

Präklinische Evaluierung von therapeutischer Vakzinierung
zur Effizienzsteigerung der adoptiven Immuntherapie von
Cytomegalovirus-Erkrankungen

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaft

Am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Kerstin Marlene Gergely

geb. am 22.12.1980 in Darmstadt/Hessen

Mainz, Oktober 2012

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2012

*So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muß sie für fertig erklären,
wenn man nach Zeit und Umständen
das mögliche getan hat.*

J. W. von Goethe, „Italiänische Reise“, 16. März 1787

Zusammenfassung

Klinische Manifestationen einer Cytomegalovirus (CMV)-Infektion gefährden den therapeutischen Erfolg der hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT). Dabei stellt insbesondere die Reaktivierung von latentem CMV im HSCT-Rezipienten das häufigste Infektionsrisiko dar. Die Inzidenz der CMV-Erkrankung kann durch Rekonstitution adoptiv transferierter CMV-spezifischer CD8 T-Zellen im HSCT-Rezipienten reduziert werden. Das Modell der sogenannten adoptiven Immuntherapie wurde zunächst im murinen Modell entwickelt und bereits in klinischen Studien bestätigt. Jedoch ist der adoptive Transfer (AT) aufgrund der nur limitiert zur Verfügung stehenden therapeutisch effektiven Zellzahlen zurzeit in der klinischen Routine nicht einsetzbar.

Ziel dieser Arbeit war daher die präklinische Evaluierung einer Kombinationstherapie aus AT einer limitierten Anzahl CMV-spezifischer T-Zellen und deren *in vivo* Expansion durch therapeutische Vakzinierung nach HSCT. Zur Testung dieser Therapie wurde ein murines Modell auf der Grundlage von rekombinanten murinen CMV (mCMV) und rekombinanten HCMV Dense Bodies (DB) etabliert. Beide exprimieren das gut charakterisierte MHC-Klasse I K^b-restringierte SIINFEKL-Peptid (OVA₂₅₇₋₂₆₄) des Ovalbumins (OVA) bzw. die Funktionsverlustmutante SIINFEKA als Modellantigen. In den rekombinanten mCMV, mCMV-Δm157Luc/m164-SIINFEKL/-A (mCMV-SIINFEKL/-A), wurde mittels orthotopen Peptid-austauschs das m164₂₅₇₋₂₆₅ Peptid des gp36,5/m164 Proteins deletiert und durch das SIINFEKL- bzw. SIINFEKA-Peptid ersetzt. Anhand von *Priming*-Analysen konnte gezeigt werden, dass nach Infektion von C57BL/6 Mäusen mit mCMV-SIINFEKL SIINFEKL-spezifische T-Zellen nachweisbar sind und das im CMV-Genom integrierte SIINFEKL funktional prozessiert und präsentiert wird. Parallel hierzu konnte nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL *in vivo* ein SIINFEKL-spezifisches CD8 T-Zell-*Priming* induziert werden. In weiteren Experimenten konnte nach DB-SIINFEKL-Immunisierung im poplitealen Lymphknoten sowie in der Milz eine Proliferation von adoptiv transferierten CD8 T-Zellen beobachtet werden. Die anschließenden *Challenge*-Versuche zeigten, dass eine DB-SIINFEKL-Immunisierung epitopspezifisch vor einer hoch dosierten *Challenge*-Infektion mit mCMV-SIINFEKL schützt. Im AT-Modell konnte gezeigt werden, dass adoptiv transferierte OT-I Zellen hämatoablativ behandelte Rezipienten epitopspezifisch vor einer mCMV-SIINFEKL-Infektion schützen können, wobei der erzielte Schutz durch zusätzliche Vakzinierung mit DB-SIINFEKL deutlich verbessert werden konnte. Im Anschluss konnte im HSCT-Rezipienten erstmals eine durch zusätzliche Vakzinierung signifikante Verbesserung des protektiven Potenzials adoptiv transferierter OT-I Zellen bestätigt werden. Diese Verstärkung der Protektion ermöglicht die Reduktion der Anzahl der für den Schutz benötigten Zellzahl und erhöht damit die Effizienz der adoptiven Immuntherapie.

Summary

Clinical manifestations of cytomegalovirus (CMV)-infection compromise the therapeutic success of hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). The reactivation of latent CMV especially displays a common and life-threatening complication in HSCT-recipients. In HSCT-recipients the incidence of CMV-disease can be reduced by adoptive transfer (AT) of CMV-specific CD8 T cells. This concept of adoptive immunotherapy was first established in the murine model and was later confirmed in clinical trials. Due to the high number of transferred cells required for antiviral protection, adoptive immunotherapy has not entered clinical routine.

The aim of the study was the preclinical evaluation of an antiviral combination therapy in HSCT recipients, composed of AT of a limited number of CMV-specific T cells and their *in vivo* expansion induced by therapeutic vaccination. For testing this, a murine model based on recombinant murine CMV (mCMV) and recombinant human CMV (hCMV) Dense Bodies (DB) was established. Both express the well characterized MHC-class-I K^b restricted ovalbumin (OVA)-derived peptide SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), or its non-antigenic analogon SIINFEKA (OVA₂₅₇₋₂₆₄ L→A). The recombinant viruses mCMV-Δm157luc/SIINFEKL and -A (mCMV-SIINFEKL/-A) were generated via “orthotopic peptide swap” replacing the immunodominant D^d restricted antigenic peptide m164₁₅₀₋₁₅₈ of gp36.5/m164 protein with SIINFEKL and SIINFEKA, respectively.

Successful priming of immunocompetent C57BL/6 mice showed that the in CMV-genome integrated SIINFEKL was functionally processed and presented. In parallel the immunogenicity of DB-SIINFEKL also has been confirmed after immunization. Furthermore, protection against a high dose challenge-infection in mice after immunization with DB-SIINFEKL was confirmed.

In following experiments, proliferation of adoptively transferred SIINFEKL-specific CD8 T cells could be detected in popliteal lymph nodes and spleen of C57BL/6 mice after immunization with DB-SIINFEKL or mCMV-SIINFEKL infection. In an AT of SIINFEKL-specific CD8 T cells epitope-specific protection of hematoablated recipients against mCMV-SIINFEKL has been proofed. This protection can be significantly improved by additional immunization with DB-SIINFEKL.

Finally, a distinct improvement of the protective potential of adoptive transferred SIINFEKL-specific CD8 T cells, due to additional vaccination with DB-SIINFEKL could be confirmed in HSCT-recipients. This shows for the first time that a combination of therapeutic vaccination enhance protection and allows the reduction of transferred cells.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
SUMMARY	II
INHALTSVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das Cytomegalovirus	1
1.2 Eigenschaften von CMV	2
1.2.1 Morphologie von CMV-Virionen	2
1.2.2 Genomstruktur von CMV	3
1.2.3 Replikationszyklus der CMV	3
1.3 Immunologische Kontrolle der mCMV-Infektion	5
1.4 Medizinische Aspekte der hCMV-Infektion	9
1.4.1 Epidemiologie	9
1.4.2 Symptomatik im immunkompetenten Patienten	9
1.4.3 Symptomatik im immunsupprimierten Patienten	9
1.5 Antivirale Therapie.....	11
1.6 Adoptive Immuntherapie.....	12
1.7 Dense Bodies als ein potentieller hCMV-Vakzine-Kandidat	14
1.8 Die mCMV-Infektion als Modellsystem für die hCMV-Infektion	15
1.9 SIINFEKL als Modellantigen für AT, Vakzinierung und Kontrolle der CMV-Infektion.	16
1.10 Zielsetzung	17
2 MATERIAL	19
2.1 Allgemeine Laborgeräte	19
2.2 Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien	21
2.3 Lösungen und Chemikalien	23
2.4 Kits	26
2.5 Enzyme	26
2.6 Oligonukleotide.....	26

2.7	Antigene Peptide	27
2.8	Antikörper	28
2.8.1	AK für die Durchflusszytometrie.....	28
2.8.2	AK für IFN- γ <i>ELISpot-Assay</i>	28
2.8.3	AK für Immunfluoreszenzen.....	28
2.8.4	AK und Seren für die Immunhistochemie.....	29
2.8.5	AK für die MACS-Separation	29
2.8.6	AK für die <i>in vivo</i> Depletion von CD8 T-Zellen	29
2.9	Materialien für die Zellkultur.....	29
2.9.1	Zellkulturmedien	29
2.9.2	Medienzusätze und Reagenzien.....	30
2.9.3	Primäre Zellen und Zelllinien	32
2.10	Bakterien	32
2.11	Viren.....	33
2.12	Rekombinante DB	33
2.13	Versuchstiere	34
3	METHODEN.....	35
3.1	Zellbiologische Methoden	35
3.1.1	Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen	35
3.1.2	Ermittlung der Zellvitalität und Zellzahl	35
3.1.3	Anlage von murinen embryofetalen Fibroblasten (MEF)	36
3.1.4	Transfektion von BAC-Plasmid-DNA	37
3.1.5	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung.....	37
3.2	Virologische Methoden	38
3.2.1	mCMV Produktion	38
3.2.2	Virustiter-Bestimmung eines Virusstocks.....	40
3.2.3	Virustiter-Bestimmung von Organhomogenaten	41
3.2.4	Eliminierung von BAC-Sequenzen aus rekombinanten mCMV	41
3.3	Molekularbiologische Methoden	42
3.3.1	Quantifizierung von Nukleinsäuren	42
3.3.2	Enzymatische Restriktion von BAC-DNA	43
3.3.3	Native Gelelektrophorese von DNA	43
3.3.4	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	44

3.3.5	Bakterienanzucht.....	44
3.3.5.1	Flüssigkulturen	44
3.3.5.2	Plattenkulturen.....	45
3.3.5.3	Dauerkulturen	45
3.3.6	Transformation elektrokompeter Bakterienzellen	46
3.3.6.1	Herstellung elektrokompeter Bakterien	46
3.3.6.2	Elektrotransformation.....	46
3.3.7	Isolation und Analyse von Nukleinsäuren	46
3.3.7.1	Schnelle Präparation von BAC-Plasmiden	46
3.3.7.2	Isolierung der Virus-DNA aus Überständen	47
3.3.7.3	Maxipräparation von BAC-DNA	48
3.3.8	Polymerasekettenreaktion	48
3.3.9	Quantitative <i>real-time</i> PCR (qPCR)	49
3.3.10	Herstellung rekombinanter mCMV mittels Zwei-Schritt-BAC-Mutagenese im <i>E.coli</i> Stamm DH10B.....	50
3.4	Immunologische Methoden.....	51
3.4.1	Isolation von Zellen aus Organen	51
3.4.2	Gewinnung von Knochenmarkzellen (KMZ).....	53
3.4.3	MACS	53
3.4.3.1	Positive Selektion per MACS	54
3.4.3.2	Positive Selektion per <i>auto</i> MACS	55
3.4.3.3	Depletion von CD8- und CD4 T-Zellen aus KMZ.....	55
3.4.4	Herstellung einer epitopspezifischen CTLL.....	55
3.4.5	Zytolysetest ($[^{51}\text{Cr}]$ - <i>Release-Assay</i>).....	56
3.4.6	<i>Enzyme linked immuno spot-Assay (ELISpot-Assay)</i>	57
3.4.7	Zielzellen für peptidspezifische CTL	59
3.4.7.1	Endogene Beladung von MEF durch DB	59
3.4.7.2	Exogene Beladung von MEF mit synthetischem Peptid	60
3.4.8	<i>In vitro</i> CFSE-Proliferations- <i>Assay</i>	60
3.4.9	Zytofluorometrische Analyse.....	61
3.5	Histologische Methoden	63
3.5.1	Immunhistochemie	63
3.6	Tierexperimentelle Methoden	65
3.6.1	Immunsuppression	65

3.6.2	Intraplantare Infektion	66
3.6.3	Intravenöse Infektion immunkompetenter Tiere	66
3.6.4	Immunisierung	66
3.6.4.1	Immunisierung mit DB	66
3.6.5	Organentnahme und Probenkonservierung	67
3.6.6	<i>In vivo</i> Proliferations-Assay.....	67
3.6.7	<i>Challenge</i> -Infektion.....	68
3.6.8	<i>In vivo</i> Depletion von CD8 T-Zellen	68
3.6.9	Adoptiver Transfer	69
3.6.10	Adoptiver Transfer und Vakzinierung.....	69
3.6.11	Adoptive Immuntherapie und Vakzinierung im HSCT-Rezipienten.....	70
4	ERGEBNISSE.....	71
4.1	Herstellung rekombinanter mCMV mit orthotopem Peptid austausch	71
4.1.1	Generierung der rekombinanten mCMV-BAC-Plasmide mittels Zwei-Schritt-BAC-Mutagenese im <i>E.coli</i> Stamm DH10B.....	72
4.1.2	Molekulare Charakterisierung der generierten mCMV-BAC-Plasmide	73
4.1.2.1	Überprüfung des orthotopen Peptid austauschs	73
4.1.2.2	Überprüfung der Integrität der BAC-Plasmide.....	74
4.1.2.3	Sequenzierung der generierten mCMV-BAC-Plasmide.....	75
4.1.3	Herstellung rekombinanter mCMV aus BAC-Plasmiden und Exzision der BAC-Sequenzen	76
4.1.4	Nachweis der BAC-Freiheit mittels qPCR.....	77
4.1.5	Bestimmung des Genom-zu-PFU-Verhältnisses.....	78
4.2	Charakterisierung der mCMV-Rekombinanten	79
4.2.1	Nachweis der intrazellulären Lokalisation des gp36,5/m164 Proteins	80
4.2.2	Replikative Fitness und Infektiosität <i>in vivo</i>	81
4.3	Immunologische Charakterisierung der mCMV-Rekombinanten.....	84
4.3.1	Testung der epitopspezifischen Immunogenität der generierten Rekombinanten .	84
4.3.1.1	Nachweis der epitopspezifischen Immunogenität <i>in vivo</i>	84
4.3.2	Nachweis der funktionellen Avidität SIINFEKL-spezifischer CD8 T-Zellen	85
4.3.2.1	Ermittlung der funktionellen Avidität SIINFEKL-spezifischer <i>in vivo</i> geprimter CD8 T-Zellen	86
4.3.2.2	Vergleich der funktionellen Avidität von OT-I Zellen mit der <i>in vivo</i> geprimter CD8 T-Zellen	87
4.3.2.3	Vergleich der funktionellen Avidität von OT-I Zellen mit der generierter CTLL ..	89

4.4	Immunologische Charakterisierung rekombinanter DB	91
4.4.1	Überprüfung der SIINFEKL-spezifischen Immunogenität rekombinanter DB	92
4.4.2	Ermittlung eines dosisabhängigen T-Zell- <i>Primings</i>	93
4.4.3	Vergleich der SIINFEKL-spezifischen Immunantwort nach DB-Immunisierung und nach mCMV-Infektion	95
4.5	Nachweis von Proliferation adoptiv transferierter OT-I Zellen nach Infektion bzw. Immunisierung.....	96
4.5.1	Nachweis von Proliferation adoptiv transferierter OT-I Zellen nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL	96
4.5.2	Nachweis von Proliferation SIINFEKL-spezifischer CD8 T-Zellen nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL.....	100
4.5.2.1	Nachweis von Proliferation adoptiv transferierter OT-I Zellen <i>in vitro</i>	100
4.5.2.2	Nachweis von <i>in vivo</i> Proliferation adoptiv transferierter OT-I Zellen nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL.....	102
4.6	Nachweis der protektiven Funktion adoptiv transferierter SIINFEKL-spezifischer T-Zellen	104
4.6.1	Nachweis eines protektiven Potenzials adoptiv transferierter OT-I Zellen in mCMV-SIINFEKL infizierten Rezipienten.....	105
4.6.2	Nachweis eines protektiven Potenzials adoptiv transferierter SIINFEKL-spezifischer CTLL in mCMV-SIINFEKL infizierten Rezipienten	106
4.7	Nachweis von Protektion durch Immunisierung mit DB-SIINFEKL.....	108
4.7.1	Nachweis von Protektion durch Immunisierung mit DB-SIINFEKL nach <i>Challenge</i> -Infektion mit mCMV-SIINFEKL	109
4.7.2	Die Protektion durch Immunisierung mit DB-SIINFEKL nach <i>Challenge</i> -Infektion ist abhängig von CD8 T-Zellen.....	111
4.8	<i>In vivo</i> Adjuvanseffekt durch DB-Immunisierung.....	113
4.9	Verbesserung des protektiven Potenzials adoptiv transferierter epitopspezifischer T-Zellen durch therapeutische Vakzinierung mit DB-SIINFEKL.....	117
4.10	Verbesserung der adoptiven T-Zell Therapie durch Vakzinierung mit DB-SIINFEKL nach KMT	120
5	DISKUSSION.....	129
	LITERATURVERZEICHNIS.....	146
	PUBLIKATIONEN	173
	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	175
	DANKSAGUNG.....	176
	LEBENS LAUF.....	177

Abkürzungsverzeichnis

A. bidest.	Reinstwasser (<i>Aqua bidestillata</i>)
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase- <i>Complex</i>
A. dest.	<i>Aqua destillata</i>
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
AK	Antikörper
ALVAC	Canarypox Vektor
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
APES	3-Aminopropyltriethoxysilan
AS	Aminosäure
AT	Adoptiver Transfer
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium
<i>bGH</i>	<i>bovine growth hormone</i>
bp	Basenpaare (<i>base pairs</i>)
BSA	Bovines Serum Albumin
β-ME	β-Mercaptoethanol
c_{End}	Endkonzentration
Cam	Chloramphenicol
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDV	Cidofovir
CFDA-SE	Carboxyfluoreszein Diazetat Succinimidyl Ester
CFSE	Carboxyfluoreszein-Succinimidyl Ester

CID	<i>cytomegalic inclusion disease</i>
CMV	Cytomegalovirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Na ₂ [⁵¹ Cr]O ₄	[⁵¹ Cr]-Natrium-Chromat
CTL	zytolytische T-Lymphozyten (<i>cytolytic T lymphocytes</i>)
CTLL	zytolytische T-Lymphozyten-Linie(n) (<i>cytolytic T lymphocyte line(s)</i>)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DB	Dense Bodies
DC	dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DL	Detektionslimit
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DT	<i>doubling times</i>
dNTP(s)	Desoxyribonukleotidtriphosphat(e)
E	<i>early</i>
E	Extinktionen
EBV	Eppstein-Barr-Virus
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
EEC	<i>early effector cells</i>
EGFR	epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
<i>ELISA</i>	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
<i>ELISpot</i>	<i>enzyme linked immuno spot</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAAP	<i>ER aminopeptidase associated with antigen processing</i>

ERAP	ER-Aminopeptidase
ERGIC	ER/Golgi- <i>immediate compartment</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
for	<i>forward</i>
FOS	Foscarnet
FSC	<i>forward scatter</i>
<i>galk</i>	Galaktokinase
g	Glykoprotein
gC	Glykoproteinkomplex (<i>glycoprotein complex</i>)
GCV	Ganciclovir
GMP	<i>good manufacturing practice</i>
GP	<i>guinea pig</i> ; Meerschwein
GvHD	<i>graft versus host disease</i>
Gy	<i>gray</i>
h	Stunde(n)
HCL	Salzsäure
hCMV	Humanes Cytomegalovirus
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HHV	humanes Herpesvirus
hc	<i>high control</i>
HLA	humane Leukozyten Antigene
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{demin.}	Demineralisiertes Wasser
H ₂ O _{reinst.}	Reinstwasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

HPI	Helikase-Primase-Inhibitoren
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSC	hämatopoetische Stammzellen (<i>hematopoietic stem cells</i>)
HSCT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
HSV	Herpes-Simplex-Virus
IE	<i>immediate early</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
LDS	Lipiddoppelschicht
IL	Interleukin
i.pl.	intraplantar
i.v.	intravenös
KAc	Kaliumacetat
Kan	Kanamycin
kb	<i>kilobase</i>
kbp	<i>kilobase pair</i>
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
KMZ	Knochenmarkzellen
L	<i>late</i>
LB	Luria-Bertani
lc	<i>low control</i>
LD	<i>large cells columns for depletion</i>
LK	Lymphknoten

LS	<i>large cells columns for separation</i>
Luc	Luciferase
MACS	magnetische Zellseparation (<i>magnetic cell separation</i>)
max.	maximal
mCMV	murines Cytomegalovirus
MEF	murine embryofetale Fibroblasten
MEM	<i>minimum essential medium</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MIE	<i>major immediate early</i>
MIEP	<i>major immediate early promoter</i>
MIEPE	<i>major immediate early promotor-enhancer</i>
MIE-PEEP	<i>major immediate early promoter enhancer-enhancer promotor</i>
min	Minute(n)
MOI	<i>multiplicity of Infection</i>
MPN	<i>most probable number</i>
MVA	modifizierten Vaccinia Virus Ankara
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ EDTA	Natrium-EDTA
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
nf	<i>negative fraction</i>
NFκB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NIEPS	<i>non-infectious enveloped particles</i>
NK-Zelle	natürliche Killer-Zelle
OD	optische Dichte

ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
OVA	Ovalbumin
p.a.	<i>pro analysi</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerkettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cyanin-5
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin-7
PFU	<i>plaque-forming unit</i>
<i>pH</i>	<i>potentia hydrogenii</i>
p.i.	nach Infektion (<i>post infection</i>)
pp	Phosphoprotein
pUL	phosphorylierte <i>UL</i>
restl.	restliche(n)
rev	<i>reverse</i>
rh IL-2	rekombinantes humanes Interleukin-2
RNase	<i>ribonuclease</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	<i>reverse</i> Transkriptase
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFU	<i>plaque-forming-unit</i>
qPCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SCT	Stammzelltransplantation

SDS	Natriumlaurylsulfat
SLEC	<i>short-lived effector cells</i>
SPF	<i>specified pathogen free</i>
SSC	<i>sideward scatter</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
Taq	<i>thermus aquaticus</i>
T _{CM}	<i>central-memory t cells</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TE	Tris-EDTA
T _{EM}	<i>effector-memory t cells</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
U	<i>units</i>
UL	<i>unique long region</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute
ü.N.	über Nacht
V	Verdünnungsfaktor
ValGCV	Valganciclovir
VEE	<i>Venezuelan Equine Encephalitis</i>
VRP	<i>virus-like replicon particle</i>
vs.	<i>versus</i>
VSP	Virusstandardpuffer
v/v	Volumen/Volumen (<i>volume/volume</i>)

VZV	Varizella-Zoster-Virus
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen (<i>weight/volume</i>)
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZVTE	Zentrale Versuchstiereinrichtung

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

1 Einleitung

1.1 Das Cytomegalovirus

Das Cytomegalovirus (CMV) wird nach der Klassifikation des Internationalen Komitees für Virustaxonomie (Roizman et al., 1981; Pellet und Roizman, 2006; Davison et al., 2008) der Familie der Herpesviren (*Herpesviridae*) zugeordnet. Den Namen verdankt das Virus der Eigenschaft, dass sich Zellen durch eine Infektion mit dem CMV drastisch vergrößern (Weller et al., 1960). Dieses Phänomen wird auch als „Cytomegalie“ bezeichnet. Zu der ubiquitär verbreiteten Familie der *Herpesviridae* zählen sieben weitere humanpathogene Vertreter, die beiden Herpes-Simplex-Viren (HSV)-1 und -2, das Varizella-Zoster-Virus (VZV), die humanen Herpesviren (HHV)-6 und -7, das Epstein-Barr-Virus (EBV) sowie das Kaposi-Sarkom assoziierte Herpesvirus (HHV-8). Eine Eigenschaft aller *Herpesviridae* ist die Fähigkeit eine lebenslange, latente Infektion im Wirtsorganismus auszubilden (Roizman und Baines, 1991). Die Zuordnung der Mitglieder zur Familie der *Herpesviridae* erfolgte primär anhand der Morphologie der Viruspartikel (Plummer, 1967), des Weiteren werden sie entsprechend ihrer biologischen Eigenschaften, wie Replikationsgeschwindigkeit, Zelltropismus, Wirtsspektrum sowie Ort ihrer Latenz, in die drei Unterfamilien α -, β - und γ -*Herpesvirinae* eingeordnet (Pellet und Roizman, 2006). Die α -*Herpesvirinae* weisen ein breites Wirtsspektrum sowie einen kurzen Replikationszyklus auf und etablieren Latenz überwiegend in den Nervenzellen sensorischer Ganglien. Im Gegensatz dazu zeichnen sich die β - sowie die γ -*Herpesvirinae* durch ein enges Wirtsspektrum und einen langsamen Replikationszyklus aus. Die produktive Infektion sowie die Etablierung von Latenz erfolgt bei den γ -*Herpesvirinae* primär in B- und T-Lymphozyten, dagegen zeigen β -*Herpesvirinae* einen breiten Zelltropismus und infizieren beispielsweise Speicheldrüsen sowie lymphoretikuläre Zellen (Rolle und Mayr, 2002; Pellet und Roizman, 2006). Das humane CMV (hCMV) etabliert Latenz in unterschiedlichen Organen wie Lunge, Leber, Pankreas, Niere und Herz (Koffron et al., 1997), nach Infektion mit dem murinen CMV (mCMV) kann latentes Virus zusätzlich in der Milz, Speicheldrüse, Nebenniere, jedoch nicht im Pankreas, nachgewiesen werden (Baltesen et al., 1993; Collins et al., 1993; Koltman et al., 1990; Reddehase et al., 1994). Aufgrund seines langsamen Replikationszyklus in Zellkultur, seiner ausgeprägten Wirtsspezifität sowie der nach Infektion auftretenden Cytomegalie wird das CMV der Subfamilie der β -*Herpesvirinae* zugeordnet (Mocarski et al., 2006).

1.2 Eigenschaften von CMV

1.2.1 Morphologie von CMV-Virionen

Die Virionen der CMV besitzen einen Durchmesser von 150 bis 200nm und zeigen die typische Morphologie der *Herpesviridae* (Abb. 1.1). Sie sind große DNA-Viren, deren lineares, doppelsträngiges Genom von einem ikosaedrischen Nukleokapsid, das sich aus 162 Kapsomeren zusammensetzt (Chen et al., 1999), umschlossen wird. Dieses wird vom Tegument, das aus etwa 25 verschiedenen viralen Proteinen besteht, umgeben. Die Hauptkomponenten des hCMV-Teguments sind die Phosphoproteine pp65 (pUL83), pp150 (pUL32), pp71 (pUL82), pUL48 sowie pUL25, sie bilden etwa 30% der gesamten Proteinmasse der Virionen (Varnum et al., 2004). Die äußere Hülle des CMV-Virions ist eine Lipiddoppelschicht (LDS), die von Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (ER)/Golgi-*immediate compartment* (ERGIC) abstammt und in die zelluläre sowie virale Glykoproteine eingelagert sind (Pellet und Roizman, 2006; Streblow et al., 2006).

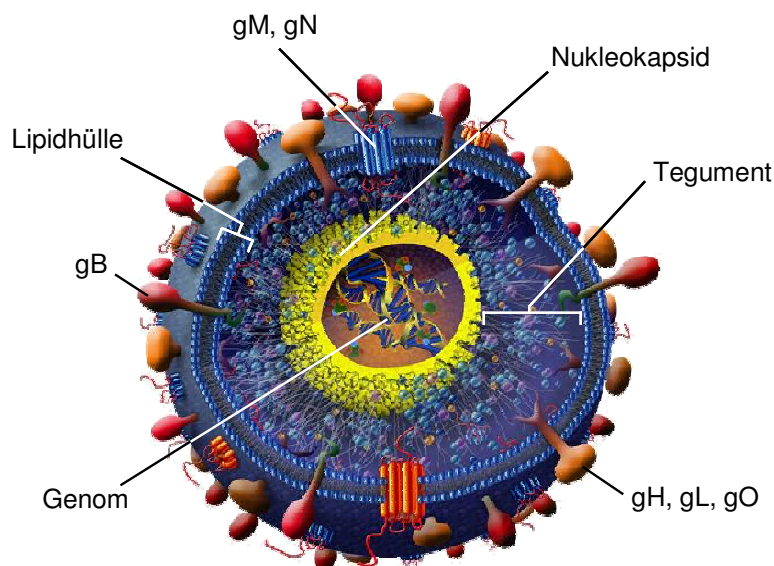


Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines hCMV-Virions. Typische dreischichtige Struktur des hCMV-Virions, bestehend aus Lipidhülle, Tegument und Nukleokapsid. Die Lipidhülle enthält eine Vielzahl viraler Glykoproteine (verändert nach Streblow et al., 2006).

Die viralen Glykoproteine, von denen das gM sowie das gB am häufigsten vertreten sind (Varnum et al., 2004), spielen bei der Anheftung der Virionen an die Membran der Wirtszelle (*Attachment*), der Penetration der Wirtszelle sowie bei der Reifung des Virions eine essentielle Rolle (Britt und Mach, 1996; Mocarski et al., 2006; Streblow et al., 2006) und sind wichtige Zielantigene der Antikörper-vermittelten (humoralen) Immunantwort des Wirts gegen hCMV.

1.2.2 Genomstruktur von CMV

Die CMV-Genome gehören mit ihrer Länge von etwa 230kbp zu den größten Genomen innerhalb der Familie der *Herpesviridae*. mCMV kodiert für etwa 170 *open reading frames* (ORF; offener Leserahmen) (Rawlinson et al., 1996; Tang et al., 2006), dagegen konnten für den hCMV-Laborstamm AD169 etwa 200 ORF identifiziert werden (Davison et al., 2003; Murphy et al., 2003; Dolan et al., 2004). Bei hCMV sind von diesen ORF nur 45 als essentiell für die *in vivo* Replikation beschrieben (Dunn et al., 2003). Vielen der restlichen ORF sowie ihrer putativen Genprodukte konnte gegenwärtig noch keine Funktion zugeordnet werden. hCMV und mCMV besitzen 78 homologe ORF, die primär im zentralen Genombereich vorliegen und sowohl sequenz- als auch positionshomolog sein können, d.h. die Genome sind zueinander kollinear (Landolfo et al., 2003).

1.2.3 Replikationszyklus der CMV

Die Penetration der Wirtszelle beginnt mit der Adsorption der Virionen. Hierbei erfolgt eine unspezifische Bindung viraler Glykoproteine an Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) auf der Oberfläche der Wirtszelle (Compton et al., 1993). Dabei spielen das Glykoprotein gB sowie der Glykoproteinkomplex (gC) gCII, der sich aus dem gM und gN zusammensetzt, eine essentielle Rolle (Compton et al., 1993; Boyle und Compton, 1998; Kari und Gehrz, 1992). Glykoproteine können zudem an zelluläre Integrine binden (Isaacson et al., 2007). Eine Bindung an zelluläre Rezeptoren, wie beispielsweise an den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR), wird diskutiert (Wang et al., 2003). Nach der Adsorption fusioniert die virale Lipidmembran mit der Zellmembran der Wirtszelle (Navarro et al., 1993), dabei gelangt das Nukleokapsid mit den Tegumentkomponenten in das Zytoplasma der Wirtszelle (*penetration*) (Boehme und Compton, 2006). Bei dieser pH-unabhängigen Fusion scheinen das Glykoprotein gB sowie der Glykoproteinkomplex gCIII, aus gH, gL und gO, von Bedeutung zu sein (Feire et al., 2004; Huber und Compton, 1999; Li et al., 1997). Neuere Arbeiten konnten zeigen, dass bei der Infektion von Endothel- und Epithelzellen ein anderer Komplex, der aus den viralen Proteinen UL128, UL130 und UL131A sowie aus den Glykoproteinen gH und gL besteht, eine entscheidende Rolle spielt. Bei Endothel- und Epithelzellen erfolgt der hCMV-Eintritt nicht über Fusion an der Zellmembran sondern über Endozytose. Bei diesem Eintrittsweg ist der pentamere Komplex ein wichtiger Mediator (Wang und Shenk, 2005; Ryckman et al., 2008). Nach Entfernung des Teguments (*uncoating*) im Zytoplasma der Wirtszelle erfolgt die Translokation des Nukleokapsids zum Nukleus. Dabei wird vermutlich analog zu HSV-1 das Kapsid über einen Dynein-vermittelten, aktiven Transport entlang der Mikrotubuli zum Zellkern transportiert (Sodeik et al., 1997;

Diefenbach et al., 2002; Dohner und Sodeik, 2004). Das Nukleokapsid bindet dort an den Kernporenkomplex und das lineare CMV-Genom wird durch die Kernporen in das Nukleoplasma eingeschleust (Ogawa-Goto et al., 2003), wo es nach Fusion der Genomenden zu einem extrachromosomalen Episom zirkularisiert (Nixon und McVoy, 2002) und in einer *nucleosome-like-structure* vorliegt (Marks und Spector, 1988).

Die Genexpression der viralen DNA ist bei allen Vertretern der *Herpesviridae* kaskadenartig reguliert und erfolgt in drei Stufen. Dabei werden erst die Gene der *immediate-early* (IE)-, dann die der *early* (E)- und letztlich die der *late* (L)-Phase transkribiert (Hones und Roizman, 1974; Emery und Griffith, 1990; Mocarski et al., 2006). Die IE-Genexpression beginnt unmittelbar nach der Infektion. Während der initialen IE-Phase binden Transkriptionsfaktoren an den *major immediate-early* (MIE)- *promotor-enhancer* (MIEPE; hCMV) bzw. an den MIE-*promoter-enhancer-enhancer-promoter* (MIE-PEEP; mCMV; Kropp et al., 2009) und initiieren die Transkription der IE-Gene *ie1* und *ie2* (hCMV) bzw. *ie1*, *ie2* und *ie3* (mCMV). Die IE-Genprodukte steuern die koordinierte Expression der E-Gene (Keil et al., 1984; Bühler et al., 1990; Messerle et al., 1992). Die E-Phase beginnt bei mCMV ca. 2h nach Infektion, bei hCMV wird sie zwischen 4-24h nach Infektion definiert. Die Genprodukte der E-Phase, u.a. die virale DNA-Polymerase, sind für die Replikation des CMV-Genoms essentiell (Pellet und Roizman, 2006). Der Beginn der DNA-Replikation, ca. 16h (mCMV) bzw. 24-36h (hCMV) nach Infektion, definiert den Anfang der L-Phase, in der die viralen Strukturproteine synthetisiert werden (Mocarski et al., 2006). Während der DNA-Replikation, die nach dem Prinzip des *rolling circle* erfolgt, werden die viralen Genome als Konkatemere synthetisiert. Sie bleiben kovalent mit der Matrix-DNA verbunden und werden erst vor der Verpackung in die Nukleokapside in lineare Einzelgenome gespalten (Marks und Spector, 1988). Der Zusammenbau der Pro-Kapside leitet die Morphogenese der Virionen ein. Die mit einem vorläufigen Tegument umhüllten Nukleokapside (Gibson, 2006) knospen an der inneren Kernmembran, erhalten dabei eine von der inneren Kernmembran abstammende Hülle (*primary envelopment*) und gelangen in den perinukleären Raum. Die primäre Hüllmembran fusioniert hier mit der äußeren Kernmembran (*de-envelopment*), wodurch die unbehüllten Nukleokapside in das Zytoplasma der Wirtszelle gelangen, wo sie ihr endgültiges Tegument erhalten. Anschließend findet im trans-Golgi-Netzwerk eine zweite Reifungsknospe (*secondary envelopment*) statt. Hier werden die Virionen mit einer doppelten Hüllmembran versehen, wobei die äußere dieser beiden Membranen mit der Plasmamembran der Wirtszelle fusioniert und die reifen, einfach umhüllten Virionen in den extrazellulären Raum freigesetzt werden (Eickmann et al., 2006; Mettenleiter et al., 2006).

In Zellkultur werden von hCMV-infizierten Zellen neben infektiösen Virionen auch nicht-infektiöse umhüllte Partikel, die so genannten NIEPS (*non-infectious enveloped particles*), sowie Dense Bodies (DB) gebildet (Sarov und Abady, 1975; Irmieri und Gibson, 1983) und

in den Zellkulturüberstand freigesetzt. Diese Partikel, in denen kein virales Genom nachzuweisen ist (Mocarski und Courcelle, 2001; Streblow et al., 2006), besitzen eine dem Virion ähnelnde Hüllmembran, die integrierte virale Glykoproteine enthält, und sind entsprechend den Virionen fusionsaktiv. Die NIEPS enthalten keine virale DNA und gleichen in ihrer Proteinzusammensetzung sowie in ihrer Struktur den Virionen. Jedoch besitzen sie noch ein weiteres Protein, das *assembly* Protein. Die DB unterscheiden sich dagegen deutlich von den Virionen. Neben der nicht vorhandenen DNA besitzen sie zudem kein Kapsid und bestehen vorwiegend aus Glyko- sowie Tegumentproteinen, die von einer Hüllmembran umgeben sind (Varnum et al., 2004).

1.3 Immunologische Kontrolle der mCMV-Infektion

Die primäre CMV-Infektion wird im immunkompetenten Wirt von Komponenten des angeborenen (*innate immunity*) sowie des adaptiven Immunsystems (*adaptive immunity*) kontrolliert. Zu den Komponenten der angeborenen Immunantwort gehören u.a. Makrophagen, Dendritische Zellen (DC) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Die Effektorfunktionen der angeborenen Immunität gehen der einige Tage später einsetzenden Aktivierung der adaptiven Immunität voraus. Die CMV-Infektion wird innerhalb der ersten drei Tage und somit in der frühen Phase der Infektion primär durch NK-Zellen kontrolliert (Bukowski et al., 1985; Arase et al., 2002; Jonjic, et al., 2006).

Die **NK-Zellen** stellen mit einem Anteil von 5-20% der Gesamt-Blutlymphozyten die Haupteffektoren der angeborenen Immunität dar. Sie erkennen infizierte oder transformierte Zellen und stellen die primäre Abwehrlinie des Immunsystems dar. Die NK-Zellen vermitteln ihre antivirale Aktivität durch Sezernierung unterschiedlicher Zytokine, wie Interferon (IFN)- γ , Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α , sowie Chemokine und Interleukine (IL)-5, IL-10 und IL-13. Dadurch können sie das Wachstum sowie die Dissemination von Pathogenen als auch Tumoren kontrollieren. Zudem beeinflussen sie die Initiation sowie Aufrechterhaltung adaptiver Immunantworten und sind zur direkten Zytolyse von Zielzellen, die durch Exozytose von Perforin und Granzym (Tay et al., 1997; van Dommelen et al., 2003; Loh et al., 2005) oder durch Aktivierung apoptotischer Signalwege (Nagata, 1997; Smyth et al., 2003) vermittelt wird, fähig. In verschiedenen Studien mit NK-Zell-defizienten oder -depletierten mCMV-infizierten Mäusen konnte gezeigt werden, dass die NK-Zellen die Virusreplikation in verschiedenen Organen begrenzen (Bukowski et al., 1984; Welsh et al., 1991). Bukowski und Kollegen (1985) konnten zudem nachweisen, dass der Transfer von NK-Zellen sowohl neugeborene Mäuse mit nicht ausgereiftem Immunsystem als auch immunsupprimierte adulte Tiere vor einer mCMV-Erkrankung schützt (Bukowski et al., 1985). Eine Besonderheit der NK-Kontrolle der mCMV-Infektion stellt die genetisch determinierte

mCMV-Suszeptibilität von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen dar. Diese lässt sich auf das *CMV1*-Allel (*CMV1*) innerhalb des NK-Lokus zurückführen (Scalzo et al., 1990; Webb et al., 2002; Scalzo et al., 2008). Das dominante Allel kodiert in mCMV-resistenten C57BL/6-Mäusen für das Protein Ly49H. Ly49H ist ein aktivierender Rezeptor auf NK-Zellen, der durch Bindung an das Genprodukt des viralen ORF *m157* die Erkennung von mCMV-infizierten Zellen vermittelt (Arase et al., 2002; Smith et al., 2002; Babić et al., 2011). Die aktivierten NK-Zellen sezernieren IFN- γ und lysieren infizierte Zielzellen. Im Gegensatz zur BALB/c Maus, in denen *Ly49H* nicht exprimiert wird, ist die C57BL/6 Maus durch die Expression des Ly49H weniger anfällig gegenüber der mCMV-Infektion (Lee et al., 2001; 2003). Da allerdings die NK-Zellen die CMV-Infektion nicht dauerhaft kontrollieren können, ist die Ausbildung einer CMV-spezifischen CD8 T-Zell-Antwort des adaptiven Immunsystems für die Kontrolle der Infektion essentiell (Welsh et al., 1991).

Antivirale CD8 T-Zellen sind während der Kontrolle der akuten CMV-Infektion die Haupteffektoren und sind für die Terminierung der produktiven Infektion sowie für die langfristige Kontrolle der CMV-Infektion verantwortlich (Reddehase, 2002; Holtappels et al., 2006). Die zelluläre Immunantwort ist ab etwa zwei Tagen nach Infektion nachzuweisen und erreicht an Tag zehn ihr Maximum (Böhm et al., 2008).

CD8 T-Zellen werden durch die Erkennung antigener Peptide, die über MHC-Klasse-I Moleküle auf der Oberfläche infizierter oder transformierter Zellen präsentiert werden, aktiviert. Die antigenen Peptide sind Produkte der zellulären Protein-Degradation, wobei für die meisten zytoplasmatischen Proteine die Degradation über den Ubiquitin-Proteasom-Weg erfolgt (Goldberg et al., 2003; Cresswell et al., 2005). Das Proteasom ist ein multikatalytischer Proteasekomplex, der in ubiquitinylierten Proteinen die Hydrolyse nach großen hydrophoben, basischen oder sauren Aminosäureresten katalysiert (Rock und Goldberg, 1999; Kloetzel, 2001; Rock et al., 2002). Eine modifizierte Form des Proteasoms ist das Immunoproteasom, das in lymphatischen Geweben oder in Gewebezellen exprimiert wird. In diesem sind die drei aktiven Zentren der β -Untereinheit durch alternative, IFN- γ induzierbare Untereinheiten ersetzt. Durch die unterschiedliche proteolytische Aktivität beider Proteasom-Spezies erhöht sich die Diversität der generierten Peptide (Kloetzel, 2004). Die generierten Peptide besitzen eine Länge von 3-20 Aminosäuren (AS), werden durch zytosolische Peptidasen weiter prozessiert (*trimming*) (Rock et al., 2004; Saveanu et al., 2005a) und über den TAP (*transporter associated with antigen processing*) in das ER transportiert. Dort werden die Polypeptidketten durch ER-Aminopeptidasen (ERAP) wie ERAP-1 und ERAP-2 (human, Saric et al., 2002; Saveanu et al., 2005a,b; Haroon und Inman, 2010) oder durch ERAAP (*ER aminopeptidase associated with antigen processing*) (murin, Serwold et al., 2002; Hammer et al., 2006) weiter *getrimmt* und Peptide mit einer Länge von 8-10 AS (Rammensee et al., 1993) auf MHC-Klasse-I Moleküle geladen. Dieser

MHC-Klasse-I-Peptid-Komplex wird über den sekretorischen Transportweg zur Zelloberfläche transportiert und kann dort von CD8 T-Zellen erkannt werden (Rock et al., 2004).

