

Einfluss Zelltod-inhibierender Proteine des murinen Cytomegalovirus auf die Initiation der antiviralen CD8 T-Zellantwort

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Stefan Ebert
geb. am 07.08.1980 in Rothenburg o.T.

Mainz, Januar 2014

Vom Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz als Dissertation
angenommen am: 16.01.2014

Dekan:

Erstgutachter:

Zweitgutachter:

Tag der mündlichen Prüfung: 21.02.2014

Alle Dinge sind möglich dem, der da glaubt.

(Mk 9, 23)

Zusammenfassung

Die Inhibition des programmierten Zelltods ist ein essentieller Faktor der viralen Replikationsfähigkeit. Das murine Cytomegalovirus kodiert deshalb für verschiedene Zelltod-inhibierende Gene, um dem programmierten Zelltod zu entgehen bis die Virusproduktion abgeschlossen ist. Da die Expression des viralen anti-apoptotischen Gens *M36* infizierte Makrophagen vor der Apoptose schützt (Menard *et al.*, 2003), wurde in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung der Deletionsmutante mCMV- Δ M36 (Δ M36) der Einfluss von Apoptose auf das *Priming* Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen untersucht.

Interessanterweise waren die Frequenzen mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen nach Infektion mit Δ M36 für alle getesteten Epitope sowohl im Haplotyp H-2^d als auch im Haplotyp H-2^b deutlich erhöht. Zusätzlich konnte mit Hilfe der mCMV-ORF-*Library* eine Verbreiterung des CD8 T-Zellepitop-Repertoire nach Infektion mit Δ M36 nachgewiesen werden, was neben der quantitativen auch eine qualitative Steigerung des CD8 T-Zell-*Primings* aufzeigt.

In der funktionellen Revertante Δ M36-FADD^{DN} wird die anti-apoptotische Funktion durch eine dominant-negative Form des zellulären Adapterproteins FADD (FADD^{DN}) substituiert (Cicin-Sain *et al.*, 2008), die das Apoptose-*Signaling* verhindert. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von FADD^{DN} nicht nur den Apoptose-Phänotyp wieder revertiert, sondern auch die Verbesserung des CD8 T-Zell-*Primings* aufhebt. Diese Beobachtung belegt eindeutig, dass das verbesserte CD8 T-Zell-*Priming* auf einer verstärkten Apoptose-Induktion beruht.

Bemerkenswerterweise konnte das verbesserte *Priming* auch nach Deletion des anti-nekroptotischen Gens *M45* nachgewiesen werden. So konnte nach Infektion mit mCMV-M45-BamX (M45-BamX) (Brune *et al.*, 2001) gezeigt werden, dass auch die Induktion der Nekroptose zu einem verbesserten CD8 T-Zell-*Priming* sowie zu einer Verbreiterung des CD8 T-Zellepitop-Repertoires führt.

Nach Infektion von *Cross-Priming*-defizienten 3d-Mäusen (Tabeta *et al.*, 2006) konnte eine Steigerung mCMV-spezifischer CD8 T-Zell-Frequenzen in Abwesenheit von M36 oder M45 nicht beobachtet werden. Dieser Befund lässt auf ein erhöhtes *Cross-Priming* von CD8 T-Zellen durch Δ M36 oder M45-BamX infolge einer verstärkten Induktion des programmierten Zelltods schließen.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Inhibition des programmierten Zelltods durch die mCMV-Gene *M36* und *M45* das CD8 T-Zell-*Priming* limitiert. Somit fördern virale Zelltod-inhibierende Gene die virale Replikationsfähigkeit, indem sie die Virusproduktion *per se* in der individuellen Zelle steigern und zusätzlich die Immunkontrolle reduzieren, was wiederum eine verbesserte Dissemination *in vivo* ermöglicht.

Summary

Inhibition of programmed cell death is a key determinant of viral fitness. Murine cytomegalovirus (mCMV) encodes several cell death-inhibiting genes, a strategy to delay cell death until virus production is accomplished. As gene *M36* prevents apoptosis in infected macrophages (Menard *et al.*, 2003), we have used the deletion mutant mCMV- Δ M36 (Δ M36) to test a putative role for apoptosis in priming of epitope-specific CD8 T cells.

Interestingly, frequencies of mCMV-specific CD8 T cells were found to be increased after infection with Δ M36 for all epitopes tested in haplotypes H-2^d and H-2^b. Moreover, testing an mCMV-ORF library revealed a broader epitope usage after infection with Δ M36, so that priming is improved quantitatively as well as qualitatively.

In the functional revertant Δ M36-FADD^{DN}, the anti-apoptotic function is restored by a dominant-negative form of the cellular adaptor protein FADD (FADD^{DN}) that centrally blocks the death receptor-mediated signaling pathway of apoptosis (Cicin-Sain *et al.*, 2008). We show here that expression of FADD^{DN} not only reverts the apoptosis phenotype but also abrogates the enhancement of CD8 T-cell priming. This is strong evidence to conclude that enhanced priming by Δ M36 is causally related to enhanced apoptosis.

Notably, this conclusion is corroborated by the finding that deletion of an anti-necroptotic mCMV protein, namely the M45 protein in mutant virus mCMV-M45-BamX (M45-BamX) (Brune *et al.*, 2001), also enhanced CD8 T-cell priming, suggesting a more general principle. After infection of cross-priming-deficient 3d-mice (Tabeta *et al.*, 2006) we could observe a leveling of mCMV-specific CD8 T-cell frequencies in the absence of M36 or M45.

Based on these findings we propose a model of improved cross-priming of CD8 T cells by Δ M36 or M45-BamX due to enhanced apoptosis of infected cells.

To our knowledge this is the first example showing that inhibition of programmed cell death by cytomegalovirus genes, *M36* and *M45*, limits CD8 T-cell priming. Thus, cell death-inhibiting viral genes can promote viral fitness by combined enhancement of viral productivity in infected cells and simultaneous reduction of immune control that enables virus spread *in vivo*.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	i
Inhaltsverzeichnis.....	iii
Abbildungsverzeichnis.....	viii
Abkürzungsverzeichnis.....	x
1 Einleitung.....	1
1.1 Klassifizierung der Herpesviren.....	1
1.2 Die Cytomegaloviren.....	2
1.2.1 Strukturelle und biologische Eigenschaften.....	2
1.2.2 Epidemiologie, Pathogenese und klinische Relevanz.....	4
1.2.3 Das murine Cytomegalovirus als Modellsystem.....	7
1.3 Immunologische Kontrolle der CMV-Infektion.....	8
1.3.1 Reaktion des angeborenen Immunsystems.....	8
1.3.2 Reaktion des adaptiven Immunsystems.....	11
1.4 Antigenpräsentation und CD8 T-Zell- <i>Priming</i> nach CMV-Infektion.....	13
1.4.1 Direkte Präsentation endogener Peptide.....	13
1.4.2 <i>Cross</i> -Präsentation exogener Peptide.....	14
1.4.3 Dendritische Zellen – professionell <i>cross</i> -präsentierende Zellen.....	15
1.5 Immunmodulation durch CMV.....	17
1.5.1 Immunmodulation der angeborenen und adaptiven Immunantwort.....	17
1.5.2 Modulation des programmierten Zelltods nach CMV-Infektion.....	19
1.5.2.1 Modulation der Apoptose-Induktion.....	19
1.5.2.2 Modulation der Nekroptose-Induktion.....	22
1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	24

2	Material.....	25
2.1	Allgemeine Laborgeräte.....	25
2.2	Verbrauchsmaterialien und Plastikwaren.....	28
2.3	Chemikalien, Lösungen und Zusätze.....	33
2.4	Kits.....	36
2.5	Zellkultur.....	37
2.5.1	Zusätze und Reagenzien.....	37
2.5.2	Zellkulturmedien.....	40
2.6	Antikörper.....	41
2.6.1	Antikörper für den ELISpot-Assay.....	41
2.6.2	Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	41
2.6.3	Antikörper für die Immunhistochemie.....	42
2.6.4	Antikörper für die <i>in vivo</i> Depletion von Lymphozyten.....	42
2.6.5	Microbeads-gekoppelte Antikörper für die magnetische Zellsortierung.....	42
2.7	Viren.....	43
2.8	Antigene mCMV-Peptide.....	45
2.9	mCMV-ORF <i>Library</i>	46
2.10	Primäre Zellen und Zelllinien.....	46
2.11	Versuchstiere.....	47
2.12	Oligonukleotide.....	48
2.13	Zusammengesetzte Puffer und Lösungen.....	49
2.13.1	Puffer für tierexperimentelle Methoden.....	49
2.13.2	Puffer für die Generierung von mCMV-Stocks.....	49
2.13.3	Puffer für die immunologische Analyse.....	50
2.13.4	Puffer und Lösungen für die histologische Analyse.....	50

3 Methoden.....	51
3.1 Allgemeine zellbiologische Methoden.....	51
3.1.1 Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität.....	51
3.1.2 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen.....	52
3.2 Tierexperimentelle Methoden.....	52
3.2.1 Anlage muriner embryonaler Fibroblasten (MEF).....	53
3.2.2 Infektion von Mäusen.....	54
3.2.3 Immunsuppression von Mäusen.....	55
3.2.4 <i>In vivo</i> Depletion von CD8 T-Zellen und NK-Zellen.....	55
3.2.5 <i>Ex vivo</i> Isolierung von Lymphozyten aus unterschiedlichen Organen.....	56
3.2.6 Immunomagnetische Separation von CD8 T-Zellen.....	58
3.2.7 Adoptiver Transfer von CD8 T-Zellen.....	60
3.3 Virologische Methoden.....	62
3.3.1 Generierung von mCMV-Stocks.....	62
3.3.2 Virustiterbestimmung mittels Plaque-Assay.....	63
3.4 Immunologische Methoden.....	65
3.4.1 IFN- γ ELISpot-Assay.....	65
3.4.2 Zytofluorometrische Analyse.....	67
3.4.3 mCMV-ORF- <i>Library Screening</i>	68
3.5 Molekularbiologische Methoden.....	71
3.5.1 RNA-Isolierung aus Gewebe.....	71
3.5.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	72
3.5.3 Absolute Quantifizierung viraler Transkripte mittels TaqMan™ RT-qPCR.....	72
3.6 Histologische Methoden.....	74
3.6.1 Fixierung und Paraffinierung von Organen.....	74
3.6.2 Anfertigung von Gewebeschnitten.....	75
3.6.3 Deparaffinierung und Rehydratisierung von Gewebeschnitten.....	75
3.6.4 Immunhistochemische Einfach- und Doppelfärbung (IE1 und/oder CD3).....	76
3.7 Statistische Analyse.....	77

4 Ergebnisse.....	78
4.1 Einfluss von Apoptose auf die mCMV-Replikation <i>in vivo</i>	79
4.2 Einfluss von Apoptose auf die Initiation der CD8 T-Zellantwort.....	83
4.2.1 Vergleich der akuten CD8 T-Zellantwort in Abhängigkeit von M36 in BALB/c und C57BL/6.....	84
4.2.2 Kinetik des CD8 T-Zell- <i>Primings</i> in An- oder Abwesenheit von M36.....	85
4.2.3 Einfluss von M36 auf das akute CD8 T-Zell- <i>Priming</i> in Abhängigkeit von der Infektionsdosis.....	86
4.3 Inhibition der Apoptose-Induktion durch eine dominant-negative Variante des viralen FADD-Gens.....	88
4.4 Einfluss von Nekroptose auf die Initiation der CD8 T-Zellantwort.....	90
4.5 Einfluss von Apoptose auf die akute CD8 T-Zellantwort in Milz und Lunge.....	92
4.6 Analyse des genomweiten CD8 T-Zellepitop-Repertoires in Abhängigkeit von M36 oder M45.....	93
4.7 Auswirkung der Deletion nicht Zelltod-inhibierender Gene auf die Initiation der CD8 T-Zellantwort.....	96
4.7.1 Einfluss des viralen Immunevasins m152 auf das CD8 T-Zell- <i>Priming</i>	96
4.7.2 Einfluss des viralen IFN-Antagonisten M27 auf das CD8 T-Zell- <i>Priming</i>	98
4.7.3 Einfluss des viralen NK-Zell-Liganden m157 auf das CD8 T-Zell- <i>Priming</i>	99
4.8 Analyse der CD8 T-Zellantwort in <i>Cross-Priming</i> -defizienten Mäusen.....	101
4.8.1 Einfluss von Apoptose auf die CD8 T-Zellantwort in Abwesenheit von <i>Cross</i> -Präsentation.....	102
4.8.2 Einfluss von Nekroptose auf die CD8 T-Zellantwort in Abwesenheit von <i>Cross</i> -Präsentation.....	104
4.9 Einfluss von Apoptose auf den CD8 <i>Memory</i> -T-Zell- <i>Pool</i>	106
4.9.1 Einfluss von M36 auf die CD8 T-Zell-Frequenzen in der <i>Memory</i> -Phase.....	106
4.9.2 Analyse des genomweiten CD8 <i>Memory</i> -T-Zellepitop-Repertoires in An- oder Abwesenheit von M36.....	108
4.10 Einfluss des anti-apoptotischen Proteins M36 auf das protektive Potential adoptiv transferierter mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen.....	109

4.10.1	Präventiver Transfer antiviraler CD8 T-Zellen in Abhängigkeit von M36.....	110
4.10.2	Therapeutischer Transfer antiviraler CD8 T-Zellen in Abhängigkeit von M36.....	112
4.11	Einfluss des anti-apoptischen Proteins M36 auf das protektive Potential mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen im <i>Challenge</i> -Modell.....	114
4.11.1	Protektives Potential antiviraler CD8 T-Zellen in Abhängigkeit von M36.....	115
4.11.2	Protektives Potential antiviraler CD8 T-Zellen in Abhängigkeit von M36 und in Abwesenheit von Antikörpern.....	116
4.11.3	Protektives Potential antiviraler CD8 T-Zellen in Abhängigkeit von M36 bei einer niedrigen Infektionsdosis.....	118
5	Diskussion.....	120
5.1	Die Induktion des programmierten Zelltods führt zu einem verbesserten CD8 T-Zell- <i>Priming</i>	120
5.2	Das verbesserte CD8 T-Zell- <i>Priming</i> beruht auf der Cross-Präsentation viraler Antigene aus apoptotischen oder nekroptotischen Zellen.....	123
5.3	Modell des verbesserten CD8 T-Zell- <i>Primings</i> nach Induktion des programmierten Zelltods.....	127
5.4	Das verbesserte CD8 T-Zell- <i>Priming</i> nach Induktion von Apoptose führt zu einer verbesserten Kontrolle der Infektion in der Leber.....	129
5.5	Fazit und Ausblick.....	131
6	Literaturverzeichnis.....	133
7	Anhang.....	164
7.1	Zuordnung der mCMV-ORF <i>Library</i> -Nummern zu den getesteten mCMV-ORFs.....	164
	Publikationen.....	166
	Lebenslauf.....	168
	Danksagung.....	169
	Eidesstattliche Erklärung.....	170

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematischer Aufbau eines CMV-Virions.....	3
Abb. 1.2: Charakterisierung muriner DC-Subtypen.....	16
Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Apoptose- <i>Signalings</i> und dessen Inhibition durch mCMV.....	20
Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Nekroptose- <i>Signalings</i> und dessen Inhibition durch mCMV.....	23
Abb. 3.1: Schematische Darstellung des mCMV-ORF- <i>Library Screenings</i>	70
Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Apoptose- und Nekroptose-Inhibition durch mCMV.....	79
Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Apoptose-Induktion durch Δ M36.....	80
Abb. 4.3: Einfluss von M36 auf die virale Genexpression im Fuß und im drainierenden LK.....	81
Abb. 4.4: Depletion von NK- und CD8 T-Zellen im drainierenden LK.....	82
Abb. 4.5: Einfluss von NK- und/oder CD8 T-Zellen auf die virale Genexpression in Abhängigkeit von der M36-Expression.....	83
Abb. 4.6: Einfluss von M36 auf das CD8 T-Zell- <i>Priming</i> nach akuter Infektion in den Haplotypen H-2 ^d und H-2 ^b	84
Abb. 4.7: CD8 T-Zell- <i>Priming</i> -Kinetik im drainierenden LK in Abhängigkeit von der M36-Expression.....	86
Abb. 4.8: Dosis-Abhängigkeit des CD8 T-Zell- <i>Primings</i> im drainierenden LK in An- oder Abwesenheit von M36.....	87
Abb. 4.9: Schematische Darstellung der Apoptose-Inhibition durch FADD ^{DN}	88
Abb. 4.10: Einfluss von FADD ^{DN} auf die virale Genexpression sowie das CD8 T-Zell- <i>Priming</i> im drainierenden LK während der akuten Infektion.....	89
Abb. 4.11: Schematische Darstellung der Nekroptose-Induktion durch M45-BamX.....	90
Abb. 4.12: Virale Genexpression und CD8 T-Zell- <i>Priming</i> im LK in An- oder Abwesenheit von M45 während der akuten Infektion.....	91
Abb. 4.13: Einfluss von M36 auf die mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort in Milz und Lunge.....	93

Abb. 4.14: mCMV-spezifisches CD8 T-Zellepitop-Repertoire in Abhängigkeit von M36 oder M45 während der akuten Infektion.....	95
Abb. 4.15: Virale Genexpression und CD8 T-Zell- <i>Priming</i> im LK in Abhängigkeit von der m152-Expression.....	97
Abb. 4.16: Virale Genexpression und CD8 T-Zell- <i>Priming</i> im LK in Abhängigkeit von der M27-Expression.....	99
Abb. 4.17: Virale Genexpression und CD8 T-Zell- <i>Priming</i> im LK in Abhängigkeit von der m157-Expression.....	100
Abb. 4.18: Einfluss von M36 auf die CD8 T-Zellantwort in 3d-Mäusen.....	103
Abb. 4.19: Einfluss von M36 auf die CD8 T-Zellantwort in 3d- Mäusen.....	104
Abb. 4.20: Einfluss von M45 auf die CD8 T-Zellantwort in 3d-Mäusen.....	105
Abb. 4.21: Kinetik der CD8 <i>Memory</i> -T-Zellantwort in Abhängigkeit von der M36-Expression.....	107
Abb. 4.22: mCMV-spezifisches CD8 <i>Memory</i> -T-Zellepitop-Repertoire in Abhängigkeit von der M36-Expression.....	109
Abb. 4.23: Experimentelles System zur Analyse des protektiven Potentials akut <i>geprimter</i> CD8 T-Zellen im adoptiven Transfer-Modell.....	110
Abb. 4.24: Einfluss von M36 auf das protektive Potential akut <i>geprimter</i> CD8 T-Zellen im präventiven Transfer-Modell.....	111
Abb. 4.25: Einfluss von M36 auf das protektive Potential akut <i>geprimter</i> CD8 T-Zellen im therapeutischen Transfer-Modell.....	113
Abb. 4.26: Experimentelles System zur Analyse des protektiven Potentials akut <i>geprimter</i> CD8 T-Zellen im <i>Challenge</i> -Modell.....	114
Abb. 4.27: Antivirale Wirkung akut <i>geprimter</i> CD8 T-Zellen nach <i>Challenge</i> in der BALB/c-Maus.....	115
Abb. 4.28: Antivirale Wirkung akut <i>geprimter</i> CD8 T-Zellen nach <i>Challenge</i> in der IgMi-Maus.....	117
Abb. 4.29: Antivirale Wirkung akut <i>geprimter</i> CD8 T-Zellen nach <i>Challenge</i> in Abhängigkeit von einer niedrigen Infektionsdosis.....	119
Abb. 5.1: Modell des mCMV-spezifischen CD8 T-Zell- <i>Primings</i> in An- oder Abwesenheit viraler Zelltod-inhibierender Proteine.....	128

Abkürzungsverzeichnis

A

Aqua bidest.	<i>Aqua bidestillata</i>
Abb.	Abbildung
ABC	<i>Avidin-biotin complex</i> (Avidin-Biotin Komplex)
AIDS	<i>Aquired immunodeficiency syndrome</i> (Erworbenes Immunschwäche-Syndrom)
AIM2	<i>Absence in melanoma 2</i>
Ak	Antikörper
AP	Alkaline Phosphatase
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
Apaf-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
APC	<i>Antigen presenting cell</i> (Antigen-präsentierende Zelle)
Asialo GM1	<i>Ganglio-n-tetraosylceramide</i>
AT	<i>Adoptive transfer</i> (Adoptiver Transfer)
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat

B

β-ME	β-Mercaptoethanol
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i>
Bak	<i>Bcl-2 antagonist/killer 1</i>
BALB	Bagg albino (*)
Batf3	<i>Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
BCIP/NBT	<i>5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphate/p-Nitroblue-Tetrazolium</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BDCA3	<i>Human blood dendritic cell antigen 3</i>
BFA	Brefeldin A
Bid	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>
bp	Base pairs (Basenpaare)
BSA	Bovines Serumalbumin

(*) <http://jaxmice.jax.org/jaxnotes/archive/443a.html>

C

cDC	<i>Conventional dendritic cell</i> (konventionelle dendritische Zelle)
cDNA	<i>Complementary desoxyribonucleic acid</i> (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CDV	Cidovovir
CEI	<i>Centrifugal enhancement of infectivity</i>
cFLIP	<i>Cellular FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme (FLICE)-like inhibitory protein</i>
clAP	<i>Cellular inhibitor of apoptosis protein</i>
CID	<i>Cytomegalic inclusion disease</i> (Zytomegale Einschlusskörperchenkrankheit)
Clec9a	<i>C-type lectin domain family 9, member a</i>
CMV	Cytomegalovirus
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i> (zytotoxischer T-Lymphozyt)
CTLL	<i>Cytotoxic T lymphocyte line</i> (zytotoxische T-Lymphozytenlinie)
CXCL8	CXC-Motiv-Chemokin 8
CYLD	Cylindromatosis-Protein

D

DAB	3,3-Diaminobenzidin
DAI	<i>DNA-dependent activator of IFN-regulatory factor</i>
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
DC	<i>Dendritic cell</i> (Dendritische Zelle)
DC-SIGN	<i>Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>
DD	<i>Death domain</i>
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	n,n-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>

E

E	<i>Early</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ELISpot	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Spot</i>
ER	<i>Endoplasmic reticulum</i> (Endoplasmatisches Retikulum)
ERAD	<i>Endoplasmic reticulum associated degradation</i>
ERGIC	<i>Endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment</i>

F

FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FasL	Fas-Ligand
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (Fetales Kälberserum)
FELASA	<i>Federation European Laboratory Animal Science Association</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flt3L	<i>Fms-like tyrosine kinase 3 ligand</i>
FOS	Foscarnet
FSC	<i>Forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)

G

GCV	Ganciclovir
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
gp	<i>Glycoprotein</i> (Glykoprotein)
Gy	Gray

H

h	<i>Hour</i> (Stunde)
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HEPES	Hydroxyethylpiperazinyl-Ethansulfonsäure
HHV	Humanes Herpesvirus
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> (Humanes Immunschwäche-Virus)
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> (Humanes Leukozytenantigen)

HPLC *High-Performance Liquid Chromatography*
(Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)

HSV Herpes-Simplex-Virus

Hz Hertz

I

ICTV *International Committee on Taxonomy of Viruses*

IE *Immediate early*

IFN Interferon

Ig Immunglobulin

IHC Immunhistochemie

IL Interleukin

IMDM *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*

i.p. intraperitoneal

IRF *Interferon-regulatory factor*

ISG *Interferon stimulated gene*

i.v. intravenös

J

JAK *Janus kinase*

K

kbp Kilobasenpaar

Klra8 *Killer cell lectin-like receptor 8*

KM Knochenmark

KMT Knochenmarktransplantation

KSHV Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus

L

L *Late*

LK Lymphknoten

Ly49 *Lymphocyte antigen 49*

LPS Lipopolysaccharid

M

Mab	<i>Monoclonal antibody</i> (Monoklonaler Antikörper)
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i> (Magnetische Zellseparierung)
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
mCMV	murines Cytomegalovirus
MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated gene 5</i>
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblast</i> (Murine Embryonale Fibroblasten)
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MHC-I	MHC-Klasse-I
MIE	<i>Major immediate early</i>
MIEP	<i>Major immediate early promotor</i>
MIEPE	<i>Major immediate early promotor enhancer</i>
MLKL	<i>Mixed lineage kinase like protein</i>
M. m.	<i>Mus musculus</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MOMP	<i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
MPN	<i>Most probable number</i>
muHV-1	murides Herpesvirus-1
muHV-2	murides Herpesvirus-2
MVA	<i>Modified vaccinia Ankara</i>

N

NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
ng	Nanogramm
NKG2D	<i>Natural killer group 2D</i>
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
NLR	<i>NOD-like receptor</i> (NOD-ähnlicher Rezeptor)
nm	Nanometer
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
Nr	Nummer

O

ORF *Open reading frame*

P

PAMP *Pathogen-associated molecular pattern*
 pDC *Plasmacytoid dendritic cell* (plasmazytoide dendritische Zelle)
 PGAM5 *Phosphoglycerate mutase family member 5*
 profAPC *Professional antigen presenting cell* (professionell Antigen-präsentierende Zelle)
 PBS *Phosphate Buffered Saline* (Phosphatgepufferte Salzlösung)
 PCR *Polymerase chain reaction* (Polymerasekettenreaktion)
 PE Phycoerythrin
 PE-Cy5 Phycoerythrin-Cyanin 5
 Pen/Strep Penicillin/Streptomycin
 PFA Paraformaldehyd
 PFU *Plaque forming unit*
 p.i. *Post infectionem*
poly(I:C) *Polyinosinic:polycytidylic acid*
 PRR *Pattern-recognition receptor*
 PVDF Polyvinylidenfluorid

R

RAE-1 *Retinoic acid early-inducible gene-1*
 RAG *Recombination activating gene*
 RAGE *Receptor for advanced glycation end products*
 rCMV *rat CMV*
 Rev Revertante
 RHIM *RIP homotypic interaction motif*
 RIG-I *Retinoic-acid-inducible gene I*
 RIP *Receptor interacting protein*
 RLR *RIG-I-like receptor* (RIG-I-ähnlicher Rezeptor)
 RNA *Ribonucleic acid* (Ribonukleinsäure)
 ROS *Reactive oxygen species*
 ROX *5-Carboxy-X-rhodamine*

rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
RT-qPCR	<i>Quantitative real time</i> RT-PCR (quantitative Echtzeit RT-PCR)

S

SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
SMAC	<i>Second mitochondrial activator of caspase</i>
SPF	<i>Specified pathogen free</i> (spezifiziert Pathogen-frei)
SSC	<i>Sideward scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
SV40	<i>Simian Virus-40</i> (Affenvirus 40)

T

Tab	Tabelle
TAP	<i>Transporter associated with antigen processing</i> (Antigen-Peptid Transporter)
TCR	<i>T cell receptor</i> (T-Zell Rezeptor)
TLR	<i>Toll-like receptor</i> (Toll-ähnlicher Rezeptor)
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (Tumornekrosefaktor)
TNFR1	<i>TNF receptor 1</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRAILR1/2	<i>TRAIL receptor 1/2</i>
TRIF	<i>TIR-domain containing adaptor protein-inducing IFN-β</i>
TRIS	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TNF α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>

U

UL	<i>Unique long region</i>
UV	Ultraviolett

V

valGCV	Valganciclovir
vIBO	<i>Viral inhibitor of Bak oligomerization</i>
vICA	<i>Viral inhibitor of caspase-8-induced apoptosis</i>
vIRA	<i>Viral inhibitor of RIP-mediated activation</i>
vIRS	<i>Viral inhibitor of RIP-mediated signaling</i>
vMIA	<i>Viral mitochondrial inhibitor of apoptosis</i>
vRAP	<i>Viral regulators of antigen presentation</i> (Virale Regulatoren der Antigenpräsentation)
VSP	Virusstandardpuffer
v/v	<i>volume/volume</i> (Volumen/Volumen)
VZV	Varizella-Zoster-Virus

W

WT	Wildtyp
w/v	<i>weight/volume</i> (Gewicht/Volumen)

X

XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
------	--

Z

ZVTE	Zentrale Versuchstiereinrichtung
------	----------------------------------

Anmerkung: Die internationale Terminologie auf Englisch oder Latein wurde beibehalten und zur Kennzeichnung *kursiv* gesetzt.

1 Einleitung

1.1 Klassifizierung der Herpesviren

Die **Familie der Herpesviren (*Herpesviridae*)** gehört zur Ordnung der *Herpesvirales*, deren Vertreter ubiquitär in nahezu allen Wirbeltierklassen (*Vertebrata*), aber auch in wirbellosen Tieren (*Invertebrata*), zu finden sind (Davison *et al.*, 2009; Pellet *et al.*, 2011). Die evolutionär sehr alten Herpesviren sind durch eine einheitliche Virionenstruktur charakterisiert (Plummer, 1967). Die Namensgebung der Herpesviren basiert auf der charakteristischen „kriechenden“ (griech. *herpeton*, latein. *herpes*) Verbreitung des Hautausschlages nach Herpes-Simplex-Virusinfektion.

Ein besonderes Merkmal aller Herpesviren ist die Fähigkeit Latenz zu etablieren. Dieser besondere Mechanismus der Persistenz erlaubt es den Herpesviren nach Primärinfektion ruhend, d.h. ohne produktive Infektion, ein Leben lang im Wirtszellorganismus zu verbleiben. Nach Immunsuppression können die Herpesviren reaktivieren und erneut eine produktive Infektion induzieren (Roizman und Baines, 1991).

Die Herpesviren werden nach Klassifikation des Internationalen Komitees für Virustaxonomie (ICTV, *International Committee on Taxonomy of Viruses*) anhand der Struktur des viralen Genoms und biologischer Eigenschaften, wie Wirtsspektrum, Replikationsgeschwindigkeit und Zelltropismus, in drei Unterfamilien (*Herpesvirinae*) eingeteilt (Roizman *et al.*, 1981). Bisher konnten 8 humane Herpesviren (HHV-1 bis HHV-8) identifiziert werden.

Die **α -Herpesviren (*Alphaherpesvirinae*)** zeichnen sich durch ein sehr breites Zell- und Wirtsspektrum aus. Sie vermehren sich mit einem kurzen Replikationszyklus und persistieren *in vivo* in den sensorischen Ganglienzellen. Die humanpathogenen Vertreter dieser Unterfamilie sind das Herpes-Simplex-Virus (HSV) 1 und 2 (HHV-1 und HHV-2; Gattung Simplexviren) sowie das Varizella-Zoster-Virus (VZV oder HHV-3; Gattung Varicelloviren).

Zu den **β -Herpesviren (*Betaherpesvirinae*)** gehören neben HHV-6 und HHV-7 (Gattung Roseoloviren) auch das humane Cytomegalovirus (HCMV oder HHV-5; Gattung Cytomegaloviren). Diese Unterfamilie weist im Gegensatz zu den α -Herpesviren eine sehr strikte Speziespezifität mit einem langen Replikationszyklus auf. Neben einem sehr breiten Spektrum produktiv infizierbarer Zellen persistieren die β -Herpesviren in lymphoretikulären Bindegewebszellen und sekretorischen Drüsenzellen.

Die Vertreter der **γ -Herpesviren (*Gammaherpesvirinae*)** sind das Epstein-Barr-Virus (EBV oder HHV-4; Gattung Lymphokryptoviren), sowie das Kaposi-Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV oder HHV-8; Gattung Rhadinoviren). Sie besitzen ebenfalls eine strikte Speziespezifität, wohingegen die Dauer des Replikationszyklus variiert. Die Infektion und Persistenz dieser Unterfamilie findet überwiegend in lymphoiden Geweben statt. Zudem

besitzen die γ -Herpesviren transformierende Fähigkeiten und können maligne Erkrankungen auslösen (EBV: Burkitt-Lymphom; KSHV: Kaposi-Sarkom) (Pellet und Roizman, 2007).

1.2. Die Cytomegaloviren

Die Cytomegaloviren (CMV) werden aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften den β -Herpesviren zugeordnet, die sich in 3 weitere Gattungen untergliedern; die Roseoloviren (siehe oben), die Muromegaloviren und die neu entdeckten Probosciviren (Davison *et al.*, 2009; Davison, 2011). Streng genommen werden als Cytomegaloviren nur HCMV und die Cytomegaloviren der Menschenaffen, sowie der Neu- und Altweltaffen bezeichnet. In der Praxis werden jedoch auch die Muromegaloviren im Begriff der Cytomegaloviren vereint (Davison *et al.*, 2013). Zu dieser Gattung gehören das murine CMV (mCMV oder murides Herpesvirus 1, MuHV1) und das CMV der Ratte (rCMV oder MuHV2). Die Namensgebung basiert auf der für die CMV-Infektion charakteristischen Vergrößerung infizierter Zellen (griech. *kytos*: Zelle; griech. *megalo*: groß).

1.2.1 Strukturelle und biologische Eigenschaften

Die **Virionenstruktur** von CMV entspricht der typischen Morphologie der *Herpesviridae* (Abb. 1.1). Mit einem Virionen-Durchmesser von ca. 150-200nm gehört CMV zu den größten Vertretern der Herpesviren. Im Inneren befindet sich ein DNA-Protein Komplex, der von einem ikosaedrischen Nukleokapsid (ca. 100nm) – bestehend aus 162 Kapsomeren – umschlossen ist (Chen *et al.*, 1999). Dem Kapsid ist das Tegument, eine amorphe Proteinmatrix aus ca. 25 verschiedenen viralen Phosphoproteinen, aufgelagert. Das Virion ist nach außen durch eine Lipid-Doppelmembran abgegrenzt, die sowohl virale als auch zelluläre Glykoproteine enthält (Streblow *et al.*, 2006; Mocarski *et al.*, 2007). Zusätzlich kann in den Virionen neben einer Reihe viraler auch zelluläre RNA nachgewiesen werden (Terhune *et al.*, 2004).

Das **doppelsträngige lineare DNA-Genom** mit einer Länge von ca. 240kbp zählt zu den größten Genomen Säugetier-infizierender Viren (Davison, 2003). Während für HCMV eine Kodierungskapazität vorhergesagt wird, die zwischen 165 und 252 offenen Leserahmen (ORFs, *open reading frames*) liegt (Chee *et al.*, 1990; Cha *et al.*, 1996; Novotny *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2003; Dolan, 2004; Mocarski *et al.*, 2007), kodiert mCMV wahrscheinlich für ca. 170 ORFs (Rawlinson *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 2006). Allerdings wurde bei der Bestimmung der bisher beschriebenen ORFs das umfangreiche Proteom von CMV (Murphy und Shenk, 2008) nicht berücksichtigt. In einer aktuellen Studie konnte für HCMV gezeigt werden, dass die Regulation alternativer Transkriptionsstartpunkte zu einer deutlichen

Erhöhung der Kodierungskapazität von HCMV führt (Stern-Ginossar *et al.*, 2012). Genexpressionsanalysen führten zur Entdeckung mehrerer hundert noch nicht identifizierter ORFs; es wurden insgesamt 751 translatierte ORFs beschrieben (Stern-Ginossar *et al.*, 2012). Hierfür wurde das sog. ribosomale *Profiling* verwendet, eine Methode, die sich das *Next Generation Sequencing* zunutze macht, und dadurch ein systematisches *Monitoring* zellulärer Translationsprozesse ermöglicht.

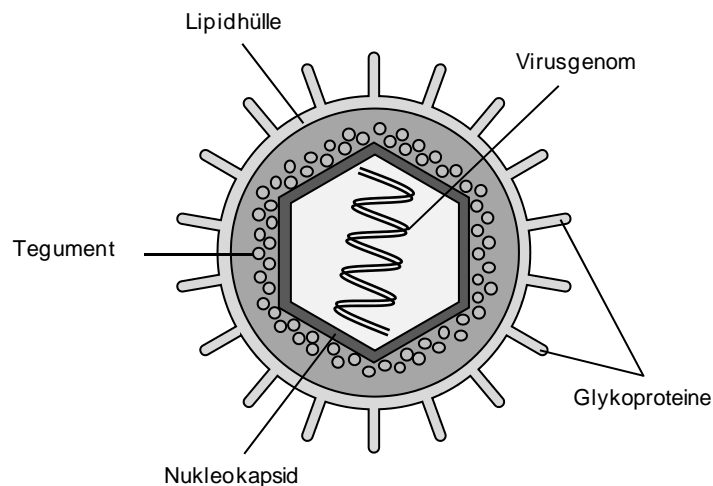


Abb. 1.1: Schematischer Aufbau eines CMV-Virions.

Die Cytomegaloviren weisen nach systemischer Infektion einen sehr **breiten Zelltropismus** auf. Während Epithelzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen produktiv infiziert werden, verläuft die Infektion von Hepatozyten, Neuronen, Trophoblasten, Makrophagen und dendritischen Zellen wahrscheinlich weniger produktiv (Myerson *et al.* 1984; Ibanez *et al.* 1991; Sinzger *et al.*, 2000; Adler und Sinzger, 2013). Das Eindringen des Virus in eine Zelle ist hierbei nicht notwendigerweise gleichbedeutend mit der Etablierung einer produktiven Infektion. Für diese sind neben der DNA-Replikation und Genexpression auch der Zusammenbau und die Freisetzung neuer Viruspartikel unabdingbar. *In vitro* findet eine produktive Replikation nur in primären Fibroblasten, Endothelzellen und differenzierten myeloischen Zellen statt (Ibanez *et al.*, 1991; Nowlin *et al.*, 1991).

Die **Penetration der Wirtszelle** wird durch Anheftung der Virionen über eine reversible Interaktion von viralen Glykoproteinen (gB, gM/gN) mit Heparansulfat-Proteoglykanen der Wirtszellmembran vermittelt. Dieses sog. *Attachement* wird daraufhin durch eine stabilere Bindung viraler Glykoproteine bzw. Glykoproteinkomplexe (gH/gL/gO) an spezifische Rezeptoren der Wirtszelloberfläche verstärkt (Adler und Sinzger, 2013). Der eigentliche Eintritt des Virus in die Zelle erfolgt entweder durch direkte Fusion von Virushülle und Wirtszellmembran oder nach Rezeptor-abhängiger Endozytose, die aus einer Fusion der Virushülle mit Membranen endozytotischer Vesikel resultiert. Danach kommt es zur

Freisetzung und Translokation des Nukleokapsids zum Zellkern der Wirtszelle (Boehme und Compton, 2006), wo es an den Kernporenkomplex bindet und die virale DNA ins Nukleoplasma freisetzt (Ojala *et al.*, 2000).

Unabhängig vom Zelltyp oder Virusstamm verläuft die **virale Genexpression** während der akuten Infektion in einer kaskadenartig regulierten Form ab (Mocarski *et al.*, 2007). Zeitlich aufeinander folgend wird die CMV-Infektion in eine *Immediate Early* (IE)-, *Early* (E)- und *Late* (L)-Phase eingeteilt (Honess und Roizman, 1974; Emery und Griffiths, 1990).

Die **IE-Phase** beginnt unmittelbar nach Eintritt der viralen DNA in den Zellkern. Die IE-Gene *IE1*, *IE2* und *IE3* bei mCMV, sowie *IE1* und *IE2* bei HCMV, bilden den *Major Immediate Early* (MIE)-Lokus. Ihre Transkription wird durch den *MIE-Promotor* (MIEP) und den *MIEP-Enhancer* (MIEPE) reguliert (Stenberg *et al.*, 1984; Meier und Stinski, 2006). Die Transkription der MIE-Gene erfolgt durch die zelluläre RNA-Polymerase II und ist von der *de novo*-Synthese viraler Proteine unabhängig. Die **E-Phase** der Genexpression wird durch die IE-Proteine koordiniert (Keil *et al.*, 1984; Bühler *et al.*, 1990) und beginnt ca. 1,5h (mCMV) oder 4-24h (HCMV) nach Infektion. Die Genprodukte der E-Phase sind für die virale DNA-Replikation essentiell und diese erfolgt analog den anderen Herpesviren nach dem Prinzip des *rolling circle* (Marks und Spector, 1998). Mit dem Beginn der viralen DNA-Synthese durch die virale DNA-Polymerase geht die Infektion per Definition in die **L-Phase** über und schließt mit der Synthese der Strukturproteine, die für die Morphogenese der Kapside und die Verpackung der Genome im Zellkern essentiell sind, ab (Mocarski *et al.*, 2007).

Nach Aufnahme der DNA werden die Nukleokapside in einem ersten Knospungsprozess (*primary envelopment*) durch die innere Kernmembran, die als vorübergehende Kapsidhülle dient, in den perinukleären Raum geschleust. Nach Fusion mit der äußeren Kernmembran werden die nackten Nukleokapside ins Zytoplasma freigesetzt, wo sie ihr Tegument enthalten. Die Reifung des Teguments erfolgt durch Anlagerung viraler Glykoproteine im Zytoplasma und Trans-Golgi Netzwerk. Danach erfolgt eine zweite Knospung an den Vesikeln des *endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartments* (ERGIC), bei der die Kapside mit der endgültigen Hüllmembran umgeben werden (*secondary envelopment*). Nach Fusion mit der Plasmamembran der Wirtszelle werden die reifen Virionen in den extrazellulären Raum freigesetzt (Eickmann *et al.*, 2006).

1.2.2 Epidemiologie, Pathogenese und klinische Relevanz

HCMV ist ubiquitär verbreitet. Die Prävalenz der Infektion ist neben Alter, Geschlecht und Rasse vorwiegend vom geographischen und sozioökonomischen Status der Individuen abhängig. Während Vorschulkinder in Großbritannien und den USA eine Seroprävalenz von <20% aufweisen, sind gleichaltrige Kinder in Ostasien, Indien und Südamerika zu >90%

seropositiv (Britt, 2010). Da mit fortschreitendem Alter ein Anstieg der Durchseuchungsrate nachzuweisen ist, liegt diese in Mitteleuropa und Nordamerika bei ca. 40-60% der Gesamtbevölkerung; die Durchseuchungsrate in Entwicklungsländern liegt bei nahezu 100% (Mocarski *et al.*, 2007). Die Übertragung von HCMV erfolgt vorwiegend durch direkten Körperkontakt als Schmier- oder Tröpfcheninfektion über Speichel, Urin, Blut, Genitalsekrete oder Muttermilch (Pass *et al.*, 1985; Mocarski *et al.*, 2007; Boppana und Britt, 2013).

Die **horizontale Transmission** findet meistens durch intensiven Kontakt mit Kindern in der eigenen Familie oder in Betreuungseinrichtungen für Kinder statt (Reddehase, 2002). Eine Übertragung durch Organtransplantation oder Bluttransfusion ist ein Aspekt, der in der Transplantationsmedizin eine wichtige Rolle spielt (Mocarski *et al.*, 2007)

Die **vertikale Transmission**, die diaplazentar oder während der Geburt von der infizierten Mutter auf das ungeborene Kind oder postnatal über die Muttermilch geschieht, ist ein charakteristisches Merkmal für HCMV (Fitzgerald *et al.*, 1990; Mocarski *et al.*, 2007). Die Gefahr einer intrauterinen Transmission besteht sowohl nach Primärinfektion der Mutter als auch nach Reaktivierung (Boppana *et al.* 2001; Kenneson und Cannon, 2007). Die Inzidenz einer kongenitalen Infektion beträgt unter allen Schwangerschaften ca. 2%, von denen aber etwa 90% asymptomatisch verlaufen. Die Inzidenz der Infektion des Kindes nach Primärinfektion der Mutter ist dagegen mit ca. 40% deutlich höher als nach Reaktivierung (ca. 1%) (Hanshaw und Dudgeon, 1978; Stagno und Whitley, 1985; Boppana und Britt, 2013).

HCMV zählt zu den typischen opportunistischen Krankheitserregern, deren Primärinfektion in immunkompetenten Personen meist asymptomatisch verläuft, da die Virusausbreitung durch das Immunsystem sehr effizient kontrolliert wird. Zu einer Manifestation der HCMV-Erkrankung kommt es vorwiegend in immunsupprimierten Personen oder nach Infektion von Neugeborenen oder Ungeborenen, deren Immunsystem noch nicht vollständig ausgereift ist.

Zu einer **kongenitalen Infektion** mit schweren Verlaufsformen kommt es vor allem nach Primärinfektion oder Reinfektion (Fowler *et al.*, 1992; Boppana *et al.*, 2001). Die Infektion manifestiert sich hauptsächlich im zentralen Nervensystem, der Leber oder dem Blutsystem und führt in schweren Verlaufsformen oft zu lebenslangen neurologischen Folgen wie Taubheit, Blindheit und mentaler Retardation (Colugnati, 2007; Kenneson und Cannon, 2007). Ein fetaler oder neonataler Tod tritt in etwa 10% der symptomatisch infizierten Individuen auf (Fowler *et al.*, 1992).

Eine wichtige Risikogruppe stellen Patienten mit **immunsuppressiver Behandlung** wie Krebspatienten oder Patienten nach Organ-, Knochenmark- oder hämatopoetischer Stammzelltransplantation, dar (Dowling *et al.*, 1976; Neimann *et al.*, 1977, Britt, 2006). Zu

den häufigsten Symptomatiken zählen hierbei die interstitielle Pneumonie sowie Retinitis und Hepatitis (Meyers *et al.*, 1986; Reinke *et al.*, 1999; Mocarski *et al.*, 2007).

Eine weitere Risikogruppe sind Personen mit einer angeborenen (z.B. *severe combined immunodeficiency*, SCID) oder erworbenen (z.B. *acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS) **Immunschwächekrankheit**. Auch in diesen Fällen werden Retinitis und Pneumonie am häufigsten diagnostiziert (Moskowitz *et al.*, 1985; Drew, 1992).

Neben der Manifestation von HCMV in immunsupprimierten Personen konnte auch eine Reaktivierung nach Sepsis gezeigt werden (Heininger *et al.*, 2001; von Muller *et al.*, 2007). HCMV in Verbindung mit anderen Krankheiten wie Arteriosklerose, Tumorbildung, Alzheimer und Immunoseneszenz ist Gegenstand aktueller Forschung (Stassen *et al.*, 2006; Maussang *et al.*, 2009; Caposio *et al.*, 2011; Hill, 2013).

Eine wirksame **Behandlung der klinischen Manifestationen** von CMV ist bis heute nach wie vor schwierig. Für die präventive oder therapeutische Behandlung von HCMV-Erkrankungen werden derzeit überwiegend drei Medikamente, sog. **Virostatika**, angewandt. Zu diesen gehören Ganciclovir (GCV)/Valganciclovir (valGCV), Cidofovir (CDV) und Foscarnet (FOS), die alle mit der viralen DNA-Polymerase interferieren und dadurch die virale Replikation inhibieren (Michel und Mertens, 2006; Michel *et al.*, 2013; Plotkin und Plachter, 2013; Seo und Boekh, 2013). Aufgrund ihrer starken Nebenwirkungen und der zunehmenden Resistenzentwicklung von HCMV gegen diese Virostatika ist die Entwicklung alternativer Medikamente gegen HCMV unabdingbar. Folgende antivirale Wirkstoffe befinden sich aktuell in klinischen Studien. Maribavir, ein Inhibitor der viralen Proteinkinase, befindet sich aktuell in einer klinischen Phase-3-Studie; CMX-001, ein Lipid-Konjugat Nukleotid-Analogon von CDV, weist eine 300- bis 400-fach höhere Aktivität gegen HCMV auf als CDV (klinische Phase-2-Studie); Letermovir (AIC246), ein Inhibitor der HCMV-Replikation, ist gegen multiresistente HCMV-Varianten wirksam (klinische Phase-2-Studie). Des Weiteren sind Artesunat, ein Wirkstoff gegen Malaria, der eine breite antivirale Wirkung u.a. gegen Herpesviren zeigt, und Leflunomid, ein Immunsuppressivum gegen rheumatische Arthritis, das die HCMV-Replikation beeinträchtigt, Gegenstand aktueller Forschung (Michel *et al.*, 2013; Seo und Boekh, 2013).

Für **passive Immunisierungen** mit HCMV-spezifischen neutralisierenden Antikörpern ist bei kongenitalen Infektionen ein guter Schutz beschrieben (Nigro *et al.*, 2005; Maidji *et al.*, 2010; Nigro und Adler, 2011), während bei Transplantat-Empfängern meist nur der adoptive Transfer von CD8 T-Zellen eine Wirkung zeigt (Riddell *et al.*, 1992; Walter *et al.*, 1995; Einsele *et al.*, 2002; Feuchtinger *et al.*, 2010; Peggs *et al.*, 2011).

Ein wirksamer Impfstoff gegen HCMV steht aktuell nicht zur Verfügung, jedoch sind verschiedene Strategien für Lebendimpfstoffe und Nicht-Lebendimpfstoffe Gegenstand

aktueller Forschung. Dazu gehören attenuierte Viren, Vektoren, rekombinante Glykoproteine, DNA-Vakzine, Peptide und subvirale Viruspartikel (Plotkin und Plachter, 2013).

1.2.3 Das murine Cytomegalovirus als Modellsystem

Aufgrund der strikten Speziespezifität der Cytomegaloviren ist eine Untersuchung von HCMV in experimentellen Tiermodellen nicht möglich. Somit ist ein geeignetes Tiermodell für die Untersuchung von Infektion und Pathogenese der Cytomegaloviren unverzichtbar. Da das murine Cytomegalovirus (mCMV) neben einer strukturellen, biologischen und teilweise genetischen Vergleichbarkeit mit HCMV auch analoge Anpassungsmechanismen an das Immunsystem des Wirtes besitzt, macht dies mCMV zum meistverwendeten Modellsystem für die HCMV-Infektion (Rawlinson *et al.*, 1996; Reddehase, 2002; Holtappels *et al.*, 2006b; Holtappels *et al.*, 2013).

Zu den natürlichen Wirten von mCMV zählen die Vertreter der Hausmaus (*Mus musculus*, *M. m.*), die mehrere Subspezies unter sich vereinen (Tucker, 2007). Die weltweit in Forschungslaboren für experimentelle Modelle verwendeten Mäuse basieren mehrheitlich auf dem genetischen Hintergrund der *M. m. domesticus* (Frazer *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011; Redwood *et al.* 2013).

Die **Pathogenese der Infektion** von mCMV ist mit der von HCMV sowohl im immunsupprimierten als auch im immunkompetenten Wirt vergleichbar (Krmptotic *et al.*, 2003; Scalzo *et al.*, 2007). Des Weiteren verläuft die angeborene und adaptive Immunantwort mit einer vergleichbaren Kinetik. Die Immunkontrolle wird sowohl nach mCMV- als auch HCMV-Infektion hauptsächlich durch CD8 T-Zellen vermittelt (Reddehase, 2002; Holtappels *et al.*, 2006b).

Im Hinblick darauf hat sich die im murinen System entwickelte **CD8 T-Zell-basierte antivirale Immuntherapie** (Reddehase *et al.*, 1985; Reddehase *et al.*, 1987; Reddehase *et al.*, 1988; Holtappels *et al.*, 2008a; Ebert *et al.*, 2012b) auch als sehr wirkungsvoll für die humane Immuntherapie nach Knochenmark- oder Organtransplantation erwiesen (Greenberg *et al.* 1991; Riddell *et al.*, 1992; Walter *et al.*, 1995). Obwohl die Immuntherapie in den letzten Jahren signifikante Fortschritte verzeichnen konnte (Peggs *et al.*, 2003; Einsele *et al.*, 2003; Cobbold *et al.*, 2005; Feuchtinger *et al.*, 2010) ist die erforderliche hohe Zellzahl für die CD8 T-Zell-basierte Immuntherapie noch ein bedeutendes Hindernis in der klinischen Routine.

HCMV und mCMV kodieren für Proteine, die sowohl mit Komponenten der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort interferieren (Reddehase, 2002; Mocarski, 2002). Aufgrund dessen wird das murine Modell auch für die Untersuchung der **immunmodulatorischen Funktionen** verschiedener mCMV-Proteine genutzt. HCMV und mCMV besitzen auf Genomebene eine Sequenzhomologie von 42,5%; die Mehrzahl der

immunmodulatorischen Gene weisen jedoch keine Sequenzhomologien auf. Dennoch haben sich analoge Mechanismen der Immunmodulation entwickelt, die eine Übertragung der im murinen Modell erworbenen Erkenntnisse auf die HCMV-Infektion erlauben (Reddehase, 2002; Mocarski, 2002). Von den 170 für mCMV beschriebenen ORFs zeigen 78 eine signifikante Sequenzhomologie mit HCMV-Proteinen (Rawlinson *et al.*, 1996; Landolfo *et al.*, 2003).

Einen großen Vorteil für die Untersuchung der Funktion sowie der *in vivo*-Relevanz einzelner Gene bieten murine Infektionsmodelle mit genetisch manipulierten Viren und/oder Wirten. Des Weiteren können in etablierten Tiermodellen Fragestellungen untersucht werden, die im humanen System aus ethischen Gründen nicht vertretbar sind.

Für die **experimentelle mCMV-Infektion** werden überwiegend zwei Laborstämme verwendet, *Smith* (Smith, 1954) und K181 (Hudson *et al.*, 1976). Zunächst war eine Mutagenese des Virusgenoms nur im Zuge einer ineffizienten homologen Rekombination in eukaryotischen Zellen möglich (Späte und Mocarski, 1987). Die Klonierung des mCMV-Genoms in künstliche Bakterienchromosomen (BAC, *bacterial artificial chromosome*) machte den Weg für mannigfaltige Genmanipulationen in *E. coli* frei (Messerle *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 1999; Redwood *et al.*, 2005).

1.3 Immunologische Kontrolle der CMV-Infektion

Die immunologische Kontrolle der CMV-Infektion beruht im immunkompetenten Wirt auf einem Zusammenspiel von Komponenten des angeborenen und adaptiven Immunsystems (Reddehase, 2002; Paludan *et al.*, 2011). Während Typ-I Interferone (IFN) und natürliche Killer (NK)- Zellen – Hauptkomponenten des angeborenen Immunsystems – eine essentielle Rolle für die Eindämmung der frühen CMV-Infektion spielen (Bukowski *et al.*, 1984; Biron *et al.*, 1989; Arase *et al.*, 2002; Salazar-Mather *et al.*, 2002), ist die adaptive zytotoxische CD8 T-Zellantwort für die Terminierung der CMV-Infektion unabdingbar (Welsh *et al.*, 1991; Jonjic *et al.*, 1994; Reddehase *et al.*, 1994).

Eine weitere Komponente des adaptiven Immunsystems ist die Antikörper-vermittelte humorale Immunität, die aber bei der Kontrolle der CMV-Primärinfektion nur eine untergeordnete Rolle spielt. Vielmehr sind die von B-Zellen sezernierten CMV-spezifischen Antikörper in der Lage, die Virusdissemination im Verlauf einer rekurrenten oder Sekundär-Infektion zu limitieren (Jonjic *et al.*, 1994; Reddehase *et al.*, 1994; Klenovsek *et al.*, 2007; Wirtz *et al.*, 2008).

1.3.1 Reaktion des angeborenen Immunsystems

Das angeborene Immunsystem stellt eine erste Verteidigungslinie gegen eindringende Pathogene dar. Deren Detektion erfolgt durch spezialisierte Rezeptoren, sog. *pattern-recognition receptors* (PRRs), die auf verschiedensten Zellen des Immunsystems exprimiert werden und konservierte charakteristische Strukturen, sog. *pathogen-associated molecular patterns* (**PAMPs**), auf den Pathogenen erkennen (Akira *et al.*, 2006; Lotze *et al.*, 2007). Über verschiedene Signalkaskaden führt die Erkennung anschließend zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und dadurch entweder direkt oder indirekt über Zytokine zur Initiierung einer frühen antiviralen Immunantwort (Akira *et al.*, 2001; Janeway und Medzhitov, 2002; Kawai und Akira, 2010). Neben den PAMPs wird das Immunsystem auch durch endogene Signale, sog. *damage-associated molecular patterns* (**DAMPs**), alarmiert, die infolge von Zellschädigung durch das Auflösen der Zelle freigesetzt werden. Sie werden meist durch die gleichen PRRs wie auch die PAMPs erkannt (Lotze *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2012).

Die bekanntesten PRRs sind die **membranständigen Toll-like Rezeptoren** (TLRs) auf der Zytoplasmamembran oder in endosomalen Kompartimenten (Akira *et al.*, 2006; Kawai und Akira, 2010; Paludan *et al.*, 2011). Während die TLRs auf der Zytoplasmamembran hydrophobe Liganden wie Lipide und Proteine binden, sind die endosomalen TLRs für die Erkennung von Nukleinsäuren zuständig (Takeuchi und Akira, 2010; Paludan *et al.*, 2011). Bisher sind vier TLRs (TLR2, 3, 7 und 9) beschrieben, die entweder an CMV-Proteine auf der Zelloberfläche oder an intrazelluläre CMV-Nukleinsäuren binden (Tabeta *et al.*, 2004; Boehme *et al.*, 2006; Paludan *et al.*, 2011).

Neben den gut charakterisierten TLRs wurden kürzlich verschiedene **intrazelluläre PRRs** identifiziert, die im Zytoplasma lokalisiert sind und Nukleinsäuren erkennen (Takeuchi und Akira, 2010; Paludan *et al.*, 2011). Von besonderer Relevanz sind neben **RNA-Sensoren**, wie *retinoic-acid-inducible gene 1* (RIG-I)-ähnlichen Rezeptoren (RLR) (Schlee *et al.*, 2009) und *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5) (Pichlmair *et al.*, 2009) auch **DNA-Sensoren**, wie DAI (*DNA-dependent activator of IFN-regulatory factor*) (Takaoka *et al.*, 2007) und AIM2 (*absence in melanoma 2*) (Hornung *et al.*, 2009). Des Weiteren sind zytoplasmatische PRRs bekannt, die vor allem auf zelluläre Stressfaktoren und Inflammation reagieren, hierzu zählen die *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)-ähnlichen Rezeptoren (NLRs) (Kawai und Akira, 2010) oder RAGE (*receptor for advanced glycation end products*) (Yan *et al.*, 2010).

Zu den **Haupteffektorzellen des angeborenen Immunsystems** gegen virale Pathogene gehören neben Monozyten/Makrophagen und dendritischen Zellen (DCs) auch NK-Zellen. Nach der Detektion viraler PAMPs und DAMPs kommt es zur Aktivierung der

Transkriptionsfaktoren *IFN-regulatory factor* (IRF)-3 und -7, *activator protein* (AP)-1 und *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B), die anschließend zur Induktion proinflammatorischer Zytokine, wie *tumor necrosis factor alpha* (TNF α), Interleukin (IL)-1 β , -6 und -12, sowie Chemokine (z.B. CXCL8) und Typ-I IFN (IFN- α , IFN- β) führen (Kawai und Akira, 2006; Seth *et al.*, 2006; Kawai und Akira, 2007; Kawai und Akira, 2010).

Das **Interferon-System** zählt zu den zentralen Abwehrmechanismen der angeborenen Immunantwort. Bereits vor über 50 Jahren wurde die antivirale Wirkung der Interferone in der Literatur beschrieben (Isaacs und Lindenmann, 1957). Mittlerweile ist bekannt, dass das Interferon-System eine viel weitreichendere Funktion einnimmt und durch eine Vielzahl von Stimuli induziert werden kann (Pestka *et al.*, 1987; Samuel, 2001). Es besitzt neben seinen antiviralen Eigenschaften auch eine regulatorische Funktion beim Zellwachstum und bei der Immunmodulation (Grander *et al.*, 1997; Biron, 2001). Den Interferonen kommt aufgrund der Induktion der *major histocompatibility complex class I* (MHC-I)-Genexpression (Bukowski *et al.*, 1985; Israel *et al.*, 1986; Korber *et al.*, 1987) und der Aktivierung von NK-Zellen (Biron *et al.*, 1996; Biron *et al.*, 1999) eine verbindende Funktion zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort zu (Biron, 2001).

Zu den **Typ-I Interferonen** gehören verschiedene Subtypen von IFN- α , die hauptsächlich von Leukozyten, und IFN- β , das nahezu von allen kernhaltigen Zellen exprimiert wird. IFN- γ zählt zu den **Typ-II Interferonen** und wird von verschiedenen Immunzellen, wie CD4 und CD8 T-Zellen oder NK-Zellen produziert (Taniguchi und Takaoka, 2001; Zimmermann und Hengel, 2006).

Die **NK-Zellen** nehmen eine Sonderstellung im Zuge der angeborenen Immunantwort ein, da sie neben der Sezernierung verschiedener Zytokine (TNF α , IFN- γ , IL-5, -10 und -13) und Chemokine auch an der Initiation und Aufrechterhaltung der adaptiven Immunantwort beteiligt sind (Jonjic *et al.*, 2006). Des Weiteren sind NK-Zellen in der Lage in infizierten Zellen entweder indirekt über Perforin und Granzym B (Tay *et al.*, 1997; van Dommelen *et al.*, 2003) oder direkt durch Bindung an Todesrezeptoren (z.B. Fas) Apoptose zu induzieren (Nagata, 1997; Smyth *et al.*, 2003; Chavez-Galan *et al.*, 2009). Ihre Aktivierung erfolgt unspezifisch und unterliegt einem Zusammenspiel von inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren (Kirwan und Burshtyn, 2007).

Nach CMV-Infektion wird die MHC-I Expression auf der Oberfläche von infizierten Zellen herabreguliert und führt zu einer verminderten Erkennung durch CD8 T-Zellen (Reddehase, 2002). Diese Herabregulation von MHC-I kann jedoch nach der „*missing-self* Theorie“ (Kärre *et al.*, 1986) zu einer Aktivierung von NK-Zellen führen. Bereits in frühen Studien konnte gezeigt werden, dass eine eingeschränkte NK-Zell-Funktion zu einer erhöhten viralen Suszeptibilität führt (Shellam *et al.*, 1981; Bukowski *et al.*, 1984; Shanley, 1990; Welsh *et al.*, 1991) und dass der adoptive Transfer von NK-Zellen in immunsupprimierte Mäuse vor CMV-

Pathogenese schützt (Bukowski *et al.*, 1985; Bukowski *et al.*, 1988). Beim Menschen konnte eine NK-Defizienz mit einer erhöhten Zahl an Primärinfektionen und Reaktivierungen in Verbindung gebracht werden (Shellam *et al.*, 1981; Biron *et al.*, 1989).

Die NK-Zell-Kontrolle ist im Wirtsorganismus genetisch determiniert und führt zu einer **unterschiedlichen mCMV-Suszeptibilität** verschiedener Mausstämme (Bancroft *et al.*, 1981). Der Unterschied hinsichtlich der NK-Zell-Kontrolle zwischen C57BL/6- und BALB/c-Mäusen konnte mit Hilfe genetischer Analysen auf das *CMV1*-Allel innerhalb des NK-Lokus der C57BL/6-Maus zurückgeführt werden (Allan und Shellam, 1984), das für den aktivierenden NK-Zellrezeptor Ly49H (*Klra8*, *killer cell lectin-like receptor 8*) kodiert (Scalzo *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001). Dieser Rezeptor interagiert mit dem viralen Glykoprotein m157, das auf der Oberfläche infizierter Zellen exprimiert wird, und aktiviert NK-Zellen in der C57BL/6-Maus (Arase *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002; Arase und Lanier, 2004; Jonjic *et al.*, 2006). Dagegen führt die Deletion von m157 durch den Wegfall der NK-Zell-Kontrolle über Ly49H zu einer Zunahme der Virulenz (Bubic *et al.*, 2004). Eine Aktivierung der NK-Zellen über Ly49H ist in der BALB/c-Maus nicht möglich, da deren NK-Zellen diesen Rezeptor nicht exprimieren (Brown *et al.*, 2001; Daniels *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001).

In der BALB/c-Maus sowie in nahezu allen anderen Mausstämmen und natürlichen Mauspopulationen wird die Aktivierung der NK-Zellen hauptsächlich über den aktivierenden NK-Zell-Rezeptor NKG2D (*natural killer group 2D*), der verschiedene Liganden auf infizierten Zellen erkennt, vermittelt (Redwood *et al.*, 2013). Zu den Liganden zählen Mitglieder der RAE-1- (*retinoic acid early-inducible gene-1*) und H60-Familie sowie MULT-1 (*murine UL16 protein-like transcript 1*). Die Bindung von NKG2D an einen der Liganden führt zur Aktivierung der NK-Zell-Zytotoxizität sowie zur Produktion von IFN- γ und TNF- α (Brown *et al.*, 2001; Krmpotic *et al.*, 2002; Vidal *et al.*, 2013).

1.3.2 Reaktion des adaptiven Immunsystems

Das angeborene Immunsystem vermittelt gegen Infektionen wie CMV nur einen temporären Schutz und ist bis zur Initiation der adaptiven Immunantwort primär für eine Eindämmung der Infektion im Organismus verantwortlich (Krmpotic *et al.*, 2003). Eigenschaften wie Spezifität, Diversität und die Bildung von Gedächtnis (*Memory*)-Zellen repräsentieren elementare Eigenschaften der adaptiven Immunantwort (Ahmed und Gray, 1996).

Zu den **Haupteffektoren des adaptiven Immunsystems** nach CMV-Infektion zählen die zytotoxischen CD8 T-Zellen (CTLs, *cytotoxic T lymphocytes*), deren Immunantwort – bedingt durch klonale Expansion und Differenzierung – etwa 3 Tage nach Infektion einsetzt (Quinnan *et al.*, 1978; Hokeness *et al.*, 2007; Böhm *et al.*, 2008). Die Aktivierung der CD8 T-Zellen, das sog. CD8 T-Zell-*Priming*, beruht auf der Detektion von prozessierten Peptiden auf MHC-I

Molekülen auf der Oberfläche professionell Antigen-präsentierender Zellen (profAPCs, *professional antigen presenting cells*). Weiterhin ist die Interaktion kostimulatorischer Moleküle mit Liganden der Zielzelle sowie die Freisetzung verschiedener Zytokine durch profAPCs für das CD8 T-Zell-*Priming* essentiell (Rudolph *et al.*, 2006).

Die spezifische **Erkennung der Peptid-beladenen MHC-I (pMHC-I)-Komplexe** erfolgt durch den T-Zell-Rezeptor (TCR, *T-cell receptor*) zusammen mit weiteren kostimulatorischen Molekülen, die mit Liganden der Zielzelle interagieren (Marrack und Kappler, 1987). Nach Antigenkontakt werden naive CD8 T-Zellen zur Proliferation angeregt (klonale Expansion) und differenzieren zu CTLs. Gleichzeitig kommt es zur Generierung von *Memory*-T-Zellen, die als immunologisches Gedächtnis im Körper verbleiben und bei erneutem Antigenkontakt schnell aktiviert werden können (Stemberger *et al.*, 2007).

