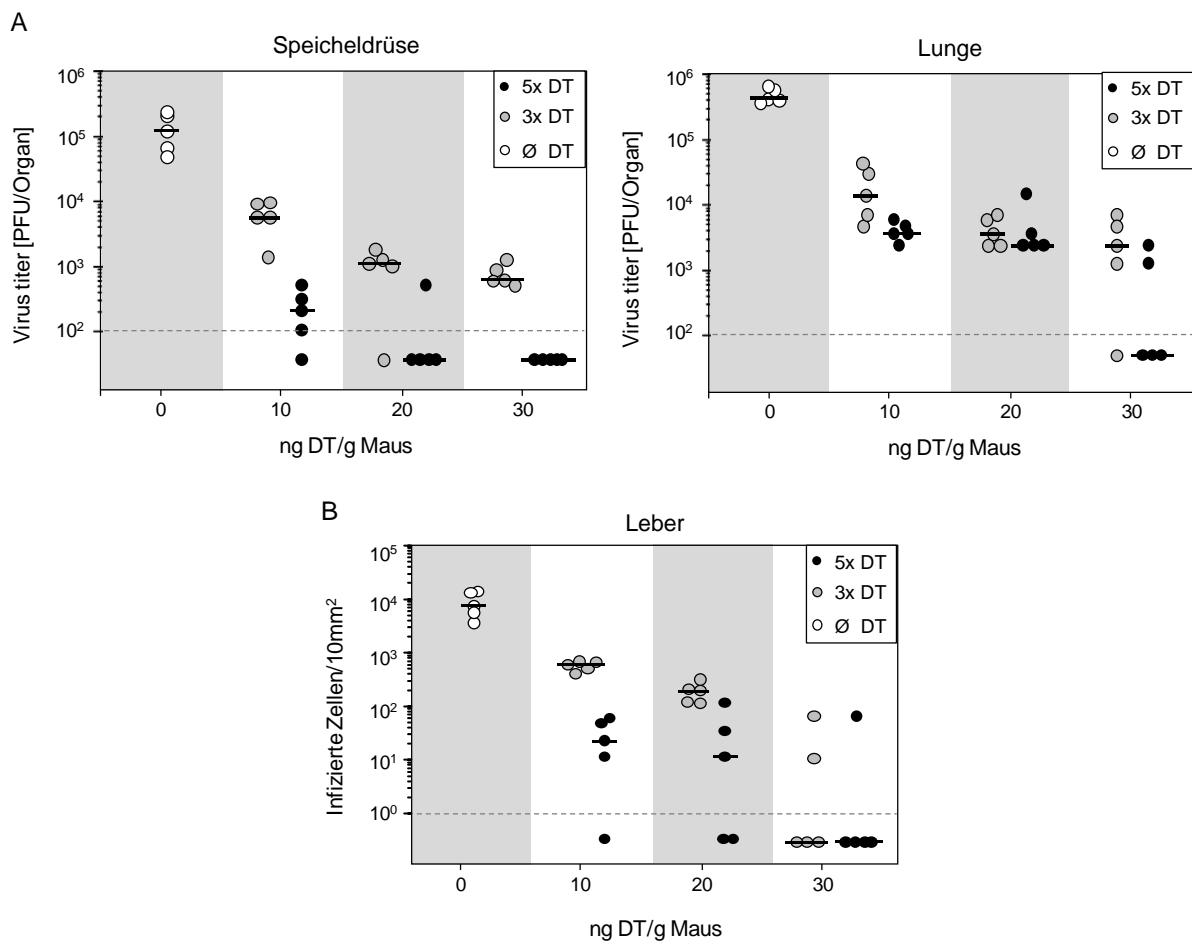


**Abb. 3.27: Modell zur Optimierung der DT-Applikation *in vivo***

Zur Ermittlung der optimalen DT-Konzentration für *in vivo* Versuche mit immunsupprimierten, *i.pl.* mCMV- $\Delta$ ie2-DTR-infizierten BALB/cJ Mäusen wurden den Tieren 10, 20 oder 30ng DT/g Körpergewicht *i.v.* injiziert. Die DT-Gabe erfolgte repetitiv entweder drei- oder fünfmal, beginnend 6h *p.i.* in einem Abstand von 16h. An Tag 10 *p.i.* wurden die Organe zur Bestimmung des Virustiters bzw. der Anzahl infizierter Zellen entnommen.

Wie aus Abbildung 3.28 deutlich wird, führte eine dreimalige *i.v.* DT-Applikation von 10ng/g Körpergewicht zu einer Reduktion der Viruslast um  $\sim 1,5$   $\log_{10}$ -Stufen in Speicheldrüse und Lunge und um  $\sim 1$   $\log_{10}$ -Stufe in der Leber. Die Erhöhung der Dosis auf 20 bzw. 30ng DT/g Körpergewicht steigerte den Effekt auf  $\sim 2$  bzw.  $\sim 2,5$   $\log_{10}$ -Stufen in Speicheldrüse und Lunge und auf  $\sim 1,5$  bzw.  $\sim 4$   $\log_{10}$ -Stufen in der Leber. Eine fünfmalige Gabe von 10 bzw. 20ng DT/g

Maus resultierte in einem um  $\sim 2 \log_{10}$ -Stufen geringeren Virustiter in der Lunge. In der Leber konnte eine um  $\sim 3 \log_{10}$ -Stufen geringere Viruslast beobachtet werden. Nach fünfmaliger DT-Applikation mit einer Dosis von 10ng/g Körpergewicht wurde der Titer der Speicheldrüse um  $\sim 2,5 \log_{10}$ -Stufen reduziert, bei weiterer Erhöhung der DT-Konzentration lag der Virustiter unter der Detektionsgrenze. Eine fünfmalige DT-Applikation von 30ng/g Körpergewicht führte in allen untersuchten Organen zur fast vollständigen Reduktion der Viruslast unterhalb des Detektionslimits. Daher wurde dieses Applikationsmodell für alle folgenden *in vivo* Versuche gewählt.

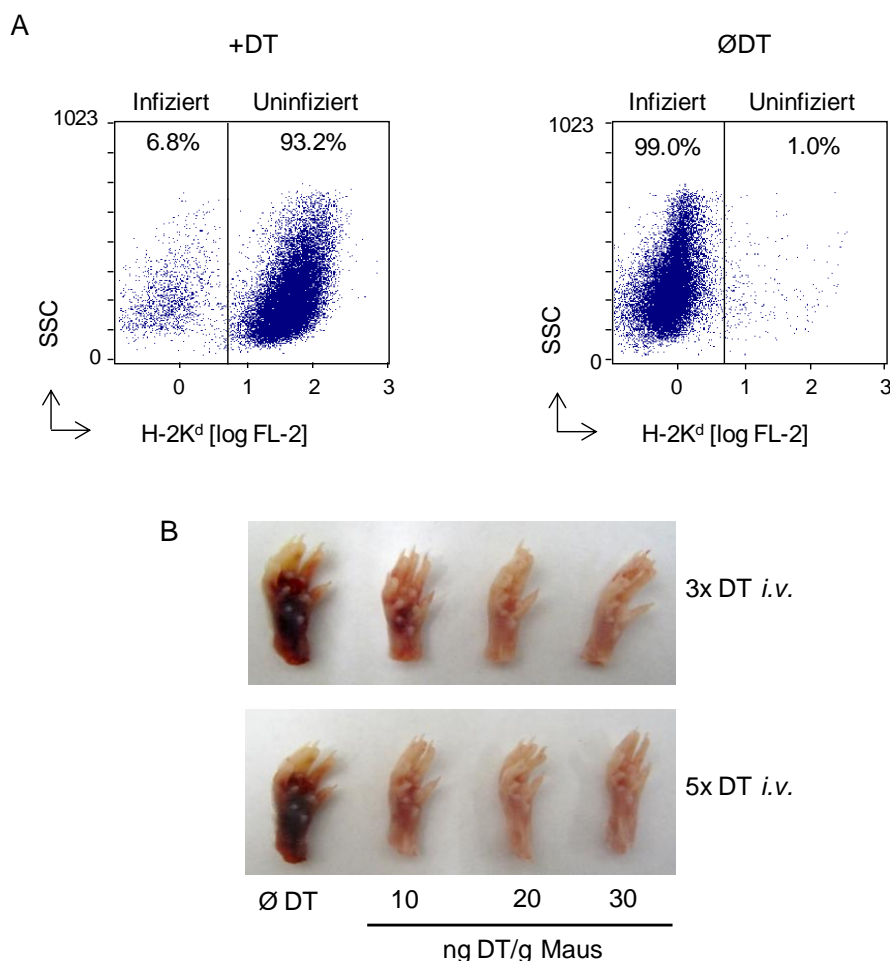


**Abb. 3.28: Reduktion der Viruslast nach repetitiver DT-Applikation *in vivo***

Immunsupprimierte BALB/cJ Mäuse wurden mit  $2 \times 10^5$  PFU mCMV- $\Delta$ ie2-DTR *i.pl.* infiziert, an Tag 10 *p.i.* erfolgte die Organentnahme. Die Bestimmung der Virustiter in Speicheldrüse und Lunge nach drei- (graue Punkte) bzw. fünfmaliger (schwarze Punkte) DT-Gabe mit einer Konzentration von 10, 20 oder 30ng DT pro g Körpergewicht erfolgte im Plaque-Assay. Im Vergleich dazu ist der Virustiter ohne DT-Applikation dargestellt (weiße Punkte) (A). Zusätzlich erfolgte die Analyse der Anzahl infizierter Leberzellen. Dazu wurden die viralen IE1 Proteine mittels IHC angefärbt und die positiven Zellen pro  $10 \text{ mm}^2$  ausgezählt (B). Jeder Punkt steht für eine Maus, die schwarzen Balken repräsentieren die Mediane von 5 Tieren pro Konzentration.

### 3.2.2 DT vermittelt nach mCMV- $\Delta$ ie2-DTR Infektion einen antiviralen Effekt *in vitro* und *in vivo*

Der Effekt der DT-Applikation wird durch die Blockade des EF-2 und damit durch die Hemmung der viralen und zellulären Translation, sowie durch Induktion von Apoptose vermittelt (Kato & Pappenheimer, 1960). Dies verursacht eine antivirale Aktivität und damit einen Schutz vor der mCMV-Infektion. In *in vitro* und *in vivo* Versuchen sollte diese Aktivität nun nachgewiesen werden.



#### Abb. 3.29: Nachweis des DT-vermittelten antiviralen Effekts nach mCMV- $\Delta$ ie2-DTR Infektion

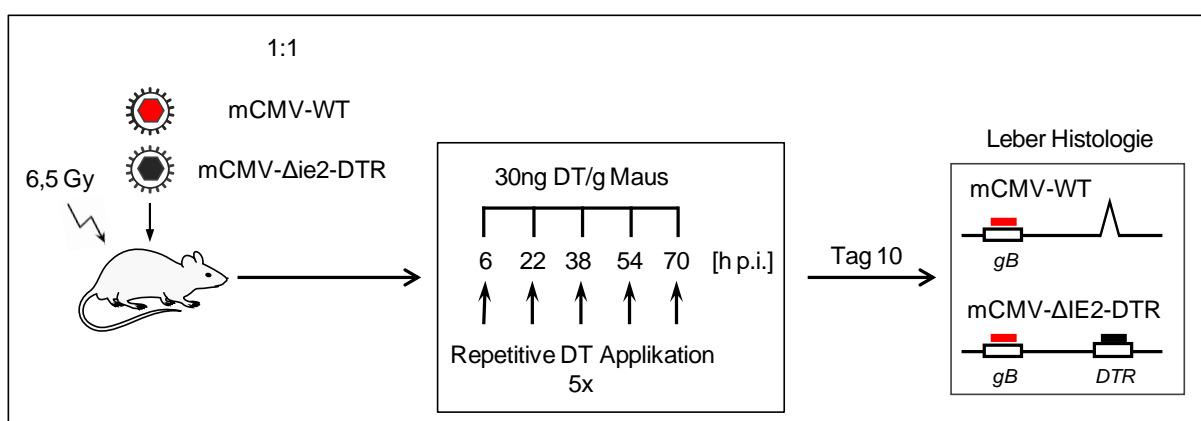
(A) DT verursacht eine antivirale Aktivität *in vitro*. MEF wurden mit einer MOI von 4 mit mCMV- $\Delta$ ie2-DTR zentrifugal infiziert und mit einer Konzentration von 100ng/ml DT behandelt, eine infizierte Kontrollgruppe blieb unbehandelt. 48h nach der Infektion erfolgte die zytofluorometrische Analyse der MHC-I (H-2K<sup>d</sup>) Expression auf den Zellen. Infizierte Zellen sind H-2K<sup>d</sup><sup>-</sup>, nicht-infizierte Zellen H-2K<sup>d</sup><sup>+</sup>. (B) Effekt der DT-Applikation *in vivo*. Im Vergleich ist die rechte hintere Extremität von *i.pl.* mCMV- $\Delta$ ie2-DTR-infizierten BALB/cJ Mäusen ohne Behandlung bzw. mit DT-Behandlung (verschiedene Konzentrationen 10, 20 oder 30ng/Körpergewicht, drei- oder fünfmal repetitiv *i.v.* verabreicht) dargestellt.

Zur *in vitro* Analyse wurden MEF (MOI = 4) mit mCMV- $\Delta$ ie2-DTR zentrifugal infiziert und mit DT (100ng/ml) behandelt, eine Kontrollgruppe blieb unbehandelt. In Abbildung 3.29 A ist die zytofluorometrische Analyse der Zellen 48h nach Infektion dargestellt. Die Färbung mit

einem  $\alpha$ -H-2K<sup>d</sup> Antikörper erlaubte die Differenzierung zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen. Dieser Antikörper markiert MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche, die während der produktiven Infektion durch virale Immunevasine herunter reguliert werden. Die H-2K<sup>d</sup> negative Population stellt also infizierte und die H-2K<sup>d</sup> positive Population nicht-infizierte Zellen dar. Die antivirale Aktivität nach DT-Applikation mit 93,2% nicht-infizierten und lediglich 6,8% infizierten Zellen (Abb. 3.29 A, links), im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe mit 99% infizierten Zellen (Abb. 3.29 A, rechts) war deutlich zu erkennen. In dem bereits vorgestellten *in vivo* Versuch (Abb. 3.27) zur Optimierung der DT-Applikation, war der antivirale Effekt bereits mit dem bloßen Auge anhand einer reduzierten Pathogenität am Infektionsort zu sehen (Abb. 3.29 B). Ohne DT-Behandlung war eine deutliche Hämorrhagie und Schwellung der Hinterpfoten zu erkennen, mit steigender Konzentration und Anzahl der DT-Applikationen war dieser Phänotyp nur sehr schwach bzw. gar nicht sichtbar.

### 3.2.3 Nachweis von mCMV- $\Delta$ ie2-DTR infizierten Leberzellen und der DT-vermittelten Depletion dieser Zellen mittels DTR-spezifischer ISH

Zum direkten Nachweis der DT-vermittelten Depletion infizierter Zellen im Gewebeverband wurde eine DTR-spezifische ISH etabliert. Die hierfür benötigte spezifische DTR-Sonde umfasst die komplette Sequenz des *dtr*-Gens und ist über ihre gesamte Länge mit Digoxigenin markiert (2.2.5.17); diese Sonde detektiert spezifisch mCMV- $\Delta$ ie2-DTR infizierte Zellen. Mit Hilfe einer gB-spezifischen, Fluorescein-markierten Sonde konnten sowohl mCMV- $\Delta$ ie2-DTR- als auch mCMV-WT-BAC-infizierte Zellen nachgewiesen werden.

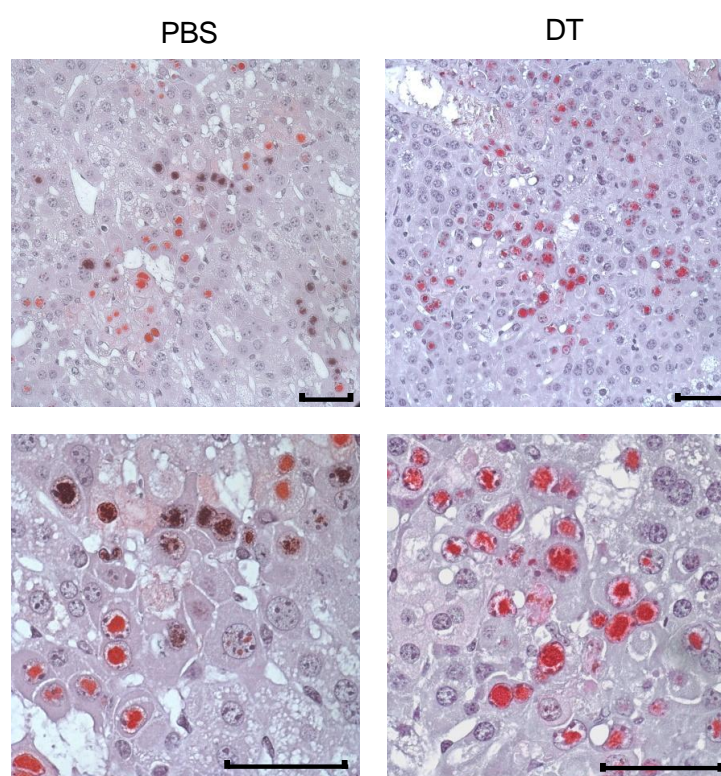


**Abb. 3.30: Modell zur histologischen Analyse mCMV- $\Delta$ ie2-DTR- und mCMV-WT-BAC-koinfizierter, DT-behandelter Leberzellen**

Immunsupprimierte BALB/cJ Mäuse wurden mit  $2 \times 10^5$  PFU eines 1:1 Gemisches der beiden Viren mCMV- $\Delta$ ie2-DTR und mCMV-WT-BAC *i.p.* infiziert und anschließend mit DT (5x 30ng/g Körpergewicht) behandelt, eine Kontrollgruppe bekam PBS verabreicht. Am Tag 10 *p.i.* wurde die Leber entnommen, die Detektion der infizierten Zellen erfolgte durch ISH über DTR- und gB-spezifische Sonden.



Zum Nachweis der Selektivität der DT-Applikation wurde das in Abbildung 3.30 dargestellte Modell einer Ko-Infektion mit mCMV- $\Delta$ ie2-DTR und mCMV-WT-BAC etabliert. Nach Infektion immunsupprimierter BALB/cJ Mäuse mit einem 1:1 Gemisch beider Viren erfolgte eine fünfmalige DT-Gabe mit einer Konzentration von 30ng/g Maus in einem Zeitintervall von 16h, beginnend 6h nach Infektion. Die Kontrollgruppe wurde zu den gleichen Zeitpunkten mit PBS behandelt. An Tag 10 wurden histologische Leberschnitte angefertigt (2.2.7.1) und eine DTR- und gB-spezifische ISH durchgeführt (2.2.7.3). Die Umsetzung des Substrates DAB/Nickel bewirkte eine Schwarzfärbung mCMV- $\Delta$ ie2-DTR infizierter Zellen, das Substrat Neufuchsin verursachte eine Rotfärbung mCMV-WT-BAC infizierter Zellen.



**Abb. 3.31: Histologischer Nachweis der DT-vermittelten Depletion mCMV- $\Delta$ ie2-DTR infizierter Zellen**

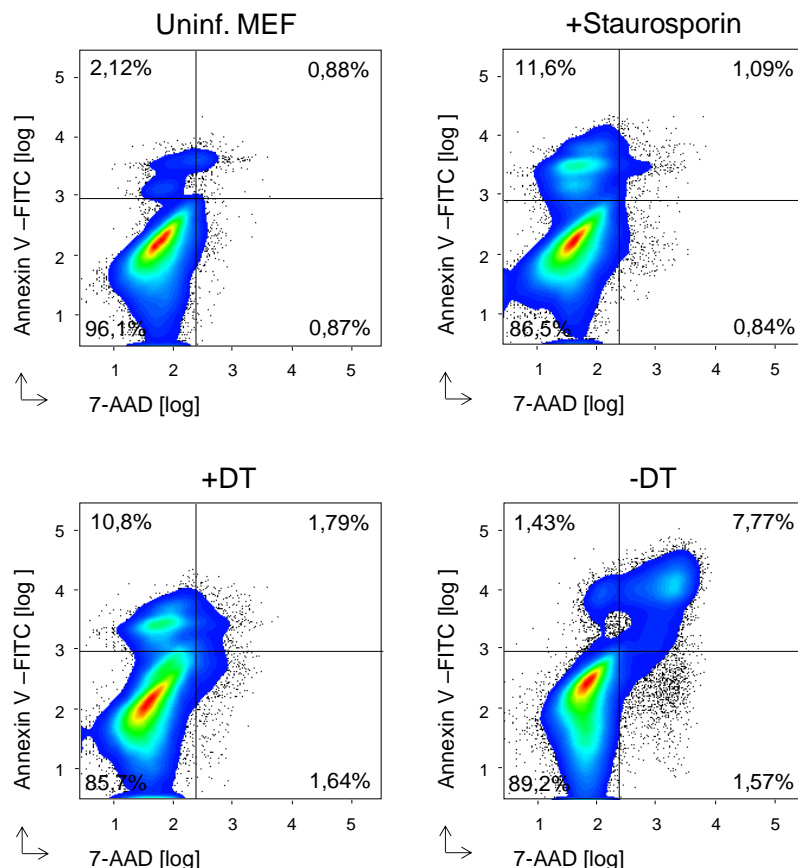
Infizierte Zellen wurden in Leberschnitten von mCMV- $\Delta$ ie2-DTR und mCMV-WT-BAC ko-infizierten Mäusen mittels DTR- und gB-Sonden detektiert. Die gB-Sonde wurde mit roter, die DTR-Sonde mit schwarzer Farbreaktion nachgewiesen. Beide Viren kodieren gB, während alleine mCMV- $\Delta$ ie2-DTR das *dtr*-Gen trägt. Demzufolge sind alle infizierten Zellen rot gefärbt, in mCMV- $\Delta$ ie2-DTR oder ko-infizierten Zellen kommt es zur Überlagerung der roten Farbe mit der Schwarzfärbung durch die DTR-Sonde. In der PBS-Gruppe sind sowohl schwarz (mCMV- $\Delta$ ie2-DTR oder ko-infizierte) als auch rot gefärbte (mCMV-WT) Zellen detektierbar. Nach der DT-Behandlung kommt es zur Auslöschung der mCMV- $\Delta$ ie2-DTR infizierten Zellen und es sind nur noch rot gefärbte mCMV-WT infizierte Zellen zu sehen. Die Balken repräsentieren 50 $\mu$ m.

Abbildung 3.31 zeigt die ISH in Leberschnitten PBS- bzw. DT-behandelter Tiere nach Koinfektion. Wie zu erwarten waren nach PBS-Applikation sowohl schwarz gefärbte mCMV- $\Delta$ ie2-DTR infizierte, als auch rote mCMV-WT-BAC infizierte Zellen nachweisbar. Es ist zu beachten, dass die DTR-spezifische Schwarzfärbung eine Überlagerung der roten gB-

spezifischen Farbe verursacht. Nach fünfmaliger Applikation von 30ng DT/g Maus konnten nur noch rot gefärbte mCMV-WT-BAC infizierte Zellen detektiert und somit der direkte Nachweis der DT-vermittelten Depletion mCMV- $\Delta$ ie2-DTR infizierter Zellen erbracht werden.

### 3.2.4 Analyse der Anzahl viraler Genome nach durchflusszytometrischer Sortierung vitaler Zellen *in vitro*

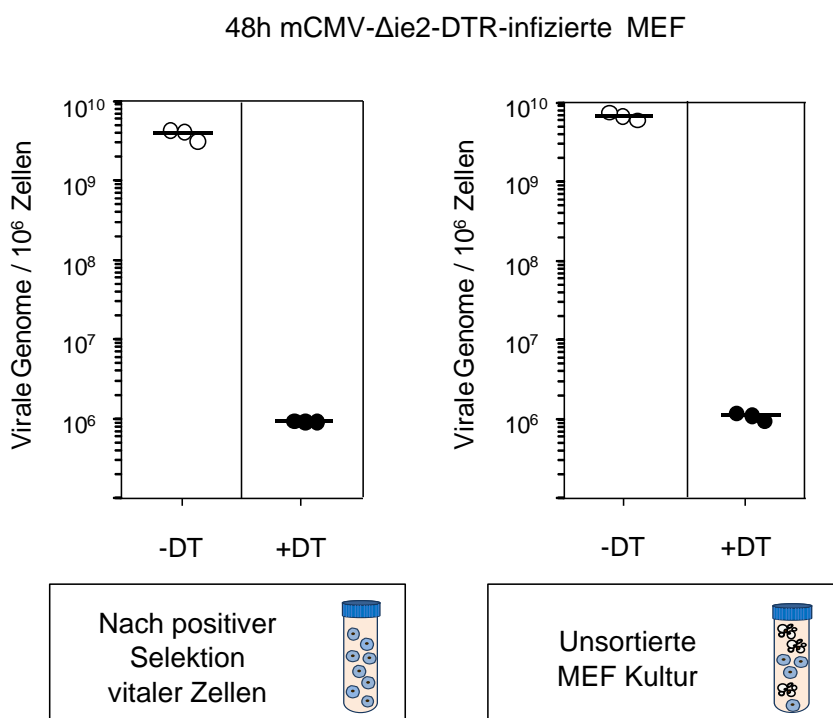
Um zwischen den beiden zu Beginn aufgestellten Hypothesen der Latenz-Etablierung (Abb. 3.26), also einem von Anfang an inaktiven Genom oder einem Genom, welches IE-Expression zur Etablierung von Latenz benötigt, unterscheiden zu können, musste eine Selektion auf lebende Zellen erfolgen. Anderenfalls würde man eventuell noch in den apoptotischen Zellen enthaltene Genombruchstücke detektieren und ein verfälschtes Ergebnis erhalten.



**Abb. 3.32: Durchflusszytometrische Analyse von Annexin V/7-AAD gefärbten MEF zur Identifizierung der lebenden Zellpopulation**

Das Diagramm oben links zeigt die Färbung nicht-infizierter MEF als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle erfolgte der Zusatz von  $1\mu\text{M}$  des Apoptose-Auslösers Staurosporin 30min vor Analyse. Für die Analyse der Übrigen Ansätze wurden MEF mit mCMV- $\Delta$ ie2-DTR (MOI 4) zentrifugal infiziert. Die Gruppe +DT wurde mit 100ng/ml DT behandelt, der -DT-Ansatz blieb unbehandelt. Die Zellen wurden 48h nach Infektion Annexin V-FITC und 7-AAD gefärbt. Lebende Zellen sind jeweils im unteren linken Quadranten zu sehen, Apoptotische im oberen linken und nekrotische Zellen im oberen rechten Quadranten.

