

JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ

Molekulare Grundlagen der Immunkontrolle des murinen
Cytomegalovirus in Gegenwart viruskodierter Immunevasine

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Annette Fink

geboren am 04.01.1982 in Erlangen

Mainz, Januar 2014

Dekan: aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht genannt

1. Berichterstatter: aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht genannt

2. Berichterstatter: aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht genannt

Tag der mündlichen Prüfung: 25.03.2014

für Hermine & Margot

Holzhacken ist deshalb so beliebt, weil man bei dieser Tätigkeit den Erfolg sofort sieht.

Albert Einstein, 1879-1955

Zusammenfassung

Die Kontrolle der Infektion mit dem humanen Cytomegalovirus (HCMV) wird primär durch antivirale CD8 T-Zellen vermittelt. Während der Koevolution zwischen Virus und Wirt wurden Immunevasionsmechanismen entwickelt, die direkt die Expression der Peptid-MHC-Klasse-I-Komplexe an der Zelloberfläche beeinflussen und es dem Virus ermöglichen, der Immunkontrolle des Wirtes zu entkommen. Da HCMV und das murine CMV (mCMV) zum Teil analoge Strategien zur Modulation des MHC-Klasse-I-Antigen-Präsentationswegs entwickelt haben, wurde in der vorliegenden Arbeit auf das experimentelle Modell mit mCMV zurückgegriffen. Die für die Immunevasion verantwortlichen Genprodukte m04/gp34, m06/gp48 und m152/gp40 werden aufgrund ihres regulatorischen Einflusses auf die Antigenpräsentation als vRAPs (*viral regulators of antigen presentation*) bezeichnet. Diese interferieren mit dem Transport Peptid-beladener MHC-Klasse-I-Moleküle und reduzieren in ihrer konzertierten Wirkung die Präsentation viraler Peptide an der Zelloberfläche.

Die Transplantation hämatopoietischer Zellen nach Immunoablation stellt eine etablierte Therapieform bei malignen hämatologischen Erkrankungen dar. Zwischen Immunoablation und der Rekonstitution des Immunsystems sind die Empfänger der transferierten Zellen stark immunsupprimiert und anfällig für eine CMV-Erkrankung bei Reaktivierung des Virus. Neben der Gabe antiviraler Medikamente ist der adoptive Transfer antiviraler CD8 T-Zellen eine vielversprechende Therapiemöglichkeit, um reaktivierende CMV zu kontrollieren, bis das körpereigene Immunsystem wieder funktionsfähig ist. Obwohl im murinen Modell sehr wohl etabliert, stellen im humanen System die eingeschränkte Wirkung und die Notwendigkeit der konsequenten Gabe hoher Zellzahlen gewisse logistische Schwierigkeiten dar, welche die Methode bisher von der klinischen Routine ausschließen.

Das murine Modell sagte eine Rolle von IFN- γ voraus, da Depletion dieses Zytokins zu einer verminderten Schutzwirkung gegen die mCMV-Infektion führt.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte ein möglicher inhibitorischer Effekt von m04 auf m152 untersucht werden, der bei der Rekombinanten Δ m06^W beobachtet wurde. Mit neu generierten Viren (Δ m06^{L1+2}) konnte dieser Effekt allerdings nicht bestätigt werden. Bei Δ m06^W fehlte jedoch eine höher N-glykosylierte Isoform des m152-Proteins. Um zu untersuchen, ob die N-Glykosylierung von m152 für seine Funktion notwendig ist, wurde ein rekombinantes Virus generiert, das in Folge einer Deletion aller 3 N-Glykosylierungssequenzen nur eine nicht-glykosylierte Isoform des m152-Proteins bilden kann. In Übereinstimmung mit der zwischenzeitlich publizierten Kristallstruktur des Komplexes von m152 und dem Liganden RAE-1 des aktivierenden NK-Zellrezeptors NKG2D konnte erstmals gezeigt werden, dass die Funktionen von m152 in der adaptiven und in der angeborenen Immunität auch von der nicht N-glykosylierten Isoform wahrgenommen werden können.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte mit Hilfe eines Sets an vRAP Deletionsmutanten der Einfluss von IFN- γ auf die einzeln oder in Kombination exprimierten vRAPs untersucht werden. Es zeigte sich, dass Vorbehandlung der Zellen mit IFN- γ die Antigenprozessierung nach Infektion stark erhöht und die vRAPs dann nicht mehr in der Lage sind, die Präsentation aller Peptid-beladener MHC-Klasse-I-Komplexe zu verhindern. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass vorher nicht-schützende CD8 T-Zellen Schutz vermitteln können, wenn das Gewebe der Rezipienten konstitutiv mit IFN- γ versorgt wird. Die zusätzliche Gabe von IFN- γ stellt daher eine vielversprechende Möglichkeit dar, den adoptiven Transfer als Therapie in der klinischen Routine einzusetzen.

Summary

Infection with human cytomegalovirus (HCMV) is primarily controlled by virus specific CD8 T cells. During virus-host co-evolution CMV has developed strategies of immune evasion in order to subvert immune control by CD8 T cells. As HCMV and its murine equivalent (mCMV) developed analogous strategies for modulation of the MHC class I pathway, the experimental mCMV model has been used in this study. mCMV encodes three viral regulators of antigen presentation (vRAPs): m04/gp34, m06/gp48 and m152/gp40; vRAPs obstruct the transport of peptide-loaded MHC molecules to the cell surface and downmodulate MHC class I surface expression in a cooperative fashion.

Hematopoietic cell transplantation (HCT) following hematoablation is an established alternative therapy for certain types of hematopoietic malignancies. In the transient phase between hematoablation and reconstitution of the immune system HCT recipients are severely immunocompromised, and are therefore at high risk for CMV disease in case of virus reactivation. Besides treatment with antivirals, exogenous reconstitution of virus-specific immune cells by cell transfer, of CD8 T cells in particular, is a promising therapy option to control reactivated CMV infection in HCT recipients prior to endogenous reconstitution of antiviral immunity. Despite recent progress in developing CD8 T-cell-based immunotherapy and promising results in preclinical studies in the murine model, limited efficacy and the consequent requirement of high cell numbers pose logistical problems that have so far prevented this therapy from becoming clinical routine.

The murine model predicted a role for interferon (IFN)- γ , because *in vivo* depletion of this cytokine abolished control of infection by CD8 T cells.

In the first part of this work, a presumed inhibitory effect of m04 against the function of m152 should be investigated. This effect was seen after infection with recombinant virus $\Delta m06^W$. Newly generated viruses ($\Delta m06^{L1+2}$) did not confirm this effect, but it was shown that in cells infected with $\Delta m06^W$ a higher glycosylated isoform of m152 is missing. To test if N-glycosylation is essential for m152 function, a recombinant virus was generated in which mutation of all three N-glycosylation sites allowed only the expression of the unglycosylated isoform. In accordance with the meanwhile published crystal structure of the complex between m152 and ligand RAE-1 of the activatory NK cell receptor NKG2D, it could here be shown that the unglycosylated isoform of m152 is sufficient for mediating innate and adaptive immune evasion.

Using a set of vRAP-deletion mutants, the effect of IFN- γ on vRAP function was investigated in the second part of this work. It could be shown that pretreatment of cells with IFN- γ enhances antigen-processing and thus generates higher numbers of pMHC-I complexes that exhaust the inhibitory capacity of vRAPs. Pre-conditioning of tissue with IFN- γ renders otherwise non-protective CD8 T cells into cells protective against CMV disease upon adoptive transfer.

The results of this work predict that pre-conditioning of patients with a short-term IFN- γ therapy preceding HCT enhances the efficacy of preemptive CD8 T-cell therapy of CMV infection and disease.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Klassifizierung der Herpesviren	1
1.2 Eigenschaften der Cytomegaloviren	2
1.2.1 Virionstruktur	2
1.2.2 Genomstruktur	3
1.2.3 Viraler Infektionszyklus und Morphogenese	3
1.3 Medizinische Aspekte der HCMV-Infektion	5
1.3.1 Epidemiologie.....	5
1.3.2 Symptomatik der CMV-Infektion	6
1.3.3 Therapeutische Ansätze und Vakzinierung.....	7
1.4 Die mCMV-Infektion als Modellsystem für die HCMV-Infektion	8
1.5 Immunkontrolle der CMV-Infektion.....	9
1.5.1 Reaktion des angeborenen Immunsystems gegen CMV	10
1.5.2 Reaktion des adaptiven Immunsystems gegen CMV	13
1.6 Antigenpräsentation über MHC-Klasse-I.....	15
1.6.1 MHC-Klasse-I-Peptidkomplex.....	15
1.6.2 MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation	15
1.7 Immunevasion des murinen Cytomegalovirus.....	16
1.8 Zielsetzung	19
2 Material	21
2.1 Allgemeine Laborgeräte.....	21
2.2 Plastikwaren und Verbrauchsmaterial.....	23
2.3 Chemikalien und andere Reagenzien	24
2.4 Kits	26
2.5 Bakterien	26
2.6 Viren.....	27
2.7 mCMV-Peptide	28
2.8 Vektoren	28
2.9 Enzyme	28

2.10	Antikörper	29
2.11	Oligonukleotide und Sonden.....	31
2.12	Medien und Medienzusätze für die Zellkultur.....	32
2.13	Primäre Zellen und Zelllinien	34
2.14	Versuchstiere.....	35
3	Methoden	36
3.1	Zellbiologische Methoden	36
3.1.1	Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen.....	36
3.1.2	Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität	36
3.1.3	Anlage von Murinen Embryofetalen Fibroblasten	37
3.1.4	Vorbehandlung von MEF mit IFN- γ	37
3.1.5	Transfektion	37
3.2	Virologische Methoden	39
3.2.1	mCMV Produktion	39
3.2.2	mCMV-Titer Bestimmung	39
3.2.3	Zentrifugale Infektion von MEF	40
3.2.4	Eliminierung von BAC-Sequenzen aus rekombinanten mCMV	41
3.3	Tierexperimentelle Methoden	42
3.3.1	Immunsuppression	42
3.3.2	Depletion der natürlichen Killerzellen und Blockade des NKG2D-Rezeptors	42
3.3.3	Infektion der Maus mit mCMV	42
3.3.4	Organentnahme und Probenkonservierung	43
3.4	Molekularbiologische Methoden.....	43
3.4.1	Umgang mit Bakterien.....	43
3.4.2	Anzucht von Flüssigkulturen.....	43
3.4.3	Plattenkulturen	44
3.4.4	Herstellung von Dauerkulturen	44
3.4.5	Herstellung elektrokompetenter Zellen	44
3.4.6	Transformation elektrokompetenter Bakterien	45
3.4.7	Plasmid-Minipräparation.....	45
3.4.8	Plasmid-Midipräparation.....	45
3.4.9	Schnellpräparation von BAC-DNA (BAC-Minipräparation).....	45
3.4.10	Isolierung von BAC-DNA mit <i>Nucleobond</i> PC 500 (BAC-Maxipräparation).....	46
3.4.11	Isolierung von viraler DNA.....	46
3.4.12	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	47
3.4.13	Polymerase Kettenreaktion	47

3.4.14	Quantitative <i>real-time</i> PCR (qPCR)	49
3.4.15	Plasmid-Standards zur absoluten Quantifizierung	49
3.4.16	TaqMan PCR	50
3.4.17	Enzymatische Restriktion von Nukleinsäuren	51
3.4.18	Native Gelelektrophorese von DNA	51
3.4.19	Elution von DNA aus Agarose-Gelen	52
3.4.20	Reinigung von DNA	52
3.4.21	Ligation von DNA-Fragmenten	52
3.4.22	Mutagenese	53
3.5	Proteinbiochemische Methoden	61
3.5.1	Aufreinigung antigener Peptide	61
3.5.2	Proteinextraktion aus eukaryotischen Zellen	67
3.5.3	Quantifizierung von Proteinen	67
3.5.4	Immunpräzipitation	68
3.5.5	Deglykosylierung von Proteinen	68
3.5.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	69
3.5.7	Western Blot	70
3.6	Immunologische Methoden	71
3.6.1	<i>Ex vivo</i> Isolation von CD8 T-Zellen aus der Milz	71
3.6.2	MACS Separation	72
3.6.3	Generierung und Restimulation von CTLL	72
3.6.4	Zytolysetest ($[^{51}\text{Cr}]$ -Release-Assay)	73
3.6.5	Adoptiver Transfer von CTLL	74
3.6.6	ELISpot (Enzyme linked immuno spot) Assay	74
3.6.7	Zytofluorometrische Analyse	76
3.7	Immunhistochemie (IHC)	77
3.7.1	Vorbereitung der Organe	77
3.7.2	mCMV-IHC	78
4	Ergebnisse	81
4.1	Neu-Charakterisierung der mCMV-Rekombinante $\Delta\text{m06}^{\text{W}}$	81
4.1.1	In der Mutante $\Delta\text{m06}^{\text{W}}$ ist die Expression von m152/gp40 verringert	81
4.1.2	Die neu generierten Δm06 -Rekombinanten inhibieren die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression	83
4.1.3	Die neu generierten Δm06 inhibieren die Präsentation viraler Antigene	84
4.1.4	Fehlen der gp48 Isoform des m152-Proteins in mit $\Delta\text{m06}^{\text{W}}$ infizierten Zellen	85
4.2	Generierung einer m152-Glykosylierungsmutante durch Zwei-Schritt-Rekombination	86

4.2.1	Mutation der N-Glykosylierungsstellen von m152	87
4.3	Rekonstitution und Aufreinigung der Rekombinante m152 Δ 3Glyc	93
4.3.1	Charakterisierung der neu generierten mCMV-Rekombinante.....	94
4.4	Einfluss der Nicht-Glykosylierung auf die Funktion des vRAPs m152	96
4.4.1	Die 36kDa Isoform von m152 verhindert die Antigenpräsentation	97
4.4.2	Die 36kDa Isoform von m152 inhibiert die Oberflächenexpression von RAE-1 ..	98
4.4.3	Die 36kDa Isoform von m152 inhibiert die Aktivierung von NK-Zellen durch RAE-1/NKG2D Interaktion	99
4.5	Einfluss von IFN- γ auf die Funktion der vRAPs <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	101
4.5.1	vRAPs regulieren die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression	101
4.5.2	Vorbehandlung mit IFN- γ vermindert den Einfluss der vRAPs auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression.....	103
4.5.3	IFN- γ -Vorbehandlung hebt die vRAP-abhängigen Unterschiede in der Antigenpräsentation auf.....	104
4.5.4	IFN- γ -Vorbehandlung hebt die Wirkung der vRAPs auf ohne ihre Funktion zu beeinträchtigen.....	105
4.5.5	Die Erkennung Antigen-präsentierender Zellen ist abhängig von einer effizienten Antigen-Prozessierung	107
4.5.6	IFN- γ -Vorbehandlung <i>in vivo</i> führt zu einem besseren Schutz nach adoptivem Transfer M45D ^b -spezifischer CTLL.....	110
5	Diskussion	113
5.1	Diskussion der Ergebnisse zur Untersuchung des vRAPs m152	115
5.2	Diskussion der Ergebnisse zum Einfluss von IFN- γ auf die Effizienz der vRAPs .	121
5.3	Fazit	126
6	Literatur	130
7	Anhang	149

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Struktur eines HCMV-Virions.	3
Abb. 3.1 Flussschema zur Strategie der Mutagenese von mCMV-BAC-Plasmiden mittels Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren.	56
Abb. 3.2 Schema der Red-vermittelten markerlosen DNA-Rekombination.	60
Abb. 4.1 Expression der vRAPs in den unterschiedlichen vRAP-Deletionsmutanten.	82
Abb. 4.2 Expression der vRAPs und Proteine der IE-, E- und L-Phase nach Infektion mit WT oder $\Delta m06^W$ in der Immunhistochemie.	83
Abb. 4.3 MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression in Abhängigkeit der exprimierten vRAPs. ..	84
Abb. 4.4 Antigenpräsentation in Abhängigkeit der exprimierten vRAPs.	84
Abb. 4.5 Proteinexpression von m152 nach Zugabe von CHX.	85
Abb. 4.6 Deglykosylierung mit Endo H oder PNGase F.	86
Abb. 4.7 Analyse des m152-Proteins nach Mutation der einzelnen N-Glykosylierungsstellen.	88
Abb. 4.8 Klonierungsschema für die Generierung des <i>Shuttle</i> -Vektors pST76K_m152_N208/241Q_flank.	90
Abb. 4.9 Auftrennung der mit <i>Pst</i> I verdauten PCR-Produkte.	91
Abb. 4.10 Integrität des mCMV-BAC-Genoms.	91
Abb. 4.11 Auftrennung der m152-PCR-Produkte.	92
Abb. 4.12 Chromatogramme der Sequenzierungen von WT und m152 Δ 3Glyc.	93
Abb. 4.13 Proteinexpression von WT und m152 Δ 3Glyc.	95
Abb. 4.14 Replikatives Potential von WT und m152 Δ 3Glyc in immunsupprimierten Tieren. ..	96
Abb. 4.15 Antigenpräsentation in BALB/c und C57BL/6 MEF in Abhängigkeit von m152.	97
Abb. 4.16 MHC-Klasse-I- und RAE-1-Oberflächenpräsentation in Abhängigkeit von m152.	99
Abb. 4.17 Virustiter in Abhängigkeit von m152 nach NK-Zell Depletion oder NKG2D Blockade.	100
Abb. 4.18 Einfluss der vRAPs auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression.	102
Abb. 4.19 Einfluss der vRAPs auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression nach IFN- γ - Vorbehandlung.	103
Abb. 4.20 Antigenpräsentation infizierter MEF.	104
Abb. 4.21 Vergleich der Antigenpräsentation Δ vRAP-infizierter und IFN- γ vorbehandelter WT-infizierter MEF.	106
Abb. 4.22 Vergleich der Spotgrößen im ELISpot Assay nach Infektion mit Δ vRAP und WT mit und ohne IFN- γ -Vorbehandlung.	106
Abb. 4.23 Einfluss von IFN- γ auf die Antigenpräsentation von M45D ^b -Peptiden.	108

Abb. 4.24 Werte des Zytolysetests M45D ^b -spezifischer CTL und Ableitung der Regressionsgerade.....	109
Abb. 4.25 Einfluss von IFN- γ auf die Prozessierung von M45D ^b -Peptiden.	110
Abb. 4.26 IFN- γ -Vorbehandlung <i>in vivo</i> führt zum Schutz durch adoptiv transferierte M45D ^b - spezifische CTL.	111
Abb. 5.1 Struktur des m152/RAE-1 γ -Komplexes.....	120
Abb. 5.2 Modell zur Rolle von IFN- γ bei der Eindämmung der Virusausbreitung.....	128

Abkürzungsverzeichnis

Anmerkung: International übliche Terminologie auf Englisch wurde beibehalten und zur Kennzeichnung *kursiv* gesetzt.

AAF	<i>IFN-α activated factor</i>
A. bidest.	Aqua bidestillata
Abb.	Abbildung
AF	Alexa Fluor
AIDS	Erworbenes Immunschwäche-Syndrom (<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
Amp	Ampicillin
AP	Adaptorprotein
APC	Antigen-präsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
APC	Allophycocyanin
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
AT	Adoptiver Transfer
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BMDM	<i>bone marrow derived macrophages</i>
β -ME	β -Mercaptoethanol
bp	Basenpaare (<i>base pairs</i>)
BSA	bovines Serumalbumin
Cam	Chloramphenicol
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CHX	Cycloheximid
CMV	Cytomegalovirus
CTL	zytolytische T-Lymphozyten (<i>cytolytic T lymphocytes</i>)
CTLL	zytolytische T-Lymphozyten-Linie (<i>cytolytic T lymphocyte line</i>)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DC	Dendritische Zelle (<i>Dendritic Cell</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
E	<i>Early</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>

EGTA	Ethylen-Glykol-Tetra-Essigsäure
eIF	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ELISpot	<i>Enzyme-Linked Immunospot</i>
Endo H	Endoglykosidase H
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAAP	Endoplasmatisches Retikulum-assoziierte Aminopeptidase
ERGIC	<i>ER-Golgi-Intermediate Compartment</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FCS	Fetales Kälberserum
GAF	<i>IFN-γ-activated factor</i>
GAS	<i>IFN-γ-activated site</i>
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
gp	Glykoprotein
h	Stunde(n)
HAART	<i>highly active antiretroviral therapy</i>
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HHV	Humanes Herpesvirus
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPV	Humanes Papillomavirus
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
HSV	Herpes Simplex Virus
IE	<i>Immediate Early</i>
IFN	Interferon
IFNAR	IFN- α -Rezeptor
IFNGR	IFN- γ -Rezeptor
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.pl.	intraplantar
IRF	<i>IFN-regulatory factor</i>
ISG	<i>IFN-stimulated gene</i>
ISGF	<i>IFN-stimulated gene factor</i>
ISRE	<i>IFN-stimulated response element</i>
i.v.	intravenös
Jak	Janus Kinase
Kan	Kanamycin
kbp	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
KMT	Knochenmarktransplantation

L	<i>Late</i>
LMP	<i>low molecular weight protein</i>
LT	Lymphotoxin
Lys	Lysin
MACS	<i>Magnetic Cell Separation</i>
mCMV	murines Cytomegalovirus
MCP	<i>Major Capsid Protein</i>
MECL	<i>multicatalytic endopeptidase complex subunit</i>
MEF	murine embryofetale Fibroblasten
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
Met	Methionin
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MIE	<i>Major Immediate Early</i>
MIEP	<i>Major Immediate Early Promotor</i>
MIEPE	<i>Major Immediate Early Promotor Enhancer</i>
min	Minute(n)
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
N	Asparagin
Neo	Neomycin
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
pfu	<i>plaque forming unit</i>
p.i.	nach Infektion (<i>post infection</i>)
PKR	Proteinkinase RNA-aktiviert
pMHC-I	Peptid-beladener MHC-I-Komplex
PNGase F	Peptid:N-Glykosidase F
Pro	Prolin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	Glutamin
qPCR	quantitative Real-time PCR
RAE-1	<i>Retinoic Acid Early-Inducible Gene-1</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RPC	<i>Reversed Phase-Chromatographie</i>
SAP	<i>Serum Amyloid P</i>
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
SDS	Natriumdedocylsulfat (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)

Ser	Serin
SPF	<i>specified pathogen free</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SV40	<i>Simian Virus-40</i>
Tab.	Tabelle
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TFA	Trifluoressigsäure
T _H C	T-Helferzelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
Trp	Tryptophan
Tyk	Tyrosinkinase
Tyr	Tyrosin
U	Umdrehungen
ü.N.	über Nacht
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen (<i>volume/volume</i>)
VIPRs	<i>viral gene products that interfere with antigen presentation</i>
Vol.	Volumen
vRAPs	virale Regulatoren der Antigenpräsentation (<i>viral regulators of antigen presentation</i>)
VSP	Virusstandardpuffer
VZ	Verdopplungszeit
w/v	Gewicht/Volumen (<i>weight/volume</i>)
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Klassifizierung der Herpesviren

Die Familie der *Herpesviridae* umfasst derzeit die Humanen Herpesviren (HHV) 1-8 (siehe Tab. 1.1) sowie über 100 tierpathogene Erreger (zur Übersicht: Roizman et al., 1992), die in die Subfamilien der α -, β - und γ -*Herpesvirinae* eingeteilt werden (Roizman et al., 1981).

Die Mitglieder der *Herpesviridae* zeichnen sich durch eine einheitliche Architektur des Viruspartikels (Plummer, 1967; Roizman et al., 1992) sowie gemeinsame biologische Eigenschaften aus. Allen Herpesviren ist die Fähigkeit zur Latenz gemein, d.h. nach einer Primärinfektion verbleibt die virale DNA ruhend im Organismus. Unter Immunsuppression kann die DNA transkriptionell reaktivieren und eine produktive Infektion induzieren (Roizman & Baines, 1991; Reddehase et al., 2008).

Unterfamilie	Genus	Virus	Referenz
<i>α-Herpesvirinae</i>	Simplexvirus	HHV-1 Herpes-Simplex-Virus 1 HHV-2 Herpes-Simplex-Virus 2	(Gruter, 1924) (Schneweis, 1962)
	Varicellovirus	HHV-3 Varizella-Zoster-Virus	(Dumas et al., 1980)
<i>β-Herpesvirinae</i>	Cytomegalovirus	HHV-5 Humanes Cytomegalovirus	(Smith, 1956)
	Roseolovirus	HHV-6 HHV-7	(Lindquester & Pellett, 1991) (Frenkel et al., 1990)
<i>γ-Herpesvirinae</i>	Lymphocryptovirus	HHV-4 Epstein-Barr-Virus	(Epstein et al., 1965)
	Rhadinovirus	HHV-8 Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus	(Chang et al., 1994)

Tabelle 1.1 Systematische Einteilung der humanpathogenen Herpesviren (HHV)

Die Einteilung in die drei Unterfamilien erfolgt anhand des Wirtsspektrums, der Replikationsgeschwindigkeit, sowie des Zelltropismus.

Die *α -Herpesvirinae* zeichnen sich durch ein breites Wirtsspektrum und einen kurzen Replikationszyklus aus. *In vivo* sind sie neurotrop und etablieren Latenz hauptsächlich in sensorischen Ganglien.

Vertreter der *β -Herpesvirinae* zeigen eine strikte Speziespezifität und einen langsamen Replikationszyklus.

Die *γ -Herpesvirinae* zeigen ebenfalls ein limitiertes Wirtsspektrum. Die produktive Infektion sowie die Etablierung der Latenz erfolgt hauptsächlich in B- und T-Lymphozyten (Pellett & Roizman, 2013).

1.2 Eigenschaften der Cytomegaloviren

Namensgebend für die Cytomegaloviren war die typische Vergrößerung infizierter Zellen (Zytomegalie) (Weller et al., 1960). Die Cytomegaloviren (*human*: HCMV; *murin*: mCMV) sind große DNA-Viren der Unterfamilie der β -*Herpesvirinae* mit einer Kodierungskapazität von etwa 165-170 Proteinen (Davison et al., 2003; Murphy et al., 2003). In einer aktuellen Studie werden mittels *Ribosom-Profiling* und Translationsanalysen für HCMV 751 translatierte Offene Leserahmen (*open reading frames*, ORFs) beschrieben (Stern-Ginossar et al., 2012). Dabei wird die durch Ribosomen geschützte mRNA isoliert, in cDNA transkribiert und anschließend durch *deep-sequencing* analysiert.

1.2.1 Virionstruktur

Reife CMV-Virionen haben einen Durchmesser von 150-200nm. In ihrem Inneren weisen sie eine elektronendichte Strukturkomponente (*core*) auf, die aus dem mit fibrillären Proteinen komplexierten, linearen, doppelsträngigen DNA-Genom besteht. Das virale Genom ist umgeben von einem ikosaedrisch geformten Nukleokapsid (Durchmesser ca. 100nm), welches aus 162 Kapsomeren aufgebaut ist (Chen et al., 1999) und vom Tegument umgeben ist. Dieses besteht hauptsächlich aus viralen Phosphoproteinen, enthält aber auch eine Reihe zellulärer und viraler RNA-Spezies (Terhune et al., 2004). Die Oberfläche des Virus-Partikels wird von einer Lipid-Doppelschicht (*envelope*) zellulären Ursprungs gebildet (Tooze et al., 1993), in die virale und zelluläre Glykoproteine eingelagert sind (zur Übersicht: Caposio et al., 2013; Mocarski et al., 2013). Die viralen Glykoproteine vermitteln das virale *Attachment* an der Wirtszelle sowie die Penetration durch pH-unabhängige Membranfusion (Compton et al., 1992). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Infektion von Endothelzellen auch über Endozytose erfolgt (Adler & Sinzger, 2013). Des Weiteren haben die viralen Glykoproteine essentielle Funktionen während der Reifung des Virions (Britt & Mach, 1996).

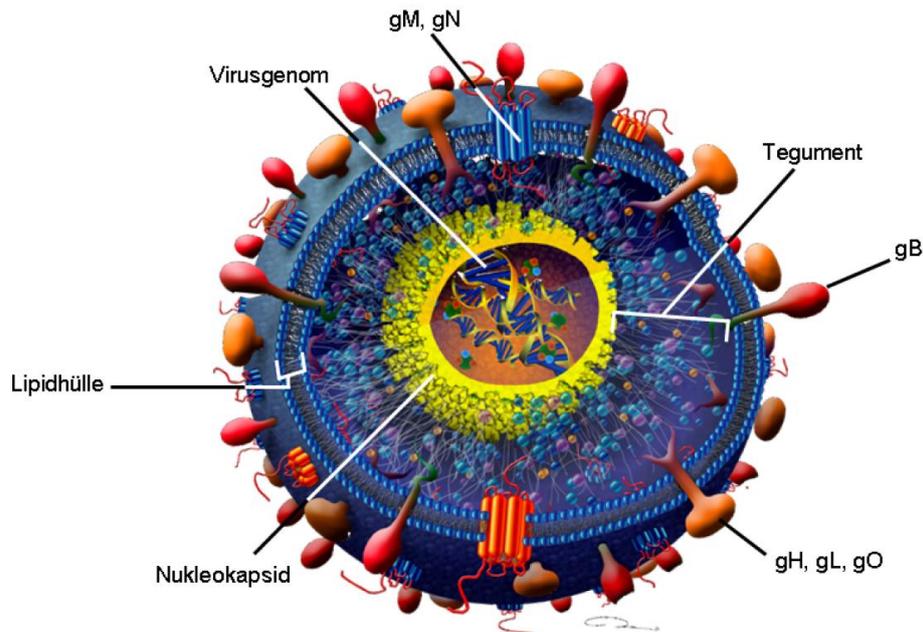


Abb. 1.1 Struktur eines HCMV-Virions.

Typische dreischichtige Struktur des HCMV-Virions, bestehend aus Lipidhülle, Tegument und Nukleokapsid. Die Lipidhülle enthält eine Vielzahl viraler Glykoproteine (nach Caposio et al., 2013).

1.2.2 Genomstruktur

Cytomegaloviren besitzen ein doppelsträngiges, lineares DNA-Genom mit terminalen repetitiven Sequenzen. Mit mehr als 230kbp zählt es zu den größten Genomen von Säugetier-infizierenden Viren (zur Übersicht: Davison et al., 2013). Im Gegensatz zum Genom von mCMV enthält das HCMV-Genom zusätzliche interne repetitive Elemente (zur Übersicht: Mocarski et al., 2013). Der Mehrheit der bisher beschriebenen ~170 (mCMV) (Rawlinson et al., 1996; Tang et al., 2006) bzw. ~200 (HCMV) (Chee et al., 1990; Cha et al., 1996; Murphy et al., 2003; Dolan, 2004) ORFs (nach konventionellen Methoden; nach Ribosom-Profiling werden wohl auch für mCMV deutlich mehr ORFs als bisher beschrieben werden) konnte bisher noch keine Funktion zugeordnet werden. Die Homologien zwischen mCMV und HCMV erstrecken sich auf 78 ORFs, die vorrangig im zentralen Bereich der jeweiligen Genome lokalisiert sind.

1.2.3 Viraler Infektionszyklus und Morphogenese

1.2.3.1 Penetration der Wirtszelle

Die Anheftung der Virionen an die Membran der Wirtszelle (*attachment*) erfolgt durch die zunächst unspezifische Bindung der viralen Glykoproteine gM, gN und gB an Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) der Zelloberfläche (Compton et al., 1993). Anschließend interagieren virale Glykoproteine mit weiteren zellulären Proteinen, so dass es zu einer stabilen Bindung des Virions an die Zelloberfläche kommt (*docking*). Mögliche, aber in der Literatur kontrovers

diskutierte zelluläre Rezeptoren sind der *Epidermal-Growth-Factor-Receptor* (EGFR) (Wang et al., 2003), Annexin II (Wright et al., 1994; 1995), CD13 (Söderberg et al., 1993) oder zelluläre Integrine (Isaacson et al., 2007). Für letztere ist eine multiple Heterodimerisierung als Folge der Glykoprotein-Bindung beschrieben worden (Feire et al., 2004).

Nach der Bindung fusionieren Virus- und Zellmembran in einem pH-unabhängigen Prozess (Compton et al., 1992) und das vom Tegument umgebene Nukleokapsid wird ins Zytoplasma der Wirtszelle freigesetzt (Penetration) (Boehme & Compton, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass die Glykoproteine gB und gH eine Rolle bei der Fusion der Virushülle mit der Zellmembran spielen (Kinzler & Compton, 2005).

Nach Entfernung des Teguments (*uncoating*) werden die Nukleokapside zur Kernpore transportiert. Dies geschieht vermutlich, analog zu HSV-1, über einen Dynein-vermittelten, aktiven Transport entlang von Mikrotubuli (Sodeik et al., 1997; Döhner & Sodeik, 2005). Die Nukleokapside binden an den Kernporenkomplex und das virale Genom wird in das Nukleoplasma abgegeben (Ojala et al., 2000), wo es nach Fusion der beiden Genomenden zeitweise in einer zirkularisierten und mit Histonen komplexierten Nukleosomen-ähnlichen Struktur vorliegt (Marks & Spector, 1988).

1.2.3.2 CMV-Genexpression

Wie bei allen Herpesviren ist die Genexpression bei CMV kaskadenartig reguliert. Aufeinanderfolgend werden erst die Gene der *Immediate Early* (IE)-, dann die der *Early* (E)- und schließlich die der *Late* (L)-Phase transkribiert (Honess & Roizman, 1974; Emery & Griffiths, 1990; zur Übersicht: Mocarski et al., 2013).

Unmittelbar nach dem Eintritt der viralen DNA in den Zellkern startet die IE-Phase. Die IE-Gene *ie1*, *ie2* und *ie3* (mCMV) bzw. *ie1* und *ie2* (HCMV) bilden den *Major Immediate Early* (MIE) *Locus*. Ihre Transkription wird durch den *Major Immediate Early Promotor* (MIEP) sowie durch eine regulatorische DNA-Sequenz, den *Major Immediate Early Promotor Enhancer* (MIEPE) reguliert (Stenberg et al., 1984; zur Übersicht: Mocarski et al., 2013). Die Transkription der IE-Gene erfolgt durch die zelluläre RNA-Polymerase II und ist unabhängig von der *de novo* Synthese anderer viraler Proteine.

Die IE-Proteine steuern die koordinierte Expression der E-Gene (Keil et al., 1984; Bühler et al., 1990; Messerle et al., 1992), die bei mCMV ca. 90 Minuten nach Infektion, bei HCMV 4-24h nach Infektion beginnt. Die Produkte der E-Gene, wie die virale DNA-Polymerase, sind für den Start der viralen DNA-Replikation notwendig (zur Übersicht: Pellett & Roizman, 2013).

Die Expression der L-Gene, von denen ein Großteil für Strukturproteine des Viruspartikels kodieren, beginnt definitionsgemäß nach Einsetzen der viralen DNA-Replikation (Honess & Roizman, 1974; Emery & Griffiths, 1990; zur Übersicht: Mocarski et al., 2013).

1.2.3.3 CMV-Replikation und Virionmorphogenese

Die DNA-Replikation von CMV erfolgt analog zu der anderer Herpesviren nach dem Prinzip des *rolling circle*. Die dabei neu synthetisierten viralen Genome bleiben mit der Matrix-DNA als vielgenomige Konkatemere kovalent verbunden. Die Spaltung in lineare Einzelgenome erfolgt erst während der Verpackung der DNA in die Nukleokapside (Marks & Spector, 1988). Der Zusammenbau der Kapside (*assembly*) sowie die Verpackung der Genome findet im Zellkern statt. Anschließend knospen die Nukleokapside an der inneren Kernmembran, erhalten dabei eine von dieser abstammende Hüllmembran (*primary envelopment*) und gelangen in den Perinuklearraum (Gibson, 2006). Dort fusioniert die primäre Virushülle mit der äußeren Kernmembran (*deenvelopment*), so dass unbehüllte Nukleokapside ins Zytoplasma freigesetzt werden. Die Anlagerung der Tegumentkomponenten erfolgt sowohl während der intranukleären als auch während der intrazytoplasmatischen Reifungsphase der Virionen (Trus et al., 1999; Sanchez et al., 2000). Im Anschluss erfolgt eine zweite Knospung an Vesikeln des *ER-Golgi-Intermediate Compartment* (ERGIC), während der die Viruspartikel mit einer doppelten Hüllmembran versehen werden (*secondary envelopment*). Die äußere der beiden Membranen fusioniert mit der Plasmamembran der Wirtszelle, woraufhin die reifen, einfach umhüllten Viren aus der Zelle freigesetzt werden (zur Übersicht: Eickmann et al., 2006).

1.3 Medizinische Aspekte der HCMV-Infektion

1.3.1 Epidemiologie

HCMV ist in der menschlichen Population ubiquitär verbreitet. Die Prävalenz ist abhängig von Alter und sozioökonomischen Faktoren. Untersuchungen zeigen, dass in Mitteleuropa und Nordamerika ca. 50% der Erwachsenen HCMV-positiv sind, während die HCMV-Infektion in Südostasien und Afrika meist bereits im Kindesalter erworben wird und die Durchseuchung bei nahezu 100% liegt (zur Übersicht: Mocarski et al., 2013).

Die horizontale Übertragung erfolgt meist durch Tröpfchen- oder Schmierinfektion. Neben Muttermilch, Speichel, Sperma, Tränenflüssigkeit, Urin und Zervixsekret ist auch Blut als infektiös anzusehen, mit der Folge, dass auch eine Übertragung über Bluttransfusionen und Organtransplantationen möglich ist.

Eine vertikale Übertragung ist als transplazentale Infektion des Embryos oder Fetus möglich. Die Inzidenz der kongenitalen HCMV-Infektion beträgt etwa 0,2-2,3% aller Schwangerschaften, allerdings verlaufen nur 10% dieser Infektionen symptomatisch. Damit ist die HCMV-Infektion die häufigste virale kongenitale Infektion. Die Wahrscheinlichkeit einer

Infektion des Kindes ist nach Primärinfektion der Mutter deutlich höher (40%) als nach einer Reaktivierung (ca. 1%) (Hanshaw & Dudgeon, 1978; Stagno & Whitley, 1985).

1.3.2 Symptomatik der CMV-Infektion

In immunkompetenten Individuen verläuft die primäre Infektion in der Regel asymptomatisch. Es können jedoch allgemeines Unwohlsein sowie leichtes Fieber auftreten; selten kommt es zu einer infektiösen Mononukleose-ähnlichen Symptomatik (Kääriäinen et al., 1966). Die Infektion wird zwar innerhalb kurzer Zeit durch die Effektorfunktion der angeborenen und adaptiven Immunabwehr terminiert, jedoch kommt es nach Beendigung der produktiven Infektion zur Etablierung lebenslanger Latenz. Infektiöse Virionen werden sowohl während der Primärinfektion als auch während Reaktivierungsphasen, welche zumeist inapparent verlaufen, ausgeschieden (zur Übersicht: Mocarski et al., 2013).

In immunsupprimierten Patienten und bei der Infektion von Neu- und Ungeborenen mit nicht ausgereiftem Immunsystem führt die Infektion zu schweren klinischen Manifestationen. Die Pathogenese in immunsupprimierten Individuen stellt daher die klinisch relevante Form der CMV-Infektion dar. Dabei werden die drei folgenden Risikogruppen unterschieden:

Kongenital infizierte Embryonen oder Feten

Während einer Primärinfektion der Mutter können nach kongenitaler Infektion des Embryos oder Fötus schwere Embryo- oder Fetopathien wie Schädigung des Nervensystems, Hepatosplenomegalie, Thrombozytopenie oder Chorioretinitis beobachtet werden (Boppana et al., 1992; 1997). Als Folge können lebenslang anhaltende neurologische Schädigungen wie Mikroenzephalie, mentale Retardation oder Verlust des Seh- oder Hörvermögens auftreten (Fowler et al., 1992; zur Übersicht: Reddehase, 2002; Cannon et al., 2013; Mocarski et al., 2013). 10% der symptomatischen kongenitalen CMV-Infektionen führen zum Tod des Neugeborenen (Boppana et al., 1992).

Immunsupprimierte Patienten

Eine weitere Risikogruppe stellen Personen dar, die therapiebedingt einer immunsuppressiven Behandlung unterzogen werden (Dowling et al., 1976; Neiman et al., 1977). Zu dieser Gruppe gehören neben Krebspatienten, bei denen die Chemotherapie zu immunsupprimierenden Nebenwirkungen führt, auch Empfänger solider Organtransplantate sowie Empfänger eines Knochenmarktransplantats bzw. hämatopoietischer Stammzellen. Generell verläuft eine durch das Transplantat induzierte Primärinfektion des Rezipienten schwerer als Reaktivierungen in seropositiven Empfängern (Peterson et al., 1980). Häufig kommt es zu Organmanifestationen wie interstitieller Pneumonie, Kolitis, Gastroenteritis, Hepatitis und Retinitis (Meyers et al., 1986; zur Übersicht: Mocarski et al., 2013). Des Weiteren kann die CMV-Infektion von

Transplantat-Empfängern zu einer starken Funktionsminderung des transplantierten Organs (Duncan et al., 1994; Roberts et al., 1998) oder zu dessen Abstoßung führen (Waiser et al., 1998; Hartmann et al., 2006).

Immundefiziente Patienten

Bei Personen mit angeborener (*severe combined immunodeficiency*, SCID) oder erworbener (*acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS) Immundefizienz kann es durch Primärinfektion, Re-Infektion oder Virusrekurrenz zu einem schweren Verlauf der CMV-Erkrankung kommen. Meist sind Retina, Gastrointestinaltrakt, zentrales Nervensystem oder Lunge betroffen (Moskowitz et al., 1985; Drew, 1992). Vor Einführung der Therapie mittels HAART (*highly active antiretroviral therapy*) entwickelten 20-40% der erwachsenen AIDS-Patienten eine CMV-Erkrankung.

1.3.3 Therapeutische Ansätze und Vakzinierung

Zur medikamentösen Therapie der HCMV-Infektion stehen heute Medikamente wie Ganciclovir, Foscarnet oder abgeleitete Derivate zur Verfügung. Ganciclovir ist ein Nukleosidanalogen, das zunächst von viralen Proteinkinasen zum Monophosphat, danach durch zelluläre Kinasen zum 5'-Triphosphat phosphoryliert wird. Letzteres wird von der viralen DNA-Polymerase als Substrat verwendet. Der Einbau dieses Guanin-Analogons führt zum Abbruch der viralen DNA-Synthese und somit zu einer starken Reduktion der viralen Replikation. Foscarnet wirkt als Analogon des Pyrophosphats und blockiert als solches die Pyrophosphatbindungsstelle der viralen DNA-Polymerase (Michel & Mertens, 2006). In klinischen Studien der Phase II befindet sich derzeit der Wirkstoff AIC246 (Letermovir), der auf unbekannte Weise auf die Untereinheit pUL56 der viralen Terminase wirkt und so die virale Replikation inhibiert (zur Übersicht: Gibson & Bogner, 2013)

In klinischen Studien vermittelt eine passive Immunisierung mit HCMV-spezifischen Immunglobulinen einen guten Schutz bei Neugeborenen, während Transplantatempfänger nur geringfügig profitieren (Puius & Snyderman, 2007).

Ein wirksamer Impfstoff gegen HCMV steht bislang nicht zur Verfügung, seine Entwicklung ist allerdings das Ziel verschiedener Forschergruppen. Bisherige Ansätze folgten unterschiedlichen Strategien zur Induktion einer schützenden humoralen und zellulären Immunantwort. Dazu zählen die Gabe attenuierter Viren (Starr et al., 1981; Plotkin et al., 1989) oder die Immunisierung mit rekombinanten Glykoproteinen (Frey et al., 1999; Pass et al., 1999). Neuere Ansätze sind die DNA-Vakzinierung (Endr sz et al., 2001; Ye et al., 2002) oder die Immunisierung mit *dense bodies* (Pepperl et al., 2000; Pepperl-Klindworth et al., 2002),

nicht-infektiösen, umhüllten Viruspartikeln, die hauptsächlich aus viralen Tegumentproteinen und Glykoproteinen bestehen, denen jedoch das virale Kapsid und die virale DNA fehlt.

1.4 Die mCMV-Infektion als Modellsystem für die HCMV-Infektion

Aufgrund der strikten Speziespezifität der Cytomegaloviren kann die HCMV-Infektion nicht in einem Tiermodell untersucht werden. Viele der im Mausmodell der mCMV-Infektion gewonnenen Erkenntnisse können jedoch aufgrund der strukturellen, biologischen und genetischen Ähnlichkeit beider Viren auf die HCMV-Infektion des Menschen übertragen werden (Rawlinson et al., 1996; Reddehase, 2002; Holtappels et al., 2006b).

Die Pathogenese der Infektionen ist sowohl im immunkompetenten als auch im immunsupprimierten Wirt vergleichbar (Krpmotić et al., 2003). Der Verlauf und die Symptomatik der mCMV-Erkrankung in immunsupprimierten Mäusen, vor allem die sich manifestierende interstitielle Pneumonie, ist vergleichbar zur HCMV-Erkrankung immunsupprimierter Patienten (Barry et al., 2000; Podlech et al., 2000). Im Gegensatz zu HCMV wird mCMV nicht diaplazentar übertragen; viele klinische und histopathologische Parameter der Infektion neugeborener Mäuse entsprechen allerdings der kongenitalen HCMV-Infektion (Fitzgerald et al., 1990; Bantug et al., 2008). Beide Viren etablieren nach Terminierung der Primärinfektion eine lebenslange Latenz, wobei Lunge und Speicheldrüse die Hauptzielorgane darstellen (Balthesen et al., 1993; Reddehase et al., 1994; 2002; Krmpotić et al., 2003). Auch die Immunkontrolle der Infektion der beiden Viren erfolgt mit vergleichbarer Kinetik und wird primär durch CD8 T-Zellen vermittelt (Reddehase et al., 2002; Holtappels et al., 2006b).

Daher hat sich die mCMV-Infektion der Maus als effizientes Modellsystem für die Analyse unterschiedlichster Aspekte der HCMV-Infektion erwiesen. Das in unserer Arbeitsgruppe etablierte Modell der experimentellen Knochenmarktransplantation (KMT) mit anschließender Infektion stellt ein kliniknahes Modellsystem dar, das bereits wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der viralen Latenz, der Pathogenese der Infektion unter Immunsuppression sowie des Beitrags unterschiedlicher Effektorzell-Populationen zur immunologischen Kontrolle der Infektion liefern konnte (Holtappels et al., 2006b; Simon et al., 2006). Auch die mit Hilfe der experimentellen Zytoimmuntherapie-Studien im Mausmodell gewonnenen Ergebnisse haben prädiktiven Wert für die klinische Anwendung und haben bereits zu vielversprechenden zytoimmuntherapeutischen Ansätzen bei HCMV-infizierten KMT-Patienten geführt (Riddell et al., 1992; Walter et al., 1995; Einsele & Hamprecht, 2003; Cobbold et al., 2005).

Darüber hinaus stellt die mCMV-Infektion ein etabliertes Modell zur Analyse der viralen Immunevasions-Mechanismen dar. Sowohl HCMV als auch mCMV modulieren effizient die Immunantwort des Wirtes, insbesondere die CD8 T-Zell-vermittelte Immunkontrolle

(Reddehase, 2002). Die der Immunevasion dienenden Gene beider Viren weisen zwar keine Homologien auf, dennoch haben sich in beiden Virus-Wirt-Systemen analoge Mechanismen entwickelt, die eine Übertragung der im Mausmodell erworbenen Erkenntnisse auf die HCMV-Infektion erlauben (Reddehase, 2002; Reddehase et al., 2004).

1.5 Immunkontrolle der CMV-Infektion

Komponenten sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems tragen zur effizienten Kontrolle der CMV-Infektion im immunkompetenten Wirt bei. Zu den Komponenten des angeborenen Immunsystems gehören u.a. Makrophagen, dendritische Zellen (DCs) und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Die Effektorfunktionen der angeborenen Immunität gehen der einige Tage später einsetzenden Aktivierung der adaptiven Immunantwort voraus. Innerhalb der ersten drei Tage der Infektion wird die Kontrolle der CMV-Infektion vorrangig durch NK-Zellen vermittelt (Bukowski et al., 1984; Arase et al., 2002; Jonjić et al., 2006). Die NK-Zellen sind jedoch nicht in der Lage, die CMV-Infektion dauerhaft zu kontrollieren; daher ist die Etablierung einer CMV-spezifischen Antwort des adaptiven Immunsystems für die Terminierung der produktiven Infektion zwingend notwendig (Welsh et al., 1991).

Zur adaptiven Immunantwort gehören Antigen-spezifische Antikörper, die von B-Zellen sezerniert werden, sowie Antigen-spezifische CD4 und CD8 T-Zellen. Während der CMV-Primärinfektion spielt die Antikörper-vermittelte Immunität nur eine untergeordnete Rolle, sie limitiert jedoch die Dissemination des Virus während rekurrenter Infektionen und vermittelt Schutz gegen sekundäre CMV-Infektionen (Jonjić et al., 1994; Reddehase et al., 1994; Klenovsek et al., 2007; Wirtz et al., 2008).

Die zentrale Rolle hinsichtlich der Kontrolle der CMV-Infektion spielen antivirale CD8 T-Zellen. Sie sind verantwortlich für die Terminierung der produktiven Infektion und die langfristige Kontrolle der CMV-Infektion im Zielorgan (Reddehase, 2002; Holtappels et al., 2006b). Hinsichtlich der immunologischen Kontrolle der Infektion nimmt die Speicheldrüse eine Sonderstellung ein. In diesem Organ wird die Kontrolle der Infektion der Speicheldrüsenzellen nicht durch CD8 T-Zellen vermittelt, sondern durch die Freisetzung von Interferon (IFN)- γ durch CD4 T-Zellen (Jonjić et al., 1989; Debes et al., 2006; Humphreys et al., 2007; Walton et al., 2011).

1.5.1 Reaktion des angeborenen Immunsystems gegen CMV

NK-Zellen

NK-Zellen sind eine der Hauptkomponenten der angeborenen Immunität. Sowohl in der Maus, als auch im Menschen, haben sie einen Anteil von ca. 5-20% der Lymphozyten-Population in Milz, Leber und Blut. NK-Zellen erkennen Antigen-unabhängig infizierte oder transformierte Zellen und stellen eine primäre Verteidigungslinie des Immunsystems dar, die innerhalb kürzester Zeit reagieren kann.

Die antivirale Aktivität der NK-Zellen beruht auf der Sezernierung von Zytokinen, u.a. IFN- γ , TNF- α , Interleukin (IL)-5, IL-10 und IL-13 sowie Chemokinen, die das Wachstum und die Dissemination von Pathogenen und Tumoren kontrollieren. Die von NK-Zellen sezernierten Zytokine haben außerdem das Potential, die Initiation und Aufrechterhaltung adaptiver Immunantworten zu beeinflussen. Darüber hinaus sind NK-Zellen zur direkten Zytolyse von Zielzellen befähigt. Diese wird durch die Exozytose von Perforin und Granzym (Tay & Welsh, 1997; van Dommelen et al., 2003; Loh et al., 2005) oder durch die Aktivierung apoptotischer Signalwege vermittelt. Die Bedeutung dieser ersten Immunantwort wird dadurch unterstrichen, dass nach NK-Zell-Depletion im mCMV-Modell vermehrt Reaktivierungen und höhere Organtiter beobachtet wurden (Bukowski & Welsh, 1985). Vergleichbares konnte in klinischen Studien für die HCMV-Infektion gezeigt werden. So war in Transplantatempfängern die niedrige zytotoxische Aktivität der NK-Zellen mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Venema et al., 1994).

NK-Zellen exprimieren sowohl aktivierende als auch inhibitorische Rezeptoren (Yokoyama, 1998; Ortaldo & Young, 2005). Die Vernetzung der Signale beider Rezeptorarten bestimmt die Aktivität der NK-Zellen (Ortaldo & Young, 2005; Orr et al., 2010). Signale über aktivierende Rezeptoren aktivieren die NK-Zelle, welche daraufhin Perforin und Granzym sezerniert und so die Lyse der Zielzelle vermittelt. Aktivierung der NK-Zellen kann durch die Co-Ligation inhibitorischer Rezeptoren mit MHC-Klasse-I-Molekülen blockiert werden, wodurch die NK-Zellen an der Lyse körpereigener Zellen gehindert werden (Lanier, 2008). NK-Zellen, die inhibitorische Rezeptoren exprimieren, werden als *licensed* bezeichnet und sind generell reaktiver als *unlicensed* NK-Zellen (Yokoyama & Kim, 2006). Interessanterweise konnte jedoch für die mCMV-Infektion gezeigt werden, dass *in vivo* hauptsächlich die *unlicensed* Zellen für die Kontrolle der Infektion verantwortlich sind (Orr et al., 2010). Wird jedoch die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I Molekülen vermindert, z.B. in Folge der Immunmodulation durch Viren wie CMV, wird die Zytolyse der infizierten Zelle aufgrund des *missing self* (Kärre et al., 1986) durch die aktivierenden Signale induziert.

NK-Zellen können auch durch Typ1 IFN und andere Zytokine aktiviert werden (Biron et al., 1996; 1999). Es wurde bereits gezeigt, dass eine mCMV-Infektion die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen erhöht (Bancroft et al., 1981). Weitere Studien zeigten eine generelle Verknüpfung zwischen viraler Infektion und einer Erhöhung der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität. Dies wird durch die Induktion von Typ1 IFN während der mCMV-Infektion verursacht (Orange & Biron, 1996). Zwischen Tag 3-6 p.i. kann eine signifikante NK-Zellantwort nachgewiesen werden (Quinnan et al., 1982). Studien, in denen die Effekte einer NK-Zell-Depletion untersucht wurden, zeigten eine erhöhte Suszeptibilität für die Infektion, eine Erhöhung des viralen Titers und höhere Mortalitätsraten und unterstreichen damit die Bedeutung dieser Lymphozyten für die frühe angeborene Immunkontrolle der mCMV-Infektion (Bukowski et al., 1983; 1984). Im nicht infizierten Wirt sind die NK-Zellen vorrangig in der roten Pulpa der Milz, in Lymphknoten und im Thymus nachzuweisen, nicht jedoch in der Leber. Zwei Tage nach intraperitonealer Infektion durch mCMV sind die NK-Zellen hauptsächlich in lymphoiden Follikeln und der Randzone der Milz lokalisiert, wo die Produktion von Typ1 IFN durch Stromazellen und pDCs stattfindet (Loewendorf & Benedict, 2010). Drei Tage nach Infektion findet sich auch in der Leber eine stark erhöhte Menge an NK-Zellen (Dokun et al., 2001a; b; Erlach et al., 2008).

Der Genotyp des Wirts bestimmt die Effizienz, mit welcher NK-Zellen mCMV-infizierte Zellen erkennen und lysieren. Er spielt daher eine kritische Rolle hinsichtlich der Suszeptibilität unterschiedlicher Mausstämmen gegenüber der mCMV-Infektion. Die Aktivität der NK-Zellen wird durch das Gleichgewicht der über inhibierende und aktivierende NK-Zell-Rezeptoren eingehenden Signale reguliert. mCMV-resistente Mausstämmen, z.B. der C57BL/6-Stamm, exprimieren den aktivierenden NK-Zell-Rezeptor Ly49H (Brown et al., 2001; Daniels et al., 2001; Lee et al., 2001b). Dieser interagiert mit dem viralen Genprodukt von *m157* auf der Oberfläche infizierter Zellen (Arase et al., 2002; Smith et al., 2002; Arase & Lanier, 2004; Jonjić et al., 2006; Lenac et al., 2008). Dadurch werden infizierte Zellen effizient erkannt und lysiert und die Infektion wird schnell kontrolliert. NK-Zellen mCMV-sensitiver Mausstämmen, z.B. BALB/c, exprimieren den Ly49H-Rezeptor nicht. In ihnen werden während der akuten Infektionsphase, vor allem in der Milz, deutlich höhere Virustiter nachgewiesen als dies in mCMV-resistenten Mausstämmen der Fall ist (Scalzo et al., 1992; Daniels et al., 2001). Neben der Ly49H-vermittelten Erkennung sind noch weitere regulatorische Elemente im Zusammenspiel zwischen Virus und NK-Zelle beschrieben worden (Jonjić et al., 2006; Vidal & Lanier, 2006).

Die Bedeutung der NK-Zell-vermittelten Immunkontrolle für die CMV-Infektion wird auch dadurch deutlich, dass sowohl mCMV als auch HCMV Strategien entwickelt haben, die mit der Aktivierung der NK-Zell-Antwort interferieren (siehe 1.7).

Interferone

IFN sind Proteine, die antiviral und antitumoral wirken können. Die Induktion der IFN-Sezernierung wird durch eine Reihe verschiedener Stimuli induziert (Pestka et al., 1987). IFN haben nicht nur antivirale Wirkung (Levy & García-Sastre, 2001; Samuel, 2001), sondern spielen auch eine regulatorische Rolle beim Zellwachstum (Grandér et al., 1997) und haben einen Einfluss auf die Immunmodulation (Biron, 2001).

Anhand struktureller Homologie und ihrer jeweiligen Rezeptorbindung werden IFN in drei Klassen unterteilt: Zu den Typ I-IFN gehören IFN- α , und - β , während IFN- γ zu Typ II-IFN gehört. Die Typ III-IFN (IFN- λ) wurden erst später als Typ I- und Typ II-IFN beschrieben (Kotenko et al., 2003; Sheppard et al., 2003). Obwohl Typ I- und Typ III-IFN unterschiedliche Rezeptoren nutzen, ähneln sich ihre intrazellulären Signalwege (Kotenko et al., 2003).

IFN- β kann von fast allen zellkernhaltigen Zellen, insbesondere von Fibroblasten, gebildet werden. IFN- α wird hauptsächlich von Leukozyten exprimiert, kann aber durch IFN- β auch in Fibroblasten induziert werden (Erlandsson et al., 1998; Taniguchi & Takaoka, 2001; Zimmermann & Hengel, 2006). IFN- γ wird nach Kontakt ausschließlich von Zellen des Immunsystems exprimiert, unter anderem von NK-Zellen, CD4 T-Zellen und CD8 T-Zellen (Boehm et al., 1997; Taniguchi & Takaoka, 2001; Zimmermann & Hengel, 2006).

Die Bindung der IFN an ihren jeweiligen Rezeptor (Typ I: IFNAR1 und IFNAR2; Typ II: IFNGR1 und IFNGR2; Typ III: IL28R α und IL10R2) führt zu Aktivierung von rezeptorgebundenen Janus Kinasen (Jaks; Jak1 und Jak2 bei Typ II; Jak1 bei Typ I und III) und Tyrosinkinase (Tyk; Tyk2 bei Typ I und III) (Darnell et al., 1994; Ihle and Kerr, 1995; Kotenko et al., 2003). Die Aktivierung von Jak und Tyk wiederum führt zur Phosphorylierung von STAT1 und STAT2 (*signal transducers and activators of transcription*) (Darnell et al., 1994; Ihle, 1995; Taniguchi, 1995; Stark et al., 1998). Diese bilden zusammen mit IRF-9 (*IFN-regulatory factor*) einen heterotrimeren Komplex, ISGF-3 (*IFN-stimulated gene factor*), der eine Reihe von IFN-induzierbaren Genen über eine *IFN-stimulated response element* (ISRE)-Konsensussequenz in deren Promotor aktiviert. Zusätzlich bildet das phosphorylierte STAT1 Homodimere: GAF (*IFN- γ -activated factor*) und AAF (*IFN- α -activated factor*); diese binden an die *IFN- γ -activated site* (GAS) in der Promotorregion des Zielgens und initiieren dessen Transkription (Darnell et al., 1994; Bluysen et al., 1996). Die Induktion der IFN-stimulierten Gene (ISG), welche hauptsächlich für antivirale Proteine kodieren, ist für die Wirkung von IFN von großer Bedeutung. Ein gut untersuchtes ISG ist die durch dsRNA aktivierte Serin/Threonin Proteinkinase (PKR) (Meurs et al., 1990), die in ihrer aktiven Form das Ser51 des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors eIF-2 α phosphoryliert und so dessen Recycling und damit die Transkription und Translation inhibiert. Da somit auch die virale Replikation eingedämmt wird, ist die PKR ein Ziel der viralen Immunmodulation (Katze et al., 2002).