Zu den **Effektorfunktionen von CTLs** zählen neben der direkten zytolytischen Aktivität (Doherty, 1993), auch die Sezernierung von Zytokinen (TNF α , IFN- γ) und Chemokinen (Harty *et al.*, 2000). Wie bei den NK-Zellen kann die zytolytische Aktivität entweder direkt über die Bindung von Todesrezeptoren (z.B. Fas) oder indirekt über Perforin und Granzym B erfolgen (Chavez-Galan *et al.*, 2009).

Die essentielle **Bedeutung von CD8 T-Zellen für die Kontrolle der CMV-Infektion** wurde in verschiedenen Systemen eindeutig belegt. Bereits 1985 konnten Reddehase und Kollegen zeigen, dass sowohl ein präventiver als auch therapeutischer Transfer mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen immunsupprimierte BALB/c-Mäuse vor einer mCMV-Infektion schützt (Reddehase *et al.*, 1985). Die CD8-negative Restpopulation vermittelte dagegen keinen Schutz. Das protektive Potential mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen konnte durch den Transfer *in vitro* generierter mCMV-Peptid-spezifischer CTL-Linien (CTLL, *cytotoxic T lymphocyte line*) bestätigt werden (Holtappels *et al.*, 2000a; Holtappels *et al.*, 2001; Pahl-Seibert *et al.*, 2005). Im kliniknahen Modell der experimentellen Knochenmarktransplantation (KMT) wurde zudem gezeigt, dass die Rekonstitution der CD8 T-Zellantwort essentiell ist, um die akute mCMV-Infektion zu terminieren (Alterio de Goss *et al.*, 1998; Holtappels *et al.*, 1998; Podlech *et al.*, 1998; Podlech *et al.*, 2000). Dieser Befund konnte später auch für die Kontrolle der HCMV-Infektion nach KMT bestätigt werden (Reusser *et al.*, 1991; Riddel und Greenberg, 1995; Cobbold *et al.*, 2005). Bei Organtransplantat-Empfängern zeigt meist nur der adoptive Transfer von CD8 T-Zellen eine Wirkung (Riddel *et al.*, 1992; Walter *et al.*, 1995; Einsele *et al.*, 2002; Feuchtinger *et al.*, 2010; Peggs *et al.*, 2011).

Die CD8 T-Zellantwort gegen Pathogene ist durch ein **spezifisches Erkennungsmuster** geprägt, das abhängig vom MHC-I Haplotyp von einzelnen CD8 T-Zellspezifitäten dominiert wird. In der BALB/c-Maus (Haplotyp: H-2^d) konnten bisher 9 antigene mCMV-Peptide identifiziert werden, von denen Peptide aus den ORFs M105, m123 (IE1), m145 und m164 in der akuten Phase der Infektion eine immundominante CD8 T-Zellantwort induzieren

(Holtappels *et al.*, 2006b; Holtappels *et al.*, 2008b; Holtappels *et al.*, 2013). In der C57BL/6-Maus wurden bisher 24 antigene mCMV-Peptide beschrieben, von denen M38, M45, M57, m139 und m141 in der akuten Phase der Infektion als immundominant eingestuft werden (Munks *et al.*, 2006a, b). Die Immundominanz der Spezifitäten korreliert jedoch nicht mit deren protektivem Potential und es konnte gezeigt werden, dass subdominante Spezifitäten ein vergleichbares protektives Potential haben wie dominante Spezifitäten (Holtappels *et al.*, 2008b, Ebert *et al.*, 2012a).

1.4 Antigenpräsentation und CD8 T-Zell-*Priming* nach CMV-Infektion

Bisher sind zwei allgemein akzeptierte MHC-I-vermittelte Antigenpräsentationswege beschrieben. Während die **direkte Präsentation** von pMHC-I-Komplexen auf der endogenen Prozessierung viraler Proteine der infizierten Zelle basiert (Rock *et al.*, 2002), wird bei der **Cross-Präsentation** antigenes Material aus der extrazellulären Umgebung aufgenommen und daraus prozessierte Peptide über MHC-I auf der nicht infizierten Zelle präsentiert (Bevan, 1976; Rock *et al.*, 1990; Heath und Carbone, 1999).

Da sowohl HCMV als auch mCMV effektive Immunevasionsmechanismen besitzen, die der direkten MHC-I-vermittelten Präsentation viraler Antigene entgegenwirken, spielt die *Cross-Präsentation* für eine effektive CD8 T-Zellantwort möglicherweise eine vorrangige Rolle (Gold *et al.*, 2002; Basta und Bennink, 2003; Munks *et al.*, 2007; Böhm *et al.*, 2008).

1.4.1 Direkte Präsentation endogener Peptide

Durch die direkte Präsentation von pMHC-I Komplexen sind infizierte oder transformierte Zellen in der Lage, die Synthese fremder oder mutierter Proteine den CD8 T-Zellen zu signalisieren. Die daraus resultierende Initiation einer CD8 T-Zellantwort gegen ein Antigen, das von der Zelle selbst synthetisiert wurde, wird auch als direktes *Priming* (*direct priming*) bezeichnet.

Beim direkten Präsentationsweg werden endogen synthetisierte Proteine im Zytosol durch das Proteasom prozessiert und die entstandenen Peptide via TAP (*Transporter associated with antigen presentation*) in das endoplasmatische Retikulum (ER) transloziert. Hier werden die antigenen Peptide mit Hilfe des Peptid-Beladungskomplexes auf neu synthetisierte MHC-I Moleküle geladen (Suh *et al.*, 1994; Grandea *et al.*, 1995). Die pMHC-I Komplexe werden dann über den konstitutiven sekretorischen Transportweg zur Zelloberfläche transportiert (Townsend *et al.*, 1989; Segura und Villadangos, 2011).

Die **intrazelluläre Prozessierung** sowohl fremder als auch zelleigener Proteine findet im Proteasom statt, das die Spaltung der entfalteten Proteine nach hydrophoben, basischen

oder sauren Aminosäureresten katalysiert (Rock und Goldberg, 1999; Rock *et al.*, 2002). Dadurch entstehen Peptide mit einer Länge von 3-20 Aminosäuren, die durch zytosolische Peptidasen und durch Aminopeptidasen im ER weiter getrimmt werden, bis Peptide in der Länge von 8-10 Aminosäuren entstehen (Serwold *et al.*, 2002; Rock *et al.*, 2004; Saveanu *et al.*, 2005). Das u.a. von aktivierten CD8 T-Zellen sezernierte IFN- γ induziert die Bildung von alternativen katalytischen Proteasom-Untereinheiten, die nach deren Einbau das Immunoproteasom bilden (Hisamatsu *et al.*, 1996). Dies erhöht die Variabilität der generierten Peptide, da sich die proteolytische Aktivität der beiden Proteasomen-Typen voneinander unterscheidet (Toes *et al.*, 2001). In Zellen immunologisch relevanter Organe wie Lymphknoten (LK) und Milz erhöht das Vorkommen beider Proteasomen-Arten nicht nur die Menge sondern auch die Variabilität der generierten Peptide und steigert dadurch die Effizienz der Immunantwort (Toes *et al.*, 2001).

1.4.2 Cross-Präsentation exogener Peptide

Der Begriff *Cross-Präsentation* bezeichnet die Fähigkeit von profAPCs exogenes antigenes Material via MHC-I zu präsentieren. Die daraus resultierende Initiation einer antiviralen CD8 T-Zellantwort gegen ein Antigen, das nicht von der profAPC selbst synthetisiert wurde, wird als **Cross-Priming** bezeichnet (Bevan, 1976; Heath und Carbone, 1999; den Haan und Bevan, 2001; Bevan, 2006; Shen und Rock, 2006). Exogene Antigene folgen nach Internalisierung durch Mikro- oder Makropinozytose, Rezeptor-vermittelter Endozytose oder Phagozytose wahrscheinlich einem von zwei Hauptwegen, die bisher für die *Cross-Präsentation* beschrieben worden sind (Rock und Shen, 2005; Segura und Villadangos, 2011).

Beim **TAP-unabhängigen, endozytotischen oder vakuolären Weg** findet die Peptid-Prozessierung durch intraendosomale Proteasen wie Cathepsin S ohne Beteiligung des Proteasoms statt (Shen *et al.*, 2004). Die Peptid-Beladung von MHC-I Molekülen erfolgt ebenfalls in den endosomalen Kompartimenten (Houde *et al.*, 2003; Burgdorf *et al.*, 2008). Die Literatur liefert Hinweise darauf, dass diese MHC-I Moleküle möglicherweise von der Zelloberfläche stammen und durch Endozytose in das Endosom gelangen; das saure Milieu des Endosoms erlaubt möglicherweise eine Neubeladung der MHC-I-Komplexe, die anschließend wieder zurück auf die Zelloberfläche transportiert werden (Di Pucchio *et al.*, 2008; Merzougui *et al.*, 2011; Segura und Villadangos, 2011).

Im Gegensatz dazu werden beim **TAP-abhängigen, zytosolischen Weg** exogene Antigene vom Endosom ins Zytosol transportiert und im Proteasom prozessiert (Kovacsovic-Bankowski und Rock, 1995; Norbury *et al.*, 1997; Palmowski *et al.*, 2006). Die Translokation der Peptide via TAP ins ER und die Beladung von MHC-I Molekülen mit Hilfe des Peptid-

Beladungskomplexes (Huang *et al.*, 1996) sowie der Transport der pMHC-I-Komplexe zur Zelloberfläche erfolgt anschließend analog dem direkten Präsentationsweg (siehe 1.4.1).

In vivo gilt der zytosolische Weg als der relevanteste Cross-Präsentationsweg (Rock und Shen, 2005).

In der Literatur wird jüngst über einen dritten Mechanismus diskutiert, dem sog. **Cross-Dressing**. Hierbei werden präformierte pMHC-I Komplexe von der Plasmamembran infizierter oder toter Nachbarzellen über einen aktiven Transfer, der sog. Trogozytose, aufgenommen und für das CD8 T-Zell-*Priming* verwendet (Dolan *et al.*, 2006; Wakim und Bevan, 2011). Li und Kollegen konnten zeigen, dass CD8⁺/CD103⁺ DCs sowohl naive als auch *Memory* CD8 T-Zellen durch *Cross-Dressing* aktivieren können (Li *et al.*, 2012).

1.4.3 Dendritische Zellen – professionell cross-präsentierende Zellen

Als cross-präsentierende Zellen sind in der Literatur DCs, B-Zellen und Makrophagen beschrieben. Die Fähigkeit der Cross-Präsentation wird nach Infektion zudem weiteren Zelltypen, wie neutrophilen Granulozyten, basophilen Granulozyten, Mastzellen und Endothelzellen zugeschrieben (Flinsenberg *et al.*, 2011). Während die Aufgabe der Makrophagen insbesondere im Transport von nicht prozessiertem Antigen zu anderen APCs, wie B-Zellen und DCs liegt (Gonzalez *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009; Turley *et al.*, 2010), besitzen DCs die einzigartige Fähigkeit CD8 T-Zellen *in vivo cross* zu *primen* (Carbone *et al.*, 1998; Guermonprez *et al.*, 2002; Heath und Carbone, 2010; Kurts *et al.*, 2010; Flinsenberg *et al.*, 2011).

Ausgestattet mit einem Arsenal an PRRs (siehe 1.3.1) und der Fähigkeit, Antigen direkt oder *cross* zu präsentieren, sind DCs für die Regulation verschiedenster Immunantworten verantwortlich (Steinman und Banchereau, 2007). Sie sind in peripheren Geweben positioniert, um nach Antigenaufnahme T-Zellen zu aktivieren (Huang *et al.*, 2000).

DCs reifen und differenzieren infolge mikrobieller Stimuli und können in verschiedene Untergruppen mit bestimmten PRRs und Funktionen eingeteilt werden (Reis e Sousa, 2006; Dudziak *et al.*, 2007; Shortman und Naik, 2007).

Vorläuferzellen aus dem Knochenmark differenzieren überwiegend in zwei Hauptgruppen von DCs, die **plasmazytoiden DCs** (pDCs) und die **konventionellen DCs** (cDCs) (Shortman und Liu, 2002). pDCs migrieren über das Blut zwischen sekundären, lymphatischen Organen und produzieren eine große Menge Typ-I IFN nach viraler Infektion (Swiecki und Colonna, 2010). cDCs können zusätzlich in Organ-residente oder migratorische DCs unterteilt werden (Villadangos und Schnorrer, 2007). Die Organ-residenten DCs gliedern sich ihrerseits wieder in 3 Untergruppen, CD8-positive (i), CD4-positive (ii) und doppelt-negative (iii), und können in Milz, LK und Thymus gefunden werden (Vremec *et al.*, 2000; Shortman und Liu, 2002; Turley *et al.*, 2010).

Die **CD8-positiven (CD8⁺), Organ-residenten DCs** differenzieren direkt in den sekundären, lymphatischen Organen und sind dort für die Antigenaufnahme sowie Antigenpräsentation verantwortlich (Shortman und Heath, 2010; Dresch *et al.*, 2012). Die **migratorischen DCs** sind überwiegend in nicht-lymphoiden Organen zu finden und fungieren als Wächter, die Antigene aufnehmen, über die Lymphe zum drainierenden LK wandern und dort Antigene präsentieren. Sie umfassen zwei Hauptpopulationen, CD103⁺ CD11b⁻ oder CD103⁻ CD11b⁺ DCs (Poulin *et al.*, 2007; Ginhoux *et al.*, 2009; Turley *et al.*, 2010). Neben diesen beiden DC-Subtypen sind noch die **inflammatorischen DCs** zu nennen, die sich im Zuge einer Entzündungsreaktion aus Monozyten entwickeln können (Leon *et al.*, 2007).

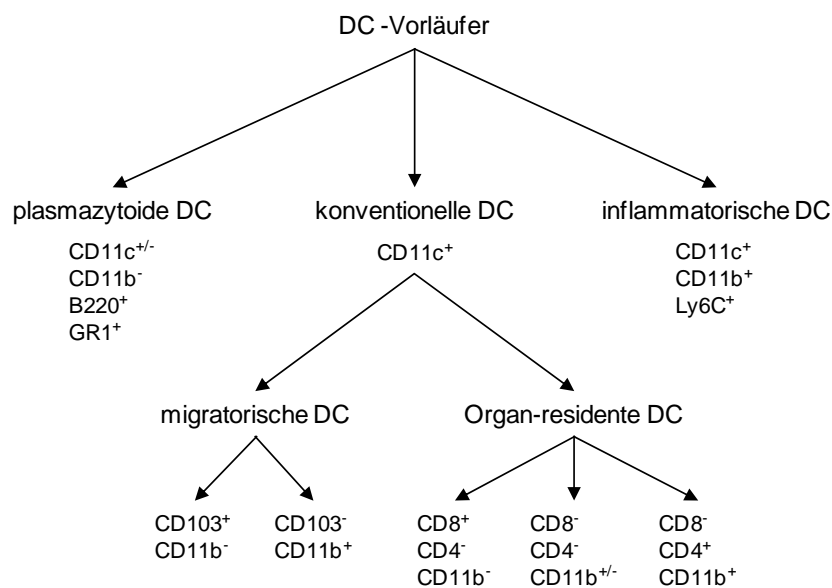


Abb. 1.2: Charakterisierung muriner DC-Subtypen (Turley *et al.*, 2010)

In der Maus besitzen Organ-residente CD8⁺ DCs und migratorische CD103⁺ DCs die Fähigkeit der Antigen-Cross-Präsentation (den Han *et al.*, 2000; Shortman und Heath, 2010). Beide sind in der Lage antigenes Material von absterbenden oder toten Zellen aufzunehmen und dieses *cross* zu präsentieren (Iyoda *et al.*, 2002; Schulz und Reis e Sousa, 2002; Dresch *et al.*, 2012). Neben diesen sind auch inflammatorische DCs in der Lage, Antigen *cross* zu präsentieren (Shortman *et al.*, 2010).

Die **murinen CD8⁺ DCs** in der Milz oder dem drainierenden LK exprimieren selektiv die Transkriptionsfaktoren Batf3 (*basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3*) und IRF8 (*interferon regulatory factor 8*) (Dresch *et al.*, 2012), sowie den Chemokinrezeptor XCR1 und ein hohes Level an CD24, welches als essentielles kostimulatorisches Molekül für T-Zellen gilt (Askew und Harding, 2008). Des Weiteren exprimieren CD8⁺ DCs bestimmte endozytotische Rezeptoren wie Clec9a (*C-type lectin domain family 9, member a*), DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*; CD209) und

DEC205 (CD205), sowie Mannose-Rezeptor 1 (CD206) und Fc-Rezeptoren (Kurts *et al.*, 2010; Shortman *et al.*, 2010; Nierkens *et al.*, 2013).

Das **humane Pendant** zu murinen CD8⁺ DCs sind BDCA3⁺ (*human blood DC antigen 3*) DCs, die ebenfalls XCR1 und Clec9a auf ihrer Oberfläche exprimieren und die Fähigkeit der Antigen-Cross-Präsentation besitzen (Bachem *et al.*, 2010; Crozat *et al.*, 2010; Poulin *et al.*, 2010).

Einige Studien weisen darauf hin, dass CD8⁺ DCs erst im Laufe ihrer Entwicklung die Kapazität der Antigen-Cross-Präsentation erwerben (de Brito *et al.*, 2011; Sathe *et al.*, 2011; Zhan *et al.*, 2011). Die volle **Entwicklung zur reifen DC** mit immunogenen Eigenschaften fordert die Erkennung von PAMPs über PRRs wie TLRs, NLRs und RLRs (siehe 1.3.1). PAMPs, DAMPs und inflammatorische Zytokine wie GM-CSF, die im Zuge der viralen Infektion oder nach dem programmierten Zelltod auftreten, mobilisieren nicht nur DC-Vorläuferzellen sondern agieren auch synergistisch für eine effektive Cross-Präsentation (de Brito *et al.*, 2011; Sancho und Reis e Sousa, 2013). Nach Infektion kann die Aktivierung von TLR3 und 9 in DCs auch die Cross-Präsentation und somit die CD8 T-Zell-Antwort verstärken (Maurer *et al.*, 2002; Schulz *et al.*, 2005).

1.5 Immunmodulation durch CMV

Im Laufe der evolutionären Adaptationsprozesse an den jeweiligen Wirt entwickelte CMV mannigfaltige Strategien die antivirale Immunantwort zu modulieren, um einer vollständigen Eliminierung durch das wirtseigene Immunsystem zu entgehen. Diese Strategien werden unter Immunmodulation, -manipulation oder -evasion zusammengefasst. Es konnte bisher sowohl für HCMV als auch für mCMV eine Anzahl an Proteinen identifiziert werden, die für eine Modulation (i) des angeborenen Immunsystems, (ii) des adaptiven Immunsystems, oder (iii) zellintrinsic Mechanismen, zu denen auch die Induktion des programmierten Zelltods zählt, verantwortlich sind (Mocarski 2002; Reddehase 2002, Mocarski 2004; Hansen und Bouvier, 2009; Miller-Kittrell und Sparer, 2009; Loewendorf und Benedict, 2010).

1.5.1 Immunmodulation der angeborenen und adaptiven Immunkontrolle

Typ-I Interferone und NK-Zellen gehören zu den Hauptakteuren der angeborenen Immunkontrolle bei CMV-Infektionen (Scalzo *et al.*, 2007). Um dem Effekt der bereits früh nach Infektion induzierten Interferone (Navarro *et al.*, 1998; Boyle *et al.*, 1999) entgegen zu wirken kodiert CMV für Proteine, die deren Wirkung abschwächen (Miller *et al.*, 1999; Powers *et al.*, 2008). Die Bindung von IFN- α und - β an ihre Rezeptoren führt zur Aktivierung der JAK/STAT (*Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*)-Signalkaskade

und letztendlich zur Transkription von Genen, welche die Zielzellen in einen antiviralen Zustand versetzen, um eine Ausbreitung der Infektion zu verhindern (Müller *et al.*, 1994).

Das **mCMV-kodierte Protein M27** ist ein viraler Inhibitor der JAK/STAT-Signalkaskade, das durch Herabregulation von STAT2 auf das Typ I und II IFN-*Signaling* einwirkt (Zimmermann *et al.*, 2005). Es verhindert die Expression von zellulärem STAT2, indem es die Transkription von Bestandteilen des Immunoproteasoms negativ beeinflusst (Abenes *et al.*, 2001; Zimmermann *et al.*, 2005). Da das Immunoproteasom die Prozessierung von MHC-I Peptiden und dadurch deren Präsentation steigert, bewahrt M27 mCMV nicht nur vor einem direkten antiviralen Effekt, sondern auch vor der Präsentation viraler Peptide an CD8 T-Zellen (Miller-Kittrell und Sparer, 2009).

Die **mCMV-Proteine m142** und **m143** sind in der Lage die virale Proteinsynthese und Replikation zu verbessern, indem sie die Aktivierung der IFN-induzierten Proteinkinase R verhindern, die ansonsten eine effiziente virale Proteinsynthese und Replikation in infizierten Zellen verhindern würde.

Ein weiteres Ziel immunmodulatorischer mCMV-Proteine ist die NK-Zellkontrolle. Das mCMV kodiert für mehrere Proteine, die die Oberflächenexpression von aktivierenden NK-Zell-Liganden vermindern (Jonjic *et al.*, 2008; Lenac *et al.*, 2008). Es konnten bisher vier virale Proteine identifiziert werden, die die Aktivierung des NK-Zellrezeptors NKG2D negativ beeinflussen: **m138** interferiert mit der Oberflächenexpression der Liganden MULT-1 und H60 (Lenac *et al.*, 2006), **m145** inhibiert die Oberflächenexpression von MULT-1 (Krmptotic *et al.*, 2005), **m152** ist für die intrazelluläre Retention der unterschiedlichen RAE-1-Isoformen verantwortlich (Lodoen *et al.*, 2003), und **m155** vermindert die Expression von H60 auf der Oberfläche von infizierten Zellen (Lodoen *et al.*, 2004; Hasan *et al.*, 2005).

Die **Modulation des pMHC-I Präsentationsweges** im Zuge der CD8 T-Zellkontrolle zählt zu den für CMV am besten charakterisierten Immunevasionsmechanismen (Hengel *et al.*, 1999; Kavanagh und Hill, 2001; Reddehase, 2002; Reddehase *et al.*, 2004; Holtappels *et al.*, 2006a; Doom und Hill, 2008; Lemmermann *et al.*, 2012). Die von mCMV kodierten Immunevasionsproteine m04/gp34, m06/gp48 und m152/gp40, in der Literatur auch als vRAPs (*viral regulators of antigen presentation*) bekannt (Holtappels *et al.*, 2006a; Böhm *et al.*, 2008), interferieren mit der Präsentation von pMHC-I Komplexen auf der Oberfläche infizierter Zellen. **m04** bildet im ER einen stabilen Komplex mit pMHC-I Molekülen und wird an die Zelloberfläche transportiert. Dort verhindert es durch Ligation inhibitorischer Rezeptoren der Ly49-Familie die Aktivierung der NK-Zellen über *missing-self recognition* (Kielczewska *et al.*, 2009; Babic *et al.*, 2010; Lemmermann *et al.*, 2011; Lemmermann *et al.*, 2012). **m06** bindet ebenfalls stabil an pMHC-I Moleküle im ER und vermittelt deren Transport aus dem ER in den endolysosomalen Abbauweg der Zelle (Reusch *et al.*, 1999). **m152** ist

das Hauptimmunevasionsprotein und bindet transient an pMHC-I Komplexe. Dies führt zu einer Retention der pMHC-I Komplexe im *ER-Golgi Intermediate Compartment* (ERGIC) und dadurch zu einer verringerten Peptidpräsentation auf der Zelloberfläche infizierter Zellen (del Val *et al.*, 1992; Thäle *et al.*, 1995; Ziegler *et al.*, 1997; Ziegler *et al.*, 2000; Lemmermann *et al.*, 2012).

1.5.2 Modulation des programmierten Zelltods nach CMV-Infektion

Zu den wichtigsten Wirtsabwehrmechanismen gegen intrazelluläre Erreger wie Viren gehört die Induktion des programmierten Zelltods. Um infizierte Zellen hiervor zu schützen haben Viren verschiedene Strategien entwickelt, die in die Induktion und Regulation des programmierten Zelltods eingreifen. Dies ist insbesondere für langsam replizierende Viren wie CMV von essentieller Bedeutung, um einen vollständigen Replikationszyklus gewährleisten zu können. Sowohl HCMV als auch mCMV kodieren für verschiedene Inhibitoren, die mit Regulatoren des extrinsischen oder intrinsischen Apoptose-Signalwegs interferieren (Brune, 2011; Mocarski *et al.*, 2011; Fliss und Brune, 2012; Handke *et al.*, 2012). Zu den am besten charakterisierten Inhibitoren zählen **vICA** (*viral inhibitor of caspase-8-induced apoptosis*) (Skaletskaya *et al.*, 2001), **vMIA** (*viral mitochondrial inhibitor of apoptosis*) (Goldmacher *et al.*, 1999) und **vIBO** (*viral inhibitor of Bak oligomerization*) (Cam *et al.*, 2010). Außerdem ist für mCMV ein weiterer Inhibitor, **vIRS** (*viral inhibitor of receptor interacting protein (RIP)-mediated signaling*), beschrieben, der mit der programmierten Nekrose oder Nekroptose interferiert (Mack *et al.*, 2008). Dieser Inhibitor ist in der Literatur auch als vIRA (*viral inhibitor of RIP activation*) bekannt (Upton *et al.*, 2008) und beeinflusst einen alternativen Mechanismus des programmierten Zelltods, der als *Backup*-Weg zur Apoptose fungiert (Festjens *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2011; Kaczmarek *et al.*, 2013).

1.5.2.1 Modulation der Apoptose-Induktion

Die am besten charakterisierte Form des programmierten Zelltods – die Apoptose – wird durch verschiedene Caspasen, eine Familie von Aspartat-spezifischen Zystein-Proteasen, gesteuert. Dies geschieht unter regulierten Bedingungen ohne Initiation einer Entzündungsreaktion. Daher findet der programmierte Zelltod durch Apoptose auch in verschiedenen physiologischen Prozessen wie der Embryonalentwicklung sowie im Kontext der Gewebemöostase statt (Elmore, 2007).

Der Begriff Apoptose wurde eingeführt, um eine regulierte Form des Zelltods mit einer bestimmten Morphologie gegenüber der Nekrose abzugrenzen. Die Apoptose ist ein zellautonomer Prozess, der durch (i) Schrumpfen der Zelle, (ii) Kondensierung des Chromatins und (iii) Fragmentierung der DNA gekennzeichnet ist. Des Weiteren kommt es zu einem (iv) geordneten Abbau der Zelle in kleine membranumhüllte Vesikel, sog. *apoptotic*

bodies (Kerr *et al.*, 1972; Häcker, 2000). Die Exposition von Phosphatidylserin auf der extrazellulären Seite der Zellmembran wird von Phagozyten erkannt, die anschließend die Zellfragmente aufnehmen (Fadok *et al.*, 1998). Die Apoptose wird hauptsächlich über zwei definierte Signalwege induziert (Abb. 1.3).

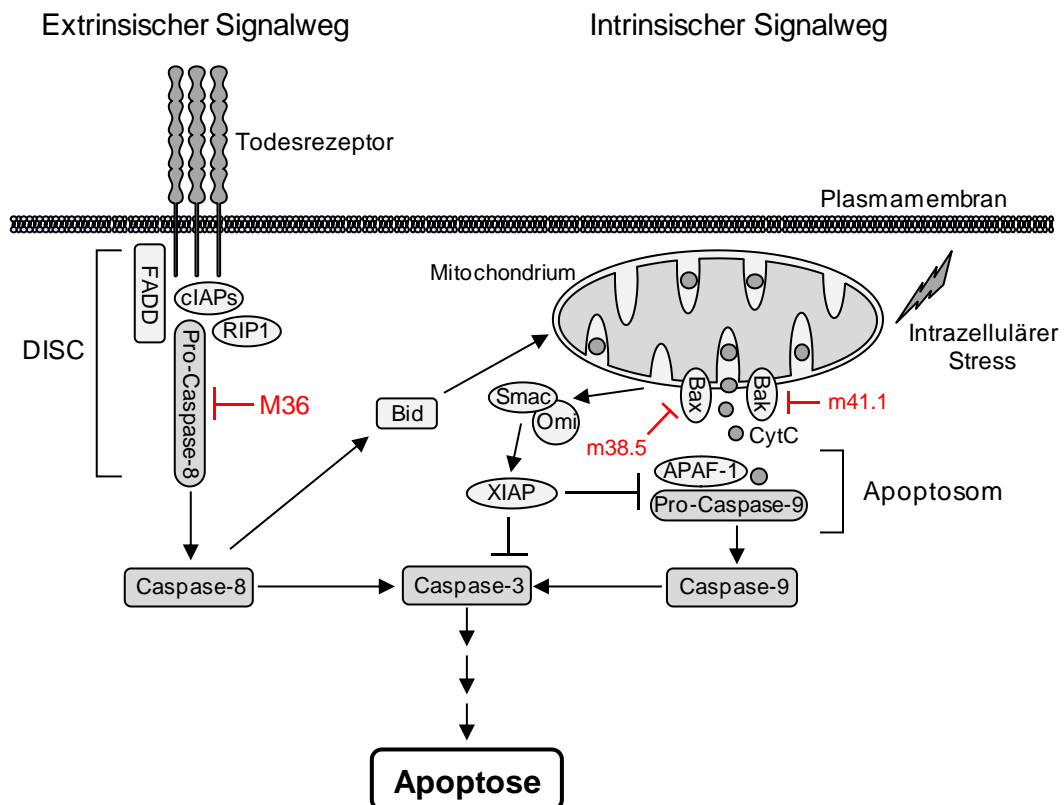


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Apoptose-Signaling und dessen Inhibition durch mCMV.

Der **extrinsische Signalweg** der Apoptose wird durch Bindung von Todesliganden (*death ligands*) der Tumornekrosefaktor (TNF)-Superfamilie eingeleitet. Hierzu gehören TNF α , FasL (Fas-Ligand) und TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) mit den korrespondierenden Rezeptoren TNFR1 (*TNF receptor 1*), Fas (CD95, APO-1) und TRAILR 1/2 (*TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1/2*). Diese Bindung führt zur Rezeptor-Trimerisierung und endet nach Rekrutierung verschiedener Adaptermoleküle über ihre Todesdomäne (DD, *death domain*) in der Formierung des DISC (*death-inducing signaling complex*) (Walczak und Krammer, 2000; Lavrik *et al.*, 2005; Fulda und Debatin, 2006). Dieser Multiproteinkomplex beinhaltet neben dem Adaptermolekül FADD (*Fas-associated death domain*) und dem Signaltransduktionsmolekül RIP1 (*receptor-interacting protein 1*) auch anti-apoptotische Proteine wie cIAP (*cellular inhibitor of apoptosis protein*). DISC aktiviert die Initiator-Caspase-8, die anschließend entweder direkt oder indirekt über den

intrinsischen Signalweg zur Initiation der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 führt (Kischkel *et al.*, 1995; Scaffidi *et al.*, 1998; Schütze *et al.*, 2008).

Der **intrinsische Signalweg** kann durch zellinterne Stresssignale, wie DNA-Schäden, oxidativen Stress durch reaktive Sauerstoffverbindungen (*reactive oxygen species*, ROS), ER-Stress durch die Anhäufung fehlgefalteter Proteine oder intrazelluläre Infektionen ausgelöst werden (Schmitt und Lowe, 1999; Mayer und Oberbauer, 2003). Diese Signale führen zur Aktivierung pro-apoptotischer Proteine der *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2)-Proteinfamilie, wie Bax (Bcl-2 associated X protein) und Bak (Bcl-2 antagonist/killer 1) sowie zur Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (*mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP). Anschließend kommt es zur Freisetzung von apoptotischen Faktoren wie Zytochrom C, Smac (*second mitochondrial activator of caspase*; DIABLO) und Omi (Htr2A) ins Zytosol der Zelle (Hengartner, 2000; Saelens *et al.*, 2004). Die Freisetzung von Zytochrom C bewirkt zusammen mit Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor 1*) und Caspase-9 die Formation des Apoptosoms, das die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 aktivieren kann (Cain *et al.*, 2000). Smac und Omi fördern dagegen die Caspase-Aktivität, indem sie den Apoptoseinhibitor XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) blockieren. Außerdem ist beschrieben worden, dass bei Störung der DISC-Formierung die Spaltung von Bid (*BH3-interacting domain death agonist*) durch Caspase-8 zu einer Verstärkung des intrinsischen *Signalings* führen kann (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998).

Die für mCMV am besten charakterisierten **anti-apoptotischen Proteine** werden durch die ORFs **M36** (vICA; HCMV: UL36, *unique long region 36*), **m38.5** (vMIA; HCMV: UL37x1) und **m41.1** (vIBo) kodiert (siehe Abb. 1.3).

Während m38.5 und m41.1 den intrinsischen Weg der Apoptose durch die Inhibierung von MOMP unterdrücken (Norris *et al.*, 2008; Cam *et al.*, 2010; Brune, 2011; Handke *et al.*, 2012), ist mCMV durch M36 ebenfalls in der Lage, den extrinsischen Weg der Apoptose zu unterbinden. Sowohl M36 als auch sein HCMV-Homolog UL36 binden an Pro-Caspase-8 und inhibieren deren proteolytische Prozessierung und Aktivierung. Hierdurch wird die Rekrutierung von Pro-Caspase-8 an FADD unterbunden und die Formierung des DISC inhibiert, so dass die Signalkaskade unterbrochen wird (Skaletskaya *et al.*, 2001; Menard *et al.*, 2003; McCormick *et al.*, 2003). Die Konservierung des vICA-Proteins bei nahezu allen Betaherpesviren unterstreicht die Wichtigkeit der Apoptoseinhibition für die Replikation dieser Viren (McCormick *et al.*, 2003).

1.5.2.2 Modulation der Nekroptose-Induktion

Im Gegensatz zur Apoptose wurde die Nekrose lange Zeit als eine nichtregulierte Form des Zelltods betrachtet, die nur infolge von schweren Verletzungen, Sauerstoffmangel, Hyper- oder Hypothermie, sowie nach Kontakten mit Toxinen eintritt (Krysko *et al.*, 2008; Vanden Berghe *et al.*, 2010).

Nekrotische Zellen sind durch eine frühe Permeabilisierung der Plasmamembran, sowie eines Anschwellens der Zellorganellen charakterisiert. Hierdurch kommt es zur Zellyse und Freisetzung von intrazellulären Bestandteilen, die als DAMPs von PRRs erkannt werden (Chen und Nunez, 2010) und eine Entzündungsreaktion auslösen können (Festjens *et al.*, 2006; Vandenabeele *et al.*, 2010, Krysko *et al.*, 2011).

Erst in jüngster Zeit wurde eine regulierte Form der Nekrose, die sog. **programmierte Nekrose** (Chan *et al.*, 2003) oder **Nekroptose** (Degterev *et al.*, 2005), als eine Möglichkeit des programmierten Zelltods definiert (Zong und Thompson, 2006; Vandenabeele *et al.*, 2010). Die Regulation der Nekroptose ist bisher kaum untersucht, jedoch konnte ein Zusammenspiel des intrazellulären *Signalings* mit Kinasen der RIP-Familie, RIP1 und RIP3, gezeigt werden (Abb. 1.4). Diese Kinasen interagieren über RHIM (*RIP homotypic interaction motif*) miteinander (Holler *et al.*, 2000; Declercq *et al.*, 2009; Vandenabeele *et al.*, 2010). Die meisten Untersuchungen zur Nekroptose beschreiben den TNFR1-induzierten Signalweg (Vandenabeele *et al.*, 2010). Nach der Stimulation von Todesrezeptoren (TNFR1, Fas) entscheidet die Ubiquitinierung von RIP1 über die Einleitung des programmierten Zelltods. Wird RIP1 durch die Ligasen cIAP1/2 ubiquitiniert führt dies zur Aktivierung von NF- κ B sowie MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) und zum Überleben der Zelle (Devin *et al.*, 2000; Bianchi und Meier, 2009; Long und Ryan, 2012). Dagegen erfolgt nach Deubiquitinierung von RIP1 durch das Enzym Cyldromatosis (CYLD) (O'Donnell *et al.*, 2011), das über Caspase-8 reguliert wird (Kaiser *et al.*, 2011; Oberst *et al.*, 2011), der Übergang von Komplex I zu Komplex II (Micheau und Tschopp, 2003).

Der **Komplex I** ist eine DISC-ähnliche Caspase-8-aktivierende Plattform, die auch als Ripoptosom bezeichnet wird (Vandenabeele *et al.*, 2010; Bertrand und Vandenabeele, 2011; Long und Ryan, 2012).

In **Komplex IIa** katalysiert Caspase-8 die proteolytische Spaltung und Inaktivierung von RIP1/3 und es erfolgt der Übergang zur Apoptose (Lin *et al.*, 1999, Feng *et al.*, 2007). Demgegenüber führt die Unterdrückung der Pro-Caspase-8-Rekrutierung durch cFLIP (*cellular FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme (FLICE)-like inhibitory proteins*) oder virale Inhibitoren (z.B. vICA) in **Komplex IIb** zur Akkumulation und Phosphorylierung von RIP1/3 und damit zur Initiation der Nekroptose (Zhang *et al.*, 2011).

Der Komplex IIb wird auch als Nekrosom bezeichnet und rekrutiert Proteine wie MLKL (*mixed lineage kinase like protein*) oder die Phosphatase PGAM5 (*phosphoglycerate mutase*

family member 5) (Zhao *et al.*, 2012). Dies führt zu einer Überproduktion von ROS in der Zelle (Vanlangenakker *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009). Des Weiteren ist bekannt, dass RIP3 durch Interaktion mit DAI zur RIP3-abhängigen programmierten Nekrose führt (Mocarski *et al.*, 2011; Upton *et al.*, 2012). Die Auslösung der Nekroptose kann ebenfalls durch die Aktivierung von TLR3 über TRIF (*TIR-domain containing adaptor protein-inducing IFN- β*) und dessen Interaktion mit RIP1/3 erfolgen (Feoktistova *et al.*, 2011).

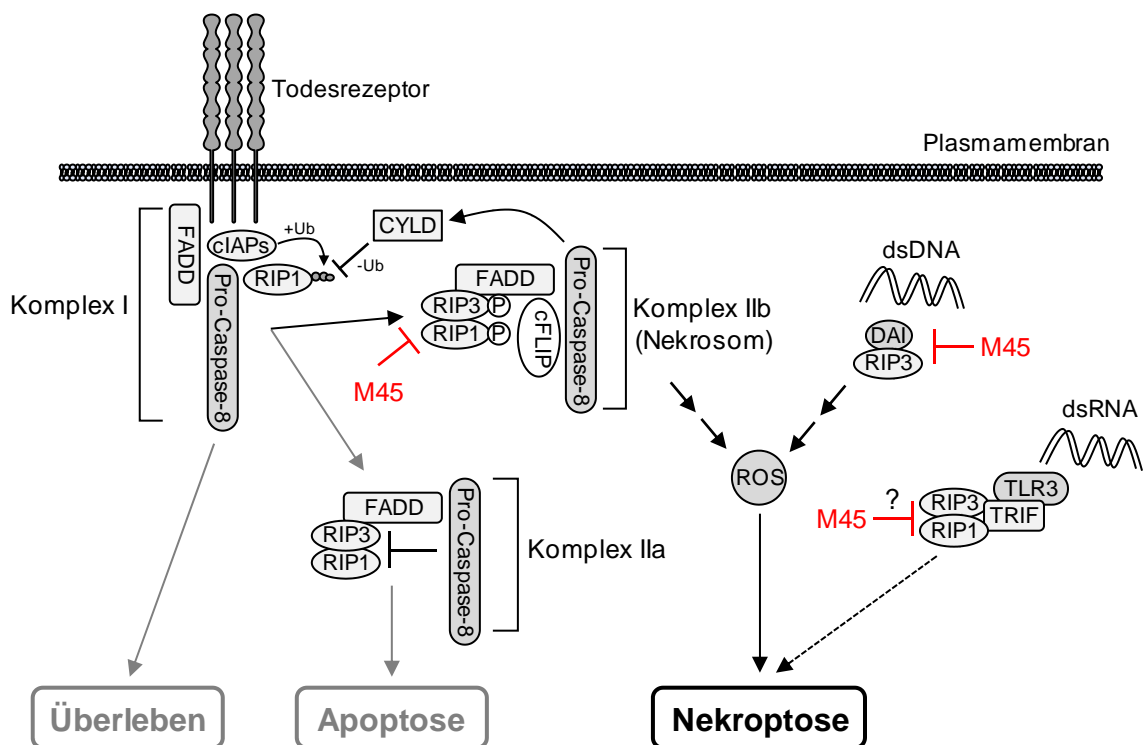


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Nekroptose-Signalings und dessen Inhibition durch mCMV.

Das für mCMV charakterisierte **anti-nekroptotische Protein** (vIRS) wird durch den ORF **M45** kodiert. M45 wurde ursprünglich als Ribonukleotid-Reduktase R1 Homolog beschrieben (Rawlinson *et al.*, 1996), das jedoch eine katalytisch inaktive Form der R1-Untereinheit besitzt (Lembo *et al.*, 2004; Lembo und Brune, 2009). M45 besitzt ein RHIM-Motiv durch das es RHIM-abhängige Protein-Protein Interaktionen inhibieren kann und dadurch die Initiation der Nekroptose unterbindet (Upton *et al.*, 2008; Upton *et al.*, 2010; Upton *et al.*, 2012). M45 ist ebenfalls in der Lage, Interaktionen zwischen RIP und DAI (Kaiser *et al.*, 2008; Rebsamen *et al.*, 2009) oder TRIF (McCormick and Mocarski, 2013) zu blockieren. Ein HCMV-Analogon konnte bisher nicht identifiziert werden.

1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Initiation des programmierten Zelltods infizierter Zellen ist ein elementarer Bestandteil der intrinsischen Abwehr, um der viralen Replikation *in vivo* entgegenzuwirken. Für Viren wie CMV, die einen langsamen Replikationszyklus besitzen, ist die Unterdrückung des programmierten Zelltods essentiell, um eine produktive Infektion zu gewährleisten. Sowohl für HCMV als auch für mCMV konnten Zelltod-inhibierende Proteine charakterisiert werden, die den programmierten Zelltod an verschiedenen Regulationsstellen unterdrücken (siehe 1.5.2).

Es war bereits bekannt, dass die Deletion dieser Zelltod-inhibierenden Proteine *in vitro* zu einer verstärkten Induktion des programmierten Zelltods in Makrophagen führt und dadurch die virale Replikation beeinträchtigt (Brune *et al.*, 2001; Menard *et al.*, 2003). Auch *in vivo* konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von M36 bzw. M45 für die virale Replikation und Dissemination notwendig ist (Lembo *et al.*, 2004; Cicin-Sain *et al.*, 2005; Cicin-Sain *et al.*, 2008; Upton *et al.*, 2010).

Aufgrund dieser Befunde sollte in der vorliegenden Arbeit zunächst die virale Replikation nach intraplantarer Infektion in An- oder Abwesenheit von M36 bzw. M45 im poplitealen LK untersucht werden. Möglicherweise ist nach Induktion des programmierten Zelltods auch im LK ein Unterschied in der viralen Replikation zu erwarten.

Da die antivirale CD8 T-Zell-Antwort für die immunologische Kontrolle der mCMV-Infektion eine zentrale Rolle einnimmt, sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des mCMV-kodierten anti-apoptotischen Proteins M36 sowie des anti-nekroptotischen Proteins M45 auf die antivirale CD8 T-Zellantwort untersucht werden. Die Initiation der CD8 T-Zellantwort findet nach intraplantarer Infektion im drainierenden LK statt; deshalb sollte zunächst geklärt werden, ob die Deletion von M36 bzw. M45 das CD8 T-Zell-*Priming* im LK beeinflusst. Die Antigen-Präsentation über MHC-I kann sowohl direkt auf infizierten Zellen oder indirekt über *Cross-Präsentation* von Antigenen aus exogen erworbenem Material erfolgen (siehe 1.4). Im Zuge der mCMV-Infektion wurde dem *Cross-Priming* von CD8 T-Zellen eine übergeordnete Rolle zugesprochen (Böhm *et al.*, 2008; Snyder *et al.*, 2010; Torti *et al.*, 2011a; Busche *et al.*, 2013). Zudem ist bekannt, dass sowohl apoptotisches als auch nekroptotisches Material *cross-präsentiert* werden kann (Albert *et al.*, 1998; Krysko *et al.*, 2006). Der programmierte Zelltod infizierter Zellen könnte zu einer gesteigerten *Cross-Präsentation* exogen erworbener Antigene und dadurch zu einem verstärkten *Cross-Priming* mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen führen.

2 Material

2.1 Allgemeine Laborgeräte

Bunsenbrenner	FIREBOY eco; INTEGRA Biosciences AG (Zizers, Schweiz)
CO ₂ -Inkubator	BB16Ch; Heraeus Holding GmbH (Hanau) Hera Cell 240; Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Durchflusszytometer	FACSort; Becton Dickinson GmbH (Heidelberg) Cytomics FC500; Beckman Coulter GmbH (Krefeld)
ELISpot-Stanzwerkzeug	Eli.Punch; A.EL.VIS GmbH (Hannover)
Flockeneisbereiter	AF 100; Scotsman Ice Systems (Mailand, Italien)
Flüssigstickstofftank	Messer Group GmbH (Bad Soden)
Hand-Homogenisator	Dounce; B. Braun AG (Melsungen)
Infektionskammer	Universität Tübingen
Kleintierbestrahlungsanlage	OB 58-BA; BUCHLER GmbH (Braunschweig)
MACS-System	MACS <i>Multi Stand</i> ; Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach) MidiMACS <i>Separator</i> ; Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach) MiniMACS <i>Separator</i> ; Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
Magnetrührer	C-MAG HS 7; IKA-Werke GmbH & CO. KG (Staufen) Combimag RET; IKA-Werke GmbH & CO. KG (Staufen)
Mikroskope	Axiolab re; Carl Zeiss (Jena) CKX31SF; Olympus (Hamburg) DM IL; Leica Microsystems GmbH (Wetzlar) DM IRB; Leica Microsystems GmbH (Wetzlar)

	Se-Ph-3; Nikon (Düsseldorf)
	SZX-ILLK 200; Olympus (Hamburg)
	SZX-ZB12; Olympus (Hamburg)
Mikrotom	HM 355; Microm (Walldorf)
Multikanalpipetten	<i>Discovery Comfort</i> ; ABIMED GmbH (Langenfeld)
	Finnpipette; Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA)
	m300; BioHit GmbH (Rosbach v. d. Höhe)
Multistepper	<i>Distribman</i> ; Gilson, Inc. (Middleton, USA)
	<i>Repeater Plus</i> ; Eppendorf (Hamburg)
Paraffinerhitzer	HistoTAPlus; Leica (Bensheim)
Peristaltikpumpe	<i>Dose-it</i> 803; INTEGRA Biosciences AG (Zizers, Schweiz)
Pipetten	mLINE; BioHit GmbH (Rosbach v. d. Höhe)
	<i>Pipetman</i> ; Gilson Inc. (Middleton, USA)
	RAININ Classic; Mettler Toledo GmbH (Gießen)
	RAININ Pipet-Lite XLS; Mettler Toledo GmbH (Gießen)
	<i>Research</i> ; Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfe	<i>Pipetboy acu</i> ; INTEGRA Biosciences (Fernwald)
Reagenzglasschüttler	<i>Rock'n'Roller</i> L-202; Labor-Brand (Gießen)
<i>Real time</i> PCR-Gerät	ABIPrism 7500 <i>Real Time PCR System</i> ; Applied Biosystems (Foster City, USA)
Schüttler	KS 260 basic; IKA-Werke GmbH & CO. KG (Staufen)
	MS 3 basic; IKA-Werke GmbH & CO. KG (Staufen)
	Vortex-Genie 2; Scientific Industries, Inc. (New York, USA)
Schwingmühle (<i>Mixer Mill</i>)	MM 300; Retsch GmbH (Haan)

Sezierbesteck	Hammacher; Karl Hammacher GmbH (Solingen) Aesculap; B. Braun AG (Melsungen)
Sicherheitswerkbank	HB 2472; Heraeus Holding GmbH (Hanau) HS 12/2; Heraeus Holding GmbH (Hanau) HS 15/2; Heraeus Holding GmbH (Hanau) HS 18; Heraeus Holding GmbH (Hanau) HV 2472; Heraeus Holding GmbH (Hanau) Template Tamer Captair bio; Erlab D.F.S S.A.S (Köln)
Spektralphotometer	Nanodrop ND-1000; PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Tischzentrifugen	<i>Centrifuge</i> 5417C; Eppendorf (Hamburg) <i>Centrifuge</i> 5417R; Eppendorf (Hamburg) <i>Centrifuge</i> 5424; Eppendorf (Hamburg) <i>Labofuge</i> 200; Heraeus Holding GmbH (Hanau) <i>Megafuge</i> 2.0; Heraeus Holding GmbH (Hanau) Mikrozentrifuge Force 7; Carl Roth GmbH (Karlsruhe) <i>Mini Centrifuge</i> C-1200; VWR International GmbH (Darmstadt) <i>Multifuge</i> 3L; Heraeus Holding GmbH (Hanau) <i>Multifuge</i> 3 S-R; Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Ultrazentrifugen	Combi Plus; Sorvall (Langenselbold) RC 5C; Sorvall (Langenselbold) Optima L-90K; Beckman Coulter (Krefeld)
UV-Lampe	UVC-CRL 400; Umwelt und Technik GmbH (Horb) VL-315G; VILBER LOURMAT GmbH (Eberhardzell)
Waagen	BP61; Sartorius (Göttingen) 510; Kern & Sohn GmbH (Balingen)

	UW2200HV; Shimadzu GmbH (Duisburg)
Wasserbad	Memmert GmbH (Schwabach)
Zählkammern	Neubauer- <i>improved</i> , Nr. 1100000; LO-Laboroptik GmbH (Bad Homburg)
	Neubauer- <i>improved</i> , Nr. 717805; Brand GmbH + CO KG (Wertheim)

2.2 Verbrauchsmaterialien und Plastikwaren

Durchflusszytometerröhrchen	<i>Round-Bottom Tube</i> 12x75mm, Nr. 352008; Falcon, Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
	<i>Test Tube</i> 12x75mm, Nr. 2523749; Beckman Coulter (Krefeld)
Einfrierröhrchen	<i>Cryo Tube Vials</i> 1,8ml, Nr. 375418; Nalgene Nunc International (Roskilde, Dänemark)
	CRYO.S 2ml, Nr. 126263; Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Einfrierboxen	81F- <i>Vials Blue Cs24</i> , Nr. 16001-146; VWR International GmbH (Darmstadt)
Einmalkanülen	Sterican Standardkanülen 0,40x12mm, Nr. 4665406; B. Braun AG (Melsungen)
	Sterican Standardkanülen 0,45x12mm, Nr. 4665457; B. Braun AG (Melsungen)
	Sterican Standardkanülen 0,60x30mm, Nr. 4657640; B. Braun AG (Melsungen)
Einmalspritzen	HSW Norm-Ject 5ml, Nr. 4050.000D0; Henke-Sass, Wolf GmbH (Tuttlingen)
	Injekt-F Solo 1ml, Nr. 9166017V; B. Braun AG (Melsungen)
	Injekt Solo 2ml, Nr. 4606027V; B. Braun AG (Melsungen)
	Injekt Solo 10ml, Nr. 4606108V; B. Braun AG (Melsungen)
	Omnifix-F Solo 1ml, Nr. 9161406V; B. Braun AG (Melsungen)

	2-Part Syringes 20ml, Nr. SS+T20ES; Terumo GmbH (Eschborn)
ELISpot-Platten	MultiScreen _{HTS} -IP Filter Plate, 96-Well, Nr. MSIPN4550; Millipore GmbH (Schwalbach)
ELISpot-Stanzfolie	Eli.Foil; A.EL.VIS GmbH (Hannover)
Gewebeinbettkassetten	<i>Uni-Cassette</i> TT III, Nr. 4170; Tissue-Tek, Sakura Finetek GmbH (Staufen)
Laborglas	Duran Group GmbH (Wertheim) Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
Infrarotlampe	R95 IR, 100W, Nr. 145598; Philips GmbH (Hamburg)
MACS-Säulen	LS <i>Columns</i> , Nr. 130-042-401; Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach) MS <i>Columns</i> , Nr. 130-042-201; Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
Manetrührstab	zylindrisch, 40x8mm, Nr. 442-4527; VWR International GmbH (Darmstadt)
Mikroteströhrchen	<i>Microtubes</i> 1,2ml, Nr. I1412-7400; STARLAB GmbH (Ahrensburg)
Mikrotiterplatten	PCR Platte, 96- <i>Well</i> , Nr. 652270; Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen) Rundbodenplatte, 96- <i>Well</i> , Nr. 650101; Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen) Abdeckplatte, Nr. 656101; Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Nirosta-Stahlkugeln	rostfreier Stahl Ø 2mm; WVV Wälzlager-Vertrieb Wiesbaden GmbH (Mainz-Kastell) rostfreier Stahl Ø 4mm; WVV Wälzlager-Vertrieb Wiesbaden GmbH (Mainz-Kastell)
Petrischalen	steril, 60x15mm, Nr. 628161; Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen) steril, 100x20mm, Nr. 624161; Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Pipettenspitzen	Universal 10-200µl, Nr. 739296; Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)

	Universal 200-1000µl, Nr. 740296; Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Pipettenspitzen mit Filter	<p>Biosphere 10µl, Nr. 70.1130.210; Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)</p> <p>Biosphere 20µl, Nr. 70.760.213; Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)</p> <p>Biosphere 200µl, Nr. 70.760.211; Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)</p> <p>Biosphere 1000µl, Nr. 70.762.211; Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)</p> <p>RAININ BioClean 10µl, Nr. GP-10F; Mettler Toledo GmbH (Gießen)</p> <p>RAININ BioClean 200µl, Nr. GP-200F; Mettler Toledo GmbH (Gießen)</p> <p>RAININ BioClean 1000µl, Nr. GP-1000F; Mettler Toledo GmbH (Gießen)</p>
Reaktionsgefäße	<p>1,5ml, Nr. 72.690; Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)</p> <p><i>Safe Lock</i>, 1,5ml, Nr. 0030 120.086; Eppendorf (Hamburg)</p> <p><i>Safe Lock</i>, 2ml, Nr. 0030 120.094; Eppendorf (Hamburg)</p> <p><i>Safe Seal</i>, 2ml, Nr. 72.695; Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)</p>
Reaktionsgefäße für RT-qPCR	<p>PCR 8er Streifen, 0,2ml, Nr. 673210; Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)</p> <p>PCR Deckelkette für 8er Streifen, Nr. 373250; Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)</p>
Serologische Plastikpipetten	<p>Pipette 5ml, Nr. 606180; Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)</p> <p>Pipette 10ml, Nr. 607180; Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)</p> <p>Pipette 25ml, Nr. 760180; Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)</p> <p>Costar Stripette 5ml, Nr. 4487; Corning (New York, USA)</p> <p>Costar Stripette 10ml, Nr. 4488; Corning (New York, USA)</p>

	Costar Stripette 25ml, Nr. 4489; Corning (New York, USA)
	Serologische Pipette 5ml, Nr. 86.1253.001; Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
	Serologische Pipette 10ml, Nr. 86.1254.001; Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
	Serologische Pipette 25ml, Nr. 86.1685.001; Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Sterilfilter	<p>Millex-GP Filter Unit 0,22µm, Nr. SLGP033RS; Millipore GmbH (Schwalbach)</p> <p>Spritzenvorsatzfilter 0,45µm, Nr. 514-0063; VWR International GmbH (Darmstadt)</p> <p><i>Stericup</i> Express Plus 0,22µm, 150ml, Nr. SCGPU01RE; Millipore GmbH (Schwalbach)</p> <p><i>Stericup</i> Express Plus 0,22µm, 250ml, Nr. SCGPU02RE; Millipore GmbH (Schwalbach)</p> <p><i>Stericup</i> Express Plus 0,22µm, 500ml, Nr. SCGPU05RE; Millipore GmbH (Schwalbach)</p>
Zellkulturplatten	<p>Suspensionskultur-Flachbodenplatte, 6-Well, Nr. 657185; Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)</p> <p>Suspensionskultur-Flachbodenplatte, 24-Well, Nr. 662102; Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)</p> <p>Zellkultur-Flachbodenplatte, 6-Well, Nr. 353046; Falcon, Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)</p> <p>Zellkultur-Flachbodenplatte, 24-Well, Nr. 353047; Falcon, Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)</p> <p>Zellkultur-Flachbodenplatte, 48-Well, Nr. 353078; Falcon, Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)</p> <p>Zellkultur Mikroplatte, 96-Well, F-Form, Nr. 655180; Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)</p> <p>Zellkultur Mikroplatte, 96-Well, U-Form, Nr. 650180; Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)</p>

Zellkulturflaschen	<p><i>Cell Culture Flask</i>, 50ml, 25cm², Nr. 353014; Falcon, Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)</p> <p><i>Cell Culture Flask</i>, 250ml, 75cm², Nr. 353135; Falcon, Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)</p> <p><i>Filter Top</i>, 50ml, 25cm², Nr. 690175; Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)</p> <p><i>Filter Top</i>, 250ml, 75cm², Nr. 658175; Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)</p>
Zellkulturschalen	<p><i>Cell Culture</i> 100x20mm, Nr. 353003; Falcon, Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)</p> <p><i>Easygrip</i>, 60x15mm, Nr. 353004; Falcon, Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)</p> <p><i>Intergrid</i>, 150x25mm, Nr. 353025; Falcon, Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)</p>
Zellschaber	<p><i>Cell Scraper</i>, Nr. 353087; Falcon, Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)</p>
Zellsiebe	<p><i>Cell Strainer</i>, 40µm, Nr. 352340; Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)</p> <p><i>Cell Strainer</i>, 100µm, Nr. 352360; Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)</p>
Zentrifugenröhrchen	<p>Rundboden, 5ml, Nr. 115261; Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)</p> <p>Spitzboden, 14ml, Nr. 352096; Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)</p> <p>Spitzboden, 50ml, Nr. 352070; Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)</p> <p>QTY25, 36ml, Nr. 03141; Sorvall (Asheville, USA)</p>

2.3 Chemikalien, Lösungen und Zusätze

Es wurden alle aufgelisteten Chemikalien und Reagenzien, wenn nicht anders vermerkt, in p.a. Qualität bezogen. Für das Ansetzen von Puffern und Lösungen wurde ausschließlich *Aqua bidest.* (*Aqua B. Braun*, steril und pyrogenfrei) verwendet.

β-ME (2-Mercaptoethanol)	Nr. M7522; Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
<i>Aqua bidest.</i> (<i>Aqua B. Braun</i>)	Nr. 82479E; B. Braun AG (Melsungen)
Aceton	Nr. 00570; Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Acetonitril	Nr. 271004; Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Amphotericin B	Nr. A2411; Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Ammonium-Nickelsulfat-Hexahydrat (Peroxidase Substrat)	Nr. 09885; Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
BCIP/NBTplus Substrat	Nr. 3650-10; Mabtech AB (Hamburg)
BSA (Bovines Serum Albumin)	Nr. K41-001-500; PAA Laboratories GmbH (Cölbe) Nr. A7906; Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) 22%, Nr. 718110; Ortho-Clinical Diagnostics Inc. (Neckarsgmünd)
BFA (Brefeldin A)	Nr. B7651; Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
DAB (3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) Peroxidase Substrat	Nr. D5637; Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
DEPC (Diethylpolycarbonat)	Nr. K028.2; Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Desinfektionsmittel	Alkopharm 70, Nedalco; Cargill Deutschland GmbH (Heilbronn)
DMF (n,n-Dimethylformamid)	Nr. D15.855-0; Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Nr. 1.02951.1000; Merck KGaA (Darmstadt)

DNase I	Nr. DN-25, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
dNTP Set (Desoxyribonukletidtriphosphat)	Nr. R0181; Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Nr. 3619.1; Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Einbettmedium	PARAmount; Earth Safe Industries (Belle Mead, USA)
Erythrozyten-Lysepuffer (<i>Red Blood Cell Lysing Buffer</i>)	Nr. R7757; Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Essigsäure (HAc) 100% (v/v)	Nr. 3738.2; Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Ethanol (C ₂ H ₆ O) absolut 100% (v/v)	Nr. A1613; AppliChem GmbH (Darmstadt)
FBS (<i>Fetal Bovine Serum</i>) Gold	Nr. A15-151; PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Ficoll (LSM 1077)	Nr. J15-004; PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Formalin 37% (v/v)	Nr. K31602203302; Merck KGaA (Darmstadt)
FuGene6 <i>Transfection Reagent</i>	Nr. 11 814 443 001; Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Heparin-Natrium 25000	Nr. 5394.02.00; Ratiopharm GmbH (Ulm)
HEPES (Hydroxyethylpiperazinyl-Ethansulfonsäure) Puffer	Nr. 15630-056; Gibco, Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Isopropanol	<i>Isopropyl Alcohol</i> GMP; Aug. Hedinger GmbH & Co. KG (Stuttgart)
Kaliumchlorid (KCl)	Nr. 6781.1; Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Nr. 3904.1; Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Kollagenase A	Nr. 10 103 586 001; Roche (Mannheim)
L-Glutamin 200mM (100x)	Nr. 25030-024; Gibco, Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ x 6H ₂ O)	Nr. 2189.1; Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Mantelflüssigkeit (<i>Sheath Fluid</i>)	Iso Flow™, Nr. 8546859; Beckman Coulter GmbH (Krefeld) FACSFlow™, Nr. 342003; Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Methanol (CH ₃ OH) ≥ 99% (v/v)	Nr. 8388.5; Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

Methylzellulose	Nr. 8421.1; Carl Roth GmbH (Karlsruhe) Nr. 25499.182; VWR International GmbH (Darmstadt)
Natriumacetat ($C_2H_3NaO_2 \times 3H_2O$)	Nr. 6779.2; Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Nr. 8563.1; Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl)	Nr. 4360.2; Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Nr. 6885.1; Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumhydrogenphosphat ($Na_2HPO_4 \times 2H_2O$)	Nr. 2370.1; Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Paraffin (Histo-Comp 56°C)	Nr. V0-5-1002; Tissue-Tek, Sakura Finetek GmbH (Staufen)
PBS (<i>Phosphate buffered saline</i>)	Nr. 14190-094; Gibco, Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Penicillin-Streptomycin <i>liquid</i>	Nr. 15140-122; Gibco, Life Technologies GmbH (Darmstadt)
QIAzol <i>Lysis Reagent</i>	Nr. 79306; QIAGEN GmbH (Hilden)
Reinigungsmittel (<i>Cleaning Agent</i>)	Coulter Clenz™, Nr. 8448222; Beckman Coulter GmbH (Krefeld) FACS <i>Clean Solution</i> , Nr. 340345; Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
RNase AWAY	Nr. 10180601; Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
Streptavidin-ALP (Alkaline Phosphatase)	Nr. 3310-10; Mabtech AB (Hamburg)
Trichlormethan/Chloroform	Nr. 6340.1; Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
TRIS (Tris-hydroxymethyl-aminomethan)	Nr. 4855.2; Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Trypanblau	Nr. L6323; Biochrom AG (Berlin)
Trypsin	Nr. T7409; Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Trypsin 250	Nr. 215240; Difco, Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	10x, Nr. 15400-054; Gibco, Life Technologies GmbH (Darmstadt)

Türks-Lösung	Nr. 1.09277.0100; Merck KGaA (Darmstadt)
Tween 20	Nr. P1379; Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30% (v/v)	Nr. 80701; Carl Roth GmbH (Karlsruhe) Nr. 1.07209.0250; Merck KGaA (Darmstadt)
Xylol	Nr. 1.08685.2500; Merck KGaA (Darmstadt)

2.4 Kits

Biotin <i>Blocking System</i>	Nr. X0590; Dako Deutschland GmbH (Hamburg)
<i>Cytofix/Cytoperm Plus Kit mit Golgi Plug</i>	Nr. 555028; Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Fuchsin Substrat-Chromogen System (Alkalische Phosphatase Substrat)	Nr. K0625; Dako Deutschland GmbH (Hamburg)
<i>OneStep RT-PCR Kit</i>	Nr. 210212; QIAGEN GmbH (Hilden)
RNase-Free DNase Set	Nr. 79254; QIAGEN GmbH (Hilden)
RNeasy <i>Mini Kit</i>	Nr. 74106; QIAGEN GmbH (Hilden)
RNeasy <i>Lipid Tissue Mini Kit</i>	Nr. 74804; QIAGEN GmbH (Hilden)
VECTASTAIN® ABC-Peroxidase-Kit	Nr. PK-4000; Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, USA)

2.5 Zellkultur

2.5.1 Zusätze und Reagenzien

Alle Zusätze und Reagenzien wurden ausschließlich mit *Aqua bidest.* (*Aqua B. Braun*) angesetzt und bei Bedarf über einen 0,22µm Membranfilter steril filtriert.

β-ME (2-Mercaptoethanol)

Das Reduktionsmittel wurde in einer Stocklösung von 100µl β-ME pro 100ml A. bidest. angesetzt, aliquotiert (10ml) und bei -20°C aufbewahrt. Für die Verwendung wurde es bei 4°C aufgetaut und als Oxidationsschutz diverser Inhaltstoffe den entsprechenden Medien in einer Endkonzentration von $5 \times 10^{-5} \text{M}$ zugesetzt. Die aufgetaute Lösung ist bei 4°C nur begrenzt lagerfähig.

Amphotericin B

Das Antimykotikum Amphotericin B, welches ein sehr breites Wirkungsspektrum besitzt, wurde dem Medium, das für die Lagerung von *ex vivo* entnommenen Organen verwendet wurde, optional hinzugefügt, um eine mögliche Kontamination mit Pilzen zu vermeiden. Die angesetzte Stocklösung [1,4mg/ml] wurde aliquotiert (500µl), bei -20°C gelagert und bei Gebrauch ein Aliquot pro 500ml Zellkulturmedium (1:1000) zugesetzt.

DMSO (Dimethylsulfoxid)

Das organische Lösungsmittel DMSO wurde für die Kryokonservierung von Zellen verwendet, da es aufgrund seiner stark hygroskopischen Eigenschaften der Bildung zellschädigender Eiskristalle entgegenwirkt.