Bevor mit *in vivo* Studien begonnen wurde, erfolgte die Testung des Systems *in vitro* mit mCMV- $\Delta$ ie2-DTR-infizierten MEF (MOI 4). Mit Hilfe einer Annexin V/7-AAD Färbung konnte zytofluorometrisch zwischen lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden werden (Abb. 3.32). Der Apoptosemarker Annexin V färbt das membranständige Phosphatidylserin (PS), welches bereits früh in der Apoptose von der inneren auf die äußere Seite der Zellmembran transloziert. Der DNA interkalierende Farbstoff 7-AAD ist nicht membrangängig und färbt daher nur nekrotische Zellen mit zerstörter Membranintegrität. Nach Infektion der Zellen wurde eine Gruppe mit 100ng/ml DT behandelt, eine Gruppe blieb unbehandelt. Als Positivkontrolle wurde ein Ansatz nicht-infizierter MEF 30min vor Analyse mit Staurosporin (1 $\mu$ M), einem Apoptose-Auslöser, versetzt. Nicht-infizierte, unbehandelte MEF fungierten als Negativkontrolle. 48h nach Infektion erfolgte die Analyse. Wie in Abbildung 3.32 dargestellt, befanden sich in der Negativkontrolle der nicht-infizierten MEF lediglich 2% apoptotische Zellen, nach Auslösen von Apoptose mittels Staurosporin waren 11,6% der Zellen apoptotisch. Ein vergleichbarer Anteil von apoptotischen Zellen, mit 10,8%, war nach DT-Behandlung nachweisbar. Ohne DT-Behandlung waren 7,8% der infizierten MEF nekrotisch, Apoptose war in diesem Ansatz kaum zu finden.



**Abb. 3.33: Depletion mCMV- $\Delta$ ie2-DTR-infizierter Zellen *in vitro***

MEF wurden mit einer MOI von 4 mit mCMV- $\Delta$ ie2-DTR zentrifugal infiziert und mit einer Konzentration von 100ng DT /ml behandelt, eine Kontrollgruppe blieb unbehandelt. In der rechten Spalte ist die Anzahl der viralen Genome/10<sup>6</sup> Zellen von MEF Kulturen mit und ohne DT-Behandlung dargestellt. Die Abbildung links zeigt die gleiche Analyse bei vorheriger positiver Selektion der vitalen Zellen. So konnte die Detektion von viralen Genomen apoptotischer Zellen vermieden werden. Die schwarzen Balken repräsentieren die Mediane.

Die mittels FACS von den übrigen Zellpopulationen abgetrennten vitalen Zellen standen zur weiteren Analyse bereit. Nach Isolierung der DNA aus den Zellen (2.2.5.1.3) der lebenden Population mCMV- $\Delta$ ie2-DTR-infizierter MEF zum Zeitpunkt 48h *p.i.*, mit (100ng/ml) und ohne DT-Behandlung, erfolgte die Quantifizierung der viralen Genome mittels *gB*-spezifischer qPCR (2.2.5.3). Die viralen Genome wurden durch eine zusätzliche *pThrp*-spezifische qPCR auf  $1 \times 10^6$  Zellen normiert.

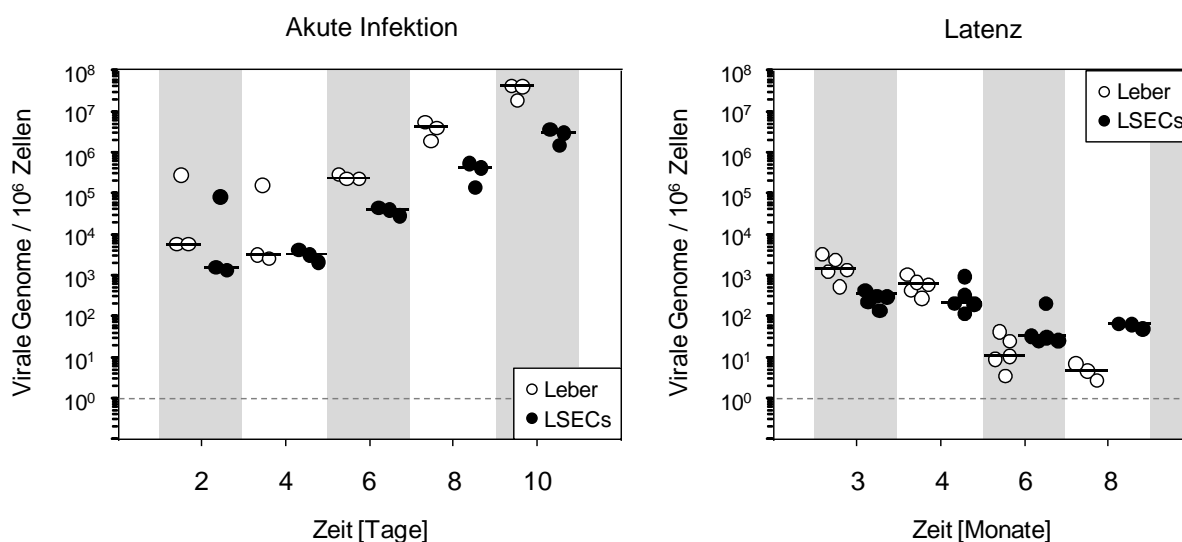
Die Analyse der viralen Genome in der vitalen Zellpopulation mCMV- $\Delta$ ie2-DTR infizierter MEF zum Zeitpunkt 48h *p.i.* betrug nach Behandlung mit DT  $\sim 10^6$  virale Genome/ $10^6$  Zellen. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe mit  $\sim 5 \times 10^9$  viralen Genomen/ $10^6$  Zellen bedeutete dies eine Reduktion der viralen *Load* um  $\sim 3,5$   $\log_{10}$ -Stufen (Abb. 3.33, links). Die noch nachweisbare Menge viraler Genome nach DT-Applikation scheint für die Hypothese des *gene-silencing* zu sprechen. Nahezu identische Werte wurden auch ohne vorhergehende Selektion der vitalen Zellen ermittelt (Abb. 3.33, rechts), daher könnte die Verunreinigung durch virale Genome apoptotischer Zellen *in vitro* möglicherweise zu vernachlässigen sein.

Zusammenfassung: Nach DT-Behandlung (100ng/ml) mCMV- $\Delta$ ie2-DTR-infizierter MEF war zum Zeitpunkt 48h *p.i.* ein Anteil von 10,8% der Zellen apoptotisch. In einem Ansatz ohne DT-Behandlung war kaum Apoptose nachweisbar (1,4%). Nach positiver Selektion der vitalen Zellpopulation wurde in der DT-behandelten Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe eine Reduktion der viralen *Load* um  $\sim 3,5$   $\log_{10}$ -Stufen nachgewiesen. Dieses Ergebnis scheint für die Hypothese des *gene-silencing* zu sprechen

### 3.2.5 Analyse der Anzahl viraler Genome nach durchflusszytometrischer Sortierung vitaler Zellen *in vivo*

Nach der erfolgreichen *in vitro* Etablierung folgten die *in vivo* Untersuchungen in infizierten LSECs. Da bereits gezeigt wurde, dass LSECs der latent infizierte Zelltyp der Leber, mit  $\sim 10$  Genomen pro Zelle, sind (Seckert et al., 2009), wurden diese für die *in vivo* Studien ausgewählt. Zunächst erfolgte die Charakterisierung der akuten und latenten Infektion der LSECs im Rahmen einer Kinetik. Auf der linken Seite der Abbildung 3.34 ist der Verlauf der Infektion, sowohl in LSECs als auch in der gesamten Leber, während der akuten Phase dargestellt. Für diesen Versuch wurden immunsupprimierte BALB/cJ Mäuse mit  $2 \times 10^5$  PFU mCMV- $\Delta$ ie2-DTR *i.pl.* infiziert und nach 2, 4, 6, 8 und 10 Tagen *p.i.* erfolgte die Entnahme der Lebern. Von drei Tieren pro Zeitpunkt wurden die LSECs aus den Lebern isoliert (siehe 2.2.3.6), von drei weiteren Tieren wurde die gesamte Leber zur Analyse verwendet. Aus den LSECs und der Gesamt-Leber wurden die viralen Genome mittels *gB*- und *pThrp*-spezifischer qPCR quantifiziert.

Die virale DNA-Load in der Leber und den LSECs stieg während der akuten Infektion bis Tag 10 *p.i.* kontinuierlich an (Abb. 2.34, linke Seite). Wie zu erwarten war die virale Load in der Gesamt-Leber höher als in den LSECs, da die Hepatozyten den Hauptort der akuten Infektion in der Leber repräsentieren. Zur Etablierung von Latenz wurde das unter Abbildung 3.4 beschriebene Infektionsmodell nach KMT verwendet. Analog zur akuten Phase wurde auch hier die Anzahl der viralen Genome in der Gesamt-Leber bzw. in LSECs quantifiziert. Im Vergleich zur akuten Infektion war während der Latenz, zu den Zeitpunkten 3, 4, 6 und 8 Monate *p.i.*, eine deutlich niedrigere virale DNA-Load detektierbar. Auf der rechten Seite von Abbildung 3.34 ist deutlich erkennbar, dass die Load der LSECs an den Monaten 3 und 4 geringer als in der Gesamt-Leber war: An den Monaten 6 und 8 befanden sich wie erwartet mehr Genome in den LSECs als in der Gesamt-Leber, da diese auch Zelltypen beinhaltet, die nicht-infiziert sind. Unter allen Zellen einer Leber betragen die LSECs ~20%.

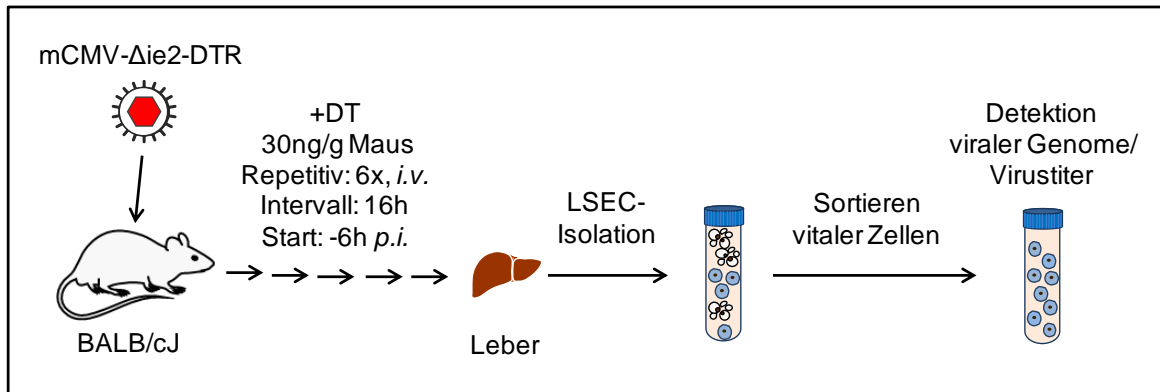


**Abb. 3.34: Kinetik der akuten und latenten mCMV-Infektion in der Leber und in LSECs**

Die Anzahl der viralen Genome in der Leber sowie in isolierten LSECs ist für die akute Infektion in einem Zeitraum von 2-10 Tagen *p.i.* und in der Latenz für die Zeitpunkte 3, 4, 6 und 8 Monate *p.i.* dargestellt. Für die Analyse der akuten Infektion wurden immunsupprimierte BALB/cJ Mäuse mit  $2 \times 10^5$  PFU mCMV- $\Delta$ ie2-DTR infiziert, die Latenz-Studien erfolgten im KMT-Modell (siehe Abb. 3.4). Jeder Punkt repräsentiert eine Maus, die schwarzen Balken stellen die Mediane dar.

In Abbildung 3.35 ist das Modell zur *in vivo* Untersuchung der zu Beginn aufgestellten Hypothese der Latenz-Etablierung dargestellt. Immunsupprimierte BALB/cJ Mäuse wurden mit mCMV- $\Delta$ ie2-DTR *i.v.* infiziert, anschließend erfolgte eine sechsmalige DT-Applikation von 30ng/g Maus DT *i.v.*, beginnend -6h *p.i.* in einem Intervall von 16h. Als Kontrollen wurden jeweils eine unbehandelte und eine, zu den angegebenen Zeitpunkten, mit PBS behandelte Gruppe verwendet. Die Entnahme der Lebern und Isolierung der LSECs fand 16h nach der letzten DT-Gabe statt. Den *in vitro* Analysen entsprechend erfolgte auch hier die positive Selektion der lebenden Zellen mittels FACS. Im Anschluss wurde eine

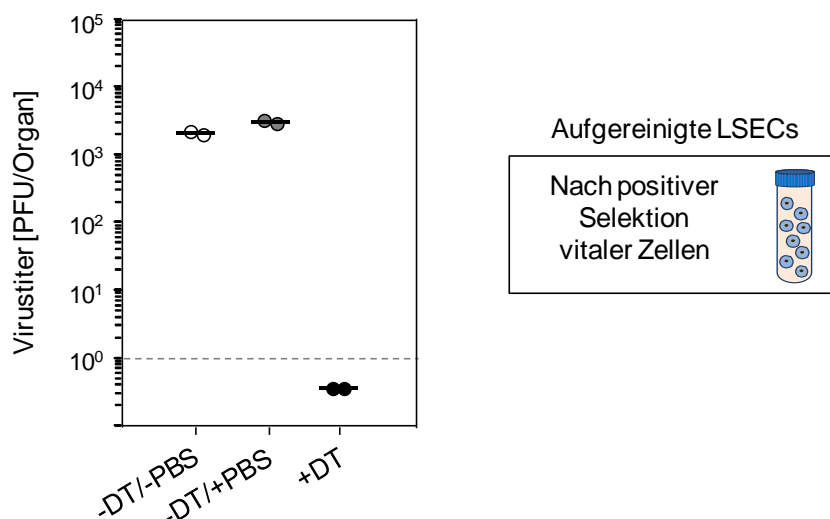
Virustiterbestimmung durchgeführt und die viralen Genome wurden mittels *gB*- und *pThrp*-spezifischer qPCR (2.2.5.3) quantifiziert.



**Abb. 3.35: Modell zur Analyse des Virustiters und der viralen Genome nach durchflusszytometrischer Sortierung der vitalen LSEC-Population**

Immunsupprimierte BALB/cJ Mäuse wurden mit  $1 \times 10^5$  PFU mCMV-Δie2-DTR *i.v.* infiziert. Die repetitive (6x, *i.v.*) DT-Applikation begann 6h vor der Infektion in einem Intervall von 16h und erfolgte mit einer Konzentration von 30ng/g Körpergewicht. Eine infizierte Kontrollgruppe wurde zu den gleichen Zeitpunkten mit PBS behandelt, eine weitere Gruppe blieb ohne Behandlung. 16h nach der letzten DT-Gabe wurde die Lebern entnommen und daraus die LSECs isoliert. Nach Sortierung der lebenden Zellen erfolgte die Analyse der Virustiter und der viralen Genome.

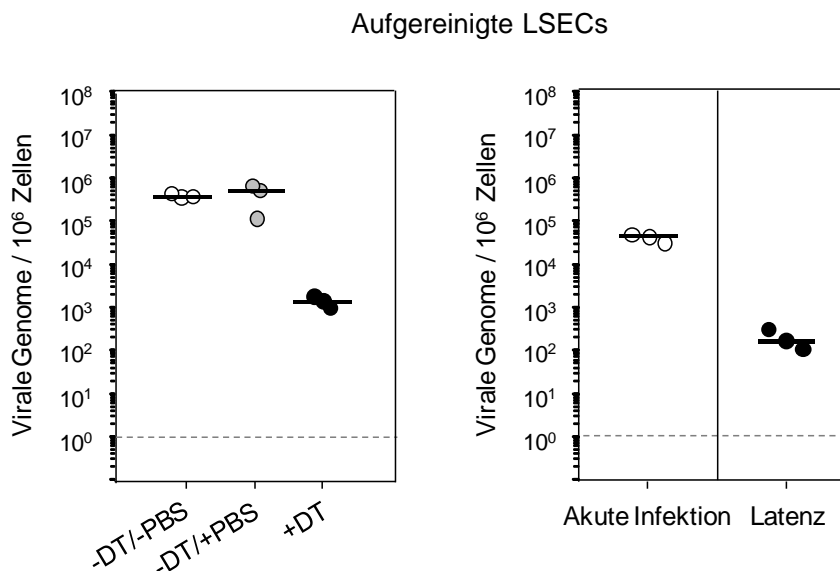
Für die Virustiterbestimmung wurden 50μl der sortierten, vitalen Zellen in einen Plaque-Assay eingesetzt. In Abbildung 3.36 sind die Ergebnisse der Virustiterbestimmung mCMV-Δie2-DTR-infizierter LSECs mit bzw. ohne DT-Behandlung dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass nach DT-Applikation kein infektiöses Virus mehr in den lebenden Zellen nachweisbar war. Unbehandelte, bzw. PBS-behandelte Zellen hingegen wiesen einen Titer von  $\sim 2 \times 10^4$  PFU auf.



**Abb. 3.36: Depletion mCMV-Δie2-DTR infizierter Zellen *in vivo* -Virustiter**

Aufgereinigte LSECs der DT-behandelten (6x, 30ng/g Körpergewicht) Gruppe sowie der beiden Kontrollgruppen (PBS, unbehandelt) wurden einer positiven Selektion der vitalen Zellpopulation unterzogen. 50μl der Zellsuspension wurden im Plaque-Assay analysiert. Die schwarzen Balken repräsentieren die Mediane.

Die Quantifizierung der viralen Genome mittels *gB*- und *pThrp*-spezifischer qPCR ist in Abbildung 3.37 gezeigt. Auf der linken Seite sind die Ergebnisse für die sortierten, lebenden Zellen mit und ohne DT-Behandlung zu sehen. Für beide Kontrollgruppen (ohne Behandlung; +PBS) war eine Anzahl von  $\sim 5 \times 10^6$  Genomen pro  $1 \times 10^6$  Zellen detektierbar, nach DT-Applikation erfolgte eine Reduktion der *Load* um  $\sim 2,5 \log_{10}$ -Stufen auf  $\sim 1 \times 10^3$  Genome.



**Abb. 3.37: Depletion mCMV- $\Delta$ ie2-DTR-infizierter Zellen *in vivo* –DNA-Load**

In der linken Spalte ist die Anzahl der viralen Genome/ $1 \times 10^6$  Zellen der DT-behandelten (6x, 30ng/g Körpergewicht) Gruppe und der PBS- bzw. unbehandelten Kontrollgruppe, nach LSEC-Isolierung und Sortierung der vitalen Zellen dargestellt (Infektionsmodell Abb. 3.35). Dem gegenüber ist in der rechten Spalte die Anzahl viraler Genome von akut und latent mit  $2 \times 10^5$  PFU mCMV- $\Delta$ ie2-DTR *i.p.l.* infizierten LSECs zu sehen (analog zu Abb. 3.34). Akute Infektion = Tag 6 *p.i.*; Latenz = Monat 4 *p.i.*. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus; die schwarzen Balken stellen die Mediane dar.

Vergleicht man nun diese Resultate mit LSEC-Analysen der akuten Infektion (Tag 6 *p.i.*) und der Latenz (4 Monate *p.i.*), die analog zu denen in Abb. 3.34 durchgeführt wurden, so sind gewisse Parallelen zu erkennen (Abb. 3.37, rechte Seite). Abgesehen von der etwas höheren *Load* im Falle der akuten Infektion auf der linken Seite der Abb. 3.37 ist in beiden Fällen eine Reduktion der Anzahl viraler Genome um  $\sim 2,5 \log_{10}$ -Stufen nachweisbar. Da nach DT-Behandlung noch eine hohe Anzahl viraler Genome detektierbar war, vergleichbar mit der Menge viraler Genome in LSECs während der Latenz nach KMT, muss man von der Gültigkeit der Hypothese des *gene-silencing* ausgehen. Im Falle des Modells der vorhergehenden IE-Expression wäre eine deutlich niedrigere *Load*, nahe oder unter der Nachweisgrenze zu erwarten gewesen.

Allgemein lässt sich beobachten, dass eine repetitive (6x, *i.v.*) DT-Applikation, mit einer Konzentration von 30ng/g Körpergewicht, von immunsupprimierten BALB/cJ Mäusen nach

Infektion mit mCMV- $\Delta$ ie2-DTR zur Verhinderung einer akuten Infektion und zur Latenz-Etablierung zu führen scheint.

Zusammenfassung: Im *in vivo* Modell führte eine repetitive (6x, *i.v.*) DT-Applikation, mit einer Konzentration von 30ng/g Körpergewicht, in der vitalen LSEC-Population immunsupprimierter BALB/cJ Mäuse, nach Infektion mit mCMV- $\Delta$ ie2-DTR, zur Verhinderung der akuten Infektion. Im Vergleich zu einer unbehandelten bzw. PBS-behandelten Kontrollgruppe ließ sich eine Reduktion der viralen *Load* um  $\sim 2,5 \log_{10}$ -Stufen nachweisen. Dabei war die *Load* der DT-Gruppe mit der Anzahl viraler Genome von LSECs während der Latenz vergleichbar.



## 4 Diskussion

Nach der Primärinfektion etabliert CMV, wie alle anderen Herpesviren, lebenslange Latenz in seinen Wirtszellen. In dieser Phase werden keine infektiösen Partikel gebildet und das Virus liegt in einem nicht-replikativen Zustand vor. Allerdings kann es zu Reaktivierungen kommen, die in immunsupprimierten Personen häufig zu lebensbedrohlichen Erkrankungen führen. Da die Mechanismen, die der Etablierung und Aufrechterhaltung der CMV-Latenz zugrundeliegen, erheblich zur Pathogenität des Virus beitragen, ist die Aufklärung dieser Mechanismen von besonderer Wichtigkeit.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass das virale Genom von mCMV während der Latenz nicht vollständig inaktiv vorliegt, sondern Episoden transienter, transkriptioneller Aktivität stattfinden. So wurden in latent infizierten Lungen, einem Hauptort der mCMV-Latenz, die Transkripte des MIE-Lokus *IE1* und *IE2* nachgewiesen (Kurz et al., 1999; Kurz & Reddehase, 1999; Grzimek et al., 2001). Auch für hCMV wurden bereits eine Reihe in der Latenz exprimierter Transkripte nachgewiesen (Übersicht: Slobedman et al., 2013). Der Beitrag dieser Transkripte zur Etablierung und Aufrechterhaltung der Latenz wird jedoch kontrovers diskutiert (Auswahl: White et al., 2000; Lunetta & Wiedeman, 2000; Cheung et al., 2006; Goodrum et al., 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte erstmals die transkriptionelle Aktivität der mCMV-Latenz *in vivo* in einer Kinetik über mehrere Monate anhand der Expression der Transkripte *IE1*, *IE3*, *E1*, *m164*, *M105* und *M86* verfolgt werden.

Während die Quantifizierung von Transkripten aus latent infizierten Geweben mittels hochsensitiver RT-qPCR möglich ist, konnte die virale Proteinexpression während der Latenz bisher nicht direkt nachgewiesen werden. Hinweise darauf wurden allerdings kürzlich von unserer Arbeitsgruppe erbracht. Da die virale Proteinmenge während der Latenz unter dem Detektionslimit des *WesternBlots* liegt, wurde der Nachweis über die Expression eines funktionalen DTR geführt, dessen Gensequenz anstelle des *ie2*-Gens im CMV-Genom insertiert war. Die DT-Applikation führte nach Expression des DTR auf der Zelloberfläche latent infizierter Zellen zu einer deutlich reduzierten Anzahl latenter viraler Genome (Scheller, 2011). Weitere Hinweise ergaben sich aus der Verbindung zwischen der Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort und der transkriptionellen Aktivität während der Latenz (Simon et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde neben den Transkript-Expressionsanalysen zeitgleich die immunologische Charakterisierung von immunodominanten, Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen (*IE1*, *m164* und *M105*) vorgenommen. Dies sollte es ermöglichen, eine eventuelle Verbindung der molekularen Latenz zur immunologischen Kontrolle zu erkennen. Eine umfangreiche Charakterisierung einzelner Subpopulationen der Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-

Zellen sollte genauere Erkenntnisse über die Vorgänge der ‚*memory inflation*‘-Entstehung liefern.

Eine weitere Fragestellung bezog sich auf die Etablierung der Latenz und ob hierfür IE-Genexpression notwendig ist. Dies wurde mit Hilfe des oben erwähnten DTR-Modells der konditionalen Zell-Depletion untersucht.

Bis jetzt ist sehr wenig zur Etablierung der CMV-Latenz bekannt, es existieren jedoch Arbeiten, die drauf schließen lassen, dass die Latenz-Etablierung vermutlich zu sehr frühen Zeitpunkten nach Infektion stattfindet (Marks & Spector, 1984; Mohr et al., 2010).

#### 4.1 Während der Latenz findet Transkriptexpression auf geringem Level statt

Dass das latente herpesvirale Genom nicht in einem komplett inaktiven Zustand in seiner Wirtszelle verweilt, sondern Phasen der transkriptionellen Aktivität existieren, konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden. Die zugehörigen Transkripte werden „Latenz assoziierte Transkripte“-LATs und speziell für CMV „CMV Latenz assoziierte Transkripte“-CLTs genannt. Für die LATs von HSV-1 und die Genprodukte der ORFs 4 und 63 von VZV wurde eine wichtige Rolle bei der Latenz-Etablierung postuliert (Sawtell et al., 1992; Cohen et al., 2004; 2005). Des Weiteren erfolgt die Expression der Transkripte *LMP-1/-2* und *EBER-1/-2* von EBV exklusiv in der Latenz (Robertson, 2010). Damit stellen diese Transkripte echte, Latenz-spezifische Transkripte dar. Im Gegensatz dazu wird die Latenz-Spezifität aller bisher bekannten CLTs für CMV, wie bereits erwähnt, kontrovers diskutiert oder ist bereits widerlegt worden. Deshalb ist der Begriff TELs-*‘transcripts expressed in latency’* zu bevorzugen, da er eine Expression der TELs in der akuten Phase der Infektion nicht ausschließt und lediglich auf eine nachweisbare Expression während der Latenz hinweist (Seckert et al., 2012).

Bisher wurden folgende TELs für hCMV publiziert: Transkripte des ORF LUNA, antiparallel zur UL81-82 Region (Bego et al., 2005), Transkripte der Genregion US28 (Beisser et al., 2001) und UL111.5A. Dabei ist für UL111.5A ein differierendes *splicing* in produktiver und latenter Infektion bekannt (Kotenko et al., 2000; Jenkins et al., 2004). Weitere TELs stellen einige *sense* und *antisense* Transkripte der MIE-Region (Kondo et al., 1994; 1996) und die Transkripte der Genregion UL138 dar. Die Beteiligung von UL138 an der Latenz-Etablierung ist gegenwärtig heftig umstritten (*pro*: Goodrum et al., 2007; *contra*: Kondo et al., 1994; Hahn et al., 1998; White et al., 2000; Cheung et al., 2006).