Als weitere antivirale Effektorfunktion induzieren IFN die Verstärkung der Oberflächenexpression von pMHC-I-Komplexen sowie die Expression des Immunoproteasoms. Des Weiteren fungieren IFN als Aktivatoren der NK-Zell-Toxizität (Biron et al., 1996; 1999) und stellen somit eine Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunität her.

Sowohl in BALB/c als auch in C57BL/6 Mäusen induziert die Infektion (i.p.) mit mCMV eine biphasische Typ I-IFN-Antwort. Nach ca. 8h erreichen die mRNA-Level der Typ I-IFN einen ersten Peak, der innerhalb der nächsten 16h wieder abfällt. Während dieser Phase produzieren Lymphotoxin (LT) β -Rezeptor exprimierende Stromazellen der Milz den Hauptanteil der Typ I-IFN-Antwort. Dafür sind LT β -exprimierende B-Zellen essentiell. Die zweite, länger andauernde IFN-Antwort erfolgt im Zeitraum von 36-72h p.i. (Schneider et al., 2008). Die wichtigsten IFN sezernierenden Zellen sind nun unausgereifte Antigen-präsentierende pDCs (Asselin-Paturel et al., 2001). Nach mCMV-Infektion reifen diese und können nun NK-Zellen stimulieren und Antigene präsentieren, um T-Zellen zu aktivieren (Dalod et al., 2002).

1.5.2 Reaktion des adaptiven Immunsystems gegen CMV

Die Haupteffektoren des adaptiven Immunsystems zur Kontrolle der CMV-Infektion sind virus-spezifische T-Zellen. Die hohe Diversität der T-Zell-Rezeptoren (TCR) ermöglicht die Erkennung einer Vielzahl von antigenen Peptiden. Diese Diversität entsteht durch das Rearrangement der variablen Gensegmente in den beiden Ketten des membranständigen TCR. Anhand der Zusammenstellung des TCR lassen sich T-Zellen in zwei Gruppen einteilen: $\alpha\beta$ -T-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen. Zu ersteren gehören die beiden großen Populationen der zytolytischen T-Zellen (CTL) und T-Helferzellen (T_HC) sowie die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) und NKT-Zellen (*natural killer* T-Zellen).

Zusätzlich zum TCR exprimieren T-Zellen Co-Rezeptoren, deren klassische Vertreter CD4 und CD8 sind und deren Expression T_HC (CD4⁺) von CTL (CD8⁺) unterscheidet. CD8 T-Zellen erkennen mit Peptid-beladene MHC-Klasse-I-Moleküle, während CD4 T-Zellen von MHC-Klasse-II präsentierte Peptide auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC) erkennen (Germain, 1994). Die spezifische Aktivierung einer T-Zelle erfolgt durch Interaktion ihres TCR mit dem Peptid-MHC-Komplex bei gleichzeitiger Interaktion co-stimulierender Moleküle mit Liganden der Zielzelle (Rudolph et al., 2006). Daraufhin kommt es zur Ausbildung von Effektorfunktionen und einer umfangreichen Proliferation der aktivierten T-Zellen (klonale Expansion). Zusätzlich werden Memory-T-Zellen gebildet, die als Gedächtniszellen im Körper verbleiben und bei erneutem Kontakt mit dem entsprechenden Antigen innerhalb kurzer Zeit Effektorfunktionen ausbilden können (Stemberger et al., 2007a; b). Zu den Effektorfunktionen der CTLs gehören

ihre direkte zytolytische Aktivität (Doherty, 1993) sowie die Sezernierung verschiedener Zytokine (z.B. TNF, IFN- γ) und Chemokine (Harty et al., 2000).

Die essentielle Bedeutung der CTL-vermittelten Immunkontrolle der CMV-Infektion ist vielfach belegt (Quinnan et al., 1978; Reddehase et al., 1985; 1987b; Steffens et al., 1998; Holtappels et al., 2006b). Bereits 1985 konnte gezeigt werden, dass ein präemptiver adoptiver Transfer (AT) von spezifischen CD8⁺ T-Lymphozyten immunsupprimierte BALB/c Mäuse vor einer mCMV-Infektion schützen kann. Erfolgte der AT 6 Tage nach Infektion, einem Zeitpunkt also, zu welchem schon deutliche Organmanifestationen zu erkennen waren, vermittelten die T-Lymphozyten auch eine effiziente Kontrolle der bestehenden Infektion (therapeutischer T-Zell-Transfer), wenngleich in diesem Fall eine ~10fach höhere Zellzahl erforderlich war (Reddehase et al., 1985). Die CD8⁻ Restpopulation (inkl. CD4 T-Zellen) dagegen vermittelte keinen Schutz. Diese ursprünglich mit polyklonalen Zellpopulationen erhobenen Daten konnten mit Peptid-spezifischen CTL-Linien (CTLL) (Holtappels et al., 2000; 2001; 2002b) sowie *ex vivo* isolierten Peptid-spezifischen CD8 T-Zellen (Pahl-Seibert et al., 2005; Böhm et al., 2008a) vielfach bestätigt werden.

Dass die Rekonstitution der CD8 T-Zell-Antwort nach Immunsuppression die akute Infektion terminiert und den Ausbruch der Erkrankung verhindert, konnte darüber hinaus im kliniknahen Modell der experimentellen, syngenen (Holtappels et al., 1998; Podlech et al., 1998; 2000) als auch allogenen (Alterio de Goss et al., 1998) KMT gezeigt werden.

In jeder CTL-vermittelten Immunantwort dominieren bestimmte Peptid-Spezifitäten, die über MHC-Klasse-I-Glykoproteine präsentiert werden. In der BALB/c-Maus (Haplotyp H-2^d) wurden bisher 9 antigene mCMV-Peptide identifiziert, gegen die messbare Frequenzen spezifischer CD8 T-Zellen induziert werden (Holtappels et al., 2006b; 2008a). Die Frequenzen der gegen diese Epitope gerichteten T-Zellen definieren die zugehörigen antigenen Peptide als immundominant, intermediär oder subdominant. Von unserer Arbeitsgruppe wurde mehrfach gezeigt, dass die Immundominanz der antigenen Peptide und das protektive Potential der entsprechenden T-Zell-Spezifitäten nicht miteinander korrelieren (Holtappels et al., 2004; 2006b). In der BALB/c-Maus sind bisher zwei immundominante Peptide beschrieben worden; zum einen das vom frühen regulatorischen IE1-Protein abgeleitete Peptid m123₁₆₈₋₁₇₆ (Reddehase & Koszinowski, 1984; Reddehase et al., 1989) und zum anderen ein Peptid aus dem ORF m164 (m164₂₅₇₋₂₆₅) (Holtappels et al., 2002a). Für den Haplotyp H-2^b der C57BL/6-Maus sind mehrere immundominante Peptide beschrieben worden, u. a. M38₃₁₆₋₃₂₅, M45₉₈₅₋₉₉₃ und m139₄₁₉₋₄₂₆ (Munks et al., 2006b).

Auch für die HCMV-Infektion konnte die wichtige Rolle der CD8 T-Zell-vermittelten Kontrolle der Infektion durch AT von CD8 T-Zellen bestätigt werden (Reusser et al., 1991; Riddell & Greenberg, 1995; Walter et al., 1995; Einsele & Hamprecht, 2003; Cobbold et al., 2005).

1.6 Antigenpräsentation über MHC-Klasse-I

Die Erkennung und Eliminierung von Virus-infizierten oder transformierten Zellen wird von CD8 T-Zellen vermittelt und erfordert die Interaktion zwischen APC und CTL (Marrack & Kappler, 1987). Antigene Peptide werden zunächst intrazellulär prozessiert und an den spezialisierten Proteinkomplex MHC-Klasse-I gebunden und anschließend von der APC an der Zelloberfläche präsentiert. Die CTL erkennt diesen Peptid-MHC-Klasse-I-Komplex über ihren TCR. Dieser bildet daraufhin zusammen mit akzessorischen Molekülen wie CD8 oder CD28 die sogenannte immunologische Synapse aus und aktiviert die CTL. Aktivierte CTL dienen dem Immunsystem als Effektorzellen, die infizierte Zellen erkennen und diese aus dem Organismus eliminieren (Rock et al., 2002; 2004).

1.6.1 MHC-Klasse-I-Peptidkomplex

Der MHC-Klasse-I-Peptidkomplex ist ein Heterotrimer bestehend aus der α -Kette (44-47kDa), dem mit ihr nicht kovalent verbundenen β 2-Microglobulin (12kDa) und dem präsentierten antigenen Peptid. Die α -Kette verankert den Komplex in der Zellmembran und bindet in einer von den α 1- und α 2-Domänen gebildeten Grube die 8-11 Aminosäuren langen Peptide. Die α 3-Domäne und das β 2-Microglobulin bilden jeweils eine Immunglobulin-ähnliche Struktur aus. An die α 3-Domäne bindet das CD8-Molekül der CTL und stabilisiert den MHC-TCR Komplex. Das β 2-Microglobulin hingegen stabilisiert die Peptid-Bindungsgrube (Rudolph et al., 2006).

1.6.2 MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation

Über den klassischen MHC-Klasse-I-Antigenpräsentationsweg präsentiert die Zelle kontinuierlich ein Abbild der intrazellulären Proteinexpression auf ihrer Oberfläche. Die hierfür verwendeten Peptide sind Produkte der zellulären Protein-Degradation, die für die meisten zytoplasmatischen Proteine über den Ubiquitin-Proteasom-Weg abläuft (Goldberg, 2003; Cresswell et al., 2005). Alte oder während der Synthese fehlgefaltete Proteine werden initial an der Aminogruppe von Lysinen mit einem *tag* von vier oder mehr Ubiquitin-Molekülen versehen (Yewdell & Hill, 2002; Yewdell, 2007). Dieser *tag* dient als Signal für das 26S-Proteasom, eine multikatalytische Protease mit drei unterschiedlichen Peptidase-Aktivitäten, die die Hydrolyse nach großen hydrophoben (*chymotrypsin-like*), basischen (*trypsin-like*) oder sauren (*post-acidic* oder *caspase-like*) Resten katalysiert. Das gesamte Proteasom ist ein Multiproteinkomplex aus einer 700kDa schweren Haupteinheit sowie weiteren katalytischen Untereinheiten. In immunologisch relevanten Geweben oder nach IFN- γ Stimulus werden die drei aktiven Zentren der β -Untereinheit durch LMP1, LMP7 (*low molecular weight proteins*) und MECL-1 (*multicatalytic endopeptidase complex subunit 1*) ersetzt und das Proteasom somit zum Immunoproteasom modifiziert. Das Vorkommen beider Proteasom-Arten erhöht die

Variabilität der generierten Peptide, da sich die proteolytischen Aktivitäten der katalytischen Zentren beider Typen unterscheiden (Toes et al., 2001).

Der überwiegende Teil der vom Proteasom generierten Peptide wird direkt durch Exo- und Endopeptidasen des Zytosols weiter zu Aminosäuren abgebaut. Der restliche Teil der entstandenen reifen Peptide (8- bis 11-mere; Chang et al., 2005) oder N-terminal verlängerten *Precursor*-Epitope wird in einem ATP-abhängigen Schritt über den TAP (*transporter associated with antigen presentation*) in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transloziert. Dort trimmen Aminopeptidasen wie ERAP1 (*human*; Saric et al., 2002; York et al., 2002) bzw. ERAAP (*murin*; Serwold et al., 2002) die N-terminal verlängerten *Precursor*-Peptide weiter (Kloetzel & Ossendorp, 2004). Die reifen Peptide werden schließlich in einem Komplex bestehend aus dem MHC-Klasse-I-Heterodimer, dem TAP sowie unterschiedlichen Chaperonen, u.a. Calreticulin, ERp57 und Tapasin (Suh et al., 1994; Grandea et al., 1995; Ortmann et al., 1997) auf leere MHC-Klasse-I-Moleküle geladen (Baas et al., 1992). Diese MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe folgen dem sekretorischen Transportweg zur Zelloberfläche, wo das gebundene Peptid präsentiert und von CD8 T-Zellen erkannt wird (Townsend et al., 1989). Neben diesem klassischen Weg der MHC-Klasse-I-Beladung sind noch weitere TAP- und Proteasom-unabhängige Wege beschrieben worden. Für HIV und HBV wurde die Generierung von antigenen Peptiden im ER und Trans-Golgi beschrieben (Hammond et al., 1995; Gil-Torregrosa et al., 2000). Für die EBV-Infektion liegen Daten vor, die ein TAP-unabhängiges, Proteasom-abhängiges Beladen von MHC-Klasse-I-Molekülen zeigen (Lautscham et al., 2003).

In den bisher beschriebenen Antigenpräsentationswegen werden bereits in der Zelle vorhandene Proteine degradiert und anschließend präsentiert. Es können jedoch auch extrazelluläre Proteine oder Proteinbruchstücke von professionellen APC zur Präsentation genutzt werden. Diese Peptide werden mittels Endozytose oder Phagozytose von der Zelle aufgenommen, degradiert und in den Antigenpräsentationsweg eingeschleust (Raghavan et al., 2008). Eine besondere Bedeutung dieses als *cross-presentation* bezeichneten Phänomens zeigt sich darin, dass trotz starker Immunevasion (siehe 1.7) in CMV-infizierten Individuen CD8 T-Zellen erfolgreich *geprimt* werden (Gold et al., 2004; Böhm et al., 2008b).

1.7 Immunevasion des murinen Cytomegalovirus

Die Fähigkeit eines Pathogens, die Immunantwort des Wirtes derart zu modulieren, dass er trotz der immunologischen Abwehrmechanismen teilweise der Immunkontrolle entkommt, nennt man Immunevasion. Im Laufe der Evolution haben CMV, wie viele andere Viren auch,

Mechanismen entwickelt, sowohl Komponenten der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort des Wirtes zu entgehen.

Ein zentrales Ziel effizienter Immunevasion ist die NK-Zell-Antwort. Sowohl HCMV als auch mCMV kodieren für Proteine, deren Funktion eine verminderte Oberflächenexpression von Liganden aktivierender NK-Zell-Rezeptoren induziert, wodurch die Aktivierung der NK-Zell-Antwort vermindert wird (Jonjić et al., 2008; Lenac et al., 2008). Bei mCMV wurden vier Proteine identifiziert, welche - teils redundant - die Oberflächenexpression von Liganden des aktivierenden NK-Zell-Rezeptors NKG2D herabregulieren: m145 inhibiert die Oberflächenexpression von MULT-1 (Krpmotić et al., 2005), m152 ist für die intrazelluläre Retention der unterschiedlichen RAE-1 (*retinoic acid early-inducible gene-1*)-Isoformen verantwortlich (Lodoen et al., 2003), m155 vermindert die Oberflächenexpression von H60 (Lodoen et al., 2004; Hasan et al., 2005) und m138 interferiert mit der Oberflächenexpression der Liganden MULT-1 und H60 (Lenac et al., 2006).

Auch die CD8 T-Zell-vermittelte Kontrolle der Infektion stellt ein wichtiges Ziel immunmodulatorischer Mechanismen dar (Hengel et al., 1999; Kavanagh & Hill, 2001; Reddehase, 2002; Reddehase et al., 2004; Holtappels et al., 2006b; Doom & Hill, 2008; Lemmermann et al., 2011; 2012). Sowohl HCMV als auch mCMV kodieren für Proteine, die die Präsentation viraler Peptide auf der Oberfläche infizierter Zellen und somit die Erkennung infizierter Zellen durch CD8 T-Zellen vermindern. Diese Proteine werden als Immunevasine bezeichnet. Die für die Immunevasine kodierenden Gene beider Viren zeigen keinerlei Sequenzhomologie und sind hinsichtlich ihrer Lokalisation im viralen Genom nicht ortholog. Beide Viren bedienen sich jedoch z.T. analoger Mechanismen, um die MHC-Klasse-I-Expression infizierter Zellen zu vermindern (Tortorella et al., 2000; Reddehase, 2002).

Für mCMV sind bisher drei Immunevasine oder vRAPs (*viral regulators of antigen presentation*) beschrieben; dies sind die Genprodukte der ORFs *m04*, *m06* und *m152* (zur Übersicht: Reddehase, 2002; Yewdell & Hill, 2002; Reddehase et al., 2004; Holtappels et al., 2006b; Doom & Hill, 2008). Der Nettoeffekt ihrer Wirkungen vermindert die Erkennung und damit die Zytolyse infizierter Zellen durch Antigen-spezifische CD8 T-Zellen (Holtappels et al., 2006a; Pinto et al., 2006). Bei allen drei Genprodukten handelt es sich um Typ I-Glykoproteine mit einer *early* Expressionskinetik (Kleijnen et al., 1997; Ziegler et al., 1997; Reusch et al., 1999). Hohe Transkriptionslevel werden in infizierten Zellen zuerst von m152 und m06 erreicht (2 Stunden p.i.), etwas später von m04 (Holtappels et al., 2002a). Die Expression von m04 und m06 bleibt während des weiteren Verlaufs der Infektion stabil, es kommt jedoch im Verlauf der Infektion zu einer Reduktion der m152-Expression (Holtappels et al., 2002a).

m04/gp34 (kurz: m04)

bindet im ER stabil an MHC-Klasse-I-Moleküle und kann nur im Komplex mit diesen an der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Kleijnen et al., 1997; Kavanagh et al., 2001b), es verhindert also nicht die Oberflächenexpression von pMHC-Komplexen. m04 trägt ein Adaptorproteinbindemotiv (YRRF), welches mit den Adaptorproteinen AP-2/4 interagieren (Nakatsu & Ohno, 2003) und somit den intrazellulären Transport der Proteinkomplexe steuern könnte. Obwohl m04 alleine die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression nicht reduziert (Wagner et al., 2002), wurde in der Literatur eine negative Wirkung des Proteins auf die CD8 T-Zell-Aktivierung beschrieben (zur Übersicht: Lilley & Ploegh, 2005). Daher wurde postuliert, dass die Bindung des Proteins an MHC-Klasse-I-Moleküle die Erkennung präsentierter Peptide auf der Zelloberfläche verhindert (Kavanagh et al., 2001a). Unsere Arbeitsgruppe konnte allerdings zeigen, dass die Erkennung des Komplexes gerade nicht behindert wird (Holtappels et al., 2006a), so dass der Beitrag von m04 zur mCMV-Immunevasion nicht eindeutig geklärt ist. Die Klassifizierung von m04 als Immunevasin beruhte allein auf der Beobachtung, dass die Infektion mit einer m04-Deletionsmutante zu einer im Vergleich zum Wildtyp (WT)-Virus verbesserten Antigen-Präsentation führt (Kavanagh et al., 2001a; Holtappels et al., 2006a; Pinto et al., 2006). Zusätzlich wurde die Rolle von m04 als Immunevasin der NK-Zell-Erkennung diskutiert (Kleijnen et al., 1997; Pinto & Hill, 2005). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I im Komplex mit m04 für ein NK-Zell-*Silencing* verantwortlich ist und das Fehlen des Proteins zu einer reduzierten Viruslast führt (Babić et al., 2010).

m06/gp48 (kurz: m06)

bindet im ER ebenfalls stabil an pMHC-I-Komplexe und vermittelt deren Einschleusung in den endolysosomalen Abbauweg der Zelle. Dieser intrazelluläre Transport wird durch ein Dileucin-Motiv im zytoplasmatischen Teil von m06 vermittelt, worüber das Protein mit den zellulären, heterotetrameren Adaptorproteinen AP-1A/3A interagiert (Reusch et al., 1999; 2002). Im Lysosom kommt es zum Abbau sowohl der MHC-Klasse-I-Moleküle als auch von m06 (Reusch et al., 1999). Durch die Funktion von m06 wird folglich die Oberflächen-expression Peptid-beladener MHC-Klasse-I-Moleküle limitiert.

m152/gp40 (kurz: m152)

bindet über seine lumenale Domäne transient an die lumenale Domäne der in der ER-Membran verankerten MHC-Klasse-I-Moleküle und vermittelt deren Retention und Akkumulation in einem ERGIC/cis-Golgi-Kompartiment (del Val et al., 1992; Ziegler et al., 1997; 2000). Dadurch kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Dichte von pMHC-Komplexen auf der Oberfläche infizierter Zellen (del Val et al., 1989; 1992). Während m152 schnell lysosomal abgebaut wird, akkumulieren die MHC-Peptid-Komplexe im ERGIC (Ziegler

et al., 2000). Der genaue Mechanismus der Retention ist bisher jedoch nicht aufgeklärt. Da nach Deletion des ORF m152 die MHC-Klasse-I-Expression an der Zelloberfläche wiederhergestellt wird (Krmpotić et al., 1999; Gold et al., 2002; Holtappels et al., 2004; 2006a), gilt m152 als das zentrale Immunevasin von mCMV.

Das Protein m152 moduliert somit auf zwei unterschiedliche Weisen die Immunantwort des Wirtes. Zum einen bewirkt es die Retention von pMHC-Komplexen im ERGIC/cis-Golgi, zum anderen verhindert es die Expression des NKG2D-Liganden RAE-1 auf der Zelloberfläche (siehe oben).

1.8 Zielsetzung

Die mCMV-Infektion wird durch virusspezifische CD8 T-Zellen kontrolliert. Diese erkennen auf MHC-Klasse-I-Komplexen präsentierte virale Peptide und lysieren die infizierte Zelle. Durch Beeinflussung der Oberflächenexpression der MHC-Klasse-I-Komplexe versucht mCMV dieser Kontrolle zu entgehen. Die hierfür verantwortlichen Genprodukte wurden als m04/gp34, m06/gp48 und m152/gp40 identifiziert (zur Übersicht: Reddehase, 2002) und aufgrund ihres regulatorischen Einflusses auf die Antigenpräsentation als vRAPs bezeichnet.

In früheren Arbeiten konnten sowohl kooperative als auch antagonistische Wechselwirkungen der drei vRAPs in infizierten Zellen nachgewiesen werden (Wagner et al., 2002; Holtappels et al., 2006a; Pinto et al., 2006).

Nach Infektion von MEF mit der Rekombinante Δ m06 waren sowohl die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression als auch die Antigenerkennung durch CD8 T-Zellen (Wagner et al., 2002; Holtappels et al., 2006a; Pinto et al., 2006) wiederhergestellt. m04 schien daher in Abwesenheit von m06 als Antagonist von m152 zu wirken und hob dessen inhibitorischen Effekt teilweise auf. Der dahinterliegende Mechanismus, d.h. ob m04 die Expression von m152 negativ reguliert, oder ob m04 noch vor m152 die MHC-Klasse-I-Moleküle bindet und somit vor einer Retention im ERGIC schützt, blieb jedoch ungeklärt. Letzteres ist aber unwahrscheinlich, da die Transkription von m152 früher beginnt, als die von m04 und auch das Protein früher exprimiert wird.

Ein Ziel der Arbeit war es daher, den antagonistischen Effekt zwischen den vRAPs m04 und m152 aufzuklären. Nach Infektion von MEF mit mCMV sollte die Kinetik Expression beider Proteine genauer untersucht werden.

Zu Beginn der Arbeit war außerdem bekannt, dass die Expression aller drei vRAPs zwar die stärkste Inhibition der Antigenpräsentation vermittelt (Holtappels et al., 2006a), jedoch nicht die effiziente Kontrolle der Infektion durch CD8 T-Zellen *in vivo* verhindert (zur Übersicht: Reddehase, 2002). *In vitro* wurde beobachtet, dass eine Vorbehandlung von Zellen mit IFN- γ

den Rückgang der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression und der Erkennung WT-infizierter Zellen weitgehend aufhebt (Hengel et al., 1994). In adoptiven Transferexperimenten konnte eine IFN- γ -Abhängigkeit der CD8 T-Zell Effektorwirkung gezeigt werden. Die *in vivo*-Depletion von IFN- γ in immunsupprimierten, WT-infizierten Rezipienten führte zu einer signifikanten Reduktion des protektiven Potentials der transferierten CD8 T-Zellen (Hengel et al., 1994). Dies legt nahe, dass IFN- γ die Antigen-Präsentation auch *in vivo* reguliert.

Ein weiteres Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, die bisherigen Erkenntnisse zum Einfluss von IFN- γ auf die Wirkung der einzeln oder co-exprimierten vRAPs zu erweitern. Hierfür sollten nach Infektion mit den vRAP-Deletionsmutanten die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression und die Antigenpräsentation infizierter MEF ermittelt werden. Des Weiteren sollte die Antigenprozessierung nach IFN- γ Vorbehandlung eingehender untersucht werden. Da der Effekt der *in vivo*-Depletion von IFN- γ bekannt war, sollte nun umgekehrt getestet werden, ob eine konstitutive IFN- γ -Expression im Wirt zu einem stärkeren schützenden Potential der transferierten CD8 T-Zellen führt. Dieser Ansatz bietet die translationale Perspektive einer möglichen Verbesserung der CD8 T-Zell Immuntherapie der CMV-Infektion.

2 Material

In der folgenden Tabelle sind alle Firmen mit jeweiligem Firmensitz aufgelistet, bei denen Material für diese Arbeit erworben wurde.

Firma	Sitz	Firma	Sitz
Aesculap	Tuttlingen	Merck	Darmstadt
Agilent Technologies	Kronberg	Messer	Griesheim
Allied Vision Technologies	Stadtroda	Mettler Toledo	Gießen
Applied Biosystems	Foster City, USA	Millipore	Schwalbach
Appligene	Heidelberg	Miltenyi Biotech	Bergisch-Gladbach
Bachofer	Reutlingen	New England Biolabs (NEB)	Frankfurt/Main
Beckman Coulter	Krefeld	Nikon	Düsseldorf
Becton Dickinson (BD)	Heidelberg	Nunc	Wiesbaden
Biometra	Göttingen	Olympus	Hamburg
Biorad	München	PAA	Pasching, Österreich
Braun	Melsungen	PALL	New York, USA
Buchler	Braunschweig	Peqlab	Erlangen
DIFCO Laboratories	Detroit, MI, USA	Perkin-Elmer	Rodgau
Eppendorf	Hamburg	Pharmacia	Erlangen
Erlab	Köln	Privileg	Fürth
FS Medical	Nordhausen	Rainin	Oakland, USA
Imaging Gilson	Villies Le Bel, Frankreich	Rische + Herfurth	Hamburg
Grant	VWR, Wien	Roche	Mannheim
Greiner	Nürtingen	Roth	Karlsruhe
INTEGRA Biosciences	Fernwald	Sartorius	Göttingen
Janke und Kunkel	Staufen	Sarstedt	Nümbrecht
JPT	Berlin	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim
Labotec	Wiesbaden	Thermo Scientific	Langenselbold
Leica	Wetzlar	Qiagen	Hilden
life technologies	Darmstadt	Vogel Histo-Comp	Gießen
Macherey-Nagel	Düren	VWR International	Darmstadt
		Zeiss	Jena

2.1 Allgemeine Laborgeräte

autoMACS
 Brutschrank B6 und B12 (Bakterien)
 Brutschrank B12 und Hera Cell240 (Zellen)
 Chromatographie-G25-System:
 CO₂-Inkubator
 Durchflusszytometer

Miltenyi Biotech
 Heraeus; Thermo Scientific
 Heraeus; Thermo Scientific
 Pharmacia LKB
 Heraeus; Thermo Scientific
 Cytomics FC500, Beckman Coulter

Elektroblotter	PerfectBlue Semi-Dry SEDEC M, Peqlab
Elektroporator	Gene Pulser™, Biorad
Flüssigstickstofftank	Messer
Gel-Dokumentationsanlage	Marlin F-145B2 IRF, Allied Vision Technologies
Gelelektrophoresekammer	Peqlab
Heizplatte/Magnetrührer	IKA RH basic2, Janke und Kunkel
HPLC-Niederdruckgradienten-System:	
ÄKTAdesign	Amersham Biosciences
Injektor Rheodyne 7125	Sigma-Aldrich, Nr. 58826
Säulenofen 2155	LKB
Säule Nucleosil 100-5 C18	Macherey-Nagel, Nr. 72001446
Hybridisierungsöfen	OV1, Biometra
Laminiergerät	Polystar 244, Rische + Herfurth
Mikroskope:	
Fluoreszenzmikroskop	Axiophot, Zeiss
Invertmikroskop	Leica DM, Leica, Wetzlar
Zählmikroskop	Nikon SE, Nikon
Zählmikroskop ELISpot Assay	Olympus SZX 12, Olympus Highlight 3100, Olympus Miltenyi Biotech
MACS <i>MultiStand</i>	Privileg
Mikrowelle	RM 2255, Leica, Wetzlar
Mikrotom	HistoTAPplus, Leica, Bensheim
Paraffinerhitzer	BioPhotometer, Eppendorf
Photometer	Nanodrop-1000, Qiagen
Pipetten	Eppendorf
	Gilson
	Rainin
Pipettierhilfe	Pipetboy, INTEGRA Biosciences
<i>Power Supply</i>	EPS 301, Pharmacia
	EPS 600, Pharmacia
<i>real-time</i> PCR System	ABI 7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems
Schüttelinkubator	Cellstar, NUNC
	Certomat, Labotec
Schüttelwasserbad	OLS 200, Grant
Sicherheitswerkbank	HERA safe HS 12/2 und HS15/2, Heraeus
	Template Tamer Captair bio, Erlab
	Template Tamer Oncor, Appligene
<i>Thermocycler</i>	GenAmp PCR System 9700, Perkin-Elmer
Thermoschüttler	Eppendorf
UV-Transilluminator	FluoLink, Bachofer
	UV-Star 30, Biometra
Vollschutz-Kleintierbestrahlungsanlage	Typ OB 58-BA, Buchler
Waagen	BP 61, Sartorius
	Kern 510, Albstadt
	Kern 572, Albstadt
Zentrifugen:	
Präparative Zentrifuge	Sorvall RC5C Plus, Thermo Scientific
	Sorvall RC6+, Thermo Scientific
Tischzentrifugen	centrifuge 5417, Eppendorf
	centrifuge 5417C, Eppendorf
	centrifuge 5417R, Eppendorf

Ultrazentrifuge	Labofuge 200, Heraeus Labofuge 400, Heraeus Megafuge 2.0; Heraeus Mikrozentrifuge AL, Roth Multifuge 3 S-R, Heraeus Sorvall Combi Plus, Sorvall
-----------------	--

2.2 Plastikwaren und Verbrauchsmaterial

Einfrierröhrchen	2ml Cryo's, PP (Greiner)
Einmal-Plastikpipetten	5ml (Greiner, Nr. 606180) 10ml (Greiner, Nr. 607180) 25ml (Greiner, Nr. 760180)
Einmal-Spritzen	1ml (Braun, Nr. 9166017V) 2ml (Braun, Nr. 4606027V) 5ml (BD, Nr. 309050) 10ml (BD, Nr. 309110) 50ml (BD, Nr. 300296) DistriTip Maxi 12,5ml (Gilson, Nr. 7-4386)
Elektroporationsküvetten	2mm Spaltbreite (Peglab, Nr. 71-2020-LE)
ELISpot-Mikrotiterplatten	MultiScreen ^R HTS Filter Plates (Millipore, Nr. MSIPN4550)
FACS-Röhrchen	12x75mm Rundboden RIA tube (Falcon, BD Nr. 2008)
Filterspitzen	10µl Rainin (Mettler Toledo, Nr. GP-L10F) 200µl Rainin (Mettler Toledo, Nr. GP-L200F) 1000µl Rainin (Mettler Toledo, Nr. GP-L1000F) 10µl (Sarstedt, Nr. 70.760.213) 200µl (Sarstedt, Nr. 70.760.211) 1000µl (Sarstedt, Nr. 70.762.211)
Kanülen	0,4x12mm (Braun, Nr. 4665406) 0,45x12mm (Braun) 0,6x30mm (Braun, Nr. 4657640))
MACS Säulen und Zubehör	MS Columns (Miltenyi Biotech, Nr. 130-042-201) LS Columns (Miltenyi Biotech, Nr. 130-042-401) Pre-Separation Filters (Miltenyi Biotech, Nr. 130-041-407)
Mikrotiterplatten	96 Well-Flachbodenplatten (Falcon, BD, Nr. 353072) 96 Well-Rundbodenplatten (Greiner Bio One, Nr. 650180)
PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran	Immobilon-FL (Millipore, Nr. IPFL00010)
Reaktionsgefäße	1,5ml (Sarstedt, Nr. 72.690) 2ml Safe Seal (Sarstedt, Nr. 72.695)
Reaktionsgefäße (PCR)	PP-PCR-Vessel, 0,2ml Thinwall (Greiner, Nr. 671281) PCR-Streifen 1x8 Gefäße 0,2ml (Greiner, Nr. 673210)

Röntgenfilme	Strip Caps für 8 Gefäße, Flachdeckel (Greiner, Nr. 373250) Fujifilm Super RX (FS Medical Imaging, Nr. 4741008379)
Skalpelle	Einmalskalpelle (Aesculap, Nr. 291322)
Sterilfilter	250ml Stericup Express plus 0,22µm (Millipore, Nr. SCGPU02RE) 500ml Stericup Express plus 0,22µm (Millipore, Nr. SCGPU05RE)
Spritzenfilter	Acrodisc Syringe Filters with GHP Membran, 13mm, 0,45µm (PALL, Nr. 4560) Spritzenvorsatzfilter 0,45µm (VWR, Nr. 514-0063) Syringe filter Millex GP PES 33mm 0.22µm (Millipore, Nr. 10268401)
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer <i>improved</i> , Kammertiefe 0,1mm (LO Laboroptik GmbH; Roth, Nr. PC72.1)
Zellkulturplatten	6-Well-Flachbodenplatten (Falcon, BD, Nr. 353046) 24-Well-Flachbodenplatten (Falcon, BD, Nr. 353047) 48-Well-Flachbodenplatten (Falcon, BD, Nr. 353078)
Zellkulturschalen	60/15mm (Falcon, BD, Nr. 353004) 100/20mm (Falcon, BD, Nr. 353003) 150/25mm (Falcon, BD, Nr. 353025)
Zellnylonsieb	40µm (Falcon, BD, Nr. 352340) 100µm (Falcon, BD, Nr. 352360)
Zentrifugenröhrchen	12ml Polyallomer (Sorvall, Nr. 03699) 15ml Spitzboden Polypropylen (Falcon, BD, Nr. 352096) 50ml Spitzboden Polypropylen (Falcon, BD, Nr. 353070) 13ml für BAC Aufreinigung, 95x16,8mm, PP (Sarstedt, Nr. 55.518) 36ml für ZU, PP (Sorvall, Nr. 03141) 250ml für Virusaufreinigung 500ml für Virusaufreinigung

2.3 Chemikalien und andere Reagenzien

Aceton	Applichem, Nr. A1582,2500PE
Acrylamid	Rotiphorese®Gel30, Roth, Nr. 3029.1
Agarose (Biozym LE)	Biozym, Nr. 840004
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Nr. 9592.2
Ampicillin	Roth, Nr. K029.1
Arabinose	Roth, Nr. 5118.2
Bacto Agar	BD, Nr. 214010
Bromphenolblau	Roth, Nr. A512.1
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA, Nr. K41-001-500 Sigma-Aldrich Chemie, Nr. A-7906

Caseinhydrolysat	Roth, AE41.1
CD8a (Ly-2) Micro-Beads	Miltenyi Biotech, Nr. 130-049-401
Chloramphenicol	Roth, Nr. 3886.2
[⁵¹ Cr]-Natrium-Chromat (Na ₂ [⁵¹ Cr]O ₄)	Perkin Elmer, Nr. NEZ030; 2mCi/0,ml
Cycloheximid	Sigma-Aldrich Chemie, Nr. C7698-1g
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, 4720.2
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Nr. 6908.3
DNA-Längenstandards	1kb DNA Ladder, NEB, Nr. N3232 100bp DNA Ladder, NEB, Nr. N3231 2-Log DNA Ladder, NEB, Nr. N3200
Dynabeads® Sheep anti-Mouse IgG	life technologies, NR. 11031
EGTA	Roth, Nr. 3054.1
Erythrozyten-Lysepuffer	Sigma-Aldrich Chemie, Nr. R7757
Essigsäure 100% (v/v)	Roth, Nr. 3738.5
Ethanol 100% (v/v)	Roth, Nr. 5054.2
Ethidiumbromid	Roth, Nr. 2218.1
Ethylendiamin-tetra-essigsäure	Roth, Nr. 8043.1
Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	
Glucose	Roth, Nr. X997.2
Glycin	Roth, Nr. 3908.3
Glycerin 86% (v/v)	Roth, Nr. 7533.3
Glycerin 100% (v/v)	Roth, Nr. 7530.1
Hepes	Gibco, Nr. 15630-112
Interferon-γ (IFN-γ)	R&D, Nr. 485-MI-100
Isopropanol	Roth, Nr. CP41.1
Kaliumchlorid	Roth, Nr. 6781.1
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Nr. 4873
Kanamycin	Roth, Nr. T832.2
Magnesiumchlorid	Roth, Nr. 2189.1
Magnesiumsulfat	Roth, Nr. P027.2
2-Mercaptoethanol (β-ME)	Roth, Nr. 4227.1
Methanol	Roth, Nr. 4627.2
Methylcellulose	VWR, Nr. 25499.182
Milchpulver	Roth, Nr. T145.3
Natriumacetat (NaAc)	Roth, Nr. 6779.1
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Nr. 3957.1
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Nr. 6771.2
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Nr. CN30.1
Paraffin	Vogel Histo-Comp, Nr. V0-5-1002
Paraformaldehyd (PAA)	Merck, Nr. 4005
Polyfect	Qiagen, Nr. 301107
Polyoxoethylensorbitan Monolaurat (Tween®20)	Sigma, Nr. P2287
Proteaseinhibitor	Roche, Nr. 1697498
Protein Standard	Thermo Scientific, Nr. 26616
Salzsäure (HCl) 25%	Merck, Nr. 1.00316.2500
Saccharose	Roth, Nr. 4621.1
Sephadex G-25 Fine	GE Healthcare, Nr. 17-0032-01
TEMED	Roth, Nr. 2367.3
Trifluoressigsäure	Merck, Nr. 1.08178.0050

Triton X-100 (Iso-octylphenoxy-polyethoxyethanol)	Roth, 3051.3
Trypsin	DIFCO Laboratories, Nr. 0152-1
Trypton	Oxoid, Nr. OM0129
Whatman-Paper	Scheicher & Schuell, Nr. 3030690
Xylol	Merck, Nr. 1.08685.2500
Yeast extract Servabacter	Serva, Nr. 24540

2.4 Kits

Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Solution Kit with BD GolgiPlug	BD, Nr. 555028
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Roche, Nr. 11858874001
HotStar HiFidelity Polymerase Kit	Qiagen, Nr. 202602
NucleoBond™ Xtra Midi	Macherey-Nagel, Nr. 740410.50
Nucleobond™ Kit PC 500	Macherey-Nagel, Nr. 740574.25
QuantiTect SYBR GreenI PCR Kit	Qiagen, Nr. 204143
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Nr. 28706
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen, Nr. 28104
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Nr. 27106
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Nr. 12163
Qiashredder	Qiagen, Nr. 79656
QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent, Nr. 200523

2.5 Bakterien

DH10B:

F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL nupG λ⁻ (Life Technologies)

GS1783:

DH10B λ cl857 (cro-bioA)⟨>araC-P_{BAD}I-Scel auf DY380 *E. coli* basierend, trägt zusätzlich im Genom die Sequenz der *Homingendonuklease I-Scel* (Arabinose induzierbar); Temperaturinduzierbare Red-Rekombinase (zur Übersicht: (Warming et al., 2005)

XL1-Blue:

endA1 supE44 thi-1 hsdR17 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr] (Agilent Technologies)

2.6 Viren

Soweit nicht anders angegeben wurden die Deletionsmutanten von M. Wagner hergestellt (Wagner et al., 2002) und uns freundlicherweise von U.H. Koszinowski, Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Mikrobiologie in München, zur Verfügung gestellt.

MW97.01 (mCMV-BAC-WT): Die chimäre mCMV-Rekombinante wurde überwiegend aus dem Genom des Laborstammes ATCC VR-1399 sowie einem Anteil (*Hind*III-E-Fragment) des mCMV-Laborstammes K181 generiert. Nach der Klonierung des chimären mCMV-Genoms in ein BAC und anschließender Transfektion in murine embryofetale Fibroblasten (MEF) konnte aus dem Überstand das rekonstituierte Virus MW97.01 isoliert werden (Wagner et al., 1999). MW97.01 zeigte *in vivo* keine Unterschiede in den biologischen Eigenschaften zu mCMV-WT.Smith (Wagner et al., 1999).

mCMV- Δ vRAP: Dieser Deletionsmutante fehlen die ORFs der Immunevasionsgene m04, m06 und m152.

mCMV- Δ m04: Dieser Deletionsmutante fehlt der ORF des m04 Genprodukts.

mCMV- Δ m06^w: Es fehlt der ORF des Immunevasionsgens m06.

mCMV- Δ m06^l: Es fehlt der ORF des Immunevasionsgens m06. (Fink et al., 2012).

mCMV- Δ m152: Es fehlen die Nukleotide 210.244 bis 211.379 (im ORF des Immunevasionsgens m152).

mCMV- Δ m04 Δ m06: Bei dieser Deletionsmutante fehlen die ORFs der Gene m04 und m06.

mCMV- Δ m04 Δ m152: Es fehlen die ORFs der Gene m04 und m152.

mCMV- Δ m06 Δ m152: Es fehlen die ORFs der Gene m06 und m152.

Rekombinantes mCMV, das in dieser Arbeit mittels BAC-Mutagenese generiert wurde:

mCMV-m152 Δ 3Glyc: Bei diesem Virus wurden die 3 N-Glykosylierungsstellen an den AS-Positionen 61, 208 und 241 durch Glutaminreste ersetzt.

In dieser Arbeit werden die Viren im Folgenden abgekürzt: mCMV-BAC.WT als WT, mCMV- Δ vRAP als Δ vRAP, usw.

2.7 mCMV-Peptide

Die in dieser Arbeit verwendeten MHC-Klasse-I-restringierten antigenen mCMV-Peptide wurden von der Firma JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin synthetisiert. Die HPLC-gereinigten Peptide wurden als Lyophilisate mit einer Reinheit von ~80% bezogen. Sie wurden zur Restimulation mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen und zur Beladung Antigen-präsentierender Zellen (APC) im ELISpot Assay eingesetzt. Die Lyophilisate wurden in 10µl DMSO gelöst (oder Acetonitril bei Cystein-haltigen Peptiden) und anschließend mit PBS auf die Konzentration von 10⁻³M oder 10⁻⁴M eingestellt.

ORF	Peptidsequenz	MHC-I-Restriktion	Referenz
M105	²⁰⁷ TYWPVVSDI ²¹⁵	K	Holtappels et al., 2008b
m123	¹⁶⁸ YPHFMPNTL ¹⁷⁶	L	Reddehase et al., 1989

Tabelle 2.1: Antigene Peptide des Haplotyps H-2d.

ORF	Peptidsequenz	MHC-I-Restriktion	Referenz
M45	⁹⁸⁵ HGIRNASFI ⁹⁹³	D	Munks et al., 2006a; b

Tabelle 2.2: Antigene Peptide des Haplotyps H-2b.

2.8 Vektoren

pBAD-*I-SceI*:

Prokaryotischer Expressionsvektor, Amp^{res}, Arabinose induzierbare Expression von *I-SceI* (Tischer et al., 2006)

pEPkan-S:

Universales Transferplasmid für das Einbringen des Kanamycingens mittels „en passant“ Mutagenese. Das Plasmid besitzt Restriktionsschnittstellen für *I-SceI*; Kan^{res} (Tischer et al., 2006)

pcDNA3.1/*myc*-His A+:

Expressionsplasmid für eukaryotische Zellen, Amp^{res}, Neo^{res} (Life Technologies)

2.9 Enzyme

Alle enzymatischen Reaktionen wurden nach den Angaben des jeweiligen Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt.

<i>Bam</i> HI	NEB, Nr. R0136 S
<i>Dpn</i> I	NEB, Nr. R0176S

<i>EcoRI</i>	NEB, Nr. R0101L
Endo H	NEB; Nr. P0702S
<i>HindIII</i>	NEB, Nr. R0104 S
<i>NheI</i>	NEB, Nr. R0131 S
PNGase F	NEB, Nr. P0704S
<i>PstI</i>	NEB, Nr. R0140 S
<i>SacI</i>	NEB, Nr. R0156 S
<i>SphI</i>	NEB, Nr. R0182 S
<i>XmaI</i>	NEB, Nr. R0180 S
T4DNA Ligase	NEB, Nr. M0202

2.10 Antikörper

Antikörper für den Western Blot

Antikörper	Klon	Spezies	Verdünnung	Quelle
α -IE1	Croma 101	Maus	1:7000	Prof. S. Jonjić; Rijeka
α -m152	M3D10	Ratte	1:250	Ziegler et al., 2000
α -m06	1516-3	Kaninchen	1:350	PSL, Heidelberg
α -m04	1718-1	Kaninchen	1:5000	PSL, Heidelberg
α -m164	Pep2_7	Kaninchen	1:500	Holtappels et al., 2006a
α -Kaninchen HRP	polyklonal	Schwein	1:10 000	DakoCytomation, Nr. P021702-2
α -Ratte HRP	polyklonal	Kaninchen	1:10 000	DakoCytomation, Nr. P045001-8

Antikörper für die Immunpräzipitation

Antikörper	Klon	Spezies	Verdünnung	Quelle
α -m152	152 01	Maus	1:100	Prof S. Jonjić; Rijeka

Antikörper für die Immunhistochemie

Antikörper	Klon	Spezies	Verdünnung	Quelle
α -IE1	Croma 101	Maus	1:250	Prof S. Jonjić; Rijeka
α -E1	Croma 103	Maus	1:250	Prof S. Jonjić; Rijeka
α -MCP	polyklonal	Kaninchen	1:2000	Wilhelmi et al., 2008
α -m152	M3D10	Ratte	1:200	Ziegler et al., 2000
α -m06	1516-3	Kaninchen	1:1000	PSL, Heidelberg

α -m04	1718-1	Kaninchen	1:1000	PSL, Heidelberg
α -CD3 ϵ	CL CD3-12	Maus, Mensch	1:300	Acris, No. SM1754P
α -mouse (Fab)-biotin	polyklonal	Ziege	1:200	Sigma, Nr. B0529
α -rat (Fab)-biotin	polyklonal	Ziege/Maus	1:100	BD Biosciences, Nr. 554014 / 553880
α -mouse alkaline phosphatase	polyklonal	Ziege	1:100	AbD Serotec, Nr. OBT 1172
Kaninchen Normalserum	polyklonal	Kaninchen	1:10	Invitrogen Life Technologies, Nr. 16120099
Ziegen Normalserum	polyklonal	Ziege	1:10	Invitrogen Life Technologies, Nr. 16210064
Pferde Normalserum	polyklonal	Pferd	1:10	Invitrogen Life Technologies, Nr. 16050130

Antikörper für die Zytofluorometrie

Antikörper	Klon	Spezies	Verdünnung	Quelle
α -m164	Pep2_7	Kaninchen	1:20	Holtappels et al., 2006a
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)		Ziege	1:1000	Invitrogen Life Technologies, Nr. A-11008
PE Mouse Anti-Mouse H-2K ^d	SF1-1.1	Maus	1:1000	BD, Nr. 553566
Anti-mouse Rae-1 (pan-specific)-APC	186107	Ratte	1:10	R&D Systems, Nr. FAB17582A

Antikörper für den ELISpot Assay

Antikörper	Klon	Spezies	Verdünnung	Quelle
α -mouse IFN γ	RMMG-1	Ratte	5 μ g/ml (Eli)	Biosource Europe, Nr. AMC4834
α -mouse IFN γ biotin-labeled	XMG1.2	Ratte	0.5mg/ml (Eli)	BD Pharmingen™, Nr. 18112D

Antikörper für Zell-Depletion oder Rezeptorblockade

Antikörper	Klon	Spezies	Verdünnung	Quelle
α -mouse asialo GM1	polyklonal	Kaninchen	20 μ l/Maus	WAKO Chemicals GmbH, Nr. 986-10001
α -mouse NKG2D	C7	Hamster	300 μ g/Maus	Prof. S. Jonjić; Rijeka

2.11 Oligonukleotide und Sonden

Die Oligonukleotide wurden als Lyophilisate (entsalzt) von den Firmen Metabion (Martinsried), Operon Biotechnologies (Köln) oder biomers (Ulm) bezogen. Eine Aufreinigung über HPLC erfolgte für sehr lange Oligonukleotide oder *TaqMan*-Sonden. Nach Lieferung wurden die Oligonukleotide in sterilem *A. bidest.* gelöst.

Die Positionsangaben für mCMV-Sequenzen erfolgen nach Rawlinson et al., 1996 (GenBank Accession No.: NC_004065). Die Sequenzen der *Primer* sind in 5´-3´ Orientierung angegeben. Basenaustausche im Vergleich zum Wildtyp sind in fett, die *Priming Region* des Vektors pEPkan-S ist kursiv dargestellt.

Primer zur gerichteten Mutagenese der putativen N-Glykosylierungsstellen in m152/gp40

m152_N_61_Q_rev:

^{211.116}CCAGCTCGCTCAC**CTGC**ATCCAAGGAAAATG^{211.146}

m152_N_61_Q_for:

^{211.146}CATTTTCCTTGGATG**CAGGTG**AGCGAGCTGG^{211.116}

m152_N_208_Q_rev:

^{210.671}CCGTTGCGGAGACTGAT**CTGGT**ACGCCAACGGAACC^{210.706}

m152_N_208_Q_for:

^{210.706}GGTTCCGTTGGCGTACC**CAGAT**CAGTCTCGCGAACGG^{210.671}

m152_N_241_Q_rev:

^{210.571}CGCGAAGTCGGTACTACC**CTGC**AGGTCTCTGAGATCGAGC^{210.610}

m152_N_241_Q_for:

^{210.610}GCTCGATCTCAGAGACCTG**CAGGGT**AGTACCGACTTCGCG^{210.571}

pEPkan-S_m152N61Q_rev:

^{211.094}ACGAAGAACGCACTCTCCTGCGCCAGCTCGCTCAC**CTGC**ATCCAAGGAAAATGT
TTCAC^{211.152}CAGGATGACGACGATAAGTAGGG

pEPkan-S_m152N61Q_for:

^{211.177}CTTTCGGATCGAAGCCTCCGGAGAGGTGAAACATTTTCCTTGGATG**CAGGTG**AG
CGAGCTGGCGCAG^{211.111}CAACCAATTAACCAATTCTGATTAG

m152_BAC_rev:

^{208.796}TAGACCGCCGACAATCAG^{208.813}

m152_BAC_for:

^{212.506}GCGAGTTCGTCTCGAAG^{212.490}

m152_BAC_Seq_rev:

^{210.232}GCACGAACATCACCACAC^{210.249}

m152_BAC_Seq_for:

^{211.378}AATGCTGGGCGCTATCAC^{211.361}

Primer für die TaqMan-Quantifizierung von BAC-Sequenzen

BAC_taq_for:

GTTCTGTCATGATGCCTGCAA

BAC_taq_rev:

AATCCGCTCCACTTCAACGT

Primer für die TaqMan-Quantifizierung von M55/gB

gB_Taq_for:

^{83.137}CTAGCTGTTTTAACGCGCGG^{83.156}

gB_Taq_rev:

^{83.227}GGTAAGGCGTGGACTAGCGAT^{83.207}

2.12 Medien und Medienzusätze für die Zellkultur

Die sterilen Zellkulturmedien wurden von der Firma Gibco-BRL (Invitrogen) bezogen und bei 4°C gelagert. Medienzusätze wurden bei Bedarf zugesetzt.

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*): Nr. 61965-062

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

MEM (*Minimal Essential Medium*): Nr. 41090-028

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

MEM 10x (*Minimal Essential Medium*): Nr. 21430-20

MEM Alpha (*Minimal Essential Medium*): Nr. 32561-029

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

β-Mercaptoethanol	5x10 ⁻⁵ M
HEPES	10mM
IL-2	optional; 1x10 ⁻⁵ U

RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*): Nr. 81870-010

FCS	10% (v/v)
Penicillin	100U/ml
Streptomycin	0,1mg/ml
β-Mercaptoethanol	5x10 ⁻⁵ M
HEPES	10mM

Fetales Kälberserum (FCS): Steriles und auf Mycoplasmen getestetes FCS der Firma PAA Laboratories (Nr. A15-151) diente als Zusatz für Zellkulturmedien. Die Lagerung des FCS erfolgte bei -20°C. Vor Gebrauch wurde es bei 4°C aufgetaut und anschließend für 30min bei 56°C im Wasserbad zur Komplement-Inaktivierung inkubiert. Das inaktivierte FCS wurde in Aliquots bei -20°C gelagert.

L-Glutamin: Die Stocklösung (200mM mit einer Endkonzentration von 29,2mg/ml in 0,85% (w/v) NaCl) wurde von Gibco-BRL bezogen (Nr. 25030-24). In Aliquots wurde es bei -20°C gelagert und mit einer Endkonzentration von 20nM dem Medium zugesetzt.

Methylzellulose: Methylzellulose wurde von VWR International bezogen (Nr. 25499.182) und zum Überschichten von infizierten Zellkulturen bei der Bestimmung von Virustitern verwendet. Dazu wurden 8,8g Methylzellulose in 360ml *A. bidest.* autoklaviert und bei 4°C über Nacht unter Rühren gelöst.

Vor dem Gebrauch wurden folgende Zusätze zugegeben:

MEM 10x	40ml
Penicillin	100U/ml
Streptomycin	0,1mg/ml
L-Glutamin	2mM
FCS	4% (v/v)
NaHCO ₃ (Stocklösung: 55g/l)	auf pH7,5

PBS-Puffer Dulbecco (*Phosphate Buffered Saline*): Nr. 14190

NaCl	140mM
KCl	2,7mM
Na ₂ PO ₄	6,5mM
KH ₂ PO ₄ , (pH 7,4)	1,5mM

Penicillin/Streptomycin: Als Antibiotika-Prophylaxe gegen grampositive und gramnegative Bakterien wurde Penicillin/Streptomycin in Kombination eingesetzt. Die Stocklösung (10 000U Penicillin und 10mg/ml Streptomycin in 0,9% (w/v) NaCl) wurde von Gibco-BRL bezogen (Nr. 15140-122). Die Stocklösung wurde in 5ml Aliquots bei -20°C gelagert und bei Bedarf dem Kulturmedium in einer Endkonzentration von 100U/ml Penicillin und 0,1mg/ml Streptomycin zugesetzt.

Rekombinantes Maus Interferon- γ (IFN- γ): Das Zytokin wurden von der Firma R&D bezogen. Es wurde in Aliquots bei -20°C aufbewahrt und in einer Konzentration von 0,2 μ g/10ml 48h vor Infektion zu den Zellen gegeben (Nr. 485-MI-100).

TÜRK's Lösung: Die Lösung dient zum Anfärben der Zellkerne mononukleärer Zellen bei gleichzeitiger Hämolyse der Erythrozyten durch die in der Lösung enthaltene Essigsäure. Sie wurde von der Firma Merck bezogen (Nr. 109277)

Trypanblau: Eine Gebrauchslösung dieses Vitalfarbstoffs (0,1% (w/v), in PBS) wurde zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen verwendet. Bezogen wurde es bei der Firma Biochrom (Nr. L6323).

Trypsin/EDTA: Die zum Ablösen von adhären Zellen verwendete Lösung der Firma Gibco-BRL (Nr. 15400-054) wurde 1:10 mit PBS verdünnt eingesetzt. Dies entspricht einer Endkonzentration von 0,5g/l Trypsin und 0,2g/l EDTA, pH 7,4-7,6).

2.13 Primäre Zellen und Zelllinien

COS-7-Zellen: Diese immortalisierte Fibroblasten-Zelllinie stammt aus dem Nierengewebe der grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*). Die Zellen wurden stabil mit einer Mutante des SV40-Virus transfiziert und produzieren das *large T-antigen*. Sie eignen sich sehr gut für Transfektionsexperimente, bei denen Fremd-DNA mittels Vektoren wie pcDNA3 (Invitrogen) in die Zellen eingebracht wird. Diese Vektoren werden während der Zellteilung der COS-7-Zellen über das *large T-antigen* repliziert und an die Tochterzellen weitergegeben. Hierdurch erhöht sich die Transfektionsrate der Zellen substantiell.

CTLL (Zytolytische T-Lymphozyten Linien): Zur Generierung mCMV-Peptid-spezifischer CTLL gegen die antigenen Peptide m123L^d, M105K^d oder M45D^b wurden Milzzellen von WT infizierten Mäusen im Memory-Stadium aufgearbeitet (siehe 3.6.1) und über MACS die CD8 T-Zellen isoliert. Diese wurden für 2-3 Wochen in IL-2 haltigem Medium kultiviert und mit synthetischen Peptiden in unterschiedlichen molaren Konzentrationen stimuliert (siehe 3.6.3)
Kulturmedium: MEM Alpha + 7,5% (v/v) FCS

EL4: (Nr. TIB-39TM, ATCC): Diese immortalisierte T-Zell Lymphom-Zelllinie wurde ursprünglich aus der C57BL/6 Maus isoliert und besitzt den MHC-Haplotyp H-2^b. Sie wurde als APC im Zytolysetest verwendet. Kulturmedium: DMEM + 10% (v/v) FCS

MEF (Murine Embryofetale Fibroblasten): Diese primären Zellen (siehe 3.1.3) wurden bis einschließlich der 3. Passage zur mCMV-Produktion und für Infektions-Studien verwendet. Die Permissivität dieser Zellen für mCMV ist hoch und die Plauebildung gut sichtbar. Auch zur Rekonstitution rekombinanter Viren nach Transfektion von mCMV-BAC-DNA wurden MEF verwendet. Kulturmedium: MEM + 10% (v/v) FCS

P815 (Nr. TIB-64TM, ATCC): Diese immortalisierte Mastozytom-Zelllinie wurde ursprünglich aus der DBA/2-Maus isoliert und besitzt den MHC-Haplotyp H-2^d. Die Zelllinie wurde zur Restimulation H-2^d-restringierter T-Zellen verwendet. Kulturmedium: RPMI + 5% (v/v) FCS

2.14 Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der klinisch-theoretischen Institute der Universitätsmedizin Mainz unter SPF (*specified pathogen free*) Bedingungen gezüchtet. Die Genehmigungsnummer der Bezirksregierung Rheinhessen-Pfalz für alle tierexperimentellen Arbeiten war 051-61. Für die Versuche wurden männliche und weibliche Tiere der folgenden Inzuchtstämme verwendet:

<u>Stamm</u>	<u>Haplotyp</u>	<u>MHC-Klasse-I-Moleküle</u>
BALB/cJ	H-2 ^d	K ^d , D ^d und L ^d
C57BL/6	H-2 ^b	K ^b und D ^b
C57BL/6-Tg(APCS- Ifng)5Imeg	H-2 ^b	K ^b und D ^b ; diese Tiere exprimieren IFN-γ konstitutiv unter der Kontrolle des Leber-spezifischen <i>Serum Amyloid P</i> (SAP) <i>component</i> Genpromotors (Toyonaga et al., 1994)

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

Zur Vermeidung von Kontaminationen mit Luftkeimen (Pilzsporen, Bakterien) wurden alle Zellkulturarbeiten an einer Steril-Werkbank unter Verwendung steriler Glas- und Plastikwaren ausgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in CO₂-Inkubatoren (37°C, 5% CO₂ (v/v)) in gesättigter Wasserdampfatmosfera (95% (v/v) relative Luftfeuchte). Bei diesen Bedingungen ist die Aufrechterhaltung des physiologischen pH-Wertes der CO₃²⁻/HCO₃⁻-gepufferten Medien sichergestellt.

3.1.1 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Material:

Einfriermedium	90% (v/v) FCS 10% (v/v) DMSO
----------------	---------------------------------

Die Langzeitlagerung von eukaryotischen Zellen (Kryokonservierung) erfolgt bei -196°C in flüssigem Stickstoff. Der Zusatz von DMSO verhindert auf Grund der hygroskopischen Eigenschaften des DMSO Zellschädigungen durch Eiskristallbildung während des Einfrierens.

Für die Kryokonservierung wurden Zellen in einer Konzentration von 1-5×10⁶/ml in 4°C kaltem Einfriermedium aufgenommen und in 1ml Aliquots in eisgekühlte Kryoröhrchen überführt. Anschließend erfolgte das langsame Einfrieren bei -70°C in einer isolierenden Umhüllung (Zellstoff). Nach 24h wurden die Aliquots in flüssigen Stickstoff überführt, wo sie über Jahre ohne Vitalitätsverlust gelagert werden können.