Fetales Kälberserum (FCS, *fetal calf serum*)

Das fetale Kälberserum ist ein wichtiges Supplement vieler Zellkulturmedien, da es einen hohen Anteil an Serumproteinen, Wachstumsfaktoren, Hormonen etc. beinhaltet, die für die Aufzucht und Kultivierung von Zellen notwendig sind. Des Weiteren wurde es für die Kryokonservierung und zum Abstoppen enzymatischer Reaktionen in der Zellkultur verwendet. Das standardisierte FCS wurde steril und Mykoplasmen-frei bezogen, die Lagerung erfolgte bei -20°C. Für den Gebrauch wurde das FCS langsam bei 4°C aufgetaut, um eine Ausfällung von Lipoproteinen zu verhindern, anschließend 30min bei 56°C im Wasserbad hitzeinaktiviert und bei 4°C weiter gelagert. Durch das Erhitzen wurden thermolabile Viren und störende Komplementbestandteile inaktiviert.

HEPES Puffer (Hydroxyethylpiperazinyl-Ethansulfonsäure)

HEPES, eine im physiologischen pH-Bereich wirksame, Puffersubstanz wurde vor allem den Zellkulturmedien besonders schnell wachsender Kulturen hinzugefügt, um den pH-Wert stabil zu halten. Die Pufferkapazität von HEPES liegt zwischen pH6,8 und pH8,2. Diese Puffersubstanz wurde als 1M Lösung bezogen, bei 4°C gelagert und in einer Endkonzentration von 10mM dem Medium hinzugefügt.

L-Glutamin

Die Aminosäure L-Glutamin wurde als 100x Stocklösung (200mM in 0,9% (w/v) NaCl) bezogen, aliquotiert (5ml) und bei -20°C gelagert. Für die Verwendung in der Zellkultur wurde das L-Glutamin frisch aufgetaut und bei 37°C in Lösung gebracht. Anschließend wurde es den entsprechenden Medien in einer Endkonzentration von 2mM eingesetzt.

Methylzellulose (Zellulosemethylether)

Das hydrophile Pulver wurde in einer stark viskosen Lösung zum Überschichten von infizierten Zellkulturen bei der Virustiterbestimmung eingesetzt. Für 500ml Methylzellulose-Medium wurden 8,8g Methylzellulose in 360ml *Aqua bidest.* suspendiert und zusammen mit einem Magnetstab in einer 500ml Laborflasche autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde die Methylzellulose durch Rühren bei 4°C gelöst und bis zur Verwendung ebenfalls bei 4°C aufbewahrt. In dieser Form kann die viskose Lösung mehrere Monate aufbewahrt werden. Für die Verwendung des Methylzellulose-Mediums in der Zellkultur wurden die unten aufgeführten Zusätze hinzugefügt.

MEM 10x	12,5% (v/v)
Penicillin	100U/ml
Streptomycin	0,1mg/ml
FCS	4% (v/v)
L-Glutamin	2mM

mit NaHCO₃ (Stocklösung 55mg/ml) auf pH7,4 einstellen

PBS-Puffer (PBS, *Dulbecco's Phosphate Bufferd Saline*), pH7,4

Die phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) wurde steril bezogen, bei Raumtemperatur gelagert und in der Zellkultur verwendet.

KCl	2,67mM
KH ₂ PO ₄	1,47mM
NaCl	137,93mM
Na ₂ HPO ₄	8,06mM

Penicillin-Streptomycin

Die Kombination beider Antibiotika wurde als Stocklösung (10.000U Penicillin, 10mg/ml Streptomycin in 0,85% (w/v) NaCl) bezogen, aliquotiert (5ml) und bei -20°C gelagert. Als Prophylaxe gegen Kontaminationen mit grampositiven und gramnegativen Bakterien wurde es nach dem Auftauen den entsprechenden Medien in einer Endkonzentration von 100U Penicillin und 0,1mg/ml Streptomycin hinzugefügt.

Trypanblau (Benzaminblau, Direkt Blau 14)

Der anionische Diazofarbstoff bindet an Zellproteine und färbt als nicht membrangängiger Farbstoff nur tote Zellen intrazellulär an. Somit kann Trypanblau auch für eine Vitalfärbung eingesetzt werden. Der Farbstoff wurde als Stocklösung (5% (w/v) in PBS) bezogen, bei Raumtemperatur gelagert, vor Gebrauch 1:5 mit PBS verdünnt und in einer Endkonzentration von 0,1% (v/v) für Färbung eingesetzt.

Trypsin/EDTA (Trypsin-Ethylendiamintetraacetat)

Die Endopeptidase Trypsin ist ein Verdauungsenzym, das in der Zellkultur für das Ablösen von adhären Zellen verwendet wird. Nach kurzer Behandlung werden zunächst nur die extrazellulären Matrixproteine gespalten und die Zellen lösen sich leicht vom Boden der Zellkulturschale ab. Für die Zellkultur wurde die EDTA-gepufferte 10x Stocklösung 1:10 mit PBS verdünnt (Endkonzentration 0,5mg/ml Trypsin, 0,22mg/ml EDTA, pH7,0-pH7,5) und nach Vorwärmen im Wasserbad auf 37°C zum Ablösen von adhären Zellen verwendet. Die Lagerung der Lösung erfolgte nach 1:10 Verdünnung bei 4°C.

Türks-Lösung (*acetic acid gentian violet solution*)

Diese Lösung wird routinemäßig für das Zählen von Lymphozyten in der hämatologischen Diagnostik eingesetzt und gewährleistet eine exakte Zellzahlbestimmung in Anwesenheit von Erythrozyten, die eine ähnliche Größe wie die Lymphozyten besitzen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Türks-Lösung für die Bestimmung der Zellzahl in der Milz verwendet. Die in der Lösung enthaltene 3%ige Essigsäure hämoysiert die Erythrozyten, während die Zellkerne mononukleärer Zellen durch Kristallviolett (Gentianaviolett) angefärbt werden.

2.5.2 Zellkulturmedien

Es wurden ausschließlich Zellkulturmedien der Handelsmarke Gibco® von der Firma Life Technologies GmbH (Darmstadt) bezogen und mit den unten angegebenen Zusätzen supplementiert. Soweit nicht anders vermerkt, wurden in dieser Arbeit nur GlutaMAX™ Medien mit einer stabilisierten Dipeptid-Form von L-Glutamin (L-Alanyl-L-Glutamin) verwendet.

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), Nr. 61965-026

Penicillin	100U/ml
Streptomycin	0,1mg/ml
FCS	10% (v/v)

MEM (*Minimum Essential Medium*), Nr. 41090-028

Penicillin	100U/ml	
Streptomycin	0,1mg/ml	
FCS	10% (v/v)	
Amphotericin B	1,4µg/ml	(optional bei Lagerung von Organen)

MEM α (*Minimum Essential Medium alpha*), Nr. 32561-029

Penicillin	100U/ml
Streptomycin	0,1mg/ml
β -ME	$5 \times 10^{-5} \text{M}$
HEPES	10mM
FCS	7,5% (v/v)

MEM (*Minimum Essential Medium*), 10x, ohne Glutamin, Nr. 21430-020

Opti-MEM® I Reduced Serum Medium, Nr. 51985-026

RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) Medium 1640, Nr. 61870-010

Penicillin	100U/ml
Streptomycin	0,1mg/ml
β -ME	$5 \times 10^{-5} \text{M}$
HEPES	10mM
FCS	5% (v/v)

2.6 Antikörper

2.6.1 Antikörper für den ELISpot-Assay

Bezeichnung	Isotyp	Klon	Konz.	Bezugsquelle
Anti-Maus IFN- γ (Coating-Ak, Mab)	Ratte IgG1	RMMG-1	5 μ g/ml	Nr. AMC4834; Life Technologies (Darmstadt)
Anti-Maus IFN- γ (Detektions-Ak, Biotin-gekoppelt)	Ratte IgG1	XMG1.2	1 μ g/ml	Nr. 554410; Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)

2.6.2 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Isotyp	Klon	Menge	Bezugsquelle
Anti-Maus CD16/ CD32 (Fc Block)	Ratte IgG2b	2.4G2	1 μ g/10 ⁶ Zellen	Nr. 553142; Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
FITC-anti-Maus CD8a (Ly-2)	Ratte IgG2a	53-6.7	0,5 μ g/10 ⁶ Zellen	Nr. 553031; Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
FITC-anti-Maus CD49b/Pan NK	Ratte IgM	DX5	1 μ g/10 ⁶ Zellen	Nr. 553857; Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
FITC-anti-Maus IFN- γ (Ly-2)	Ratte IgG1	XMG-1	3 μ g/10 ⁶ Zellen	Nr. 554411; Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
FITC IgG1 Isotyp	Ratte IgG1	R3-34	1 μ g/10 ⁶ Zellen	Nr. 554684; Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
PE-anti-Maus CD49b/Pan NK	Ratte IgM	DX5	1 μ g/10 ⁶ Zellen	Nr. 553858; Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
PE-anti-Maus CD314/NKG2D	Ratte IgG1	CX5	1 μ g/10 ⁶ Zellen	Nr. 558403; Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
PE-anti-Maus TCR- β Kette	Hamster IgG2	H57-597	0,3 μ g/10 ⁶ Zellen	Nr. 553172; Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
PE-Cy5 IgG2a Isotyp	Ratte IgG2a	eBR2a	1 μ g/10 ⁶ Zellen	Nr. 15-4321-82; eBioscience (Frankfurt)
PE-Cy5-anti- Maus CD8a (Ly-2)	Ratte IgG2a	53-6.7	1 μ g/10 ⁶ Zellen	Nr. 553034; Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)

2.6.3 Antikörper für die Immunhistochemie

Bezeichnung	Isotyp	Klon	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-mCMV IE1 (pp89) Mab	Maus IgG1	Croma 101	1:500	Prof. Dr. Stipan Jonjić, CapRi (Rijeka, Kroatien)
Anti-Maus CD3ε (Mab)	Ratte IgG1	CD3-12	1:300	Nr. SM1754P; Acris Antibodies GmbH (Herford)
Anti-Maus IgG (Antiserum)	Ziege	polyklonal	1:20	Nr. B5899; Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Anti-Maus IgG (Biotin-gekoppelt)	Ziege IgG F(ab) ₂	polyklonal	1:200	Nr. B0529; Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Anti-Ratte IgG (Biotin-gekoppelt)	Ziege IgG	polyklonal	1:100	Nr. 554014; Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
APAAP-Komplex (Mab)	Maus	AP1B9	1:50	Nr. A7827; Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Normalserum Kaninchen	Kaninchen	polyklonal	1:10	Nr. R4505; Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Normalserum Ziege	Ziege	polyklonal	1:10	Nr. 16210-064; Life Technologies (Darmstadt)

2.6.4. Antikörper für die *in vivo* Depletion von Lymphozyten

Bezeichnung	Isotyp	Klon	Menge	Bezugsquelle
Anti-Asialo GM1 Antiserum	Kaninchen IgG, IgA, IgM	polyklonal	25µl/Maus	Nr. 986-10001; Wako Chemicals GmbH (Neuss)
Anti-Maus CD8 (Mab)	Ratte IgG2b	YTS 169 4.2	1mg/Maus	Prof. Dr. Stipan Jonjić, CapRi (Rijeka, Kroatien)

2.6.5. *Microbeads*-gekoppelte Antikörper für die magnetische Zellsortierung (MACS)

Bezeichnung	Isotyp	Klon	Menge	Bezugsquelle
Anti-Maus CD8a (Ly-2) <i>Microbeads</i>	Ratte IgG2a	keine Angabe	10µl/10 ⁷ Zellen	Nr. 130-049-401; Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)

2.7 Viren

Alle in dieser Arbeit verwendeten Viren gehen auf den von der ATCC (*American Type Culture Collection*) erworbenen Wildtyp-Stamm (*Smith strain*, 1954) mCMV-WT ATCC VR-194 (neue Bezeichnung VR-1399) zurück. Dieser WT-Stamm war Grundlage für die genomweite Sequenzierung von mCMV durch William Rawlinson (Rawlinson *et al.*, 1996). Seit der Klonierung des Genoms von VR-194 in ein *Bacterial Artificial Chromosom* (BAC) durch Messerle *et al.* (1997) sind gezielte genetische Manipulationen bei mCMV möglich. Die in dieser Arbeit verwendeten Virus-Rekombinanten wurden alle basierend auf dem mCMV-BAC Plasmid pSM3fr (Wagner *et al.*, 1999) generiert und mit Hilfe der BAC-Mutagenese Technik hergestellt.

Für die Infektion der Versuchstiere wurden ausschließlich Zellkultur gereinigte Virus-Stocks verwendet.

MW97.01 (mCMV-WT.BAC)

Die chimäre mCMV-Rekombinante wurde aus dem Genom des Laborstammes ATCC-VR1399 (mCMV-WT, *Smith strain*, 1954) und einem Anteil des Laborstammes K181 (*HindIII*-E-Fragment) generiert. Die Rekombinante entspricht in allen wesentlichen biologischen Eigenschaften dem mCMV-WT.Smith (Wagner *et al.*, 1999) und wurde unserem Institut freundlicherweise von Prof. Dr. Ulrich H. Koszinowski (Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Mikrobiologie, München) zur Verfügung gestellt.

mCMV- Δ M27, mCMV- Δ M27-Rev

Die Rekombinante mCMV- Δ M27 unterscheidet sich von mCMV-WT.BAC durch eine vollständige Deletion des ORF M27, der für einen viralen IFN-Antagonisten kodiert. Bei der Revertante mCMV- Δ M27-Rev wurde die M27-kodierende Sequenz vollständig an ihrer ursprünglichen Position reinseriert (Zimmermann *et al.*, 2005). Die beiden mCMV-Rekombinanten wurden unserem Institut freundlicherweise von Prof. Dr. Hartmut Hengel (Institut für Virologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

mCMV- Δ M36, mCMV- Δ M36-Rev

Das rekombinante mCMV- Δ M36 unterscheidet sich von mCMV-WT.BAC durch eine vollständige Deletion des ORF M36 (Menard *et al.*, 2003), der für ein Protein kodiert, das den extrinsischen Signalweg der Apoptose blockiert. Bei der Revertante mCMV- Δ M36-Rev wurde die M36-kodierende Sequenz vollständig an ihrer ursprünglichen Position reinseriert (Cicin-Sain *et al.*, 2008). Die beiden mCMV-Rekombinanten wurden unserem Institut freundlicherweise von Prof. Dr. Ulrich H. Koszinowski (Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Mikrobiologie, München) zur Verfügung gestellt.

mCMV-ΔM36-FADD^{DN}, mCMV-WT-FADD^{DN}

Das rekombinante mCMV-ΔM36-FADD^{DN} stellt eine funktionelle Revertante von mCMV-ΔM36 dar. Anders als bei der Revertante mCMV-ΔM36-Rev wurde die M36 kodierende Sequenz nicht an ihrer nativen Position reinseriert, sondern es erfolgte die Insertion einer dominant-negativen Variante des FADD-Gens (FADD^{DN}) in die intergenische Region zwischen den ORFs m16 und m17. Die Insertion von FADD^{DN} bewirkt eine konstitutive Blockade des extrinsischen Apoptose-Signalwegs. Die Generierung von mCMV-WT-FADD^{DN} wurde analog ausgeführt, wobei diese Rekombinante auf dem mCMV-WT.BAC basiert (Cicin-Sain *et al.*, 2008). Beide Rekombinanten wurden unserem Institut freundlicherweise von Prof. Dr. Ulrich H. Koszinowski (Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Mikrobiologie, München) zur Verfügung gestellt.

mCMV-M45-BamX, mCMV-M45-BamX-Rev

Die beiden Virusrekombinanten basieren auf dem Transposon-Donor-Plasmid pTsTM16 (Brune *et al.*, 2001). Als Basis wurde die Transposon-Mutante IID7 verwendet, um die BamX-*Frameshift*-Mutation einzufügen. Der Austausch der Transposon-Insertion bewirkt eine 4bp-Insertion an der BamHI Restriktionsstelle im ORF M45, die zu einer *Missense*-Mutation der Aminosäuresequenz des Proteins M45 führt, das den Signalweg der Nekroptose blockiert (Brune *et al.*, 2001; Lembo und Brune, 2009). Im Falle der Revertante wurde die Transposon-Insertion durch die WT-Sequenz ersetzt, sie ist demnach keine Revertante von BamX, sondern der parentalen Mutante IID7. Die beiden Viren wurden unserem Institut freundlicherweise von Prof. Dr. Wolfram Brune (Heinrich-Pette-Institut, Leibniz Institut für Experimentelle Virologie, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

mCMV-Δm152, mCMV-Δm152-Rev

Die Virusrekombinante mCMV-Δm152 wurde ausgehend von mCMV-WT.BAC durch vollständige Deletion des ORF m152, der für das Hauptimmunevasionsprotein m152 kodiert, generiert. Bei der Revertante mCMV-Δm152-Rev wurde die m152-kodierende Sequenz vollständig an ihrer ursprünglichen Position reinseriert (Wagner *et al.*, 2002). Beide Virusrekombinanten wurden unserem Institut freundlicherweise von Prof. Dr. Ulrich H. Koszinowski (Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Mikrobiologie, München) zur Verfügung gestellt.

mCMV-Δm157luc

Die Rekombinante unterscheidet sich von WT.BAC durch einen Austausch des ORF m157 durch ein DNA-Fragment bestehend aus dem HCMV-MIEP (*Major Immediate Early Promotor*), dem Luciferase-Gen aus dem Plasmid pGL3 (Invitrogen - Life Technologies),

sowie einem polyA-Signal des *bGH*-Gens (*bovine-growth-hormone*) aus dem Plasmid pcDNA3.1 (Invitrogen; Life Technologies). Die Rekombinante mCMV- Δ m157luc wurde von Prof. Dr. Martin Messerle (Medizinische Hochschule Hannover, Institut für Virologie) generiert (Klenovsek *et al.*, 2007) und unserem Institut freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.8 Antigene mCMV-Peptide

Die in dieser Arbeit verwendeten synthetischen mCMV-Peptide wurden von der Firma JPT Peptide Technologies GmbH (Berlin) als Lyophilisate in einer Reinheit von >80% bezogen. Für den weiteren Gebrauch wurden die Peptide in PBS 30% Acetonitril (v/v) gelöst, auf eine Konzentration von 10^{-3} M eingestellt und bei -70°C gelagert. Die antigenen Peptide wurden zur Beladung Antigen-präsentierender Zellen (APCs) eingesetzt, um die Frequenzen mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen zu bestimmen.

Verwendete antigene mCMV-Peptide im Haplotyp H-2^d

ORF	MHC-I-Restriktion	Peptidsequenz	Referenz
m04	D ^d	²⁴³ YGPSLYRRF(F) ²⁵²	Holtappels et al., 2000b
m18	D ^d	³⁴⁶ SGPSRGRII ³⁵⁴	Holtappels et al., 2002a
M45	D ^d	⁵⁰⁷ VGPALGRGL ⁵¹⁵	Holtappels et al., 2004
M83	L ^d	⁷⁶¹ YPSKEPFNF ⁷⁶⁹	Holtappels et al., 2001
M84	K ^d	²⁹⁷ AYAGLFTPL ³⁰⁵	Holtappels et al., 2000c
M105	K ^d	²⁰⁷ TYWPVVSDI ²¹⁵	Holtappels et al., 2008b
m123	L ^d	¹⁶⁸ YPHFMPTNL ¹⁷⁶	Reddehase et al., 1989
m145	K ^d	⁴⁵¹ CYYASRTKL ⁴⁵⁹	Holtappels et al., 2008b
m164	D ^d	²⁵⁷ AGPPRYSRI ²⁶⁵	Holtappels et al., 2002b

Verwendete antigene mCMV-Peptide im Haplotyp H-2^b

ORF	MHC-I-Restriktion	Peptidsequenz	Referenz
M38	K ^b	³¹⁶ SSPPMFRVP ³²⁴	Munks et al., 2006a, b
M45	D ^b	⁹⁸⁵ HGIRNASFI ⁹⁹³	Munks et al., 2006a, b
M57	K ^b	⁸¹⁶ SCLEFWQRV ⁸²⁴	Munks et al., 2006b
M122	K ^b	⁴¹⁶ RALEYKNL ⁴²³	Munks et al., 2006a
m139	K ^b	⁴¹⁹ TVYGFCLL ⁴²⁶	Munks et al., 2006a, b
m141	K ^b	¹⁶ VIDAFSRL ²³	Munks et al., 2006a, b

Die Position der Aminosäuren bezieht sich auf die nach Rawlinson *et al.* (1996) definierten ORFs.

2.9 mCMV-ORF-Library

Das für die genomweite Detektion antigener ORFs verwendete mCMV-ORF-Library Screening wurde von Michael W. Munks (*Department of Molecular Microbiology and Immunology, Oregon Health & Science University, Portland, OR, USA*) generiert und unserem Institut freundlicherweise zur Verfügung. Für dieses Screening wurden die von Rawlinson *et al.* (1996) beschriebenen ORFs des mCMV-WT unter Kontrolle des HCMV-MIE-Promotor-Enhancers in den Vektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen; Life Technologies) kloniert (Munks *et al.*, 2006).

Hinweis: Auflistung und Zuordnung der nach Rawlinson *et al.* (1996) definierten ORFs siehe Anhang (7.1).

2.10 Primäre Zellen und Zelllinien

Murine embryonale Fibroblasten (MEF)

Diese primären, adhärenenten Fibroblasten wurden aus 14-17 Tage alten Föten des Mausstammes BALB/c wie unter 3.2.5 beschrieben isoliert (Passage 1) und für die weitere Verwendung erneut passagiert oder für die Lagerung wie unter 3.1.2 beschrieben kryokonserviert. Aufgrund ihrer Permissivität für mCMV wurden sie für die *in vitro*-Vermehrung von mCMV, sowie für Virustiter-Bestimmungen verwendet.

Die Kultivierung der MEFs erfolgte auf Zellkulturschalen (100x20mm) in MEM + 10% FCS (10ml/Schale). Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA (1ml/Schale) abgelöst und für die weitere Kultivierung 1:3 oder 1:4 gesplittet. Die MEFs wurden ausschließlich in Passage 3 für den Versuch eingesetzt.

Kulturmedium: MEM + 10% FCS (v/v)

P815 (Nr. TIB-64™, ATCC)

Die immortalisierte Mastozytom-Zelllinie wurde ursprünglich aus dem Mausstamm DBA/2 isoliert und besitzt den MHC-Haplotyp H-2^d (MHC-Klasse I Moleküle: D^d, K^d, L^d). Die Suspensionszelllinie ist MHC-Klasse II negativ und wurde in dieser Arbeit als APC für CD8 T-Zellen aus der BALB/c Maus im ELISpot-Assay eingesetzt.

Für die Kultivierung wurden die P815 in RPMI + 5% FCS auf eine 24-Well Platte in einer Verdünnungsreihe von 8 aufeinander folgenden Verdünnungsstufen (1:5) gesplittet. Die Expansion der Zellen erfolgte in 250ml Zellkulturflaschen.

Kulturmedium: RPMI + 5% FCS (v/v)

EL4 (Nr. TIB-39™, ATCC)

Diese immortalisierten Suspensionszellen wurden ursprünglich aus einem induzierten T-Zell Lymphom der C57BL/6 Maus isoliert und besitzen daher den MHC-Haplotyp H-2^b (MHC-Klasse I Moleküle: D^b, K^b). Diese Zelllinie ist MHC-Klasse II negativ und wurde als APC für CD8 T-Zellen aus Mäusen des Haplotyps H-2^b im ELISpot-Assay eingesetzt.

Für die Kultivierung wurden die EL4 in einer 50ml Zellkulturflasche alle 3-4 Tage mit DMEM + 10% FCS 1:10 gesplittet. Die Expansion der Zellen erfolgte in 250ml Zellkulturflaschen.

Kulturmedium: DMEM + 10% FCS (v/v)

SV40-transformierte BALB/c-Fibroblasten (BALB/SV40)

Diese SV40 transformierte, aus BALB/c-Fibroblasten generierte, Zelllinie wurde unserem Institut freundlicherweise von Prof. Dr. David C. Johnson (Oregon Health & Science University Portland, OR, USA) zur Verfügung gestellt. Diese adhärente Zelllinie besitzt den MHC-Haplotyp H-2^d und wurde für die Transfektion von ORF-Plasmiden im mCMV-ORF-*Library Screening* verwendet.

Kulturmedium: DMEM + 10% FCS (v/v)

2.11 Versuchstiere

Die in dieser Arbeit verwendeten Versuchstiere wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universitätsmedizin und der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter SPF-Bedingungen (*Specified Pathogen Free*) gezüchtet und gehalten.

BALB/cJ (Nr. 000651, JAX®)

Der Inzucht-Stamm BALB/cJ (BALB/c) wurde von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) bezogen und in der ZVTE weiter gezüchtet.

C57BL/6J (Nr. 000664, JAX®)

Der Inzucht-Stamm C57BL/6J (C57BL/6) wurde ebenfalls von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) bezogen und in der ZVTE weiter gezüchtet.

C57BL/6-IgMi (IgMi)

Der *Knock-in* Stamm IgMi, bei dem die konstante Region des IgM-Gens in den IgH-Lokus eingefügt wurde, basiert auf dem genetischen C57BL/6-Hintergrund. Der daraus resultierende Genlocus kodiert nur noch für die IgM konstante Region. Dadurch sind die B-Zellen der IgMi-Maus nicht mehr in der Lage, den Klassenwechsel oder die

Differenzierung zu Plasmazellen in den Keimzentren lymphatischer Organe zu durchlaufen. Die B-Zellen der IgMi-Mäuse besitzen zwar einen B-Zell-Rezeptor in Form von IgM, sind aber nicht mehr in der Lage Antikörper zu sezernieren (Waisman *et al.*, 2008). Dieser Knock-in Stamm wurde unserem Institut freundlicherweise von Prof. Dr. Ari Waisman (Institut für Molekulare Medizin, Universitätsmedizin Mainz) zur Verfügung gestellt.

C57BL/6-*Unc93b1*^{3d/3d} (3d)

Der Mausstamm 3d beruht auf einer durch N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff induzierten *Missense*-Mutation im *Unc93b1*-Gen (H412R Mutation) und verhindert ein *Signaling* über die intrazellulären *Toll-like* Rezeptoren (TLR) 3, 7 und 9. Des Weiteren weisen die 3d-Mäuse sowohl einen Verlust der *Cross*-Präsentation über MHC-I auf, als auch eine verminderte Präsentation von exogenem Antigen über MHC-II (Tabeta *et al.*, 2006). Diese *Cross-Priming*-defiziente Maus basiert auf dem genetischen C57BL/6-Hintergrund und wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. Melanie Brinkmann (Virale Immunmodulation, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung Braunschweig) zur Verfügung gestellt.

2.12 Oligonukleotide

In der vorliegenden Arbeit wurden die Oligonukleotide für die absolute Quantifizierung von IE1-Transkripten entweder von Operon Biotechnologies (Köln) oder von biomers.net (Ulm) bezogen. Die Positionsangaben der mCMV-Sequenzen erfolgten nach Rawlinson *et al.* (1996) (*GenBank-Accession* No. NC_004065). Die verwendeten Primer wurden in sterilem Aqua bidest. gelöst, die TaqMan-Sonde in TRIS-Puffer (10mM) pH 8,0.

Oligonukleotide für TaqMan-Quantifizierungen (Primer):

IE1_Taq_For1	n 181184-181210; 5'-TGG CTG ATT GAT AGT TCT GTT TTA TCA-3'
IE1_Taq_Rev1	n 181438-181421; 5'-CTC ATG GAC CGC ATC GCT-3'

Amplifikatgröße: 133bp

Fluoreszenz-markierte Oligonukleotide für die RT-qPCR (TaqMan-Sonde):

IE1_Taq_P1	n 181239-181249 (Exon 4), n'181372-181385 (Exon 3); 5'-[6~FAM] AAC GCT CCT CAC TGC AGC ATG CTT G[TAMRA~6~FAM]-3'
------------	--

2.13 Zusammengesetzte Puffer und Lösungen

Für das Ansetzen von Puffern und Lösungen wurde ausschließlich steriles *Aqua bidest.* oder PBS verwendet und bei Bedarf sterilfiltriert (*Stericup Express Plus* 0,22µm).

2.13.1 Puffer für tierexperimentelle Methoden

5x MACS-Puffer, pH7,2

BSA	12,5g	2,5% (w/v)	
EDTA	1,86g	10mM	ad 500ml PBS

Nach vollständigem Lösen der Bestandteile auf einem Magnetrührer wurde die Lösung sterilfiltriert. Vor Gebrauch wurde der 5xMACS-Puffer 1:5 mit PBS verdünnt und als 1x Puffer verwendet.

PBS/Heparin-Lösung für die Lungenperfusion

Heparin-Natrium 25000	500µl	0,1% (v/v)	ad 500ml PBS
-----------------------	-------	------------	--------------

Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

Trypsin/EDTA-Puffer, pH6,4

Trypsin 250	1,25g		
EDTA	1,25g	3,4mM	ad 1000ml PBS

Für das Einstellen der Lösung auf pH6,4 wurde 1M NaOH verwendet. Anschließend wurde der Puffer sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

2.13.2 Puffer für die Generierung von mCMV-Stocks

Virusstandard-Puffer (VSP), pH7,8

TRIS	6,1g	50mM	
Na-EDTA	1,86g	5mM	
KCl	0,895g	12mM	ad 1000ml <i>Aqua bidest.</i>

Der VSP wurde mit HCl auf pH7,8 eingestellt und anschließend autoklaviert.

VSP + 15% (w/v) Saccharose

Saccharose	30g	15% (w/v)	ad 200ml VSP
------------	-----	-----------	--------------

Diese Lösung wurde vor Gebrauch frisch angesetzt und anschließend sterilfiltriert.

2.13.3 Puffer für die immunologische Analyse

ELISpot-Waschpuffer

Tween 20	50µl	0,01% (v/v)	ad 500ml PBS
----------	------	-------------	--------------

Der Waschpuffer kann bei 4°C maximal 4 Wochen gelagert werden.

Analyse-Puffer für die Durchflusszytometrie

FCS	500µl	0,1% (v/v)	ad 500ml PBS
-----	-------	------------	--------------

Der Analyse-Puffer wurde bei 4°C maximal 4 Wochen gelagert.

2.13.4 Puffer und Lösungen für die histologische Analyse

Gepufferte Formalinlösung 4% (v/v), pH7,4

KH ₂ PO ₄	9,07g	66mM	
Na ₂ HPO ₄	11,86g	84mM	
Formalin 37% (v/v)	108ml		ad 1000ml <i>Aqua bidest.</i>

Für das Einstellen auf pH7,4 wurde NaOH verwendet.

Trypsin-Lösung, pH7,4

NaCl	8g	137mM	
KCl	0,2g	2,7mM	
KH ₂ PO ₄	0,2g	1,5mM	
Na ₂ HPO ₄	1,15g	6,5mM	
EDTA	1,25g	3,4mM	ad 1000ml <i>Aqua bidest.</i>

Für das Einstellen auf pH7,4 wurde NaOH verwendet. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert und erst danach 1,25g Trypsin 250 (Difco) zugegeben.

Blocklösung

H ₂ O ₂ 30% (v/v)	0,6ml	0,3% (v/v)	ad 60ml Methanol
---	-------	------------	------------------

Demaskierungslösung

Trinatriumzitat-Dihydrat	2,941g	10mM	ad 1000ml <i>Aqua bidest.</i>
--------------------------	--------	------	-------------------------------

10x TBS-Puffer, pH7,4

TRIS	121,1g	1M	
NaCl	87,6g	1,5M	ad 1000ml <i>Aqua bidest.</i>

Für das Einstellen auf pH7,4 wurde HCl verwendet. Vor Gebrauch wurde der Puffer 1:10 mit *Aqua bidest.* verdünnt und als 1x TBS-Puffer verwendet.

3 Methoden

3.1 Allgemeine zellbiologische Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden alle zellbiologischen Methoden unter einer sterilen Sicherheitswerkbank durchgeführt und ausschließlich sterile Plastikwaren oder Glasgefäße verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem CO₂-Inkubator (5% (v/v) CO₂) bei 37°C unter gesättigter Wasserdampfatmosphäre (95% (v/v) relativer Luftfeuchtigkeit), um den physiologischen pH-Wert der CO₂/Bicarbonat-gepufferten Zellkulturmedien aufrechtzuerhalten.

3.1.1 Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mikroskopisch mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Hierfür wurden die Zellen entweder mit Trypanblau oder Türks-Lösung angefärbt. Der Vitalfarbstoff Trypanblau wurde verwendet, um neben der Zellzahl auch die Vitalität der Zellen festzustellen. Da die Zellmembran toter Zellen für den Farbstoff permeabel ist und zu einer Blau-Färbung des Cytoplasmas führt, während die Zellmembran lebender Zellen ca. 5-10min impermeabel für diesen Farbstoff bleibt, ermöglicht dies eine Unterscheidung von lebenden und toten Zellen. Die Türks-Lösung wurde für die Zellzahlbestimmung aus der Milz verwendet. Der in der Lösung enthaltene Farbstoff Kristallviolett färbt spezifisch nur die Zellkerne mononukleärer Zellen (z.B. Lymphozyten) an, während die Erythrozyten durch die in der Lösung enthaltene Essigsäure hämolysiert werden. Eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen ist damit jedoch nicht möglich.

Material:

- Trypanblau
- Türks-Lösung
- Neubauer-Zählkammer

Durchführung:

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde ein geringes Volumen einer Zellsuspension in einem definierten Verhältnis mit dem jeweiligen Farbstoff verdünnt (Verdünnungsfaktor) und in die Neubauer-Zählkammer überführt. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops wurde anschließend die Zellzahl durch das Auszählen des mittleren oder der vier äußeren Großquadrate nach folgender Formel bestimmt:

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

N = Anzahl der gezählten Zellen

n = Anzahl der gezählten Großquadrate

V = Verdünnungsfaktor

10^4 = Kammerfaktor

3.1.2 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Für das Aufbewahren von Zelllinien und primären Zellkulturen wurde die Kryokonservierung bei -196°C in flüssigem Stickstoff angewandt, die eine Lagerung von Zellen über viele Jahre ohne signifikanten Vitalitätsverlust gewährleistet. Um eine Zellschädigung beim Einfrierprozess durch Eiskristallbildung zu vermeiden, wurde dem Einfriermedium DMSO (Dimethylsulfoxid) zugesetzt.

Material:

- sterile Einfrierröhrchen
- Einfriermedium: 90% (v/v) FCS + 10% (v/v) DMSO

Durchführung:

Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen in einer Konzentration von $1-5 \times 10^6$ Zellen/ml in 4°C kaltem Einfriermedium aufgenommen und jeweils 1ml in vorgekühlte Einfrierröhrchen überführt. Für ein langsames und zellschonendes Einfrieren wurden die aliquotierten Zellen in einer isolierenden Umhüllung (z.B. Zellstoff) langsam auf -70°C abgekühlt und nach 24h in flüssigen Stickstoff überführt.

Für die Rekultivierung wurden die Zellen bei 37°C im Wasserbad vorsichtig, ohne Schütteln aufgetaut, mit ca. 30ml Zellkulturmedium gewaschen (Zentrifugationsschritt: 423xg, 5min), in frischem Zellkulturmedium aufgenommen, in ein geeignetes Zellkulturgefäß überführt und bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

3.2 Tierexperimentelle Methoden

Alle tierexperimentellen Arbeiten erfolgten mit der Genehmigung der Bezirksregierung Rheinhessen-Pfalz (Aktenzeichen 23 177-07-04/051-62 und 177-07/G09-1-004) und wurden gemäß den Richtlinien der FELASA (*Federation European Laboratory Animal Science Association*) durchgeführt. Um Kontaminationen mit Keimen zu verhindern wurden alle tierexperimentellen Methoden mit sterilen Instrumenten unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt.

3.2.1 Anlage muriner embryonaler Fibroblasten (MEF)

Aufgrund ihrer Permissivität für mCMV wurden MEF für die *in vitro* Vermehrung von mCMV, sowie für die Virustiter-Bestimmung verwendet.

Material:

- steriles Sezierbesteck
- steriles Metallsieb
- steriler Erlenmayerkolben (300ml)
- sterile Glaskugeln (Durchmesser 1-2mm)
- sterile Petrischale (60x15mm)
- steriler Magnetstab
- Zentrifugenröhrchen (50ml)
- Zellkulturschale (150x25mm)
- Trypsin/EDTA-Puffer (pH6,4) (siehe 2.13.1)
- Trypsin/EDTA
- PBS
- Zellkulturmedium: MEM + 10% (v/v) FCS

Durchführung:

Die Anlage primärer Fibroblasten erfolgte nach dem in Podlech *et al.*, 2002 beschriebenen Protokoll. Hierfür wurden die Föten (BALB/c) an Tag 14-17 der Schwangerschaft steril entnommen und sofort auf Eis gekühlt. Nach Entfernung des Gehirns, der Augenanlagen und der inneren Organe wurde das verbleibende Gewebe mit einer Schere zerkleinert und mit Hilfe von Skalpell zu einer homogenen Zellmasse verarbeitet, die anschließend für den Verdau mit 15ml PBS und 15ml Trypsin/EDTA-Puffer (pH6,4) in einen sterilen Glaskolben mit Glasperlen und einem Magnetstab überführt wurde. Die Zellsuspension wurde unter Rühren für insgesamt 90min bei 37°C inkubiert, wobei nach jeweils 30min und 60min erneut 15ml PBS und 15ml Trypsin/EDTA-Puffer (pH6,4) hinzugefügt wurden. Der Inhalt des Erlenmayerkolbens wurde im Anschluss über ein steriles Metallsieb filtriert und mit Kulturmedium gespült, um den Verlust von Zellen zu minimieren. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt, bei 302xg für 10min zentrifugiert, in Kulturmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Für die anschließende Kultivierung wurden die Zellen auf $2-3 \times 10^7 / 25\text{ml}$ Kulturmedium eingestellt und auf Zellkulturschalen ausgesät. Von den adhären wachsenden Fibroblasten wurde am nächsten Tag das Medium abgenommen und diese vorsichtig einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Fibroblasten bis zum Erreichen der Konfluenz in frischem Medium ca. 2-3 Tage kultiviert (Passage 1), anschließend mit Trypsin/EDTA abgelöst, mit ca. 30ml Medium gewaschen (Zentrifugationsschritt: 423xg, 5min) und für die Kryokonservierung in Einfriermedium aufgenommen (siehe 3.1.2).

3.2.2 Infektion von Mäusen

Um vergleichbare Bedingungen bei der Infektion von Mäusen zu gewährleisten wurden alle Infektionen wie beschrieben mit 8 bis 12 Wochen alten, falls nicht anders vermerkt weiblichen Versuchstieren durchgeführt. In Versuchen mit nicht infizierten Kontrolltieren wurde steriles PBS für die Injektion verwendet.

Material:

- Einmalspritze (1ml, 2ml)
- Kanüle (0,40x12mm)
- PBS
- Infrarotlampe
- Infektionskammer

Durchführung:

Intraplantare Infektion

Als Infektionsroute im Mausmodell wurde in der vorliegenden Arbeit die intraplantare Injektion einer Virus/PBS-Verdünnung in die rechte Hinterpfote gewählt. Hierfür wurde pro Maus eine Konzentration von 2×10^5 PFU (*Plaque Forming Units*) mCMV in 50 μ l PBS angesetzt und mittels einer 1ml-Spritze und einer Kanüle mit dem Durchmesser 0,40x12mm jeweils 50 μ l subkutan in die Unterseite der Pfote injiziert. Da erfahrungsgemäß nach intraplantarer Infektion ein Tropfen der Infektionslösung (ca. 50%) wieder aus dem Gewebe austritt, wurde mit einer tatsächlichen Infektionsdosis von 1×10^5 PFU im Experiment gerechnet.

Challenge-Infektion

Die *Challenge*-Infektion, auch häufig als Belastungsinfektion bezeichnet, wurde in der vorliegenden Arbeit nach vorhergehender, intraplantarer Primärinfektion intravenös (i.v.) verabreicht, um das protektive Potential akut *geprimter* CD8 T-Zellen im immunkompetenten Tier untersuchen zu können. Für die *Challenge*-Infektion wurde pro Maus eine Konzentration von 1×10^6 PFU mCMV in 500 μ l PBS angesetzt und mittels einer 2ml-Spritze und einer Kanüle mit dem Durchmesser 0,40x12mm jeweils 500 μ l Virus/PBS-Verdünnung in die Schwanzvene (*Vena cava caudalis*; hintere Hohlvene) der Maus injiziert. Um den Blutkreislauf anzuregen und die Venen zu erweitern, wurden die Mäuse vorher mit einer Infrarot-Wärmelampe für ca. 5-10min bestrahlt.

Achtung:

In den über Saccharose-Gradienten gereinigten mCMV-Stocks befindet sich eine nicht unerhebliche Verunreinigung mit Saccharose. Wird bei einer i.v.-Infektion für das Inokulum das Volumen von 5 μ l Virussuspension pro 500 μ l PBS überschritten, wirkt die Saccharose toxisch auf die Versuchstiere.

3.2.3 Immunsuppression von Mäusen

Für die Untersuchung der mCMV-Replikation und ihrer Pathogenese in Abwesenheit der Immunkontrolle des Wirtes wurden die Mäuse vor der Infektion einer hämatoablativen Behandlung unterzogen.

Kleintierbestrahlungsanlage (OB58-BA):

- Strahler Nr. 086-90 und 090-90, Typ CDCK 4905 (*special form*, Iso Klassifikation E65546), Nuklid Cs-137, Aktivität 2 Quellen á 60 TBq vom 07.12.1990

Durchführung:

In der vorliegenden Arbeit wurden BALB/c-Mäuse in einer Ganzkörper-Kleintierbestrahlungsanlage einer subletalen radioaktiven Strahlung mit der Dosis 6,5Gy ausgesetzt. Die der gewählten Dosis entsprechende Bestrahlungszeit wurde monatlich gemäß der Halbwertszeit von [¹³⁷Cs] ($T_{1/2} = 30a$) und der Aktivität zum Zeitpunkt T_0 ($A_0 = 0,708Gy/min$) neu berechnet. Die γ -Strahlung von [¹³⁷Cs] führt durch die Auslöschung der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen zu einer Aplasie des Knochenmarks (Mutter *et al.*, 1998).

3.2.4 *In vivo* Depletion von CD8 T-Zellen und NK-Zellen

Die Immunkontrolle der mCMV-Infektion basiert auf der Existenz, sowie der Interaktion verschiedener Lymphozytenpopulationen. Eine gängige Methode den Einfluss von CD8 T-Zellen und NK-Zellen auf den Verlauf der mCMV-Infektion zu analysieren ist die selektive *in vivo* Depletion mit Hilfe von Antikörpern, die gegen Oberflächenantigene der jeweiligen Zellpopulationen gerichtet sind. Die spezifischen Antikörper bilden *in vivo* Antigen-Antikörper-Komplexe und werden durch die F_c -vermittelte Antikörper-abhängige Zytotoxizität (ADCC) und/oder komplementabhängige Zytotoxizität (CDC) eliminiert werden. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, gezielt eine definierte Lymphozytenpopulation zu einem definierten Zeitpunkt depletieren zu können.

Material:

- Einmalspritze (2ml)
- Kanüle (0,45x12mm)
- Anti-CD8 Mab (Stockkonzentration: 8mg/ml)
- Anti-Asialo GM1 Antiserum
- *Aqua bidest.*
- PBS

Durchführung:

In dieser Arbeit wurden CD8 T-Zellen durch Gabe eines anti-CD8 Mab oder NK-Zellen durch ein anti-Asialo GM1 Antiserum, das gegen ein Glykosphingolipid (Gangliotetraosylceramid) auf der Oberfläche von NK-Zellen (Kasai *et al.*, 1982) gerichtet ist, *in vivo* depletiert. Hierfür

wurden 125µl (1mg) anti-CD8 Mab oder 25µl anti-Asialo GM1 Antiserum in einem Volumen von 500µl PBS in die Schwanzvene der Maus injiziert. Die *in vivo* Depletion erfolgte immer 24h vor der Infektion, um eine vollständige Ablation von NK- oder CD8 T-Zellen gewährleisten zu können. Die Effizienz der Depletion wurde zytofluorometrisch kontrolliert.

Anmerkung:

Das anti-Asialo GM1 Antiserum ist nach Angaben des Herstellers rekonstituiert nur etwa 2-3 Monate bei 4°C haltbar. Der anti-CD8 Mab wurde in 500µl Einheiten aliquotiert und bei -80°C gelagert, um ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen zu verhindern.

Um die *in vivo* Depletion von NK- oder CD8 T-Zellen über einen längeren Zeitraum aufrecht zu erhalten, muss der jeweilige Depletionsantikörper alle 3-4 Tage erneut appliziert werden.

Achtung:

Für eine Depletion von NK-Zellen nach mCMV-Infektion ist das anti-Asialo GM1 Antiserum nicht geeignet, da das entsprechende Antigen ebenfalls auf aktivierten Virus-spezifischen CD8 und CD4 T-Zellen exprimiert wird, die dann gleichfalls depletiert werden würden (Slifka *et al.*, 2000).

3.2.5 *Ex vivo* Isolierung von Lymphozyten aus unterschiedlichen Organen

In der vorliegenden Arbeit wurden CD8 T-Zellen *ex vivo* entweder aus dem poplitealen Lymphknoten, der Milz oder aus der Lunge isoliert und ihre Effektorfunktion *in vitro* im ELISpot-Assay oder in der zytofluorometrischen Analyse oder *in vivo* im adoptiven Transfer analysiert.

Material:

- steriles Sezierbesteck
- steriles Metallsieb
- sterile Petrischale (60x15mm)
- Einmalspritze (2ml)
- Zellsieb (Porengröße: 100µm; 40µm)
- Zentrifugenröhrchen (14ml, 50ml)
- Zellkulturmedium: RPMI + 5% (v/v) FCS
- MACS-Puffer (4°C) (siehe 2.13.1)
- PBS/Heparin-Lösung (siehe 2.13.1)
- Ficoll (LSM 1077, *Lymphocyte Separation Medium*)
- Kollagenase A (Stock: 0,239 U/mg)
- DNase I (Stock: 3mg/ml)
- Erlenmeyerkolben (100ml)
- Pasteurpipette

Durchführung:

Nach zervikaler Dislokation wurden die entsprechenden Organe steril entnommen und bis zur Aufarbeitung in RPMI + 5% FCS bei 4°C gelagert. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 552xg für 5min durchgeführt, um eine maximale Ausbeute mit möglichst geringem Vitalitätsverlust zu gewährleisten.

Poplitealer Lymphknoten

Die Lymphknoten intraplantar infizierter, immunkompetenter Mäuse wurden zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb der ersten Woche nach Infektion aus der Kniekehle entnommen und mit Hilfe des Stempels einer Einmalspritze durch ein steriles Metallsieb in eine Petrischale gedrückt. Durch Nachspülen mit Medium und mehrmaliges auf und ab pipettieren wurde eine homogene Zellsuspension gewonnen, die danach über ein Zellsieb (40µm) in ein Zentrifugenröhrchen filtriert wurde, um verbleibende Gewebereste zu entfernen. Anschließend wurde die Einzelzellsuspension einmal mit ca. 30ml Medium gewaschen und entweder in Medium oder im Falle einer immunomagnetischen Zellseparation in MACS-Puffer aufgenommen. Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Erwartete Zellzahl nach intraplantarer Infektion: ca. $1-2 \times 10^7$ Zellen pro LK

Achtung:

Bei der Isolierung von Zellen aus dem Lymphknoten ist es wichtig die verwendeten Schalen und Zellsiebe sorgfältig mit Medium nachzuspülen, um den Verlust von Zellen möglichst gering zu halten, da die Zellausbeute im Lymphknoten das weitere experimentelle Vorgehen limitiert.

Milz

Für die *ex vivo* Isolierung von CD8 T-Zellen aus der Milz wurden die Milzen ebenfalls mittels Stempel einer Einmalspritze durch ein Metallsieb in eine Petrischale gedrückt, mit Medium nachgespült und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren die Zellen vereinzelt. Anschließend wurde die homogene Zellsuspension zuerst über ein Zellsieb (100µm) in ein Zentrifugenröhrchen filtriert und mit ca. 30ml Medium gewaschen (Zentrifugationsschritt: 552xg, 5min). Danach wurde das Pellet in Medium aufgenommen, nochmals über ein Zellsieb (40µm) filtriert, und mit ca. 30ml Medium gewaschen. Danach wurden die Zellen entweder in Medium oder im Falle einer immunomagnetischen Zellseparation in MACS-Puffer aufgenommen. Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Erwartete Zellzahl nach intraplantarer Infektion: ca. $1-2 \times 10^8$ Zellen pro Milz

Anmerkung:

Für die Ermittlung der Zellzahl wurde Türks-Lösung verwendet, um eine exakte Zählung von Lymphozyten zu gewährleisten.

Lunge

Für die *ex vivo* Isolierung von CD8 T-Zellen aus der Lunge wurde zunächst eine Lungenperfusion durchgeführt, um intravasale Blutzellen zu entfernen. Hierfür wurden die Mäuse letal mit CO₂ anästhesiert, das Herz am rechten Ventrikel punktiert und die Lunge mit 5-10ml PBS/Heparin-Lösung gespült. Danach wurde die Lunge entnommen und in ein mit Medium gefülltes Zentrifugenröhrchen (50ml) überführt. Anschließend wurde die Lunge in eine Petrischale gegeben, die hilaren Lymphknoten, Trachea sowie Bronchien entfernt und das Gewebe mit einer Schere zerkleinert. Das Lungengewebe wurde in einen Erlenmeyerkolben (max. 5 Lungen pro Kolben) mit 2 Magnetrührstäbchen überführt und anschließend in 15ml Medium, welchem 300µl DNase I (Endkonzentration: 50µg/ml) und 1ml Kollagenase A (Endkonzentration: 1,6mg/ml) zugesetzt wurden, für eine Stunde bei 37°C enzymatisch verdaut. Die Suspension wurde anschließend über ein Metallsieb gegeben und mit dem Stempel einer 2ml-Einmalspritze zerrieben, um Gewebereste zu entfernen. Danach wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen (50ml) überführt und für 7min bei 552xg zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden Pellet und Überstand voneinander getrennt, der Überstand nochmal zentrifugiert und beide Pellets in einem Volumen von 16ml Medium aufgenommen und über ein Zellsieb (100µm) filtriert. Anschließend wurde jeweils 4ml Ficoll in ein Zentrifugenröhrchen (15ml) vorgelegt, mit je 8ml Zellsuspension vorsichtig überschichtet und für 30min bei 760xg ohne Bremese zentrifugiert (Ficoll-Dichte 1,077 g/ml). Mittels Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation konzentrierten sich die Lymphozyten in einer Bande an der Grenze zwischen Ficoll und Medium. Diese wurde mit einer Pasteurpipette abgezogen, in 20ml frisches Medium überführt und für 4min bei 423xg zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in Medium oder im Falle einer immunomagnetischen Zellseparation in MACS-Puffer aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

Erwartete Zellzahl nach intraplantarer Infektion: ca. $5-8 \times 10^6$ Zellen pro Lunge

3.2.6 Immunomagnetische Separation von CD8 T-Zellen

Für die selektive Anreicherung von Lymphozyten-Subpopulationen aus einem Gesamtpool einer Organzellsuspension wurde die MACS-Separation (*Magnetic Activated Cell Sorting*) verwendet. Mit Hilfe von paramagnetischen MicroBeads, an deren Oberfläche spezifische, monoklonale Antikörper gebunden sind, können CD8 T-Zellen immunomagnetisch über eine Separationssäule isoliert werden (Miltenyi *et al.*, 1990). Um eine Reinheit von >95% zu

erreichen wurden die CD8 T-Zellen über zwei hintereinander geschaltete Säulen positiv selektioniert.

Material:

- manuelles MACS-System
- Separationssäulen (MS *Columns*, LS *Columns*)
- CD8a (Ly-2) *MicroBeads*
- MACS-Puffer (4°C) (siehe 2.13.1)
- Zentrifugenröhrchen (14ml, 50ml)
- Zellkulturmedium: MEM α + 7,5% (v/v) FCS

Durchführung:

Für die MACS-Separation wurden die Zellen aus Lymphknoten, Milz oder Lunge wie unter 3.2.6 beschrieben isoliert, in MACS-Puffer aufgenommen und eine definierte Menge der Gesamtzellsuspension mit anti-Maus CD8a (Ly-2) *MicroBeads* nach Protokoll des Herstellers markiert. Die Zellen wurden in einem Volumen von 90 μ l MACS-Puffer pro 10^7 Zellen mit 10 μ l *MicroBeads* pro 10^7 Zellen für 15min bei 4°C unter kontinuierlicher Bewegung inkubiert. Danach wurden die markierten Zellen in 10-fachem Volumen MACS-Puffer gewaschen (Zentrifugationsschritt: 300xg, 10min), um die ungebundenen *MicroBeads* zu entfernen und anschließend das Pellet in einem Volumen von 0,5ml pro 10^8 Zellen resuspendiert.

Anmerkung:

Um eine vergleichbar hohe Reinheit an CD8 T-Zellen aus der Lunge zu erhalten, wie nach Separation von Lymphozyten aus LK oder Milz, wurde für das Markieren der Zellsuspension die doppelte Menge an *MicroBeads* (20 μ l pro 10^7 Zellen) eingesetzt.

Achtung:

Um eine Internalisierung der *MicroBeads* zu verhindern, müssen alle Separationsschritte mit kaltem (4°C) MACS-Puffer durchgeführt werden.

Poplitealer Lymphknoten

Die CD8 T-Zellen aus dem Lymphknoten wurden nach Protokoll des Herstellers manuell über MS-Separationssäulen immunomagnetisch angereichert. Nach Äquilibration der MS-Säulen mit 0,5ml MACS-Puffer wurde die Zellsuspension auf die Säule geladen und dreimal mit 0,5ml MACS-Puffer gewaschen. Für die Elution der positiven Zellfraktion wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die Zellen mit 1ml MACS-Puffer mit Hilfe des Stempels aus der Säule gespült. Das Eluat wurde nochmals über eine zweite Säule positiv selektioniert, um die Reinheit zu steigern.

Anmerkung:

Die Kapazität der MS-Säule liegt bei 1×10^7 markierten Zellen in maximal 2×10^8 Gesamtzellen und darf nicht überschritten werden.

Milz

Die Anreicherung der CD8 T-Zellen aus der Milz erfolgte manuell über LS-Separationssäulen nach Protokoll des Herstellers. Nach Äquilibration der LS-Säulen mit 3ml MACS-Puffer wurde die Zellsuspension auf die Säule geladen und dreimal mit 3ml MACS-Puffer gewaschen. Für die Elution der positiven Zellfraktion wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die Zellen mit 5ml MACS-Puffer mit Hilfe des Stempels aus der Säule gespült. Das Eluat wurde nochmals über eine zweite Säule positiv selektioniert, um die Reinheit zu steigern.

Anmerkung:

Die Kapazität der LS-Säule liegt bei 1×10^8 markierten Zellen in maximal 2×10^9 Gesamtzellen und darf nicht überschritten werden.

Lunge

Die CD8 T-Zellen aus der Lunge wurden manuell über MS-Separationssäulen nach Protokoll des Herstellers angereichert (siehe LK).

Für die weitere Verwendung wurden die CD8-positiven Zellen anschließend mit ca. 5ml Medium gewaschen (Zentrifugationsschritt: 552xg, 5min) und in 1ml Medium aufgenommen. Nach Ermittlung der Zellzahl konnten die CD8 T-Zellen im Experiment eingesetzt werden. Zur Überprüfung der Reinheit der CD8 T-Zellen wurden 1×10^6 separierte Zellen zytofluorometrisch analysiert.

Erwartete Zellausbeute nach immunomagnetischer Separation:

Lymphknoten: 5-10% CD8-positive Zellen

Milz: 3-6% CD8-positive Zellen

Lunge: 5-8% CD8 positive Zellen

3.2.7 Adoptiver Transfer von CD8 T-Zellen

Der adoptive Transfer wurde in der vorliegenden Arbeit für die Untersuchung des protektiven Potentials virusspezifischer CD8 T-Zellen eingesetzt. Um zu überprüfen, ob diese T-Zellen in der Lage sind immunsupprimierte Mäuse vor einer Virusinfektion zu schützen, wurden *ex vivo* isolierte CD8 T-Zellen aus den Milzen akut infizierter Donoren in bestrahlte und infizierte Rezipienten adoptiv transferiert und die Organe nach 10-11 Tagen für weitere Analysen entnommen. Als Donoren und Rezipienten dienten BALB/c-Mäuse gleichen Alters.

Material:

- Einmalspritze (2ml)
- Kanüle (0,45x12mm)
- PBS (steril)

Durchführung:

Der adoptive CD8 T-Zell-Transfer wurde analog dem in Lemmermann *et al.*, 2010 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die *ex vivo* Isolierung und immunomagnetische Separation von CD8 T-Zellen erfolgte wie unter 3.2.5 und 3.2.6 beschrieben.

Für den Transfer wurden die CD8-positiven Zellen nach der immunomagnetischen Separation dreimal mit ca. 20ml sterilem PBS gewaschen (Zentrifugationsschritt: 552xg, 5min), um eine isotonische Zellsuspension für die i.v. Applikation zu erhalten. Nach Ermittlung der Zellzahl wurden die CD8 T-Zellen auf die jeweilige zu transferierende Zellzahl in einem Volumen von 500µl PBS pro Maus eingestellt und bei 4°C gelagert. Nach Immunsuppression der Rezipienten durch Bestrahlung (siehe 3.2.3), wurden die isolierten CD8 T-Zellen in die Schwanzvene der Mäuse appliziert.

Anmerkung:

Die immunomagnetische Separation von CD8 T-Zellen erfolgte für den adoptiven Transfer mit sterilem MACS-Puffer unter einer Sicherheitswerkbank, um eine kontaminationsfreie CD8 T-Zellpopulation für den *in vivo* Transfer zu erhalten.

In der vorliegenden Arbeit wurden CD8 T-Zellen entweder präventiv vor der Infektion oder therapeutisch nach Infektion zu einem definierten Zeitpunkt adoptiv transferiert. Als Kontrolltiere wurden bestrahlte und infizierte Rezipienten mitgeführt, die anstelle von CD8 T-Zellen nur steriles PBS injiziert bekamen. Diese Versuchstiergruppe diente neben der Positivkontrolle für die Viruslast auch als Indikator für den zeitlichen Abbruch des Versuches; erfahrungsgemäß sterben die Mäuse ab Tag 10-11 nach Infektion. Wenn nicht anders vermerkt wurden Milz, Lunge und Speicheldrüse für die Virustiterbestimmung verwendet, wohingegen die Leber der Quantifizierung infizierter Zellen mittels IE1-spezifischer Immunhistochemie (siehe 3.6.4) diente.

3.3 Virologische Methoden

3.3.1 Generierung von mCMV-Stocks

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich mCMV-Stocks aus infizierten Zellkulturen (MEF), die über Saccharose-Gradienten gereinigt wurden, für die Infektion verwendet.

Material:

- MEF (Passage 2)
- Zellkulturmedium: MEM + 10% (v/v) FCS
- Zellkulturschalen (150x25mm)
- Zellschaber
- sterile Zentrifugenbecher (500ml, 250ml)
- sterile Polyallomer Ultrazentrifugenröhrchen (QTY25, 36ml)
- Hand-Homogenisator
- Virusstandard-Puffer (VSP) (siehe 2.13.2)
- VSP + 15% (w/v) Saccharose (siehe 2.13.2)
- Medium: MEM + 10% (v/v) FCS

Durchführung:

Für die Generierung hochreiner mCMV-Stocks wurden ca. 50 Zellkulturschalen (150x25mm) mit MEF der Passage 3 bis zu einer Konfluenz von 80-90% kultiviert. Die Infektion erfolgte anschließend mit jeweils $0,5-1 \times 10^5$ PFU mCMV in 5ml Medium pro Zellkulturschale bei Raumtemperatur für 30min. Nach Zugabe von 20ml Medium wurden die infizierten MEF für 4-5 Tage bei 37°C inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt ist der infektionsbedingte zytopathische Effekt (Abkugelung und Ablösen der Zellen) bereits sehr stark ausgeprägt und es befinden sich ca. 80% der Zellen im Überstand.

Die Aufreinigung der Virionen erfolgte nach dem in Lemmermann *et al.*, 2010 beschriebenen Protokoll. Nach dem Ablösen der restlichen adhärennten Zellen mit einem sterilen Zellschaber wurden diese zusammen mit dem Überstand in sterile Zentrifugenbecher (500ml) überführt und bei 6400xg für 20min zentrifugiert (Sorvall RC 5C Plus; Rotor SLA-3000). Die Überstände mit freien Virionen wurden anschließend in sterilen Zentrifugenbechern (250ml) bei 4°C gelagert, während das Zellpellet einer Homogenisation und Zentrifugation bei 3600xg für 20min (Sorvall RC 5C Plus; Rotor SS34) ausgesetzt wurde. Nach Vereinigung beider Überstände erfolgte das Pelletieren der Virionen durch eine dreistündige Zentrifugation bei 26.000xg (Sorvall RC 5C Plus, Rotor SLA-1500). Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet über Nacht bei 4°C durch das zurücklaufende Medium angelöst. Das Pellet wurde am nächsten Morgen erneut homogenisiert, im Verhältnis 1:10 vorsichtig auf ein 15% (w/v) Saccharose/VSP-Kissen geladen und für eine Stunde bei 52.800xg pelletiert (Ultrazentrifuge Sorvall Combi Plus, Rotor AH-629). Nach einer

vierstündigen Inkubation der Pellets in ca. 0,5ml Saccharose/VSP-Puffer auf Eis folgte ein letzter Homogenisationsschritt in einem Volumen von ca. 3ml. Die gereinigte Virusstock-Lösung wurde anschließend aliquotiert (20µl, 50µl, 100µl) und bei -70°C gelagert.

Erwartete Ausbeute:

Bei ca. 50 Zellkulturschalen mCMV-WT infizierter MEF und einem Volumen des gereinigten Virusstocks von ca. 3ml kann mit einem Virustiter von 5×10^8 bis 2×10^9 PFU gerechnet werden. Die durch BAC-Mutagenese generierten Virusrekombinanten erreichen für gewöhnlich einen niedrigeren Virustiter.

Anmerkung:

Die gereinigte Virusstock-Lösung wurde nicht öfters als drei Mal aufgetaut und wieder eingefroren, um einen gleichbleibenden Virustiter zu gewährleisten. Für Tierversuche wurden ausschließlich noch nicht aufgetaute Aliquots verwendet, um Verunreinigungen und Titterschwankungen auszuschließen. Virusstock-Verdünnungen können ca. einen Tag bei 4°C gelagert werden.

3.3.2 Virustiterbestimmung mittels Plaque-Assay

Der Plaque-Assay ist nach wie vor die Standardmethode für den Nachweis der Infektiosität von infiziertem Material. Der Virustiter von Virusstocks oder Homogenaten infizierter Organe wird in PFU (*plaque forming unit*) angegeben. Nach Definition ist ein PFU die Menge an Virus, die benötigt wird, um auf permissiven Zellen einen einzelnen Plaque zu erzeugen. Dabei benötigt eine Plaquebildung mindestens ein infektiöses Viruspartikel, das nach Infektion der permissiven Zelle Tochter-Virionen produziert, die anschließend freigesetzt werden. Diese infizieren benachbarte Zellen und es entsteht nach und nach ein im Mikroskop sichtbares Loch (Plaque).

Material:

- steriles Sezierbesteck
- sterile Einfrierröhrchen
- Zellkulturmedium: MEM + 10% (v/v) FCS
- Amphotericin B (Endkonzentration: 1,4µg/ml)
- MEF (Passage 2)
- 48-Well Zellkulturplatten
- Methylzellulose-Medium (siehe 2.5.1)
- steriles Metallsieb
- sterile Petrischale (60x15mm)
- Einmalspritze (2ml)
- Einfrierröhrchen (1,8ml)

Durchführung:

Die Bestimmung der Virustiter mittels Plaque-Assay erfolgte nach dem in Lemmermann *et al.*, 2010 beschriebenen Protokoll. Hierfür wurden konfluente MEF der Passage 2 auf 48-Well Zellkulturplatten ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz mit 100µl pro Well einer Verdünnungsreihe (\log_{10}) der titrierten Virus- oder Organhomogenat-Suspension infiziert. Um Sekundärinfektionen durch freigesetzte Viruspartikel über Diffusion zu verhindern wurde der Zellrasen nach der Infektion jedes Wells mit 500µl Methylzellulose-Medium überschichtet.