Neben den in der Zelle vorhandenen Antigenen können auch Peptide extrazellulärer Antigene über den MHC-Klasse-I-Weg präsentiert werden. Dieses Phänomen wird als *Cross-Präsentation* bezeichnet (Cresswell et al., 2005). Die extrazellulären Antigene werden mittels Endozytose oder Phagozytose von der Zelle aufgenommen, im Zytosol proteasomal prozessiert, in den Antigenpräsentationsweg eingebracht und in Assoziation mit MHC-Klasse-I Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert (Rock and Shen, 2005; Raghavan et al., 2008). Die durch *Cross-Präsentation* initiierte Aktivierung von CD8 T-Zellen wird als *Cross-Priming* bezeichnet (Shen und Rock, 2006; Basta und Alatery, 2007). Bei der Initiierung der T-Zell Antwort wird durch Migration von DC aus der Peripherie Antigen in der T-Zell Zone der sekundären lymphoiden Organe angereichert (von Adrian et al., 2000). Da die Anzahl an Antigen-tragenden DC relativ gering ist, erhöht dieser Prozess die Wahrscheinlichkeit, dass die entsprechenden spezifischen naiven T-Zellen, die ebenfalls rar vorkommenden, mit den DC interagieren können. Darüberhinaus produzieren aktivierte DC Chemokine, die naive CD8 T-Zellen zu den Antigen-präsentierenden DC rekrutieren (Castellino et al., 2006; Semmling et al., 2010). Die spezifische Aktivierung von T-Zellen erfolgt durch Interaktion ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) mit dem Peptid-MHC-Komplex und benötigt außerdem die Interaktion kostimulierender Moleküle mit Liganden der Antigen-präsentierenden Zelle (APC) (Rudolph et al., 2006). Die vollständige Aktivierung der CD8 T-Zell-Effektorfunktionen kann bereits wenige Stunden nach Antigen-Kontakt beobachtet werden (Norbury et al., 2002; Prlc et al., 2006). Aufgrund der Aktivierung kommt es zur Proliferation der aktivierten CD8 T-Zellen (klonale Expansion). Zeitgleich erfolgt die Bildung von *Memory-T-Zellen*, die als sogenannte Gedächtniszellen im Organismus verbleiben und bei erneutem Antigenkontakt wieder aktiviert werden können (Stemberger et al., 2007a; b; Wiesel, 2009). Die aktivierten CD8 T-Zellen verlassen den LK, den Ort der primären Aktivierung, über die efferenten Lymphgefäße, zirkulieren durch den Körper und infiltrieren entlang chemotaktischer Gradienten infiziertes Gewebe.

Unter den CD8 T-Zellen existieren Zellen mit unterschiedlichem Phänotyp. So konnten Hamann (1997) und Sallusto (1999) zwei Phänotypen von Memory T-Zellen identifizieren, die sogenannten *effector memory t-cells* (T_{EM}) und die *central memory t-cells* (T_{CM}). $CD8^+ T_{EM}$ sind unter anderem durch einen $KLRG1^{low}$, $CD62L^{low}$, $CD127^{high}$ und $CD44^{high}$, $CD8^+ T_{CM}$ durch einen $KLRG1^{low}$, $CD62L^{high}$, $CD127^{high}$ und $CD44^{high}$ gekennzeichnet. Während die T_{CM} vorzugsweise in sekundären Organen wie im LK oder in der Milz lokalisiert sind, werden die T_{EM} primär im peripheren Gewebe, wie in der Lunge, der Leber und den Gedärmen vorgefunden. Um die Heterogenität innerhalb der Effektor CD8 T-Zell Population zu erklären

haben Obar und Kollegen (2010a) ein *early fate model* vorgeschlagen. In diesem resultiert die Aktivierung von CD8 T-Zellen in der Bildung einer *early effector cell* (EEC) Population, die sich zu short lived effector cells (SLEC), T_{CM}-Vorläufer und T_{EM}-Vorläufern differenziert. Für diese Differenzierung scheinen die Signale, die während der T-Zell-Aktivierung und der frühen Expansionsphase entstehen, entscheidend zu sein (Obar et al., 2010c). Zu ihnen gehören TCR-vermittelte Signale, Ko-Stimulation und/oder inflammatorische Zytokine (Mescher et al., 2007). Beispielsweise reguliert der CD28 und CD27 Weg die IL-2 Produktion (Peperzak et al., 2010; Shahinian et al., 1993), die für die Regulation der Differenzierung der SLEC wichtig zu sein scheint (Kalia et al., 2010; Ober et al., 2010b; Pipkin et al., 2010).

Zu den Effektorfunktionen von CD8 T-Zellen gehören die direkte zytolytische Aktivität (Doherty, 1993) sowie die Sezernierung von Zytokinen (u.a. IFN- γ , TNF- α) und Chemokinen (Harty et al., 2000). Die essentielle Bedeutung der zytotoxischen T-Lymphozythen (CTL)-vermittelten Kontrolle der mCMV-Infektion ist vielfach belegt (Reddehase et al., 1985; 1987; Steffens et al., 1998; Holtappels et al., 2006). Sowohl im klinischen Modell der experimentellen, syngenen (Holtappels et al., 1998; Podlech et al., 1998; 2000) als auch der allogenen (Alterio de Goss et al., 1998) Knochenmarktransplantation (KMT) konnte gezeigt werden, dass die Rekonstitution der CD8 T-Zell-Antwort die akute Infektion terminiert und den Ausbruch der mCMV-Erkrankung verhindert. Die protektive Wirkung von CD8 T-Zellen konnte in adoptiven Transfer (AT)-Modellen bestätigt werden. So konnte gezeigt werden, dass sowohl ein präemptiver als auch ein therapeutischer AT von CD8 T-Zellen in immunsupprimierten, mCMV-infizierten BALB/c-Mäusen Schutz vermittelt (Reddehase et al., 1985). In klinischen Studien konnte des Weiteren eine Korrelation zwischen der Kontrolle der hCMV-Infektion nach KMT und der Rekonstitution antiviraler CD8 T-Zellen festgestellt werden (Reusser et al., 1991). Demzufolge lässt sich die Inzidenz der CMV-Erkrankung nach KMT durch den AT virusspezifischer CTL-Linien (CTLL) reduzieren (Ridell et al., 1992; Walter et al., 1995; Cobbold et al., 2005).

Neben CD8 T-Zellen stellen CD4 T-Zellen, die für die Kontrolle der mCMV-Infektion in der Speicheldrüse eine wichtige Rolle spielen (Jonjic et al., 1989; 1990), und die von B-Zellen sezernierten antigenspezifischen Antikörper (AK) weitere Komponenten der adaptiven Immunantwort dar. Virusspezifische AK spielen für die Kontrolle der primären CMV-Infektion nur eine untergeordnete Rolle, allerdings wird durch sie die Virus-Dissemination nach Reaktivierung reduziert sowie der Schutz vor Sekundärinfektion vermittelt (Jonjic et al., 1994; Reddehase et al., 1994; Mach, 2006; Klenovsek et al., 2007; Wirtz et al., 2008).

1.4 Medizinische Aspekte der hCMV-Infektion

1.4.1 Epidemiologie

hCMV ist ein ubiquitär verbreitetes, fakultativ-pathogenes Virus, dessen Inzidenz abhängig vom Lebensalter und von sozioökonomischen Faktoren ist. Während die Durchseuchung in Entwicklungsländern bis zu 100% beträgt, sind in den Industrieländern etwa 50% der Bevölkerung mit hCMV infiziert (Mocarski et al., 2006; Ho, 2008). Die Übertragung von CMV kann sowohl horizontal als auch vertikal erfolgen, wobei in den meisten Fällen die **horizontale Übertragung** durch Tröpfchen- oder Schmierinfektion erfolgt. Infektiöses Virus wird über Urin, Speichel, Genitalsekrete, Tränenflüssigkeit sowie Muttermilch abgegeben (Reddehase, 2002; Mocarski et al., 2006). Zudem kann eine horizontale Übertragung durch kontaminierte Bluttransfusionen oder durch die Transplantation von Organen, Geweben sowie Knochenmark (KM) seropositiver Spender erfolgen. Die **vertikale Übertragung** kann während der Schwangerschaft diaplazentar sowie perinatal erfolgen (Reddehase, 2002; Mocarski et al., 2006).

1.4.2 Symptomatik im immunkompetenten Patienten

Die Primär- oder Sekundärinfektion **immunkompetenter** Personen verläuft meistens klinisch inapparent. Auch die Reaktivierung von CMV ist meist asymptomatisch. Gelegentlich ist eine Mononukleose-ähnliche Symptomatik wie Fieber und Müdigkeit zu beobachten (Jordan et al., 1973; Klemola et al., 1970; Cohen und Corey, 1985). Nach der Primärinfektion wird trotz effizienter Immunkontrolle lebenslange Latenz etabliert (Roizman und Baines, 1991). Während der **Latenz** ist kein infektiöses Virus mehr nachweisbar, jedoch sind weiterhin virale Genome detektierbar (Reddehase, 2002). Diese Phase kann jedoch durch sporadische **Reaktivierung** unterbrochen werden. Eine **Rekurrenz** bezeichnet eine Reaktivierung des viralen Genoms hin zur produktiven Infektion. In den meisten Fällen verläuft sie asymptomatisch, wobei allerdings Viren im Urin und Speichel nachweisbar sind (Meyers et al., 1990), sie spielt aber bei der Übertragung von Mensch zu Mensch eine entscheidende Rolle (Reddehase et al., 1994; 2002).

1.4.3 Symptomatik im immunsupprimierten Patienten

Von besonderer klinischer Relevanz ist eine CMV-Infektion **immunsupprimierter oder immunologisch unreifer Patienten**. Hierbei kann die Infektion zu schweren klinischen

Manifestationen führen (Reddehase, 2002). Es lassen sich drei Risikogruppen unterscheiden:

Eine Risikogruppe sind **kongenital infizierte Embryonen sowie Föten**, die nach primärer Infektion der Mutter infiziert wurden. Die Inzidenz einer kongenitalen hCMV-Infektion beträgt etwa 0,2-0,3% aller Schwangerschaften (Boppana et al., 1992). Die durch eine kongenitale Infektion hervorgerufene Symptomatik der CMV-Erkrankung wird als *cytomegalic inclusion disease* (CID) bezeichnet. Die CID kann asymptomatisch (90%) oder symptomatisch (10%) verlaufen, wobei 10% der symptomatischen Infektionen zum Tod des Neugeborenen führen (Boppana et al., 1992; Reddehase, 2002). Häufige CMV-Manifestationen sind Pneumonie, Hepatitis, Retinitis sowie Enteritiden. Bei schweren Verlaufsformen kann zudem das Zentrale Nervensystem (ZNS) geschädigt werden und zu mentaler Retardation, zerebraler Hypoplasie, Taubheit sowie Augenanomalien führen (Reddehase, 2002; Mocarski, 2006). Eine rekurrente Infektion der Mutter führt im Gegensatz zur Primärinfektion seltener zu schweren Schädigungen des Ungeborenen, da aufgrund vorhandener maternalen, neutralisierender AK die Dissemination von CMV deutlich erschwert ist (Stagno et al., 1982; Whitley, 2004).

Eine weitere Risikogruppe stellen Patienten mit **angeborener** (*severe combined immunodeficiency*, SCID) oder **erworbener Immundefizienz** (*acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS) dar. Bei dieser Risikogruppe kann eine Primärinfektion, eine Reinfektion oder eine Rekurrenz zur schweren CMV-Erkrankung führen. Bei HIV-Patienten ist das hCMV der häufigste opportunistische Krankheitserreger (Masur et al., 1996). Die häufigste Form der CMV-Manifestation stellt die Retinitis (Masur et al., 1996) dar. Auch können Infektionen des Gastrointestinaltrakts, der Lunge, der Leber sowie des ZNS beobachtet werden (Moskowitz et al., 1985; René et al., 1988; Drew, 1992).

Die letzte Risikogruppe bilden Patienten, die therapiebedingt eine **immunsuppressive Behandlung** erhalten haben (Dowling et al., 1976; Neimann et al., 1977; Singh et al., 1988; Britt, 2006). Zu dieser Gruppe gehören Empfänger von hämatopoetischen Stammzellen (HSC), Empfänger von Organtransplantaten sowie Krebspatienten. Eine Primärinfektion eines hCMV-seronegativen Empfängers durch ein hCMV-seropositives Organ bzw. KM kann zu schweren klinischen Manifestationen wie Pneumonie, Hepatitis oder Retinitis (Reinke et al., 1999; Mocarski et al., 2006) führen. Das Risiko einer symptomatischen Infektion ist vom CMV-Serostatus des Transplantat-Empfängers sowie des -Spenders abhängig. Während die Reaktivierungswahrscheinlichkeit nach allogener HSC-Transplantation (HSCT) bei hCMV-seropositivem Empfänger und hCMV-seronegativem bzw. hCMV-seropositivem Spender etwa 13% beträgt, liegt das Risiko einer Reaktivierung bei hCMV-seronegativem Empfänger und hCMV-seropositivem Spender lediglich bei 5% (Ljungman et al., 1998).

1.5 Antivirale Therapie

Zur medikamentösen Therapie gegen hCMV-Infektionen stehen derzeit fünf zugelassene Wirkstoffe zur Verfügung. Diese antiviralen Substanzen werden auch als Virostatika bezeichnet und werden zur Prophylaxe und/oder Therapie eingesetzt. Zu ihnen gehören Ganciclovir (GCV), Valganciclovir (ValGCV), Cidofovir (CDV), Foscarnet (FOS) sowie Fomivirsin. Diese Medikamente sind nur eingeschränkt wirksam und eine Therapie trägt erhebliche Nebenwirkungen mit sich (Steininger, 2007).

GCV und dessen Derivat **ValGCV** werden als Standardmedikament zur Therapie der hCMV-Erkrankung eingesetzt. Beide Stoffe sind Nukleosidanaloga und inhibieren die virale DNA-Synthese. Sie werden von der viralen Proteinkinase pUL97 phosphoryliert und in der phosphorylierten Form von der DNA-Polymerase eingebaut. Dies führt zum Abbruch der DNA-Synthese und somit zur Reduzierung der Virusreplikation (Sullivan et al., 1992; Michel und Mertens, 2006). Ein weiteres häufig eingesetztes Medikament ist das **CDV**, das ebenfalls die DNA-Polymerase hemmt. Es ist wie GCV ein Nukleosidanalogon, ist jedoch bereits phosphoryliert und kann somit direkt eingebaut werden (Kendle und Fan-Havard, 1998; Plosker und Noble, 1999). Im Gegensatz dazu ist **FOS** ein Analogon des Pyrophosphats (Meyer et al., 2007). Es bindet direkt an die Pyrophosphat-Bindestellen in pUL54, einer katalytischen Untereinheit der hCMV-DNA-Polymerase. Hierdurch werden diese Bindestellen blockiert und die DNA-Synthese inhibiert (Crumpacker, 1992; Oberg et al., 1982; 1989). **Fomivirsin** ist ein 21mer Phosphorothioat-Oligonukleotid, (Mulamba et al., 1998) mit einer komplementären mRNA-Sequenz der MIE transkriptionellen Einheit des hCMV. Durch die Bindung der *Antisense*-RNA an die virale mRNA wird die Translation gehemmt und damit die Expression der IE-Produkte verhindert (Anderson et al., 1996; Perry und Balfour, 1999).

Durch die antivirale Prophylaxe konnte die Inzidenz der hCMV-Erkrankung in Transplantatempfängern wesentlich verringert werden (Singh, 2006a; b; Gane et al., 1997; Paya et al., 2004). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass die antivirale Therapie nachweislich einer hCMV-Erkrankung bei Transplantations- (Saleh et al., 2010) sowie AIDS-Patienten (Tun et al., 2011) entgegenwirkt, die Inzidenz einer hCMV-Erkrankung sowie einer Allograft-Abstoßung (*Allograft-rejection*) vermindert und die Überlebensrate des Patienten erhöht (Eid und Razonable, 2010). Während die antivirale Therapie bei Erwachsenen bereits in der klinischen Routine angewendet wird, steht bislang keine zugelassene Indikation der Virostatika gegen CMV-Infektionen bei Neugeborenen oder Kindern zur Verfügung (Marshall und Koch, 2009). Auch haben Studien gezeigt, dass eine antivirale Therapie keinen Einfluss auf den Verlauf einer kongenitalen hCMV-Erkrankung hat (Sharland et al., 2011).

Die derzeitigen für antivirale Therapien zugelassenen Virostatika zeigen erhebliche Nebenwirkungen (Berger et al., 2011) wie Nephro- und Myeotoxizität sowie gastrointestinale

Beschwerden (Hauptmeier und Rohde, 2010). Die Entwicklung neuer Medikamente zur antiviralen Therapie steht daher im Vordergrund der Forschung. Ein neuerer Wirkstoff ist 1263W94, das auch unter dem Namen **Maribavir** bekannt ist und zur Gruppe der Benzimidazole gehört. Maribavir inhibiert das Protein-Kinase-Enzym pUL97 und damit die hCMV-Replikation (Biron et al., 2002). Während klinische Studien der Phase-I und -II bereits vielversprechende therapeutische Ansätze aufzeigten, konnten bislang in Phase-III Studien keine Erfolge verzeichnet werden (ViroPharma, 2009; Marty et al., 2011; Snyderman, 2011).

Eine weitere Gruppe von Virostatika zur antiviralen Therapie stellen **Artesunate** dar. Sie sind halb-synthetische Arzneimittel und wurden bereits zur Behandlung von Malaria eingesetzt (Boulangier et al., 2007). Artesunate sind in der Lage die virale Replikation von Mitgliedern der *Herpesviridae* zu inhibieren (Milbrandt et al., 2009).

Helikase-Primase-Inhibitoren (HPI) stellen eine weitere Alternative bei der antiviralen Therapie dar. Sie wurden bereits in präklinischen Studien gegen HSV-Erkrankungen untersucht (Crute et al., 2002; Kleymann et al., 2002). Bevor die HSV-DNA-Polymerase fungieren kann, muss das doppelsträngige HSV-DNA-Genom aufgewunden und die Synthese induziert werden. Diese beiden Funktionen werden von einem Komplex ausgeführt, der bei HSV aus den Produkten des UL5 (Helikase), UL52 (Primase) sowie des UL8 (akzessorisches Protein) besteht (Matthews et al., 1993). Die beiden Thiazolylphenyl-Derivate BILS 179BS und BAY 57-1293, die zu den HPI gehören, zeigten in Tiermodellen mit HSV-1- und HSV-2-Infektionen eine bemerkenswerte Effektivität auf (Crute et al., 2002; Kleymann et al., 2002). AIC316 ist ein weiterer HPI, dessen Sicherheit sowie hohe Verträglichkeit bereits in klinischen Studien bestätigt wurde. Ungeachtet der Effektivität der HPI stellt die mögliche Mutation des Virus-Genoms und somit die Resistenzbildung eine deutliche Limitation der Anwendbarkeit dar. Eine Kombination aus verschiedenen HPI und Nucleosidanaloga wäre eine Möglichkeit, dieser Therapie-Ansatz ist jedoch noch Gegenstand der Diskussion (Field und Biswas, 2011).

1.6 Adoptive Immuntherapie

Zur Therapie hämatopoetischer Neoplasien wird neben der medikamentösen Behandlung die allogene HSCT angewendet. Nach HSCT können opportunistische Infektionen wie die Reaktivierung des latenten hCMV den Patienten bedrohen und zu schweren klinischen Manifestationen (Herbart und Einsele, 2004) führen. Eine weitere Komplikation nach HSCT stellt die *graft versus host disease* (GvHD) dar. Zur Verringerung des GvHD-Risikos werden T-Lymphozyten aus dem Transplantat des Spenders depletiert, jedoch erhöht dieses Verfahren die CMV bedingte Mortalität sowie Morbidität (Craddock et al., 2001). Die derzeitigen verfügbaren Virostatika zur antiviralen Therapie sind aufgrund der erheblichen

Nebenwirkungen (Hauptmeier und Rohde, 2010; Berger et al., 2011), ihrer begrenzten Wirksamkeit sowie des Resistenzrisikos (Erice, 1999; Chou, 2001) nur unzureichend geeignet den hCMV-bedingten Komplikationen der HSCT entgegen zu wirken.

Ein weiterer Ansatz zur Therapie einer hCMV-Erkrankung im HSCT-Patienten stellt die **adoptive Immuntherapie** dar. Diese basiert auf der Beobachtung, dass Patienten, die eine schnelle Immunrekonstitution aufweisen, ein deutlich geringeres Risiko hCMV-Erkrankungen zu entwickeln besitzen (Reusser et al., 1991; Einsele et al., 1993). Steffens und Kollegen (1998) konnten zeigen, dass eine präemptive CD8 T-Zell Therapie nach HSCT und experimenteller mCMV-Infektion die letale CMV-Erkrankung verhindert, die latente mCMV-Genomlast reduziert und das Rezidivrisiko deutlich senkt. Es konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Reaktivierung des latenten mCMV durch vorhandene epitopspezifische CD8 T-Zellen verhindert werden kann (Simon et al., 2006). Aufgrund der Erkenntnis, dass eine fehlende Rekonstitution virusspezifischer CD8 T-Zellen im HSCT-Patienten mit der Intensität der hCMV-Erkrankung korreliert (Einsele et al., 1993; Ksouri et al., 2007), wurden Verfahren zur Verbesserung der Rekonstitution einer CMV-spezifischen Immunabwehr nach HSCT durch AT virusspezifischer CD8 T-Zellen entwickelt (Reddehase et al., 1987; Riddell et al., 1992; Holtappels et al., 2006; 2008). Diese Strategien eignen sich dazu, die akute CMV-Infektion zu behandeln, die Rekonstitution zu beschleunigen sowie die Frequenz der viralen Rezidiv zu vermindern (Leen und Heslop, 2008; Peggs et al., 2009). Klinische Studien haben bereits gezeigt, dass prophylaktisch transferierte antivirale T-Zelllinien, die von verwandten Spendern isoliert und *in vitro* expandiert worden waren, die hCMV-Erkrankung sowie -Reaktivierung bei KMT-Patienten verhindern konnten (Riddell et al., 1992; Walter et al., 1995; Peggs et al., 2003). Aufgrund der hohen benötigten Zellzahl an hCMV-spezifischen CD8 T-Zellen (Therapie: 1×10^7 T-Zellen/m² Körperoberfläche (Einsele et al., 2002; Prophylaxe: 1×10^9 T-Zellen/m² Körperoberfläche (Walter et al., 1995), des hohen Aufwandes ihrer Herstellung und der möglichen Induktion von GvHD sind diese Verfahren bislang nicht Bestandteil der klinischen Routine. Es ist deshalb notwendig die adoptive Immuntherapie für die klinische Anwendung zu optimieren.

Eine Möglichkeit zeigten Pahl-Seibert und Kollegen (2005). Sie konnten im Mausmodell nachweisen, dass mittels MHC-Multimere angereicherte virusspezifische *Memory* CD8 T-Zellen eine höhere Wirksamkeit aufweisen als T-Zelllinien. Dieses konnte auch in klinischen Studien bestätigt werden (Cobbold et al., 2005). Zudem kann durch epitopspezifische Zellsortierung das GvHD-Risiko reduziert werden. Ungeachtet der potentiellen Wirksamkeit wurde dieses Verfahren als Prophylaxe bei HSCT-Empfängern bislang noch nicht angewendet, da die begrenzte Verfügbarkeit von *good manufacturing practice* (GMP)-gerecht produzierten MHC Klasse-I Multimeren ein Problem darstellt.

Ein weiteres Verfahren zur Gewinnung der für den AT benötigten polyklonalen, virusspezifischen T-Lymphozyten könnte der „*IFN- γ cytokine secretion assay*“ sein, der auf der Sekretion des IFN- γ Zytokins durch aktivierte T-Zellen basiert (Becker et al., 2001; Feuchtinger et al., 2006; Leen et al., 2010). Therapeutische Studien, die sich u.a. mit der EBV-assoziierten Lymphoproliferation, die nach HSCT oder nach Organtransplantation erfolgen kann, befassten, konnten die klinische Wirksamkeit der auf diese Weise isolierten T-Zellen aufzeigen (Moosman et al., 2010; Shaffer et al., 2010). Ein limitierender Faktor dieser Strategie ist die geringe Anzahl virusspezifischer T-Zellen im peripheren Blut (Shaffer et al., 2010) und damit die benötigte große Menge an Blut, die im Rahmen einer Fremdspende nicht garantiert werden kann (Leen und Heslop, 2008).

Neben der Optimierung der Herstellung hCMV spezifischer T-Lymphozyten, spielt die Auswahl der Epitopspezifitäten bei der adoptiven Immuntherapie eine wichtige Rolle. Holtappels und Kollegen (2004) konnten im Mausmodell zeigen, dass die Stärke der Immunantwort epitopspezifischer CD8 T-Zellen gegen ein bestimmtes mCMV-Epitop nach „*Cross-Priming*“ durch APC, keinen Rückschluss auf ihre protektive Wirkung in den für die CMV-Pathogenität relevanten Organen gibt. Grundsätzlich kann ein immundominantes Epitop Schutz vermitteln. Es ist jedoch ein immundominantes Epitop (M45-D^b) bekannt das in der Schutzfunktion versagt (Holtappels et al., 2004). Ebenso konnte für subdominante Epitope gezeigt werden, dass diese nach AT von CD8 T-Zellen mit entsprechender Epitopspezifität Schutz vermitteln (Holtappels et al., 2008b). Die Schutzfunktion einer mCMV-spezifischen T-Zelllinie mit immundominanter Spezifität konnte bereits in frühen Arbeiten im murinen Modell bewiesen werden (Reddehase und Koszinowski, 1984; Reddehase et al., 1987; Del-Val et al., 1991). In einer neueren klinischen Studie konnten nach allogener HSCT in Patienten hCMV-spezifische IFN- γ -positive T-Lymphozyten identifiziert werden, die zum einen die hCMV-Replikation kontrollieren und zum anderen gegen hCMV schützen können (Sacre et al., 2008).

Eine mögliche Strategie zur Optimierung des adoptiven Transfers hCMV-spezifischer T-Lymphozyten sowie zur Verbesserung der Rekonstitution antiviraler Immunität nach HSCT stellt die Verwendung einer hCMV-Vakzine dar (Schleiss und Heineman, 2005; Schleiss, 2008; Herr und Plachter, 2009; Sung und Schleiss, 2010).

1.7 Dense Bodies als ein potentieller hCMV-Vakzine-Kandidat

Im Rahmen der HSCT ist die Konstellation hCMV-seronegativer Spender und hCMV-seropositiver Empfänger mit einem hohen Erkrankungsrisiko verbunden. In dieser Konstellation könnte eine Vakzinierung des Spenders vor einer HSCT die Induktion einer hCMV-spezifischen Immunantwort ermöglichen, die mit der HSCT übertragen werden

könnte. Dieser Ansatz ist jedoch aus ethischer Sicht eher kritisch zu betrachten. Eine Alternative wäre hingegen die Vakzinierung des HSCT-Empfängers, die zur *in vivo* Expansion der adoptiv transferierten T-Lymphozyten führen könnte. Bisher sind hierzu jedoch keinerlei Studien publiziert worden.

Die Entwicklung einer hCMV-Vakzine, die auf subviralen DB basiert, stellt eine Alternative der hCMV-Impfstoffentwicklung dar (Pepperl-Klindworth und Plachter, 2006; Mersseman 2008 a; b; Becke et al., 2010). Eine Funktion der DB ist bislang nicht bekannt. Sie entstehen in Zellkultur während der Replikation von hCMV, werden in großer Anzahl in den Zellkulturüberstand freigesetzt und können mittels Ultrazentrifugation aufgereinigt werden (Craighead et al., 1972; Irmieri und Gibson, 1983). DB enthalten wichtige Zielantigene der humoralen sowie zellulären Immunantwort gegen hCMV (Pepperl et al., 2000; Pepperl-Klindworth et al., 2002) und sind in der Lage diese effizient über Membranfusion in APC einzuschleusen (Pepperl et al., 2000; Pepperl-Klindworth et al., 2002; 2003). Analysen der Zusammensetzung haben gezeigt, dass überwiegend Tegumentproteine in DB enthalten sind und von diesen das pp65 mit 60% den Hauptbestandteil bildet (Varnum et al., 2004). Zudem konnten virale Glykoproteine wie gB, gM und gN identifiziert werden. Diese sind für die Induktion einer neutralisierenden AK-Antwort verantwortlich. *In vivo* Studien haben gezeigt, dass eine Immunisierung von HLA-A2 transgenen Mäusen zur Bildung von neutralisierenden AK und zur Induktion einer deutlichen CD8 T-Zell-Antwort führt (Pepperl et al., 2000). In einer weiteren Studie mit rekombinanten DB, die ein Fusionsprotein von pp65 und IE1 (pp65-IE1) beinhalten, konnte nachgewiesen werden, dass in HLA-A2 transgenen Mäusen auch eine CD8 T-Zell-Antwort gegen nicht-Strukturproteine durch DB-Immunisierung induziert werden kann (Mersseman et al., 2008a; b). Das IE1 Peptid wird in Zielzellen erfolgreich aus dem Fusionsprotein prozessiert und über HLA-A2 präsentiert. Aufgrund dieser Erkenntnisse stellen DB eine vielversprechende und praktikable Möglichkeit zur Entwicklung einer rekombinanten hCMV-Vakzine zur *in vivo* Expansion von adoptiv transferierten T-Lymphozyten im Rahmen der HSCT dar.

1.8 Die mCMV-Infektion als Modellsystem für die hCMV-Infektion

Aufgrund der strikten Speziespezifität aller CMV kann die hCMV-Infektion nicht in einem Tiermodell studiert werden. Da sich allerdings mCMV und hCMV in vielen strukturellen, biologischen und genetischen Eigenschaften ähneln, lassen sich viele Erkenntnisse der mCMV-Infektion der Maus auf die hCMV-Infektion des Menschen übertragen (Rawlinson et al., 1996; Reddehase, 2002; Holtappels et al., 2006). Zusätzlich ist der Verlauf der mCMV-Infektion und die virale Pathogenese in vielen Grundzügen mit der hCMV-Infektion vergleichbar (Mocarski und Courcelle, 2001; Barry et al., 2000; Podlech et al., 2000). Im Gegensatz zu hCMV wird mCMV aber nicht diaplazentar übertragen. Viele klinische sowie

histopathologische Parameter der Infektion neonataler Mäuse entsprechen allerdings der kongenitalen hCMV-Infektion (Fitzgerald et al., 1990; Bantug et al., 2008). Nach der Terminierung der Primärinfektion etablieren beide CMV-Spezies lebenslange Latenz (Balthesen et al., 1993; Reddehase et al., 1994; 2002; Krmpotić et al., 2003; Mocarski et al., 2006). Zudem wird die Immunkontrolle nach Infektion mit beiden CMV-Spezies primär durch CD8 T-Zellen vermittelt und erfolgt mit vergleichbarer Kinetik (Reddehase, 2002; Holtappels et al., 2006).

Die mCMV-Infektion der Maus hat sich als effizientes Modellsystem für die hCMV-Infektion erwiesen. Das in unserer Arbeitsgruppe etablierte Modell der experimentellen KMT mit anschließender Infektion stellt ein kliniknahes Modellsystem dar, das wichtige Erkenntnisse zur viralen Latenz, der Pathogenese der CMV-Infektion unter Immunsuppression sowie des Beitrags unterschiedlicher Effektorzell-Populationen der Immunkontrolle der CMV-Infektion liefern konnte (Holtappels et al., 2006; Simon et al., 2006). Zudem konnten durch die experimentelle Zytoimmuntherapie (adoptive Immuntherapie) im Mausmodell wichtige Erkenntnisse gewonnen werden, die für die Entwicklung klinischer zytoimmuntherapeutischer Anwendungen von hCMV-infizierten HSCT-Patienten von grundlegender Bedeutung sind (Reddehase et al., 1987; Riddell et al., 1992; Walter et al., 1995; Einsele und Hamprecht, 2003; Cobbold et al., 2005; Holtappels et al., 2008).

1.9 SIINFEKL als Modellantigen für AT, Vakzinierung und Kontrolle der CMV-Infektion

Das „Modellpeptid“ OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) ist ein MHC-Klasse-I (K^b)-präsentiertes, immundominantes, antigenes Peptid des Ovalbumins (OVA) (Rötzschke et al., 1991). OVA ist ein 42kDa großes Protein des Hühnereiweißes und gehört zu der Gruppe der Serpine (Serinproteaseinhibitoren) (Nisbet et al., 1981). Das in der Literatur ausführlich beschriebene Peptid SIINFEKL ist ein viel bearbeitetes Modellpeptid in der Immunologie (Rötzschke et al., 1991; Sigal et al., 1999), so dass neben bereits vorhandenen Erkenntnissen über die SIINFEKL-Prozessierung sowie -Präsentation einige Nachweissysteme für das SIINFEKL-Modell-System zur Verfügung stehen.

Die zytofluorometrische Quantifizierung des auf der Zelloberfläche präsentierten SIINFEKL-Peptids wird durch den monoklonalen AK T-AG 25-D1.16, der spezifisch den K^b-SIINFEKL Präsentationskomplex erkennt, ermöglicht (Porgador et al., 1997). Solche AK, die einen spezifischen Peptid-MHC-Komplex erkennen, sind generell sehr schwer zu gewinnen und stehen für intrinsische CMV-Peptide derzeit nicht zur Verfügung.

Mit der OT-I Maus steht eine transgene Maus zur Verfügung, deren CD8 T-Zellen einen klonalen K^b-SIINFEKL spezifischen TCR exprimieren, der die variablen Ketten V α 2 und V β 5

besitzt (Hogquist et al., 1994). Diese SIINFEKL-spezifischen CD8 T-Zellen (OT-I Zellen) lassen sich ohne großen Aufwand aus der OT-I Maus isolieren und können in adoptiven Transferexperimenten verwendet werden.

Passend zur K^b -Restriktion des SIINFEKL-Peptids wurden für die Versuche Tiere des murinen Inzuchtstamms C57BL/6 des Haplotyps H-2^b (MHC-Klasse-I-Moleküle K^b sowie D^b) verwendet, deren CD8 T-Zell-Antwort gegen mCMV gut charakterisiert ist (Munks et al., 2006b). Des Weiteren wurden bereits identifizierte CD8 Epitope auf ihren Beitrag zur antiviralen Protektion nach AT und akuten Immunantwort sowie Memory hin untersucht (Holtappels et al., 2004; 2006).

Für die Verwendung des SIINFEKL-Modell-Systems werden rekombinante mCMV benötigt, die das SIINFEKL in immunologisch funktioneller Weise exprimieren. In unserer Arbeitsgruppe wurden bereits mit Hilfe der Zwei-Schritt-BAC-Mutagenese SIINFEKL-exprimierende Viren generiert und die Präsentation des SIINFEKL-Peptid-MHC-Komplexes sowie eine SIINFEKL-spezifische CD8 T-Zell Antwort nach Infektion nachgewiesen (Lemmermann et al., 2010a).

1.10 Zielsetzung

Die Reaktivierung des hCMV ist eine häufige und lebensbedrohliche Komplikation nach HSCT. Die Inzidenz der CMV-Erkrankung kann durch AT antiviraler CD8 T-Zellen reduziert werden, jedoch sind aufgrund der hohen benötigten Zellzahl an hCMV-spezifischen CD8 T-Zellen diese Verfahren bislang nicht Bestandteil der klinischen Routine. Es ist deshalb notwendig, die adoptive Immuntherapie für die klinische Anwendung zu optimieren.

Ziel dieser Arbeit war die Optimierung der Zytoimmuntherapie von CMV-Infektionen. Einen Schwerpunkt stellte hierbei die präklinische Evaluierung einer Kombinationstherapie aus AT einer limitierten Anzahl epitopspezifischer CD8 T-Zellen und deren anschließenden *in vivo* Expansion im KMT-Rezipienten durch therapeutische Vakzinierung mit rekombinanten hCMV DB dar. Zur Überprüfung der Kombinationstherapie sollte ein murines Modell auf der Grundlage von rekombinanten mCMV und rekombinanten DB etabliert werden. Als Modell-Peptid wurde das gut charakterisierte SIINFEKL-Peptid (OVA₂₅₇₋₂₆₄) verwendet. Nach erfolgreicher Integration der SIINFEKL-Peptid kodierenden Nukleotidsequenz innerhalb des viralen ORF *m164* sollten die mittels BAC-Technologie generierten rekombinanten mCMV *in vitro* als auch *in vivo* charakterisiert werden. Parallel hierzu wurden SIINFEKL-tragende rekombinante DB (DB-SIINFEKL) in unserem Institut in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. B. Plachter hergestellt, die zusammen mit den mCMV-Rekombinanten *in vivo* insbesondere auf ihre immunologischen Eigenschaften hin untersucht werden sollten. Hierbei standen insbesondere die Induktion eines *in vivo* T-Zell-*Primings* und einer *in vivo* Proliferation

adoptiv transferierter SIINFEKL-spezifischer CD8 T-Zellen nach Infektion bzw. Immunisierung im Vordergrund. Anschließend sollte im AT-Modell die protektive Wirkung SIINFEKL-spezifischer CTL bestimmt und getestet werden, ob durch zusätzliche Vakzinierung mit DB-SIINFEKL der durch den AT induzierte Schutz verbessert werden kann. Im letzten Schritt sollte die Effizienzsteigerung der adoptiven Immuntherapie durch therapeutische Vakzinierung im Modell der experimentellen KMT überprüft werden.