Für die Rekultivierung wurden die Zellen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und zur Entfernung des zytotoxischen DMSO mit 50ml Kulturmedium gewaschen (5min, 300xg), in frischem Medium resuspendiert und in die Kulturgefäße überführt.

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch Färbung mit Trypanblau oder TÜRK's Lösung. Der Vitalfarbstoff Trypanblau ermöglicht die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen in Zellsuspensionen, da tote Zellen von diesem Farbstoff sofort angefärbt werden, während die Zellmembranen lebender Zellen für wenige Minuten für den Farbstoff impermeabel sind.

Zur Bestimmung von Leukozytenzahlen in mit Erythrozyten verunreinigten Proben wurde eine Färbung mit TÜRK's Lösung durchgeführt. Dabei werden kernhaltige Zellen, zum Beispiel

Leukozyten, durch Methylviolett angefärbt, während die in der Färbelösung enthaltene Essigsäure die Erythrozyten lysiert.

Für die Ermittlung von Zellzahlen wurden die Zellen in geeigneter Verdünnung mit dem entsprechenden Farbstoff gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Nach dem Auszählen von vier Großquadraten wird die Zellzahl wie folgt bestimmt:

$$ZZ/ml = N/n \times V \times 10^4$$

ZZ: Zellzahl, N: Zahl der gezählten Zellen, n: Zahl der ausgezählten Großquadrate, V: Verdünnungsfaktor, 10^4 : Kammerfaktor

3.1.3 Anlage von Murinen Embryofetalen Fibroblasten

Material:

Trypsin/EDTA pH6,4:	1,25g Trypsin 3,4mM EDTA \times 2H ₂ O PBS ad 1000ml mit NaOH auf pH6,4 einstellen, steril filtrieren und bei 4°C lagern
Kulturmedium	MEM + 10% FCS + 100U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin
Einfriermedium	siehe 3.1.1

Die Präparation primärer Fibroblasten erfolgte aus 14-17 Tage alten murinen Embryonen über Auflösung der Gewebestruktur und anschließender Kultivierung der adhärenen Zellen. Für ein genaues Protokoll siehe Podlech et al., 2002. Die so gewonnenen Fibroblasten können im Anschluss weggefroren oder direkt weiterkultiviert werden. Um vergleichbare Bedingungen für Infektion und Infektionsverlauf zu gewährleisten, wurden MEF für alle Experimente nur bis zur 3. Passage verwendet.

3.1.4 Vorbehandlung von MEF mit IFN- γ

Zur Induktion der MHC-Klasse-I-Genexpression und der verstärkten Prozessierung antigener Peptide wurden MEF mit IFN- γ vorbehandelt. Dazu wurde 48h vor der Infektion IFN- γ mit einer Endkonzentration von 0,2 μ g/10ml auf die Zellen gegeben und diese dann bei 37°C weiter inkubiert.

3.1.5 Transfektion

PolyFect besteht aus Dendrimeren, welche durch ihre sphärische Struktur aus Polyamido-Aminpolymeren und positiver Ladung Plasmid-DNA binden können. Diese sehr kleinen Komplexe gelangen wahrscheinlich über Phagozytose in die Zellen. Dort wird aufgrund der Pufferwirkung der Dendrimere ihr Abbau in Endosomen verhindert und sie gelangen schließlich in den Zellkern.

3.1.5.1 Transfektion von MEF mit BAC-Plasmid-DNA

Material:

Medium	MEM MEM + 10% FCS + 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin
--------	--

PolyFect Transfection Reagent

Die Rekonstitution rekombinanter mCMVs erfolgte über Transfektion von isolierter BAC-DNA (siehe 3.4.10) mit Hilfe des PolyFect-Reagenz. Zu 70% konfluente MEF wurden mit definierten Volumina (2,5µl, 5µl, 10µl bzw. 15µl) gereinigter BAC-DNA transfiziert. Je Well einer 6 Well-Platte wurde das entsprechende Volumen BAC-DNA mit MEM ohne Zusätze auf 100µl Gesamtvolumen eingestellt, vorsichtig durch Invertieren gemischt und mit 10µl PolyFect-Reagenz versetzt. Die Bildung der DNA-Komplexe erfolgte während 10min Inkubation bei 20-22°C.

Die Zellen wurden mit 2ml PBS gewaschen und mit 1,5ml Kulturmedium überschichtet. Nach der Inkubation wurde der Transfektionsansatz mit 600µl Kulturmedium gemischt und auf die Zellen gegeben. Nach 6-8h Inkubation bei 37°C wurde der Transfektionsansatz von den Zellen genommen, diese mit 3ml frischem Kulturmedium überschichtet und bei 37°C inkubiert.

4-6 Tage nach erfolgreicher Transfektion treten die ersten Plaques auf, die Überstände wurden nach vollständiger Lyse des Zellrasens einzeln abgenommen und zur Entfernung von Zelltrümmern zentrifugiert (5min, 500×g, 4°C; Heraeus Labofuge 400R). Die Virusüberstände können zur Entfernung der BAC-Sequenz (siehe 3.2.4) weiter passagiert oder bei -70°C gelagert werden.

3.1.5.2 Transfektion von COS-7-Zellen mit Plasmid-DNA

Um Proteine zu überexprimieren wurden COS-7-Zellen mit Expressionsplasmiden, welche die Sequenz der zu untersuchenden Proteine enthalten, transfiziert. Dazu wurden 2×10^5 Zellen pro 10cm Kulturschale ausgesät und am darauffolgenden Tag wie in 3.1.5.1 beschrieben mit 4µg Plasmid-DNA transfiziert. 48h nach Transfektion wurden die Proteine extrahiert (siehe 3.5.2).

3.2 Virologische Methoden

3.2.1 mCMV Produktion

Material:

Medium	MEM + 10% FCS + 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin
Virus Standard Puffer (VSP)	50mM Tris 5mM EDTAx2H ₂ O 12mM KCl mit HCl auf pH7,8 einstellen, autoklavieren
15%-VSP-Saccharose	15% (w/v) Saccharose in VSP steril filtrieren, bei 4°C 2-3 Tage haltbar

Die Herstellung hochreiner mCMV-Stocks erfolgt aus infizierten MEF der 3. Passage nach dem von Podlech et al., 2002 beschriebenen Protokoll.

MEF wurden auf 40-50 Kulturschalen (Ø14,5cm) ausgesät, bei 37°C inkubiert bis sie konfluent waren und mit 1×10^5 pfu (*plaque forming units*; siehe 3.2.2) mCMV pro Schale infiziert. Nach 4-5 Tagen, wenn die Zellen maximal infiziert sind und sich ca. 80% der Zellen abgekugelt haben oder im Überstand befinden, wurde der Überstand abgenommen und noch adhärenente Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und die Virionen durch Zentrifugation pelletiert (3h, 28 000×g, 4°C; RC 5C Plus; Rotor SLA-1500). Nach einem weiteren Aufreinigungsschritt über ein 15%-iges VSP-Saccharose-Kissen (1h, 52 800×g, 4°C; Sorvall Combi Plus; Rotor AH-629) wurde das aufgereinigte Virus in 2-3ml 15%-iger VSP-Saccharose-Lösung aufgenommen, aliquotiert und bei -70°C gelagert.

3.2.2 mCMV-Titer Bestimmung

Die Zahl infektiöser Virionen in einer Suspension wurde mit dem Plaquetest bestimmt. Der mCMV-Virustiter wird als *plaque forming unit* (pfu) angegeben. Eine pfu ist nach Definition die Menge an Virus, die benötigt wird, um einen einzelnen Plaque in einem Monolayer permissiver Zellen zu erzeugen. Die Berechnung erfolgt über folgende Formel:

$$\text{Virustiter (pfu/ml)} = \text{Anzahl Plaques} \times V \times 10 \quad (V: \text{Verdünnungsfaktor})$$

3.2.2.1 Virustiter-Bestimmung aus Überständen

Material:

Kulturmedium	MEM + 10% FCS + 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin
Methylcellulose	siehe 2.12

MEF der 3. Passage wurden auf 48-Well Zellkulturplatten ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz mit je 100µl/Well einer \log_{10} Verdünnungsreihe der zu titrierenden Viruslösung infiziert. Damit die freigesetzten Virionen nicht frei diffundieren können, wurden die Zellen nach einstündiger Inkubation bei 37°C mit 500µl Methylcellulose überschichtet. 4 Tage nach Infektion wurden die entstandenen Plaques im Invertmikroskop gezählt und der Virustiter berechnet. Die Titer-Bestimmung erfolgte in Triplikaten und in zwei unabhängigen Wiederholungen. Für den genauen experimentellen Ablauf siehe Podlech et al., 2002.

3.2.2.2 Virustiter-Bestimmung aus Organhomogenaten

Material:

Metallsiebe	
Kulturmedium	siehe 3.2.2.1
Methylcellulose	siehe 2.12

Die Virustiter-Bestimmung erfolgt auf MEF der 3. Passage, die auf 48-Well Zellkulturplatten ausgesät worden waren. Pro Platte können 4 Organe als Duplikate titriert werden. Hierzu wurden die entnommene Organe (siehe 3.3.3) bei 37°C aufgetaut und über einem sterilen Metallsieb homogenisiert. Das Sieb wurde mit 2ml Medium gespült und eine \log_{10} Verdünnungsreihe mit 6 Verdünnungsstufen erstellt. Von diesen wurden 100µl je Well auf die zuvor mit PBS gewaschenen MEF gegeben und diese zentrifugal infiziert (siehe 3.2.3). Anschließend wurden die Zellen mit 500µl Methylcellulose überschichtet. Die Auswertung erfolgte nach 4 Tagen durch Auszählen der Plaques im Invertmikroskop und Berechnung des Organiters als pfu/Organ (siehe auch Podlech et al., 2002).

3.2.3 Zentrifugale Infektion von MEF

Material:

Kulturmedium	siehe 3.2.2.1
--------------	---------------

Durch Zentrifugation kann die Infektion permissiver Zellen mit mCMV – in Abhängigkeit von der g-Zahl um einen Faktor von ca. 20 verstärkt werden (Osborn & Walker, 1968; Hodgkin et al., 1988; Kurz et al., 1997; Podlech et al., 2002).

Für die zentrifugale Infektion wurden MEF der 2. oder 3. Passage in 6-, 24- oder 48-Well Zellkulturplatten oder Zellkulturschalen (\varnothing 10cm) ausgesät. Nach Zugabe der Viruslösung wurden die Zellen für 5min bei 760xg (Multifuge 3 S-R) zentrifugiert. Danach wurden die Platten um 180° gedreht und für weitere 25min bei 760xg zentrifugiert. Anschließend wurden die Platten mit Medium supplementiert oder mit Methylcellulose überschichtet.

Berechnung der benötigten Virusmenge für eine Infektion mit einer MOI von ~4:

Zellzahl \times 0,2pfu = benötigte pfu des Virusstocks.

3.2.4 Eliminierung von BAC-Sequenzen aus rekombinanten mCMV

Material:

Kulturmedium	siehe 3.2.2.1
Infektionslösung	1 μ l Virusüberstand + 999 μ l Kulturmedium
Methylcellulose	siehe 3.2.2.1

Nach der Rekonstitution von rekombinanten mCMV aus BAC-DNA (siehe 3.1.5.1) ist es wichtig, die im viralen Genom vorhandenen BAC-Vektor-Sequenzen zu entfernen. Diese können zu veränderten biologischen Eigenschaften der rekombinanten Viren im Vergleich zum Wildtyp führen (Wagner et al., 1999; Adler et al., 2001).

Im mCMV-BAC-Plasmid pSM3fr sind die BAC-Vektor-Sequenzen von homologen viralen Sequenzen flankiert und können über diese durch den eukaryotischen Rekombinations-Apparat mittels homologer Rekombination eliminiert werden. Daraus resultiert ein authentisches WT-mCMV-Genom frei von BAC-Vektor-Sequenzen (Wagner et al., 1999). Allerdings sind mehrere Zellkultur-Passagen (4-5) nötig, um eine weitestgehend BAC-DNA freie mCMV Population zu erhalten.

Das Passagieren der Virusüberstände erfolgte in 6-Well-Zellkulturplatten durch wiederholte Infektion von MEF mit den Überständen. Diese wurden durch Zentrifugation (5min, 500xg, 4°C; Heraeus Labofuge 400R; Rotor 8172) von Zelltrümmern befreit und sub-konfluente MEF mit jeweils 1 μ l Viruslösung in 999 μ l frischem Medium infiziert. Der restliche Überstand wurde als *Backup* bei -70°C gelagert.

Zur Infektion wurde das Kulturmedium der MEF abgesaugt, die Zellen mit 1ml Infektionslösung bedeckt und der Ansatz für ca. 30min bei 20-22°C unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 2ml Medium überschichtet und für 4-5 Tage bei 37°C inkubiert, bis der Zellrasen zu etwa 80% durchlysiert war. Dies wurde für 5 Passagen wiederholt.

Das Inokulum der 5. Passage wurde mit 2ml Methylcellulose-Medium überschichtet, um nach 3-5 Tagen einzelne Virus-Plaques isolieren zu können. Einzeln lokalisierte Plaques wurden von der Unterseite der Kulturplatte markiert, dann wurden aus dem markierten Bereich mit

sterilen, abgeschnittenen 100µl Pipettenspitzen ein wenig Zellen und Überstand gepickt und in 1ml Medium resuspendiert. Die weitere Infektion erfolgte wie oben beschrieben. Nach Lyse der Zellen wurde der Überstand abgenommen und auf 3 Reaktionsgefäße aufgeteilt. Eins dieser Aliquots dient zur Isolation viraler DNA (siehe 3.4.11), die anderen wurden als *Backup* bei -70°C gelagert.

Zur Überprüfung rekombinanter mCMVs auf eventuell noch verbleibende BAC-Sequenzen wurden diese mit Hilfe einer quantitativen *real-time* PCR (qPCR; siehe 3.4.14) mit BAC-spezifischen Oligonukleotiden nachgewiesen. Gleichzeitig wurde die Zahl der Virusgenome mit einer *M55/gB* spezifischen qPCR bestimmt. Wenn weniger als 10^2 BAC-Sequenzen pro 10^6 Virusgenome nachweisbar waren, wurde der jeweilige Virus-Stock als BAC-frei definiert.

3.3 Tierexperimentelle Methoden

3.3.1 Immunsuppression

Zur Untersuchung der *in vivo* Replikation rekombinanter mCMV wurden 8-10 Wochen alte weibliche BALB/c Mäuse in einer Kleintierbestrahlungsanlage (OB58-BA, mit zwei [^{137}Cs]-Strahlungsquellen) mit einer Dosis von 7Gy bestrahlt. Die Dosis musste monatlich entsprechend der Halbwertszeit von [^{137}Cs] ($T_{1/2}=30\text{a}$) und der Aktivität zum Zeitpunkt T_0 ($A_0=0,708\text{ Gy/min}$) mit Hilfe des Zerfallsgesetzes ($A(t) = A_0 e^{-\lambda t}$) neu berechnet werden. Die γ -Bestrahlung führt zu Aplasie des Knochenmarks durch Auslöschung hämatopoietischer Stamm- und Progenitorzellen (Mutter et al., 1988). Anschließend wurden die Tiere intraplantar (i.pl.) mit mCMV infiziert (siehe 3.3.3).

3.3.2 Depletion der natürlichen Killerzellen und Blockade des NKG2D-Rezeptors

Um natürliche Killerzellen (NK) zu depletieren wurden Mäusen 20µl α -asialo GM1 in 500µl PBS/Tier i.v. verabreicht. Zur Blockierung des NKG2D-Rezeptors wurden 300µg des antagonistischen Antikörpers in 500µl PBS/Tier verabreicht. 24h nach der Depletion wurden die Mäuse i.v. mit mCMV infiziert (siehe 3.3.3), bei Blockade des NKG2D-Rezeptors erfolgte die Infektion bereits nach 6h.

3.3.3 Infektion der Maus mit mCMV

Für die intraplantare Infektion wurde das Virus auf eine Konzentration von 1×10^5 pfu in 25µl PBS/Tier verdünnt. Das Virus wurde stets auf Eis gehalten und den Mäusen mit einer 1ml Spritze und Kanülen (0,4×19mm) intraplantar in die rechte Hinterpfote injiziert.

Immunsupprimierte Tiere zeigen nach etwa 7 Tagen eine deutliche Hämorrhagie und lokale Schwellung an der Hinterpfote. Dagegen ist bei immunkompetenten Tieren die Schwellung deutlich geringer oder kaum feststellbar.

Für die intravenöse Infektion wurden pro Tier 2×10^5 pfu mCMV in 500 μ l PBS verdünnt und in die Schwanzvene injiziert.

3.3.4 Organentnahme und Probenkonservierung

Nach Tötung der Tiere mit CO₂ wurden Milz, Lunge, Speicheldrüse und Leber entnommen und je nach Bedarf weiter behandelt.

Organtiterbestimmung: Lagerung in Medium bei -70°C, siehe 3.2.2.2

Histologische Schnitte: Inkubation in Formalin über Nacht, Weiterverarbeitung siehe 3.7.1

Aufarbeitung von CD8 T-Zellen: Aufnahme in Medium und sofortige Weiterverarbeitung siehe 3.6.2.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Umgang mit Bakterien

Um Kontaminationen mit anderen Bakterien oder Pilzen zu vermeiden, wurde bei der Arbeit mit Bakterien auf eine sterile Handhabung geachtet. Alle Medien und Lösungen wurden autoklaviert, nicht autoklavierbare Lösungen steril filtriert. Folgende Antibiotika kamen in dieser Arbeit zum Einsatz:

Antibiotikum	gelöst in	C _{Stock}	Verdünnung	C _{End}
Ampicillin (Amp)	H ₂ O	100mg/ml	1:1.000	100 μ g/ml
Chloramphenicol (Cam)	100% EtOH	34mg/ml	1:2.000	17 μ g/ml
Kanamycin (Kan)	H ₂ O	10mg/ml	1:400	25 μ g/ml

Die Stammlösungen wurden steril filtriert und bei -20°C gelagert. Die Zugabe erfolgte erst nach dem Autoklavieren des Mediums.

3.4.2 Anzucht von Flüssigkulturen

Material:

LB-Medium

10g NaCl
10g Bacto-Trypton
5g Hefeextrakt
ad 1l H₂O

mit NaOH auf pH7,5 einstellen, autoklavieren

3.4.6 Transformation elektrokompetenter Bakterien

Für die Elektroporation von elektrokompetenten Bakterien wurden die Bakterien auf Eis aufgetaut und die zu transformierende DNA (100-500ng) zu einem Aliquot der Bakterien gegeben. Nach 1min auf Eis wurden die Bakterien in eine vorgekühlte Elektroporations-Küvette überführt und mit 2,5kV, 400Ω und 25μF perforiert (Gene Pulser, BIO-RAD, München). Nach Zugabe von 1000μl LB-Medium wurden die Bakterien 45-60min bei geeigneter Temperatur unter Schütteln inkubiert und auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotika-Zusatz ausgestrichen.

3.4.7 Plasmid-Minipräparation

Hochreine DNA Plasmid-Isolierungen im kleinen Maßstab wurden mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit ausgeführt. Dazu wurde eine 5ml-Flüssigkultur angelegt (siehe 3.4.2) und die DNA am nächsten Tag aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben: <http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=369>

3.4.8 Plasmid-Midipräparation

Diese Methode wurde verwendet, wenn DNA in besonders reiner Form und hoher Menge, zum Beispiel für Transformationen oder Klonierungen benötigt wurde. Hierfür wurde eine 100ml-Flüssigkultur angelegt (siehe 3.4.2) und die DNA am nächsten Tag aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte mit dem NucleoBond™ Xtra Midi Kit gemäß den Herstellerangaben: http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/UM_pDNA_NuBoXtra.pdf

3.4.9 Schnellpräparation von BAC-DNA (BAC-Minipräparation)

Material:

Lösung 1	25mM Tris 10mM Na ₂ EDTAx2H ₂ O ad 1l H ₂ O mit HCl auf pH8 einstellen, autoklavieren 100mg RNase bei 4°C lagern
Lösung 2	200mM NaOH 20% (v/v) SDS ad 1l H ₂ O autoklavieren, bei 20-22°C lagern
Lösung 3	3M KAc ad 1l H ₂ O mit Eisessig auf pH5,5 einstellen, autoklavieren bei 4°C lagern

Da die mCMV-BAC-DNA eine Größe von ca. 238kbp besitzt, müssen bei der Isolierung von BAC-DNA jegliche Scherkräfte vermieden werden. Daher wurden zum Pipettieren von BAC-

DNA die Pipettenspitzen abgeschnitten und die DNA nur durch vorsichtiges Invertieren gemischt.

Für den Ansatz einer ü.N.-Kultur wurden 10ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft (siehe 3.4.2) und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Von der ü.N.-Kultur wurden 750µl Bakteriensuspension zur Anlage eines Glycerinstocks (siehe 3.4.4) entnommen und der Rest durch Zentrifugation mit 3500U/min (Heraeus Labofuge 400R, Rotor 8172) für 5min bei 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in 200µl Lösung 1 resuspendiert und in ein 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur alkalischen Lyse wurden 300µl Lösung 2 zugegeben, der Ansatz vorsichtig durch Invertieren gemischt und anschließend für 5min bei 20-22°C inkubiert. Durch Zugabe von 300µl Lösung 3 und anschließender Inkubation auf Eis für 5-10min wurden SDS, chromosomale DNA und Proteinbestandteile ausgefällt. Nach Zentrifugation mit 20800xg (centrifuge 5417R Eppendorf, Hamburg) für 10min bei 4°C wurde der Überstand mit 600µl Isopropanol (20-22°C) versetzt, suspendiert und erneut für 15min zentrifugiert. Das DNA-Präzipitat wurde mit 1ml eiskaltem 70%-igem (v/v) Ethanol gewaschen (10min, 20800xg), luftgetrocknet, in 100µl 10mM Tris/HCl (pH 8,5) + RNase (0,1mg/ml) aufgenommen und zum besseren Lösen der DNA für 10min bei 37°C inkubiert. Die Lagerung der BAC-DNA erfolgte bei 4°C.

3.4.10 Isolierung von BAC-DNA mit *Nucleobond* PC 500 (BAC-Maxipräparation)

Für die Isolierung größerer Mengen reiner BAC-DNA wurde der Nucleobond Kit PC 500 (Nr. 740574.25, Macherey&Nagel) verwendet. Dazu wurden 500ml LB-Medium 1:500 mit einer frischen Bakterien-Vorkultur angeimpft und unter Schütteln bei entsprechender Temperatur für 18-20h inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation mit 6300U/min (Sorvall RC5C Plus, Rotor: SLA-1500) für 10min bei 4°C pelletiert und die BAC-DNA nach Angaben des Herstellers aufgereinigt: http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/UM_pDNA_NuBo.pdf.

Die Klärung des bakteriellen Lysates erfolgte durch Filtration über einen angefeuchteten Faltenfilter. Nach der DNA-Fällung durch Isopropanol wurde das Präzipitat in 100-200µl 10mM Tris/HCl (pH 8,5) + RNase (0,1mg/ml) aufgenommen und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

3.4.11 Isolierung von viraler DNA

Um virale DNA aus Zellkulturüberstand oder direkt aus aufgereinigten Virionen zu gewinnen, wurde der High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Nr. 11858874001, Roche) verwendet. Nach der Virus-Lyse in Gegenwart von ProteinaseK erfolgte die reversible Bindung der DNA, in Gegenwart von schützender Poly(A)+ Carrier-RNA, an eine Glasfaser-Membran. Nach Reinigung der Nukleinsäuren von Salzen, Proteinen und anderen Kontaminanten durch einen

Waschschritt konnte die gereinigte DNA von der Membran eluiert werden. Die so isolierte virale DNA diente als *Template*-DNA für die PCR zur BAC-Mutagenese und Überprüfung der Exzision von BAC-Sequenzen nach *in vitro*-Passagierung der mittels BAC-Technologie hergestellten rekombinanten Viren (siehe 3.2.4). Die Isolierung der viralen DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers:

http://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS/napi_man/pdf/chapter%202/page%2082-86.pdf.

3.4.12 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von DNA-Lösungen erfolgte standardmäßig spektrometrisch durch Messung der Extinktion bei 260nm im Nanodrop. Das minimal messbare Volumen beträgt 1µl Lösung. Bei hohen DNA-Konzentrationen wurden die Lösungen in TE-Puffer oder 10mM Tris (pH 8,0) verdünnt. Diese gepufferten Systeme sind Wasser vorzuziehen, da das Absorptionsverhalten von Nukleinsäuren in nichtgepufferten Lösungen stark variieren kann (Wilfinger et al., 1997).

Der Konzentrationsberechnung wurde folgender Wert zugrunde gelegt:

$\text{Extinktion}_{260\text{nm}} = 1 \triangleq 50\mu\text{g/ml}$ bei dsDNA

Die Reinheit einer DNA-Probe von Proteinverunreinigungen lässt sich über den Extinktionsquotient der Extinktionen E_{260}/E_{280} bestimmen. Der Quotient gibt dabei das Verhältnis zwischen Nukleinsäure und Protein an. Proteinfreie DNA-Lösungen weisen ein Verhältnis von 1,8 bis 2,0 auf, für RNA sollte der Quotient über 2,0 liegen (Sambrook & Russel, 2001).

3.4.13 Polymerase Kettenreaktion

Material:

HotStar HiFidelity DNA Polymerase

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde 1987 von Mullis & Faloona erstmals beschrieben und von Saiki et al. optimiert (1988). Mit dieser Methode können DNA-Abschnitte selektiv amplifiziert werden. Dabei definieren sequenzspezifische Oligonukleotide (*Primer*) die Enden des zu vervielfältigenden DNA-Abschnitts. Bei der Auswahl der *Primer*-Sequenzen ist auf ausreichende Sequenzspezifität (Länge von 16-20 Nukleotiden) und auf bestmögliche Hybridisierung am 3'-Ende durch ein Guanosin oder Cytosin zu achten. Des Weiteren sollten zueinander komplementäre Sequenzen innerhalb der Oligonukleotide vermieden werden, da diese zur Ausbildung von Sekundärstrukturen führen können und das *Annealing* negativ beeinflussen. Die Amplifikation wird von den *Primern* ausgehend durch eine hitzestabile DNA-abhängige DNA-Polymerase z.B. Taq-Polymerase katalysiert. Ein PCR-Zyklus beginnt mit der

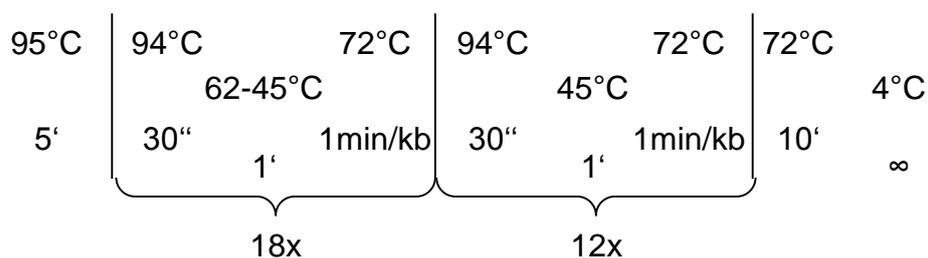
Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges bei 94-95°C. Durch Reduzierung der Temperatur kommt es zur Hybridisierung der Oligonukleotide an die DNA-Einzelstränge (*Annealing*). Anschließend erfolgt bei 72°C die Neusynthese der DNA-Doppelstränge durch die DNA-Polymerase (*Extension*). Durch Wiederholung der Schritte erfolgt eine exponentielle Synthese der spezifischen DNA-Abschnitte, so dass die Anzahl der resultierenden DNA-Doppelstränge theoretisch nach n Zyklen 2^n betragen würde. Limitierende Faktoren der Amplifikation sind die Menge an *Primern*, Nukleotiden und die Enzymaktivität.

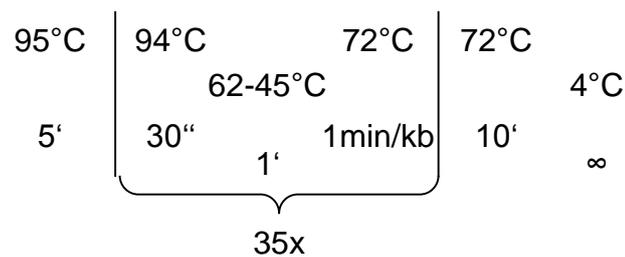
Durch die Touchdown-PCR kann die Amplifizierung unspezifischer DNA-Sequenzen erheblich reduziert werden. Dabei wird im ersten Syntheszyklus die Annealing-Temperatur so gewählt, dass sie geringfügig über der Schmelztemperatur der *Primer* liegt. Unter diesen Bedingungen bindet der *Primer* nur dann an die *Template*-DNA wenn er optimal passt. So entstehen praktisch keine Nebenprodukte aus unspezifischen Bindungen. In den darauffolgenden Syntheszyklen wird die Temperatur schrittweise gesenkt. Die *Primer* binden nun zwar unspezifischer, es sind jedoch bereits mehr spezifische *Template*-Moleküle im Ansatz vorhanden.

HiFidelity PCR Ansatz

<u>Komponente</u>	<u>Volumen/Reaktion</u>	<u>Endkonzentration</u>
10x Puffer	5µl	1x
<i>Primer</i> for [10pmol/µl]	1,5µl	0,3µM
<i>Primer</i> rev [10pmol/µl]	1,5µl	0,3µM
HiFidelity DNA Polymerase	1µl	2,5U
<i>Template</i> DNA	variabel	10ng
dH ₂ O	ad 50µl	

HiFidelity Touchdown PCR Profil



HiFidelity PCR Profil**3.4.14 Quantitative *real-time* PCR (qPCR)**

Nach einer konventionellen PCR können die Amplifikate mittels Gelelektrophorese überprüft und eine ungefähre Mengenabschätzung gemacht werden. Es ist jedoch nicht möglich, Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge des DNA-*Templates* zu ziehen, da die Amplifikation nach einer bestimmten Anzahl an Zyklen eine Plateauphase erreicht.

Bei der qPCR hingegen wird jeder Zyklus der PCR verfolgt. Insbesondere kann die exponentielle Phase detektiert werden, die sich durch eine exakte Verdopplung (Reaktionseffizienz 100%) der Amplikons auszeichnet. Die Detektion erfolgt entweder nicht-sequenzspezifisch mit dsDNA bindenden Fluorochromen (z.B. SYBR Green,) oder sequenzspezifisch mit Fluorochrom-gekoppelten Sonden (z.B. TaqMan Sonden). Durch die Proportionalität von Fluoreszenzsignal und Kopienzahl des Zielmoleküls kann direkt eine Mengenbestimmung der zu untersuchenden Probe durchgeführt werden, wenn ein definierter Standard mitgeführt wird (siehe 3.4.15).

Die Auswahl der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten sequenzspezifischen Oligonukleotide (siehe 2.11) erfolgte mit Hilfe des Programms Primer-Express Version 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3.4.15 Plasmid-Standards zur absoluten Quantifizierung

Für die absolute Quantifizierung wurden Plasmid-Standards mit definierter Teilchenanzahl benutzt. Um zu überprüfen, ob neu generierte mCMV frei von BAC-Sequenzen waren, wurde das Plasmid pDrive_gB_PTHrP_BAC (Lemmermann et al., 2010b) verwendet. Das Verhältnis zwischen BAC-Vektorsequenz und *M55/gB* wurde mit den spezifischen Oligonukleotiden und Sonden (siehe 2.11) bestimmt.

3.4.16 TaqMan PCR

Material:

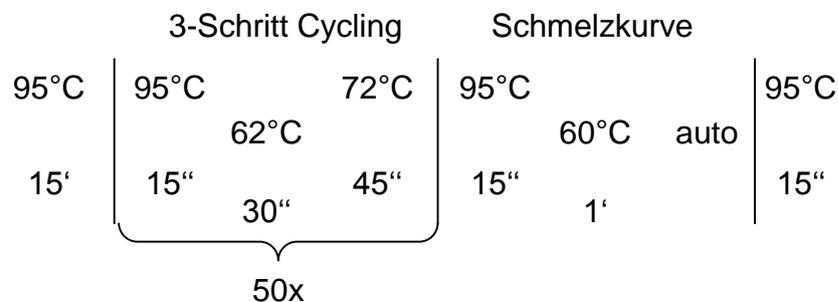
QuantiTect SYBR Green I PCR Kit

Für den Nachweis der Eliminierung der BAC-Sequenzen in neu generierten mCMV wurde die absolute Quantifizierung von *M55/gB* oder BAC mit SYBR Green durchgeführt. Während der DNA-Synthese bindet es an doppelsträngige DNA und emittiert dabei ein fluoreszierendes Signal mit einem Emissionsmaximum bei 521nm, das direkt gemessen werden kann. Da SYBR Green unspezifisch an jede synthetisierte dsDNA bindet, ist für die genaue Quantifizierung mit SYBR Green die Erstellung einer Schmelzkurve am Ende jeder PCR obligat. Durch die Temperaturerhöhung von 60 auf 95°C werden dsDNA-Moleküle langsam denaturiert und interkalierende Farbstoffe freigesetzt. Dies wird gemessen, wobei unspezifische Produkte und *Primer*-Dimere durch ihre abweichende Schmelztemperatur von den zu untersuchenden Amplifikaten unterschieden werden können. Um Kontaminationen auszuschließen wurde der Mastermix mit Puffer, *Primern* und Wasser unter einem *Template Tamer* angesetzt und anschließend auf die PCR-Gefäße aufgeteilt. Die *Template* DNA, hier entweder aufgereinigte virale DNA (siehe 3.4.11) oder der Plasmid-Standard wurde jeweils in einem anderem Raum dazu gegeben.

TaqMan7500 PCR Ansatz

<u>Komponente</u>	<u>Volumen/Reaktion</u>	<u>Endkonzentration</u>
2xQuantiTect SYBR Green	10µl	1x
PCR Master Mix		
<i>Primer</i> for [10µM]	1,5µl	0,75µM
<i>Primer</i> rev [10µM]	1,5µl	0,75µM
<i>Template</i> DNA	2-4µl	100ng
dH ₂ O	ad 20µl	

TaqMan7500 PCR Profil



3.4.17 Enzymatische Restriktion von Nukleinsäuren

Für analytische Zwecke wurden 500ng Plasmid-DNA in 20µl Ansätzen mit Restriktionsenzymen verdaut. Standardmäßig wurde eine Enzymmenge von 1U je Ansatz in einem für die Aktivität des Enzyms geeigneten Puffer eingesetzt und für 1h bei enzyspezifischer Temperatur inkubiert. Mehrfachrestriktionen können bei übereinstimmenden Reaktionsbedingungen in einem Ansatz durchgeführt werden.

Präparative DNA Restriktionen, bei denen größere Mengen an DNA verdaut wurden (10µg in 100µl), wurden für 3h inkubiert. Über eine Auftrennung der DNA im Agarose-Mini-Gel (siehe 3.4.18) kann der Erfolg der Restriktion kontrolliert werden.

Nach der Restriktion erfolgte vor der Weiterverwendung der DNA immer eine Aufreinigung entweder über ein präparatives Gel (siehe 3.4.18) und Gel-Elution (siehe 3.4.19) oder über Säulenaufreinigung (siehe 3.4.20).

3.4.18 Native Gelelektrophorese von DNA

Material:

50xTAE-Puffer	400mM Tris 50mM EDTAx2H ₂ O ad 5l 2H ₂ O mit Eisessig auf pH8,0 einstellen, autoklavieren
10xTBE-Puffer	450mM Tris 10mM EDTAx2H ₂ O 450mM Borsäure mit Eisessig auf pH8,3 einstellen, autoklavieren

Gebrauchslösung: 1xTAE-Puffer bzw. 1xTBE-Puffer

Mit Hilfe der nativen Gelelektrophorese wurden Größenabschätzungen von DNA-Fragmenten, Konzentrationsbestimmungen, Reinigung von linearen DNA-Fragmenten, Intaktheitsüberprüfungen und präparative Auftrennungen von Nukleinsäuren durchgeführt. Standardmäßig erfolgte die Auftrennung der DNA-Moleküle in 1%-igen Agarose-Gelen. Für bestimmte Fragestellungen wurden die Agarose-Konzentrationen variiert; so wurden restringierte BAC-Plasmide mit Fragment-Größen zwischen 1-30kbp in 0,7%-igen und DNA-Fragmente <1kbp in 2%-igen Agarose-Gelen, aufgetrennt. In der Regel wurden so genannte Maxi-Gele (20x20 bzw. 20x10cm) oder Mini-Gele (10x6,5cm) verwendet. Die Mini-Gele wurden in erster Linie zur schnellen Kontrolle der DNA nach Restriktionen oder PCR eingesetzt. Die Auftrennung der DNA erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern in 1xTAE. Linearisierte BAC-DNA wurde immer in speziellen Maxi-Gelen (20x25cm) über Nacht im Kühlraum (4°C) mit 1xTBE (höhere Pufferkapazität im Vergleich zu TAE) als Laufpuffer aufgetrennt (Gelherstellung siehe Gassen & Schimpf, 1999). Die angelegte Spannung (0,5-5 V/cm Elektrodenabstand) richtet sich nach Fragment- bzw. Gel-Größe. Um die DNA-Banden

beurteilen zu können, wurde dem Gel Ethidiumbromid (Endkonzentration: 1 µg/ml) hinzugefügt. Ethidiumbromid ist ein DNA-interkalierendes Fluorophor, welches nach Anregung mit UV-Licht die DNA sichtbar macht. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer CCD-Kamera.

3.4.19 Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Die Elution von DNA aus Agarose-Gelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction-Kits. Mit diesem ist eine Extraktion und Reinigung von bis zu 10 µg DNA-Fragmenten mit einer Größe von 70bp-10kbp ohne Phenolextraktion und anschließender Ethanol-Präzipitation möglich. Das Prinzip der Methode beruht auf einer quantitativen Adsorption von DNA-Molekülen an eine Silica-Gel-Membran unter Hochsalz-Bedingungen. Die anschließende Elution der DNA erfolgt bei Niedrigsalz-Bedingungen mit 10mM TrisHCl (pH 8,5). Alle Verunreinigungen wie z.B. Agarose, Proteine, Salze und Ethidiumbromid werden während der Waschschritte entfernt und die DNA im Anschluss eluiert. Diese kann dann direkt in nachfolgende Anwendungen (z.B. Ligation, PCR, Sequenzierung, etc.) eingesetzt werden. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben:

<http://www.qiagen.com/products/dnacleanup/gelpcrsicleanupsystems/qiaquickgelextractionkit.aspx#Tabs=t2>

3.4.20 Reinigung von DNA

Zur schnellen Aufreinigung von DNA, z.B. nach Restriktion oder zum Umpuffern, wurde der Qiaquick PCR Purification Kit verwendet. In Gegenwart von Guanidin-Thiocyanat bindet DNA selektiv an spezielle Glasfilter. Das folgende Waschen entfernt Oligonukleotide, Proteine und Salze aus dem Ansatz. Unter Niedrigsalzbedingungen erfolgt im Anschluss die Elution der DNA. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerangaben:

<http://www.qiagen.com/products/dnacleanup/gelpcrsicleanupsystems/qiaquickpcrpurificationqia.aspx?rp=1000254&rpg=0#Tabs=t2>.

3.4.21 Ligation von DNA-Fragmenten

Für Subklonierungen von DNA-Fragmenten ist es notwendig, freie DNA-Enden wieder zu verbinden. Die Reaktion der Ausbildung einer Phospho-di-Ester-Bindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-Hydroxylgruppe einer dsDNA wird unter ATP-Verbrauch von der T4 DNA Ligase katalysiert.

Die benötigte DNA-Menge für die Ligation ist direkt vom Größenverhältnis zwischen Vektor und Insert abhängig, so dass sich die benötigten DNA-Mengen über folgende Formel errechnen lassen:

$$\text{Masse}_{\text{Insert}}[\text{ng}] = \frac{n \times \text{Masse}_{\text{Vektor}}[\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Insert}}[\text{bp}]}{\text{Länge}_{\text{Vektor}}[\text{bp}]}$$

n = Verhältnis Insert zu Vektor

Für einen Ligationsansatz wurden 50ng linearisierte Vektor-DNA in einem Verhältnis von 1:5 zur Insert-DNA eingesetzt.

Ligationsansatz:

<u>Komponente</u>	<u>Volumen/Reaktion</u>	<u>Endkonzentration</u>
Vektor-DNA	x μ l	50ng
Insert-DNA	y μ l	variabel
10x T4 DNA Ligase Puffer	2 μ l	1x
T4 DNA Ligase	0,2-0,4 μ l	1-2U
dH ₂ O	ad 20 μ l	

Die Ansätze wurden für 2h bei 22°C inkubiert und anschließend in kompetente Bakterien transformiert (siehe 3.4.6).

3.4.22 Mutagenese

3.4.22.1 Site Directed Mutagenesis

Material:

QuikChange II Site-Directed
Mutagenesis Kit

Mit dem QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit können sehr schnell und effizient Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen in einem DNA-Plasmid eingefügt werden. Das Ausgangsplasmid mit der zu mutierenden Sequenz wird mit zwei zueinander komplementären *Primern*, welche die gewünschte Mutation tragen und einer *Pfu* Ultra high-fidelity DNA-Polymerase wie in einer Standard-PCR vervielfacht. Nach der finalen Synthese der DNA-Doppelstränge wird die methylierte Ausgangs-DNA durch *DpnI* abgebaut und mit der mutierten DNA chemokompetente XL1-Blue transformiert, in denen der *Nick* des Plasmids geschlossen wird. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerangaben: <http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/200523.pdf>

Für die Reaktion wurden folgende Komponenten gemischt:

10x Reaktionspuffer	5 μ l
Ausgangs-DNA	25ng
<i>Primer for</i>	125ng
<i>Primer rev</i>	125ng
dNTPs	1 μ l
QuikSolution	1,5 μ l
dH ₂ O	ad 49 μ l
QuikChange Enzym	1 μ l

3.4.22.2 Mutagenese mittels Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren im *E. coli* Stamm DH10B zur Herstellung rekombinanter mCMV mittels BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*)-Technologie

Die Zwei-Schritt-Rekombinationsmutagenese in *E. coli* wurde in Anlehnung an die Verfahren von O'Connor et al. (1989), Messerle et al. (1997), Borst et al. (1999; 2004a; b) sowie Wagner et al. (1999) durchgeführt. Für eine detaillierte Darstellung siehe Abb. 3.1.

Die mCMV-sequenzspezifischen Manipulationen wurden in *high-copy* Vektoren durchgeführt. In einem abschließenden Klonierungsschritt wurde das manipulierte Fragment in das *low-copy Shuttle*-Plasmid pST76K_SR (Pósfai et al., 1997; Hobom et al., 2000; Borst et al., 2004b) kloniert. Für eine effektive und spezifische homologe Rekombination ist es notwendig, dass die einzubringenden Sequenzen von gleich langen Sequenzen (1,5-3kbp beidseitig) (Smith, 1988) flankiert werden, die homolog zum Integrationsort sind.

Cotransformation des Shuttle-Plasmids und Bildung der Cointegrate

Elektrokompetente DH10B Bakterien, die das zu mutierende mCMV-BAC-Plasmid enthielten, wurden mit 15ng *Shuttle*-Plasmid-DNA transformiert (siehe 3.4.6) und für 1h in LB-Medium (ohne Antibiotika) bei 30°C geschüttelt. Der gesamte Ansatz wurde auf LB-Platten (Cam/Kan) ausgestrichen und für 24-36h bei 30°C inkubiert. Dabei erfolgt eine erste homologe Rekombination. Die so gebildeten Cointegrate haben die *Shuttle*-Plasmid-DNA vollständig in das mCMV-BAC-Plasmid integriert.

Anreicherung der Cointegrate und Entfernung der Shuttle-Plasmide

10 Cointegrate enthaltende Bakterienkolonien wurden auf LB-Platten ausplattiert (Cam/Kan) und ü.N. bei 43°C im Brutschrank inkubiert. Bei dieser Temperatur können Cointegrate replizieren, nicht jedoch die *Shuttle*-Plasmide, da bei 43°C ein falsch gefaltetes RepA-Protein entsteht, das den temperatursensitiven Replikationsursprung pSC101 nicht mehr induzieren kann (Hashimoto-Gotoh et al., 1981; Steinmetz et al., 1985; Blomfield et al., 1991). Das Entstehen großer Einzelkolonien ist in diesem Schritt essentiell, es kann daher notwendig sein diesen Schritt zu wiederholen.

Cointegrat-Auflösung

Um die Auflösung der Cointegrate durch eine erneute homologe Rekombination zu gewährleisten, wurden 10 Kolonien als Verdünnungsausstrich auf LB-Platten (Cam) ausplattiert und ca. 30h bei 30°C inkubiert. Die resultierenden Kolonien sind eine Mischung aus Bakterien mit aufgelösten und Bakterien mit nicht-aufgelösten Cointegraten.

Selektion gegen nicht-aufgelöste Cointegrate

Die Identifizierung von Bakterien mit aufgelösten Cointegraten erfolgte über einen Verdünnungsausstrich auf LB-Platten (Cam) mit 5% (w/v) Saccharose und 30h Inkubation bei 30°C. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Unter diesen Bedingungen können nur Bakterien mit aufgelösten Cointegraten replizieren, da sie das *SacB*-Gen verloren haben. Bakterien mit nicht-aufgelösten Cointegraten exprimieren hingegen das Exoenzym Levan-Saccharase, welches die Synthese des Polysaccharids Levan aus Saccharose katalysiert (Blomfield et al., 1991). Infolgedessen kommt es zur Akkumulation von Levan im periplasmatischen Raum mit letalen Konsequenzen für *E. coli* (Gay et al., 1983).

Durch die Auflösung der Cointegrate haben die Bakterien die zuvor eingebrachte Kan-Resistenz wieder verloren. Die daraus folgende Kan-Sensitivität wurde bei 100 Einzelkolonien des Schrittes getestet. Dazu wurden LB-Platten (Kan/Cam) und LB-Platten (Cam) parallel beimpft und bei 37°C ü.N. inkubiert. Dabei ist es wichtig, zuerst die Kan- und dann erst die Cam-Platte zu beimpfen. Mindestens 80% der Klone sollten Kan-sensitiv sein.

Charakterisierung Kan-sensitiver Klone

Von 10 Kan-sensitiven Bakterienkolonien wurde je eine 10ml LB-Kultur (Cam) angeimpft und bei 37°C ü.N. unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die BAC-DNA isoliert (siehe 3.4.9) und mittels Restriktionsanalyse charakterisiert. Zur Sicherung der Klone wurden von diesen Glycerinzellen angelegt (siehe 3.4.4).

Durch die Restriktion konnte die globale Integrität des mCMV-Genoms kontrolliert werden. Dieses kann in einigen Fällen größere Deletionen aufweisen, da es in Folge der *RecA*-Expression zu Instabilitäten durch unerwünschte intramolekulare Rekombinationsereignisse im mCMV-BAC-Genom kommen kann (Horsburgh et al., 1999; Smith & Enquist, 2000). Zur Identifikation der gesetzten Mutationen wurde mittels PCR der entsprechende Sequenzabschnitt vervielfacht und nach Reinigung über ein Agarose-Gel sequenziert. Statistisch gesehen sollten 50% der Klone dieser Kolonien das korrekt mutierte mCMV-BAC-Plasmid enthalten.

Für die anschließende Red-vermittelte markerlose Rekombination nach Tischer (siehe 3.4.22.3) wurde die BAC-DNA isoliert (3.4.10) und in elektrokompetente GS1783 Bakterien umklont (siehe 3.4.6).

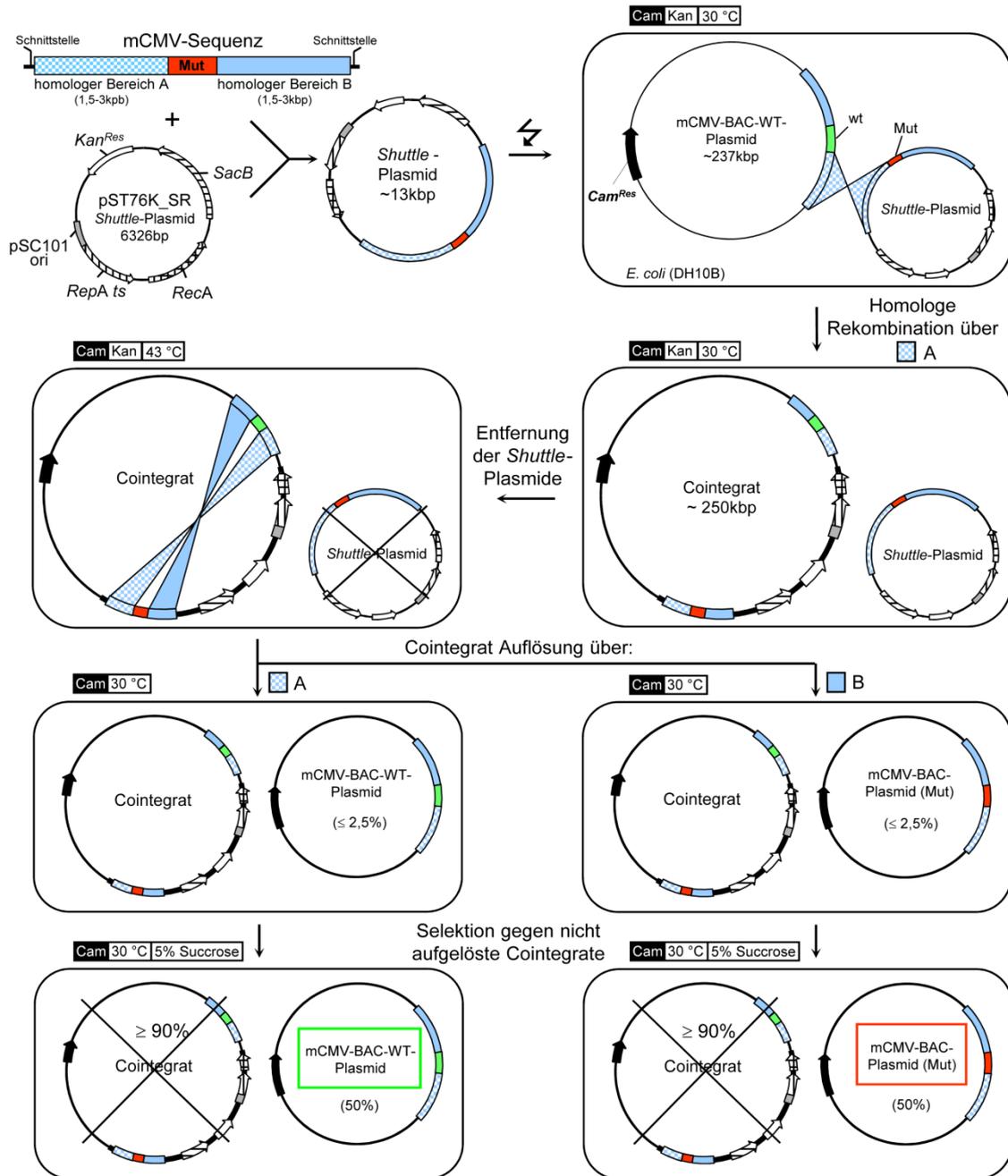


Abb. 3.1 Flusschema zur Strategie der Mutagenese von mCMV-BAC-Plasmiden mittels Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren.

Das Shuttle-Plasmid pST76K_SR wird nach Subklonierung der mutierten viralen Sequenz (Mut, rot) mit zum Integrationsort im Virusgenom angrenzenden Homologien (homologer Bereich A bzw. B) in *E. coli* (DH10B), welche bereits ein mCMV-BAC-WT-Plasmid besitzen transformiert. Während der Inkubation bei 30°C wird das RecA-Protein exprimiert und homologe Rekombination kann z.B. über die Homologien A erfolgen. Dadurch entsteht ein Cointegrat, auf das mit Chloramphenicol (Cam) und Kanamycin (Kan) selektioniert werden kann. Anschließende Inkubation der Bakterien in Gegenwart von Cam und Kan bei 43°C verhindert die Replikation des Shuttle-Plasmids. Nach erneuter Inkubation bei 30°C in Gegenwart von Cam kann wieder eine homologe Rekombination zwischen den beiden Homologie-Paaren erfolgen. Verläuft dies erneut über Homologie A, so entsteht wieder ein mCMV-BAC-WT-Plasmid. Verläuft die Auflösung jedoch über Homologie B, so wird ein rekombinantes mCMV-BAC-Plasmid (Mut) mit der gewünschten Mutation erhalten. Zur Erhöhung der Ausbeute an aufgelösten Cointegraten wird mit 5% Saccharose gegen nicht-aufgelöste Cointegrate (mit *SacB*-Gen) selektioniert (aus Simon, 2006).

3.4.22.3 Red-vermittelte markerlose DNA Rekombination in *E. coli*

Mit der 2006 beschriebenen Methode der Red-vermittelten markerlosen DNA Rekombination (Tischer et al., 2006) ist es möglich, Deletionen, Insertionen oder Punktmutationen in BAC-Plasmiden durchzuführen, ohne dass Reste von Fremd-DNA im Genom zurückbleiben, die unter Umständen zu unerwünschten Nebeneffekten bei der Proteinsynthese oder -expression führen können.

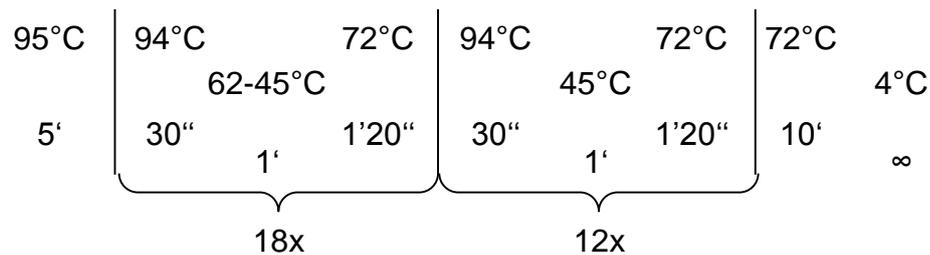
Mittels PCR wird ein positiver Selektionsmarker (Kan-Kassette) amplifiziert. Durch die *Primer* werden zum Integrationsort homologe Sequenzen, welche jedoch die gewünschten Mutationen haben, an 5'- und 3'-Ende des PCR-Produkts angefügt. Das PCR-Produkt enthält zusätzlich eine Schnittstelle der Homing-Endonuklease *I-SceI*. Das PCR-Produkt wird anschließend in elektrokompente GS1783 transformiert, in denen durch Red-Rekombination das PCR-Produkt in die BAC-DNA aufgenommen wird. Durch anschließende Arabinose-induzierte *I-SceI* Expression wird ein Doppelstrangbruch herbeigeführt, dessen Produkte als Substrate für eine weitere Red-Rekombination dienen. Das Endprodukt ist eine BAC-DNA, die die gewünschte Mutation enthält, jedoch keine Überreste des positiven Selektionsmarkers. Für ein Schema siehe Abb. 3.2.

Herstellung und Aufreinigung des PCR-Fragments

Zur Amplifikation des Kanamycin-Resistenzgens aus dem Plasmid pEPkan-S werden Oligonukleotide verwendet, die aus 70 bis 120 Nukleotiden bestehen. An ihren 3'-Enden befindet sich die jeweilige *Priming Region* des Plasmids, an ihren 5'-Enden die mCMV homologe Sequenz mit den Basenaustauschen. Für die spätere homologe Rekombination zwischen dem PCR-Fragment und der mCMV-BAC-DNA wird ein Homologiebereich von mindestens 40 Nukleotiden benötigt. Für die PCR wird 5x folgender Ansatz pipettiert:

<u>Komponente</u>	<u>Volumen</u>	<u>Endkonzentration</u>
5xPCR-Puffer	10µl	1x
<i>Primer for</i>	1,5µl	0,3µM
<i>Primer rev</i>	1,5µl	0,3µM
HotStar HiFidelity Polymerase	1µl	2,5U
pEPkan-S	variabel	10ng
dH ₂ O	ad 50µl	

PCR-Profil:



Um die *Template*-DNA abzubauen wurde jedem Ansatz nach der PCR je 40U *DpnI* zugegeben und 1,5h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die PCR-Produkte in einem 1%-igen Agarose-Gel aufgetrennt und mittels Gel Extraction-Kit aufgereinigt (siehe 3.4.19). Nach Elution in je 30µl dH₂O wurden die Produkte vereint und eine Ethanolfällung durchgeführt.

Ethanolfällung

Für die Fällung der DNA wird diese mit 1/10 Volumen 3M NaAc (pH 5,2) und zwei Volumina eiskaltem 100% EtOH gemischt und für 30-60min bei -70°C gefällt. Nach Zentrifugation (20min, 20800xg) wird das Pellet mit eiskaltem 80% (v/v) EtOH gewaschen, nochmals zentrifugiert, für 15min bei 20-22°C getrocknet und anschließend in 15µl dH₂O aufgenommen.

Induktion der Red-Rekombinase

Zur Durchführung der Zwei-Schritt Red-vermittelten markerlosen DNA Rekombination muss zuerst die Induktion der Red-Gene (Expression der Red-Rekombinations-Proteine Bet, Exo und Gam; siehe auch Datsenko & Wanner, 2000; Lee et al., 2001a) im Bakterienstamm GS1783 (Warming et al., 2005), der bereits das zu mutierende mCMV-BAC-Plasmid enthält, erfolgen. Anschließend werden die Bakterien elektrokompent gemacht.

Alle Präparationsschritte wurden sofern nicht anders angegeben auf Eis durchgeführt, alle Materialien und Gerätschaften wurden auf 4°C vorgekühlt. Von Einzelkolonien GS1783 mit entsprechendem BAC-Plasmid wurden 5ml ü.N.-Kulturen in LB-Medium (Cam) angesetzt. 50ml frisches LB-Medium (Cam) wurden mit 1:20 bis 1:50 Verdünnungen der ü.N.-Kulturen angeimpft und bei 32°C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5-0,7 erreicht war. Die Induktion der Red-Gene erfolgt durch 15minütige Inkubation der Kulturen in einem 42°C warmen Wasserbad. Nach Umfüllen der Kulturen in vorgekühlte 50ml Reaktionsgefäße wurden diese im Eisbad für 20min unter gelegentlichem Schwenken abgekühlt. Die Bakterien wurden dann dreimal mit 50ml 10%-iger Glycerinlösung gewaschen (5min, 4500xg). Nach dem letzten Waschschrift wurde das Bakterienpellet in 500µl 10%-iger Glycerinlösung resuspendiert, in Aliquots à 50µl in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und direkt für die Elektroporation verwendet.

Elektroporation und erste Red-Rekombination

50µl frische, elektrokompetente GS1783 wurden mit unterschiedlichen Volumina des gereinigten linearen PCR-Produkts transformiert (siehe 3.4.6). Nach 90min Inkubation bei 32°C wurden 100µl der Bakterien direkt ausplattiert, der Rest pelletiert und in ca. 50µl Restvolumen resuspendiert und ebenfalls ausplattiert (Cam & Kan). 24-48h später wurden 10-20 ü.N.-Kulturen angesetzt und BAC-DNA (BAC-Minis) isoliert (siehe 3.4.9), um die Integrität der BAC-DNA zu überprüfen.