Virustiterbestimmung von gereinigten mCMV-Stocks

Für die Virustiterbestimmung eines mCMV-Stocks wurden ca. 6-8 Verdünnungsstufen (\log_{10}) des Virusstocks in Triplikaten für 1h bei 37°C auf konfluenten MEF inkubiert, um eine effiziente Adsorption und Penetration der Virionen zu gewährleisten. Nach der Infektion wurden die Zellen mit Methylzellulose-Medium überschichtet und für 4-5 Tage bei 37°C inkubiert. Anschließend konnten die entstandenen Plaques mit Hilfe eines Invertmikroskops ausgezählt und der Virustiter nach folgender Formel berechnet werden.

$$\text{Virustiter (PFU/ml)} = \text{Mittelwert der gezählten Plaques} \times 10 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Virustiterbestimmung aus Organhomogenaten

Nach zervikaler Dislokation wurden die zu untersuchenden Organe steril entnommen, in Einfrierröhrchen mit Amphotericin B-haltigem MEM + 10% FCS (1ml pro Röhrchen) überführt und bei -70°C tiefgefroren, um einen Aufschluss der Zellen im Organ zu gewährleisten. Die Organe wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und sofort wieder auf Eis gelagert. Anschließend wurde jedes Organ separat mit Hilfe des Stempels einer Einmalspritze gründlich durch ein steriles Metallsieb gedrückt. Anschließend wurde das Sieb mit 2ml Medium gespült und das Homogenat in ein neues Einfrierröhrchen überführt. Aus dem Homogenat wurde eine Verdünnungsreihe (\log_{10}) mit insgesamt 6 Verdünnungsstufen erstellt und von diesen je 100µl in Duplikaten auf konfluente MEF übertragen. Bei der Virustiterbestimmung aus Organhomogenaten wurde die zentrifugale Verstärkung der Infektiosität (CEI, *Centrifugal Enhancement of Infectivity*; Hudson *et al.*, 1976, Kurz *et al.*, 1997) angewandt. Hierfür wurden die 48-Well Platten für 30min bei 760xg zentrifugiert, um eine ca. 20-fach verstärkte Penetration der Viruspartikel und somit eine höhere Sensitivität des Assays zu erreichen. Nach dem Überschichten der infizierten MEF mit Methylzellulosemedium und einer viertägigen Inkubation bei 37°C wurden die Plaques ausgezählt und der Virustiter nach folgender Formel bestimmt werden.

$$\text{Virustiter (PFU/Organ)} = \text{Summe der gezählten Plaques} \times 10 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.4 Immunologische Methoden

3.4.1 IFN- γ ELISpot-Assay (*Enzyme-Linked Immunosorbent Spot*)

Mit Hilfe des ELISpot-Assays wurde in dieser Arbeit die IFN- γ Sekretion aktivierter CD8 T-Zellen detektiert. Der Einzelzell-Assay zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität aus, da nach Antigenstimulation jede IFN- γ sezernierende CD8 T-Zelle erfasst werden kann. Das Prinzip des ELISpot-Assays beruht auf dem klassischen Sandwich-ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), in dem das von der CD8 T-Zelle freigesetzte IFN- γ von einem an die PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran immobilisierten *Coating*-Antikörper gebunden wird und anschließend mit einem Biotin-gekoppelten Detektionsantikörper durch eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen werden kann. Im ELISpot-Assay entspricht eine IFN- γ sezernierende CD8-positive Effektorzelle genau einem Spot. Die Spotgröße korreliert mit der Menge an IFN- γ und ist damit auch ein Maß für die Intensität der CD8 T-Zellaktivierung (Taguchi *et al.*, 1990; Miyahira *et al.*, 1995).

Für die Detektion von Frequenzen oder Aviditäten virusspezifischer CD8 T-Zellen wurden mit synthetischen Peptiden beladene Stimulatorzellen als APC (*Antigen Presenting Cells*) in den Assay eingesetzt.

Material:

- ELISpot-Platte
- 35% (v/v) Ethanol
- *Coating*-Antikörper: Anti-Maus IFN- γ Mab (Endkonzentration: 5 μ g/ml)
- Blockmedium: MEM α + 10% (v/v) FCS
- Zellkulturmedium: MEM α + 7,5% (v/v) FCS
- Stimulatorzellen (APC): P815 (H-2^d), EL4 (H-2^b)
- synthetische mCMV-Peptide (siehe 2.8)
- ELISpot-Waschpuffer (siehe 2.13.3)
- Detektionsantikörper: Biotin-gekoppelter anti-Maus IFN- γ Mab
(Endkonzentration: 1 μ g/ml + 0,5% BSA)
- BSA (22,1%)
- Enzym: Streptavidin-ALP
- Substrat: BCIP/NBTplus

Durchführung:

Die hydrophobe PVDF-Membran der ELISpot-Platte wurde zunächst mit 35% (v/v) Ethanol (20 μ l/*Well*) für eine Minute bei RT inkubiert und danach dreimal mit PBS (200 μ l/*Well*) gewaschen. Anschließend wurde die aktivierte Membran mit dem *Coating*-Antikörper (55 μ l/*Well*) beschichtet und für 18h bei 4°C oder für 2h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte zweimal mit *Aqua bidest.* (200 μ l/*Well*) gewaschen und für das Blocken

unspezifischer Bindungen mit Blockmedium (150µl/Well) für mindestens 2h bei 37°C inkubiert.

Währenddessen wurden die als Effektoren dienenden CD8 T-Zellen aus dem drainierenden Lymphknoten und/oder der Milz wie unter 3.2.6 beschrieben isoliert und immunomagnetisch angereichert (siehe 3.2.7). Die Effektoren wurden anschließend in mindestens 3 Konzentrationsstufen im Bereich von 5×10^3 bis 1×10^5 Zellen pro Well je nach erwarteter Spotanzahl titriert und in einem Volumen von 100µl auf die ELISpot-Platte überführt. Die als APC dienenden Stimulatorzellen (P815: Haplotyp H-2^d; EL4: Haplotyp H-2^b) wurden einmal mit Medium gewaschen und auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Für die exogene Beladung der APC mit synthetischem Peptid wurden 90µl der Stimulatorzellen mit 10µl einer 10^{-6} M Peptid-Lösung (96-Well Rundbodenplatte) ca. 45-60min bei RT inkubiert. Zur Bestimmung der Avidität der Effektoren wurden die synthetischen Peptide auf der Peptidplatte in Verdünnungsstufen (\log_{10}) im Bereich von 10^{-6} M bis 10^{-13} titriert und für die exogene Beladung der APC eingesetzt. Von den Stimulatorzellen wurden anschließend pro Well 1×10^5 Zellen (50µl) auf die ELISpot-Platte mit den titrierten Effektoren überführt und für mindestens 18h bei 37°C erschütterungsfrei inkubiert. Im Anschluss wurden die Platten 10-mal mit Waschpuffer (200µl/Well) gewaschen und für 2h bei 37°C mit dem Detektionantikörper (55µl/Well) inkubiert. Nach erneutem 6-maligen Waschen der Platten mit Waschpuffer (200µl/Well) wurden diese für 45min bei RT mit 100µl einer 1:1000 Verdünnung (in PBS) des Streptavidin-ALP Enzyms inkubiert. Anschließend wurden die Platten zunächst dreimal mit Waschpuffer und danach dreimal mit PBS gewaschen bevor die Zugabe des Substrats erfolgte. Das auf RT gebrachte Substrat BCIP/NPTplus wurde filtriert (0,45µm) und in einem Volumen von 100µl pro Well auf die ELISpot-Platten überführt. Nach einer Inkubation von 20min bei RT werden die Spots als blaue Punkte auf der Membran sichtbar. Zum Abstoppen der Enzym-Substrat Reaktion wurde die Membran gründlich von oben und nach Abnahme des *Underdrains* auch von unten mit fließendem Wasser gespült, ausgeklopft und über Nacht im Dunkeln getrocknet. Die Ermittlung der Spotanzahl erfolgte mit Hilfe eines Stereo-Zoom-Mikroskops bei 10-facher Vergrößerung.

Achtung:

Beim Umgang mit hochdosierten Peptidkonzentrationen muss nach jedem Pipettierschritt die Spitze gewechselt werden, um eine Verschleppung von Peptid zu verhindern.

Frequenzanalyse des ELISpot-Assays

Die Auswertung der Frequenzen IFN-γ sezernierender CD8 T-Zellen erfolgte mit Hilfe der Software Mathematica 8.0.4 (Wolfram Research Europe Ltd., Long Hanborough Oxfordshire, UK), die eine Datenanalyse auf der Basis einer linearen Regression erlaubt. Während die Konzentrationsstufen der eingesetzten Effektoren auf der x-Achse und die jeweiligen, in Triplikaten ermittelten, Spotsfrequenzen auf der y-Achse aufgetragen wurden, konnte anhand

der mit Mathematica errechneten Regressionsgeraden die MPN (*Most Probable Number*) der Spotfrequenz ermittelt werden. Weiterhin wurde das 95% Konfidenzintervall der MPN angegeben, das den Bereich kennzeichnet, der die Spotfrequenz mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% beinhaltet.

3.4.2 Zytofluorometrische Analyse

Die zytofluorometrische Analyse erlaubt eine Analyse von Einzelzellen sowohl hinsichtlich ihrer morphologischen Eigenschaften als auch anhand der Expression von intra- und extrazellulären Proteinen. In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie Subpopulationen von Lymphozyten aus Organen von Versuchstieren phänotypisiert. Die zytofluorometrische Analyse einer Zellsuspension basiert auf einer – durch hydrodynamischer Fokussierung (Haynes *et al.*, 1988) erreichten – Vereinzeln der Zellen, die in einer Quarzküvette einen Laserstrahl passieren. Das entstehende Streulicht wird anschließend von einem Detektor ausgewertet. Während anhand der Vorwärtslichtstreuung (*Forward Scatter*, FSC) die relative Größe einer Zelle ermittelt werden kann, ist die relative Granularität einer Zelle anhand des Seitwärtsstreulichts (*Sideward Scatter*, SSC) detektierbar. Der Nachweis von Fluorochrom-markierten Zellen erfolgt über hochempfindliche Photozellen (*Photomultiplier*), die das emittierte Licht spezifischer Fluorochrome in einzelnen Fluoreszenzkanälen detektieren.

Material:

- Analyse-Puffer: PBS + 0,1% (v/v) FCS (siehe 2.13.3)
- Antikörper für die Durchflusszytometrie (siehe 2.6.2)
- Durchflusszytometerröhrchen
- Durchflusszytometer:
 - FACSsort (Becton Dickinson)
 - Cytomics FC500 (Beckman Coulter)

Durchführung:

Für die zytofluorometrische Analyse wurden jeweils $0,5 \cdot 10^6$ Zellen in Analyse-Puffer (100µl/Probe) aufgenommen und mit Fc-Block Antikörper ($1\mu\text{g}/1 \cdot 10^6$ Zellen) für 10min bei 4°C inkubiert, um unspezifische, Fc-Rezeptor-vermittelte Antikörperbindungen zu reduzieren. Anschließend konnten die Zellen direkt mit den für die Oberflächenfärbung spezifischen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert werden (15min bei 4°C im Dunkeln). Um nicht gebundene Antikörper aus der Probe zu entfernen, wurden die Zellen einmal mit FACS-Puffer (1ml/Probe) gewaschen und für 5min bei 300xg zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in FACS-Puffer (500µl/Probe) aufgenommen und die Probe im Durchflusszytometer

analysiert. Die Auswertung der Messdaten erfolgte entweder mit der CXP-Software (Beckman Coulter) oder mit CellQuest Pro 3.3 (Becton Dickinson).

Anmerkung:

Die Ermittlung der für die jeweilige Antikörperkombination optimalen Antikörperkonzentration ist essentiell, um Kreuzreaktivitäten oder unspezifische Bindungen zu minimieren.

3.4.3 mCMV-ORF-Library Screening

Die Analyse des mCMV-spezifischen CD8 T-Zellepitop-Repertoires erfolgte durch ein genomweites ORF-Library Screening, das von Michael W. Munks (Munks *et al.*, 2006b) in der Gruppe von Ann B. Hill (*Oregon Health & Science University, Molecular Microbiology & Immunology*, Portland, OR, USA) etabliert worden war. Jeder der 170 vorhergesagten ORFs (Rawlinson *et al.*, 1996), der ein oder mehrere mögliche CD8 T-Zellepitope beinhalteten kann, war dabei in ein Expressionsplasmid kloniert worden. Nach Transfektion von Fibroblasten exprimieren diese das Genprodukt des jeweiligen ORF, die entsprechenden antigenen Peptide werden prozessiert und über MHC-I auf der Zelloberfläche präsentiert. Dort können sie von entsprechenden mCMV-spezifischen CD8 T-Zellen erkannt werden. Der Nachweis der aktivierten CD8 T-Zellen erfolgte zytofluorometrisch durch intrazellulären IFN- γ Nachweis.

Material:

- Plasmidpräparationen: 0,5 μ g in 20 μ l PBS (96-Well PCR-Platte)
- BALB/SV40-Fibroblasten
- 96-Well Zellkultur Mikroplatte, F-Form
- 96-Well PS-Mikroplatte, U-Form
- Transfektionsreagenz: FuGene 6
- mCMV-Peptide: 10⁻⁵M in 20 μ l PBS (96-Well PS-Mikroplatte)
- Zellkulturmedien: DMEM + 10% (v/v) FCS
OPTIMEM ohne Zusätze
MEM α + 7,5% (v/v) FCS
- Erythrozyten-Lysepuffer
- Analyse-Puffer: PBS + 0,1% (v/v) FCS (siehe 2.13.3)
- Antikörper für die Durchflusszytometrie (siehe 2.6.2)
- *Cytofix/Cytoperm* Plus Kit mit Golgi Plug (Brefeldin A)
- Durchflusszytometerröhrchen
- Durchflusszytometer: FACSort (Becton Dickinson GmbH)
Cytomics FC500 (Beckman Coulter GmbH)

Durchführung:

Die Analyse des genomweiten CD8 T-Zellepitop-Repertoires wurde nach dem in Lemmermann *et al.*, 2010 beschriebenen 5-Tage Protokoll durchgeführt. Hierfür wurden pro *Well* einer 96-*Well* Zellkulturplatte 12.000 BALB/SV40-Fibroblasten (H-2^d) in 100µl DMEM ausgesät. Am nächsten Tag wurden diese in Duplikaten mit je 0,25µg des entsprechenden Plasmids unter Verwendung von FuGene 6 (FuGene 6:DNA 3:1 (v/w)) transfiziert und für 2 Tage bei 37°C inkubiert. Als Effektoren dienten Gesamtmilzzellen infizierter BALB/c-Mäuse, die wie unter 3.2.6 beschrieben isoliert und anschließend einer Erythrozytenlyse nach Protokoll des Herstellers unterzogen wurden. Die Zugabe von 1×10^6 Effektorzellen pro *Well* auf die transfizierten Fibroblasten erfolgte in einem Endvolumen von 200µl MEM α in Anwesenheit von Brefeldin A (Verdünnung 1:1000). Um einen effizienten Kontakt zwischen Effektoren und APCs zu gewährleisten, wurden die Platten für eine Minute bei 216xg zentrifugiert. Als Kontrolle wurden Milzzellen (2×10^6 Zellen/*Well*) in Anwesenheit synthetischer mCMV-Peptide (Endkonzentration: 10^{-6} M) mitgeführt. Anschließend wurden die Reaktionsansätze für mindestens 6h bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die jeweiligen Duplikate in einer 96-*Well* PS-Mikroplatte (U-Form) vereint und einmal mit Analyse-Puffer (150µl/*Well*) gewaschen (Zentrifugationsschritt: 261xg, 3min). Anschließend wurden die Zellen mit 50µl/*Well* eines PE-Cy5-konjugierten anti-Maus CD8-Antikörper (Verdünnung 1:200) für 20min bei 4°C inkubiert. Nach Wiederholung des Waschschrittes wurden die Zellen mit 75µl/*Well* Cytotfix/Cytoperm für 20min bei 4°C fixiert und permeabilisiert. Für die intrazelluläre Detektion wurden die permeabilisierten Zellen im Anschluss mit 50µl/*Well* des FITC-konjugierten anti-Maus IFN- γ -Antikörpers (Verdünnung 1:200) in *Perm/Wash*-Puffer für 20min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit *Perm/Wash*-Puffer (150µl/*Well*) gewaschen, in 100µl Analyse-Puffer aufgenommen und bis zur zytofluorometrischen Analyse am nächsten Tag bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Anmerkung:

Da eine parallele Epitop-Repertoire-Analyse aus mit unterschiedlichen Virusrekombinanten infizierten Mäusen logistisch nicht möglich war, wurden die unabhängig voneinander durchgeführten Analysen in aufeinanderfolgenden Wochen, mit Mäusen gleichen Alters und nach exakt gleichem Protokoll durchgeführt.

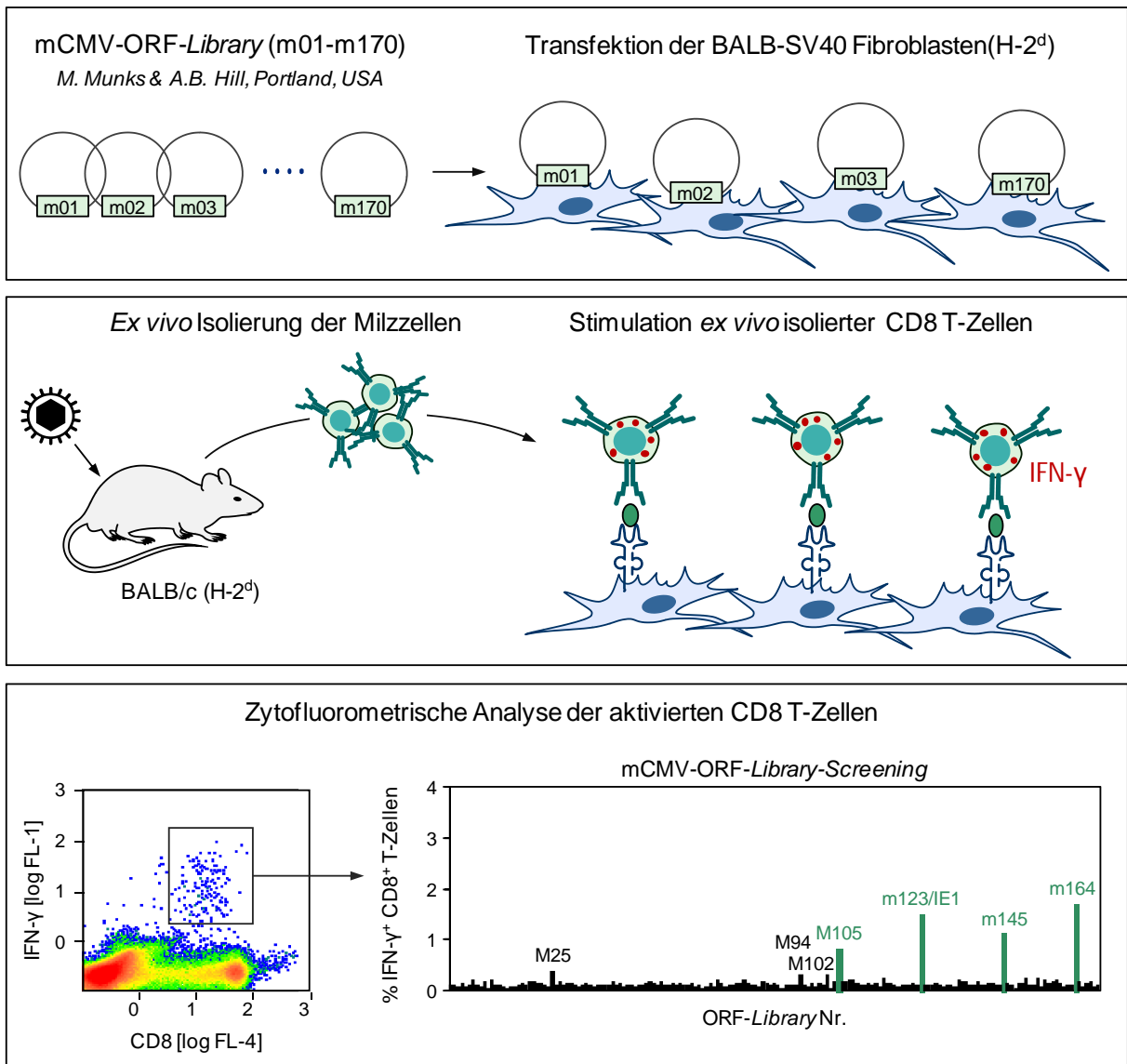


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des mCMV-ORF-Library Screenings.
(verändert nach Holtappels *et al.*, 2013)

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 RNA-Isolierung aus Gewebe

In der vorliegenden Arbeit wurde RNA entweder aus der Pfote (Infektionsort) oder aus dem poplitealen Lymphknoten, den Infektionsort-drainierenden Lymphknoten, isoliert.

Material:

- steriles Sezierbesteck
- sterile Einfrierröhrchen
- RNase-freie, sterile *safe-lock* Reaktionsgefäße (2ml)
- RNase-freie, sterile Nirosta-Stahlkugeln (Durchmesser: 2mm, 4mm)
- RNase-freie, sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Trichlormethan/Chloroform
- 70% (v/v) Ethanol
- RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN)
- RNase-Free DNase Set (QIAGEN)
- RNase-freies, sterils Wasser

Durchführung:

Nach zervikaler Dislokation wurde das jeweilige Gewebe in leere Einfrierröhrchen überführt, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Die RNA-Isolierung aus dem Gewebe infizierter Mäuse erfolgte nach dem in Lemmerman *et al.*, 2010 beschriebenen Protokoll in Anlehnung an das RNeasy-Protokoll von QIAGEN (*Purification of total RNA from animal tissues*) mit dem RNeasy Lipid Tissue Mini Kit. Zunächst wurde das Gewebe in Anwesenheit eines phenolhaltigen Lysepuffers (QIAzol Lysis Reagent) und zwei Nirosta-Stahlkugeln in einer Schwingmühle (*Mixer Mill* MM300) homogenisiert (zweimal 3min). Die Aufreinigung der RNA aus dem homogenisierten Gewebe erfolgte anschließend gemäß den Angaben des Herstellers (RNeasy® *Mini Handbook*; www.qiagen.com/hb/rneasymini). In der Phenol-Chloroform-Extraktion wird eine Zwei-Phasentrennung der Probe erreicht; während sich die Proteine in der unteren organischen Phase ansammeln, befindet sich die RNA in der oberen wässrigen Phase. Die DNA ist überwiegend an der Phasengrenze konzentriert und kann durch vorsichtiges Abnehmen der oberen, wässrigen Phase dem Ansatz fern gehalten werden. Nach Ethanolfällung wurde die RNA in Gegenwart eines Puffersystems unter Hochsalzbedingungen an eine Silica-Gel-Membran (RNeasy *Mini Spin* Säule) immobilisiert. Um mögliche DNA-Verunreinigungen der Probe auszuschließen, wurde die RNA noch zusätzlich einem DNase-Verdau (RNase-Free DNase Set) unterzogen. Die angereicherte RNA wurde anschließend in 50µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -70°C gelagert.

Anmerkung:

Bei der Isolierung von RNA ist besonders darauf zu achten alle Schritte unter Ribonuklease (RNase)-freien Bedingungen durchzuführen, da diese ubiquitär vorhandenen Enzyme den Abbau von RNA katalysieren.

3.5.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten RNA erfolgte im Spektralphotometer (Nanodrop ND-1000), der die Extinktion der Probe bei einer Wellenlänge von 260nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, misst. Da reine RNA bei einer optischen Dichte von 1 eine Konzentration von 40µg/ml besitzt, konnte die RNA-Konzentration der Proben anhand der Extinktionswerte ermittelt werden. Die zusätzlich ermittelte Extinktion bei 280nm und des daraus resultierenden Extinktionsquotienten (E_{260}/E_{280}) ermöglichte den Nachweis von Verunreinigung durch Protein oder Phenol. Das Verhältnis der Extinktion bei 260 und 280nm, die $\geq 2,0$ betragen sollte, kann als Maß für die Reinheit der RNA verwendet werden (Sambrook *and* Russel, 2001).

3.5.3 Absolute Quantifizierung viraler Transkripte mittels TaqMan™ RT-qPCR

In dieser Arbeit wurden virale IE1-Transkripte aus der Pfote (Infektionsort) oder dem drainierenden Lymphknoten (poplitealer Lymphknoten) quantifiziert. Die so bestimmte transkriptionelle Aktivität kann als direktes Maß für die virale Replikation dienen. Für die absolute Quantifizierung viraler Transkripte wurde eine TaqMan™ RT-qPCR verwendet. Bei dieser wird zunächst von einer reversen Transkriptase (RT), eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die RNA in cDNA (*complementary* DNA) übersetzt, die wiederum als Template für die quantitative *real time* PCR (qPCR) dient.

Die TaqMan™ PCR (Lee *et al.*, 1993; Applied Biosystems) ermöglicht dabei eine Sequenz-spezifische Detektion der Amplifikate mittels fluorogenen Sonden, sog. TaqMan-Sonden. Eine TaqMan-Sonde besteht aus einem Oligonukleotid mit einem 5' Reporter-Farbstoff (hier: FAM, 6-Carboxy-Fluorescein) und einem 3' *Quencher*-Farbstoff (hier: TAMRA, 6-Carboxy-tetramethyl-Rhodamin), der mit einem Phosphatrest (Phosphalink) blockiert ist. Während der *Annealing*-Phase der PCR hybridisiert die Sonde zusammen mit den Primern an den Matrizen-Strang und wird während der Elongations-Phase durch die 5'-3' Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase wieder abgebaut. Dies führt zur räumlichen Trennung von Reporter und *Quencher* und ermöglicht die Detektion der Reporter-Fluoreszenz. Der Anstieg des detektierten Fluoreszenz-Signals ist dabei proportional zur Kopienzahl der Amplifikate. Somit ist die TaqMan™-PCR in der Lage, die exponentielle Wachstumsphase der Reaktion, die sich durch eine exakte Verdopplung der Amplifikate pro Zyklus auszeichnet, in Echtzeit zu detektieren.

Design und Auswahl der in dieser Arbeit verwendeten sequenzspezifischen Oligonukleotide (siehe 2.12) erfolgte mit Hilfe der Software PrimerExpress 2.0 (Applied Biosystems).

Material:

- Reaktionsgefäße: PCR 8er Streifen, 0,2ml; PCR Deckelkette für 8er Streifen
- *OneStep* RT-PCR Kit (QIAGEN)
- RNase-freies, sterils Wasser
- *Real time* PCR Gerät: ABIPrism 7500 (Applied Biosystems)

Durchführung:

Alle Quantifizierungen wurden nach dem in Lemmermann *et al.*, 2010 beschriebenen Protokoll mit Hilfe des *OneStep* RT-PCR Kits durchgeführt. Der Enzym-Mix dieses Kits beinhaltet neben hoch effizienten, spezifischen reversen Transkriptasen (*Omniscrypt* und *Sensiscrypt*), mit einer Sensitivität von 1pg bis 2µg RNA, eine *HotStarTaq* DNA-Polymerase, die es ermöglicht die reverse Transkription und die DNA-Polymerisation zeitlich getrennt voneinander ablaufen zu lassen. Die DNA-Polymerase bleibt während der reversen Transkriptase-Reaktion komplett inaktiv und wird erst nach einem Temperatur-Schritt von 95°C aktiviert, der wiederum die Reverse Transkriptase inaktiviert. Für alle Ansätze wurde wenn nicht anders vermerkt 50ng RNA, die wie unter 3.5.1 beschrieben isoliert wurde, verwendet. Der RT-qPCR Ansatz wurde als *Master-Mix* räumlich getrennt von der *Template*-Zugabe unter einer PCR-Sicherheitswerkbank (*Template Tamer* Captair bio) angesetzt, um Kontaminationen zu vermeiden.

Ansatz RT-qPCR: Endvolumen 25µl

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
5x RT-PCR Puffer	5µl	1x
Forward-Primer (IE1_Taq_For1) (10µM)	1,9µl	0,76µM
Reverse-Primer (IE1_Taq_Rev1) (10µM)	1,9µl	0,76µM
<i>TaqMan</i> -Sonde (IE1_Taq_P1) (10µM)	0,66µl	0,264µM
MgCl ₂ (25mM)	1µl	1,0mM
dNTP Mix (10mM je dNTP)	1,67µl	0,67mM
*ROX (10µM)	0,33µl	0,132µM
RT-PCR Enzym Mix	1µl	
Template (RNA)	xµl	10-100ng/Reaktion
RNase-freies Wasser	ad 25µl	

*Der passive Referenzfarbstoff ROX (6-Carboxy-X-Rhodamin) dient zur Normalisierung der Reportersignale in den einzelnen Ansätzen.

Bedingungen für die RT-qPCR: Zyklusanzahl 50

PCR-Programm	Zeit	Temperatur
cDNA-Synthese	30min	50°C
Aktivierung der DNA-Polymerase	15min	95°C
Denaturierung	15sec	94°C
Annealing und Extension	60sec	60°C

Für die absolute Quantifizierung wurden in dieser Arbeit auf eine definierte Teilchenanzahl eingestellte, synthetische *in vitro* Transkripte (Kurz *et al.*, 1999) als externer Standard verwendet. Die Herstellung der synthetischen Transkripte erfolgte nach dem in Lemmermann *et al.*, 2010 beschriebenen Protokoll unter Zuhilfenahme des Megascript Kits (Applied Biosystems). Der Standard wurde von 10^7 bis 10^1 Teilchen pro Ansatz in \log_{10} -Schritten titriert und als Duplikate im Ansatz der RT-qPCR mitgeführt. Alle Transkript-Quantifizierungen wurden auf einem ABIPrism 7500 (Applied Biosystems) durchgeführt.

3.6 Histologische Methoden

3.6.1 Fixierung und Paraffinierung von Organen

Material:

- steriles Sezierbesteck
- Gewebereinbettkassetten
- gepufferte Formalinlösung 4% (v/v), pH 7,4 (siehe 2.13.4)
- Isopropanol
- Xylol
- Paraffin

Durchführung:

Nach zervikaler Dislokation wurden die Organe in Gewebereinbettkassetten überführt, sofort in eine gepufferte Formalinlösung gegeben und darin ca. 18h bei 20-22°C fixiert. Nach der Fixierung wurden die Organe für ca. 2h gewässert. Danach erfolgte die Dehydrierung der Organe in Isopropanol/Wasser in insgesamt 6 Stufen mit aufsteigender Alkohol-Konzentration (20%, 40%, 60%, 80%, 90%, 100% (v/v) Isopropanol) für jeweils 45min. Der letzte Schritt mit 100% Isopropanol wurde zweimal für 45min mit jeweils frischem Isopropanol wiederholt. Für die vollständige Entfernung des Alkohols wurden die Organe anschließend dreimal für 60min in jeweils frischem Xylol inkubiert und dieses durch ein 18-stündiges Paraffinbad bei 55°C durch Paraffin ersetzt. Das Einblocken der Organe in Paraffin

erfolgte am nächsten Tag bei 55-70°C. Die paraffinierten Organe sind bei 20-22°C nahezu unbegrenzt lagerbar.

3.6.2 Anfertigung von Gewebeschnitten

Material:

- Mikrotom
- Wasserbad
- Objektträger (Silan-beschichtet)

Durchführung:

Für das Anfertigen der Gewebeschnitte wurden die eingeblockten Organe zuvor auf -20°C abgekühlt und am Mikrotom Konsekutivschnitte mit einer Gewebedicke von 2µm hergestellt. Jeder Konsekutivschnitt wurde in einem Kaltwasserbad (ca. 20°C) aufgefangen, im Warmwasserbad (ca. 45°C) gestreckt und anschließend auf einen Silan-beschichteten Objektträger gezogen. Anschließend wurden die Schnitte zur Glättung und Anheftung für 18h bei 37°C getrocknet.

3.6.3 Deparaffinierung und Rehydratisierung von Gewebeschnitten

Material:

- Xylol
- Isopropanol
- *Aqua bidest.*

Durchführung:

Um eine immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten durchführen zu können, müssen diese zunächst wieder vom Paraffin befreit werden. Dies wurde durch eine dreimalige Inkubation (5min) mit Xylol erreicht. Für die Rehydrierung der Schnitte wurden diese in Isopropanol/Wasser in 4 Stufen mit absteigender Alkohol-Konzentration (100%, 90%, 70% und 50% (v/v) Isopropanol) für jeweils 3min inkubiert, wobei der erste Schritt zweimal in jeweils frischem 100% Isopropanol durchgeführt wurde. Anschließend wurden die Gewebeschnitte für ca. 5min in *Aqua bidest.* vollständig rehydriert und konnten für die Immunhistochemie eingesetzt werden.

3.6.4 Immunhistochemische Einfach- und Doppelfärbung (IE1 und/oder CD3)

Material:

- Trypsin-Lösung, pH7,4 (siehe 2.13.4)
- Blocklösung (siehe 2.13.4)
- Demaskierungslösung (siehe 2.13.4)
- TBS-Puffer, pH7,4 (siehe 2.13.4)
- Antikörper und Seren für die Immunhistochemie (siehe 2.6.3)
- Biotin *Blocking* System
- VECTASTAIN® ABC-Peroxidase-Kit
- Diaminobenzidin (DAB)
- Ammonium-Nickelsulfat-Hexahydrat
- Fuchsin Substrat-Chromogen System
- Mayer's Hämatoxylin
- PARAmount Einbettmedium

Durchführung:

In der vorliegenden Arbeit wurde die mCMV-Infektion in der Leber mit Hilfe einer immunhistochemischen Einfachfärbung des viralen *immediate-early* 1 (IE1) Proteins (pp76/89) und Auszählung der positiven Zellen quantifiziert. Dieses Protein wird nach Infektion in großer Menge produziert und bleibt während des gesamten viralen Replikationszyklus im Nukleus lokalisiert. Nach Inkubation mit einem anti-mCMV IE1-spezifischen Primärantikörper (Croma 101) und einem biotinylierten Ziege-anti-Maus IgG F(ab)₂-Fragment als Sekundärantikörper konnte das IE1-Protein über eine Biotin-Peroxidase-Reaktion (ABC-Peroxidase-Kit) hochsensitiv nachgewiesen werden (Podlech *et al.*, 2002). Als Substrat der Peroxidase-Reaktion diente dabei Diaminobenzidin (DAB), das zu einem braunen Niederschlag, oder in Verbindung mit Nickelsulfat zur Bildung eines schwarzen Präzipitats im Zellkern führte. Die IE1-spezifische Immunhistochemie wurde genau nach dem in Lemmermann *et al.*, 2010 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Bei der immunhistochemischen Doppelfärbung konnten simultan zwei Proteine in infizierten Gewebeschnitten nachgewiesen werden, das virale IE1 im Nukleus infizierter Zellen und das zelluläre CD3 auf der Oberfläche von T-Zellen. Hierfür wurde das mCMV-IE1 über einen sekundären, mit alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörper und Fuchsin als Substrat anhand einer Rotfärbung nachgewiesen. Zum Nachweis des CD3 wurde die ABC-Peroxidase-Technik eingesetzt, die zur Schwarzfärbung der Zellmembran der CD3 positiven Zellen führte. Die Durchführung erfolgte nach dem in Lemmermann *et al.*, 2010 beschriebenen Protokoll.

3.7 Statistische Analyse

Die statistische Signifikanz von experimentell ermittelten Unterschieden zwischen zwei unabhängigen Versuchsgruppen wurde mit dem ungleichen Varianz t-Test (Welch-Test) ermittelt. Da die Varianzen zweier unabhängiger Versuchsgruppen nur selten gleich sind, darf der Zweistichproben-t-Test (*Students t-test*) nicht angewandt werden. Geht man von log-normalverteilten Werten aus, kann der Welch-Test, ein abgewandelter t-Test, der eine Näherungslösung für die Unterschiede errechnet, für die Analyse herangezogen werden.

Die Berechnungen wurden mittels einer *online* zur Verfügung stehenden Software (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>; GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Dabei wurden P-Werte $<0,05$ als statistisch signifikant betrachtet.

Anmerkung:

Geht man von einem exponentiellen Ausgangsereignis aus, wie es z.B. bei der Bestimmung von Virustitern, Transkripten oder der Zahl infizierter Zellen der Fall ist, dann sind die Daten log-normalverteilt und demzufolge logarithmiert in den Test einzusetzen.

4 Ergebnisse

Alle Cytomegaloviren (CMV) entwickelten im Zuge der Koevolution von Virus und Wirt mannigfaltige Strategien der Immunkontrolle zu entgehen. So gewährleiten die von CMV kodierten immunmodulatorischen Funktionen eine effektive Infektion, Dissemination und Latenzetablierung im immunkompetenten Wirt. Neben der Modulation von angeborenen und adaptiven Immunkontrollmechanismen (Mocarski, 2002; Reddehase, 2002, Mocarski, 2004; McCormick und Mocarski, 2007; Miller-Kittrell und Sparer, 2009; Loewendorf und Benedict, 2010; Lemmermann *et al.*, 2011) interferiert das murine Cytomegalovirus (mCMV) ebenfalls mit zellintrinsic Mechanismen wie der Apoptose, die indirekt zur antiviralen Abwehr der mCMV-Infektion beitragen (Goldmacher, 2005; Andoniou, 2010; Brune, 2011; Handke *et al.*, 2012). In den vergangenen Jahren wurde neben der Apoptose eine alternative Form des programmierten Zelltods identifiziert, die als programmierte Nekrose oder Nekroptose bezeichnet wird (Chan *et al.*, 2003; Galluzzi *et al.*, 2012) und ebenfalls indirekt zur antiviralen Abwehr der mCMV-Infektion beitragen könnte.

Für den infizierten Wirt ist die Induktion des programmierten Zelltods ein wichtiger Mechanismus die virale Replikation zu limitieren. Im Gegensatz dazu ist es für langsam replizierende Viren wie CMV essentiell, den programmierten Zelltod zu unterdrücken, um einen vollständigen viralen Replikationszyklus gewährleisten zu können. Die Inhibition der Apoptose bzw. Nekroptose in mCMV-infizierten Zellen kann somit Auswirkungen auf die virale Replikation haben und dadurch die immunologische Kontrolle nach akuter Infektion sowie die Etablierung von Latenz beeinflussen.

Die in der vorliegenden Arbeit zu untersuchenden, von mCMV kodierten, viralen Zelltod-Inhibitoren sind das anti-apoptotische Protein M36, das mit dem Caspase-abhängigen Zelltod interferiert sowie das anti-nekroptotische Protein M45, das auf einen alternativen, Caspase-unabhängigen Signalweg des programmierten Zelltods einwirkt (Abb. 4.1).

Das Protein **M36**, auch *viral inhibitor of caspase activation* (vICA) genannt, verhindert durch Interaktion mit Pro-Caspase-8 die proteolytische Aktivierung von Caspase-8 und in der Folge den extrinsischen Signalweg der Apoptose (Skaletskaya *et al.*, 2001; McCormick *et al.*, 2003; Menard *et al.*, 2003; Cicin-Sain *et al.*, 2008; Ebermann *et al.*, 2012).

Das Protein **M45**, auch *viral inhibitor of receptor-interacting protein mediated signaling* (vIRS) genannt, fungiert als eine Art *Backup*-Mechanismus (Festjens *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2011; Kaczmarek *et al.*, 2013), indem es in Anwesenheit von vICA durch Interaktion mit dem *receptor-interacting protein* (RIP)1/3 den alternativen Signalweg der Nekroptose inhibiert (Mack *et al.*, 2008; Upton *et al.*, 2008; Lembo und Brune, 2009, Handke *et al.*, 2012).

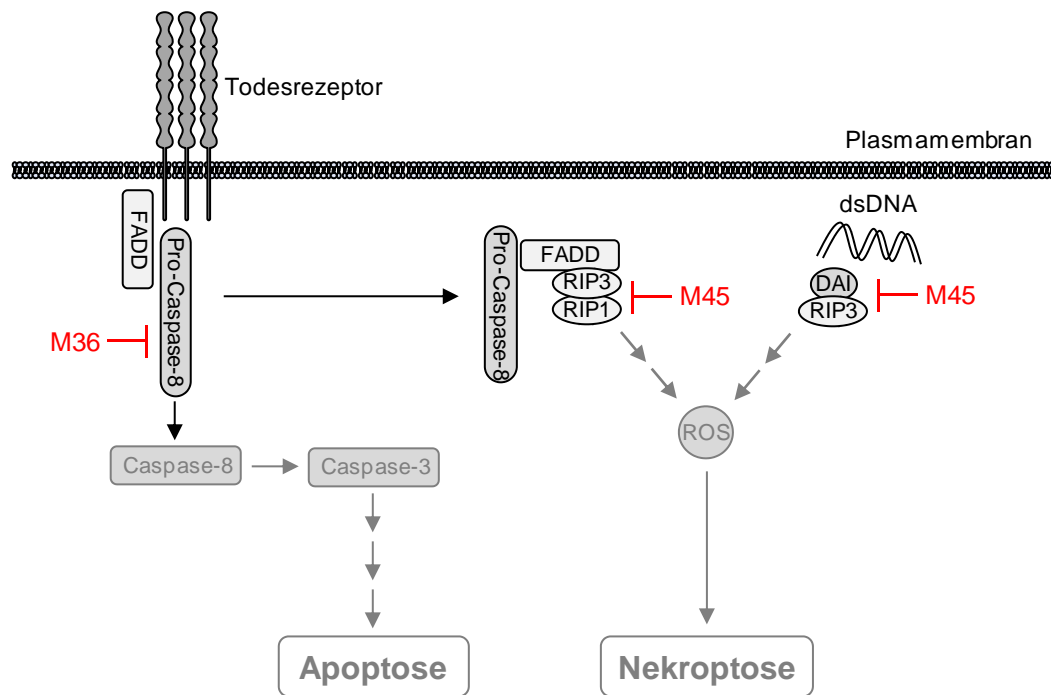


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Apoptose- und Nekroptose-Inhibition durch mCMV.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss des programmierten Zelltods auf die Virusreplikation und das antivirale CD8 T-Zell-*Priming* aufzuklären. Insbesondere sollte der Einfluss des anti-apoptotischen Proteins M36 oder des anti-nekroptotischen Proteins M45 auf die Initiation der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort im drainierenden Lymphknoten (LK) und in der Milz nach akuter Infektion analysiert werden. Des Weiteren sollte der Einfluss des anti-apoptotischen Proteins M36 auf das protektive Potential mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen in zwei verschiedenen Modellen untersucht werden.

4.1 Der Einfluss von Apoptose auf die mCMV-Replikation *in vivo*

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die mCMV-Replikation – in An- oder Abwesenheit von M36 – im poplitealen Lymphknoten (LK) analysiert werden. Hierfür wurden die Deletionsmutante mCMV- Δ M36 (Δ M36) und die Revertante mCMV- Δ M36-Rev (Δ M36-Rev) verwendet (Menard *et al.*, 2003).

In der Gruppe von Prof. Dr. Ulrich H. Koszinowski konnte gezeigt werden, dass die Infektion von Makrophagen mit Δ M36 in Zellkultur zu einer massiven Apoptose-Induktion führt und dadurch die Virusreplikation beeinträchtigt wird (Menard *et al.*, 2003; Cicin-Sain *et al.*, 2008; Ebermann *et al.*, 2012). Des Weiteren war bekannt, dass die virale Replikation in Makrophagen wichtig für die mCMV-Dissemination *in vivo* ist (Hanson *et al.*, 1999; Mocarski *et al.*, 2007). Ein Disseminationsdefekt von Δ M36 vom Infektionsort zu den Zielorganen konnte sowohl in immunsupprimierten Mäusen nach intraplantarer Infektion (Cicin-Sain *et al.*,

2005) als auch in immunkompetenten Mäusen nach intraperitonealer (i.p.) Infektion (Cicin-Sain *et al.*, 2008) nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Befunde war zunächst zu klären, ob nach intraplantarer Infektion immunkompetenter Mäuse ein Replikationsdefekt im LK bestätigt werden kann.

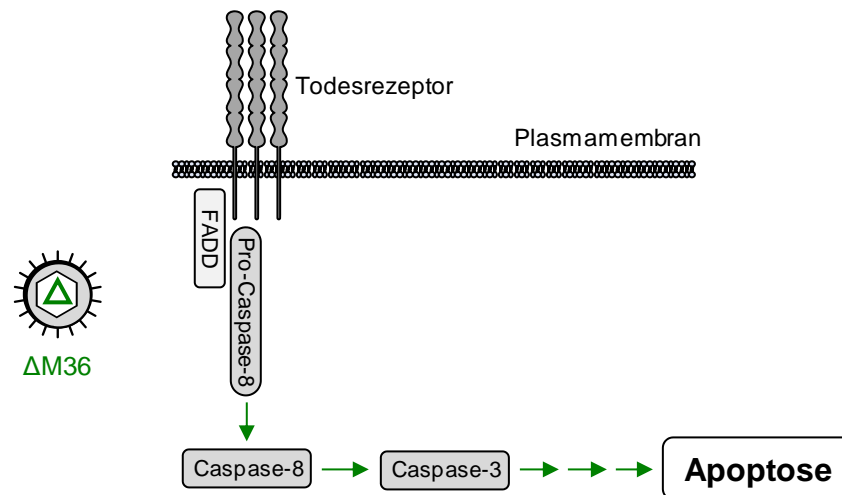


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Apoptose-Induktion durch $\Delta M36$.

Die Analyse der mCMV-Replikation in der immunkompetenten Maus wird durch eine sehr schnelle und effektive NK- und CD8 T-Zell-Kontrolle der mCMV-Infektion erschwert. Es ist daher kaum möglich, die Virusreplikation nach intraplantarer Infektion anhand von Virustitern oder infizierten Zellen in den Zielorganen zu untersuchen. Um die Virusreplikation am Infektionsort (Fuß) und dem regionalen (poplitealen) LK zu analysieren, wurde die Expression des viralen *IE1*-Gens als Maß für das replikative Potential von mCMV verwendet. Dazu wurden die *IE1*-Transkripte mittels RT-qPCR (siehe 3.5.3) absolut quantifiziert. Da das regulatorische *IE1*-Protein kein Bestandteil des Virions ist, sondern erst nach Infektion in der Zelle exprimiert wird, hat die Expression des *IE1*-Gens direkte Auswirkungen auf die Präsentation des antigenen *IE1*-Peptids. Die Quantifizierung der Transkription eines Gens kann somit als Maß für die Virusreplikation *in vivo* genommen werden.

Im folgenden Experiment wurden jeweils 5 immunkompetente BALB/c-Mäuse intraplantar mit den angegebenen Viren infiziert. Anschließend wurde die Zahl der *IE1*-Transkripte 48h nach Infektion im Fuß sowie im drainierenden LK mittels RT-qPCR bestimmt.

Abb. 4.3 zeigt die absolute Quantifizierung von *IE1*-Transkripten im Fuß und im drainierenden LK als Einzeltierbestimmung. Während die Menge an *IE1*-Transkripten nach Infektion mit WT.BAC, $\Delta M36$ oder $\Delta M36$ -Rev im Fuß nahezu identisch ist, zeigt die Analyse des regionalen LK eine signifikante Reduzierung der *IE1*-Transkriptmenge um etwa eine halbe log-Stufe nach Infektion mit $\Delta M36$ im Vergleich zu WT.BAC ($P < 0,0001$) bzw. $\Delta M36$ -

Rev ($P=0,011$). Dieser Befund lässt auf einen Replikationsdefekt von $\Delta M36$ im drainierenden LK schließen.

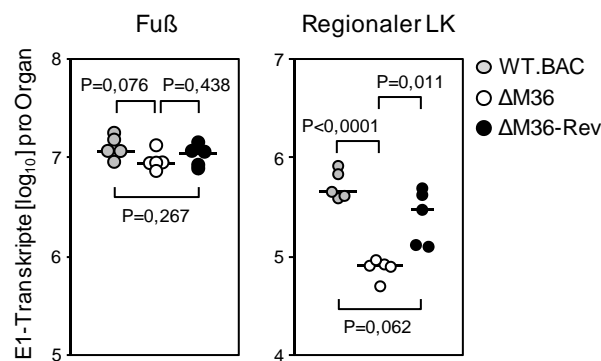


Abb. 4.3: Einfluss von M36 auf die virale Genexpression im Fuß und im drainierenden LK. Die Quantifizierung viraler IE1-Transkripte erfolgte nach intraplantarer Infektion von jeweils 5 immunkompetenten BALB/c-Mäusen mit 1×10^5 PFU WT.BAC (graue Symbole), $\Delta M36$ (weiße Symbole) oder $\Delta M36$ -Rev (schwarze Symbole) mittels RT-qPCR 48h nach Infektion. Die Symbole repräsentieren die Ergebnisse der Einzeltierbestimmungen, der Median ist als horizontaler Balken dargestellt. Für den Vergleich zweier Versuchsgruppen wurde der P-Wert mit dem ungleichen Varianz t-Test (Welch-Test) bestimmt. Ein P-Wert $< 0,05$ zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an.

Da bekannt war, dass die mCMV-Infektion im poplitealen LK immunkompetenter BALB/c-Mäuse bereits 48-72h nach Infektion sowohl einer effektiven NK-Zell- als auch einer frühen CD8 T-Zell-Kontrolle unterliegt (Böhm *et al.*, 2008), sollte im nächsten Versuch geklärt werden, ob der beobachtete Replikationsdefekt von $\Delta M36$ möglicherweise auf die immunologische Kontrolle durch NK- und/oder CD8 T-Zellen zurückzuführen ist. Hierfür wurden die NK- und CD8 T-Zellen, wie unter 3.2.4 beschrieben, 24h vor Infektion mit entsprechenden Depletionsantikörpern (siehe 2.6.4) depletiert. Um die Effizienz der *in vivo*-Depletion der Lymphozytensubpopulationen zu kontrollieren, wurde die Depletion von NK- und/oder CD8 T-Zellen durchflusszytometrisch überprüft (Abb. 4.4).

Nach der Zelloberflächenfärbung mit TCR- β -, CD49b- und CD8-spezifischen Fluorochromgekoppelten Antikörpern (siehe 2.6.2) konnten die Zellen aus dem drainierenden LK für die Analyse eingesetzt werden (siehe 3.4.2). Dazu wurde die Lymphozytenpopulation zunächst mit Hilfe des TCR- β spezifischen Antikörpers in eine TCR- β negative Fraktion, die alle Lymphozyten ohne T-Zell-Rezeptor beinhaltet, und eine TCR- β positive Fraktion aufgetrennt. Während für die Kontrolle der NK-Zell-Depletion nur die TCR- β negativen Zellen analysiert wurden, da Subpopulationen von T-Zellen existieren, die ebenfalls den NK-spezifischen Marker CD49b auf der Oberfläche tragen (Ortaldo *et al.*, 1998), wurden zur Kontrolle der CD8 T-Zell-Depletion nur die TCR- β positiven T-Zellen analysiert.

Nach Injektion eines anti-Asialo GM1 Antiserums 24h vor Infektion konnte gezeigt werden, dass im LK der mit dem Depletionsantikörper behandelten Gruppe im Vergleich zur nicht

behandelten Gruppe mehr als 90% der CD49⁺ NK-Zellen 72h nach Infektion depletiert waren. Des Weiteren konnte durch Injektion eines CD8-spezifischen Depletionsantikörpers eine Reduktion der CD8 T-Zellpopulation um mehr als 99% im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Depletion beobachtet werden.

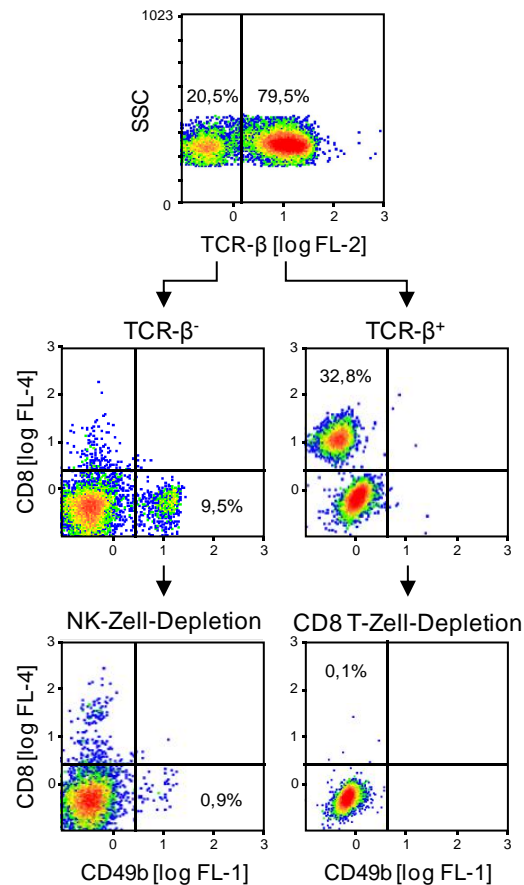


Abb. 4.4: Depletion von NK- und CD8 T-Zellen im drainierenden LK. Die Depletion von NK- (TCR-β⁻ CD8⁻ CD49b⁺) bzw. CD8 T-Zellen (TCR-β⁺ CD8⁺ CD49b⁺) wurde 72h nach intraplantarer Infektion mit 1×10^5 PFU zytofluorometrisch mittels Dreifarbenganalyse im poplitealen LK überprüft. SSC, *Sideward Scatter* im Lymphozyten-Gate. FL, Fluoreszenzkanal und log-Intensität. Die in den *Dot Plots* repräsentierten Zellen wurden als *Color-Density Plots* dargestellt (rot: höchste Dichte; blau: geringste Dichte). Die Lymphozytenpopulation von Interesse ist jeweils in Prozent angegeben.

In Abb. 4.5 zeigt sich in der Gruppe ohne Depletion 72h nach Infektion mit Δ M36 eine signifikante Reduktion der IE1-Transkriptmenge um mehr als eine log-Stufe im Vergleich zur Infektion mit Δ M36-Rev ($P < 0,0001$). Der Replikationsdefekt von Δ M36 im poplitealen LK ist somit 72h nach Infektion noch stärker ausgeprägt (vergleiche Abb. 4.3, 48h nach Infektion). Durch eine Depletion von NK- bzw. CD8 T-Zellen konnte der Replikationsdefekt von Δ M36 nicht aufgehoben werden; der Unterschied der IE1-Transkriptmenge im poplitealen LK Δ M36- und Δ M36-Rev-infizierter Mäuse bleibt nach Depletion von NK- und/oder CD8 T-Zellen nahezu konstant gleich ($P \leq 0,0001$). Nach der Depletion von NK-Zellen konnte jedoch mit beiden Viren ein signifikanter Anstieg der IE1-Transkriptmenge im Vergleich zur

jeweiligen Gruppe ohne Depletion beobachtet werden ($\Delta M36$: $P=0,0023$; $\Delta M36$ -Rev: $P=0,0011$). Dies lässt auf eine starke NK-Zell-Kontrolle der Virusreplikation zu einem frühen Zeitpunkt nach Infektion schließen. Die Depletion von CD8 T-Zellen zeigt hingegen keine Auswirkung auf die IE1-Transkriptmenge. Analog verhält sich eine weitere Gruppe mit NK- und CD8 T-Zell-Depletion.

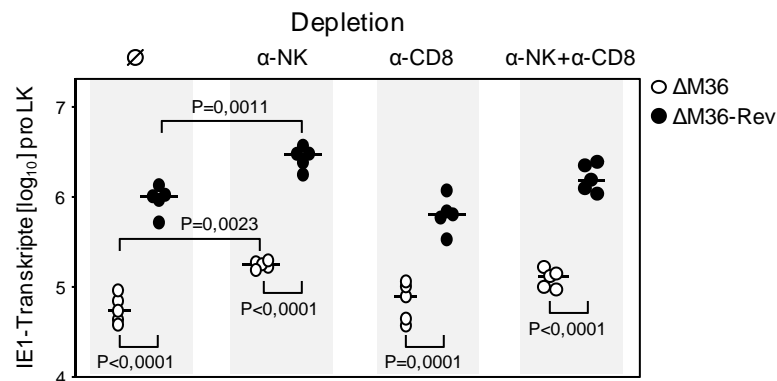


Abb. 4.5: Einfluss von NK- und/oder CD8 T-Zellen auf die virale Genexpression in Abhängigkeit von der M36-Expression. Die Quantifizierung viraler IE1-Transkripte erfolgte 72h nach intraplantarer Infektion von jeweils 5 immunkompetenten BALB/c-Mäusen mit 1×10^5 PFU $\Delta M36$ (weiße Symbole) oder $\Delta M36$ -Rev (schwarze Symbole) mittels RT-qPCR. Die Symbole repräsentieren die Ergebnisse der Einzeltierbestimmungen, der Median ist als horizontaler Balken dargestellt. Die *in vivo*-Depletion von NK- bzw. CD8 T-Zellen erfolgte 24h vor Infektion durch i.v.-Injektion eines anti-Asialo GM1 Serums bzw. eines monoklonalen anti-Maus CD8 Antikörpers. Für den Vergleich zweier Versuchsgruppen wurde der P-Wert mit dem ungleichen Varianz t-Test (Welch-Test) bestimmt. Ein P-Wert $< 0,05$ zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an.

Fazit:

Die Quantifizierung viraler IE1-Transkripte im drainierenden LK immunkompetent infizierter BALB/c-Mäuse weist auf eine Attenuierung von $\Delta M36$ hin. Diese Attenuierung beruht definitiv nicht auf einer verstärkten Immunkontrolle sondern ist sehr wahrscheinlich auf eine verstärkte Apoptose-Induktion in infizierten Zellen zurückzuführen.

4.2 Einfluss von Apoptose auf die Initiation der CD8 T-Zellantwort

Das initiale *Priming* antiviraler CD8 T-Zellen findet nach intraplantarer Infektion im regionalen LK statt. Anschließend expandieren die aktivierten CD8 T-Zellen klonal und wandern in die Peripherie und nachgeordnete lymphatische Organe aus. Da bekannt war, dass sich die Inhibition der Caspase-8-abhängigen Apoptose durch das virale Protein M36 positiv auf die Replikationsfähigkeit des Virus auswirken kann (Menard *et al.*, 2003; Cicin-Sain *et al.*, 2008; Ebermann *et al.*, 2012), wäre ein Einfluss auf die immunologische Kontrolle während der akuten Infektion sowie die Etablierung und Aufrechterhaltung von Latenz möglich. Dies sollte

im Hinblick auf das antivirale CD8 T-Zell-*Priming* – in An- oder Abwesenheit von M36 – im poplitealen LK untersucht werden. Wie unter 4.1 gezeigt, hat die Deletion der M36-kodierenden Region in einem rekombinanten Virus, aufgrund der verstärkten Apoptose-Induktion, einen erheblichen Einfluss auf die intranodale Replikation und muss daher bei der Analyse der akuten CD8 T-Zellantwort berücksichtigt werden.

4.2.1 Vergleich der akuten CD8 T-Zellantwort in Abhängigkeit von M36 in BALB/c und C57BL/6 Mäusen

Um den Einfluss des viralen, anti-apoptotischen Proteins M36 auf das CD8 T-Zell-*Priming* im drainierenden Lymphknoten immunkompetenter Mäuse während der akuten Infektionsphase zu analysieren, wurden BALB/c (H-2^d) und C57BL/6 (H-2^b) Mäuse intraplantar mit WT.BAC, Δ M36 oder Δ M36-Rev infiziert und am Tag 7 nach Infektion die Frequenzen mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen im drainierenden LK mittels IFN- γ ELISpot-Assay (siehe 3.4.1) bestimmt.

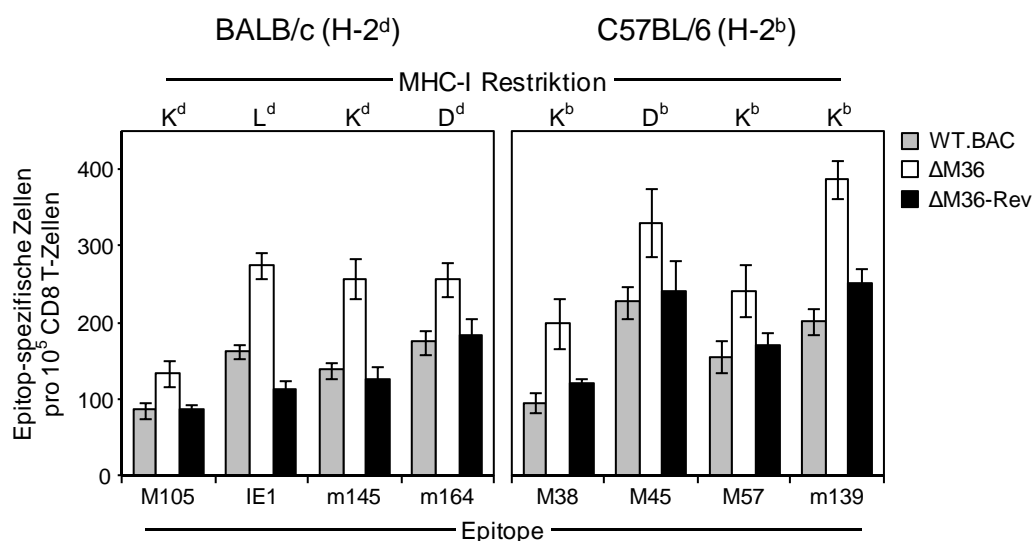


Abb. 4.6: Einfluss von M36 auf das CD8 T-Zell-*Priming* nach akuter Infektion in den Haplotypen H-2^d und H-2^b. Die Zahl Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen im drainierenden LK wurde 7 Tage nach intraplantarer Infektion von jeweils 5 immunkompetenten BALB/c (Haplotyp: H-2^d) bzw. C57BL/6 (Haplotyp: H-2^b) mit 1×10^5 PFU WT.BAC (graue Balken), Δ M36 (weiße Balken) oder Δ M36-Rev (schwarze Balken) im IFN- γ ELISpot-Assay bestimmt. Die CD8 T-Zellen wurden immunomagnetisch separiert und durch APCs (P815: H-2^d; EL4: H-2^b), die in einer Endkonzentration von 10^{-7} M mit den entsprechenden synthetischen Peptiden beladen worden waren, stimuliert. Die jeweilige MHC-I Restriktion der mCMV-Peptide ist angegeben. Die Auswertung Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse durch die Statistik-Software Mathematica 8.0.4; das jeweilige 95% Konfidenzintervall ist als Fehlerbalken dargestellt.

Dazu wurden die für den jeweiligen Haplotyp bekannten, während der akuten mCMV-Infektion immundominanten, 4 Epitope in Form synthetischer Peptide für die exogene Beladung von APCs verwendet. Dies sind für den Haplotyp H-2^d die Peptide M105, m123/IE1, m145 und m164 und für den Haplotyp H-2^b die Peptide M38, M45, M57 und m139 (siehe 2.8).

Die mCMV-spezifischen CD8 T-Zell-Frequenzen waren nach Infektion mit WT.BAC bzw. Δ M36-Rev wie erwartet für beide Haplotypen vergleichbar und folgen dem für die akute mCMV-Infektion bekannten Muster (Abb. 4.6). Nach Infektion mit Δ M36 ist sowohl im Haplotyp H-2^d als auch im Haplotyp H-2^b eine deutliche Steigerung der mCMV-spezifischen CD8 T-Zell-Frequenzen für alle getesteten Epitope zu beobachten. Die durchschnittliche Erhöhung der CD8 T-Zell-Frequenzen nach Infektion mit Δ M36 liegt in einem Bereich um den Faktor 1,5 bis 2. Dies zeigt 7 Tage nach Infektion eine verstärkte mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort in Abwesenheit von M36, und dies obwohl Δ M36 am Tag 2 bzw. 3 nach Infektion im LK einen hoch signifikanten Replikationsdefekt im Vergleich zu WT.BAC oder Δ M36-Rev aufweist (Abb. 4.3 und 4.5). Diese Beobachtung lässt auf einen Zusammenhang zwischen einer verstärkten Apoptose-Induktion in infizierten Zellen und einer gesteigerten CD8 T-Zellantwort *in vivo* schließen.

Fazit:

Obwohl Δ M36 im drainierenden LK attenuiert ist, führt dessen Infektion zu einer Erhöhung der mCMV-spezifischen CD8 T-Zell-Frequenzen im Vergleich zur Infektion mit WT.BAC oder Δ M36-Rev. Dieses verbesserte CD8 T-Zell-*Priming* ist sowohl in BALB/c als auch in C57BL/6 zu beobachten.

4.2.2 Kinetik des CD8 T-Zell-*Primings* in An- oder Abwesenheit von M36

Um einen möglichen Einfluss der M36-Expression auf den zeitlichen Verlauf des CD8 T-Zell-*Primings* zu analysieren, wurden die Frequenzen mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen in einer Kinetik analysiert. Hierfür wurden immunkompetente BALB/c-Mäuse intraplantar mit Δ M36 bzw. Δ M36-Rev infiziert und die Frequenzen Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen aus dem drainierenden LK zu definierten Zeitpunkten (Tag 2-7) nach Infektion im IFN- γ ELISpot-Assay ermittelt.

Die Ergebnisse in Abb. 4.7 zeigen, dass bereits am Tag 2 nach Infektion mCMV-spezifische CD8 T-Zellen detektiert werden können. Die Erhöhung der mCMV-spezifischen CD8 T-Zell-Frequenzen nach Infektion mit Δ M36 ist ab Tag 3 nach Infektion sichtbar. Dieser *Priming*-Vorteil setzt sich in den folgenden Tagen nach Infektion weiter fort und bestätigt den bereits beschriebenen *Priming*-Phänotyp von Δ M36 (siehe Abb. 4.6).

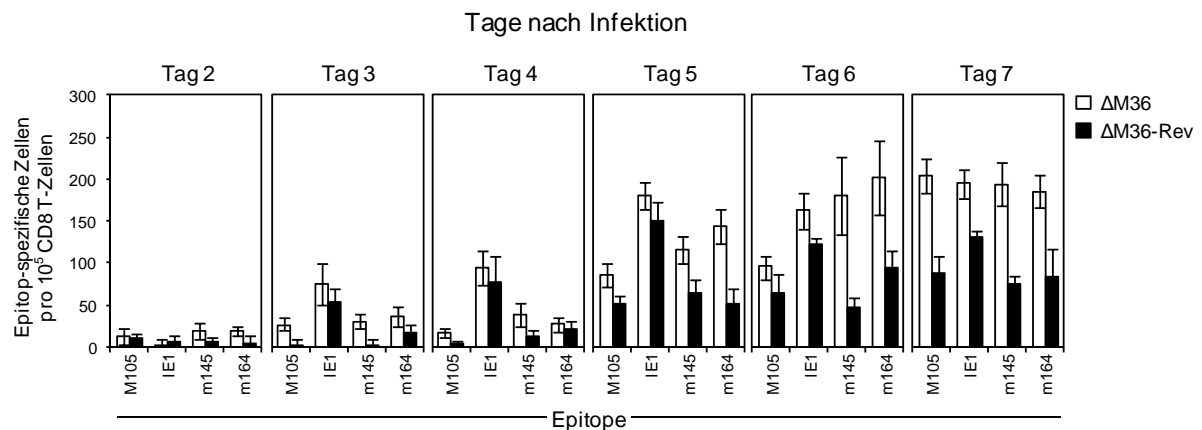


Abb. 4.7: CD8 T-Zell-Priming-Kinetik im drainierenden LK in Abhängigkeit von der M36-Expression. Die Zahl Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen wurde an Tag 2 bis 7 nach intraplantarer Infektion von jeweils 5 immunkompetenten BALB/c mit 1×10^5 PFU Δ M36 (weiße Balken) bzw. Δ M36-Rev (schwarze Balken) im IFN- γ ELISpot-Assay bestimmt. Die CD8 T-Zellen wurden aus dem poplitealen Lymphknoten separiert und durch APCs (P815: H-2^d), die in einer Endkonzentration von 10^{-7} M mit den entsprechenden synthetischen Peptiden beladen worden waren, stimuliert. Die Bestimmung der Frequenzen Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse durch die Statistik-Software Mathematica 8.0.4; das jeweilige 95% Konfidenzintervall ist als Fehlerbalken dargestellt.