2 Material

2.1 Allgemeine Laborgeräte

autoMACS	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Brutschrank (Bakterien)	B6 und T18; Heraeus (Hanau)
CO ₂ -Inkubator (Zellen)	Hera Cell 240; Heraeus (Hanau)
Dounce-Homogenisator	Braun (Melsungen, Nr. 530830815)
Durchflusszytometer	FC500; Beckman Coulter (Krefeld)
Elektroporator	Gene Pulser™; BioRad (München)
Feuchte Kammern	Haushaltswarenbedarf Gerda (Schuch, Langgöns)
Flüssigstickstofftank	Taylor Wharton XL-160; Tec-Lab (Königstein, Nr. 408-062)
Gamma-Counter Cobra II	Packard Canberra (Frankfurt a. M.)
Gel-Dokumentationsanlage	Digit Store; INTAS (Göttingen)
Heizplatte / Magnetrührer	IKA Combimag RET; Janke & Kunkel (Staufen)
MACS <i>MultiStand</i>	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Mikroskope	Auflichtmikroskop; SZX12; Olympus (Hamburg) Highlight 3100; Olympus (Hamburg) Invertmikroskop: Leica DM IRB SL; Leica DM; konfokales <i>Laser Scanning</i> Mikroskop (LSM) Leica (Wetzlar) Phasenmikroskop: Nikon SE; Nikon (Düsseldorf)
Mikrotom	HM 355; Microtom (Walldorf)
Mikrowelle	Privileg (Fürth)
Multikanalpipette: Finnpipette	Labsystems (Helsinki, Finnland) Gilson (Villies Le Bel, Frankreich)
Varipette	Eppendorf (Hamburg)
Paraffinerhitzer	Hiso TAPplus; Leica (Bensheim)
Peristaltikpumpe	Reglo Digital; Ismatec (Wertheim-Mondfel)
Photometer	Nanodrop; PEQLAB (Erlangen)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg) Gilson (Villies Le Bel, Frankreich) Rainin; Mettler Toledo, Oakland, CA, USA)
Pipettierhilfe	Pipetboy; INTEGRA Biosciences (Fernwald)
<i>Power Supply</i>	EPS 301; Pharmacia (Erlangen) EPS 600; Pharmacia (Erlangen)

Reagenzglasschüttler	Rock'n' Roller L-202; MBT Brand (Giessen)
<i>real-time</i> PCR System	ABI 7500 Real Time PCR System; Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
Schüttelinkubator	Cellstar; NUNC (Wiesbaden) Certomat; Labotec (Wiesbaden)
Schüttelwasserbad	OLS 200; Grant, VWR (Wien)
Sterile Werkbank	Typ HS18; Heraeus (Hanau) HERA <i>safe</i> HS12/2 und HS 15/2; Heraeus (Hanau) Template Tamer; Appligene (Heidelberg)
Tischzentrifugen	centrifuge 5417; Eppendorf (Hamburg) centrifuge 5417C; Eppendorf (Hamburg) centrifuge 5417R; Eppendorf (Hamburg) Labofuge 200; Heraeus (Hanau) Labofuge 400; Heraeus (Hanau) Megafuge 2.0; Heraeus (Hanau) Mikrozentrifuge AL; Roth (Karlsruhe) Mikrozentrifuge Force 7; Roth (Karlsruhe) Multifuge 3 S-R; Heraeus (Hanau)
<i>Thermocycler</i>	GenAmp PCR System 9700; Perkin-Elmer (Foster City, USA)
Thermoschüttler	Eppendorf (Hamburg)
Ultrazentrifuge	Sorvall Combi Plus; Sorvall (Langenselbold) Sorvall RC 5C; Sorvall (Langenselbold)
UV-Lampe	UVC-CRL 400; Umwelt und Technik GmbH (Horb)
UV-Transilluminator	FluoLink; Bachofer (Reutlingen) Vetter GmbH (Wiesbaden)
Vollschutz-Kleintier- Bestrahlungsanlage	Typ OB 58-BA; Buchler (Braunschweig)
Vortex-Mixer	MS1 Minishaker; Janke & Kunkel (Staufen)
Waagen	BP 61; Sartorius (Göttingen) Kern 510 (Albstadt) Kern 572 (Albstadt)
Wasserbad	GFL (Burgwedel); Memmert GmbH (Schwabach)
Zellbestrahlungsanlage	Gammacell 2000; Mølsgaard Medical (Dänemark)

2.2 Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien

Counterröhrchen	6,0 x 38mm GLKL, 0,6 ml; Greiner Bio-One (Nürtingen, Nr. 101101)
Deckglas	12mm Ø; Marienfeld Lab. Glassware (Lauda-Königshofen, Nr. 011152)
Einblock-Kassetten	Tissue Tek III; Sakura Finetek BV (Zoeterwoude, Niederlande)
Einfrierröhrchen	1,8ml Cryo Tube Vials; Nalgene Nunc International (Dänemark, Nr. 375418)
Einmal-Feinjustierspritze	1ml Omican F; Braun (Melsungen, Nr. 9161502)
Einmal-Plastikpipetten	5ml serologische Pipette, Greiner Bio One (Frickenhausen, Nr. 606180) 10ml serologische Pipette, Greiner Bio One (Frickenhausen, Nr. 607180) 25ml serologische Pipette, Greiner Bio One (Frickenhausen, Nr. 760180)
Einmal-Pipettenspitzen	10µl Pipette; Sarstedt (Nümbrecht, Nr. 70.1130) 200µl Pipette; Tip One, Starlab (Ahrensburg, Nr. S1111-1006) 1000µl Pipette; Greiner Bio One (Frickenhausen, Nr. 686271)
Einmal-Skalpelle	Aesculap AG & Co. KG (Tuttlingen, Nr. 5518075)
Einmal-Spitzen	DistriTip Maxi ST 12,5ml; Gilson (Limburg, Nr. 7-4386) Präzisions-Dispenser-Tips; Brand (Wertheim, Nr. 702370)
Einmal-Spritzen	1ml Braun (Melsungen, Nr. 9166017V) 2ml Braun (Melsungen, Nr. 04606027V) 20ml Braun (Melsungen, Nr. SS + T20ES)
Elektroporationsküvetten	0,2cm Spaltbreite; PeqLab (Erlangen, Nr. 71-2020-LE)
FACS-Röhrchen	LAB EQUIP: TEST TUBE, 12; Beckman Coulter (Krefeld, Nr. 2523749)
Kanülen	0,4 x 12mm Braun (Melsungen, Nr. 4665406)
MACS-Säulen und Zubehör	autoMACS <i>Columns</i> ; Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Nr. 130-021-101) MS <i>Columns</i> ; Miltenyi Biotec

	(Bergisch Gladbach, Nr. 130-042-201)
	LS <i>Columns</i> ; Miltenyi Biotec
	(Bergisch Gladbach, Nr. 130-042-401)
	LD <i>Columns</i> ; Miltenyi Biotec
	(Bergisch Gladbach, Nr.130-042-901)
Neubauer Zählkammer <i>improved</i>	LO Laboroptik GmbH (Friedrichsdorf, Nr. 1100000)
Objektträger	76 x 26mm Menzel GmbH & CoKG; Thermo- Scientific (Braunschweig, Nr. 8037/1)
Polyallomerröhrchen	36ml QTY25; Sorvall (Newtown, USA, Nr. 03141)
Reaktionsgefäße	0,05ml PCR Tube, Greiner (Nürtlingen, Nr. 6722019) 1,5 ml Eppendorf (Hamburg, Nr. 0030102.002) 2ml; Eppendorf (Hamburg, Nr. 0030 120.086) PCR Streifen 1 x 8 Gefäße 0,2ml; Greiner Bio-One (Frickenhausen, Nr. 673210) Strip Cap für 8 Gefäße, Flachdeckel; Greiner Bio-One (Frickenhausen, Nr. 373250)
Spritzenvorsatzfilter	MILLEX GP 0,22µm steril; Millipore GmbH (Schwalbach, Nr. SLGPO33RS)
Sterilfilter	250ml Stericup Express Plus 0,22µm; Millipore GmbH (Schwalbach, Nr. SCGPU02RE) 500ml Stericup Express Plus 0,22µm; Millipore GmbH (Schwalbach, Nr. SCGPU05RE)
6-Well-Platten	für adhärenente Zellen: Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 353046)
24-Well-Platten	für Suspensionszellen: Greiner Bio-One (Nürtingen, Nr. 662102) für adhärenente Zellen: Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 353047)
48-Well-Platten	für adhärenente Zellen: Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 35 3078)
96-Well-ELISpotplatte	MultiScreen _{HTS} -IP, Millipore (Schwalbach, Nr. MSIPN45)

96-Well-Rundbodenplatten	für Suspensionszellen: Greiner Bio-One (Frickenhausen, Nr. 655180)
Zellkulturflaschen	25cm ² Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 35 3024) 75cm ² Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 35 3135)
Zellkulturschalen	für adhärenente Zellen: 6cm Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 35 3004) 10cm Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 35 3003) 14,5cm Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 35 3025) für nicht adhärenente Zellen: 6cm Greiner Bio-One (Frickenhausen, Nr. 628161) 10cm Greiner Bio-One (Frickenhausen, Nr. 664102)
Zell-Nylonsieb	40µm Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 35 2340)
Zentrifugenröhrchen	4ml Rundboden; Greiner Bio-One (Frickenhausen, Nr. 115261) 14ml Spitzboden; Falcon (Heidelberg, Nr. 352096) 50ml Spitzboden; Falcon (Heidelberg, Nr. 352070) 13ml für BAC Aufreinigung, 95 x 16,8mm, PP Sarstedt (Nümbrecht, Nr. 55.518) 36ml für ZU, PP Sorvall (Langenselbold, Nr. 03141)

2.3 Lösungen und Chemikalien

Alle aufgelisteten Chemikalien und Reagenzien wurden, wenn nicht ausdrücklich erwähnt, in p.a. Qualität bezogen. Zum Ansetzen der Lösungen und Puffer wurde ausschließlich A. bidest. (*Aqua ad iniectabilia*; Braun, Melsungen) verwendet.

Aceton	Fluka (Schweiz, Nr. 00570)
Agarose LE SeaKem	Cambrex Bio Science (Rockland ME, USA, Nr. 840004)
3-Aminopropyltriethoxysilan (APES)	Sigma (Deisenhofen, Nr. A-3648)
Ammonium-Nickelsulfat-Hexahydrat	Sigma (Traufkirchen, Nr. 09885)
Amphotericin B	Sigma (Nr. A-2411)
5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate /nitroblue tetrazolium (BCIP / NBTplus)	MABTECH (Hamburg, Nr. 3650)
Bacto Agar	Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 214010)
Bacto-Trypton	Tryptone Soya Broth; OXOID (Wesel, Nr. CM0129)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe, Nr. A512.1)
Borsäure	Roth (Karlsruhe, Nr. 6943.1)
Bovines Serum Albumin (BSA)	für MACS-Puffer und Immunfluoreszenzen: PAA Laboratories (Cölbe, Nr. K45-001) für Histologie: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Nr. A-7906) Für ELISpot: Ortho-Clinical Diagnostics Inc. (Neckargemünd, Nr. 718110)
Chloramphenicol (Cam)	Roth (Karlsruhe, Nr. 3886.2)
[⁵¹ Cr]-Natrium-Chromat (Na ₂ [⁵¹ Cr]O ₄)	Perkin Elmer (Zaventem, Belgien, Nr. NEZ030)
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Nr. D5637)
Coulter Clenz	Beckman Coulter (Krefeld, Nr. 8448222)
Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs)	Set, MBI Fermentas (St. Leo-Rot, Nr. R0181)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt, Nr. 1.02951.1000)
DNA-Längenstandard	1kbp Leiter, Invitrogen (Karlsruhe, Nr. 15615-016)
Entellan	Merck (Darmstadt, Nr. 1.07960)
Erythrozyten-Lysepuffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Nr. R7757)
Ethanol 100% (v / v)	Roth (Karlsruhe, Nr. 5054.1)
Ethanol absolut	AppliChem (Darmstadt, Nr. A1613,100PE)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe, Nr. 2218.1)
Ethylendiamin-Tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Roth (Karlsruhe, Nr. 3619.1)

Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories (Pasching, Österreich, Nr. A15-151)
Formalin 37%ig (v / v)	Merck (Darmstadt, Nr. K31602203302)
Glycerin	Roth (Karlsruhe, Nr. 7533.3)
Hämalaun nach Mayer	Waldeck (Münster, Nr. 2E010)
HEPES	Gibco (Eggenstein, Nr. 15630-056)
Hoechst 33342	Invitrogen (Karlsruhe, Nr. H3570)
<i>IsoFlow Sheat Fluid</i>	Beckman Coulter (Krefeld, Nr. 8546859)
Isopropanol	Hedinger (Stuttgart, Nr. 7474907)
Kaliumacetat (KAc)	Roth (Karlsruhe, Nr. 4986.1)
Kaliumchlorid (KCl)	Roth (Karlsruhe, Nr. 6781.1)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth (Karlsruhe, Nr. 3904.1)
Kanamycin (Kan)	Roth (Karlsruhe, Nr. T832.2)
L-Glutamin	Invitrogen (Karlsruhe, Nr. 25030-024)
2-Mercaptoethanol (β-ME)	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Nr. M7522)
Methanol	Becton Dickinson (Poole, England, Nr. 10158BG)
Methylzellulose	Prolabo (Leuven, Nr. 25499.182)
Mowiol®4-88 Reagent	Roth (Karlsruhe, Nr. 0713.1)
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Roth (Karlsruhe, Nr. 8563.1)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Karlsruhe, Nr. 4360.2)
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth (Karlsruhe, Nr. 6771.3)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Roth (Karlsruhe, Nr. 6885.1)
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O)	Roth (Karlsruhe, Nr. 2370.1)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe, Nr. 4360.2/.1)
Ovalbumin	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Nr. 9006-59-1)
Paraffin	HistoComp; Vogel (Giessen, Nr. VO-5-1002)
Paraformaldehyd (PFA)	Merck (Darmstadt, Nr. 104005)
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen (Karlsruhe, Nr. 15140-122)
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Invitrogen (Karlsruhe, Nr. 14190-094)
PolyFect	Qiagen (Hilden, Nr. 301105)
Red Blood Cell Lysis Buffer	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Nr. R7757)
Salzsäure (HCL) 25%	Merck (Darmstadt, Nr. 100316)
Saccharose	Roth (Karlsruhe, Nr. 4621.2)
Tris	Roth (Karlsruhe, Nr. 4855.2)
Triton-X-100	Roth (Karlsruhe, Nr. 3051.3)

Trypanblau	Biochrom (Berlin, Nr. L6323)
Trypsin	Difco (Michigan, USA, Nr. 0152-1)
Trypsin/EDTA	Invitrogen (Karlsruhe, Nr. 15400-054)
Türcks-Lösung	Merck (Darmstadt, Nr. HX778468)
<i>Tween 20</i>	Sigma (Deisenhofen, Nr. P1379)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck (Darmstadt, Nr. 1.07209.0250)
Xylol	Merck (Darmstadt, Nr. 1.08685.2500)
Yeast Extract Servabacter	Serva (Heidelberg, Nr. 24540)

2.4 Kits

Vybrant™ CFDA-SE Cell Tracer Kit	Molecular Probes (Göttingen, Nr. V-12883)
<i>NucleoBond</i> PC 500 Kit	MACHEREY & NAGEL (Düren, Nr. 740574)
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche (Mannheim, Nr. 11732668001)
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Roche (Mannheim, Nr. 11858874001)
Neufuchsin-Kit	DAKOCytomation (Hamburg, Nr. K 0625)
Vectastain Elite ABC-Peroxidase-Kit	Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA, USA, Nr. PK-6100)

2.5 Enzyme

Alle enzymatischen Reaktionen erfolgten bei den vom jeweiligen Hersteller angegebenen Temperaturen unter Verwendung der entsprechenden Puffer.

<i>HotStar</i> Taq-DNA-Polymerase	QIAGEN (Hilden, Nr. 203205)
Proteinase K	Roche Diagnostics (Mannheim, Nr. 0311583600)
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas (St. Leon-Rot) New England Biolabs (Frankfurt/Main)

2.6 Oligonukleotide

Die hier aufgeführten Oligonukleotide wurden in lyophilisierter Form von den Firmen Operon Biotechnologies (Köln) sowie Metabion (Martinsried) bezogen und wurden direkt nach Lieferung in sterilem A. bidest. oder Tris Puffer (pH 8,0) gelöst. Sehr lange Oligonukleotide sowie TaqMan-Sonden mussten dagegen zuvor über eine HPLC (*high performance liquid chromatography*) aufgereinigt werden. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Die Positionsangaben für mCMV-Sequenzen erfolgten nach Rawlinson et al., 1996 (*GenBank Accession No.*: NC_004065).

Primer zum Nachweis von gp36,5/m164

m164_Sonde_for n'223.261-223.281 5'-AAC AAG ATC TAT CCC GAC CAG-3'
m164_Sonde_rev n'222.415-222.435 5'-TGG CTG ATG GT TGCG CGA CAC-3'

Sequenzier-Oligonukleotide für gp36,5/m164

m164_seq_for n'223.037-223.016 5'-GTG TGC GAC ATC GAC CAT GTG-3'
m164_seq_rev n'222.581-222.601 5'-GCT CCA ACT GAC AGT CGC AGC-3'

Primer/Sonden Paar zur TaqMan-Quantifizierung von BAC-Sequenzen

BAC_taq_for 5'-GTT CTG TCA TGA TGC CTG CAA-3'
BAC_taq_rev 5'-AAT CCG CTC CAC TTC AAC GT-3'
Sonde BAC_taq
5'-[6~FAM]CAC CGC ACG AAG ATT TCT ATT GTT CCT GA[TAMRA~6~FAM]-3'

Primer/Sonden Paar zur TaqMan-Quantifizierung von gB/M55

gB_Taq_For n'83.137-83.156 5'-CTA GCT GTT TTA ACG CGC GG-3'
gB_Taq_Rev n'83.227-83.207 5'-GGT AAG GCG TGG ACT AGC GAT-3'
Sonde gB_Taq n'83.175-83.200
5'-[6~FAM]TGC TCG GTG TAG GTC CTC TCC AAG CC[TAMRA~6~FAM]-3'

2.7 Antigene Peptide

Die synthetischen antigenen Peptide von mCMV wurden von der Firma JERINI Bio Tools GmbH (Berlin) hergestellt und als Lyophilisate geliefert. Sie wurden in 30% (v/v) Acetonitril in PBS mit einer Konzentration von 10^{-3} M gelöst und bei -70°C gelagert.

Tab. 2.1: Liste der verwendeten antigenen Peptide (H-2^b) von mCMV

ORF/Name	Peptid-Sequenz	MHC-Klasse-I Restriktion	Referenz
M38	³¹⁶ SSPPMFRV ³²³	K ^b	Munks et al., 2006a, b
M45	⁹⁸⁵ HGIRNASFI ⁹⁹³	D ^b	Munks et al., 2006a, b
M57	⁸¹⁶ SCLEFWQRV ⁸²⁴	K ^b	Munks et al., 2006b
m139	⁴¹⁹ TVYGFCLL ⁴²⁶	K ^b	Munks et al., 2006a, b
m164	¹⁶⁰ WAVNNQIAV ¹⁶⁸	D ^b	Munks et al., 2006b
OT-I	²⁵⁷ SIINFEKL ²⁶⁴	K ^b	Röttschke et al., 1991

2.8 Antikörper

2.8.1 AK für die Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Isotyp	Klon	Einzusetzende Menge	Referenz
FITC anti-Maus CD4	Ratte anti-Maus IgG2a _κ	H129.19	0,5µg/10 ⁶ Zellen	BD Biosciences (Heidelberg, Nr. 553650)
FITC anti-Maus CD8a	Ratte anti-Maus IgG2a _κ	53-6.7	0,5µg/10 ⁶ Zellen	BD Biosciences (Heidelberg, Nr. 553031)
PE-Cy5 anti-Maus CD8a	Ratte anti-Maus IgG2a _κ	53-6.7	0,2µg/10 ⁶ Zellen	BD Biosciences (Heidelberg, Nr. 553034)
ECD anti-Maus CD8a	Ratte anti-Maus IgG2a	53-6.7	0,8µg/10 ⁶ Zellen	Beckman Coulter (Krefeld, Nr. MCD0817)
CD16/CD32 Fc Block TM	Ratte anti-Maus IgG2b _κ	2.4G2	1µg/10 ⁶ Zellen	BD Biosciences (Heidelberg, Nr. 553142)
PE-Cy7 anti-Maus CD44	Ratte anti-Maus IgG2b	IM7	0,2µg/10 ⁶ Zellen	eBioscience (Frankfurt, Nr. 25-0441-82)
PE anti-Maus CD62L	Ratte anti-Maus IgG2a	Mel-14	0,25µg/10 ⁶ Zellen	Pharmingen (Hamburg, Nr. 12-0621-83)
PE-Cy5 anti-Maus CD127	Ratte anti-Maus IgG2a	A7R35	0,2µg/10 ⁶ Zellen	eBioscience (Frankfurt, Nr. 15-1271-81)
FITC anti-Maus KLRG1	Hamster anti-Maus IgG	2F1	0,2µg/10 ⁶ Zellen	eBioscience (Frankfurt, Nr. 11-5893-83)
PE anti-Maus TCRβ	Hamster anti-Maus IgG2,λ	H57-597	0,2µg/10 ⁶ Zellen	BD Biosciences (Heidelberg, Nr. 553172)
PE anti-Maus TCRβ 5.1/5.2	Ratte anti-Maus IgG1 _κ	MR 9-4	0,2µg/10 ⁶ Zellen	BD Biosciences (Heidelberg, Nr. 553190)
APC anti-Maus Vα2	Ratte anti-Maus IgG2a,λ	B20.1	0,4µg/10 ⁶ Zellen	BD Biosciences (Heidelberg, Nr. 560622)
MHC Dextramer H-2K ^b SIINFEKL (APC)			10µl/1-2x10 ⁶	Immudex (Kopenhagen, Nr. JD2163-APC)

2.8.2 AK für IFN-γ ELISpot-Assay

Bezeichnung	Isotyp	Klon	Einzusetzende Menge	Referenz
Primär-AK- anti-Maus IFN-γ	Ratte anti-Maus IgG 1	RMMG-1	5µg/ml	Biosource Europe (Solingen, Nr. AMC4834)
Sekundär-AK anti-Maus IFN-γ	Ratte anti-Maus IgG 1	XMG 1.2	1µg/ml	Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 18112D)

2.8.3 AK für Immunfluoreszenzen

Bezeichnung	Immunisierte Spezies	Typ/Klon	Verdünnung	Referenz
Anti-m164	Kaninchen	pAk	1:200	I. Med. Klinik Universität Mainz
Anti-Kaninchen	Ziege	AF546	1:100	MoBiTec (Göttingen, Nr. A11010)

2.8.4 AK und Seren für die Immunhistochemie

Bezeichnung	Isotyp	Klon	Verdünnung	Referenz
Anti-mCMV-IE1 (pp76/89)	Maus IgG1	Croma 101	1:500	Prof. Jonjic, Rijeka (Kroatien)
Anti-Maus IgG (Fab)-Biotin	Ziege IgG	polyklonal	1:200	Sigma (Deisenhof, Nr. B0529)
Normalserum Kaninchen	-	polyklonal	1:10	Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe, Nr. 16120099)
Normalserum Ziege	-	polyklonal	1:10	Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe, Nr. 16210064)

2.8.5 AK für die MACS-Separation

Bezeichnung	Isotyp	Klon	Einzusetzende Menge	Referenz
CD4 (L3T4) <i>Microbeads</i>	Ratte anti- Maus IgG2b	Keine Angabe vom Hersteller	10µl/10 ⁷ Zellen	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Nr. 130-049- 201)
CD8 (Ly-2) <i>Microbeads</i>	Ratte anti- Maus IgG2a	Keine Angabe vom Hersteller	10µl/10 ⁷ Zellen	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Nr.130- 049-401)

2.8.6 AK für die *in vivo* Depletion von CD8 T-Zellen

Bezeichnung	Isotyp	Klon	Einzusetzende Menge	Referenz
Anti-Maus CD8	Ratte	YTS169.4.	1mg/Maus	Prof. Jonjic, Rijeka (Kroatien)

2.9 Materialien für die Zellkultur

2.9.1 Zellkulturmedien

Die Medien wurden steril von der Firma Gibco (Karlsruhe) bezogen und enthalten bereits, wenn nicht anders beschrieben, L-Glutamin in Form von L-Glutamax. Die Medien wurden bei 4°C gelagert und vor Gebrauch mit den aufgelisteten Zusätzen supplementiert.

DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium)	(Nr. 61965-026)
10% (v/v)	FCS
100U/ml	Penicillin
0,1mg/ml	Streptomycin

MEM (Minimum Essential Medium)		(Nr. 41090-028)
10% (v/v)	FCS	
100U/ml	Penicillin	
0,1mg/ml	Streptomycin	
ad 1,4µg/ml	Amphotericin B	(Zugesetzt nur für Lagerung von Organen)

MEM alpha (MEM α)		(Nr. 32561-029)
7,5% (v/v)	FCS	
10mM	HEPES	
5 x 10 ⁻⁵ M	β-ME	
100U/ml	Penicillin	
0,1mg/ml	Streptomycin	
ad 100U/ml	rhIL-2	(Zugesetzt nur für Kultivierung von CTLL)

Methylzellulose-Medium

360ml	A. bidest
8,8g	Methylzellulose

Nach dem Ansetzen wurde die Suspension autoklaviert, bis zum vollständigen Lösen der Methylzellulose gerührt und bei 4°C aufbewahrt. Direkt vor Gebrauch wurden folgende Zusätze zugegeben:

40ml	MEM 10x	(Gibco-BRL, Nr. 21430-20)
10% (v/v)	FCS	
2mM	L-Glutamin	
100U/ml	Penicillin	
0,1mg/ml	Streptomycin	

Lösung mit NaHCO₃ (Stocklösung: 55g/l) auf pH 7,5 einstellen.

RPMI 1640 (Rosewell Park Memorial Institute)		(Nr.61870-010)
5% (v/v)	FCS	
10mM	HEPES	
5 x 10 ⁻⁵ M	β-ME	
100U/ml	Penicillin	
0,1mg/ml	Streptomycin	

2.9.2 Medienzusätze und Reagenzien

Amphotericin B: Amphotericin B wurde dem Medium zugesetzt, wenn isolierte Organe für einen längeren Zeitraum gelagert werden sollten. Dieses Antimykotikum wurde als Stocklösung (1,4mg/ml) in 500µl Aliquots bei -20°C gelagert und im Verhältnis von 1:1000 (Endkonzentration: 1,4µg/ml) dem Medium zugesetzt.

Carboxyfluoreszein-Diazetat-Succinimidyl-Ester (CFDA-SE):

Der Farbstoff CFDA-SE dient zum Markieren von Zellen und wird für Proliferations-Studien verwendet. CFDA-SE passiert die Zellmembran, bindet an zytoplasmatische Proteine und wird dort durch Abspaltung zweier Acetatgruppen in das nicht mehr membrangängige, fluoreszente Carboxyfluoreszein-Succinimidyl Ester (CFSE) umgewandelt (Lyons et al., 1994; Parish et al., 2009; Quah et al., 2007, 2010). Das CFDA-SE wurde als 10mM Stocklösung in DMSO gelöst. Diese Stocklösung wurde aliquotiert, bei -20°C gelagert und konnte nach dem Auftauen nicht mehr eingefroren werden.

Fötale Kälberserum (FCS): Vor Verwendung des FCS, das bei -20°C gelagert wurde, mussten die Komplementbestandteile durch eine 30-minütige Inkubation bei 56°C im Wasserbad inaktiviert werden. Danach wurde das Serum bei 4°C aufbewahrt.

HEPES: Der Zusatz von HEPES verhindert durch seine im physiologischen Bereich liegende Pufferkapazität das schnelle Ansäuern des Mediums bei besonders schnell wachsenden Zellkulturen. Es wurde als 1M Lösung bezogen und davon 5ml pro 500ml Kulturmedium eingesetzt (Endkonzentration 10mM).

L-Glutamin: Das L-Glutamin (Stocklösung: 200mM in 0,9% (w/v) NaCl) wurde in 5ml Aliquots bei -20°C gelagert und im Verhältnis von 1:100 (Endkonzentration: 2mM) dem Medium zugesetzt.

β-Mercaptoethanol (β-ME): β-ME ist ein starkes Reduktionsmittel, das die Oxidation der Inhaltsstoffe verhindert. Die Stocklösung (100µl β-ME/100ml A. bidest.) wurde bei -20°C gelagert und davon 1,75ml 500ml Kulturmedium (Endkonzentration: 5×10^5 M) zugesetzt.

PolyFect: Dieses Transfektionsreagenz ist ein polykationisches Dendrimer, das an DNA bindet und mit dieser zu einer kompakten Struktur kondensiert. Diese werden von Zellen phagozytiert und die DNA anschließend im Zytoplasma freigesetzt.

Penicillin/Streptomycin: Die Stocklösung (10.000U Penicillin + 10mg/ml Streptomycin in 0,9% (w/v) NaCl) wurde in 5ml Aliquots bei -20°C gelagert und im Verhältnis von 1:100 (Endkonzentration: 100U/ml Penicillin + 0,1mg/ml Streptomycin) dem Medium zugesetzt. Diese Kombinationslösung wurde dem Medium zur Verhinderung des Wachstums grampositiver sowie -negativer Bakterien beigefügt.

Phosphate Buffered Saline (PBS): PBS wurde als einfach konzentrierter Puffer bezogen und setzt sich wie folgt zusammen: 140mM NaCl; 6,5mM Na₂HPO₄; 2,7mM KCl; 1,5mM KH₂PO₄ (pH 7,4).

Rekombinantes humanes Interleukin-2 (rhIL-2): rhIL-2 (lot.89050/84802) ist ein T-Zell-Wachstumsfaktor und unterstützt die Differenzierung sowie die Proliferation von

Lymphozyten (Cantrell et al., 1984; Jelinek et al., 1987; Smith et al., 1984, 1988). Es wurde uns freundlicherweise vom Sandoz Forschungsinstitut (Wien) zur Verfügung gestellt. Die Stocklösung (spezifische Aktivität: $7,3 \times 10^6 \text{U/mg}$) wurde aliquotiert, bei -70°C gelagert und das rhIL-2 in einer Konzentration von 100U/ml ($0,88 \text{pmol}$) für die Kultivierung von CTLL eingesetzt.

Trypanblau: Die 5%-ige Stocklösung (w/v, in PBS) des Vitalfarbstoffs wurde vor ihrer Verwendung 1:5 mit PBS verdünnt und in einer Endkonzentration von 0,1% (v/v) verwendet.

Trypsin/EDTA: Die Stocklösung wurde 1:10 mit PBS verdünnt und zum Ablösen von adhärennten Zellen verwendet (Endkonzentration $0,5 \text{g/l}$ Trypsin, $0,2 \text{g/l}$ EDTA, pH 7,4-7,6).

Türcks-Lösung: Die Verwendung der Lösung diente dem Anfärben kernhaltiger Zellen bei gleichzeitiger Lyse von Erythrozyten durch die enthaltene Essigsäure.

2.9.3 Primäre Zellen und Zelllinien

Murine embryofetale Fibroblasten (MEF): Diese primären (siehe 3.1.3), adhärennten, für die mCMV-Infektion hoch permissiven Zellen wurden u.a. für die Virustiterbestimmung mCMV-infizierter Organe (*Plaque-Assay*), zur mCMV-Produktion oder der Rekonstitution rekombinanter Viren nach Transfektion aufgereinigter BAC-DNA (siehe 3.1.4) verwendet.

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

EL-4: Die murinen EL-4 Zellen wurden von der Firma *American Type Culture Collection* (ATCC; Manassas, VA, USA; ATCC-Nr. TIB-39) bezogen und wurden durch die Etablierung eines 9,10- Dimethyl-1,2-Benzanthracene induzierten T-Zell-Lymphoms in C57BL/6 Mäusen generiert. Diese Suspensionszelllinie wurde im ELISpot-Assay sowie Zytolysetest als APC für H-2^b präsentierte Peptide verwendet.

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

2.10 Bakterien

E.coli Bakterien des Stamms DH10B wurden für die molekularbiologischen Arbeiten verwendet. In diesen elektrokompetenten Bakterien, die sich besonders gut für Elektrotransformationen (siehe 3.3.6.2) eignen, wurden Manipulationen am mCMV-BAC-Plasmid durchgeführt.

DH10B F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara, leu)7697 galU galK λ - rpsL nupG

2.11 Viren

mCMV- Δ m157Luc: Das rekombinante mCMV- Δ m157Luc basiert auf dem mCMV-BAC Plasmid pSM3fr (Wagner et al., 1999). Dabei unterscheidet sich das mCMV- Δ m157Luc von dem Wildtyp mCMV (Stamm Smith ATCC VR-194/1981) durch eine Deletion im ORF *m157* zwischen den Nukleotiden n´216.300 bis n´216.885 (mCMV Positionsangabe nach Rawlinson, et al., 1996). Die Rekombinanten wurden im Labor von Prof. M. Messerle mittels ET-Rekombination hergestellt (Klenovsek et al., 2007). Während der Rekombination erfolgte die Ersetzung des ORF *m157* durch ein DNA-Fragment bestehend aus dem hCMV *major immediate early promoter* (MIEP) und dem Luciferase-Gen, aus dem Plasmid pGL3 (Invitrogen), sowie ein polyA-Signal des *bovine growth hormone (bGH)*-Gen aus dem Plasmid pcDNA3.1 (Invitrogen). Das mCMV- Δ m157Luc wurde unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von Prof. M. Messerle, Institut für Virologie der Medizinischen Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt.

Rekombinante mCMV, die in dieser Arbeit mittels BAC-Mutagenese generiert wurden:

mCMV- Δ m157Luc/m164-SIINFEKL	(Epitop-Mutante)
mCMV- Δ m157Luc/m164-SIINFEKA	(Epitopverlust-Mutante)

Zur Beschreibung siehe 4.2

2.12 Rekombinante DB

In dieser Arbeit wurden rekombinante Dense Bodies (DB) verwendet, die das SIINFEKL- bzw. das SIINFEKA-Peptid in Form eines Fusionsproteins pp65-SIINFEKL bzw. pp65-SIINFEKA transportieren. Diese DB wurden in dieser Arbeit als DB-SIINFEKL und DB-SIINFEKA bezeichnet. Die für die DB-Gewinnung benötigten rekombinanten hCMV, wurden im Labor von Prof. B. Plachter mit Hilfe der *galk* Methode (Mersseman et al., 2008a; b) generiert. Dabei wurde das entsprechende Peptid an der Amminosäureposition 157 des Proteins pp65/UL83 integriert (Becke et al., 2010). Die Rekombinanten exprimieren somit ein pp65-SIINFEKL oder ein pp65-SIINFEKA Fusionsprotein. Die das entsprechende Fusionsprotein transportierenden DB wurden mir freundlicherweise von Prof. B. Plachter zur Verfügung gestellt.

2.13 Versuchstiere

C57BL/6: Für die Versuche wurden weibliche sowie männliche Tiere des murinen Inzuchtstamms C57BL/6 des Haplotyps H-2^b (MHC-Klasse-I-Moleküle K^b sowie D^b) verwendet.

OT-I: Der transgene Mausstamm OT-I mit C57BL/6 Hintergrund wurde erstmals von Hogquist et al. (1994) beschrieben. Die CD8 T-Zellen der OT-I Maus (OT-I Zellen) exprimieren einen transgenen TCR, der spezifisch den SIINFEKL-H-2K^b-Komplex erkennt. Etwa 95% aller OT-I Zellen tragen den transgenen TCR mit den variablen Ketten V α 2 und V β 5.

Die verwendeten Versuchstiere wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der klinischtheoretischen Institute der Universität Mainz unter *specified pathogen free* (SPF)-Bedingungen gezüchtet. Die in dieser Arbeit durchgeführten Tierexperimente erfolgten mit der Genehmigung der Bezirksregierung Rheinhessen-Pfalz (Genehmigungs-Nummern 23 177-07/G 10-1-052).

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten mit kultivierten Zellen wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt, um Kontaminationen mit Pilzsporen und Bakterien zu vermeiden. Für die Zellkulturarbeiten wurden ausschließlich sterile Glas- und Plastikwaren verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in CO₂-Inkubatoren (37°C, 5% (v/v) CO₂) in gesättigter Wasserdampfatmosphäre (95% (v/v) Luftfeuchtigkeit). Bei diesen Bedingungen ist die Aufrechterhaltung eines physiologischen pH-Wertes der CO₂/Bicarbonat-gepufferten Kulturmedien gewährleistet.

3.1.1 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Einfriermedium

90% (v/v) DMSO

10% (v/v) FCS

Die Langzeitlagerung von Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C. Dem Einfriermedium wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt, das durch seine hygroskopischen Eigenschaften die Bildung von intrazellulären Eiskristallen verhindert.

Die pelletierten Zellen wurden in einer Konzentration von $1-5 \times 10^6$ Zellen/ml in gekühltem Einfriermedium aufgenommen und je 1ml in Kryoröhrchen überführt. Bei dieser Arbeit muss auf die stetige Kühlung der Zellen sowie der verwendeten Gefäße geachtet werden. Die Röhrchen wurden mit Zellstoff isoliert, bei -70°C eingefroren und nach 48h zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff überführt.

Zur Rekultivierung wurden die Zellen bei 37°C im Wasserbad angetaut und zur Verdünnung des toxischen DMSO unverzüglich in ein großes Volumen Kulturmedium überführt. Die Zellen wurden zweimal in Kulturmedium gewaschen, um mögliche Rückstände an DMSO zu entfernen, in Medium aufgenommen und bei 37°C kultiviert.

3.1.2 Ermittlung der Zellvitalität und Zellzahl

Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wird der Vitalfarbstoff Trypanblau verwendet. Der Farbstoff wird von toten Zellen unverzüglich aufgenommen, wodurch das Zytoplasma der Zellen blau angefärbt wird. Bei lebenden Zellen wird die Membran erst nach 5-10min für den Farbstoff permeabel.

Um kernhaltige Leukozyten von kernlosen Erythrozyten zu differenzieren, wurde Türk-Lösung verwendet. Diese Lösung färbt die Nuklei aller Zellen nicht selektiv an und kann somit nicht zum Nachweis der Zellvitalität verwendet werden.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein geringes Volumen der Zellsuspension mit dem Farbstoff in einem festgelegten Volumen gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer (Kammertiefe 0,1mm) überführt. Es wurde mindestens ein Großquadrat mit Hilfe eines Lichtmikroskops ausgezählt und die Zellzahl mit Hilfe folgender Formel berechnet:

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

N = Zahl gezählter Zellen

n = Zahl gezählter Großquadrate

V = Verdünnungsfaktor

10^4 = Kammerfaktor

3.1.3 Anlage von murinen embryofetalen Fibroblasten (MEF)

Trypsin/EDTA (pH 6,4):

1,25g Trypsin

1,25g EDTAx2H₂O

ad 1l PBS

Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C gerührt, mit 1M NaOH auf pH 6,4 eingestellt, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert. Die Lösung wurde vor ihrer Verwendung 1:1 mit PBS verdünnt.

Die Anlage von MEF wurde, wie in Podlech et al. (2002) beschrieben durchgeführt. Am ersten Tag der Herstellung wurden einer trächtigen Maus, 14-17 Tage nach Fertilisation, die Embryonen steril entnommen und sofort in einer Petrischale gekühlt. Zunächst wurden die Plazenta, alle inneren Organe, die Augenanlagen, sowie das Gehirn entfernt und das restliche Gewebe wurde mit Hilfe von Schere und Skalpell zu einer homogenen Masse zerkleinert. Die Zellmasse wurde in einen sterilen Erlenmeyerkolben, der Glasperlen sowie einen Magnetrührer enthielt, überführt und zusammen mit 30ml Trypsin/EDTA/PBS unter langsamem Rühren für 90min bei 37°C inkubiert. Dabei wurden im Abstand von je 30min erneut 30ml Trypsin/EDTA/PBS hinzugeführt. Die Zellmasse wurde zur Entfernung verbliebener Gewebstücke über ein steriles Metallsieb gegeben, Erlenmeyerkolben und das Metallsieb wurden gründlich nachgespült und die Zellen bei 311xg für 10min pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, die Zellen einmal gewaschen, das Pellet in 10ml neuem Medium resuspendiert und die Zellen über ein 100µm *Cell Stainer* gegeben. Zur Kultivierung wurden 2-3x10⁷ Zellen auf beschichtete Zellkulturschalen (Ø 14,5cm) ausgesät (Passage 0).

Am zweiten Tag wurde das Kulturmedium vorsichtig entfernt, die adhärennten Zellen viermal mit PBS gewaschen und in Medium weiter kultiviert. Die Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz mit PBS gewaschen, mit 3ml Trypsin vom Boden abgelöst und bei 311xg für 10min pelletiert. Die Zellen wurden in vorgekühltem Einfriermedium in einem Verhältnis von 1:3 oder 1:9 aufgenommen, dabei in die Passage 1 überführt und eingefroren (siehe 3.1.1).

3.1.4 Transfektion von BAC-Plasmid-DNA

Die Rekonstitution von rekombinanten mCMV erfolgt über Transfektion von aufgereinigter BAC-DNA mit Hilfe des PolyFect-Reagenzes. Für die Transfektion kann kein definiertes Verhältnis zwischen BAC-DNA und Reagenz eingesetzt werden, da die BAC-DNA hochviskös ist und daher ihre Konzentration photometrisch nicht ermittelt werden kann. Um trotzdem eine optimale Transfektion zu ermöglichen, wurden unterschiedliche Volumina an BAC-DNA eingesetzt. Die in 6-Well-Platten kultivierten MEF wurden bei einer Konfluenz von etwa 80% mit definierten Volumina (2,5; 5; 10 bzw. 15µl) an gereinigter BAC-DNA (siehe 3.3.7.3) transfiziert. In jedes Well wurde ein entsprechendes Volumen an BAC-DNA mit MEM (ohne Zusätze) auf ein Endvolumen von 100µl eingestellt. Anschließend wurden die Lösungen vorsichtig durch invertieren gemischt und jeweils 10µl PolyFect-Reagenz hinzugegeben. Während einer Inkubation für 10min bei 20-22°C kommt es zur Bildung von DNA-PolyFect-Komplexen. Die Zellen wurden in der Zwischenzeit einmal mit 2ml PBS gewaschen und mit 1,5ml neuem Kulturmedium versetzt. Nach der Inkubationszeit wurden 600µl Kulturmedium zu den Transfektionsansätzen hinzugefügt und das Gemisch wurde sofort auf die Zellen gegeben. Nach 6h Inkubation bei 37°C wurde das Kulturmedium durch 3ml neues Medium ersetzt und die Zellen wurden weiter kultiviert. Die ersten *Plaques* sind bei erfolgreicher Transfektion nach 4-7 Tagen zu erkennen. Nach vollständiger Lyse der Zellen wurden die Überstände der *Wells* einzeln abgenommen und zur Entfernung der Zelltrümmer mit 500xg für 5min bei 4°C zentrifugiert. Die Virusüberstände können bei -70°C gelagert oder zur Entfernung der BAC-Sequenz (siehe 3.2.4) auf frische MEF überführt werden.

3.1.5 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

4% (w/v) PFA/Saccharose:

4% PFA

4% Saccharose

ad PBS

Permeabilisierungslösung:

0,2% Triton-X-100

ad PBS

Blockierungspuffer:

1% Bovines Serum Albumin (BSA)

ad PBS

Für indirekte Immunfluoreszenzfärbungen wurden MEF auf sterilen Deckgläschen ausgesät und bei einer Konfluenz von etwa 80% zentrifugal infiziert (Zentrifugation für 30min bei 760xg). Die zentrifugale Infektion verstärkt die Infektion permissiver Zellen mit mCMV um einen Faktor von etwa 20 (Osborn und Walker, 1968; Hodgkin et al., 1988; Kurz et al., 1997; Podlech et al., 2002). Nach 8h wurde die Infektion durch zweimaliges Waschen mit PBS gestoppt und die Zellen in 4%-iger PFA-Saccharose fixiert (20min, 20-22°C). Anschließend wurde das Fixans abgesaugt und die Zellen zweimal mit je 1ml PBS gewaschen. Die Lagerung der fixierten Zellen ist in PBS bei 4°C für etwa zehn Tage möglich. Vor dem Färben wurden die fixierten Zellen zweimal für jeweils 5min mit 2ml PBS gewaschen. Die anschließende Inkubation (20min, 20-22°C) in 1ml 0,2% Triton-X-100 diente zur Permeabilisierung der Zellen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 45min mit 1ml Blockierungspuffer inkubiert. Um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern, erfolgten alle weiteren Inkubationsschritte in einer feuchten Kammer bei 20-22°C. Nach dem Blockierungsschritt wurden die Zellen für 2h mit 25µl Primär-AK (verdünnt in Blockierungspuffer) inkubiert, anschließend wurde durch dreimaliges Waschen (3x5min) in PBS ungebundene AK entfernt. Um das Ausbleichen der Fluoreszenz zu unterbinden, erfolgten alle weiteren Inkubationen im Dunkeln. Der Fluorochrom-gekoppelte Sekundär-AK wurde 1:200 in Blockierungspuffer verdünnt und zum Färben der Zellkerne Hoechst-Lösung (Endkonzentration: 1:100) zur Sekundär-AK-Verdünnung hinzugegeben. Die Zellen wurden mit 30µl der Sekundär-AK-Verdünnung für 1h inkubiert und anschließend dreimal für 5min in PBS und zweimal 5min in A. bidest. gewaschen. Nach dem Eindeckeln der Deckgläschen mit Mowiol können sie bei 4°C gelagert werden. Die Auswertung erfolgte mittels konfokaler *Laser Scanning* Mikroskopie (LSM).

3.2 Virologische Methoden

3.2.1 mCMV Produktion

Die in dieser Arbeit verwendeten Viren wurden aus infizierten MEF der 3. Passage nach dem in Lemmermann et al. (2010b) beschriebenen Protokoll aufgereinigt. Das mCMV wurde in

MEF angezogen, anschließend isoliert und über ein Saccharose-Kissen aufgereinigt. Die Lagerung der gereinigten Viren erfolgte bei -70°C.