Zweite Red-Rekombination und Integratauflösung

1ml LB-Medium (Cam) wurde mit einer Einzelkultur, die den positiven Selektionsmarker erfolgreich in ihre BAC-DNA integriert hatte, angeimpft und über Nacht bei 32°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 2ml LB-Medium (Cam) mit 100µl der ü.N.-Kultur angeimpft und bei 32°C (230U/min) für 2h inkubiert. Zur Arabinose-Induktion der *I-SceI* Kasette wurden 2ml vorgewärmtes LB (Cam+1% Arabinose; immer frisch ansetzen) hinzugefügt und für exakt 30min bei 32°C (230U/min) inkubiert. Dabei schneidet die Homing-Endonuklease *I-SceI* an ihrer Schnittstelle und es kommt zu einem Doppelstrangbruch. Für die Induktion der Red-Gene wurden die Kulturen im vorgeheiztem Wasserbad bei 42°C (230U/min) für exakt 15min inkubiert und anschließend für weitere 3h bei 32°C (230U/min) inkubiert. In dieser Zeit erfolgt eine weitere Red-Rekombination. Nach Verdünnung der Kulturen zu 1:1000 und 1:10000 wurden davon jeweils 100µl auf LB-Platten (Cam+1% Arabinose) ausplattiert. Dazu wurden die Bakterien pelletiert, der Überstand verworfen, das Pellet im verbliebenen LB-Medium resuspendiert und mittels Drei-Ösenausstrich ausplattiert. Die Platten wurden ü.N. bei 32°C inkubiert, am nächsten Tag wurden Einzelkolonien auf frische LB-Platten (Cam+1% Arabinose) überführt und über Nacht bei 32°C inkubiert. Dann wurden Einzelkolonien auf Replikplatten übertragen, d.h. eine Kolonie wurde zuerst auf eine LB-Platte (Cam/Kan), dann auf eine LB-Platte (Cam) übertragen. Wichtig sind die kleinen Kolonien, größere Kolonien scheinen kein mCMV-Genom mehr zu enthalten. Nach erfolgreicher Rekombination sollte der positive Selektionsmarker (Kan) nicht mehr im Genom vorhanden sein. Mit Kan-sensitiven Kolonien wurden 10ml LB (Cam) angeimpft und über Nacht bei 32°C inkubiert. Dann wurde die BAC-DNA aufgereinigt und die Integrität des BACs mittels *EcoRI*-Verdau überprüft. Zur Bestätigung der eingefügten Mutationen wurde die DNA sequenziert (GATC, Konstanz).

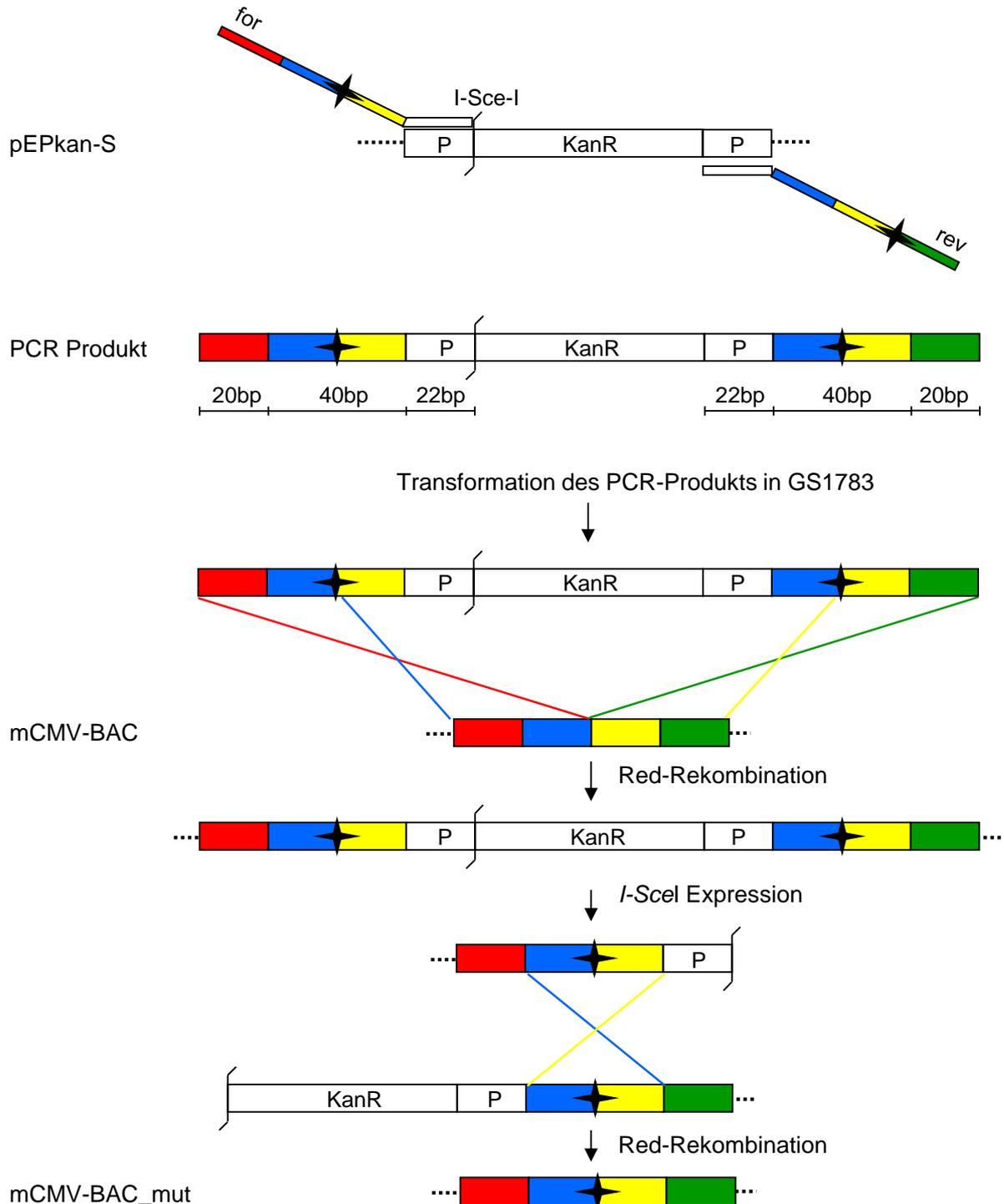


Abb. 3.2 Schema der Red-vermittelten markerlosen DNA-Rekombination.

Das Plasmid pEPkan-S diente als *Template* in einer PCR, bei der die Kanamycin-Kassette mit einer *I-Sce-I* Schnittstelle amplifiziert wird. Die *Primer* binden an die *Priming*region (P) des Vektors und tragen an ihren 5'-Enden zum Integrationsort homologe Sequenzen und die eingefügten Basenaustausche für die Mutation (schwarzes Kreuz). Nach Induktion ihrer Red-Gene werden elektrokompetente GS1783 mit dem PCR-Produkt transformiert. Es folgt eine Red-Rekombination, bei der das PCR-Produkt in das BAC der Bakterien integriert wird. Durch *I-SceI* Expression kommt es zu einem Doppelstrangbruch, zwischen den Fragmenten kommt es zu einer weiteren Red-Rekombination, so dass ein BAC entsteht, das die mutierte Sequenz enthält. Nach Tischer et al., 2006.

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Aufreinigung antigener Peptide

Die Isolierung natürlichprozessierter viraler, antigener Peptide kann durch Extraktion infizierter Zellen und anschließender chromatographischer Auftrennung erfolgen. Dabei wird zunächst durch Trifluoressigsäure (TFA)-Behandlung ($\text{pH} < 2$) der trimolekulare MHC-I/ β_2 -Mikroglobulin/Peptid-Komplex denaturiert und das antigene Peptid freigesetzt (Röttschke et al., 1990). Im Anschluss werden die Extrakte mittels Gelfiltration und Festphasenextraktion vorgereinigt und anschließend in einer *Reversed Phase* Chromatographie aufgetrennt.

3.5.1.1 Peptidextraktion aus Zellen

Material:

TFA	0,1% in dH_2O
	1% in dH_2O
PBS + 1% FCS (v/v)	

MEF wurden zentrifugal mit WT infiziert, 24h p.i. zweimal mit PBS gewaschen und mit Trypsin von der Petrischale abgelöst. Die Zellen wurden in 50ml Röhren in PBS/FCS abzentrifugiert (10min, 450xg, 4°C), nach dreimaligem Waschen mit PBS in einem 15ml Röhren in PBS aufgenommen und gezählt. Nach Pelletion der Zellen wurden sie auf dem Vortexer zunächst mit 100 μl /2x10⁵ Zellen 0,1% TFA, dann tröpfchenweise mit der gleichen Menge 1% TFA versetzt. Dabei ist auf einen konstanten Wert von pH 2 zu achten.

Die Zellen wurden anschließend mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators auf Eis homogenisiert. Homogenisator und Röhren wurden dann mit der doppelten Menge der anfangs eingesetzten 0,1% TFA gespült und die Spüllösung ebenfalls homogenisiert. Die Homogenate wurden in einem frischen 15ml Röhren vereint und bei 4°C 10mal für jeweils 10sec sonifiziert (80W).

Die aufgeschlossenen Zellen wurden 30min auf Eis inkubiert, in ein 12ml-Polyallomerröhren überführt und 60min bei 3850xg und 4°C zentrifugiert, um größere Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde über ein 0,8 μm Filter in ein neues 12ml-Röhren überführt. Bis zur Aufreinigung und Fraktionierung erfolgte die Lagerung bei -70°C.

3.5.1.2 Aufreinigung von Extrakten

Bevor die Peptide chromatographisch aufgetrennt werden können, müssen die Extrakte durch Gelfiltration und Festphasenextraktion vorgereinigt werden.

Sephadex-G25 Gelchromatographie

Material:

Chromatographiesystem	Schlauchpumpe Microperpex Vario Detektor 2238 UVICORD SII Schreiber 2210 RECORDER 1-CHANNEL Fraktionssammler Redi-Frac Säulenmantel C16/70 Säulenadapter AC 16
Säulenmatrix	Sephadex-G25 fine
Laufmittel	0,1% TFA in dH ₂ O

Mit einer Sephadex-G25 Säule wurde der hochmolekulare Anteil des Extraktes (Proteine) vom niedermolekularen Anteil abgetrennt, der Peptide, Nukleotide oder Oligosaccharide enthält. Die Säulen werden isokratisch eluiert, das heißt, die mobile Phase ändert sich während der Elution nicht.

Füllen der Säule:

Das Sephadex-Pulver wurde zunächst mit dH₂O gewaschen. Für ein Säulenvolumen von 60ml wurden 20g Sephadex-Pulver und 150ml 0,1%-ige TFA in eine Saugflasche gegeben und für 1h bei 22-24°C gequollen. Dann wurde die Saugflasche an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen und für 30min entgast. Das Entgasen wurde nach einigen Stunden wiederholt. Der Ansatz konnte anschließend über einen längeren Zeitraum bei 4°C gelagert werden.

Der Säulenmantel wurde mit dH₂O gespült, das gequollene Sephadex in ein Becherglas überführt, die Saugflasche mit Laufmittel gespült und die Spüllösung in den Säulenmantel gegeben. Nach Abfließen des Laufmittels wurde das gequollene Säulenmaterial langsam und kontinuierlich in den Säulenmantel gegossen.

Währenddessen wurden die Schläuche des Systems und die Probenschleife mit Laufmittel gespült, die Probenschleife mit Laufmittel gefüllt und der Laufmittelfluss zugeschaltet. Nachdem sich das Sephadex gesetzt hatte wurde der mit ddH₂O gereinigte Stempel eingesetzt. Zunächst wurde bei vorhandenem Luftpolster das Säulenmaterial vorsichtig komprimiert und die Luft anschließend ruckartig aus dem System entfernt. Um ein Trockenlaufen der Säule zu verhindern, wurde die Säule so fixiert, dass der Stempelkopf niedriger lag als die Auslauföffnung.

Dann wurde die Pumpe angeschlossen und bei einer Flussrate von 0,1ml/min für 4h Laufmittel über die Säule gegeben. Anschließend wurde die Flussrate gedrosselt und der Stempelknopf auf die Oberfläche des Säulenmaterials abgesenkt, damit kein Totraum über der Säulenmatrix entstehen konnte.

Säulenlauf:

Vor der Beladung mit einer Probe wurde das Sephadex-G25 System für 30min mit Laufmittel äquilibriert (Flussrate von 0,5ml/min). Die Extrakte (siehe 3.5.1.1) wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und zur Reduktion einer möglichen Proteasenaktivität sofort auf Eis gestellt. Dann wurden sie im Ultraschallbad für 30sec sonifiziert und in die Probenschleife der G25-Säule gegeben. Anschließend wurde der Säulendurchfluss in 5ml Fraktionen gesammelt. Bei einer Wellenlänge von 280nm konnten die Fraktionen mit hochmolekularem Anteil von denen mit niedermolekularem unterschieden werden. Letztere wurden vereint und in einer Sep-Pak-Kartusche weiter aufgereinigt. Bis zur Weiterverarbeitung konnten die Proben bei -70°C gelagert werden.

Festphasenextraktion (Sep-Pak-Kartusche)

Material:

Acetonitril (AcN)	100%
	70% (v/v)
	50% (v/v); verdünnt in 0,1% TFA
TFA	0,1% in dH ₂ O

Die Kartusche dient der Reinigung und Konzentrierung der Proben. Das Prinzip ähnelt dem der Säulenchromatographie mit Kieselgel-gebundenen C18-Ketten als Adsorptionsmatrix (siehe 3.5.1.3): Peptide binden an die Matrix, während Nukleotide ausgewaschen werden.

Zunächst wurde die Kartusche mit je 5ml 100% AcN, 5ml 50% AcN und 5ml 0,1% TFA gewaschen und äquilibriert. Dann wurde die Probe mit Hilfe einer 50ml Spritze langsam auf die Kartusche aufgetragen, diese mit 5ml 0,1% TFA gespült und die Extrakte erst mit 2ml 50% AcN, dann mit 2ml 100% AcN eluiert. Das Eluat wurde in Eppendorf-Gefäßen gesammelt und im Vakuumkonzentrator für ca. 2h auf ein Volumen von 1ml reduziert. Nachdem sie über einen 0,45µm Filter in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt wurden, konnten die nun vorgereinigten Extrakte bis zur Fraktionierung (siehe 3.5.1.3) bei -70°C gelagert werden.

3.5.1.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Material:

HPLC-Niederdruck-Gradienten System	Fraktionssammler Frac 900 HPLC Pumpen P900 Säulenofen 2155 Injektor Rheodyne 7125 Zwei-Wellenlängenmonitor Variabler UV Detektor 900 HPLCmanager
Säule	Nucleosil 100-5 C18
Laufmittel:	A: 0,1% TFA B: 50% AcN (v/v), in 0,09% TFA

Harnstofflösung	6M (in 50%-iger Essigsäure)
Eichpeptid	M45D ^b -Peptid

Bei dem hier angewandten Separationssystem handelt es sich um eine Adsorptions-Chromatographie, bei der die Retention der Probensubstanzen durch Bindung an eine stationäre Phase zustande kommt. Die Elution erfolgt durch Veränderung der mobilen Phase. Grundsätzlich unterscheidet man zwei Typen von Phasensystemen: Das Normalphasensystem, bei dem polar beschichtete Kieselgel-Partikel zum Einsatz kommen und das Umkehrphasensystem (*Reversed Phase*-Chromatographie, RPC), bei dem die Beschichtung apolar ist. Das hier eingesetzte Trennverfahren beruht auf dem Prinzip der RPC, wobei das Phasensystem aus einer nicht polaren stationären und einer polaren mobilen Phase besteht. Als stationäre Phase werden in der Regel poröse Kieselgele verwendet an deren Oberfläche Alkylgruppen mit unterschiedlichen Kettenlängen chemisch gebunden sind. Bei der hier verwendeten RPC handelt sich um ein Trägermaterial mit n-Octadecylgruppen (C18-Typ).

Normierung der HPLC-Säule

Die Säule wurde zuerst bei einer Flussrate von 200µl/ml wie folgt gespült:

Dauer [min]	Anteil Laufmittel B [%]
1) 30	10
2) 30-60	90
3) 30	10

Um die Dichte des Systems zu überprüfen, wurde folgendermaßen gespült:

Flußrate	Dauer [min]	Anteil Laufmittel B [%]
1) 1ml/min	10-15	10
2) 100µl/min	mind. 3h; besser ü.N.	50

Währenddessen wurde auch der Injektor gespült. Nach dem Spülen der Säule wurde ein Leerlauf mit Laufmittel durchgeführt. Dieser diente als Kontrolle zur Testung auf kontaminierendes, antigenes Material aus vorhergehenden HPLC-Läufen.

Anschließend wurde der Eichlauf gestartet. Dazu wurde das Eichpeptid mit einer Konzentration von 1mg/ml Laufmittel A im Ultraschallbad sonifiziert und 10µl dieser Lösung auf die Säule aufgetragen. Nach der Eichung war das HPLC-System für Separationszwecke einsatzbereit.

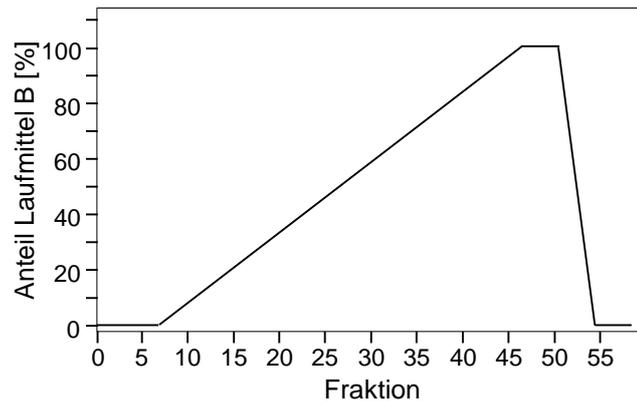
Vorbereitung des Systems

Injektor und Hamilton-Injektionsspritze wurden zunächst mit 3ml 6M Harnstoff, 5ml dH₂O und 5ml Laufmittel A gespült. Dann wurden ein kurzer Waschlauf und anschließend ein Leerlauf mit je 1ml Laufmittel A und Sammlung der Fraktionen durchgeführt.

Probenfraktionierung

Der Gradient wurde bei einer Fraktionsgröße von 0,8ml/min folgendermaßen eingestellt:

t [min]	Anteil Laufmittel B [%]
0-6	0
6-46	+2,5% pro min
46-50	100
50-54	-25% pro min
54-58	2



Die Probe wurde aufgetaut, sofort im Ultraschallbad (100Watt) für 30sec sonifiziert und auf die Säule aufgetragen (maximal 1ml). Die Fraktionen wurden in Eppendorf-Gefäßen aufgefangen und entweder bei -70°C gelagert oder sofort für den Test auf antigene Peptide im Zytolysetest (siehe 3.6.4) in 96-Well-Rundbodenplatten pipettiert. Das im Laufmittel enthaltene AcN wurde den Fraktionen im Exsikkator (60min) entzogen. Die Platten wurden dann für mind. 2h bei -70°C tiefgefroren und anschließend im vorgekühlten Lyophilisator gefriergetrocknet. Die Platten konnten bei -70°C gelagert werden.

3.5.1.4 Berechnung der Peptidkonzentration

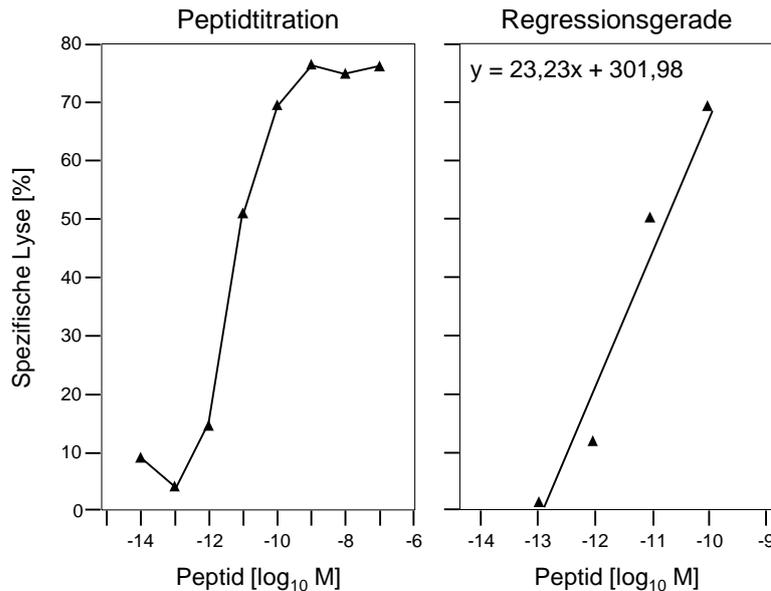
Um die Peptidkonzentration in den entsprechenden HPLC-Fraktionen zu quantifizieren und damit Aussagen über die Effizienz der Antigenprozessierung machen zu können wurde folgende Berechnung durchgeführt (Pamer, 1994).

Aufstellung der Geradengleichung für die Lyse

Aus den in einem Zytolysetest (siehe 3.6.4) gemessenen Lysewerten einer Peptidtitration wurde eine Regressionsgerade erstellt. Hierfür wurden diejenigen Werte ausgewählt, die beim semilogarithmischen Auftrag im linearen Bereich lagen.

Beispiel für die Titration des M45D^b-Peptids:

Peptidkonzentration [\log_{10} M]	Lyse [%]
-7	76,27
-8	75,01
-9	76,51
-10	69,56
-11	51,05
-12	14,70
-13	4,26
-14	9,22



Berechnung der Molarität des Peptids

Aus den %-Lysewerten der im Zytolysetest eingesetzten Proben kann über die Regressionsfunktion die entsprechende Peptidkonzentration errechnet werden. Der errechnete Wert entspricht dabei der molekularen Peptidkonzentration im Testansatz (200 μ l/Well):

$$\begin{aligned}
 y &= ax + b \\
 \%Lyse &= a \times \log [\text{Peptidkonzentration [mol/l]}] + b \\
 \log [\text{Peptidkonzentration [mol/l]}] &= (\%Lyse - b)/a
 \end{aligned}$$

Berechnung der Peptidmoleküle pro Zelle

Um aus der Peptidkonzentration im Testansatz die Anzahl der Peptidmoleküle pro Zelle zu errechnen, wurde folgende Berechnung durchgeführt:

$$\begin{aligned}
 \text{Peptidmoleküle/Zelle} &= (c \times D \times V \times N_A)/Z \\
 c &= \text{Peptidkonzentration [mol/l]} \\
 D &= \text{Verdünnungsfaktor} \\
 V &= \text{Volumen [l]} \\
 N_A &= \text{Avogadro-Konstante} \\
 Z &= \text{in die Extraktion eingesetzte Zellen}
 \end{aligned}$$

Der Verdünnungsfaktor gibt den Anteil des im Zytolysetest eingesetzten Fraktionsvolumen am Gesamtextrakt wieder. Wurden zum Beispiel 50% des Extrakts für die HPLC-Trennung verwendet und von der HPLC-Fraktion 1/8 im CTL-Test eingesetzt, ergibt sich ein Verdünnungsfaktor von 16 (=2x8).

3.5.2 Proteinextraktion aus eukaryotischen Zellen

Material:

Lysepuffer	0,2M NaCl 1,5mM MgCl 4mM EDTA 4mM EGTA 1% Triton-X 100 20mM HEPES steril filtrieren und bei 4°C lagern
frisch dazugeben	0,5mM DTT 1:25 Protease-Inhibitor

Um die Expression viraler Proteine zu untersuchen, wurden MEF in 10cm Kulturschalen infiziert (siehe 3.2.3) oder COS-7-Zellen (ebenfalls in 10cm Kulturschalen) mit Plasmid-DNA transfiziert (siehe 3.1.5.2) und bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion oder 48h nach Transfektion geerntet. Dazu wurde das Medium von den Zellen gesaugt, die Zellen 2x mit kaltem PBS gewaschen und im Restvolumen mit einem Zellschaber abgelöst. Die Zellen wurden im Anschluss bei 960xg pelletiert (5min, 4°C) und in 200µl/10er Schale Lysepuffer resuspendiert. Der Lysepuffer enthält Protease-Inhibitoren um die Degradation der Proteine zu verhindern, DTT dient zur Reduktion der Aminosäuren. Nach 15min Inkubation auf Eis wurden die Zelltrümmer bei 21000xg pelletiert (10min, 4°C), die Überstände in neue 1,5ml Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

3.5.3 Quantifizierung von Proteinen

Material:

BCA™ Protein Assay Kit (ThermoFisher)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Zelllysaten wurde mittels BCA (Bicinchoninsäure)-Reaktion durchgeführt (Smith et al., 1985), die auf der Biuret Reaktion beruht. Tripeptide und größere Polypeptide reduzieren unter alkalischen Bedingungen Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{1+} . BCA bildet mit Cu^{1+} einen Chelatkomplex, dessen Absorptionsmaximum bei 562nm liegt. Die Absorption steigt in einem Konzentrationsbereich von 20µg/ml bis 2mg/ml linear zur Proteinkonzentration. Da BCA und Cu-Ionen im Überschuss vorhanden sind, würde die Farbreaktion auf unbestimmte Zeit weiterlaufen, daher wird die Absorption nach 30min gemessen. Zur absoluten Bestimmung der Proteinkonzentration wird die Absorption der Probe jeweils mit der Eichgerade einer Standardreihe verglichen.

Die eingefrorenen Zelllysate wurden auf Eis aufgetaut, die Reagenzien des Kits nach Herstellerangaben gemischt und für jede Probe in Duplikaten 200µl in das Well einer 96-Well-Flachbodenplatte pipettiert. Anschließend wurden 10µl des Lysats dazugegeben und die Platte für 30min bei 37°C inkubiert. Die Absorption wurde photometrisch bestimmt und die Proteinkonzentration der Proben mittels der BSA-Standardkurve errechnet.

3.5.4 Immunpräzipitation

Material:

Dynabeads	Sheep anti-Mouse IgG
Waschpuffer 1	PBS + 0,1% BSA
Waschpuffer 2	PBS
Antikörper	siehe 2.10

Um Proteine spezifisch anzureichern, wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Dazu wurden magnetische Beads verwendet, an die der Fängerantikörper bindet, der wiederum an die entsprechenden Proteine im Zelllysate bindet. Zum Waschen der Beads wird das Gefäß in ein Magnetfeld gestellt. Die Beads und daran gebundenen Antikörper werden zurückgehalten, während ungebundene Antikörper oder Proteine mit dem Überstand abgenommen werden.

Pro Ansatz wurden 6×10^7 Dynabeads nach vortexen in ein 2ml Eppendorfgefäß überführt und dieses für 2min in ein Magnetfeld gestellt. Nach Abnahme des Überstands wurden die Beads mit je 500µl Waschpuffer 1 und 2 gewaschen (Resuspendieren der Beads in der Lösung, dann 2min in Magnetfeld) und anschließend in 300µl Waschpuffer 2 aufgenommen. Dann wurden die Beads mit dem Antikörper (1:100) beladen und über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit je 500µl Waschpuffer 2 wurde ungebundener Antikörper entfernt. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand komplett abgenommen, 430µg Gesamtprotein aus Zelllysaten (siehe 3.5.2) auf die Beads gegeben und für 20min bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 500µl Waschpuffer 2 wurden die Beads in 100µl Waschpuffer 2 aufgenommen.

3.5.5 Deglykosylierung von Proteinen

Glykosylierte Proteine können durch die Behandlung mit Endoglykosidase H (Endo H) oder Peptid:N-Glykosidase F (PNGase F) von ihren Zuckerresten befreit werden. Endo H spaltet die endständige Chitobiose-Einheit in mannosereichen Oligosacchariden, so dass nur noch ein Monosaccharid am Protein verbleibt. PNGase F dagegen spaltet zwischen dem Asparagin des Proteins und dem endständigen GlcNAc der Zuckerkette. Dabei wird Asparagin in Asparaginsäure umgewandelt und somit die Ladung des Proteins verändert. Zur Deglykosylierung der Proteine wurde die Hälfte der Beads aus 3.5.4 (50µl) in das Magnetfeld gestellt, der Überstand nach 2min abgenommen und dann folgende Komponenten auf die Beads gegeben:

	Endo H	PNGase F
dH ₂ O	18µl	18µl
10x Denaturierungspuffer	2µl	2µl

Dieser Ansatz wurde 10min bei 100°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Dann wurden folgende Komponenten hinzugegeben:

	Endo H	PNGase F
dH ₂ O	14,5µl	10µl
10x G7-Puffer	4µl	4µl
10% NP-40	--	4µl
PNGase F	--	2µl (1000U)
Endo H	1,5µl (750U)	--

Nach 1h Inkubation bei 37°C wurde die Probe mit 10µl 5x Laemmli-Puffer versetzt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 3.5.6).

3.5.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Material:

Laemmli-Puffer	1,5M β-Mercaptoethanol 0,225M Tris/HCl pH 6,8 20% Glycerin 5% SDS 0,05% Bromphenolblau 0,25M DTT
Acrylamid	Rotiphorese®Gel30
TEMED	
APS	10% in A. dest. gelöst
Protein Standard	PageRuler Prestained Protein Ladder
5x Laufpuffer	0,5% SDS 960mM Glycin 125mM Tris pH8,3
4x Sammelgelpuffer	0,4% SDS 0,5M Tris/H ₃ PO ₄ pH6,8
4x Trenngelpuffer	0,4% SDS 1,5M Tris/HCl pH8,8

Die Auftrennung von Proteingemischen fand in einer diskontinuierlichen SDS-PAGE statt (Laemmli, 1970). Für die Gelelektrophorese wurden 30µg Gesamtproteinlysate eingesetzt. Das entsprechende Volumen wurde in ein 2ml *safe cup* Eppendorfgefäß überführt, mit Laemmli-Puffer (Endkonzentration: 1x) versetzt und für 5min bei 95°C erhitzt. Der Puffer enthält DTT und SDS, um die Reduktion bzw. Denaturierung der Proteine zu erleichtern. Dadurch werden Proteininteraktionen und Quartärstrukturen aufgelöst. Durch das Erhitzen der Proben werden Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine zerstört und die Proteine unterscheiden sich nun nur noch durch ihre Größe. Im elektrischen Feld wandern sie zur Anode und durch die Polyacrylamid-Matrix werden sie der Größe nach aufgetrennt, da kleinere Proteine schneller wandern als größere.

Sammelgel

Trenngel 12,5%

Acrylamid	1,5ml	7,2ml
4x Sammelgelpuffer	2,8ml	-
4x Trenngelpuffer	-	4,5ml
dH ₂ O	6,93ml	6,3ml
APS	150µl	144µl
TEMED	20µl	14,4µl

Für die Herstellung des SDS-Gels wurden zwei mit Ethanol gesäuberte Glasplatten in die Gelapparatur gespannt und die Trenngel-Lösung dazwischen pipettiert. Damit das Trenngel mit ebener Oberfläche polymerisiert, wurde es mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisierung des Trenngels wurde die Sammelgel-Lösung darauf gegeben und ein Kamm für die Ausbildung der Taschen hineingesteckt. Das fertige Gel wurde in eine Elektrophoresekammer in 1xLaufpuffer überführt und die Proben in die Taschen des Gels pipettiert.

Zunächst wurde an das Gel eine Spannung von 100V angelegt, bis die Proben ins Trenngel eingelaufen waren. Dann wurde die Spannung auf 150V erhöht. Kurz nachdem der Blaumarker der Proben aus dem Gel herausgelaufen war wurde die Auftrennung beendet.

3.5.7 Western Blot

Material:

Transferpuffer	48mM Tris 39mM Glycin 20% Ethanol
10x PBS	1,37M NaCl 26,8mM KCl 78,1mM Na ₂ HPO ₄ 14,7mM KH ₂ PO ₄ Autoklavieren
Blocklösung	5% Milchpulver in Waschpuffer 1
Waschpuffer 1	1x PBS 0,1% Triton X-100
Waschpuffer 2	1% Milchpulver in Waschpuffer 1

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden Proteine im Semidry-Verfahren auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran übertragen (Pluskal, 1986). Dazu wurden 4 Whatmanpapiere und die Membran in der Größe des Gels zurechtgeschnitten (5,5x16,5cm). Die Whatmanpapiere wurden für 10min in Transferpuffer äquilibriert. Die Membran wurde zunächst für 1min in 100% Methanol aktiviert, einmal mit Wasser gespült und ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. 2 Whatmanpapiere wurden auf die Kathode der Blotkammer gelegt und die Membran auf diese gelegt. Nach Abtrennen des Sammelgels wurde das Trenngel ebenfalls kurz in Transferpuffer äquilibriert und luftblasenfrei auf die Membran übertragen. Darüber wurden 2 Whatmanpapiere gelegt. Um einen gleichmäßigen Stromfluss über die gesamte Fläche zu gewährleisten, wurden mithilfe einer kleinen Küvette eventuell verbliebene

Luftblasen entfernt. Der Transfer erfolgte bei $2\text{mA}/\text{cm}^2$ für 90min. Durch die Verwendung des vorgefärbten Protein Standards konnte der erfolgreiche Proteintransfer überprüft werden.

Nach dem Blotvorgang wurde die Membran für 1h in Blocklösung inkubiert um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Der Erstantikörper wurde in Blocklösung verdünnt und die Membran ü.N. bei 4°C in 4-7ml der Verdünnung inkubiert. Anschließend wurde die Membran 5×10 min mit Waschpuffer 2 gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde 1:10000 in Waschpuffer 2 verdünnt und für 1h inkubiert. Nach 5×10 min Waschen mit Waschpuffer 1 wurde das Signal detektiert.

3.5.7.1 Detektion des Western Blot Signals

Für die Detektion des Western Blot-Signals wurde das ECL Plus Western Blotting Detecting Reagent verwendet, die Detektion erfolgt über Chemilumineszenz. Durch Oxidation des zyklischen Diacylhydrazids Luminol in Gegenwart von H_2O_2 und Meerrettichperoxidase entsteht als Zwischenprodukt ein Acridinium-Ester. Dieser Ester wird durch H_2O_2 weiter oxidiert; das Produkt emittiert Licht mit einem Emissionsmaximum bei 430nm , welches mit einem Autoradiographiefilm detektiert werden kann. Pro Membran wurden 2ml der Lösungen A und B des Kits nach Herstellerangaben 40:1 gemischt auf eine Folie gegeben. Die Membran wurde mit der Proteinseite nach unten luftblasenfrei aufgelegt und 5min inkubiert. Anschließend wurde in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm aufgelegt und nach verschiedenen Expositionszeiten entwickelt.

3.6 Immunologische Methoden

3.6.1 *Ex vivo* Isolation von CD8 T-Zellen aus der Milz

Material:

Erythrozytenlysepuffer
Medium

RPMI + 5% FCS

8-10 Wochen alte immunkompetente BALB/c Mäuse wurden durch intraplantare Injektion mit mCMV infiziert (s. 3.3.3). Die Zellen aus der Milz wurden frühestens 3 Monate p.i. (*Memory-Phase*) isoliert und im ELISpot Assay eingesetzt.

Zunächst wurden die Milzen von 3 Mäusen entnommen und in ein mit Medium gefülltes 15ml-Röhrchen überführt. Dann wurden die Organe über einem sterilen Metallsieb homogenisiert, das Sieb mit Medium gespült und die Zellsuspension pelletiert (5min, $1900\text{U}/\text{min}$, Megafuge 2.0 Heraeus). Zur Erythrozytenlyse wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 3ml Erythrozytenpuffer (1ml/Organ) resuspendiert und für ca. 2min unter Schwenken bei $20\text{-}22^\circ\text{C}$ inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen 2-3-mal mit Medium gewaschen (5min, $1900\text{U}/\text{min}$),

bis der Überstand klar war. Anschließend wurde das Pellet in einem definierten Volumen Medium aufgenommen, über ein 100µm Gazesieb gegeben und die Zellzahl bestimmt (siehe 3.1.2). Die erwartete Zellzahl in der Milz eines unbehandelten Tieres liegt bei etwa 1×10^8 Zellen/Milz. Die CD8 T-Zellen wurden im Anschluss mittels MACS aufgereinigt (siehe 3.6.2).

3.6.2 MACS Separation

Material:

Medium	RPMI + 5% FCS
CD8a (Ly-2) Micro-Beads	Miltenyi Biotech, Nr. 130-049-401
5xMACS-Puffer	2,5% (w/v) BSA
	10mM EDTA
	ad PBS
	steril filtrieren, bei 4°C lagern und vor Gebrauch mit sterilem PBS 1:5 verdünnen

Für die magnetische Zellseparation werden sogenannte Micro-Beads verwendet. Diese bestehen aus monoklonalen Antikörpern an deren F_c -Teil (para)magnetische Partikel gebunden sind. Nach Bindung der Antikörper an epitoptragende Zellen werden diese in einem Magnetfeld einer Separationseinheit zurückgehalten, während die nicht antikörpertragenden Zellen die Säule durchlaufen. Zur Elution wird die Säule außerhalb des Magnetfelds mit Druck gespült und die Zellen aufgefangen (Miltenyi et al., 1990).

In dieser Arbeit wurden mit Hilfe dieser Methode CD8 T-Lymphozyten aus Milzzellen angereichert. Für die Aufreinigung wurde eine dem Protokoll angepasste Menge aufgearbeiteter Milzzellen (siehe 3.6.1) nach dem Zählen in MACS-Puffer aufgenommen und mit CD8a (Ly-2) Micro-Beads versetzt. Standardmäßig wurden je 1×10^7 Zellen 90µl MACS-Puffer und 10µl Micro-Beads eingesetzt. Um eine >95%-ige Reinheit zu erhalten wurden die Zellen über zwei Säulen aufgereinigt. Die Zellen wurden für 15min bei 4°C unter leichtem Schwenken mit den Micro-Beads inkubiert und zur Entfernung von ungebundenen Beads mit MACS-Puffer gewaschen (10min, 300xg). Dann wurden sie in 500µl MACS Puffer pro 1×10^8 Zellen aufgenommen und auf die zuvor im Magnetfeld mit MACS-Puffer äquilibrierte erste Säule gegeben. Dann wurde die Säule 3x mit MACS-Puffer gewaschen, aus dem Magnetfeld genommen und die Zellen mit 5ml MACS-Puffer aus der Säule gespült. Das Eluat wurde auf eine zweite vorher äquilibrierte Säule gegeben, diese dreimal mit MACS-Puffer gewaschen und die Zellen wieder mit 5ml eluiert. Das Eluat wurde mit Medium gewaschen (5min, 300xg), das Pellet in einem geringen Volumen Medium aufgenommen und nach Bestimmung der Zellzahl in einem versuchsbedingten Volumen Medium resuspendiert. Die zu erwartende Frequenz von CD8 T-Zellen beträgt in der Milz etwa 2-5% der Gesamtzellzahl.

3.6.3 Generierung und Restimulation von CTLL

Material:

Medium	RPMI + 5% FCS (v/v) MEM α + 7% FCS (v/v) +/- 200U/ml rh IL-2
Synthetisches Peptid	

Zur Generierung mCMV-Peptidspezifischer CD8 T-Lymphozyten Linien (CTLL) wurden Milzzellen von mCMV-WT infizierten Mäusen im Memory-Stadium aufgearbeitet (siehe 3.6.1) und die CD8 T-Zellen über MACS aufgereinigt (siehe 3.6.2). Die isolierten Zellen wurden für 2-3 Wochen in IL-2 haltigem MEM α kultiviert und mit synthetischen mCMV-Peptiden stimuliert, bevor sie als Effektorzellen im ELISpot Assay eingesetzt wurden.

Nach Aufreinigung der CD8 T-Zellen wurden $1,5 \times 10^7$ Zellen/1,5ml MEM α ohne IL-2 in 24-Well Platten ausgesät und die für die gewünschte T-Zellspezifität benötigte Menge an synthetischem Peptid zugesetzt. Nach 4 Tagen wurden 0,5ml/Well IL-2 haltiges Medium supplementiert. Eine Woche nach der ersten Stimulation wurden die Zellen mit synthetischem Peptid restimuliert. Die weiteren Restimulationen erfolgten alle 2 Wochen. Dazu wurden EL4 Zellen (für das M45D^b-Peptid) oder P815 Zellen (für das m123- oder M105-Peptid) als peptidbeladene Antigen-präsentierende Zellen (APC) eingesetzt. Um zu verhindern, dass die APC in den Kulturen wachsen, wurden sie mit 90Gy bestrahlt und anschließend 8×10^5 Zellen/Well ausgesät. Für die Co-kultivierung mit den APC wurden 5×10^5 Zellen/ml der CTLL verwendet. Nach 2-3 Restimulationen haben die CTLL ihre Epitop-Monospezifität erreicht (Pahl-Seibert et al., 2005). Bevor sie in einem adoptiven Transfer zum Einsatz kamen, wurden sie in einem Zytolysetest (siehe 3.6.4) auf ihre zytolytische Aktivität getestet.

3.6.4 Zytolysetest (⁵¹Cr]-Release-Assay)

Um die zytolytische Effektorfunktion von CTLL zu überprüfen, wurden diese gegen APC im ⁵¹Cr]-Release-Assay getestet (Brunner et al., 1968; Cerottini, 1993).

Dazu werden die APC mit ⁵¹Cr] markiert. Nach Erkennung ihres spezifischen Peptids lysieren die Effektorzellen die APC, wobei das ⁵¹Cr] freigesetzt wird. Die Freisetzung wird in einem γ -Counter gemessen.

Als APC wurden EL4 oder P815 Zellen verwendet. Die Zellen wurden zunächst gewaschen, gezählt und mit $100 \mu\text{Ci}/1 \times 10^6$ Zellen ($\text{Na}_2^{51}\text{Cr}]\text{O}_4$) markiert. Nach 1h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen dreimal mit Medium gewaschen (5min, 300xg), gezählt und auf eine Zelldichte von 1×10^3 Zellen/Well einer 96 Well-Platte eingestellt. Dann wurden sie mit definierten Konzentrationen des synthetischen Peptids beladen und für 1h bei 37°C inkubiert. Alternativ wurden sie mit in der HPLC aufgereinigten Peptiden, die in Form von lyophilisierten Fraktionen (siehe 3.5.1.3) vorlagen, beladen. Hierfür wurden nach Aufnahme der Lyophilisate in kaltem Medium die markierten APC dazu gegeben und für 1h bei 37°C inkubiert.

Währenddessen wurden die CTL gewaschen (5min, 300xg), gezählt und titriert auf die markierten und antigenbeladenen APC gegeben. Nach 5min Zentrifugation bei 120xg wurden die Zellen 4h bei 37°C inkubiert, dann wurden die Zellen abgenommen, durch 10min Zentrifugation bei 680xg pelletiert und 100µl des Überstands in Counter-Röhrchen pipettiert. Die Radioaktivität wurde am γ -Counter gemessen und die spezifische Lyse berechnet.

$$\text{Spezifische Lyse [\%]} = (\text{cpm} - \text{lc}) / (\text{hc} - \text{lc}) \times 100$$

cpm = counts pro min der gemessenen Probe
 lc = low control (APC ohne Effektoren, gemessen wird die durch Spontanlyse freigesetzte Radioaktivität im Überstand)
 hc = high control (APC ohne Effektoren, gemessen wird die Radioaktivität suspendierter Zellen)

3.6.5 Adoptiver Transfer von CTLL

Im adoptiven Transfer (AT) *in vitro* generierter CTLL, kann das schützende antivirale Potential dieser Zellen getestet werden. Immunsupprimierte, mCMV-infizierte Mäuse sterben in der Regel an Tag 10-12 nach Infektion mit mCMV. Zu diesem Zeitpunkt ist die generalisierte Infektion in vielen Organen nachweisbar, die Gabe protektiver CD8 T-Zellen unterdrückt jedoch die Infektion (Reddehase et al., 1985).

Immunsupprimierten Mäusen (siehe 3.3.1) wurden titrierte CTLL in einem Volumen von 0,5ml PBS/Maus (2×10^4 , 1×10^5 oder 5×10^5 CTLL/Maus) i.v. verabreicht. Zusätzlich dienten Tiere, die keine CTLL erhalten hatten als Kontrolle. Die Tiere wurden anschließend mit $1 \times 10^5/25\mu\text{l}$ PBS/Maus mCMV intraplantar infiziert (siehe 3.3.3). 11 Tage nach dem Transfer wurden die Organe entnommen (siehe 3.3.4) und die Virusreplikation in Milz und Lunge mittels Plaquetest ermittelt (siehe 3.2.2.2). In den Lebern wurde in der Immunhistologie die Anzahl der IE1-positiven Zellen bestimmt (siehe 3.7).

3.6.6 ELISpot (Enzyme linked immuno spot) Assay

Material:

ELISpot-Mikrotiterplatten	
Blockmedium	MEM α + 10% FCS
Waschlösung	PBS + 0,01% Tween20
α -Maus-IFN- γ (Fängerantikörper)	5µg/ml PBS; pro Vertiefung 55µl
α -Maus-IFN- γ biotinkoppelt (Detektionsantikörper)	1µg/ml PBS + 0,5% BSA
Streptavidin-Alkalin Phosphat	1:1000 in PBS
BCIP/NBTplus	vor Gebrauch filtrieren (0,45µm)

Aktivierete CD8 T-Zellen produzieren und sezernieren IFN- γ . Die Sezernierung dieses Zytokins, aber auch die Zahl IFN- γ -produzierender Zellen kann im ELISpot Assay nachgewiesen werden.

Das Prinzip der Detektion des sezernierten Antigens im ELISpot Assay beruht auf einem klassischen Sandwich-ELISA: Der Fängerantikörper ist durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der PVDF-Membran am Boden einer ELISpot-Mikrotiterplatte immobilisiert und die von den Zellen sezernierten Antigene werden in einem ersten Schritt direkt von diesem gebunden. In einem zweiten Schritt wird das Antigen von einem enzymgekoppelten, ebenfalls antigenbindenden Detektionsantikörper erkannt. Diese Bindung kann in einer enzymatischen Farbreaktion dargestellt werden. Dabei bildet jede Antigen-sezernierende Zelle einen Spot, dessen Größe mit der Menge an Antigen korreliert und damit auch eine Abschätzung der Antigenmenge erlaubt (Czerkinsky et al., 1988; Miyahira et al., 1995).

Einen Tag vor dem Assay wurde die Membran der einzelnen Wells der ELISpot-Platte mit je 200µl frisch angesetzttem 35%-igem Ethanol für 1min aktiviert und dreimal mit 200µl/Well PBS gewaschen. Dann wurden in jedes Well 55µl des verdünnten α -Maus-IFN- γ Fängerantikörpers gegeben und ü.N. bei 4°C inkubiert.

Durch zweimaliges Waschen mit dH₂O wurde ungebundener Antikörper entfernt. Um freie Membranbindungsstellen zu blockieren wurden 200µl Blockmedium/Well zugegeben und für mindestens 2h bei 37°C inkubiert. Währenddessen wurden die APC geerntet, gewaschen (5min, 300xg, Heraeus Megafuge 2.0), gezählt und auf eine Zellzahl von $1 \times 10^5/50\mu\text{l}$ pro Well eingestellt. Als APC dienten infizierte MEF (siehe 3.2.3) (90min p.i.). Die als Effektorzellen dienenden CD8 T-Zellen wurden frisch isoliert (siehe 3.6.1), aufgearbeitet (siehe 3.6.2), gewaschen und titriert. Wurden CTLL als Effektoren verwendet, wurden diese dreimal mit Medium gewaschen (5min, 300xg) und anschließend gezählt und titriert. Nach der Blockierung wurde das Medium entfernt, 50µl der APC und 100µl der Effektoren als Triplikate hinzu pipettiert und ü.N. (14-18h) bei 37°C im Brutschrank co-kultiviert.

Die Platten wurden nun 10mal mit 200µl/Well Waschlösung gewaschen, je 50µl des Detektions-Antikörpers pro Well auspipettiert und der Ansatz für 2h bei 20-22°C inkubiert. Ungebundener Detektions-Antikörper wurde durch 6-maliges Waschen mit 200µl/Well Waschlösung entfernt, je 100µl des Streptavidin-Alkalin Phosphat Enzyms pro Well pipettiert und für 45min bei 20-25°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten dreimal mit 200µl Waschlösung und dreimal mit PBS gewaschen. Dann wurden 100µl des Substrats BCIP/NBTplus pro Well gegeben. Nach etwa 20min Inkubation bei 20-25°C wurden Spots sichtbar und die Platten wurden unter fließendem Wasser gründlich gewaschen. Nachdem die Platten getrocknet waren, wurden die Spots an einem Mikroskop ausgezählt (Olympus SZX 12).

3.6.7 Zytofluorometrische Analyse

Die Durchflusszytometrie dient der Analyse von Oberflächenantigenen oder intrazellulärer Proteine auf Einzelzellebene und ermöglicht hierdurch die biochemische und funktionelle Zellcharakterisierung.

Eine Einzelzellsuspension wird mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt und passiert im Durchflusszytometer einen fokussierten Laserstrahl. Beim Durchtritt der Zellen durch den Fokus des Lasers wird zunächst die Lichtstreuung der Zellen als Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*, FSC) und die Lichtstreuung in einem 90° Winkel als Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*, SSC) detektiert. Der FSC ermöglicht hierbei eine grobe Charakterisierung der Zellgröße, während der SSC die Granularität und Struktur der Zelle angibt. Zusätzlich werden die Antikörper-gekoppelten Fluorochrome energetisch angeregt und emittieren Licht mit definierter Wellenlänge beim Rückgang auf ein energetisches Grundniveau. Diese Emission wird über hochempfindliche Photozellen detektiert. Um bei Mehrfachfärbungen die verschiedenen Emissionsspektren der verwendeten Fluorochrome zu unterscheiden, werden in der optischen Messeinheit zusätzlich Farbteilerspigel und Bandpassfilter eingesetzt. Da sich die Emissionsspektren der eingesetzten Fluorochrome teilweise überlappen, müssen die erhobenen Daten durch Kompensation korrigiert werden. Zusätzlich können bei der Analyse Zellpopulationen, die sich über mehrere Parameter definieren, über *Gates* verknüpft werden. Für diese Arbeit wurde das Durchflusszytometer FC500 von Beckman Coulter mit der Gerätesoftware CXP verwendet.

3.6.7.1 Färbung von Oberflächenmolekülen

Material:

FACS-Puffer	1% FCS (v/v) in PBS
Fc-Block	CD16/CD32 Rezeptorantikörper

Die Färbung von Oberflächenmolekülen wurde angewandt um die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Komplexen oder von RAE-1 auf mCMV-infizierten MEF zu bestimmen. MEF wurden entweder 48h vor der zentrifugalen Infektion (siehe 3.2.3) mit IFN- γ vorbehandelt (siehe 3.1.4) oder blieben unbehandelt. 16h nach der Infektion wurde der Überstand abgenommen und in einem 50ml Falcon gesammelt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gespült und anschließend mit Trypsin/EDTA abgelöst. Dann wurden sie mit dem Überstand vereint und zweimal mit je 10ml Medium gewaschen (300xg, 10min). Nach Aufnahme in 1ml FACS-Puffer wurden sie gezählt (siehe 3.1.2).

Für die zytofluorometrischen Analysen wurden je Ansatz 5×10^5 Zellen eingesetzt. Um antigen-unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren wurden die Zellen zunächst mit 2 μ l Fc-Block in 98 μ l FACS-Puffer für 5-10min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die benötigten Antikörper hinzugegeben und mit den Zellen für 20min bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen

der Zellen mit 1ml FACS-Puffer (300xg, 5min) wurden diese in 500µl PBS aufgenommen und für die FACS Messung eingesetzt.

3.6.7.2 Färbung intrazellulärer Proteine

Material:

FACS-Puffer	1% FCS (v/v) in PBS
Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Solution Kit with BD GolgiPlug	

Zum Nachweis infizierter MEF im Durchflusszytometer wurde das intrazelluläre virale Protein *m164/gp36,5* nachgewiesen. Für die Färbung wurden jeweils 5×10^5 Zellen eingesetzt. Nach Zugabe von 2µl F_c-Block und anschließender Inkubation mit den Antikörpern für die Oberflächenfärbung (siehe 3.6.7.1) wurden die Zellen in 100µl Cytofix/Cytoperm aufgenommen und für 30min bei 4°C inkubiert, hierbei werden die Zellen erst fixiert und anschließend permeabilisiert. Dann wurden die Zellen mit 1ml PermWash-Puffer gewaschen (300xg, 5min), der Antikörper für die intrazelluläre Färbung hinzugegeben und für 30min bei 4°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1ml FACS-Puffer wurde ein Zweitantikörper hinzugegeben und die Zellen für weitere 30min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit 1ml PermWash-Puffer gewaschen und für die FACS-Messung in 500µl PBS aufgenommen.

3.7 Immunhistochemie (IHC)

Um die Menge an infizierten Zellen nach Infektion mit verschiedenen rekombinanten mCMV *in situ* vergleichen zu können wurde in der Leber das virale IE1-Protein in histologischen Schnitten mittels Immunhistochemie nachgewiesen und IE1 positive Zellen ausgezählt. Zum weiteren Vergleich zweier Viren wurden außerdem die viralen Proteine E1, MCP, m04, m06 und m152 nachgewiesen.

3.7.1 Vorbereitung der Organe

Material:	
Formalin 4% (gepuffert)	66mM KH ₂ PO ₄ 84mM Na ₂ HPO ₄ 140ml Formalin 37% (v/v) ad H ₂ O mit NaOH pH auf 7,4 einstellen

Die entnommenen Lebern wurden für mindestens 18h in 4% (v/v) gepuffertem Formalin fixiert und anschließend für mindestens 2h in Leitungswasser gewaschen. Die Dehydrierung der Organe erfolgte anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Nach vollständiger Dehydrierung wurden die Organe in Paraffin eingebettet. Danach sind die Gewebestücke bei

20-22°C fast unbegrenzt lagerungsfähig. Die Gewebestücke wurden zum Schneiden bei -20°C eingefroren und am Mikrotom mit einer Schichtdicke von 2µm geschnitten. Die Gewebeschnitte wurden in einem Kaltwasserbad (20°C) aufgefangen und in einem Warmwasserbad (40°C) gestreckt um anschließend auf einem Objektträger aufgezogen zu werden. Dann wurden sie bei 37°C im Brutschrank getrocknet.

<u>Aufsteigende Alkoholreihe</u>				<u>Paraffineinbettung</u>	
20%	Isopropanol	1x	45min	4h	55°C
40%	Isopropanol	1x	45min	ü.N.	55°C
60%	Isopropanol	1x	45min	4h	55°C
80%	Isopropanol	1x	45min	Einblocken bei 55-70°C	
90%	Isopropanol	1x	45min		
100%	Isopropanol	2x	45min		
100%	Isopropanol	1x	18h		
100%	Xylol	3x	60min		

Bevor die Gewebeschnitte weiterbehandelt werden können, müssen sie von Paraffin befreit und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert werden.

<u>Absteigende Alkoholreihe</u>			
100%	Xylol	3x	5min
90%	Isopropanol	1x	1min
70%	Isopropanol	1x	1min
50%	Isopropanol	1x	1min
	H ₂ O	1x	2min

3.7.2 mCMV-IHC

Material:	
Blockierlösung	0,6ml H ₂ O ₂ 30% (v/v) 59,6ml Methanol
Substrat	10mg 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) 75mg Ammoniumnickel (II) sulfat Hexahydrat in 50ml Tris-HCl (50mM, pH 7,5) 17µl H ₂ O ₂ 30% (v/v)
Tris Buffered Saline (TBS)	100mM Tris 150mM NaCl ad H ₂ O, pH 7,5
Trypsin	3,4mM EDTA 137mM NaCl 6,5mM Na ₂ HPO ₄ 2,7mM KCl 1,5mM KH ₂ PO ₄ ad H ₂ O pH auf 7,5 einstellen, autoklavieren und dann 1,25g Trypsin zugeben; bei 4°C lagern
Vectastain ABC-Peroxidase Kit	

Mit der Immunhistochemie (IHC) lassen sich spezifische Antigene in Organschnitten nachweisen. Dazu wird das Gewebe mit einem antigenspezifischen Primärantikörper und einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Die Antikörperbindung kann in

der Folge mittels Avidin-Biotin-Peroxidase-Färbung hochsensitiv nachgewiesen werden. Das Substrat der Färbung ist Diaminobenzidin (DAB), die Färbung kann durch den Zusatz von Nickelsulfat noch intensiviert werden (Bildung von schwarzen Präzipitaten).

Der Nachweis von mCMV infizierten Zellen in einer Wachstumskinetik, nach AT oder NK-Depletion erfolgte standardmäßig in der IHC mit einem anti-mCMV-IE1 (pp89)-spezifischen Antikörper (Croma 101). Um Viren auf Unterschiede hinsichtlich ihrer Proteinexpression im Gewebe zu untersuchen, wurde die IHC mit Antikörpern spezifisch für E1, MCP, m04, m06 und m152 durchgeführt. Die rehydrierten Gewebeschnitte wurden zur Permeabilisierung für 15min bei 37°C in Trypsin-Lösung inkubiert und danach für 3min in $H_2O_{demin.}$ gewaschen.

Endogene Peroxidasen wurden durch 30min Inkubation bei 20°C in Blockierlösung inaktiviert und die Schnitte anschließend für 3min in $H_2O_{demin.}$ gewaschen. Unspezifische Antikörper-Bindungsstellen wurden durch 30min Präinkubation mit 1:10 in TBS verdünntem Kaninchenserum geblockt. Alle weiteren Schritte erfolgten in einer feuchten Kammer um das Austrocknen der Präparate zu vermeiden. Nach Zugabe des IE1-spezifischen Antikörpers Croma 101 (1:250 verdünnt in TBS) wurden die Gewebeschnitte für 18h bei 4°C inkubiert. Nichtgebundene Antikörper wurden durch einmaliges Waschen mit TBS entfernt. Im Anschluss daran wurden die Gewebeschnitte für 30min bei 20-22°C mit einem polyklonalen Ziege-anti-Maus IgG (1:200 in TBS) inkubiert.

Der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Vectastain ABC Kit PK-4000) wurde nach Anleitung des Herstellers angesetzt und die Gewebeschnitte für 30min damit inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für 10min in TBS gewaschen und für 5-10min bei 20°C mit dem Substrat inkubiert. Überschüssiges Substrat wurde durch dreimaliges Waschen für 1min mit H_2O entfernt und die Schnitte wurden für 5 Sekunden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Dabei färben sich die Zellkerne nicht infizierter Zellen blau. Abschließend wurden die Gewebeschnitte in einer schnell aufsteigenden Alkoholreihe wieder dehydriert und durch Einbetten in das synthetische Einschlussmittel Entellan dauerhaft konserviert. Für ein genaues Protokoll siehe Podlech et al. (2002), Wilhelmi et al. (2008) und Lemmermann et al. (2012).

Schnell aufsteigende Alkoholreihe

50%	Isopropanol	1x	30s
70%	Isopropanol	1x	30s
90%	Isopropanol	1x	30s
100%	Isopropanol	2x	30s
100%	Xylol	3x	kurz

Die Zahl der positiven Zellen pro Fläche Gewebeschnitt (10mm²) wurde nach der Färbung im Durchlichtmikroskop bestimmt.

4 Ergebnisse

4.1 Neu-Charakterisierung der mCMV-Rekombinante $\Delta m06^W$

Die Immunevasionsproteine von mCMV bewirken eine verminderte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche infizierter Zellen (Reddehase, 2002; Wagner et al., 2002; Holtappels et al., 2006b) und dadurch eine verminderte Präsentation viraler Antigene (Holtappels et al., 2006a; b; Doom & Hill, 2008; Lemmermann et al., 2010a). Nach Infektion mit vRAP-Deletionsmutanten, welche die vRAPs in allen möglichen Kombination exprimieren, wurde bereits gezeigt, dass m152 der stärkste Inhibitor der Antigenpräsentation ist, während m06 die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression am effektivsten inhibiert. m04 alleine konnte dabei keine inhibitorische Funktion zugewiesen werden (Wagner et al., 2002; Holtappels et al., 2006a; Pinto et al., 2006). Nach solitärer Deletion der vRAPs konnten auch synergistische Effekte von zwei vRAPs untersucht werden. Die Rekombinante $\Delta m06$ (nur m04 und m152 werden exprimiert) zeigte dabei einen interessanten Phänotyp: Nach Infektion von MEF mit dieser Rekombinante waren sowohl die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression als auch die Antigenerkennung durch CD8 T-Zellen (Wagner et al., 2002; Holtappels et al., 2006a; Pinto et al., 2006) weitgehend wiederhergestellt. m04 schien daher in Abwesenheit von m06 als dominanter Antagonist von m152 zu wirken und hob den inhibitorischen Effekt dieses vRAP auf. Der dahinterliegende Mechanismus, d.h. ob m04 die Expression von m152 negativ reguliert, oder ob m04 noch vor m152 die MHC-Klasse-I-Moleküle bindet und somit vor einer Retention im ERGIC schützt, blieb jedoch unerklärt.

In dieser Arbeit sollte deshalb der Mechanismus hinter der m04-Wirkung auf m152 untersucht werden. Da eine Revertierung des $\Delta m06$ aufgrund der von Wagner et al. (2002) gewählten Mutagenese-Strategie technisch nicht möglich war, wurden in unserer Arbeitsgruppe von N. Lemmermann zwei neue, mit unterschiedlichen Methoden generierte Viren hergestellt: $\Delta m06^{L1}$ und $\Delta m06^{L2}$ (Fink et al., 2012).