Cheung et al. (2006) demonstrierten mittels *microarray*-Technologie die Anwesenheit von 37 verschiedenen Transkripten in infizierten myeloiden Progenitorzellen. Da gezeigt wurde, dass Latenz in diesen Zellen nach 14 Tagen erfolgreich etabliert ist (Slobedman & Mocarski, 1999), fokussierte sich die *in vitro* Studie mit Analysezeitpunkten von 1, 2, 3, 5, und 11 Tagen *p.i.* auf sehr frühe Zeitpunkte, zu denen vermutlich die Etablierung der Latenz erfolgt.

Die Arbeitsgruppe vermutet, dass das Vorhandensein eines gewissen Transkript-Musters die Latenz-Etablierung erst ermöglicht.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde nun erstmals eine longitudinale *in vivo* Studie zur transkriptionellen Aktivität während der mCMV-Latenz durchgeführt. Dazu wurden die Kinetiken einiger ausgewählter Transkripte in der Lunge verfolgt. Frühere Arbeiten unserer Gruppe identifizierten die Lunge als einen Hauptort der mCMV-Pathogenese (Reddehase et al., 1985). Zusätzlich war die Zahl der latenten viralen Genome nach überstandener produktiver Infektion in diesem Organ besonders hoch (Balthesen et al., 1993). Weiterführende Arbeiten demonstrierten, dass die produktive Infektion in der Lunge nach 3-4 Monaten vollständig terminiert ist und die latenten viralen Genome annähernd gleichmäßig verteilt in der Lunge vorliegen (Kurz et al., 1999).

Ebenso wie in den oben beschriebenen Arbeiten wurde auch in der Vorliegenden das Latenzmodell der mCMV-Infektion nach Immunsuppression durch hämatoablative  $\gamma$ -Bestrahlung und syngener, experimenteller KMT in BALB/cJ Mäusen verwendet. In diesem Modell konnte gezeigt werden, dass bereits 14 Wochen nach KMT kein infektiöses Virus mehr nachweisbar war und demzufolge ab diesem Zeitpunkt Latenz etabliert war (Abb. 3.5). Die Analyse von Transkript-Expressionsmustern erfolgte mittels spezifischer RT-qPCR zu den Zeitpunkten 4, 6 und 8 Monate nach Infektion. Als Material diente PolyA<sup>+</sup> RNA von insgesamt acht Lungenstücken des superioren, medialen und inferioren Lobus der rechten Lungenhälfte, sowie des post-cavalen Lobus (PCL). Für die Transkriptanalyse wurden Vertreter aller drei kinetischen Klassen ausgewählt. Die Transkripte *IE1* und *IE3* repräsentierten die IE-Phase; *E1*, *m164* und *M105* die E-Phase und *M86* die L-Phase. Frühere Studien unserer Gruppe beschrieben die stochastische Expression der Transkripte *IE1* und *IE2* in der Lunge (Kurz et al., 1999; Kurz & Reddehase 1999; Grzimek et al., 2001). Das *IE1* Protein fungiert als Ko-Transaktivator der E-Phase Genexpression (Messerle et al., 1992), es spielt allerdings keine Rolle bei der Etablierung oder Aufrechterhaltung der Latenz (Busche et al., 2009). Auch *IE2*, dessen genaue Funktion noch nicht aufgeklärt wurde, ist nicht an der Latenz-Etablierung oder Replikation beteiligt (Cardin et al., 1995). *IE3*, das murine Homolog zu *IE2* bei hCMV, fungiert als Schlüssel-Transaktivator der E-Phase Genexpression und ist essentiell für eine erfolgreiche virale Replikation (Messerle et al., 1992; Angulo et al., 2000). Interessanterweise konnten in den bisherigen Studien niemals *IE3*-Transkripte in der latent infizierten Lunge nach KMT und mCMV-WT-Infektion detektiert werden. In aufgereinigten LSECs, dem latent infizierten Zelltyp der Leber war es möglich *IE3* Transkripte während der Latenz nach KMT und mCMV-WT-Infektion zu detektieren (Seckert et al., 2009). Auch nach Infektion mit einer *IE1*-Epitopmutanten (Simon et al., 2006) und nach mCMV-WT-Infektion mit zusätzlicher TNF- $\alpha$ -Vorbehandlung (Simon et al., 2005) waren *IE3*-Transkripte nachweisbar. Dies lässt vermuten, dass die in der hier vorliegenden Arbeit

untersuchten Tiere möglicherweise durch zusätzliche Infektionen, bedingt durch die Haltungsbedingungen einen erhöhten TNF- $\alpha$ -Level aufwiesen. Da *IE1* und *IE3* durch alternatives *splicing* aus ihrem Vorläufer-Transkript *IE1/3* entstehen wurde vermutet, dass dieses *splicing* einen molekularen Kontrollpunkt zur Aufrechterhaltung der Latenz repräsentiert.

Für das ebenfalls in die Analyse eingeschlossene Transkript *E1* wurden bisher vier verschiedene Isoformen beschrieben (Bühler et al., 1990; Ciocco-Schmitt et al., 2002). Damit führt ein differenzielles *splicing* des *E1* Vorläufer-Transkripts zur Entstehung von vier bisher bekannten Proteinen (Übersicht: Brune et al., 2013). In diesem Zusammenhang muss darauf hingewiesen werden, dass durchaus mehr *splice*-Varianten der mCMV-Transkripte existieren könnten als bisher bekannt. Aufgrund der getroffenen *Primer*-Wahl in dieser Arbeit kann nur eine Aussage über jene Transkripte getätigt werden, welche homolog zu den jeweils amplifizierten Bereichen sind. Im Fall des *E1*-Transkripts binden die *Primer* über die Intron-Exon-Grenzen der Exons 1 und 2 bzw. der Exons 3 und 2. Die Angabe dieser Informationen (siehe 2.1.8.1) ist für die Evaluierung der Ergebnisse unter Berücksichtigung zukünftiger Erkenntnisse über *splice*-Varianten essentiell. Obwohl die *E1*-Proteine bereits seit geraumer Zeit beschrieben sind, ist wenig über ihre Funktion bekannt. Sie scheinen die Expression von Genen, die an der DNA-Replikation beteiligt sind, zu verstärken (Iskenderian et al., 1996; Kerry et al., 1996). Außerdem wurde postuliert, dass *E1*-Proteine dsDNA und ssDNA binden sowie an den Orten der Replikation akkumulieren (Iwayama et al., 1994). Tang et al. (2005) beschrieben die Fähigkeit des großen *E1*-Proteins mit *IE3* zu interagieren und damit die Auto-Repression des *ie1/3*-Promotors zu unterbinden.

Desweiteren wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression des Transkripts *M105* analysiert. Das zugehörige Protein stellt eine Untereinheit des herpesviralen Helikase-Primase-Komplexes dar (Martignetti & Barrell, 1991; Rawlinson et al., 1996) und ist ein struktureller Bestandteil des Virions (Varnum et al., 2004). Außerdem wurde die Expression des Transkripts *m164* untersucht. Der ORF *m164* kodiert für ein Glykoprotein (Rawlinson et al., 1996; Däubner et al., 2010) und beinhaltet ebenso wie *M105* ein immunodominantes antigenes Peptid (Holtappels et al., 2002). Zusätzlich erfolgte die Analyse des L-Phase Transkripts *M86*. Es kodiert für das '*major capsid protein*'; das Hauptprotein des viralen Capsids (Übersicht: Caposio et al., 2013).

Alle ausgewählten *IE*-, *E*- und *L*-Transkripte konnten in der vorliegenden Arbeit zu jedem Zeitpunkt der Latenz detektiert werden. Im Mittel wurde für jedes untersuchte Lungenstück, das positiv für Transkripte war, eine Anzahl von  $\sim 100$  Transkripten pro  $2 \times 10^7$  zellulären  $\beta$ -*Actin* Transkripten quantifiziert. Allerdings schwankten die Werte in einem Bereich von 10-1000 Transkripten.

Voraussetzung für eine solche Analyse ist die Vergleichbarkeit der Sensitivitäten und Effizienzen der jeweiligen Transkript-spezifischen RT-qPCRs. Die detektierten Transkripte wurden anhand spezifischer *in vitro*-Transkriptstandards absolut quantifiziert. Um eine Vergleichbarkeit der Amplifikationseffizienzen (E) der einzelnen Standards zu gewährleisten durfte  $\Delta E$  nicht mehr als 5% betragen. Diese Forderung wurde mit einem Wert von 4% sehr gut erfüllt. Die Bestimmung der Sensitivitätsgrenzen der spezifischen RT-qPCRs erfolgte mittels *limiting dilution* Versuchen und ermöglichte die Berechnung der Detektionsgrenzen. Diese lagen in Bereichen von 5-13 Kopien. Die in der vorliegenden Arbeit erfolgten Analysen lagen demzufolge nahe am Detektionslimit. In Bezug auf Viruslatenz-Versuche stellen die geringen Mengen nachweisbaren Materials das größte Problem dar und erschweren das Unterscheiden von technischen und biologischen Schwankungen (Bengtsson et al., 2008).

#### **4.2 Die Transkriptexpression sinkt mit voranschreitender Zeit während der Latenz und ist stochastischer Natur**

In der hier vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal eine mit der Zeit voranschreitende Abnahme der Transkriptmengen während der Latenz *in vivo* nachgewiesen werden. Die Generierung eines binären Transkriptmusters ermöglichte eine bessere Übersicht dieser Beobachtung. Das entstandene Muster zeigte die stochastische Verteilung der Transkriptexpression, welche in der Latenz im Gegensatz zur produktiven Infektion oder infolge einer Reaktivierung nicht der klassischen IE-E-L-Kinetik folgt.

Insgesamt waren in den hier gezeigten Versuchen 37 von 40 getesteten Lungenstücken an Monat 4 positiv für das *IE1* Transkript. Mit voranschreitender Zeit konnte eine Reduktion der positiven Stücke auf 27 an Monat 6 und 22 an Monat 8 beobachtet werden. Ein stärkerer Rückgang wurde für die Transkripte *IE3*, *E1* und *m164* analysiert: *IE3*: 27-18-8, *E1*: 34-6-2, *m164*: 36-10-4 positive Stücke an den Monaten 4-6-8. Die Transkripte *M105* und *M86* waren weniger stark vertreten: *M105*: 12-2-1, *M86*: 10-2-2 positive Stücke an den Monaten 4-6-8.

Da die Transkriptexpression auch von der Zahl der latenten viralen Genome abhängig sein kann, war es wichtig, diese parallel zur Transkriptmenge zu bestimmen. Die *Load* wurde pro Monat aus zwei Lungenstücken von insgesamt fünf Mäusen quantifiziert, wobei in Monat 4 im Mittel 5.000 Genome, in Monat 6: 2.000 und in Monat 8: 1.500 Genome pro  $1 \times 10^6$  Zellen vorhanden waren. Zwischen Monat 4 und 6 war eine signifikante Abnahme der viralen *Load* zu beobachten, die möglicherweise den Rückgang der Transkriptexpression beeinflusste. Die Abnahme der *Load* zwischen Monat 6 und 8 war allerdings nicht signifikant und somit der Rückgang der Transkriptexpression auch nicht durch die *Load* bedingt. Generell sprach auch eine Betrachtung auf Einzeltier-Ebene eindeutig gegen eine Korrelation von Transkriptmengen und viraler *Load*.

In Verbindung mit früheren Arbeiten unserer Gruppe ist die in der vorliegenden Arbeit gemessene virale *Load* mit Werten von 1.000-6.000 Genomen pro  $1 \times 10^6$  Zellen durchaus vergleichbar. So beschrieben Grzimek et al. (2001) unter Verwendung des gleichen Infektionsmodells eine *Load* von 3.000-6.000 Genomen zu einem Zeitpunkt von 10 Monaten nach Infektion. Eine etwas höhere Anzahl viraler Genome von  $\sim 10.000$  pro  $1 \times 10^6$  Zellen wurde von Simon et al. (2006) 12 Monate *p.i.* quantifiziert. Trotz der etwas geringeren Anzahl an viralen Genomen konnte in der vorliegenden Arbeit eine Expressionsaktivität für alle untersuchten Transkripte nachgewiesen werden. Diese war sogar höher als in der bisher existierenden Literatur. So waren in der Publikation von Grzimek et al. (2001) 10 Monate *p.i.* von insgesamt 80 getesteten Lungentücken 43 positiv für *IE1*; *IE3* konnte nicht quantifiziert werden. In der Studie von Simon und Kollegen waren 12 Monate *p.i.* lediglich 14 von 80 Lungenstücken *IE1* positiv. Verwendeten sie eine *IE1*-Epitop-Mutante wurde die Transkriptexpression gesteigert, was den Nachweis von 51 *IE1*-positiven Stücken bei insgesamt 80 getesteten Lungentücken ermöglichte. Zusätzlich wurden auch *IE3*-positive Stücke (7/80) und ein einzelnes *M55*-positives Lungenstück quantifiziert. Die *Load* von WT und Mutante waren vergleichbar. So scheint die virale DNA-*Load* also nicht alleine für das Ausmaß an Transkriptexpression verantwortlich zu sein. Die Expressionsunterschiede zwischen der hier vorliegenden Arbeit und den früheren Publikationen könnten auf Schwankungen zwischen den einzelnen *in vivo*-Experimenten und den Unterschieden bezüglich der Analysetechniken und Auswertzeitpunkten beruhen.

Die Hypothese einer stochastischen Transkriptexpression, welche mit voranschreitender Zeit abnimmt, wird durch hCMV *in vitro*-Studien von Cheung et al. (2006) gestützt. Sie beschreiben die Analyse von 37 Transkripten in myeloiden Progenitorzellen während der Latenz-Etablierungsphase zu den Zeitpunkten 1-11 Tage nach Infektion. Auch hier war ein Rückgang der Transkription zu beobachten: an Tag 1 konnten 25 verschiedene Transkripte quantifiziert werden, an Tag 11 waren es nur noch 7 verschiedene. Die virale DNA-*Load* hingegen blieb über den gesamten Zeitraum konstant.

Aus dem binären Muster der transkriptionellen Aktivität wurde mit Hilfe der Poisson-Verteilungsfunktion eine statistische Abschätzung der transkriptionellen Ereignisse in den latent infizierten Lungenstücken durchgeführt. Diese Abschätzung erfolgte bereits retrospektiv anhand der Daten von Kurz et al. (1999) publiziert in Seckert et al. (2013): Basierend auf einer Anzahl von 500.000 Genomen pro Lunge und einer Kopienzahl von  $\sim 10$  Genomen pro latent infizierter Zelle ergab sich für *IE1* mit  $\sim 10$  transkriptionellen Ereignissen in einer berechneten Durchschnitts-Lunge, dass 1 von 5.000 latent infizierten Zellen *IE1* exprimiert. Dies entspricht 0,02% aller latent infizierten Zellen einer Lunge.

In der vorliegenden Arbeit wurden aufgrund der stärkeren Transkriptexpression und niedrigeren *Load* dementsprechend höhere Werte berechnet. Basierend auf der Zahl von

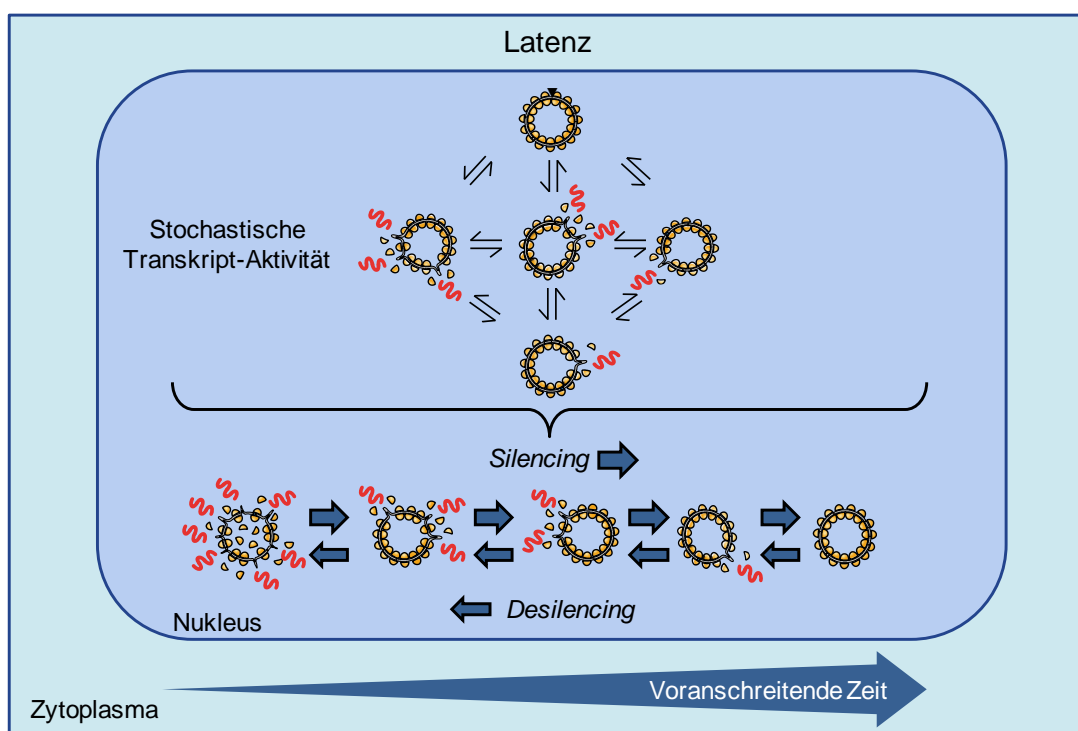
60.000-480.000 Genomen pro Lunge und einer Kopienzahl von ~10 Genomen pro latent infizierter Zelle ergab sich für *IE1* mit ~40 transkriptionellen Ereignissen in einer berechneten Durchschnitts-Lunge im Monat 4 *p.i.*, dass 1 von ~150-1.200 latent infizierten Zellen *IE1* exprimiert. Dies entspricht ~0,67-0,08% aller latent infizierten Zellen einer Lunge.

Es handelt sich also um sehr selten auftretende Ereignisse, wobei *IE1* noch eines der am Häufigsten exprimierten Transkripte war. Dies lässt den Schluss zu, dass die Transkriptexpression während der Latenz möglicherweise *'transcriptional noise'* repräsentiert. Dieses Phänomen wurde für Eukaryonten bereits beschrieben (Blake et al., 2003; Kaern et al., 2005) und scheint auch für das latente mCMV-Genom zu gelten. Verursacht durch seine Dynamik liegt das als transkriptionell inaktiv bekannte Heterochromatin vermutlich nie vollständig geschlossen vor.

Die transkriptionelle Aktivität wird durch Chromatin-Modifikationen beeinflusst. Für mCMV wurden in der Latenz Acetylierungen und Methylierungen, typisch für inaktives Heterochromatin, sowie die Rekrutierung der Repressor-Proteine HDAC, Daxx und HP-1 nachgewiesen (Liu et al., 2008; 2010). Heterochromatin ist keine statische Struktur; es sollte im Gegenteil eher als dynamisch angesehen werden. Diese Dynamik wurde auch für das CMV-Genom beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass zu frühen Zeitpunkten nach Infektion Histon-Modifikationen an den IE-Promotoren vorliegen, die charakteristisch für transkriptionell aktives Chromatin sind, während die L-Promotoren Modifikationen eines inaktiven Heterochromatins aufweisen. Diese Verhältnisse wechseln mit fortschreitender Infektion und ermöglichen so die Transkription der L-Gene (Reeves et al., 2006; Cuevas-Bennett & Shenk, 2008; Groves et al., 2009).

Aufgrund der dynamischen Natur des inaktiven Heterochromatins und der, in der vorliegenden Arbeit, erhobenen Daten postulieren wir folgende Hypothese: die Transkriptexpression während der Latenz ist stochastischer Natur und es existieren Episoden des *desilencing* und *silencing* einzelner Genom-Loci. Dabei wird die transkriptionelle Aktivität mit voranschreitender Zeit während der Latenz immer weiter reduziert (siehe Abb. 4.1). Es ist davon auszugehen, dass die Transkripte aller ~180 ORFs exprimiert werden können und somit theoretisch  $2^{180}$  verschiedene binäre Muster denkbar sind. Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Transkripte wären mit  $n=6$  also 32 verschiedene Muster möglich. Lässt man das Transkript *IE3* wegen seiner Kopplung an *IE1* einmal außen vor, sind mit  $n=5$  noch 32 verschiedene Muster möglich. Bei einem Probenumfang von insgesamt 120 analysierten Lungenstücken konnten 13 von 32 möglichen Expressionsmustern nachgewiesen werden. Da die Enhancer bedingte Dominanz von *IE1* die Zahl der Muster einengt, wurde gezählt wieviele der 16 möglichen Muster für die Transkripte *E1*, *m164*, *M105* und *M86* vorkamen. Von diesen 16 Expressionsmustern wurden 11 realisiert.

Die vermehrte Expression der IE-Transkripte im Vergleich zu den anderen Transkripten lässt sich durch den starken *enhancer* des MIEP erklären. Es ist sehr wahrscheinlich, dass solche starken Promotoren den Modifikationen zugunsten eines inaktiven Heterochromatins länger widerstehen können als schwächere Promotoren. Der *enhancer* des MIEP besitzt eine ganze Reihe von *cis*-regulatorischen Elementen mit Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, welche den Promotor und damit die Expression der zugehörigen Gene verstärken (Boshart et al., 1985; Dorsch-Häsler et al., 1985; Stinski & Isomura, 2008). Unsere eigene Arbeitsgruppe publizierte bereits Analysen zur Promotorstärke von  $P^{IE1/3}$  und  $P^{IE2}$  (Grzimek et al., 2001; Simon et al., 2006). Die Analyse der übrigen Promotoren zu den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Transkripten steht noch aus.



**Abb.4.1:** Hypothese der stochastischen Transkriptexpression, welche mit voranschreitender Zeit immer weiter reduziert wird.

#### 4.3 Die stochastische Natur der Transkriptexpression ist nicht durch die Stabilität der Transkripte bedingt

Es bestand die Möglichkeit, dass unterschiedliche Stabilitäten der einzelnen Transkripte die quantifizierten Expressionsmuster beeinflussen. Aus diesem Grund wurden die Halbwertszeiten für *IE1*, *IE3*, *E1*, *m164*, *M105* und *M86* bestimmt.

Zunächst wurde die Transkriptexpression zu frühen Zeitpunkten nach mCMV-WT-BAC-Infektion (MOI=4) zur Bestimmung der *in vitro* Transkript-Plateaus analysiert. Die Transkripte *IE1* und *IE3* erreichten bereits nach 60min *p.i.* ihr Plateau, die E- und L-Transkripte *E1*, *M105*



und *M86* nach 90min *p.i.*. Nur das Transkript *m164* erreichte erst 120min *p.i.* sein Plateau. Warum ein E-Transkript, ohne bisher bekannte *splice*-Varianten, längere Zeit benötigt sein Transkript-Plateau zu erreichen als ein L-Transkript, könnte damit erklärt werden, dass die mRNA Prozessierung und das *splicing* für verschiedene Transkripte unterschiedlich reguliert werden.

Neuere Analysen bestätigen die hier beobachtete frühe Initiation der Genexpression von Vertretern aller kinetischer Klassen. Marcinowski et al. (2012) beschrieben einen Anstieg aller untersuchten mCMV-spezifischen Transkripte während der ersten Stunden nach Infektion; der Höchstwert war bereits nach 1-2h *p.i.* erreicht. Nach 5-6h beobachteten sie einen Rückgang der neu synthetisierten RNA, wobei für die L-Transkripte mit dem Start der DNA-Replikation ein erneuter Anstieg ihrer Syntheseraten einsetzte. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass nach CMV-Infektion auch zelluläre Transkriptionsfaktoren vermehrt exprimiert werden. So scheint das Virus durch bisher unbekannte Mechanismen die Expression der Transkriptionsfaktoren zu regulieren und damit die eigene virale Transkription zu initiieren.

Die Halbwertszeit von RNA kann durch Blockieren der Transkription mittels Inhibitoren, wie Actinomycin D (Act-D) und der Detektion des anschließenden RNA-Zerfalls über die Zeit ermittelt werden. Die mittlere Halbwertszeit von Transkripten prokaryontischer Zellen beträgt 20-30min (Bernstein et al., 2002), wohingegen für eukaryontische Zellen im Durchschnitt eine Zeit von 10h für den Abbau von 50% der mRNA beschrieben wird (Yang et al., 2003). Es wird angenommen, dass die spezifische Stabilität einer mRNA mit ihrer physiologischen Funktion in Verbindung steht. Die Zerfallsraten von *housekeeping* Genen sind sehr niedrig, während die von regulatorischen Genen vergleichsweise sehr viel höher sind (Yang et al., 2003; Raghavan & Bohjanen, 2004; Tani et al., 2012). Analog dazu konnten Dölken et al. (2008) Raten von 1-2% neusynthetisierter mRNA für *housekeeping* Gene und von >95% für regulatorische Gene nachweisen.

Die Untersuchung der Halbwertszeiten der viralen Transkripte ergab Werte von 4h für *IE1*, 2h für *E1*, 3h für *m164* und *M105*; nur *M86* war mit 6h geringfügig stabiler. Diese Transkripte wiesen alle eine mit dem *housekeeping* Gen  *$\beta$ -actin* vergleichbare Stabilität auf. Eine Ausnahme bildete das Transkript *IE3*, das mit einer deutlich niedrigeren Halbwertszeit von 0,48h eher mit regulatorischen Genen vergleichbar ist. Diese niedrige Halbwertszeit war bezüglich seiner Funktion als Schlüssel-Transaktivator der E-Phase-Genexpression zu erwarten (Messerle et al., 1992; Angulo et al., 2000).

In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass die Art und Weise der Auswertung eine große Rolle bei der Bestimmung der Halbwertszeiten spielt. So wurden in dieser Arbeit analog zu Tani et al. (2012) nur jene Werte in die Berechnung einbezogen, die einen Rückgang der mRNA zeigten. Gerade zu späteren Zeitpunkten mussten Werte aus der

Kalkulation ausgeschlossen werden. Aufgrund von unterschiedlichen Auswertungsmethoden wurde in der vorliegenden Arbeit eine sehr viel niedrigere Halbwertszeit für *IE1* quantifiziert als in einer früheren Studie unserer Gruppe (Simon et al., 2007).

Die gemessenen mRNA Levels setzen sich aus Neusynthese und Degradierung der mRNA zusammen. Der genaue Prozess des mRNA-Zerfalls ist noch nicht verstanden. Bekannt ist, dass zunächst das PolyA<sup>+</sup>-Ende und die 5'CAP-Struktur durch Ribonukleasen entfernt werden und anschließend 3'-5'- sowie 5'-3'-Exonukleasen für den Abbau der mRNA sorgen. Eingeleitet wird der gesamte Prozess wahrscheinlich von RNA-Bindeproteinen, welche über *cis*-Elemente der mRNA interagieren (Übersicht: Raghavan & Bohjanen, 2004). Gaglia und Glaunsinger (2010) postulierten, dass RNA-Viren Mechanismen entwickelt haben, um der RNA-Degradierung durch die Wirtszelle zu entgehen und eine vermehrte virale Replikation und Genexpression zu begünstigen. Es wäre ein interessanter Forschungsansatz herauszufinden, ob auch CMV solche Mechanismen zur Begünstigung der viralen Replikation und Transkription besitzt.