Kulturmedium:

MEM + 10% (v/v) FCS

Virusstandardpuffer (VSP):

50mM	Tris
5mM	EDTAx2H ₂ O
12mM	KCl
ad.	A. bidest.

Lösung mit HCl auf pH 7,8 einstellen und autoklavieren.

VSP + 15% Saccharose (w/v):

(15g Saccharose/100ml VSP)

Die Lösung wurde sterilfiltriert. Haltbarkeit beträgt drei Tage bei 4°C.

Für die Virusaufreinigung wurden maximal 55 Zellkulturschalen (Ø 14,5cm) mit konfluenten MEF mit 1×10^5 PFU (*plaque forming unit*) pro Zellkulturschale für 30min bei 20-22°C infiziert. Nach etwa vier Tagen sollten 80% der Zellen bereits abgekugelt sein und sich im Überstand befinden. Der Überstand wurde in 500ml Zentrifugenbecher überführt, die restlichen Zellen mit einem Zellspatel abgekratzt, die Schalen mit Medium (5ml je zehn Zellkulturschalen) gespült und die Zellen mit dem Kulturüberstand vereinigt. Anschließend wurden die Zellen bei 6387xg (20min, 4°C) (Zentrifuge: Sorvall RC, Rotor: SLA-3000) pelletiert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten nun auf Eis. Die Überstände wurden in 250ml Zentrifugenbecher überführt und bei 4°C gelagert. Das Pellet wurde in 10ml Kulturmedium resuspendiert, in einem sterilen *Dounce*-Homogenisator überführt und die Zellen wurden aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden für 20min bei 3615xg pelletiert (Zentrifuge: Sorvall RC, Rotor: SS-34), die Überstände mit den bereits vorhandenen Überständen vereinigt und das Pellet wurde verworfen. Die Virionen wurden bei 26069xg für 3h pelletiert (Zentrifuge: Sorvall RC, Rotor: SLA-1500) und die Überstände danach vorsichtig dekantiert. Das Pellet wurde über Nacht (ü.N.) auf Eis gelöst, am nächsten Tag in dem verbliebenen Volumen an Medium resuspendiert und auf Eis erneut homogenisiert. Das Homogenat wurde vorsichtig in einem Puffer-zu-Virus Verhältnis von 10:1 (27ml Puffer + 3ml Viruslösung) auf ein kaltes 15%-iges Saccharose/VSP-Kissen gegeben (30ml Polyallomerröhrchen) und für 1h bei 52800xg (Zentrifuge: Sorvall Combi Plus, Rotor AH629, Accel = N) pelletiert. Das Pellet wurde mit 1ml eiskaltem Saccharose/VSP-Puffer überschichtet und zum Lösen für 4h auf Eis gestellt. Danach wurde die Lösung homogenisiert, die Viruslösung aliquotiert und bei -70°C eingefroren.

Der Titer des aufgereinigten Virus wurde mit dem *Plaque-Assay* (siehe 3.2.2) bestimmt. Das aufgereinigte Virus kann maximal dreimal aufgetaut werden, ohne dass der Virustiter vermindert wird.

3.2.2 Virustiter-Bestimmung eines Virusstocks

Medien:

Methylzellulose-Medium

MEM + 10% FCS (v/v)

Mit dem *Plaque-Assay* kann der Virustiter aufgereinigter mCMV oder die Viruslast infizierter Organe (siehe 3.2.3) bestimmt werden. Hierbei werden MEF durch die Infektion lysiert und benachbarte Zellen infiziert, sodass es nach mehreren Infektionsrunden zur Bildung von Löchern (*Plaques*) im intakten Zellrasen kommt, die mit Hilfe eines Invertmikroskops gezählt werden können. Einer auf diese Weise entstandener *Plaque* kann auf mindestens ein infektiöses Viruspartikel zurückgeführt werden. Die Berechnung des Virustiters erfolgt mit der Formel:

$$\text{Virustiter (PFU/ml)} = \text{Plaquezahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10$$

Der Virustiter wird als PFU/ml angegeben, wobei ein PFU nach Definition die Menge an Virus ist, die benötigt wird, um einen *Plaque* zu erzeugen.

Die Virustiter-Bestimmung erfolgte auf MEF (Passage 3), die auf 48-*Well*-Platten ausgesät und bei 37°C bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert wurden. Von einem Virusstock wurde eine \log_{10} Titrationsreihe in Medium auf Eis hergestellt. Es sollte darauf geachtet werden, dass die Pipettenspitze nicht in das Medium eintaucht, um eine Verschleppung von Viruspartikel zu verhindern und somit der Verfälschung des Virustiters vorzubeugen. Die Virusverdünnungen wurden in Triplikaten von je 100µl auf die MEF gegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Methylzellulose-Medium überschichtet, wodurch ein Ausbreiten der Virusinfektion über den gesamten MEF-*Monolayer* verhindert und das Entstehen einzelner, zählbarer *Plaques* ermöglicht wird. Nach vier Tagen der Kultivierung wurde der Virustiter bestimmt. Bei der Berechnung wurden die Triplikate gemittelt und als Durchschnittswert in die Formel eingesetzt. Die Bestimmung des Virustiters wurde in zwei unabhängigen Versuchen ermittelt. Das ausführliche Protokoll ist in Lemmermann et al. (2010b) beschrieben.

3.2.3 Virustiter-Bestimmung von Organhomogenaten

Medien:

Methylzellulose-Medium

MEM + 10% FCS (v/v)

Die Virustiter-Bestimmung von Organhomogenaten erfolgte auf MEF der 3. Passage, die auf 48-Well-Platten ausgesät worden waren. Die entnommenen, eingefrorenen Organe (siehe 3.6.5) wurden zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und sofort auf Eis gestellt. Das Organ wurde auf ein steriles Metallsieb gegeben und mit Hilfe eines Spritzenstempels einer 2ml Spritze zerrieben. Die Zellen wurden anschließend in 2ml Medium aufgenommen und in neue Kryoröhrchen überführt. Von jedem Organ wurde eine \log_{10} Verdünnungsreihe (insgesamt sechs Verdünnungsstufen) in Medium hergestellt und je Verdünnungsstufe 100µl in Duplikaten auf den MEF-Monolayer in 48-Well-Platten überführt. Die Platte wurde für 30min bei 760xg zentrifugiert, danach wurden die Zellen mit Methylzellulose-Medium überschichtet und vier Tage später die *Plaques* ausgezählt (siehe Podlech et al., 2002).

Der berechnete Virustiter wird als PFU/Organ angegeben. Da das Organ in 2ml Kulturmedium aufgenommen wurde, muss dies in der Berechnung mit berücksichtigt werden.

$$\text{Virustiter (PFU/Organ)} = \text{Anzahl Plaques} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10 \times 2$$

3.2.4 Eliminierung von BAC-Sequenzen aus rekombinanten mCMV

Medien:

Methylzellulose-Medium

MEM + 10% FCS (v/v)

Eine Entfernung der BAC-Sequenz ist nach der Rekonstitution von rekombinanten mCMV essentiell, da die im viralen Genom vorhandenen BAC-Vektor-Sequenzen zu veränderten biologischen Eigenschaften der generierten Viren im Vergleich zum Ursprungsvirus führen können (Wagner et al., 1999; Adler et al., 2001).

Die Sequenz des BAC-Vektors ist im mCMV-BAC-Plasmid von homologen viralen Sequenzen flankiert. Durch den eukaryotischen Rekombinations-Apparat kann sie durch homologe Rekombination deletiert werden, was zu einem BAC-Vektor-Sequenz freien, dem Ursprungsvirus gleichen, mCMV-Genom führt (Wagner et al., 1999). Um überwiegend BAC-DNA freie mCMV zu erhalten, müssen nach der Virus-Rekonstitution mindestens fünf Zellkulturpassagen durchlaufen werden.

Das Passagieren der Virusüberstände erfolgte in 6-Well-Platten durch wiederholte Infektion von MEF. Die Virusüberstände wurden von vorhandenen Zelltrümmern durch Zentrifugation (5min; 500xg; 4°C) getrennt. Anschließend wurde 1µl der Viruslösung mit 999µl neuem

Kulturmedium versetzt, das Kulturmedium von sub-konfluenten MEF in 6-Well-Platten abgesaugt und die Zellen wurden mit dem hergestellten Ansatz für 30min bei 20-22°C infiziert. Danach wurden jeweils 2ml frisches Kulturmedium auf die Zellen gegeben und die Zellen für weitere 4-5 Tage bei 37°C, bis zum Erreichen einer 80%-igen Lyse der Zellen, kultiviert. Die restlichen Virusüberstände wurden bei -70°C gelagert. Das Passagieren wurde dreimal wiederholt. In der 4. Passage wurden die Zellen nach der 30-minütigen Infektionszeit mit Methylzellulose-Medium überschichtet, um etwa vier Tage später einzelne *Plaques* isolieren zu können. Die *Plaques* wurden auf der Unterseite der 6-Well-Platte markiert, mit einer sterilen abgeschnittenen 1ml Pipettenspitze wurde vorsichtig durch die Methylzellulose-Schicht gestochen und bis zum *Plaque* vorgedrungen. Es wurden einige Zellen und etwas Überstand abgenommen, in 1ml Kulturmedium resuspendiert und von diesem Virusansatz wurde ein neues 6-Well mit MEF infiziert. Von jedem 6-Well wurden mehrere *Plaques* gepickt und je *Plaque* wurde ein 6-Well infiziert. Nach der Lyse der Zellen wurden die einzelnen Überstände abgenommen und auf jeweils drei Reaktionsgefäße verteilt, wobei eins zur DNA-Isolierung (siehe 3.3.7.2) verwendet wurde und die anderen beiden zur Lagerung bei -70°C eingefroren wurden.

Die BAC-Freiheit im viralen Genom wurde mit Hilfe einer quantitativen *real-time* PCR (qPCR) (siehe 3.3.9) getestet. Hierfür wurden BAC-Sequenz-spezifische Oligonukleotide und Sonden verwendet. Eine aufgereinigte mCMV-DNA wurde als BAC-frei definiert, wenn bei der qPCR weniger als 100 BAC-Sequenzen pro 1×10^6 mCMV-Genome nachgewiesen wurden.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Mit Hilfe des Nanodrops (PEQLAB) wurde die Konzentration von DNA in Lösungen ermittelt. Die Lösungen wurden bei hoher DNA-Konzentration mit TE-Puffer oder 10mM Tris pH 8,0 verdünnt. Die Verdünnung wurde ausschließlich mit gepufferten Lösungen hergestellt, da Nukleinsäuren in nicht gepufferten Lösungen z.B. A. bidest. ein verändertes Absorptionsverhalten zeigen (Wilfinger et al., 1997).

Die Konzentration von doppelsträngiger DNA wird folgendermaßen berechnet:

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

Der Grad der Verunreinigung einer DNA-Probe lässt sich durch den Extinktionsquotienten der Extinktionen E_{260}/E_{280} bestimmen. Der Extinktionsquotient gibt das Verhältnis zwischen

Nukleinsäuren und Proteinen an. Der Quotient proteinfreier DNA liegt zwischen 1,8 und 2,0, bei RNA-Proben sollte er über 2,0 liegen (Sambrook und Russel et al., 2001).

3.3.2 Enzymatische Restriktion von BAC-DNA

Zur Kontrolle der Integrität aufgereinigter BAC-Plasmide wurde die BAC-DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen verdaut und die Fragmente wurden über Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierfür wurde BAC-DNA in 60µl Ansätzen mit 5-20U Restriktionsenzym in entsprechendem Puffer verdaut. Die Inkubation erfolgte für 2-16h bei entsprechender Temperatur.

Standard-Ansatz:

xµl	BAC-DNA
6µl	10x Restriktionspuffer
3µl	Restriktionsenzym
ad 60µl	H ₂ O _{reinst.}

3.3.3 Native Gelelektrophorese von DNA

50x TAE-Puffer:

400mM	Tris
50mM	EDTAx2H ₂ O
ad.	H ₂ O _{demin.}

Lösung mit Eisessig auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren.

10x TBE-Puffer:

450mM	Tris
10mM	EDTAx2H ₂ O
450mM	Borsäure
ad.	H ₂ O _{demin.}

Lösung mit Eisessig auf pH 8,3 einstellen und autoklavieren.

10x Probenpuffer:

0,25%	Bromphenolblau (w/v)
40%	Saccharose (w/v)

Mit Hilfe der nativen Gelelektrophorese kann die Reinigung von linearen DNA-Fragmenten, Intaktheitsüberprüfungen, Konzentrationsbestimmungen, Größenabschätzungen von DNA-Fragmenten sowie präparative Auftrennungen von Nukleinsäuren erfolgen. In Agarose-Gelen werden DNA-Fragmente elektrophoretisch nach ihrer Größe hin aufgetrennt. Die

Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte standardgemäß in 1%-igen Agarose-Gelen. Für die Auftrennung von restringierten BAC-Plasmiden, die eine Fragmentgröße von 1-30kb besitzen, wurden 0,7%-ige Gele eingesetzt. Mini-Gele (10x6,5cm) dienen zur schnellen Kontrolle der PCR-Produkte oder der DNA nach Restriktion. Um das Einsinken der Nukleinsäuren in die Geltaschen zu ermöglichen wurden die Proben 1:10 mit Probenpuffer versetzt. Die Trennung der Fragmente wurde in 1xTAE-Puffer in horizontalen Submers-Elektrophoresekammern durchgeführt. Die Spannung (0,5-5V/cm Elektrodenabstand) wurde auf die Gel- bzw. Fragmentgröße angepasst.

Linearisierte BAC-DNA wurde in Maxi-Gelen (20x25cm) bei 4°C ü.N. aufgetrennt. Für ihre Auftrennung wurde 1xTBE-Puffer, der im Gegensatz zum TAE-Puffer eine höhere Pufferkapazität aufweist, als Laufpuffer eingesetzt (Gelherstellung siehe Gassen und Schimpf, 1999). Um die DNA-Banden im Gel sichtbar zu machen, wurde dem Gel Ethidiumbromid in einer Konzentration von 1µg/ml zugefügt. Ethidiumbromid ist ein Fluorophor, das in die DNA interkaliert und unter UV-Licht (560nm) angeregt wird.

3.3.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden vor der Sequenzierung mittels *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt. Hierbei wird die DNA in Anwesenheit von Guanidin-Thiocyanat und einer hohen Salzkonzentration an eine *Silica*-Gel-Membran gebunden, während Proteine, Salze und Oligonukleotide die Säule passieren. Mögliche Rückstände werden durch anschließendes Waschen entfernt. Die DNA wird unter basischen Bedingungen und Niedrig-Salzkonzentrationen von der Membran eluiert. Versuchsprotokoll siehe:

<http://www.qiagen.com/Products/DnaCleanup/GelPcrSiCleanupSystems/QIAquickPCRPurificationKit.aspx?r=926>)

3.3.5 Bakterienanzucht

3.3.5.1 Flüssigkulturen

LB-Medium:

10g	NaCl
10g	Bacto-Trypton
5g	Hefeextrakt
1000ml	H ₂ O _{demin.}

Lösung mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren.

Antibiotikastammlösung:

Chloramphenicol (Cam): 34mg/ml (in Ethanol (100%); 1:2000, $c_{\text{End}} = 70\mu\text{g/ml}$)

Kanamycin (Kan): 10mg/ml (in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst.}}$; 1:400, $c_{\text{End}} = 25\mu\text{g/ml}$)

Die Lösungen wurden sterilfiltriert und bei -20°C gelagert. Die Zugabe des Antibiotikums erfolgte nach dem Autoklavieren des Mediums.

Für die Herstellung von Flüssigkulturen wurde stets von einer einzelnen Kolonie einer frischen Plattenkultur ausgegangen. Mit sterilen Pipettenspitzen wurden die einzelnen Kolonien von der Kulturplatte gepickt, in Kulturröhrchen in 10ml LB-Medium (für *low-copy* Plasmide) gegeben und nach Bedarf mit Antibiotikum versetzt. Die Anzucht der Bakterien erfolgte ü.N. bei geeigneter Temperatur unter Schütteln (250U/min). Wurden mehr als 10ml der Flüssigkultur benötigt, so wurden 5ml Vorkultur angelegt und mit dieser nach etwa 6-stündiger Inkubation ein entsprechendes Volumen im Verhältnis 1:1000 angeimpft.

3.3.5.2 PlattenkulturenLB-Agar:

10g	NaCl
10g	Bacto-Trypton
5g	Hefeextrakt
15g	Bacto-Agar
ad. 1000ml	$\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$

Plattenkulturen werden zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet und dienen zur maximal zweiwöchigen Lagerung von Bakterien oder zur Selektion von Transformanden. Zur Herstellung der Agarplatten wurde LB-Agar durch Aufkochen verflüssigt und auf $40-45^\circ\text{C}$ wieder abgekühlt. Erst danach konnte die Zugabe des Antibiotikums erfolgen. Nachdem der noch flüssige LB-Agar in sterile Einweg-Plastikschalen gegossen wurde, konnte die Platte nach der Polymerisierung bei 4°C für mehrere Wochen gelagert werden. Die Plattenkulturen wurden aus Übernachtkulturen mittels Verdünnungsausstrich angelegt. Nach Transformation wurde die Bakterienkultur mit Hilfe eines Drigalski-Spatels auf der Agarplatte verteilt.

3.3.5.3 Dauerkulturen

Zur längeren, stabilen Lagerung von Bakterien wurden Dauerkulturen (Glycerol-Kultur) angelegt. Hierzu wurden $600\mu\text{l}$ einer frischen LB-Kultur in Kryoröhrchen überführt und mit $400\mu\text{l}$ 86%-igem Glycerin gemischt. Die Lagerung erfolgte anschließend bei -70°C .

3.3.6 Transformation elektrokompeterer Bakterienzellen

3.3.6.1 Herstellung elektrokompeterer Bakterien

Glycerinlösung:

10% Glycerin (v/v)

Von einer Plattenkultur wurde eine Einzelkolonie gepickt und mit dieser 5ml LB-Medium, welches gegebenenfalls mit entsprechendem Antibiotikum versetzt wurde, angeimpft. Die Inkubation erfolgte unter Schütteln ü.N. bei 37°C. Am nächsten Tag wurden 100ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum versetzt und 1:100 mit der Vorkultur überimpft. Die anschließende Inkubation erfolgte bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5. Danach wurde die Bakterienkultur für 15min auf Eis gestellt und für 15min bei 4000xg und 4°C zentrifugiert (Zentrifuge: Sorvall RC5 Plus, Rotor: SLA-3000). Die darauf folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis und mit gekühlter 10%-iger Glycerinlösung (v/v) durchgeführt. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet dreimal mit einem Kulturvolumen der Glycerinlösung gewaschen und am Ende in einem 1/100 Kulturvolumen in der Glycerinlösung aufgenommen. Die kompetenten Zellen wurden in 50µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

3.3.6.2 Elektrotransformation

Für die Elektroporation wurde ein Aliquot elektrokompeterer Bakterien (siehe 3.3.6.1) auf Eis aufgetaut und mit 1-5ng der zu transformierenden DNA gemischt. Der Ansatz wurde in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Ø 0,2cm) überführt, die Bakterien bei 2,5kV, 400Ω und 25mF transformiert (Gene Pulser) und der Ansatz sofort in 500µl LB-Medium aufgenommen. Die Bakterien wurden für 30-90min bei definierter Temperatur unter Schütteln inkubiert und anschließend auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen.

3.3.7 Isolation und Analyse von Nukleinsäuren

3.3.7.1 Schnelle Präparation von BAC-Plasmiden

Puffer-I:

10mM Na₂EDTAx2H₂O

25mM Tris

ad. H₂O_{demin.}

Lösung mit HCl auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren. Anschließend Zugabe von 100mg/ml RNase. Lösung bei 4°C lagern.

Puffer-II:

0,2M NaOH

1% SDS

ad. H₂O_{demin.}

Lösung autoklavieren und bei RT lagern.

Puffer-III:

3M KAcetat

ad. H₂O_{demin.}

Lösung mit Eisessig auf pH 5,5 einstellen, autoklavieren und bei 4 °C lagern.

Die mCMV-BAC-Plasmide besitzen eine Größe von etwa 240kbp. Um ihre Integrität zu erhalten müssen Scherkräfte durch Verzicht von Vortexen oder Verwendung von abgeschnittenen Pipettenspitzen vermieden werden. Zunächst wurde eine Übernachtskultur in 10ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum (siehe 3.3.5.1) angesetzt und davon eine Glycerol-Kultur (siehe 2.3.5.3) angelegt. Die restliche Kultur wurde für 10min bei 4500rpm und 4 °C (Heraeus Laborfuge 400R, Rotor 8172) pelletiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 250µl eiskaltem Puffer-I resuspendiert und in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt. Zur alkalischen Lyse wurden zu jedem Ansatz 350µl des Puffer-II hinzugegeben, die Ansätze vorsichtig invertiert und für 5min bei 20-22°C inkubiert. Nach der Zugabe von 350µl eiskaltem Puffer-III wurden während der folgenden 10-minütigen Inkubation auf Eis Proteine, chromosomale DNA und SDS ausgefällt. Diese können bei 14000rpm (Zentrifuge 5417R Eppendorf, Hamburg) und 4°C innerhalb von 10-15min pelletiert werden. Die Überstände mit der DNA wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und mit 700µl (0,8-faches Volumen) Isopropanol versetzt. Nach erneuter Zentrifugation bei 14000rpm und 4°C für 25min, wurde der Überstand vorsichtig entfernt und das DNA-Präzipitat mit 750µl 70%-igem Ethanol gewaschen (Zentrifugation für 10min bei 14000rpm und 4°C). Das Pellet wurde für etwa 10min luftgetrocknet und die DNA in 100µl Tris/HCl pH 8,5 gelöst (10min bei 37°C). Die Lagerung der BAC-DNA erfolgte bei 4°C.

3.3.7.2 Isolierung der Virus-DNA aus Überständen

Die virale DNA wurde mit Hilfe des *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* (Roche, Mannheim) aus Zellkulturüberständen infizierter Zellen isoliert. Im ersten Schritt wird die Viruslyse durch die vorhandene Proteinase K induziert und anschließend die DNA in Gegenwart von Poly(A)⁺ *Carrier*-RNA reversibel an eine Glasfaser-Membran gebunden. Die DNA wurde durch mehrmaliges Waschen von Salzen, Proteinen sowie weiteren Kontaminationen gereinigt und schließlich mittels Elutionspuffer von der Membran gelöst. Die mit dieser Methode isolierte DNA wurde als *Template* für Sequenzierungen eingesetzt oder diente zur Überprüfung der

Exzision von BAC-Sequenzen nach *in vitro*-Passagierung, der mit Hilfe der BAC-Technologie generierten, rekombinanten Viren.

Versuchsprotokoll siehe:

http://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS/napi_man/pdf/chaopter2/page_69-73.pdf

3.3.7.3 Maxipräparation von BAC-DNA

Die Aufreinigung von großen Mengen hochreiner BAC-DNA wurde mit Hilfe des *NucleoBond Kit PC 500* (Macherey und Nagel, Düren) durchgeführt. Zunächst wurde eine Vorkultur angelegt, die nach einer Inkubation ü.N. 1:100 in 500ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überimpft und für weitere 16h bei 37°C kultiviert wurde.

Die Bakterien wurden mit 5000xg für 10min bei 4°C (Zentrifuge: Sorvall RC5C Plus, Rotor: SLA-1500) pelletiert. Die weiteren Schritte erfolgten nach Herstellerprotokoll. Die BAC-DNA wurde schließlich in 150µl Tris/HCl pH 8,5 aufgenommen und bei 4°C gelagert.

Versuchsprotokoll siehe:

http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/UM_pDNA_NuBo.pdf

3.3.8 Polymerasekettenreaktion

Die Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde 1987 von Kay B. Mullis entwickelt und von Saiki et al. (1989) verbessert. Mit Hilfe der PCR können selektiv DNA-Bereiche amplifiziert werden. Hierfür werden sequenzspezifische Oligonukleotide (*Primer*) verwendet, die die Enden des zu amplifizierenden Bereichs definieren. Zunächst wird die doppelsträngige DNA bei 94-95°C denaturiert und anschließend auf eine *Primer*-abhängige *Annealing*-Temperatur herunter gekühlt. Nach der Hybridisierung der *Primer* an die nun einzelsträngig vorliegende DNA folgt die durch eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase (z.B: *Taq*-DNA-Polymerase) katalysierte DNA-Extension bei 72°C. Durch eine mehrfache Wiederholung der Schritte wird das erwünschte DNA-Fragment exponentiell amplifiziert. Die Anzahl der DNA-Moleküle verdoppelt sich im Idealfall in jeder Syntheserunde, wodurch theoretisch nach n Runden 2^n Amplifikate vorliegen. Um die Sequenzspezifität der *Primer* zu gewährleisten und eine bestmögliche Hybridisierung dieser an die DNA zu ermöglichen, musste bei der Wahl der *Primer* darauf geachtet werden, dass diese eine Mindestlänge von 16-20 Nukleotiden aufweisen und an den 3'-Enden ein Guanin oder Cytosin tragen.

HotStar Taq PCR Ansatz

<u>Komponente</u>	<u>Volumen/Reaktion</u>	<u>Endkonzentration</u>
10x PCR Puffer	5µl	1x
dNTP-Mix (10mM jedes)	1,5µl	400µM je dNTP
<i>Primer-for</i> (10pmol/µl)	1,5µl	0,3µM
<i>Primer-rev</i> (10pmol/µl)	1,5µl	0,3µM
HotStar Taq DNA-Polymerase	0,25µl	1,25U
H ₂ O _{reinst.}	Variabel	
Template DNA	Variabel, max. 5µl	100-1000ng genomische DNA 1-50ng Plasmid-DNA
	Endvolumen 50µl	

Standard HotStar Taq Profil

<u>Schritt</u>	<u>Zeit</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Bemerkung</u>
Initialer Aktivierungsschritt	15min	95°C	Aktivierung der HotStar Taq DNA-Polymerase
<i>3-Schritt Cycling</i>			
Denaturierung	30-60s	94°C	
<i>Annealing</i>	30-60s	50-68°C	in Abhängigkeit von der <i>Primer</i> -Sequenz
<i>Extension</i>	60s/1kbp	72°C	Zyklenzahl 30-35
Abschließende <i>Extension</i>	10min	72°C	
Ende	∞	4°C	

3.3.9 Quantitative *real-time* PCR (qPCR)

Zur Detektion des PCR-Amplifikats wird nach einer konventionellen PCR das PCR-Produkt auf ein Agarose-Gel aufgetragen. In der Endphase der PCR ist das Substrat aufgebraucht und die Polymeraseaktivität reduziert, dadurch erreicht die Amplifikation in dieser Phase ein Plateau. Die Bandenstärke gibt daher keine Aussage über die Ausgangskonzentration des DNA-*Templates* an. Bei der qPCR kann bereits während der exponentiellen Phase, die sich durch eine exakte Verdopplung (Reaktionseffizienz 100%) der PCR-Amplifikate auszeichnet, die Detektion der Amplikons erfolgen. Die Detektion erfolgt entweder sequenzspezifisch mit fluorogenen Sonden (z.B. TaqManTM-Sonden) oder sequenzunspezifisch mit Hilfe DNA-interkalierender Fluorochrome (z.B. SYBR Green). Anhand der Proportionalität von Fluoreszenzsignal und Kopienzahl des Zielmoleküls kann direkt die Ausgangskonzentration der DNA der zu untersuchenden Probe bestimmt werden. Für den Nachweis der BAC-Freiheit in den generierten mCMV-Rekombinanten fand eine qPCR mit TaqManTM-Sonden (*dual labeled probes*) Verwendung. Zur Überprüfung des Genom-zu-PFU-Verhältnis wurde

eine qPCR mittels *SYBR Green I* durchgeführt. Für den Nachweis der BAC-Freiheit sowie zur Bestimmung des Genom-zu-PFU-Verhältnis wurden die in Lemmermann et al. (2010b) beschriebenen Protokolle analog verwendet.

3.3.10 Herstellung rekombinanter mCMV mittels Zwei-Schritt-BAC-Mutagenese im *E.coli* Stamm DH10B

Mit Hilfe der Zwei-Schritt-BAC-Mutagenese wurde im ORF *m164* von mCMV ein D^d-restringiertes, antigenes Peptid gegen das K^b-restringierte Peptid SIINFEKL bzw. SIINFEKA ausgetauscht (Lemmermann et al. 2010a).

Das Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren 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. Die benötigten *Shuttle*-Plasmide wurden bereits vorher in unserer Arbeitsgruppe hergestellt (Lemmermann et al. 2010a).

I. Cotransformation des *Shuttle*-Plasmids und Bildung der Cointegrate

Elektrokompetente DH10B Bakterien, die das zu mutierende mCMV-BAC-Plasmid enthielten, wurden mit 1ng *Shuttle*-Plasmid-DNA elektrotransformiert (siehe 3.3.6.2.) und für 1h bei 30°C in LB-Medium (ohne Antibiotikum) inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf LB Cam/Kan-Platten ausgestrichen und für 30-48h bei 30°C inkubiert. Durch homologe Rekombination entstehen in diesem Schritt Cointegrate, in denen die *Shuttle*-Plasmid-DNA vollständig im mCMV-BAC-Plasmid integriert ist.

II. Anreicherung der Cointegrate und Entfernung der *Shuttle*-Plasmide

Mit Hilfe des Verdünnungsausstriches wurden zehn große Bakterienkolonien des Schrittes-I auf LB Cam/Kan-Platten ausgestrichen und ü.N. im Brutschrank bei exakt 43°C inkubiert. Bei dieser Temperatur können ausschließlich Bakterien, die die Cointegrate tragen, replizieren. In diesem Schritt ist die Bildung von großen Einzelkolonien wichtig, daher kann es nötig sein diesen Schritt mehrmals zu wiederholen.

III. Cointegrat-Auflösung

Es wurden zehn große Bakterienkolonien aus Schritt-II auf LB Cam-Platten mittels Verdünnungsausstrich ausplattiert und für etwa 30h bei 30°C kultiviert. Dieser Schritt dient zur Auflösung der Cointegrate durch eine erneute homologe Rekombination. Die entstandenen Kolonien sind eine Mischung aus Bakterien mit aufgelösten und intakten Cointegraten.

IV. Selektion gegen nicht-aufgelöste Cointegrate

Für eine Selektion gegen nicht-aufgelöste Cointegrate wurde jeweils ein Klon, der in Schritt-III gewachsenen Kolonien, von der LB Cam-Platte gepickt und mittels Verdünnungsausstrich auf LB Cam/5%-Saccharose-Platten ausgestrichen. Die Kultivierung erfolgte für weitere 30h bei 30 °C. Um eine bessere Selektion zu erhalten, wurde dieser Schritt zweimal wiederholt.

V. Identifikation der Bakterien mit aufgelöstem Cointegrat

Bakterien mit aufgelöstem Cointegrat sind sensitiv gegenüber Kan, da sie durch das Auflösen des Cointegrats die Kan-Resistenz verloren haben. Die Kolonien aus Schritt-IV wurden auf ihre Kan-Sensitivität hin untersucht. Hierzu wurden 100 große Kolonien gepickt und jeweils LB Cam/Kan-Platten und LB Cam-Platten beimpft. Die Kultivierung erfolgte ü.N. bei 37 °C. Mindestens 80% der Klone sollten gegenüber Kan sensitiv sein.

VI. Charakterisierung Kanamycin-sensitiver Klone

Zunächst wurde von zehn Kan-sensitiven Bakterienkolonien jeweils eine Übernachtskultur angesetzt. Am Folgetag wurde die BAC-DNA isoliert (siehe 3.3.7.1) und mittels Restriktionsanalyse charakterisiert. Zur Sicherung der Klone wurde von diesen eine Glycerinkultur angelegt. Durch die Restriktionsanalyse kann nur die globale Integrität des mCMV-Genoms kontrolliert werden. Um die Mutation im mCMV-Genom zu identifizieren, wurde die entsprechende DNA-Sequenz mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Statistisch gesehen sollten 50% der Klone das mutierte mCMV-Plasmid enthalten.

VII. Virusrekonstitution

Die abschließende Virusrekonstitution wurde in MEF durchgeführt. Dafür wurde die mCMV-BAC-DNA der positiv sequenzierten Klone isoliert (siehe 3.3.7.1) und die Integrität des BAC mittels Restriktionsanalyse überprüft. Wurde eine hohe DNA-Qualität im Agarose-Gel bestätigt, konnten MEF mit der mCMV-BAC-DNA transfiziert werden (siehe 3.1.4).

3.4 Immunologische Methoden

3.4.1 Isolation von Zellen aus Organen

Medium:

RPMI + 5% (v/v) FCS

MEM α + 7,5% (v/v) FCS

FACS-Puffer:

1% FCS

in sterilem PBS

5x MACS-Puffer:

10mM	EDTA
2,5% (w/v)	BSA
ad. 500ml	PBS

Die Lösung auf pH 7,2 einstellen, sterilfiltrieren und bei 4°C lagern. Vor Gebrauch 1:5 mit sterilem PBS verdünnen.

Milz:

Milzzellen wurden für den *in vivo* Proliferations-Assay (siehe 3.6.7) und für die Anlage sowie Restimulation von mCMV-spezifischen polyklonalen CTLL (siehe 3.4.4) benötigt. Aus der Milz isolierte CD8 T-Zellen wurden u.a. als Effektorzellen im *ELISpot-Assay* (siehe 3.4.6), im *in vitro* Proliferations-Assay (siehe 3.4.8) sowie als CTL bei adoptiven Transfers (siehe 3.6.8 und 3.6.9) eingesetzt. Je nach Verwendungszweck wurden die Milzen aus nicht-infizierten, akut- oder latent infizierten Tieren aufgearbeitet.

Die Milzen wurden unter sterilen Bedingungen entnommen und in ein mit RPMI befülltes Röhrchen gegeben. Die Organe wurden mit Hilfe eines Stempels einer 2ml Spritze auf einem sterilen Metallsieb zerrieben, in Medium aufgenommen und die Milzzellen wurden in ein 50ml-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden pelletiert (5min, 681xg) und anschließend zweimal mit Medium gewaschen. Das Pellet wurde in 5ml MEM α bzw. in entsprechendem Puffer aufgenommen. Bei anschließender magnetischen Zellseparation (MACS) (siehe 3.6.3) wurden die Zellen in MACS-Puffer, für das Markieren mit Carboxyfluoreszein Succinimidyl Ester (CFSE) (siehe 3.6.7) in PBS und für *fluorescence activated cell sorting* (FACS)-Analysen in FACS-Puffer aufgenommen. Zur Entfernung von Geweberesten wurden die Zellen über ein 40 μ m *Cell Stainer* gegeben, anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen wurden auf die benötigte Konzentration eingestellt. Bei einem unbehandelten Tier sind etwa 1×10^8 Zellen je Milz zu erwarten. Je nach Verwendung wurden die Milzzellen in Kultur genommen, CFSE-gelabelt (siehe 3.6.7), für FACS-Analysen (siehe 3.4.9) mit entsprechenden AK markiert oder mittels MACS weiter aufgereinigt (siehe 3.6.3).

LK:

In den LK wurde die peptidspezifische *in vivo* Proliferation von transferierten CFSE-markierten CD8 T-Zellen (siehe 3.6.7) nachgewiesen.

Hierzu wurden LK-Zellen nach Infektion (siehe 3.6.2.1) bzw. nach Immunisierung (siehe 3.6.4) aus dem poplitealen LK isoliert. Der LK wurde entnommen und in RPMI überführt. Bei der Entnahme sollte darauf geachtet werden, dass so wenig Fettgewebe wie möglich mitgenommen wird, da bei der folgenden FACS-Analyse die Nadel des FACS-Gerätes durch zu viel Fettgewebe in der Probe verstopfen kann. Der LK wurde mit Hilfe eines Stempels einer 2ml Spritze auf einem sterilen Metallsieb zerrieben, in Medium aufgenommen und die LK-Zellen wurden in ein 50ml-Röhrchen überführt. Die LK-Zellen wurden nach der

Zentrifugation (5min, 681xg) in 0,5ml FACS-Puffer aufgenommen und über ein 40µm *Cell Strainer* gegeben. Nach Ermittlung der Zellzahl wurden die Zellen auf die benötigte Konzentration eingestellt und für folgende FACS-Analysen (siehe 3.4.9) mit Fluorochromgekoppelten AK markiert.

3.4.2 Gewinnung von Knochenmarkzellen (KMZ)

Spüllösung:

2,5% (v/v) FCS in PBS

Die Lösung vor Gebrauch frisch und steril ansetzen.

MACS-Puffer:

(siehe 3.4.1)

Die Isolation von KMZ erfolgte aus Spendertieren im Alter von 3-6 Monaten. Nach zervikaler Dislokation wurden die Hinterbeine der Tiere beidseitig entfernt, der *Femur* wurde von der Hüftgelenkspfanne abgetrennt und *Femur* sowie *Tibia* wurden entnommen. Die Knochen wurden in Spüllösung gesammelt, um ein Austrocknen des Knochenmarks (KM) zu verhindern. Anschließend wurden die Epiphysen abgeschnitten und das KM wurde aus den Markhöhlen der Knochen mit einer 0,4x12mm Kanüle gespült. Nach zweimaligem Waschen der KMZ mit PBS (10min bei 300xg) wurde das Zellpellet in 10ml MACS-Puffer aufgenommen und über ein 40µm *Cell Strainer* gegeben. Die Zellzahl wurde ermittelt und aus den KMZ wurden die CD8- sowie CD4 T-Zellen mittels MACS depletiert (siehe 3.4.3.4).

3.4.3 MACS

Medien:

MEMα + 7,5% (v/v) FCS

MACS-Puffer:

(siehe 3.4.1)

10 x autoMACS-Laufpuffer:

20mM EDTA

ad. 500ml PBS

Lösung auf pH 7,2 einstellen, steril filtrieren und vor Gebrauch 1:10 mit sterilem PBS verdünnen.

Lagerung der Lösungen bei 4°C.

Bei der magnetischen Zellseparation unterscheidet man zwischen positiver- und negativer Selektion. Bei der positiven Selektion werden Zellpopulationen spezifisch markiert und

isoliert. Die Markierung erfolgt mit (*para*)magnetischen *Microbeads*, die eine Größe von 50nm besitzen und am Fc-Teil monoklonaler AK gebunden sind. Die mit den *Microbeads* markierten Zellen bleiben innerhalb eines Magnetfeldes in der Separations-Säule hängen, während unmarkierte Zellen diese passieren. Die markierten Zellen werden anschließend außerhalb des Magnetfeldes durch Druck von der Säule gespült und in einem Röhrchen aufgefangen (Miltenyi et al., 1990). Mit dieser positiven Selektion wurden CD8 T-Zellen aus Gesamt-Milzzellen isoliert.

Die Selektion erfolgte entweder manuell oder mittels *autoMACS*. Der *autoMACS* erlaubt eine automatisierte Zellseparation. Die Anreicherung von CD8 T-Zellen erfolgte hierbei unter Verwendung von zwei Säulen.

Bei der negativen Selektion (Depletion) können Zellpopulationen aus einem Gemisch entfernt werden. Die zu entfernenden Zellen werden mit den *Microbeads* markiert und im Magnetfeld zurückgehalten, während nicht-markierte Zellen die Säule passieren. In dieser Arbeit wurden mittels negativer Selektion CD8- und CD4 T-Zellen aus isolierten KMZ entfernt.

3.4.3.1 Positive Selektion per MACS

Aufgearbeitete, gezählte Milzzellen (siehe 3.4.1) wurden pelletiert und mit MACS-Puffer und den *Microbeads* (für CD8; Ly-2) in folgendem Verhältnis aufgenommen: 10µl *Microbeads*/90µl MACS-Puffer/10⁷ Zellen. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 4°C unter Schütteln wurden die Zellen mit 10-fachem Volumen an MACS-Puffer gewaschen (10min bei 300xg) und in 1ml MACS-Puffer/1x10⁸ Zellen aufgenommen. Für die positive Selektion wurden LS-Säulen (*large cells columns for separation*), deren Bindekapazität 1x10⁸ markierte Zellen/2x10⁹ Gesamtzellen beträgt, verwendet. Nach dem Waschen und Äquilibrieren der Säulen mit 2ml MACS-Puffer wurden die markierten Zellen auf die Säule überführt und zweimal mit 2ml MACS-Puffer gespült. Der Durchfluss wurde bei 4°C gelagert und die Zellen wurden anschließend in 2ml MACS-Puffer eluiert. Um eine höhere Reinheit zu erzielen, wurde die Anreicherung wiederholt. Die eluierten Zellen wurden mit 5ml MEMα gewaschen (4min bei 423xg), in 1ml MEMα resuspendiert und die Zellzahl wurde bestimmt. Ein Aliquot von 1x10⁶ Zellen wurde jeweils vor und nach dem Anreichern zur Prüfung der Reinheit mittels zytofluorometrischer Analyse (siehe 3.4.9.1) entnommen.

3.4.3.2 Positive Selektion per *autoMACS*

Die positive Selektion mittels *autoMACS* wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Milzzellen wurden wie in 3.4.3.1 beschrieben mit *Microbeads* markiert und die CD8 T-Zellen über zwei Säulen (Programm: „possel-D“) angereichert. Die angereicherten Zellen wurden als positive Fraktion aufgefangen. Die Zellen wurden nach der Zugabe von 5ml MEM α pelletiert (4min bei 423xg), in 1ml MEM α resuspendiert, die Zellzahl wurde bestimmt und die Zellen wurden auf die benötigte Konzentration eingestellt. Der Reinheitsgrad der Probe wurde zytofluorometrisch getestet (siehe 3.4.9).