Anmerkung: Da sich die Daten von $\Delta m06^{L1}$ und $\Delta m06^{L2}$ nicht unterscheiden, wird in den meisten Abbildungen nur das Ergebnis von $\Delta m06^{L1}$ gezeigt. Es wird dann als $\Delta m06^L$ bezeichnet. Das von Wagner et al. (2002) publizierte Virus wird hier $\Delta m06^W$ genannt.

4.1.1 In der Mutante $\Delta m06^W$ ist die Expression von m152/gp40 verringert

Um die generelle Expression aller drei vRAPs in allen vorhandenen vRAP-Deletionsmutanten zu untersuchen, wurden MEF mit dem kompletten Set an Immunevasions-Mutanten infiziert, 6h p.i. die Proteine extrahiert (siehe 3.5.2) und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Abb. 4.1 bestätigt die Identität der gesetzten Deletionen und zeigt die Expression der restlichen vRAPs.

Überraschend war nach Infektion mit dem bereits publizierten $\Delta m06^W$ keine m152-spezifische Bande zu detektieren. Dagegen exprimiert die neu generierte Rekombinante $\Delta m06^L$ das m152-Protein in einer vergleichbaren Menge wie die Viren, in denen m06 vorhanden ist.

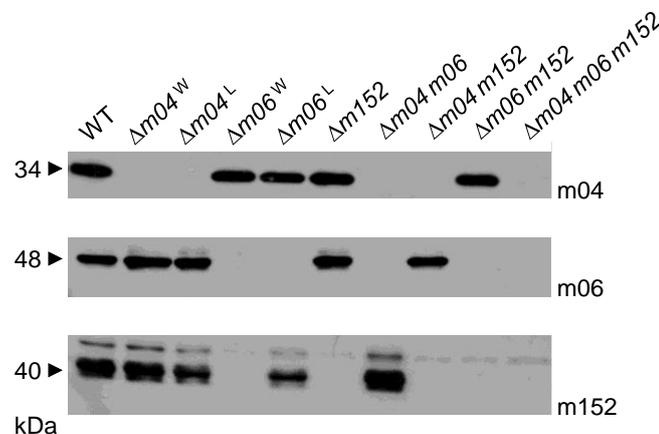


Abb. 4.1 Expression der vRAPs in den unterschiedlichen vRAP-Deletionsmutanten.

MEF wurden zentrifugal (MOI=4) mit den angegebenen Viren infiziert. Nach 6h wurden die Zellen geerntet und die Proteine extrahiert. Je 30 μ g Gesamtproteinlysate wurden in einer 12,5%-igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die vRAPs m04/gp34, m06/gp48 und m152/gp40 wurden mit den Antikörpern 1718-1 (1:5000), 1516-3 (1:350) bzw. M3D10 (1:250) detektiert. Verändert nach Lemmermann et al., 2012.

Um zu prüfen, ob die fehlende Expression von m152 auch *in vivo* nachzuweisen ist, wurde eine immunhistologische Analyse durchgeführt. Dazu wurden immunsupprimierte C57BL/6 Mäuse mit WT oder $\Delta m06^W$ infiziert und 12 Tage nach Infektion die Lebern entnommen. In der darauf folgenden IHC-Analyse wurden sowohl IE-, E- und L-Phasen-spezifische Proteine (IE1, E1 und MCP) als auch die vRAPs m04, m06 und m152 in den Gewebeschnitten gefärbt. Bei der Expression von IE1, E1, MCP und m04 zeigte sich kein Unterschied zwischen den Viren (Abb. 4.2). Wie erwartet wird m06 von der Deletionsmutante nicht exprimiert. Im Gegensatz zum Western Blot konnten in der IHC m152-positive Zellen nachgewiesen werden, allerdings war die Anzahl der Zellen wesentlich geringer als nach Infektion mit WT (Abb. 4.2 A und B).

Auch in der Immunfluoreszenz gelang es, m152 nachzuweisen (nicht publizierte Daten von J. Podlech) und durch eine Erhöhung der aufgetragenen Proteinmengen im Western Blot war eine spezifische m152 Bande nach $\Delta m06^W$ -Infektion nachzuweisen (nicht gezeigt). Das Protein wird also weiterhin synthetisiert, aber die exprimierte Menge ist drastisch reduziert. Dies geht bei genauer Betrachtung auch aus der Originalarbeit über $\Delta m06^W$ im Western Blot hervor (Wagner et al., 2002).

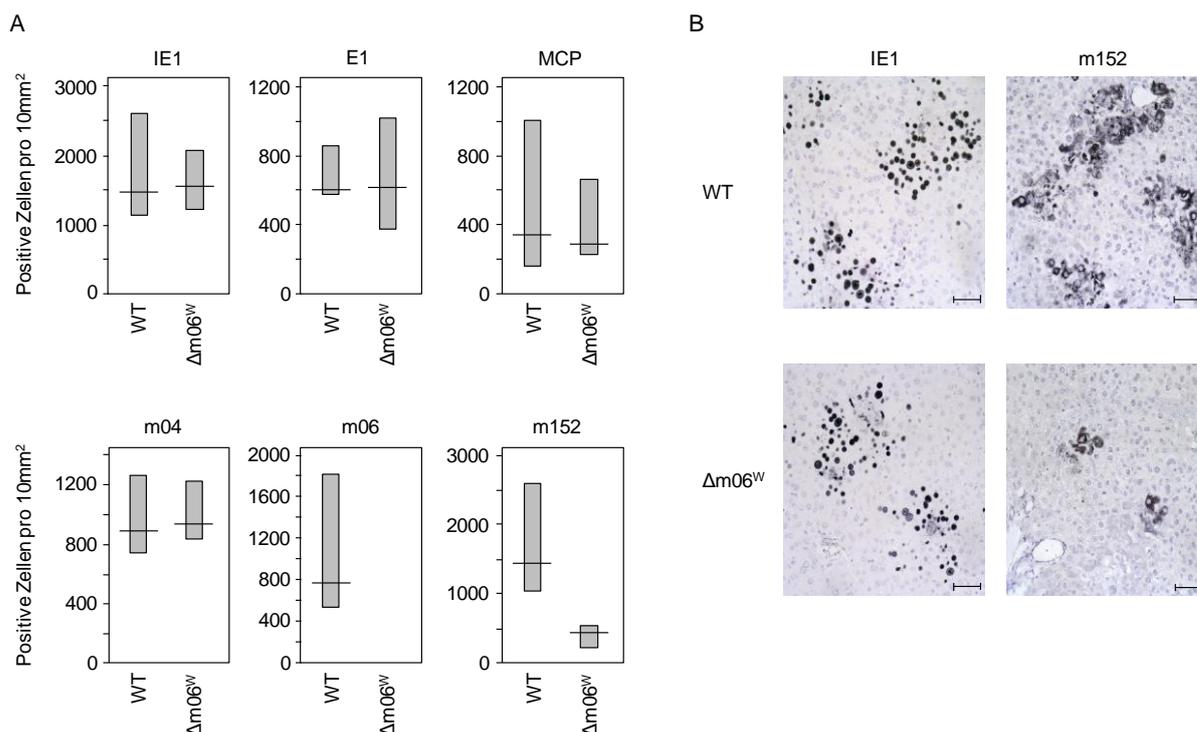


Abb. 4.2 Expression der vRAPs und Proteine der IE-, E- und L-Phase nach Infektion mit WT oder $\Delta m06^W$ in der Immunhistochemie.

C57BL/6-Mäuse wurden durch γ -Bestrahlung immunsupprimiert und anschließend mit 1×10^5 pfu/25 μ l PBS/Maus intraplantar mit WT oder $\Delta m06^W$ infiziert. 12d p.i. wurde den Tieren die Leber entnommen und (A) die Anzahl infizierter Zellen durch IE1-, E1-, MCP-, m04-, m06- oder m152-spezifische IHC für eine repräsentative Fläche von 10mm² ermittelt. Die Balken stellen die Gesamtbereiche der Einzeltierbestimmungen dar, die Mediane sind als horizontale Balken eingezeichnet. (B) Immunhistologischer Nachweis von intranukleärem IE1 und m152 in infizierten Leberzellen. Die Länge des Balkens entspricht 50 μ m.

4.1.2 Die neu generierten $\Delta m06$ -Rekombinanten inhibieren die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression

Nachdem $\Delta m06^L$ eine dem WT vergleichbare Expression von m152 zeigte, sollte nun untersucht werden, wie sich die neu generierten $\Delta m06$ -Rekombinanten in Bezug auf ihre MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression verhalten. Sollte m04 in Abwesenheit von m06 tatsächlich einen inhibitorischen Effekt auf die Funktion von m152 haben, dann sollte die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression nicht inhibiert sein.

Um den Einfluss von m04 und m152 alleine und in Kombination auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression zu untersuchen, wurden MEF mit den entsprechenden Viren infiziert und 16h p.i. wurde die Expression von MHC-Klasse-I-Komplexen (H2-K^d) auf der Zelloberfläche zytofluorometrisch analysiert (siehe 3.6.7). Als Marker für infizierte Zellen diente das virale Protein m164/gp36,5.

Während $\Delta m06^W$ -infizierte MEF eine hohe MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression (Abb. 4.3) zeigen, die nur unwesentlich schwächer ist als nach Infektion mit $\Delta m06\Delta m152$ (nur m04 wird exprimiert), induzieren die beiden neu generierten Viren eine starke Reduktion der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression; vergleichbar mit dem Virus $\Delta m04m06$, von dem nur m152

exprimiert wird. In Bezug auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression scheint m04 in den neu generierten Viren also keinen oder nur einen minimalen inhibitorischen Effekt zu haben.

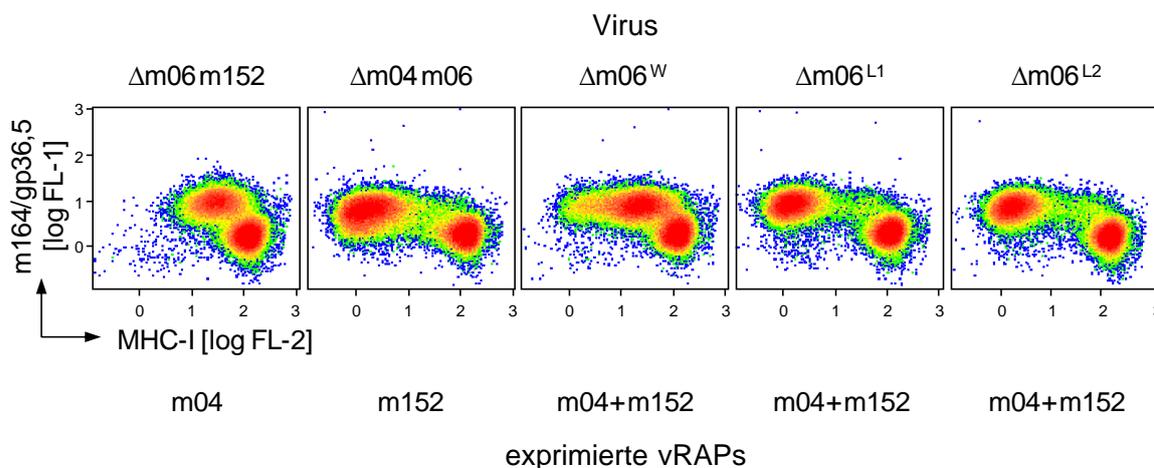


Abb. 4.3 MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression in Abhängigkeit der exprimierten vRAPs.

MEF wurden zentrifugal (MOI=4) mit den angegebenen Viren infiziert. Unten sind die jeweils exprimierten Proteine angegeben. 16h p.i. wurde MHC-Klasse-I-K^d (1:1000; PE-gekoppelt) an der Oberfläche und intrazelluläres m164/gp36,5 (1:20; Zweitantikörper AF-488) detektiert. Anschließend wurden die Zellen zytofluorometrisch analysiert. Dargestellt sind je 50000 Zellen. $\Delta m06^W$ ist das bereits beschriebene, von M. Wagner generierte Virus, $\Delta m06^{L1}$ und $\Delta m06^{L2}$ sind die in unserem Labor neu hergestellten vRAP-Rekombinanten; n.i. nicht infizierte Zellen. Verändert nach Lemmermann et al., 2012.

4.1.3 Die neu generierten $\Delta m06$ inhibieren die Präsentation viraler Antigene

In der Zytofluorometrie konnte mit den neu generierten $\Delta m06$ -Rekombinanten ein inhibitorischer Einfluss von m04 auf die Wirkung von m152 nicht bestätigt werden. Da $\Delta m06^W$ auch in Hinblick auf die Antigenpräsentation diesen negativen Einfluss vermuten ließ, wurde im Folgenden die Antigenpräsentation von infizierten Zellen im ELISpot Assay genauer untersucht.

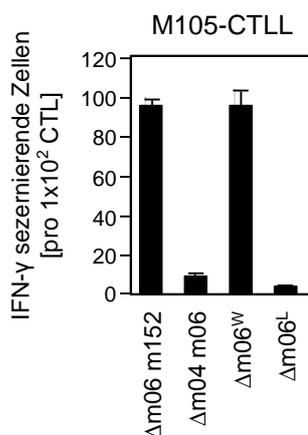


Abb. 4.4 Antigenpräsentation in Abhängigkeit der exprimierten vRAPs.

MEF wurden zentrifugal (MOI=4) mit den angegebenen Viren infiziert und 90min p.i. in den ELISpot Assay eingesetzt. Als Effektoren dienen M105-spezifische CTL. Die Frequenzen IFN- γ produzierender CD8 T-Zellen wurden mittels linearer Regressionsanalyse mit Hilfe der Statistik-Software Mathematica V8 ermittelt. Die 95% Konfidenzintervalle sind als Fehlerbalken dargestellt. Verändert nach Lemmermann et al., 2012.

Auch hier unterscheiden sich die neu generierten Viren von $\Delta m06^W$ (Abb. 4.4). Nach Infektion mit $\Delta m06^W$ können M105-spezifische CTL an der Oberfläche präsentierte Peptide vergleichbar wie nach Infektion mit $\Delta m06\Delta m152$ erkennen. Mit dem neu generierten $\Delta m06^L$ infizierte Zellen dagegen zeigen fast keine Antigenpräsentation und die CTL sezernieren dementsprechend auch kein IFN- γ .

Die fehlende Inhibition der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression und der Antigenpräsentation nach Infektion mit der Rekombinante $\Delta m06^W$ konnte mit den neu generierten Viren nicht beobachtet werden. Sequenzierungen der Genregion von m152 (ORF, 3'- und 5'-UTRs, Promotorbereich) zeigten keine Sequenzunterschiede zwischen $\Delta m06^W$ und $\Delta m06^L$ (nicht gezeigt), so dass ein in der m152 Genregion lokalisierter mutationsbedingter Phänotyp ausgeschlossen werden kann.

4.1.4 Fehlen der gp48 Isoform des m152-Proteins in mit $\Delta m06^W$ infizierten Zellen

Die Ursache für die Defizienz von m152 in $\Delta m06^W$ ist bisher vollkommen ungeklärt. Es stellte sich nun die Frage, ob die stark verminderte Expression des Proteins (vgl. 4.1.1) durch einen schnelleren Abbau verursacht wird. Dazu wurde eine Kinetik der m152-Proteinexpression durchgeführt. 6h nach Infektion wurde die Translation durch die Zugabe von Cycloheximid (CHX) für 0 bis 3h inhibiert und die Expression analysiert. Um höhere Proteinmengen zu erhalten, wurde m152 mittels IP angereichert.

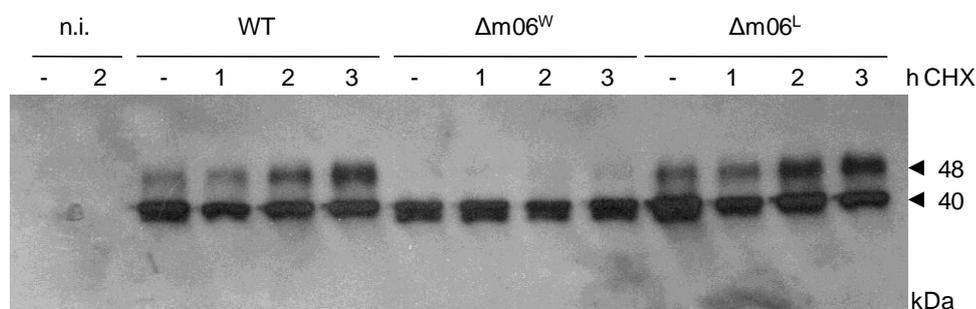


Abb. 4.5 Proteinexpression von m152 nach Zugabe von CHX.

MEF wurden zentrifugal (MOI=4) mit den angegebenen Viren infiziert und 6h p.i. für die angegebenen Zeiten mit CHX inkubiert. Nach Proteinextraktion wurde mit 430 μ g Gesamtprotein eine m152-IP mit dem Antikörper 152.01 (1:100) und Dynabeads durchgeführt. Das Präzipitat wurde in einem 12,5%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und m152 mit dem Antikörper M3D10 (1:250) detektiert; n.i. nicht infizierte Zellen. Verändert nach Fink et al., 2013.

Hier zeigt sich, dass sich die Proteinexpression von WT und $\Delta m06^L$ nicht unterscheidet (Abb. 4.5). Das Protein ist 6h p.i. nachweisbar mit einer prominenten Bande bei 40kDa und einer weiteren, schwächeren Bande bei ca. 48kDa. Nach Blockade der Translation mit CHX wird die 48kDa-Bande prominenter. Diese Bande war nach Infektion mit $\Delta m06^W$ nicht nachweisbar und es zeigt sich über den gesamten Zeitraum ein einheitliches Bild mit einer Bande bei 40kDa. Die Abnahme der unteren und die gleichzeitige Zunahme der oberen Bande über den Zeitraum von 3h legte die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um unterschiedlich glykosylierte

Isoformen von m152 handelt. Um dies zu überprüfen wurden die präzipitierten Proteine mit Endo H oder PNGase F deglykosyliert.

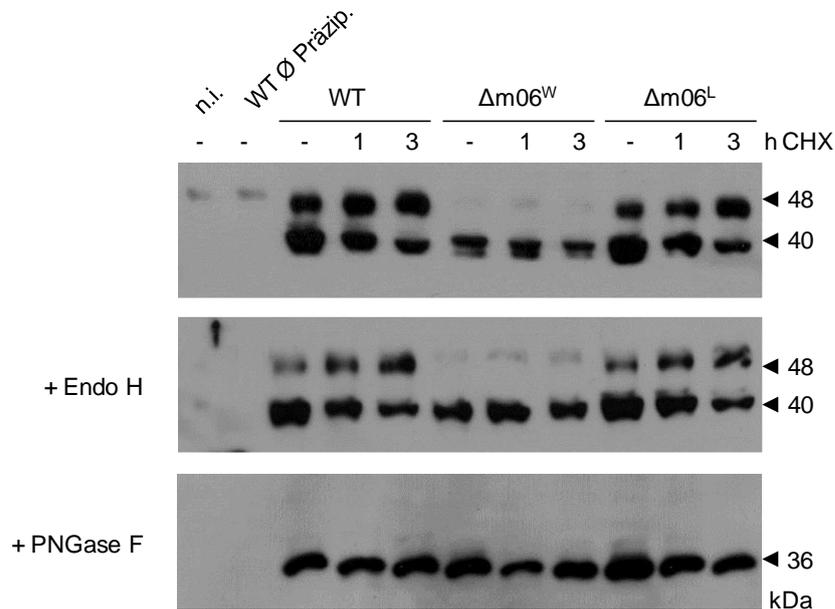


Abb. 4.6 Deglykosylierung mit Endo H oder PNGase F.

MEF wurden mit den angegebenen Viren zentrifugal infiziert (MOI=4) und 6h p.i. für die angegebenen Zeiten mit CHX inkubiert. Die Proteine wurden extrahiert und eine m152-IP mit 430µg Gesamtprotein durchgeführt (vgl. Abb. 4.5). Die Präzipitate blieben unbehandelt oder wurden mit 750U Endo H oder 1000U PNGase F deglykosyliert und anschließend in einem 12,5%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und m152 mit dem Antikörper M3D10 (1:250) detektiert; n.i. nicht infizierte Zellen; WTØ Präzip, die m152-IP wurde ohne präzipitierenden Antikörper durchgeführt. Verändert nach Fink et al., 2013.

Wie in Abb. 4.6 zu sehen, sind alle präzipitierten Proteine Endo H resistent, sie durchlaufen demnach das ER und den Golgi-Apparat und werden dabei mit komplexen Zuckerresten beladen, die durch Endo H nicht abgespalten werden können. PNGase F dagegen entfernt auch komplexe Zuckerreste und die Proteine aller Viren fallen auf eine molekulare Masse von ca. 36kDa zurück.

Die mengenmäßige Zunahme von gp48 ohne weiterhin stattfindende Proteinsynthese und die gleichzeitige Abnahme an gp40 lässt die Vermutung zu, dass gp40 ein Vorläuferprodukt der höher glykosylierten Isoform gp48 darstellt.

4.2 Generierung einer m152-Glykosylierungsmutante durch Zwei-Schritt-Rekombination

Die fehlende Inhibition der Antigenpräsentation und MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression nach Infektion mit $\Delta m06^w$ geht mit einer fehlenden höheren Glykosylierungsform von m152 einher. Die Überlegung war daher, dass gp48 möglicherweise die funktionelle Isoform für die

m152-vermittelte Immunevasion darstellt. In der Aminosäure (AS)-Sequenz von m152 werden 3 potentielle N-Glykosylierungsstellen vorhergesagt: Asn61, Asn208 und Asn241. Zunächst sollten mittels Transfektionsexperimenten die tatsächlich genutzten N-Glykosylierungsstellen identifiziert werden und im weiteren Verlauf der Arbeit ein rekombinantes Virus generiert werden, in welchem diese Positionen selektiv ausgeschaltet werden, so dass keine N-Glykosylierung mehr stattfinden kann.

4.2.1 Mutation der N-Glykosylierungsstellen von m152

Um die N-Glykosylierung von m152 zu kartieren, wurden insgesamt 8 Expressionsplasmide hergestellt. Neben der WT-Sequenz wurden die N-Glykosylierungsstellen in allen möglichen Kombinationen mutiert, so dass anstelle von Asn (Einbuchstabencode: N) für Gln (Q) kodiert wird. Durch Subklonierung des m152-Gens über *Bam*HI/*Hind*III-Restriktion aus dem Vektor pDrive_m152 in pUC19 und von dort über eine *Eco*RI-Restriktion in den Vektor pcDNA3.1mycHis(+)*A* wurde das Plasmid pcDNA_m152 generiert. Es diente als Ausgangsmatrize für die Einzelaustausche N61Q, N208Q bzw. N241Q mit Hilfe des QuikChange Site Directed Mutagenesis Kits. Hierbei wurden die *Primerpaare* m152_N61Q_for/rev, m152_N208Q_for/rev bzw. m152_N241Q_for/rev mit den Komponenten des Kits nach Herstellerangaben eingesetzt. Nach Abschluss der Mutagenese nach dem in 3.4.22.1 beschriebenen Protokoll konnten die Konstrukte pcDNA_m152_N61Q, pcDNA_m152_N208Q und pcDNA_m152_N241Q generiert werden. pcDNA_m152_N61Q diente wiederum als Ausgangsvektor für die weiterführende Mutagenese von N208Q bzw. N241Q nach dem gleichen Prinzip, so dass die Konstrukte pcDNA_m152_N61/208Q und pcDNA_m152_N208/241Q erzeugt werden konnten. Das Plasmid pcDNA_m152_N208Q wurde dementsprechend als Ausgangsmatrize für die Generierung von pcDNA_m152_N208/261Q verwendet, während pcDNA_m152_N61/208Q zur Generierung von pcDNA_m152_N61/208/241Q (m152 Δ 3Glyc) diente. Die einzelnen Mutationen wurden anschließend durch Sequenzierung bestätigt.

Um den Einfluss der veränderten N-Glykosylierungsstellen zu untersuchen, wurden mit den generierten Expressionsplasmiden COS-7-Zellen transfiziert (siehe 3.1.5.2). 48h nach Transfektion wurde aus den Zellen Gesamtprotein extrahiert (siehe 3.5.2), jeweils 30 μ g Gesamtprotein mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die m152 Isoformen im Western Blot dargestellt.

Von den Austauschen N61Q, N208Q und N241Q führten nur die beiden erstgenannten zu einer Abnahme der molekularen Masse von m152 um 2kDa (siehe Abb. 4.7). Dies deutet darauf hin, dass die AS-Position Asn241 nicht genutzt wird, wenn die beiden anderen Glykosylierungsstellen vorhanden sind. Der Doppelaustausch N61/208Q resultiert in einer

prominenten Bande bei ca. 36kDa (vergleichbar mit p36 nach PNGase F-Behandlung; vgl. Abb. 4.6) und einer schwachen Bande bei 38kDa, so dass es scheint, als ob in Abwesenheit der beiden prädominanten Glykosylierungsstellen die dritte doch genutzt werden kann. Die Auslöschung aller drei Glykosylierungsstellen ($\Delta 3\text{Glyc}$) führte ebenfalls zu p36 als prominente Bande. Da die weitere, schwache Bande mit noch geringerer molekularer Masse nur nach Transfektion (und nicht nach Infektion, siehe unten) nachweisbar war, wurde die Aufklärung ihrer Identität nicht weiter verfolgt.

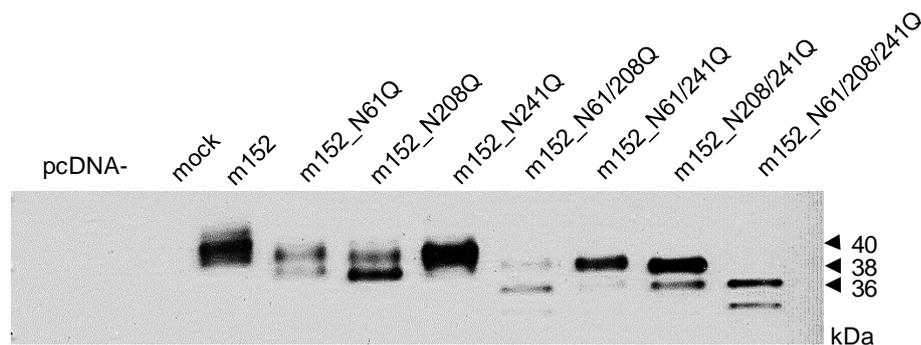


Abb. 4.7 Analyse des m152-Proteins nach Mutation der einzelnen N-Glykosylierungsstellen.

2×10^5 COS-7-Zellen wurden in 10cm Kulturschalen ausgesät und am folgenden Tag mit jeweils $4 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA der angegebenen Expressionsplasmide transfiziert. 48h nach Transfektion wurde Gesamtprotein extrahiert, je $30 \mu\text{g}$ Proteinlysate in einer 12,5%-igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblotet. m152 wurde mit dem Antikörper M3D10 (1:250) detektiert. mock, Leervektor. Verändert nach Fink et al., 2013.

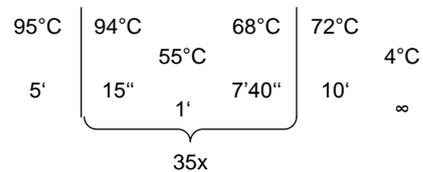
Da nach Transfektion die Nutzung der einzelnen N-Glykosylierungsstellen nicht eindeutig bestimmt werden konnte, wurde im Folgenden eine mCMV-Rekombinante generiert, in der vorsorglich alle 3 potentiellen N-Glykosylierungsstellen ausgetauscht wurden. Für eine singuläre 2-Schritt-Rekombination mittels *Shuttle*-Plasmid lagen die Nukleotide der N-Glykosylierungsstellen jedoch zu weit voneinander entfernt. Daher wurden zunächst die AS-Positionen Asn208 und Asn241 durch Gln ersetzt, das mutierte Fragment mittels *Shuttle*-Plasmid in das WT.BAC-Genom eingefügt und anschließend die AS-Position Asn61 durch Red-vermittelte, markerlose DNA Rekombination ausgetauscht.

4.2.1.1 Klonierung des *Shuttle* Vektors pST76K_m152N208/241Q_flank

Für eine erfolgreiche Mutagenese mittels *Shuttle*-Vektor ist es notwendig, dass die zu mutierende Sequenz auf beiden Seiten von 1000-1500bp langen, zum Integrationsort homologen Sequenzen flankiert wird. Dazu wurde zunächst ein PCR-Produkt aus WT-BAC-DNA generiert, welches die Sequenz des ORF m152 und die flankierenden Bereiche enthält. Durch Subklonierung in einem *high-copy* Plasmid wurde die WT-Sequenz durch die mutierte Sequenz ersetzt (siehe 4.2.1) und das *Shuttle*-Plasmid mit den gewünschten Mutationen generiert.

Für eine Übersicht der Klonierungsschritte siehe Abb. 4.8. Mit Hilfe des High Pure Viral Nucleic Acid Kit wurde mCMV-WT-DNA aufgereinigt (siehe 3.4.11). Um den ORF m152 und seine flankierenden Bereiche zu vervielfältigen, wurde diese in eine PCR mit den *Primern* m152_BAC_for und m152_BAC-rev eingesetzt.

PCR-Profil:



Anschließend wurden das PCR-Fragment und der Vektor pBlueScript mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *XmaI* verdaut (siehe 3.4.17), die beiden Produkte ligiert (siehe 3.4.21) und der Bakterienstamm DH10B mit dem Ligationsprodukt transformiert (siehe 3.4.6). Dies ergab das Produkt pB_m152_flank.

pB_m152_flank und pcDNA_m152_N208/241Q (siehe 4.2.1) wurden mit *SphI* und *NheI* geschnitten und die so erhaltenen Fragmente ligiert, so dass das Produkt pB_m152_N208/241Q_flank entstand. Aus diesem Produkt wurde mit *SacI/XmaI*-Restriktion das mutierte m152-Produkt geschnitten und in das mit den gleichen Enzymen geöffnete *Shuttle*-Plasmid pST76K_SR subkloniert; dies ergab das finale Produkt pST76K_m152_N208/241Q_flank, mit welchem WT.BAC-DNA tragende DH10B transformiert wurden.

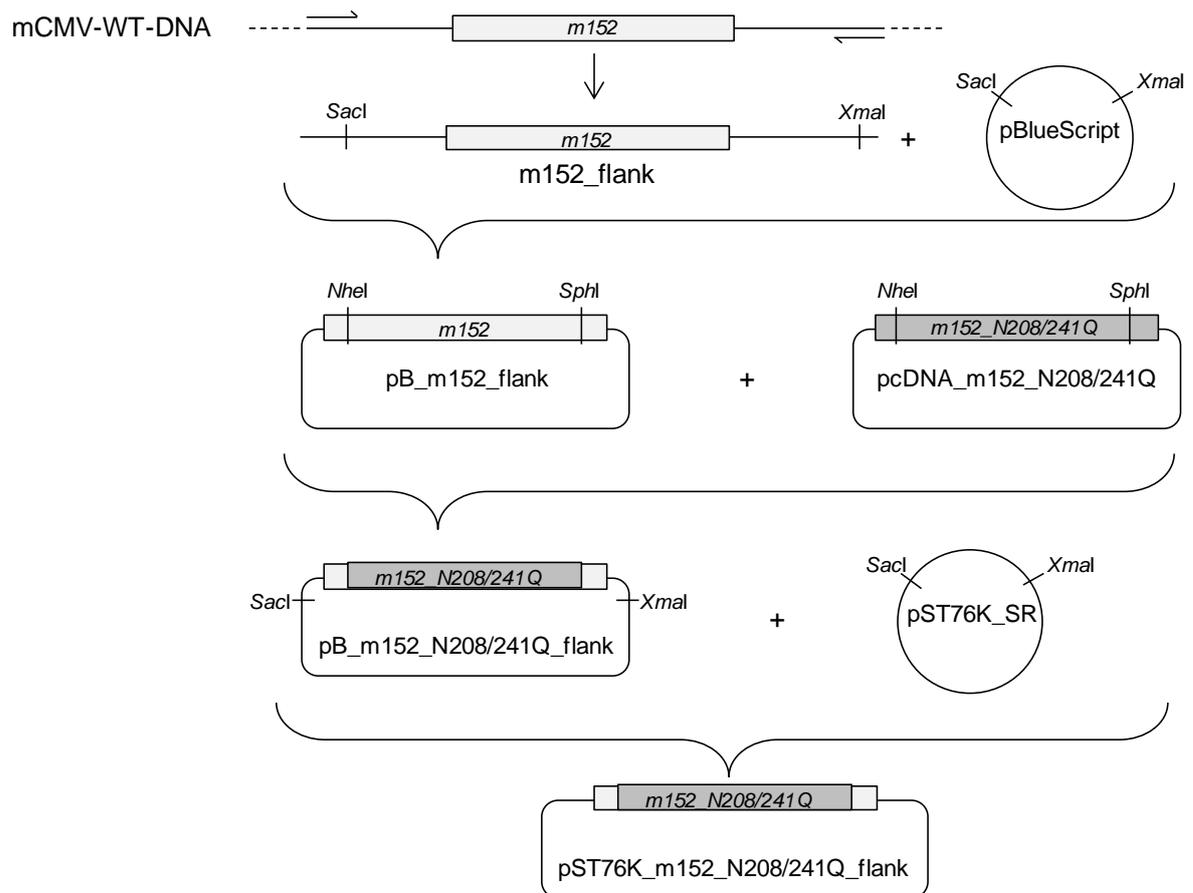


Abb. 4.8 Klonierungsschema für die Generierung des Shuttle-Vektors pST76K_m152_N208/241Q_flank. mCMV-WT-DNA wurde als *Template* für eine PCR eingesetzt, um das Produkt m152_flank zu erhalten. Über *SacI/XmaI*-Restriktion wurde das Fragment in den Vektor pBlueScript subkloniert. Das so erhaltene Produkt pB_m152_flank wurde mit *NheI/SphI*-Restriktion geöffnet und die WT-Sequenz (hellgrau) durch das mutierte Fragment (dunkelgrau) aus pcDNA_m152_N208/241Q ersetzt. Das Fragment m152_N208/241Q_flank wurde über *SacI/XmaI*-Restriktion in den Shuttle-Vektor pST76K-SR subkloniert.

Nach homologer Rekombination, Entfernung des *Shuttle*-Plasmids, Auflösung der Co-Integrate und Selektionierung (siehe 3.4.22.2 und Abb. 3.1) wurde zur Überprüfung der erfolgreichen Mutagenese BAC-DNA aufgereinigt (siehe 3.4.9) und 2 µl der DNA als *Template* für eine PCR mit den *Primern* m152_BAC_Seq_rev und m152_BAC_Seq_for eingesetzt. Da die Mutagenese an AS-Position 241 eine *PstI*-Schnittstelle einfügt, wurde das PCR-Produkt mit *PstI* verdaut. Bei einem positiven Klon wird das 1147bp lange PCR-Produkt in ein 789bp und ein 358bp langes Produkt gespalten. Abb. 4.9 zeigt ein DNA-Bild der geschnittenen PCR-Produkte. Mit Klon 8 wurde eine BAC-Maxipräparation durchgeführt (siehe 3.4.10). Mit der so erhaltenen DNA wurden elektrokompente GS1783 transformiert (siehe 3.4.6).

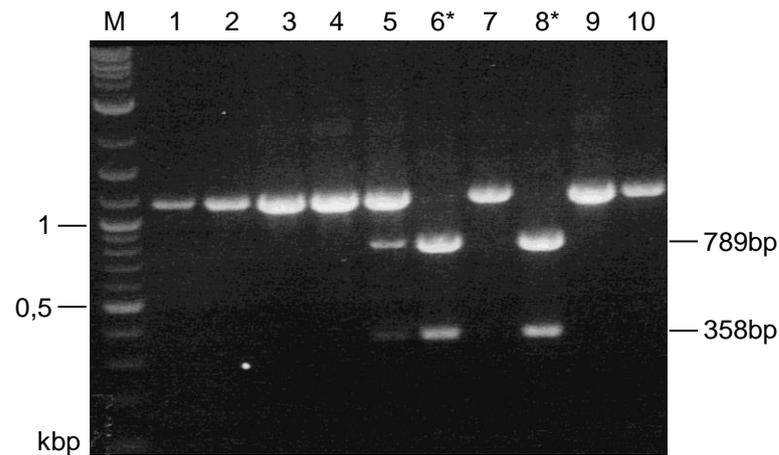


Abb. 4.9 Auftrennung der mit *PstI* verdauten PCR-Produkte.

Nach BAC-Minipräparationen wurde die DNA als *Template* für eine m152-PCR eingesetzt, die PCR-Produkte mit *PstI* geschnitten und in einem 1%-igen Agarose-Gel aufgetrennt. Die Mutation an AS-Position 241 fügt eine *PstI*-Schnittstelle ein und das PCR-Produkt wird in ein 789bp und ein 358bp langes Fragment gespalten. Positive Klone sind mit * markiert. M: 1kbp Marker.

Um die Integrität der umklonierten BAC-Plasmide zu prüfen, wurde die BAC-DNA aus den GS1783 Bakterien aufgereinigt und mit *EcoRI* verdaut. Nach der Auftrennung im Agarose-Gel zeigen sich die für BAC-DNA typischen verschiedenen Bandenmuster. Klone, die nach der Rekombination nur noch BAC-Vektor-*Backbone* enthalten, zeigen 2 Banden bei 1,93kbp und 6,45kbp. Wie in Abb. 4.10 zu sehen, traf das für die Mehrheit der Klone zu. Nur 4 von 18 Klonen haben noch intakte BAC-DNA. Für die daran anschließende Red-vermittelte Rekombination wurde Klon 4 verwendet.

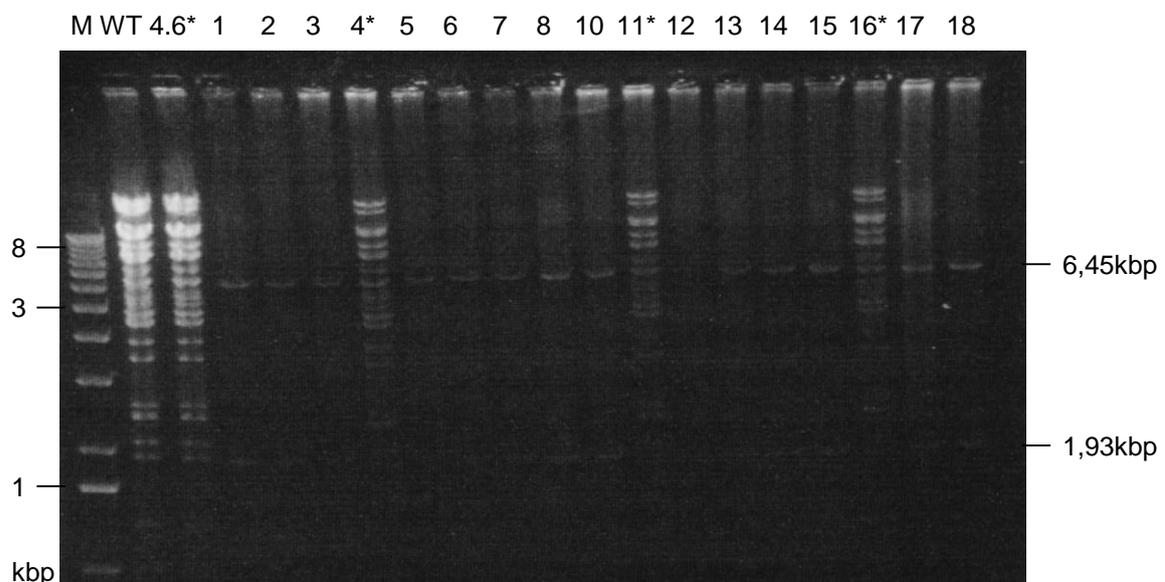


Abb. 4.10 Integrität des mCMV-BAC-Genoms.

Nach BAC-Minipräparationen wurde die DNA mit *EcoRI* geschnitten und in einem 0,7%-igen Agarose-Gel aufgetrennt. * kennzeichnet positive Klone. WT, WT.BAC-DNA; M, 1kbp Marker.

4.2.1.2 Red-vermittelte markerlose DNA Rekombination in *E. coli* zur Herstellung des rekombinanten mCMV-BAC-m152 Δ 3Glyc

Um den AS-Austausch an Position Asn61 einzufügen, wurde das Plasmid pEPkan-S als *Template* in einer PCR mit den *Primern* pEPkan-S_m152N61Q_for/rev eingesetzt. Nach Gelextraktion (siehe 3.4.19) und Ethanolfällung (siehe 3.4.22.3) wurde das PCR-Produkt für die Transformation der zuvor elektrokompent gemacht, mCMV-m152_N208/241Q-DNA tragenden GS1783 verwendet. Nach Red-Rekombination, Integratauflösung und Selektion von Cam^{res}/Kan^{sen} Kolonien (siehe 3.4.22.3 und Abb. 3.2) erfolgte aus diesen die Aufreinigung der BAC DNA, die wiederum als *Template* für eine PCR mit den *Primern* m152_BAC_Seq_for und m152_BAC_Seq_rev diente. Das PCR-Produkt sollte 1055bp lang sein. Abb. 4.11 zeigt die auf ein Agarose-Gel aufgetragenen PCR-Produkte.

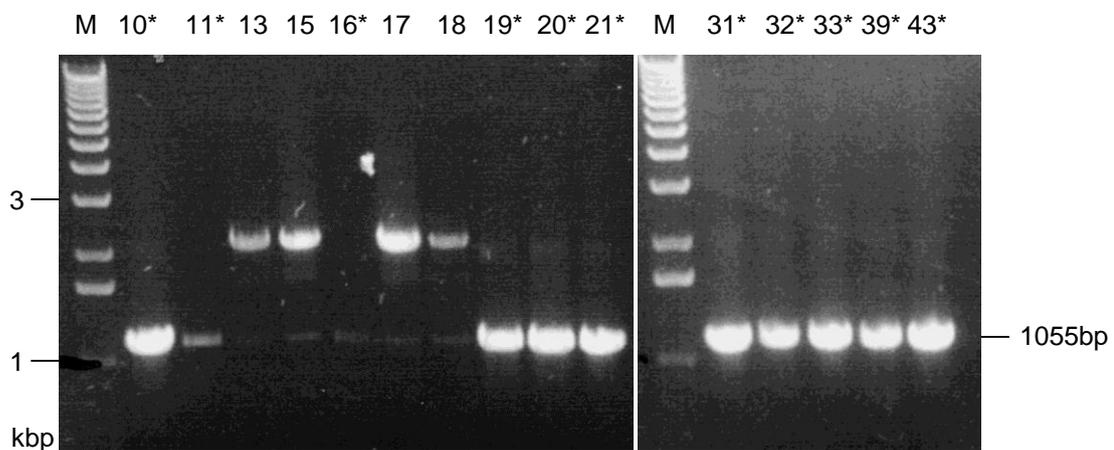


Abb. 4.11 Auftrennung der m152-PCR-Produkte.

Nach BAC-Minipräparation wurde die DNA als *Template* für eine m152-PCR eingesetzt. Das erwartete PCR-Produkt ist 1055bp lang. *kennzeichnet positive Klone. M, 1kb Marker.

Um die Mutationen zu bestätigen, wurden die PCR-Produkte sequenziert. Die Chromatogramme der Sequenzierungen in Abb. 4.12 zeigen, dass die Mutationen erfolgreich eingefügt wurden. Die anschließende BAC-Maxipräparation (siehe 3.4.10) erfolgte mit Klon 39.

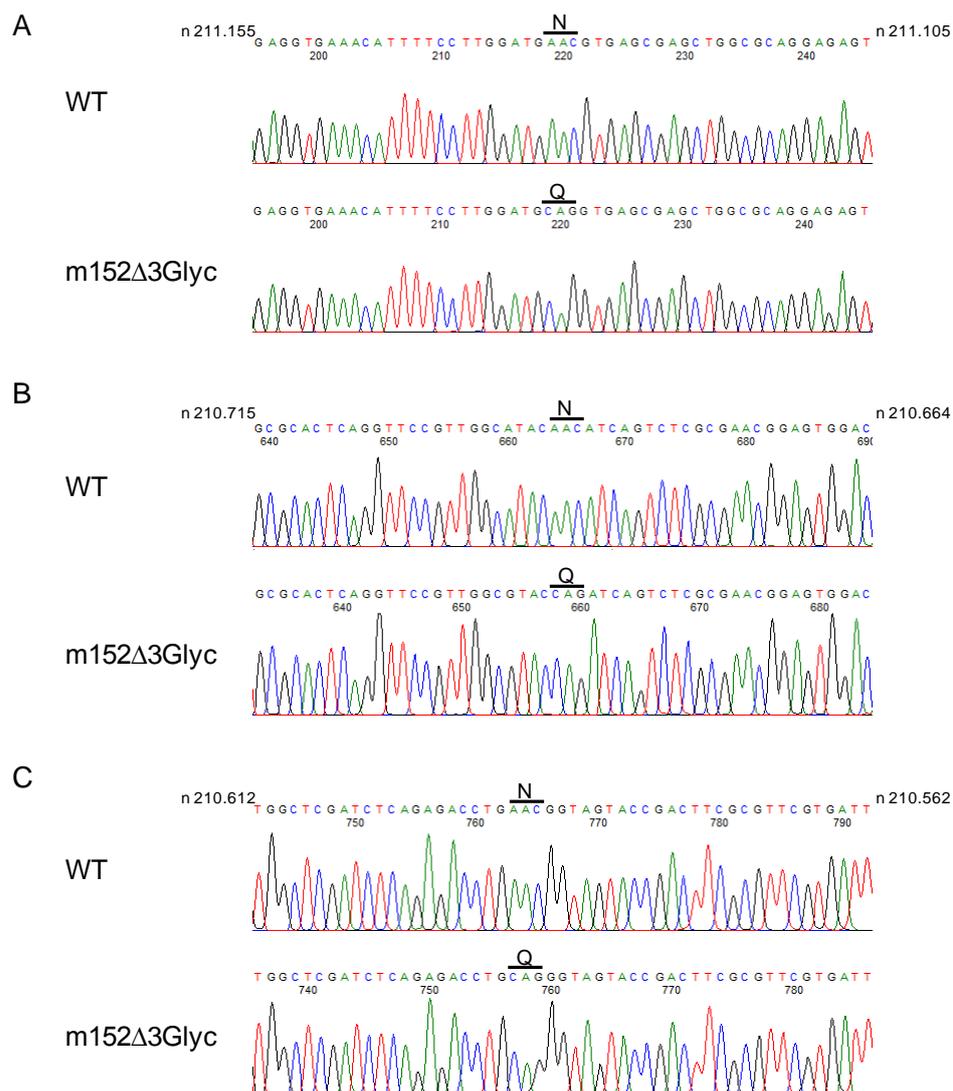


Abb. 4.12 Chromatogramme der Sequenzierungen von WT und m152Δ3Glyc.

DNA des ORF m152 wurde mittels PCR amplifiziert und sequenziert. A, AS Austausch an Position 61, B, AS-Austausch an Position 208, C, AS-Austausch an Position 241. Angegeben sind die Nukleotidpositionen (n) des WT.Smith Genoms (Rawlinson et al., 1996). Verändert nach Fink et al., 2013.

4.3 Rekonstitution und Aufreinigung der Rekombinante m152Δ3Glyc

Mit der aufgereinigten BAC-DNA aus 4.2.1.2 wurden MEF transfiziert (siehe 3.1.5) und das rekonstituierte Virus über mehrere Passagen von BAC-Sequenzen befreit (siehe 3.2.4). Um zu überprüfen, ob die rekombinanten Viren tatsächlich BAC-frei waren, wurde eine M55/gB- und BAC-Sequenz-spezifische qPCR (siehe 3.4.14) durchgeführt, bei der aufgereinigte virale DNA aus Zellkulturüberständen (siehe 3.4.11) als *Template* diente. Als Standard der absoluten Quantifizierung dienten \log_{10} Titrations des Plasmids pDrive_gB-PTHrP_BAC (siehe 3.4.15). Tab. 4.1 zeigt die ermittelten Werte der rekonstituierten m152Δ3Glyc-Rekombinanten nach 5 Passagen. Wenn weniger als 10^2 BAC-Sequenzen pro 10^6 Virusgenome nachweisbar waren, wurde das jeweilige rekombinante mCMV als BAC-frei definiert (Lemmermann et al., 2010).

Dies war für die Klone 1.1, 1.2 und Klon 3 der Fall. Für die Aufreinigung des rekombinanten Virus mCMV-m152 Δ 3Glyc (siehe 3.2.1) wurde der Überstand von Klon 1.1, Passage 5 verwendet. Anschließend wurde der Virustiter des erhaltenen Stocks mittels Plaquetest bestimmt (siehe 3.2.2.1).

Klon	BAC Sequenzen	Genome (<i>M55/gB</i>)	BAC/10 ⁶ Genome
1.1*	1,6x10 ⁰	1,7x10 ⁶	9,4x10 ⁻¹
1.2*	1,4x10 ⁰	1,0x10 ⁶	1,4x10 ⁰
1.3	4,2x10 ²	1,4x10 ⁶	3x10 ²
2	5,9x10 ⁴	4,1x10 ⁵	1,4x10 ⁵
3*	3,2x10 ¹	4,1x10 ⁵	7,8x10 ¹
4	6,9x10 ¹	5,5x10 ⁵	1,3x10 ²

Tab. 4.1 Quantifizierung der BAC-Sequenzen nach Viruspassagierung von m152 Δ 3Glyc. Die virale DNA wurde aus 200 μ l Überstand nach 5 Passagen der jeweiligen Virusklone aufgereinigt. Jeweils 2 μ l der DNA wurden als *Template* für eine M55/gB- und BAC-spezifische qPCR eingesetzt (Mittelwert aus Duplikaten). Als Standard diente das Plasmid pDrive_gB-PTHrP_BAC. * markiert als BAC-frei definierte Klone.

4.3.1 Charakterisierung der neu generierten mCMV-Rekombinante

Um auszuschließen, dass die eingefügten Mutationen einen Einfluss auf die Proteinexpression haben oder sich negativ auf die replikative Fitness des Virus auswirken, wurde das neu generierte Virus zunächst dahingehend überprüft.

4.3.1.1 Die virale Proteinexpression der m152 Δ 3Glyc-Rekombinante entspricht der des WT-Virus

Um die virale Proteinexpression zu charakterisieren, wurden MEF zentrifugal infiziert (MOI=4) und zu den Zeitpunkten 1h, 2h, 4h, 6h, 12h und 24h p.i. die Proteine extrahiert (siehe 3.5.2). Jeweils 30 μ g Gesamtproteinlysate wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe 3.5.6) und auf eine PVDF-Membran geblottet (siehe 3.5.7). Anschließend wurden mittels Western Blot die Proteine m152 und IE1 detektiert. Wie zu erwarten, ist das IE1-Protein schon 2h nach Infektion nachweisbar (Abb. 4.13). Darin unterscheiden sich WT-Virus und die Rekombinante nicht. m152 zeigt in beiden Viren ebenfalls keinen Unterschied in seiner Expressionskinetik und ist in beiden Viren ab 4h p.i. nachweisbar. Nach Infektion mit WT sind eine prominente Bande bei 40kDa und eine schwächere bei 48kDa nachzuweisen. Im Verlauf nimmt nach WT-Infektion die obere Bande (48kDa) leicht zu, während die Rekombinante erwartungsgemäß nur eine Bande bei ca. 36kDa aufweist. Das m152-Protein von m152 Δ 3Glyc verhält sich wie nach PNGase F Verdau (vergleiche Abb. 4.6), eine N-Glykosylierung findet folglich nicht statt.

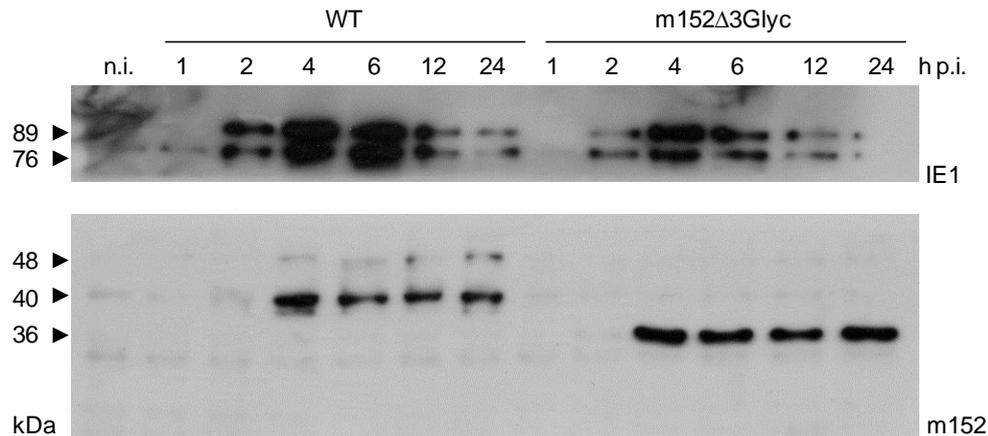


Abb. 4.13 Proteinexpression von WT und m152Δ3Glyc.

MEF wurden mit WT oder m152Δ3Glyc zentrifugal infiziert (MOI=4) und zu den angegebenen Zeiten p.i. die Proteine extrahiert. Jeweils 30μg Gesamtprotein wurden in einem 12,5%-igen SDS-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und das IE1-Protein mit Croma101, m152 mit dem Antikörper M3D10 detektiert. n.i. nicht infiziert. Verändert nach Fink et al., 2013.

4.3.1.2 Die Rekombinante m152Δ3Glyc repliziert wie das WT-Virus

Bisher konnte gezeigt werden, dass sich die Nicht-Glykosylierung des m152 nicht auf die Expression des Proteins auswirkt. Um zu zeigen, dass sich die Mutation auch nicht auf die *in vivo* Replikation auswirkt, wurde die replikative Fitness der generierten Rekombinante *in vivo* überprüft. Da die natürliche mCMV-Infektion im immunkompetenten Tier effektiv vom Immunsystem kontrolliert wird, wird die *in vivo* Replikation im immundepletierten Tier untersucht. Durch die Mutation sollte es zu keiner Attenuierung oder Verstärkung der Virulenz kommen.

8-9 Wochen alte BALB/c Mäuse wurden durch γ -Bestrahlung immunsupprimiert (siehe 3.3.1) und anschließend i.pl. mit WT oder m152Δ3Glyc infiziert (siehe 3.3.3). An Tag 2, 4, 6, 8 und 10 p.i. wurden den Tieren Leber, Milz und Lunge entnommen. Mit den Lebern wurde eine IE1-spezifische IHC durchgeführt, um die Anzahl der infizierten Zellen zu bestimmen (siehe 3.7), Lungen und Milzen wurden homogenisiert und der Virustiter mittels Plaquetest (siehe 3.2.2.2) bestimmt. Abb. 4.14 (A) zeigt die Virustiter in Milz und Lunge, (B) die Anzahl IE1 positiver Hepatozyten in 10mm² Gewebeschnitt. Die Verdopplungszeiten (VZ) der Viren wurden über die Steigung (m) der jeweiligen Regressionsgeraden mit Hilfe der Formel $VZ = \log 2 / m$ ermittelt.

In der Milz konnte an Tag 4 p.i. Infektiosität bei beiden Viren nachgewiesen werden (Abb. 4.14), in der Lunge erst an Tag 6 p.i.. In der Leber wurden an Tag 4 p.i. (WT) bzw. an Tag 6 p.i. (m152Δ3Glyc) infizierte Zellen sichtbar. Somit zeigen in der Milz beide Viren eine vergleichbare Kinetik, in Lunge und Leber zeigt die Rekombinante jedoch eine leichte Attenuierung, was sich in verlängerten Verdopplungszeiten in den Organen auswirkt.

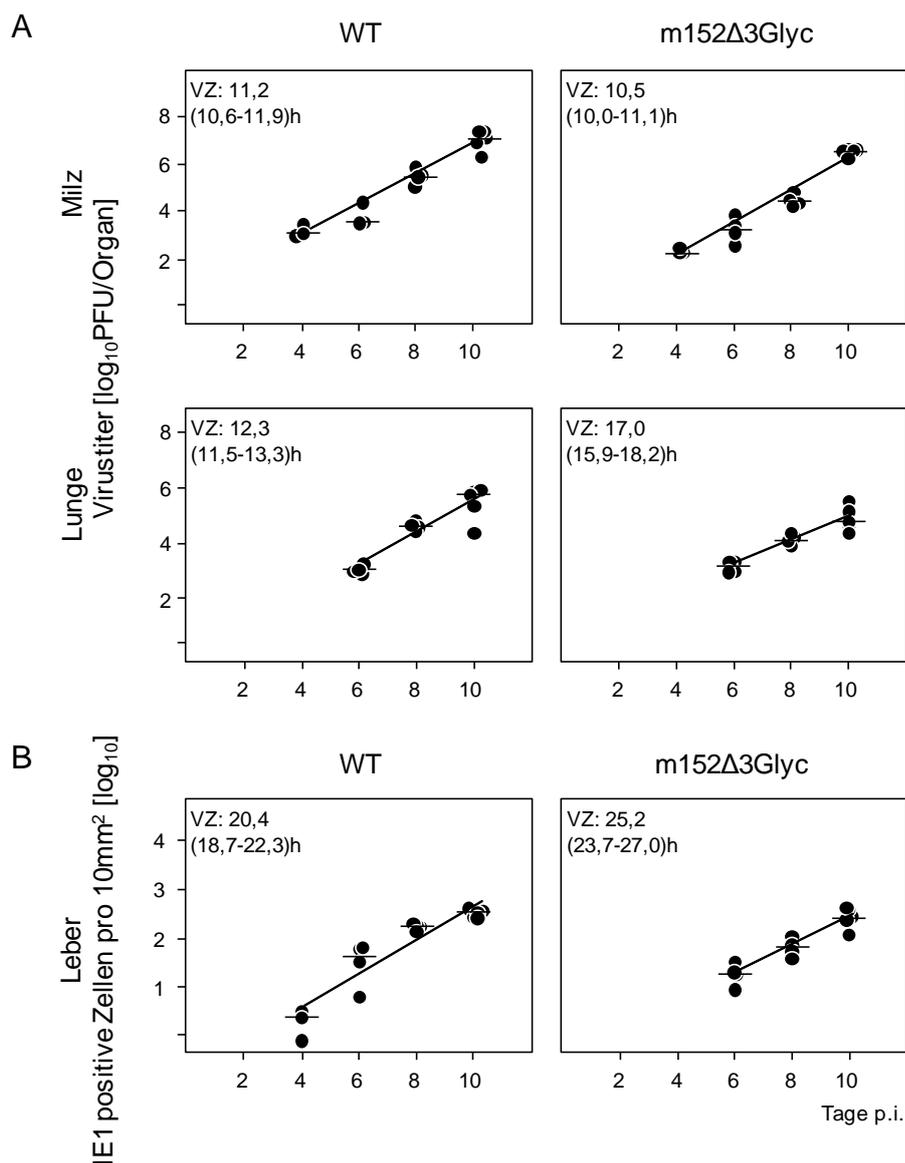


Abb. 4.14 Replikatives Potential von WT und m152Δ3Glyc in immunsupprimierten Tieren.

Pro Zeitpunkt wurden 3-5 BALB/c Mäuse durch 6,5Gy γ -Bestrahlung immunsupprimiert und mit 10^5 pfu WT oder m152Δ3Glyc i.p.l. infiziert (in 25 μ l PBS/Maus). Zu den angezeigten Zeitpunkten p.i. wurden den Tieren Milz, Lunge und Leber entnommen und (A) der Virustiter in Milz und Lunge mittels Plaqueassay bestimmt oder (B) in der Leber die Anzahl infizierter Zellen durch IE1-spezifische IHC für eine repräsentative Fläche von 10mm² ermittelt. Die Punkte stellen Einzeltierbestimmungen dar, die Mediane sind als horizontale Balken eingezeichnet. Die Verdopplungszeiten der Viren (VZ; mit 95% Konfidenzintervallen in Klammern) wurden mittels linearer Regressionsanalyse bestimmt (Mathematica V8). Verändert nach Fink et al., 2013.