Fazit:

Die erhöhten Frequenzen mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen nach Infektion mit Δ M36 sind bereits 3 Tage nach Infektion nachweisbar und steigen bis Tag 7 nach Infektion weiter an.

4.2.3 Einfluss von M36 auf das akute CD8 T-Zell-Priming in Abhängigkeit von der Infektionsdosis

Bisher wurden die Frequenzen mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen nach Infektion mit einer Dosis von 10^5 PFU pro Maus bestimmt. Da die Infektionsdosis im Zuge einer natürlichen Infektion jedoch um ein Vielfaches geringer ist, sollte im Folgenden getestet werden, in wie weit sich Unterschiede im Inokulum auf das CD8 T-Zell-Priming im LK auswirken. Hierfür wurden immunkompetente BALB/c-Mäuse intraplantar mit in \log_{10} -Stufen (10^1 - 10^5 PFU) titrierten Virussuspensionen von Δ M36 bzw. Δ M36-Rev infiziert und die Frequenzen Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen aus dem drainierenden LK am Tag 7 nach Infektion im IFN- γ ELISpot-Assay bestimmt.

Die in Abb. 4.8 dargestellten Frequenzen mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen zeigen eine deutliche Dosis-Abhängigkeit des CD8 T-Zell-Primings im poplitealen LK. Während nach Infektion mit 10 PFU bereits ein geringes CD8 T-Zell-Priming detektiert werden kann, steigen die Frequenzen mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen nach Infektion mit zunehmender Infektionsdosis durchschnittlich um einen Faktor von 1,5 bis 2 an. Es war bereits bekannt, dass eine 10-fache Steigerung der Infektionsdosis nach intraplantarer Infektion mit WT.BAC

die IE1-spezifische Genexpression im LK ebenfalls um den Faktor 10 erhöht. Die daraus resultierenden CD8 T-Zell-Frequenzen sind jedoch nicht mit dem Erhöhungsfaktor des Inokulums identisch (Böhm *et al.*, 2008). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

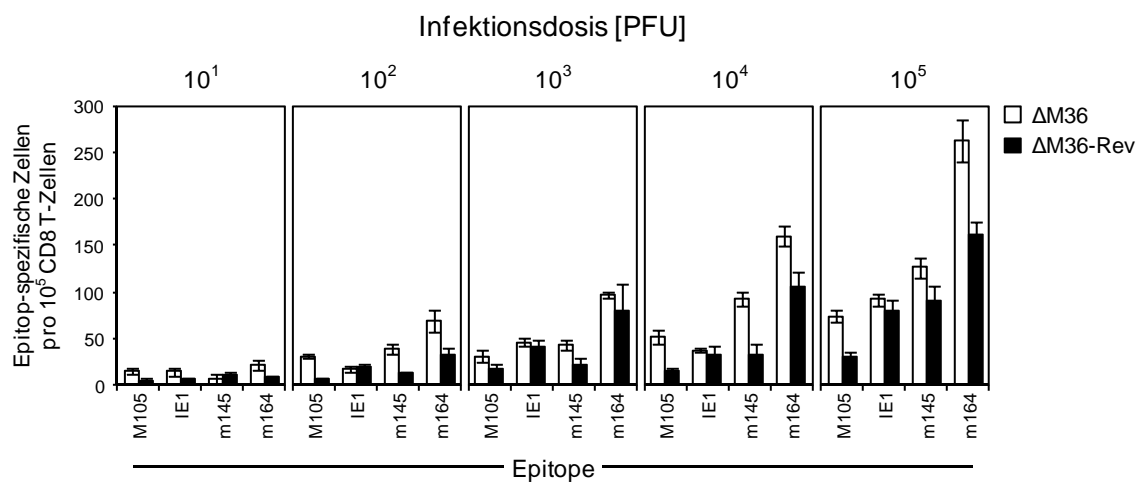


Abb. 4.8: Dosis-Abhängigkeit des CD8 T-Zell-Primings im drainierenden LK in An- oder Abwesenheit von M36. Die Zahl Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen wurde 7 Tage nach intraplantarer Infektion von jeweils 5 immunkompetenten BALB/c mit den angegebenen Infektionsdosen von 10^1 bis 10^5 PFU mit Δ M36 (weiße Balken) bzw. Δ M36-Rev (schwarze Balken) im IFN- γ ELISpot-Assay bestimmt. Die CD8 T-Zellen wurden immunomagnetisch separiert und durch APCs (P815: H-2^d), die in einer Endkonzentration von 10^{-7} M mit den entsprechenden synthetischen Peptiden beladen worden waren, stimuliert. Die Auswertung Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse durch die Statistik-Software Mathematica 8.0.4; das 95% Konfidenzintervall ist als Fehlerbalken dargestellt.

Das CD8 T-Zell-*Priming* profitiert bereits ab einer Infektionsdosis von 100 PFU von der Abwesenheit von M36 und weist auf eine um den Faktor 1,5 bis 2 verstärkte mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort im Vergleich zur Infektion mit Δ M36-Rev hin. Dies bestätigt das verbesserte CD8 T-Zell-*Priming* nach Infektion mit Δ M36, das bereits in den vorangegangenen Experimenten (Abb. 4.6 und 4.7) gezeigt werden konnte und impliziert einen Zusammenhang zwischen der verstärkten Apoptose-Induktion und einem verbesserten CD8 T-Zell-*Priming*.

Fazit:

Δ M36-*geprimte* CD8 T-Zellen zeigen auch nach Infektion mit niedrigen Infektionsdosen eine gesteigerte mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort. Dieser *Priming*-Vorteil ist bereits ab einer Infektionsdosis von 100 PFU deutlich sichtbar.

4.3 Inhibition der Apoptose-Induktion durch eine dominant-negative Variante des viralen FADD-Gens

Da bisher noch nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte, ob die gesteigerten Frequenzen mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen nach Infektion mit $\Delta M36$ tatsächlich auf eine verstärkte Apoptose-Induktion oder aber auf einen anderen, durch die Deletion von M36 hervorgerufenen, Mechanismus zurückzuführen sind, sollte dies im folgenden Versuch unter Zuhilfenahme einer funktionellen Revertante von $\Delta M36$ untersucht werden. Die funktionelle Revertante mCMV- $\Delta M36$ -FADD^{DN} ($\Delta M36$ -FADD^{DN}) kodiert für eine dominant-negative Variante der FAS associated death domain (FADD^{DN}). Das viral exprimierte FADD^{DN} verhindert nach Infektion die Rekrutierung von endogenem FADD, das für die Formierung des *death inducing signaling complex* (DISC) verantwortlich ist, und blockiert dadurch konstitutiv den extrinsischen Signalweg der Apoptose in infizierten Zellen (Abb. 4.9).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass nach Infektion mit $\Delta M36$ -FADD^{DN} das viral exprimierte FADD^{DN} die fehlende anti-apoptotische Funktion von $\Delta M36$ revertiert und dadurch die Attenuierung von $\Delta M36$ sowohl *in vitro* als auch *in vivo* aufhebt (Cicin-Sain *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe dieser funktionellen Revertante geklärt werden, ob nach Infektion mit $\Delta M36$ -FADD^{DN} sowohl der Replikationsdefekt als auch die gesteigerte mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort von $\Delta M36$ revertiert werden kann. Neben $\Delta M36$ -FADD^{DN} wurde das mCMV-WT.FADD^{DN} (WT.FADD^{DN}) als Kontrolle mitgeführt.

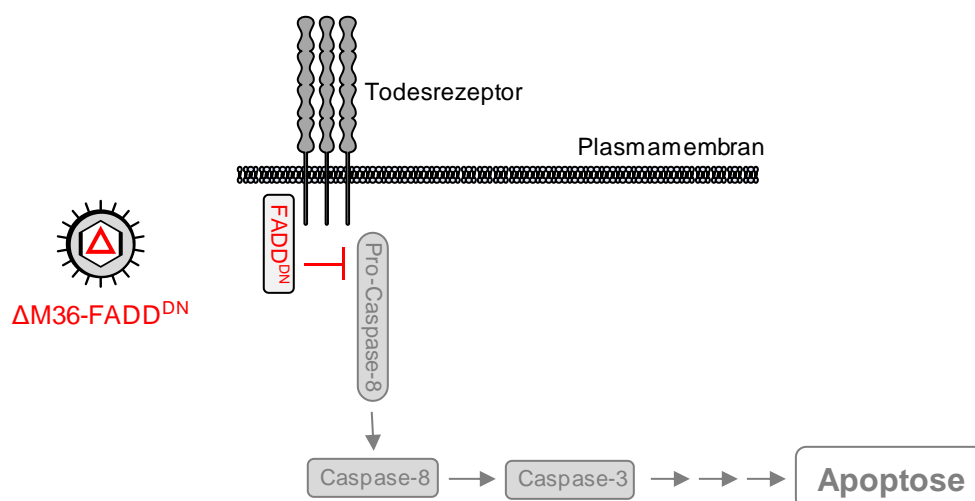


Abb. 4.9: Schematische Darstellung der Apoptose-Inhibition durch FADD^{DN}.

Für diesen Versuch wurden immunkompetente BALB/c-Mäuse intraplantar infiziert und 48h nach Infektion die Zahl der IE1-Transkripte mittels RT-qPCR im infizierten Fuß und im drainierenden LK bestimmt (Abb. 4.10, A). Die Ergebnisse der absoluten Quantifizierung weisen im Fuß eine vergleichbare Zahl von IE1-Transkripten nach Infektion mit WT.FADD^{DN},

$\Delta M36$ oder $\Delta M36\text{-FADD}^{\text{DN}}$ auf. Demgegenüber kann im drainierenden LK der erwartete Replikationsdefekt von $\Delta M36$ im Vergleich zu $\text{WT.FADD}^{\text{DN}}$ ($P < 0,0001$) nachgewiesen werden. Die Expression von FADD^{DN} nach Infektion mit der funktionellen Revertante $\Delta M36\text{-FADD}^{\text{DN}}$ führt dagegen wieder zu einer signifikanten Zunahme der IE1-Transkriptmenge im LK ($P = 0,0002$), allerdings konnte das WT-Niveau nicht ganz erreicht werden ($P = 0,0012$). Die Transkriptmenge nach Infektion mit $\Delta M36\text{-FADD}^{\text{DN}}$ entsprach ungefähr der von $\Delta M36\text{-Rev}$ (siehe Abb. 4.3). Basierend auf diesen Daten kann auf eine Reversion der fehlenden anti-apoptotischen Funktion von $\Delta M36$ durch FADD^{DN} geschlossen werden.

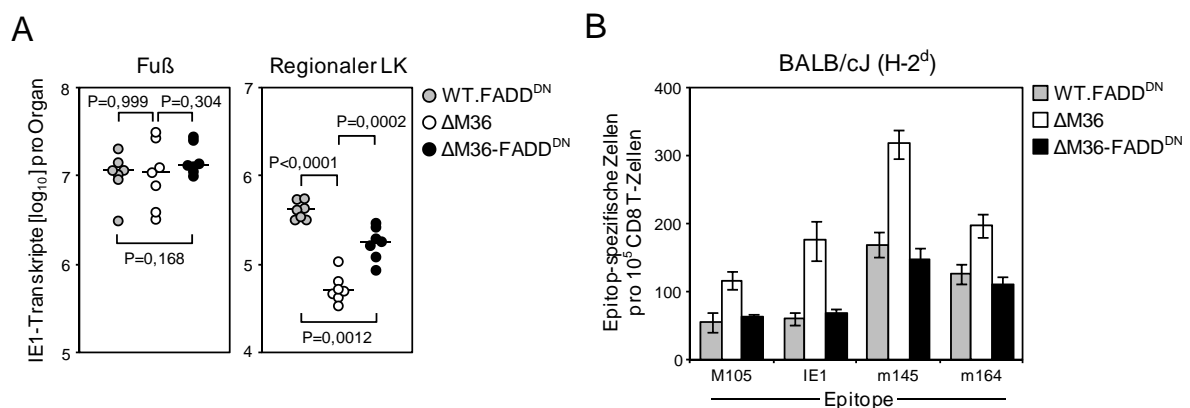


Abb. 4.10: Einfluss von FADD^{DN} auf die virale Genexpression sowie das CD8 T-Zell-Priming im drainierenden LK während der akuten Infektion. (A) Virale Genexpression im Fuß und drainierenden LK. Die Quantifizierung viraler IE1-Transkripte erfolgte 48h nach intraplantarer Infektion immunkompetenter BALB/c mit 1×10^5 PFU $\text{WT.FADD}^{\text{DN}}$ (graue Symbole), $\Delta M36$ (weiße Symbole) oder $\Delta M36\text{-FADD}^{\text{DN}}$ (schwarze Symbole) mittels RT-qPCR. Die Symbole repräsentieren die Ergebnisse der Einzeltierbestimmungen, der Median ist als horizontaler Balken dargestellt. Für den Vergleich zweier Versuchsgruppen wurde der P-Wert mit dem ungleichen Varianz t-Test (Welch-Test) bestimmt. Ein P-Wert $< 0,05$ zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an. (B) CD8 T-Zell-Priming im poplitealen LK. Die Zahl Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen wurde 7 Tage nach intraplantarer Infektion von jeweils 5 immunkompetenten BALB/c mit 1×10^5 PFU $\text{WT.FADD}^{\text{DN}}$ (graue Balken), $\Delta M36$ (weiße Balken) oder $\Delta M36\text{-FADD}^{\text{DN}}$ (schwarze Balken) mit Hilfe des IFN- γ ELISpot-Assays bestimmt. Die CD8 T-Zellen wurden immunomagnetisch separiert und durch APCs (P815: H-2^d), die in einer Endkonzentration von 10^{-7} M mit den entsprechenden synthetischen Peptiden beladen worden waren, stimuliert. Die Auswertung Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse durch die Statistik-Software Mathematica 8.0.4; das 95% Konfidenzintervall ist als Fehlerbalken dargestellt.

Im folgenden Experiment sollte nun geklärt werden, ob die gesteigerten mCMV-spezifischen CD8 T-Zell-Frequenzen durch die FADD^{DN} -Expression wieder reduziert werden. Hierfür wurde die Zahl Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen im drainierenden LK 7 Tage nach Infektion im IFN- γ ELISpot-Assay ermittelt. Der verbesserte Priming-Phänotyp von $\Delta M36$ konnte auch im Vergleich zu $\text{WT.FADD}^{\text{DN}}$ bestätigt werden (Abb 4.10, B). Die Infektion mit $\Delta M36\text{-FADD}^{\text{DN}}$ führt dagegen zu einer konsistenten Reduktion der mCMV-spezifischen CD8 T-Zell-Frequenzen auf das WT-Niveau und belegt, dass der Priming-Phänotyp von $\Delta M36$ auf eine verstärkte Apoptose-Induktion zurückzuführen ist.

Fazit:

Durch die Expression von viralem FADD^{DN} in infizierten Zellen konnte eindeutig belegt werden, dass die gesteigerte mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort nach Infektion mit Δ M36 auf einer verstärkten Apoptose-Induktion in infizierten Zellen beruht und nicht auf einen unbekanntem anderen, durch die Deletion von M36 hervorgerufenen, Effekt zurückzuführen ist.

4.4 Einfluss von Nekroptose auf die Initiation der CD8 T-Zellantwort

Die Nekroptose wird als eine Art *Backup*-Mechanismus der Zelle beschrieben, der genau dann in Kraft treten kann, wenn die Apoptose durch Caspase-8-Inhibitoren (z.B. vICA) aktiv unterdrückt wird (Festjens *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2011; Kaczmarek *et al.*, 2013). Da mCMV neben dem anti-apoptotischen Protein M36 auch für ein anti-nekroptotisches Protein, M45, kodiert (Mack *et al.*, 2008; Upton *et al.*, 2008; Lembo und Brune, 2009), ist es auch im Falle einer Nekroptose-Induktion in der Lage, dem programmierten Zelltod zu entgehen. Deshalb sollte untersucht werden, ob die Deletion von *M45* einen vergleichbaren Einfluss auf die virale intranodale Genexpression und die mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort im drainierenden LK hat, wie die *M36*-Deletion.

Für die folgenden Analysen wurde die *M45-Frameshift*-Mutante mCMV-M45-BamX (M45-BamX), die eine *Missense*-Mutation in der M45-Aminosäuresequenz trägt und dadurch ein nicht funktionelles M45-Protein exprimiert, sowie die Revertante mCMV-M45-BamX-Rev (M45-BamX-Rev) verwendet (Brune *et al.*, 2001; Lembo und Brune, 2009).

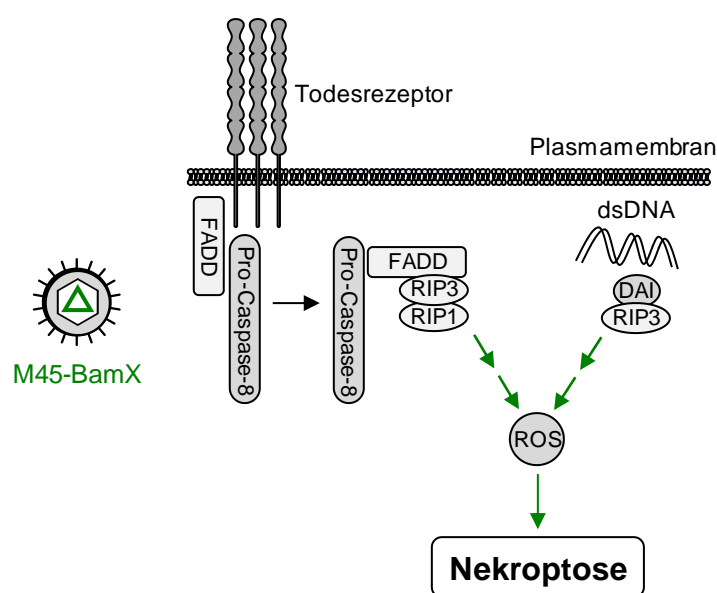


Abb. 4.11: Schematische Darstellung der Nekroptose-Induktion durch M45-BamX.

In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Infektion von Makrophagen und Endothelzellen mit *M45*-Deletionsmutanten in Zellkultur zu einem schnellen virusinduzierten Zelltod führt und dadurch die Virusreplikation beeinträchtigt (Brune *et al.*, 2001). Darüber hinaus sind *M45*-Deletionsmutanten in immunsupprimierten SCID-Mäusen (*severe combined immunodeficiency*) völlig avirulent, wohingegen eine Infektion mit Wildtypvirus zu einer 100%igen Mortalität dieser Mäuse führt (Lembo *et al.*, 2004). Dies lässt ebenfalls auf einen mit Δ M36 vergleichbaren Disseminationsdefekt von M45-BamX im infizierten Wirt schließen.

Um in der vorliegenden Arbeit den Einfluss von M45 auf die akute mCMV-Infektion im drainierenden LK zu analysieren wurden jeweils 5 immunkompetente BALB/c-Mäuse intraplantar mit WT.BAC, M45-BamX und M45-BamX-Rev infiziert. 48h nach Infektion wurde die Zahl der IE1-Transkripte im infizierten Fuß und im drainierenden LK bestimmt.

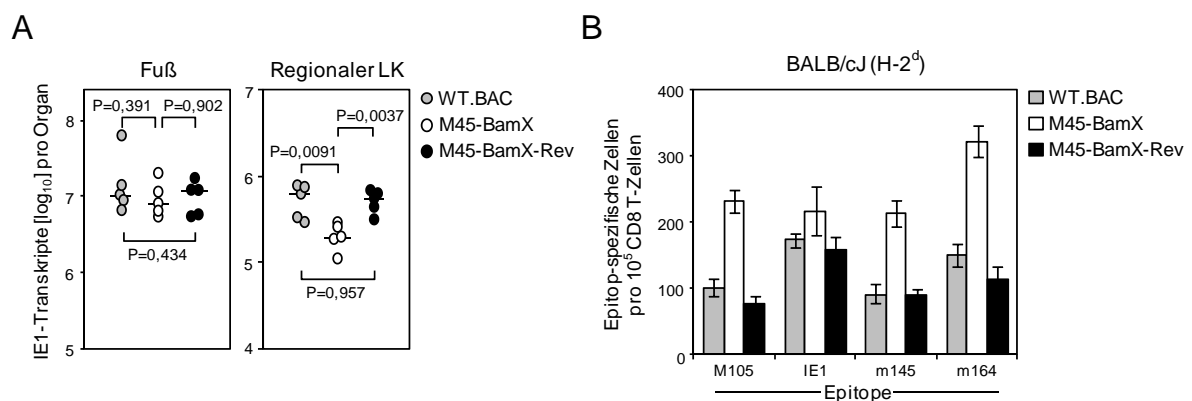


Abb. 4.12: Virale Genexpression und CD8 T-Zell-Priming im LK in An- oder Abwesenheit von M45 während der akuten Infektion. (A) Virale Genexpression im Fuß und im drainierenden LK. Die Quantifizierung viraler IE1-Transkripte erfolgte 48h nach intraplantarer Infektion immunkompetenter BALB/c mit 1×10^5 PFU WT.BAC (graue Symbole), M45-BamX (weiße Symbole) oder M45-BamX-Rev (schwarze Symbole) mittels RT-qPCR. Die Symbole repräsentieren die Ergebnisse der Einzeltierbestimmungen, der Median ist als horizontaler Balken dargestellt. Für den Vergleich zweier Versuchsgruppen wurde der P-Wert mit dem ungleichen Varianz t-Test (Welch-Test) bestimmt. Ein P-Wert $< 0,05$ zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an. (B) CD8 T-Zell-Priming im poplitealen LK. Die Zahl Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen wurde 7 Tage nach intraplantarer Infektion von jeweils 5 immunkompetenten BALB/c mit 1×10^5 PFU WT.BAC (graue Balken), M45-BamX (weiße Balken) oder M45-BamX-Rev (schwarze Balken) im IFN- γ ELISpot-Assay bestimmt. Die CD8 T-Zellen wurden immunomagnetisch separiert und durch APCs (P815: H-2^d), die in einer Endkonzentration von 10^{-7} M mit den entsprechenden synthetischen Peptiden beladen worden waren, stimuliert. Die Auswertung Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse durch die Statistik-Software Mathematica 8.0.4; das 95% Konfidenzintervall ist als Fehlerbalken dargestellt.

Wie erwartet konnte im Fuß kein Unterschied in der IE1-Transkriptmenge beobachtet werden (Abb 4.12, A). Im LK kommt es nach Infektion mit M45-BamX im Vergleich zu WT.BAC zu einer signifikanten Reduktion der IE1-Transkriptmenge um ca. eine halbe log-Stufe ($P=0,0091$). Die Revertante erreicht nahezu das WT-Niveau ($P=0,957$) und somit ist auch deren IE1-Transkriptmenge gegenüber der Mutante signifikant erhöht ($P=0,0037$).

Die Ergebnisse zeigen somit, dass auch die Deletion von *M45* und die damit verbundene Induktion von Nekroptose zu einem Replikationsdefekt von M45-BamX im LK führt.

Zur Analyse des mCMV-spezifischen CD8 T-Zell-*Primings* – in An- oder Abwesenheit von M45 – wurden immunkompetente BALB/c-Mäuse intraplantar mit den angegebenen Viren infiziert und die Zahl Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen im drainierenden LK 7 Tage nach Infektion im IFN- γ ELISpot-Assay bestimmt. Die ELISpot-Analyse (Abb. 4.12, B) zeigt auch nach Infektion mit M45-BamX eine Erhöhung der mCMV-spezifischen CD8 T-Zell-Frequenzen um den Faktor 1,5 bis 2 im Vergleich zur Infektion mit WT.BAC oder M45-BamX-Rev. Die ermittelten CD8 T-Zell-Frequenzen sind mit denen von Δ M36 vergleichbar (Abb. 4.6 und 4.10). Somit konnte für ein zweites virales Zelltod-inhibierendes Protein gezeigt werden, dass eine verstärkte Induktion des programmierten Zelltods infizierter Zellen zu einem verbesserten mCMV-spezifischen CD8 T-Zell-*Priming* führt.

Fazit:

Neben der Apoptose führt auch die Induktion von Nekroptose zu einer deutlichen Steigerung der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort, obwohl auch M45-BamX eine Attenuierung im drainierenden LK aufweist.

4.5 Einfluss von Apoptose auf die akute CD8 T-Zellantwort in Milz und Lunge

Bisher waren alle ELISpot-Analysen auf *ex vivo* isolierte CD8 T-Zellen aus dem poplitealen LK beschränkt, da das initiale *Priming* antiviraler CD8 T-Zellen nach intraplantarer Infektion im regionalen, dem den Infektionsort drainierenden LK stattfindet. Da aktivierte CD8 T-Zellen nach der Expansion im LK in die Peripherie und nachfolgende lymphatische Organe wie die Milz auswandern oder in die Lunge rekrutiert werden können, sollte in einem weiteren Experiment geklärt werden, ob es in diesen Organen zu einer vergleichbaren mCMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort mit ähnlichem Immundominanzmuster nach Infektion mit Δ M36 kommt.

Hierfür wurden immunkompetente BALB/c- und C57BL/6-Mäuse intraplantar mit Δ M36 oder Δ M36-Rev infiziert und die Zahl Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen in Milz und Lunge 7 Tage nach Infektion im IFN- γ ELISpot-Assay ermittelt.

Nach Infektion mit Δ M36 ist eine deutliche Steigerung der CD8 T-Zell-Frequenzen für die Epitope M105, m145 und m164 im Vergleich zur Infektion mit Δ M36-Rev im Haplotyp H-2^d zu beobachten (Abb 4.13, A). Eine Erhöhung der IE1-spezifischen CD8 T-Zell-Frequenzen war nach Δ M36-Infektion in diesem Experiment nicht zu beobachten. Diese Steigerung der Frequenzen mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen ist mit denen im drainierenden LK vergleichbar (siehe 4.6).

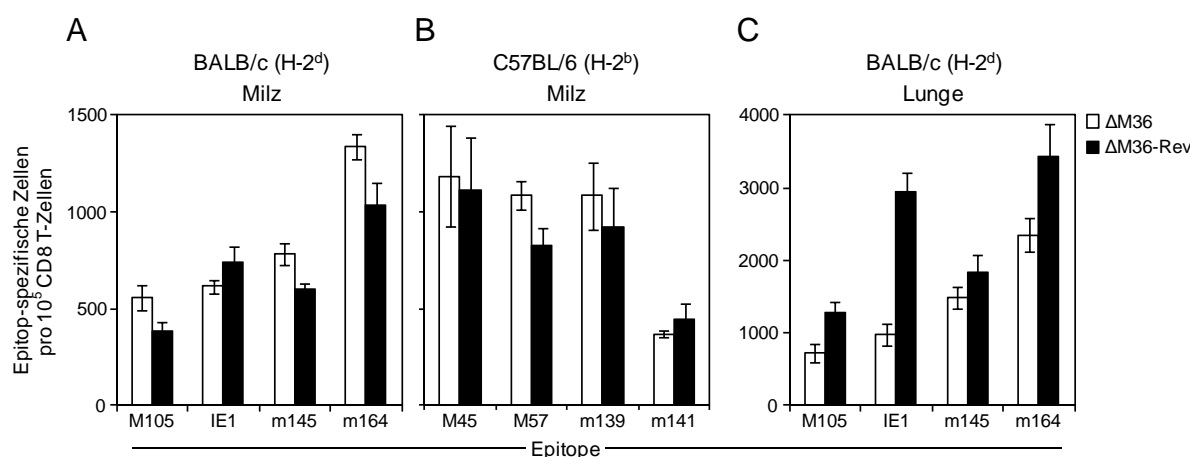


Abb. 4.13: Einfluss von M36 auf die mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort in Milz und Lunge.

Die Zahl Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen in Milz und Lunge wurde 7 Tage nach intraplantarer Infektion von jeweils 5 immunkompetenten BALB/c (Haplotyp: H-2^d) (A) und (C) bzw. C57BL/6 (Haplotyp: H-2^b) (B) mit 1×10^5 PFU Δ M36 (weiße Balken) oder Δ M36-Rev (schwarze Balken) im IFN- γ ELISpot-Assay bestimmt. Die CD8 T-Zellen wurden immunomagnetisch separiert und durch APCs (P815: H-2^d; EL4: H-2^b), die in einer Endkonzentration von 10^{-7} M mit den entsprechenden synthetischen Peptiden beladen worden waren, stimuliert. Die Auswertung Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse durch die Statistik-Software Mathematica 8.0.4; das 95% Konfidenzintervall ist als Fehlerbalken dargestellt.

Im Haplotyp H-2^b konnten ebenfalls höhere CD8 T-Zell-Frequenzen nach Infektion mit Δ M36 im Vergleich zur Revertante für die Epitope M45, M57 und m139 nachgewiesen werden (Abb. 4.13, B). Für das Epitop m141 ist in diesem Experiment keine Steigerung der CD8 T-Zellantwort zu beobachten. Die Frequenzen mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen verhalten sich in der Lunge invers zu den Befunden in LK und Milz; die Infektion mit der Revertante zeigt für alle getesteten Epitope deutlich höhere CD8 T-Zell-Frequenzen als nach Infektion mit Δ M36 (Abb. 4.13, C). Dies ist wahrscheinlich auf eine verringerte Rekrutierung mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen infolge der schlechteren Δ M36-Dissemination zurückzuführen.

Fazit:

Die intraplantare Infektion mit Δ M36 führt auch in der Milz zu einer höheren mCMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort.

4.6 Analyse des genomweiten CD8 T-Zellepitop-Repertoires in Abhängigkeit von M36 bzw. M45

Die bisherigen Untersuchungen beschränkten sich auf bekannte CD8 T-Zellepitope. Um einen möglichen Einfluss der M36- oder M45-Expression auf das gesamte mCMV-spezifische CD8 T-Zell-Immuno zu analysieren, wurde die von Michael W. Munks generierte mCMV-ORF-Library (Munks *et al.*, 2006b) verwendet. Mit ihrer Hilfe können CD8

T-Zellen mit Spezifität gegen mögliche Epitope aller 170 für mCMV vorhergesagten ORFs (Rawlinson *et al.*, 1996) ermittelt werden (siehe 3.4.3; zur Übersicht Abb. 3.1).

Für die Repertoire-Analysen wurden immunkompetente BALB/c-Mäuse intraplantar mit den angegebenen Viren infiziert und 7 Tage nach Infektion ein *Pool* ihrer Milzzellen als Effektoren für den Assay verwendet. Die aktivierten CD8 T-Zellen konnten anhand ihres positiven intrazellulären IFN- γ -*Stainings* detektiert werden (Holtappels *et al.*, 2013). Die Auswertung der zytofluorometrisch akquirierten Daten erfolgte durch das sequenzielle Setzen von *Gates*, was eine Abtrennung von definierten Zellpopulationen erlaubt. Zur übersichtlicheren Darstellung der positiven Signale wurden unspezifische Hintergrundsignale subtrahiert.

Nach Infektion mit WT.BAC (Abb. 4.14 A) konnten in der Epitop-Repertoire-Analyse die für den Wildtyp bekannten dominanten CD8 T-Zell-Spezifitäten (M105, m123/IE1, m145 und m164) mit einem für mCMV typischen Immundominanzmuster nach akuter Infektion (Seckert *et al.*, 2011) beobachtet werden. Dieses Muster wurde auch nach Stimulation mit synthetischen Peptiden bestätigt, die als Kontrolle mitgeführt wurden.

Das Epitop-Repertoire nach Infektion mit Δ M36 (Abb. 4.14, B) zeigt im Vergleich zur Infektion mit WT.BAC eine Expansion der CD8 T-Zell-Frequenzen, um einen Faktor von etwa 2, für die bekannten immundominanten Epitope. Dieser Befund ist auch in der Kontrolle mit synthetischem Peptid zu beobachten. Zudem wurden neue CD8 T-Zell-Spezifitäten detektiert, bei denen es sich um ein oder mehrere Epitope aus den vorhergesagten ORFs M25, M54, M57, M71, M78 und M118 handelt. CD8 T-Zell-Spezifitäten gegen Epitope aus den ORFs M94 und M102 konnten sowohl nach Infektion mit WT.BAC also auch mit Δ M36 nachgewiesen werden. Diese Spezifitäten profitierten ebenfalls von der M36-Abwesenheit. Nach Infektion mit den beiden Revertanten, Δ M36-Rev oder Δ M36-FADD^{DN} zeigten die Frequenzen mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen wieder WT-Niveau.

Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die Abwesenheit des anti-nekroptotischen Proteins M45 eine ähnliche Auswirkung auf die CD8 T-Zellantwort besitzt wie das anti-apoptotische Protein M36. Die Epitop-Repertoire-Analyse weist nach Infektion mit M45-BamX (Abb. 4.14, C) eine nahezu identische Erhöhung der CD8 T-Zell-Frequenzen, um einen Faktor von etwa 2, für alle bekannten immundominanten Epitope auf. Dies konnte auch in der Kontrolle mit synthetischem Peptid bestätigt werden. Ebenfalls wurden in Abwesenheit eines funktionellen M45-Proteins CD8 T-Zellen gegen neue Spezifitäten nachgewiesen. Diese konnten, wie nach Infektion mit Δ M36, den ORFs M25, M78 und M118 zugeordnet werden. CD8 T-Zell-Spezifitäten gegen Epitope aus den ORFs M25, M94 und M102 wurde auch nach Infektion mit M45-BamX beobachtet. Nach Infektion mit M45-BamX-Rev entsprachen die CD8 T-Zell-Frequenzen wieder dem WT-Niveau.

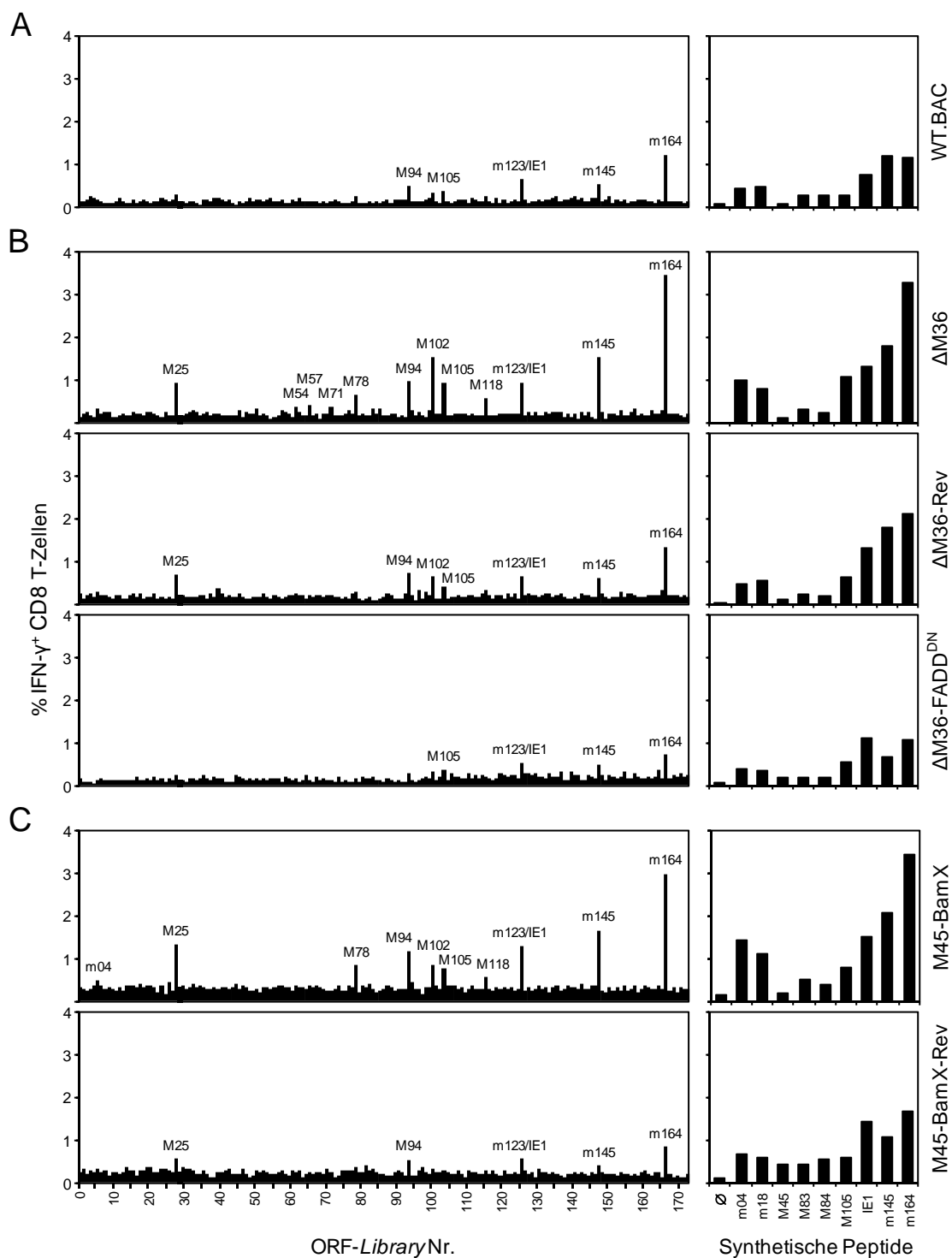


Abb. 4.14: mCMV-spezifisches CD8 T-Zellepitop-Repertoire in Abhängigkeit von M36 oder M45 während der akuten Infektion. Die Frequenzen mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen wurden 7 Tage nach intraplantarer Infektion von jeweils 7 immunkompetenten BALB/c mit 1×10^5 PFU WT.BAC (A), Δ M36, Δ M36-Rev oder Δ M36-FADD^{DN} (B) bzw. M45-BamX oder M45-BamX-Rev (C) zytofluorometrisch nach intrazellulärem IFN- γ *Staining ex vivo* isolierter Milzzellen bestimmt. Als Stimulatorzellen dienten SV40-transformierte Fibroblasten (Haplotyp: H-2^d), die mit jeweils einem der 170 vorhergesagten ORF (siehe Anhang, 7.1) tragenden Expressionsplasmiden transient transfiziert worden waren. Als Kontrolle wurden die Milzzellen parallel dazu mit den 9 bekannten synthetischen mCMV-Peptiden mit der optimierten Konzentration von 10^{-6} M stimuliert.

Fazit:

Eine verstärkte Induktion des programmierten Zelltods, durch die Abwesenheit von M36 oder M45, führt neben einer gesteigerten mCMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort auch zu einer Verbreiterung des CD8 T-Zellepitop-Repertoires.

4.7 Auswirkung der Deletion viraler nicht Zelltod-inhibierender Gene auf die Initiation der CD8 T-Zellantwort

Die bisherigen Ergebnisse haben eindrucksvoll gezeigt, dass eine verstärkte Induktion des programmierten Zelltods zu einer Verbesserung des mCMV-spezifischen CD8 T-Zell-*Primings* führt. Gleichzeitig zeigen die Virusrekombinanten Δ M36 und M45-BamX eine verminderte Replikation im drainierenden LK. Um zu zeigen, dass die Verbesserung des CD8 T-Zell-*Primings* keine generelle Eigenschaft attenuierter Viren ist, sollte dies mit Hilfe weiterer Virusmutanten, geprüft werden.

4.7.1 Einfluss des viralen Immunevasins m152 auf die akute Infektion

Die derzeit bekannten, von mCMV kodierten Immunevasionsproteine m04/gp34, m06/gp48 und m152/gp40 (Reddehase, 2002; Lemmermann *et al.*, 2010; Fink *et al.*, 2013), in der Literatur auch als vRAPs (*viral regulators of antigen presentation*) bezeichnet (Holtappels *et al.*, 2006; Böhm *et al.*, 2008), interferieren mit dem Transport und dadurch auch mit der Präsentation von Peptid-beladenen MHC-I-Komplexen auf der Oberfläche infizierter Zellen. Für m152/gp40 konnte gezeigt werden, dass es alleine in der Lage ist die Präsentation viraler Antigene auf der Oberfläche infizierter Zellen effizient zu inhibieren und deshalb wahrscheinlich das Hauptimmunevasin von mCMV darstellt (Lemmermann *et al.*, 2012). Des Weiteren war bekannt, dass eine Deletion der vRAPs zu einer verbesserten Immunkontrolle im poplitealen LK führt und dadurch die Replikationsfähigkeit des Virus negativ beeinflusst (Böhm *et al.*, 2008). Durch die verminderte Virusreplikation im LK kommt es zu einer geringeren, für das CD8 T-Zell-*Priming* zur Verfügung stehenden, Antigenmenge, was sich wiederum negativ auf die mCMV-spezifischen CD8 T-Zell-Frequenzen im LK auswirkt. Diese negative *Feed-Back-Regulation*, die in der Literatur auch als Immunevasionsparadoxon bezeichnete wird, sollte im Folgenden in An- oder Abwesenheit des viralen Hauptimmunevasins m152 analysiert werden.

Hierfür wurden jeweils 5 immunkompetente BALB/c-Mäuse intraplantar mit WT.BAC, mCMV- Δ m152 (Δ m152) und mCMV- Δ m152-Rev (Δ m152-Rev) infiziert und 48h nach Infektion wurde die Menge an IE1-Transkripten mittels RT-qPCR im infizierten Fuß und im

drainierenden LK quantifiziert. Im LK zeigt die Analyse eine signifikante Reduktion der IE1-Transkriptmenge nach Infektion mit $\Delta m152$ im Vergleich zu WT.BAC ($P=0,0006$) bzw. $\Delta m152$ -Rev ($P=0,0475$) (Abb. 4.10, A). Dies bestätigt die in Böhm *et al.* (2008) veröffentlichten Daten zu einer verringerten Replikationsfähigkeit in Abwesenheit der Immunevasine, die als Indiz für eine effizientere Immunkontrolle diskutiert wurde. Eine Reduktion der IE1-Transkripte nach Infektion mit $\Delta m152$ im Vergleich zu WT.BAC ($P=0,0005$) war auch im Fuß zu beobachten und lässt möglicherweise auf eine effektivere Immunkontrolle bereits an der Infektionsstelle schließen (Abb. 4.15, A). Während die Infektion mit $\Delta m152$ -Rev im regionalen LK in etwa dem WT-Niveau entsprach ($P=0,068$), konnte dieser Phänotyp im Fuß nicht bestätigt werden ($P<0,0001$).

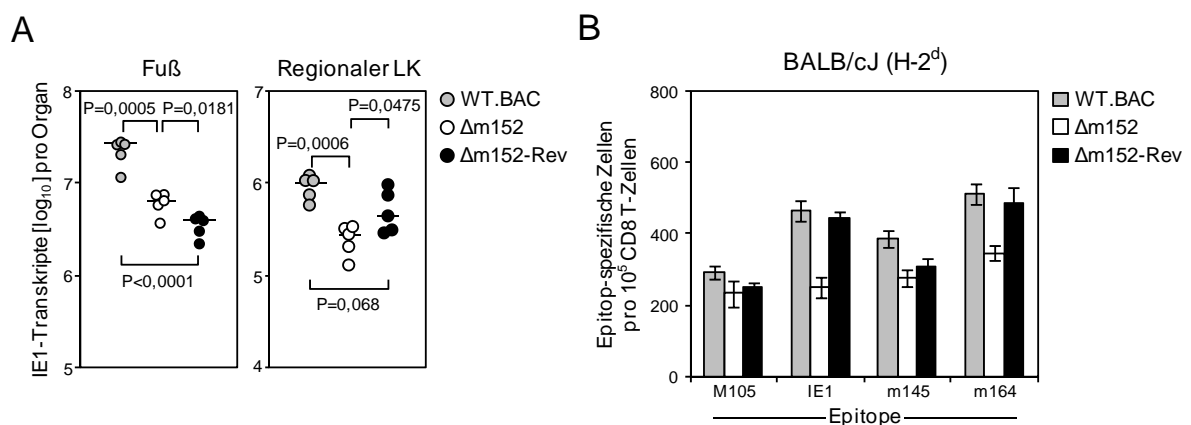


Abb. 4.15: Virale Genexpression und CD8 T-Zell-Priming im LK in Abhängigkeit von der m152-Expression. (A) Einfluss von m152 auf die virale Genexpression im Fuß und im drainierenden LK. Die Quantifizierung viraler IE1-Transkripte erfolgte 48h nach intraplantarer Infektion immunkompetenter BALB/c mit 1×10^5 PFU WT.BAC (graue Symbole), $\Delta m152$ (weiße Symbole) oder $\Delta m152$ -Rev (schwarze Symbole) mittels RT-qPCR. Die Symbole repräsentieren die Ergebnisse der Einzeltierbestimmungen, der Median ist als horizontaler Balken dargestellt. Für den Vergleich zweier Versuchsgruppen wurde der P-Wert mit dem ungleichen Varianz t-Test (Welch-Test) bestimmt. Ein P-Wert $<0,05$ zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an. (B) Einfluss von m152 auf das CD8 T-Zell-Priming im poplitealen LK. Die Zahl Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen wurde 7 Tage nach intraplantarer Infektion von jeweils 5 immunkompetenten BALB/c mit 1×10^5 PFU WT.BAC (graue Balken), $\Delta m152$ (weiße Balken) oder $\Delta m152$ -Rev (schwarze Balken) mit Hilfe eines IFN- γ ELISpot-Assays bestimmt. Die CD8 T-Zellen wurden immunomagnetisch separiert und durch APCs (P815: $H-2^d$), die in einer Endkonzentration von $10^{-7}M$ mit den entsprechenden synthetischen Peptiden beladen worden waren, stimuliert. Die Auswertung erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse durch die Statistik-Software Mathematica 8.0.4; das 95% Konfidenzintervall ist als Fehlerbalken dargestellt.

Im IFN- γ ELISpot-Assay wurden die Frequenzen Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen im drainierenden LK 7 Tage nach Infektion mit den angegebenen Viren bestimmt. Die Analyse zeigt wie erwartet nach Infektion mit $\Delta m152$ eine verringerte Zahl Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen im Vergleich zur Infektion mit WT.BAC oder $\Delta m152$ -Rev (Abb. 4.15, B). Auch dies korreliert mit den in Böhm *et al.* (2008) veröffentlichten Daten.

Fazit:

Ein verringertes Replikationspotential im LK, das nach Deletion von *m152* aufgrund der effizienteren CD8 T-Zell-Kontrolle erreicht wird, führt nicht zu einer Steigerung mCMV-spezifischer CD8 T-Zell-Frequenzen. Es ist vielmehr eine Reduktion der CD8 T-Zellantwort zu beobachten.

4.7.2 Einfluss des viralen IFN-Antagonisten M27 auf die akute Infektion

Um mit einem weiteren Ansatz nochmals abzusichern, dass die Verbesserung des mCMV-spezifischen CD8 T-Zell-*Primings* keine generelle Eigenschaft attenuierter Viren ist, sollte im folgenden Experiment das CD8 T-Zell-*Priming* nach Infektion mit einer Virusmutante, deren Replikationspotential nicht durch eine effizientere Immunkontrolle sondern durch die Deletion eines für die Virusreplikation essentiellen Gens verringert ist, analysiert werden. Hierfür wurde die Deletionsmutante mCMV- Δ M27 (Δ M27) verwendet, die unserem Institut zusammen mit der Revertante mCMV- Δ M27-Rev (Δ M27-Rev) freundlicherweise von Prof. Dr. Hartmut Hengel (Institut für Virologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) zur Verfügung gestellt wurde. M27 ist ein viraler Inhibitor der JAK/STAT-Signalkaskade, das durch Herabregulation von STAT2 auf das Typ I und II IFN-*Signaling* einwirkt (Zimmermann *et al.*, 2005). In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass das mCMV-Protein M27 für eine effiziente Virusreplikation *in vivo* essentiell ist (Abenes *et al.*, 2001; Zimmermann *et al.*, 2005). Im folgenden Versuch sollte geklärt werden, ob die Deletion von *M27* auch zu einer Verringerung der viralen Genexpression im poplitealen LK führt und infolgedessen Auswirkungen auf das mCMV-spezifische CD8 T-Zell-*Priming* hat.

Hierfür wurden jeweils 5 immunkompetente BALB/c-Mäuse intraplantar mit WT.BAC, Δ M27 und Δ M27-Rev infiziert und 48h nach Infektion wurde die Menge an IE1-Transkripten mittels RT-qPCR im infizierten Fuß und im drainierenden LK bestimmt. Die Menge an IE1-Transkripten im Fuß war nach Infektion in allen Gruppen vergleichbar (Abb. 4.16 A). Die Analyse im LK zeigt eine signifikante Reduktion der IE1-Transkriptmenge nach Infektion mit Δ M27 im Vergleich zu WT.BAC ($P=0,0058$), nämlich um ca. eine halbe log-Stufe. Ein Anstieg der IE1-Transkriptmenge auf WT-Niveau konnte nach Infektion mit der Revertante in diesem Experiment nicht erreicht werden ($P=0,0001$).

Für die Untersuchung des Einflusses von M27 auf die akute mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort wurden immunkompetente BALB/c-Mäuse intraplantar mit WT.BAC, Δ M27 und Δ M27-Rev infiziert und anschließend die Frequenzen Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen im drainierenden LK, 7 Tage nach Infektion, im IFN- γ ELISpot-Assay bestimmt. Der ELISpot-Assay zeigt nach Infektion mit Δ M27, für alle getesteten Epitope, um den Faktor 2-3 verringerte CD8 T-Zell-Frequenzen, (Abb. 4.16 B). Nach Infektion mit Δ M27-Rev war zwar

wieder ein Anstieg der CD8 T-Zell-Frequenzen erkennbar, diese konnten aber das WT-Niveau nicht ganz erreichen.

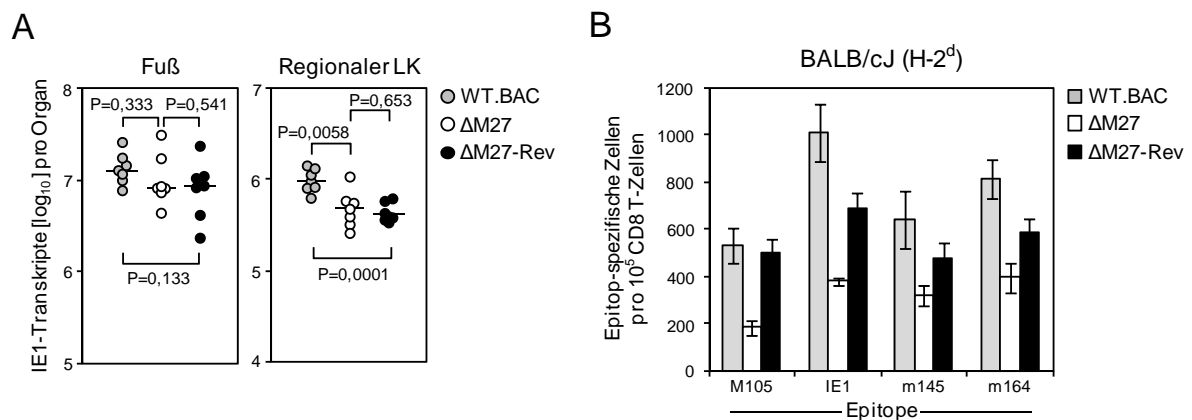


Abb. 4.16: Virale Genexpression und CD8 T-Zell-Priming im LK in Abhängigkeit von der M27-Expression. (A) Einfluss von M27 auf die virale Genexpression im Fuß und im drainierenden LK. Die Quantifizierung viraler IE1-Transkripte erfolgte 48h nach intraplantarer Infektion immunkompetenter BALB/c mit 1×10^5 PFU WT.BAC (graue Symbole), Δ M27 (weiße Symbole) oder Δ M27-Rev (schwarze Symbole) mittels RT-qPCR. Die Symbole repräsentieren die Ergebnisse der Einzeltierbestimmungen, der Median ist als horizontaler Balken dargestellt. Für den Vergleich zweier Versuchsgruppen wurde der P-Wert mit dem ungleichen Varianz t-Test (Welch-Test) bestimmt. Ein P-Wert $< 0,05$ zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an. (B) Einfluss von M27 auf das CD8 T-Zell-Priming im poplitealen LK. Die Zahl Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen wurde 7 Tage nach intraplantarer Infektion von jeweils 5 immunkompetenten BALB/c mit 1×10^5 PFU WT.BAC (graue Balken), Δ M27 (weiße Balken) oder Δ M27-Rev (schwarze Balken) im IFN- γ ELISpot-Assay bestimmt. Die CD8 T-Zellen wurden immunomagnetisch separiert und durch APCs (P815: H-2^d), die in einer Endkonzentration von 10^{-7} M mit den entsprechenden synthetischen Peptiden beladen worden waren, stimuliert. Die Auswertung Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse durch die Statistik-Software Mathematica 8.0.4; das 95% Konfidenzintervall ist als Fehlerbalken dargestellt.

Fazit:

Die Deletion von *M27* führt zu einer verminderten Virusreplikation im LK und demzufolge zu einer geringeren mCMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort. Dies impliziert eine Reduktion des CD8 T-Zell-Primings aufgrund der verminderten Virusreplikation.

4.7.3 Einfluss des viralen NK-Zell-Liganden m157 auf die akute Infektion

Um zu zeigen, dass eine gesteigerte mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort in der Regel mit einer erhöhten Virusreplikation einhergeht, sollte dies im folgenden Experiment durch die Deletion des NK-Zell-Liganden *m157*, der typischerweise zu einer starken NK-Zell-Kontrolle der mCMV-Infektion in der C57BL/6-Maus führt, untersucht werden. Das virale Protein *m157* dient auf der Oberfläche infizierter Zellen als aktivierender NK-Zell Ligand und interagiert mit dem NK-Zell Rezeptor Ly49H in der C57BL/6-Maus (Scalzo *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001). Diese Aktivierung der NK-Zellen ist in der BALB/c-Maus nicht möglich, da

deren NK-Zellen den Ly49H-Rezeptor nicht tragen (Brown *et al.*, 2001; Daniels *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion von m157 eine Aktivierung der NK-Zellen verhindert und zu einer Zunahme der Virulenz führt (Bubic *et al.*, 2004; Klenovsek *et al.*, 2007). Mitrovic *et al.* (2012) konnten außerdem zeigen, dass der Verlust der NK-Zell-Kontrolle über m157/Ly49H zu einer höheren viralen Antigenmenge im LK und dadurch zu einer gesteigerten CD8 T-Zellantwort in der C57BL/6-Maus führt. Dieser Befund sollte im Zuge der vorliegenden Arbeit noch einmal bestätigt werden. Hierfür wurde die Deletionsmutante mCMV- Δ m157luc (Δ m157) verwendet, die uns freundlicherweise von Prof. Dr. Martin Messerle (Medizinische Hochschule Hannover, Institut für Virologie) zur Verfügung gestellt wurde.

Für die Analyse der viralen Genexpression im drainierenden LK in An- oder Abwesenheit von m157 wurden jeweils 5 immunkompetente C57BL/6-Mäuse intraplantar mit WT.BAC oder Δ m157 infiziert und 48h nach Infektion wurde die Menge an IE1-Transkripten mittels RT-qPCR im infizierten Fuß und im drainierenden LK bestimmt.

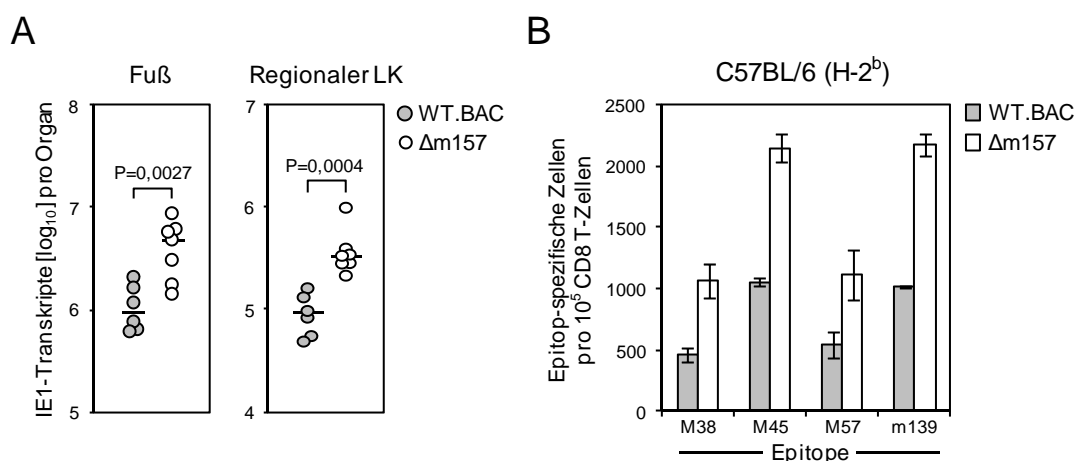


Abb. 4.17: Virale Genexpression und CD8 T-Zell-Priming im LK in Abhängigkeit von der m157-Expression. (A) Einfluss von m157 auf die virale Genexpression im Fuß und im drainierenden LK. Die Quantifizierung viraler IE1-Transkripte erfolgte 48h nach intraplantarer Infektion immunkompetenter C57BL/6 mit 1×10^5 PFU WT.BAC (graue Symbole) oder Δ m157 (weiße Symbole) mittels RT-qPCR. Die Symbole repräsentieren die Ergebnisse der Einzeltierbestimmungen, der Median ist als horizontaler Balken dargestellt. Für den Vergleich zweier Versuchsgruppen wurde der P-Wert mit dem ungleichen Varianz t-Test (Welch-Test) bestimmt. Ein P-Wert $< 0,05$ zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an. (B) Einfluss von m157 auf das CD8 T-Zell-Priming im poplitealen LK. Die Zahl Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen wurde 7 Tage nach intraplantarer Infektion von jeweils 5 immunkompetenten C57BL/6 mit 1×10^5 PFU WT.BAC (graue Balken) oder Δ m157 (weiße Balken) im IFN- γ ELISpot-Assay bestimmt. Die CD8 T-Zellen wurden immunomagnetisch separiert und durch APCs (EL4: H-2^b), die in einer Endkonzentration von 10^{-7} M mit den entsprechenden synthetischen Peptiden beladen worden waren, stimuliert. Die Auswertung Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse durch die Statistik-Software Mathematica 8.0.4; das 95% Konfidenzintervall ist als Fehlerbalken dargestellt.

Nach Infektion mit Δ m157 kommt es im Vergleich zu WT.BAC sowohl im Fuß als auch im regionalen LK zu einer Erhöhung der IE1-Transkriptmenge um etwa eine halbe log-Stufe

(Abb. 4.17 A). Der signifikante Anstieg der IE1-Transkriptmenge im Fuß ($P=0,0027$) bzw. im LK ($P=0,0004$) kann auf die verminderte NK-Zell-Kontrolle nach m157-Deletion zurückgeführt werden. Ein Vergleich der IE1-Transkriptmengen nach Infektion mit WT.BAC in der C57BL/6 bzw. BALB/c-Maus belegt die effiziente NK-Zell-Kontrolle der akuten mCMV-Infektion im C57BL/6 System. Während 48h nach Infektion der BALB/c-Maus im Fuß ca. 10^7 bzw. im LK ca. 10^6 IE1-Transkripte detektiert werden können (Abb. 4.3, 4.7, 4.8, 4.10 und 4.11), ist die IE1-Transkriptmenge in der C57BL/6-Maus jeweils um etwa eine log-Stufe verringert.

Um den Einfluss von m157 auf die akute mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort zu untersuchen, wurden immunkompetente C57BL/6-Mäuse intraplantar mit WT.BAC bzw. Δ m157 infiziert und 7 Tage nach Infektion wurde die Zahl Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen im drainierenden LK mit dem IFN- γ ELISpot-Assay bestimmt. Nach Infektion mit Δ m157 konnten für alle getesteten Epitope CD8 T-Zell-Frequenzen nachgewiesen werden, die im Vergleich zu WT.BAC um etwa den Faktor 2 erhöht waren (Abb. 4.17, B). Dieser Versuch bestätigt noch einmal die Befunde von Mitrovic *et al.* (2012).

Fazit:

Eine gesteigerte Virusreplikation aufgrund der Aufhebung der m157/Ly49H-induzierten NK-Zell-Kontrolle führt im LK zu einem verbesserten mCMV-spezifischen CD8 T-Zell-*Priming*.

Diese Befunde beweisen eindeutig, dass die Erhöhung der Frequenzen mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen nach Infektion mit Δ M36 oder M45-BamX keine generelle Eigenschaft replikationsdefekter Viren ist.

4.8 Analyse der CD8 T-Zellantwort in *Cross-Priming*-defizienten Mäusen

Ein vieldiskutiertes Thema bei der Analyse der Immunantwort gegen mCMV ist der Mechanismus des mCMV-spezifischen CD8 T-Zell-*Primings*. Bis heute konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob ein Großteil der antiviralen CD8 T-Zellantwort über direktes *Priming* oder über *Cross-Priming* initiiert wird. Arbeiten von Dr. Verena Böhm in unserer Arbeitsgruppe postulierten im Zuge des Modells der negativen *Feed-Back*-Regulation ein *Priming* durch *cross*-präsentierende APCs (Böhm *et al.*, 2008). Auch andere Arbeitsgruppen teilen die Auffassung, dass das initiale CD8 T-Zell-*Priming* nach mCMV-Infektion durch *Cross*-Präsentation dominiert wird (Snyder *et al.*, 2010; Torti *et al.*, 2011a; Busche *et al.*, 2013).

Um in der vorliegenden Arbeit den Einfluss des *Cross-Primings* auf die Initiation der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort untersuchen zu können, wurde die *Cross-Priming*-defiziente Unc93b1^{3d/3d} (3d)-Maus, die uns freundlicherweise von Prof. Dr. Melanie Brinkmann (Virale Immunmodulation, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung Braunschweig) zur Verfügung

gestellt wurde, verwendet. Die 3d-Maus (Haplotyp H-2^b) besitzt eine *Missense*-Mutation im *Unc93b1*-Gen, die ein *Signaling* über die intrazellulären TLR 3, 7 und 9 verhindert. Des Weiteren besitzt diese Maus einen Defekt in der Prozessierung von exogenen Antigenen und ist somit nicht in der Lage, diese über MHC-I oder -II zu präsentieren (Tabeta *et al.*, 2006; Janssen *et al.*, 2006). Neben einer unveränderten Entwicklung der lymphatischen Organe und einer normalen Zahl an peripheren CD4 und CD8 T-Zellen, B-Zellen und NK- sowie NKT-Zellen kann in dieser Maus auch von einer regulären MHC-I und -II Expression auf der Oberfläche Antigen-präsentierender Zellen ausgegangen werden (Tabeta *et al.*, 2006).

4.8.1 Einfluss von Apoptose auf die CD8 T-Zellantwort in Abwesenheit von Cross-Präsentation

Während der Apoptose kommt es zu einem geordneten Abbau der Zelle in kleine membranumhüllte Vesikel (*apoptotic bodies*). Diese apoptotischen Vesikel können von professionellen APCs (profAPC) aufgenommen und die darin enthaltenen Antigene über MHC-I *cross*-präsentiert werden (Albert *et al.*, 1998; Albert *et al.*, 2004; Blachere *et al.*, 2005). Falls die durch verstärkte Apoptose hervorgerufene Verbesserung des *Primings* nach Infektion mit Δ M36 (Abb. 4.6) auf der Aufnahme von *cross*-präsentierten Antigenen aus apoptotischen Vesikeln beruht, sollte dies in *Cross-Priming*-defizienten 3d-Mäusen nicht stattfinden. Um dies zu prüfen wurden 3d-Mäuse intraplantar mit Δ M36 oder Δ M36-Rev infiziert und die Frequenzen Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen im drainierenden LK und in der Milz 7 Tage nach Infektion im IFN γ -ELISpot-Assay bestimmt.

Im regionalen LK zeigt sich nach Infektion mit Δ M36 oder Δ M36-Rev für nahezu alle getesteten Epitope kein Unterschied in den CD8 T-Zell-Frequenzen (Abb. 4.18). Lediglich für die Peptide m139 bzw. m141 ist eine Zu- bzw. Abnahme der CD8 T-Zell-Frequenzen zu beobachten. In der Milz konnte nach Infektion mit der Revertante sogar eine Steigerung der CD8 T-Zellantwort für alle getesteten Epitope beobachtet werden. Dies verhält sich invers zu der Beobachtung in C57BL/6-Wildtyp Mäusen, die nach Infektion mit der Revertante geringere CD8 T-Zell-Frequenzen im Vergleich zur Infektion mit Δ M36 aufweisen (Abb. 4.13, B). Eine Veränderung der Epitop-Hierarchie konnte im Vergleich zu C57BL/6-Wildtyp nicht beobachtet werden.

Durch dieses Experiment konnte die Hypothese, dass die Infektion von *Cross-Priming*-defizienten Mäusen mit Δ M36 nicht zu einer gesteigerten CD8 T-Zellantwort führt, bestätigt werden. Dieser Befund impliziert im Umkehrschluss ein effizienteres CD8 T-Zell-*Priming* im Zuge der Δ M36-Infektion durch die verstärkte *Cross*-Präsentation von apoptotischem Material.

Es ist jedoch sehr auffallend, dass die Infektion von *Cross-Priming*-defizienten Mäusen mit mCMV sowohl im LK als auch in der Milz zu einer starken mCMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort führt, obwohl den für das *Priming* des Hauptanteils antiviraler CD8 T-Zellen verantwortlichen APCs die Fähigkeit zur *Cross-Präsentation* in der 3d-Maus fehlt. Dies lässt auf einen großen Einfluss der direkten Präsentation bei der Initiierung der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort schließen.