Es sollte darauf geachtet werden, dass bei mehreren Durchläufen das Gerät zwischen den Runden gespült wird, um Kontaminationen der zu untersuchenden Gruppen zu vermeiden. (siehe auch: http://www.miltenyibiotec.com/download/datasheets_en/49/MiltenyiBiotec_DataSheet_CD8a-%28Ly-2%29-MicroBeads,-mouse_130-049-401.pdf)

3.4.3.3 Depletion von CD8- und CD4 T-Zellen aus KMZ

Aufgearbeitete, gezählte KMZ (siehe 3.4.2) wurden pelletiert und für die Depletion von CD8- sowie CD4 T-Zellen mit MACS-Puffer und den *Microbeads* in folgendem Verhältnis gemischt: 10 μ l CD4 *Microbeads*/10 μ l CD8 *Microbeads*/80 μ l MACS-Puffer/1x10⁷ KMZ. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei 4°C unter Schütteln wurde der Ansatz einmal mit 50ml MACS-Puffer gewaschen (10min bei 300xg) und das Pellet in 0,5ml MACS-Puffer/1x10⁸ KMZ eingestellt. Für die Depletion per *handMACS* wurden LD-Säulen (*large cells columns for depletion*), deren Kapazität 1x10⁸ markierte Zellen/5x10⁸ Gesamtzellen beträgt, verwendet. Die markierten Zellen wurden über eine LD-Säule gegeben und anschließend wurde die Säule zweimal mit 2ml MACS-Puffer gewaschen. Die markierten CD8- und CD4 T-Zellen werden in der Matrix der Säule zurückgehalten und damit aus dem Zellansatz depletiert. Der Durchfluss wurde zweimal mit 50ml PBS gewaschen (10min bei 300xg), die KMZ wurden in 10ml PBS aufgenommen, die Zellzahl wurde bestimmt und die KMZ wurden in benötigter Konzentration eingestellt. Ein Aliquot von 1x10⁶ Zellen wurde jeweils vor und nach der Separation entnommen und die Depletion zytofluorometrisch überprüft (siehe 3.4.9).

3.4.4 Herstellung einer epitopspezifischen CTLL

Lösungen:

Erythrozyten-Lysepuffer

Peptidstock in PBS

Medien:

RPMI + 5% FCS (v/v)

MEM α + 7,5% (v/v) FCSMEM α + 7,5% (v/v) FCS + 100U/ml rhIL-2

Für die Anlage von polyklonalen, peptidspezifischen CTLL wurden Milzen aus infizierten *Memory*-Mäusen, d.h. Mäusen, die mindestens drei Monate mit mCMV infiziert waren, benötigt. Die Milzzellen wurden in IL-2 haltigem Medium kultiviert und dabei im Abstand von je einer Woche mit entsprechendem, synthetischen Peptid sowie Milzzellen restimuliert. Für die Anlage der CTLL wurden drei Milzen isoliert, aufgearbeitet (siehe 3.4.1) und das Pellet wurde nach der ersten Zentrifugation in 2ml Erythrozyten-Lysepuffer/Milz resuspendiert. Während der Inkubation von 5-10min bei 20-22°C werden die Erythrozyten durch osmotische Lyse zerstört, andere Zellen bleiben hingegen intakt. Nach zweimaligem Waschen mit RPMI wurde das Pellet in MEM α aufgenommen, über ein 40 μ m *Cell Strainer* gegeben und die Zellzahl ermittelt. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von 5×10^7 Zellen/1,5ml/*Well* eingestellt, das synthetische mCMV-Peptid wurde in definierter Molarität direkt hinzugegeben und die Zellen wurden in 24-*Well*-Platten ausgesät. Nach vier Tagen wurden 0,5ml MEM α + IL-2 je *Well* hinzugefügt. Alle drei bis vier Tage wurde die Dichte der Zellen überprüft, das Medium gewechselt bzw. die Zellen wurden gesplittet. Eine Woche nach Anlange der CTLL erfolgte die erste Restimulation, bei der Milzzellen einer unbehandelten Maus als Stimulatorzellen verwendet wurden. Die Milzzellen wurden in einer Dichte von 5×10^5 /ml eingestellt und letal (30Gy; [137 Cs]-Quelle) bestrahlt. Anschließend wurde synthetisches Peptid zu den Stimulatorzellen gegeben. Die CTL wurden auf neue 24-*Well*-Platten ausgesät und 1ml der Stimulatorlösung wurde pro *Well* verteilt. Bei gutem Wachstum und großer Anzahl an spezifischen T-Zellen, die im Mikroskop als kleine wurmförmige Zellen zu sehen sind, konnte bereits nach der zweiten Restimulation die zytolytische Aktivität getestet werden (siehe 3.4.5).

3.4.5 Zytolysetest ([51 Cr]-*Release-Assay*)Medium:

RPMI + 5% FCS (v/v)

Der Zytolysetest (Brunner et al., 1968; Dunkley et al., 1974) wird zur Bestimmung der zytolytischen Aktivität von peptidspezifischen CTLL (siehe 3.4.4) herangezogen. Bei diesem Test werden APC mit [51 Cr] radioaktiv markiert, mit mCMV-spezifischem Peptid beladen und anschließend mit den T-Zellen inkubiert. Durch die zytolytische Aktivität der T-Zellen werden die APC lysiert und das [51 Cr] in den Überstand freigesetzt. Die Menge des freigesetzten

[⁵¹Cr] ist proportional zur Zahl lysierter Zellen und kann im *Gamma-Counter* quantifiziert werden.

Bei der Messung müssen verschiedene Kontrollen mitgeführt werden. Für die *low control* (lc) bzw. *high control* (hc) werden APC ohne Effektoren eingesetzt. In der hc wird die Gesamtaktivität von 1×10^3 Zellen bestimmt, in der lc die durch Spontanlyse freigesetzte Radioaktivität im Überstand. Zur Bestimmung der unspezifischen Lyse wird eine *negative fraction* (nf) mitgeführt, bei der Zielzellen und Effektoren ohne Peptid inkubiert werden. Mit Hilfe der hc und lc lässt sich die spezifische Lyse der zu untersuchenden CTLL durch folgende Formel berechnen:

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

Die APC wurden geerntet, ihre Zellzahl wurde bestimmt, 1×10^6 Zellen wurden in ein 1,5ml Eppendorfgefäß gegeben und mit $100 \mu\text{Ci}$ [⁵¹Cr] markiert. Die Zellen wurden mit dem gleichen Volumen an [⁵¹Cr] 1:1 versetzt und für 1,5h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz dreimal gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Bevor die APC in einer 96-Well-Platte exogen mit synthetischem Peptid beladen wurden, wurde in der Platte eine \log_{10} Titration des Peptids hergestellt. Zum Peptidansatz, der in Triplikaten und einem Volumen von $100 \mu\text{l}$ angelegt wurde, wurden die APC in einer Dichte von $1 \times 10^3 / 50 \mu\text{l}$ hinzugegeben. Während der Inkubation (30min bei 20-22°C) wurde die CTLL geerntet, dreimal mit Medium gewaschen und auf eine Konzentration von $1,5 \times 10^4 / 50 \mu\text{l}$ eingestellt. Zu den exogen beladenen APC wurden $50 \mu\text{l}$ der CTLL pipettiert und zur besseren Kontaktaufnahme der Effektoren mit den APC wurde der Ansatz für 5min bei 100xg zentrifugiert. Nach einer Inkubation für 3,5h bei 37°C wurden die Zellen pelletiert (5min bei 500xg), je $100 \mu\text{l}$ des Überstands in *Counter*-Röhrchen überführt und die freigesetzte Radioaktivität wurde im *Gamma-Counter* gemessen. Für die Messung der hc sowie lc wurden 1×10^3 APC/ $200 \mu\text{l}$ ohne Effektoren und für die nf 1×10^3 APC/ $1,5 \times 10^4$ CTLL/ $200 \mu\text{l}$ in jeweils 12-facher Wiederholung eingesetzt.

3.4.6 Enzyme linked immuno spot-Assay (ELISpot-Assay)

Medien:

RPMI + 5% FCS (v/v)

MEMα + 7,5% (v/v) FCS

Blockierungspuffer:

MEMα + 10% (v/v) FCS

Waschpuffer:

0,25% Tween20 (v/v) in PBS

Lösungen:

Alkohol: Ethanol 35% (v/v)
Enzym: Streptavidin-Alkalin-Phosphatase (Gebrauchslösung: 1:1000 in PBS)
Substrat: BCIP/NBTplus (vor Gebrauch sterilfiltrieren)

Antikörper:

Primär-AK: anti-Maus IFN- γ (0,5 μ g/ml in PBS)
Sekundär-AK: anti-Maus IFN- γ biotinyliert (1 μ g/ml + 0,5% BSA in PBS; frisch ansetzen)

Der *ELISpot-Assay* dient zur Detektion von IFN- γ produzierenden Zellen auf Einzelzellebene (Huang et al., 1995). Im Gegensatz zum *ELISA* (*Enzyme linked immunosorbent assay*) wird die Anzahl der Zytokin-sezernierenden Zellen im Ansatz und nicht die Gesamtmenge des sezernierten Zytokins in Zellkulturüberständen bestimmt.

Bei dieser Methode bindet das von aktivierten Effektorzellen sezernierte IFN- γ an einen an eine Mikrotitermembran gebundenen AK. An diesen Antigen-AK-Komplex bindet wiederum ein biotinylierter, sekundärer AK. Das IFN- γ wird mit Hilfe des Enzyms und des Substrats detektiert, indem nach der Enzym-Substrat-Reaktion an der Stelle des IFN- γ ein blauer Punkt (*Spot*) zu sehen ist. Dabei entspricht ein *Spot* einer aktivierten Effektorzelle und die *Spot*-Größe korreliert mit der Menge an Zytokin (Czerkinsky, 1988; Miyahira, 1995).

In dieser Arbeit wurde der *ELISpot-Assay* verwendet, um die Frequenz epitopspezifischer CD8 T-Zellen immunisierter (siehe 3.6.4) oder mCMV-infizierter (siehe 3.6.2.1) Mäuse zu bestimmen. Zudem wurde diese Methode herangezogen, um die Aviditäten peptidspezifischer CTLL zu vergleichen. Hierfür wurden APC mit titrierten Mengen an synthetischem Peptid beladen und zur Stimulation der Effektoren eingesetzt.

Für das *Coating* der *ELISpot*-Platten mit dem primären AK wurde die Membran mit 20 μ l 35%-igem Ethanol/*Well* für exakt 1min aktiviert, die Platte sofort ausgeklopft, dreimal mit Waschpuffer (200 μ l/*Well*) gewaschen und mit 55 μ l des primären AK/*Well* ü.N. bei 4°C inkubiert. Die Mikrotiterplatte wurde zweimal mit A. bidest. (200 μ l/*Well*) gewaschen und die Membran zur Blockierung der freien, unspezifischen Bindestellen mit Blockierungspuffer (200 μ l/*Well*) für mindestens 2h bei 37°C inkubiert. Währenddessen wurden die APC (EL-4 Zellen) geerntet, pelletiert (5min bei 423xg), in 10ml MEM α resuspendiert und auf eine Konzentration von 1x10⁵ Zellen/50 μ l eingestellt. Zur exogenen Peptidbeladung der APC wurden 90 μ l Zellsuspension je *Well* in eine 96-*Well*-Platte pipettiert, in der die Peptide in einer Konzentration von 10⁻⁶M bzw. in einer log₁₀ Titration in 10 μ l/*Well* vorgelegt wurden und der Ansatz wurde für 1h bei 20-22°C inkubiert. Anschließend wurden die entsprechenden Effektoren vorbereitet und titriert auf die *ELISpot*-Platte gegeben, um eine zählbare Dichte der *Spots* zu erhalten. Wurden CTLL als Effektorzellen verwendet, so wurden diese geerntet, dreimal mit MEM α gewaschen (5min bei 423xg) und in 1ml MEM α aufgenommen. Sollten *ex vivo* isolierte CD8 T-Zellen als Effektoren eingesetzt werden, dann wurden die Milzen

entnommen, aufgearbeitet (siehe 3.4.1) und die CD8 T-Zellen mittels MACS (siehe 3.4.3) isoliert. Die exogen beladenen APC wurden auf die *ELISpot*-Platte überführt (50µl/*Well*), anschließend wurden die Effektoren (100µl/*Well*) von niedrig zu hoher Peptidkonzentration hinzu pipettiert und die Platte wurde für etwa 16h bei 37°C inkubiert. Je Effektor-Konzentration wurde ein Triplikat hergestellt. Nach der Inkubation wurde die *ELISpot*-Platte zehnmal mit Waschpuffer gewaschen (200µl/*Well*) und für 2h bei 37°C mit dem sekundären AK (55µl/*Well*) inkubiert. Nach erneutem, sechsmaligem Waschen wurden 100µl des Enzymansatzes/*Well* pipettiert und die Platte wurde für 45min bis maximal 1h bei 20-22°C inkubiert. Die Inkubation sollte 1h nicht überschreiten, da bei längerer Inkubation der Hintergrund deutlich zunimmt. Die Platte wurde dreimal mit Waschpuffer, danach dreimal mit PBS gewaschen und anschließend 100µl des Substrats (BCIP/NBTplus)/*Well* verteilt. Die Entwicklungsdauer erfolgte bei 20-22°C und variierte von 20-40min. Sobald die *Spots* gut sichtbar waren wurde die Platte dreimal mit A. bidest. (200µl/*Well*) gewaschen, der *Underdrain* abgezogen, die Membran unter fließendem Leitungswasser gründlich gespült und ü.N. im Dunkeln bei 20-22°C getrocknet. Die sichtbaren *Spots* auf der Membran wurden bei 10-facher Vergrößerung mittels Stereomikroskop ausgezählt.

Die Bestimmung der Frequenz der IFN-γ sezernierenden CTL erfolgte mit Hilfe einer Regressionsanalyse. Dabei wurde die Zahl der Effektorzellen auf der x-Achse und die zugehörige *Spot*-Frequenz auf der y-Achse abgetragen. Die zugehörige Regressionsgerade wurde über die Geradengleichung $y=ax$ beschrieben. Anhand dieser Gleichung konnte die *most probable number* (MPN) der *Spot*-Frequenz ermittelt werden. Die Geradengleichung wurde mit der Software Mathematica 7 (Wolfram Research Inc., Champaign, IL) bestimmt. Das 95%-ige Konfidenzintervall und der zugehörige p-Wert wurden ebenfalls errechnet.

3.4.7 Zielzellen für peptidspezifische CTL

In dieser Arbeit wurden APC benötigt, um die zytolytische Aktivität von CTLL (siehe 3.4.5) sowie die Spezifität von CD8 T-Zellen zu untersuchen. Die APC wurden entweder exogen mit Peptid (Antigen) beladen oder mit DB zur Präsentation von endogen prozessierten Antigenen inkubiert.

3.4.7.1 Endogene Beladung von MEF durch DB

Medium:

MEMα + 7,5% (v/v) FCS

MEF wurden in 24-Well-Platten kultiviert und bei einer Konfluenz von etwa 80% mit den DB inkubiert. Dazu wurde der Überstand der MEF abgesaugt und die DB wurden in einer Konzentration von 1,5µg/200µl Medium/Well hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 1,5h bei 37°C wurde das Volumen in den Well auf 1ml mit MEMα aufgefüllt. Die Zellen wurden für weitere 24h bei 37°C kultiviert, bevor sie im *in vitro* CFSE-Proliferations-Assay eingesetzt wurden (siehe 3.4.8).

3.4.7.2 Exogene Beladung von MEF mit synthetischem Peptid

Medium:

MEMα + 7,5% (v/v) FCS

Um Fibroblasten exogen mit Peptid zu beladen, wurden MEF trypsinisiert und in 1ml Medium mit der entsprechenden Molarität an synthetischem Peptid für 1h bei 20-22°C inkubiert. Dabei wurde der Ansatz alle 15min geschüttelt. Nach viermaligem Waschen (2min bei 423xg) der Zellen mit je 1ml MEMα, wurde die Zellzahl bestimmt. Für den *in vitro* CFSE-Proliferations-Assay (siehe 3.4.8) wurden die Zellen in einer Konzentration von 4×10^5 MEF/ml eingestellt und davon wurde 1ml/Well einer 24-Well-Platte verteilt. Zur Adhäsion und Regeneration der MEF wurden die Zellen für 6h bei 37°C kultiviert. Erst danach wurden die CFSE-markierten CD8 T-Zellen (siehe 3.4.8) hinzugegeben.

3.4.8 *In vitro* CFSE-Proliferations-Assay

Medium:

RPMI + 5% (v/v) FCS

MEM α + 7,5% (v/v) FCS

CFDA-SE-Stocklösung:

10mM Carboxyfluoreszein Diazetat Succinimidyl Ester (CFDA-SE)

Die Stocklösung wird vor Gebrauch 1:2000 mit sterilem PBS verdünnt, um eine Arbeitslösung von 5µM zu erhalten.

Waschlösungen:

100% FCS

10% FCS in PBS

5% FCS in PBS

FACS-Puffer:

(siehe 3.4.1)

Im CFSE-Proliferations-Assay kann untersucht werden ob CD8 T-Zellen durch Antigenkontakt zur Proliferation angeregt werden. Für den *in vitro* Proliferations-Assay werden CD8 T-Zellen aus der Milz isoliert (siehe 3.4.2.2) und mit CFDA-SE (siehe 2.9) markiert. CFDA-SE ist ein Farbstoff, der die Zellmembran passiert und an freie Amine von zytoplasmatischen Proteinen bindet. Dort werden zwei Acetatgruppen des CFDA-SE durch intrazelluläre Esterasen abgespalten, wodurch das CFDA-SE zum nicht membrangängigen CFSE umgewandelt wird. Der Farbstoff ist über einen langen Zeitraum stabil im Zytoplasma nachweisbar und wird bei Zellteilung jeweils zur Hälfte an die Tochterzellen weitergegeben. CFSE markierte Zellen können im Durchflusszytometer im FL-1-Kanal identifiziert werden (Lyons et al., 1994; Parish et al., 2009; Quah et al., 2007; 2010). In dieser Arbeit wurde der *in vitro* Proliferations-Assay verwendet, um die epitopspezifische Proliferation von SIINFEKL-spezifischen CD8 T-Zellen durch DB beladene MEF zu untersuchen.

Für die CFSE-Markierung von CD8 T-Zellen wurden Milzen von OT-I Mäusen entnommen und die CD8 T-Zellen isoliert (siehe 3.4.2.3). Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen (5min, 681xg), das Pellet wurde in 5ml PBS resuspendiert, die Zellzahl ermittelt und die Zellen wurden auf eine Konzentration von 1×10^6 /ml mit PBS eingestellt. Es ist zu beachten, dass die CFSE-Markierung zu einem Verlust von 50% der eingesetzten Zellen führen kann. Die CFDA-SE-Arbeitslösung wurde in einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ in PBS angesetzt und mit dem gleichen Volumen Zellsuspension (1:1) gemischt, sodass eine Endkonzentration von $2,5 \mu\text{M}$ CFDA-SE erreicht wurde. Nach einer exakt 4-minütigen Inkubation bei 37°C wurde der Markierungsvorgang durch die Zugabe von 2-fachem Volumen an FCS gestoppt. Nach einer Zentrifugation von 5min bei 624xg wurden die Zellen zuerst mit 10%-igem FCS/PBS, danach mit 5%-igem FCS/PBS und schließlich mit 100%-igem PBS gewaschen. Diese Waschschrte sorgen für verbesserte Populationstrennung in der Zytofluorometrie. Anschließend wurden die T-Zellen pelletiert (5min bei 624 x g) und auf eine Konzentration von 5×10^5 Zellen/0,5ml eingestellt.

Die Überstände der vorbehandelten MEF (siehe 3.4.7.1) wurden nun abgenommen, die Zellen einmal mit MEM α gewaschen und 0,5ml der T-Zell-Lösung wurde auf die MEF pipettiert. Danach wurden 1ml MEM α /Well hinzugegeben und die Zellen bei 37°C inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die T-Zellen geerntet, einmal mit FACS-Puffer gewaschen und das Pellet wurde in 0,5ml FACS-Puffer resuspendiert. Die Proliferation der T-Zellen wurde zytofluorometrisch visualisiert.

3.4.9 Zytofluorometrische Analyse

FACS-Puffer:

(siehe 3.4.1)

Lösungen:

IsoFlow Sheat Fluid

Coulter Clenz

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann neben der Analyse der physikalischen Eigenschaften einer Zelle, die Zellzahl einer Probe bestimmt werden. Der Nachweis sowie die Quantifizierung von intra- und extrazellulären Proteinen erfolgt durch fluorochrommarkierte AK, die an ihr entsprechendes Antigen binden.

Die markierten Zellen werden im Durchflusszytometer (FC-500; Beckman Coulter) vereinzelt in einem Zelltransportsystem in partikelfreier Flüssigkeit transportiert und für die Messung schließlich in einem laminaren Flüssigkeitsstrom an einem Laserlicht vorbei geführt. Durch den Laser wird das Fluorochrom angeregt, das danach Licht einer definierten Wellenlänge emittiert. Das emittierte Licht wird von einem Linsensystem mit speziellen Filtern auf Photomultiplier gelenkt, die es detektieren, verstärken und in ein elektronisches Signal umwandeln. Da sich die Emissionsspektren verschiedener Fluorochrome überlappen, müssen diese während der Analyse kompensiert werden. Bei Mehrfachfärbungen ist bei der Wahl der Fluorochrome darauf zu achten, dass diese Überlappung so gering wie möglich ist. Überlappende Anteile werden durch Kompensation von einander subtrahiert.

Die Bestimmung der Größe und Granularität einer Zelle erfolgt durch die Analyse des Streulichts und ist fluoreszenzunabhängig. Die Zellgröße wird über das Vorwärtsstreulicht im FSC (*forward scatter*), des in einem Winkel von 2° - 10° gebeugten Lichts detektiert, bestimmt. Das in einem Winkel von 90° gebrochene Seitwärtsstreulicht, das im SSC (*sideward scatter*) bestimmt wird, stellt ein Maß für die Granularität der Zellen dar.

Für die Oberflächen-Markierung wurden 1×10^6 Zellen in FACS-Puffer in einem FACS-Röhrchen aufgenommen, pelletiert (5min bei 260xg) und mit Fc-Block (anti-CD16/CD32) in einer Konzentration von $1 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ zur Blockierung unspezifischer Fc-Rezeptor-Bindungen für 10min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen mit AK in definierter Konzentration versetzt und der Ansatz wurde für weitere 30min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden mit 1ml FACS-Puffer gewaschen (5min bei 260xg), das Pellet wurde in 0,5ml FACS-Puffer aufgenommen und bis zur Messung dunkel bei 4°C gelagert. Wurde MHC Dextramer SIINFEKL verwendet, so wurden die Zellen nach dem Blockieren einmal gewaschen (5min bei 300xg). Anschließend wurden $10 \mu\text{l}$ Dextramer hinzu gegeben und der Ansatz wurde für 10min bei 20°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Fluorochrommarkierten AK in definierter Konzentration hinzu gegeben und der Ansatz wurde für 20min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben gewaschen und in Puffer aufgenommen. Die Überprüfung von unspezifischen Bindungen erfolgte unter Verwendung eines nicht-bindenden AK des gleichen Isotyps (Isotypkontrolle). Vor dem Gebrauch eines

AK ist die einzusetzende AK-Konzentration durch Titration zu bestimmen. Die in dieser Arbeit verwendeten AK sind in 2.1.8.1 aufgelistet.

3.5 Histologische Methoden

3.5.1 Immunhistochemie

10x BSA-TBS: Stammlösung

10% BSA in 1xTBS

Lösung vor Gebrauch 1:10 mit 1xTBS verdünnen und Lösungen bei -20° lagern.

4%-ige Formalinlösung:

66 mM KH_2PO_4

84 mM Na_2HPO_4

37% (v/v) Formalin

in A. bidest.

Lösung mit NaOH auf pH 7,4 einstellen.

4% gepuffertes Formalin (v/v):

66mM KH_2PO_4

84mM Na_2HPO_4

in A. bidest.

11% 37%-iges Formalin

Lösung auf pH 7,4 einstellen.

Methanol- H_2O_2 -Block:

30ml Methanol

30ml PBS

1ml 30%-iges H_2O_2 (v/v)

10x TBS-Puffer (*Tris Buffered Saline*): Stammlösung

1,5mM NaCl

1M Tris-HCl

in A. bidest.

Lösung mit HCl auf pH 7,4 einstellen, bei 25° lagern und vor Gebrauch 1:10 mit A. bidest. verdünnen.

Trypsinlösung (w/v)

3,4mM EDTA

2,7mM KCl

1,5mM KH_2PO_4

137mM NaCl

8,1mM Na_2HPO_4

in A. bidest.

Lösung mit NaOH auf pH 7,4 einstellen, autoklavieren und 1,25g Trypsin (1:250; Difco, USA)/l einrühren. Die Lösung wird bei 4 °C gelagert.

AK:

Primäre AK: anti-mouse IE1 (Croma 101); anzuwenden 1:500 verdünnt in 1:10 verdünntem Kaninchenserum (in 1% (v/v) BSA-TBS)

Sekundäre AK: Ziege-anti-Maus IgG-(Fab)-Biotin; anzuwenden 1:200 (v/v) in BSA-TBS

Kits:

Vectastain Elite ABC-Peroxidase-Kit

Neufuchsin-Kit

Die Immunhistochemie (IHC) eignet sich zur Identifizierung und Quantifizierung infizierter Zellen in Geweben. Die Markierung des intranukleären viralen IE-Proteins IE1 (pp89) ist eine der sensitivsten Methoden für den *in situ* Nachweis mCMV-infizierter Zellen. Das IE1-Protein wird bereits 2h nach Infektion exprimiert und akkumuliert während der L-Phase des Replikationszyklus in intranukleären Einschlusskörperchen. Der monoklonale AK Croma 101 detektiert spezifisch das IE1-Protein im Gewebeschnitt. Ein Peroxidase-gekoppelter anti-Maus AK bindet an Croma 101 und kann durch Zugabe des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes (ABC) und des Substrats 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) den Antigen-AK-Komplex anfärben. Der Zusatz von Nickelsulfat verstärkt die Färbung durch Bildung eines schwarzen Präzipitats (Podlech et al., 2002).

Für die IHC wurden die Lebern entnommen und in 4%-iger (v/v) wässriger Formalinlösung für 8-18h unter Schütteln fixiert. Nach der Fixierung wurden die Organe für 2h in Leitungswasser gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert.

Isopropanol	20%	(v/v)	1x	45min
Isopropanol	40%	(v/v)	1x	45min
Isopropanol	60%	(v/v)	1x	45min
Isopropanol	80%	(v/v)	1x	45min
Isopropanol	90%	(v/v)	1x	45min
Isopropanol	100%	(v/v)	3x	45min
Xylol	100%	(v/v)	3x	60min

Die Organe wurden danach in Paraffin eingebettet und bei 20-22 °C dauerhaft gelagert. Um 2µm dicke Schnitte mit dem Mikrotom schneiden zu können, wurden die Paraffinblöcke bei -20 °C gefroren. Die Schnitte wurden im Kaltwasserbad (20 °C) aufgefangen, bei 40 °C im Wasserbad gestreckt, gleichmäßig auf silanisierte Objektträger gezogen und für 18h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Für die immunhistologische Färbung wurden die Gewebe mittels absinkender Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert.

Xylol	100%	(v/v)	3x	5min
Isopropanol	100%	(v/v)	3x	5min
Isopropanol	90%	(v/v)	1x	1min
Isopropanol	70%	(v/v)	1x	1min

Isopropanol	50%	(v/v)	1x	1min
A. bistest.			1x	2min

Zur Permeabilisierung des Gewebes wurden die Organschnitte für 15min bei 37°C in Trypsinlösung inkubiert, anschließend dreimal mit A. bistest. (je 1min) gewaschen und zur Inhibierung der endogenen Peroxidasen für 35min bei 20-22°C in Methanol-H₂O₂ inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (je 1min) in TBS wurden unspezifischen Bindestellen durch Präinkubation (für 20min bei 20-22°C) mit 1:10 verdünntem Kaninchen-Normalserum blockiert. Anschließend wurden die Organschnitte mit dem AK Croma 101 für 1h bei 37°C inkubiert. Die Objektträger wurden dreimal in TBS (je 1min) gewaschen, mit dem sekundären AK für 30min bei 20-22°C inkubiert und anschließend erneut dreimal in TBS (je 1min) gewaschen. Im Anschluss folgte eine 30-minütige Inkubation mit dem nach Angaben des Herstellers angesetzten ABC (Vectastain ABC Kit PK-4000). Nach mehrmaligem Spülen in TBS (je 10min) wurde die Färbelösung mit dem Substrat hinzugegeben und die Substratreaktion nach 20min durch dreimaliges Waschen in TBS (je 1min) gestoppt. Die Organschnitte wurden zum Anfärben der Zellkerne nicht-infizierter Zellen für 3sec mit Hämalaun (Hämalaun nach Mayer) behandelt und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert.

Isopropanol	50%	(v/v)	1x	30sec
Isopropanol	70%	(v/v)	1x	30sec
Isopropanol	90%	(v/v)	1x	30sec
Isopropanol	100%	(v/v)	2x	30sec

Die Organschnitte wurden getrocknet, dreimal in Xylol gewaschen (je 30sec) und zur dauerhaften Konservierung in das synthetische Einschlussmittel Entellan eingebettet. Mit Hilfe des Durchlichtmikroskops wurde die Zahl IE1 positiver Zellen/10mm² des Gewebeschnittes bestimmt. Das genaue Protokoll ist Podlech et al. (2002) zu entnehmen.

3.6 Tierexperimentelle Methoden

3.6.1 Immunsuppression

Um die Pathogenese der mCMV-Infektion in Organen und die *in vivo* Replikation der generierten mCMV in Abwesenheit der Immunkontrolle des Wirts zu analysieren, wurden Infektionen von immunsupprimierten Tieren durchgeführt.

Die subletale γ -Bestrahlung mit 7Gy in einer Kleintierbestrahlungsanlage (OB58, mit zwei [¹³⁷Cs]-Strahlungsquellen) führt zur Auslöschung hämatopoetischer Stamm- sowie Progenitorzellen und somit zur Aplasie des KM (Mutter et al., 1988). Die Dosis wurde monatlich entsprechend der Halbwertszeit des [¹³⁷Cs] ($T_{1/2}=30a$) und der Aktivität zum Zeitpunkt T_0 ($A_0=0,708Gy/min$) mit Hilfe des Zerfallsgesetzes neu berechnet.

3.6.2 Intraplantare Infektion

Für die intraplantare (i.pl.) Infektion wurde standardgemäß eine mCMV-Konzentration von 2×10^5 PFU/50 μ l verwendet. Durch teilweisen Volumenverlust (etwa 50%) durch Wiederaustritt der Infektionslösung betrug die tatsächliche Infektionsdosis 1×10^5 PFU/25 μ l. Der Virusstock wurde in PBS verdünnt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Die Viruslösung wurde mit einer 1ml-Spritze und Kanüle (Größe 0,4x12mm) i.pl. in die rechte Hinterpfote der Maus injiziert. Etwa 6-7 Tage nach Infektion ist bei immunsupprimierten Mäusen am Injektionsort eine Hämorrhagie sowie eine lokale Schwellung zu beobachten. Im immunkompetenten Tier ist dies nicht bzw. kaum zu beobachten. Sollte der Einfluss der Virusdosis auf das *Priming* von CD8 T-Zellen untersucht werden, so wurden die Tiere mit titriertem mCMV infiziert. Um T-Zellen immunkompetenter Tiere gegen mCMV-Antigene zu *primen*, wurden die Mäuse i.pl. mit einer nicht letalen Virusdosis von 1×10^2 PFU infiziert.

3.6.3 Intravenöse Infektion immunkompetenter Tiere

Zum Nachweis einer produktiven mCMV-Infektion in immunkompetenten Tieren wurden diese mit 1×10^6 PFU intravenös (i.v.) in eine der lateralen Schwanzvenen infiziert. Der Virusstock wurde in 0,5ml PBS verdünnt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Die i.v. Infektion wurde im *Challenge*-Modell für den Nachweis einer protektiven Wirkung *in vivo* *geprimter* T-Zellen nach DB-Immunsierung verwendet (siehe 3.6.7).

3.6.4 Immunsierung

Die Immunsierung von immunkompetenten Mäusen erfolgte durch die i.pl. Injektion von Antigen. Diese wurden in entsprechender Konzentration in PBS eingestellt und von diesem Ansatz 50 μ l/Maus injiziert. Die Immunsierung erfolgte je nach Bedarf mit OVA, synthetischem SIINFEKL-Peptid oder DB.

3.6.4.1 Immunsierung mit DB

Durch die Immunsierung mit DB sollten T-Zellen *in vivo* spezifisch *geprimt* oder zu ihrer Proliferation angeregt werden. Dazu wurden 20 μ g DB/50 μ l PBS/Maus i.pl. in die rechte Hinterpfote injiziert. Die Injektion wurde mit einer Feinjüsterspritze durchgeführt, da es durch die sehr feine Kanüle an der Injektionsstelle zu keinem bzw. nur sehr geringem Wiederaustritt der Lösung kommt. Für die Untersuchung einer Dosis-Abhängigkeit des CD8

T-Zell-*Primings*, wurden die Mäuse mit titrierten DB immunisiert. Die Bestimmung der *Priming*-Frequenz erfolgte sieben Tage nach Immunisierung im *ELISpot-Assay* (siehe 3.4.6). Die Induktion einer CD8 T-Zell Proliferation wurde im Proliferations-*Assay* (siehe 3.4.8 und 3.6.6) erfasst.

3.6.5 Organentnahme und Probenkonservierung

Konservierungsmedium:

10%	FCS
0,7mg	Amphotericin B [1,4µg/ml]
ad. 500ml	MEM

Fixierungslösung:

4%-ige Formalinlösung (siehe 3.5.1)

Nach CO₂-Begasung der Tiere und anschließender zervikaler Dislokation wurden die Milz, Lunge, Speicheldrüse sowie Leber entnommen. Sollten die Organe mit dem *Plaque-Assay* (siehe 3.2.3) analysiert werden, so wurden die Organe nach der Entnahme in 1ml Konservierungsmedium überführt und bei -70°C gelagert. Für die immunhistologische Untersuchung (siehe 3.5), d.h. zur Quantifizierung der Zahl infizierter Zellen, wurden die Organe in Fixierungslösung inkubiert.

3.6.6 *In vivo* Proliferations-*Assay*

Medium:

RPMI + 5% (v/v) FCS
MEM α + 7,5% (v/v) FCS

CFDA-SE-Stocklösung:

(siehe 3.4.8)

Waschlösungen:

(siehe 3.4.8)

FACS-Puffer:

(siehe 3.4.1)

Wie bereits in 3.4.8 beschrieben, kann im CFSE-Proliferations-*Assay* die durch Antigenkontakt induzierte Proliferation von CD8 T-Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum *in vitro* CFSE-Proliferations-*Assay* (siehe 3.4.8), bei dem isolierte OT-I CD8 T-Zellen mit CFSE markiert werden, werden für den *in vivo* Versuch CFSE-markierte

Milzzellen der OT-I Maus verwendet. In dieser Arbeit wurde im *in vivo* Proliferations-Assay überprüft, ob in der Milz sowie im poplitealen LK CD8 T-Zellen nach einer mCMV-Infektion oder Immunisierung immunkompetenter C57BL/6 Mäuse epitopspezifisch proliferieren.

Die Milzen wurden aus OT-I Mäusen entnommen, wie in 3.4.1 beschrieben aufgearbeitet, die Einzelzellsuspension wurde gewaschen und in Erythrozyten-Lysepuffer (2ml/Milz) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 5-10min wurden die Zellen zweimal mit je 50ml PBS gewaschen, in 10ml PBS aufgenommen, über ein 40µm *Cell Strainer* gegeben und auf eine Konzentration von 5×10^7 Zellen/1,5ml eingestellt. Die Milzzellen wurden entsprechend der CD8 T-Zellen (siehe 3.4.8) mit CFSE markiert, auf eine Konzentration von 2×10^7 Zellen/0,5ml eingestellt und 0,5ml der Zelllösung wurde pro Maus i.v. injiziert. Ein Tag nach Zelltransfer wurden die Mäuse mit mCMV i.pl. mit 1×10^5 PFU infiziert (siehe 3.6.2) oder mit DB immunisiert (siehe 3.6.4.1). Die Proliferation der CD8 T-Zellen wurde zu definierten Zeitpunkten nach Infektion bzw. Immunisierung in der Milz sowie im poplitealen LK zytofluorometrisch überprüft. Hierzu wurden die Milzen entnommen und aufgearbeitet (siehe 3.4.1), anschließend wurden die CD8 T-Zellen isoliert (siehe 3.4.3) und 2×10^6 der CD8 T-Zellen mit den entsprechenden AK markiert (siehe 3.4.9). Um ausreichend CFSE-markierte CD8 T-Zellen zu erfassen wurde der gesamte Ansatz per FACS analysiert (siehe 3.4.9). Die LK wurden wie in 3.4.1 beschrieben entnommen und aufgearbeitet. Anschließend wurden 2×10^6 LK-Zellen mit den entsprechenden AK markiert (siehe 3.4.9) und der ganze Ansatz wurde analysiert. Es ist zu beachten, dass im LK 24h p.i. mit einer geringeren Gesamtzellzahl (5×10^5 - 1×10^6) zu rechnen ist.

3.6.7 Challenge-Infektion

Mit Hilfe einer *Challenge*-Infektion kann im immunkompetenten Tier die protektive Wirkung zuvor *geprimter* mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen untersucht werden. Hierzu erfolgte die Induktion des *Primings* durch Immunisierung (siehe 3.6.4) oder gering dosierte, nicht letale Virusinfektion (siehe 3.6.2). Sieben Tage später wurden die Tiere mit 1×10^6 PFU i.v. infiziert (siehe 3.6.3) und an Tag zehn nach Infektion wurden die Organe entnommen. Der Virustiter wurde in der Milz, Lunge sowie Speicheldrüse mit dem *Plaque-Assay* (siehe 3.2.3) bestimmt und die Zahl infizierter Zellen in der Leber immunhistochemisch quantifiziert (siehe 3.5).

3.6.8 *In vivo* Depletion von CD8 T-Zellen

Durch eine gezielte *in vivo* Depletion von Lymphozytensubpopulationen kann deren Einfluss auf die Kontrolle der mCMV-Infektion untersucht werden. Mit Hilfe der *in vivo* Depletion sollte die Rolle der CD8 T-Zellen nach *Challenge*-Infektion (siehe 3.6.3) untersucht werden.

Hierzu wurden sechs Tage nach Immunisierung die CD8 T-Zellen depletiert. Die *in vivo* Depletion erfolgte standardmäßig 24h vor *Challenge*-Infektion, um den Einfluss der zu depletierenden Subpopulation auf den Verlauf der Infektion ausschließen zu können. Für die Depletion von CD8 T-Zellen wurde ein monoklonaler anti-CD8 AK (Prof. Jonjic; Rijeka, Kroatien) in einer Konzentration von 1mg/0,5ml PBS/Maus intraperitoneal injiziert. Der AK bindet *in vivo* an das entsprechende Antigen und vermittelt eine AK-abhängige Zytotoxizität. Die Effektivität der Depletion wurde am Tag der Organentnahme durch FACS-Analyse der entsprechenden Population kontrolliert (siehe 3.4.9).

3.6.9 Adoptiver Transfer

Der AT *ex vivo* isolierter *Memory*-CD8 T-Zellen oder *in vitro* generierter, peptidspezifischer CTLL ist geeignet, um das protektive Potenzial dieser Zellen in immunsupprimierten und infizierten Tieren, d.h. in Abwesenheit anderer potentiell protektiver Immunzellen, zu analysieren.

Die zu transferierenden Zellen wurden bestrahlten Mäusen i.v. injiziert und die Mäuse anschließend i.pl. mit mCMV infiziert (siehe 3.6.2). Um eine Korrelation zwischen transferierter Zellzahl und Protektion zu untersuchen, wurden definierte Zellzahlen für den AT eingesetzt. Zudem sollte ein möglicher Unterschied des protektiven Potenzials zwischen *ex vivo* isolierten CD8 T-Zellen und CTLL ermittelt werden.

Die peptidspezifischen CTLL sind wie in 3.4.4 beschrieben generiert worden. Am Versuchstag wurden sie geerntet und dreimal mit MEM α gewaschen (5min bei 423xg). Das Pellet wurde in 1ml MEM α aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Wurden CD8 T-Zellen der Milz als CTL eingesetzt, so wurden die Organe entnommen, aufgearbeitet (siehe 3.4.1), die CD8 T-Zellen mittels MACS isoliert (siehe 3.4.3) und die Zellen auf die benötigte Konzentration in PBS eingestellt. Für den AT wurden 0,5ml der Zelllösung i.v. in die laterale Schwanzvene der mit 7Gy bestrahlten Mäuse injiziert und die Tiere am gleichen Tag mit 1×10^5 PFU i.pl. (siehe 3.6.2) infiziert. Am zehnten Tag nach Infektion wurden die Tiere durch zervikale Dislokation abgetötet und die Organe steril entnommen. Der Virustiter wurde in der Milz, Lunge sowie Speicheldrüse mit dem *Plaque-Assay* (siehe 3.2.3) bestimmt und die Zahl infizierter Zellen in der Leber mit Hilfe der IE1-spezifischen IHC (siehe 3.5) quantifiziert.

3.6.10 Adoptiver Transfer und Vakzinierung

Im AT-Modell kann überprüft werden, ob durch eine zusätzliche Vakzinierung das protektive Potential adoptiv transferierter CTL (siehe 3.6.9) in immunsupprimierten und infizierten

Mäusen verstärkt werden kann. Als CTL wurden aus der Milz *ex vivo* isolierte CD8 T-Zellen oder virusspezifische CTLL verwendet. Die CTLL wurde wie in 3.4.4 beschrieben generiert und die CD8 T-Zellen wurden mittels MACS aus der Milz isoliert (siehe 3.4.3). Die Zellen wurden in einem Volumen von 0,5ml i.v. in mit 7Gy immunsupprimierten Mäusen (siehe 3.6.1) transferiert. Die eingesetzte Zellzahl der CTL sollte bei der Schutzwirkung noch einen Spielraum zur Verbesserung zulassen. Ein Tag nach AT erfolgten Vakzinierung und mCMV-Infektion durch die i.pl. Injektion eines gemeinsamen Ansatzes (50µl/Maus). Dabei erhielt jede Maus 20µg DB und 1×10^5 PFU mCMV. Die Injektion wurde mit Hilfe einer Feinjüsterspritze (siehe 3.6.4) durchgeführt. Zehn Tage nach mCMV-Infektion wurden die Organe steril entnommen und wie in 3.6.9 beschrieben analysiert.