Da sowohl die Neusynthese von Transkripten als auch der mRNA-Zerfall eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression spielen, ist es wichtig, zwischen beiden unterscheiden zu können. Dölken et al. (2008) entwickelten eine neue Methode, die ein *screenen* neusynthetisierter mRNA mittels thiolierter Nukleosiden (4-Thiouridin(4sU)) erlaubt. Nach Thiol-spezifischer Biotinylierung kann die Gesamt-mRNA durch magnetische Separation in neue, markierte und bereits existierende, unmarkierte mRNA getrennt und quantifiziert werden. Tani et al. (2012) beschrieben eine ähnliche Methode, bei der die Inkorporation von 5-Bromuridin in die mRNA erfolgt und der anschließende RNA-Zerfall mittels *deep sequencing* quantifiziert wird. Im Gegensatz zu den alten, auf Inhibitoren basierenden Methoden wird die Transkription hier nicht blockiert. Es muss bedacht werden, dass der Act-D-vermittelte Arrest der Transkription Stressreaktionen in der Zelle induziert, wodurch individuelle Transkripte erheblich stabilisiert werden können (Bhattacharyya et al., 2006). Daher sollte eine Analyse der Transkriptstabilität unter Verwendung einer der neuen Methoden durchgeführt werden, um die in der vorliegenden Arbeit evaluierten Daten bestmöglich zu bestätigen.

Die Veröffentlichung von Marcinowski et al. (2012) dokumentiert, unter Verwendung der 4sU-Methode, die Syntheseraten der Transkripte *IE1*, *m169*, *m152*, *m129/131* und *M94* zu frühen Zeitpunkten nach Infektion. Weitere Transkriptanalysen werden vermutlich in Kürze folgen und dabei helfen, einen tieferen Einblick in die komplexe transkriptionelle Aktivität des CMV-Genoms zu bekommen. Diese Analysen tragen möglicherweise zur Aufklärung der Mechanismen bei, die der Latenz-Etablierung zugrundeliegen.

#### 4.4 Die Verbindung von molekularer Latenz zur *memory inflation*

Nach der CMV-Infektion werden naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch die Interaktion ihres T-Zell-Rezeptors mit Peptid-MHC-I Präsentationskomplexen aktiviert. Nach ihrer Expansion tragen die spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen erheblich zur Beendigung der Infektion bei. Diese Aktivierung, auch *priming* genannt, wird nach bisherigen Erkenntnissen vorrangig durch *cross*-präsentierende Zellen vermittelt (Joffre et al., 2012), welche virale Antigene aus der Umgebung aufnehmen und präsentieren (Shen & Rock, 2006; Kurts et al., 2010). Eine Arbeit von Snyder und Kollegen (2010) lieferte einen direkten Nachweis für die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch *cross*-Präsentation *in vivo*. MHC-I defiziente MEFs (K<sup>b</sup> D<sup>b</sup> -/-) wurden mit einer Rekombinanten mCMV-ΔgI, die nur eine Infektionsrunde zulässt, infiziert und C57BL/6 Mäusen injiziert. Dadurch kann es ausschließlich zu einer CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort kommen, wenn endogene Zellen virales Antigen über MHC-I *cross*-präsentieren.

Allerdings herrscht weiterhin eine kontroverse Diskussion bezüglich der Beteiligung von direkter und *cross*-Präsentation an der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung. Unveröffentlichte Daten unserer eigenen Gruppe weisen darauf hin, dass in Mäusen, die nicht zur *cross*-Präsentation befähigt sind, die direkte Präsentation zur CD8<sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung ausreicht. Ong et al. (2013) berichten ebenso von einer CD8<sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung durch direkte Präsentation nach Blockieren der *cross*-Präsentation durch CpG-Behandlung.

In der Literatur wird die T-Zell-Antwort in 4 Phasen unterteilt: Aktivierung, Expansion, Kontraktion und *memory*. In Folge eines primären antigenen Kontaktes kommt es zur Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Diese expandieren zunächst, allerdings gehen 90-95% der Zellen während der Kontraktionsphase in Apoptose. Letztlich bleibt eine geringe Menge langlebiger *memory*-Zellen zurück (Kaech et al., 2002). Die Besonderheit der CMV-Infektion liegt allerdings darin, dass für gewisse Epitope spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der *memory*-Phase expandieren. Dieses Phänomen wird *memory-inflation* genannt (Holtappels et al., 2000; Karrer et al., 2003; Munks et al., 2006). Wir vermuten, dass die *memory-inflation* eine wiederholte Stimulation der T-Zell-Antwort reflektiert; ausgelöst durch die transkriptionelle Aktivität des latent vorliegenden Genoms. Damit bestünde eine direkte Verbindung zwischen molekularer Latenz und *memory inflation*.

Es gibt Hinweise darauf, dass die *memory inflation* auf direkter Antigenpräsentation beruht. Seckert et al. (2011) berichteten von einem Ausbleiben einer IE1-spezifischen *memory inflation* in einem *in vivo* Modell, in welchem die Präsentation des L<sup>d</sup> restringierten IE1-Epitops exklusiv durch profAPCs möglich war. Auch Arbeiten von Torti et al. (2011a, b) lieferten Hinweise auf die Notwendigkeit der direkten Antigen-Präsentation. Es ist davon auszugehen, dass die stochastischen Transkriptionsereignisse infizierter stromaler Zellen während der Latenz zur Peptid-Präsentation führen. Diese Peptide würden daraufhin von patrouillierenden CD8<sup>+</sup> *memory* T-Zellen erkannt werden. Einen ersten Hinweis auf den

direkten Zusammenhang zwischen molekularer Latenz und `memory inflation` lieferten Versuche, die zeigten, dass die Effektor-Funktionen der IE1-Peptid-spezifischen T-Zellen die *IE1*-Transkription während der Latenz kontrollieren (Simon et al., 2006). So zeigte die Infektion mit einer mCMV-IE1-Peptid-Mutante, durch das Ausbleiben der spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Kontrolle, eine deutlich erhöhte *IE1*-spezifische Transkriptmenge während der Latenz.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Epitope IE1, m164 und M105 wurden von unserer Gruppe bereits als immunodominant für die akute Infektion im BALB/cJ Mausmodell (Haplotyp H-2<sup>d</sup>) identifiziert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass IE1 und m164 `memory inflation` aufweisen; für M105 lagen je nach untersuchtem Organ variierende Ergebnisse vor (Übersicht: Holtappels et al., 2013; IE1: Holtappels et al., 2000; m164: Holtappels et al., 2002). Diese Erkenntnisse wurden durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten zytofluorometrischen Analysen bestätigt.

In Lunge und Milz konnte für IE1 und m164 das Phänomen der `memory inflation` verifiziert werden. Für das immunodominante Epitop M105 zeigte sich lediglich in der Milz ein leichter Anstieg. Bei Betrachtung der normierten Zahlen der Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen pro  $1 \times 10^5$  gesamt-CD8<sup>+</sup> T-Zellen hingegen waren für alle Epitope sowohl in der Lunge als auch in der Milz zwischen Monat 4 und 6 Anstiege der Zellzahl zu beobachten. An Monat 8 kam es zu einem Rückgang der Zellzahlen. In der Milz war die Anzahl Epitop-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen pro  $1 \times 10^5$  gesamt-CD8<sup>+</sup> T-Zellen deutlich niedriger als in der Lunge

Da die Epitop-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort vermutlich die vorausgegangene transkriptionelle Aktivität des latent vorliegenden Genoms reflektiert, war ein Zusammenhang zwischen der Transkriptmenge und der Anzahl spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu erwarten.

Die direkte Gegenüberstellung der transkriptionellen Ereignisse und der Anzahl Epitop-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen lieferte einen Hinweis auf einen möglichen, direkten Einfluss der Transkriptexpression auf die Immunkontrolle. Die Menge der *M105* Transkripte war stets am geringsten, einhergehend mit den niedrigsten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Frequenzen für M105. Umgekehrt dominierte *IE1* sowohl die Transkriptexpression als auch die Epitop-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zell-Anzahl. Eine sehr hohe Anzahl transkriptioneller Ereignisse an Monat 4 ist vermutlich für die Aktivierung der jeweiligen Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen verantwortlich und führt zu einem zeitversetzten Anstieg dieser Zellen an Monat 6. Da die Transkriptionsereignisse an Monat 6 allerdings zurückgegangen sind, werden daraufhin auch weniger Epitop-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen stimuliert und diese Zellen nehmen demzufolge an Monat 8 ab. Die weitere Abnahme der transkriptionellen Ereignisse an Monat 8 lässt einen nachfolgenden Rückgang der zugehörigen Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen an Monat 10 vermuten. Allerdings muss man beachten, dass es zwischen stochastischer Genexpression und Immunkontrolle noch mehrere Zwischenschritte gibt und der triviale Vergleich zwischen Transkriptmenge und

CD8<sup>+</sup> T-Zell-Frequenz nur Hinweise geben kann. Folgende Aspekte spielen in diesem Prozess eine große Rolle: die Avidität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die Affinität zwischen Peptid und MHC-Molekül, die Effizienz der proteasomalen Prozessierung und der Translation, die Stabilität der Transkripte, sowie die Stärke der jeweiligen Promotoren.

Bisher ist ungeklärt, warum einige Epitope eine *memory inflation* zeigen und andere nicht. Auch hat die Stärke der Immunantwort einer Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Population während der Akutphase keinen Einfluss auf die *memory inflation* (Munks et al., 2006). Eine hohe Peptid-Prozessierungsrate von IE1 und m164 ist, im Gegensatz zu der anderer Peptide unabhängig von IFN- $\gamma$ -Vorbehandlung (Holtappels et al., 2013). Interessanterweise ist die Peptid-Prozessierung von IE1 zusätzlich unabhängig vom vorhergehender Ubiquitylierung (Voigt et al., 2007). Möglicherweise sind dies Faktoren, welche die *memory inflation* beeinflussen.

#### 4.5 Der *memory*-T-Zell-pool wird von CD8<sup>+</sup>-SLECs dominiert

Zur weiteren Charakterisierung der Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden diese anhand der Oberflächenmarker CD127, CD62L sowie KLRG1 differenziert. Folgende CD8<sup>+</sup> T-Zell-Populationen konnten charakterisiert werden: *early-effector cells*-EECs (CD127<sup>low</sup> CD62L<sup>low</sup> KLRG1<sup>low</sup>), *short-lived-effector cells*-SLECs (CD127<sup>low</sup> CD62L<sup>low</sup> KLRG1<sup>high</sup>), *double-positive-effector cells*-DPECs (CD127<sup>high</sup> CD62L<sup>low</sup> KLRG1<sup>high</sup>), *effector-memory cells*-T<sub>EM</sub> (CD127<sup>high</sup> CD62L<sup>low</sup> KLRG1<sup>low</sup>), und *central-memory cells*-T<sub>CM</sub> (CD127<sup>high</sup> CD62L<sup>high</sup> KLRG1<sup>low</sup>) (Obar & Lefrancois, 2010a, Obar et al., 2011).

Die SLECs stellten sowohl in der Lunge als auch in der Milz die dominante Population unter der Gesamtheit aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen dar (Lunge: 30-50%, Milz: 10-30%), jedoch konnten in der Milz im Vergleich zur Lunge wesentlich mehr T<sub>EM</sub> und T<sub>CM</sub> detektiert werden. Dies war zu erwarten, da die Milz ein sekundär lymphatisches Organ darstellt und hier die *memory*-Zellen zur Rekrutierung in infiziertes Gewebe bereitstehen.

Auch unter den einzelnen Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen dominierte sowohl in der Lunge als auch in der Milz die SLEC-Population. Für die Lunge ergab sich folgende Hierarchie: SLECs > EECs > T<sub>EM</sub> > T<sub>CM</sub> > DPECs. In der Milz bildeten die EECs die am wenigsten vertretene Subpopulation: SLECs > T<sub>EM</sub> und T<sub>CM</sub> > EECs > DPECs. Allerdings muss erwähnt werden, dass M105 in Monat 4 und 6 eine Ausnahme bildete. Zu diesen Zeitpunkten übertrafen die Frequenzen der M105-spezifischen T<sub>CM</sub> den Anteil der SLECs, in der Milz und in der Lunge dominierten die EECs statt der SLECs. Eine weitere Ausnahme bildeten die DPECs, da ihre Frequenzen an Monat 8 zunahmen und mit denen der T<sub>EM</sub> und T<sub>CM</sub> vergleichbar waren.

Der Begriff *'memory inflation'* suggeriert, dass *memory*-Zellen für den Anstieg der Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen während der Latenz verantwortlich sind. Allerdings konnte durch die Darstellung der einzelnen Subpopulationen normiert auf  $1 \times 10^5$  gesamt-CD8<sup>+</sup> T-Zellen gezeigt werden, dass die SLECs die Hauptpopulation aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen ausmachten, welche für die Zunahme der Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der latent infizierten Lunge und Milz verantwortlich sind. Demzufolge sind die SLECs die Verursacher der *'memory inflation'*.

Des Weiteren zeigten die DPECs in der latent infizierten Milz und die M105-spezifischen DPECs in der Lunge einen interessanten Phänotyp mit einem fortwährenden Anstieg dieser Zellen zwischen Monat 5 und 8. Bisher ist sehr wenig über die Population der DPECs bekannt. Obar et al. (2011) beschrieben eine sehr viel größere DPEC-Population nach sekundärer *Listeria monocytogenes*- oder *Vesicular Stomatitis*-Virus-Infektion im Vergleich zur primären Infektion. Für Viren, die zur Latenzetablierung befähigt sind (hCMV, EBV, HIV), wurde gezeigt, dass es zur Herabregulation von CD127 während der Latenz kommt (Van Leeuwen et al., 2005), und auch, dass eine hohe Frequenz KLRG-1 positiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachweisbar ist (Thimme et al., 2005). Eine genauere Analyse zur Charakterisierung der DPEC-Population, wäre im Hinblick auf ihren *'inflationary'*-Phänotyp in der Milz von besonderem Interesse.

Außerdem war zu beobachten, dass eine niedrigere SLEC-Frequenz mit einer erhöhten EEC-Anzahl einherging. Es ist bereits publiziert, dass eine inflammatorische Umgebung die Entwicklung von SLECs begünstigt (Pham et al., 2009). Der Einfluss der Pathogen-induzierten inflammatorischen Umgebung auf die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Differenzierung wurde auch von Obar et al. (2011) beschrieben. Die Autoren beobachteten nach sekundärer und tertiärer Infektion mit *Listeria monocytogenes* oder dem *Vesicular Stomatitis* Virus erhöhte SLEC-Frequenzen, die über eine Periode von mehreren Monaten nachweisbar waren. Im Falle der VSV Infektion stiegen die SLEC-Frequenzen von 30% nach der Primärinfektion auf 80% während einer sekundären Infektion.

Wir stellten uns die Frage, ob die SLECs zugleich auch IFN- $\gamma$  produzieren und untersuchten die Menge der IFN- $\gamma$  produzierenden Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, um sie dem prozentualen Anteil der Epitop-spezifischen SLECs gegenüberzustellen. Allerdings konnte kein direkter Zusammenhang zwischen IFN- $\gamma$  und SLECs nachgewiesen werden. Demzufolge handelt es sich bei den SLECs auch nicht um die IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zell-Population.

Es ist bekannt, dass neben IFN- $\gamma$  auch andere Cytokine eine Rolle für die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Differenzierung spielen. IL-12 und IFN- $\alpha$ / $\beta$  z.B. fungieren als Wachstumsfaktoren von Effektor-CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Xiao et al., 2009) und fördern die Entwicklung von SLECs (Joshi et al., 2007; Cui et al., 2009). Auch IL-2 beeinflusst die SLEC-Differenzierung positiv (Joshi et

al., 2007; Kalia et al., 2010). Das Überleben der SLECs scheint von dem Cytokin IL-15 abhängig zu sein (Rubinstein et al., 2008). Die Aufklärung der Mechanismen, welche zur Differenzierung von CD8<sup>+</sup> T-Zell-Populationen führen und die Rolle der Cytokine in diesem Zusammenhang, würde voraussichtlich erheblich zum Verständnis der 'memory inflation' beitragen.

#### 4.6 Ist IE-Genexpression zur Latenz-Etablierung notwendig?

Nach dem Stand der heutigen Forschung ist sehr wenig darüber bekannt, welche Mechanismen zur Latenz-Etablierung beitragen. Eine Aufklärung würde maßgeblich zum Verständnis der CMV-Infektion und der Entwicklung neuer Therapieansätze beitragen.

Hinweise darauf, dass Latenz bereits zu sehr frühen Zeitpunkten nach Infektion etabliert wird, lieferten Versuche von Marks & Spektor, die bereits 1984 zeigen konnten, dass das virale Genom von mCMV schon 2h *p.i.* zirkulär als Episom in der Zelle vorliegt. Bevan et al. (1996) zeigten, dass Virus-Replikation nicht notwendig ist, um Latenz zu etablieren. Erst kürzlich wurde publiziert, dass bereits die erste Infektionsrunde zur vollständigen Latenz-Etablierung ausreicht (Mohr et al., 2010). Die Autoren verwendeten die Rekombinante mCMV- $\Delta$ M94, welche die Zelle nach Infektion nicht mehr verlassen kann, und zeigten, dass die latente DNA-Load dieser Mutante im Vergleich zum WT-Virus zu einem Zeitpunkt von 12 Monaten *p.i.* keinerlei Unterschiede aufwies. Cheung et al. (2006) postulierten, dass Genexpression zur Latenz-Etablierung von hCMV notwendig ist. Sie begründeten dies damit, dass die Genome von UV-inaktivierten Viren im Vergleich zu WT-Genomen rasch nach der Infektion wieder abgebaut werden. Da ein erheblicher Unterschied der DNA-Load allerdings erst 72h nach Infektion sichtbar wurde, scheint dies kein direkter Beweis für eine benötigte Genexpression zur Latenz-Etablierung zu sein, sondern lässt eher vermuten, dass ein UV-inaktiviertes Virus durch fehlende Genexpression nicht fähig ist Latenz aufrecht zu erhalten. Auch der Nachweis der replikationsunabhängigen Bildung von viralem Heterochromatin mit hoher Nukleosomendichte im Zellkern, bereits 30min nach Infektion (Nitzsche et al., 2008), legt nahe, dass Histonmodifikationen nicht nur in der Latenz sondern auch während ihrer Etablierung eine besondere Rolle spielen. So ist beispielsweise bekannt, dass das virale Genom kurz nach Infektion mit ND10-Strukturen assoziiert, welche die virale Genexpression unterdrücken (Kalejta, 2008; Maul, 2008). Dabei ist das IE1 Protein dazu befähigt, diese Strukturen aufzulösen und damit die virale Replikation zu initiieren (Korioth et al., 1996).

Theoretisch sind drei Hypothesen zur Latenz-Etablierung denkbar. Die Erste postuliert eine direkte Latenz-Etablierung, ohne dass virale Genexpression nötig ist. Dies könnte auch abhängig vom infizierten Zelltyp sein; z.B. sind CD34<sup>+</sup> myeloide Progenitorzellen nur latent

mit hCMV infizierbar und es kommt erst nach ihrer Differenzierung zur Reaktivierung des Virus (Sinclair & Sissons, 2006).

In der zweiten Hypothese wäre virale Genexpression zur Latenz-Etablierung notwendig und andere, bisher unbekannte Mechanismen müssten das Einsetzen einer produktiven Infektion mit vollständiger IE-E-L-Expression verhindern.

Die dritte Hypothese würde das Vorhandensein von Transkripten voraussetzen, die nicht mit dem produktiven Zyklus in Zusammenhang stehen, sondern nur mit der Etablierung und Aufrechterhaltung von Latenz. Da solche Transkripte für CMV bisher nicht entdeckt wurden, bzw. noch kontrovers diskutiert werden, schlossen wir diese Hypothese in unseren Überlegungen von vorneherein aus und fokussierten uns auf die ersten Beiden mit dem Ziel die Frage zu klären, ob eine IE-Genexpression der Etablierung von Latenz vorausgeht.

#### 4.6.1 Konditionale Zelldepletion mittels DTR

Die Bearbeitung der oben erwähnten Fragestellung erfolgte mit Hilfe eines Modells der konditionalen Zell-Depletion. Dazu wurde das genetisch veränderte Virus mCMV- $\Delta$ ie2-DTR verwendet, welches das *dtr*-Gen unter Kontrolle des *ie2*-Promotors trägt (Scheller, 2011). Im Fall einer IE-Genexpression kommt es zur Expression des DTR auf der Oberfläche infizierter Zellen, die durch DT-Gabe depletiert werden.

Der Wirkmechanismus des DT beruht auf der Hemmung der viralen und zellulären Translation durch Inhibition des EF-2 (Übersicht: Pappenheimer et al., 1977). Zusätzlich führt die DT-Applikation zur Induktion von Apoptose (Morimoto & Bonavida, 1992). Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnte ein durch Apoptose verursachter, DT-vermittelter antiviraler Effekt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachtet werden. Die durchflusszytometrische Analyse mCMV- $\Delta$ ie2-DTR infizierter MEF (48h) zeigte einen Anteil von lediglich 7% infizierter Zellen nach DT-Applikation; ohne DT-Gabe waren es 99% der Zellen. Mit mCMV- $\Delta$ ie2-DTR infizierte BALB/cJ Mäuse wiesen nach DT-Behandlung eine deutlich reduzierte Pathogenität am Infektionsort auf. Durch Einleitung der Apoptose wird die Übertragung viraler Genome auf Nachbarzellen sowie die Produktion infektiöser Nachkommen verhindert und dadurch das Ausmaß der CMV-Infektion eingegrenzt.

Es ist bekannt, dass DT exponentiell abgebaut wird und nach 19h weniger als 1% des *i.v.* verabreichten Toxins im Gewebe von Meerschweinchen nachweisbar ist. Aus diesem Grund ist eine repetitive Applikation unerlässlich (Masouredis, 1959). Hinsichtlich der DT-Applikation im Mausmodell existieren einige Publikationen, die die DT-vermittelte Zelldepletion in den verschiedensten Systemen beschreiben. Buch und Kollegen (2005) z.B. verwendeten transgene Mäuse, in denen der DTR exklusiv auf B- und T-Zellen bzw. auf Oligodendrozyten exprimiert wird. Eine repetitive DT-Gabe *i.p.* mit einer Konzentration von



5ng/g Körpergewicht in einem 8h Intervall für einen Zeitraum von 7 Tagen führte dabei zur vollständigen Depletion der Lymphozyten in der Milz bzw. schweren Schäden der Myelin-Strukturen im gesamten zentralen Nervensystem. Da sich eine DT-Konzentration von 50ng/g nach dreimaliger *i.v.* Gabe in einem Intervall von 16h als toxisch erwies (Scheller, 2011), wurde in der hier vorliegenden Arbeit eine weitere Optimierung der DT-Applikation im verwendeten Tiermodell vorgenommen. Eine Konzentration von 30ng DT/g Maus sorgte bei fünfmaliger Gabe für eine fast vollständige Reduktion der Viruslast unterhalb des Detektionslimits in Speicheldrüse, Lunge und Leber. Dieses Modell wurde daher für alle durchgeführten *in vivo* Versuche gewählt und sorgte für eine effektive Zell-Depletion nach DTR-Expression.

Die direkte Funktionalität des DTR *in vivo* konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels ISH erbracht werden. Die Herstellung einer DTR-Sonde ermöglichte den spezifischen Nachweis des mCMV- $\Delta$ ie2-DTR-Virus; mit der gB-Sonde konnte zusätzlich auch mCMV-WT detektiert werden. Die Umsetzung des Substrates DAB/Nickel bewirkte eine Schwarzfärbung mCMV- $\Delta$ ie2-DTR infizierter Zellen und das Substrat Neufuchsin verursachte eine Rotfärbung mCMV-WT-BAC infizierter Zellen. Nach Koinfektion von BALB/cJ Mäusen mit einem 1:1 Gemisch der beiden Viren mCMV- $\Delta$ ie2-DTR und mCMV-WT waren auf den histologischen Leberschnitten der akut infizierten Tiere sowohl rot gefärbte mCMV-WT-BAC infizierte Zellen als auch mCMV- $\Delta$ ie2-DTR infizierte bzw. ko-infizierte schwarz gefärbte Zellen sichtbar. In Folge der DT-Applikation konnten keinerlei mCMV- $\Delta$ ie2-DTR oder ko-infizierte Zellen mehr detektiert werden. Dies ermöglichte den direkten Nachweis der DTR-spezifischen Zell-Depletion *in vivo*. Wären wirklich keinerlei Genome mehr detektierbar, würde dies für eine der Latenz-Etablierung voranschreitende IE-Genexpression sprechen. Die im Folgenden durchgeführten hochsensitiven qPCR Analysen des mCMV- $\Delta$ ie2-DTR Genoms latent infizierter LSECs erlaubten im Gegensatz zur weniger sensitiven ISH allerdings durchaus den Nachweis mCMV- $\Delta$ ie2-DTR infizierter Zellen. Außerdem muss beachtet werden, dass die histologischen Schnitte alle Leberzellen enthielten und die spezifische qPCR mit aufgereinigten LSEC durchgeführt wurde, welche nur ~20% der Gesamt-Zellzahl ausmachen.

#### 4.6.2 ***In vitro* und *in vivo* Analysen zur Aufklärung der Latenz-Etablierungs-Hypothesen**

Unsere Hypothese besagt, dass es im Falle eines von Beginn an inaktiven Genoms nicht zur DTR-Expression und in Folge einer DT-Applikation auch nicht zur Depletion latent infizierter Zellen käme. Eine, der Latenz-Etablierung vorhergehende, IE-Genexpression würde hingegen zur DT-vermittelten Auslöschung latent infizierter Zellen führen. Zur Analyse wurde

die Zahl der viralen Genome vitaler Zellen und der Einfluss der DT-Applikation auf diese, sowohl mittels *in vitro*- als auch *in vivo*-Studien bestimmt.

Eine DT-Behandlung *in vitro* konnte die virale Genom-Zahl mCMV- $\Delta$ ie2-DTR-infizierter MEF (MOI=4) innerhalb von 48h um 3,5  $\log_{10}$ -Stufen, von  $\sim 5 \times 10^9$  Genomen pro  $10^6$  Zellen auf  $\sim 10^6$  Genome pro  $10^6$  Zellen reduzieren.