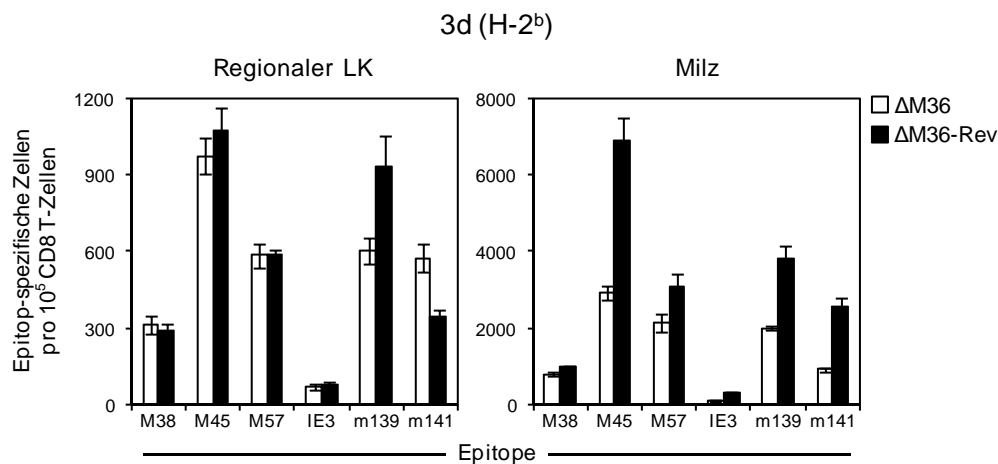


Abb. 4.18: Einfluss von M36 auf die akute CD8 T-Zellantwort in 3d-Mäusen. Die Zahl Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen wurde 7 Tage nach intraplantarer Infektion von jeweils 3 immunkompetenten 3d-Mäusen mit 1×10^5 PFU Δ M36 (weiße Balken) bzw. Δ M36-Rev (schwarze Balken) im IFN- γ ELISpot-Assay bestimmt. Die CD8 T-Zellen wurden immunomagnetisch separiert und durch APCs (EL4: H-2^b), die in einer Endkonzentration von 10^{-7} M mit den entsprechenden synthetischen Peptiden beladen worden waren, stimuliert. Die Auswertung Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse durch die Statistik-Software Mathematica 8.0.4; das 95% Konfidenzintervall ist als Fehlerbalken dargestellt.

In einem Folgeexperiment sollte die Hypothese, dass die Infektion von *Cross-Priming*-defizienten Mäusen mit Δ M36 nicht zu einer gesteigerten CD8 T-Zellantwort führt, bestätigt werden. Hierfür wurden 3d-Mäuse intraplantar mit Δ M36 oder Δ M36-FADD^{DN} infiziert und die Zahl Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen aus dem drainierenden LK, der Milz und der Lunge 7 Tage nach Infektion im IFN- γ ELISpot-Assay bestimmt.

Der vorherige Befund (Abb. 4.18) konnte in diesem Experiment nach Infektion mit Δ M36 und der funktionellen Revertante Δ M36-FADD^{DN} bestätigt werden. Während die CD8 T-Zell-Frequenzen im drainierenden LK für alle Epitope nahezu gleich waren, konnte in der Milz wiederum eine gesteigerte CD8 T-Zellantwort nach Infektion mit Δ M36-FADD^{DN} im Vergleich zur Δ M36-Infektion beobachtet werden. Die mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort war nach Infektion mit Δ M36 und Δ M36-FADD^{DN} in der Lunge ungefähr vergleichbar, wobei eine Tendenz für höhere CD8 T-Zell-Frequenzen nach Infektion mit der Revertante erkennbar war.

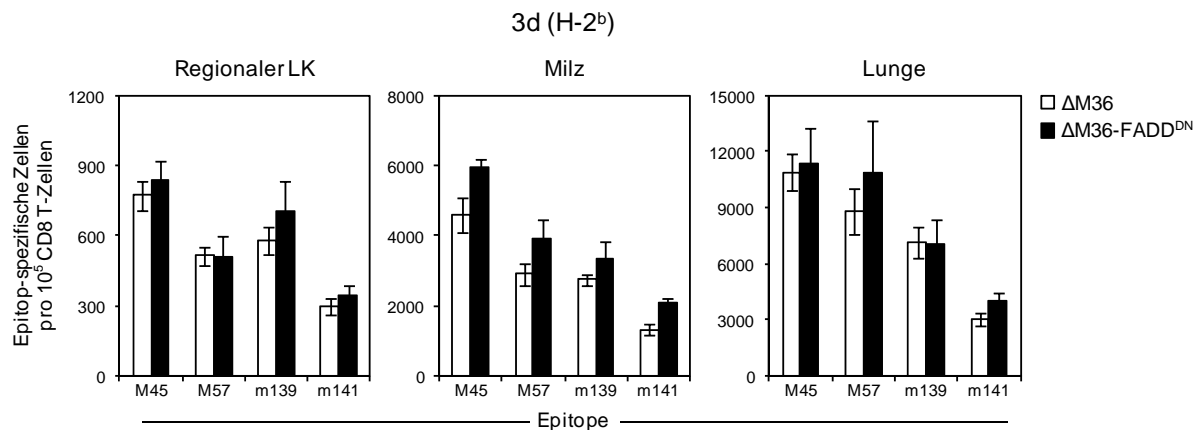


Abb. 4.19: Einfluss von M36 auf die akute CD8 T-Zellantwort in 3d-Mäusen. Die Zahl Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen wurde 7 Tage nach intraplantarer Infektion von jeweils 4 3d-Mäusen mit 1×10^5 PFU $\Delta M36$ (weiße Balken) oder $\Delta M36$ -FADD^{DN} (schwarze Balken) im IFN- γ ELISpot-Assay bestimmt. Die CD8 T-Zellen wurden immunomagnetisch separiert und durch APCs (EL4: H-2^b), die in einer Endkonzentration von 10^{-7} M mit den entsprechenden synthetischen Peptiden beladen worden waren, stimuliert. Die Auswertung Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse durch die Statistik-Software Mathematica 8.0.4; das 95% Konfidenzintervall ist als Fehlerbalken dargestellt.

Fazit:

Die Befunde in der 3d-Maus weisen überraschenderweise auf einen großen Einfluss von direktem *Priming* nach mCMV-Infektion hin, der bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde. Des Weiteren impliziert die Verwendung von *Cross-Priming*-defizienten Mäusen, dass das in WT-Mäusen verbesserte CD8 T-Zell-*Priming* nach Infektion mit $\Delta M36$ durch die *Cross*-Präsentation von zusätzlichem, durch die Apoptose zur Verfügung gestelltem Material hervorgerufen wird.

4.8.2 Einfluss von Nekroptose auf die CD8 T-Zellantwort in Abwesenheit von *Cross*-Präsentation

Im Gegensatz zur Apoptose führt die Nekroptose durch die Auflösung der infizierten Zelle in nicht membranumhüllte Vesikel (Debris) zur Freisetzung von *damage associated molecular patterns* (DAMPs) und viralen Produkten, die eine Entzündungsreaktion auslösen können. Da neben der Apoptose auch die Induktion von Nekroptose zu einem effizienteren CD8 T-Zell-*Priming* führt (Abb. 4.12, B) und in der Literatur ebenfalls beschrieben ist, dass nekroptotische Zelltrümmer durch profAPCs *cross*-präsentiert werden können (Krysko *et al.*, 2003; Krysko *et al.*, 2006; Andersen und Ohlfest, 2012; Buckwalter und Srivastava, 2013; Kaczmarek *et al.*, 2013), sollte im folgenden Experiment untersucht werden, ob auch nach Infektion mit M45-BamX ein verbessertes CD8 T-Zell-*Priming* in *Cross-Priming*-defizienten Mäusen aus bleibt.

Hierfür wurden 3d-Mäuse intraplantar mit M45-BamX oder M45-BamX-Rev infiziert und die Zahl Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen im drainierenden LK, der Milz und der Lunge 7 Tage nach Infektion im ELISpot-Assay bestimmt.

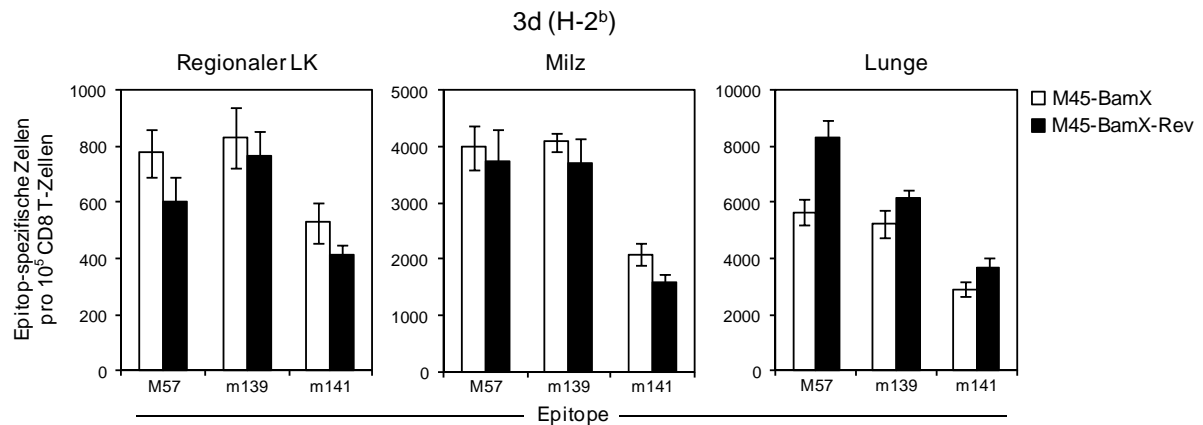


Abb. 4.20: Einfluss von M45 auf die akute CD8 T-Zellantwort in 3d-Mäusen. Die Zahl Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen wurde 7 Tage nach intraplantarer Infektion von jeweils 4 3d-Mäusen mit 1×10^5 PFU M45-BamX (weiße Balken) bzw. M45-BamX-Rev (schwarze Balken) im IFN- γ ELISpot-Assay bestimmt. Die CD8 T-Zellen wurden immunomagnetisch separiert und durch APCs (EL4: H-2^b), die in einer Endkonzentration von 10^{-7} M mit den entsprechenden synthetischen Peptiden beladen worden waren, stimuliert. Die Auswertung Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse durch die Statistik-Software Mathematica 8.0.4; das 95% Konfidenzintervall ist als Fehlerbalken dargestellt.

Im drainierenden LK und in der Milz konnte nach Infektion mit M45-BamX sowie M45-BamX-Rev für alle getesteten Epitope vergleichbare CD8 T-Zell-Frequenzen beobachtet werden (Abb. 4.20). Im Gegensatz zur Infektion mit Δ M36-Rev sowie Δ M36-FADD^{DN} (Abb. 4.18 bzw. 4.19) konnte nach Infektion mit der M45-Revertante jedoch keine gesteigerte CD8 T-Zellantwort in der Milz festgestellt werden. In der Lunge sind nach Infektion mit der M45-Revertante die mCMV-spezifischen CD8 T-Zell-Frequenzen erhöht, was mit der Tendenz nach Infektion mit Δ M36-FADD^{DN} (Abb. 4.19) übereinstimmt.

Fazit:

Auch die Induktion von Nekroptose führte in *Cross-Priming*-defizienten 3d-Mäusen zu keiner Steigerung der mCMV-spezifischen CD8 T-Zell-Frequenzen, wie es auch nach Induktion von Apoptose in diesen Mäusen gezeigt werden konnte.

4.9 Einfluss von Apoptose auf den CD8 *Memory*-T-Zell-Pool

Eine primäre mCMV-Infektion wird im immunkompetenten Wirt sehr schnell durch eine effiziente antivirale CD8 T-Zellantwort kontrolliert, die auch nach Abklingen der akuten Infektion im latent infizierten Wirt erhalten bleibt. Die CD8 T-Zell-Proliferation geht nach Kontrolle der produktiven Infektion in eine Kontraktionsphase mit abnehmender Zahl Epitop-spezifischer CD8 *Memory*-T-Zellen über (Klenermann und Dunbar, 2008). Aufgrund der transkriptionellen Aktivität des latent vorliegenden Genoms kommt es im Zuge der sog. *Memory-Inflation* (Holtappels *et al.*, 2002b; Karrer *et al.*, 2003; Munks *et al.*, 2006a; Seckert *et al.*, 2011) zu einer wiederholten Stimulation der CD8 T-Zellantwort, die zu einer Reexpansion einzelner CD8 T-Zell-Spezifitäten führt. Dies kann zu einer Veränderung des Immundominanzmusters der CD8 T-Zell-Spezifitäten führen, wie es vor allem für den Haplotyp H-2^b beschrieben ist (Munks *et al.*, 2006a).

In der vorliegenden Arbeit konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass die gesteigerten Frequenzen Δ M36-geprimter CD8 T-Zellen nach akuter Infektion durch die *Cross*-Präsentation von zusätzlichem, durch die Apoptose zur Verfügung gestelltem Material hervorgerufen werden. Da Seckert und Kollegen in unserer Arbeitsgruppe zeigen konnten, dass *Memory-Inflation* wahrscheinlich auf direkter Antigenpräsentation beruht (Seckert *et al.*, 2011), was auch durch Arbeiten von Torti und Kollegen bestätigt werden konnte (Torti *et al.*, 2011a, b), sollte der Einfluss der Apoptose auf die Etablierung der mCMV-spezifischen CD8 *Memory*-T-Zellantwort untersucht werden.

4.9.1 Einfluss von M36 auf die CD8 T-Zell-Frequenzen in der *Memory*-Phase

Um den Einfluss des viralen anti-apoptotischen Proteins M36 auf die mCMV-spezifische CD8 *Memory*-T-Zellantwort zu analysieren, wurden immunkompetente BALB/c-Mäuse intraplantar mit WT.BAC, Δ M36 oder Δ M36-FADD^{DN} infiziert und die Frequenzen Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen zu definierten Zeitpunkten nach Infektion (Woche 8, 12 und 24; bzw. Monat 21) in der Milz im IFN- γ ELISpot-Assay bestimmt.

Während die Frequenzen mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen 8 Wochen nach Infektion mit Δ M36 im Vergleich zur Infektion mit WT.BAC noch erhöht sind, kommt es 12 und 24 Wochen nach Infektion zu einer Angleichung der CD8 T-Zell-Frequenzen (Abb. 4.21, A). Lediglich für das M105-Epitop konnte 24 Wochen nach Δ M36-Infektion immer noch eine erhöhte CD8 T-Zellantwort zu beobachten werden. Dies lässt vermuten, dass aufgrund der fehlenden produktiven Infektion in der Latenz kein zusätzliches, durch die Apoptose zur Verfügung gestelltes Material für *Cross-Priming* zur Verfügung steht und demnach *Memory-Inflation* auf direkter Antigenpräsentation basiert.

Im Gegensatz dazu ist 21 Monate nach Infektion eine deutliche Reduktion der CD8 T-Zell-Frequenzen nach Infektion mit $\Delta M36$ zu beobachten, während nach Infektion mit WT.BAC oder der funktionellen Revertante ($\Delta M36$ -FADD^{DN}) die CD8 T-Zell-Frequenzen dem für die CD8 *Memory*-T-Zellantwort bekannten Muster entsprechen (Abb. 4.21, B) Dies lässt auf eine unzureichende Latenzetablirung von $\Delta M36$ schließen.

Die für den Haplotyp H-2^d typische Reexpansion der CD8 *Memory*-T-Zell-Spezifitäten (*Memory-Inflation*) gegen die Epitope IE1 und m164 (Holtappels *et al.*, 2002b; Karrer *et al.*, 2003, Seckert *et al.*, 2011) ist sowohl 24 Wochen als auch 21 Monate nach Infektion deutlich sichtbar.

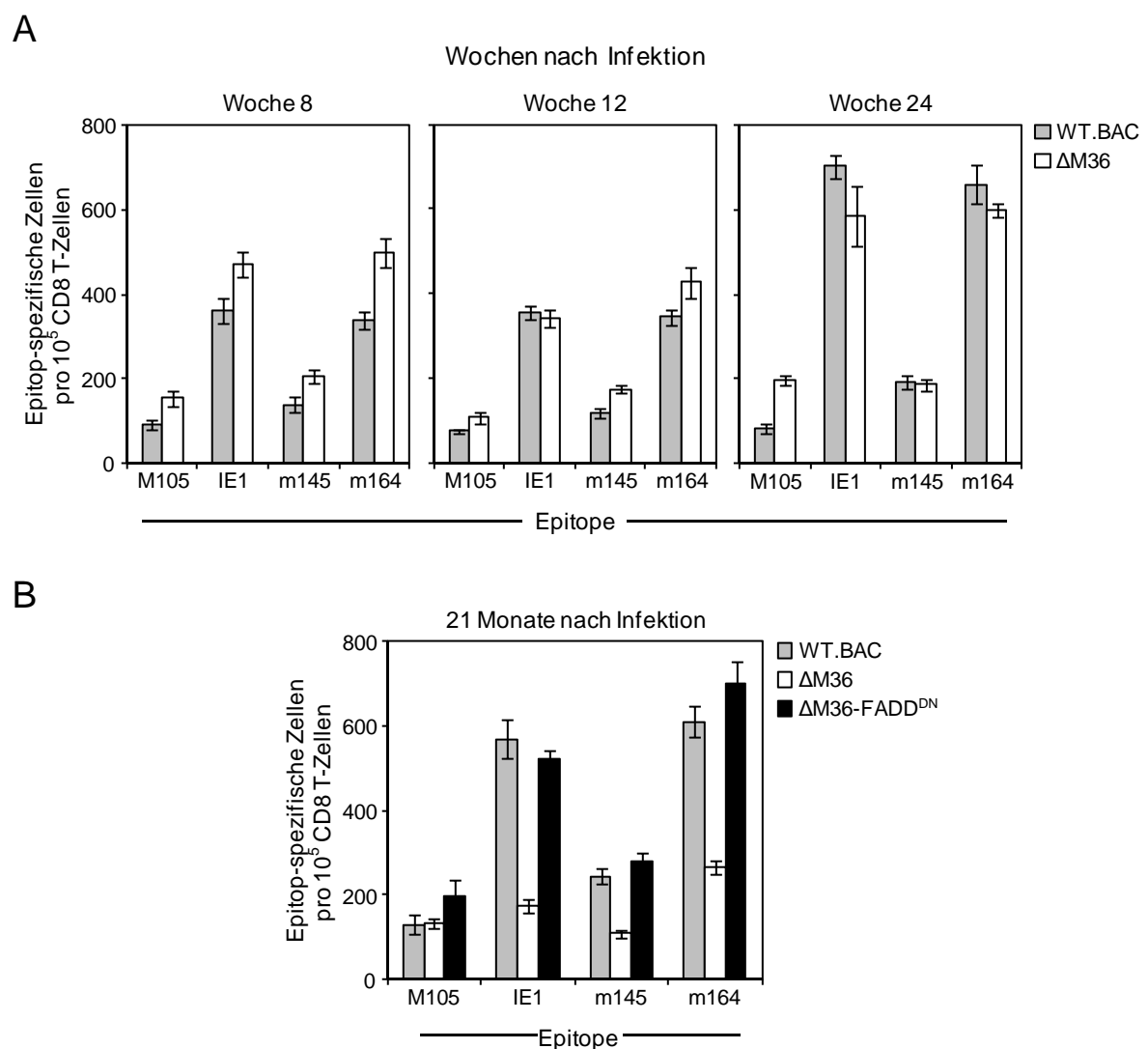


Abb. 4.21: Kinetik der CD8 *Memory*-T-Zellantwort in Abhängigkeit von der M36-Expression. Nach intraplantarer Infektion von jeweils 3 immunkompetenten BALB/c-Mäusen mit 1×10^5 PFU WT.BAC (graue Balken), $\Delta M36$ (weiße Balken) oder $\Delta M36$ -FADD^{DN} (schwarze Balken) wurde die Zahl Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen im IFN- γ ELISpot-Assay bestimmt. Die CD8 T-Zellen wurden immunomagnetisch separiert und durch APCs (P815: H-2^d), die in einer Endkonzentration von 10^{-7} M mit den entsprechenden synthetischen Peptiden beladen worden waren, stimuliert. Die Auswertung Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse durch die Statistik-Software Mathematica 8.0.4; das 95% Konfidenzintervall ist als Fehlerbalken dargestellt.

Aktuell werden Epitop-spezifische CD8 T-Zellen, die anhand von Oberflächenmarker charakterisiert werden, hauptsächlich in EECs (*early effector cells*), SLECs (*short-lived-effector cells*), T_{EM} (*effector-memory cells*) und T_{CM} (*central-memory cells*) unterteilt (Obar und Lefrancois, 2010a, b). Daten in unserer Arbeitsgruppe (Doktorarbeit Marion Grießl „Charakterisierung der Latenz des murinen Cytomegalovirus *in vivo*“) lassen vermuten, dass *Memory-Inflation* nicht auf einen Anstieg Epitop-spezifischer CD8 *Memory*-T-Zellen (T_{EM}, *effector-memory cells*; T_{CM}, *central-memory cells*) zurückzuführen ist, sondern durch ein Ansteigen der SLECs verursacht wird. Demnach beruht die Reduktion der Epitop-spezifischen CD8 T-Zell-Frequenzen 21 Monate nach Infektion wahrscheinlich auf einem Ausfall der SLECs.

Fazit:

Die nach akuter Infektion mit Δ M36 beobachteten gesteigerten Frequenzen mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen werden im Zuge der CD8 *Memory*-T-Zellantwort nivelliert. Eine unzureichende Latenzetablierung von Δ M36 und demzufolge ein Ausfall der SLECS ist möglicherweise für die Reduktion mCMV-spezifischer CD8 T-Zell-Frequenzen verantwortlich.

4.9.2 Analyse des genomweiten CD8 *Memory*-T-Zellepitop-Repertoires in An- oder Abwesenheit von M36

Um einen möglichen Einfluss von M36 auf das gesamte mCMV-spezifische CD8 *Memory*-T-Zell-Immuno zu analysieren, wurde wie unter 4.6 beschrieben die mCMV-ORF-*Library* verwendet. Für diese Repertoire-Analysen wurden immunkompetente BALB/c-Mäuse intraplantar mit WT.BAC bzw. Δ M36 infiziert und 22 Monate nach Infektion ein *Pool* aus Milzzellen als Effektoren für den Assay verwendet.

Das ORF-*Library*-*Screening* zeigte nach Infektion mit WT.BAC die für den Wildtyp bekannten mCMV-spezifischen CD8 *Memory*-T-Zell-Frequenzen (m123/IE1 und m164) mit einem typischen Immundominanzmuster (Abb. 4.22). Dies konnte anhand der Kontrolle mit synthetischem Peptid bestätigt werden. Die Epitop-Repertoire-Analyse nach Infektion mit Δ M36 zeigte dagegen eine deutliche Reduktion der CD8 T-Zell-Frequenzen für die Epitope m123/IE1 und m164 und konnte die ELISpot-Daten aus dem vorhergehenden Experiment bestätigen.

Fazit:

Eine Reduktion der mCMV-spezifischen CD8 T-Zell-Frequenzen konnte nach Infektion mit Δ M36 im ORF-*Library*-*Screening* bestätigt werden.

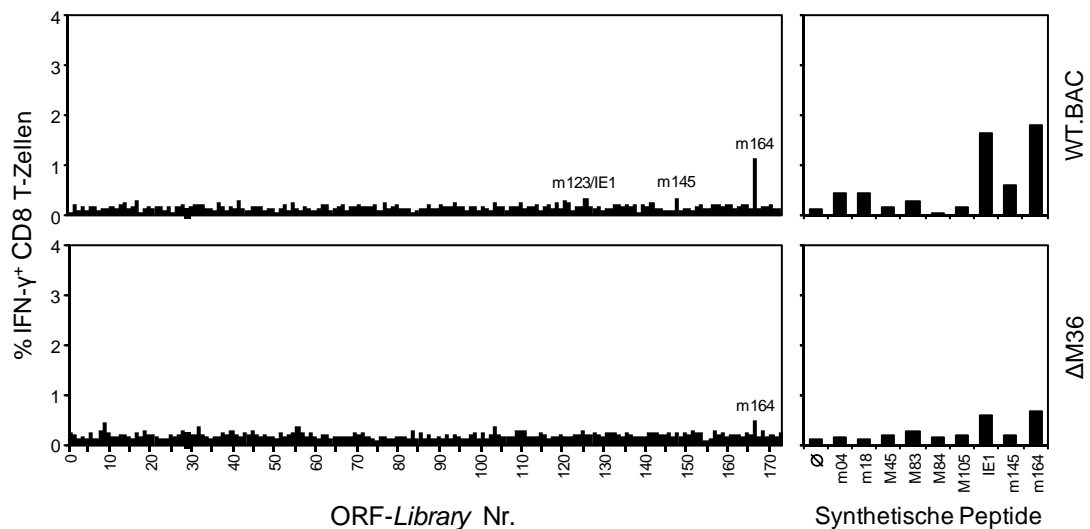


Abb. 4.22: mCMV-spezifisches CD8 *Memory*-T-Zellepitop-Repertoire in Abhängigkeit von der M36-Expression. Die Frequenzen mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen wurden 22 Monate nach intraplantarer Infektion von jeweils 7 immunkompetenten BALB/c mit 1×10^5 PFU WT.BAC bzw. Δ M36 mittels intrazellulärem IFN- γ *Staining* zytofluorometrisch aus *ex vivo* isolierten Milzzellen bestimmt. Als Stimulatorzellen dienten SV40-transformierte Fibroblasten (Haplotyp: H-2^d), die mit jeweils einem der 170 vorhergesagten ORF (siehe Anhang, 7.1) tragenden Expressionsplasmiden transient transfiziert worden waren. Als Kontrolle wurden die Milzzellen parallel dazu mit den 9 bekannten synthetischen mCMV-Peptiden mit der optimierten Konzentration von 10^{-6} M stimuliert.

4.10 Einfluss des anti-apoptischen Proteins M36 auf das protektive Potential adoptiv transferierter mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen

Das protektive Potential von CD8 T-Zellen aus mCMV-*geprimten* Mäusen konnte im immunsupprimierten Wirt bereits vor über 20 Jahren in verschiedenen experimentellen Ansätzen nachgewiesen werden (Reddehase *et al.*, 1985; Reddehase *et al.*, 1987a/b, Reddehase *et al.*, 1988). In der vorliegenden Arbeit konnte klar gezeigt werden, dass die Infektion mit Δ M36 in der immunkompetenten Maus zu gesteigerten Frequenzen mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen führt und zudem das CD8 T-Zellepitop-Repertoire erweitert. Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob das verbesserte CD8 T-Zell-*Priming* auch zu einem Anstieg des protektiven Potentials Δ M36-*geprimter* CD8 T-Zellen führt. Hierfür wurde das experimentelle System des adoptiven CD8 T-Zell-Transfers verwendet (Abb. 4.23). Dieses Experimentalmodell beruht auf der Rekonstitution der CD8 T-Zell-Kontrolle im immunsupprimierten Rezipienten durch den adoptiven Transfer *ex vivo* isolierter, akut *geprimter* CD8 T-Zellen (siehe 3.2.7). Die Gabe der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellen erfolgte entweder unmittelbar vor Infektion (präventiv) oder 6 Tage nach Infektion (therapeutisch) der durch Bestrahlung immunsupprimierten Rezipienten.

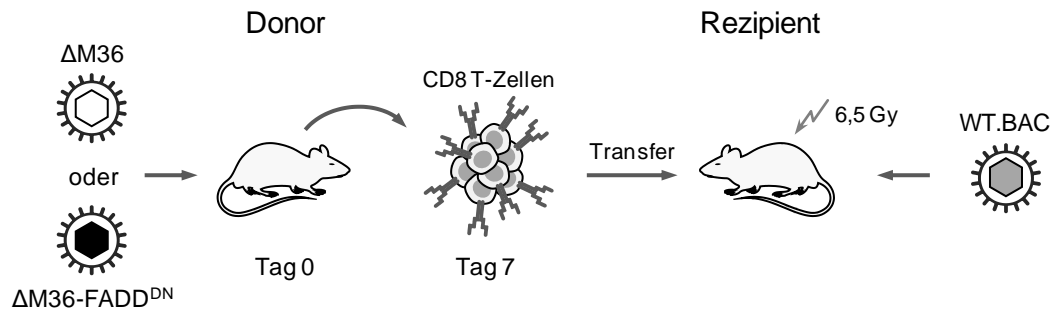


Abb. 4.23: Experimentelles System zur Analyse des protektiven Potentials akut *geprimter* CD8 T-Zellen im adoptiven Transfer-Modell. 7 Tage nach intraplantarer Infektion der BALB/c-Donortiere mit $\Delta M36$ oder $\Delta M36-FADD^{DN}$ wurden deren Milzen entnommen und daraus die CD8 T-Zellen immunomagnetisch isoliert. Anschließend wurden die *ex vivo* isolierten CD8 T-Zellen in durch Bestrahlung immunsupprimierte und WT.BAC infizierte BALB/c-Rezipienten übertragen. Der Transfer der CD8 T-Zellen erfolgte entweder unmittelbar vor der Infektion (präventiv) oder 6 Tage nach Infektion (therapeutisch).

In diesem Transfer-Modell mit anschließender Infektion der Rezipienten kann davon ausgegangen werden, dass andere Immunzellen wie z.B. NK- oder B-Zellen für die Kontrolle der Infektion vernachlässigbar sind, da eine Rekonstitution dieser Populationen nach der Immunsuppression durch Bestrahlung noch nicht stattgefunden hat.

Mit Hilfe des adoptiven Transfer-Modells sollte das protektive Potential mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen, die in An- ($\Delta M36-FADD^{DN}$) bzw. Abwesenheit ($\Delta M36$) des anti-apoptotischen Proteins M36 *geprimt* wurden, verglichen werden.

4.10.1 Präventiver Transfer antiviraler CD8 T-Zellen in Abhängigkeit von M36

Zunächst sollte im präventiven Transfer-Modell untersucht werden, ob das verbesserte CD8 T-Zell-*Priming* auch zu einem Anstieg des protektiven Potentials mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen führt. Hierfür wurden immunkompetente BALB/c-Mäuse mit $\Delta M36$ bzw. $\Delta M36-FADD^{DN}$ infiziert und 7 Tage nach Infektion die Milzen entnommen und die CD8 T-Zellen *ex vivo* isoliert. Die CD8 T-Zellen wurden in verschiedenen Konzentrationen von 1×10^3 - $1,25 \times 10^5$ in bestrahlte Rezipienten i.v. injiziert und die Mäuse anschließend mit WT.BAC intraplantar infiziert. Das protektive Potential der antiviralen CD8 T-Zellpopulationen wurde durch Bestimmen der Virustiter in Lunge und Milz sowie durch Quantifizieren der infizierten Hepatozyten in der Leber ermittelt. Als Kontrolle dienten bestrahlte und infizierte Rezipienten ohne CD8 T-Zell-Transfer.

Die in Abb. 4.24, A gezeigten Ergebnisse weisen in Lunge und Milz auf ein vergleichbares protektives Potential der beiden transferierten mCMV-spezifischen CD8 T-Zellpopulationen hin. In diesen beiden Organen war erst nach Transfer von $1,25 \times 10^5$ CD8 T-Zellen eine signifikante Reduktion der Virustiter und damit eine Kontrolle der Infektion nachweisbar.

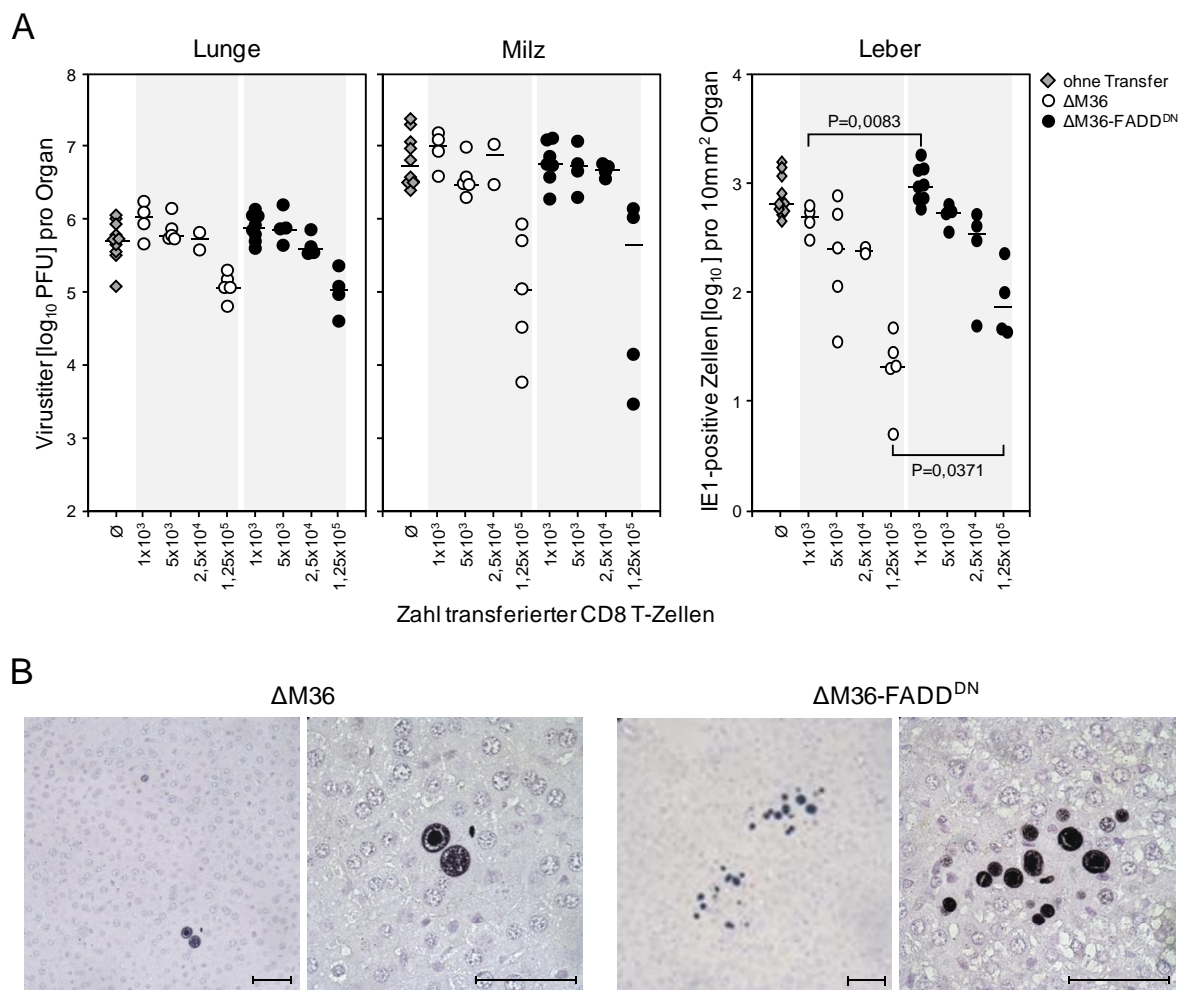


Abb. 4.24: Einfluss von M36 auf das protektive Potential akut *geprimter* CD8 T-Zellen im präventiven Transfer-Modell. Als Donoren wurden jeweils 5 immunkompetente BALB/c intraplantär mit 1×10^5 PFU ΔM36 bzw. $\Delta\text{M36-FADD}^{\text{DN}}$ infiziert und die CD8 T-Zellen 7 Tage nach Infektion aus der Milz immunomagnetisch separiert. Die *ex vivo* isolierten CD8 T-Zellen wurden in den angegebenen Konzentrationen in immunsupprimierte (Bestrahlung: 6,5Gy) BALB/c-Rezipienten i.v. transferiert. Anschließend erfolgte die intraplantäre Infektion der Rezipienten mit 1×10^5 PFU WT.BAC. Als Kontrolle dienten bestrahlte und mit WT.BAC infizierte Rezipienten ohne CD8 T-Zell-Transfer (\emptyset). (A) Die Virustiter in Lunge und Milz wurden mittels Plaque-Assay bestimmt, während die Zahl infizierter Zellen in der Leber mittels IE1-spezifischer Immunhistochemie ermittelt wurde. Die Symbole repräsentieren die Ergebnisse der Einzeltierbestimmungen am Tag 10 nach Infektion: Rezipienten ohne CD8 T-Zell-Transfer (graue Rauten), Transfer von $\Delta\text{M36-geprimten}$ (weiße Kreise) oder $\Delta\text{M36-FADD}^{\text{DN-geprimten}}$ (schwarze Kreise) CD8 T-Zellen. Der Median ist als horizontaler Balken dargestellt. (B) Repräsentativer Ausschnitt der Lebergewebeschnitte. Gezeigt sind IE1-positive Zellkerne (schwarz) nach Transfer von $1,25 \times 10^5$ $\Delta\text{M36-geprimten}$ oder $\Delta\text{M36-FADD}^{\text{DN-geprimten}}$ CD8 T-Zellen. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Die Marker repräsentieren $50\mu\text{m}$.

In der Leber zeigten bereits 1×10^3 transferierte und $\Delta\text{M36-geprimte}$ CD8 T-Zellen ein protektives Potential; im Vergleich zu $\Delta\text{M36-FADD}^{\text{DN-geprimten}}$ CD8 T-Zellen konnte hier ein signifikanter Unterschied ($P=0,0083$) in der Viruskontrolle nachgewiesen werden. Nach Transfer von 5×10^3 sowie $2,5 \times 10^4$ CD8 T-Zellen ist tendenziell ein besseres protektives Potential $\Delta\text{M36-geprimter}$ CD8 T-Zellen erkennbar, der Unterschied war jedoch nicht

signifikant. Bei einer Konzentration von $1,25 \times 10^5$ transferierten CD8 T-Zellen konnte wieder ein signifikant besserer Schutz $\Delta M36$ -geprimter CD8 T-Zellen ($P=0,0371$) beobachtet werden, was auch anhand von Lebergewebeschnitten erkennbar war (Abb. 4.24, B).

Fazit:

Der präventive Transfer $\Delta M36$ -geprimter CD8 T-Zellen führt in der Leber zu einer Verbesserung des protektiven Potentials gegenüber $\Delta M36$ -FADD^{DN}-geprimten CD8 T-Zellen.

4.10.2 Therapeutischer Transfer antiviraler CD8 T-Zellen in Abhängigkeit von M36

Da der präventive Transfer in Abwesenheit von M36 geprimter CD8 T-Zellen in der Leber einen Vorteil im protektiven Potential bietet, sollte in einem weiteren Transfer-Experiment geklärt werden, ob durch eine therapeutische Gabe $\Delta M36$ - oder $\Delta M36$ -FADD^{DN}-geprimter CD8 T-Zellen auch in anderen Organen ein signifikanter Unterschied in der Viruskontrolle nachweisbar ist.

Da vor dem therapeutischen Transfer von potentiell schützenden CD8 T-Zellen die mCMV-Infektion bereits etabliert ist, muss erfahrungsgemäß für einen ausreichenden Schutz eine 10-fach höhere Zahl an CD8 T-Zellen verabreicht werden (Reddehase *et al.*, 1985). Basierend auf diesen Befunden wurden 6 Tage nach Bestrahlung und Infektion der Rezipienten mit WT.BAC 1×10^5 , 1×10^6 und 1×10^7 CD8 T-Zellen aus $\Delta M36$ - oder $\Delta M36$ -FADD^{DN}-infizierten Donoren transferiert. Die Effizienz der Viruskontrolle beider CD8 T-Zellpopulationen wurde in Lunge, Milz, Speicheldrüse und Leber im Plaque-Assay ermittelt. Zusätzlich wurde die Zahl infizierter Hepatozyten in der Leber mit einer IE1-spezifischen Immunhistochemie nachgewiesen. Als Kontrollgruppe dienten wiederum bestrahlte und infizierte Rezipienten ohne CD8 T-Zell-Transfer.

Die Ergebnisse des therapeutischen CD8 T-Zell-Transfers (Abb. 4.25) zeigen in Lunge, Milz und Speicheldrüse erst ab einem Transfer von 1×10^7 mCMV-spezifischen CD8 T-Zellen einen deutlichen Schutzeffekt. In der Leber konnte bereits durch 1×10^3 transferierte und $\Delta M36$ -geprimte CD8 T-Zellen Schutz induziert werden; im Vergleich zu $\Delta M36$ -FADD^{DN}-geprimten CD8 T-Zellen konnte wie beim präventiven Transfer bei dieser Konzentration ein signifikanter Unterschied ($P=0,003$) in der Viruskontrolle nachgewiesen werden. Eine Tendenz dieses Unterschieds konnte auch bei der Virustiterbestimmung in der Leber beobachtet werden.

Fazit:

Eine effektivere Viruskontrolle $\Delta M36$ -geprimter CD8 T-Zellen aufgrund eines verbesserten CD8 T-Zell-Primings konnte nach therapeutischem Transfer in der Leber nur bedingt nachgewiesen werden.

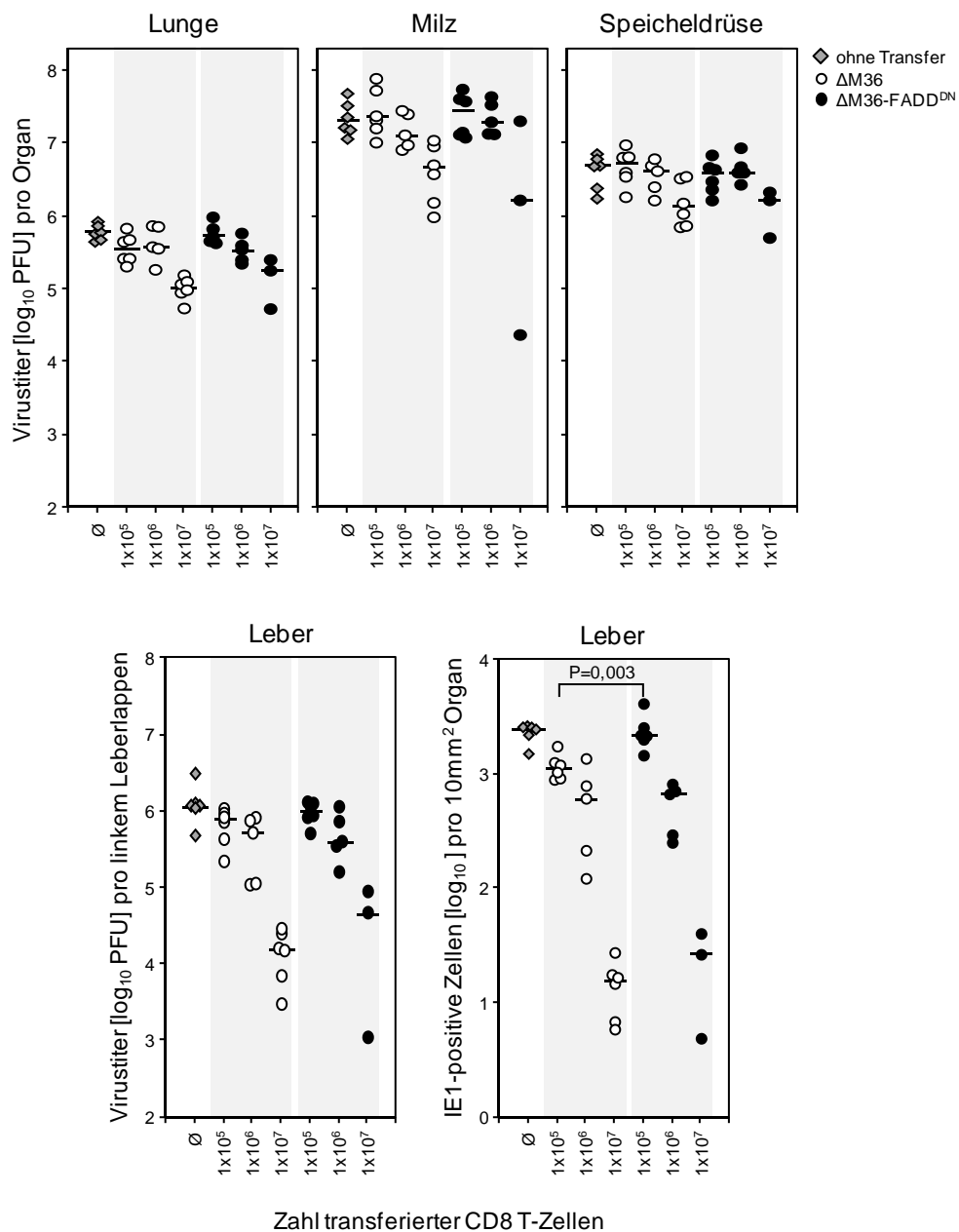


Abb. 4.25: Einfluss von M36 auf das protektive Potential akut *geprimter* CD8 T-Zellen im therapeutischen Transfer-Modell. CD8 T-Zellen wurden 7 Tage nach intraplantarer Infektion mit 1×10^5 PFU $\Delta M36$ bzw. $\Delta M36\text{-FADD}^{\text{DN}}$ aus der Milz von jeweils 20 immunkompetenten BALB/c immunomagnetisch isoliert. Die CD8 T-Zellen wurden anschließend in den angegebenen Konzentrationen in immunsupprimierte (Bestrahlung: 6,5Gy) mit 1×10^5 PFU WT.BAC infizierte BALB/c-Rezipienten am Tag 6 nach Infektion i.v. transferiert. Als Kontrolle dienten bestrahlte und mit WT.BAC infizierte Rezipienten ohne CD8 T-Zell-Transfer (\emptyset). Die Virustiter in Lunge, Milz, Speicheldrüse und dem linken Leberlappen wurden im Plaque-Assay bestimmt, während die Zahl infizierter Zellen im Rest der Leber mittels IE1-spezifischer Immunhistochemie ermittelt wurde. Die Symbole repräsentieren die Ergebnisse der Einzeltier-bestimmungen am Tag 11 nach Infektion: Rezipienten ohne CD8 T-Zell-Transfer (graue Rauten), Transfer von $\Delta M36$ -*geprimten* (weiße Kreise) oder $\Delta M36\text{-FADD}^{\text{DN}}$ -*geprimten* (schwarze Kreise) CD8 T-Zellen. Der Median ist als horizontaler Balken dargestellt.

4.11 Einfluss des anti-apoptotischen Proteins M36 auf das protektive Potential mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen im *Challenge*-Modell

Da es im Modell des adoptiven CD8 T-Zell-Transfers in immunsupprimierte Rezipienten nur in der Leber gelungen war einen Unterschied im protektiven Potential Δ M36- bzw. Δ M36-FADD^{DN}-geprimter CD8 T-Zellen nachzuweisen, sollte ein weiteres Modell etabliert werden, das die Analyse des protektiven Potentials mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen in der immunkompetenten Maus erlaubt. Dieses experimentelle System basiert auf einem akuten Infektionsmodell, in dem 7 Tage nach Primärinfektion eine *Challenge*-Infektion i.v. mit hoher Dosis erfolgt (1×10^6 PFU), um die Viruslast in den Organen immunkompetenter Mäuse analysieren zu können (Abb. 4.26).

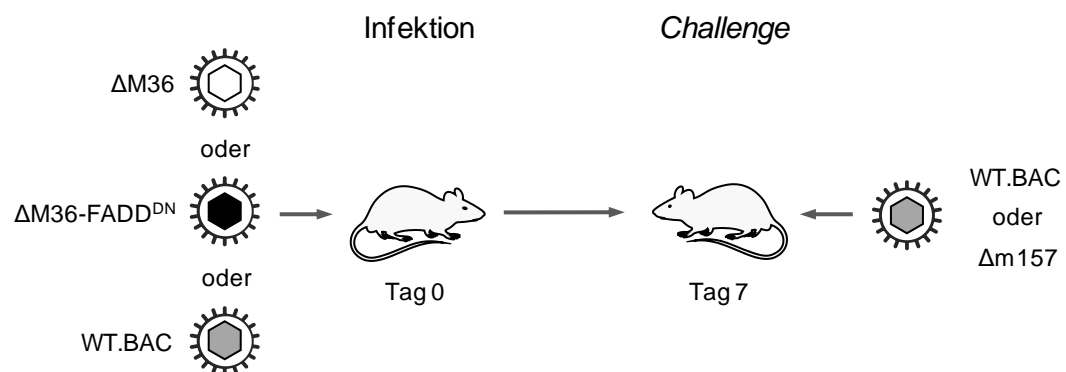


Abb. 4.26: Experimentelles System zur Analyse des protektiven Potentials akut geprimter CD8 T-Zellen im *Challenge*-Modell. BALB/c- oder C57BL/6-Mäuse wurden am Tag 0 mit den angegebenen Viren intraplantar infiziert. 7 Tage nach der Infektion erfolgte in den gleichen Mäusen ein *Challenge* i.v. mit hoher Dosis. Je nach Haplotyp der Mäuse wurde der *Challenge* entweder mit WT.BAC im Falle von BALB/c oder mit Δ m157 im Falle von C57BL/6 durchgeführt.

Da mCMV-spezifische CD8 T-Zellen für die Terminierung der produktiven Infektion verantwortlich sind (Reddehase 2002; Holtappels et al., 2006b), gibt eine Verringerung der Viruslast in den Organen infizierter Mäuse Aufschluss über das protektive Potential mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen. Für das *Priming* wurden WT.BAC, Δ M36 und die funktionelle Revertante Δ M36-FADD^{DN} verwendet. Die *Challenge*-Infektion erfolgte im BALB/c-System mit WT.BAC bzw. im C57BL/6-System, aufgrund der starken NK-Zell-Kontrolle der mCMV-Infektion, mit Δ m157. Die Viruslast wurde zu definierten Zeitpunkten nach dem *Challenge* in Lunge und Milz mittels Plaque-Assay bzw. in der Leber durch Quantifizierung von IE1-positiven Zellen bestimmt.

4.11.1 Protektives Potential antiviraler CD8 T-Zellen in Abhängigkeit von M36

Für das *Challenge*-Experiment wurden BALB/c-Mäuse am Tag 0 mit den unten angegebenen Viren infiziert (1×10^5 PFU, intraplantar) und 7 Tage später die zweite Infektion (*Challenge*) mit 1×10^6 PFU WT.BAC i.v. durchgeführt. Als Kontrolltiere wurden BALB/c-Mäuse mitgeführt, die vorher nicht *geprimt* wurden, bei denen also die *Challenge*-Infektion die Primärinfektion darstellte. Die Bestimmung der Viruslast erfolgte an den Tagen 1, 2, 3, 5 und 7 nach dem *Challenge*, um die Effizienz der Viruskontrolle in einem größeren Zeitfenster zu erfassen.

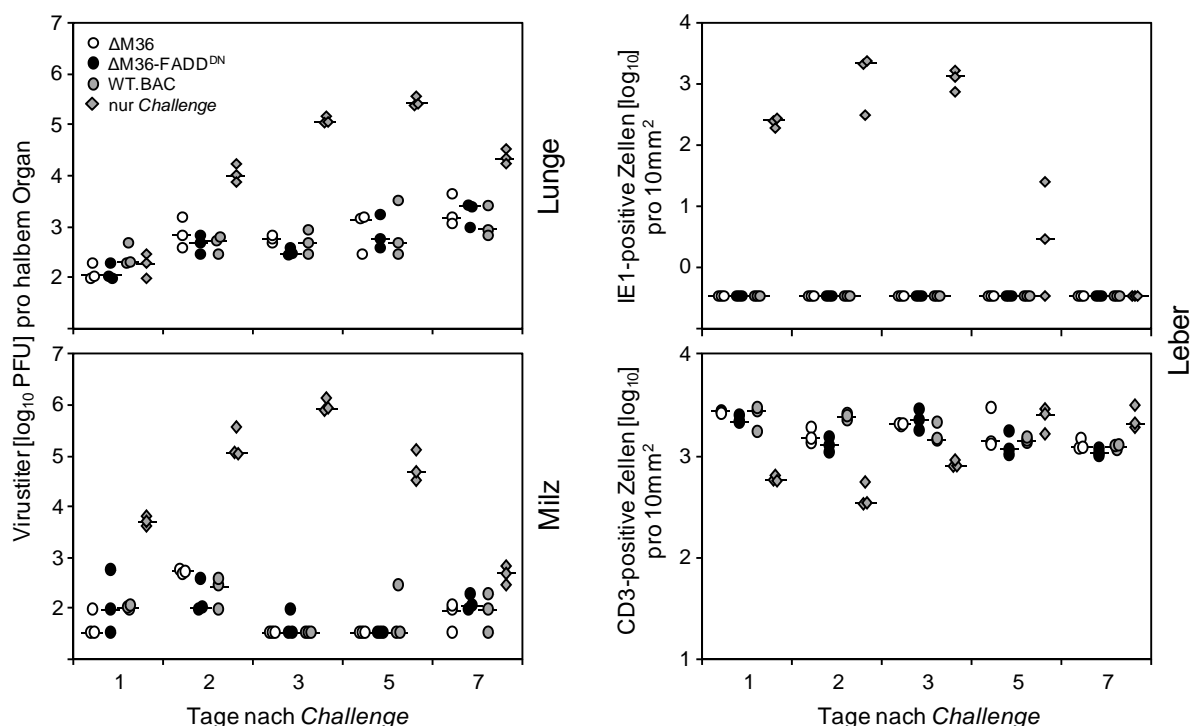


Abb. 4.27: Antivirale Wirkung akut geprimter CD8 T-Zellen nach *Challenge* in der BALB/c-Maus. Immunkompetente BALB/c wurden intraplantar mit 1×10^5 PFU Δ M36 (weiße Kreise), Δ M36-FADD^{DN} (schwarze Kreise) oder WT.BAC (graue Kreise) infiziert. 7 Tage nach Primärinfektion erfolgte eine *Challenge*-Infektion i.v. mit 1×10^6 PFU WT.BAC. Als Kontrolltiere wurden BALB/c mitgeführt, die keine Primärinfektion erhalten hatten (graue Rauten). Die Virustiter in Lunge und Milz wurden im Plaque-Assay bestimmt, während die Zahl infizierter Zellen in der Leber mittels IE1-spezifischer Immunhistochemie ermittelt wurde. Zusätzlich wurde in der Leber die Zahl CD3-positiver Zellen immunhistochemisch bestimmt. Die Symbole repräsentieren die Ergebnisse der Einzeltierbestimmungen an den angegebenen Tagen nach *Challenge*-Infektion. Der Median ist als horizontaler Balken dargestellt.

In allen getesteten Organen konnte gegenüber der alleinigen i.v.-Infektion der Kontrolltiere mit hoher Dosis ein sehr starkes protektives Potential der akut geprimten CD8 T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.27). Demgegenüber zeigen die Virustiter in den Kontrolltieren einen parabolischen Kurvenverlauf, der den Verlauf und die Kontrolle der produktiven Infektion ohne vorheriges *Priming* widerspiegelt. In den Kontrolltieren ist die Terminierung der Infektion in der Leber bereits am Tag 5 bzw. in der Milz am Tag 7 nach Infektion zu

erkennen, während die Terminierung der Infektion in der Lunge nach der 7-Tage Analyse noch nicht vollständig ist. Die *geprimten* Gruppen weisen in der Lunge eine moderate Virusreplikation auf, die auch am Tag 7 nach *Challenge* noch nicht vollständig kontrolliert wurde. Während die Infektion in der Milz bereits am Tag 3 nach *Challenge* kontrolliert ist, können in der Leber gar keine infizierten Zellen nachgewiesen werden. Die sofortige Kontrolle in der Leber spiegelt sich auch in der Zahl CD3-positiver Zellen wieder, die nach *Challenge*-Infektion konstant hoch bleibt, während in der Kontrollgruppe erst am Tag 5 die maximale Infiltration erreicht wird.

Fazit:

Alle Gruppen, die einer vorherigen *Priming*-Situation ausgesetzt waren, weisen nach dem *Challenge* eine vergleichbare Viruslast in den getesteten Organen auf. Ein Vorteil von Δ M36-*geprimten* CD8 T-Zellen bezüglich der Effizienz der Viruskontrolle konnte im Vergleich zu Δ M36-FADD^{DN}- oder WT.BAC-*geprimten* CD8 T-Zellen nicht nachgewiesen werden.

4.11.2 Protektives Potential antiviraler CD8 T-Zellen in Abhängigkeit von M36 und in Abwesenheit von Antikörpern

Da im vorherigen *Challenge*-Experiment eine sofortige und sehr effiziente Kontrolle der Virusreplikation nach dem *Challenge* eintrat, sollte in einem weiteren Versuch geklärt werden, ob dieser Befund möglicherweise aufgrund von mCMV-spezifischen Antikörpern, die das *Challenge*-Virus maskieren, hervorgerufen werden kann. Die Rolle von Antikörpern in der frühen humoralen Immunantwort konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, jedoch weisen Befunde aus meiner Diplomarbeit „Analyse der humoralen Immunantwort gegen das murine Cytomegalovirus“ (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Thomas Winkler, Lehrstuhl für Genetik, Universität Erlangen-Nürnberg) auf einen frühen Schutz durch mCMV-spezifische Antikörper hin. In dieser Arbeit konnte zu sehr frühen Zeitpunkten (3-6 Tage) nach Infektion ein mCMV-spezifischer IgG-Serumtiter nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der therapeutische Transfer eines Tag 7 (nach Infektion)-Serums in immundefiziente und infizierte RAG1^{-/-}-Mäuse eine signifikante Reduktion der Viruslast in Milz, Lunge und Speicheldrüse innerhalb der ersten 10 Tage nach mCMV-Infektion bewirkt.

Aufgrund dieser Befunde sollte ein weiteres *Challenge*-Experiment in Abwesenheit von Antikörpern durchgeführt werden. Hierfür wurden C57BL/6-IgMi (IgMi)-Mäuse verwendet, deren B-Zellen nicht in der Lage sind einen Klassenwechsel oder die Differenzierung zu Plasmazellen durchzuführen (Waisman *et al.*, 2007; Waisman *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu B-Zell defizienten μ MT- (Kitamura *et al.*, 1991) oder JHT-Mäusen (Gu *et al.*, 1993) besitzen IgMi-Mäuse B-Zellen, die zwar IgM als membranständigen B-Zellrezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren, allerdings nicht in der Lage sind Antikörper zu sezernieren.

Die IgMi-Mäuse wurden analog mit den angegebenen Viren infiziert und 7 Tage später die *Challenge*-Infektion mit $\Delta m157$ durchgeführt, um der starken NK-Zellantwort über $m157/Ly49H$ im Haplotyp H-2^b zu entgehen. Als Kontrolltiere wurden IgMi-Mäuse mitgeführt, die vorher nicht *geprimt* wurden, bei denen also die *Challenge*-Infektion die Primärinfektion darstellte. Die Analyse wurde am Tag 3 nach *Challenge* durchgeführt, da die Viruslast der Kontrolltiere zu diesem Zeitpunkt in den getesteten Organen durchschnittlich am höchsten war.

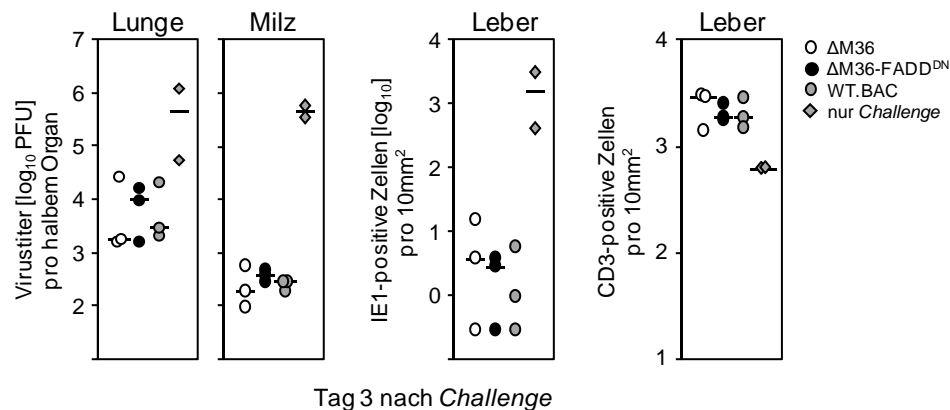


Abb. 4.28: Antivirale Wirkung akut *geprimter* CD8 T-Zellen nach *Challenge* in der IgMi-Maus. IgMi-Mäuse wurden intraplantar mit 1×10^5 PFU $\Delta M36$ (weiße Kreise), $\Delta M36-FADD^{DN}$ (schwarze Kreise) oder WT.BAC (graue Kreise) infiziert. 7 Tage nach Primärinfektion erfolgte eine *Challenge*-Infektion i.v. mit 1×10^6 PFU $\Delta m157$. Als Kontrolltiere wurden IgMi-Mäuse mitgeführt, die keine Primärinfektion erhalten hatten (graue Rauten). Die Virustiter in Lunge und Milz wurden anhand eines Plaque-Assays bestimmt, während die Zahl infizierter Zellen in der Leber mittels IE1-spezifischer Immunhistochemie ermittelt wurde. Zusätzlich wurde in der Leber die Zahl CD3-positiver Zellen immunhistochemisch bestimmt. Die Symbole repräsentieren die Ergebnisse der Einzeltierbestimmungen an Tag 3 nach *Challenge*-Infektion. Der Median ist als horizontaler Balken dargestellt.

Die Analyse der IgMi-Mäuse (Abb. 4.28) war mit den Ergebnissen der BALB/c-Mäuse (Abb. 4.27) vergleichbar. Es konnte weder eine stark verminderte Effizienz der Viruskontrolle durch die Abwesenheit von frühen mCMV-spezifischen Antikörpern, noch ein Unterschied im protektiven Potential in An- oder Abwesenheit von M36 *geprimter* CD8 T-Zellen beobachtet werden. Auch die Zahl CD3-positiver Zellen in der Leber war mit den vorherigen Ergebnissen (Abb. 4.27) vergleichbar.

Somit muss nach intraplantarer Infektion mit 1×10^5 PFU von einer sehr starken antiviralen Wirkung akut *geprimter* CD8 T-Zellen ausgegangen werden, die in der Lage ist, die Virusreplikation nach einer *Challenge*-Infektion mit 1×10^6 PFU i.v. sofort zu kontrollieren.

Fazit:

Der Einfluss von mCMV-spezifischen Antikörpern auf die *Challenge*-Infektion ist somit zu vernachlässigen. Eine effektivere Viruskontrolle $\Delta M36$ -*geprimter* CD8 T-Zellen konnte auch im IgMi-*Challenge*-Modell nicht beobachtet werden.

4.11.3 Protektives Potential antiviraler CD8 T-Zellen in Abhängigkeit von M36 bei einer niedrigen Infektionsdosis

Für die bisherigen *Challenge*-Experimente wurden die Mäuse mit 1×10^5 PFU *geprimt*. Es stellte sich daher die Frage, ob eine Reduktion der Infektionsdosis und die damit verbundene geringere *Priming*-Kapazität mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen eine mögliche Abhängigkeit des protektiven Potentials von M36 besser aufzutrennen vermag.

Im folgenden Experiment wurden BALB/c-Mäuse, unter Berücksichtigung der gezeigten Dosis-Abhängigkeit (Abb. 4.8) des CD8 T-Zell-*Primings*, mit einer Dosis von nur 100 PFU infiziert und 7 Tage später die *Challenge*-Infektion mit WT.BAC durchgeführt. Als Kontrolltiere wurden BALB/c-Mäuse mitgeführt, die vorher nicht *geprimt* wurden, bei denen also die *Challenge*-Infektion die Primärinfektion darstellte. Die Viruslast wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen nach *Challenge*-Infektion analysiert.

Die Virustiter in Lunge und Milz, sowie die Zahl IE1-positiver Zellen in der Leber zeigten aufgrund der geringeren *Priming*-Dosis eine erhöhte Viruslast in den getesteten Organen (Abb. 4.29). Die Organtiter der Kontrolltiere stimmten mit den in Abb. 4.27 aufgeführten Titern überein und zeigten ebenfalls einen parabolischen Kurvenverlauf. Die Viruslast der *geprimten* Mäuse ist in der Lunge an Tag 1 und 2 nach *Challenge* mit der Kontrollgruppe vergleichbar. An Tag 3 ist eine beginnende Kontrolle der Infektion in der Lunge zu beobachten, jedoch scheint diese im weiteren Verlauf nicht aufrecht erhalten zu werden und die Virustiter steigen im weiteren Analysezeitraum bis Tag 7 wieder an. Während die Virusreplikation in der Milz trotz der niedrigen *Priming*-Dosis von nur 100 PFU schon am Tag 3 nach *Challenge* nahezu vollständig kontrolliert wird, können in der Leber bereits am Tag 2 keine IE1-positiven Zellen mehr nachgewiesen werden. Insgesamt untermauert dieses Experiment die hohe Effizienz der Viruskontrolle im immunkompetenten *geprimten* Tier. Ein verbessertes protektives Potential Δ M36-*geprimter* Mäuse konnte wie zuvor auch hier nicht beobachtet werden.

Fazit:

Eine höhere Effizienz der Viruskontrolle durch Δ M36-*geprimte* CD8 T-Zellen konnte auch nach Infektion mit einer geringen Dosis (100 PFU) im Vergleich zu Δ M36-FADD^{DN}- oder WT.BAC-*geprimten* CD8 T-Zellen nicht erreicht werden.

Es gibt somit keinen Hinweis darauf, dass das klar belegte verbesserte CD8 T-Zell-*Priming* nach Deletion des anti-apoptotischen Proteins M36 zu einer Erhöhung des protektiven Potentials mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen führt.

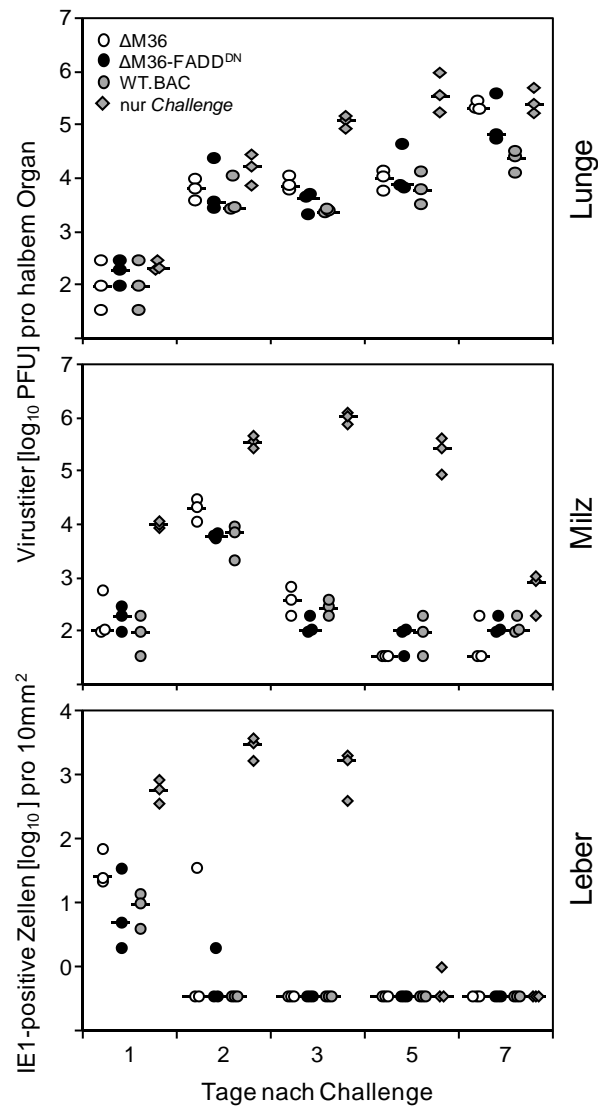


Abb. 4.29: Antivirale Wirkung akut *geprimter* CD8 T-Zellen nach *Challenge* in Abhängigkeit von einer niedrigen Infektionsdosis. Immunkompetente BALB/c wurden intraplantar mit 1×10^2 PFU $\Delta M36$ (weiße Kreise), $\Delta M36\text{-FADD}^{\text{DN}}$ (schwarze Kreise) oder WT.BAC (graue Kreise) infiziert. 7 Tage nach Primärinfektion erfolgte eine *Challenge*-Infektion i.v. mit 1×10^6 PFU WT.BAC. Als Kontrolltiere wurden BALB/c mitgeführt, die keine Primärinfektion erhalten hatten (graue Rauten). Die Virustiter in Lunge und Milz wurden anhand eines Plaque-Assays bestimmt, während die Zahl infizierter Zellen in der Leber mittels IE1-spezifischer Immunhistochemie ermittelt wurde. Zusätzlich wurde in der Leber die Zahl CD3-positiver Zellen immunhistochemisch bestimmt. Die Symbole repräsentieren die Ergebnisse der Einzeltierbestimmungen an den angegebenen Tagen nach *Challenge*-Infektion. Der Median ist als horizontaler Balken dargestellt.