4.4 Einfluss der Nicht-Glykosylierung auf die Funktion des vRAPs m152

Um zu prüfen, ob die fehlende Glykosylierung die Funktion von m152 als Inhibitor der Antigenpräsentation oder MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression verhindert, wurde der Phänotyp der neu generierten Virusrekombinante m152Δ3Glyc im ELISpot Assay und mittels Durchflusszytometrie eingehender untersucht.

4.4.1 Die 36kDa Isoform von m152 verhindert die Antigenpräsentation

Eine Funktion von m152 ist es, Peptid-beladene MHC-I-Moleküle im ERGIC zurückzuhalten und somit die Menge an pMHC-I-Komplexen, die an der Zelloberfläche präsentiert werden und daraufhin von CD8 T-Zellen erkannt werden können, zu verringern. Die Präsentation von pMHC-I-Komplexen kann durch die Bestimmung der Anzahl an Virus-Epitop spezifischen, polyklonalen CD8 T-Zellen, die durch den Kontakt mit infizierten Zellen aktiviert und zur IFN- γ -Sekretion stimuliert werden, ermittelt werden. Um zu testen ob p36 der Rekombinanten m152 Δ 3Glyc diese Funktion weiterhin erfüllen kann, wurden MEF (BALB/c, Haplotyp H-2^d oder C57BL/6, Haplotyp H-2^b) infiziert und 90min p.i. als Zielzellen in den ELISpot Assay eingesetzt. Als Effektoren dienten MACS-aufgereinigte CD8 T-Zellen aus den Milzen latent infizierter Tiere (BALB/c oder C57BL/6).

Die Erkennung WT-infizierter Zellen ist im Vergleich zur Immunevasin-Deletionsmutante Δ m152 gering (Abb. 4.15). Δ m06^W-infizierte MEF, in denen m152 nur in reduzierten Mengen vorhanden ist und die 48kDa Isoform von m152 nicht nachweisbar war, werden sogar noch besser erkannt, was durch einen hohen Anteil an IFN- γ sezernierenden CD8 T-Zellen zum Ausdruck kommt. Die Infektion mit Δ m06^L führt dagegen zu einer vergleichbar geringen Erkennung wie nach WT-Infektion. Ebenso zeigt die Infektion mit m152 Δ 3Glyc eine mit dem WT vergleichbare Erkennung, woraus zu schließen ist, dass m152/p36 in seiner Funktion nicht eingeschränkt ist. In beiden Haplotypen ist der Trend gleich, allerdings ist in BALB/c-Mäusen die Antigenpräsentation generell stärker ausgeprägt.

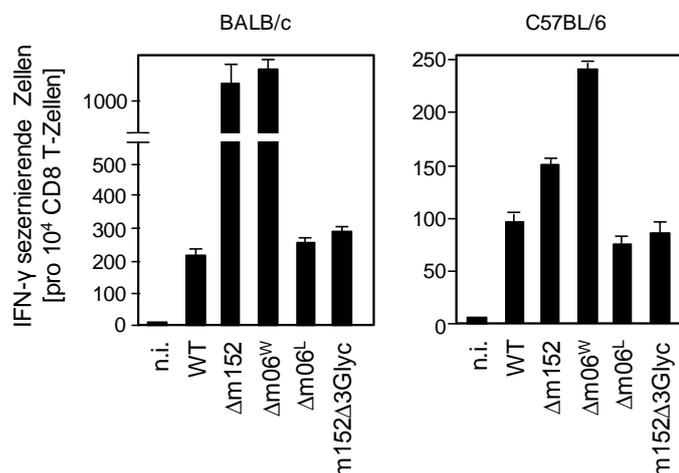


Abb. 4.15 Antigenpräsentation in BALB/c und C57BL/6 MEF in Abhängigkeit von m152.

MEF wurden mit den angegebenen Viren zentrifugal infiziert (MOI=4) und 90min p.i. als Zielzellen in den ELISpot Assay eingesetzt. Als Effektoren dienten MACS-aufgereinigte Milzzellen aus latent infizierten BALB/c (links) oder C57BL/6 (rechts) Mäusen. Die Frequenzen IFN- γ produzierender CD8 T-Zellen wurden mittels linearer Regressionsanalyse mit Hilfe der Statistik-Software Mathematica V8 ermittelt. Die 95% Konfidenzintervalle sind als Fehlerbalken dargestellt; n.i. nicht infiziert. Verändert nach Fink et al., 2013.

Die N-Glykosylierung von m152 ist daher für die immunevasive Funktion des m152 auf die Präsentation antigener Peptide durch MHC-I-Moleküle der zwei getesteten Haplotypen nicht

von Bedeutung und das nicht-glykosylierte Vorläuferprodukt p36 in der Lage, die immunevasive Funktion zu erfüllen.

4.4.2 Die 36kDa Isoform von m152 inhibiert die Oberflächenexpression von RAE-1

m152 hält MHC-Klasse-I-Moleküle auf bisher unbekannte Weise im ERGIC zurück und verhindert so deren Transport an die Zelloberfläche und somit die Antigenpräsentation. Des Weiteren inhibiert m152 auch die Oberflächenexpression von RAE-1, einem MHC-I-ähnlichen Liganden des NKG2D-Rezeptors, und verhindert so die Aktivierung von NK-Zellen. Obwohl die Interaktion von m152 und MHC-I-Komplexen ähnlich der mit RAE-1 sein sollte, könnte sich die N-Glykosylierung unterschiedlich auf die m152/MHC-I- und m152/RAE-1-Interaktion auswirken.

Um zu testen, ob durch die fehlende Glykosylierung von m152 die MHC-Klasse-I- oder RAE-1-Oberflächenexpression beeinflusst ist, wurden MEF mit WT, verschiedenen m152-Deletionsmutanten oder m152 Δ 3Glyc infiziert und 16h p.i. MHC-Klasse-I (K^d) und RAE-1 an der Zelloberfläche, sowie intrazelluläres m164/gp36,5 zytofluorometrisch nachgewiesen.

WT-infizierte Zellen zeigen die beiden charakteristischen Populationen aus nicht infizierten (m164/gp36,5/MHC-I^{hoch}) und infizierten (m164/gp36,5⁺/MHC-I^{niedrig}) Zellen (Abb. 4.16, jeweils linke Spalte). Dies gilt ebenso für Δ m152 und m152 Δ 3Glyc. Nach Infektion mit Δ m06^L ist die Herabregulation von MHC-Klasse-I-Molekülen nicht ganz so stark ausgeprägt (vgl. 4.5.1). Δ m06 Δ m152 reguliert die MHC-Klasse-I-Moleküle nur unwesentlich herunter und Δ m06^W (durch das schwach exprimierte m152) etwas stärker. Die reduzierte m152-Expression dieses Virus kann demnach noch einen Teil der pMHC-I-Komplexe im ERGIC zurückhalten. Während die Viren, die kein (Δ m152, Δ m06 Δ m152) oder kaum (Δ m06^W) m152 exprimieren, keinen Einfluss auf die RAE-1-Oberflächenexpression zeigen, wird diese nach Infektion mit WT und Δ m06^L stark inhibiert. Auch die Rekombinante m152 Δ 3Glyc, also die p36 Isoform von m152, ist vollständig in der Lage, die RAE-1-Oberflächenexpression herunter zu regulieren.

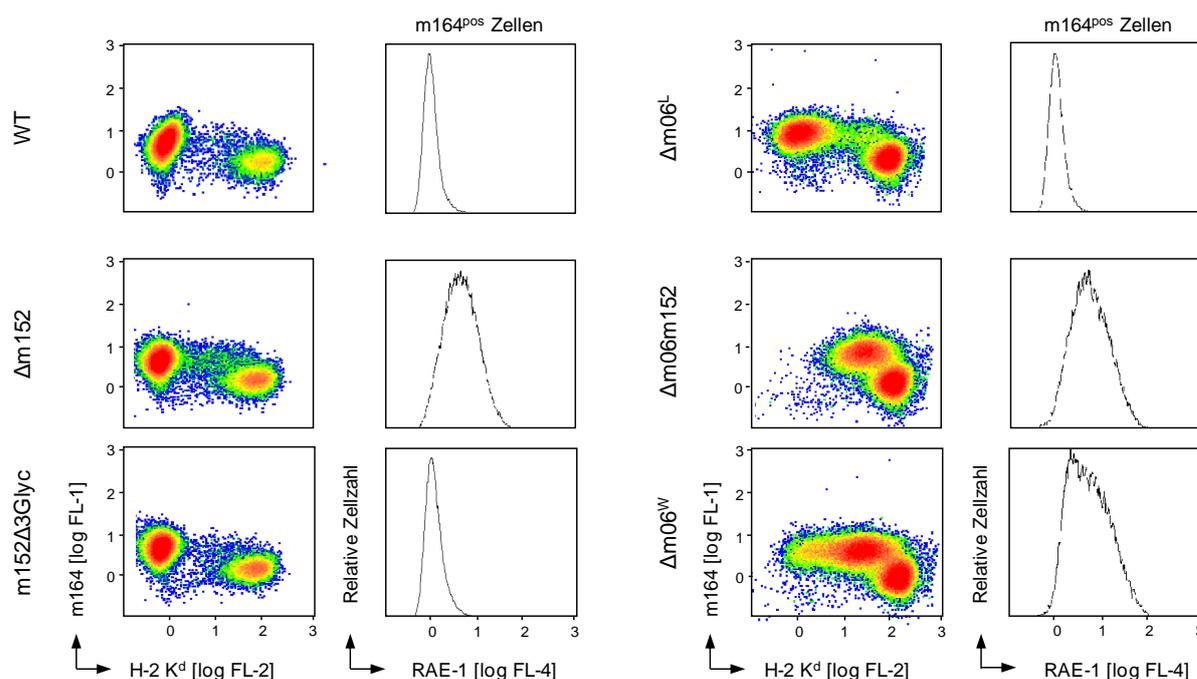


Abb. 4.16 MHC-Klasse-I- und RAE-1-Oberflächenpräsentation in Abhängigkeit von m152.

MEF wurden zentrifugal (MOI=04) mit den angegebenen Viren infiziert. 16h p.i. wurden MHC-I-K^d (1:1000; PE-gekoppelt) und RAE-1 (1:10; APC-gekoppelt) an der Zelloberfläche und intrazelluläres m164/gp36,5 (1:20; Zweiantikörper AF-488) detektiert. Anschließend wurden die Zellen zytofluorometrisch analysiert. Dargestellt sind je 50000 Zellen. Verändert nach Fink et al., 2013.

Die Auslöschung der drei N-Glykosylierungsstellen hat folglich keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression von RAE-1 (im Vergleich zum WT). Dies bedeutet, dass p36 in der Lage ist, RAE-1 effektiv im ERGIC zurückzuhalten. Die starke Herabregulation der MHC-Klasse-I-Moleküle durch m06 (sichtbar nach Infektion mit Δ m152) verdeckt jedoch einen möglichen Einfluss von p36, so dass dessen tatsächliche Wirkung erst nach Deletion von m06 sichtbar wäre. Eine Aussage über die inhibitorische Kapazität der p36 Isoform auf die MHC-Klasse-I-Moleküle kann deshalb in diesem Versuchsaufbau nicht gemacht werden,

4.4.3 Die 36kDa Isoform von m152 inhibiert die Aktivierung von NK-Zellen durch RAE-1/NKG2D Interaktion

Die bisherigen Daten zeigen, dass die p36 Isoform von m152 ausreicht, um die Antigenpräsentation, die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression (in Kombination mit m06) und die RAE-1-Oberflächenexpression vergleichbar zu inhibieren wie das WT-m152. Um den Effekt von p36 auf die RAE-1-Oberflächenexpression funktionell zu bestätigen, wurde ein *in vivo* NK-Zell-Assay durchgeführt.

8-10 Wochen alte BALB/c Mäuse wurden mit 1×10^5 pfu WT, Δ m152, oder m152 Δ 3Glyc infiziert (siehe 3.3.3). 24h vor der Infektion wurden die NK-Zellen depletiert oder 6h vor der Infektion wurde der NKG2D Rezeptor mit einem antagonistischen Antikörper blockiert (siehe 3.3.2). Drei Tage p.i. wurden die Virustiter in Milz und Lunge mittels Plaquetest (siehe 3.2.2.2) bestimmt.

Da bekannt war, dass die Blockade des NKG2D-Rezeptors keinen Einfluss auf den Virustiter des WT hat (Krpmotić et al., 2005), wurde diese Gruppe aufgrund von Tierzahlreduktion ausgelassen.

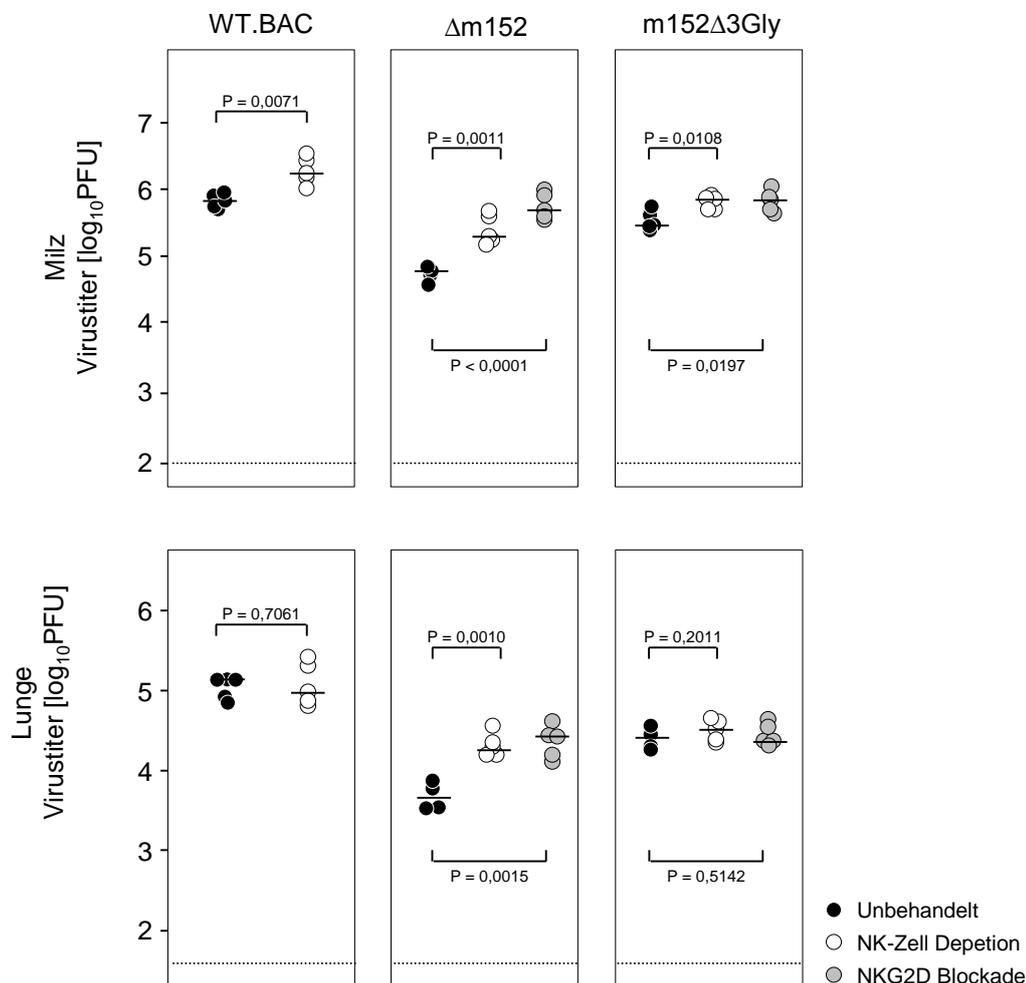


Abb. 4.17 Virustiter in Abhängigkeit von m152 nach NK-Zell Depletion oder NKG2D Blockade.

BALB/c Mäuse blieben unbehandelt oder wurden mit 20µl α -asialo GM1 NK-Zell depletiert. Zur Blockierung des NKG2D-Rezeptors wurden 300µg Antikörper verabreicht. Die Tiere wurden 24h nach Depletion bzw. 6h nach Rezeptor-Blockade i.v. mit den angezeigten Viren infiziert (2×10^5 pfu in 500µl PBS/Maus). 3 Tage p.i. wurden den Tieren Milz und Lunge entnommen und der Virustiter in den Organen mittels Plaquetest bestimmt. Die Punkte stellen Einzeltierbestimmungen dar, die Mediane sind als horizontale Balken eingezeichnet. Die Berechnung der P-Werte (*Welch's unpaired t-test*) der log-transformierten Daten erfolgte mit Hilfe einer Online zur Verfügung stehenden Software (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm?Format=SD>). P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das Detektionslimit.

Nach Infektion mit WT führt die alleinige Depletion der NK-Zellen zu keiner signifikanten Änderung des Virustiters in der Lunge (Abb. 4.17). In der Milz ist eine leichte NK-Zell Aktivität nachzuweisen. $\Delta m152$ unterliegt in unbehandelten Tieren der NK-Zell-Kontrolle und ist deutlich attenuiert; der Titer liegt eine \log_{10} -Stufe niedriger als der von WT. In der Milz führen sowohl die NK-Zell Depletion als auch die NKG2D-Blockade zu einer signifikanten Erhöhung des Titers auf WT-Niveau. $m152\Delta 3Glyc$ zeigt zwar in beiden Organen einen geringeren Titer als WT, die Depletion oder Rezeptorblockade führen aber zu einem mit dem WT vergleichbaren Unterschied. In der Lunge ist der Titer leicht niedriger als im WT, was auch

schon in der Wachstumskinetik der Rekombinanten zu beobachten war (vgl. Abb. 4.14). Da es nach NK-Zell Depletion oder Rezeptorblockade jedoch nicht zu einem Titeranstieg kommt, ist dieser Phänotyp nicht durch eine verminderte NKG2D-spezifische NK-Zell-Evasion verursacht.

Für das neu generierte Virus m152 Δ 3Glyc zeigte sich auch *in vivo* kein Phänotyp, der eine Bedeutung der Glykosylierung für die Funktion des Proteins zeigen könnte. Trotz des Ausgangbefundes in Δ 06^W konnte nach zielgerichteter Mutagenese keine Notwendigkeit der Glykosylierung für die Immunevasionsfunktion von m152 nachgewiesen werden und die nicht-glykosylierte Isoform p36 ist in der Lage, die immunevasive Funktion von m152 zu erfüllen.

4.5 Einfluss von IFN- γ auf die Funktion der vRAPs *in vitro* und *in vivo*

Der CD8 T-Zell-vermittelte Schutz gegen die CMV-Infektion erfordert eine Erkennung von viralen pMHC-I-Komplexen an der Oberfläche infizierter Zellen. Durch die Wirkung der vRAPs wird jedoch diese Präsentation stark eingeschränkt.

In Umkehr wird die Infektion mit Δ vRAP besser kontrolliert als eine WT-Infektion, was auf die fehlende Wirkung der Immunevasine schließen lässt. Es scheint also notwendig zu sein, für eine verbesserte Kontrolle der Infektion die vRAPs zu inhibieren oder die infizierten Zellen zu einer erhöhten Antigenpräsentation zu stimulieren. Insbesondere kann eine Behandlung mit IFN- γ die Expression von TAP und die MHC-Klasse-I-Präsentation verbessern. Der Einfluss von IFN- γ auf eine verbesserte Kontrolle der Infektion wurde bereits von Hengel et al. (1994) angedeutet, allerdings waren zu diesem Zeitpunkt die Immunevasionsproteine von mCMV noch nicht beschrieben.

Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss einer IFN- γ Vorbehandlung auf die Antigenpräsentation unter dem Einfluss der einzelnen vRAPs charakterisiert werden. Hierfür wurde das Set an mCMV-Rekombinanten verwendet, die nach Infektion die vRAPs in allen möglichen Kombinationen exprimieren (Wagner et al., 2002; Fink et al., 2012).

Anmerkung: Aufgrund der bisher erhaltenen Ergebnisse nach Infektion mit Δ m06^W wurde diese in den folgenden Experimenten durch Δ m06^{L1} ersetzt und als Δ m06 bezeichnet.

4.5.1 vRAPs regulieren die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression

Um den Einfluss der vRAPs auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression zu untersuchen, wurden konfluente MEF mit dem kompletten Set an vRAP-Deletionsmutanten (Wagner et al., 2002; Fink et al., 2012) zentrifugal infiziert (siehe 3.2.3). 16h p.i. wurde die Expression von MHC-I-Komplexen (H2-K^d) auf der Zelloberfläche zytofluorometrisch analysiert (siehe 3.6.7). Als Marker für infizierte Zellen diente das virale Protein m164/gp36,5.

Während MEF einer nicht infizierten Kultur nur eine Population zeigen, nämlich m164/gp36,5/MHC-I^{intermediär} (Abb. 4.18, a), führt die Infektion mit WT zu zwei klar voneinander getrennten Populationen: infizierte Zellen mit m164/gp36,5^{hoch}/MHC-I^{niedrig} und nicht infizierte Zellen mit m164/gp36,5/MHC-I^{hoch} (Abb. 4.18, b). Dass nicht infizierte Zellen in diesen infizierten Kulturen nachweisbar sind, wurde bereits von unserer Arbeitsgruppe beschrieben (Holtappels et al., 2006a). Diese Zellen können als interner Standard für die MHC-Klasse-I-Expression betrachtet werden, während sich die infizierten Zellen abhängig vom infizierenden Virus in ihrer MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression unterscheiden.

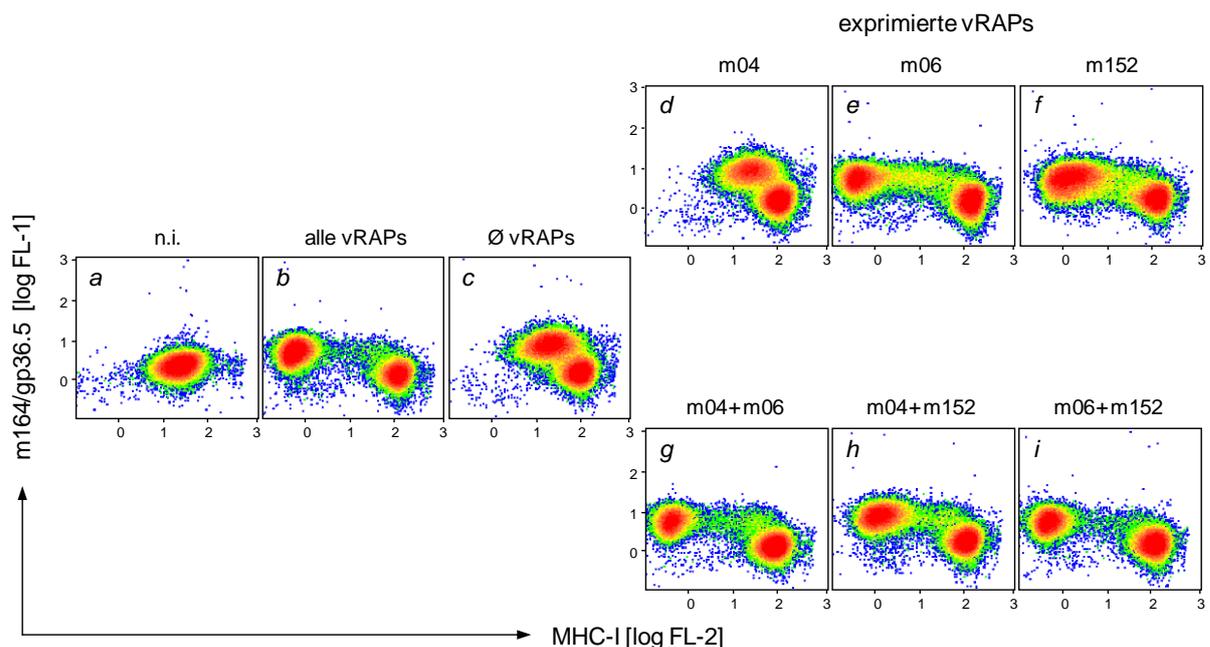


Abb. 4.18 Einfluss der vRAPs auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression.

MEF wurden zentrifugal (MOI=4) mit dem kompletten Set an Immunevasin-Deletionsmutanten infiziert. Angegeben sind die jeweils exprimierten Proteine. 16h p.i. wurden MHC-I-K^d (PE-gekoppelt; 1:1000) an der Oberfläche und intrazelluläres m164/gp36,5 (1:20; Zweiantikörper AF-488) markiert. Anschließend wurden die Zellen zytofluorometrisch analysiert. Dargestellt sind je 50000 Zellen; n.i. nicht infizierte Zellen. Verändert nach Fink et al., 2012.

Interessanterweise stellt die Infektion mit Δ vRAP die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression im Vergleich zu den nicht infizierten Zellen nicht vollständig wieder her (vgl. Abb. 4.18, b und c). Die alleinige Expression von m04 zeigt keinen sichtbaren Effekt auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression (vgl. Panel d und c), demgegenüber führt die alleinige Expression von m06 (Panel e) zu einer starken, und von m152 (Panel f) zu einer moderaten Reduktion. Panels g-i zeigen des Weiteren, dass es unter diesen Bedingungen keine nennenswerten kooperative Effekte der vRAPs gibt. So werden die Einflüsse von m06 oder m152 durch die zusätzliche Expression von m04 nicht noch stärker beeinflusst und m152 kann den bereits sehr starken Einfluss von m06 nicht zusätzlich verstärken.

Dies bedeutet, dass im Zusammenhang mit der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression m06 den stärksten negativen Einfluss besitzt, während m04 für sich selbst kein negativer Regulator

zu sein scheint. Insgesamt zeigte sich folgender Einfluss der Immunevasine auf die Oberflächenexpression: $m06 > m152 > m04$.

4.5.2 Vorbehandlung mit IFN- γ vermindert den Einfluss der vRAPs auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression

Parallel zu dem in 4.5.1 beschriebenen Versuch wurden MEF 48h vor Infektion mit IFN- γ vorbehandelt und in identischer Weise zytofluorometrisch analysiert. Hierbei zeigt sich, dass eine Vorbehandlung mit IFN- γ sowohl die generelle MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression beeinflusst, als auch den Einfluss der vRAPs auf diese verändert.

Auf nicht infizierten Zellen zeigt sich die erhöhte MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression (Abb. 4.19, a), die auf den nicht infizierten Zellen der infizierten Kulturen nicht mehr durch parakrine Interferone erhöht werden konnte. Nach Infektion mit WT ist die Regulation der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression nicht mehr so stark ausgeprägt wie in nicht vorbehandelten Zellen (vgl. Abb. 4.18b und Abb. 4.19b; zum leichteren Vergleich sind die Abb. parallel angeordnet) und nach Infektion mit Δ vRAP sind die infizierten und nicht infizierten Zellen kaum noch voneinander zu unterscheiden (Abb. 4.19, c).

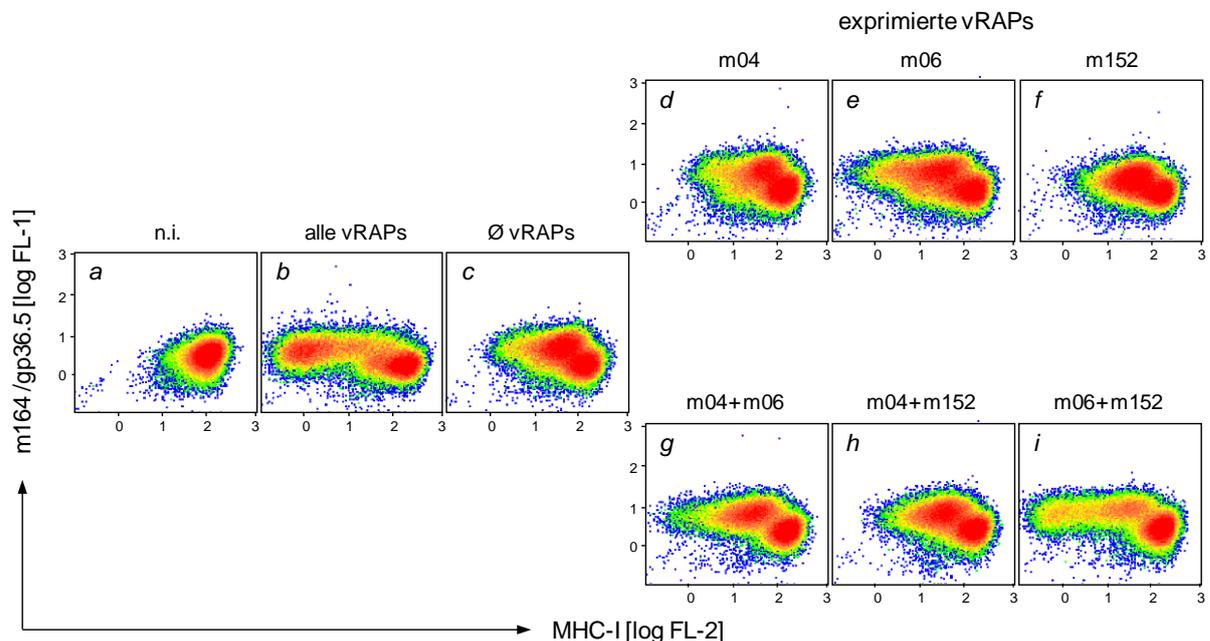


Abb. 4.19 Einfluss der vRAPs auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression nach IFN- γ -Vorbehandlung.

MEF wurden 48h vor zentrifugaler Infektion (MOI=4) mit dem kompletten Set an Immunevasin-Deletionsmutanten mit IFN- γ vorbehandelt. Angegeben sind die jeweils exprimierten Proteine. Protokoll und Darstellung wie in Abb. 4.18; verändert nach Fink et al., 2012.

Rein qualitativ erscheinen die Effekte der einzelnen vRAPs unverändert, d.h. $m06 > m152 > m04$ (vgl. d-i in Abb. 4.18 und Abb. 4.19), jedoch sind die inhibitorischen Effekte quantitativ stark vermindert. Dies hat zur Folge, dass der ohnehin schon moderate Effekt von m152 nach IFN- γ -Vorbehandlung nicht mehr nachzuweisen ist (vgl. c und f). Interessanterweise wird nun ein

kooperativer Effekt von m06 und m152 sichtbar (vgl. i mit e und f), und m04, das bisher keinen negativen Effekt auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression zu haben schien, verstärkt seinerseits die jeweiligen Effekte von m06 (vgl. e und g) und m152 (vgl. f und h). Die stärkste Reduktion zeigte sich nach Expression aller drei vRAPs (vgl. b und i sowie b und c).

Es zeigt sich also, dass sich eine immunevasive Funktion von m04 nur unter verstärkter MHC-Klasse-I-Expression nachweisen lässt und dass die vRAPs nach IFN- γ -Vorbehandlung ihren negativen regulatorischen Einfluss stark einbüßen.

4.5.3 IFN- γ -Vorbehandlung hebt die vRAP-abhängigen Unterschiede in der Antigenpräsentation auf

Wie schon von Lemmermann et al. (2010a) gezeigt, geschieht die Regulation der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression vorrangig durch die Inhibition des MHC-Klasse-I-Transports an die Zelloberfläche durch m06 und m152. Hierdurch wird auch die Erkennung von viralen MHC-I-Peptid-Komplexen auf der Zelloberfläche beeinflusst. Um den Einfluss der einzeln oder in Kombination exprimierten vRAPs kombiniert mit dem Effekt von IFN- γ zu untersuchen, wurden unbehandelte oder IFN- γ vorbehandelte MEF mit den jeweiligen Viren infiziert und 90min p.i. als Zielzellen in den ELISpot Assay eingesetzt.

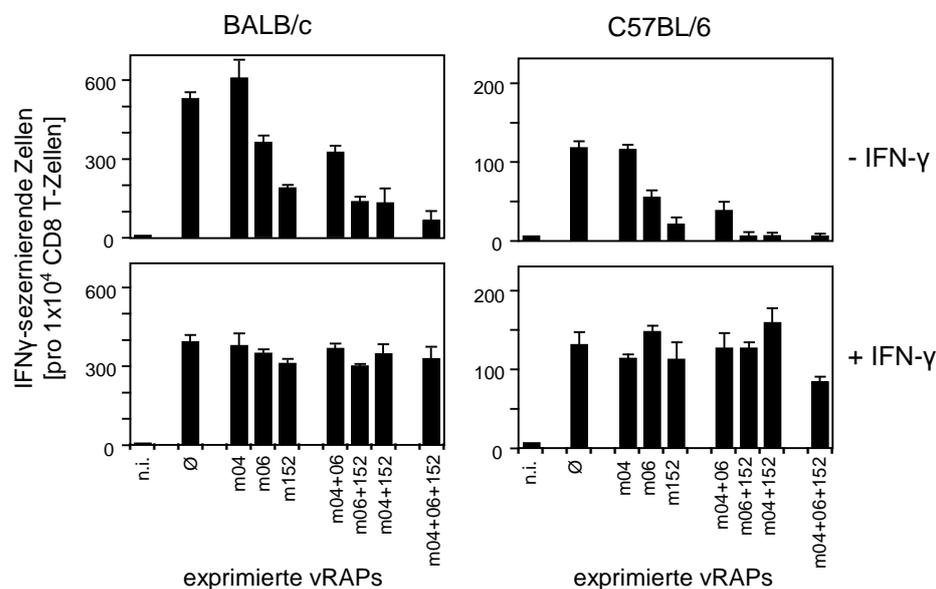


Abb. 4.20 Antigenpräsentation infizierter MEF.

MEF wurden 48h vor Infektion entweder mit IFN- γ vorbehandelt oder blieben unbehandelt. 90min nach zentrifugaler Infektion (MOI=4) mit dem kompletten Set an Immunevasin-Deletionsmutanten (angegeben sind die jeweils exprimierten Proteine) wurden sie als Zielzellen in den ELISpot Assay eingesetzt. Als Effektoren dienten per MACS aufgereinigte CD8 T-Zellen aus den Milzen latent infizierter BALB/c (links) oder C57BL/6 Mäuse (rechts). Die Frequenzen IFN- γ produzierender CD8 T-Zellen wurden mittels linearer Regressionsanalyse mit Hilfe der Statistik-Software Mathematica V8 ermittelt. Die 95% Konfidenzintervalle sind als Fehlerbalken dargestellt; n.i. nicht infiziert. Verändert nach Fink et al., 2012.

Abb. 4.20 zeigt die Aktivierung polyklonaler CD8 T-Zellen aus der Milz latent infizierter BALB/c oder C57BL/6 Mäuse im ELISpot Assay durch infizierte MEF. Die Erkennung der Präsentation

viraler Peptide auf infizierten MEF durch polyklonale CD8 T-Zellen ist vorrangig von neubeladenen pMHC-I-Komplexen abhängig. Hier zeigt sich, dass m152 den stärksten Einfluss auf die Inhibition der Präsentation neubeladener pMHC-I Komplexe hat (im Gegensatz zu m06 bei der gesamten MHC-I-Oberflächenexpression). Generell sind die Unterschiede im BALB/c Modell besser zu erkennen. Durch die Vorbehandlung mit IFN- γ werden die Unterschiede nivelliert und die infizierten MEF zeigen alle eine ähnliche Peptidpräsentation. Nur auf C57BL/6 MEF bewirkt die Expression aller drei vRAPs (WT) auch nach IFN- γ -Vorbehandlung eine partielle Inhibition der Antigenpräsentation.

4.5.4 IFN- γ -Vorbehandlung hebt die Wirkung der vRAPs auf ohne ihre Funktion zu beeinträchtigen

Es besteht die Möglichkeit, dass die IFN- γ Behandlung die Funktion der vRAPs direkt beeinflusst, indem IFN- γ die Expression der vRAPs inhibiert oder deren Interaktion mit MHC-Klasse-I-Molekülen verhindert. Allerdings gibt es hierfür bisher keine Anhaltspunkte, da die Zellen nach IFN- γ -Kontakt bereits vor der Infektion und somit vor der Expression der vRAPs ihre MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression erhöhen (Hengel et al., 1994).

Die Erkennung infizierter Zellen durch CD8 T-Zellen ist eine sehr sensitive Methode zum Nachweis der Antigenpräsentation, da sehr wenige pMHC-I-Moleküle ausreichen, um die CD8 T-Zellen über ihren TCR zu aktivieren und so zur Ausschüttung von IFN- γ oder zu zytolytischer Aktivität zu führen (Sykulev et al., 1996). Da die IFN- γ -Sekernierung der CD8 T-Zellen allerdings nur ein Indiz dafür ist, dass pMHC-I-Komplexe an der Oberfläche präsentiert werden, können Aussagen über die tatsächliche Menge an pMHC-I-Komplexen an der Oberfläche auf diese Weise nicht gemacht werden. Der Grad der Aktivierung der CD8 T-Zellen kann jedoch über die Menge des sezernierten IFN- γ beurteilt werden, das sich wiederum im ELISpot Assay anhand der Spotgröße relativ abschätzen lässt.

In 4.5.3 konnte gezeigt werden, dass es nach IFN- γ Vorbehandlung und Infektion mit WT oder Δ vRAP keinen (BALB/c) oder einen nur geringen (C57BL/6) Unterschied in der Anzahl der IFN- γ sezernierenden CD8 T-Zellen gibt. Nun sollte verglichen werden, ob die Vorbehandlung mit IFN- γ einen Einfluss auf den Grad der Aktivierung der CD8 T-Zellen hat.

Hierfür wurden unbehandelte oder IFN- γ vorbehandelte MEF (siehe 3.1.4) mit WT infiziert (siehe 3.2.3). Für die Infektion mit Δ vRAP wurden unbehandelte Zellen verwendet. 90min nach Infektion wurden die Zellen in den ELISpot Assay (siehe 3.6.6) eingesetzt. Als Effektoren dienten IE1-spezifische CTL. Wie in Abb. 4.21 zu sehen, führt die Stimulation mit nicht-vorbehandelten WT-infizierten MEF nur zu einer schwachen Aktivierung: lediglich 6 (7-8) von 100 CTL sezernieren IFN- γ . Sowohl die Vorbehandlung mit IFN- γ als auch das Fehlen der vRAPs (ohne Vorbehandlung) führt zu einer stark erhöhten Aktivierung: 84 (78-90) bzw. 92

(85-99) von 100 Zellen produzieren hier IFN- γ . In beiden Fällen reicht die Dichte der pMHC-I-Komplexe an der Oberfläche der APC aus, um fast alle CD8 T-Zellen zu aktivieren.

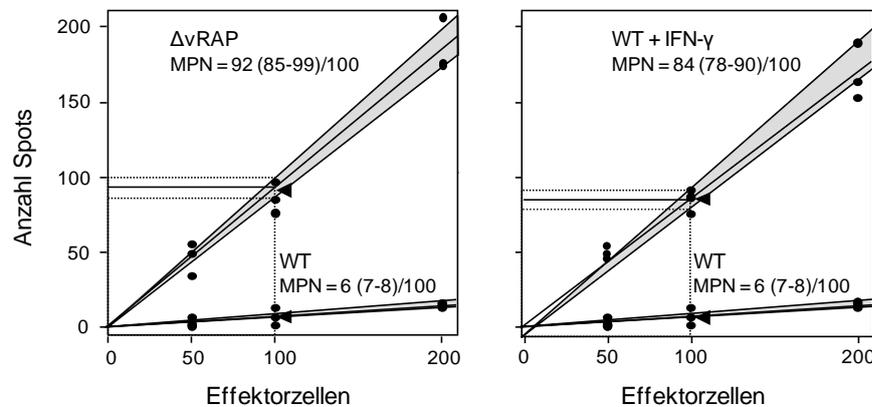


Abb. 4.21 Vergleich der Antigenpräsentation Δv RAP-infizierter und IFN- γ vorbehandelter WT-infizierter MEF.

MEF wurden ohne Vorbehandlung mit Δv RAP oder WT oder nach IFN- γ -Vorbehandlung mit WT zentrifugal infiziert (MOI=4). 90min p.i. wurden die Zellen in den ELISpot Assay eingesetzt, als Effektoren dienten IE1-spezifische CTL. Links: Vergleich Δv RAP und WT ohne IFN- γ , Rechts: Vergleich WT mit IFN- γ und WT ohne IFN- γ (der WT ohne IFN- γ ist in beiden Fällen die gleiche Analyse). Punkte stellen die Einzelwerte der in Triplikaten gezählten Spots dar. Die 95% Konfidenzintervalle der Regressions-Ursprungsgeraden sind grau hinterlegt. MPN, *most probable number*, in Klammern sind die 95% Konfidenzintervalle der MPN angegeben. Verändert nach Fink et al., 2012.

Dass sich die tatsächliche Menge an sezerniertem IFN- γ jedoch zwischen den Gruppen stark unterscheidet, zeigte sich bei der Analyse der Spot-Größenverteilung (Abb. 4.22).

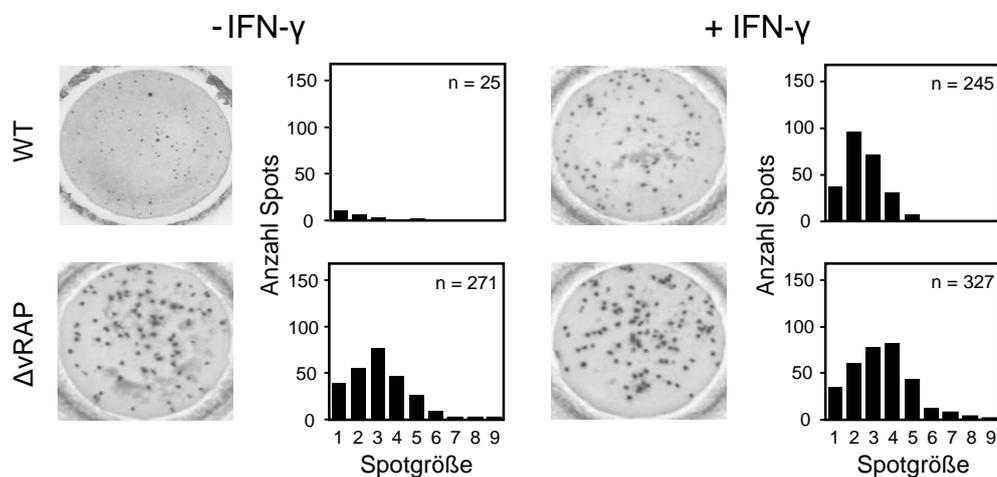


Abb. 4.22 Vergleich der Spotgrößen im ELISpot Assay nach Infektion mit Δv RAP und WT mit und ohne IFN- γ -Vorbehandlung.

Infektion siehe Abb. 4.21. Gezeigt sind Bilder repräsentativer Assay-Felder mit 100 Effektoren aus Abb. 4.21. Unterschiedliche Spotgrößen bedeuten unterschiedliche Intensitäten der CTL-Erkennung. Die Balken zeigen die Gesamtspts der Replikate. Die Spotgrößen sind in folgende Einheiten eingeteilt: 1: 500-5000 μm^2 ; 2: 5000-10000 μm^2 ; 3: 10000-15000 μm^2 ; 4: 15000-20000 μm^2 ; 5: 20000-25000 μm^2 ; 6: 25000-30000 μm^2 ; 7: 30000-35000 μm^2 ; 8: 35000-40000 μm^2 ; 9: >40000 μm^2 . Verändert nach Fink et al., 2012.

Mit Δv RAP infizierte Zellen führen zu einer stärkeren Aktivierung der CD8 T-Zellen (mehrheitlich große Spots), während nicht vorbehandelte WT-infizierte Zellen nur kleine Spots induzieren (fast keine Aktivierung der CD8 T-Zellen). Dagegen führt die IFN- γ Vorbehandlung

WT-infizierter Zellen zu einer stärkeren Aktivierung, die aber immer noch schwächer ist als die nach Infektion mit der Deletionsmutante. Die größeren Spots weisen also auf eine größere Anzahl an pMHC-I-Komplexen an der Oberfläche Δ vRAP-infizierter Zellen hin.

Die stärkste Aktivierung, erkennbar an der Spot-Größenverteilung erfolgte nach Δ vRAP-Infektion IFN- γ vorbehandelter Zellen. Die stärkere Aktivierung der IE1-spezifischen CTL durch Δ vRAP-infizierte Zellen im Vergleich zu IFN- γ vorbehandelten WT-infizierten Zellen zeigt, dass die Vorbehandlung mit IFN- γ die Wirkung der vRAPs nicht aufhebt. In Gegenwart der vRAPs werden also auch nach Vorbehandlung mit IFN- γ weniger pMHC-I-Komplexe an die Zelloberfläche transportiert als nach Deletion der vRAPs.

4.5.5 Die Erkennung Antigen-präsentierender Zellen ist abhängig von einer effizienten Antigen-Prozessierung

Es erscheint wahrscheinlich, dass die vRAPs die Oberflächenexpression von pMHC-I-Komplexen effizient verhindern können, wenn die Anzahl an pMHC-I-Komplexen kleiner oder gleich der Anzahl an vRAP Molekülen ist. Wird dagegen die Zahl an pMHC-I-Komplexen erhöht, reicht die inhibitorische Kapazität der vRAPs rein stochiometrisch nicht mehr aus, um alle Komplexe effizient zurückzuhalten. Die Antigenpräsentation auf infizierten Zellen und die antivirale Funktion der CD8 T Zellen *in vivo* in Anwesenheit der vRAPs korrelieren mit einer effizienten Prozessierung und einer damit verbundenen erhöhten Zahl an pMHC-I-Komplexen auf Einzelzellbasis (Holtappels et al., 2002a; 2009). Wie von unserer Arbeitsgruppe bereits publiziert, vermitteln nach Immunsuppression adoptiv transferierte M45D^b-spezifische CTL keinen Schutz gegen eine nachfolgende WT-Infektion (Holtappels et al., 2004; 2009). M45D^b stellt daher den Prototyp einer nicht-schützenden Spezifität dar (Holtappels et al., 2004). Dies ist insofern interessant, als die CTL eine gemessene hohe funktionelle Avidität (10^{-10} M) aufwiesen und exogen beladene APC gut erkannten. Das Fehlen des Schutzes nach Transfer M45D^b-spezifischer CTL geht einher mit der Nicht-Erkennung WT-infizierter Zellen *in vitro*. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass das M45D^b-Peptid sehr schlecht prozessiert und präsentiert wird und es damit zu einem sehr niedrigen Level an M45D^b-Komplexen auf der Zelloberfläche kommt (Holtappels et al, 2009). Interessanterweise konnte nach Infektion mit Δ m152 und Transfer von M45D^b-spezifischen CTL wieder Schutz gegen die Infektion vermittelt werden. Fehlt der stärkste negative Regulator der Antigenpräsentation, m152 (siehe 4.5.3), führt also auch eine sehr niedrige Prozessierungsrate zu einer Erkennung der Zielzellen durch CD8 T-Zellen und somit zu einem Schutz *in vivo*.

Es stellte sich nun die Frage, ob durch eine Vorbehandlung mit IFN- γ die Prozessierungsrate so gesteigert werden kann, dass die inhibitorische Aktivität der vRAPs nicht mehr ausreicht, um alle M45D^b-Komplexe zurückzuhalten und es somit zu einer Aktivierung M45D^b-spezifischer CD8 T-Zellen kommt.

Um die Aktivierung der CD8 T-Zellen zu analysieren, wurden unbehandelte oder IFN- γ vorbehandelte MEF mit dem kompletten Set an vRAP-Deletionsmutanten infiziert und 90min p.i. in den ELISpot Assay eingesetzt. Abb. 4.23 zeigt die Aktivierung M45D^b-spezifischer CD8 T-Zellen durch infizierte MEF. Dabei stimmt die Erkennung der Präsentation viraler Peptide auf infizierten MEF durch monospezifische CD8 T-Zellen weitestgehend mit der polyklonalen überein (vgl. Abb. 4.20 in 4.5.3). Auch hier hat m152 den stärksten Einfluss auf die Inhibition der Präsentation. Nach Vorbehandlung mit IFN- γ werden die Unterschiede zwischen den Immunevasionsmutanten aufgehoben, d.h. die infizierten MEF scheinen eine ähnliche Peptidpräsentation aufzuweisen. Allerdings werden die M45D^b-spezifischen CD8 T-Zellen im Vergleich zu polyklonalen CD8 T-Zellen nach Inkubation mit WT-infizierten MEF nur schwach aktiviert.

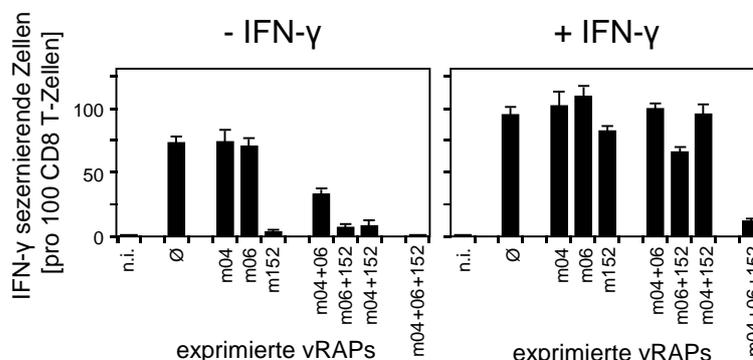


Abb. 4.23 Einfluss von IFN- γ auf die Antigenpräsentation von M45D^b-Peptiden.

IFN- γ vorbehandelte oder unbehandelte MEF wurden mit den angegebenen Viren zentrifugal infiziert (MOI=4; angegeben sind die jeweils exprimierten Proteine) und 90min p.i. in den ELISpot Assay eingesetzt. Als Effektoren dienten M45D^b-spezifische CTL. Die Frequenzen IFN- γ produzierender CD8 T-Zellen wurden mittels linearer Regressionsanalyse mit Hilfe der Statistik-Software Mathematica V8 ermittelt. Die 95% Konfidenzintervalle sind als Fehlerbalken dargestellt; n.i. nicht infiziert. Verändert nach Fink et al., 2012.

In einem nächsten Schritt sollten die Peptidmoleküle pro Zelle quantifiziert werden. Hierfür wurde zunächst im Zytolysetest (siehe 3.6.4) eine Eichkurve der Erkennung von synthetischem Peptid durch M45D^b-spezifische CTL erstellt. Abb. 4.24 zeigt die im Zytolysetest gemessenen Lysewerte. Um die Peptidkonzentration und daraus die Menge der Peptide pro Zelle nach Infektion zu bestimmen wurde aus den im linearen Bereich (10^{-13} M bis 10^{-11} M) liegenden Werten der Standardkurve eine Regressionsgerade erstellt.

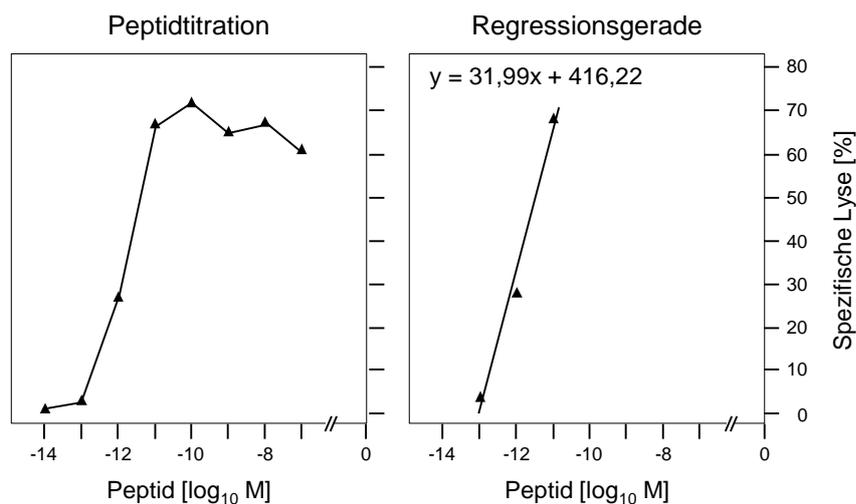


Abb. 4.24 Werte des Zytolysetests M45D^b-spezifischer CTL und Ableitung der Regressionsgerade.

EL4 Zellen wurden mit 100 μ Ci [⁵¹Cr] Natrium-Chromat pro 1x10⁶ Zellen markiert und für 1h bei 37°C mit den angegebenen Konzentrationen an synthetischem M45D^b-Peptid beladen. M45D^b-spezifische CTL wurden zu den APC gegeben und 4h bei 37°C kokultiviert. Anschließend wurden die Zellen abgenommen, pelletiert und die freigesetzte Radioaktivität in 100 μ l des Überstandes am γ -Counter analysiert. Die Regressionsgerade wurde aus den im linearen Bereich liegenden Lysewerten ermittelt.

Für die Analyse der *steady-state* Menge an MHC-I-geschütztem Peptid zum Zeitpunkt der Extraktion wurden unbehandelte oder IFN- γ vorbehandelte MEF mit WT infiziert und 24h p.i. eine Peptidextraktion durchgeführt (siehe 3.5.1.1). Die Extrakte wurden mittels G25-Sephadex und Sep-Pak-Kartusche (siehe 3.5.1.2) aufgereinigt, konzentriert und anschließend über die HPLC fraktioniert (siehe 3.5.1.3). Die gesammelten Fraktionen wurden im Zytolysetest (siehe 3.6.4) auf das antigene M45D^b-Peptid hin untersucht. Abb. 4.25 zeigt, dass das Peptid um Fraktion 28 eluiert wird, da bei dieser Fraktion die CD8 T-Zellen aktiviert werden. Um die Peptidmoleküle pro Zelle zu quantifizieren, wurden von Fraktion 28 (nach IFN- γ Vorbehandlung zusätzlich von Fraktion 27) Verdünnungen hergestellt und diese wiederum in einen Zytolysetest eingesetzt.

Berechnung der Molarität des Peptids

Anmerkung: Sowohl die Lysewerte als auch die errechneten Werte der Peptidmoleküle pro Zelle sind in Abb. 4.25 dargestellt.

$$\begin{aligned}
 y &= ax + b \\
 \%Lyse &= a \times \log [\text{Peptidkonzentration [mol/l]}] + b \\
 \log [\text{Peptidkonzentration [mol/l]}] &= (\%Lyse - b)/a \\
 &= (\%Lyse - 416,22)/31,99
 \end{aligned}$$

	-IFN- γ			+IFN- γ (Fraktion 28 in Klammern)		
Eingesetzte Zellen	2,75x10 ⁸			2,3x10 ⁸		
Anteil Gesamtextrakt	25%			25%		
Menge HPLC-Fraktion (aus 800 μ l)	180 μ l	60 μ l	10 μ l	10 μ l (60 μ l)	1,7 μ l (10 μ l)	0,28 (1,7 μ l)
%Lyse	33,99	25,97	7,84	59,68 (57,12)	38,13 (40,74)	8,92 (14,64)

Peptidkonzentration	$1,12 \times 10^{-12}$	$6,27 \times 10^{-13}$	$1,7 \times 10^{-13}$	$7,1 \times 10^{-12}$ ($5,9 \times 10^{-12}$)	$1,5 \times 10^{-12}$ ($1,82 \times 10^{-12}$)	$1,84 \times 10^{-13}$ ($2,77 \times 10^{-13}$)
---------------------	------------------------	------------------------	-----------------------	--	---	--

Berechnung der Peptidmoleküle pro Zelle

$$\text{Peptidmoleküle/Zelle} = \frac{(c \times D \times V \times N_A)}{Z}$$

Beispiel für 180µl-Fraktion: $1,12 \times 10^{-12} \times 17,78 \times 10^{-4} \times 6,023 \times 10^{23} / 2,75 \times 10^8$
= 4,36

	-IFN-γ			+IFN-γ (Fraktion 28 in Klammern)		
Menge HPLC-Fraktion (aus 800µl)	180µl	60µl	10µl	10µl (60µl)	1,7µl (10µl)	0,28µl (1,7µl)
Peptidkonzentration	$1,12 \times 10^{-12}$	$6,27 \times 10^{-13}$	$1,7 \times 10^{-13}$	$7,1 \times 10^{-12}$ ($5,9 \times 10^{-12}$)	$1,5 \times 10^{-12}$ ($1,82 \times 10^{-12}$)	$1,84 \times 10^{-13}$ ($2,77 \times 10^{-13}$)
Peptidmoleküle/Zelle	4,36	7,32	11,9	1024	1330	1030
Mittelwert	8			1128		

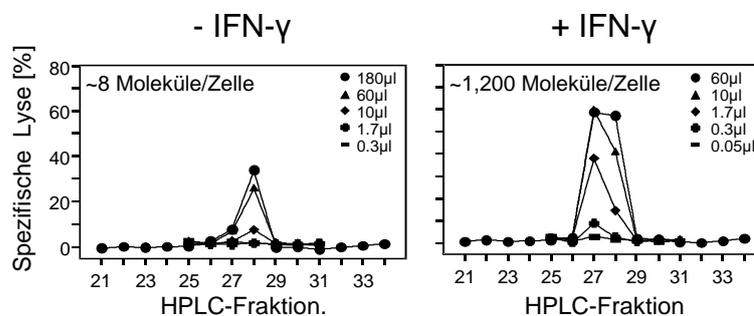


Abb. 4.25 Einfluss von IFN-γ auf die Prozessierung von M45D^b-Peptiden.

IFN-γ vorbehandelte oder unbehandelte MEF wurden mit WT zentrifugal infiziert (MOI=4) und 24h p.i. eine Peptidextraktion durchgeführt. Nach Aufreinigung und Aufkonzentration mittels G25-Sephadex und Sep-Pak-Kartusche sowie Fraktionierung mittels der HPLC wurden EL4 Zellen mit [⁵¹Cr] markiert, 1h bei 37°C mit den jeweiligen Fraktionen beladen und anschließend für 4h mit M45D^b-spezifischen CTL bei 37°C kokultiviert. Anschließend wurden die Zellen abgenommen, pelletiert und die freigesetzte Radioaktivität in 100µl des Überstandes am γ-Counter analysiert. Verändert nach Fink et al., 2012.

Nach WT-Infektion liegt der *steady-state* Level des M45D^b-Peptids bei nur ca. 8 Molekülen/Zelle (Abb. 4.25). Dementsprechend gering ist auch die Aktivierung der M45D^b-spezifischen CTL. Demgegenüber führt die Vorbehandlung mit IFN-γ zu einer Erhöhung des *steady-state* Levels auf ca. 1200 Moleküle/Zelle. Die Quantifizierung der prozessierten Peptide zeigt sehr deutlich, dass durch die Vorbehandlung mit IFN-γ die Prozessierung und Präsentation des antigenen Peptides stark erhöht wird. In Kombination mit den Ergebnissen in Abb. 4.23 kann geschlossen werden, dass der inhibitorische Effekt der vRAPs dann nicht mehr ausreicht, um den Transport aller M45D^b-Komplexe an die Zelloberfläche zu verhindern.

4.5.6 IFN-γ-Vorbehandlung *in vivo* führt zu einem besseren Schutz nach adoptivem Transfer M45D^b-spezifischer CTL

Es sollte nun getestet werden, ob der Einfluss von IFN-γ auch *in vivo* einen Effekt auf den Schutz vor mCMV-Erkrankung hat. Hierfür wurde untersucht, ob die in 4.5.5 beschriebenen, nicht-schützenden M45D^b-spezifischen CTL durch IFN-γ eine schützende Eigenschaft

etablieren können. Hierfür wurden SAP-IFN- γ -Mäuse (Haplotyp H-2^b) immunsupprimiert, infiziert und ihnen anschließend M45D^b-spezifische CTL transferiert. Diese transgenen Tiere exprimieren IFN- γ konstitutiv unter der Kontrolle des Leber-spezifischen *Serum Amyloid P* (SAP) *component* Genpromotors und weisen hierdurch verglichen mit nicht-transgenen Tieren (<125pg/ml) einen hohen konstitutiven IFN- γ Spiegel (ca. 3500pg/ml) im Serum auf (Toyonaga et al., 1994).