Da die LSECs in einer früheren Studie als der latent infizierte Zelltyp der Leber identifiziert wurden (Seckert et al., 2009), wurde dieser Zelltyp für die *in vivo*-Studien der Latenz-Etablierung verwendet. Zunächst erfolgte die Charakterisierung der akuten und latenten Infektion in LSECs im Rahmen einer Kinetik. Für die Kinetik der akuten Infektion wurden immunsupprimierte Tiere mit  $2 \times 10^5$  PFU mCMV- $\Delta$ ie2-DTR *i.pl.* infiziert; für die Untersuchungen in der Latenz wurde zusätzlich eine KMT durchgeführt (Abb.3.4). Die Virale DNA-Load in der Leber und den LSECs stieg während der akuten Infektion bis Tag 10 *p.i.* kontinuierlich an. Da die Hepatozyten den Hauptort der akuten Infektion in der Leber repräsentieren, war die virale Load in der Gesamt-Leber ( $\sim 5 \times 10^7$  virale Genome/ $10^6$  Zellen) wie zu erwarten höher als in den LSECs ( $\sim 5 \times 10^6$  virale Genome/ $10^6$  Zellen). Im Vergleich zur akuten Infektion war während der Latenz eine deutlich niedrigere virale DNA-Load detektierbar. So betrug die Zahl viraler Genome zum Zeitpunkt 8 Monate *p.i.* in den LSECs  $\sim 1 \times 10^2$ ; in der Gesamt-Leber waren es  $\sim 1 \times 10^1$  Genome pro  $10^6$  Zellen. Dieses Ergebnis bestätigte die Erwartungen, da die LSECs etwa 20% aller Leberzellen ausmachen.

Zur *in vivo* Untersuchung einer möglichen IE-Genexpression, welche der Latenz-Etablierung voranschreitet, wurden BALB/cJ Mäuse mit mCMV- $\Delta$ ie2-DTR *i.v.* infiziert und über einen Zeitraum von 90h mit DT behandelt, beginnend 6h vor Infektion. Die LSECs wurden 16h nach der letzten DT-Behandlung isoliert. In der vitalen LSEC-Population dieser Tiere konnten in der DT-behandelten Gruppe  $\sim 1 \times 10^3$  virale Genome/ $1 \times 10^6$  Zellen quantifiziert werden und in den Kontrollgruppen  $\sim 5 \times 10^5$  virale Genome/ $1 \times 10^6$  Zellen. Unter DT-Einwirkung waren also nur noch 0,2% der Genome im Vergleich zur Kontrollgruppe vorhanden. Zusätzlich war keinerlei infektiöses Virus in den vitalen Zellen der DT-Gruppe nachweisbar (Abb. 3.36). Interessanterweise glich die virale Load der LSECs DT-behandelter Tiere der Load latent infizierter LSECs (4 Monate *p.i.*) nach KMT (Abb. 3.37). Wäre eine IE-Genexpression zur Latenz-Etablierung nötig, würde man keine oder nur sehr wenige Genome erwarten. Demgegenüber sprechen die erhobenen Daten für die *silencing*-Hypothese, der zufolge das virale Genom von Beginn an inaktiv in der latent infizierten Zelle vorliegt.

Die Detektion des DTR Proteins im *WesternBlot* gelang erst ab einem Zeitpunkt von 2h *p.i.* (S. Scheller, 2011) und es ist schwer zu sagen ab welchem Zeitpunkt der DTR an der Zelloberfläche exprimiert wird. Marcinowski und Kollegen (2012) lieferten Hinweise darauf, dass die *ie1*-Genexpression bereits nach 1-2h ihren Scheitelpunkt erreicht und schon 5-6h

*p.i.* wieder herunter reguliert wird. Da sowohl IE- als auch E- und L-Gene diese Synthesemuster aufwiesen, könnte *ie2* gleichermaßen reguliert werden. Daraus könnte man schließen, dass eine Latenzetablierung ohne vorhergehende *ie*-Expression vermutlich zu einem Zeitpunkt stattfindet zu dem der DTR noch nicht an der Zelloberfläche exprimiert wird. Nichtsdestotrotz sollten alle Zellen, in denen eine IE-Genexpression stattfand durch die konstante DT-Applikation über einen Zeitraum von 90h ausgelöscht worden sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass sich die Latenz-Etablierung bereits zu sehr frühen Zeitpunkten nach Infektion ereignet und die DT-Applikation über einen Zeitraum von 90h genügt, um die virale *Load* auf das Level einer latenten Infektion zu reduzieren. Dieser Ansatz könnte zugleich ein neues Tier-Modell zur Latenz-Etablierung darstellen. Weitere Versuche müssten diese Hypothese noch verifizieren. Allerdings könnten im Vergleich zum bisherig verwendeten KMT-Modell die Tierkosten erheblich reduziert werden. Eine verkürzte Dauer bis zur vollständigen Latenz-Etablierung wäre sehr attraktiv für zukünftige Untersuchungen der mCMV-Latenz.

#### 4.7 Fazit und Ausblick

Die Analyse Latenz-assoziiierter Transkripte und deren Rolle bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der latenten CMV-Infektion stehen schon lange Zeit im Fokus der Forschung. Im Unterschied zu anderen Herpesviren wie HSV-1, EBV und VZV, die echte Latenz-spezifische Transkripte exprimieren (Sawtell et al., 1992; Cohen et al., 2004; 2005; Robertson, 2010), war es bisher nicht möglich, solche Transkripte für CMV zu identifizieren. Alle bekannten während der Latenz exprimierten Transkripte (TEs) spielen vermutlich keine Rolle bei der Latenz-Etablierung und werden auch während der produktiven Infektion exprimiert. Für mCMV waren bisher lediglich zwei TEs, *IE1* und *IE2*, bekannt (Kurz et al., 1997; Grzimek et al., 2001).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal eine umfassende Transkriptexpressions-Studie latent mCMV-infizierter BALB/cJ Mäuse durchgeführt. In der Lunge, dem Hauptort der mCMV-Pathogenese, wurden die Transkripte *IE1*, *IE3*, *E1*, *m164*, *M105* sowie *M86* mittels RT-qPCR nachgewiesen und die Ergebnisse in ein binäres Expressionsmuster übersetzt. Die Transkriptexpression folgte in der Latenz nicht dem klassischen IE-E-L-Muster der produktiven Infektion, sondern war stochastischer Natur und wurde mit voranschreitender Zeit immer weiter reduziert. Gestützt wird diese These durch *in vitro* Arbeiten zur Untersuchung der hCMV Latenz-Etablierung (Cheung et al., 2006).

Die stochastische Transkriptexpression während der Latenz scheint durch Episoden des *desilencing* und *silencing* einzelner Genom-*Loci* hervorgerufen zu werden, die wiederum die dynamische Natur des inaktiven Heterochromatins widerspiegeln. Genauere Analysen zur Aufklärung der Histon-Modifikationen einzelner Genom-*Loci* während der Latenz sind daher

unerlässlich. Diese erweisen sich allerdings als schwierig, da die Majorität der Genom-Loci inaktiv vorliegt. Interessant wäre die Durchführung von Analysen auf Einzel-Zell-Ebene, um die molekularen Mechanismen der Zelle besser verstehen zu können. Mikroaspiration über Glaskapillaren, Durchflusszytometrie oder *Laser-Capture* Mikrodissektion erlauben die Gewinnung einzelner Zellen, welche im Anschluss für Transkriptexpressions-Studien mittels RT-qPCR, sowie zur Analyse von Genomen (Chromatinisierungs-Studien), Proteinen oder Metaboliten bereitstehen (Stahlberg et al., 2011).

Auch die Rolle der Promotorstärke der jeweiligen Transkripte sollte nicht unbeachtet bleiben. So können starke Promotoren, im Gegensatz zu Schwächeren, den Modifikationen zugunsten eines inaktiven Heterochromatins während der Latenz vermutlich sehr viel länger widerstehen. Promotoranalysen der Genom-Loci, zugehörig zu den in dieser Arbeit untersuchten Transkripten, stehen noch aus und sollen in naher Zukunft an unserem Institut durchgeführt werden.

Neuere Methoden erlauben die direkte Analyse neusynthetisierter mRNA mittels thiolierten Nukleosiden (Dölken et al., 2008). Im Gegensatz zur Messung des gesamt-mRNA-Levels können so direktere Eindrücke in das Transkriptexpressions-Geschehen infizierter Zellen gewonnen werden. Die Synthese einiger ausgewählter Transkripte wurde bereits während der akuten Infektion detektiert (Marcinowski et al., 2012). Eine umfassende *next-generation sequencing* oder *microarray*-Analyse sowohl während akuter als auch latenter CMV-Infektion sollte in naher Zukunft verfügbar sein.

Mit dem Ziel herauszufinden, ob die Epitop-spezifische CD8<sup>+</sup> T Zell-Antwort die transkriptionelle Aktivität des latent vorliegenden Genoms reflektiert, wurde in der vorliegenden Arbeit der Zusammenhang zwischen den transkriptionellen Ereignissen und der Anzahl spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen während der Latenz analysiert. Dabei schien eine vorhergehende transkriptionelle Aktivität zeitversetzt die Epitop-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort zu beeinflussen.

Durch die weitere Charakterisierung einzelner Subpopulationen dieser Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, konnten die SLECs als die dominierende Zellpopulation sowohl in der Lunge als auch in der Milz während der mCMV-Latenz beschrieben werden. Zugleich konnten die SLECs als die Hauptpopulation aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen identifiziert werden, die für das Phänomen der *memory inflation* verantwortlich sind

In einem weiteren Teil der Arbeit ging es um die Aufklärung der Frage, ob eine IE-Genexpression der Latenz-Etablierung voranschreitet. Die Fragestellung wurde mit Hilfe eines Modells der konditionalen Zell-Depletion untersucht, in welchem es zur DT-vermittelten Auslöschung DTR-exprimierender Zellen kommt. Durch 90-stündige DT-Applikation konnte *in vivo* eine Reduktion der viralen *Load* mCMV- $\Delta$ ie2-DTR infizierter LSECs auf das Level

latent infizierter LSECs erreicht werden. Diese Daten gaben Hinweise darauf, dass das virale Genom von Beginn an inaktiv in der latent infizierten Zelle vorliegt und zur Latenz-Etablierung keine IE-Genexpression notwendig ist. Zusätzlich stellt dieser Ansatz ein neues Tier-Modell zur Latenz-Etablierung dar. Durch eine verringerte Wartezeit bis zur vollständigen Latenz-Etablierung, im Vergleich zum bisherigen KMT-Modell, könnten anfallende Tierhaltungskosten erheblich reduziert und das Voranschreiten der Forschung beschleunigt werden.

## 5 Referenzen

- Adler, B. and C. Sinzger.** 2013. Cytomegalovirus Interstrain Variance in Cell Type Tropism. p 297-321. *In: M. J. Reddehase (ed.), Cytomegaloviruses: From molecular pathogenesis to intervention.* vol.1. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, UK.
- Akbar, A. N., and J. M. Fletcher.** 2005. Memory T cell homeostasis and senescence during aging. *Curr. Opin. Immunol.* **17**:480–485.
- Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho.** 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* **2**:675–680.
- Alterio de Goss, M., R. Holtappels, H. P. Steffens, J. Podlech, P. Angele, L. Dreher, D. Thomas, and M. J. Reddehase.** 1998. Control of cytomegalovirus in bone marrow transplantation chimeras lacking the prevailing antigen-presenting molecule in recipient tissues rests primarily on recipient-derived CD8 T cells. *J. Virol.* **72**:7733–7744.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403–410.
- Angulo, A., P. Ghazal, and M. Messerle.** 2000. The major immediate-early gene *ie3* of mouse cytomegalovirus is essential for viral growth. *J. Virol.* **74**:11129–11136.
- Arase, H., E. S. Mocarski, A. E. Campbell, A. B. Hill, and L. L. Lanier.** 2002. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science.* **296**: 1323-1326.
- Ardavín, C., G. Martínez del Hoyo, P. Martín, F. Anjuère, C. F. Arias, A. R. Marín, S. Ruiz, V. Parrillas, and H. Hernández.** 2001. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol.* **22**:691–700.
- Asselin-Paturel, C., A. Boonstra, M. Dalod, I. Durand, N. Yessaad, C. Dezutter-Dambuyant, A. Vicari, A. O'Garra, C. Biron, F. Brière, and G. Trinchieri.** 2001. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat. Immunol.* **2**:1144–1150.
- Baldick, C. J., and T. Shenk.** 1996. Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles. *J. Virol.* **70**:6097–6105.
- Balthesen, M., M. Messerle, and M. J. Reddehase.** 1993. Lungs are a major organ site of cytomegalovirus latency and recurrence. *J. Virol.* **67**:5360–5366.
- Banh, C., C. Fugère, and L. Brossay.** 2009. Immunoregulatory functions of KLRG1 cadherin interactions are dependent on forward and reverse signaling. *Blood* **114**:5299–5306.
- Bártová, E., J. Krejčí, A. Harnicarová, G. Galiová, and S. Kozubek.** 2008. Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J. Histochem. Cytochem.* **56**:711–721.
- Basha, G., G. Lizée, A. T. Reinicke, R. P. Seipp, K. D. Omilusik, and W. A. Jefferies.** 2008. MHC class I endosomal and lysosomal trafficking coincides with exogenous antigen loading in dendritic cells. *PLoS ONE* **3**:e3247.
- Bate, S. L., S. C. Dollard, and M. J. Cannon.** 2010. Cytomegalovirus seroprevalence in the United States: the national health and nutrition examination surveys, 1988-2004. *Clin. Infect. Dis.* **50**:1439–1447.
- Bego, M., J. Maciejewski, S. Khaiboullina, G. Pari, and S. St Jeor.** 2005. Characterization of an antisense transcript spanning the UL81-82 locus of human cytomegalovirus. *J. Virol.* **79**:11022–11034.
- Beisser, P. S., L. Laurent, J. L. Virelizier, and S. Michelson.** 2001. Human cytomegalovirus chemokine receptor gene US28 is transcribed in latently infected THP-1 monocytes. *J. Virol.* **75**:5949–5957.
- Bengtsson, M., M. Hemberg, P. Rorsman, and A. Stahlberg.** 2008. Quantification of mRNA in single cells and modelling of RT-qPCR induced noise. *BMC Mol Biol.* **9**:63.

- Bernstein, J. A., A. B. Khodursky, P.-H. Lin, S. Lin-Chao, and S. N. Cohen.** 2002. Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**:9697–9702.
- Bevan I. S., C. C. Sammons, and C. Sweet.** 1996. Investigation of murine cytomegalovirus latency and reactivation in mice using viral mutants and the polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.* **48**:308–320.
- Bevan M. J.** 1976. Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J. Immunol.* **117**:2233–2238.
- Bhattacharyya, S. N., R. Habermacher, U. Martine, E. I. Closs, and W. Filipowicz.** 2006. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* **125**:1111–1124.
- Blake, W. J., M. Kaern, C. R. Cantor, and J. J. Collins.** 2003. Noise in eukaryotic gene expression. *Nature* **422**:633–637.
- Blattman, J. N., R. Antia, D. J. D. Sourdive, X. Wang, S. M. Kaech, K. Murali-Krishna, J. D. Altman, and R. Ahmed.** 2002. Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J. Exp. Med.* **195**:657–664.
- Böhm, V., C. O. Simon, J. Podlech, C. K. Seckert, D. Gendig, P. Deegen, D. Gillert-Marien, N. A. W. Lemmermann, R. Holtappels, and M. J. Reddehase.** 2008a. The immune evasion paradox: immunoevasins of murine cytomegalovirus enhance priming of CD8 T cells by preventing negative feedback regulation. *J. Virol.* **82**:11637–11650.
- Böhm, V., J. Podlech, D. Thomas, P. Deegen, M.-F. Pahl-Seibert, N. A. W. Lemmermann, N. K. A. Grzimek, S. A. Oehrlein-Karpi, M. J. Reddehase, and R. Holtappels.** 2008b. Epitope-specific in vivo protection against cytomegalovirus disease by CD8 T cells in the murine model of preemptive immunotherapy. *Med. Microbiol. Immunol.* **197**:135–144.
- Boppana, S. B., R. F. Pass, W. J. Britt, S. Stagno, and C. A. Alford.** 1992. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **11**:93–99.
- Boppana, S.B., and W.J Britt.** 2013. Synopsis of clinical aspects of human cytomegalovirus disease. p 1-25. *In*: M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: From molecular pathogenesis to intervention*. vol.2. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, UK.
- Boshart, M., F. Weber, G. Jahn, K. Dorsch-Häsler, B. Fleckenstein, and W. Schaffner.** 1985. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* **41**:521–530.
- Brautigam, A. R., F. J. Dutko, L. B. Olding, and M. B. Oldstone.** 1979. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection: the macrophage as a permissive cell for cytomegalovirus infection, replication and latency. *J. Gen. Virol.* **44**:349–359.
- Britt, W. J.** 1984. Neutralizing antibodies detect a disulfide-linked glycoprotein complex within the envelope of human cytomegalovirus. *Virology* **135**:369–378.
- Britt, W. J., and D. Auger.** 1986. Human cytomegalovirus virion-associated protein with kinase activity. *J. Virol.* **59**:185–188.
- Britt, W.J.** 2010. Cytomegalovirus. p706-755. *In*: J.S. Remington, J.O. Klein, C.B. Wilson, V. Nizet and Y. Maldonado (eds.), Elsevier Saunders, Philadelphia.
- Brockschneider, D., C. Lappe-Siefke, S. Goebbels, M. R. Boesl, K.-A. Nave, and D. Riethmacher.** 2004. Cell depletion due to diphtheria toxin fragment A after Cre-mediated recombination. *Mol. Cell. Biol.* **24**:7636–7642.
- Brown, M. G., A. O. Dokun, J. W. Heusel, H. R. Smith, D. L. Beckman, E. A. Blattenberger, C. E. Dubbelde, L. R. Stone, A. A. Scalzo, and W. M. Yokoyama.** 2001. Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* **292**:934–937.

- Brune, W.** 2013. Molecular basis of cytomegalovirus host species specificity. p 322-29. *In: M. J. Reddehase (ed.), Cytomegaloviruses: From molecular pathogenesis to intervention. vol.1. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, UK.*
- Bubić, I., M. Wagner, A. Krmpotić, T. Saulig, S. Kim, W. M. Yokoyama, S. Jonjić, and U. H. Koszinowski.** 2004. Gain of virulence caused by loss of a gene in murine cytomegalovirus. *J. Virol.* **78**:7536–7544.
- Buch, T., F. L. Heppner, C. Tertilt, T. J. A. J. Heinen, M. Kremer, F. T. Wunderlich, S. Jung, and A. Waisman.** 2005. A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. *Nat. Methods* **2**:419–426.
- Buck, A. H., J. Santoyo-Lopez, K. A. Robertson, D. S. Kumar, M. Reczko, and P. Ghazal.** 2007. Discrete clusters of virus-encoded micRNAs are associated with complementary strands of the genome and the 7.2-kilobase stable intron in murine cytomegalovirus. *J. Virol.* **81**:13761–13770.
- Bühler, B., G. M. Keil, F. Weiland, and U. H. Koszinowski.** 1990. Characterization of the murine cytomegalovirus early transcription unit e1 that is induced by immediate-early proteins. *J. Virol.* **64**:1907–1919.
- Bukowski, J. F., B. A. Woda, and R. M. Welsh.** 1984. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *J. Virol.* **52**:119–128.
- Busch, D. H., I. M. Pilip, S. Vijh, and E. G. Pamer.** 1998. Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity* **8**:353–362.
- Busche, A., A. C. Jirno, S. P. M. Welten, J. Zischke, J. Noack, H. Constabel, A.-K. Gatzke, K. A. Keyser, R. Arens, G. M. N. Behrens, and M. Messerle.** 2013. Priming of CD8+ T cells against cytomegalovirus-encoded antigen is dominated by cross-presentation. *J. Immunol.* **190**:2767–2777.
- Busche, A., A. Marquardt, A. Bleich, P. Ghazal, A. Angulo, and M. Messerle.** 2009. The mouse cytomegalovirus immediate-early 1 gene is not required for establishment of latency or for reactivation in the lungs. *J. Virol.* **83**:4030–4038.
- Bustin, S. A.** 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* **25**:169–193.
- Bustin, S.A.** (ed.). 2004. PCR encyclopaedia A–Z of quantitative PCR. International University Line, La Jolla, CA.
- Bustin, S.A., and T. Nolan.** 2004. Template handling, preparation, and quantification. p 87–120. *In: S.A. Bustin, (ed.), The real-time PCR encyclopaedia A–Z of quantitative PCR. International University Line, La Jolla, CA.*
- Butcher, S. J., J. Aitken, J. Mitchell, B. Gowen, and D. J. Dargan.** 1998a. Structure of the human cytomegalovirus B capsid by electron cryomicroscopy and image reconstruction. *J. Struct. Biol.* **124**:70–76.
- Butcher, S., K. L. Arney, and G. P. Cook.** 1998b. MAFA-L, an ITIM-containing receptor encoded by the human NK cell gene complex and expressed by basophils and NK cells. *Eur. J. Immunol.* **28**:3755–3762.
- Butz, E. A., and M. J. Bevan.** 1998. Massive expansion of antigen-specific CD8+ T cells during an acute virus infection. *Immunity* **8**:167–175.
- Cannon, M.J., S. D. Grosse, and K. B. Fowler.** 2013. The epidemiology and public health impact of congenital cytomegalovirus infection. p 26-48. *In: M. J. Reddehase (ed.), Cytomegaloviruses: From molecular pathogenesis to intervention. vol.2. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, UK.*
- Caposio, P., D. N. Streblow and J. A. Nelson.** 2013. Cytomegalovirus proteomics. p 86-108. *In: M. J. Reddehase (ed.), Cytomegaloviruses: From molecular pathogenesis to intervention. vol.1. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, UK.*



- Cardin, R. D., G. B. Abenes, C. A. Stoddart, and E. S. Mocarski.** 1995. Murine cytomegalovirus IE2, an activator of gene expression, is dispensable for growth and latency in mice. *Virology* **209**:236–241.
- Carlson, C., W. J. Britt, and T. Compton.** 1997. Expression, purification, and characterization of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B. *Virology* **239**:198–205.
- Cedar, H., and Y. Bergman.** 2009. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat. Rev. Genet.* **10**:295–304.
- Chang, J. T., V. R. Palanivel, I. Kinjyo, F. Schambach, A. M. Intlekofer, A. Banerjee, S. A. Longworth, K. E. Vinup, P. Mrass, J. Oliaro, N. Killeen, J. S. Orange, S. M. Russell, W. Weninger, and S. L. Reiner.** 2007. Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* **315**:1687–1691.
- Chang, Y., E. Cesarman, M. S. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, D. M. Knowles, and P. S. Moore.** 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* **266**:1865–1869.
- Chee, M. S., A. T. Bankier, S. Beck, R. Bohni, C. M. Brown, R. Cerny, T. Horsnell, C. A. Hutchison, T. Kouzarides, and J. A. Martignetti.** 1990. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **154**:125–169.
- Chen, D. H., H. Jiang, M. Lee, F. Liu, and Z. H. Zhou.** 1999. Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. *Virology* **260**:10–16.
- Cheng, T. P., M. C. Valentine, J. Gao, J. T. Pingel, and W. M. Yokoyama.** 2010. Stability of murine cytomegalovirus genome after in vitro and in vivo passage. *J. Virol.* **84**:2623–2628.
- Cheung, A. K. L., A. Abendroth, A. L. Cunningham, and B. Slobedman.** 2006. Viral gene expression during the establishment of human cytomegalovirus latent infection in myeloid progenitor cells. *Blood* **108**:3691–3699.
- Cheung, A. K. L., D. J. Gottlieb, B. Plachter, S. Pepperl-Klindworth, S. Avdic, A. L. Cunningham, A. Abendroth, and B. Slobedman.** 2009. The role of the human cytomegalovirus UL111A gene in down-regulating CD4<sup>+</sup> T-cell recognition of latently infected cells: implications for virus elimination during latency. *Blood* **114**:4128–4137.
- Choe, S., M. J. Bennett, G. Fujii, P. M. Curmi, K. A. Kantardjieff, R. J. Collier, and D. Eisenberg.** 1992. The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature* **357**:216–222.
- Chong, K. T., and C. A. Mims.** 1981. Murine cytomegalovirus particle types in relation to sources of virus and pathogenicity. *J. Gen. Virol.* **57**:415–419.
- Ciocco-Schmitt, G. M., Z. Karabekian, E. W. Godfrey, R. M. Stenberg, A. E. Campbell, and J. A. Kerry.** 2002. Identification and characterization of novel murine cytomegalovirus M112-113 (e1) gene products. *Virology* **294**:199–208.
- Cobbold, M., N. Khan, B. Pourghesari, S. Tauro, D. McDonald, H. Osman, M. Assenmacher, L. Billingham, C. Steward, C. Crawley, E. Olavarria, J. Goldman, R. Chakraverty, P. Mahendra, C. Craddock, and P. A. H. Moss.** 2005. Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J. Exp. Med.* **202**:379–386.
- Cohen, J. I., E. Cox, L. Pesnicak, S. Srinivas, and T. Krogmann.** 2004. The varicella-zoster virus open reading frame 63 latency-associated protein is critical for establishment of latency. *J. Virol.* **78**:11833–11840.
- Cohen, J. I., T. Krogmann, J. P. Ross, L. Pesnicak, and E. A. Prikhod'ko.** 2005. Varicella-zoster virus ORF4 latency-associated protein is important for establishment of latency. *J. Virol.* **79**:6969–6975.
- Compton, T.** 2004. Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. *Trends Cell Biol.* **14**:5–8.