5 Diskussion

Die Induktion des programmierten Zelltods gehört nach Infektion mit intrazellulären Erregern zu den wichtigsten Abwehrmechanismen infizierter Zellen. Dieser wird entweder durch zellintrinsische Signale, z.B. infolge der Virusreplikation, oder durch extrinsische Stimuli über Liganden von Todesrezeptoren ausgelöst. Insbesondere für langsam replizierende Viren wie CMV ist die Unterdrückung des programmierten Zelltods von essentieller Bedeutung, um einen vollständigen Replikationszyklus gewährleisten zu können. Daher haben sowohl mCMV als auch HCMV im Laufe der Koevolution mit ihrem Wirt Gene erworben, die für Inhibitoren des programmierten Zelltods kodieren (Brune, 2011; Mocarski *et al.*, 2011; Handke *et al.*, 2012; Fliss und Brune, 2012). Diese Inhibitoren können somit Auswirkungen auf die Replikation des Virus haben und dadurch auch die immunologische Kontrolle der Infektion beeinflussen. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des anti-apoptotischen mCMV-Proteins M36 (Menard *et al.*, 2003; Cicin-Sain *et al.*, 2008; Ebermann *et al.*, 2012) sowie des anti-nekroptotischen mCMV-Proteins M45 (Mack *et al.*, 2008; Upton *et al.*, 2008; Lembo und Brune, 2009) auf die Initiation der antiviralen CD8 T-Zellantwort untersucht werden.

5.1 Die Induktion des programmierten Zelltods führt zu einem verbesserten CD8 T-Zell-Priming

In der vorliegenden Arbeit konnte für mCMV erstmals gezeigt werden, dass die Induktion der Apoptose das CD8 T-Zell-Priming verbessert. Die Deletion des viralen anti-apoptotischen Gens *M36* führt sowohl im Haplotyp H-2^d als auch im Haplotyp H-2^b zu einer deutlichen Steigerung der Frequenzen mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen. Zusätzlich konnte mit Hilfe der mCMV-ORF-Library eine Verbreiterung des CD8 T-Zellepitop-Repertoires nachgewiesen werden. Dies impliziert nicht nur eine quantitative sondern auch qualitative Steigerung der mCMV-spezifischen CD8 T-Zell-Antwort nach Infektion mit $\Delta M36$. Bemerkenswerterweise konnte sowohl das verbesserte CD8 T-Zell-Priming als auch die Verbreiterung des CD8 T-Zellepitop-Repertoires ebenfalls nach Deletion des anti-nekroptotischen Gens *M45* nachgewiesen werden. Im Umkehrschluss belegen diese Daten, dass die Inhibition der Apoptose durch *M36* sowie die Inhibition der Nekroptose durch *M45* das CD8 T-Zell-Priming limitiert.

Eine Steigerung der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort ging in der Literatur bisher nur mit einer verbesserten Replikation und der damit verbundenen erhöhten Antigenmenge einher. Um den Einfluss der viralen Replikation auf das mCMV-spezifische CD8 T-Zell-Priming zu untersuchen, wurde die IE1-Transkriptmenge im LK, die als Maß für das

replikative Potential von mCMV gilt, mit der dort induzierten CD8 T-Zellantwort korreliert. Dabei lässt die Expressionsstärke des *IE1*-Gens nicht nur Rückschlüsse auf die Replikationsfähigkeit des Virus zu; sie ist auch ein Maß für die im LK zur Verfügung stehende Antigenmenge, da das *IE1*-Gen für ein dominantes CD8 T-Zellepitop kodiert (Reddehase *et al.*, 1989).

In unserer Arbeitsgruppe war bereits gezeigt worden, dass eine Steigerung der Infektionsdosis nach intraplantarer Infektion mit WT.BAC die *IE1*-Genexpression im LK um den gleichen Faktor erhöht und mit einem Anstieg der mCMV-spezifischen CD8 T-Zell-Frequenzen einhergeht (Böhm *et al.*, 2008). Auch in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stipan Jonjic wurde eine bessere mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort infolge einer stärkeren Virusreplikation nachgewiesen. Wir konnten in der C57BL/6-Maus zeigen, dass das Ausschalten der m157/Ly49H-regulierten NK-Zell-Kontrolle nach Infektion mit Δ m157 zu einer Steigerung der mCMV-spezifischen CD8 T-Zell-Frequenzen führt (Mitrovic *et al.*, 2012). In der vorliegenden Arbeit konnte nach Infektion mit Δ m157 sowohl die erhöhte *IE1*-Transkriptmenge als auch die verbesserte CD8 T-Zellantwort nochmals bestätigt werden.

Nach Infektion mit Δ M36 oder M45-BamX konnte im Vergleich zu WT.BAC eine signifikante Reduktion der *IE1*-Transkriptmenge im drainierenden LK festgestellt werden, die nach Infektion mit der jeweiligen Revertante wieder aufgehoben wurde. Dies impliziert eine Attenuierung der beiden Viren infolge der Induktion des programmierten Zelltods mCMV-infizierter Zellen.

In der Gruppe von Prof. Dr. Ulrich H. Koszinowski konnte gezeigt werden, dass sowohl die Deletion des viralen anti-apoptotischen Gens *M36* als auch des anti-nekroptotischen Gens *M45* bei mCMV zur Induktion des programmierten Zelltods in infizierten Makrophagen führt. (Brune *et al.*, 2001; Menard *et al.*, 2003). Während die Replikation dieser Virusmutanten *in vitro* auf MEF unbeeinflusst war, konnte aufgrund der Induktion von Apoptose oder Nekroptose eine Inhibition der Replikation in Makrophagen nachgewiesen werden. Cicin-Sain und Kollegen gelang es in immunsupprimierten BALB/c-Mäusen eine *in vivo*-Relevanz von *M36* nach intraplantarer mCMV-Infektion zu dokumentieren, in dem sie eine verringerte Dissemination von Δ M36 von der Infektionsstelle (Fuß) zu weiter entfernt liegenden Organen wie Lunge, Milz, Leber und Speicheldrüse im Vergleich zum WT nachweisen konnten (Cicin-Sain *et al.*, 2005). Dieser Befund wurde in immundefizienten *RAG1*^{-/-}-Mäusen bestätigt (Ebermann *et al.*, 2012). Eine verringerte Dissemination von Δ M36 konnte auch nach i.p.-Infektion immunkompetenter BALB/c-Mäuse gezeigt werden (Cicin-Sain *et al.*, 2008). Für die *in vivo*-Relevanz von *M45* stehen derzeit nur Daten aus immundefizienten SCID-Mäusen zur Verfügung, in denen die Infektion mit der *M45*-Deletionsmutante im Gegensatz zur Infektion mit dem WT-Virus völlig inapparent verläuft (Lembo *et al.*, 2004).

Die Daten der vorliegenden Arbeit korrelieren mit den Befunden in der Literatur und weisen nach intraplantarer Infektion auf eine Attenuierung von $\Delta M36$ bzw. M45-BamX im LK hin. Da die mCMV-Replikation in Makrophagen *in vivo* essentiell ist (Hanson *et al.*, 1999; Mocarski *et al.*, 2007), wäre dies eine naheliegende Erklärung für die Attenuierung im LK. Somit konnte entgegen aller Erwartungen gezeigt werden, dass die Infektion mit $\Delta M36$ bzw. M45-BamX trotz Attenuierung zu einem effizienteren CD8 T-Zell-*Priming* führt.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass ein verbessertes CD8 T-Zell-*Priming* eine grundsätzliche Eigenschaft replikationsdefekter Viren ist, wurden verschiedene Virusmutanten mit verringerter Replikationsfähigkeit dahingehend untersucht. Es war beschrieben, dass die Deletion der für die mCMV-Immunevasionsproteine (vRAPs) kodierenden Gene *m04*, *m06* und *m152* in einer Virusmutante zu einer verstärkten CD8 T-Zell-Kontrolle der mCMV-Infektion führt und dadurch die virale Replikation im poplitealen LK beeinträchtigt (Böhm *et al.*, 2008). Diese negative *Feedback*-Regulation führt zu einer Reduktion der für das CD8 T-Zell-*Priming* zur Verfügung stehenden Antigenmenge, was sich negativ auf das CD8 T-Zell-*Priming* im LK auswirkt (Böhm *et al.*, 2008). Dieser Befund konnte in der vorliegenden Arbeit noch einmal unter Verwendung der Deletionsmutante $\Delta m152$ bestätigt werden.

Als weiteres replikationsdefektes Virus wurde in der vorliegenden Arbeit eine Mutante verwendet, in der mit *M27* ein essentielles Gen für die Virusreplikation *in vivo* deletiert war (Abenes *et al.*, 2001; Zimmermann *et al.*, 2005). Eine Auswirkung auf die Replikationsfähigkeit im poplitealen LK sowie das antivirale CD8 T-Zell-*Priming* wurde bisher nicht beschrieben. Die Daten der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass die Infektion mit $\Delta M27$ im Vergleich zu WT.BAC zu einer schlechteren Replikation im LK sowie zu einer geringeren mCMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort aufgrund der reduzierten Antigenmenge führt.

Diese Ergebnisse belegen, dass das verbesserte CD8 T-Zell-*Priming* nach Infektion mit $\Delta M36$ oder M45-BamX keine grundsätzliche Eigenschaft replikationsdefekter Viren ist und weisen auf einen direkten Zusammenhang von Apoptose sowie Nekroptose und dem *Priming* mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen hin.

Um zu prüfen, ob das verbesserte mCMV-spezifische CD8 T-Zell-*Priming* nach $\Delta M36$ -Infektion durch die Induktion von Apoptose hervorgerufen wird, wurde in der vorliegenden Arbeit eine funktionelle Revertante ($\Delta M36$ -FADD^{DN}) von $\Delta M36$ verwendet. In dieser ist die anti-apoptotische Funktion durch eine dominant-negative Form des zellulären Adapterproteins FADD (FADD^{DN}) substituiert, wodurch das Apoptose-*Signaling* verhindert wird (Cicin-Sain *et al.*, 2008). Es konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass die Expression von FADD^{DN} die gesteigerte CD8 T-Zellantwort sowohl im ELISpot-Assay als auch im ORF-*Library-Screening* wieder revertiert. Diese Beobachtung belegt, dass der verbesserte

Priming-Phänotyp nach $\Delta M36$ -Infektion auf einer verstärkten Apoptose-Induktion beruht und nicht auf einen anderen, durch die Deletion von M36 möglicherweise hervorgerufenen, Effekt zurückzuführen ist. Mit Hilfe der funktionellen Revertante konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Deletion von M36 nicht *per se* zu einer Attenuierung führt, da eine Reversion der IE-Transkriptmenge im drainierenden LK nach $\Delta M36$ -FADD^{DN}-Infektion auf WT-Niveau beobachtet werden konnte. Diese Ergebnisse stimmten mit dem Befund einer früheren Studie überein, in der gezeigt werden konnte, dass FADD^{DN} den Disseminationsphänotyp von $\Delta M36$ sowohl *in vitro* als auch *in vivo* revertiert (Cicin-Sain *et al.*, 2008).

5.2 Das verbesserte CD8 T-Zell-*Priming* beruht auf der Cross-Präsentation viraler Antigene aus apoptotischen oder nekroptotischen Zellen

Der Mechanismus des mCMV-spezifischen CD8 T-Zell-*Primings* ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Die Auffassung, dass mCMV-spezifische CD8 T-Zellen hauptsächlich durch Cross-Präsentation exogener Antigene *geprimt* werden, wird in der Literatur von einem Großteil der Arbeitsgruppen vertreten. Auch in unserer Arbeitsgruppe wurde eine durch *Cross-Priming* initiierte mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort postuliert, weilein vergleichbares CD8 T-Zell-*Priming* in An- oder Abwesenheit der Immunevasionsgene (vRAPs) in der BALB/c-Maus gezeigt werden konnte (Böhm *et al.*, 2008) und dieser Befund nicht mit direkter Antigenpräsentation im Einklang zu stehen schien. Da die Immunevasine die direkte Präsentation Peptid-beladener MHC-I-Komplexe unterdrücken und es nach deren Deletion trotzdem zu einer mit dem WT vergleichbaren CD8 T-Zellantwort kam, lieferte *Cross-Priming* eine plausible Erklärung für die Daten.

Des Weiteren konnten Snyder und Kollegen zeigen, dass die Injektion von H-2^b MHC-defizienten Fibroblasten, die mit einem replikationsdefekten mCMV (mCMV- Δ gL) infiziert worden waren, in C57BL/6-Mäusen eine CD8 T-Zellantwort induzierte. Daraus wurde ebenfalls eine Vernachlässigbarkeit des direkten *Primings* nach mCMV-Infektion gefolgert (Snyder *et al.*, 2010).

Einen möglichen direkten Hinweis auf eine untergeordnete Rolle des direkten *Primings* nach mCMV-Infektion erbrachten Torti und Kollegen unter Verwendung der Batf3^{-/-}-Maus (Torti *et al.*, 2011a). Diese Mäuse weisen eine Defizienz in den – für das *Cross-Priming* von CD8 T-Zellen wichtigen – Organ-residenten CD8⁺ DCs und migratorischen CD103⁺ DCs auf (Hildner *et al.*, 2008; Edelson *et al.*, 2010). In der Batf3^{-/-}-Maus konnte 7 Tage nach Infektion mit einer hohen Dosis mCMV (1x10⁷ PFU, i.v.) eine stark beeinträchtigte mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort in Lunge und Milz im Vergleich zur C57BL/6-Maus nachgewiesen werden, die vermutlich auf das Fehlen der cross-präsentierenden DCs zurückzuführen war (Torti *et al.*, 2011a). Diese Reduktion der mCMV-spezifischen CD8 T-Zell-Frequenzen in der Batf3^{-/-}-

Maus konnte in einer weiteren Publikation noch einmal bestätigt werden (Nopora *et al.*, 2012). Die CD8 T-Zellantwort nach Rekonstitution der Batf3^{-/-}-Maus mit zur *Cross-Präsentation* befähigten DCs wurde jedoch in keiner dieser beiden Publikation gezeigt. Somit bleibt unbeantwortet, ob nicht auch ein anderer Mechanismus in der Batf3^{-/-}-Maus für die reduzierten Frequenzen mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen verantwortlich sein kann. Hinweise in diese Richtung geben Seillet und Kollegen, die zeigen konnten, dass die Expression des Transkriptionsfaktors Batf3 in CD8⁺ DCs für die *Cross-Präsentation* viraler antigener Peptide nicht zwingend notwendig ist (Seillet *et al.*, 2013). Aufgrund dessen kann ein *Cross-Priming* von CD8 T-Zellen in der Batf3^{-/-}-Maus nicht ausgeschlossen werden. Eine weitere Problematik der Batf3^{-/-}-Maus ist darin begründet, dass bisher die Infizierbarkeit von *cross-präsentierenden* CD8⁺ oder CD103⁺ DCs nicht ausgeschlossen werden konnte. Somit könnte die Fähigkeit der direkten Präsentation in dieser Maus ebenfalls beeinträchtigt sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde die *Cross-Priming*-defiziente 3d-Maus verwendet, um den Einfluss der *Cross-Präsentation* auf die antivirale CD8 T-Zellantwort nach mCMV-Infektion zu untersuchen. Der Verlust der *Cross-Priming*-Kapazität zeichnet sich in dieser Maus nicht durch ein Fehlen der *cross-präsentierenden* DC-Subpopulationen aus, sondern wird durch einen Defekt in der Prozessierung exogener Antigene hervorgerufen, wodurch die *Cross-Präsentation* antigener Peptide verhindert wird (Tabeta *et al.*, 2006; Janssen *et al.*, 2006).

In der vorliegenden Arbeit konnte überraschenderweise gezeigt werden, dass neben dem *Cross-Priming* auch das direkte *Priming* mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen eine erhebliche Rolle spielen muss. In dieser Maus konnten nach Infektion mit mCMV für alle getesteten Epitope mit C57BL/6-vergleichbare CD8 T-Zell-Frequenzen nachgewiesen werden. Dieser Befund widerspricht der bisher vertretenen Meinung, dass das antivirale CD8 T-Zell-*Priming* nach mCMV-Infektion vom *Cross-Priming* dominiert wird. Auch die unveränderte Epitop-Hierarchie lässt auf eine direkte Präsentation viraler antigener Peptide schließen.

Crane und Kollegen konnten in der Leber der 3d-Maus ebenfalls ein mit der C57BL/6-Maus vergleichbares *Priming* M45-spezifischer CD8 T-Zellen zeigen (Crane *et al.*, 2012), was mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit übereinstimmt. Ein Befund in einer weiteren aktuellen Publikation von Nopora und Kollegen weist ebenfalls auf ein direktes *Priming* mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen hin. Unter Verwendung der *Cross-Priming*-defizienten CD11c-Rac1-Maus konnte in dieser Publikation gezeigt werden, dass nach Infektion mit einer hohen Dosis mCMV (4×10^6 PFU, i.v.) die CD8 T-Zell-Frequenzen in der Milz mit den Frequenzen in der C57BL/6-Maus vergleichbar waren (Nopora *et al.*, 2012). Einen weiteren Hinweis lieferten Ong und Kollegen in einer aktuellen Publikation, indem sie die *Cross-Präsentation* von DCs durch Vorbehandlung mit synthetischen CpG-Oligonukleotiden unterdrückten. Sie konnten nach CpG-Behandlung von BALB/c-Mäusen zeigen, dass die

direkte Präsentation viraler Antigene für die Initiation einer starken mCMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort verantwortlich ist (Ong *et al.*, 2013).

Einen eindrucksvollen Hinweis auf die Priorität des direkten CD8 T-Zell-*Primings* nach mCMV-Infektion wurde durch Julia Büttner in unserer Arbeitsgruppe kürzlich gezeigt (Poster Julia Büttner, 43. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Immunologie, Mainz, 2013). Sie konnte mit Hilfe einer Virusmutante, die das Hauptimmonevasin m152 sowohl in der E-Phase als auch in der IE-Phase der viralen Replikation exprimiert, zeigen, dass die verstärkte Unterdrückung der Peptidpräsentation auf der Oberfläche infizierter Zellen zu einem schlechteren *Priming* mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen in der BALB/c-Maus führt. Durch diese Virusmutante konnte erstmals eine Reduktion der CD8 T-Zellantwort aufgrund der Unterdrückung der direkten Präsentation in Anwesenheit aller professionell Antigen-präsentierender Zellen beobachtet werden.

Bislang konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sowohl die Induktion von Apoptose als auch die von Nekroptose zu einer Verbesserung des mCMV-spezifischen CD8 T-Zell-*Primings* führt, obwohl die für das verbesserte *Priming* verantwortlichen Virusmutanten attenuiert waren. Wie bereits ausführlich thematisiert, weisen aktuelle Befunde auf eine bedeutende Rolle des direkten *Primings* mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen hin. Da jedoch basierend auf direktem *Priming* eine Steigerung der antiviralen CD8 T-Zellantwort mit einer verbesserten Replikation und der damit verbundenen erhöhten Antigenmenge einhergeht, kann das hier gezeigte verbesserte CD8 T-Zell-*Priming* nicht durch direktes *Priming* erklärt werden.

Es ist bekannt, dass apoptotische Vesikel von DCs aufgenommen und die enthaltenen Antigene über MHC-I *cross*-präsentiert werden können (Albert *et al.*, 1998; Albert *et al.*, 2004; Blachere *et al.*, 2005). Für HCMV konnte gezeigt werden, dass infizierte apoptotische MRC5-Fibroblasten von DCs internalisiert werden und zum *Cross-Priming* antiviraler CD8 T-Zellen führen (Arrode *et al.*, 2000). Basierend auf diesen Fakten und Befunden wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit postuliert, dass neben dem direkten *Priming* mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen die Induktion des programmierten Zelltods zusätzlich antigenes Material für das *Cross-Priming* bereitstellt und dadurch zu einem *Priming*-Vorteil mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen führt.

Um in der vorliegenden Arbeit zeigen zu können, dass das verbesserte CD8 T-Zell-*Priming* nach Infektion mit Δ M36 oder M45-BamX auf die *Cross*-Präsentation viraler Antigene aus apoptotischen oder nekroptotischen Zellen zurückzuführen ist, wurde die CD8 T-Zellantwort in der *Cross-Priming*-defizienten 3d-Maus im Hinblick auf die M36- bzw. M45-Expression untersucht. Konsequenterweise müsste bei Abwesenheit von *Cross*-Präsentation auch die nach Δ M36 bzw. M45-BamX-Infektion beobachteten erhöhten mCMV-spezifischen CD8 T-Zell-Frequenzen wieder auf das Niveau nach WT-Infektion sinken. In der 3d-Maus konnte

dann tatsächlich gezeigt werden, dass aufgrund der fehlenden Fähigkeit zur *Cross-Präsentation* die mCMV-spezifischen CD8 T-Zell-Frequenzen nach Infektion mit Δ M36 im LK nicht ansteigen. Dies impliziert, dass die gesteigerte CD8 T-Zellantwort nach Infektion mit Δ M36 auf der *Cross-Präsentation* von zusätzlichem – durch die Apoptose zur Verfügung gestelltem – Material beruht.

Janssen und Kollegen konnten in einem Ovalbumin-spezifischen Immunisierungsmodell zeigen, dass *Fms-like tyrosine kinase 3* Ligand (Flt3L)-induzierte DCs aus dem Knochenmark, die sich nach Reifung zu Organ-residenten CD8⁺ DCs entwickeln, Antigene von apoptotischen Zellen aufnehmen und CD8 T-Zellen effektiv *cross-primen* können (Janssen *et al.*, 2006). Zudem konnte in dieser Publikation bestätigt werden, dass in der 3d-Maus eine Aktivierung von CD8 T-Zellen durch *Cross-Priming* nicht möglich war. Diese Daten bestätigen unsere Hypothese und lassen eine essentielle Funktion der *Cross-Präsentation* von Antigenen apoptotischer Vesikel erkennen.

Da die *Cross-Präsentation* von antigenem Material nekroptotischer Vesikel in der Literatur ebenfalls beschrieben war (Krysko *et al.*, 2003; Krysko *et al.*, 2006; Andersen und Ohlfest, 2012; Buckwalter und Srivastava, 2013; Kaczmarek *et al.*, 2013) wurde ein verbessertes CD8 T-Zell-*Priming* auch nach einer gesteigerten Nekroptose-Induktion überprüft. In *Cross-Priming*-defizienten 3d-Mäusen konnte tatsächlich gezeigt werden, dass auch die Infektion mit M45-BamX nicht zu einem Anstieg mCMV-spezifischer CD8 T-Zell-Frequenzen führt. Somit konnte ein verbessertes CD8 T-Zell-*Priming* infolge der *Cross-Präsentation* von zusätzlichem – durch die Nekroptose zur Verfügung gestelltem – Material bestätigt werden.

Eine Verbesserung des Primings erfolgt also unabhängig davon ob zusätzliches antigenes Material durch Apoptose oder Nekroptose entsteht.

Anzeichen für eine verbesserte CD8 T-Zellantwort infolge der Induktion von Apoptose sind bisher vor allem in bakteriellen Systemen, wie z.B. nach Infektion mit *Salmonella typhimurium* oder *Mycobakterium tuberculosis* beschrieben worden (Ylrid und Wick, 2000; Winau *et al.*, 2006). In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass apoptotische Vesikel aus infizierten Makrophagen zu einem effizienten DC-induzierten *Cross-Priming* von CD8 T-Zellen führen.

Im Kontext von HIV-Infektionen war der Beitrag der Apoptose zur adaptiven Immunantwort bereits vor 20 Jahren beschrieben worden (Gorla *et al.*, 1994). In einer aktuellen Publikation verwendeten Perdiguero und Kollegen eine attenuierte Variante des *Modified Vaccinia Ankara* (MVA) Virus, MVA-C, die für HIV-1-Antigene kodiert, um die Auswirkung einer gesteigerten Apoptose auf die adaptive Immunantwort in BALB/c-Mäusen zu untersuchen. Für MVA-C konnte gezeigt werden, dass eine Deletion des viralen, anti-apoptotischen Gens *F1L*, das als Bak/Bax-Inhibitor die Caspase-9-Aktivierung verhindert, die CD8 T-Zellantwort gegen HIV-1-Antigene steigert (Perdiguero *et al.*, 2012). Dieser Befund bestätigt die Daten

der vorliegenden Arbeit und zeigt, dass auch die Inhibition des intrinsischen Apoptose-*Signalings* zu einer verbesserten CD8 T-Zellantwort führen kann.

In einem auf Influenza A basierenden Infektionsmodell konnten Uhl und Kollegen zeigen, dass das *Cross-Priming* antiviraler CD8 T-Zellen nach Immunisierung mit MEFs, die durch Autophagie sterben, viel effizienter ist als nach Immunisierung mit apoptotischen MEFs (Uhl *et al.*, 2009). In dieser Publikation wurde die durch Autophagie-induzierte gesteigerte *Priming*-Effizienz durch eine verbesserte *Cross*-Präsentation, sowie durch die Induktion von Typ-I Interferonen erklärt. Die Autophagie, ein Caspase-unabhängiger Mechanismus, ist vor allem bei stressbedingter Zellreparatur essentiell und führt nicht zwangsläufig zur Apoptose (Shimizu *et al.*, 2004). Erst nach Sauerstoff- und/oder Nährstoffmangel sowie Infektions-assoziiertem *Signaling* kann die Autophagie zur Apoptose führen (Maiuri *et al.*, 2007). Uhl und Kollegen spekulierten, dass dieser Mechanismus möglicherweise in Situationen, in denen die Apoptose, z.B. durch Tumorentstehung oder nach Infektionen, inhibiert wird, eine wichtige Rolle bei der *Cross*-Präsentation einnimmt.

Diese Befunde bestätigen die Annahme eines verbesserten CD8 T-Zell-*Primings* nach Infektion mit M45-BamX in der vorliegenden Arbeit, da die Deletion des viralen Gens *M45* ebenfalls zu einem Caspase-unabhängigen Zelltod (Nekroptose) infizierter Zellen führt.

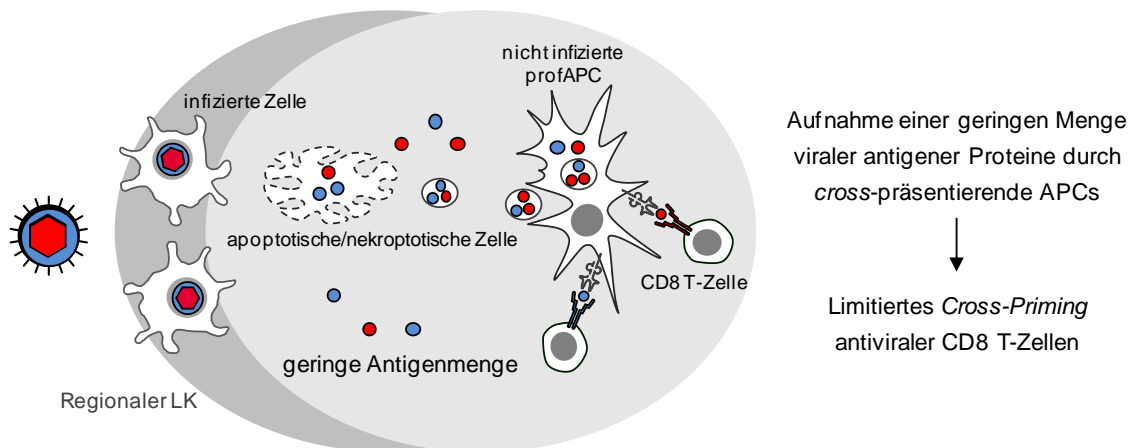
Eine *Cross-Priming*-steigernde Funktion wird auch den Typ-I Interferonen (IFN- α , IFN- β), die sowohl von infizierten Zellen als auch von nicht infizierten, aktivierten DCs sezerniert werden, zugesprochen (Le Bon *et al.*, 2003; Lapenta *et al.*, 2006; Le Bon und Tough, 2008). Lorenzi und Kollegen konnten dies während der Aufnahme Tumor-assoziiertes apoptotischer Zellen beobachten (Lorenzi *et al.*, 2011). Ebenfalls konnten Janssen und Kollegen eine Typ-I Interferon-Produktion von DCs nach Kokultivierung mit apoptotischen Zellen nachweisen (Janssen *et al.*, 2006). In einer weiteren Publikation wurde eine durch IFN- α -induzierte, Proteasom-abhängige Auswirkung auf die *Cross*-Präsentation beschrieben, die mit einer gesteigerten Expression aller Untereinheiten des Immunproteasoms einherging und dadurch zu einer höheren proteolytischen Aktivität des Proteasoms führt (Lattanzi *et al.*, 2011).

5.3 Modell des verbesserten CD8 T-Zell-*Primings* nach Induktion des programmierten Zelltods

Im drainierenden (poplitealen) LK kommt es durch die Infektion von Zellen, möglicherweise auch *Cross-Priming*-fähigen DCs, in einer definierten Zone unterhalb des subkapsulären Sinus zur Produktion und Freisetzung viraler Antigene, die von nicht infizierten profAPCs aufgenommen und *cross*-präsentiert werden können. Dies führt anschließend zu einem *Cross-Priming* mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen in den peripheren interfollikulären Regionen

des LK (Abb. 5.1). Diese Annahme wird durch Befunde von Hickman und Kollegen bestärkt, die eine Rekrutierung von CD8 Effektor-T-Zellen zu den infizierten Zellen unterhalb des subkapsulären Sinus beschreiben (Hickman *et al.*, 2008).

A *Priming* in Anwesenheit viraler Zelltod-inhibierender Proteine



B *Priming* in Abwesenheit viraler Zelltod-inhibierender Proteine

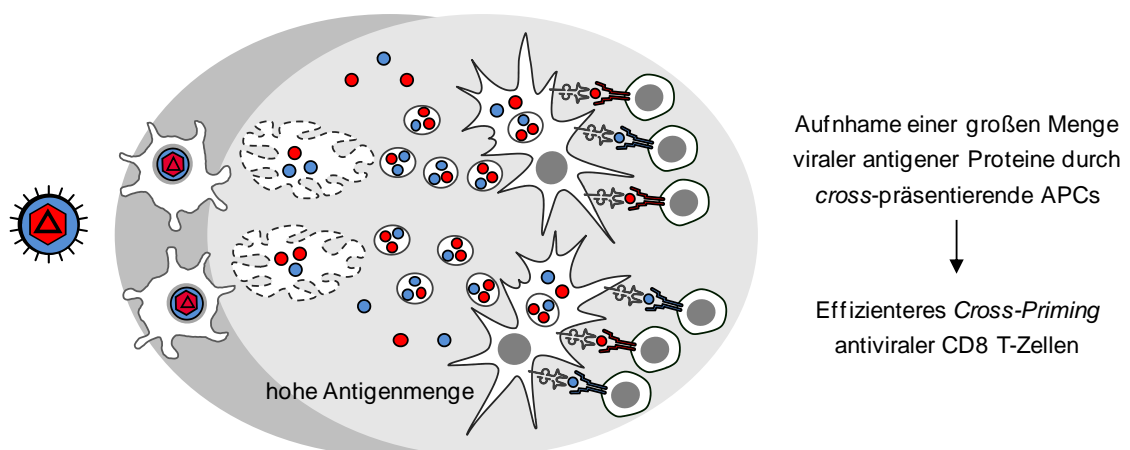


Abb. 5.1: Modell des mCMV-spezifischen CD8 T-Zell-Primings in An- oder Abwesenheit viraler Zelltod-inhibierender Proteine. (A) CD8 T-Zell-Priming nach Inhibition des programmierten Zelltods infolge der WT-Infektion. (B) CD8 T-Zell-Priming nach Induktion des programmierten Zelltods infolge der Infektion mit $\Delta M36$ oder M45-BamX. Die dunkelgrauen und hellgrauen Bereiche symbolisieren die infizierten kortikalen bzw. nicht infizierten subkortikalen Bereiche des LK.

Nach Infektion mit mCMV-WT verhindern die Immunevasine (vRAPs) die Präsentation antigener Peptide auf infizierten Zellen und schützen diese vor der Erkennung durch antivirale CD8 T-Zellen. Die Expression viraler anti-apoptotischer und anti-nekroptotischer Proteine ist ein weiterer Beitrag der Immunmodulation von CMV und führt zu einer Inhibition der programmierten Zelltodmechanismen in infizierten Zellen. Dadurch wird die Apoptose

bzw. Nekroptose infizierter Zellen reduziert und damit die Zufuhr viraler Antigene für die Cross-Präsentation limitiert (Abb. 5.1, A).

Findet dagegen die Infektion in Abwesenheit eines anti-apoptotischen (Δ M36) oder anti-nekroptotischen Proteins (M45-BamX) statt, kommt es zu einer verstärkten Induktion des programmierten Zelltods und somit zur Freisetzung größerer Mengen viraler Proteine, die von profAPCs aufgenommen und effizient *cross-präsentiert* werden können. Daraus resultiert ein Vorteil im initialen *Priming*, der zu einem verbesserten *Cross-Priming* antiviraler CD8 T-Zellen und damit zu einem Anstieg der Frequenzen mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen sowie zu einer Verbreiterung des Epitoprepertoires führt (Abb. 5.1, B).

5.4 Das verbesserte CD8 T-Zell-*Priming* nach Induktion von Apoptose führt zu einer verbesserten Kontrolle der Infektion in der Leber

Eine effektive, antivirale CD8 T-Zellantwort ist für die Kontrolle der akuten mCMV-Infektion essentiell (Reddehase, 2002; Holtappels *et al.*, 2006b; Holtappels *et al.*, 2008a; Holtappels *et al.*, 2013). Dies konnte insbesondere durch die protektive Wirkung adoptiv transferierter, mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen nach präventivem sowie therapeutischem Transfer in immunsupprimierten und infizierten Rezipienten belegt werden (Reddehase, 1985; Pahl-Seibert *et al.*, 2005).

Das in der vorliegenden Arbeit gezeigte verbesserte mCMV-spezifische CD8 T-Zell-*Priming* und die daraus resultierende Zunahme der CD8 T-Zell-Frequenzen sowie die zusätzliche Verbreiterung des CD8 T-Zellepitop-Repertoires ließen eine verbesserte Schutzwirkung Δ M36-*geprimter* CD8 T-Zellen vermuten.

Nach präventivem Transfer Δ M36-*geprimter* CD8 T-Zellen konnte in der Leber ein Unterschied in der Kontrolle der Infektion nachgewiesen werden; ein besseres protektives Potential Δ M36-*geprimter* CD8 T-Zellen war nach therapeutischem Transfer nur tendenziell erkennbar. In Lunge und Milz konnte eine bessere Viruskontrolle nicht gezeigt werden. Möglicherweise war das protektive Potential WT-*geprimter* bzw. in diesem Fall mit der funktionellen Revertante (Δ M36-FADD^{DN}) *geprimter* CD8 T-Zellen für die Kontrolle der mCMV-Infektion in Lunge und Milz ausreichend und konnte nicht durch ein verbessertes CD8 T-Zell-*Priming* verstärkt werden.

Da der adoptive Transfer im immunsupprimierten Tier den Nachweis eines verbesserten protektiven Potentials Δ M36-*geprimter* CD8 T-Zellen nur in der Leber erlaubte, wurde ein System etabliert, das die Analyse im immunkompetenten Tier ermöglicht. In diesem System erfolgte 7 Tage nach Primärinfektion eine *Challenge*-Infektion i.v. mit hoher Dosis, um die Viruslast in den Organen immunkompetenter Versuchstiere bestimmen zu können

Im ersten *Challenge*-Experiment konnte nach vorherigem *Priming* der Versuchstiere in allen Organen eine sehr effiziente Schutzwirkung gegenüber der i.v.-Infektion nicht *geprimter* Kontrolltiere gezeigt werden. Ein effizienteres protektives Potential Δ M36-*geprimter* CD8 T-Zellen konnte im Vergleich zu Revertante- bzw. WT-*geprimter* CD8 T-Zellen jedoch nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise konnte im immunkompetenten Tier aufgrund der effizienten Immunkontrolle gegen die *Challenge*-Infektion kein Unterschied im protektiven Potential nachgewiesen werden.

Eine mögliche Erklärung für die sofortige Kontrolle der *Challenge*-Infektion wäre eine Maskierung des Virus durch mCMV-spezifische Antikörper. Diese Hypothese basierte auf den Daten meiner Diplomarbeit „Analyse der humoralen Immunantwort gegen das murine Cytomegalovirus“ (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Thomas Winkler, Lehrstuhl für Genetik, Universität Erlangen-Nürnberg), die auf eine frühe Kontrolle der akuten Infektion durch mCMV-spezifische Antikörper im Serum hinweist. In dieser Arbeit konnte ein sehr früher mCMV-spezifischer IgG-Serumtiter nachgewiesen werden, der nach therapeutischem Transfer in immundefiziente und infizierte RAG1^{-/-}-Mäuse eine signifikante Reduktion der Viruslast in Milz, Lunge und Speicheldrüse bewirkte.

Um ein weiteres *Challenge*-Experiment ohne Einfluss von Antikörpern durchzuführen, wurde die IgMi-Maus verwendet, in der selektiv nur die Sezernierung von Antikörpern durch B-Zellen blockiert ist (Waisman *et al.*, 2007; Waisman *et al.*, 2008). Ein effizienteres protektives Potential Δ M36-*geprimter* CD8 T-Zellen konnte auch hier nicht nachgewiesen werden.

Dem dritten *Challenge*-Experiment lag die Hypothese zugrunde, dass nach Gabe einer verringerten *Priming*-Dosis ein Unterschied im protektiven Potential nachgewiesen werden könnte. Allerdings war es auch in diesem Experiment nicht möglich, ein effizienteres protektives Potential mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen infolge eines verbesserten CD8 T-Zell-*Primings* zu zeigen. Vielmehr konnte nach *Priming* mit einer 1000-fach geringeren Dosis (100 PFU) dennoch eine sehr effiziente Kontrolle der *Challenge*-Infektion beobachtet werden.

5.5 Fazit und Ausblick

Die Fähigkeit zum *Cross-Priming* von CD8 T-Zellen macht DCs zu einer essentiellen Komponente bei der Initiation einer effektiven Immunantwort gegen Viren, Tumore und Autoimmunerkrankungen (Kurts *et al.*, 2010). Die immunologische Analyse der DCs gehört deshalb zu einem wichtigen Ansatzpunkt immuntherapeutischer Strategien. Das erst kürzlich beschriebene humane Pendant der murinen *cross*-präsentierenden CD8⁺ DCs brachte die DCs weiter in den Mittelpunkt des Interesses (Bachem *et al.*, 2010). Die Bereitstellung von Antigenen aus apoptotischen Zellen für das *Cross-Priming* von CD8 T-Zellen wurde bisher in etlichen *ex vivo*- und *in vivo*-Systemen bestätigt und liefert eine vielversprechende Basis für die Immuntherapie beim Menschen.

Da die Kontrolle der CMV-Infektion von einer effektiven antiviralen CD8 T-Zellantwort abhängt (Reddehase *et al.*, 1985; Reddehase *et al.*, 1988; Reusser *et al.*, 1991; Holtappels *et al.*, 2006b; Holtappels *et al.*, 2008a; Holtappels *et al.*, 2013), ist die Etablierung einer CD8 T-Zell-basierten Immuntherapie beim Menschen Gegenstand aktueller Forschung. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals für CMV gezeigt werden, dass die Induktion des programmierten Zelltods zu einem effizienteren CD8 T-Zell-*Priming* führt. Daher wäre die exogene Beladung von *Cross-Priming*-fähigen DCs mit viralen Antigenen aus infizierten apoptotischen oder nekroptotischen Zellen für die nachfolgende Re-Infusion in Patienten ein denkbarer Ansatz für die Immuntherapie beim Menschen.

Eine weitere vielversprechende Strategie wäre die Entwicklung einer CMV-Vakzine auf Basis einer attenuierten Zelltod-induzierenden Virusmutante. In der vorliegenden Arbeit konnte nach Deletion des anti-apoptotischen Gens *M36* bzw. des anti-nekroptotischen Gens *M45* ein Defekt in der Replikationsfähigkeit des Virus bereits im drainierenden LK nachgewiesen werden. Obwohl diese Deletionsmutanten eine Attenuierung *in vivo* aufwiesen, induzierten sie erheblich gesteigerte mCMV-spezifische CD8 T-Zell-Frequenzen. Dieser Befund könnte bei der Entwicklung einer wirksamen CMV-Vakzine von Interesse sein, da diese Virusmutanten trotz Attenuierung keinen Verlust der Immunogenität zeigen.

Die Herstellung einer Doppeldeletionsmutante, in der die viralen Gene *M36* und *M45* deletiert sind, könnte den Phänotyp der Einzeldelentionsmutanten noch verstärken, da diese Virusmutante neben der Apoptose auch die Nekroptose fördern sollte. Möglicherweise wäre hierdurch eine noch stärkere Attenuierung bei gleichbleibender oder erhöhter Immunogenität zu erreichen.

Perdiguero und Kollegen konnten zeigen, dass die Deletion des viralen, anti-apoptotischen Gens *F1L* in MVA-C zur Induktion des intrinsischen, Mitochondrien-abhängigen Apoptose-*Signalings* führt und eine Infektion von BALB/c-Mäusen in einer gesteigerten antiviralen CD8 T-Zellantwort resultiert (Perdiguero *et al.*, 2012). Da die viralen, anti-apoptotischen Proteine, die den intrinsischen, Mitochondrien-abhängigen Weg über Bax und Bak (m38.5 und m41.1)

inhibieren, für mCMV ebenfalls bekannt sind (Brune *et al.*, 2011; Handke *et al.*, 2012; Fliss und Brune, 2013), wäre mit den entsprechenden Deletionsmutanten ebenfalls eine gesteigerte CD8 T-Zellantwort zu erwarten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten grundlegende Erkenntnisse im Hinblick auf das initiale CD8 T-Zell-*Priming* nach mCMV-Infektion im LK gewonnen werden. Es ergeben sich aber auch neue Fragestellungen, die zu einem besseren Verständnis des *Cross-Priming*-Mechanismus führen könnten. Die Identifizierung der profAPCs im drainierenden LK und ihre Suszeptibilität gegenüber mCMV ist eine Problematik, die aktuell noch geklärt werden muss. Hsu und Kollegen konnten zeigen, dass ca. 80% der infizierten Zellen im subkapsulären Sinus des mediastinalen LK zu sehr frühen Zeitpunkten (8h) nach mCMV-Infektion (i.p.) CD169⁺ waren. Dieser Marker wird spezifisch auf phagozytären Makrophagen exprimiert (Hsu *et al.*, 2009). Dies weist auf einen nicht unbedeutenden Einfluss von Makrophagen auf das CD8 T-Zell-*Priming* im LK hin und könnte Auswirkungen auf die Ansichten zu *Cross-Priming* und direktem *Priming* haben. Durch die Depletion von Makrophagen mit Clodronat-Liposomen sind wir aktuell dabei, die Beteiligung von Makrophagen am initialen CD8 T-Zell-*Priming* aufzuklären.

6 Literaturverzeichnis

A

- Abenes, G., M. Lee, E. Haghjoo, T. Tong, X. Zhang, and F. Liu.** 2001. Murine cytomegalovirus open reading frame M27 plays an important role in growth and virulence in mice. *J. Virol.* 75:1697-1707.
- Adler, B., and C. Sinzger.** 2013. Cytomegalovirus interstrain variance in cell type tropism, Vol. I.17, p.297-321. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Ahmed, R., and D. Gray.** 1996. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272:54-60.
- Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho.** 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2:675-680.
- Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi.** 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 124:783-801.
- Albert, M.L.** 2004. Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation? *Nat. Rev. Immunol.* 4:223-231.
- Albert, M. L., B. Sauter, and N. Bhardwaj.** 1998. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392:86-89.
- Allan, J. E., and G. R. Shellam.** 1984. Genetic control of murine cytomegalovirus infection: virus titres in resistant and susceptible strains of mice. *Arch. Virol.* 81:139-150.
- 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.
- Anderson, B. M., and J. R. Ohlfest.** 2012. Increasing the efficacy of tumor cell vaccines by enhancing cross priming. *Cancer Lett.* 325:155-164.
- Andoniou, C. E.** 2010. Suicide watch: how cytomegalovirus interferes with the cell-death pathways of infected cells. *Tissue Antigens* 76:1-8.
- Arase, H., and L. L. Lanier.** 2004. Specific recognition of virus-infected cells by paired NK receptors. *Rev. Med. Virol.* 14:83-93.
- 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.
- Arrode, G., C. Boccaccio, J. Lule, S. Allart, N. Moinard, J. P. Abastado, A. Alam, and C. Davrinche.** 2000. Incoming human cytomegalovirus pp65 (UL83) contained in apoptotic infected fibroblasts is cross-presented to CD8(+) T cells by dendritic cells. *J. Virol.* 74:10018-10024.
- Askew, D., and C. V. Harding.** 2008. Antigen processing and CD24 expression determine antigen presentation by splenic CD4+ and CD8+ dendritic cells. *Immunology* 123:447-455.

B

- Babic, M., M. Pyzik, B. Zafirova, M. Mitrovic, V. Butorac, L. L. Lanier, A. Krmpotic, S. M. Vidal, and S. Jonjic.** 2010. Cytomegalovirus immunoevasin reveals the physiological role of "missing self" recognition in natural killer cell dependent virus control *in vivo*. *J. Exp. Med.* 207:2663-2673.
- Bachem, A., S. Güttler, E. Hartung, F. Ebstein, M. Schaefer, A. Tannert, A. Salama, K. Movassaghi, C. Opitz, H. W. Mages, V. Henn, P. M. Kloetzel, S. Gurka, and R. A. Kroczeck.** 2010. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c⁺ CD141⁺ cells as homologues of mouse CD8⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207:1273-1281.
- Bancroft, G. J., G. R. Shellam, and J. E. Chalmer.** 1981. Genetic influences on the augmentation of natural killer (NK) cells during murine cytomegalovirus infection: correlation with patterns of resistance. *J. Immunol.* 126:988-994.
- Bertrand, M. J., and P. Vandenabeele.** 2011. The ripoptosom: death decision in the cytosol. *Mol. Cell* 43:323-325.
- Basta, S., and J. R. Bennink.** 2003. A survival game of hide and seek: cytomegaloviruses and MHC class I antigen presentation pathways. *Viral. Immunol.* 16:231-242.
- Bevan, M. J.** 1976. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic Assay. *J. Exp. Med.* 143:1283-1288.
- Bevan, M. J.** 2006. Cross-priming. *Nat. Immunol.* 7:363-365.
- Bianchi, K., and P. Meier.** 2009. A tangled web of ubiquitin chains: breaking news in TNF-R1 signaling. *Mol. Cell* 36:736-742.
- Biron, C. A.** 2001. Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look. *Immunity* 14:661-664.
- Biron, C. A., K. S. Byron, and J. L. Sullivan.** 1989. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N. Engl. J. Med.* 320:1731-1735.
- Biron, C. A., K. B. Nguyen, G. C. Pien, L. P. Cousens, and T. P. Salazar-Mather.** 1999. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 17:189-220.
- Biron, C. A., H. C. Su, and J. S. Orange.** 1996. Function and regulation of natural killer (NK) cells during viral infections: characterization of responses *in vivo*. *Methods.* 9:379-393.
- Blachere, N. E., R. B. Darnell, and M. L. Albert.** 2005. Apoptotic cells deliver processed antigen to dendritic cells for cross-presentation. *PLoS Biol.* 3:e185.
- 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.** 2008. The Immune evasion paradox: immunoevasins of murine cytomegalovirus enhance priming of CD8 T cells by preventing negative feed-back regulation. *J. Virol.* 82:11637-11650.
- Boehme, K. W., and T. Compton.** 2006. Virus entry and activation of innate immunity, p.63-89. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.

- Boppana, S. B., and W. J. Britt.** 2013. Synopsis of clinical aspects of human cytomegalovirus disease, Vol. II.1, p.1-25. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Boppana, S. B., L. B. Rivera, K. B. Fowler, M. Mach, and W. J. Britt.** 2001. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N. Engl. J. Med.* 344:1366-1371.
- Boyle, K. A., R. L. Pietropaolo, and T. Compton.** 1999. Engagement of the cellular receptor for glycoprotein B of human cytomegalovirus activates the interferon-responsive pathway. *Mol. Cell. Biol.* 19:3607-3613.
- Britt, W. J.** 2006. Human cytomegalovirus infections and mechanisms of disease, p. 1-28. In: M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Britt, W. J.** 2010. Cytomegalovirus, p.706-755. In J.S. Remington, J.O. Klein, C.B. Wilson, V. Nizet and Y. Maldonado (eds.), Elsevier Saunders, Philadelphia.
- Brown, M. G.** 2001. Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* 292:934-937.
- 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.** 2011. Inhibition of programmed cell death by cytomegaloviruses. *Virus. Res.* 157:144-150.
- Brune, W., C. Menard, J. Heesemann, and U. H. Koszinowski.** 2001. A ribonucleotide reductase homolog of cytomegalovirus and endothelial cell tropism. *Science* 291:303-305.
- Bubic, I., M. Wagner, A. Krmpotic, T. Saulig, S. Kim, W. M. Yokoyama, S. Jonjic, and U. H. Koszinowski.** 2004. Gain of virulence caused by loss of a gene in murine cytomegalovirus. *J. Virol.* 78:7536-7554.
- Buckwalter, M. R., and P. K. Srivastava.** 2013. Mechanism of dichotomy between CD8+ responses elicited by apoptotic and necrotic cells. *Cancer Immun.* 13:2.
- Bukowski J. F., J. F. Warner, G. Dennert, and R. M. Welsh.** 1985. Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells *in vivo*. *J. Exp. Med.* 161:40-52.
- Bukowski, J. F., B. A. Woda, and R. M. Welsh.** 1984. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *J. Virol.* 52:119-118.
- Bukowski, J. F., H. Yang, and R. M. Welsh.** 1988. Antiviral effect of lymphokine-activated killer cells: characterization of effector cells mediating prophylaxis. *J. Virol.* 62:3642-3648.
- 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.

Burgdorf, S., C. Schölz, A. Kautz, R. Tampe, and C. Kurts. 2008. Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nat. Immunol.* 9:558-566.

C

Cam, M., W. Handke, M. Picard-Maureau, and W. Brune. 2010. Cytomegaloviruses inhibit Bak- and Bax-mediated apoptosis with two separate viral proteins. *Cell Death Differ.* 17:655-665.

Cain, K., S. B. Bratton, C. Langlais, G. Walker, D. G. Brown, X. M. Sun, and G. M. Cohen. 2000. Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J. Biol. Chem.* 275:6067-6070.

Caposio, P., S. L. Orloff, and D. N. Streblow. 2011. The role of cytomegalovirus in angiogenesis. *Virus Res.* 157:204-211.

Carbone, F. R., C. Kurts, S. R. Bennett, J. F. Miller, and W. R. Heath. 1998. Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. *Immunol. Today.* 19:368-373.

Cha, T. A., E. Tom, G. W. Kemble, G. M. Duke, E. S. Mocarski, and R. R. Spaete. 1996. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J. Virol.* 70:78-83.

Chan, F. K., J. Shisler, J. G. Bixby, M. Felices, L. Zheng, M. Appel, J. Orenstein, B. Moss, and M. J. Lenardo. 2003. A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. *J. Biol. Chem.* 278:51613-51621.

Chavez-Galan, L., M. C. Arenas-Del Angel, E. Zenteno, R. Chavez, R. Lascurain. 2009. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell. Mol. Immunol.* 6:15-25.

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.

Chen, G. Y., and G. Nunez. 2010. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* 10:826-837.

Chou, S.W. 2001. Cytomegalovirus drug resistance and clinical implications. *Transpl. Infect. Dis.* 3:20-24.

Cicin-Sain, L., J. Podlech, M. Messerle, M. J. Reddehase, and U. H. Koszinowski. 2005. Frequent coinfection of cells explains functional *in vivo* complementation between cytomegalovirus variants in the multiply infected host. *J. Virol.* 79:9492-9502.

- Cicin-Sain, L., Z. Ruzsics, J. Podlech, I. Bubic, C. Menard, S. Jonjic, M. J. Reddehase, and U. H. Koszinowski.** 2008. Dominant-negative FADD rescues the *in vivo* fitness of cytomegalovirus lacking an antiapoptotic viral gene. *J. Virol.* 82:2056-2064.
- Cobbold, M., N. Khan, B. Pourgheysari, 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. 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.
- Colugnati, F. A., S. A. Staras, S. C. Dollard, and M. J. Cannon.** 2007. Incidence of cytomegalovirus infection among the general population and pregnant women in the United States. *BMC Infect. Dis.* 7:71.
- Crane, M. J., P. J. Gaddi, and T. P. Salazar-Mather.** 2012. UNC93B1 mediates innate inflammation and antiviral defense in the liver during acute murine cytomegalovirus infection. *PLoS One.* 7:e39161.
- Crozat, K., R. Guiton, M. Guilliams, S. Henri, T. Baranek, I. Schwartz-Cornil, B. Malissen, and M. Dalod.** 2010. Comparative genomics as a tool to reveal functional equivalences between human and mouse dendritic cell subsets. *Immunol. Rev.* 234:177-198.

D

- 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.
- Davison, A. J.** 2003. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J. Gen. Virol.* 84:17-28.
- Davison, A. J.** 2011. Evolution of sexually transmitted and sexually transmissible human herpesviruses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1230:37-49.
- Davison, A. J., and D. J. Bhella.** 2007. Comparative genome and virion structure, pp. 177–203. In Arvin, A., G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P. S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi (eds.), *Human herpesviruses: biology, therapy and immunoprophylaxis*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Davison, A. J., R. Eberle, B. Ehlers, G. S. Hayward, D. J. McGeoch, A. C. Minson, P. E. Pellett, B. Roizman, M. J. Studdert, and E. Thiry.** 2009. The order Herpesvirales. *Arch. Virol.* 154:171-177.
- Davison A. J., M. Holton, A. Dolan, D. J. Dargan, D. Gatherer, and G. S. Hayward.** 2013. Comparative genomics of primate cytomegaloviruses, Vol. I, p.1-22. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Debes, G. F., M. E. Dahl, A. J. Mahiny, K. Bonhagen, D. J. Campbell, K. Siegmund, K. J. Erb, D. B. Lewis, T. Kamradt, and A. Hamann.** 2006. Chemotactic responses of IL-4-, IL-10-, and IFN-gamma-producing CD4+ T cells depend on tissue origin and microbial stimulus. *J Immunol.* 176:557-566.

- de Brito, C., M. Tomkowiak, R. Ghittoni, C. Caux, Y. Leverrier, and J. Marvel.** 2011. CpG promotes cross-presentation of dead cell-associated antigens by pre-CD8 α ⁺ dendritic cells. *J. Immunol.* 186:1503-1511.
- Declerq, W., T. Vanden Berghe, and P. Vandenabeele.** 2009. RIP kinases at the crossroads of cell death and survival. *Cell* 138:229-232.
- Degterev, A., Z. Huang, M. Boyce, Y. Li, P. Jagtap, N. Mizushima, G. D. Cuny, T. J. Mitchison, M. A. Moskowitz, and J. Yuan.** 2005. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat. Chem. Biol.* 2:112-119.
- del Val, M., H. Hengel, H. Häcker, U. Hartlaub, T. Ruppert, P. Lucin, and U. H. Koszinowski.** 1992. Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide-loaded major histocompatibility complex class I molecules into the medial-Golgi compartment. *J. Exp. Med.* 176:729-738.
- den Haan, J. M., and M. J. Bevan.** 2001. Antigen presentation to CD8⁺ T cells: cross-priming in infectious diseases. *Curr. Opin. Immunol.* 13:437-441.
- 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.
- Devin, A., A. Cook, Y. Lin, Y. Rodriguez, M. Kelliher, and Z. Liu.** 2000. The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity* 12:419-429.
- Di Pucchio, T., B. Chatterjee, A. Smed-Sørensen, S. Clayton, A. Palazzo., M. Montes, Y. Xue, I. Mellman, J. Banachereau, and J. E. Connolly.** 2008. Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nat. Immunol.* 9:551-557.
- Doherty, P. C.** 1993. Cell-mediated cytotoxicity. *Cell* 75:607-612.
- Dolan, A.** 2004. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 85:1301-1312.
- Dolan, B. P., K. D. Gibbs, and S. Ostrand-Rosenberg.** 2006. Dendritic cells cross-dressed with peptide MHC class I complexes prime CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* 177:6018-6024.
- Dowling, J. N., A. R. Saslow, J. A. Armstrong, and M. Ho.** 1976. Cytomegalovirus infection in patients receiving immunosuppressive therapy for rheumatologic disorders. *J. Infect. Dis.* 133:399-408.
- Doom, C. M., and A. B. Hill.** 2008. MHC class I immune evasion in MCMV infection. *Med. Microbiol. Immunol.* 197:191-204.
- Dresch, C., Y. Leverrier, J. Marvel, and K. Shortman.** 2012. Development of antigen cross-presentation capacity in dendritic cells. *Trends Immunol.* 33:381-388.
- Drew, W. L.** 1992. Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 14:608-615.
- Dudziak, D., A. O. Kamphorst, G. F. Heidkamp, V. R. Buchholz, C. Trumpfheller, S. Yamazaki, C. Cheong, K. Liu, H. W. Lee, C. G. Park, R. M. Steinman, and M. C. Nussenzweig.** 2007. Differential antigen processing by dendritic cell subsets *in vivo*. *Science* 315:107-111.

E

- Ebermann, L., Z. Ruzsics, C. A. Guzman, N. van Rooijen, R. Casalegno-Garduno, U. H. Koszinowski, and L. Cicin-Sain.** 2012. Block of death-receptor apoptosis protects mouse cytomegalovirus from macrophages and is a determinant of virulence in immunodeficient hosts. *PLoS Pathog.* 8:e1003062.
- Ebert, S., N. A. Lemmermann, D. Thomas, A. Renzaho, M. J. Reddehase, and R. Holtappels.** 2012a. Immune control in the absence of immunodominant epitopes: implications for immunotherapy of cytomegalovirus infection with antiviral CD8 T cells. *Med. Microbiol. Immunol.* 201:541-545.
- Ebert, S., J. Podlech, D. Gillert-Marien, K. M. Gergely, J. K. Büttner, A. Fink, K. Freitag, D. Thomas, M. J. Reddehase, and R. Holtappels.** 2012b. Parameters determining the efficacy of adoptive CD8 T-cell therapy of cytomegalovirus infection. *Med. Microbiol. Immunol.* 201:527–539.
- Edelson, B. T., W. KC, R. Juang, M. Kohyama, L. A. Benoit, P. A. Klekotka, C. Moon, J. C. Albring, W. Ise, D. G. Michael, D. Bhattacharya, T. S. Stappenbeck, M. J. Holtzman, S. S. Sung, T. L. Murphy, K. Hildner, and K. M. Murphy.** 2010. Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8a+ conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207:823–836.
- 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, United Kingdom.
- Einsele, H., and K. Hamprecht.** 2003. Immunotherapy of cytomegalovirus infection after stem-cell transplantation: a new option? *Lancet.* 362:1343-1344.
- Einsele, H., G. Rauser, U. Grigoleit, H. Hebart, C. Sinzger, S. Riegler, and G. Jahn.** 2002. Induction of CMV-specific T-cell lines using Ag-presenting cells pulsed with CMV protein or peptide. *Cytotherapy.* 4:49-54.
- Einsele, H., E. Roosnek, N. Rufer, C. Sinzger, S. Riegler, J. Löffler, U. Grigoleit, A. Moris, H. G. Rammense, L. Kanz, A. Kleihauer, F. Frank, G. Jahn, and H. Hebart.** 2002. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood.* 99:3916-3922.
- Elmore, S.** 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35:495-516.
- Emery, V. C., and P. D. Griffiths.** 1990. Molecular biology of cytomegalovirus. *Int. J. Exp. Pathol.* 71:905-918.
- Erlach, K. C., V. Böhm, C. K. Seckert, M. J. Reddehase, and J. Podlech.** 2006. Lymphoma cell apoptosis in the liver induced by distant murine cytomegalovirus infection. *J. Virol.* 80:4801-4819.
- Erice, A.** 1999. Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drugs. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:286–297.

F

- Fadok, V. A., D. L. Bratton, S. C. Frasch, M. L. Warner, and P. M. Henson.** 1998. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* 5:551-562.
- Feng, S., Y. Yang, Y. Mei, L. Ma, D. E. Zhu, N. Hoti, M. Castanares, and M. Wu.** 2007. Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain. *Cell Signal.* 19:2056-2067.
- Feoktistova, M., P. Geserick, B. Kellert, D. P. Dimitrova, C. Langlais, M. Hupe, K. Cain, M. MacFarlane, G. Häcker, and M. Leverkus.** 2011. cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. *Mol. Cell* 43:449-463.
- Festjens, N., T. Vanden Berghe, and P. Vandenabeele.** 2006. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochem. Biophys. Acta.* 1757:1371-1387.
- Feuchtinger, T., K. Opherk, W. A. Bethge, M. S. Topp, F. R. Schuster, E. M. Weissinger, M. Mohty, R. Or, M. Maschan, M. Schumm, K. Hamprecht, R. Handgretinger, P. Lang, and H. Einsele.** 2010. Adoptive transfer of pp65-specific T-cells for the treatment of chemorefractory cytomegalovirus disease or reactivation after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood* 116:4360–4367.
- Fink, A., A. Renzaho, M. J. Reddehase, and N. A. Lemmermann.** 2013. The p36 isoform of murine cytomegalovirus m152 protein suffices for mediating innate and adaptive immune evasion. *Viruses* 5:3171-3191.
- Fitzgerald, N. A., J. M. Papadimitriou, and G. R. Shellam.** 1990. Cytomegalovirus-induced pneumonitis and myocarditis in newborn mice. A model for perinatal human cytomegalovirus infection. *Arch. Virol.* 115:75-88.
- Flinsenberg, T. W., E. B. Compeer, J. J. Boelens, and M. Boes.** 2011. Antigen cross-presentation: extending recent laboratory findings to therapeutic intervention. *Clin. Exp. Immunol.* 165:8-18.
- Fliss, P. M., and W. Brune.** 2012. Prevention of cellular suicide by cytomegaloviruses. *Viruses* 4:1928-1949.
- Fowler, K. B., S. Stagno, R. F. Pass, W. J. Britt, T. J. Boll, and C. A. Alford.** 1992. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N. Engl. J. Med.* 326:663-667.
- Frazer, K.A., E. Eskin, H. M. Kang, M. A. Bogue, D. A. Hinds, E. J. Beilharz, R. V. Gupta, J. Montgomery, M. M. Morenzoni, G. B. Nilsen, C. L. Pethiyagoda, L. L. Stuve, F. M. Johnson, M. J. Daly, C. M. Wade, and D. R. Cox.** 2007. A sequencebased variation map of 8.27 million SNPs in inbred mouse strains. *Nature* 448:1050–1053.
- Fulda, S., and K. M. Debatin.** 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25:4798-4811.

G

Galluzzi, L., I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, T. M. Dawson, V. L. Dawson, W. S. El-Deiry, and S. Fulda. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 19:107–120.

Ginhoux, F., K. Liu, J. Helft, M. Bogunovic, M. Greter, D. Hashimoto, J. Price, N. Yin, J. Bromberg, S. A. Lira, E. R. Stanley, M. Nussenzweig, and M. Merad. 2009. The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *J. Exp. Med.* 206:3115-3130.

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.

Goldmacher, V. S. 2002. vMIA, a viral inhibitor of apoptosis targeting mitochondria. *Biochimie* 84:177-185.

Goldmacher, V. S., L. M. Bartle, A. Skaletskaya, C. A. Dionne, N. L. Kedersha, C. A. Vater, J. W. Han, R. J. Lutz, S. Watanabe, E. D. Cahir McFarland, E. D. Kieff, E. S. Mocarski, and T. Chittenden. 1999. A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:12536-12541.

Gonzalez, S. F., L. A. Pitcher, T. Mempel, F. Schuerpf, and M. C. Carroll. 2009. B cell acquisition of antigen *in vivo*. *Curr. Opin. Immunol.* 21:251-257.

Gorla, R., L. Imberti, E. Prati, D. Brugnani, S. Caligaris, R. Cattaneo, A. Albertini, and D. Primi. 1994. Differential priming to programmed cell death of superantigen-reactive lymphocytes of HIV patients. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 10:1097-1103.

Grande, A. G., M. J. Adrolewicz, R. S. Athwal, D. E. Geraghty, and T. Spies. 1995. Dependence of peptide binding by MHC class I molecules on their interaction with TAP. *Science* 270:105-108.

Grander, D, O. Sangfelt, and S. Erickson. 1997. How does interferon exert its cell growth inhibitory effect? *Eur. J. Haematol.* 59:129-35.