3.6.11 Adoptive Immuntherapie und Vakzinierung im HSCT-Rezipienten

Bei der experimentellen KMT (Koszinowski et al., 1990; Reddehase et al., 1991; Holtappels et al., 2006; 2008; 2013; Ebert et al., 2012) wird ein AT von antiviralen CD8 T-Zellen mit einer therapeutischen Vakzinierung kombiniert. Die Vakzinierung erfolgte hierbei mit DB und sollte die Expansion der transferierten, protektiven Zellen im HSCT-Rezipienten induzieren. Zu definierten Zeitpunkten nach KMT wurde überprüft, ob die Kombinationstherapie vor einer mCMV-Erkrankung schützt bzw. den Schutz verbessert.

Die 8-10 Wochen alten Rezipienten wurden bestrahlt (siehe 3.6.1) und erhielten eine Kombination aus KMZ und *ex vivo* isolierten OT-I CD8 T-Zellen i.v., wobei die Zellen auf eine Konzentration von 1×10^2 OT-I CD8 T-Zellen/ 5×10^6 KMZ/0,5ml eingestellt waren. Die für die KMT benötigten KMZ wurden aus 19-21 Wochen alten Mäusen isoliert (siehe 3.4.2). Anschließend wurden die CD8- sowie CD4 T-Zellen mittels MACS aus den KMZ depletiert (siehe 3.4.3), um sicherzustellen, dass die eventuelle Protektion durch die adoptiv transferierten CD8 T-Zellen herbeigefügt wurde. Vor dem Transfer wurde das T-Zell depletierte KM mit MACS isolierten OT-I CD8 T-Zellen versetzt, um diese zeitgleich zu transferieren, wobei 0,5ml des Ansatzes/Rezipient i.v. injiziert wurden. Ein Tag nach dem Zelltransfer erfolgte die mCMV-Infektion mit gleichzeitiger Vakzinierung durch die i.pl. Injektion von 50µl eines gemeinsamen Ansatzes. Jede Maus wurde dabei mit 1×10^5 PFU mCMV infiziert und mit 20µg DB vakziniert. Zu definierten Zeitpunkten nach KMT wurden die Organe von fünf Tieren je Gruppe entnommen. Der Virustiter wurde mit dem *Plaque-Assay* (siehe 3.2.3) in der Milz, Lunge, Speicheldrüse sowie in einem Stück der Leber bestimmt und in der Leber wurden zusätzlich die infizierten Zellen mit Hilfe der IE1-spezifischen IHC (siehe 3.5) quantifiziert.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung rekombinanter mCMV mit orthotopem Peptidaustausch

Zu Beginn der Arbeit sollten mCMV-Rekombinanten generiert werden, in denen die SIINFEKL-Peptid kodierende Nukleotidsequenz im mCMV-Genom integriert ist. Die Insertion erfolgte durch einen so genannten orthotopem Peptidaustausch (Lemmermann et al. 2010a; b) innerhalb des viralen ORF *m164* (Rawlinson et al., 1996) (siehe Abb. 4.1). Dieser ORF kodiert für das nicht essentielle E-Phase Glykoprotein gp36,5/m164, dessen biochemische Eigenschaften von unserer Arbeitsgruppe beschrieben wurden (Däubner et al. 2010).

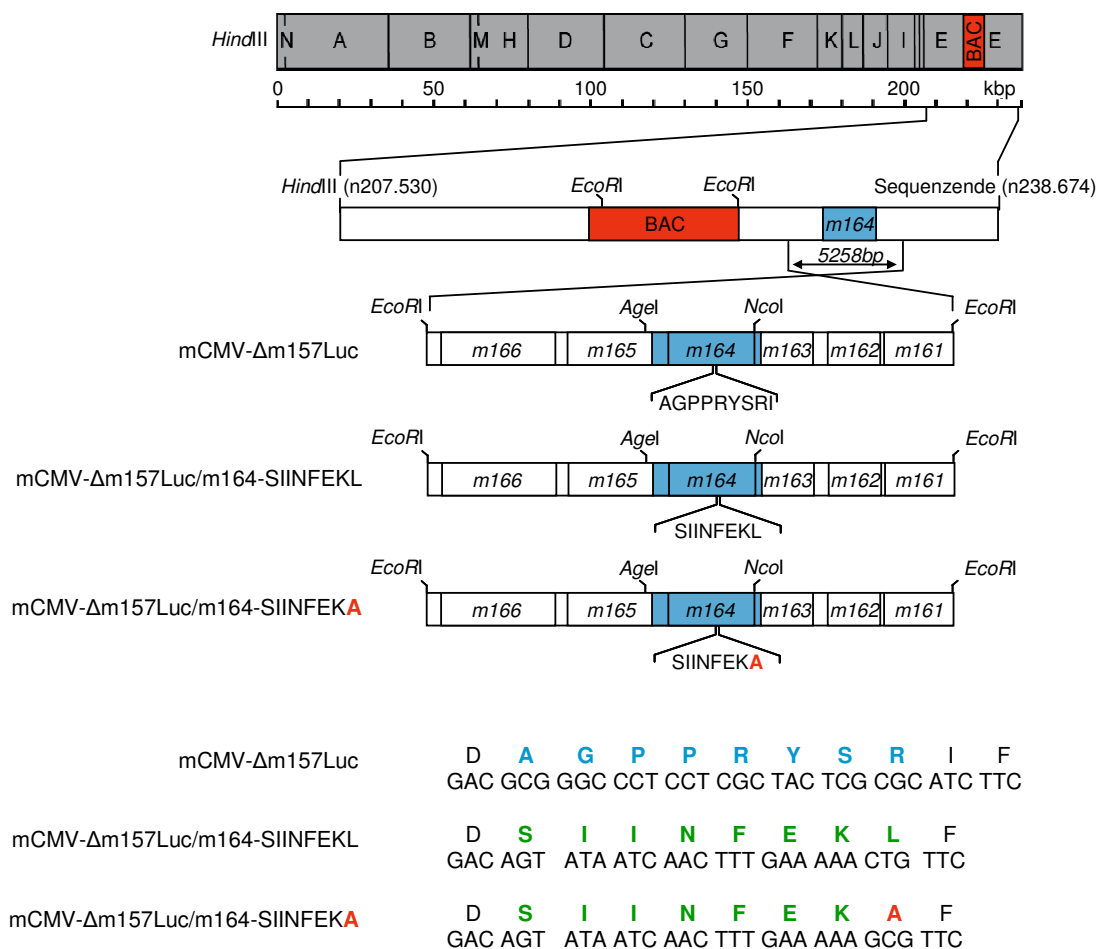


Abb. 4.1: Konstruktion rekombinanter Viren mittels orthotopem Peptidaustausches. Im oberen Teil der Abbildung ist die *HindIII* Karte des mCMV-Genoms des mCMV-BAC- Δ m157Luc-Plasmids mit der im E-Fragment lokalisierten BAC-Vektor Sequenz (rot markiert) sowie einem Ausschnitt des E-Fragments mit den ORF *m161* - *m166* dargestellt. Die vergrößerte Region zeigt die Position des für das Protein gp36,5/m164 kodierenden ORF *m164* und seine Überlappungen mit den benachbarten ORF *m163* und *m165* (blau markiert) sowie die Position des Peptidaustausches. Im unteren Teil der Abbildung sind die Aminosäuresequenzen, inklusive ihrer N- und C-terminal flankierenden Enden, und ihre entsprechenden Codons des intrinsischen antigenen Peptids *m164*₂₅₇₋₂₆₅ (blaue Buchstaben) und die der Peptide (grüne Buchstaben), die gegen das intrinsische Peptid ausgetauscht wurden, dargestellt. Beim orthotopem Peptidaustausch wird das Isoleucin-282 deletiert. Die Mutation der C-

terminalen MHC Ankeraminosäure Leucin → Alanin ist farblich rot dargestellt (Abbildung verändert nach Lemmermann et al., 2010a).

Das Protein gp36,5/m164 beinhaltet mehrere CD8 T-Zell Epitope, u.a. ein D^d-restringiertes Peptid (m164₂₅₇₋₂₆₅), das *in vivo* eine immundominante CTL-Antwort induziert (Holtappels et al., 2002, 2006). Für den orthotopen Peptidaustausch wurde das Peptid m164₂₅₇₋₂₆₅ deletiert und durch SIINFEKL ersetzt (siehe Abb. 4.1). Zusätzlich wurde eine mCMV-Rekombinante generiert, bei der das Peptid SIINFEKA an Position m164₂₅₇₋₂₆₅ integriert wurde (Lemmermann et al., 2010a). In diesem Peptid wurde die C-terminale MHC Ankeraminosäure Leucin (L) durch Alanin (A) ersetzt (OVA₂₅₇₋₂₆₄ → OVA_{257-264L→A} bzw. SIINFEKL → SIINFEKA). Diese Mutation führt zur Deletion der proteasomalen Schnittstelle und zur Reduktion der Bindeaffinität an das H-2K^b. Das Vermeiden der proteasomalen Degradation führt zur fehlenden Prozessierung des Peptids SIINFEKA und damit zur Verhinderung seiner Präsentation (Lemmermann et al., 2011a). Mit Hilfe des SIINFEKA-kodierenden Kontrollvirus kann das protektive Potenzial der SIINFEKL-spezifischen CD8 T-Zellen von dem anderer antiviraler Spezifitäten unterschieden werden. Zusätzlich zur Integration der Peptide SIINFEKL bzw. SIINFEKA ist in den generierten Viren das Gen *m157* deletiert. Dieses Gen kodiert für einen Liganden des in der C57BL/6 Maus exprimierten und aktivierenden NK Zellrezeptors Ly49H (Arase et al., 2002; Smith et al., 2002). Im Gegensatz zur BALB/c Maus ist die C57BL/6 Maus durch die Expression dieses Rezeptors weniger suszeptibel gegenüber einer mCMV-Infektion (Lee et al., 2001; 2003).

4.1.1 Generierung der rekombinanten mCMV-BAC-Plasmide mittels Zwei-Schritt-BAC-Mutagenese im *E.coli* Stamm DH10B

Das rekombinante mCMV-BAC-Δm157Luc/m164-SIINFEKL (mCMV-BAC-SIINFEKL) wurde mit Hilfe der Zwei-Schritt-BAC-Mutagenese (siehe 3.5.10) generiert, bei der der orthotope Peptidaustausch des D^d-restringierten Peptids m164₂₅₇₋₂₆₅ gegen das K^b-restringierte Peptid SIINFEKL erfolgte. Das für die homologe Rekombination benötigte *Shuttle*-Plasmid pST76K_m164-SIINFEKL war bereits vorhanden (Lemmermann et al., 2010a). Das *Shuttle*-Plasmid enthält die Sequenzen des zu integrierenden Peptids SIINFEKL sowie die für die Rekombination benötigten, die Insertionsstelle flankierenden, Sequenzen des mCMV-Genoms und trägt weitere für die Mutagenese essentielle Gene. Nach der Transformation des *Shuttle*-Plasmids in elektrokompetente Zellen, die bereits das zu mutierende BAC-Plasmid mCMV-BAC-Δm157Luc beinhalten, erfolgte durch homologe Rekombination die Bildung eines Cointegrates, bestehend aus dem BAC- und dem *Shuttle*-Plasmid. Während der Kultivierung bei 43 °C wurden nicht-rekombinierte Plasmide aus dem Ansatz entfernt und die Cointegrate repliziert. Im nächsten Schritt lösten sich die Cointegrate durch erneute

homologe Rekombination wieder auf. Dabei entstand entweder das rekombinante mCMV-BAC-SIINFEKL-Plasmid oder das ursprüngliche mCMV-BAC- Δ m157Luc. Die rekombinanten mCMV-BAC-SIINFEKL-Plasmide tragen an der Stelle des m164₂₅₇₋₂₆₅ das antigene Peptid SIINFEKL. Die Herstellung des rekombinanten Plasmids mCMV-BAC- Δ m157Luc/m164-SIINFEKA (mCMV-BAC-SIINFEKA) erfolgte analog zur Generierung des mCMV-BAC-SIINFEKL unter Verwendung des *Shuttle*-Plasmids pST76K_m164-SIINFEKA (Lemmermann et al., 2010a). Die generierten mCMV-BAC-SIINFEKA-Plasmide enthalten im ORF *m164* an der Stelle des m164₂₅₇₋₂₆₅ die Funktionsverlustmutante SIINFEKA.

Tab. 4.1: Liste der verwendeten Plasmide zur Generierung der BAC-Rekombinanten

<i>Shuttle</i> -Plasmid	Ausgangs-BAC-Plasmid	Rekombinantes BAC-Plasmid
pST76K_m164-SIINFEKL	mCMV-BAC- Δ m157Luc	mCMV-BAC-SIINFEKL
pST76K_m164-SIINFEKA	mCMV-BAC- Δ m157Luc	mCMV-BAC-SIINFEKA

4.1.2 Molekulare Charakterisierung der generierten mCMV-BAC-Plasmide

Die Integrität der BAC-Plasmide, die Identifikation der generierten Rekombinanten und die erfolgreiche Insertion des Peptids in das mCMV-Genom wurden im Anschluss an die Zwei-Schritt-BAC-Mutagenese durch Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft.

4.1.2.1 Überprüfung des orthotopen Peptidaustauschs

Durch den orthotopen Peptidaustausch m164₂₅₇₋₂₆₅ \rightarrow OVA₂₅₇₋₂₆₄ bzw. m164₂₅₇₋₂₆₅ \rightarrow OVA_{257-264L \rightarrow A} wird eine *Apal*-Schnittstelle deletiert. Dadurch kann in einem Restriktionsverdau mit *Apal* zwischen dem Ausgangs-BAC-Plasmid und dem rekombinanten BAC-Plasmid unterschieden werden. Von mCMV-SIINFEKL sowie mCMV-SIINFEKA wurden mehrere Kan-sensitive Klone getestet. Hierfür wurde zunächst die BAC-DNA aufgereinigt (siehe 3.3.7.1). Die für die Restriktion benötigten DNA-Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert. Da das BAC-Plasmid über einige *Apal*-Schnittstellen verfügt ist dieser PCR-Schritt essentiell. Die Amplifizierung des PCR-Fragments, in dem die DNA-Sequenzen des orthotopen Peptidaustauschs SIINFEKL bzw. SIINFEKA vorhanden sind, wurde mit dem Oligonukleotidpaar m164sonde_rev/m164sonde_fwd amplifiziert.

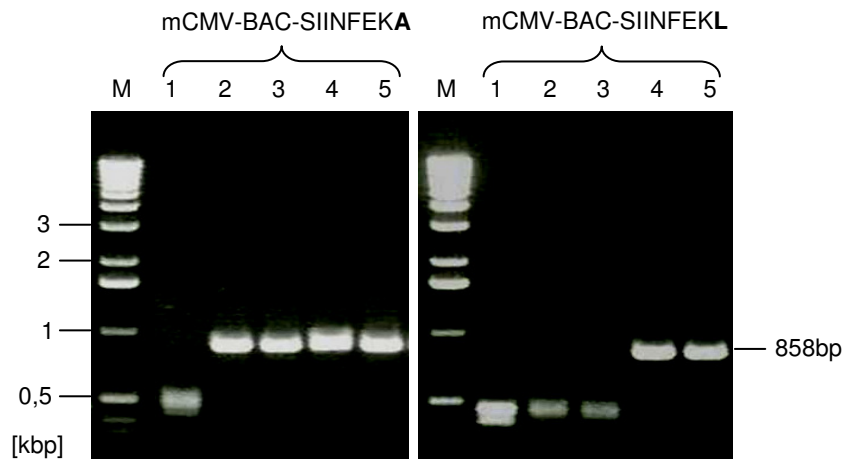


Abb. 4.2: Überprüfung der Deletion der *Apal*-Schnittstelle. Exemplarische Darstellung der Überprüfung der Deletion der *Apal*-Schnittstelle nach orthotopem Peptidaustausch. Nach der PCR wurden die PCR-Fragmente (858bp) mit *Apal* restringiert und die Ansätze in einem 1%-igen Agarose-Gel aufgetrennt. In den mCMV-BAC-SIINFEKA Klonen #2, 3, 4, 5 sowie in den mCMV-BAC-SIINFEKL Klonen #4, 5 wurde die *Apal*-Schnittstelle erfolgreich deletiert. Spur M, 1kbp DNA-Längenstandard.

Nach der PCR wurde das PCR-Fragment (858bp) mit *Apal* restringiert und anschließend im Agarose-Gel aufgetrennt. Bei erfolgreicher Integration des SIINFEKL bzw. des SIINFEKA war nach dem Restriktionsverdau nur eine Bande mit einer Größe von 858bp auf dem Agarose-Gel nachzuweisen, dagegen entstehen bei fehlendem Austausch bzw. nach Auflösung des Cointegrats in das ursprüngliche BAC-Plasmid (mCMV-BAC- Δ m157Luc) zwei kleinere Banden mit den Größen von 353bp und 515bp. Der Abb. 4.2 ist zu entnehmen, dass die *Apal*-Schnittstelle in den mCMV-BAC-SIINFEKA Klonen #2, 3, 4, 5 sowie in den mCMV-BAC-SIINFEKL Klonen #4, 5 erfolgreich deletiert wurde.

Da die positiven Klone anschließend zur Bestätigung des orthotopem Peptidaustausches sequenziert wurden und dafür die Fehlerrate bei der Amplifizierung so gering wie möglich gehalten werden muss, wurde für die PCR eine *proofreading* DNA-Polymerase verwendet.

4.1.2.2 Überprüfung der Integrität der BAC-Plasmide

Während der Rekombination kann es zu unerwünschten Deletionen im mCMV-Genom kommen. Daher muss nach der BAC-Mutagenese die Integrität des BAC-Plasmids überprüft werden. Nach der Überprüfung der Deletion der *Apal*-Schnittstelle wurde von den positiven Klonen die BAC-DNA mittels Maxipräparation (Protokoll nach Macherey und Nagel) aufgereinigt und mit *EcoRI* verdaut. Nach der Auftrennung der verdauten BAC-DNA im Agarose-Gel zeigten sich die typischen Bandenmuster der Klone (siehe Abb. 4.3).

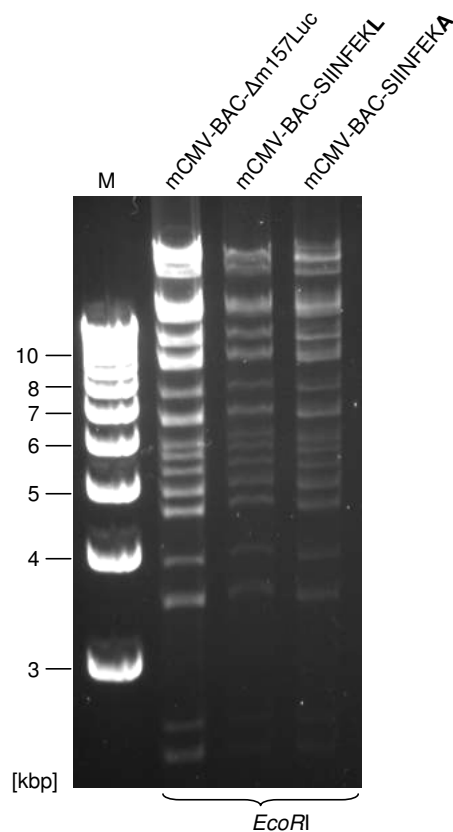


Abb. 4.3: Integrität der rekombinanten mCMV-BAC-Plasmide nach der BAC-Mutagenese. Die Überprüfung der Integrität der mCMV-BAC-Plasmide nach der BAC-Mutagenese ist am Beispiel des mCMV-BAC-SIINFEKL (Klon #5) und des mCMV-BAC-SIINFEKA (Klon #5) gezeigt. Die BAC-DNA wurde nach der BAC-Maxipräparation mit *EcoRI* verdaut und auf einem 0,7%-igen Agarose-Gel aufgetrennt. Beide Klone zeigen das für mCMV-BAC- Δ m157Luc typische Bandenmuster. Spur M, 1 kbp DNA-Längenstandard.

Es konnte kein Unterschied der Bandenmuster der beiden Rekombinanten im Vergleich zu dem des Ausgangsplasmids (mCMV-BAC- Δ m157Luc) festgestellt werden. Während der BAC-Mutagenese kam es somit zu keiner ungewollten Rekombination innerhalb des mCMV-Genoms. Die Ergebnisse bestätigten die Integrität der rekombinanten BAC-Plasmide.

4.1.2.3 Sequenzierung der generierten mCMV-BAC-Plasmide

Zur Verifizierung des korrekten orthotopen Peptidaustausches sowie zur Kontrolle der integrierten Nukleotidsequenz auf unerwünschte Nukleotidaustausche, wurden die durch den Restriktionsverdau positiv getesteten PCR-Amplifikate (siehe 4.2.2.1) sequenziert. Zur Überprüfung des *sense* sowie des *antisense* Stranges der DNA erfolgte die Sequenzierung mit den Sequenzier-Oligonukleotiden m164_seq_rev und m164_seq_for. Die Sequenzierreaktion sowie die Sequenzbestimmung wurden bei GATC (Konstanz) durchgeführt. In Abb. 4.4 ist jeweils ein Ausschnitt der Chromatogramme der Rekombinanten im Vergleich zum mCMV-BAC- Δ m157Luc dargestellt.

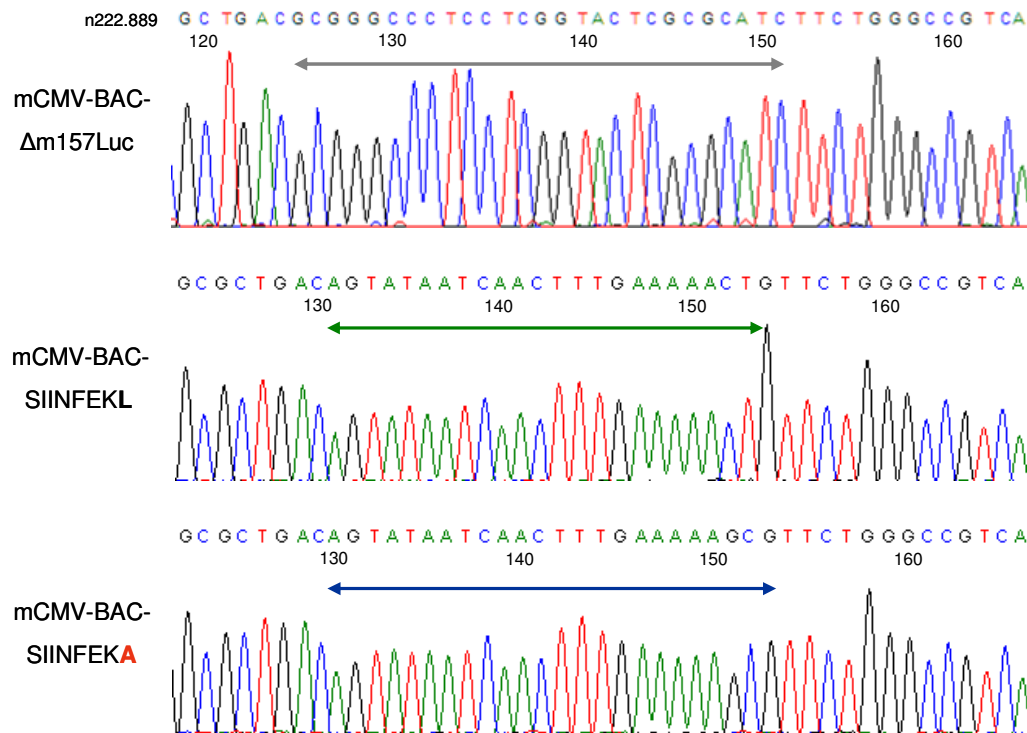


Abb. 4.4: Chromatogramme der Sequenzierungen von mCMV-BAC- Δ m157Luc, mCMV-BAC-SIINFEKL und mCMV-BAC-SIINFEKA. Zur Kontrolle der orthotopen Peptidaustausche ($m164_{257-265} \rightarrow OVA_{257-264}$ bzw. $m164_{257-265} \rightarrow OVA_{257-264L_{\rightarrow A}}$) wurden je rekombinantes BAC-Plasmid fünf BAC-Klone sequenziert. Die Abbildung zeigt exemplarisch einen Ausschnitt der Chromatogramme der Sequenzierung, die mit dem Oligonukleotid m164_seq_for erhalten wurde.

Mit Hilfe der Zwei-Schritt-BAC-Mutagenese konnten die beiden rekombinanten mCMV-BAC-Plasmide mCMV-BAC-SIINFEKL und mCMV-BAC-SIINFEKA generiert werden, deren jeweiliger orthotoper Peptidaustausch durch Sequenzierung bestätigt werden konnte. Zudem konnte mittels Restriktionsenzymverdau die Integrität der beiden generierten mCMV-BAC-Plasmide verifiziert werden. Die Rekombinanten waren somit zur Generierung rekombinanter Viren geeignet.

4.1.3 Herstellung rekombinanter mCMV aus BAC-Plasmiden und Exzision der BAC-Sequenzen

Zur Rekonstitution von rekombinanten mCMV aus BAC-Plasmiden wurden C57BL/6 MEF mit aufgereinigter mCMV-BAC-Plasmid-DNA mit Hilfe des PolyFect-Reagenzes transfiziert (siehe 3.4.1). Nach der Rekonstitution von rekombinanten mCMV ist die Entfernung der BAC-Sequenz aus dem viralen Genom essentiell, da die BAC-Vektor-Sequenzen zu veränderten biologischen Eigenschaften der generierten Viren führen können (Wagner et al., 1999; Adler et al., 2001). Die Eliminierung der BAC-Sequenzen erfolgte durch wiederholte Infektion von C57BL/6 MEF durch Passagieren der Virusüberstände (siehe 3.2.4). Um eine

ausreichende Anzahl an Rekombinationsereignissen zu garantieren, müssen mindestens fünf Passagen auf MEF durchlaufen werden. Während der wiederholten Passagierung werden die BAC-Vektor-Sequenz flankierenden Sequenzwiederholungen von zellulären Rekombinationsmechanismen erkannt (Sugawara et al., 2000) und die BAC-Vektor-Sequenzen durch homologe Rekombination aus dem Virusgenom entfernt. Das BAC-Vektor-Sequenz freie mCMV-Genom liegt nun in seiner ursprünglichen Länge vor und wird während des *packaging* bevorzugt in den viralen Kapsiden verpackt, was ein Anreichern BAC-freier Viren zur Folge hat (Wagner et al., 1999).

Mit Hilfe der BAC-Mutagenese konnten zwei mCMV-Rekombinanten generiert werden mCMV- Δ m157Luc/m164-SIINFEKL (mCMV-SIINFEKL) und mCMV- Δ m157Luc/m164-SIINFEKA (mCMV-SIINFEKA). Die BAC-Freiheit im viralen Genom wurde anschließend mit Hilfe der qPCR (siehe 3.3.9) überprüft.

4.1.4 Nachweis der BAC-Freiheit mittels qPCR

Zum Nachweis der Eliminierung der BAC-Sequenzen in den generierten rekombinanten Viren, wurde eine qPCR analog zu dem in Lemmermann et al. (2010b) beschriebenen Protokoll durchgeführt. Um das Verhältnis zwischen den gesamten mCMV-Genomen und den BAC-Vektor-Sequenzen tragenden Genomen zu bestimmen, wurde zusätzlich eine *gB/M55*-spezifische qPCR (Simon et al., 2005) durchgeführt.

Beide qPCR erfolgten auf einem TaqMan 7500 unter Verwendung des standardisierten Protokolls. Als Plasmid-Standard diente das linearisierte Plasmid pDrive_gB_PTHrP_BAC (Lemmermann et al., 2010a), das die entsprechenden Sequenzen des *gB/M55* bzw. des BAC-Vectors enthält. In der qPCR wurde das Plasmid in einer \log_{10} Titration eingesetzt und die Zielsequenz mit den Oligonukleotidpaaren (*gB_Taq_for/gB_Taq_rev* bzw. *BAC_Taq_for/BAC_Taq_rev*) und den Sonden (*gB_Taq* bzw. *BAC_Taq_1*) (siehe 2.6) amplifiziert.

Die virale DNA wurde zunächst aus den Virusüberständen der fünften Passage isoliert (siehe 3.3.7.2) und diente als Template für eine *gB*- bzw. BAC-Sequenz spezifische qPCR. Durch die qPCR konnte die Gesamtgenomzahl sowie die Anzahl der BAC-Sequenzen bestimmt und die Zahl der BAC-Sequenzen pro 1×10^6 Genome berechnet werden. Eine aufgereinigte mCMV-DNA wurde als BAC-frei bezeichnet, wenn bei der qPCR weniger als 100 BAC-Sequenzen/ 1×10^6 mCMV-Genome quantifiziert wurden. BAC-freie Überstände wurden anschließend aufgereinigt (siehe 3.2.1) und BAC-freie Virusstocks generiert. Die Ergebnisse der Quantifizierung der BAC-Sequenzen sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Tab. 4.2: Quantifizierung der BAC-Sequenzen aus Virusüberständen der rekombinanten mCMV

Rekombinantes mCMV	Genome (gB/M55)	BAC-Sequenzen	BAC-Sequenzen / 1x10 ⁶ Genome
mCMV-SIINFEKL - Ü1	6,4x10 ⁶	9,0x10 ¹	1,4x10 ¹
mCMV-SIINFEKL - Ü2	6,9x10 ⁶	7,2x10 ⁰	1x10 ⁰
mCMV-SIINFEKL - Ü3	1,2x10 ⁷	4,1x10 ³	3,4x10 ²
mCMV-SIINFEKA - Ü4	1,3x10 ⁷	4,0x10 ²	3,1x10 ¹
mCMV-SIINFEKA - Ü5	1,3x10 ⁷	6,3x10 ²	4,9x10 ¹
mCMV-SIINFEKA - Ü6	1x10 ⁷	3,0x10 ²	3x10 ¹

Auflistung der quantifizierten Virusüberstände der generierten rekombinanten mCMV. Die Überstände wurden mittels *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* isoliert und anschließend 1µl der aufgereinigten DNA als *Template* in der qPCR eingesetzt. Die grau hinterlegten BAC-freien Virusüberstände wurden anschließend weiter aufgereinigt.

Die Werte zeigen deutlich, dass bereits nach der fünften Passage die meisten Virusüberstände beider rekombinanten mCMV BAC-frei waren. Jedoch waren bei mCMV-SIINFEKA-Ü3 noch >100 BAC-Sequenzen nachzuweisen. Dies verdeutlicht, dass nach jeder mCMV-Rekonstitution die BAC-Freiheit kontrolliert werden muss. Von jeder mCMV-Rekombinanten wurde ein BAC-freier Überstand aufgereinigt (siehe 3.2.1). Nach Ermittlung des Virustiters (siehe 3.2.2) erfolgte die Lagerung des Virusstocks bei -70 °C. Die Virustiter sind in der Tab. 4.3 zusammengefasst.

Tab 4.3: Virustiter der generierten BAC-freien mCMV-Rekombinanten sowie des parentalen mCMV

Rekombinantes mCMV	Virustiter (PFU/ml)
mCMV-Δm157Luc	2,07 x 10 ⁸
mCMV-SIINFEKL	5,38 x 10 ⁸
mCMV-SIINFEKA	3,6 x 10 ⁸

Auflistung der Virustiter der generierten BAC-freien mCMV-Rekombinanten sowie des parentalen Virus. Nach der Virusauflistung wurden die Virustiter der Virusstocks wie in 3.2.2. beschrieben bestimmt.

4.1.5 Bestimmung des Genom-zu-PFU-Verhältnisses

Das Genom-zu-PFU-Verhältnis gibt die Zahl der Genome an, die für die Bildung eines *Plaques* auf MEF in Zellkultur benötigt werden und somit einer PFU entsprechen. Zusätzlich gibt das Genom-zu-PFU-Verhältnis Aufschluss über die Infektiosität der Rekombinanten, da die *Plaque*-Bildung über mehrere Infektionsrunden hinweg erfolgt. Das von Kurz et al. (1997)

beschriebene Genom-zu-PFU-Verhältnis für mCMV-WT.Smith beträgt ~500:1 und kann als Richtwert für eine unbeeinflusste Replikation dienen.

Zur Ermittlung des Genom-zu-PFU-Verhältnisses wurde die von Simon et al. (2005) etablierte qPCR zur Quantifizierung des viralen Gens *gB/M55* verwendet. Die Quantifizierung erfolgte durch eine *SYBR-Green* TaqMan-PCR (siehe 3.3.9) mit dem *Primer*-Paar *gB_Taq-For/gB_Taq_Rev* und der Sonde *gB_Taq*. Dazu wurde die virale DNA aufgereinigt und in \log_{10} -Stufen titriert. Anschließend wurde die Zahl der viralen Genome in jeder Verdünnungsstufe in Duplikaten bestimmt, die einer definierten PFU-Zahl zugewiesen werden konnten. Als externer Standard diente das mit *SmaI* linearisierte Plasmid *pDrive_gB_PTHrP_BAC* (Lemmermann et al., 2010b). In der Tab. 4.4 sind die für die beiden generierten Rekombinanten ermittelten Genom-zu-PFU-Verhältnisse im Vergleich zum Ausgangsvirus (mCMV- Δ m157Luc) und zum WT-Stamm (mCMV-WT.BAC) dargestellt. Wie aus der Tabelle hervorgeht unterschieden sich die generierten Viren nur gering vom Literaturwert von 500:1 (Kurz et al., 1997).

Tab. 4.4 Genom-zu-PFU-Verhältnisse der generierten mCMV-Rekombinanten

Getestete mCMV	Virustiter (PFU/ml)	Genome/PFU (Triplikate)	Genome/PFU (Mittelwert)
mCMV-WT.BAC	$2,80 \times 10^8$	208 / 197	203
mCMV- Δ m157Luc	$2,07 \times 10^8$	341 / 361	351
mCMV-SIINFEKL	$5,38 \times 10^8$	461 / 452	456
mCMV-SIINFEKA	$3,60 \times 10^8$	272 / 284	278

Die einer definierten PFU-Zahl entsprechende virale DNA wurde unabhängig in Duplikaten aufgereinigt, jeweils in fünf \log_{10} -Stufen titriert und in eine *M55/gB*-spezifische qPCR eingesetzt. Das linearisierte Plasmid *pDrive_gB_PTHrP_BAC* diente als Standard. Die berechneten Werte der viralen Genome/PFU sind gemittelt aufgelistet. Zum Vergleich wurden die Werte des Ausgangsvirus (mCMV- Δ m157Luc) sowie von mCMV-WT.BAC ebenfalls bestimmt.

Die Quantifizierung der Genom-zu-PFU-Verhältnisse zeigt, dass sich die *in vitro* Infektiosität der generierten mCMV-Rekombinanten im Vergleich zum Ausgangsvirus (mCMV- Δ m157Luc) sowie zum mCMV-WT.BAC durch den orthotopen Peptidaustausch nicht wesentlich verändert hat.

4.2 Charakterisierung der mCMV-Rekombinanten

Die bis zu diesem Zeitpunkt erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass der orthotope Peptidaustausch erfolgreich war und BAC-freie mCMV-Rekombinanten generiert werden konnten. Lemmermann und Kollegen (2010a) konnten bereits zeigen, dass der orthotope Peptidaustausch $m164_{257-265} \rightarrow OVA_{257-264}$ bzw. $m164_{257-265} \rightarrow OVA_{257-264L_{\rightarrow A}}$ keinen Einfluss

auf die Expression und die intrazelluläre Lokalisation des gp36,5/m164 Proteins hat und zu keiner veränderten *in vitro* als auch *in vivo* Infektiosität führt. Wie in 4.1.5 gezeigt, ist die *in vitro* Infektiosität der mCMV-Rekombinanten im Vergleich zum Ausgangsvirus (mCMV- Δ m157Luc) unverändert. Nun galt es zu überprüfen, ob nach Infektion von MEF mit den in dieser Arbeit generierten Rekombinanten die Lokalisation bzw. die Expression des Trägerproteins gp36,5/m164 durch den orthotopen Austausch beeinflusst wird. Im Anschluss sollte der Einfluss des Peptidaustausches auf die *in vivo* Infektiosität untersucht werden.

4.2.1 Nachweis der intrazellulären Lokalisation des gp36,5/m164 Proteins

Zum Nachweis der unbeeinflussten Expression des gp36,5/m164 Proteins wurde die Lokalisation des Trägerproteins *via* Immunfluoreszenz überprüft. Hierzu wurden MEF mit mCMV- Δ m157Luc, mCMV-SIINFEKL oder mCMV-SIINFEKA zentrifugal mit einer MOI von zehn infiziert und 8h nach Infektion fixiert. Das gp36,5/m164 Protein wurde durch einen polyklonalen anti-m164 AK und einem Fluorochrom-gekoppelten Sekundär-AK markiert und konnte mit Hilfe eines konfokalen *Laser Scanning* Mikroskops (LSM) dokumentiert werden.

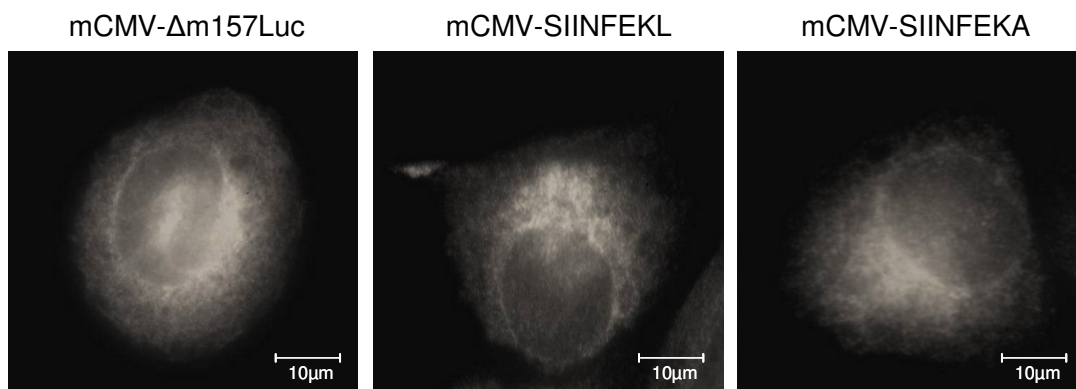


Abb. 4.5: Lokalisation des gp36,5/m164 Proteins in infizierten MEF. Für den Nachweis der unbeeinflussten Lokalisation des gp36,5/m164 Proteins wurden MEF mit mCMV- Δ m157Luc, mCMV-SIINFEKL oder mCMV-SIINFEKA zentrifugal mit einer MOI von zehn infiziert und 8h p.i. mit 4%-iger PFA/Saccharose-Lösung fixiert. Die Detektion des gp36,5/m164 Proteins erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenz unter Verwendung eines anti-m164 AK sowie eines Alexa Fluor konjugierten Sekundär-AK (Ziege-anti-Kaninchen). Mit Hilfe eines LSM konnte das Fluorochrom durch einen Argonlaser ($\lambda=546\text{nm}$) angeregt und das gp36,5/m164 Protein im Kernrandbereich und in einem zytoplasmatischen Netzwerk (ER) detektiert werden.

Weder nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL noch nach Infektion mit mCMV-SIINFEKA konnte eine veränderte Lokalisation des gp36,5/m164 Proteins im Vergleich zum Ausgangsvirus festgestellt werden (siehe Abb. 4.5). Das gp36,5/m164 Protein ist als Fluoreszenz im Kernrandbereich sowie im ER (Däubner, 2010) nachweisbar. Diese Daten bestätigen, dass der orthotope Peptidaustausch keinen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation hat.

4.2.2 Replikative Fitness und Infektiosität *in vivo*

Die vorangegangenen Ergebnisse haben gezeigt, dass der orthotope Peptidaustausch keinen Einfluss auf die *in vitro* Infektiosität sowie auf die intrazelluläre Lokalisation des gp36,5/m164 Proteins hat. Nun sollte überprüft werden, ob der Austausch die replikative Fitness, d.h. die *in vivo* Infektiosität beeinflusst. Hierzu wurde die *in vivo* Replikation der generierten mCMV-Rekombinanten im Vergleich zu der des parentalen mCMV- Δ m157Luc untersucht. Im immunkompetenten Tier wird die mCMV-Infektion durch das intakte Immunsystem sehr schnell kontrolliert. Nach Immunsuppression ist die zelluläre Immunantwort ausgeschaltet, sodass die Virusreplikation im immunsupprimierten Tier nicht durch das Immunsystem kontrolliert wird und sich eine Multiorganerkrankung manifestieren kann (Podlech et al. 1998).

Für die Replikationskinetik wurden acht Wochen alte C57BL/6 Mäuse mit 7,5Gy bestrahlt (siehe 3.6.1) und mit 1×10^5 PFU mCMV-SIINFEKL, mCMV-SIINFEKA oder mCMV- Δ m157Luc i.pl. infiziert (siehe 3.6.2). Zu definierten Zeitpunkten nach Infektion wurden aus fünf Tieren je Infektionsgruppe Milz, Lunge, Speicheldrüse sowie Leber entnommen. Die Virustiter von Milz, Lunge sowie Speicheldrüse wurden mittels *Plaque-Assay* (siehe 3.2.2) bestimmt, wobei je Infektionsgruppe maximal vier Tiere untersucht wurden. Die Zahl infizierter Zellen wurde in der Leber mit Hilfe einer IE1-spezifischen Immunhistochemie (IHC) (siehe 3.5) quantifiziert. Die IE1-spezifische IHC identifiziert während des gesamten Replikationszyklus infizierte Zellen, da das IE1-Protein (pp76/89) bereits 2h nach der Infektion in großen Mengen synthetisiert und in den Nukleus transportiert wird, wo es dann angereicherter vorliegt. Die Verdopplungszeiten (*Doubling Times*, DT) der Viren wurden in den vier getesteten Zielorganen mittels linearer Regressionsanalyse berechnet.

In der Milz konnten zwei Tage p.i. in den mit mCMV-SIINFEKL und mCMV-SIINFEKA infizierten Mäusen infektiöse Partikel detektiert werden (siehe Abb. 4.6), wobei bereits vier Tage p.i. vergleichbare Virustiter erreicht wurden. In der Leber konnten vier Tage p.i. in allen drei Gruppen *Plaques* detektiert werden, die sechs Tage p.i. eine vergleichbare Anzahl erreichte. In der Lunge sowie in der Speicheldrüse waren die Virustiter der einzelnen Infektionsgruppen sechs Tage p.i. ähnlich und erreichten zu späteren Zeitpunkten vergleichbare Organtiter. Insgesamt konnte im immunsupprimierten Tier eine vergleichbare *in vivo* Replikation der getesteten Viren in allen vier Organen nachgewiesen werden.