- Compton, T., D. M. Nowlin, and N. R. Cooper.** 1993. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* **193**:834–841.
- Compton, T., E. A. Kurt-Jones, K. W. Boehme, J. Belko, E. Latz, D. T. Golenbock, and R. W. Finberg.** 2003. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J. Virol.* **77**:4588–4596.
- Cook, C. H., J. Trgovcich, P. D. Zimmerman, Y. Zhang, and D. D. Sedmak.** 2006. Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor alpha, or interleukin-1beta triggers reactivation of latent cytomegalovirus in immunocompetent mice. *J. Virol.* **80**:9151–9158.
- Craig, J. M., J. C. Macaulley, T. H. Weller, and P. Wirth.** 1957. Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **94**:4–12.
- Cremisi, C., P. F. Pignatti, O. Croissant, and M. Yaniv.** 1975. Chromatin-like structures in polyoma virus and simian virus 10 lytic cycle. *J. Virol.* **17**:204–211.
- Cuevas-Bennett, C., and T. Shenk.** 2008. Dynamic histone H3 acetylation and methylation at human cytomegalovirus promoters during replication in fibroblasts. *J. Virol.* **82**:9525–9536.
- Cui, W., N. S. Joshi, A. Jiang, and S. M. Kaech.** 2009. Effects of Signal 3 during CD8 T cell priming: Bystander production of IL-12 enhances effector T cell expansion but promotes terminal differentiation. *Vaccine* **27**:2177–2187. doi:10.1016/j.vaccine.2009.01.088.
- Daniels, K. A., G. Devora, W. C. Lai, C. L. O'Donnell, M. Bennett, and R. M. Welsh.** 2001. Murine cytomegalovirus is regulated by a discrete subset of natural killer cells reactive with monoclonal antibody to Ly49H. *J. Exp. Med.* **194**:29–44.
- Das, S., A. Vasanji, and P. E. Pellett.** 2007. Three-dimensional structure of the human cytomegalovirus cytoplasmic virion assembly complex includes a reoriented secretory apparatus. *J. Virol.* **81**:11861–11869.
- Das, S., and P. E. Pellett.** 2011. Spatial relationships between markers for secretory and endosomal machinery in human cytomegalovirus-infected cells versus those in uninfected cells. *J. Virol.* **85**:5864–5879.
- Däubner, T., A. Fink, A. Seitz, S. Tenzer, J. Müller, D. Strand, C. K. Seckert, C. Janssen, A. Renzaho, N. K. A. Grzimek, C. O. Simon, S. Ebert, M. J. Reddehase, S. A. Oehrlein-Karpi, and N. A. W. Lemmermann.** 2010. A novel transmembrane domain mediating retention of a highly motile herpesvirus glycoprotein in the endoplasmic reticulum. *J. Gen. Virol.* **91**:1524–1534.
- Delale, T., A. Paquin, C. Asselin-Paturel, M. Dalod, G. Brizard, E. E. M. Bates, P. Kastner, S. Chan, S. Akira, A. Vicari, C. A. Biron, G. Trinchieri, and F. Brière.** 2005. MyD88-dependent and -independent murine cytomegalovirus sensing for IFN-alpha release and initiation of immune responses in vivo. *J. Immunol.* **175**:6723–6732.
- Demircik, F., T. Buch, and A. Waisman.** 2013. Efficient B Cell Depletion via Diphtheria Toxin in CD19-Cre/iDTR Mice. *PLoS ONE* **8**:e60643.
- den Haan, J. M., S. M. Lehar, and M. J. Bevan.** 2000. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J. Exp. Med.* **192**:1685–1696.
- Derveaux, S., J. Vandesompele, and J. Hellemans.** 2010. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods* **50**:227–230.
- Dittmer, A., J. C. Drach, L. B. Townsend, A. Fischer, and E. Bogner.** 2005. Interaction of the putative human cytomegalovirus portal protein pUL104 with the large terminase subunit pUL56 and its inhibition by benzimidazole-D-ribonucleosides. *J. Virol.* **79**:14660–14667.
- Döcke, W. D., S. Prösch, E. Fietze, V. Kimel, H. Zuckermann, C. Klug, U. Syrbe, D. H. Krüger, R. von Baehr, and H. D. Volk.** 1994. Cytomegalovirus reactivation and tumour necrosis factor. *Lancet* **343**:268–269.

- Dolan, A., C. Cunningham, R. D. Hector, A. F. Hassan-Walker, L. Lee, C. Addison, D. J. Dargan, D. J. McGeoch, D. Gatherer, V. C. Emery, P. D. Griffiths, C. Sinzger, B. P. McSharry, G. W. G. Wilkinson, and A. J. Davison.** 2004. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* **85**:1301–1312.
- Dölken, L., J. Perot, V. Cognat, A. Alioua, M. John, J. Soutschek, Z. Ruzsics, U. Koszinowski, O. Voinnet, and S. Pfeffer.** 2007. Mouse cytomegalovirus microRNAs dominate the cellular small RNA profile during lytic infection and show features of posttranscriptional regulation. *J. Virol.* **81**:13771–13782.
- Dölken, L., Z. Ruzsics, B. Rädle, C. C. Friedel, R. Zimmer, J. Mages, R. Hoffmann, P. Dickinson, T. Forster, P. Ghazal, and U. H. Koszinowski.** 2008. High-resolution gene expression profiling for simultaneous kinetic parameter analysis of RNA synthesis and decay. *RNA* **14**:1959–1972.
- Dorsch-Häsler, K., G. M. Keil, F. Weber, M. Jasin, W. Schaffner, and U. H. Koszinowski.** 1985. A long and complex enhancer activates transcription of the gene coding for the highly abundant immediate early mRNA in murine cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**:8325–8329.
- Draper, R. K., and M. I. Simon.** 1980. The entry of diphtheria toxin into the mammalian cell cytoplasm: evidence for lysosomal involvement. *J. Cell Biol.* **87**:849–854.
- Dumas, A. M., J. L. Geelen, W. Maris, and J. Van der Noordaa.** 1980. Infectivity and molecular weight of Varicella-zoster virus. *J. Gen. Virol.* **47**: 233-235.
- Dunn, W., P. Trang, Q. Zhong, E. Yang, C. van Belle, and F. Liu.** 2005. Human cytomegalovirus expresses novel microRNAs during productive viral infection. *Cell. Microbiol.* **7**:1684–1695.
- Dunne, P. J., J. M. Faint, N. H. Gudgeon, J. M. Fletcher, F. J. Plunkett, M. V. D. Soares, A. D. Hislop, N. E. Annels, A. B. Rickinson, M. Salmon, and A. N. Akbar.** 2002. Epstein-Barr virus-specific CD8(+) T cells that re-express CD45RA are apoptosis-resistant memory cells that retain replicative potential. *Blood* **100**:933–940.
- Eberharter, A., and P. B. Becker.** 2002. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep.* **3**:224–229.
- Eickbush, T. H., and E. N. Moudrianakis.** 1978. The compaction of DNA helices into either continuous supercoils or folded-fiber rods and toroids. *Cell* **13**:295–306.
- Eickmann M., D. Gicklhorn, and K. Radsak.** 2006. Glycoprotein trafficking in virion morphogenesis. p 245-264. In: M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, UK.
- Emery, V. C., and P. D. Griffiths.** 1990. Molecular biology of cytomegalovirus. *Int J Exp Pathol* **71**:905–918.
- Epstein, M. A., G. Henle, B. G. Achong, and Y. M. Barr.** 1965. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from burkitts' lymphoma. *J. Exp. Med.* **121**:761–770.
- Erdbruegger, U., I. Scheffner, M. Mengel, A. Schwarz, W. Verhagen, H. Haller, and W. Gwinner.** 2012. Impact of CMV infection on acute rejection and long-term renal allograft function: a systematic analysis in patients with protocol biopsies and indicated biopsies. *Nephrol. Dial. Transplant.* **27**:435–443.
- Falnes, P. O., S. Ariansen, K. Sandvig, and S. Olsnes.** 2000. Requirement for prolonged action in the cytosol for optimal protein synthesis inhibition by diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.* **275**:4363–4368.
- Fazekas de St Groth.** 1982. The evaluation of limiting dilution assays. *J. Immunol. Methods* **49**:R11-23.
- Feinberg, A. P., and B. Vogelstein.** 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**:6–13.

- Finney, D.J.** 1952. *Statistical method in biological assay*. 1<sup>st</sup> ed., Charles Griffin, London, UK.
- Fish, K. N., S. G. Stenglein, C. Ibanez, and J. A. Nelson.** 1995. Cytomegalovirus persistence in macrophages and endothelial cells. *Scand J Infect Dis Suppl* **99**:34–40.
- Fisher, R.A.** 1922. On the mathematical foundations of theoretical statistics. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A.* **222**:309-368.
- Fortunato, E. A., A. K. McElroy, I. Sanchez, and D. H. Spector.** 2000. Exploitation of cellular signaling and regulatory pathways by human cytomegalovirus. *Trends Microbiol.* **8**:111–119.
- Frenkel, N., E. C. Schirmer, L. S. Wyatt, G. Katsafanas, E. Roffman, R. M. Danovich, and C. H. June.** 1990. Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**:748–752.
- Fuji, S., M. Kapp, G. U. Grigoleit, and H. Einsele.** 2011. Adoptive immunotherapy with virus-specific T cells. *Best Pract Res Clin Haematol* **24**:413–419.
- Gaglia, M. M., and B. A. Glaunsinger.** 2010. Viruses and the cellular RNA decay machinery. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **1**:47–59.
- Garber, D. A., S. M. Beverley, and D. M. Coen.** 1993. Demonstration of circularization of herpes simplex virus DNA following infection using pulsed field gel electrophoresis. *Virology* **197**:459–462.
- Gassen, H. G., and G. Schrimpf.** 2002. *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. 5<sup>th</sup> ed., Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg.
- Gatherer, D., S. Seirafian, C. Cunningham, M. Holton, D. J. Dargan, K. Baluchova, R. D. Hector, J. Galbraith, P. Herzyk, G. W. G. Wilkinson, and A. J. Davison.** 2011. High-resolution human cytomegalovirus transcriptome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**:19755–19760.
- Gerlach, C., J. W. J. van Heijst, E. Swart, D. Sie, N. Armstrong, R. M. Kerkhoven, D. Zehn, M. J. Bevan, K. Schepers, and T. N. M. Schumacher.** 2010. One naive T cell, multiple fates in CD8+ T cell differentiation. *J. Exp. Med.* **207**:1235–1246.
- Ghazal, P., A. E. Visser, M. Gustems, R. García, E. M. Borst, K. Sullivan, M. Messerle, and A. Angulo.** 2005. Elimination of ie1 significantly attenuates murine cytomegalovirus virulence but does not alter replicative capacity in cell culture. *J. Virol.* **79**:7182–7194.
- Gheryani, N., S. B. Coffelt, A. Gartland, R. M. H. Rumney, E. Kiss-Toth, C. E. Lewis, G. M. Tozer, D. R. Greaves, T. N. Dear, and G. Miller.** 2013. Generation of a novel mouse model for the inducible depletion of macrophages in vivo. *Genesis* **51**:41–49.
- Gibson, W.** 1996. Structure and assembly of the virion. *Intervirology* **39**:389–400.
- Gibson, W., and E. Bogner.** 2013. Morphogenesis of the cytomegalovirus virion and subviral particles. p 230-246. *In*: M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: From molecular pathogenesis to intervention*. vol.1. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, UK.
- Gold, M. C., M. W. Munks, M. Wagner, U. H. Koszinowski, A. B. Hill, and S. P. Fling.** 2002. The murine cytomegalovirus immunomodulatory gene m152 prevents recognition of infected cells by M45-specific CTL but does not alter the immunodominance of the M45-specific CD8 T cell response in vivo. *J. Immunol.* **169**:359–365.
- Goodrum, F. D., C. T. Jordan, K. High, and T. Shenk.** 2002. Human cytomegalovirus gene expression during infection of primary hematopoietic progenitor cells: a model for latency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**:16255–16260.
- Goodrum, F., C. T. Jordan, S. S. Terhune, K. High, and T. Shenk.** 2004. Differential outcomes of human cytomegalovirus infection in primitive hematopoietic cell subpopulations. *Blood* **104**:687–695.

- Goodrum, F., M. Reeves, J. Sinclair, K. High, and T. Shenk.** 2007. Human cytomegalovirus sequences expressed in latently infected individuals promote a latent infection in vitro. *Blood* **110**:937–945.
- Greenfield, L., M. J. Bjorn, G. Horn, D. Fong, G. A. Buck, R. J. Collier, and D. A. Kaplan.** 1983. Nucleotide sequence of the structural gene for diphtheria toxin carried by corynebacteriophage beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**:6853–6857.
- Grey, F., A. Antoniewicz, E. Allen, J. Saugstad, A. McShea, J. C. Carrington, and J. Nelson.** 2005. Identification and characterization of human cytomegalovirus-encoded microRNAs. *J. Virol.* **79**:12095–12099.
- Groves, I. J., M. B. Reeves, and J. H. Sinclair.** 2009. Lytic infection of permissive cells with human cytomegalovirus is regulated by an intrinsic 'pre-immediate-early' repression of viral gene expression mediated by histone post-translational modification. *J. Gen. Virol.* **90**:2364–2374.
- Gruter, W.** 1924. Das Herpesvirus, seine aetiologische und klinische Bedeutung. *Muench. Med. Wochenschr.* **71**: 1058-1060.
- Grzimek, N. K., D. Dreis, S. Schmalz, and M. J. Reddehase.** 2001. Random, asynchronous, and asymmetric transcriptional activity of enhancer-flanking major immediate-early genes *ie1/3* and *ie2* during murine cytomegalovirus latency in the lungs. *J. Virol.* **75**:2692–2705.
- Guermonez, P., L. Saveanu, M. Kleijmeer, J. Davoust, P. van Endert, and S. Amigorena.** 2003. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* **425**:397–402.
- Hahn, G., R. Jores, and E. S. Mocarski.** 1998. Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**:3937–3942.
- Hamann, D., P. A. Baars, M. H. Rep, B. Hooibrink, S. R. Kerkhof-Garde, M. R. Klein, and R. A. van Lier.** 1997. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* **186**:1407–1418.
- Hancock, M. H., I. Landais, L. M. Hook, F. Grey, R. Tirabassi and J. A. Nelson.** 2013. Cytomegalovirus-encoded miRNAs. p 68-85. *In*: M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: From molecular pathogenesis to intervention*. vol.1. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, UK.
- Harty, J. T., and V. P. Badovinac.** 2008. Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nat. Rev. Immunol.* **8**:107–119.
- Haynes, J. L.** 1988. Principles of flow cytometry. *Cytometry Suppl.* **3**:7–17.
- Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, and S. Akira.** 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**:740–745.
- Henson, S. M., O. Franzese, R. Macaulay, V. Libri, R. I. Azevedo, S. Kiani-Alikhan, F. J. Plunkett, J. E. Masters, S. Jackson, S. J. Griffiths, H.-P. Pircher, M. V. D. Soares, and A. N. Akbar.** 2009. KLRG1 signaling induces defective Akt (ser473) phosphorylation and proliferative dysfunction of highly differentiated CD8+ T cells. *Blood* **113**:6619–6628.
- Hochrein, H., K. Shortman, D. Vremec, B. Scott, P. Hertzog, and M. O'Keeffe.** 2001. Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. *J. Immunol.* **166**:5448–5455.
- Holland, P. M., R. D. Abramson, R. Watson, and D. H. Gelfand.** 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**:7276–7280.
- Holtappels, R., D. Thomas, J. Podlech, and M. J. Reddehase.** 2002. Two antigenic peptides from genes *m123* and *m164* of murine cytomegalovirus quantitatively dominate CD8 T-cell memory in the H-2d haplotype. *J. Virol.* **76**:151–164.

- Holtappels, R., J. Podlech, G. Geginat, H. P. Steffens, D. Thomas, and M. J. Reddehase.** 1998. Control of murine cytomegalovirus in the lungs: relative but not absolute immunodominance of the immediate-early 1 nonapeptide during the antiviral cytolytic T-lymphocyte response in pulmonary infiltrates. *J. Virol.* **72**:7201–7212.
- Holtappels, R., J. Podlech, M.-F. Pahl-Seibert, M. Jülch, D. Thomas, C. O. Simon, M. Wagner, and M. J. Reddehase.** 2004. Cytomegalovirus misleads its host by priming of CD8 T cells specific for an epitope not presented in infected tissues. *J. Exp. Med.* **199**:131–136.
- Holtappels, R., M. F. Pahl-Seibert, D. Thomas, and M. J. Reddehase.** 2000. Enrichment of immediate-early 1 (m123/pp89) peptide-specific CD8 T cells in a pulmonary CD62L(lo) memory-effector cell pool during latent murine cytomegalovirus infection of the lungs. *J. Virol.* **74**:11495–11503.
- Holtappels, R., M. W. Munks, J. Podlech, and M. J. Reddehase.** 2006. CD8 T-cell-based immunotherapy of cytomegalovirus disease in the mouse model of the immunocompromised bone marrow transplantation recipient. p 383-418. *In*: M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, UK.
- Holtappels, R., S. Ebert, J. Podlech, A. Fink, V. Böhm, N.A.W. Lemmermann, K. Freitag, A. Renzaho, D. Thomas, and M.J. Reddehase.** 2013. Murine model for cytoimmunotherapy of CMV disease after hematopoietic cell transplantation. p 354-381. *In*: M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: From molecular pathogenesis to intervention*. vol.2. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, UK.
- Holtappels, R., V. Böhm, J. Podlech, and M. J. Reddehase.** 2008. CD8 T-cell-based immunotherapy of cytomegalovirus infection: "proof of concept" provided by the murine model. *Med. Microbiol. Immunol.* **197**:125–134.
- Honess, R. W., and B. Roizman.** 1974. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J. Virol.* **14**:8–19.
- Hu, Y., and G. K. Smyth.** 2009. ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *J. Immunol. Methods* **347**:70–78. doi:10.1016/j.jim.2009.06.008.
- Huber, M. T., and T. Compton.** 1997. Characterization of a novel third member of the human cytomegalovirus glycoprotein H-glycoprotein L complex. *J. Virol.* **71**:5391–5398.
- Humar, A., and D. Snyderman.** 2009. Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Am. J. Transplant.* **9**:78-86.
- Hummel, M., Z. Zhang, S. Yan, I. DePlaen, P. Golia, T. Varghese, G. Thomas, and M. I. Abecassis.** 2001. Allogeneic transplantation induces expression of cytomegalovirus immediate-early genes in vivo: a model for reactivation from latency. *J. Virol.* **75**:4814–4822.
- Huppmann, A. R., and J. M. Orenstein.** 2010. Opportunistic disorders of the gastrointestinal tract in the age of highly active antiretroviral therapy. *Hum. Pathol.* **41**:1777–1787.
- Hwang, J.-S., and E. Bogner.** 2002. ATPase activity of the terminase subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *J. Biol. Chem.* **277**:6943–6948.
- Ibanez, C. E., R. Schrier, P. Ghazal, C. Wiley, and J. A. Nelson.** 1991. Human cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages. *J. Virol.* **65**:6581–6588.
- Irmiere, A., and W. Gibson.** 1983. Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology* **130**:118–133.
- Isaacson, M. K., and T. Compton.** 2009. Human cytomegalovirus glycoprotein B is required for virus entry and cell-to-cell spread but not for virion attachment, assembly, or egress. *J. Virol.* **83**:3891–3903.

- Iskenderian, A. C., L. Huang, A. Reilly, R. M. Stenberg, and D. G. Anders.** 1996. Four of eleven loci required for transient complementation of human cytomegalovirus DNA replication cooperate to activate expression of replication genes. *J. Virol.* **70**:383–392.
- Isomura, H., M. F. Stinski, T. Murata, Y. Yamashita, T. Kanda, S. Toyokuni, and T. Tsurumi.** 2011. The human cytomegalovirus gene products essential for late viral gene expression assemble into prereplication complexes before viral DNA replication. *J. Virol.* **85**:6629–6644.
- Iwamoto, R., S. Higashiyama, T. Mitamura, N. Taniguchi, M. Klagsbrun, and E. Mekada.** 1994. Heparin-binding EGF-like growth factor, which acts as the diphtheria toxin receptor, forms a complex with membrane protein DRAP27/CD9, which up-regulates functional receptors and diphtheria toxin sensitivity. *EMBO J.* **13**:2322–2330.
- Iwayama, S., T. Yamamoto, T. Furuya, R. Kobayashi, K. Ikuta, and K. Hirai.** 1994. Intracellular localization and DNA-binding activity of a class of viral early phosphoproteins in human fibroblasts infected with human cytomegalovirus (Towne strain). *J. Gen. Virol.* **75**:3309–3318.
- Iyoda, T., S. Shimoyama, K. Liu, Y. Omatsu, Y. Akiyama, Y. Maeda, K. Takahara, R. M. Steinman, and K. Inaba.** 2002. The CD8<sup>+</sup> dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J. Exp. Med.* **195**:1289–1302.
- Janeway, C. A., and R. Medzhitov.** 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**:197–216.
- Jarvis, M. A., and J. A. Nelson.** 2002. Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**:403–407.
- Jenkins, C., A. Abendroth, and B. Slobedman.** 2004. A novel viral transcript with homology to human interleukin-10 is expressed during latent human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* **78**:1440–1447.
- Jiang, X. J., B. Adler, K. L. Sampaio, M. Digel, G. Jahn, N. Ettischer, Y.-D. Stierhof, L. Scrivano, U. Koszinowski, M. Mach, and C. Sinzger.** 2008. UL74 of human cytomegalovirus contributes to virus release by promoting secondary envelopment of virions. *J. Virol.* **82**:2802–2812.
- Joffre, O. P., E. Segura, A. Savina, and S. Amigorena.** 2012. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* **12**:557–569.
- Jonjić, S., I. Pavić, B. Polić, I. Crnković, P. Lucin, and U. H. Koszinowski.** 1994. Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J. Exp. Med.* **179**:1713–1717.
- Jonjić, S., W. Mutter, F. Weiland, M. J. Reddehase, and U. H. Koszinowski.** 1989. Site-restricted persistent cytomegalovirus infection after selective long-term depletion of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **169**:1199–1212.
- Joshi, N. S., W. Cui, A. Chandele, H. K. Lee, D. R. Urso, J. Hagman, L. Gapin, and S. M. Kaech.** 2007. Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8<sup>(+)</sup> T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity* **27**:281–295.
- Jurak, I., and W. Brune.** 2006. Induction of apoptosis limits cytomegalovirus cross-species infection. *EMBO J.* **25**:2634–2642.
- Kaech, S. M., E. J. Wherry, and R. Ahmed.** 2002. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* **2**:251–262.
- Kaech, S. M., J. T. Tan, E. J. Wherry, B. T. Konieczny, C. D. Surh, and R. Ahmed.** 2003. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat. Immunol.* **4**:1191–1198.
- Kaern, M., T. C. Elston, W. J. Blake, and J. J. Collins.** 2005. Stochasticity in gene expression: from theories to phenotypes. *Nat. Rev. Genet.* **6**:451–464.

- Kalejta, R. F.** 2008. Functions of human cytomegalovirus tegument proteins prior to immediate early gene expression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **325**:101–115.
- Kalia, V., S. Sarkar, S. Subramaniam, W. N. Haining, K. A. Smith, and R. Ahmed.** 2010. Prolonged interleukin-2 $\alpha$  expression on virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. *Immunity* **32**:91–103.
- Kari, B., and R. Gehrz.** 1992. A human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II is a major heparin-binding component of the envelope. *J. Virol.* **66**:1761–1764.
- Kari, B., and R. Gehrz.** 1993. Structure, composition and heparin binding properties of a human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II. *J. Gen. Virol.* **74**:255–264.
- Kärre, K.** 1985. Role of target histocompatibility antigens in regulation of natural killer activity. A reevaluation and a hypothesis. p 81-91. *In*: R. B. Habermann, and D. M. Callewaert (eds.), *Mechanisms of NK cell mediated cytotoxicity*. Academic Press, Orlando.
- Karrer, U., S. Sierro, M. Wagner, A. Oxenius, H. Hengel, U. H. Koszinowski, R. E. Phillips, and P. Klenerman.** 2003. Memory inflation: continuous accumulation of antiviral CD8<sup>+</sup> T cells over time. *J. Immunol.* **170**:2022–2029.
- Kato, I., and A. M. Pappenheimer.** 1960. An early effect of diphtheria toxin on the metabolism of mammalian cells growing in culture. *J. Exp. Med.* **112**:329–349.
- Kattenhorn, L. M., R. Mills, M. Wagner, A. Lomsadze, V. Makeev, M. Borodovsky, H. L. Ploegh, and B. M. Kessler.** 2004. Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions. *J. Virol.* **78**:11187–11197.
- Katz, P., A. M. Zaytoun, and J. H. Lee.** 1985. Characterization of corticosteroid receptors in natural killer cells: comparison with circulating lymphoid and myeloid cells. *Cell. Immunol.* **94**:347–352.
- Kawai, T., and S. Akira.** 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**:373–384.
- Keil, G. M., A. Ebeling-Keil, and U. H. Koszinowski.** 1984. Temporal regulation of murine cytomegalovirus transcription and mapping of viral RNA synthesized at immediate early times after infection. *J. Virol.* **50**:784–795.
- Kenneson, A., and M. J. Cannon.** 2007. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev. Med. Virol.* **17**:253–276.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie.** 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**:239–257.
- Kerry, J. A., M. A. Priddy, T. Y. Jervey, C. P. Kohler, T. L. Staley, C. D. Vanson, T. R. Jones, A. C. Iskenderian, D. G. Anders, and R. M. Stenberg.** 1996. Multiple regulatory events influence human cytomegalovirus DNA polymerase (UL54) expression during viral infection. *J. Virol.* **70**:373–382.
- Khan, N., N. Shariff, M. Cobbold, R. Bruton, J. A. Ainsworth, A. J. Sinclair, L. Nayak, and P. A. H. Moss.** 2002. Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. *J. Immunol.* **169**:1984–1992.
- Khochbin, S., A. Verdel, C. Lemercier, and D. Seigneurin-Berny.** 2001. Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**:162–166.
- Khorasanizadeh, S.** 2004. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* **116**:259–272.
- Kidd, I. M., D. A. Clark, C. A. Sabin, D. Andrew, A. F. Hassan-Walker, P. Sweny, P. D. Griffiths, and V. C. Emery.** 2000. Prospective study of human betaherpesviruses after renal transplantation: association of human herpesvirus 7 and cytomegalovirus co-infection with cytomegalovirus disease and increased rejection. *Transplantation* **69**:2400–2404.