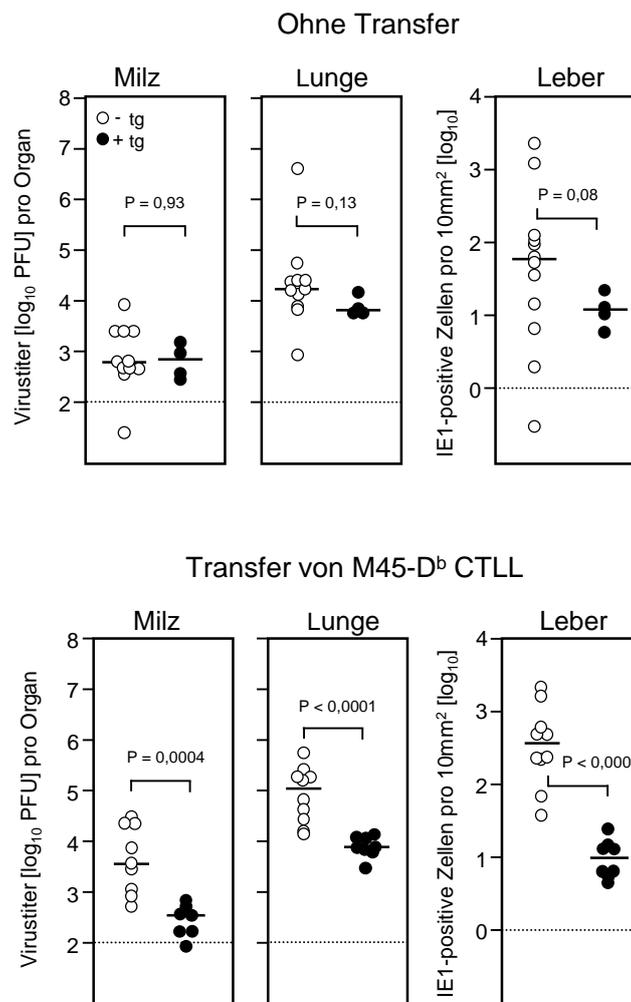


Abb. 4.26 IFN- γ -Vorbehandlung *in vivo* führt zum Schutz durch adoptiv transferierte M45D^b-spezifische CTL.

SAP-IFN- γ -Mäuse wurden durch γ -Bestrahlung immunsupprimiert und anschließend mit 1×10^5 pfu/25 μ l PBS/Maus intraplantar mit WT infiziert. 10d p.i. wurden den Tieren Milz, Lunge und Leber entnommen und der Virustiter in Milz und Lunge mittels Plaqueassay aus Organhomogenaten bestimmt oder in der Leber die Anzahl infizierter Zellen durch IE1-spezifische IHC für eine repräsentative Fläche von 10mm² ermittelt. Die Punkte stellen Einzeltierbestimmungen dar, die Mediane sind als horizontale Balken eingezeichnet. Oben: ohne adoptiven Transfer; Unten: nach adoptivem Transfer von 1×10^6 M45D^b-spezifischen CTL (in 500 μ l PBS/Maus; i.v.). Offene Kreise/-tg: nicht transgene Tiere (Pool aus mehreren Würfen); schwarze Punkte/+tg: transgene Tiere (aus denselben Würfen). Transgene Tiere exprimieren konstitutiv IFN- γ , was einer *in vivo* Vorbehandlung der Zellen vergleichbar der *in vitro* Situation entspricht. Die Berechnung der P-Werte (*Welch's unpaired t-test*) der log-transformierten Daten erfolgte mit Hilfe einer Online zur Verfügung stehenden Software (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm?Format=SD>). P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet. Verändert nach Fink et al., 2012.

Nach Infektion mit WT ohne Transfer der CTLL unterscheiden sich die Virustiter in Milz und Lunge von transgenen und nicht-transgenen Tieren nicht (Abb. 4.26). Auch die Anzahl

infizierter (IE1-positiver Zellen) in der Leber ist nicht beeinflusst. Die Überexpression von IFN- γ zeigt also keinen direkten antiviralen Effekt (vgl. 4.5.4). Ein adoptiver Transfer von 1×10^6 M45D^b-spezifischen CTL hingegen bewirkt in den transgenen Tieren einen signifikanten Titer-Abfall verglichen zu nicht-transgenen Tieren. Der Einfluss der IFN- γ Überexpression ist in allen drei untersuchten Organen zu erkennen. Dies zeigt, dass die IFN- γ -Überexpression zu Schutz durch ansonsten nicht-schützende M45D^b-spezifischen CTL führt.

5 Diskussion

Die klinische Relevanz der HCMV-Infektion zeigt sich in der weltweiten Verbreitung, der hohen Durchseuchung sowie dem von hoher Morbidität und Mortalität gekennzeichneten Krankheitsbild in immunsupprimierten Patienten, wie Empfängern hämatopoietischer Zelltransplantationen oder Organtransplantaten. Lebenslange neurologische Spätfolgen wie Hörverlust und mentale Retardation, ausgelöst durch die kongenitale Infektion des Fötus im Mutterleib, sind ein nicht unerheblicher Kostenfaktor für die Gesundheitssysteme (Grosse et al., 2013). In immunkompetenten Individuen spielt die CMV-Infektion dagegen eine eher untergeordnete Rolle. Die effiziente Kontrolle durch das Immunsystem scheint mit dem Wissen in Konflikt zu stehen, dass sowohl HCMV als auch CMV anderer Spezies während der Koevolution mit ihrem jeweiligen Wirt Mechanismen entwickelt haben, um der Erkennung durch das angeborene und adaptive Immunsystem zu entgehen (zur Übersicht: Reddehase, 2002; Vidal et al., 2013). Da die Immunkontrolle sowohl der HCMV- als auch der mCMV-Infektion hauptsächlich durch CD8 T-Zellen vermittelt wird (Reddehase et al., 1985; 1988; Reusser et al., 1991; Riddell et al., 1991; Reddehase, 2002; Holtappels et al., 2006b; 2008a), ist seit über 20 Jahren die Wechselwirkung von HCMV (zur Übersicht: Lilley & Ploegh, 2005; Lin et al., 2007) bzw. mCMV (del Val et al., 1989; Reddehase et al., 2004; Pinto & Hill, 2005; Böhm et al., 2008b) mit dem MHC-Klasse-I-Weg der Antigenpräsentation ein Schwerpunkt der Forschung.

Im murinen Modellsystem konnten bisher drei für die Immunevasion verantwortliche Genprodukte (m04/gp34, m06/gp48 und m152/gp40) identifiziert werden. Sie interagieren während der produktiven Infektion mit Peptid-beladenen MHC-Klasse-I-Komplexen und verhindern die Präsentation viraler Peptide an der Zelloberfläche (Hengel et al., 1999). Aus diesem Grund werden diese drei Genprodukte als vRAPs (*viral regulators of antigen presentation*) (Reddehase, 2002; Holtappels et al., 2006a), oder VIPRs (*viral gene products that interfere with antigen presentation*) (Pinto & Hill, 2005) bezeichnet. Die Funktionen der einzelnen vRAPs wurden innerhalb der letzten Jahre mit Hilfe eines von Markus Wagner generierten Sets an Immunevasions-Deletionsmutanten (Wagner et al., 2002), in denen die Proteine einzeln oder in allen möglichen Kombinationen deletiert sind, eingehend untersucht (Wagner et al., 2002; Holtappels et al., 2006a; Pinto et al., 2006).

In unserer Arbeitsgruppe konnte nach Infektion von MEF mit der Rekombinanten $\Delta m06^W$ ein inhibitorischer Effekt von m04 auf die Wirkung von m152 beschrieben werden (Holtappels et al., 2006a). Dieser hatte zur Folge, dass mit $\Delta m06^W$ infizierte Zellen gut von CD8 T-Zellen erkannt wurden, obwohl das m152 als starker Inhibitor der Präsentation viraler Antigene exprimiert ist. Die inhibitorische Wirkung von m04 auf die Funktion von m152 zeigte sich

allerdings nur in Abwesenheit des dritten vRAPs m06, da die Infektion mit WT und die damit verbundene Expression aller drei vRAPs die stärkste Inhibition der Antigenpräsentation vermittelte (Holtappels et al., 2006a).

Die effiziente Kontrolle der Infektion durch CD8 T-Zellen *in vivo* wird trotz Expression der vRAPs und somit Inhibition der Antigenpräsentation nicht verhindert (zur Übersicht: Reddehase, 2002). Im murinen Modell der CMV-Erkrankung konnte der schützende Effekt von Virus-Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen nach Hämatoablation durch γ -Bestrahlung mit anschließendem AT der CMV-geprägten CD8 T-Zellen (präemptiver T-Zell-Transfer) und intraplantarer Infektion mit mCMV gezeigt werden (Reddehase et al., 1985; 1987a; b; 1988). Erfolgte der AT 6 Tage nach Infektion, einem Zeitpunkt also, zu welchem schon deutliche Organmanifestationen zu erkennen waren, vermittelten die T-Lymphozyten zwar auch eine effiziente Kontrolle der bestehenden Infektion (therapeutischer T-Zell-Transfer), in diesem Fall war jedoch eine ~10fach höhere Zellzahl erforderlich (Reddehase et al., 1985). In der klinischen Anwendung ist der Zeitpunkt einer Virusreaktivierung - sei es in den transplantierten hämatopoietischen Zellen eines CMV-positiven Spenders oder im CMV-positiven Empfänger selbst - ein variabler Parameter. Klinisch gesehen ist die „präemptive Therapie“ (sowohl die Gabe antiviraler Mittel als auch die Immuntherapie) als die Therapie definiert, die zu dem Zeitpunkt begonnen wird, zu welchem erstmals eine CMV-Reaktivierung festgestellt wird. Dies geschieht meist mittels qPCR auf virale DNA (Madej et al., 2010; Pollack et al., 2011).

Im kliniknahen Modell einer experimentellen, syngenen (Holtappels et al., 1998; Podlech et al., 1998; 2000) als auch einer allogenen (Alterio de Goss et al., 1998) KMT konnte gezeigt werden, dass die Kontrolle der mCMV-Infektion von der endogenen Rekonstitution antiviraler CD8 T-Zellen abhängt. Dementsprechend verbessert der zusätzliche Transfer virus-spezifischer CD8 T-Zellen die Terminierung der akuten Infektion und erhöht die Überlebensrate in Abhängigkeit von der verabreichten Dosis (Steffens et al., 1998).

Basierend auf dem murinen Modell wurden große Anstrengungen auf die Übertragung des AT in die klinische Anwendung unternommen (Greenberg et al., 1991; Riddell et al., 1992; Walter et al., 1995). Obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt werden konnten (Peggs et al., 2003; Einsele & Hamprecht, 2003; Cobbold et al., 2005; Feuchtinger et al., 2010; Schmitt et al., 2011), stellt die Bereitstellung der notwendigen CD8 T-Zell Zahl in der klinischen Anwendung den limitierenden Faktor dar. Um Schutz auch mit einer geringeren Menge an CD8 T-Zellen zu gewährleisten, stellt sich die Frage nach einer Möglichkeit, die Präsentation der pMHC-Klasse-I-Komplexe zu erhöhen oder wiederherzustellen. Hengel und Kollegen zeigten, dass eine Vorbehandlung von Zellen mit IFN- γ *in vitro* einer durch mCMV-Infektion hervorgerufenen Reduktion der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression entgegenwirkt (Hengel et al., 1994). Zusätzlich konnte in adoptiven Transferexperimenten die strikte Abhängigkeit der CD8 T-Zell-Effektorleistung des Wirtes von IFN- γ gezeigt werden. So wurde das protektive

Potential der transferierten CD8 T-Zellen durch die *in vivo*-Depletion von IFN- γ in immunsupprimierten, WT-infizierten Rezipienten signifikant reduziert (Hengel et al., 1994). Dieses legt nahe, dass die Antigen-Präsentation auch *in vivo* von IFN- γ beeinflusst wird.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war zum einen, die Wechselwirkung zwischen den vRAPs m04 und m152 näher zu charakterisieren und den beobachteten negativen Einfluss von m04 auf die Wirkung von m152 nach Infektion mit Δ m06^W aufzuklären. Zum anderen sollten die bisherigen Erkenntnisse zum Einfluss von IFN- γ auf die Wirkung der vRAPs erweitert werden.

5.1 Diskussion der Ergebnisse zur Untersuchung des vRAPs m152

Der putativ inhibitorische Effekt von m04 auf die Wirkung von m152 in mit Δ m06^W infizierten Zellen zeigte sich im Vergleich zur Δ m04m06-Infektion, nach der m152 solitär exprimiert wird. m152 ist nach letzterer in der Lage, die MHC-Klasse-I-Oberflächenpräsentation effektiv zu inhibieren. Es schien aber so als würde die verminderte Präsentation viraler Peptide an der Oberfläche infizierter Zellen durch die Co-Expression von m04 aufgehoben (Holtappels et al., 2006a). Der Effekt konnte für alle MHC-Klasse-I-Moleküle der Haplotypen H-2^d und H-2^b und für 10 verschiedene Epitope von 9 viralen Proteinen beobachtet werden (Holtappels et al., 2006a). Allerdings konnte der anti-immunevasive Effekt von m04 mit den neu generierten Viren Δ m06^{L1} und Δ m06^{L2} nicht reproduziert werden (Lemmermann et al., 2012). Vielmehr konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass m152 in Δ m06^W-infizierten Zellen in wesentlich geringeren Mengen synthetisiert wird, als nach Infektion mit anderen Viren, welche ebenfalls für m152 kodieren. Eine beschleunigte Degradation von m152 in Δ m06^W-infizierten Zellen konnte durch die Blockade der Proteinsynthese mittels Cycloheximid und anschließender Analyse der Proteine im Western Blot ausgeschlossen werden. Es konnte jedoch nach Infektion mit WT oder Δ m06^L neben der bekannten 40kDa-Bande eine weitere, ca. 48kDa schwere Bande nachgewiesen werden. Diese wurde nach Blockade der Translation prominenter, was auf eine posttranslationale Modifikation des Proteins hindeutet. Diese Bande fehlte nach Infektion mit Δ m06^W. Alle nachgewiesenen Protein Isoformen zeigten sich Endo H resistent, die Behandlung mit PNGase F führte hingegen zu einem Abfall aller Banden auf ca. 36kDa, was dem nicht glykosylierten Protein entspricht. Ziegler und Kollegen konnten nach Behandlung der Zellen mit Tunicamycin, durch das spezifisch die N-Glykosylierung blockiert wird, eine ca. 34kDa schwere Bande nachweisen (Ziegler et al., 1997). Durch die Deglykosylierung mit PNGase F wird das Asn, von welchem die Zuckerreste abgespalten werden in Asp umgewandelt und dadurch die Ladung des Proteins verändert. Es kann sich demnach durchaus um die gleiche Isoform des m152-Proteins handeln.

Nach den bisherigen Beobachtungen geht das Fehlen der Immunevasion von Δ m06^W mit einer reduzierten Glykosylierung des m152 einher. Um zu untersuchen, ob die Glykosylierung für

die Funktion des Proteins notwendig ist, wurden in dieser Arbeit zunächst Expressionsplasmide hergestellt, um die genutzten N-Glykosylierungsstellen zu identifizieren. Im Anschluss daran wurde eine Virusrekombinante generiert, in der die putativen N-Glykosylierungsstellen von m152 mutiert waren, so dass das Protein nach Infektion nicht glykosyliert werden konnte.

Mutation der drei putativen N-Glykosylierungsstellen von m152

Putative N-Glykosylierungsstellen von m152 wurden an den Asparagin-(Asn; Einbuchstabencode: N)-Resten Asn61, Asn208 und Asn241 vorhergesagt. Durch die Generierung der Expressionsplasmide in denen die N-Glykosylierung von m152 in allen möglichen Kombinationen durch AS-Austausche der jeweiligen Asn durch Glutamin (Gln; Einbuchstabencode: Q) verhindert wird, sollte zunächst untersucht werden, welche AS-Position tatsächlich für die N-Glykosylierung genutzt wird. Die Transfektion von COS-7-Zellen mit den jeweiligen Expressionsplasmiden deutete auf eine Nutzung der Positionen Asn61 und Asn208 hin, denn nach singulärem AS-Austausch zeigte sich im Western Blot nur dort ein *Shift* der Proteine um ca. 2kDa von 40kDa auf 38kDa. Dieser *Shift* war nach singulärer Mutation des Asn241 nicht nachweisbar, so dass diese Position wahrscheinlich nicht genutzt wird, wenn die beiden anderen vorhanden sind. War jedoch eine der Positionen durch den Austausch zu Gln nicht mehr für eine N-Glykosylierung zugänglich, konnte – zumindest in COS-7-Zellen – auch Asn241 glykosyliert werden. Daher führte die Mutation N61/208Q zu einer prominenten Bande bei 36kDa und einer schwachen Bande bei 38kDa. Waren alle 3 Positionen mutiert, zeigte sich wiederum die 36kDa-Spezies als prominente Bande. so dass die tatsächlich genutzten N-Glykosylierungsstellen aus den Transfektionsexperimenten nicht eindeutig bestimmt werden konnten.

In einer vor Kurzem veröffentlichten Studie wurde mit Hilfe der Ektodomäne des His6-getaggten m152, welche in Drosophila S2-Zellen exprimiert wurde, die Kristallstruktur des m152/RAE-1 γ -Komplexes aufgeklärt (Wang et al., 2012). Dabei wurde des Weiteren gezeigt, dass die AS-Positionen Asn61 und Asn208 eine N-Glykosylierung aufweisen, nicht jedoch Asn241. Die in der hier vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse unterstützen diesen Befund.

Um den funktionellen Einfluss der N-Glykosylierung des m152 auf dessen immunevasive Funktion zu untersuchen, wurde die mCMV-Rekombinante m152 Δ 3Glyc generiert. Die Herstellung erfolgte in einer Kombination aus Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren des BAC-Systems (Messerle et al., 1997; Borst et al., 1999; 2004b; Wagner et al., 1999; 2002) und Red-vermittelter markerloser DNA-Rekombination nach Tischer et al. (2006). Zunächst wurden die für Asn kodierenden Nukleotide an den Positionen 210 688-210 690 und 210 589-210 589 (AS-Positionen 208 und 241) mit Hilfe des *Shuttle*-Vektors

pST76K_m152N208/241Q_flank ausgetauscht. Nach Umklonierung des BAC-Plasmids in GS1783-Bakterien konnte die dritte Mutation an Nukleotidposition 211 129-211 131 (N61Q) durch Red-vermittelte Rekombination eines PCR-Fragments mit dem BAC-Plasmid eingefügt werden. Nach abschließender Transfektion der rekombinanten mCMV-BAC-Plasmide in permissive Zellen und ihrer Rekonstitution wurde das Virus aus Zellkulturüberstand aufgereinigt.

Die fehlende Glykosylierung von m152 hat keinen Einfluss auf den viralen Infektionszyklus

Ein Ziel dieser Arbeit war es, eine mCMV-Rekombinante zu generieren, mit welcher der Einfluss der N-Glykosylierung von m152 für die Immunevasion untersucht werden kann. Gleichzeitig musste jedoch ausgeschlossen werden, dass die AS-Austausche und die damit verbundene Nicht-Glykosylierung die Expression des m152-Proteins oder die replikative Fitness des Virus *in vivo* beeinträchtigen.

Die Proteinexpressionskinetik von m152 zeigte in m152 Δ 3Glyc-infizierten MEF keinen Unterschied zum unveränderten Protein (WT). Das Protein war ab 4h p.i. nachweisbar und unterscheidet sich lediglich in seiner molekularen Masse (36kDa) vom Ursprungprotein (40kDa bzw. 48kDa). Auch die *in vivo* Replikation der mCMV-Rekombinanten in immunsupprimierten BALB/c-Mäusen war von der fehlenden Glykosylierung weitestgehend unbeeinflusst. m152 Δ 3Glyc replizierte in der Milz mit vergleichbarer Kinetik wie WT, zeigte jedoch in Lunge und Leber eine leichte Attenuierung, was sich in einer verlängerten Verdopplungszeit äußerte. Der Grund für diese Attenuierung ist bisher nicht geklärt. Obwohl in BALB/c Mäusen nach Immunsuppression durch γ -Bestrahlung (6-7Gy) eine durch NK-Zellen vermittelte Restimmunität erhalten bleibt (Erlach et al., 2008; Slavuljica et al., 2010), ist es unwahrscheinlich, dass die verzögerte Replikation auf eine eingeschränkte NK-Zell Immunevasion des Virus zurückzuführen ist, da sonst auch in der Milz eine Attenuierung hätte nachweisbar sein müssen.

Die fehlende Glykosylierung von m152 zeigt keinen Einfluss auf die Funktion des Proteins

In der Folge wurde die inhibitorische Kapazität des nicht-glykosylierten m152 (p36) auf die Peptidpräsentation sowie auf MHC-Klasse-I- und RAE-1-Oberflächenexpression untersucht. Im ELISpot Assay wurde geprüft, ob p36 in der Lage ist, peptidbeladene MHC-Klasse-I-Moleküle im ERGIC zu retendieren und somit die Anzahl der an der Zelloberfläche präsentierten pMHC-Klasse-I-Moleküle zu reduzieren. Es zeigte sich, dass die fehlende Glykosylierung keinen Einfluss auf das inhibitorische Potential von m152 hat und p36 vergleichbar wie das WT-Protein die Aktivierung von CD8 T-Zellen verhindern kann (vgl. Abb. 4.15). Im Gegensatz dazu wurde nach Infektion von BALB/c-MEF mit den Rekombinanten Δ m152 und Δ m06^W eine ca. 5-fach höhere Zahl an CD8 T-Zellen aktiviert als nach Infektion

mit WT, $\Delta m06^L$ oder $m152\Delta 3Glyc$. In C57BL/6-MEF war die Antigenpräsentation generell schwächer ausgeprägt, es wurden jedoch nach Infektion mit $\Delta m152$ und $\Delta m06^W$ im Vergleich zu den Ergebnissen nach Infektion mit den anderen Viren ebenfalls mehr CD8 T-Zellen aktiviert.

Dies zeigte erneut, dass $m152$ essentiell für die Inhibition der Peptid-beladenen MHC-Klasse-I-Moleküle ist und eine verminderte Expression nach Infektion mit $\Delta m06^W$ dafür nicht ausreichend ist. Die N-Glykosylierung von $m152$ spielt jedoch keine Rolle für die immunevasive Funktion des Proteins in Bezug auf die Peptidpräsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Gesamt-Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen nach Infektion zytofluorometrisch bestimmt. Hierbei konnte nach Infektion mit $m152\Delta 3Glyc$ kein Unterschied zur WT-Infektion ausgemacht werden und die Infektion führte gleichfalls zu einer starken Herabregulation der MHC-Klasse-I-Moleküle. Die fehlende Glykosylierung hat demnach keinen Einfluss auf die Funktion des Proteins für die Interaktion mit MHC-Klasse-I-Molekülen. Hier ist jedoch zu beachten, dass eine eventuelle Funktionsstörung von $m152$ unter Umständen nur nach zusätzlicher Depletion von $m06$ nachweisbar wäre (entspricht einer Rekombinante $\Delta m06m152\Delta 3Glyc$), denn sowohl $m04$ und $m06$ (Infektion mit $\Delta m152$), $m04$ und $m152$ (Infektion mit $\Delta m06^L$) als auch $m06$ alleine (Infektion mit $\Delta m04\Delta m152$) sind in der Lage, die Oberflächenexpression der MHC-Klasse-I-Komplexe effizient zu reduzieren (vgl. Abb. 4.16). Die alleinige Expression von $m04$ (Infektion mit $\Delta m06m152$) oder die Expression von $m04$ und wenig $m152$ (Infektion mit $\Delta m06^W$) reicht dagegen nicht aus, um die Oberflächen-MHC-Klasse-I-Moleküle zu reduzieren.

Bereits 2000 konnten Ziegler und Kollegen mit verschiedenen $m152$ -Mutanten, in denen definierte Regionen des Proteins deletiert waren, zeigen, dass weder der zytoplasmatische Teil noch die Transmembrandomäne (TMD) für die Retention der MHC-Klasse-I-Komplexe notwendig sind. Ohne TMD konnte zwar keine Retention nachgewiesen werden, hierfür ist jedoch die fehlende Membranverankerung des Proteins verantwortlich, denn eine Proteinchimäre, bei der die natürliche TMD durch die CD4-TMD ausgetauscht wurde retendierte die MHC-Klasse-I-Moleküle effektiv (Ziegler et al., 2000). In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die AS-Positionen 278-304, welche im lumenalen Bereich des Proteins liegen, essentiell für die Retention sind. Die putativen N-Glykosylierungsstellen von $m152$ liegen an den AS-Positionen 61, 208 und 241, daher wäre es durchaus möglich, dass die N-Glykosylierung für die Funktion des Proteins, die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression zu vermindern, nicht von Bedeutung ist. Dass die N-Glykosylierung hierfür notwendig sein könnte, basierte auf den Ergebnissen, die nach Infektion mit der Rekombinanten $\Delta m06^W$ erhalten wurden, in welchen eine höher glykosylierte Isoform des $m152$ nicht nachgewiesen werden konnte. Die Vermutung für eine Notwendigkeit der N-Glykosylierung konnte in der

vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Dass die höher glykosylierte Isoform von m152 in $\Delta m06^W$ -infizierten Zellen nicht nachgewiesen werden konnte, könnte damit zusammenhängen, dass das Protein generell schwächer exprimiert wird als in mit den anderen Viren infizierten Zellen. Erst durch Anreicherung mittels Immunpräzipitation war es möglich, überhaupt eine glykosylierte Isoform (40kDa) des m152-Proteins zu detektieren. Um zusätzlich die höher glykosylierte Isoform (48kDa) nachzuweisen, müsste die Sensitivität des Western Blots verbessert werden. Die verringerte Menge an m152 konnte schon auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Der Grund für die verminderte Expression von m152 der Rekombinanten $\Delta m06^W$ ist bisher ungeklärt. Sequenzierungen der Genregion von m152 (ORF, 3'- und 5'-UTRs, Promotorbereich) zeigten keine Sequenzunterschiede zwischen $\Delta m06^W$ und $\Delta m06^L$, so dass ein mutationsbedingter Phänotyp innerhalb der m152 Transkriptionseinheit bisher ausgeschlossen werden konnte (nicht gezeigt).

m152 wirkt nicht nur durch die Retention der MHC-Klasse-I-Moleküle negativ auf die Erkennung infizierter Zellen durch CD8 T-Zellen, sondern ist gleichfalls in der Lage die NK-Zell-Antwort durch Regulation der RAE-1-Oberflächenexpression zu inhibieren (Lodoen et al., 2003). Obwohl die nun aufgeklärte Kristallstruktur des Komplexes zwischen m152 und dem MHC-Klasse-I-ähnlichen NKG2D-Liganden RAE-1 als Modell für die MHC/MHC-Interaktion - und somit auch für die Interaktion zwischen m152 und MHC-Klasse-I-Molekülen - dienen kann, ist es denkbar, dass die N-Glykosylierung sich anders auf die m152/MHC-I-Interaktion auswirkt als auf die m152/RAE-1-Interaktion. Diese Überlegung konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Analyse der RAE-1-Oberflächenexpression ausgeschlossen werden, denn die nicht-glykosylierte Isoform p36 ist wie das WT-Protein in der Lage, die RAE-1-Oberflächenexpression zu blockieren. Im Gegensatz dazu wurde diese nach Infektion mit der Rekombinanten $\Delta m152$ gar nicht und nach Infektion mit $\Delta m06^W$ nur geringfügig reduziert. Wie oben beschrieben konnte gezeigt werden, dass das m152-Protein von $\Delta m06^W$ -infizierten Zellen in wesentlich geringeren Mengen synthetisiert wird als von WT-infizierten Zellen. Diese Menge reicht allem Anschein nach nicht aus, um die RAE-1-Oberflächenexpression effektiv zu verhindern.

Wie bereits erwähnt, wurde die Kristallstruktur des m152/RAE-1 γ -Komplexes erst kürzlich aufgeklärt (Wang et al., 2012). Es zeigte sich dabei, dass die N-terminale Region von m152 (Tyr48-Met54; Lys110-Pro114) mit N-terminalen *loops* von RAE-1 γ interagiert. Glu50 von m152 bildet Wasserstoffbrückenbindungen mit Trp21/22 von RAE-1 γ aus. Zusätzlich werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Asp135 und Asp137 von m152 und Arg73, Ser77 und Asn78 von RAE-1 γ ausgebildet. Die dabei nachgewiesenen N-Glykosylierungen an den AS-Positionen Asn61 und Asn208 von m152 befinden sich jedoch nicht in physikalischer Nähe der m152/RAE-1-Kopplungsstelle (Abb. 5.1), so dass die Glykosylierungen für diese

Interaktion wahrscheinlich nicht relevant sind. Dies bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit Daten zur Funktion.

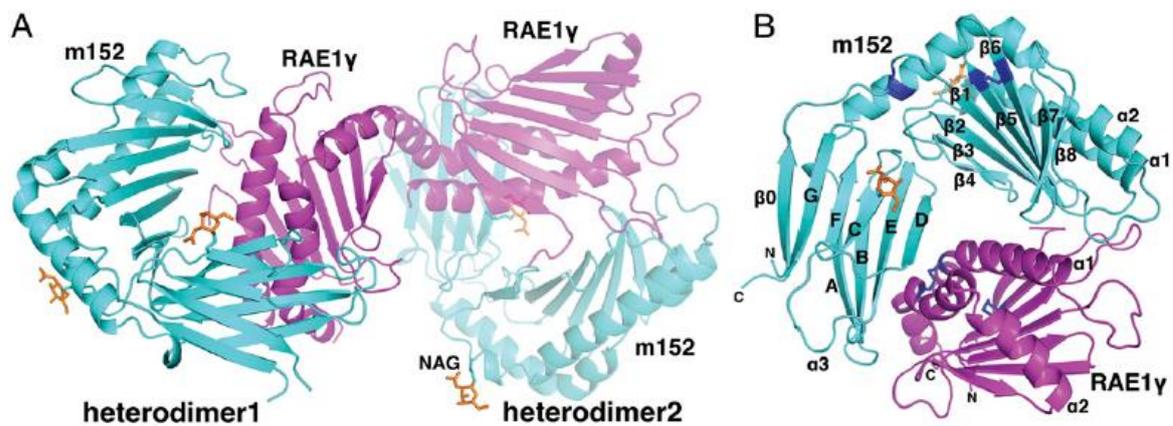


Abb. 5.1 Struktur des m152/RAE-1 γ -Komplexes.

(A) Darstellung der heterodimeren Struktur des m152/RAE-1 γ -Komplexes basierend auf einer 2,45Å Röntgenstrukturanalyse des Komplexes. In beiden Heterodimeren ist m152 in türkis, RAE-1 γ in lila dargestellt. Das Heterodimer2 ist mit einer Transparenz von 50% gezeigt. Glykosylierte Asn-Reste des m152 sind orange eingefärbt. (B) Struktur des Heterodimers 1; die Farbeinteilung entspricht der aus A. Disulfidbrücken sind blau markiert (Wang et al., 2012).

Die durch die *in vitro* erhaltenen Daten des Effekts von m152 (sowohl gp40 als auch p36) auf die RAE-1-Oberflächenexpression konnten auch *in vivo* bestätigt werden. Die antivirale Wirkung von NK-Zellen in Milz und Lunge in einem NK-Zell-Assay (Lenac et al., 2008) zeigte sich nach Infektion mit der m152-Deletionsmutante, von der RAE-1 nicht herunter reguliert wird, so dass im Folgenden die NK-Zellen durch die Bindung ihres aktivierenden Rezeptors NKG2D an seinen Liganden RAE-1 aktiviert werden. Sowohl NK-Zell-Depletion als auch Blockade des NKG2D-Rezeptors führten zu einem Titeranstieg auf WT-Level. Die Virustiter von WT und der Rekombinanten m152 Δ 3Glyc waren dagegen von der Depletion oder Rezeptorblockade unbeeinflusst. Dass die Rekombinante in der Lunge einen niedrigeren Titer aufweist als der WT liegt vermutlich an der leichten Attenuierung, die bereits in der Wachstumskinetik des neu generierten Virus feststellbar war. Eine verminderte NK-Zell-Evasion der Rekombinante kann ausgeschlossen werden, da nach Infektion mit der Rekombinanten weder die Depletion der NK-Zellen noch die Rezeptorblockade zu einer Erhöhung des Virustiters führten. Die N-Glykosylierung von m152 ist demnach für die m152/RAE-1-Interaktion, die zu einer Verhinderung der NKG2D-abhängigen Aktivierung der NK-Zellen führt, nicht essentiell.

5.2 Diskussion der Ergebnisse zum Einfluss von IFN- γ auf die Effizienz der vRAPs

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte der Einfluss von IFN- γ auf die Effizienz der einzelnen vRAPs in der Inhibition der Antigenpräsentation untersucht werden. Nach Immunablation im Rahmen einer Knochenmarktransplantation dauert es eine gewisse Zeit bis das körpereigene Immunsystem wieder voll funktionsfähig ist. Währenddessen ist der Patient stark immunsupprimiert; ein Zustand der die Reaktivierung von latent vorliegendem CMV begünstigt. Neben der Gabe antiviraler Medikamente wäre die exogene Rekonstitution virusspezifischer Immunzellen durch Transfer von CD8 T-Zellen eine wichtige therapeutische Maßnahme, um die Kontrolle des Virus zwischen Hämatoablation und Rekonstitution der protektiven Immunität zu gewährleisten. Um einen ausreichenden Schutz sicherzustellen, müssen jedoch große Mengen an Zellen verabreicht werden, was in der Praxis den limitierenden Faktor darstellt. Aus diesem Grund wird nach Möglichkeiten gesucht, auch mit geringeren Mengen an CD8 T-Zellen einen Schutz zu erhalten.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von IFN- γ auf die Wirkung der einzeln oder verschieden kombiniert exprimierten vRAPs zu untersuchen und den möglichen Erfolg eines therapeutischen Einsatzes von IFN- γ zusätzlich zum Transfer von CD8 T-Zellen zu klären.

Die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression wird durch vRAPs effektiv reduziert und durch IFN- γ wieder hergestellt

Die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression mCMV-infizierter Zellen wird durch die konzertierte Wirkung der vRAPs stark inhibiert. Eine Deletion der vRAPs stellt die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression jedoch nicht in dem Maße wieder her, wie sie auf nicht infizierten Zellen nachzuweisen ist. Ob dies mit der Expression eines bisher unbekannt vierten vRAPs zusammenhängt, ist bisher nicht bekannt. Wahrscheinlicher wäre es, dass infizierte Zellen schlechter auf parakrines Interferon reagieren, als nicht infizierte Zellen derselben Kultur. Eine Erklärung hierfür wäre der Effekt des viralen Proteins M27, welches das IFN- γ -*Signaling* durch die Herabregulation von STAT2 inhibiert (Zimmermann et al., 2005). Aufschluß darüber erhielt man über eine Rekombinante, in welcher zusätzlich zu den drei vRAPs das M27-Protein deletiert wäre (Δ vRAP Δ M27). Nach Infektion mit dieser Rekombinante sollte es zwischen infizierter und nicht infizierter Kultur keinen Unterschied in Bezug auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression geben. Tomaš et al. (2010) beschreiben außerdem einen E-Phase Effekt, der das Recycling der MHC-Klasse-I-Komplexe in infizierten Zellen inhibiert, was zu deren schnellerem Abbau führt. Es ist bisher nicht bekannt, welches Genprodukt für diesen

Effekt verantwortlich ist, die drei bekannten vRAPs konnten jedoch ausgeschlossen werden (Tomaš et al., 2010).

Durch die singuläre Expression von m04 wird die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression auf infizierten Zellen nicht reguliert. Dagegen führt die Expression von m06 bzw. m152 zu einer starken bzw. moderaten Reduktion. Auf nicht infizierten Zellen bewirkte die Vorbehandlung der Zellen mit IFN- γ eine Verstärkung der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression, welche auch durch die gemeinsame Wirkung aller drei vRAPs in WT-infizierten Zellen nicht mehr vollständig inhibiert werden kann mit der Folge, dass die beiden Populationen aus nicht infizierten und infizierten Zellen in der FACS-Analyse nicht mehr klar gegeneinander abgegrenzt werden können (vgl. Abb. 4.19). In dieser Arbeit konnten nach Vorbehandlung der Zellen mit IFN- γ kooperative Effekte der vRAPs nachgewiesen werden. So zeigten die beiden stark inhibitorischen vRAPs m06 und m152 eine kooperative Wirkung mit dem Ergebnis einer noch stärkeren Inhibition der MHC-Klasse-I-Oberflächenpräsentation als nach ihrer singulären Expression (Δ m04-Infektion verglichen mit Δ m04m152- bzw. Δ m04m06-Infektion). Auch m04, das ohne IFN- γ -Vorbehandlung keine inhibitorische Funktion zeigte, konnte die inhibitorischen Effekte von m06 und m152 leicht verstärken (Δ m04m152-Infektion verglichen mit Δ m152-Infektion, Δ m04m06-Infektion verglichen mit Δ m06-Infektion und Δ m04-Infektion verglichen mit WT-Infektion), obwohl seine singuläre Expression weder ohne noch mit IFN- γ -Vorbehandlung zu einer Reduktion der MHC-Klasse-I-Oberflächenpräsentation führt. Deshalb kann m04 *per se* nicht als negativer Regulator der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression bezeichnet werden.

Im Gegensatz zu m06 und m152 wurde für m04 bisher keine negativ regulierende Funktion auf die Peptidpräsentation oder die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression beschrieben. Während die Deletion von m152 zu einer besseren Erkennung infizierter Zellen durch CD8 T-Zellen führt (Holtappels et al., 2006a), m152 also den stärksten Inhibitor der Antigenpräsentation darstellt, hat m06 den stärksten negativen Einfluss auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression (Lemmermann et al., 2012). Die Depletion von m04 hat dagegen nur einen Einfluss auf diese beiden Parameter, wenn die infizierten Zellen *in vitro* mit IFN- γ vorbehandelt wurden. Dennoch führt die Depletion von m04 im BALB/c-System *in vivo* zu einer Attenuierung der mCMV-Rekombinanten (Babić et al., 2010). m04 erreicht nur im Komplex mit MHC-Klasse-I-Molekülen die Zelloberfläche (Kleijnen et al., 1997; Kavanagh et al., 2001b; Lu et al., 2006) und vor Kurzem wurde gezeigt, dass es eine wichtige Rolle bei der Inhibition von NK-Zellen spielt, da sich die beobachtete Attenuierung von Δ m04 als NK-abhängig herausstellte (Babić et al., 2010; 2011; Vidal et al., 2013).

Während m06 und m152 also direkt die Erkennung infizierter Zellen verhindern und die Lyse der infizierten Zellen inhibieren, wirkt m04 insofern „negativ“ auf die Lyse der Zellen, als es die inhibitorischen Rezeptoren der NK-Zellen aktiviert.

Die Antigenpräsentation mCMV-infizierter Zellen wird durch die konzertierte Wirkung der vRAPs inhibiert

Während einer Virusinfektion werden virale Peptide endogen im Proteasom prozessiert, über den TAP-Komplex in das ER transloziert und dort auf leere MHC-Klasse-I-Moleküle geladen. Im Anschluss daran werden die reifen pMHC-I-Komplexe an die Zelloberfläche transportiert, um dort CD8 T-Zellen präsentiert zu werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der vRAPs auf die Präsentation der prozessierten viralen Peptide ohne und mit IFN- γ -Vorbehandlung der Zellen untersucht. Im ELISpot Assay wurde dabei die Anzahl an aktivierten, virusspezifischen CD8 T-Zellen gemessen, welche nach Erkennung infizierter Zellen IFN- γ sezernieren.

Für die beiden Haplotypen H-2d und H-2b zeigte sich, dass ohne Vorbehandlung der Zellen die Expression aller drei vRAPs die Präsentation viraler pMHC-Komplexe effektiv inhibierte und dementsprechend nur wenige CD8 T-Zellen zur IFN- γ -Sekretion aktiviert wurden. Die Deletion von m04 oder m06 hatte im H-2^b-Haplotyp keinen, im H-2^d-Haplotyp im Falle von m06 nur einen sehr geringen Einfluss auf die Präsentation, wohingegen m152 als effizientester Inhibitor der Peptidpräsentation wirkte. In den Zellen beider Haplotypen bewirkte die Vorbehandlung der Zellen mit IFN- γ eine Aufhebung der vRAP-Wirkung auf die virale Gesamtantigenpräsentation und erweitert den von Hengel et al. (1994) bereits für das IE1-Peptid beschriebenen Effekt von IFN- γ auf dessen Präsentation.

Zusätzlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es nach WT-Infektion mit IFN- γ -Vorbehandlung und Δ vRAP-Infektion ohne Vorbehandlung zwar keinen Unterschied in der Anzahl aktivierter IE1-spezifischer CTL gibt, aber der Aktivierungsgrad der Zellen, der im ELISpot Assay anhand der Größe der Spots beurteilt werden kann, von der Expression der vRAPs abhängig ist. So wurden in beiden Fällen ausreichend pMHC-I-Komplexe an die Oberfläche transportiert, um gleich viele CD8 T-Zellen zu aktivieren, jedoch waren nach Infektion mit der Deletionsmutante wesentlich größere Spots nachzuweisen als nach Infektion mit dem WT. Dies zeigt, dass durch das Fehlen der vRAPs eine größere Anzahl an pMHC-I-Komplexen an der Zelloberfläche der infizierten Zellen präsentiert wird.

In Folge der mCMV-Infektion greifen die vRAPs in den Peptidtransport ein und verhindern die Präsentation der pMHC-I-Komplexe. Durch die Vorbehandlung der Zellen mit IFN- γ wird aber die Wirkung der vRAPs stark reduziert, so dass nicht mehr so viele pMHC-I-Komplexe zurückgehalten werden können. Erklärbar wird dies durch die Wirkung von IFN- γ : Es führt zu einer verstärkten Synthese von MHC-Klasse-I-Molekülen, zur Bildung des Immunoproteasoms sowie zu einer verstärkten Expression des TAP (Epperson et al., 1992; Geginat et al., 1997). Die Menge an vRAPs wird dadurch jedoch nicht beeinflusst (eigene nicht-publizierte Daten). Wenn die Anzahl der pMHC-I-Komplexe kleiner oder gleich (ohne Vorbehandlung) der Anzahl an vRAP Molekülen ist, scheint es rein stochiometrisch gesehen nachvollziehbar, dass die

vRAPs die Präsentation dieser Komplexe effizient inhibieren können. Wird jedoch die Anzahl an pMHC-I-Komplexen erhöht (mit Vorbehandlung), reicht die Menge an vRAPs nicht mehr aus, um alle Komplexe zurückzuhalten und die Peptidpräsentation wird in Folge dessen erhöht. Dies bedeutet, dass unter Einfluss von IFN- γ offensichtlich mehr pMHC-I-Komplexe gebildet werden, als durch die konzertierte Aktion der vRAPs in der Zelle retentiert (durch m152) oder abgebaut (durch m06) werden können.

IFN- γ erhöht die Peptid-Prozessierungsrate

Dass *in vivo* in Anwesenheit der vRAPs die Antigenpräsentation auf infizierten Zellen und die antivirale Funktion der CD8 T-Zellen mit der effizienten Prozessierung und der damit verbundenen hohen Zahl an pMHC-I-Komplexen auf Einzelzellbasis korrelieren (Holtappels et al., 2002a; 2009), zeigen die unterschiedlichen Prozessierungsraten von zwei vom viralen Protein M45 stammenden Peptiden: Während das MHC-I-D^d restringierte virale Peptid (M45D^d) effektiv prozessiert wird (ca. 5800 Peptide/Zelle) und transferierte M45D^d-spezifische CTL Schutz gegen die mCMV-WT-Infektion vermitteln, wird das MHC-I-D^b restringierte Peptid (M45D^b) sehr schlecht prozessiert (ca. 11 Peptide/Zelle) und selbst hoch-avide M45D^b-spezifische CTL können nicht schützen (Holtappels et al., 2004). Interessanterweise konnten die M45D^b-spezifischen CTL nach Infektion mit Δ 152 wieder Schutz gegen die Infektion vermitteln (Holtappels et al., 2004). Fehlt der stärkste negative Regulator der Antigenpräsentation, m152, führt also auch eine sehr niedrige Prozessierungsrate zur Peptid-Präsentation und zur Erkennung der Zielzellen durch CD8 T-Zellen.

Da die durch Proteinspaltung im Proteasom generierten Peptide degradiert werden, sofern sie nicht durch die Beladung auf naszierende MHC-Klasse-I-Moleküle vor dem Abbau geschützt werden, entspricht die Menge an Peptidmolekülen, die man aus infizierten Zellen isolieren kann, der Anzahl an pMHC-I-Komplexen, die zum Zeitpunkt der Extraktion vorhanden sind (Falk et al., 1990; del Val et al., 1992). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch IFN- γ die Prozessierungsrate des M45D^b-Peptids erhöht werden kann. Wurden ohne IFN- γ nur ca. 8 Peptid-Moleküle/Zelle prozessiert, führte die Vorbehandlung der Zellen zu ca. 1200 Peptid-Molekülen/Zelle. Interessanterweise führt die IFN- γ -Vorbehandlung *in vitro* zu einer 25fach stärkeren Prozessierung des IE1-Peptids (Hengel et al., 1994), nicht aber zu einer Verstärkung der Prozessierung des M45D^d-Peptids (Holtappels, unpublizierte Daten). Dies ist wohl auf die ohnehin schon hohe Prozessierungsrate des M45D^d-Peptids zurückzuführen. Ein anderer Aspekt wäre, dass nicht mehr Peptide prozessiert werden können als Ausgangsprotein zur Verfügung steht.

Konstitutiv exprimiertes IFN- γ führt zum Schutz durch M45D^b-spezifische CTL

Bereits 1994 konnten Hengel und Kollegen zeigen, dass die Depletion von IFN- γ in bestrahlten BALB/c-Mäusen nach Infektion mit mCMV-WT.Smith und AT von mCMV-geprimten CD8 T-Zellen ebenso wie die Depletion der CD8 T-Zellen zu einem Titeranstieg in Lunge und Nebenniere führt. *Vice versa* wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung einer konstitutiven IFN- γ -Expression auf die Kontrolle der Infektion nach adoptivem Transfer von M45D^b-spezifischen CTL untersucht. In Einklang mit den vorherigen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass in transgenen Tieren, in denen IFN- γ konstitutiv von Hepatozyten exprimiert wird, die M45D^b-spezifischen CTL in der Lage sind, die Infektion zu kontrollieren. Dass sich ohne AT keine Unterschiede zwischen transgenen und nicht-transgenen Tieren in den Organitern zeigten, unterstützt die bisherigen Befunde, dass IFN- γ alleine nur eine geringe antivirale Wirkung auf die mCMV-Replikation *in vitro* und *in vivo* hat (Lucin et al., 1992; 1994; Hengel et al., 1994), obwohl es eine wichtige Rolle bei der Modulation der Immunantwort auf die Infektion spielt (Hengel et al., 1994; Beutler et al., 2005). Die schwache Wirkung von IFN- γ *in vivo* überrascht, da gezeigt werden konnte, dass die IFN- γ -Vorbehandlung in NIH3T3-Fibroblasten durch Blockade der MIEP-Aktivität einen antiviralen Effekt induziert (Gribaudo et al., 1993; Lucin et al., 1994). Auch in MEF (Zimmermann et al., 2005) und BMDM (Presti et al., 2001) konnte eine antivirale Wirkung nachgewiesen werden. In BMDM führte die IFN- γ -Vorbehandlung während der ersten drei Stunden p.i. zu reduzierten Mengen an IE1-mRNA und IE1-Protein. Im Gegensatz dazu zeigte die Vorbehandlung in MEF keine Wirkung auf die mRNA- oder Proteinexpression von IE1, verringerte jedoch die mRNA Expression von *Late* Genen (Presti et al., 2001). In retinalen Pigmentepithelzellen konnte gezeigt werden, dass die HCMV-Infektion den durch IFN- γ induzierten iNOS-Signalweg blockiert, die Replikation jedoch durch den IFN-induzierten IDO-Signalweg inhibiert wird (Bodaghi et al., 1999).

Es ist schon lange bekannt, dass die prophylaktische Gabe von IFN- γ die Mortalität mCMV-infizierter immunkompetenter Tiere reduziert (Fennie et al., 1988). In der hier vorliegenden Arbeit wurde durch die konstitutive Expression von IFN- γ die prophylaktische Gabe nachgestellt, die erwähnte Wirkung zeigt sich allerdings nicht. Es ist jedoch zu beachten, dass die Tiere in der vorliegenden Arbeit durch γ -Bestrahlung immunsupprimiert waren, die Funktion der zellulären Immunantwort also ausgeschlossen war. Durch die prophylaktische Behandlung werden schon im Vorfeld der Infektion phagozytotische Zellen aktiviert und NK-Zellen stimuliert. Dies könnte von Vorteil sein, da die Immunantwort nach Infektion schneller und effektiver reagieren kann. Unterstützt wird diese Hypothese durch das Ergebnis, dass die Gabe von IFN- γ nach Infektion keinen schützenden Effekt mehr zeigt (Fennie et al., 1988). Die tägliche Gabe von IFN- γ vom Tag der Infektion an bis Tag 5 p.i. führte in immunkompetenten Tieren nicht zu einem messbaren Effekt auf die Virusreplikation, die Peptidprozessierung und das Peptid:pfu-Verhältnis (Geginat et al., 1997). Dies kann wahrscheinlich auf die hohen IFN- γ

Level nach Infektion zurückzuführen sein, deren Aktivität durch weitere Supplementierung nicht weiter gesteigert werden kann.

Die dargestellten Ergebnisse bestätigen die schon bekannte Verstärkung der Antigen-Prozessierung und der Antigenpräsentation (Hengel et al., 1994; Geginat et al., 1997) nach Vorbehandlung der Zielzellen mit IFN- γ . Des Weiteren unterstützen sie die Hypothese, dass eine Vorbehandlung der Zielzellen mit IFN- γ die Bildung einer so großen Anzahl an pMHC-I-Komplexen begünstigt, dass einige Komplexe trotz der inhibierenden Wirkung der vRAPs die Zelloberfläche über den konstitutiven Transport erreichen können. Obwohl sowohl nach Δ vRAP-Infektion (ohne Vorbehandlung) als auch nach IFN- γ -Vorbehandlung vor WT-Infektion vergleichbare CD8 T-Zell-Frequenzen im ELISpot Assay messbar waren, blieben die vRAPs in den IFN- γ -vorbehandelten Zellen wirksam und verringerten die Anzahl an pMHC-I-Komplexen, die an die Zelloberfläche gelangten. Dies wiederum führt zu einer reduzierten Stimulierung der CD8 T-Zellen und damit einhergehend zu einer verminderten IFN- γ -Sekretion.

Hengel et al. (1994) konnten zeigen, dass für die Initialisierung der IE1-Peptid-Präsentation eine IFN- γ Sekretion notwendig ist und vermuteten, dass die CD8 T-Zellen selbst als IFN- γ -Quelle dienen und die Zielzellen parakrin vorkonditioniert werden. Im späteren Verlauf der Infektion scheint dies durchaus eine mögliche Erklärung zu sein, zu Beginn der Infektion jedoch würden die vRAPs die Aktivierung der CD8 T-Zellen und somit deren IFN- γ -Produktion verhindern.

Zusätzlich besitzt mCMV die Fähigkeit über M27 STAT2 herabzuregulieren und damit das IFN- γ -*Signaling* zu inhibieren (Zimmermann et al., 2005). Ähnliches wurde für das E7-Onkogen von HPV-16 gezeigt; es verringert die IFN- γ vermittelte Phosphorylierung von STAT1 und blockiert so die IRF1- und TAP-Expression in Keratinozyten. Des Weiteren wird die MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation reduziert und die IFN- γ -vermittelte Verstärkung der MHC-Klasse-I-Antigenprozessierung sowie der T-Zell induzierten Lyse der Zielzellen inhibiert (Zhou et al., 2011; 2013).

Derzeit wird IFN- γ bei chronischer Granulomatose (Bemiller et al., 1995), Nierenkarzinom (Schmidinger et al., 2001) und Infektionen mit Papillomaviren (Rockley & Tying, 1995) therapeutisch eingesetzt. Nebenwirkungen sind Erytheme (Anderson et al., 1999), Fieber, Diarrhoe und Grippe-ähnliche Symptome (Bemiller et al., 1995).

5.3 Fazit

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der N-Glykosylierung des mCMV Immunevasins m152 mit Hilfe einer generierten Virusrekombinante, in der alle drei potentiellen N-

Glykosylierungsstellen durch AS-Austausche ausgeschaltet wurden, untersucht. In den von Wang und Kollegen (2012) publizierten Daten der Kristallstruktur des m152/RAE-1-Komplexes wurden Asn61 und Asn208 als N-glykosyliert beschrieben. Da sich diese Positionen nicht in unmittelbarer Nähe zur Interaktionsstelle der beiden Proteine befinden, wurden sie für diese als nicht essentiell erachtet. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nun auch experimentell bestätigt werden. Das Fehlen der N-Glykosylierung des m152 in der generierten Rekombinante m152 Δ 3Glyc zeigte keinen Einfluss auf die Inhibition der RAE-1-Oberflächenexpression und ist daher auch nicht von Bedeutung für die NK-Zell-vermittelte Immunevasion. Ebenso zeigte das Fehlen der N-Glykosylierung keinen Effekt auf die Interaktion von m152 mit klassischen MHC-Klasse-I-Molekülen oder die Präsentation viraler Peptide.

Mit den hier vorliegenden Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass das Fehlen der höher glykosylierten Isoform gp48 keine funktionellen Folgen für die Immunevasion hat. Daher kann die eingeschränkte Immunevasion der mCMV-Rekombinante Δ m06^W nicht durch eine veränderte N-Glykosylierung des m152-Proteins erklärt werden. Da die an Asn61 und Asn208 glykosylierte Isoform gp40 Endo H resistent ist, muss sie das ER und auch den Golgi-Apparat durchlaufen haben, während die pMHC-I-Komplexe bereits im ERGIC retentiert werden. Für einen retrograden Transport des m152 gibt es aktuell keinen Anhaltspunkt. Da außerdem die N-Glykosylierung keine Rolle für die Funktion des Proteins spielt, scheint es wahrscheinlich, dass das p36 des vRAP m152 das Molekül darstellt, welches für die Immunevasion verantwortlich ist.

Der Grund für die verminderte Expression des m152-Proteins der Rekombinanten Δ m06^W ist bisher ungeklärt. In den von uns neu generierten Δ m06 Rekombinanten (Fink et al., 2012) wurde kein Effekt auf die m152-Proteinexpression nachgewiesen. Da die beiden Viren Δ m06^{L1} und Δ m06^{L2} unabhängig voneinander generiert wurden, ist eher davon auszugehen, dass diese die authentische Situation widerspiegeln. Die Konsequenz daraus ist, dass alle bisher veröffentlichten Daten zu Δ m06^W neu interpretiert werden müssen. Die in dieser Arbeit erhaltenen Erkenntnisse unterstreichen die Unerlässlichkeit einer eingehenden Überprüfung neu generierter Virusrekombinanten. Um auszuschließen, dass der beobachtete Phänotyp andere Ursachen als die gesetzten Mutationen/Deletionen/Insertionen hat, ist die Generierung von Revertanten zur Verifizierung des Phänotyps unabdingbar.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde der Einfluss von IFN- γ auf die Modulation der CMV-Antigenpräsentation infizierter Zellen durch vRAPs *in vitro* und *in vivo* untersucht. Hierfür wurde ein Set an Immunevasions-Deletionsmutanten, welche Deletionen einzelner oder mehrerer Immunevasine in allen Kombinationen tragen, verwendet (Wagner et al., 2002; Fink et al., 2012). Dabei konnte gezeigt werden, dass IFN- γ sowohl die Erkennung infizierter Zellen

durch mCMV geprimte polyklonale *ex vivo* isolierte CD8 T-Zellen, als auch durch Zellen einer IE1 Epitop-spezifischen CTL Linie verbessern kann. Des Weiteren konnte am Beispiel des M45D^b-Peptids gezeigt werden, dass IFN- γ die Effizienz der Antigenprozessierung verbessert, so dass vorher nicht-schützende M45D^b-spezifische CTL einen Schutz gegen die mCMV-Infektion vermitteln können.

Die Notwendigkeit der Gabe von IFN- γ vor der Infektion weist auf eine gewisse Verzögerung der schützenden Wirkung der CD8 T-Zellen hin. Inhibieren die vRAPs in der ersten Infektionsrunde noch effektiv die Präsentation viraler antigener Peptide, so dass die CD8 T-Zellen infizierte Zellen nicht erkennen können, limitiert IFN- γ die immunevasive Funktion der vRAPs, so dass in nachfolgenden Infektionsrunden die infizierten Zellen erkannt und lysiert werden. Die eher eingeschränkte Schutzwirkung der transferierten CD8 T-Zellen legt außerdem die Vermutung nahe, dass das von den CD8 T-Zellen sezernierte IFN- γ für die Limitierung der vRAP-Wirkung nicht ausreicht. Dies würde bedeuten, dass es weitere IFN- γ sezernierende Zellen geben muss, welche die Zielzellen der Infektion vorkonditionieren, so dass die transferierten CD8-T Zellen ihre schützende Wirkung ab der zweiten Infektionsrunde ausüben können (siehe Abb. 5.2).

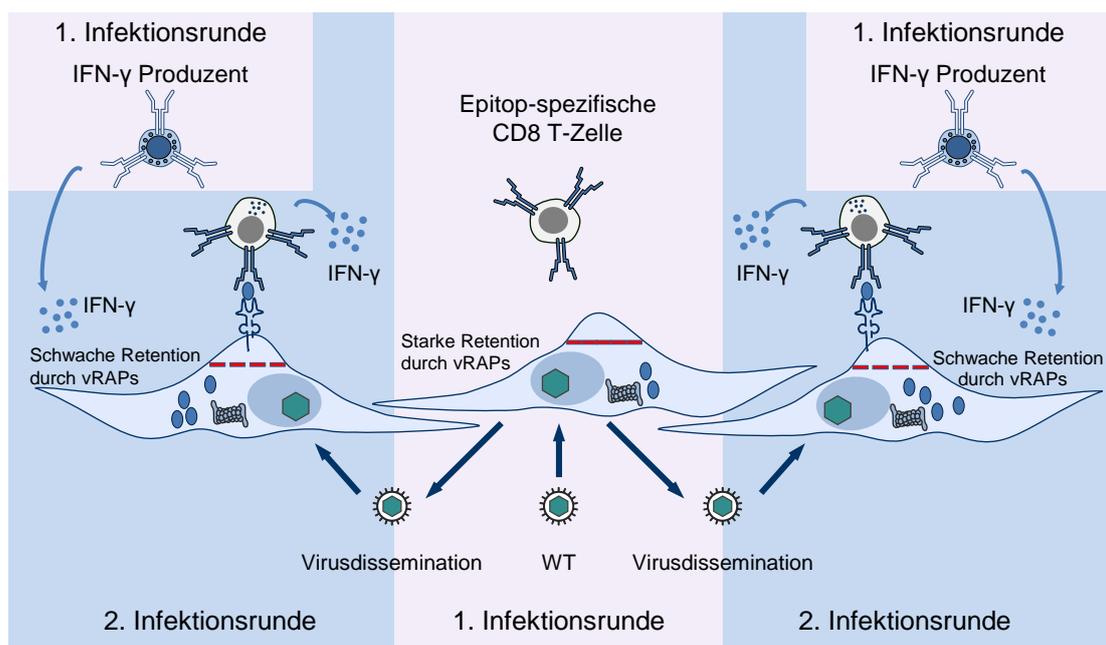


Abb. 5.2 Modell zur Rolle von IFN- γ bei der Eindämmung der Virusausbreitung.

Während der ersten Infektionsrunde verhindern die vRAPs die Erkennung der infizierten Zelle durch Epitop-spezifische CD8 T-Zellen und begünstigen somit die Virusausbreitung. IFN- γ sezernierende Zellen der ersten Infektionsrunde reduzieren die immunevasive Funktion der vRAPs, so dass einige pMHC-Klasse-I-Komplexe an die Zelloberfläche gelangen und von CD8 T-Zellen erkannt werden, welche daraufhin ebenfalls IFN- γ sezernieren. Durch die positive *Feed-Back*-Regulation wird die Funktion der vRAPs limitiert, was zu einem Schutz gegen die CMV-Infektion führt. Verändert nach Fink et al., 2012.

Eine sofortige Schutzwirkung der transferierten CD8 T-Zellen schon in der ersten Infektionsrunde benötigt dagegen die vorherige Gabe von IFN- γ . Dies konnte in der hier

vorliegenden Arbeit mit Hilfe eines Immuntherapie-Modells mit transgenen Mäusen, die IFN- γ konstitutiv überexprimieren, gezeigt werden.