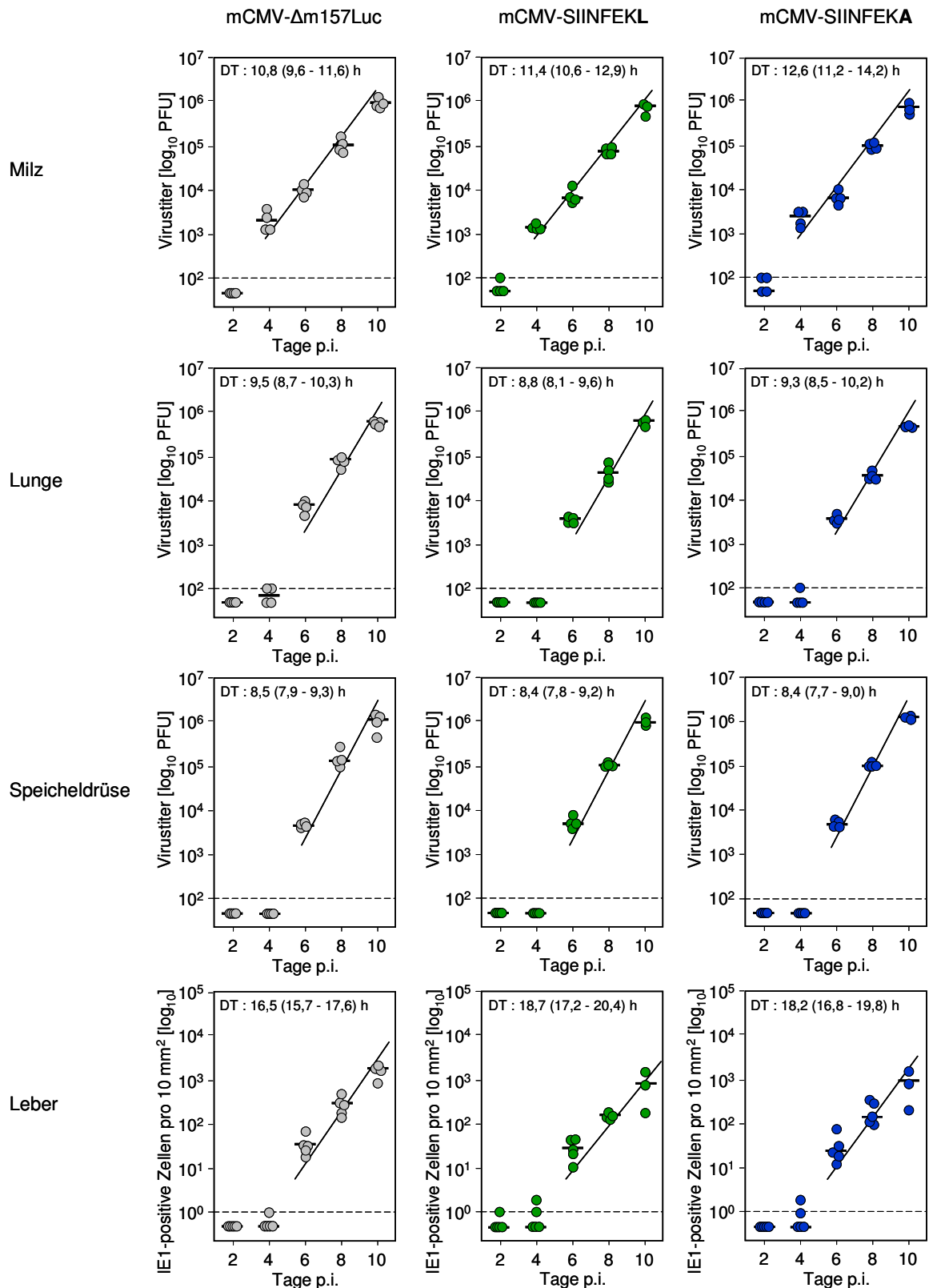


Abb. 4.6: Kinetik der *in vivo* Replikation von mCMV-SIINFEKL sowie mCMV-SIINFEKA im Vergleich zu mCMV- Δ m157Luc. Immunsupprimierte C57BL/6 Mäuse wurden mit 1×10^5 PFU mCMV- Δ m157Luc (○), mCMV-SIINFEKL (●) oder mCMV-SIINFEKA (●) intraplantar (i.pl.) infiziert. Zu den Zeitpunkten 2, 4, 6, 8, 10 Tage p.i. wurden die Milz, Lunge, Speicheldrüse und Leber entnommen. In der Milz, der Lunge und Speicheldrüse wurde mit dem *Plaque-Assay* die Viruslast bestimmt und in der Leber die Zahl infizierter Zellen mit Hilfe der IE1-spezifischen IHC quantifiziert. Die Kreise repräsentieren jeweils Daten einer individuellen Maus, die Mediane sind

durch schwarze horizontale Balken dargestellt. Das Detektionslimit (DL) ist entsprechend durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. Die Verdopplungszeiten der Viren (DT und ihre 95% Konfidenzintervalle in Klammern) wurden mittels linearer Regressionsanalyse bestimmt. Die Regressionsgerade ist durch die schwarze Linie dargestellt.

Um dieses Ergebnis zu verifizieren wurden für jedes Organ und für jedes Virus neben der *Most Probable Number* (MPN) der Geradensteigungen auch die 95% Konfidenzintervalle (*Confidence Limits*, CL) der Geradensteigungen errechnet. Anhand der Geradensteigungen wurden die Verdopplungszeiten der drei Viren berechnet. Eine vergleichbare Replikation ist durch eine Überlappung der DT bzw. der CL gekennzeichnet. Die Ergebnisse der Berechnungen sind der Tabelle 4.4 zu entnehmen und bestätigen die Vergleichbarkeit der Replikation in den untersuchten Organen. Während die DT der Viren in der Lunge und in der Speicheldrüse zwischen 8,5h (Speicheldrüse) und 9,5h (Lunge) lagen, benötigten die Viren in der Milz ca. 11,5h zur Replikation. Im Vergleich dazu lagen die Verdopplungszeiten in der Leber für alle drei Viren mit etwa 18h fast doppelt so hoch, wobei sich möglicherweise diese Differenz durch die Tatsache ergibt, dass die virale Replikation in der Leber anhand der Anzahl infizierter Zellen erfolgte, dagegen wurde sie in den anderen untersuchten Organen durch die Quantifizierung infektiöser Viruspartikel (*Plaque-Assay*) bestimmt.

Tab. 4.4: Vergleich der *in vivo* Verdopplungszeiten von mCMV-SIINFEKL, mCMV-SIINFEKA und mCMV-Δm157Luc.

Organ		mCMV-Δm157Luc		mCMV-SIINFEKL		mCMV-SIINFEKA	
		Steigung	DT [h]	Steigung	DT [h]	Steigung	DT [h]
Milz	upper	0,75	9,6	0,68	10,6	0,64	11,2
	MPN	0,69	10,5	0,63	11,4	0,57	12,6
	lower	0,62	11,6	0,56	12,9	0,51	14,2
Lunge	upper	0,83	8,7	0,89	8,1	0,85	8,5
	MPN	0,77	9,5	0,82	8,8	0,78	9,3
	lower	0,7	10,3	0,75	9,6	0,71	10,2
Speicheldrüse	upper	0,92	7,9	0,93	7,8	0,94	7,7
	MPN	0,85	9,5	0,86	8,4	0,87	8,4
	lower	0,78	10,3	0,78	9,2	0,8	9,0
Leber	upper	0,46	15,7	0,42	17,2	0,43	16,8
	MPN	0,44	16,5	0,39	18,7	0,4	18,2
	lower	0,41	17,6	0,36	20,4	0,67	19,8

Die Ermittlung der Regressionsgeraden erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse (*Mathematica* V7.0 „Linear Regression“; Wolfram Research Inc.). Die *Most Probable Number* (MPN) der Geradensteigung sowie deren 95% Konfidenzintervall (CL; upper und lower) wurde berechnet. Die Verdopplungszeit (DT) sowie der CL errechnen sich aus der Steigung der RG mit der Formel: $DT = (\log_2/MPN) \times 24h$.

Der Vergleich der *in vivo* Replikationskinetik zeigt, dass sich die drei Viren hinsichtlich ihrer *in vivo* Replikation nicht signifikant unterscheiden. Dies deutet darauf hin, dass der orthotope Peptidaustausch zu keiner *in vivo* Veränderung der generierten Rekombinanten geführt hat.

4.3 Immunologische Charakterisierung der mCMV-Rekombinanten

4.3.1 Testung der epitopspezifischen Immunogenität der generierten Rekombinanten

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass der orthotope Peptidaustausch erfolgreich war und dieser weder auf die Lokalisation des Trägerproteins gp36,5/m164 noch auf die *in vivo* Replikation einen Einfluss hatte. Nun sollte die epitopspezifische *in vivo* und *in vitro* Immunogenität der generierten Rekombinanten untersucht werden.

4.3.1.1 Nachweis der epitopspezifischen Immunogenität *in vivo*

Bei erfolgreichem orthotopen Peptidaustausch sollte nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL das orthotop integrierte SIINFEKL proteasomal prozessiert, anschließend über das MHC-Klasse-I K^b-Molekül präsentiert werden und CD8 T-Zellen aktivieren. Der Nachweis eines erfolgreichen CD8 T-Zell-*Primings* erfolgte nach i.pl. Infektion immunkompetenter C57BL/6 Mäuse durch anschließende Quantifizierung der epitopspezifischen CD8 T-Zellen im IFN- γ *ELISpot-Assay*.

Für die Untersuchung der epitopspezifischen Immunogenität bzw. eines mCMV-spezifischen CD8 T-Zell-*Primings* wurden acht Wochen alte, immunkompetente C57BL/6 Mäuse i.pl. mit mCMV- Δ m157Luc, mCMV-SIINFEKL bzw. mCMV-SIINFEKA infiziert und die *Priming*-Frequenzen in der Akut-Phase der Infektion ermittelt. Um das SIINFEKL-spezifische *Priming* in das Frequenzmuster der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellen des Haplotyps H-2^b einzuordnen, wurden die von Munks et al. (2006a; b) beschriebenen Peptide M38₃₁₆₋₃₂₃, M45₉₈₅₋₉₉₃, M57₈₁₆₋₈₂₄, m139₄₁₉₋₄₂₆, und m164₂₆₇₋₂₇₅ verwendet. Das D^b präsentierte Peptid m164₂₆₇₋₂₇₅ beginnt nur zwei Aminosäurepositionen hinter dem Integrationsort von SIINFEKL. Um ausschließen zu können, dass die Integration die Präsentation des Peptids m164₂₆₇₋₂₇₅ nicht beeinflusst, wurden die *Priming*-Frequenzen der CD8 T-Zellen für dieses Peptid bestimmt. Das M45₉₈₅₋₉₉₃ wird über das MHC-Klasse-I D^b-Molekül präsentiert, dagegen ist die Präsentation der restlichen Peptide H-2K^b restringiert. Von jeder Infektionsgruppe wurden aus einem Pool von je drei Milzen die CD8 T-Zellen mittels MACS isoliert (siehe 3.4.3) und als Effektoren im IFN- γ *ELISpot-Assay* (siehe 3.4.6) eingesetzt. Zur Stimulation dienten mit synthetischem Peptid exogen beladene APC (EL-4 Zellen).

Nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL wurden CD8 T-Zellen spezifisch gegen das SIINFEKL-Peptid *geprimt*, wobei die Frequenz des SIINFEKL nicht die des m139₄₁₉₋₄₂₆ Peptids erreichte, sondern zwischen der des M38₃₁₆₋₃₂₃ und des M45₉₈₅₋₉₉₃ lag (siehe Abb. 4.7). Im Gegensatz dazu konnten nach Infektion mit mCMV- Δ m157Luc und nach Infektion mit mCMV-SIINFEKA keine Frequenzen für das SIINFEKL-Peptid ermittelt werden. Ungeachtet

der Schwankungen waren die Frequenzmuster der CD8 T-Zell-Spezifitäten zwischen den unterschiedlichen Infektionsgruppen vergleichbar.

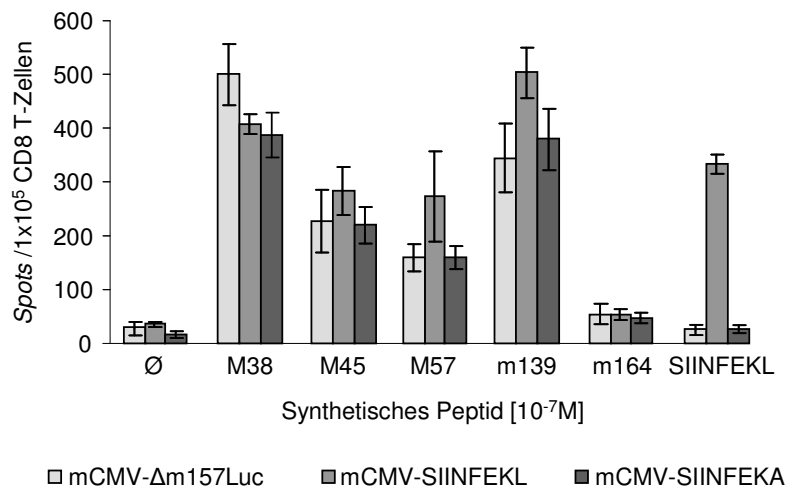


Abb. 4.7: Vergleich des CD8 T-Zell-Repertoires in der Akut-Phase der mCMV-Infektion. Die Frequenz der peptidspezifischen CD8 T-Zellen der Milz wurden in einem IFN- γ *ELISpot*-Assay bestimmt. Die CD8 T-Zellen wurden aus der Milz isoliert und mit EL-4 Zellen, die mit entsprechendem, synthetischem Peptid (10^{-7} M) beladen waren, stimuliert. Als Kontrolle dienten unbeladene APC. Die durch die Balken dargestellten MPN wurden mittels linearer Regressionsanalyse (*Mathematica* V7.0 „Linear Regression“; Wolfram Research Inc.) ermittelt. Das 95% Konfidenzintervall ist durch Fehlerbalken dargestellt.

Die Ergebnisse des IFN- γ *ELISpot*-Assay zeigen, dass nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL das im CMV-Genom integrierte SIINFEKL prozessiert sowie präsentiert wurde. Die SIINFEKL-spezifischen CD8 T-Zellen erkennen mit SIINFEKL-Peptid exogen beladene APC, wobei sich die erreichte Frequenz in das Muster der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellen des Haplotyps H-2^b einordnen lässt. Nach Infektion mit mCMV-SIINFEKA oder mCMV- Δ m157Luc waren durch fehlende Prozessierung des SIINFEKL-Peptids keine SIINFEKL-spezifischen T-Zellen nachweisbar. Die Tatsache, dass die getesteten mCMV ähnliche Frequenzmuster besitzen, bestätigte, dass der orthotope Peptidaustausch zu keiner generell veränderten *in vivo* Immunogenität geführt hat.

4.3.2 Nachweis der funktionellen Avidität SIINFEKL-spezifischer CD8 T-Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Infektion von C57BL/6 Mäusen mit mCMV-SIINFEKL zum *Priming* von CD8 T-Zellen führt und diese epitopspezifischen T-Zellen *in vitro* durch mit SIINFEKL-Peptid exogen beladene APC aktivierbar sind, sollte nun die funktionelle Avidität SIINFEKL-spezifischer CD8 T-Zellen getestet werden.

Die Avidität ist das Produkt aus Affinität, die als Stärke der Bindung zweier Moleküle wie beispielsweise dem TCR und dem Peptid-MHC-Komplex definiert ist, und der Anzahl der beteiligten Bindungen. Die Avidität ist daher zum einen durch die Änderung der Anzahl der

Bindungen und zum anderen durch die Änderung der Affinität beeinflussbar (Kedl et al., 2003; Stone et al., 2009). Die Avidität der T-Zellen ist über die Funktionalität der Zellen definiert und wird als sogenannte funktionelle Avidität bezeichnet. Antigene Peptide, die in großer Menge präsentiert werden, können von CD8 T-Zellen mit niedriger TCR-Affinität erkannt werden und können diese aktivieren. Dagegen werden in geringer Zahl präsentierte Peptide nur von CD8 T-Zellen mit hoher TCR-Affinität erkannt (Alexander-Miller et al., 1996; 2005).

Für die geplanten Transferversuche sollten OT-I Zellen (Hogquist et al., 1994), die den transgenen SIINFEKL-spezifischen TCR exprimieren, verwendet werden. Da sich die OT-I Zellen wie eine monoklonale CTLL verhalten, galt es die funktionelle Avidität der OT-I Zellen mit der einer polyklonalen SIINFEKL-spezifischen CTLL zu vergleichen. Vor dem Vergleich der beiden T-Zellen wurde zudem die funktionelle Avidität *in vivo* geprimter T-Zellen ermittelt, um die funktionelle Avidität der OT-I Zellen in das Aviditätsmuster *in vivo* geprimter T-Zellen einzuordnen.

4.3.2.1 Ermittlung der funktionellen Avidität SIINFEKL-spezifischer *in vivo* geprimter CD8 T-Zellen

Zur Ermittlung der funktionellen Avidität SIINFEKL-spezifischer *in vivo* geprimter CD8 T-Zellen wurden sieben Tage p.i. aus immunkompetenten C57BL/6 Mäusen, die i.pl. mit mCMV-SIINFEKL infiziert worden waren, CD8 T-Zellen isoliert (siehe 3.4.3). Die Bestimmung der funktionellen Avidität erfolgte im IFN- γ *ELISpot-Assay* (siehe 3.4.6) durch Stimulation mit EL-4 Zellen, die mit titriertem, synthetischem SIINFEKL-Peptid (10^{-7} M bis 10^{-13} M) beladen wurden. In der Abb. 4.8 sind die Frequenzen aller SIINFEKL-spezifischen CD8 T-Zellen dargestellt, die das präsentierte SIINFEKL-Peptid in der eingesetzten Konzentration erkennen. Dazu gehören CD8 T-Zellen mit hoher Avidität, die bereits durch geringe Mengen an Peptid aktiviert werden, sowie CD8 T-Zellen, deren Avidität für die Peptiderkennung gerade noch ausreichend ist. Die dargestellten Diagramme der Frequenzen in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration werden daher als kumulative Aviditätenverteilung bezeichnet. Zusätzlich zur kumulativen Aviditätenverteilung wurde die errechnete Aviditätenverteilung dargestellt. Diese beinhaltet ausschließlich die CD8 T-Zell-Frequenzen, deren Avidität für die Erkennung der Konzentration gerade noch ausreichen war. Die errechnete Aviditätenverteilung wird durch Transformation der kumulativen Aviditätenverteilung erreicht. Hierzu wird die Anzahl der aktivierten CD8 T-Zellen, die geringe Peptidkonzentrationen gerade noch erkannt haben, von der Gesamtheit der durch eine gegebene Peptidkonzentration aktivierten CD8 T-Zellen substrahiert. Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL etwa 0,4% aller CD8 T-Zellen SIINFEKL-

spezifisch *geprimt* wurden. Diese epitopspezifischen CD8 T-Zellen erkennen präsentierte synthetische Peptide bis zu einer Grenzmolarität von 10^{-11} M. Ab einer Molarität von 10^{-12} M lag die Konzentration des SIINFEKL-Peptids unterhalb der Sensitivitätsgrenze der SIINFEKL-spezifischen Rezeptoren. Die Aviditätenverteilung verdeutlicht, dass der Hauptbestandteil der reaktiven SIINFEKL-spezifischen CD8 T-Zellen eine relativ hohe funktionelle Avidität besaß, während nur ein geringer Teil der aktivierten CD8 T-Zellen eine niedrige bzw. besonders hohe funktionelle Avidität aufweist. Die Grenzavidität der Zellen lag bei 10^{-10} M und 10^{-11} M. Dies weist darauf hin, dass in der Gesamtheit der SIINFEKL-spezifischen CD8 T-Zellen höchstwahrscheinlich bezüglich der funktionellen Avidität zwei Populationen existieren.

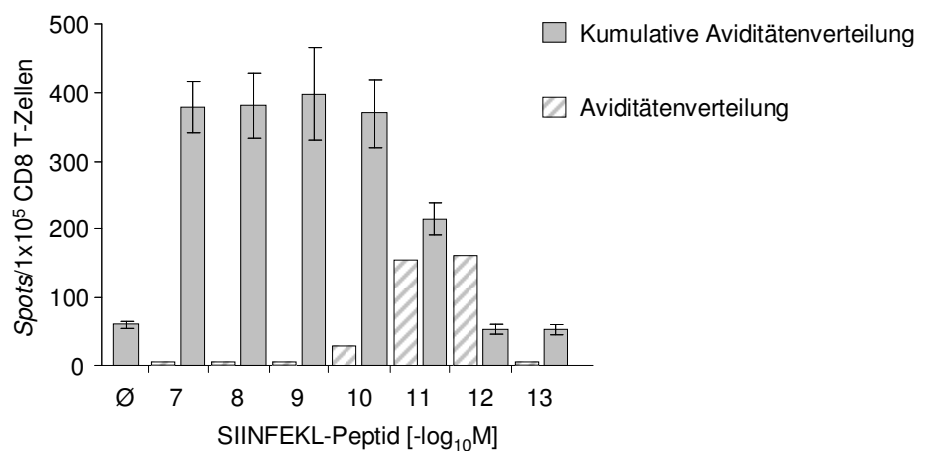


Abb. 4.8: Aviditätenverteilung SIINFEKL-spezifischer *in vivo* geprimter CD8 T-Zellen. Die Frequenz SIINFEKL-spezifischer CD8 T-Zellen wurde eine Woche p.i. in einem IFN- γ *ELISpot*-Assay bestimmt. Immunkompetente C57BL/6 Mäuse wurden mit mCMV-SIINFEKL i.p.l. infiziert und die CD8 T-Zellen aus der Milz aufgereinigt. Zur Stimulation der Effektoren wurden mit titriertem, synthetischem SIINFEKL-Peptid (10^{-7} M bis 10^{-13} M) beladene APC verwendet. Als Kontrolle dienten unbeladene EL-4 Zellen. Die durch die Balken dargestellten MPN wurden mittels linearer Regressionsanalyse (*Mathematica* V7.0 „Linear Regression“; Wolfram Research Inc.) ermittelt. Das 95% Konfidenzintervall ist durch Fehlerbalken markiert.

Die Ergebnisse des IFN- γ *ELISpot*-Assay zeigen, dass sieben Tage p.i. SIINFEKL-spezifische CD8 T-Zellen nachweisbar waren. Die Aviditätsgrenze der SIINFEKL-spezifischen *ex vivo* isolierten CD8 T-Zellen lag bei 10^{-10} M und 10^{-11} M des SIINFEKL-Peptids. Bei einer Molarität von 10^{-11} M wurden nur noch 50% der SIINFEKL-spezifischen CD8 T-Zellen aktiviert.

4.3.2.2 Vergleich der funktionellen Avidität von OT-I Zellen mit der *in vivo* geprimter CD8 T-Zellen

Anhand der bisherigen Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass eine Infektion mit mCMV-SIINFEKL zu einem SIINFEKL-spezifischen *in vivo* Priming von CD8 T-Zellen führte,

wobei die Sensitivitätsgrenze dieser T-Zellen gegen über SIINFEKL bei 10^{-11} M lag. Nun sollte die Avidität von OT-I Zellen mit der *in vivo* geprimter T-Zellen verglichen werden. Um zusätzlich die Spezifität der OT-I Zellen gegenüber SIINFEKL zu testen und zu überprüfen, ob OT-I Zellen präsentiertes SIINFEKA-Peptid erkennen können, wurde der IFN- γ *ELISpot*-Assay zusätzlich mit SIINFEKA-Peptid durchgeführt. Dies ist insbesondere von Interesse, da eine Infektion mit mCMV-SIINFEKA keine SIINFEKL-spezifische Immunantwort induziert (siehe 4.3.1.1). Zunächst wurden die OT-I Zellen aufgereinigt und direkt als Effektoren in den IFN- γ *ELISpot*-Assay eingesetzt. EL-4 Zellen wurden mit titriertem (10^{-7} M bis 10^{-13} M), synthetischem SIINFEKL-Peptid beladen und als APC eingesetzt.

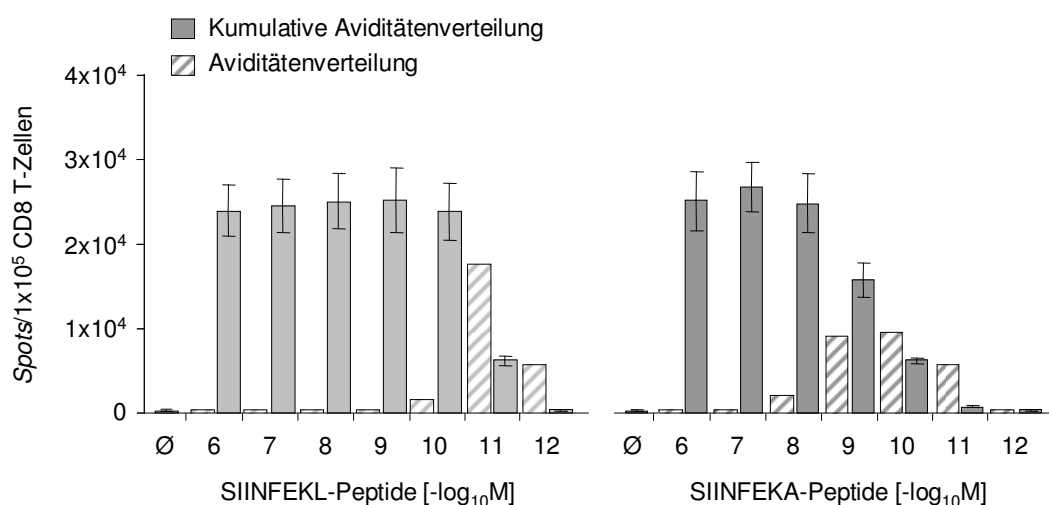


Abb. 4.9: Ermittlung der Avidität von OT-I Zellen. Die Ermittlung der funktionellen Avidität von OT-I Zellen erfolgte in einem IFN- γ *ELISpot*-Assay. Mit titriertem, synthetischem Peptid (SIINFEKL bzw. SIINFEKA; 10^{-7} M bis 10^{-13} M) beladene APC dienten als Zielzellen. Unbeladene APC wurden als Kontrolle eingesetzt. Die durch die Balken dargestellten MPN wurden mittels linearer Regressionsanalyse der Effektorzelltitration (*Mathematica* V7.0 „Linear Regression“; Wolfram Research Inc.) ermittelt. Das 95% Konfidenzintervall ist durch Fehlerbalken dargestellt.

Der Abb. 4.9 ist zu entnehmen, dass etwa 30% aller OT-I Zellen das SIINFEKL-Peptid erkannt haben und aktiviert wurden. Diese epitopspezifischen CD8 T-Zellen erkennen präsentiertes synthetische SIINFEKL-Peptid bis zu einer Grenzmolarität von 10^{-11} M, wobei eine Beladung der APC mit einer SIINFEKL-Peptid-Konzentration von 10^{-11} M im Vergleich zu 10^{-10} M zu einer um etwa 60% verminderten Reaktivität führte. Bei einer Molarität von 10^{-12} M konnte kein SIINFEKL-Peptid mehr von den OT-I Zellen erkannt werden. OT-I Zellen können auch von mit SIINFEKA-Peptid beladenen APC aktiviert werden, wobei die Sensitivität um etwa zwei log-Stufen verringert war. Die maximale Frequenz war bei 10^{-8} M zu detektieren, wobei bereits bei 10^{-9} M nur noch 50% der reaktiven OT-I Zellen aktiviert wurden. Die Aviditätenverteilung verdeutlicht, dass der Hauptbestandteil der reaktiven OT-I Zellen, wie der *in vivo* geprimter SIINFEKL-spezifischer CD8 T-Zellen, eine relativ hohe funktionelle Avidität aufwies. Nur ein geringer Teil der aktivierten OT-I Zellen zeichnete sich durch eine

niedrige funktionelle Avidität gegenüber dem SIINFEKL-Peptid aus. Im Vergleich hierzu besaß der Hauptbestandteil die OT-I Zellen bezüglich des SIINFEKA-Peptids eine intermediäre funktionelle Avidität. Die Tatsache, dass nach Infektion unter Verwendung des SIINFEKL-Peptids nur eine Gruppierung um einen Modalwert und keine bimodale Verteilung zu beobachten war, weist darauf hin, dass in der Gesamtheit der SIINFEKL-spezifischen CD8 T-Zellen hinsichtlich der funktionellen Avidität nur eine Population existiert und nicht zwei unterschiedliche Populationen vorliegen. Die Grenzavidität der OT-I Zellen gegenüber dem Peptid SIINFEKL lag bei 10^{-10}M .

Die Ergebnisse des IFN- γ *ELISpot-Assay* zeigen, dass OT-I Zellen präsentierte SIINFEKL-Peptid erkannten, wobei etwa 30% aller T-Zellen aktiviert werden konnten. Die Sensitivität der OT-I Zellen gegenüber dem SIINFEKL-Peptid war vergleichbar mit der *ex vivo* isolierter CD8 T-Zellen (4.3.2.1). Die experimentell ermittelten, kumulativen Aviditätsverteilungen sowie die errechneten Aviditätsverteilungen beider SIINFEKL-spezifischen CD8 T-Zellen unterscheiden sich nicht. Zudem konnte gezeigt werden, dass APC exogen mit SIINFEKA-Peptid beladen werden können und präsentierte SIINFEKA-Peptid OT-I Zellen aktivieren kann, wobei die Avidität der OT-I Zellen gegenüber dem SIINFEKA-Peptid um etwa zwei log-Stufen erniedrigt war.

4.3.2.3 Vergleich der funktionellen Avidität von OT-I Zellen mit der generierter CTLL

Die vorangegangenen Aviditätstests haben gezeigt, dass die Avidität der OT-I Zellen mit der *in vivo* geprimter T-Zellen vergleichbar war. Nun sollten im Anschluss die Aviditäten zwischen OT-I Zellen und generierten CTLL verglichen werden.

Zunächst erfolgte die Generierung epitopspezifischer CTLL. Neben einer polyklonalen SIINFEKL-spezifischen CTLL (CTLL-SIINFEKL) wurde zur Kontrolle eine mCMV-spezifische CTLL (CTLL-m139) generiert (siehe 3.4.4). Für die Anlage der CTLL wurden die Milzen aus drei mit mCMV-SIINFEKL infizierten *Memory*-Tieren isoliert, aufgereinigt und die Milzzellen mit einer entsprechenden Konzentration an synthetischem Peptid (SIINFEKL-Peptid bzw. m139-Peptid; 10^{-9}M bis 10^{-11}M) stimuliert (siehe 3.4.4). Eine Woche nach der 3. Restimulation wurde zunächst die zytolytische Aktivität der CTLL im Zytolysetest (siehe 3.4.5) bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass mit 10^{-10}M SIINFEKL-Peptid eine CTLL generiert werden konnte, die im Vergleich zu den beiden anderen CTLL ein besseres Wachstum sowie eine höhere zytolytische Aktivität aufzeigte (Daten nicht gezeigt). In der Abb. 4.10 ist die zytolytische Aktivität der CTLL-SIINFEKL (stimuliert mit 10^{-10}M) sowie der CTLL-m139 (stimuliert mit 10^{-9}M) dargestellt.

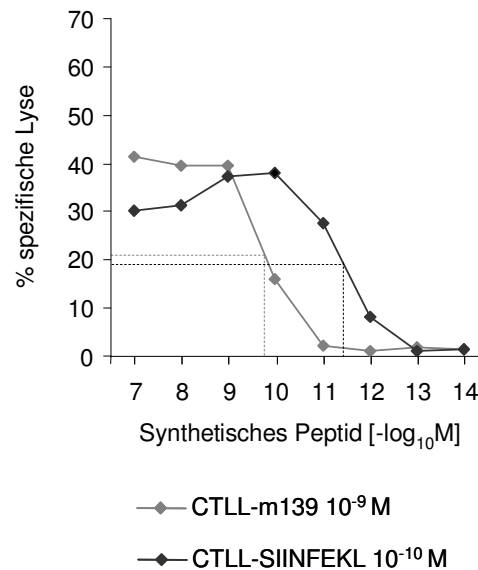


Abb. 4.10: Vergleich der zytolytischen Aktivität von CTLL-SIINFEKL mit CTLL-m139. Die zytolytische Aktivität wurde im Zytolysetest ermittelt. Dabei wurden mit titriertem, synthetischem Peptid ($10^{-7}M$ - $10^{-14}M$) beladene EL-4 Zellen als APC eingesetzt. Die untersuchten CTLL wurden aus Milzzellen mCMV-SIINFEKL infizierter *Memory*-Tiere generiert. Die Stimulation der CTLL-SIINFEKL erfolgte mit $10^{-10}M$ SIINFEKL-Peptid und die der CTLL-m139 mit $10^{-9}M$ m139-Peptid. Nach der 3. Restimulation wurden die CTLL als Effektoren in den Zytolysetest eingesetzt. Die Auswertung erfolgte wie in 3.4.5 beschrieben. Die halbmaximale Lyse ist durch die gestrichelte Linie markiert.

Im Folgeversuch sollte nun im IFN- γ *ELISpot*-Assay die funktionelle, spezifische Avidität der CTLL-SIINFEKL genauer untersucht werden, um diese mit der von OT-I Zellen vergleichen zu können. Zusätzlich wurde überprüft, ob eine CTLL-SIINFEKL wie OT-I Zellen in der Lage ist SIINFEKA-Peptid beladene EL-4 Zellen zu erkennen. Hierzu wurde die CTLL-SIINFEKL als Effektor in den IFN- γ *ELISpot*-Assay eingesetzt und mit EL-4 Zellen als Zielzellen stimuliert. Diese wurden zuvor mit titriertem, synthetischem SIINFEKL- bzw. SIINFEKA-Peptid (10^{-7} - $10^{-14}M$) exogen beladen. Die Abb. 4.11 zeigt, dass die SIINFEKL-spezifischen CTL (CTL-SIINFEKL) das präsentierte SIINFEKL-Peptid bis zu einer Molarität von $10^{-11}M$ erkannt haben und dabei 100% der T-Zellen aktiviert wurden. Bei einer Konzentration von $10^{-12}M$ lag die Anzahl des präsentierten SIINFEKL-Peptids unterhalb der Detektionsgrenze, sodass das SIINFEKL-Peptid nicht mehr von den CTL erkannt werden konnte. Hinsichtlich der Aviditätenverteilung lag die Grenzavidität der OT-I Zellen bei $10^{-11}M$. Die CTLL-SIINFEKL erkannte präsentierte SIINFEKA-Peptid, wobei dieses im Vergleich zu dem SIINFEKL-Peptid um etwa eine log-Stufe schlechter erkannt wurde.

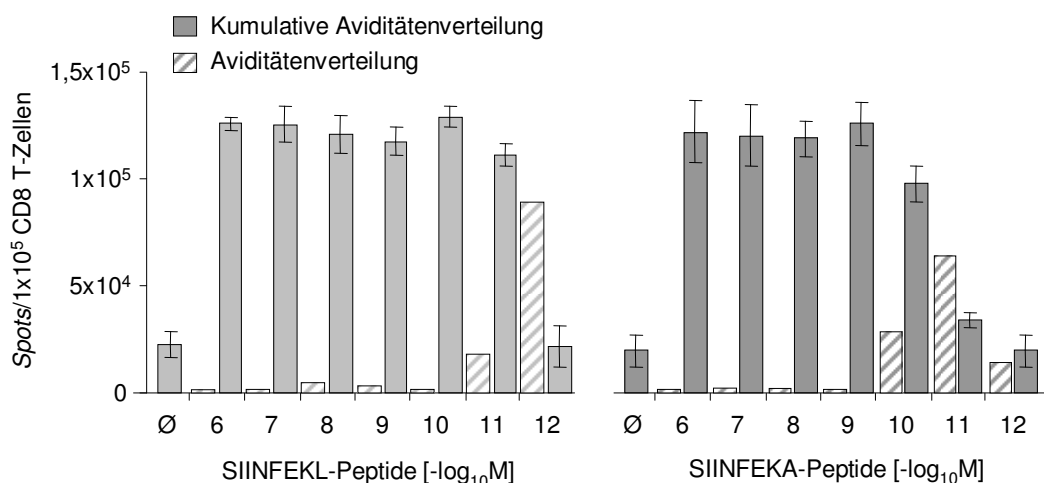


Abb. 4.11: Ermittlung der funktionellen Avidität einer CTLL-SIINFEKL [10^{-10} M]. Die funktionelle Avidität einer mit 10^{-10} M SIINFEKL-Peptid stimulierten CTLL wurde in einem IFN- γ *ELISpot-Assay* ermittelt. Als APC wurden EL-4 Zellen verwendet, die mit titriertem, synthetischem Peptid (SIINFEKL bzw. SIINFEKA; 10^{-7} M bis 10^{-13} M) beladen wurden. Als Kontrolle dienten unbeladene EL-4 Zellen. Die MPN (Balken) wurden mittels linearer Regressionsanalyse der Effektorzelltitration (*Mathematica V7.0* „Linear Regression“; Wolfram Research Inc.) ermittelt. Das 95% Konfidenzintervall ist durch Fehlerbalken dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine CTLL-SIINFEKL aus mCMV-SIINFEKL infizierten Memory-Tieren generiert werden konnte und diese nach Antigenkontakt IFN- γ sezernierten. Hierbei sind nahezu 100% der T-Zellen aktiviert worden. Die Aviditätsgrenze der CTLL-SIINFEKL sowie die maximale Frequenz lag für das SIINFEKL-Peptid bei 10^{-11} M. Der Hauptbestandteil der CTLL-SIINFEKL war im Vergleich zu OT-I Zellen gegenüber dem SIINFEKL-Peptid um lediglich eine log-Stufe sensitiver. Trotz der SIINFEKL-spezifischen Stimulation konnte die CTLL-SIINFEKL, wie bereits für OT-I Zellen gezeigt werden konnte (siehe 4.3.2.2), auch mit SIINFEKA-Peptid beladene Zielzellen erkennen, allerdings mit einer um eine log-Stufe niedrigeren Sensitivität. Im Vergleich hierzu konnten die OT-I Zellen das SIINFEKA-Peptid um zwei log-Stufen schlechter erkennen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Avidität der OT-I Zellen gegenüber dem SIINFEKL-Peptid vergleichbar mit der *in vivo* geprimter T-Zellen und der einer generierten CTLL-SIINFEKL ist. Somit eignen sich die OT-I Zellen für die geplanten Transferversuche.

4.4 Immunologische Charakterisierung rekombinanter DB

Dense Bodies (DB) werden in Zellkultur von hCMV-infizierten Fibroblasten gebildet und können aus diesen aufgereinigt werden (Craighead et al., 1972; Irmieri und Gibson, 1983). Sie sind nicht-infektiöse Partikel, in denen kein virales Genom nachzuweisen ist (Mocarski and Courcelle, 2001; Streblow et al., 2006), besitzen eine dem Virion ähnelnde Hüllmembran und sind entsprechend den Virionen fusionsaktiv. Eine Immunisierung von HLA-A2

transgenen Mäusen mit hCMV-DB führt zur Bildung von neutralisierenden AK (Pepperl et al., 2000) und zum *Priming* von CD8 T-Zellen (Mersseman et al., 2008a; Becke et al., 2010). Die Insertion eines HLA-A2 restringierten hCMV-Epitops (IE1) in den ORF des pp65 im hCMV-Genom führt zur Bildung eines Fusionsproteins, das in DB verpackt wird und *in vivo* ein epitopspezifisches T-Zell-*Priming* induziert (Mersseman et al., 2008a; b). In der hier vorliegenden Arbeit wurden rekombinante DB verwendet, die das SIINFEKL- bzw. das SIINFEKA-Peptid beinhalten. Mit Hilfe der BAC-Mutagenese (Mersseman et al., 2008a; b) wurden die für die DB-Gewinnung benötigten rekombinanten hCMV generiert. Dabei wurde das entsprechende Peptid an der Aminosäureposition 157 des Proteins pp65/UL83 inseriert (Becke et al., 2010). Die rekombinanten hCMV exprimieren somit ein pp65-SIINFEKL bzw. ein pp65-SIINFEKA Fusionsprotein und bilden entsprechende DB, die in dieser Arbeit als DB-SIINFEKL und DB-SIINFEKA bezeichnet wurden.

In dieser Arbeit sollten DB als Vakzine verwendet werden, die zum einen zur Effizienzsteigerung des AT mCMV-spezifischer T-Lymphozyten und zum anderen im HSCT-Rezipienten zur Verbesserung der Rekonstitution antiviraler Immunität beitragen sollen. Die Vakzinierung des HSCT-Empfängers mit DB sollte hierbei zur *in vivo* Expansion einer limitierten Anzahl adoptiv transferierter, antiviraler T-Zellen bzw. zur Stimulation antiviraler Immunität beitragen. Bevor die DB in den Transferversuchen eingesetzt werden konnten, musste ihre epitopspezifische *in vivo* Immunogenität überprüft werden.

4.4.1 Überprüfung der SIINFEKL-spezifischen Immunogenität rekombinanter DB

Der Nachweis einer SIINFEKL-spezifischen Immunogenität der rekombinanten DB erfolgte im IFN- γ *ELISpot-Assay*. Hierzu wurden acht Wochen alte C57BL/6 Mäuse durch i.p.l. Injektion mit 5 μ g, 10 μ g oder 15 μ g DB-SIINFEKL immunisiert. Zur Bestätigung der Spezifität wurde eine Gruppe mit 15 μ g DB-SIINFEKA immunisiert. Um das durch DB-SIINFEKL induzierte SIINFEKL-spezifische T-Zell-*Priming* in das Frequenzmuster des mCMV-SIINFEKL einordnen zu können, wurde eine Gruppe mit 1×10^5 PFU mCMV-SIINFEKL infiziert. Sieben Tage nach Immunisierung bzw. Infektion wurden die Milzen von je fünf Tieren pro Gruppe entnommen, die CD8 T-Zellen isoliert und als Effektoren im IFN- γ *ELISpot-Assay* eingesetzt. Als Zielzellen dienten mit SIINFEKL-Peptid (10^{-7} M) beladene EL-4 Zellen. Als Negativkontrolle bzw. zur Kontrolle der Infektion wurden APC mit dem mCMV-Peptid m139 beladen und als Zielzellen in den IFN- γ *ELISpot-Assay* eingesetzt.