- King, A. M.Q., M. J. Adams, E. B. Carstens, and E. J. Lefkowitz** (eds.). 2012. *Virus taxonomy: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, CA.
- Kleijmeer, M. J., J. M. Escola, F. G. UytdeHaag, E. Jakobson, J. M. Griffith, A. D. Osterhaus, W. Stoorvogel, C. J. Melief, C. Rabouille, and H. J. Geuze**. 2001. Antigen loading of MHC class I molecules in the endocytic tract. *Traffic* **2**:124–137.
- Kloetzel, P. M.** 2001. Antigen processing by the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**:179–187.
- Klonowski, K. D., K. J. Williams, A. L. Marzo, and L. Lefrançois**. 2006. Cutting edge: IL-7-independent regulation of IL-7 receptor alpha expression and memory CD8 T cell development. *J. Immunol.* **177**:4247–4251.
- Koch, S., R. Solana, O. Dela Rosa, and G. Pawelec**. 2006. Human cytomegalovirus infection and T cell immunosenescence: a mini review. *Mech. Ageing Dev.* **127**:538–543.
- Koffron, A. J., B. K. Patterson, S. Yan, D. B. Kaufman, J. P. Fryer, F. P. Stuart, and M. I. Abecassis**. 1997. Latent human cytomegalovirus: a functional study. *Transplant. Proc.* **29**:793–795.
- Koffron, A. J., M. Hummel, B. K. Patterson, S. Yan, D. B. Kaufman, J. P. Fryer, F. P. Stuart, and M. I. Abecassis**. 1998. Cellular localization of latent murine cytomegalovirus. *J. Virol.* **72**:95–103.
- Kondo, K., H. Kaneshima, and E. S. Mocarski**. 1994a. Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**:11879–11883.
- Kondo, K., J. Xu, and E. S. Mocarski**. 1996. Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocyte-macrophage progenitors in culture and in seropositive individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**:11137–11142.
- Kondo, M., Y. Ohashi, K. Tada, M. Nakamura, and K. Sugamura**. 1994b. Expression of the mouse interleukin-2 receptor gamma chain in various cell populations of the thymus and spleen. *Eur. J. Immunol.* **24**:2026–2030.
- Koopman, G., C. P. Reutelingsperger, G. A. Kuijten, R. M. Keehnen, S. T. Pals, and M. H. van Oers**. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* **84**:1415–1420.
- Korioth, F., G. G. Maul, B. Plachter, T. Stamminger, and J. Frey**. 1996. The nuclear domain 10 (ND10) is disrupted by the human cytomegalovirus gene product IE1. *Exp. Cell Res.* **229**:155–158.
- Koszinowski, U. H., M. Del Val, and M. J. Reddehase**. 1990. Cellular and molecular basis of the protective immune response to cytomegalovirus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **154**:189–220.
- Kotenko, S. V., S. Sacconi, L. S. Izotova, O. V. Mirochnitchenko, and S. Pestka**. 2000. Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**:1695–1700.
- Krug, A., R. Uppaluri, F. Facchetti, B. G. Dorner, K. C. F. Sheehan, R. D. Schreiber, M. Cella, and M. Colonna**. 2002. IFN-producing cells respond to CXCR3 ligands in the presence of CXCL12 and secrete inflammatory chemokines upon activation. *J. Immunol.* **169**:6079–6083.
- Kuo, M. H., and C. D. Allis**. 1998. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* **20**:615–626.
- Kurts, C., B. W. S. Robinson, and P. A. Knolle**. 2010. Cross-priming in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **10**:403–414.
- Kurz, S. K., and M. J. Reddehase**. 1999. Patchwork pattern of transcriptional reactivation in the lungs indicates sequential checkpoints in the transition from murine cytomegalovirus latency to recurrence. *J. Virol.* **73**:8612–8622.

- Kurz, S. K., M. Rapp, H. P. Steffens, N. K. Grzimek, S. Schmalz, and M. J. Reddehase.** 1999. Focal transcriptional activity of murine cytomegalovirus during latency in the lungs. *J. Virol.* **73**:482–494.
- Kurz, S., H. P. Steffens, A. Mayer, J. R. Harris, and M. J. Reddehase.** 1997. Latency versus persistence or intermittent recurrences: evidence for a latent state of murine cytomegalovirus in the lungs. *J. Virol.* **71**:2980–2987.
- Lafemina, R. L., and G. S. Hayward.** 1988. Differences in cell-type-specific blocks to immediate early gene expression and DNA replication of human, simian and murine cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* **69**:355–374.
- Larsson, S., C. Söderberg-Nauclér, F. Z. Wang, and E. Möller.** 1998. Cytomegalovirus DNA can be detected in peripheral blood mononuclear cells from all seropositive and most seronegative healthy blood donors over time. *Transfusion* **38**:271–278.
- Lee, J. Y., A. Irmiere, and W. Gibson.** 1988. Primate cytomegalovirus assembly: evidence that DNA packaging occurs subsequent to B capsid assembly. *Virology* **167**:87–96.
- Lee, S. H., S. Girard, D. Macina, M. Busà, A. Zafer, A. Belouchi, P. Gros, and S. M. Vidal.** 2001. Susceptibility to mouse cytomegalovirus is associated with deletion of an activating natural killer cell receptor of the C-type lectin superfamily. *Nat. Genet.* **28**:42–45.
- Lefrançois, L., and J. J. Obar.** 2010. Once a killer, always a killer: from cytotoxic T cell to memory cell. *Immunol. Rev.* **235**:206–218.
- Lemmermann, N. A. W., J. Podlech, C. K. Seckert, K. A. Kropp, N. K. A. Grzimek, M. J. R. Reddehase, and R. Holtappels.** 2010. CD8 T-cell immunotherapy of cytomegalovirus disease in the murine model. *Methods in Microbiology.* **73**:369–437.
- Lewis, B. P., C. B. Burge, and D. P. Bartel.** 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**:15–20.
- Li, L., J. A. Nelson, and W. J. Britt.** 1997. Glycoprotein H-related complexes of human cytomegalovirus: identification of a third protein in the gCIII complex. *J. Virol.* **71**:3090–3097.
- Lindquister, G. J., and P. E. Pellett.** 1991. Properties of the human herpesvirus 6 strain Z29 genome: G + C content, length, and presence of variable-length directly repeated terminal sequence elements. *Virology* **182**:102–110.
- Liu, X.-F., S. Yan, M. Abecassis, and M. Hummel.** 2008. Establishment of murine cytomegalovirus latency in vivo is associated with changes in histone modifications and recruitment of transcriptional repressors to the major immediate-early promoter. *J. Virol.* **82**:10922–10931.
- Liu, X.-F., S. Yan, M. Abecassis, and M. Hummel.** 2010. Biphasic recruitment of transcriptional repressors to the murine cytomegalovirus major immediate-early promoter during the course of infection in vivo. *J. Virol.* **84**:3631–3643.
- Loewendorf, A. I., L. Steinbrueck, C. Peter, A. Busche, C. A. Benedict, and P. C. Kay-Jackson.** 2011. The mouse cytomegalovirus glycoprotein m155 inhibits CD40 expression and restricts CD4 T cell responses. *J. Virol.* **85**:5208–5212.
- Lunetta, J. M., and J. A. Wiedeman.** 2000. Latency-associated sense transcripts are expressed during in vitro human cytomegalovirus productive infection. *Virology* **278**:467–476.
- Lusser, A.** 2002. Acetylated, methylated, remodeled: chromatin states for gene regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**:437–443.
- MacAry, P. A., M. Lindsay, M. A. Scott, J. I. Craig, J. P. Luzio, and P. J. Lehner.** 2001. Mobilization of MHC class I molecules from late endosomes to the cell surface following activation of CD34-derived human Langerhans cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**:3982–3987.

- Mach M., A.-K. Wieggers, N. Spindler and T. Winkler.** 2013. Protective humoral immunity. p 215-231. *In:* M. J. Reddehase (ed.), Cytomegaloviruses: From molecular pathogenesis to intervention. vol.2. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, UK.
- Mach, M., B. Kropff, P. Dal Monte, and W. Britt.** 2000. Complex formation by human cytomegalovirus glycoproteins M (gpUL100) and N (gpUL73). *J. Virol.* **74**:11881–11892.
- Manchester, K. L.** 1996. Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations. *BioTechniques* **20**:968–970.
- Marcinowski, L., M. Lidschreiber, L. Windhager, M. Rieder, J. B. Bosse, B. Rädle, T. Bonfert, I. Györy, M. de Graaf, O. Prazeres da Costa, P. Rosenstiel, C. C. Friedel, R. Zimmer, Z. Ruzsics, and L. Dölken.** 2012. Real-time transcriptional profiling of cellular and viral gene expression during lytic cytomegalovirus infection. *PLoS Pathog.* **8**:e1002908.
- Marks, J. R., and D. H. Spector.** 1984. Fusion of the termini of the murine cytomegalovirus genome after infection. *J. Virol.* **52**:24–28.
- Martignetti, J. A., and B. G. Barrell.** 1991. Sequence of the HindIII T fragment of human cytomegalovirus, which encodes a DNA helicase. *J. Gen. Virol.* **72**:1113–1121.
- Martin, S. J., C. P. Reutelingsperger, A. J. McGahon, J. A. Rader, R. C. van Schie, D. M. LaFace, and D. R. Green.** 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* **182**:1545–1556.
- Masopust, D., V. Vezys, A. L. Marzo, and L. Lefrançois.** 2001. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* **291**:2413–2417.
- Masouredis, S. P.** 1958. Behavior of intravenously administered I<sup>131</sup> diphtheria toxin in the guinea pig. *J. Immunol.* **82**:319–327.
- Maul, G. G.** 1998. Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication. *Bioessays* **20**:660–667.
- Maul, G. G.** 2008. Initiation of cytomegalovirus infection at ND10. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **325**:117–132.
- McKeating, J. A., J. E. Grundy, Z. Varghese, and P. D. Griffiths.** 1986. Detection of cytomegalovirus by ELISA in urine samples is inhibited by beta 2 microglobulin. *J. Med. Virol.* **18**:341–348.
- Meier, J. L.** 2001. Reactivation of the human cytomegalovirus major immediate-early regulatory region and viral replication in embryonal NTera2 cells: role of trichostatin A, retinoic acid, and deletion of the 21-base-pair repeats and modulator. *J. Virol.* **75**:1581–1593.
- Mekada, E., K. Kohno, M. Ishiura, T. Uchida, and Y. Okada.** 1982. Methylamine facilitates demonstration of specific uptake of diphtheria toxin by CHO cell and toxin-resistant CHO cell mutants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **109**:792–799.
- Mendelson, M., S. Monard, P. Sissons, and J. Sinclair.** 1996. Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *J. Gen. Virol.* **77**:3099–3102.
- Mercer, J. A., C. A. Wiley, and D. H. Spector.** 1988. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection: identification of infected cells in the spleen during acute and latent infections. *J. Virol.* **62**:987–997.
- Mescher, M. F., J. M. Curtsinger, P. Agarwal, K. A. Casey, M. Gerner, C. D. Hammerbeck, F. Popescu, and Z. Xiao.** 2006. Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol. Rev.* **211**:81–92.

- Messerle, M., B. Bühler, G. M. Keil, and U. H. Koszinowski.** 1992. Structural organization, expression, and functional characterization of the murine cytomegalovirus immediate-early gene 3. *J. Virol.* **66**:27–36.
- Messerle, M., I. Crnkovic, W. Hammerschmidt, H. Ziegler, and U. H. Koszinowski.** 1997. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**:14759–14763.
- Metcalf, D.** 1989. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature* **339**:27–30.
- Minton, E. J., C. Tysoe, J. H. Sinclair, and J. G. Sissons.** 1994. Human cytomegalovirus infection of the monocyte/macrophage lineage in bone marrow. *J. Virol.* **68**:4017–4021.
- Mitamura, T., T. Umata, F. Nakano, Y. Shishido, T. Toyoda, A. Itai, H. Kimura, and E. Mekada.** 1997. Structure-function analysis of the diphtheria toxin receptor toxin binding site by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **272**:27084–27090.
- Mizzen, C. A., and C. D. Allis.** 1998. Linking histone acetylation to transcriptional regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**:6–20.
- Mocarski, E. S., T. Shenk, and R. F. Pass.** 2006. Cytomegaloviruses, p 2701–22772. *In*: D.M. Knipe, and P.M. Howley (eds.), *Fields Virology*, 5<sup>th</sup> ed., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.
- Mocarski, E.S., and C.T. Courcelle.** 2001. Cytomegaloviruses and their replication. p 2629–2673. *In*: D.M. Knipe, and P.M. Howley (eds.), *Fields Virology*, 4<sup>th</sup> ed., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.
- Mocarski, E.S., T. Shenk, and R.F. Pass.** 2007. Cytomegaloviruses. p 2701–2772. *In*: D.M. Knipe, and P.M. Howley (eds.), *Fields Virology*, 5<sup>th</sup> ed., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.
- Mohr, C. A., J. Arapovic, H. Mühlbach, M. Panzer, A. Weyn, L. Dölken, A. Krmpotic, D. Voehringer, Z. Ruzsics, U. Koszinowski, and T. Sacher.** 2010. A spread-deficient cytomegalovirus for assessment of first-target cells in vaccination. *J. Virol.* **84**:7730–7742.
- Morimoto, H., and B. Bonavida.** 1992. Diphtheria toxin- and *Pseudomonas A* toxin-mediated apoptosis. ADP ribosylation of elongation factor-2 is required for DNA fragmentation and cell lysis and synergy with tumor necrosis factor-alpha. *J. Immunol.* **149**:2089–2094.
- Morris, R. E., A. S. Gerstein, P. F. Bonventre, and C. B. Saelinger.** 1985. Receptor-mediated entry of diphtheria toxin into monkey kidney (Vero) cells: electron microscopic evaluation. *Infect. Immun.* **50**:721–727.
- Moss, P.** 2010. The emerging role of cytomegalovirus in driving immune senescence: a novel therapeutic opportunity for improving health in the elderly. *Curr. Opin. Immunol.* **22**:529–534.
- Moya, M., A. Dautry-Varsat, B. Goud, D. Louvard, and P. Boquet.** 1985. Inhibition of coated pit formation in Hep2 cells blocks the cytotoxicity of diphtheria toxin but not that of ricin toxin. *J. Cell Biol.* **101**:548–559.
- Mullis, K. B., and F. A. Faloona.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* **155**:335–350.
- Munks, M. W., K. S. Cho, A. K. Pinto, S. Sierro, P. Klenerman, and A. B. Hill.** 2006. Four distinct patterns of memory CD8 T cell responses to chronic murine cytomegalovirus infection. *J. Immunol.* **177**:450–458.
- Murali-Krishna, K., J. D. Altman, M. Suresh, D. Sourdive, A. Zajac, and R. Ahmed.** 1998. In vivo dynamics of anti-viral CD8 T cell responses to different epitopes. An evaluation of bystander activation in primary and secondary responses to viral infection. *Adv. Exp. Med. Biol.* **452**:123–142.
- Murphy, E., and T. Shenk.** 2008. Human cytomegalovirus genome. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **325**:1–19.

- Murphy, J. C., W. Fischle, E. Verdin, and J. H. Sinclair.** 2002. Control of cytomegalovirus lytic gene expression by histone acetylation. *EMBO J.* **21**:1112–1120.
- Mutter, W., M. J. Reddehase, F. W. Busch, H. J. Bühring, and U. H. Koszinowski.** 1988. Failure in generating hemopoietic stem cells is the primary cause of death from cytomegalovirus disease in the immunocompromised host. *J. Exp. Med.* **167**:1645–1658.
- Myerson, D., R. C. Hackman, J. A. Nelson, D. C. Ward, and J. K. McDougall.** 1984. Widespread presence of histologically occult cytomegalovirus. *Hum. Pathol.* **15**:430–439.
- Nagata, S.** 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* **88**:355–365.
- Naglich, J. G., J. E. Metherall, D. W. Russell, and L. Eidels.** 1992. Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. *Cell* **69**:1051–1061.
- Nitzsche, A., C. Paulus, and M. Nevels.** 2008. Temporal dynamics of cytomegalovirus chromatin assembly in productively infected human cells. *J. Virol.* **82**:11167–11180.
- Norbury, C. C., and L. J. Sigal.** 2003. Cross priming or direct priming: is that really the question? *Curr. Opin. Immunol.* **15**:82–88.
- Novotny, J., I. Rigoutsos, D. Coleman, and T. Shenk.** 2001. In silico structural and functional analysis of the human cytomegalovirus (HHV5) genome. *J. Mol. Biol.* **310**:1151–1166.
- Obar, J. J., and L. Lefrançois.** 2010a. Early events governing memory CD8+ T-cell differentiation. *Int. Immunol.* **22**:619–625.
- Obar, J. J., and L. Lefrançois.** 2010b. Memory CD8+ T cell differentiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1183**:251–266.
- Obar, J. J., E. R. Jellison, B. S. Sheridan, D. A. Blair, Q.-M. Pham, J. M. Zickovich, and L. Lefrançois.** 2011. Pathogen-induced inflammatory environment controls effector and memory CD8+ T cell differentiation. *J. Immunol.* **187**:4967–4978.
- Ogawa-Goto, K., K. Tanaka, W. Gibson, E. Moriishi, Y. Miura, T. Kurata, S. Irie, and T. Sata.** 2003. Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *J. Virol.* **77**:8541–8547.
- Ong, M. L., M. E. Wikstrom, P. Fleming, M. J. Estcourt, P. J. Hertzog, G. R. Hill, C. E. Andoniou, and M. A. Degli-Esposti.** 2013. CpG pre-treatment enhances anti-viral T cell immunity against cytomegalovirus. *Blood*.
- Ortaldo, J. R., and H. A. Young.** 2005. Mouse Ly49 NK receptors: balancing activation and inhibition. *Mol. Immunol.* **42**:445–450.
- Ortega, N., H. Hutchings, and J. Plouët.** 1999. Signal relays in the VEGF system. *Front. Biosci.* **4**:141-52.
- Oudet, P., M. Gross-Bellard, and P. Chambon.** 1975. Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* **4**:281–300.
- Pahl-Seibert, M.-F., M. Juelch, J. Podlech, D. Thomas, P. Deegen, M. J. Reddehase, and R. Holtappels.** 2005. Highly protective in vivo function of cytomegalovirus IE1 epitope-specific memory CD8 T cells purified by T-cell receptor-based cell sorting. *J. Virol.* **79**:5400–5413.
- Paludan, S. R., A. G. Bowie, K. A. Horan, and K. A. Fitzgerald.** 2011. Recognition of herpesviruses by the innate immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **11**:143–154.
- Pappenheimer, A. M.** 1977. Diphtheria toxin. *Annu. Rev. Biochem.* **46**:69–94.
- Pappenheimer, A. M., A. A. Harper, M. Moynihan, and J. P. Brockes.** 1982. Diphtheria toxin and related proteins: effect of route of injection on toxicity and the determination of cytotoxicity for various cultured cells. *J. Infect. Dis.* **145**:94–102.

- Pellett, P. E., and B. Roizman.** 2007. The family: Herpesviridae a brief introduction. p 2479-2500. *In*: D. M. Knipe and P. M. Howley (eds.), *Fields Virology*, 5<sup>th</sup> ed., Lippincott Williams and Wilkins, New York, USA.
- Perng, Y.-C., Z. Qian, A. R. Fehr, B. Xuan, and D. Yu.** 2011. The human cytomegalovirus gene UL79 is required for the accumulation of late viral transcripts. *J. Virol.* **85**:4841–4852.
- Pfeffer, S., A. Sewer, M. Lagos-Quintana, R. Sheridan, C. Sander, F. A. Grässer, L. F. van Dyk, C. K. Ho, S. Shuman, M. Chien, J. J. Russo, J. Ju, G. Randall, B. D. Lindenbach, C. M. Rice, V. Simon, D. D. Ho, M. Zavolan, and T. Tuschl.** 2005. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat. Methods* **2**:269–276.
- Pham, N.-L. L., V. P. Badovinac, and J. T. Harty.** 2009. A default pathway of memory CD8 T cell differentiation after dendritic cell immunization is deflected by encounter with inflammatory cytokines during antigen-driven proliferation. *J. Immunol.* **183**:2337–2348.
- Pipkin, M. E., J. A. Sacks, F. Cruz-Guilloty, M. G. Lichtenheld, M. J. Bevan, and A. Rao.** 2010. Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity* **32**:79–90.
- Plummer, G.** 1967. Comparative virology of the herpes group. *Prog. Med. Virol.* **9**:302–340.
- Podlech, J., R. Holtappels, M. F. Pahl-Seibert, H. P. Steffens, and M. J. Reddehase.** 2000. Murine model of interstitial cytomegalovirus pneumonia in syngeneic bone marrow transplantation: persistence of protective pulmonary CD8-T-cell infiltrates after clearance of acute infection. *J. Virol.* **74**:7496–7507.
- Podlech, J., R. Holtappels, N. K. A. Grzimek, and M. J. Reddehase.** 2002. Animal models: murine cytomegalovirus. p 493-525. *In*: S. H. E. Kaufmann and D. Kabelitz (eds.), *Methods in microbiology, immunology of infection*. 2<sup>nd</sup> ed., vol. 32, Academic Press, London and San Diego, CA.
- Pollock, J. L., and H. W. Virgin.** 1995. Latency, without persistence, of murine cytomegalovirus in the spleen and kidney. *J. Virol.* **69**:1762–1768.
- Pollock, J. L., R. M. Presti, S. Paetzold, and H. W. Virgin.** 1997. Latent murine cytomegalovirus infection in macrophages. *Virology* **227**:168–179.
- Pomeroy, C., P. J. Hilleren, and M. C. Jordan.** 1991. Latent murine cytomegalovirus DNA in splenic stromal cells of mice. *J. Virol.* **65**:3330–3334.
- Pooley, J. L., W. R. Heath, and K. Shortman.** 2001. Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *J. Immunol.* **166**:5327–5330.
- Pósfai, G., M. D. Koob, H. A. Kirkpatrick, and F. R. Blattner.** 1997. Versatile insertion plasmids for targeted genome manipulations in bacteria: isolation, deletion, and rescue of the pathogenicity island LEE of the *Escherichia coli* O157:H7 genome. *J. Bacteriol.* **179**:4426–4428.
- Potena, L., and H. A. Valantine.** 2007. Cytomegalovirus-associated allograft rejection in heart transplant patients. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **20**:425–431.
- Prösch, S., R. Wuttke, D. H. Krüger, and H.-D. Volk.** 2002. NF-kappaB--a potential therapeutic target for inhibition of human cytomegalovirus (re)activation? *Biol. Chem.* **383**:1601–1609.
- Quirici, N., D. Soligo, L. Caneva, F. Servida, P. Bossolasco, and G. L. Deliliers.** 2001. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Br. J. Haematol.* **115**:186–194.
- Raap, A. K., F. M. van de Rijke, R. W. Dirks, C. J. Sol, R. Boom, and M. van der Ploeg.** 1991. Bicolor fluorescence in situ hybridization to intron and exon mRNA sequences. *Exp. Cell Res.* **197**:319–322.

- Raghavan, A., and P. R. Bohjanen.** 2004. Microarray-based analyses of mRNA decay in the regulation of mammalian gene expression. *Brief Funct Genomic Proteomic* **3**:112–124.
- Rammensee, H. G., K. Falk, and O. Rötzschke.** 1993. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **11**:213–244.
- Randolph, G. J., V. Angeli, and M. A. Swartz.** 2005. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat. Rev. Immunol.* **5**:617–628.
- Rawlinson, W. D., H. E. Farrell, and B. G. Barrell.** 1996. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J. Virol.* **70**:8833–8849.
- Reddehase, M. J.** 1991. Bone marrow dysfunction in irradiated, cytomegalovirus-infected mice. *Transplant. Proc.* **23**:10-1.
- Reddehase, M. J.** 2002. Antigen and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat. Rev. Immunol.* **2**:831–844.
- Reddehase, M. J., and U. H. Koszinowski.** 1984. Significance of herpesvirus immediate early gene expression in cellular immunity to cytomegalovirus infection. *Nature* **312**:369–371.
- Reddehase, M. J., F. Weiland, K. Münch, S. Jonjic, A. Lüske, and U. H. Koszinowski.** 1985. Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *J. Virol.* **55**:264–273.
- Reddehase, M. J., G. M. Keil, and U. H. Koszinowski.** 1984. The cytolytic T lymphocyte response to the murine cytomegalovirus. II. Detection of virus replication stage-specific antigens by separate populations of in vivo active cytolytic T lymphocyte precursors. *Eur. J. Immunol.* **14**:56–61.
- Reddehase, M. J., J. B. Rothbard, and U. H. Koszinowski.** 1989. A pentapeptide as minimal antigenic determinant for MHC class I-restricted T lymphocytes. *Nature* **337**:651–653.
- Reddehase, M. J., J. Podlech, and N. K. A. Grzimek.** 2002. Mouse models of cytomegalovirus latency: overview. *J. Clin. Virol.* **25**:23-36.
- Redwood, A. J., G. R. Shellam, and L. M. Smith.** 2013. Molecular evolution of murine cytomegalovirus genomes. p 23-37. *In*: M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: From molecular pathogenesis to intervention*. vol1. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, UK.
- Reeves, M. B., P. J. Lehner, J. G. P. Sissons, and J. H. Sinclair.** 2005. An in vitro model for the regulation of human cytomegalovirus latency and reactivation in dendritic cells by chromatin remodelling. *J. Gen. Virol.* **86**:2949–2954.
- Reeves, M., and J. Sinclair.** 2013. Epigenetic regulation of human cytomegalovirus gene expression: impact on latency and reactivation. p 330-346. *In*: M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: From molecular pathogenesis to intervention*. vol.1. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, UK.
- Reeves, M., J. Murphy, R. Greaves, J. Fairley, A. Brehm, and J. Sinclair.** 2006. Autorepression of the human cytomegalovirus major immediate-early promoter/enhancer at late times of infection is mediated by the recruitment of chromatin remodeling enzymes by IE86. *J. Virol.* **80**:9998–10009.
- Reinhardt, R. L., A. Khoruts, R. Merica, T. Zell, and M. K. Jenkins.** 2001. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* **410**:101–105.
- Reusser, P., S. R. Riddell, J. D. Meyers, and P. D. Greenberg.** 1991. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* **78**:1373–1380.
- Riddell, S. R., K. S. Watanabe, J. M. Goodrich, C. R. Li, M. E. Agha, and P. D. Greenberg.** 1992. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* **257**:238–241.

- Riegler, S., H. Hebart, H. Einsele, P. Brossart, G. Jahn, and C. Sinzger.** 2000. Monocyte-derived dendritic cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* **81**:393–399.
- Riley, H. D.** 1997. History of the cytomegalovirus. *South. Med. J.* **90**:184–190.
- Roberts, W. H., J. M. Sneddon, J. Waldman, and R. E. Stephens.** 1989. Cytomegalovirus infection of gastrointestinal endothelium demonstrated by simultaneous nucleic acid hybridization and immunohistochemistry. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **113**:461–464.
- Robertson, E.S.** (ed.). 2010. Epstein–Barr virus: latency and transformation. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Roizman, B.** 1996. Herpes simplex viruses and their replication. p. 2231–2295. *In*: D.M. Knipe, and P.M. Howley (eds.), *Fields Virology*, 3<sup>th</sup> ed., Lippincott-Raven, Philadelphia, PA.
- Roizman, B., and A. E. Sears.** 1987. An inquiry into the mechanisms of herpes simplex virus latency. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**:543–571.
- Roizman, B., and J. Baines.** 1991. The diversity and unity of Herpesviridae. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **14**:63–79.
- Roizman, B., and W. Batterson.** 1986. Herpesviruses and their replication. p 607-636. *In*: B. N. Fields and D. M. Knipe (eds.), *Fundamental virology*. Raven Press, New York, N.Y.
- Roizman, B., L. E. Carmichael, F. Deinhardt, G. de-The, A. J. Nahmias, W. Plowright, F. Rapp, P. Sheldrick, M. Takahashi, and K. Wolf.** 1981. Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* **16**:201–217.
- Roizmann, B., R. C. Desrosiers, B. Fleckenstein, C. Lopez, A. C. Minson, and M. J. Studdert.** 1992. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* **123**:425–449.
- Ross, J.** 1995. mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol. Rev.* **59**:423–450.
- Röttschke, O., K. Falk, K. Deres, H. Schild, M. Norda, J. Metzger, G. Jung, and H. G. Rammensee.** 1990. Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature* **348**:252–254.
- Röttschke, O., K. Falk, S. Stevanović, G. Jung, P. Walden, and H. G. Rammensee.** 1991. Exact prediction of a natural T cell epitope. *Eur. J. Immunol.* **21**:2891–2894.
- Rowe, W. P., J. W. Hartley, S. Waterman, H. C. Turner, and R. J. Huebner.** 1956. Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **92**:418–424.
- Rubin, R. H.** 1990. Impact of cytomegalovirus infection on organ transplant recipients. *Rev. Infect. Dis.* **12**:754-66.
- Rubinstein, M. P., N. A. Lind, J. F. Purton, P. Filippou, J. A. Best, P. A. McGhee, C. D. Surh, and A. W. Goldrath.** 2008. IL-7 and IL-15 differentially regulate CD8<sup>+</sup> T-cell subsets during contraction of the immune response. *Blood* **112**:3704–3712.
- Rudolph, M. G., R. L. Stanfield, and I. A. Wilson.** 2006. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu. Rev. Immunol.* **24**:419–466.
- Ryckman, B. J., B. L. Rainish, M. C. Chase, J. A. Borton, J. A. Nelson, M. A. Jarvis, and D. C. Johnson.** 2008. Characterization of the human cytomegalovirus gH/gL/UL128-131 complex that mediates entry into epithelial and endothelial cells. *J. Virol.* **82**:60–70.