Greenberg, P.D., P. Reusser, J. M. Goodrich, and S. R. Riddell. 1991. Development of a treatment regimen for human cytomegalovirus (CMV) infection in bone marrow transplantation recipients by adoptive transfer of donor-derived CMV-specific T-cell clones expanded *in vitro*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 636:184-195.

Guermonprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery, and S. Amigorena. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 20:621-667.

H

Häcker, G. 2000. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 301:-5-17.

Han, J., C. Q. Zhong, and D. W. Zhang. 2011. Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. *Nat. Immunol.* 12:1143-1149.

- Handke, W., E. Krause, and W. Brune.** 2012. Live or let die: manipulation of cellular suicide programs by murine cytomegalovirus. *Med. Microbiol. Immunol.* 201:475-486.
- Hanshaw, J. B., and J. A. Dudgeon.** 1978. Congenital cytomegalovirus. *Major Probl. Clin. Pediatr.* 17:97-152.
- Hansen, T. H., and M. Bouvier.** 2009. MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies. *Nat. Rev. Immunol.* 9:503-513.
- Hanson, L.K., J. S. Slater, Z. Karabekian, H. W. Virgin, C. A. Biron, M. C. Ruzek, N. van Rooijen, R. P. Ciavarra, R. M. Stenberg, and A. E. Campbell.** 1999. Replication of murine cytomegalovirus in differentiated macrophages as a determinant of viral pathogenesis. *J. Virol.* 73:5970-5980.
- Harty, J. T., A. R. Tvinnereim, and D. W. White.** 2000. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu. Rev. Immunol.* 18:275-308.
- Hasan, M., A. Krmpotic, Z. Ruzsics, I. Bubic, T. Lenac, A. Halenius, A. Loewendorf, M. Messerle, H. Hengel, S. Jonjic, and U. H. Koszinowski.** 2005. Selective down-regulation of the NKG2D ligand H60 by mouse cytomegalovirus m155 glycoprotein. *J. Virol.* 79:2920-2930.
- He, S., Y. Liang, F. Shao, and X. Wang.** 2011. Toll-like receptors activate programmed necrosis in macrophages through a receptor-interacting kinase-3-mediated pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108:20054-20059.
- Heath, W. R., and F. R. Carbone.** 1999. Cytotoxic T lymphocyte activation by cross-priming. *Curr. Opin. Immunol.* 11:314-318.
- Heath, W. R., and F. R. Carbone.** 2001. Crosspresentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 19:47-64.
- Heath, W. R., and F. R. Carbone.** 2009. Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nat. Immunol.* 10:1237-1244.
- Heininger, A., G. Jahn, C. Engel, T. Notheisen, K. Unertl, and K. Hamprecht.** 2001. Human cytomegalovirus infections in nonimmunosuppressed critically ill patients. *Crit. Care. Med.* 29:541-547.
- Hengartner, M. O.** 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776.
- Hengel, H., U. Reusch, A. Gutermann, H. Ziegler, S. Jonjic, P. Lucin, and U. H. Koszinowski.** 1999. Cytomegaloviral control of MHC class I function in the mouse. *Immunol. Rev.* 168:167-176.
- Hickman, H. D., K. Takeda, C. N. Skon, F. R. Murray, S. E. Hensley, J. Loomis, G. N. Barber, J. R. Bennink, and J. W. Yewdell.** 2008. Direct priming of antiviral CD8+ T cells in the peripheral interfollicular region of lymph nodes. *Nat. Immunol.* 9:155-165.
- Hildner, K., B. T. Edelson, W. E. Purtha, M. Diamond, H. Matsushita, M. Kohyama, B. Calderon, B. U. Schraml, E. R. Unanue, M. S. Diamond, R. D. Schreiber, T. L. Murphy, and K. M. Murphy.** 2008. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science.* 322:1097-1100.

- Hill, A. B.** 2013. Putative disease associations with cytomegalovirus: a critical survey, Vol. II.23, p.497-509. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Hisamatsu, H., N. Shimbara, Y. Saito, P. Kristensen, K. B. Hendil, T. Fujiwara, E. Takahashi, N. Tanahashi, T. Tamura, A. Ichihara, and K. Tanaka.** 1996. Newly identified pair of proteasomal subunits regulated reciprocally by interferon gamma. *J. Exp. Med.* 183:1807-1816.
- Hokeness, K. L., E. S. Deweerd, M. W. Munks, C. A. Lewis, R. P. Gladue, and T. P. Salazar-Mather.** 2007. CXCR3-dependent recruitment of antigen-specific T lymphocytes to the liver during murine cytomegalovirus infection. *J. Virol.* 81:1241-1250.
- Holler, N., R. Zaru, O. Micheau, M. Thome, A. Attinger, S. Valitutti, J. L. Bodmer, P. Schneider, B. Seed, and J. Tschopp.** 2000. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat. Immunol.* 1:489-495.
- Holtappels, R., V. Böhm, J. Podlech, and M. J. Reddehase.** 2008a. CD8 T-cell-based immunotherapy of cytomegalovirus infection: 'proof of concept' provided by the murine model. *Med. Microbiol. Immunol.* 197:125-134.
- 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, Vol. II, p.354-381. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Holtappels, R., D. Gillert-Marien, D. Thomas, J. Podlech, P. Deegen, S. Herter, S. A. Oehrlein-Karpi, D. Strand, M. Wagner, and M. J. Reddehase.** 2006a. Cytomegalovirus encodes a positive regulator of antigen presentation. *J. Virol.* 80:7613-7624.
- Holtappels, R., N. K. A. Grzimek, and M. J. Reddehase.** 2002a. Early gene m18, a novel player in the immune response to murine cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 83:311-316.
- Holtappels, R., M. W. Munks, J. Podlech, and M. J. Reddehase.** 2006b. CD8 T cell-based immunotherapy of cytomegalovirus disease in the mouse model of the immunocompromised bone marrow transplantation recipient, p383-418. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Holtappels, R., M. F. Pahl-Seibert, D. Thomas, and M. J. Reddehase.** 2000a. 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., 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, N. K. Grzimek, D. Thomas, M. F. Pahl-Seibert, and M. J. Reddehase.** 2001. Experimental preemptive immunotherapy of murine cytomegalovirus disease with CD8 T-cell lines specific for ppM83 and pM84, the two homologs of human cytomegalovirus tegument protein ppUL83 (pp65). *J. Virol.* 75: 6584-6600.
- 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., C. O. Simon, M. W. Munks, D. Thomas, P. Deegen, B. Kühnapfel, T. Däubner, S. F. Emde, J. Podlech, N. K. Grzimek, S. A. Oehrlein-Karpi, A. B. Hill, and M. J. Reddehase.** 2008b. Subdominant CD8 T-cell epitopes account for protection against cytomegalovirus independent of immunodomination. *J. Virol.* 82:5781-5796.
- Holtappels, R., D. Thomas, J. Podlech, G. Geginat, H. P. Steffens, and M. J. Reddehase.** 2000b. The putative natural killer decoy early gene m04 (gp34) of murine cytomegalovirus encodes an antigenic peptide recognized by protective antiviral CD8 T cells. *J. Virol.* 74:1871-1884.
- Holtappels, R., D. Thomas, J. Podlech, and M. J. Reddehase.** 2002b. 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., D. Thomas, and M. J. Reddehase.** 2000c. Identification of a K(d)-restricted antigenic peptide encoded by murine cytomegalovirus early gene M84. *J. Gen. Virol.* 81:3037-3042.
- Hornung, V., A. Ablasser, M. Charrel-Dennis, F. Bauernfeind, G. Horvath, D. R. Caffrey, E. Latz, and K. A. Fitzgerald.** 2009. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Natur* 458:514-518.
- Houde, M., S. Bertholet, E. Gagnon, S. Brunet, G. Goyette, A. Laplante, M. F. Princiotta, P. Thibault, D. Sacks, and M. Desjardins.** 2003. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425:402-406.
- Huang, A. Y., A. T. Bruce, D. M. Pardoll, and H. I. Levitsky.** 1996. In vivo cross-priming of MHC class I-restricted antigens requires the TAP transporter. *Immunity* 4:349-355.
- Hudson, J.B., V. Misra, and T. R. Mosmann.** 1976. Cytomegalovirus infectivity: analysis of the phenomenon of centrifugal enhancement of infectivity. *Virology* 72:235-243.
- Hsu, K. M., J. R. Pratt, W. J. Akers, S. I. Achilefu, and W. M. Yokoyama.** 2009. Murine cytomegalovirus displays selective infection of cells within hours after systemic administration. *J. Gen. Virol.* 90:33-43.
- Humphreys, I. R., C. de Trez, A. Kinkade, C. A. Benedict, M. Croft, and C. F. Ware.** 2007. Cytomegalovirus exploits IL-10-mediated immune regulation in the salivary glands. *J. Exp. Med.* 204:1217-1225.
- 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.

I

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.

Isaacs, A., and J. Lindenmann. 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 147:258-267.

Israel, A., A. Kimura, A. Fournier, M. Fellous, and P. Kourilsky. 1986. Interferon response sequence potentiates activity of an enhancer in the promoter region of a mouse H-2 gene. *Nature* 322:743-746.

Iyoda, T., S. Shimoyama, K. Liu, Y. Omatsu, Y. Akiyama, Y. Maeda, K. Takahara, R. M. Steinman, and K. Inaba. 2002. The CD8⁺ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and *in vivo*. *J. Exp. Med.* 195:1289-1302.

J

Janeway, C. A. Jr., and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20:197-216.

Janssen, E., K. Tabeta, M. J. Barnes, S. Rutschmann, S. McBride, K. S. Bahjat, S. P. Schoenberger, A. N. Theofilopoulos, B. Beutler, and K. Hoebe. 2006. Efficient T cell activation via a Toll-Interleukin 1 Receptor-independent pathway. *Immunity.* 24:787-799.

Jonjic, S., I. Bubic, and A. Krmpotic. 2006. Innate immunity to cytomegaloviruses, p.285-320. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.

Jonjic, S., I. Pavic, B. Polic, I. Crnkovic, 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.

Jonjic, S., B. Polic, and A. Krmpotic. 2008. Viral inhibitors of NKG2D ligands: friends or foes of immune surveillance? *Eur. J. Immunol.* 38:2952-2956.

K

Kaczmarek, A., P. Vandenabeele, and D. V. Krysko. 2013. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity.* 38:209-223.

Kaech, S. M., and R. Ahmed. 2001. Memory CD8⁺ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat. Immunol.* 2:415-422.

Kaiser, W.J., J. W. Upton, A. B. Long, D. Livingston-Rosanoff, L. P. Daley-Bauer, R. Hakem, T. Caspary, and E. S. Mocarski. 2011. RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. *Nature* 471:368-372.

- Kaiser, W.J., J. W. Upton, and E. S. Mocarski.** 2008. Receptor-interacting protein homotypic interaction motif-dependent control of NF-kappa B activation via the DNA-dependent activator of IFN regulatory factors. *J. Immunol.* 181:6427-6434.
- Kärre, K., H. G. Ljunggren, G. Piontek, and R. Kiessling.** 1986. Selective rejection of H-2 deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *J. Immunol.* 174:6566-6569.
- Karrer, U., S. Sierro, M. Wagner, A. Oxenius, H. Hengel, U. H. Koszinowski, R. E. Phillips, and P. Klenermann.** 2003. Memory inflation: continuous accumulation of antiviral CD8+ T cells over time. *J. Immunol.* 170:2022-2029.
- Kavanagh, D.G., and A. B. Hill.** 2001. Evasion of cytotoxic T lymphocytes by murine cytomegalovirus. *Semin. Immunol.* 13:19-26.
- 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.
- Kerksiek, K. M., F. Niedergang, P. Chavrier, D. H. Busch, and T. Brocker.** 2005. Selective Rac1 inhibition in dendritic cells diminishes apoptotic cell uptake and cross-presentation *in vivo*. *Blood.* 105:742-749.
- 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.
- Kielczewska, A., M. Pyzik, T. Sun, A. Krmpotic, M. B. Lodoen, M. W. Munks, M. Babić, A. B. Hill, U. H. Koszinowski, S. Jonjić, L. L. Lanier, and S. M. Vidal.** 2009. Ly49P recognition of cytomegalovirus-infected cells expressing H2-Dk and CMV-encoded m04 correlates with the NK cell antiviral response. *J. Exp. Med.* 206:515-523.
- Kirwan, S. E., and D. N. Burshtyn.** 2007. Regulation of natural killer cell activity. *Curr. Opin. Immunol.* 19:46-54.
- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Gremer, M. Pawlita, P. H. Krammer, and M. E. Peter.** 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14:5579-5588.
- Klenovsek, K., F. Weisel, A. Schneider, U. Appelt, S. Jonjic, M. Messerle, B. Bradel-Tretheway, T. H. Winkler, and M. Mach.** 2007. Protection from CMV infection in immunodeficient hosts by adoptive transfer of memory B cells. *Blood.* 110:3472-3479.
- Korber, B., L. Hood, and I. Stroynowski.** 1987. Regulation of murine class I genes by interferons is controlled by regions located both 5' and 3' to the transcription initiation site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3380-3384.
- Kovacsovics-Bankowski, M., and K. L. Rock.** 1995. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267:243-246.

- Krmpotic, A., I. Bubic, B. Polic, P. Lucin, and S. Jonjic.** 2003. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. *Microbes Infect.* 5:1263-1277.
- Krmpotic, A., D. H. Busch, I. Bubic, F. Gebhardt, H. Hengel, M. Hasan, A. A. Scalzo, U. H. Koszinowski, and S. Jonjic.** 2002. MCMV glycoprotein gp40 confers virus resistance to CD8+ T cells and NK cells *in vivo*. *Nat. Immunol.* 3:529-535.
- Krmpotic, A., M. Hasan, A. Loewendorf, T. Saulig, A. Halenius, T. Lenac, B. Polic, I. Bubic, A. Kriegeskorte, E. Pernjak-Pugel, M. Messerle, H. Hengel, D. H. Busch, U. H. Koszinowski, and S. Jonjic.** 2005. NK cell activation through the NKG2D ligand MULT-1 is selectively prevented by the glycoprotein encoded by mouse cytomegalovirus gene m145. *J. Exp. Med.* 201:211-220.
- Krysko, D. V., P. Agostinis, O. Krysko, A. D. Garg, C. Bachert, B. N. Lambrecht, and P. Vandenabeele.** 2011. Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends Immunol.* 32:157-64.
- Krysko, D. V., G. Brouckaert, M. Kalai, P. Vandenabeele, and K. D'Herde.** 2003. Mechanisms of internalization of apoptotic and necrotic L929 cells by a macrophage cell line studied by electron microscopy. *J. Morphol.* 258:336-345.
- Krysko, D. V., K. D'Herde, and P. Vandenabeele.** 2006. Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis.* 11:1709-1726.
- Krysko, D. V., T. Vanden Berghe, K. D'Herde, and P. Vandenabeele.** 2008. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods* 44:205-221.
- Kurts, C., B. W. Robinson, and P. A. Knolle.** 2010. Cross-priming in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 10:403-414.

L

- Landolfo, S., M. Gariglio, G. Gribaudo, and D. Lembo.** 2003. The human cytomegalovirus. *Pharmacol. Ther.* 98:269-297.
- Lapenta, C., S. M. Santini, M. Spada, S. Donati, F. Urbani, D. Accapezzato, D. Franceschini, M. Andreotti, V. Barnaba, and F. Belardelli.** 2006. IFN- α -conditioned dendritic cells are highly efficient in inducing cross-priming CD8(+) T cells against exogenous viral antigens. *Eur. J. Immunol.* 36:2046-2060.
- Lattanzi, L., C. Rozera, D. Marescotti, G. D'Agostino, L. Santodonato, S. Cellini, F. Belardelli, R. Gavioli, and M. Ferrantini.** 2011. IFN- α boosts epitope cross-presentation by dendritic cells via modulation of proteasome activity. *Immunobiology.* 216:537-547.
- Le Bon, A., N. Etchart, C. Rossmann, M. Ashton, S. Hou, D. Gewert, P. Borrow, and D. F. Tough.** 2003. Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat. Immunol.* 4:1009-1015.
- Le Bon, A., and D. F. Tough.** 2008. Type I interferon as a stimulus for cross-priming. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19:33-40.
- Lee, H. K., M. Zamora, M. M. Linehan, N. Iijima, D. Gonzalez, A. Haberman, and A. Iwasaki.** 2009. Differential roles of migratory and resident DCs in T cell priming after mucosal or skin HSV-1 infection. *J. Exp. Med.* 206:359-370.

- 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.
- Lembo, D., and W. Brune.** 2009. Tinkering with a viral ribonucleotide reductase. *Trends. Biochem. Sci.* 34:25-32.
- Lembo, D., M. Donalisio, A. Hofer, M. Cornaglia, W. Brune, U. H. Koszinowski, L. Thelander, and S. Landolfo.** 2004. The ribonucleotide reductase R1 homolog of murine cytomegalovirus is not a functional enzyme subunit but is required for pathogenesis. *J. Virol.* 78:4278-4288.
- Lemmermann N. A., V. Böhm, R. Holtappels, and M. J. Reddehase.** 2011. In vivo impact of cytomegalovirus evasion of CD8 T-cell immunity: facts and thoughts based on murine models. *Virus Res.* 157:161-174.
- Lemmermann, N. A., A. Fink, J. Podlech, S. Ebert, V. Wilhelmi, V. Böhm, R. Holtappels, and M. J. Reddehase.** 2012. Murine cytomegalovirus immune evasion proteins operative in the MHC class I pathway of antigen processing and presentation: state of knowledge, revisions, and questions. *Med. Microbiol. Immunol.* 201:497-512.
- Lenac, T., J. Arapovic, L. Traven, A. Krmpotic, and S. Jonjic.** 2008. Murine cytomegalovirus regulation of NKG2D ligands. *Med. Microbiol. Immunol.* 197:159-166.
- Lenac, T., M. Budt, J. Arapovic, M. Hasan, A. Zimmermann, H. Simic, A. Krmpotic, M. Messerle, Z. Ruzsics, U. H. Koszinowski, H. Hengel, and S. Jonjic.** 2006. The herpesviral Fc receptor fcr-1 down-regulates the NKG2D ligands MULT-1 and H60. *J. Exp. Med.* 203:1843-1850.
- Leon, B., M. Lopez-Bravo, and C. Ardavin.** 2007. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity.* 26:519-531.
- Li, H., H. Zhu, C. J. Xu, and J. Yuan.** 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491-501.
- Li, L., S. Kim, J. M. Herndon, P. Goedegebuure, B. A. Belt, A. T. Satapathy, T. P. Fleming, T. H. Hansen, K. M. Murphey, and W. E. Gillanders.** 2012. Cross-dressed CD8 α + / CD103+ dendritic cells prime CD8+ T cells following vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:12716-12721.
- Lin, Y., A. Devin, Y. Rodriguez, and Z. G. Liu.** 1999. Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev.* 13:2514-2526.
- Lodoen, M. B., G. Abenes, S. Umamoto, J. P. Houchins, F. Liu, and L. L. Lanier.** 2004. The cytomegalovirus m155 gene product subverts natural killer cell antiviral protection by disruption of H60-NKG2D interactions. *J. Exp. Med.* 200:1075-1081.
- Lodoen, M., K. Ogasawara, J. A. Hamerman, H. Arase, J. P. Houchins, E. S. Mocarski, and L. L. Lanier.** 2003. NKG2D-mediated natural killer cell protection against cytomegalovirus is impaired by viral gp40 modulation of retinoic acid early inducible 1 gene molecules. *J. Exp. Med.* 197:1245-1253.
- Loewendorf, A., and C. A. Benedict.** 2010. Modulation of host innate and adaptive immune defenses by cytomegalovirus: timing is everything. *J. Intern. Med.* 267:483-501.

Long, J. S., and K. M. Ryan. 2012. New frontiers in promoting tumour cell death: targeting apoptosis, necroptosis and autophagy. *Oncogene* 31:5045-5060.

Lorenzi, S., F. Mattei, A. Sistigu, L. Bracci, F. Spadaro, M. Sanchez, M. Spada, F. Belardelli, L. Gabriele, and G. Schiavoni. 2011. Type I IFNs control antigen retention and survival of CD8 α (+) dendritic cells after uptake of tumor apoptotic cells leading to cross-priming. *J. Immunol.* 186:5142-5150.

Lotze, M. T., H. J. Zeh, A. Rubartelli, L. J. Sparvero, A. A. Amoscato, N. R. Washburn, M. E. Devara, X. Liang, M. Tör, and T. Billar. 2007. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol. Rev.* 220:60-81.

Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter, and X. Wang. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:481-490.

M

Mack, C., A. Sickmann, D. Lembo, and W. Brune. 2008. Inhibition of proinflammatory and innate immune signaling pathways by a cytomegalovirus RIP1-interacting protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:3094-3099.

Maidji, E., G. Nigro, T. Tabata, S. McDonagh, N. Nozawa, S. Shiboski, S. Muci, M. M. Anceschi, N. Aziz, and S. P. Adler. 2010. Antibody treatment promotes compensation for human cytomegalovirus-induced pathogenesis and a hypoxia-like condition in placentas with congenital infection. *Am. J. Pathol.* 177:1298–1310.

Maiuri, M. C., E. Zalckvar, A. Kimchi, and G. Kroemer. 2007. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8:741-752.

Marks, J. R., and D. H. Spector. 1988. Replication of the murine cytomegalovirus genome: structure and role of the termini in the generation and cleavage of concatamers. *Virology* 162:98-107.

Marrack, P., and J. Kappler. 1987. The T cell receptor. *Science* 238:1073-1079.

Maurer, T., A. Heit, H. Hochrein, F. Ampenberger, M. O'Keeffe, S. Bauer, G. B. Lipford, R. M. Vabulas, and H. Wagner. 2002. CpG-DNA aided cross-presentation of soluble antigens by dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 32:2356-2364.

Maussang, D., E. Langemeijer, C. P. Fitzsimons, M. Stigter-van Walsum, R. Dijkman, M. K. Borg, E. Slinger, A. Schreiber, D. Michel, C. P. Tensen, G. A. van Dongen, R. Leurs, and M. J. Smit. 2009. The human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 promotes angiogenesis and tumor formation via cyclooxygenase-2. *Cancer Res.* 69:2861-2869.

Mayer, B., and R. Oberbauer. 2003. Mitochondrial regulation of apoptosis. *News Physiol. Sci.* 18:89-94.

- McCormick A. L., and E. S. Mocarski.** 2013. Cell death pathways controlled by cytomegaloviruses, Vol. I.15, p.264-277. In M. J. Reddehase (ed.), Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- McCormick, A. L., A. Skaletskaya, P. A. Barry, E. S. Mocarski, and V. S. Goldmacher.** 2003. Differential function and expression of the viral inhibitor of caspase 8-induced apoptosis (vICA) and the viral mitochondria-localized inhibitor of apoptosis (vMIA) cell death suppressors conserved in primate and rodent cytomegaloviruses. *Virology*. 316:221-233.
- McGeoch, D. J., S. Cook, A. Dolan, F. E. Jamieson, and E. A. Telford.** 1995. Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *J. Mol. Biol.* 247: 443-458.
- Meier, J. F., and M. F. Stinski.** 2006. Major immediate-early enhancer and its gene products, p.151-166. In M. J. Reddehase (ed.), Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Menard, C., M. Wagner , Z. Ruzsics, K. Holak, W. Brune, A. E. Campbell, and U. H. Koszinowski.** 2003. Role of murine cytomegalovirus US22 gene family members in replication in macrophages. *J. Virol.* 77:5557-5570.
- Merzougui, N., R. Kratzer, L. Saveanu, and P. van Endert.** 2011. A proteasome-dependent, TAP-independent pathway for cross-presentation of phagocytosed antigen. *EMBO Rep.* 12:1257-1264.
- 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. USA*, 94:14759-14763.
- Meyers, J. D., N. Flournoy, and E. D. Thomas.** 1986. Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation. *J. Infect. Dis.* 153:478-488.
- Micheau, O., and J. Tschopp.** 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114:181-190.
- Michel, D., M. Chevillotte, and T. Mertens.** 2013. Antiviral therapy, drug resistance and computed resistance profiling, Vol. II.19, p.402-423. In M. J. Reddehase (ed.), Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Michel, D., and T. Mertens.** 2006. Antiviral intervention, resistance, and perspectives, p.573-590. In M. J. Reddehase (ed.), Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Miller-Kitrell, M., and T. E. Sparer.** 2009. Feeling manipulated: cytomegalovirus immune manipulation. *Virol. J.* 6:4.
- Miller, D. M., Y. Zhang, B. M. Rahill, W. J. Waldman, and D. D. Sedmak.** 1999. Human cytomegalovirus inhibits IFN-alpha-stimulated antiviral and immunoregulatory responses by blocking multiple levels of IFN-alpha signal transduction. *J. Immunol.* 162:6107-6113.

- Mitrovic, M., J. Arapovic, S. Jordan, N. Fodil-Cornu, S. Ebert, S. M. Vidal, A. Krmpotic, M. J. Reddehase, and S. Jonjic.** 2012. The NK cell response to mouse cytomegalovirus infection affects the level and kinetics of the early CD8(+) T-cell response. *J. Virol.* 86:2165-2175.
- Mocarski, E. S.** 2002. Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. *Trends Microbiol.* 10: 332–339.
- Mocarski, E.S.** 2004. Immune escape and exploitation strategies of cytomegaloviruses: impact on and imitation of the major histocompatibility system. *Cell. Microbiol.* 6, 707–717.
- Mocarski, E. S., T. Shenk, and R. F. Pass.** 2007. Cytomegaloviruses, p.2701-22772. In Knipe D. M., and P. M. Howley (eds.), *Field's Virology* 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA.
- Mocarski, E. S., J. W. Upton, and W. J. Kaiser.** 2011. Viral infection and the evolution of caspase 8-regulated apoptotic and necrotic death pathways. *Nat. Rev. Immunol.* 12:79-88.
- Moskowitz, L., G. T. Hensley, J. C. Chan, and K. Adams.** 1985. Immediate causes of death in acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 109:735-738.
- Müller, U., U. Steinhoff, L. F. Reis, S. Hemmi, J. Pavlovic, R. M. Zinkernagel, and M. Aguet.** 1994. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264:1918- 1921.
- Munks, M. W., K. S. Cho, A. K. Pinto, S. Sierro, P. Klenerman, and A. B. Hill.** 2006a. Four distinct patterns of memory CD8 T cell responses to chronic murine cytomegalovirus infection. *J. Immunol.* 177:450-458.
- Munks, M. W., M. C. Gold, A. L. Zajac, C. M. Doom, C. S. Morello, D. H. Spector, and A. B. Hill.** 2006b. Genome-wide analysis reveals a highly diverse CD8 T cell response to murine cytomegalovirus. *J. Immunol.* 176:3760-3766.
- Munks, M. W., A. K. Pinto, C. M. Doom, and A. B. Hill.** 2007. Viral interference with antigen presentation does not alter acute or chronic CD8 T cell immunodominance in murine cytomegalovirus infection. *J. Immunol.* 178:7235-7241.
- Murphy, E., I. Rigoutsos, T. Shibuya, and T. E. Shenk.** 2003. Reevaluation of human cytomegalovirus coding potential. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100:13585-13590.
- Murphy, E., and T. Shenk.** 2008. Human cytomegalovirus genome. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325:1-19.
- 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.

N

- Nagata, S.** 1997. Apoptosis by death factor. *Cell.* 88:355-365.
- Navarro, L., K. Mowen, S. Rodems, B. Weaver, N. Reich, D. Spector, and M. David.** 1998. Cytomegalovirus activates interferon immediate-early response gene expression and an interferon regulatory factor 3-containing interferon-stimulated response element-binding complex. *Mol. Cell. Biol.* 18:3796-3802.

- Neiman, P. E., W. Reeves, G. Ray, N. Flournoy, K. G. Lerner, G. E. Sale, and E. D. Thomas.** 1977. A prospective analysis interstitial pneumonia and opportunistic viral infection among recipients of allogeneic bone marrow grafts. *J. Infect. Dis.* 136:754-767.
- Nierkens, S., J. Tel, E. Janssen, and G. J. Adema.** 2013. Antigen cross-presentation by dendritic cell subsets: one general or all sergeants? *Trends Immunol.* 34:361-370.
- Nigro, G., and S. P. Adler.** 2011. Cytomegalovirus infections during pregnancy. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 23:123–128.
- Nigro, G., S. P. Adler, R. La Torre, and A. M. Best.** 2005. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.* 353:1350–1362.
- Nopora, K., C. A. Bernhard, C. Ried, A. A. Castello, K. M. Murphy, P. Marconi, U. H. Koszinowski, and T. Brocker.** 2012. MHC class I cross-presentation by dendritic cells counteracts viral immune evasion. *Front. Immunol.* 3:348.
- Norbury, C. C., B. J. Chambers, A. R. Prescott, H. G. Ljunggren, and C. Watts.** 1997. Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 27:280-288.
- Norris, K. L., and R. J. Youle.** 2008. Cytomegalovirus proteins vMIA and m38.5 link mitochondrial morphogenesis to Bcl-2 family proteins. *J. Virol.* 82:6232-6243.
- 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.
- Nowlin D. M., N. R. Cooper, and T. Compton.** 1991. Expression of a human cytomegalovirus receptor correlates with infectibility of cells. *J. Virol.* 65:3114-3121.

O

- 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.
- Oberst, A., C. P. Dillon, R. Weinlich, L. L. McCormick, P. Fitzgerald, C. Pop, R. Hakem, G. S. Salvesen, and D. R. Green.** 2011. Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature* 471:363-367.
- O'Donnell, M. A., E. Perez-Jimenez, A. Oberst, A. Ng, R. Massoumi, R. Xavier, D. R. Green, and A. T. Ting.** 2011. Caspase 8 inhibits programmed necrosis by processing CYLD. *Nat. Cell Biol.* 13:1437-1442.
- Ojala, P. M., B. Sodeik, M. W. Ebersold, U. Kutay, and A. Helenius.** 2000. Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* 20:4922-4931.

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 pretreatment enhances antiviral T-cell immunity against cytomegalovirus. *Blood*. 122:55-60.

P

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.

Palmowski, M. J., U. Gileadi, M. Salio, A. Gallimore, M. Millrain, E. James, C. Addey, D. Scott, J. Dyson, E. Simpson, and V. Cerundolo. 2006. Role of immunoproteasomes in cross-presentation. *J. Immunol.* 177:983-990.

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.

Pass, R. F. 1985. Epidemiology and transmission of cytomegalovirus. *J. Infect. Dis.* 152:243-248.

Peggs, K. S., K. Thomson, E. Samuel, G. Dyer, J. Armoogum, R. Chakraverty, K. Pang, S. Mackinnon, and M. W. Lowdell. 2011. Directly selected cytomegalovirus-reactive donor T cells confer rapid and safe systemic reconstitution of virus-specific immunity following stem cell transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 52:49-57.

Peggs, K.S., S. Verfuether, A. Pizzey, N. Khan, M. Guiver, P. A. Moss, and S. Mackinnon. 2003. Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines. *Lancet* 362:1375–1377.

Pellett, P.E., A. J. Davison, R. Eberle, B. Ehlers, G. S. Hayward, V. Lacoste, A. C. Minson, J. Nicholas, B. Roizman, and M. J. Studdert. 2011. Herpesviridae, p. 111–122. In King, A. M. Q., M. J. Adams, E. B. Carstens, and E. J. Lefkowitz (eds.), *Virus taxonomy, Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Elsevier Academic Press, London, United Kingdom.

Pellett, P. E., and B. Roizman. 2007. The family herpesviridae: a brief introduction, p. 2479-2499. In Knipe D. M., and P. M. Howley (eds.), *Field's Virology 5th edition*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA.

Perdiguero, B., C. E. Gomez, J. L. Najera, C. O. Sorzano, J. Delaloye, R. Gonzalez-Sanz, V. Jimenez, T. Roger, T. Calandra, G. Pantaleo, and M. Esteban. 2012. Deletion of the viral anti-apoptotic gene F1L in the HIV/AIDS vaccine candidate MVA-C enhances immune responses against HIV-1 antigens. *PLoS One*. 7:e48524.

Pestka, S., J. A. Langer, K. C. Zoon, and C. E. Samuel. 1987. Interferons and their actions. *Annu. Rev. Biochem.* 56:727-777.

Pichlmair, A., O. Schulz, C. P. Tan, J. Rehwinkel, H. Kato, O. Takeuchi, S. Akira, M. Way, G. Schiavo, and C. Reis e Sousa. 2009. Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *J. Virol.* 83:10761-10769.

Plotkin, S. A., and B. Plachter. 2013. Cytomegalovirus vaccine: on the way to the future? Vol. II.16, p.424-449. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.

Plummer, G. 1967. Comparative virology of the herpes group. *Prog. Med. Virol.* 9:302-340.

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 (ed.), *Methods in Microbiology, Immunology of Infection*, 2nd ed., vol. 32. Academic Press, London and San Diego, Cal.

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. Wirtz, H. P. Steffens, and M. J. Reddehase. 1998. Reconstitution of CD8 T cells is essential for the prevention of multiple-organ cytomegalovirus histopathology after bone marrow transplantation. *J. Gen. Virol.* 79:2099-2104.

Poulin, L. F., S. Henri, B. de Bovis, E. Devilard, A. Kissenpfennig, and B. Malissen. 2007. The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 204:3119-3131.

Poulin, L. F., M. Salio, E. Griessinger, F. Anjos-Afonso, L. Craciun, J. L. Chen, A. M. Keller, O. Joffre, S. Zelenay, E. Nye, A. Le Moine, F. Faure, V. Donckier, D. Sancho, V. Cerundolo, D. Bonnet, and C. Reis e Sousa. 2010. Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207:1261-1271.

Powers, C., V. DeFilippis, D. Malouli, and K. Früh. 2008. Cytomegalovirus immune evasion. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325:333-359.

Q

Quinnan, G. V., J. E. Manischewitz, and F. A. Ennis. 1978. Cytotoxic T lymphocyte response to murine cytomegalovirus infection. *Nature* 273:541-543.

R

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.

Rebsamen, M., L. X. Heinz, E. Meylan, M. C. Michallet, K. Schroder, K. Hofmann, J. Vazquez, C. A. Benedict, and J. Tschoop. 2009. DAI/ZBP1 recruits RIP1 and RIP3 through RIP homotypic interaction motifs to activate NF-kappaB. *EMBO Rep.* 10:916-922.

Reddehase, M. J. 2002. Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat. Rev. Immunol.* 2:831-844.

- Reddehase, M. J., M. Baltesen, M. Rapp, S. Jonjic, I. Pavic, and U. H. Koszinowski.** 1994. The conditions of primary infection define the load of latent viral genome in organs and the risk of recurrent cytomegalovirus disease. *J. Exp. Med.* 179:185-193.
- Reddehase, M. J., M. R. Fibi, G. M. Keil, and U. H. Koszinowski.** 1986. Late-phase expression of a murine cytomegalovirus immediate-early antigen recognized by cytolytic T lymphocytes. *J. Virol.* 60:1125-1129.
- Reddehase, M. J., S. Jonjic, F. Weiland, W. Mutter, and U. H. Koszinowski.** 1988. Adoptive immunotherapy of murine cytomegalovirus adenitis in the immunocompromised host: CD4-helper-independent antiviral function of CD8-positive memory T-lymphocytes derived from latently infected donors. *J. Virol.* 62:1061–1065.
- 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., and U. H. Koszinowski.** 1991. Redistribution of critical major histocompatibility complex and T cell receptor-binding functions of residues in an antigenic sequence after biterminal substitution. *Eur. J. Immunol.* 21:1697-1701.
- Reddehase, M. J., W. Mutter, K. Münch, H. J. Bühring, and U. H. Koszinowski.** 1987. CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *J. Virol.* 61:3102-3108.
- Reddehase, M. J., J. Podlech, N. K. A. Grzimek.** 2002. Mouse models of cytomegalovirus latency: overview. *J. Clin. Virol.* 25:Suppl 2 23-36.
- 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., C. O. Simon, J. Podlech, and R. Holtappels.** 2004. Stalemating a clever opportunist: lessons from murine cytomegalovirus. *Hum Immunol.* 65:446-455.
- Reddehase, M. J., C. O. Simon, C. K. Seckert, N. Lemmermann, and N. K. Grzimek.** 2008. Murine model of cytomegalovirus latency and reactivation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325:315-331.
- 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.
- Redwood, A.J., M. Messerle, N. L. Harvey, C. M. Hardy, U. H. Koszinowski, M. A. Lawson, and G. R. Shellam.** 2005. Use of a murine cytomegalovirus K181-derived bacterial artificial chromosome as a vaccine vector for immunocontraception. *J. Virol.* 79:2998–3008.
- Redwood, A. J., G. R. Shellam, and L. M. Smith.** 2013. Molecular evolution of murine cytomegalovirus genomes, Vol. I, p.23-37. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Reinke, P., S. Prösch, F. Kern, and H. D. Volk.** 1999. Mechanisms of human cytomegalovirus (HCMV) (re)activation and its impact on organ transplant patients. *Transpl. Infect. Dis.* 1:157-164.
- Reis e Sousa, C.** 2006. Dendritic cells in mature age. *Nat. Rev. Immunol.* 6:476-483.

- Reusch, U., W. Muranyi, P. Lucin, H. G. Burgert, H. Hengel, and U. H. Koszinowski.** 1999. A cytomegalovirus glycoprotein re-routes MHC class I complexes to lysosomes for degradation. *EMBO J.* 18:1081-1091.
- 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., and P. D. Greenberg.** 1995. Principles for adoptive T cell therapy of human viral diseases. *Annu. Rev. Immunol.* 13:545-586.
- 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.
- Robinson, N., S. McComb, R. Mulligan, R. Dudani, L. Krishnan, and S. Sad.** 2012. Type I interferon induces necroptosis in macrophages during infection with salmonella enterica serovar typhimurium. *Nat. Immunol.* 13:954-962.
- Rock, K. L., S. Gamble, and L. Rothstein.** 1990. Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:7517-7521.
- Rock, K. L., and A. L. Goldberg.** 1999. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* 17:739-779.
- Rock, K. L., and L. Shen.** 2005. Crosspresentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol. Rev.* 207:166-183.
- Rock, K. L., I. A. York, and A. L. Goldberg.** 2004. Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nat. Immunol.* 5:670-677.
- Rock, K. L., I. A. York, T. Saric, and A. L. Goldberg.** 2002. Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv. Immunol.* 80:1-70.
- Roizman, B., and J. Baines.** 1991. The diversity and unity of Herpesviridae. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 14:63-79.
- 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.
- 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.
- Rudolph, M. G., R. L. Stanfield, and I. A. Wilson.** 2006. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu. Rev. Immunol.* 24:419-466.

S

- Salazar-Mather, T. P., C. A. Lewis, and C. A. Biron.** 2002. Type I interferons regulate inflammatory cell trafficking and macrophage inflammatory protein 1 α delivery to the liver. *J. Clin. Invest.* 110:321-330.
- Saelens, X., N. Festjens, L. Vande Walle, M. van Gorp, G. van Loo, and P. Vandenabeele.** 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene.* 23:2861-2874.
- Samuel, C. E.** 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:778-809.
- Sancho, D., and C. Reis e Sousa.** 2013. Sensing of cell death by myeloid C-type lectin receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 25:46-52.
- Sathe, P., J. Pooley, D. Vremec, J. Mintern, J. O. Jin, L. Wu, J. Y. Kwak, J. A. Villadangos, and K. Shortman.** 2011. The acquisition of antigen cross-presentation function by newly formed dendritic cells. *J. Immunol.* 186:5184-5192.
- Saveanu L., O. Carroll, Y. Hassainya, and P. Van Endert.** 2005. Complexity, contradictions, and conundrums: studying post-proteasomal proteolysis in HLA class I antigen presentation. *Immunol. Rev.* 207:42-59.
- Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. M. Debatin, P. H. Krammer, and M. E. Peter.** 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17:1675-1687.
- Scalzo, A. A., A. J. Corbett, W. D. Rawlinson, G. M. Scott, and M. A. Degli-Esposti.** 2007. The interplay between host and viral factors in shaping the outcome of cytomegalovirus infection. *Immunol. Cell. Biol.* 85:46-54.
- Scalzo, A. A., N. A. Fitzgerald, A. Simmons, A. B. La Vista, and G. R. Shellam.** 1990. *Cmv1*, a genetic locus that controls murine cytomegalovirus replication in the spleen. *J. Exp. Med.* 171:1469-1483.
- Schlee, M., E. Hartmann, C. Coch, V. Wimmernauer, M. Janke, W. Barchet, and G. Hartmann.** 2009. Approaching the RNA ligand for RIG-I? *Immunol. Rev.* 227:66-74.
- Schmitt, C. A., and S. W. Lowe.** 1999. Apoptosis and therapy. *J. Pathol.* 187:127-137.
- 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.
- Schulz, O., and C. Reis e Sousa.** 2002. Cross-presentation of cell-associated antigens by CD8 α ⁺ dendritic cells is attributable to their ability to internalize dead cells. *Immunology* 107:183-189.
- Schütze, S., V. Tchikov, and W. Schneider-Brachert.** 2008. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:655-662.
- Segura, E., and J. A. Villadangos.** 2011. A modular and combinatorial view of the antigen cross-presentation pathway in dendritic cells. *Traffic* 12:1677-1685.
- Seillet, C., J. T. Jackson, K. A. Markey, H. J. Brady, G. R. Hill, K. P. MacDonald, S. L. Nutt, and G. T. Belz.** 2013. CD8 α ⁺ DCs can be induced in the absence of transcription factors Id2, Nfil3, and Batf3. *Blood.* 121:1574-1583.

- Seo, S., and M. Boeckh.** 2013. Clinical Cytomegalovirus Research: hematopoietic cell transplantation, Vol. II.16, p.337-353. In M. J. Reddehase (ed.), Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Serwold, T., F. Gonzalez, J. Kim, R. Jacob, and N. Shastri.** 2002. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 419:480-483.
- Seth, R. B., L. Sun, and Z. J. Chen.** 2006. Antiviral innate immunity pathways. *Cell Res.* 16:141-147.
- Shanley, J. D.** 1990. *In vivo* administration of monoclonal antibody to the NK 1.1 antigen of natural killer cells: effect on acute murine cytomegalovirus infection. *J. Med. Virol.* 30:56-60.
- Shellam, G. R., J. E. Allan, J. M. Papadimitriou, and G. J. Bancroft.** 1981. Increased susceptibility to cytomegalovirus infection in beige mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78:5104-5108.
- 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, L., L. J. Sigal, M. Boes, and K. L. Rock.** 2004. Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation *in vivo*. *Immunity* 21:155-165.
- Shimizu, S., T. Kanaseki, N. Mizushima, T. Mizuta, S. Arakawa-Kobayashi, C. B. Thompson, and Y. Tsujimoto.** 2004. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat. Cell. Biol.* 6:1221-1228.
- Shortman, K., and W. R. Heath.** 2010. The CD8+ dendritic cell subset. *Immunol. Rev.* 234:18-31.
- Shortman, K., and Y. J. Liu.** 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* 2:151-161.
- Shortman, K. and S. H. Naik.** 2007. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 7:19-30.
- 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.
- Skaletskaya, A., L. M. Bartle, T. Chittenden, A. L. McChormick, E. S. Mocarski, and V. S. Goldmacher.** 2001. A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:7829-7834.
- Smith, M. G.** 1954. Propagation of salivary gland virus of the mouse in tissue cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86:435-440.
- Smith, H. R. C., J. W. Heusel, I. K. Mehta, S. Kim, B. G. Dorner, O. V. Naidenko, K. Iizuka, H. Furukawa, D. L. Beckman, J. T. Pingel, A. A. Scalzo, D. H. Fremont, and W. M. Yokoyama.** 2002. Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:8826-8831.

- Smyth, M. J., K. Takeda, Y. Hayakawa, J. J. Reschon, M. J. van den Brink, and H. Yagita.** 2003. Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy. *Immunity*. 18:1-6.
- 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.
- Späte, R. R., and E. S. Mocarski.** 1987. Insertion and deletion mutagenesis of the human cytomegalovirus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:7213-7217.
- Stagno, S., and R. J. Whitley.** 1985. Herpesvirus infections of pregnancy. Part I: Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infections. *N. Engl. J. Med.* 313:1270-1274.
- Stassen, F. R., X. Vega-Cordova, I. Vliegen, and C. A. Bruggeman.** 2006. Immune activation following cytomegalovirus infection: more important than direct viral effects in cardiovascular disease? *J. Clin. Virol.* 35:3449-353.
- Steinman, R. M., and J. Banchereau.** 2007. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449:419-426.
- Stemberger, C., M. Neuenhahn, V. R. Buchholz, and D. H. Busch.** 2007. Origin of CD8+ effector and memory T cell subsets. *Cell. Mol. Immunol.* 4:399-405.
- Stemberger, C., and A. Single.** 2007. Naive CD8+ T Cell Precursor Can Develop into Diverse Effector and Memory Subsets. *Immunity* 27:985-997.
- Stern-Ginossar, N., B. Weisburd, A. Michalski, V. T. Le, M. Y. Hein, S. X. Huang, M. Ma, B. Shen, S. B. Qian, H. Hengel, M. Mann, N. T. Ingolia, and J. S. Weissman.** 2012. Decoding human cytomegalovirus. *Science* 338:1088-1093.
- Stenberg, R. M., D. R. Thomsen, and M. F. Stinski.** 1984. Structural analysis of the major immediate early gene of human cytomegalovirus. *J. Virol.* 49:190-199.
- Streblow, D., S. M. Varnum, R. D. Smith, and J. A. Nelson.** 2006. A proteomics analysis of human cytomegalovirus particles, p.63-89. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Suh, W. K., M. F. Cohen-Doyle, K. Früh, K. Wang, P. A. Peterson, and D. B. Williams.** 1994. Interaction of MHC class I molecules with the transporter associated with antigen processing. *Science* 264:1322-1326.
- Swiecki, M., and M. Colonna.** 2010. Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance. *Immunol. Rev.* 234:142-162.

T

- Tabeta, K., P. Georgel, E. Janssen, X. Du, K. Hoebe, K. Crozat, S. Mudd, L. Shamel, S. Sovath, J. Goode, L. Alexopoulou, R. A. Flavell, and B. Beutler.** 2004. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:3516-3521.

- Tabeta, K., K. Hoebe, E. M. Janssen, X. Du, P. Georgel, K. Crozat, S. Mudd, N. Mann, S. Sovath, J. Goode, L. Shamel, A. A. Herskovitis, D. A. Portnoy, M. Cooke, L. M. Tarantino, T. Whiltshire, B. E. Steinberg, S. Grinstein, and B. Beutler.** 2006. The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat. Immunol.* 7:156-164.
- Takaoka, A., Z. Wang, M. K. Choi, H. Yanai, H. Negishi, T. Ban, Y. Lu, M. Miyagishi, T. Kodama, K. Honda, Y. Ohaba, and T. Taniguchi.** 2007. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448:501-505.
- Takeuchi, O., and S. Akira.** 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 140:805-820.
- Tang, D., R. Kang, C. B. Coyne, H. J. Zeh, and M. T. Lotze.** 2012. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol. Rev.* 249:158-175.
- Tang, Q., E. A. Murphy, and G. G. Maul.** 2006. Experimental confirmation of global murine cytomegalovirus open reading frames by transcriptional detection, and partial characterization of newly described gene products. *J. Virol.* 80:6873-6882.
- Taniguchi, T., and A. Takaoka.** 2001. A weak signal for strong responses: interferon-alpha/beta revisited. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:378-386.
- Tay, C. H., and R. M. Welsh.** 1997. Distinct organ-dependent mechanisms for the control of murine cytomegalovirus infection by natural killer cells. *J. Virol.* 71:267-275.
- Terhune, S. S., J. Schroer, and T. Shenk.** 2004. RNAs are packaged into human cytomegalovirus virions in proportion to their intracellular concentration. *J. Virol.* 78:10390-10398.
- Thäle, R., U. Szepan, H. Hengel, G. Geginat, P. Lucin, and U. H. Koszinowski.** 1995. Identification of the mouse cytomegalovirus genomic region affecting major histocompatibility complex class I molecule transport. *J. Virol.* 69:6098-6105.
- Toes, R. E., A. K. Nussbaum, S. Degermann, M. Schirle, N. P. Emmerich, M. Kraft, C. Laplace, A. Zwiderman, T. P. Dick, J. Muller, B. Schonfisch, C. Schmid, H. J. Fehling, S. Stevanovic, H. G. Rammensee, and H. Schild.** 2001. Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J. Exp. Med.* 194:1-12.
- 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. Rülcke, and A. Oxenius.** 2011b. Non-hematopoietic cells in lymph nodes drive memory CD8 T cell inflation during murine cytomegalovirus infection. *PLoS Pathog.* 7:e1002214.
- Townsend, A., C. Ohlen, J., Bastin, H. G. Ljunggren, L. Foster, and K. Karre.** 1989. Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* 340:443-448.
- Trilling, M., V. T. Le, M. Fiedler, A. Zimmermann, E. Bleifuss, and H. Hengel.** 2011. Identification of DNA-damage DNA-binding protein 1 as a conditional essential factor for cytomegalovirus replication in interferon-gammastimulated cells. *PLoS Pathog.* 7:e1002069.

Tucker, P. K. 2007. Systematics of the genus *mus*, pp.13–24. In Fox, J.G., S. W. Barthold, M. T. Davisson, C. E. Newcomer, F. W. Quimby, and A. L. Smith (eds.), *The mouse in biomedical research*. Academic Press, Amsterdam. The Netherlands.

Turley, S. J., A. L. Fletcher, and K. G. Elpek. 2010. The stromal and haematopoietic antigen-presenting cells that reside in secondary lymphoid organs. *Nat. Rev. Immunol.* 10:813-825.

U

Uhl, M., O. Kepp, H. Jusforgues-Saklani, J. M. Vicencio, G. Kroemer, and M. L. Albert. 2009. Autophagy within the antigen donor cell facilitates efficient antigen cross-priming of virus-specific CD8⁺ T cells. *Cell Death Differ.* 16:991-1005.

Upton, J. W., W. J. Kaiser, and E. S. Mocarski. 2008. Cytomegalovirus M45 cell death suppression requires receptor-interacting protein (RIP) homotypic interaction motif (RHIM)-dependent interaction with RIP1. *J. Biol. Chem.* 283:16966-16970.

Upton, J. W., W. J. Kaiser, and E. S. Mocarski. 2010. Virus inhibition of RIP3-dependent necrosis. *Cell Host Microbe* 7:302-313.

Upton, J. W., W. J. Kaiser, and E. S. Mocarski. 2012. DAI/ZBP1/DLM-1 complexes with RIP3 to mediate virus-induced programmed necrosis that is targeted by murine cytomegalovirus vIRA. *Cell Host Microbe* 11:290-297.

V

Vandenabeele, P., L. Galluzzi, T. Vanden Berghe, and G. Kroemer. 2010. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11:700-714.

Vanden Berghe, T., N. Vanlangenakker, E. Parthoens, W. Deckers, M. Devos, N. Festjens, C. J. Guerin, U. T. Brunk, W. Declercq, and P. Vandenabeele. 2010. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ.* 17:922-930.

van Dommelen, S. L., H. A. Tabarias, M. J. Smyth, and M. A. Degli-Esposti. 2003. Activation of natural killer (NK) T cells during murine cytomegalovirus infection enhances the antiviral response mediated by NK cells. *J. Virol.* 77:1877-1884.

Vanlangenakker, N., T. Vanden Berghe, D. V. Krysko, N. Festjens, and P. Vandenabeele. 2008. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Curr. Mol. Med.* 8:207-220.

Van Stipdonk, M. J., E. E. Lemmens, and S. P. Schoenberger. 2001. Naive CTLs require a brief single period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat. Immunol.* 2:423-429.

Viadal, S., A. Krmpotic, M. Pyzik, and S. Jonjic. 2013. Innate immunity to cytomegalovirus in the murine model, Vol. II.9, p.192-214. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.

Villadangos, J. A., and P. Schnorrer. 2007. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat. Rev. Immunol.* 7:543-555.

von Muller, L., A. Klemm, N. Durmus, M. Weiss, H. Suger-Wiedeck, M. Schneider, W. Hampl, and T. Mertens. 2007. Cellular immunity and active human cytomegalovirus infection in patients with septic shock. *J. Infect. Dis.* 196:1288-1295.

Vremec, D., J. Pooley, H. Hochrein, L. Wu, and K. Shortman. 2000. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J. Immunol.* 164:2978-2986.

W

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.

Wakim, L. M., and M. J. Bevan. 2011. Cross-dressed dendritic cells drive memory CD8+ T-cell activation after viral infection. *Nature* 471:629-632.

Walczak, H., and P. H. Krammer. 2000. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp. Cell Res.* 256:58-66.

Waisman, A., A. L. Croxford, and F. Demircik. 2008. New tools to study the role of B cells in cytomegalovirus infections. *Med. Microbiol. Immunol.* 197:145-149.

Waisman, A., M. Kraus, J. Seagal, S. Ghosh, D. Melamed, J. Song, Y. Sasaki, S. Classen, C. Lutz, F. Brombacher, L. Nitschke, and K. Rajewski. 2007. IgG1 B cell receptor signaling is inhibited by CD22 and promotes the development of B cells whose survival is less dependent on Ig alpha/beta. *J. Exp. Med.* 204:747-758.

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.

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.* 173:1053-63.

Whitley, R. J. 2004. Congenital cytomegalovirus infection: epidemiology and treatment. *Adv. Exp. Med. Biol.* 549:155-160.

Winau, F., S. Weber, S. Sad, J. de Diego, S. L. Hoops, B. Breiden, K. Sandhoff, V. Brinkmann, S. H. Kaufmann, and U. E. Schaible. 2006. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity* 24:105-117.

Wirtz, N., S. I. Schader, R. Holtappels, C. O. Simon, N. A. Lemmermann, M. J. Reddehase, and J. Podlech. 2008. Polyclonal cytomegalovirus-specific antibodies not only prevent virus dissemination from the portal of entry but also inhibit focal virus spread within target tissues. *Med. Microbiol. Immunol.* 197:151-158.

Y

- Yan, S. F., R. Ramasamy, and A. M. Schmidt.** 2010. The RAGE axis: a fundamental mechanism signaling danger to the vulnerable vasculature. *Circ. Res.* 106:842-853.
- Yang, H., T. A. Bell, G. A. Churchill, and F. Pardo-Manuel de Villena.** 2007. On the subspecific origin of the laboratory mouse. *Nat. Genet.* 39:1100–1107.
- Yang, H., J. R. Wang, J.P. Didion, R. J. Buus, T. A. Bell, C. E. Welsh, F. Bonhomme, A. H.-T. Yu, M. W. Nachman, J. Pialek, P. Tucker, P. Boursot, L. McMillan, G. A. Churchill, and F. P. de Villena.** 2011. Subspecific origin and haplotype diversity in the laboratory mouse. *Nat. Genet.* 43:648–655.
- Yrlid, U., and M. J. Wick.** 2000. Salmonella-induced apoptosis of infected macrophages results in presentation of a bacteria-encoded antigen after uptake by bystander dendritic cells. *J. Exp. Med.* 191:613-624.

Z

- Zhan, Y., E. M. Carrington, A. van Nieuwenhuijze, S. Bedoui, S. Seah, Y. Xu, N. Wang, J. D. Mintern, J. A. Villadangos, I. P. Wicks, and A. M. Lew.** 2011. GM-CSF increases cross-presentation and CD103 expression by mouse CD8⁺ spleen dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 41:2585-2595.
- Zhang, D. W., J. Shao, J. Lin, N. Zhang, B. J. Lu, S. C. Lin, M. Q. Dong, and J. Han.** 2009. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* 325:332-336.
- Zhang, D. W., M. Zheng, J. Zhao, Y. Y. Li, Z. Huang, and J. Han.** 2001. Multiple death pathways in TNF-treated fibroblasts: RIP3- and RIP1-dependent and independent routes. *Cell Res.* 21:368-371.
- Zhao, J., S. Jitkaew, Z. Cai, S. Choksi, Q. Li, J. Luo, and Z. G. Liu.** 2012. Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:5322-5327.
- Ziegler, H., W. Muranyi, H. G. Burgert, E. Kremmer, and U. H. Koszinowski.** 2000. The luminal part of the murine cytomegalovirus glycoprotein gp40 catalyzes the retention of MHC class I molecules. *EMBO J.* 19:870-881.
- Ziegler, H., R. Thale, P. Lucin, W. Muranyi, T. Flohr, H. Hengel, H. Farrell, W. Rawlinson, and U. H. Koszinowski.** 1997. A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/cis-Golgi compartments. *Immunity* 6:57-66.
- Zimmermann, A., and H. Hengel.** 2006. Cytomegalovirus interference with interferon, p. 321-340. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: Molecular biology and Immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Zimmermann, A., M. Trilling, M. Wagner, M. Wilborn, I. Bubic, S. Jonjic, U. Koszinowski, and H. Hengel.** 2005. A cytomegaloviral protein reveals a dual role for STAT2 in IFN- γ signaling and antiviral responses. *J. Exp. Med.* 201:1543-1553.
- Zong, W. X., and C. B. Thompson.** 2006. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* 20:1-15.

7 Anhang

7.1 Zuordnung der ORF-*Library*-Nummern zu den getesteten mCMV-ORFs

ORF- <i>Library</i> Nummer	ORF	Bemerkung	ORF- <i>Library</i> Nummer	ORF	Bemerkung
0	nicht transfizierte Zellen	Negativkontrolle	38	M32*	
1	Leer-Vektor	pcDNA3.1/V5-His-Topo; Negativkontrolle	39	M33	
2	Vektor + LacZ		40	M34	
3	m01		41	M35	
4	m02		42	M36	
5	m03		43	M37	
6	m04		44	M38	
7	m05		45	m39	
8	m06		46	m40	
9	m07		47	m41	
10	m08		48	m42	
11	m09		49	M43	
12	m10		50	M44	
13	m11		51	M45	M45 + m45.1
14	m12		52	M46	
15	m13		53	M47	
16	m14		54	M48*	
17	m15		55	m48.1	
18	m16		56	m48.2	
19	m17		57	M49	
20	m18		58	M50	
21	m19		59	M51	
22	m20		60	M52	
23	m21		61	M53	
24	m22		62	M54	
25	M23		63	M55 AA 1-400	Klonierung des gesamten Gens ist nicht gelungen
26	m23.1		64	M55 AA 730-937	
27	M24		65	M56	
28	M25		66	M57	
29	m25.1		67	M58	
30	m25.2		68	m59	75bp lange „ <i>In Frame</i> “-Deletion
31	M26		69	M69*	
32	M27		70	m69.1	
33	M28		71	M70	
34	m29	C-Terminus um 85 AA verkürzt	72	M71	
35	m29.1	Insertion an Position 464, resultierend in einem um 27 AA verlängerten Protein	73	M72	
36	m30		74	M73	
37	M31		75	M74	
			76	M75	
			77	M76	

ORF-Library Nummer	ORF	Bemerkung
78	M77	
79	M78	
80	M79	
81	M80	
82	M82*	
83	M83*	
84	M84*	
85	M85*	
86	M86*	
87	M87	
88	M88	
89	M89 Exon 1, 2	
90	m90	
91	M91	
92	M92	
93	M93	
94	M94	
95	M95	
96	M96	
97	M97	
98	M98	
99	M99	
100	M100	
101	M102	
102	M103	
103	M104	
104	M105	
105	m106	
106	m107	
107	m108	
108	M112 Exon 1	
109	M112 Exon 2, 3	
110	M113	
111	M114	
112	M115	
113	M116	
114	m117	
115	m117.1	
116	M118	
117	m119	
118	m119.1	
119	m119.2	
120	m119.3	
121	m119.4	
122	m119.5	
123	m120	
124	M121	
125	M122 Exon 2, 3, 5	IE3
126	m123 Exon 2, 3, 4	IE1
127	m124	
128	m124.1	

ORF-Library Nummer	ORF	Bemerkung
129	m125	93bp lange „In Frame“-Deletion
130	m126	
131	m127	
132	m128 Exon 3	IE2
133	m129	
134	m130	
135	m131	
136	m132/3	
137	m134	
138	m135	
139	m136	
140	m137	
141	m138	
142	m139	
143	m140	
144	m141	
145	m142	
146	m143	
147	m144	
148	m145	
149	m146	
150	m147	
151	m148	mehr als 100 Punktmutationen
152	m149	
153	m150	
154	m151	
155	m152	
156	m153	
157	m154	
158	m155	
159	m156	
160	m157	
161	m158	
162	m159	
163	m160	
164	m161	
165	m162	
166	m163	
167	m164	
168	m165	
169	m166	
170	m167	
171	m168	
172	m169	
173	m170	

* zugrunde liegender Virusstamm: mCMV-K181, kloniert im Vektor pcDNA3 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Deborah H. Spector, Department of Cellular and Molecular Medicine, University of California, San Diego, USA

Definition aller ORFs entsprechend Rawlinson *et al.*, 1996

Publikationen

Wissenschaftliche Journale

Ebert, S., N. A. Lemmermann, D. Thomas, A. Renzaho, M. J. Reddehase, and R. Holtappels. 2012. Immune control in the absence of immunodominant epitopes: implications for immunotherapy of cytomegalovirus infection with antiviral CD8 T cells. *Med. Microbiol. Immunol.* 201:541-550.

Ebert, S., J. Podlech, D. Gillert-Marien, K. M. Gergely, J. K. Büttner, A. Fink, K. Freitag, D. Thomas, M. J. Reddehase, and R. Holtappels. 2012. Parameters determining the efficacy of adoptive CD8 T-cell therapy of cytomegalovirus infection. *Med. Microbiol. Immunol.* 201:527-539.

Lemmermann, N. A., A. Fink, J. Podlech, **S. Ebert**, V. Wilhelmi, V. Böhm, R. Holtappels, and M. J. Reddehase. 2012. Murine cytomegalovirus immune evasion proteins operative in the MHC class I pathway of antigen processing and presentation: state of knowledge, revisions, and questions. *Med. Microbiol. Immunol.* 201:497-512.

Mitrovic, M., J. Arapovic, S. Jordan, N. Fodil-Cornu, **S. Ebert**, S. M. Vidal, A. Krmpotic, M. J. Reddehase, and S. Jonjic. 2012. The NK cell response to mouse cytomegalovirus infection affects the level and kinetics of the early CD8(+) T-cell response. *J. Virol.* 86:2165-2175.

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.

Däubner, T., A. Fink, A. Seitz, S. Tenzer, J. Müller, D. Strand, C. K. Seckert, C. Janssen, A. Renzaho, N. K. Grzimek, C. O. Simon, **S. Ebert**, M. J. Reddehase, S. A. Oehrlein-Karpi, and N. A. Lemmermann. 2010. A novel transmembrane domain mediating retention of a highly motile herpesvirus glycoprotein in the endoplasmic reticulum. *J. Gen. Virol.* 91:1524-1534.

Buchartikel

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 hemotopoietic cell transplantation, Vol. II, p.354-381. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.

Vorträge

Ebert, S., V. Böhm, R. Holtappels, and M.J. Reddehase. 2012. Deletion of cell death inhibiting genes of murine CMV enhances CD8 T-cell priming. Symposium SFB 490; Mainz.

Ebert, S., M. Becker, D. Thomas, M. J. Reddehase, M. Stasse, and R. Holtappels. 2011. Mast cells contribute to the immune response against murine cytomegalovirus. 10. Workshop „Pathogenitätsmechanismen und Immunkontrolle viraler Erreger“ des GfV-Arbeitskreises „Immunbiologie von Virusinfektionen“; Deidesheim.

Ebert, S., V. Böhm, J. Podlech, R. Holtappels, and M. J. Reddehase. 2011. Deletion of a viral anti-apoptotic gene enhances CD8 T-cell priming in terms of magnitude and epitope repertoire. 36th Annual International Herpesvirus Workshop; Danzig, Polen.

Ebert, S., V. Böhm, C. O. Simon, J. Podlech, R. Holtappels, and M. J. Reddehase. 2010. Deletion of viral anti-apoptotic genes enhances CD8 T-cell priming in terms of magnitude and epitope repertoire. 9. Workshop „Pathogenitätsmechanismen und Immunkontrolle viraler Erreger“ des GfV-Arbeitskreises „Immunbiologie von Virusinfektionen“; Deidesheim.

Ebert, S., V. Böhm, C. O. Simon, J. Podlech, R. Holtappels, and M. J. Reddehase. 2010. Deletion of viral anti-apoptotic genes enhances CD8 T-cell priming in terms of magnitude and epitope repertoire. 4th Mini-Herpesvirus Workshop; Berlin.

Poster

Ebert, S., M. Becker, N. A. Lemmermann, A. Michl, C. Taube, J. Podlech, M. J. Reddehase, R. Holtappels, and M. Stassen. 2013. Mast cells expedite the control of murine cytomegalovirus infection by enhancing the recruitment of protective CD8 T cells to the lungs. 43rd Annual Meeting of the German Society for Immunology; Mainz.

Ebert, S., M. Becker, D. Thomas, M. J. Reddehase, M. Stassen, and R. Holtappels. 2012. Mast cells contribute to the immune response against murine cytomegalovirus. International Symposium “Forty Years of Virology at the University of Erlangen-Nürnberg”; Erlangen.

Ebert, S., M. Becker, D. Thomas, M. J. Reddehase, M. Stassen, and R. Holtappels. 2012. Mast cells contribute to the immune response against murine cytomegalovirus. 22nd Annual Meeting of the Society for Virology; Essen.

Ebert, S., V. Böhm, J. Podlech, R. Holtappels, and M. J. Reddehase. 2011. Deletion of a viral anti-apoptotic gene enhances CD8 T-cell priming in terms of magnitude and epitope repertoire. 36th Annual International Herpesvirus Workshop; Danzig, Polen.

Lebenslauf

Danksagung

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Einfluss Zelltod-inhibierender Proteine des murinen Cytomegalovirus auf die Initiation der antiviralen CD8 T-Zellantwort“ am Institut für Virologie der Universitätsmedizin Mainz unter der Leitung von Prof. Dr. Matthias J. Reddehase selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Alle Passagen, die wörtlich oder sinngemäß aus fremden Quellen entnommen wurden, sind als solche eindeutig kenntlich gemacht. Die Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form weder veröffentlicht noch einer anderen Fachbereichskommission/Fakultät vorgelegt worden.

Mainz, Januar 2014

Stefan Ebert