Für Empfänger solider Organtransplantate oder hämatopoietischer Stammzellen gehen diese Eingriffe meist mit der Gabe immunsupprimierender Maßnahmen einher. Bis zur Wiederherstellung des Immunsystems sind die Patienten stark immunsupprimiert und daher empfänglich für die CMV-Erkrankung. Deshalb sind wirksame, antivirale Therapien bis zur Rekonstitution der eigenen Immunantwort von essentieller Bedeutung.

Die hier präsentierten Daten lassen die Hypothese zu, dass eine der hämatopoietischen Zelltransplantation vorangehende IFN- γ -Kurzzeittherapie die Wirkung einer präemptiven CD8 T-Zell-Therapie der CMV-Infektion und -Erkrankung verstärken könnte, so dass dann schon eine geringe Anzahl an transferierten CD8 T-Zellen ausreichen könnte, um den Schutz gegen HCMV zu gewährleisten.

6 Literatur

- Adler, B., and C. Sinzger.** 2013. Cytomegalovirus interstrain variance in cell type tropism. *In* Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention. Vol I. M.J. Reddehase, editor. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom. 297–321.
- Adler, H., M. Messerle, and U.H. Koszinowski.** 2001. Virus reconstituted from infectious bacterial artificial chromosome (BAC)-cloned murine gammaherpesvirus 68 acquires wild-type properties in vivo only after excision of BAC vector sequences. *J Virol.* **75**:5692–5696.
- 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, S.L., J.M. Carton, J. Lou, L. Xing, and B.Y. Rubin.** 1999. Interferon-induced guanylate binding protein-1 (GBP-1) mediates an antiviral effect against vesicular stomatitis virus and encephalomyocarditis virus. *Virology.* **256**:8–14.
- 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. Mocarski, A. Campbell, A.B. Hill, and L.L. Lanier.** 2002. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science.* **296**:1323–1326.
- Asselin-Paturel, C., A. Boonstra, M. Dalod, I. Durand, N. Yessaad, C. Dezutter-Dambuyant, A. Vicari, A. O'Garra, C.A. Biron, F. Brière, and G. Trinchieri.** 2001. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol.* **2**:1144–1150.
- Baas, E., H. van Santen, M. Kleijmeer, H. Geuze, P. Peters, and H.L. Ploegh.** 1992. Peptide-induced stabilization and intracellular localization of empty HLA class I complexes. *J Exp Med.* **176**:147–156.
- Babić, M., A. Krmpotić, and S. Jonjić.** 2011. All is fair in virus-host interactions: NK cells and cytomegalovirus. *Trends Mol. Med.* **17**:677–685.
- Babić, M., M. Pyzik, B. Zafirova, M. Mitrović, V. Butorac, L. Lanier, A. Krmpotić, S. Vidal, and S. Jonjić.** 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.
- Balthesen, M., M. Messerle, and M.J. Reddehase.** 1993. Lungs are a major organ site of cytomegalovirus latency and recurrence. *J Virol.* **67**:5360–5366.
- Bancroft, G., G. Shellam, and J. 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.
- Bantug, G., D. Cekinovic, R. Bradford, T. Koontz, S. Jonjić, and W.J. Britt.** 2008. CD8+ T lymphocytes control murine cytomegalovirus replication in the central nervous system of newborn animals. *J Immunol.* **181**:2111–2123.
- Barry, S., M. Johnson, and G. Janossy.** 2000. Cytopathology or immunopathology? The puzzle of cytomegalovirus pneumonitis revisited. *Bone Marrow Transpl.* **26**:591–597.
- Bemiller, L.S., D.H. Roberts, K.M. Starko, and J.T. Curnutte.** 1995. Safety and effectiveness of long-term interferon gamma therapy in patients with chronic granulomatous disease. *Blood Cells Mol Dis.* **21**:239–247.
- Beutler, B., K. Crozat, J.A. Koziol, and P. Georgel.** 2005. Genetic dissection of innate immunity to infection: the mouse cytomegalovirus model. *Curr Opin Immunol.* **17**:36–43.
- Biron, C.A.** 2001. Interferons alpha and beta as immune regulators - a new look. *Immunity.* **14**:661–664.

- Biron, C.A., K. Nguyen, G. Pien, L. 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. Su, and J. Orange.** 1996. Function and regulation of Natural Killer (NK) cells during viral infections: characterization of responses in vivo. *Methods.* **9**:379–393.
- Blomfield, I.C., V. Vaughn, R.F. Rest, and B.I. Eisenstein.** 1991. Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis* *sacB* gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon. *Mol Microbiol.* **5**:1447–1457.
- Bluyssen, A., J. Durbin, and D. Levy.** 1996. ISGF3 gamma p48, a specificity switch for interferon activated transcription factors. *Cytokine Growth Factor Rev.* **7**:11–17.
- Bodaghi, B., O. Goureau, D. Zipeto, L. Laurent, J.L. Virelizier, and S. Michelson.** 1999. Role of IFN-gamma-induced indoleamine 2,3 dioxygenase and inducible nitric oxide synthase in the replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells. *J Immunol.* **162**:957–964.
- Boehm, U., T. Klamp, M. Groot, and J.C. Howard.** 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol.* **15**:749–795.
- Boehme, K., and T. Compton.** 2006. Virus entry and activation of innate immunity. *In* Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology. M.J. Reddehase, editor. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom. 63–68.
- Böhm, V., J. Podlech, D. Thomas, P. Deegen, M.F. Pahl-Seibert, N.A. Lemmermann, N.A. Grzimek, S.A. Oehrlein-Karpi, M.J. Reddehase, and R. Holtappels.** 2008a. Epitope-specific in vivo protection against cytomegalovirus disease by CD8 T cells in the murine model of preemptive immunotherapy. *Med Microbiol Immunol.* **197**:135–144.
- Böhm, V., C.O. Simon, J. Podlech, C.K. Seckert, D. Gendig, P. Deegen, D. Gillert-Marien, N.A. Lemmermann, R. Holtappels, and M.J. Reddehase.** 2008b. The immune evasion paradox: immunoevasins of murine cytomegalovirus enhance priming of CD8 T cells by preventing negative feedback regulation. *J Virol.* **82**:11637–11650.
- Boppana, S.B., K.B. Fowler, Y. Vaid, G. Hedlund, S. Stagno, W.J. Britt, and R.F. Pass.** 1997. Neuroradiographic findings in the newborn period and long-term outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics.* **99**:409–414.
- Boppana, S.B., R.F. Pass, W.J. Britt, S. Stagno, and C.A. Alford.** 1992. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatr Infect Dis J.* **11**:93–99.
- Borst, E.M., I. Crnkovic-Mertens, and M. Messerle.** 2004a. Cloning of beta-herpesvirus genomes as bacterial artificial chromosomes. *Methods Mol Biol.* **256**:221–239.
- Borst, E.M., G. Hahn, U.H. Koszinowski, and M. Messerle.** 1999. Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *J Virol.* **73**:8320–8329.
- Borst, E.M., G. Posfai, M. Pogoda, and M. Messerle.** 2004b. Mutagenesis of herpesvirus BACs by allele replacement. *In* *Methods Mol. Biol., Bacterial Artificial Chromosomes*. Vol. 256. S. Zhao and M. Stodolsky, editors. Humana Press, Totowa NJ, USA. 269–280.
- Britt, W.J., and M. Mach.** 1996. Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology.* **39**:401–412.
- Brown, M., A. Dokun, J. Heusel, H. Smith, D. Beckman, E. Blattenberger, C. Dubbelde, L. Stone, A. Scalzo, and W. Yokoyama.** 2001. Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* **292**:934–937.
- Brunner, K., J. Mael, J. Cerottini, and B. Chapuis.** 1968. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology.* **14**:181–196.

- Bühler, B., G.M. Keil, F. Weiland, and U.H. Koszinowski.** 1990. Characterization of the murine cytomegalovirus early transcription unit e1 that is induced by immediate-early proteins. *J Virol.* **64**:1907–1919.
- Bukowski, J., and R. Welsh.** 1985. Inability of interferon to protect virus-infected cells against lysis by natural killer (NK) cells correlates with NK cell-mediated antiviral effects in vivo. *J Immunol.* **135**:3537–3541.
- Bukowski, J., B. Woda, S. Habu, K. Okumura, and R. Welsh.** 1983. Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo. *J Immunol.* **131**:1531–1538.
- Bukowski, J., B. Woda, and R. Welsh.** 1984. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *J Virol.* **52**:119–128.
- Cannon, M., S. Grosse, and K. Fowler.** 2013. The epidemiology and public health impact of congenital cytomegalovirus infection. *In* Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention. Vol II. M.J. Reddehase, editor. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom. 26–54.
- Caposio, P., D. Streblow, and J. Nelson.** 2013. Cytomegalovirus proteomics. *In* Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention. Vol I. M.J. Reddehase, editor. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom. 86–108.
- Cerottini, J.** 1993. T-cell mediated cytotoxicity: a historical note. *In* Cytotoxic Cells. M. Sitkovsky and M. Henkart, editors. Birkhauser, Boston. 5–8.
- Cha, T., E. Tom, G. Kemble, G. Duke, E. Mocarski, and R. Spaete.** 1996. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol.* **70**:78–83.
- Chang, S., F. Momburg, N. Bhutani, and A. Goldberg.** 2005. The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a “molecular ruler” mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA.* **102**:17107–17112.
- Chang, Y., E. Cesarman, M. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, D. Knowles, and P. Moore.** 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi’s sarcoma. *Science* **266**:1865–1869.
- Chee, M., A. Bankier, S. Beck, R. Bohni, C. Brown, R. Cerny, T. Horsnell, C. Hutchison, T. Kouzarides, and J. 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. Jiang, M. Lee, F. Liu, and Z. Zhou.** 1999. Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. *Virology.* **260**:10–16.
- 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. 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.
- Compton, T., R. Nepomuceno, and D. Nowlin.** 1992. Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology.* **191**:387–395.
- Compton, T., D. Nowlin, and N. Cooper.** 1993. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology.* **193**:834–841.
- Cresswell, P., A. Ackerman, A. Giodini, D. Peaper, and P. Wearsch.** 2005. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol Rev.* **207**:145–157.
- Czerkinsky, C., G. Andersson, H. Ekre, L. Nilsson, L. Klareskog, and O. Uchterslony.** 1988. Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. *J Immunol Methods.* **110**:29–36.

- Dalod, M., T.P. Salazar-Mather, L. Malmgaard, C. Lewis, C. Asselin-Paturel, F. Brière, G. Trinchieri, and C.A. Biron.** 2002. Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J Exp Med.* **195**:517–528.
- Daniels, K., G. Devora, W. Lai, C. O'Donnell, M. Bennett, and R. 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.
- Darnell, J., I. Kerr, and G. Stark.** 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**:1415–1421.
- Datsenko, K., and B. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**:6640–6645.
- Davison, A., A. Dolan, P. Akter, C. Addison, D. Dargan, D. Alcendor, D. McGeoch, and G. Hayward.** 2003. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J Gen Virol.* **84**:17–28.
- Davison, A., M. Holton, A. Dolan, D. Dargan, D. Gatherer, and G. Hayward.** 2013. Comparative genomics of primate cytomegaloviruses. *In Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention.* Vol I. M.J. Reddehase, editor. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom. 1–22.
- Debes, G., M. Dahl, A. Mahiny, K. Bonhagen, D. Campbell, K. Siegmund, K. Erb, D. 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.
- Doherty, P..** 1993. Cell-mediated cytotoxicity. *Cell.* **75**:607–612.
- Döhner, K., and B. Sodeik.** 2005. The role of the cytoskeleton during viral infection. *Curr Top Microbiol Immunol.* **285**:67–108.
- Dokun, A., D. Chu, L. Yang, A. Bendelac, and W. Yokoyama.** 2001a. Analysis of in situ NK cell responses during viral infection. *J Immunol.* **167**:5286–5293.
- Dokun, A., S. Kim, H. Smith, H. Kang, D. Chu, and W. Yokoyama.** 2001b. Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection. *Nat Immunol.* **2**:951–956.
- Dolan, A..** 2004. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J Gen Virol.* **85**:1301–1312.
- Van Dommelen, S.L.H., 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.
- Doom, C., and A.B. Hill.** 2008. MHC class I immune evasion in MCMV infection. *Med Microbiol Immunol.* **197**:191–204.
- Dowling, J., A. Saslow, J. Armstrong, and M. Ho.** 1976. Cytomegalovirus infection in patients receiving immunosuppressive therapy for rheumatologic disorders. *J Infect Dis.* **133**:399–408.
- Drew, W..** 1992. Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. *Clin Inf Dis.* **14**:608–615.
- Dumas, A., J. Geelen, W. Maris, and J. Van der Noordaa.** 1980. Infectivity and molecular weight of varicella-zoster virus DNA. *J Gen Virol.* **47**:233–235.
- Duncan, S., W. Grgurich, A. Iacono, G. Burckart, S. Yousem, I. Paradis, P. Williams, B. Johnson, and B. Griffith.** 1994. A comparison of ganciclovir and acyclovir to prevent cytomegalovirus after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* **150**:146–152.
- Eickmann, M., D. Gicklhorn, and K. Radsak.** 2006. Glycoprotein trafficking in virion morphogenesis. *In Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology.* M.J. Reddehase, editor. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom. 245–264.

- Einsele, H., and K. Hamprecht.** 2003. Immunotherapy of cytomegalovirus infection after stem-cell transplantation: a new option? *Lancet*. **362**:1343–1344.
- Emery, V.C., and P.D. Griffiths.** 1990. Molecular biology of cytomegalovirus. *Int J Exp Path.* **71**:905–918.
- Endr sz, V., K. Buri n, K. Berencsi, Z. Gyulai, L. Kari, H. Horton, D. Virok, C. M ric, S. Plotkin, and E. G ncz l.** 2001. Optimization of DNA immunization against human cytomegalovirus. *Vaccine*. **19**:3972–3980.
- Epperson, D.E., D. Arnold, T. Spies, P. Cresswell, J.S. Pober, and D.R. Johnson.** 1992. Cytokines increase transporter in antigen processing-1 expression more rapidly than HLA class I expression in endothelial cells. *J Immunol*. **149**:3297–3301.
- Epstein, M., G. Henle, B. Achong, and Y. Barr.** 1965. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J Exp Med*. **121**:761–778.
- Erlach, K.C., V. B hm, M. Knabe, P. Deegen, M.J. Reddehase, and J. Podlech.** 2008. Activation of hepatic natural killer cells and control of liver-adapted lymphoma in the murine model of cytomegalovirus infection. *Med Microbiol Immunol*. **197**:167–178.
- Erlandsson, L., R. Blumenthal, M. Eloranta, H. Engel, G. Alm, S. Weiss, and T. Leanderson.** 1998. Interferon-beta is required for interferon-alpha production in mouse fibroblasts. *Curr Biol*. **8**:223–226.
- Falk, K., O. R ttschke, and H. Rammensee.** 1990. Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*. **348**:248–251.
- Feire, A., H. Koss, and T. Compton.** 2004. Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proc Natl Acad Sci USA*. **101**:15470–15475.
- Fennie, E.H., Y.S. Lie, M.A. Low, P. Gribling, and K.P. Anderson.** 1988. Reduced mortality in murine cytomegalovirus infected mice following prophylactic murine interferon-gamma treatment. *Antivir. Res.* **10**:27–39.
- 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., N.A. Lemmermann, D. Gillert-Marien, D. Thomas, K. Freitag, V. B hm, V. Wilhelmi, K. Reifenberg, M.J. Reddehase, and R. Holtappels.** 2012. Antigen presentation under the influence of "immune evasion" proteins and its modulation by interferon-gamma: implications for immunotherapy of cytomegalovirus infection with antiviral CD8 T cells. *Med Microbiol Immunol*. **201**:513–525.
- 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., J. Papadimitriou, and G. Shellam.** 1990. Cytomegalovirus-induced pneumonitis and myocarditis in newborn mice. A model for perinatal human cytomegalovirus infection. *Arch Virol*. **115**:75–88.
- 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.
- Frenkel, N., E. Schirmer, L. Wyatt, G. Katsafanas, E. Roffman, R. Danovich, and C. June.** 1990. Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. **87**:748–752.

- Frey, S., C. Harrison, R. Pass, E. Yang, D. Boken, R. Sekulovich, S. Percell, A. Izu, S. Hirabayashi, R. Burke, and A. Duliège.** 1999. Effects of antigen dose and immunization regimens on antibody responses to a cytomegalovirus glycoprotein B subunit vaccine. *J Infect Dis.* **180**:1700–1703.
- Gassen, H., and G. Schimpf.** 1999. *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor.* 5th ed. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg.
- Gay, P., D. Le Coq, M. Steinmetz, E. Ferrari, and J.A. Hoch.** 1983. Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **153**:1424–1431.
- Geginat, G., T. Ruppert, H. Hengel, R. Holtappels, and U.H. Koszinowski.** 1997. IFN-gamma is a prerequisite for optimal antigen processing of viral peptides in vivo. *J Immunol.* **158**:3303–3310.
- Germain, R..** 1994. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell.* **76**:287–299.
- Gibson, W..** 2006. Assembly and maturation of the capsid. *In Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology.* M.J. Reddehase, editor. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom. 231–244.
- Gibson, W., and E. Bogner.** 2013. Morphogenesis of the cytomegalovirus virion and subviral particles. *In Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention.* Vol I. M.J. Reddehase, editor. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom. 230–246.
- Gil-Torregrosa, B., A. Castaño, D. López, and M. Del Val.** 2000. Generation of MHC class I peptide antigens by protein processing in the secretory route by furin. *Traffic.* **1**:641–651.
- Gold, M.C., M.W. Munks, M. Wagner, U.H. Koszinowski, A.B. Hill, and S. 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.
- Gold, M.C., M.W. Munks, M. Wagner, C. McMahon, A. Kelly, D.G. Kavanagh, M. Slifka, U.H. Koszinowski, D. Raulet, and A.B. Hill.** 2004. Murine cytomegalovirus interference with antigen presentation has little effect on the size or the effector memory phenotype of the CD8 T cell response. *J Immunol.* **172**:6944–6953.
- Goldberg, A..** 2003. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature.* **426**:895–899.
- Grande, A.G., M.J. Androlewicz, 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.
- Grandér, D., O. Sangfelt, and S. Erickson.** 1997. How does interferon exert its cell growth inhibitory effect? *Eur J Haematol.* **59**:129–135.
- 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.
- Gribaudo, G., S. Ravaglia, A. Caliendo, R. Cavallo, M. Gariglio, M.G. Martinotti, and S. Landolfo.** 1993. Interferons inhibit onset of murine cytomegalovirus immediate-early gene transcription. *Virology.* **197**:303–311.
- Grosse, S., I. Ortega-Sanchez, S. Bialek, and S. Dollard.** 2013. Addendum. *In Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention.* Vol II. M.J. Reddehase, editor. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom. 49–54.
- Gruter, W..** 1924. Das Herpesvirus, seine aetiologische und klinische Bedeutung. *Münch. Med. Wochenschr.* **71**:1058–1060.

- Hammond, S., R. Johnson, S. Kalams, B. Walker, M. Takiguchi, J. Safrit, R. Koup, and R. Siliciano.** 1995. An epitope-selective, transporter associated with antigen presentation (TAP)-1/2-independent pathway and a more general TAP-1/2-dependent antigen-processing pathway allow recognition of the HIV-1 envelope glycoprotein by CD8+ CTL. *J Immunol.* **154**:6140–6156.
- Hanshaw, J., and J. Dudgeon.** 1978. Congenital cytomegalovirus. *Major Probl Clin Pediatr.* **17**:97–152.
- Hartmann, A., S. Sagedal, and J. Hjelmesaeth.** 2006. The natural course of cytomegalovirus infection and disease in renal transplant recipients. *Transplantation.* **82**:S15–17.
- Harty, J., A. Tvinnereim, and D. White.** 2000. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol.* **18**:275–308.
- Hasan, M., A. Krmptic, 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.
- Hashimoto-Gotoh, T., F.C. Franklin, A. Nordheim, and K.N. Timmis.** 1981. Specific-purpose plasmid cloning vectors. I. Low copy number, temperature-sensitive, mobilization-defective pSC101-derived containment vectors. *Gene.* **16**:227–235.
- Hengel, H., P. Lucin, S. Jonjić, T. Ruppert, and U.H. Koszinowski.** 1994. Restoration of cytomegalovirus antigen presentation by gamma interferon combats viral escape. *J Virol.* **68**:289–297.
- 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.
- Hobom, U., W. Brune, M. Messerle, G. Hahn, and U.H. Koszinowski.** 2000. Fast screening procedures for random transposon libraries of cloned herpesvirus genomes: mutational analysis of human cytomegalovirus envelope glycoprotein genes. *J Virol.* **74**:7720–7729.
- Hodgkin, P., A. Scalzo, N. Swaminathan, P. Price, and G. Shellam.** 1988. Murine cytomegalovirus binds reversibly to mouse embryo fibroblasts: implications for quantitation and explanation of centrifugal enhancement. *J Virol Methods.* **22**:215–230.
- 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., 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.A. Grzimek, C. Simon, D. Thomas, D. Dreis, and M.J. Reddehase.** 2002a. Processing and presentation of murine cytomegalovirus pORFm164-derived peptide in fibroblasts in the face of all viral immunosubversive early gene functions. *J Virol.* **76**:6044–6053.
- 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. *In Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology.* M.J. Reddehase, editor. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom. 383–418.
- 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.A. 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. Simon, M.W. Munks, D. Thomas, P. Deegen, B. Kühnapfel, T. Däubner, S. Emde, J. Podlech, N.A. 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, 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, J. Podlech, H.P. Steffens, G. Geginat, and M.J. Reddehase.** 2000. 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, and M.J. Reddehase.** 2009. The efficacy of antigen processing is critical for protection against cytomegalovirus disease in the presence of viral immune evasion proteins. *J Virol.* **83**:9611–9615.
- Honess, R., 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.
- Horsburgh, B.C., M.M. Hubinette, D. Qiang, M.L. MacDonald, and F. Tufaro.** 1999. Allele replacement: an application that permits rapid manipulation of herpes simplex virus type 1 genomes. *Gene Ther.* **6**:922–930.
- Humphreys, I., C. de Trez, A. Kinkade, C.A. Benedict, M. Croft, and C. Ware.** 2007. Cytomegalovirus exploits IL-10-mediated immune regulation in the salivary glands. *J Exp Med.* **204**:1217–1225.
- Ihle, J.N.** 1995. The Janus protein tyrosine kinases in hematopoietic cytokine signaling. *Semin Immunol.* **7**:247–254.
- Ihle, J.N., and I. Kerr.** 1995. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet.* **11**:69–74.
- Isaacson, M., A. Feire, and T. Compton.** 2007. Epidermal growth factor receptor is not required for human cytomegalovirus entry or signaling. *J Virol.* **81**:6241–6247.
- Jonjić, S., M. Babić, B. Polić, and A. Krmpotić.** 2008. Immune evasion of natural killer cells by viruses. *Curr Opin Immunol.* **20**:30–38.
- Jonjić, S., I. Bubic, and A. Krmpotić.** 2006. Innate immunity to cytomegaloviruses. *In* Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology. M.J. Reddehase, editor. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom. 285–320.
- Jonjić, S., W. Mutter, F. Weiland, M.J. Reddehase, and U.H. Koszinowski.** 1989. Site-directed persistent cytomegalovirus infection after selective long-term depletion of CD4⁺ T lymphocytes. *J Exp Med.* **169**:1199–1212.
- Jonjić, S., I. Pavić, B. Polić, I. Crnković, P. Lucin, and U.H. Koszinowski.** 1994. Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J Exp Med.* **179**:1713–1717.
- Kääriäinen, L., E. Klemola, and J. Paloheimo.** 1966. Rise of cytomegalovirus antibodies in an infectious-mononucleosis-like syndrome after transfusion. *Br Med J.* **1**:1270–1272.
- Kärre, K., H. Ljunggren, G. Piontek, and R. Kiessling.** 1986. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature.* **319**:675–678.
- Katze, M.G., Y. He, and M. Gale.** 2002. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol.* **2**:675–687.

- Kavanagh, D.G., M.C. Gold, M. Wagner, U.H. Koszinowski, and A.B. Hill.** 2001a. The multiple immune-evasion genes of murine cytomegalovirus are not redundant: m4 and m152 inhibit antigen presentation in a complementary and cooperative fashion. *J Exp Med.* **194**:967–978.
- Kavanagh, D.G., and A.B. Hill.** 2001. Evasion of cytotoxic T lymphocytes by murine cytomegalovirus. *Semin Immunol.* **13**:19–26.
- Kavanagh, D.G., U.H. Koszinowski, and A.B. Hill.** 2001b. The murine cytomegalovirus immune evasion protein m4/gp34 forms biochemically distinct complexes with class I MHC at the cell surface and in a pre-Golgi compartment. *J Immunol.* **167**:3894–3902.
- 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.
- Kinzler, E., and T. Compton.** 2005. Characterization of human cytomegalovirus glycoprotein-induced cell-cell fusion. *J Virol.* **79**:7827–7837.
- Kleijnen, M.F., J. Huppa, P. Lucin, S. Mukherjee, H. Farrell, A. Campbell, U.H. Koszinowski, A.B. Hill, and H.L. Ploegh.** 1997. A mouse cytomegalovirus glycoprotein, gp34, forms a complex with folded class I MHC molecules in the ER which is not retained but is transported to the cell surface. *EMBO J.* **16**:685–694.
- Klenovsek, K., F. Weisel, A. Schneider, U. Appelt, S. Jonjić, M. Messerle, B. Bradel-Tretheway, T. Winkler, and M. Mach.** 2007. Protection from CMV infection in immunodeficient hosts by adoptive transfer of memory B cells. *Blood.* **110**:3472–3479.
- Kloetzel, P., and F. Ossendorp.** 2004. Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr Opin Immunol.* **16**:76–81.
- Kotenko, S. V, G. Gallagher, V. V Baurin, A. Lewis-Antes, M. Shen, N.K. Shah, J. a Langer, F. Sheikh, H. Dickensheets, and R.P. Donnelly.** 2003. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol.* **4**:69–77.
- Krmpotić, A., I. Bubić, B. Polić, P. Lucin, and S. Jonjić.** 2003. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. *Microbes Infect.* **5**:1263–1277.
- Krmpotić, 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. Busch, U.H. Koszinowski, and S. Jonjić.** 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.
- Krmpotić, A., M. Messerle, I. Crnkovic-Mertens, B. Polic, S. Jonjić, and U.H. Koszinowski.** 1999. The immunoevasive function encoded by the mouse cytomegalovirus gene m152 protects the virus against T cell control in vivo. *J Exp Med.* **190**:1285–1296.
- Kurz, S., H.P. Steffens, A. Mayer, J. Harris, and M.J. Reddehase.** 1997. Latency versus persistence or intermittent recurrences: evidence for a latent state of murine cytomegalovirus in the lungs. *J Virol.* **71**:2980–2987.
- Laemmli, U.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680–685.
- Lanier, L.L.** 2008. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol.* **9**:495–502.
- Lautscham, G., A. Rickinson, and N. Blake.** 2003. TAP-independent antigen presentation on MHC class I molecules: lessons from Epstein-Barr virus. *Microbes Infect.* **5**:291–299.
- Lee, E., D. Yu, J. Martinez de Velasco, L. Tessarollo, D. Swing, D. Court, N. Jenkins, and N. Copeland.** 2001a. A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics.* **73**:56–65.

- Lee, S., S. Girard, D. Macina, M. Busà, A. Zafer, A. Belouchi, P. Gros, and S. Vidal. 2001b. 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.
- Lemmermann, N.A., V. Böhm, R. Holtappels, and M.J. Reddehase. 2011. In vivo impact of cytomegalovirus immune 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.
- Lemmermann, N.A., K. Gergely, V. Böhm, P. Deegen, T. Däubner, and M.J. Reddehase. 2010a. Immune evasion proteins of murine cytomegalovirus preferentially affect cell surface display of recently generated peptide presentation complexes. *J Virol.* **84**:1221–1236.
- Lemmermann, N.A., J. Podlech, C.K. Seckert, K. Kropp, N.A. Grzimek, M.J. Reddehase, and R. Holtappels. 2010b. CD8 T-Cell immunotherapy of cytomegalovirus disease in the murine model. *In Methods in microbiology: immunology of infection*. D. Kabelitz and S.H.E. Kaufmann, editors. Academic Press, London. 369–420.
- Lenac, T., J. Arapović, L. Traven, A. Krmpotić, and S. Jonjić. 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. Krmpotić, M. Messerle, Z. Ruzsics, U.H. Koszinowski, H. Hengel, and S. Jonjić. 2006. The herpesviral Fc receptor fcr-1 down-regulates the NKG2D ligands MULT-1 and H60. *J Exp Med.* **203**:1843–1850.
- Levy, D., and A. García-Sastre. 2001. The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion. *Cytokine Growth Factor Rev.* **12**:143–156.
- Lilley, B., and H.L. Ploegh. 2005. Viral modulation of antigen presentation: manipulation of cellular targets in the ER and beyond. *Immunol Rev.* **207**:126–144.
- Lin, A., H. Xu, and W. Yan. 2007. Modulation of HLA expression in human cytomegalovirus immune evasion. *Cell Mol Immunol.* **4**:91–98.
- Lindquister, G., and P. Pellett. 1991. Properties of the human herpesvirus 6 strain Z29 genome: G + C content, length, and presence of variable-length directly repeated terminal sequence elements. *Virology.* **182**:102–110.
- Lodoen, M., G. Abenes, S. Umamoto, J. 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. Hamerman, H. Arase, J. Houchins, E. 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.
- Loh, J., D. Chu, A. O'Guin, W. Yokoyama, and H. Virgin. 2005. Natural killer cells utilize both perforin and gamma interferon to regulate murine cytomegalovirus infection in the spleen and liver. *J Virol.* **79**:661–667.
- Lu, X., D.G. Kavanagh, and A.B. Hill. 2006. Cellular and molecular requirements for association of the murine cytomegalovirus protein m4/gp34 with major histocompatibility complex class I molecules. *J Virol.* **80**:6048–6055.
- Lucin, P., S. Jonjić, M. Messerle, B. Polić, H. Hengel, and U.H. Koszinowski. 1994. Late phase inhibition of murine cytomegalovirus replication by synergistic action of interferon-gamma and tumour necrosis factor. *J Gen Virol.* **75**:101–110.

- Lucin, P., I. Pavić, B. Polić, S. Jonjić, and U.H. Koszinowski.** 1992. Gamma interferon-dependent clearance of cytomegalovirus infection in salivary glands. *J Virol.* **66**:1977–1984.
- Madej, R.M., J. Davis, M.J. Holden, S. Kwang, E. Labourier, and G.J. Schneider.** 2010. International standards and reference materials for quantitative molecular infectious disease testing. *J Mol Diagn.* **12**:133–143.
- Marks, J., 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.
- Messerle, M., B. Bühler, G.M. Keil, and U.H. Koszinowski.** 1992. Structural organization, expression, and functional characterization of the murine cytomegalovirus immediate-early gene 3. *J Virol.* **66**:27–36.
- Messerle, M., I. Crnkovic, W. Hammerschmidt, H. Ziegler, and U.H. Koszinowski.** 1997. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA.* **94**:14759–14763.
- Meurs, E., K. Chong, J. Galabru, N. Thomas, I. Kerr, B. Williams, and A. Hovanessian.** 1990. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell.* **62**:379–390.
- Meyers, J., N. Flournoy, and E. Thomas.** 1986. Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation. *J Infect Dis.* **153**:478–488.
- Michel, D., and T. Mertens.** 2006. Antiviral intervention, resistance, and perspectives. *In* Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology. M.J. Reddehase, editor. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom. 573–590.
- Miltenyi, S., W. Müller, W. Weichel, and A. Radbruch.** 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry.* **11**:231–238.
- Miyahira, Y., K. Murata, D. Rodriguez, J. Rodriguez, M. Esteban, M. Rodrigues, and F. Zavala.** 1995. Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay. *J Immunol Methods.* **181**:45–54.
- Mocarski, E., T. Shenk, P. Griffiths, and R. Pass.** 2013. Cytomegaloviruses. *In* Fields Virology, 6th Edition. D. Knipe and P. Howley, editors. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA. 1960–2014.
- Moskowitz, L., G. Hensley, J. Chan, and K. Adams.** 1985. Immediate causes of death in acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med.* **109**:735–738.
- Mullis, K., and F. Faloona.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth Enzym.* **155**:335–350.
- Munks, M.W., K. Cho, A. 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. Zajac, C. Doom, C. 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.
- Murphy, E., I. Rigoutsos, T. Shibuya, and T. Shenk.** 2003. Reevaluation of human cytomegalovirus coding potential. *Proc Natl Acad Sci USA.* **100**:13585–13590.
- Mutter, W., M.J. Reddehase, F. Busch, H. Bühring, and U.H. Koszinowski.** 1988. Failure in generating hemopoietic stem cells is the primary cause of death from cytomegalovirus disease in the immunocompromised host. *J Exp Med.* **167**:1645–1658.

- Nakatsu, F., and H. Ohno.** 2003. Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network. *Cell Struct Funct.* **28**:419–429.
- Neiman, P., W. Reeves, G. Ray, N. Flournoy, K. Lerner, G. Sale, and E. Thomas.** 1977. A prospective analysis interstitial pneumonia and opportunistic viral infection among recipients of allogeneic bone marrow grafts. *J Infect Dis.* **136**:754–767.
- O'Connor, M., M. Peifer, and W. Bender.** 1989. Construction of large DNA segments in *Escherichia coli*. *Science* **244**:1307–1312.
- Ojala, P., B. Sodeik, M. 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.
- Orange, J., and C.A. Biron.** 1996. Characterization of early IL-12, IFN- $\alpha\beta$, and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol.* **156**:4746–4756.
- Orr, M., W. Murphy, and L.L. Lanier.** 2010. “Unlicensed” natural killer cells dominate the response to cytomegalovirus infection. *Nat Immunol.* **11**:321–327.
- Ortaldo, J., and H. Young.** 2005. Mouse Ly49 NK receptors: balancing activation and inhibition. *Mol Immunol.* **42**:445–450.
- Ortmann, B., J. Copeman, P.J. Lehner, B. Sadasivan, J.A. Herberg, A.G. Grandea, S.R. Riddell, R. Tampé, T. Spies, J. Trowsdale, and P. Cresswell.** 1997. A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science* **277**:1306–1309.
- Osborn, J., and D. Walker.** 1968. Enhancement of infectivity of murine cytomegalovirus in vitro by centrifugal inoculation. *J Virol.* **2**:853–858.
- 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 829 T cells purified by T-cell receptor-based cell sorting. *J Virol.* **79**:5400–5413.
- Pamer, E.** 1994. Direct sequence identification and kinetic analysis of an MHC class I-restricted *Listeria monocytogenes* CTL epitope. *J Immunol.* **152**:686–694.
- Pass, R., A. Duliegè, S. Boppana, R. Sekulovich, S. Percell, W.J. Britt, and R. Burke.** 1999. A subunit cytomegalovirus vaccine based on recombinant envelope glycoprotein B and a new adjuvant. *J Infect Dis.* **180**:970–975.
- Peggs, K.S., S. Verfuëth, 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., and B. Roizman.** 2013. Herpesviridae. *In* *Fields Virology*, 6th Edition. D. Knipe and P. Howley, editors. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA. 1802–1822.
- Pepperl, S., J. Münster, M. Mach, J. Harris, and B. Plachter.** 2000. Dense bodies of human cytomegalovirus induce both humoral and cellular immune responses in the absence of viral gene expression. *J Virol.* **74**:6132–6146.
- Pepperl-Klindworth, S., N. Frankenberg, and B. Plachter.** 2002. Development of novel vaccine strategies against human cytomegalovirus infection based on subviral particles. *J Clin Virol.* **25** Suppl 2:S75–85.
- Pestka, S., J. Langer, K. Zoon, and C. Samuel.** 1987. Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem.* **56**:727–777.
- Peterson, P., H. Balfour, S. Marker, D. Fryd, R. Howard, and R. Simmons.** 1980. Cytomegalovirus disease in renal allograft recipients: a prospective study of the clinical features, risk factors and impact on renal transplantation. *Medicine.* **59**:283–300.

- Pinto, A., and A.B. Hill.** 2005. Viral interference with antigen presentation to CD8+ T cells: lessons from cytomegalovirus. *Viral Immunol.* **18**:434–444.
- Pinto, A., M.W. Munks, U.H. Koszinowski, and A.B. Hill.** 2006. Coordinated function of murine cytomegalovirus genes completely inhibits CTL lysis. *J Immunol.* **177**:3225–3234.
- Plotkin, S., S. Starr, H. Friedman, E. Gönczöl, and R. Weibel.** 1989. Protective effects of Towne cytomegalovirus vaccine against low-passage cytomegalovirus administered as a challenge. *J Infect Dis.* **159**:860–865.
- Plummer, G..** 1967. Comparative virology of the herpes group. *Prog Med Virol.* **9**:302–340.
- Pluskal, M.** 1986. Immobilon PVDF transfer membrane: A new membrane substrate for blotting of proteins. *Biotechniques.* **4**:272–283.
- Podlech, J., R. Holtappels, N.A. Grzimek, and M.J. Reddehase.** 2002. Animal models: murine cytomegalovirus. *In* *Methods in microbiology: immunology of infection*, 2nd Edition. S.H.E. Kaufmann and D. Kabelitz, editors. Academic Press, London and San Diego, Cal. 493–525.
- 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.
- Pollack, M., J. Heugel, H. Xie, W. Leisenring, J. Storek, J.A. Young, M. Kukreja, R. Gress, M. Tomblyn, and M. Boeckh.** 2011. An international comparison of current strategies to prevent herpesvirus and fungal infections in hematopoietic cell transplant recipients. *Biol Blood Marrow Transpl.* **17**:664–673.
- Pósfai, G., M.D. Koob, H.A. Kirkpatrick, and F.R. Blattner.** 1997. Versatile insertion plasmids for targeted genome manipulations in bacteria: isolation, deletion, and rescue of the pathogenicity island LEE of the *Escherichia coli* O157:H7 genome. *J Bacteriol.* **179**:4426–4428.
- Presti, R.M., D.L. Popkin, M. Connick, S. Paetzold, and H.W. Virgin.** 2001. Novel cell type-specific antiviral mechanism of interferon gamma action in macrophages. *J Exp Med.* **193**:483–496.
- Puius, Y., and D. Snyderman.** 2007. Prophylaxis and treatment of cytomegalovirus disease in recipients of solid organ transplants: current approach and future challenges. *Curr Opin Infect Dis.* **20**:419–424.
- Quinnan, G., J. Manischewitz, and F. Ennis.** 1978. Cytotoxic T lymphocyte response to murine cytomegalovirus infection. *Nature.* **273**:541–543.
- Quinnan, G., J. Manischewitz, and N. Kirmani.** 1982. Involvement of natural killer cells in the pathogenesis of murine cytomegalovirus interstitial pneumonitis and the immune response to infection. *J Gen Virol.* **58**:173–180.
- Raghavan, M., N. Del Cid, S.M. Rizvi, and L.R. Peters.** 2008. MHC class I assembly: out and about. *Trends Immunol.* **29**:436–443.
- Rawlinson, W., H. Farrell, and B. Barrell.** 1996. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J Virol.* **70**:8833–8849.
- 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. Jonjić, I. Pavić, 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., S. Jonjić, 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., W. Mutter, and U.H. Koszinowski.** 1987a. In vivo application of recombinant interleukin 2 in the immunotherapy of established cytomegalovirus infection. *J Exp Med.* **165**:650–656.
- Reddehase, M.J., W. Mutter, K. Münch, H.J. Bühring, and U.H. Koszinowski.** 1987b. CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *J Virol.* **61**:3102–3108.
- Reddehase, M.J., J. Podlech, and N.K.A. Grzimek.** 2002. Mouse models of cytomegalovirus latency: overview. *J Clin Virol.* **25** Suppl 2:S23–36.
- 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.A. 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.
- Reusch, U., O. Bernhard, U.H. Koszinowski, and P. Schu.** 2002. AP-1A and AP-3A lysosomal sorting functions. *Traffic.* **3**:752–761.
- 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., P. Reusser, and P.D. Greenberg.** 1991. Cytotoxic T cells specific for cytomegalovirus: a potential therapy for immunocompromised patients. *Rev Infect Dis.* **13** Suppl 1:S966–973.
- 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.
- Roberts, T.C., D.C. Brennan, R.S. Buller, M. Gaudreault-Keener, M.A. Schnitzler, K.E. Sternhell, K.A. Garlock, G.G. Singer, and G.A. Storch.** 1998. Quantitative polymerase chain reaction to predict occurrence of symptomatic cytomegalovirus infection and assess response to ganciclovir therapy in renal transplant recipients. *J Infect Dis.* **178**:626–635.
- 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.

- Rockley, P.F., and S.K. Tyring.** 1995. Interferons alpha, beta and gamma therapy of anogenital human papillomavirus infections. *Pharmacol Ther.* **65**:265–287.
- Roizman, B., and J. Baines.** 1991. The diversity and unity of Herpesviridae. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* **14**:63–79.
- Roizman, B., L. Carmichael, F. Deinhardt, G. De-The, A. 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.
- Roizman, B., R. Desrosiers, B. Fleckenstein, C. Lopez, A. Minson, and M. Studdert.** 1992. The family herpesviridae: an update. The herpesvirus study group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol.* **123**:425–449.
- Röttschke, O., K. Falk, K. Deres, H. Schild, M. Norda, J. Metzger, G. Jung, and H.G. Rammensee.** 1990. Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature.* **348**:252–254.
- Rudolph, M.G., R.L. Stanfield, and I.A. Wilson.** 2006. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol.* **24**:419–466.
- Saiki, R., P. Walsh, C. Levenson, and H. Erlich.** 1989. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA.* **86**:6230–6234.
- Sambrook, J., and D. Russel.** 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual.* 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Samuel, C.E..** 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev.* **14**:778–809.
- Sanchez, V., K. Greis, E. Sztul, and W.J. Britt.** 2000. Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential. *J Virol.* **74**:975–986.
- Saric, T., S.-C. Chang, A. Hattori, I.A. York, S. Markant, K.L. Rock, M. Tsujimoto, and A.L. Goldberg.** 2002. An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat Immunol.* **3**:1169–1176.
- Scalzo, A.A., N.A. Fitzgerald, C.R. Wallace, A.E. Gibbons, Y.C. Smart, R.C. Burton, and G.R. Shellam.** 1992. The effect of the Cmv-1 resistance gene, which is linked to the natural killer cell gene complex, is mediated by natural killer cells. *J Immunol.* **149**:581–589.
- Schmidinger, M., G. Steger, C. Wenzel, G.J. Locker, A.C. Budinsky, T. Brodowicz, G. Kramer, M. Marberger, and C.C. Zielinski.** 2001. Sequential administration of interferon-gamma, GM-CSF, and interleukin-2 in patients with metastatic renal cell carcinoma: results of a phase II trial. *J Immunother.* **24**:257–262.
- Schmitt, A., T. Tonn, D.H. Busch, G.U. Grigoleit, H. Einsele, M. Odendahl, L. Germeroth, M. Ringhoffer, S. Ringhoffer, M. Wiesneth, J. Greiner, D. Michel, T. Mertens, M. Rojewski, M. Marx, S. von Harsdorf, H. Döhner, E. Seifried, D. Bunjes, and M. Schmitt.** 2011. Adoptive transfer and selective reconstitution of streptamer-selected cytomegalovirus-specific CD8⁺ T cells leads to virus clearance in patients after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Transfusion.* **51**:591–599.
- Schneider, K., A. Loewendorf, C. De Trez, J. Fulton, A. Rhode, H. Shumway, S. Ha, G. Patterson, K. Pfeffer, S.A. Nedospasov, C.F. Ware, and C.A. Benedict.** 2008. Lymphotoxin-mediated crosstalk between B cells and splenic stroma promotes the initial type I interferon response to cytomegalovirus. *Cell Host Microbe.* **3**:67–76.
- Schneweis, K.E..** 1962. Serologische Untersuchungen zur Typendifferenzierung des Herpesvirus Hominis. *Z Immunitätsforsch Exp Ther.* **124**:24–48.
- 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.

- Sheppard, P., W. Kindsvogel, W. Xu, K. Henderson, S. Schlutsmeyer, T.E. Whitmore, R. Kuestner, U. Garrigues, C. Birks, J. Roraback, C. Ostrander, D. Dong, J. Shin, S. Presnell, B. Fox, B. Haldeman, E. Cooper, D. Taft, T. Gilbert, F.J. Grant, M. Tackett, W. Krivan, G. McKnight, C. Clegg, D. Foster, and K.M. Klucher. 2003. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol.* **4**:63–68.
- Simon, C.O.. 2006. Generierung und Charakterisierung von rekombinanten Cytomegaloviren mit Punktmutationen in antigenen Peptiden. Dissertation Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Simon, C.O., C.K. Seckert, N.K. Grzimek, and M.J. Reddehase. 2006. Murine model of cytomegalovirus latency and reactivation: the silencing/ desilencing and immune sensing hypothesis. *In* Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology. M.J. Reddehase, editor. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom. 483–500.
- Slavuljica, I., A. Busche, M. Babić, M. Mitrović, I. Gašparović, D. Cekinović, E. Markova Car, E. Pernjak Pugel, A. Ciković, V.J. Lisnić, W.J. Britt, U.H. Koszinowski, M. Messerle, A. Krmpotić, and S. Jonjić. 2010. Recombinant mouse cytomegalovirus expressing a ligand for the NKG2D receptor is attenuated and has improved vaccine properties. *J Clin Invest.* **120**:4532–4545.
- Smith, G.A., and L.W. Enquist. 2000. A self-recombining bacterial artificial chromosome and its application for analysis of herpesvirus pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**:4873–4878.
- Smith, G.R.. 1988. Homologous recombination in procaryotes. *Microbiol Rev.* **52**:1–28.
- 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.
- Smith, M.G.. 1956. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc Soc Exp Biol Med.* **92**:424–430.
- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, and D.C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* **150**:76–85.
- Sodeik, B., M. Ebersold, and A. Helenius. 1997. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol.* **136**:1007–1021.
- Söderberg, C., T. Giugni, J. Zaia, S. Larsson, J. Wahlberg, and E. Möller. 1993. CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection. *J Virol.* **67**:6576–6585.
- 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.
- Stark, G.R., I.M. Kerr, B.R. Williams, R.H. Silverman, and R.D. Schreiber. 1998. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem.* **67**:227–264.
- Starr, S.E., J.P. Glazer, H.M. Friedman, J.D. Farquhar, and S.A. Plotkin. 1981. Specific cellular and humoral immunity after immunization with live Towne strain cytomegalovirus vaccine. *J Infect Dis.* **143**:585–589.
- Steffens, H.P., S. Kurz, R. Holtappels, and M.J. Reddehase. 1998. Preemptive CD8 T-cell immunotherapy of acute cytomegalovirus infection prevents lethal disease, limits the burden of latent viral genomes, and reduces the risk of virus recurrence. *J Virol.* **72**:1797–1804.
- Steinmetz, M., D. Le Coq, S. Aymerich, G. Gonzy-Tréboul, and P. Gay. 1985. The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites. *Mol Gen Genet.* **200**:220–228.
- Stemberger, C., K.M. Huster, M. Koffler, F. Anderl, M. Schiemann, H. Wagner, and D.H. Busch. 2007a. A single naive CD8+ T cell precursor can develop into diverse effector and memory subsets. *Immunity.* **27**:985–997.

- Stemberger, C., M. Neuenhahn, V.R. Buchholz, and D.H. Busch.** 2007b. Origin of CD8+ effector and memory T cell subsets. *Cell Mol Immunol.* **4**:399–405.
- Stenberg, R., D. Thomsen, and M. Stinski.** 1984. Structural analysis of the major immediate early gene of human cytomegalovirus. *J Virol.* **49**:190–199.
- Stern-Ginossar, N., B. Weisburd, A. Michalski, V.T.K. 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.
- Suh, W.K., M.F. Cohen-Doyle, K. Fruh, 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.
- Sykulev, Y., M. Joo, I. Vturina, T.J. Tsomides, and H.N. Eisen.** 1996. Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity.* **4**:565–571.
- Tang, Q., E. Murphy, and 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..** 1995. Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science.* **268**:251–255.
- 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., J. Schröer, and T. Shenk.** 2004. RNAs are packaged into human cytomegalovirus virions in proportion to their intracellular concentration. *J Virol.* **78**:10390–10398.
- Tischer, B., J. von Einem, B. Kaufer, and N. Osterrieder.** 2006. Two-step Red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *Biotechniques.* **40**:191–197.
- Toes, R.E., A.K. Nussbaum, S. Degermann, M. Schirle, N.P. Emmerich, M. Kraft, C. Laplace, A. Zwiderman, T.P. Dick, J. Müller, B. Schönfisch, 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.
- Tomaš, M., N. Kucić, H. Mahmutefendić, G. Blagojević, and P. Lucin.** 2010. Murine cytomegalovirus perturbs endosomal trafficking of major histocompatibility complex class I molecules in the early phase of infection. *J Virol.* **84**:11101–11112.
- Tooze, J., M. Hollinshead, B. Reis, K. Radsak, and H. Kern.** 1993. Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur J Cell Biol.* **60**:163–178.
- Tortorella, D., B.E. Gewurz, M.H. Furman, D.J. Schust, and H.L. Ploegh.** 2000. Viral subversion of the immune system. *Annu Rev Immunol.* **18**:861–926.
- Townsend, A., C. Ohlén, J. Bastin, H.G. Ljunggren, L. Foster, and K. Kärre.** 1989. Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature.* **340**:443–448.
- Toyonaga, T., O. Hino, S. Sugai, S. Wakasugi, K. Abe, M. Shichiri, and K. Yamamura.** 1994. Chronic active hepatitis in transgenic mice expressing interferon-gamma in the liver. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91**:614–618.
- Trus, B., W. Gibson, N. Cheng, and A. Steven.** 1999. Capsid structure of simian cytomegalovirus from cryoelectron microscopy: evidence for tegument attachment sites. *J Virol.* **73**:2181–2192.

- 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.
- Del Val, M., K. Münch, M.J. Reddehase, and U.H. Koszinowski.** 1989. Presentation of CMV immediate-early antigen to cytolytic T lymphocytes is selectively prevented by viral genes expressed in the early phase. *Cell.* **58**:305–315.
- Venema, H., A.P. van den Berg, C. van Zanten, W.J. van Son, M. van der Giessen, and T.H. The.** 1994. Natural killer cell responses in renal transplant patients with cytomegalovirus infection. *J Med Virol.* **42**:188–192.
- Vidal, S., A. Krmpotić, M. Pyzik, and S. Jonjić.** 2013. Innate immunity to cytomegalovirus in the murine model. *In Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention.* Vol II. M.J. Reddehase, editor. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom. 191–213.
- Vidal, S.M., and L.L. Lanier.** 2006. NK cell recognition of mouse cytomegalovirus-infected cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* **298**:183–206.
- Wagner, M., A. Gutermann, J. Podlech, M.J. Reddehase, and U.H. Koszinowski.** 2002. Major Histocompatibility Complex Class I Allele-specific Cooperative and Competitive Interactions between Immune Evasion Proteins of Cytomegalovirus. *J Exp Med.* **196**:805–816.
- 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.
- Waiser, J., K. Budde, M. Schreiber, K. Korn, S. Stenglein, J.T. Drenckhahn, T. Böhler, I. Hauser, and H.H. Neumayer.** 1998. Effectiveness of deferred therapy with ganciclovir in renal allograft recipients with cytomegalovirus disease. *Transpl. Proc.* **30**:2083–2085.
- 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.
- Walton, S.M., S. Mandaric, N. Torti, A. Zimmermann, H. Hengel, and A. Oxenius.** 2011. Absence of cross-presenting cells in the salivary gland and viral immune evasion confine cytomegalovirus immune control to effector CD4 T cells. *PLoS Pathog.* **7**:e1002214.
- Wang, R., K. Natarajan, M. Revilleza, L. Boyd, L. Zhi, H. Zhao, H. Robinson, and D. Margulies.** 2012. Structural basis of mouse cytomegalovirus m152/gp40 interaction with RAE1 γ reveals a paradigm for MHC/MHC interaction in immune evasion. *Proc Natl Acad Sci USA.* **109**:E3578–E3587.
- Wang, X., S. Huong, M. Chiu, N. Raab-Traub, and E. Huang.** 2003. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature.* **424**:456–461.
- Warming, S., N. Costantino, D. Court, N. Jenkins, and G. Copeland.** 2005. Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic Acids Res.* **33**:e36.
- Weller, T., J. Hanshaw, and D. Scott.** 1960. Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology.* **12**:130–132.
- Welsh, R.M., J.O. Brubaker, M. Vargas-Cortes, and C.L. O'Donnell.** 1991. Natural killer (NK) cell response to virus infections in mice with severe combined immunodeficiency. The stimulation of NK cells and the NK cell-dependent control of virus infections occur independently of T and B cell function. *J Exp Med.* **173**:1053–1063.
- Wilfinger, W., K. Mackey, and P. Chomczynski.** 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques.* **22**:474–476, 478–481.
- Wilhelmi, V., C.O. Simon, J. Podlech, V. Böhm, T. Däubner, S. Emde, D. Strand, A. Renzaho, N.A. Lemmermann, C.K. Seckert, M.J. Reddehase, and N.K. Grzimek.** 2008. Transactivation of

- cellular genes involved in nucleotide metabolism by the regulatory IE1 protein of murine cytomegalovirus is not critical for viral replicative fitness in quiescent cells and host tissues. *J Virol.* **82**:9900-9916.
- 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.
- Wright, J., A. Kurosky, E. Pryzdial, and S. Wasi.** 1995. Host cellular annexin II is associated with cytomegalovirus particles isolated from cultured human fibroblasts. *J Virol.* **69**:4784-4791.
- Wright, J., A. Kurosky, and S. Wasi.** 1994. An endothelial cell-surface form of annexin II binds human cytomegalovirus. *Biochem Biophys Res Commun.* **198**:983-989.
- Ye, M., C.S. Morello, and D.H. Spector.** 2002. Strong CD8 T-cell responses following coimmunization with plasmids expressing the dominant pp89 and subdominant M84 antigens of murine cytomegalovirus correlate with long-term protection against subsequent viral challenge. *J Virol.* **76**:2100-2112.
- Yewdell, J.W..** 2007. Plumbing the sources of endogenous MHC class I peptide ligands. *Curr Opin Immunol.* **19**:79-86.
- Yewdell, J.W., and A.B. Hill.** 2002. Viral interference with antigen presentation. *Nat Immunol.* **3**:1019-1025.
- Yokoyama, W.M..** 1998. Natural killer cell receptors. *Curr Opin Immunol.* **10**:298-305.
- Yokoyama, W.M., and S. Kim.** 2006. Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. *Immunol Rev.* **214**:143-154.
- York, I.A., S.-C. Chang, T. Saric, J.A. Keys, J.M. Favreau, A.L. Goldberg, and K.L. Rock.** 2002. The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat Immunol.* **3**:1177-1184.
- Zhou, F., J. Chen, and K.-N. Zhao.** 2013. Human papillomavirus 16-encoded E7 protein inhibits IFN- γ -mediated MHC Class I antigen presentation and CTL-induced lysis through blocking IRF-1 expression in mouse keratinocytes. *J Gen Virol.* **94**:2504-2514.
- Zhou, F., G.R. Leggatt, and I.H. Frazer.** 2011. Human papillomavirus 16 E7 protein inhibits interferon- γ -mediated enhancement of keratinocyte antigen processing and T-cell lysis. *FEBS J.* **278**:955-963.
- Ziegler, H., W. Muranyi, H. 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. Thäle, 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. *In* Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology. M.J. Reddehase, editor. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom. 321-340.
- Zimmermann, A., M. Trilling, M. Wagner, M. Wilborn, I. Bubić, S. Jonjić, U.H. Koszinowski, and H. Hengel.** 2005. A cytomegaloviral protein reveals a dual role for STAT2 in IFN-gamma signaling and antiviral responses. *J Exp Med.* **201**:1543-1553.

7 Anhang

Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Biologie Mainz zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Molekulare Grundlagen der Immunkontrolle des murinen Cytomegalovirus in Gegenwart viruskodierter Immunevasine“ am Institut für Virologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. Matthias J. Reddehase ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Biologischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Neustadt, den 22.01.2014

Annette Fink

Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in den beiden erstgenannten Journals veröffentlicht.

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.

Fink, A.*, **N.A. Lemmermann***, **D. Gillert-Marien**, **D. Thomas**, **K. Freitag**, **V. Böhm**, **V. Wilhelmi**, **K. Reifenberg**, **M.J. Reddehase**, and **R. Holtappels**. 2012. Antigen presentation under the influence of “immune evasion” proteins and its modulation by interferon-gamma: implications for immunotherapy of cytomegalovirus infection with antiviral CD8 T cells. *Med Microbiol Immunol*. **201**:513–525.

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

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.

Fink, A., **J.K. Büttner**, **D. Thomas**, **R. Holtappels**, **M.J. Reddehase**, and **N.A. Lemmermann**. 2014. Noncanonical expression of a murine cytomegalovirus early protein CD8 T-cell epitope as an immediate early epitope based on transcription from an upstream gene. *Viruses*. **6**:808-831.

John von Freyend, S., **H. Rosenqvist**, **A. Fink**, **I.M. Melzer**, **J. Clos**, **O.N. Jensen**, and **M. Wiese**. 2010. LmxMPK4, an essential mitogen-activated protein kinase of *Leishmania mexicana* is phosphorylated and activated by the STE7-like protein kinase LmxMKK5. *Int J Parasitol*. **40**:969–978.

Kropp, K.A., **C.O. Simon**, **A. Fink**, **A. Renzaho**, **B. Kühnapfel**, **J. Podlech**, **M.J. Reddehase**, and **N.K.A. Grzimek**. 2009. Synergism between the components of the bipartite major immediate-early transcriptional enhancer of murine cytomegalovirus does not accelerate virus replication in cell culture and host tissues. *J Gen Virol*. **90**:2395–2401.

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.

Podlech, J., **R. Pintea**, **K.A. Kropp**, **A. Fink**, **N.A. Lemmermann**, **K.C. Erlach**, **E. Isern**, **A. Angulo**, **P. Ghazal**, and **M.J. Reddehase**. 2010. Enhancerless cytomegalovirus is capable of establishing a low-level maintenance infection in severely immunodeficient host tissues but fails in exponential growth. *J Virol*. **84**:6254–6261.

* gleichberechtigte Autorenschaft

Vorträge

Fink, A., C. Krause, and M.J. Reddehase. 2008. Usage of vesicular trafficking pathways by vRAPs of murine cytomegalovirus to inhibit MHC class I presentation. 3rd Mini-Herpesvirus Workshop; Berlin.

Fink, A. 2010. Importance of m152 glycosylation for CTL immunoevasion. Internes Seminar der AG Jonjic; Department for Histology and Embryology, School of Medicine, University of Rijeka, Kroatien.

Fink, A., K.A. Kropp, J. Podlech, E. Isern, A. Angulo, P. Ghazal, and M.J. Reddehase. 2010. *In vivo* impact of the murine cytomegalovirus major immediate-early enhancer. 35th Annual International Herpesvirus Workshop; Salt Lake City, Utah, USA.

Poster

Fink, A., C. Krause, and M.J. Reddehase. 2008. Usage of vesicular trafficking pathways by vRAPs of murine cytomegalovirus to inhibit MHC class I presentation. 31. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie; Marburg.

Fink, A., S. Emde, C. Krause, N.A. Lemmermann, C.O. Simon, N.K.A. Grzimek, D. Strand, M.J. Reddehase, and S.A. Öhrlein-Karpi. 2009. Involvement of cellular adaptor proteins of vesicular trafficking pathways in the function of murine cytomegalovirus immunoevasins. 19th Annual Meeting of the Society for Virology; Leipzig.

Fink, A., K.A. Kropp, J. Podlech, E. Isern, A. Angulo, P. Ghazal, and M.J. Reddehase. 2010. *In vivo* impact of the murine cytomegalovirus major immediate-early enhancer. 35th Annual International Herpesvirus Workshop; Salt Lake City, Utah, USA.

Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen ist der Lebenslauf in der Online-Version nicht angezeigt.

Danksagung

Aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht genannt.