- Sacher, T., J. Podlech, C. A. Mohr, S. Jordan, Z. Ruzsics, M. J. Reddehase, and U. H. Koszinowski.** 2008. 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* **3**:263–272.
- Saffert, R. T., R. R. Penkert, and R. F. Kalejta.** 2010. Cellular and viral control over the initial events of human cytomegalovirus experimental latency in CD34+ cells. *J. Virol.* **84**:5594–5604.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487–491.
- Saito, M., T. Iwawaki, C. Taya, H. Yonekawa, M. Noda, Y. Inui, E. Mekada, Y. Kimata, A. Tsuru, and K. Kohno.** 2001. Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. *Nat. Biotechnol.* **19**:746–750.
- Salazar-Mather, T. P., J. S. Orange, and C. A. Biron.** 1998. Early murine cytomegalovirus (MCMV) infection induces liver natural killer (NK) cell inflammation and protection through macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha)-dependent pathways. *J. Exp. Med.* **187**:1–14.
- Sallusto, F., D. Lenig, R. Förster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia.** 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**:708–712.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Sanchez, V., E. Sztul, and W. J. Britt.** 2000. Human cytomegalovirus pp28 (UL99) localizes to a cytoplasmic compartment which overlaps the endoplasmic reticulum-golgi-intermediate compartment. *J. Virol.* **74**:3842–3851.
- Sanchez, V., K. D. Greis, E. Sztul, and W. J. Britt.** 2000. Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly. *J. Virol.* **74**:975–986.
- Sandvig, K., and S. Olsnes.** 1980. Diphtheria toxin entry into cells is facilitated by low pH. *J. Cell Biol.* **87**:828–832.
- Sarov, I., and I. Abady.** 1975. The morphogenesis of human cytomegalovirus. Isolation and polypeptide characterization of cytomegalovirions and dense bodies. *Virology* **66**:464–473.
- Sawtell, N. M., and R. L. Thompson.** 1992. Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcription unit promotes anatomical site-dependent establishment and reactivation from latency. *J. Virol.* **66**:2157–2169.
- Scalzo, A. A., N. A. Fitzgerald, A. Simmons, A. B. La Vista, and G. R. Shellam.** 1990. Cmv-1, a genetic locus that controls murine cytomegalovirus replication in the spleen. *J. Exp. Med.* **171**:1469–1483.
- Scalzo, A. A., N. A. Fitzgerald, C. R. Wallace, A. E. Gibbons, Y. C. Smart, R. C. Burton, and G. R. Shellam.** 1992. The effect of the Cmv-1 resistance gene, which is linked to the natural killer cell gene complex, is mediated by natural killer cells. *J. Immunol.* **149**:581–589.
- Scheffczik, H., C. G. W. Savva, A. Holzenburg, L. Kolesnikova, and E. Bogner.** 2002. The terminase subunits pUL56 and pUL89 of human cytomegalovirus are DNA-metabolizing proteins with toroidal structure. *Nucleic Acids Res.* **30**:1695–1703.
- Scheller, S.** 2011. *In vivo konditionale Depletion von latentem murinem Cytomegalovirus*. Dissertation in Biologie, Mainz.
- Schluns, K. S., W. C. Kieper, S. C. Jameson, and L. Lefrançois.** 2000. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nat. Immunol.* **1**:426–432.
- Schmitz, G. G., T. Walter, R. Seibl, and C. Kessler.** 1991. Nonradioactive labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Anal. Biochem.* **192**:222–231.

- Schneweis, K. E.** 1962. Serologische Untersuchungen zur Typendifferenzierung des Herpesvirus Hominis. *Z. Immunitätsforsch. Exp. Ther.* **124**:24-48.
- Schrage, A., C. Loddenkemper, U. Erben, U. Lauer, G. Hausdorf, P. R. Jungblut, J. Johnson, P. A. Knolle, M. Zeitz, A. Hamann, and K. Klugewitz.** 2008. Murine CD146 is widely expressed on endothelial cells and is recognized by the monoclonal antibody ME-9F1. *Histochem. Cell Biol.* **129**:441–451.
- Schulz, O., S. S. Diebold, M. Chen, T. I. Näslund, M. A. Nolte, L. Alexopoulou, Y.-T. Azuma, R. A. Flavell, P. Liljeström, and C. Reis e Sousa.** 2005. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* **433**:887–892.
- Schumacher, U., W. Handke, I. Jurak, and W. Brune.** 2010. Mutations in the M112/M113-coding region facilitate murine cytomegalovirus replication in human cells. *J. Virol.* **84**:7994–8006.
- Scrivano, L., J. Esterlechner, H. Mühlbach, N. Ettischer, C. Hagen, K. Grünewald, C. A. Mohr, Z. Ruzsics, U. Koszinowski, and B. Adler.** 2010. The m74 gene product of murine cytomegalovirus (MCMV) is a functional homolog of human CMV gO and determines the entry pathway of MCMV. *J. Virol.* **84**:4469–4480.
- Seckert, C. K., A. Renzaho, H.-M. Tervo, C. Krause, P. Deegen, B. Kühnapfel, M. J. Reddehase, and N. K. A. Grzimek.** 2009. Liver sinusoidal endothelial cells are a site of murine cytomegalovirus latency and reactivation. *J. Virol.* **83**:8869–8884.
- Seckert, C. K., M. Griebel, J. K. Büttner, K. Freitag, N. A. W. Lemmermann, M. A. Hummel, X.-F. Liu, M. I. Abecassis, A. Angulo, M. Messerle, C. H. Cook, and M. J. Reddehase.** 2013. Immune surveillance of cytomegalovirus latency and reactivation in murine models: link to 'memory inflation'. p 374-416. *In*: M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: From molecular pathogenesis to intervention*. vol.1. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, UK.
- Seckert, C. K., M. Griessl, J. K. Büttner, S. Scheller, C. O. Simon, K. A. Kropp, A. Renzaho, B. Kühnapfel, N. K. A. Grzimek, and M. J. Reddehase.** 2012. Viral latency drives 'memory inflation': a unifying hypothesis linking two hallmarks of cytomegalovirus infection. *Med. Microbiol. Immunol.* **201**:551–566.
- Seckert, C. K., S. I. Schader, S. Ebert, D. Thomas, K. Freitag, A. Renzaho, J. Podlech, M. J. Reddehase, and R. Holtappels.** 2011. Antigen-presenting cells of haematopoietic origin prime cytomegalovirus-specific CD8 T-cells but are not sufficient for driving memory inflation during viral latency. *J. Gen. Virol.* **92**:1994–2005.
- Shen, L., and K. L. Rock.** 2006. Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class I molecules. *Curr. Opin. Immunol.* **18**:85–91.
- Shen, W. H., S. Choe, D. Eisenberg, and R. J. Collier.** 1994. Participation of lysine 516 and phenylalanine 530 of diphtheria toxin in receptor recognition. *J. Biol. Chem.* **269**:29077–29084.
- Shortman, K., and Y.-J. Liu.** 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* **2**:151–161.
- Simon, C. O., B. Kühnapfel, M. J. Reddehase, and N. K. A. Grzimek.** 2007. Murine cytomegalovirus major immediate-early enhancer region operating as a genetic switch in bidirectional gene pair transcription. *J. Virol.* **81**:7805–7810.
- Simon, C. O., C. K. Seckert, D. Dreis, M. J. Reddehase, and N. K. A. Grzimek.** 2005. Role for tumor necrosis factor alpha in murine cytomegalovirus transcriptional reactivation in latently infected lungs. *J. Virol.* **79**:326–340.
- Simon, C. O., C. K. Seckert, N. K. Grzimek, and M. J. Reddehase.** 2006a. Murine model of cytomegalovirus latency and reactivation: the silencing/desilencing and immune sensing hypothesis. p 483-500. *In*: M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, UK.

- Simon, C. O., R. Holtappels, H.-M. Tervo, V. Böhm, T. Däubner, S. A. Oehrlein-Karpi, B. Kühnapfel, A. Renzaho, D. Strand, J. Podlech, M. J. Reddehase, and N. K. A. Grzimek.** 2006b. CD8 T cells control cytomegalovirus latency by epitope-specific sensing of transcriptional reactivation. *J. Virol.* **80**:10436–10456.
- Sinclair, J., and P. Sissons.** 2006. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* **87**:1763–1779.
- Sinzger, C., M. Kahl, K. Laib, K. Klingel, P. Rieger, B. Plachter, and G. Jahn.** 2000. Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is determined by a post-entry step dependent on efficient translocation to the nucleus. *J. Gen. Virol.* **81**:3021–3035.
- Slobedman, B., and E. S. Mocarski.** 1999. Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus. *J. Virol.* **73**:4806–4812.
- Slobedman, B., J. Z. Cao, S. Avdic, B. Webster, S. McAllery, A. K. Cheung, J. C. Tan, and A. Abendroth.** 2010. Human cytomegalovirus latent infection and associated viral gene expression. *Future Microbiol* **5**:883–900.
- Slobedman, B., S. Avdic, and A. Abendroth.** 2013. Transcription Associated with Human Cytomegalovirus Latency. p 347-362. *In*: M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: From molecular pathogenesis to intervention*. vol.1. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, UK.
- Smith, L. M., A. R. McWhorter, L. L. Masters, G. R. Shellam, and A. J. Redwood.** 2008. Laboratory strains of murine cytomegalovirus are genetically similar to but phenotypically distinct from wild strains of virus. *J. Virol.* **82**:6689–6696.
- Smith, M. G.** 1954. Propagation of salivary gland virus of the mouse in tissue cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **86**:435–440.
- Smith, M. G.** 1956. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **92**:424–430.
- Snyder, C. M., J. E. Allan, E. L. Bonnett, C. M. Doom, and A. B. Hill.** 2010. Cross-presentation of a spread-defective MCMV is sufficient to prime the majority of virus-specific CD8+ T cells. *PLoS ONE* **5**:e9681.
- Sobell, H. M.** 1985. Actinomycin and DNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**:5328–5331.
- Söderberg, C., S. Larsson, S. Bergstedt-Lindqvist, and E. Möller.** 1993a. Definition of a subset of human peripheral blood mononuclear cells that are permissive to human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* **67**:3166–3175.
- Söderberg, C., T. D. Giugni, J. A. Zaia, S. Larsson, J. M. Wahlberg, and E. Möller.** 1993b. CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* **67**:6576–6585.
- Soroceanu, L., A. Akhavan, and C. S. Cobbs.** 2008. Platelet-derived growth factor-alpha receptor activation is required for human cytomegalovirus infection. *Nature* **455**:391–395.
- Sparmann, A., and M. van Lohuizen.** 2006. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**:846–856.
- Staerz, U. D., H. Karasuyama, and A. M. Garner.** 1987. Cytotoxic T lymphocytes against a soluble protein. *Nature* **329**:449–451.
- Stahlberg, A., M. Kubista, and P. Aman.** 2011. Single-cell gene-expression profiling and its potential diagnostic applications. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **11**:735–740.
- Stark, T. J., J. D. Arnold, D. H. Spector, and G. W. Yeo.** 2012. High-resolution profiling and analysis of viral and host small RNAs during human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* **86**:226–235.
- Steffens, H. P., J. Podlech, S. Kurz, P. Angele, D. Dreis, and M. J. Reddehase.** 1998. Cytomegalovirus inhibits the engraftment of donor bone marrow cells by downregulation of hemopoietin gene expression in recipient stroma. *J. Virol.* **72**:5006–5015.

- Steinman, R. M.** 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* **9**:271–296.
- Stemberger, C., K. M. Huster, M. Koffler, F. Anderl, M. Schiemann, H. Wagner, and D. H. Busch.** 2007. A single naive CD8+ T cell precursor can develop into diverse effector and memory subsets. *Immunity* **27**:985–997.
- Stinski, M. F., and H. Isomura.** 2008. Role of the cytomegalovirus major immediate early enhancer in acute infection and reactivation from latency. *Med. Microbiol. Immunol.* **197**:223–231.
- Stinski, M.F., C.L. Malone, T.W. Hermiston, and B. Liu.** 1991. Regulation of human cytomegalovirus transcription. p 245–260. *In*: E.K. Wagner (ed.), *Herpesvirus transcription and its control*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Strehl, B., U. Seifert, E. Krüger, S. Heink, U. Kuckelkorn, and P.-M. Kloetzel.** 2005. Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol. Rev.* **207**:19–30.
- Swaminathan, S., and S. K. Sharan.** 2004. Bacterial artificial chromosome engineering. *Methods Mol. Biol.* **256**:89–106.
- Sylwester, A. W., B. L. Mitchell, J. B. Edgar, C. Taormina, C. Pelte, F. Ruchti, P. R. Sleath, K. H. Grabstein, N. A. Hosken, F. Kern, J. A. Nelson, and L. J. Picker.** 2005. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J. Exp. Med.* **202**:673–685.
- Szomolanyi-Tsuda, E., X. Liang, R. M. Welsh, E. A. Kurt-Jones, and R. W. Finberg.** 2006. Role for TLR2 in NK cell-mediated control of murine cytomegalovirus in vivo. *J. Virol.* **80**:4286–4291.
- Takemoto, N., A. M. Intlekofer, J. T. Northrup, E. J. Wherry, and S. L. Reiner.** 2006. Cutting Edge: IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8+ T cell differentiation. *J. Immunol.* **177**:7515–7519.
- Tanaka, K., S. Sawamura, T. Satoh, K. Kobayashi, and S. Noda.** 2007. Role of the indigenous microbiota in maintaining the virus-specific CD8 memory T cells in the lung of mice infected with murine cytomegalovirus. *J. Immunol.* **178**:5209–5216.
- Tang, Q., L. Li, and G. G. Maul.** 2005. Mouse cytomegalovirus early M112/113 proteins control the repressive effect of IE3 on the major immediate-early promoter. *J. Virol.* **79**:257–263.
- Tani, H., R. Mizutani, K. A. Salam, K. Tano, K. Ijiri, A. Wakamatsu, T. Isogai, Y. Suzuki, and N. Akimitsu.** 2012. Genome-wide determination of RNA stability reveals hundreds of short-lived noncoding transcripts in mammals. *Genome Res.* **22**:947–956.
- Taswell, C.** 1987. Limiting dilution assays for the separation, characterization, and quantitation of biologically active particles and their clonal progeny. p 109-145. *In*: Pretlow and Pretlow (eds.), *Cell separation: methods and selected applications*. vol.4, Academic Press.
- Tavalai, N., and T. Stamminger.** 2011. Intrinsic cellular defense mechanisms targeting human cytomegalovirus. *Virus Res.* **157**:128–133.
- Taylor-Wiedeman, J., G. P. Hayhurst, J. G. Sissons, and J. H. Sinclair.** 1993. Polymorphonuclear cells are not sites of persistence of human cytomegalovirus in healthy individuals. *J. Gen. Virol.* **74**:265–268.
- Taylor-Wiedeman, J., J. G. Sissons, L. K. Borysiewicz, and J. H. Sinclair.** 1991. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J. Gen. Virol.* **72**:2059–2064.
- Tedder, T. F., D. A. Steeber, A. Chen, and P. Engel.** 1995. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J.* **9**:866–873.

- Thimme R., V. Appay, M. Koschella, E. Panther, A. D. Hislop, A. B. Rickinson, S. L. Rowland-Jones, H. E. Blum, and H. Pircher.** 2005. Increased expression of the NK cell receptor KLRG1 by virus-specific CD8 T cells during persistent antigen stimulation. *J. Virol.* **79**:12112-12116.
- Thomas, M., N. Reuter, and T. Stamminger.** 2013. Multifaceted regulation of human cytomegalovirus gene expression. p 174-195. *In*: M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: From molecular pathogenesis to intervention*. vol.1. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, UK.
- Tolkoff-Rubin, N. E., J. A. Fishman, and R. H. Rubin.** 2001. The bidirectional relationship between cytomegalovirus and allograft injury. *Transplant. Proc.* **33**:1773-1775.
- Torok, D., R. W. Ching, and D. P. Bazett-Jones.** 2009. PML nuclear bodies as sites of epigenetic regulation. *Front. Biosci.* **14**:1325-1336.
- Torti, N., S. M. Walton, K. M. Murphy, and A. Oxenius.** 2011a. Batf3 transcription factor-dependent DC subsets in murine CMV infection: differential impact on T-cell priming and memory inflation. *Eur. J. Immunol.* **41**:2612-2618.
- Torti, N., S. M. Walton, T. Brocker, T. Rüllicke, and A. Oxenius.** 2011b. Non-hematopoietic cells in lymph nodes drive memory CD8 T cell inflation during murine cytomegalovirus infection. *PLoS Pathog.* **7**:e1002313.
- Tsuneoka, M., K. Nakayama, K. Hatsuzawa, M. Komada, N. Kitamura, and E. Mekada.** 1993. Evidence for involvement of furin in cleavage and activation of diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.* **268**:26461-26465.
- Uchida, T., A. M. PAPPENHEIMER, and R. Greany.** 1973. Diphtheria toxin and related proteins. I. Isolation and properties of mutant proteins serologically related to diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.* **248**:3838-3844.
- Van Leeuwen E. M., G. J. de Bree, E. B. Remmerswaal, S. L. Yong, K. Tesselaar, I. J. ten Berge, and R. A. van Lier.** 2005. IL-7 receptor alpha chain expression distinguishes functional subsets of virus-specific human CD8<sup>+</sup> T cells. *Blood* **106**:2091-2098.
- Varnum, S. M., D. N. Streblow, M. E. Monroe, P. Smith, K. J. Auberry, L. Pasa-Tolic, D. Wang, D. G. Camp, K. Rodland, S. Wiley, W. Britt, T. Shenk, R. D. Smith, and J. A. Nelson.** 2004. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J. Virol.* **78**:10960-10966.
- Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken, and C. Reutelingsperger.** 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* **184**:39-51.
- Vidal, S., A. Krmpotic, M. Pyzik, and S. Jonjic.** 2013. Innate immunity to cytomegalovirus in the murine model. p 192-214. *In*: M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: From molecular pathogenesis to intervention*. vol.2. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, UK.
- Vogelstein, B., and D. Gillespie.** 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**:615-619.
- Voigt, A., U. Salzmann, U. Seifert, M. Dathe, A. Soza, P.-M. Kloetzel, and U. Kuckelkorn.** 2007. 20S proteasome-dependent generation of an IEpp89 murine cytomegalovirus-derived H-2L(d) epitope from a recombinant protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**:549-554.
- Wagner, M., S. Jonjic, U. H. Koszinowski, and M. Messerle.** 1999. Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *J. Virol.* **73**:7056-7060.
- Wallace, D. L., J. E. Masters, C. M. de Lara, S. M. Henson, A. Worth, Y. Zhang, S. R. Kumar, P. C. Beverley, A. N. Akbar, and D. C. Macallan.** 2011. Human cytomegalovirus-specific CD8(+) T-cell expansions contain long-lived cells that retain functional capacity in both young and elderly subjects. *Immunology* **132**:27-38.

- Wallace, D. L., Y. Zhang, H. Ghattas, A. Worth, A. Irvine, A. R. Bennett, G. E. Griffin, P. C. L. Beverley, D. F. Tough, and D. C. Macallan.** 2004. Direct measurement of T cell subset kinetics in vivo in elderly men and women. *J. Immunol.* **173**:1787–1794.
- Walter, E. A., P. D. Greenberg, M. J. Gilbert, R. J. Finch, K. S. Watanabe, E. D. Thomas, and S. R. Riddell.** 1995. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N. Engl. J. Med.* **333**:1038–1044.
- Wang, Q.-Y., C. Zhou, K. E. Johnson, R. C. Colgrove, D. M. Coen, and D. M. Knipe.** 2005a. Herpesviral latency-associated transcript gene promotes assembly of heterochromatin on viral lytic-gene promoters in latent infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**:16055–16059.
- Wang, W., P. Yu, P. Zhang, Y. Shi, H. Bu, and L. Zhang.** 2008. The infection of human primary cells and cell lines by human cytomegalovirus: new tropism and new reservoirs for HCMV. *Virus Res.* **131**:160–169.
- Wang, X., D. Y. Huang, S.-M. Huong, and E.-S. Huang.** 2005b. Integrin alphavbeta3 is a coreceptor for human cytomegalovirus. *Nat. Med.* **11**:515–521.
- Wang, X., S.-M. Huong, M. L. Chiu, N. Raab-Traub, and E.-S. Huang.** 2003. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* **424**:456–461.
- Weber, B., C. Stresemann, B. Brueckner, and F. Lyko.** 2007. Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle* **6**:1001–1005.
- Weiland, F., G. M. Keil, M. J. Reddehase, and U. H. Koszinowski.** 1986. Studies on the morphogenesis of murine cytomegalovirus. *Intervirology* **26**:192–201.
- Welsh, R. M., J. O. Brubaker, M. Vargas-Cortes, and C. L. O'Donnell.** 1991. Natural killer (NK) cell response to virus infections in mice with severe combined immunodeficiency. The stimulation of NK cells and the NK cell-dependent control of virus infections occur independently of T and B cell function. *J. Exp. Med.* **173**:1053–1063.
- Weninger, W., N. Manjunath, and U. H. von Andrian.** 2002. Migration and differentiation of CD8+ T cells. *Immunol. Rev.* **186**:221–233.
- White, K. L., B. Slobedman, and E. S. Mocarski.** 2000. Human cytomegalovirus latency-associated protein pORF94 is dispensable for productive and latent infection. *J. Virol.* **74**:9333–9337.
- Whitmire, J. K., B. Eam, and J. L. Whitton.** 2008. Tentative T cells: memory cells are quick to respond, but slow to divide. *PLoS Pathog.* **4**:e1000041.
- Whitmire, J. K., J. T. Tan, and J. L. Whitton.** 2005. Interferon-gamma acts directly on CD8+ T cells to increase their abundance during virus infection. *J. Exp. Med.* **201**:1053–1059.
- Wilfinger, W. W., K. Mackey, and P. Chomczynski.** 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22**:474-6, 478-81.
- Wilhelmi, V., C. O. Simon, J. Podlech, V. Böhm, T. Däubner, S. Emde, D. Strand, A. Renzaho, N. A. W. Lemmermann, C. K. Seckert, M. J. Reddehase, and N. K. A. Grzimek.** 2008. Transactivation of cellular genes involved in nucleotide metabolism by the regulatory IE1 protein of murine cytomegalovirus is not critical for viral replicative fitness in quiescent cells and host tissues. *J. Virol.* **82**:9900–9916.
- Wilkinson, G. W. G., P. Tomasec, R. J. Stanton, M. Armstrong, V. Prod'homme, R. Aicheler, B. P. McSharry, C. R. Rickards, D. Cochrane, S. Llewellyn-Lacey, E. C. Y. Wang, C. A. Griffin, and A. J. Davison.** 2008. Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus. *J. Clin. Virol.* **41**:206–212.
- Wilson, R., and M. K. Johansson.** 2003. Photoluminescence and electrochemiluminescence of a Ru(II)(bpy)<sub>3</sub>-quencher dual-labeled oligonucleotide probe. *Chem. Commun. (Camb.)* **21**:2710–2711.

- Woodhall, D. L., I. J. Groves, M. B. Reeves, G. Wilkinson, and J. H. Sinclair.** 2006. Human Daxx-mediated repression of human cytomegalovirus gene expression correlates with a repressive chromatin structure around the major immediate early promoter. *J. Biol. Chem.* **281**:37652–37660.
- Wright, J. F., A. Kurosky, and S. Wasi.** 1994. An endothelial cell-surface form of annexin II binds human cytomegalovirus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**:983–989.
- Wyllie, A. H., R. G. Morris, A. L. Smith, and D. Dunlop.** 1984. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.* **142**:67–77.
- Xiao, Z., K. A. Casey, S. C. Jameson, J. M. Curtsinger, and M. F. Mescher.** 2009. Programming for CD8 T cell memory development requires IL-12 or type I IFN. *J. Immunol.* **182**:2786–2794.
- Yamaizumi, M., E. Mekada, T. Uchida, and Y. Okada.** 1978. One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell* **15**:245–250.
- Yamaizumi, M., T. Uchida, K. Takamatsu, and Y. Okada.** 1982. Intracellular stability of diphtheria toxin fragment A in the presence and absence of anti-fragment A antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**:461–465.
- Yang, E., E. van Nimwegen, M. Zavolan, N. Rajewsky, M. Schroeder, M. Magnasco, and J. E. Darnell.** 2003. Decay rates of human mRNAs: correlation with functional characteristics and sequence attributes. *Genome Res.* **13**:1863–1872.
- Yewdell, J. W.** 2001. Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing. *Trends Cell Biol.* **11**:294–297.
- Zimmermann, K., D. Schögl, and J. W. Mannhalter.** 1998. Digestion of terminal restriction endonuclease recognition sites on PCR products. *BioTechniques* **24**:582–584.
- Zucchini, N., G. Bessou, S. Traub, S. H. Robbins, S. Uematsu, S. Akira, L. Alexopoulou, and M. Dalod.** 2008. Cutting edge: Overlapping functions of TLR7 and TLR9 for innate defense against a herpesvirus infection. *J. Immunol.* **180**:5799–5803.
- Zydek, M., C. Hagemeier, and L. Wiebusch.** 2010. Cyclin-dependent kinase activity controls the onset of the HCMV lytic cycle. *PLoS Pathog.* **6**:e1001096.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig ohne fremde Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, Zeichnungen, Skizzen oder bildliche Darstellungen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen oder anderen Quellen entnommen sind, sind als solche eindeutig kenntlich gemacht. Die Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form noch nicht veröffentlicht und noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt worden.

---

Mainz, 15.10.2013    Marion Grießl



## Danksagung

## **Curriculum vitae**