Der Abb. 4.12 ist zu entnehmen, dass nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL CD8 T-Zellen spezifisch *geprimt* werden konnten. Die stärkste T-Zell-Aktivierung konnte mit einer Dosis von 15 μ g DB erreicht werden. Hierbei hatten etwa 0,3% aller CD8 T-Zellen das präsentierte SIINFEKL-Peptid erkannt und wurden aktiviert. Im Gegensatz dazu war die Frequenz nach

Infektion mit mCMV-SIINFEKL etwa doppelt so hoch. Nach einer Immunisierung mit DB-SIINFEKA konnten keine SIINFEKL-spezifischen CD8 T-Zellen detektiert werden. CD8 T-Zellen mit einer Spezifität gegen das mCMV-Peptid m139 konnten ausschließlich nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL nachgewiesen werden.

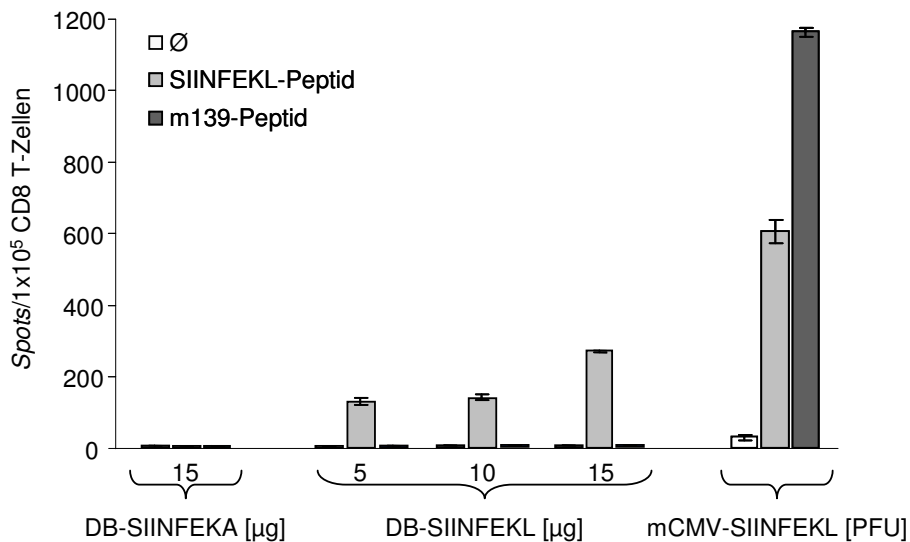


Abb. 4.12: Nachweis eines SIINFEKL-spezifischen T-Zell-Primings nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL.

Sieben Tage nach Immunisierung mit titrierten Dosen (5µg, 10µg, 15µg) an DB-SIINFEKL wurden CD8 T-Zellen aus der Milz aufgereinigt und als Effektoren in den IFN-γ *ELISpot-Assay* eingesetzt. Als Zielzellen dienten mit SIINFEKL-Peptid (10^{-7} M) bzw. m139-Peptid (10^{-7} M) beladene EL-4 Zellen. Als Kontrollen dienten mit 15µg DB-SIINFEKA immunisierte bzw. mit mCMV-SIINFEKL i.pl. infizierte Mäuse. Die MPN (Balken) wurden mittels linearer Regressionsanalyse der Effektorzelltitration (*Mathematica* V7.0 „Linear Regression“; Wolfram Research Inc.) ermittelt. Das 95% Konfidenzintervall ist durch Fehlerbalken dargestellt.

Die Ergebnisse des IFN-γ *ELISpot-Assay* zeigen, dass eine Immunisierung mit DB-SIINFEKL zu einem SIINFEKL-spezifischen T-Zell-*Priming* führt, wobei das stärkste *Priming* mit 15µg DB erreicht werden konnte. Die Epitopspezifität der DB-SIINFEKL wurde durch DB-SIINFEKA bestätigt, da eine Immunisierung mit DB-SIINFEKA zu keinem T-Zell-*Priming* geführt hatte. DB-SIINFEKA ist daher als Negativkontrolle geeignet.

4.4.2 Ermittlung eines dosisabhängigen T-Zell-Primings

In 4.4.1 konnte gezeigt werden, dass *in vivo* CD8 T-Zellen durch eine Immunisierung mit DB epitopspezifisch *geprimt* werden können, wobei die Intensität der Immunantwort von der DB-Dosis abhängig ist. Um dieses zu bestätigen und die minimal notwendige DB-Dosis, die für ein *Priming* notwendig ist, zu bestimmen, wurden immunkompetente C57BL/6 Mäuse mit titrierten Dosen (0,3µg, 0,6µg, 1,2µg, 2,5µg, 5µg, 10µg oder 15µg) an DB-SIINFEKL immunisiert. Mit 15µg DB-SIINFEKA immunisierte Mäuse dienten wiederum als Kontrollgruppe. Sieben Tage nach Infektion wurden die CD8 T-Zellen aus einem Pool von

drei Milzen isoliert und anschließend als Effektorzellen in den IFN- γ *ELISpot*-Assay eingesetzt. Mit SIINFEKL-Peptid (10^{-7} M) beladene EL-4 Zellen dienten als Zielzellen.

Die in Abb. 4.13 dargestellten Ergebnisse zeigen eine direkte Abhängigkeit zwischen der Intensität der Immunantwort und der für die Immunisierung eingesetzten Dosis an DB-SIINFEKL. Allerdings führt eine 50%-ige Reduzierung der Dosis nicht zu einer Halbierung der *Priming*-Frequenz. Bei einer Dosis von $10\mu\text{g}$ DB-SIINFEKL war die Frequenz im Vergleich zu einer Dosis von $15\mu\text{g}$ um etwa 30% reduziert und bei einer Immunisierung mit $5\mu\text{g}$ konnten nur noch etwa 0,07% aller CD8 T-Zellen SIINFEKL-spezifisch *geprimt* werden. Unterhalb einer Dosis von $1,2\mu\text{g}$ DB konnte keine messbare T-Zell-Antwort induziert werden. Somit betrug die Minimaldosis $1,2\mu\text{g}$.

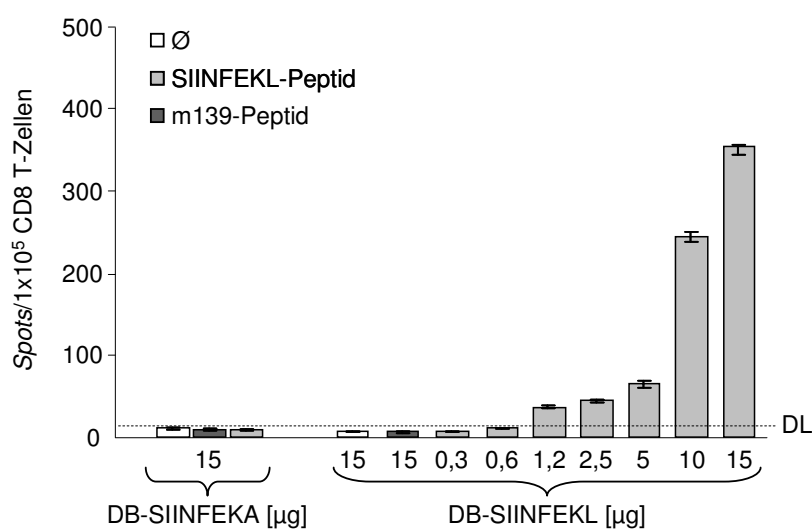


Abb. 4.13: Nachweis eines dosisabhängigen CD8 T-Zell-Primings. Der Nachweis erfolgte in einem IFN- γ *ELISpot*-Assay. C57BL/6 Mäuse wurden mit titrierten DB-SIINFEKL-Dosen ($0,3\mu\text{g}$, $0,6\mu\text{g}$, $1,2\mu\text{g}$, $2,5\mu\text{g}$, $5\mu\text{g}$, $10\mu\text{g}$ oder $15\mu\text{g}$) immunisiert. An Tag sieben nach Immunisierung wurden die CD8 T-Zellen aus einem Pool von drei Milzen isoliert und dienten als Effektoren. Mit SIINFEKL-Peptid (10^{-7} M) bzw. m139-Peptid (10^{-7} M) beladene EL-4 Zellen dienten als Zielzellen. Zur Kontrolle wurde eine Gruppe mit $15\mu\text{g}$ DB-SIINFEKA immunisiert. Das Detektionslimit (DL) ist durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet. Die MPN (Balken) wurden mittels linearer Regressionsanalyse der Effektorzelltitration (*Mathematica* V7.0 „Linear Regression“; Wolfram Research Inc.) ermittelt. Das 95% Konfidenzintervall ist durch Fehlerbalken dargestellt.

Die Ergebnisse bestätigen, dass eine Immunisierung mit DB-SIINFEKL eine SIINFEKL-spezifische CD8 T-Zell-Antwort induziert, wobei die *Priming*-Frequenz bzw. die Intensität der Immunantwort nach Antigenkontakt von der DB-Dosis anhängig ist. Das höchste CD8 T-Zell-*Priming* konnte durch eine Immunisierung mit $15\mu\text{g}$ erreicht werden, während das minimale *Priming* mit $1,2\mu\text{g}$ erzielt wurde. Aufgrund der nur limitiert zur Verfügung stehenden Menge an DB konnte nicht bis auf die für die maximale Antwort erforderliche Plateau-Dosis weiter nach oben titriert werden.

4.4.3 Vergleich der SIINFEKL-spezifischen Immunantwort nach DB-Immunsierung und nach mCMV-Infektion

In den vorherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Immunsierung mit DB-SIINFEKL zu einem dosisabhängigen, epitopspezifischen *Priming* von CD8 T-Zellen führt. Nun stellte sich die Frage, ob das nach Immunsierung mit einer hohen DB-Dosis erzielte *Priming* die *Priming*-Frequenz nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL erreichen kann. Zudem sollte eine Infektionsdosis und eine DB-Dosis ermittelt werden, die vergleichbare *Priming*-Frequenzen erzielten. Für den Nachweis wurden immunkompetente Mäuse mit titrierten Infektionsdosen (10^1 - 10^5 PFU) mCMV-SIINFEKL i.p.l. infiziert bzw. mit 5 μ g, 10 μ g oder 15 μ g DB-SIINFEKL immunsiert. Sieben Tage p.i. wurden die CD8 T-Zellen aus einem Pool von drei Milzen aufgereinigt und als Effektorzellen in den IFN- γ *ELISpot*-Assay eingesetzt. Als Zielzellen dienten mit SIINFEKL-Peptid (10^{-7} M) beladene EL-4 Zellen.

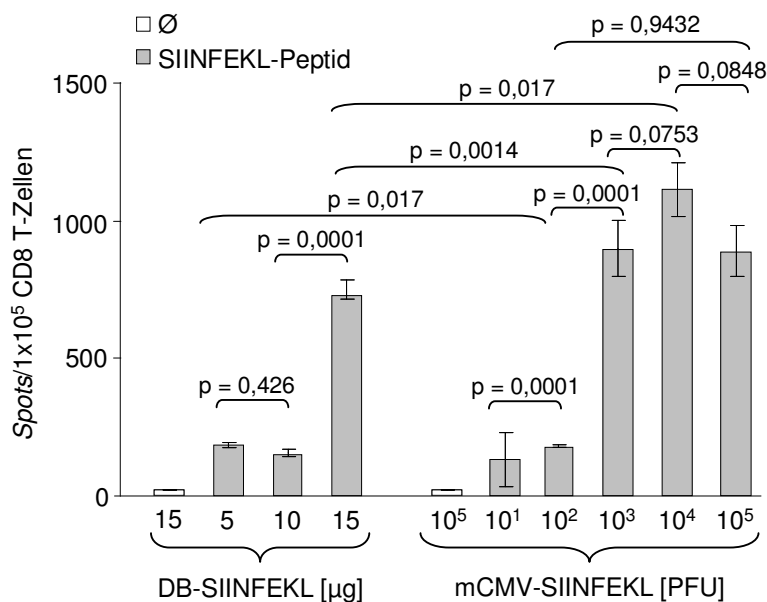


Abb. 4.14: Vergleich der durch Immunsierung bzw. Infektion induzierten *Priming*-Frequenzen. Immunkompetente C57BL/6 Mäuse wurden mit 5 μ g, 10 μ g oder 15 μ g DB-SIINFEKL immunsiert oder mit titrierten Infektionsdosen (10^1 - 10^5 PFU) mCMV-SIINFEKL i.p.l. infiziert. Sieben Tage p.i. wurden aus einem Pool von drei Milzen die CD8 T-Zellen isoliert und im IFN- γ *ELISpot*-Assay als Effektoren eingesetzt. Mit SIINFEKL-Peptid (10^{-7} M) exogen beladene EL-4 Zellen wurden als Zielzellen verwendet. Zur Kontrolle wurden unbeladene (\emptyset) APC eingesetzt. Die MPN (Balken) wurden mittels linearer Regressionsanalyse der Effektorzelltitration (*Mathematica* V7.0 „Linear Regression“; Wolfram Research Inc.) ermittelt. Das 95% Konfidenzintervall ist durch Fehlerbalken dargestellt. Die P-Werte der normal verteilten Zahlen wurden im *unpaired, two-tailed Student's t-Test* (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm?Format=C>) ermittelt. Ein P-Werte <0,05 zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an.

Wie in der Abb. 4.14 dargestellt, ist die *Priming*-Frequenz abhängig von der Infektionsdosis. Mit einer Infektionsdosis von 1×10^4 PFU wurde die stärkste Immunantwort erzielt, wobei etwa 1% aller CD8 T-Zellen das präsentierte SIINFEKL-Peptid erkannt haben und dadurch aktiviert wurden. Eine weitere Erhöhung der Virusdosis um den Faktor 10 führte zu keiner

Verstärkung der Frequenz ($p=0,0848$) und war vergleichbar mit der nach Infektion mit 1×10^3 PFU ($p=0,9432$). Die durch eine Immunisierung mit $15 \mu\text{g}$ DB-SIINFEKL erzielte Frequenz erreicht nicht das Niveau, das nach Infektion mit 1×10^3 PFU ($p=0,0014$) oder mit 1×10^4 PFU ($p=0,017$) erreicht wurde. Nach einer Infektion mit einer Virusdosis von 1×10^1 PFU oder 1×10^2 PFU wurden etwa 0,15% aller CD8 T-Zellen SIINFEKL-spezifisch *geprimt*. Vergleichbare Werte konnten nach Immunisierung mit $5 \mu\text{g}$ bzw. $10 \mu\text{g}$ DB erfasst werden ($p=0,426$).

Diese Ergebnisse zeigen eine Abhängigkeit zwischen Virusdosis und Intensität der Immunantwort. Eine DB-Dosis von $15 \mu\text{g}$ konnte nicht das *Priming* einer hohen Virusdosis von 1×10^4 PFU erreichen. $10 \mu\text{g}$ und 1×10^2 PFU erzielten vergleichbare Frequenzen.

4.5 Nachweis von Proliferation adoptiv transferierter OT-I Zellen nach Infektion bzw. Immunisierung

Die *Priming*-Analysen haben gezeigt, dass DB-SIINFEKL wie mCMV-SIINFEKL *in vivo* CD8 T-Zellen spezifisch *primen*. Nun stellte sich die Frage, ob transferierte SIINFEKL-spezifische CD8 T-Zellen nach Infektion bzw. Immunisierung proliferieren. Um diese Fragen zu klären wurde ein CFSE-Proliferations-Assay etabliert. Diese Methode, bei der Zellen effektiv und stabil mit CFSE markiert werden, wird zur Nachverfolgung der *in vitro* und der *in vivo* Proliferation von Lymphozyten verwendet (Lyons et al., 1994; Parish et al., 2009; Quah et al., 2007; 2010). Die für den Proliferations-Assay benötigten SIINFEKL-spezifischen CD8 T-Zellen wurden aus der OT-I Maus isoliert.

4.5.1 Nachweis von Proliferation adoptiv transferierter OT-I Zellen nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL

Im ersten Schritt wurde überprüft, ob nach einer Infektion mit mCMV-SIINFEKL transferierte OT-I Zellen epitopspezifisch proliferieren. Die Quantifizierung der Proliferation erfolgte dabei in lymphatischen Kompartimenten im Zeitverlauf. Im ersten Versuch wurde zunächst die *in vivo* Proliferation im LK ermittelt. Der Versuchsablauf ist in Abb. 4.15 schematisch dargestellt.

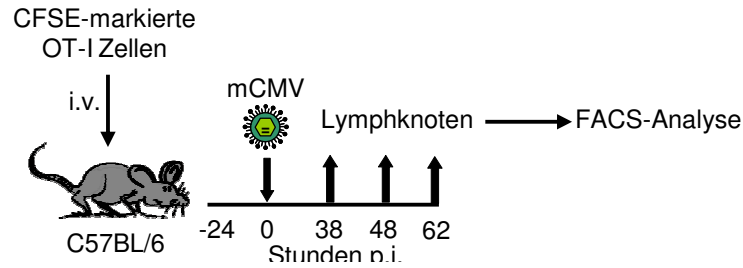


Abb. 4.15: Schematische Darstellung des Proliferations-Assay. 24h vor i.pl. Infektion wurden OT-I Milzzellen mit CFSE markiert und anschließend i.v. in immunkompetente C57BL/6 Mäuse transferiert. 38h, 48h und 60h p.i. wurden die LK entnommen und zytofluorometrisch analysiert.

OT-I Milzzellen wurden mit CFSE-markiert (siehe 3.6.6) und i.v. in immunkompetente C57BL/6 Mäuse transferiert. Am nächsten Tag erfolgte eine i.pl. Infektion mit 1×10^5 PFU mCMV-SIINFEKL. In einer Zeitkinetik wurde anschließend die Proliferation der transferierten Zellen verfolgt. Dazu wurden 38h, 48h sowie 62h p.i. die poplitealen LK der Infektionsseite entnommen. Die poplitealen LK der gegenüberliegenden Seite dienten als Kontrolle. Die CD8 T-Zellen wurden mit Fluorochrom-gekoppelten AK markiert und die Ansätze zytofluorometrisch analysiert.

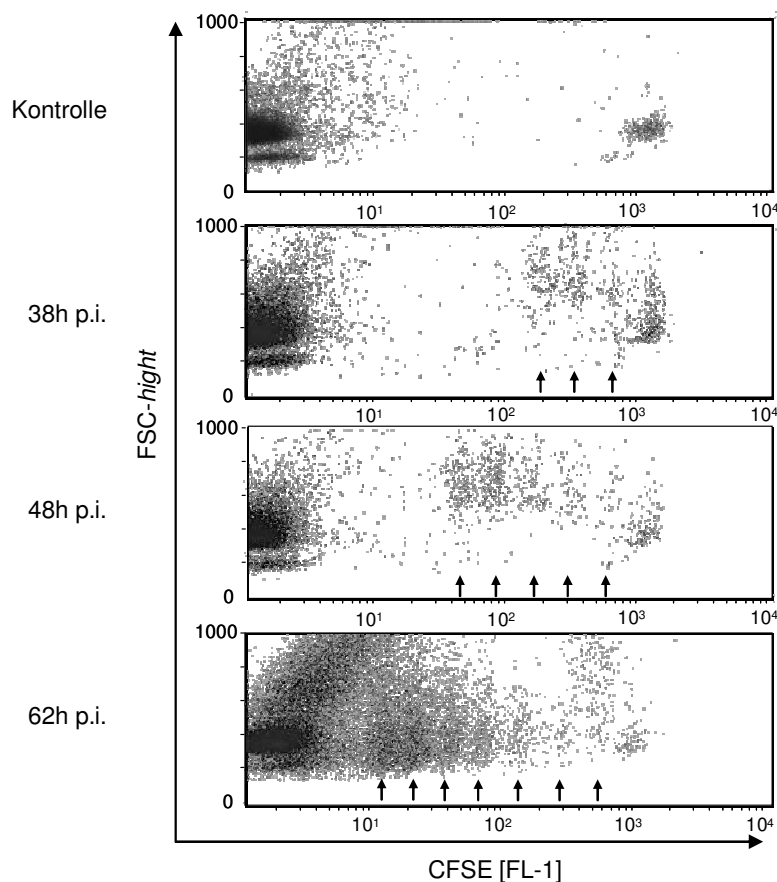


Abb. 4.16: Nachweis SIINFEKL-induzierter T-Zell-Proliferation im poplitealen LK nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL. 24h vor i.pl. Infektion mit mCMV-SIINFEKL wurden OT-I Milzzellen mit CFSE markiert und anschließend 2×10^7 Zellen i.v. in immunkompetente C57BL/6 Mäuse transferiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (38h, 48h und 62h) p.i. wurden die LK entnommen und aufgearbeitet. Die Zellen wurden mit

Fluorochrom-konjugierten AK markiert (APC-anti-CD8) und zytofluorometrisch analysiert. Zur Kontrolle dienten LK der nicht-infizierten Seite (obere Darstellung; 62h p.i.). Zunächst wurde auf Lymphozyten gegatet, die CD8 positiven Zellen wurden im Dot Plot CFSE vs. FSC dargestellt. Die CFSE positiven Zellen stellen die transferierten OT-I Zellen dar.

Bereits nach 38h Infektion waren drei Zellteilungen nachzuweisen (siehe Abb. 4.16). Dies zeigte, dass transferierte OT-I Zellen im LK nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL proliferieren. 48h p.i. konnten zwei weitere Populationen erfasst werden, somit fünf Zellteilungen und nach 62h waren es insgesamt sieben. Selbst 62h p.i. konnte in der Kontrollgruppe keine Proliferation nachgewiesen werden.

Nachdem im poplitealen LK der Infektionsseite nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL die Proliferation transferierter OT-I Zellen gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob die transferierten Zellen nicht nur im LK, sondern auch in anderen Organen nachweisbar sind. Hierfür wurde die SIINFEKL-spezifische Proliferation in der Milz untersucht. Der schematische Ablauf ist in Abb. 4.17 dargestellt

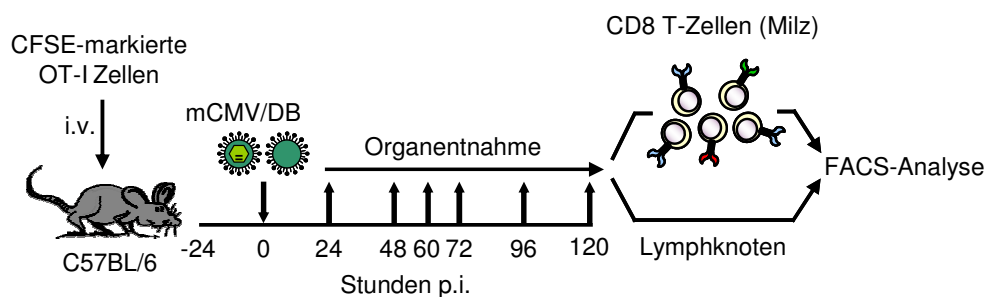


Abb. 4.17: Schema des *in vivo* CFSE-Proliferations-Assay. OT-I Milzzellen wurden mit CFSE markiert und anschließend 2×10^7 Zellen i.v. transferiert. Am Folgetag wurden immunkompetente C57BL/6 Mäuse i.pl. mit mCMV infiziert bzw. mit DB immunisiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (24h, 48h, 60h, 72h, 96h und 120h) p.i. wurden die LK bzw. die Milzen entnommen. Die LK wurden aufgearbeitet und die CD8 T-Zellen wurden aus der Milz isoliert. Die Proliferation der transferierten Zellen wurde zytofluorometrisch nachgewiesen.

Die Milzzellen der OT-I Maus wurden wie zuvor beschrieben markiert und transferiert. Am nächsten Tag wurden immunkompetente C57BL/6 Mäuse mit 1×10^5 PFU mCMV-SIINFEKL oder in der Kontrollgruppe mit mCMV-SIINFEKA infiziert. Um zu überprüfen, ob transferierte OT-I Zellen ohne Infektion im Rezipienten proliferieren können, blieb eine Gruppe mCMV-unbehandelt. An den Zeitpunkten 24h, 48h, 60h, 72h, 96h sowie 120h p.i. wurden die CD8 T-Zellen aus je einem Pool von drei Milzen aufgereinigt. Anschließend wurden die CD8 T-Zellen sowie der TCR-V α 2 mit Fluorochrom-gekoppelten AK (PE-anti-CD8 und APC-anti-TCR-V α 2) markiert und die Proben zytofluorometrisch analysiert. Die transferierten OT-I Zellen können zytofluorometrisch anhand des CFSE und durch den TCR-V α 2 identifiziert werden. Um die transferierten SIINFEKL-spezifischen CD8 T-Zellen *per* FACS-Analyse darstellen zu können, mussten etwa 2×10^6 Zellen gemessen werden.

Bis 24h Infektion war keine Proliferation der transferierten OT-I Zellen nachzuweisen (siehe Abb. 4.18), 48h p.i. hingegen konnten drei Zellteilungen erfasst werden. 60h p.i. wurden zwei

zusätzliche Tochterpopulationen detektiert, damit hatten sich die transferierten OT-I Zellen insgesamt fünfmal geteilt und nach 72h p.i. konnten sieben Zellteilungen dargestellt werden. Nach mehr als sieben Teilungen lag die CFSE-Fluoreszenz im Bereich der Eigenfluoreszenz der unmarkierten Zellen, sodass nach 96h und 120h Infektion ebenfalls sieben Zellteilungen dargestellt wurden. In der nicht-infizierten Kontrollgruppe konnte zu keinem Zeitpunkt eine Proliferation der OT-I Zellen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnten in der mCMV-SIINFEKA infizierten Gruppe 60h p.i. zwei Zellteilungen und nach 72h p.i. bzw. 96h p.i. drei Teilungen erfasst werden.

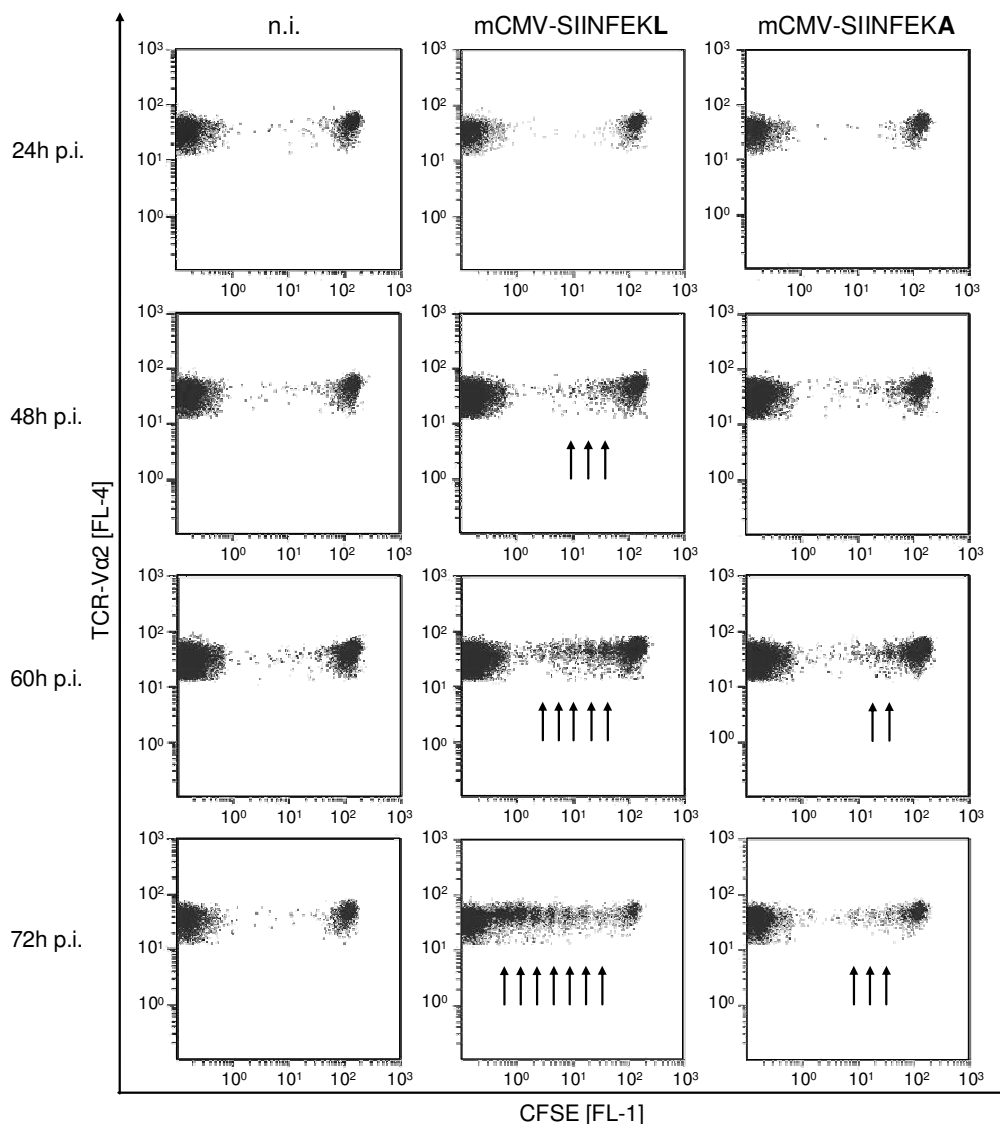


Abb. 4.18: Nachweis SIINFEKL-induzierter T-Zell-Proliferation in der Milz nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL. Im CFSE-Proliferations-Assay wurde in einer Zeitkinetik die *in vivo* Proliferation transferierter OT-I Zellen nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL in der Milz verfolgt. Dazu wurden 2×10^7 CFSE markierte OT-I Milzzellen i.v. in immunkompetente C57BL/6 Mäuse transferiert. Am nächsten Tag erfolgte die i.p.l. Infektion mit mCMV-SIINFEKL bzw. mCMV-SIINFEKA. Als Kontrolle wurde eine nicht infizierte Gruppe mitgeführt. Zu den Zeitpunkten (24h, 48h, 60h, 72h) p.i. wurden die CD8 T-Zellen aus einem Pool von drei Milzen aufgereinigt, mit Fluorochrom-konjugierten AK markiert (PE-anti-CD8 und APC-anti-TCR-Vα2) und zytofluorometrisch analysiert. Es wurden jeweils 2×10^6 Zellen analysiert. Zunächst wurde auf Lymphozyten gegatet, diese wurden im Dot Plot

CD8 vs. TCR-V α 2 dargestellt. Die CD8⁺/TCR-V α 2⁺ Zellen wurden anschließend im Dot Plot CFSE vs. TCR-V α 2 dargestellt. Die CFSE⁺ Zellen stellen die transferierten OT-I Zellen dar.

Die Ergebnisse zeigen, dass der reine Zelltransfer zu keiner Proliferation der OT-I Zellen führte. Eine Proliferation konnte nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL sowie nach Infektion mit mCMV-SIINFEKA beobachtet werden. In der mCMV-SIINFEKL Infektionsgruppe konnten bereits 48h p.i. drei Zellteilungen festgestellt werden und mit zunehmender Zeit wurden weitere Teilungen der OT-I Zellen erfasst, wobei ein Teilungszyklus etwa 5h dauerte. Die Infektion mit mCMV-SIINFEKA induziert gleichfalls eine Proliferation, die jedoch erst nach 60h p.i. und somit wesentlich später als nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL eintrat. Dies lässt darauf schließen, dass eine Infektion mit mCMV-SIINFEKL die Proliferation epitopspezifisch induziert, wohingegen die Proliferation nach Infektion mit mCMV-SIINFEKA unspezifisch durch die Infektion bedingt ist.

4.5.2 Nachweis von Proliferation SIINFEKL-spezifischer CD8 T-Zellen nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL

In den vorangegangenen *in vivo* Experimenten konnte in Reaktion auf eine infektionsbedingte SIINFEKL-Präsentation die Proliferation transferierter, CFSE-markierter OT-I Zellen nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte in den *Priming*-Analysen gezeigt werden, dass eine Immunisierung mit DB-SIINFEKL zum *Priming* SIINFEKL-spezifischer CD8 T-Zellen führte. Nun sollte überprüft werden, ob die Immunisierung mit DB-SIINFEKL gleichfalls zur Proliferation *in vivo* transferierter OT-I Zellen führt.

4.5.2.1 Nachweis von Proliferation adoptiv transferierter OT-I Zellen *in vitro*

Bevor die Frage einer *in vivo* induzierten Proliferation überprüft wurde, wurde zunächst ein *in vitro* Proliferations-Assay (siehe 3.4.8) etabliert. Mit dessen Hilfe sollte die epitopspezifische Proliferation von OT-I Zellen nach Inkubation mit DB-SIINFEKL präinkubierten MEF gezeigt werden. Als Kontrolle dienten mit DB-SIINFEKA präinkubierte sowie exogen mit SIINFEKL-Peptid beladene MEF. Durch eine Inkubation mit DB-SIINFEKL sollten MEF endogen mit SIINFEKL-Peptid beladen werden. Während der Inkubation fusioniert die DB-Hülle mit der Zellmembran der Fibroblasten. Damit gelangt der Inhalt der DB inklusive der Fusionsproteine pp65-SIINFEKL bzw. pp65-SIINFEKA in das Zytoplasma der Zelle. Nach erfolgreicher Prozessierung wird das SIINFEKL-Peptid über den MHC-Klasse-I-Präsentationsweg an der Oberfläche der MEF präsentiert. Dagegen sollte aus dem Fusionsprotein pp65-SIINFEKA kein Peptid prozessiert und präsentiert werden.

Für den *in vitro* Proliferations-Assay wurden zunächst konfluente MEF in 24-Well-Platten mit DB-SIINFEKL bzw. mit DB-SIINFEKA ü.N. präinkubiert (siehe 3.4.7.1). Während am nächsten Tag die MEF der Kontrollgruppe exogen mit SIINFEKL-Peptid (10^{-7} M) beladen (siehe 3.4.7.2) wurden, erfolgte die Isolierung der OT-I Zellen sowie ihre CFSE-Markierung (siehe 3.4.7). Die Überstände der MEF wurden abgenommen und 1×10^6 Zellen auf die MEF transferiert. Es wurden für jeden Zeitpunkt Triplikate angelegt. In einer Gruppe wurden unbehandelte MEF eingesetzt, um ausschließen zu können, dass die OT-I Zellen ohne Antigenstimulus in Kultur proliferieren.

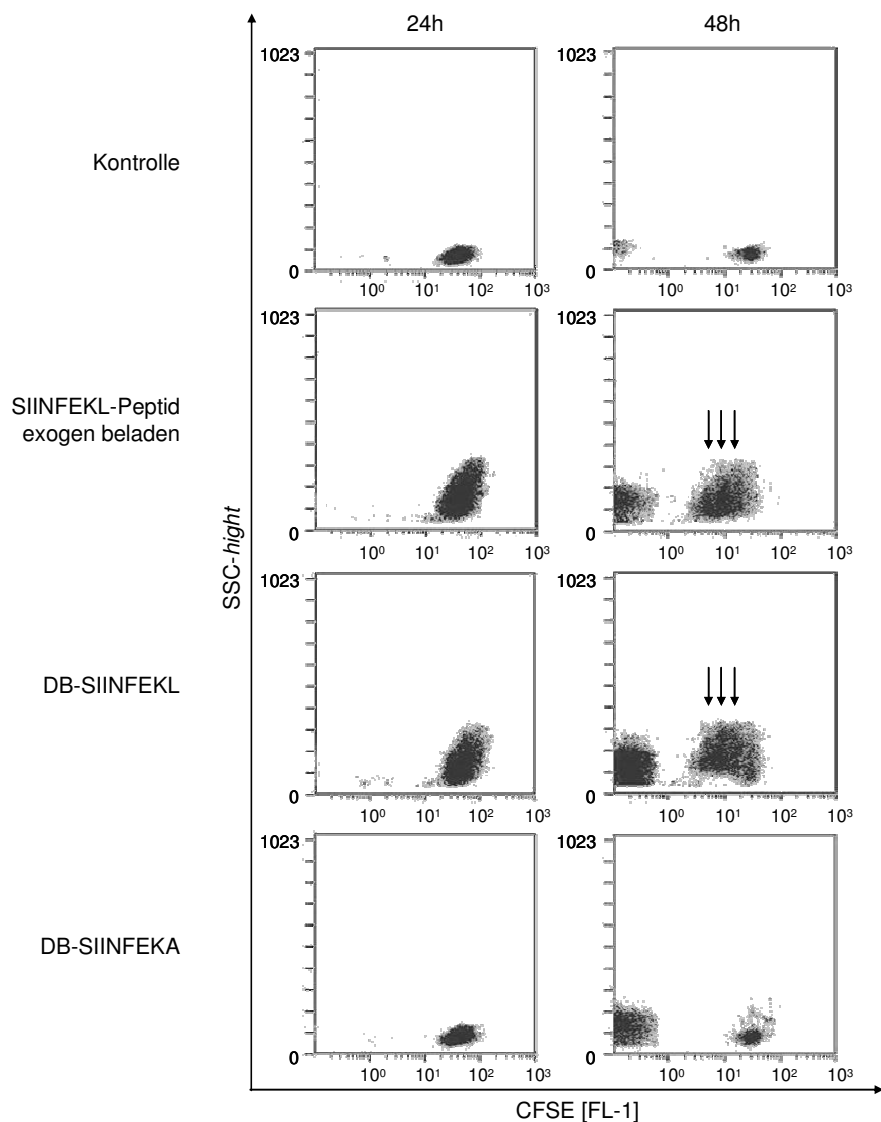


Abb. 4.19: Nachweis SIINFEKL-induzierter T-Zell-Proliferation *in vitro*. Die *in vitro* Proliferation von OT-I Zellen durch mit DB-SIINFEKL präinkubierten MEF wurde im *in vitro* Proliferations-Assay analysiert. Konfluente MEF wurden mit DB-SIINFEKL bzw. DB-SIINFEKA für 24h inkubiert. Am Folgetag wurden 1×10^6 OT-I Zellen mit CFSE markiert und mit den MEF inkubiert. Es wurden je Zeitpunkt Triplikate angelegt. Zu definierten Zeitpunkten (24h, 48h) der Kokultivierung wurden die Triplikate einer Gruppe zusammengefügt und die CD8 T-Zellen zytofluorometrisch analysiert. Es wurde max. 2×10^6 Zellen analysiert und im SSC-high gegenüber CFSE dargestellt. Die CFSE⁺ stellen die markierten OT-I Zellen dar.

Nach 24h und 48h wurden die Zellen geerntet, die Zellen einer Gruppe zusammengefügt und die Proliferation der OT-I Zellen zytofluorometrisch quantifiziert. Es wurden max. 2×10^6 Zellen analysiert und in der Darstellung 100% dargestellt. Spätere Zeitpunkte konnten nicht analysiert werden, da die CD8 T-Zellen nicht mehr intakt waren. Während nach 24h Inkubation in keiner Gruppe eine Proliferation der OT-I Zellen beobachtet werden konnte (siehe Abb. 4.19), wurden nach 48h in der DB-SIINFEKL-Gruppe drei Zellteilungen erfasst. Diese Teilungsrate war vergleichbar mit der Proliferation, die nach 48h Inkubation der OT-I Zellen mit SIINFEKL-exogenbeladenen MEF detektiert wurde. Eine Inkubation mit unbeladenen MEF oder DB-SIINFEKA-inkubierten MEF führte zu keiner Proliferation der OT-I Zellen.

Die Ergebnisse des *in vitro* Proliferations-Assay zeigen, dass MEF durch die Inkubation mit DB-SIINFEKL endogen mit SIINFEKL-Peptid beladen werden konnten und dieses präsentierte Antigen eine SIINFEKL-spezifische Proliferation der OT-I Zellen induzierte.

4.5.2.2 Nachweis von *in vivo* Proliferation adoptiv transferierter OT-I Zellen nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL

Der *in vivo* Nachweis einer induzierten Proliferation transferierter OT-I Zellen nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL erfolgte im LK sowie in der Milz im *in vivo* Proliferations-Assay (siehe 3.6.6). Dazu wurden CFSE-markierte OT-I Milzzellen (siehe 3.4.8) i.v. in immunkompetente C57BL/6 Mäuse transferiert. Am Folgetag wurden die Rezipienten mit 20 μ g DB-SIINFEKL bzw. mit 20 μ g DB-SIINFEKA immunisiert. Zur Kontrolle wurde eine Gruppe mit mCMV-SIINFEKL infiziert. Zu den Zeitpunkten 24h, 48h, 60h und 72h p.i. wurde die Proliferation in den Organen analysiert. Die aufgearbeiteten poplitealen LK der Infektionsseite sowie die aus Milzen isolierten CD8 T-Zellen wurden analog zu 4.6.1 mit Fluorochrom-gekoppelten AK markiert und analysiert. Um die transferierten SIINFEKL-spezifischen CD8 T-Zellen *per* FACS-Analyse darstellen zu können, mussten etwa 2×10^6 Zellen gemessen werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.20 dargestellt.

Ab 48h p.i. ist eine Proliferation der OT-I Zellen in der DB-SIINFEKL Immunisierungsgruppe nachweisbar, wobei zu diesem Zeitpunkt vier Zellteilungen detektiert werden konnten (siehe Abb. 4.20). Nach 60h Infektion konnten zwei weitere Zellteilungen dargestellt werden, die transferierten OT-I Zellen hatten sich bis zu diesem Zeitpunkt insgesamt sechsmal geteilt. Nach insgesamt 72h Infektion konnten sieben Zellteilungen beobachtet werden, die anhand eines *color-coded Density Plots* im *Dot Plot* markiert werden konnten. Die Proliferation in der mCMV-SIINFEKL-Infektionsgruppe war während der gesamten Zeitkinetik vergleichbar mit der Proliferation der DB-SIINFEKL-Immunisierungsgruppe. In der mit DB-SIINFEKA

immunisierten Kontrollgruppe konnte zu keinem Zeitpunkt eine Proliferation nachgewiesen werden.

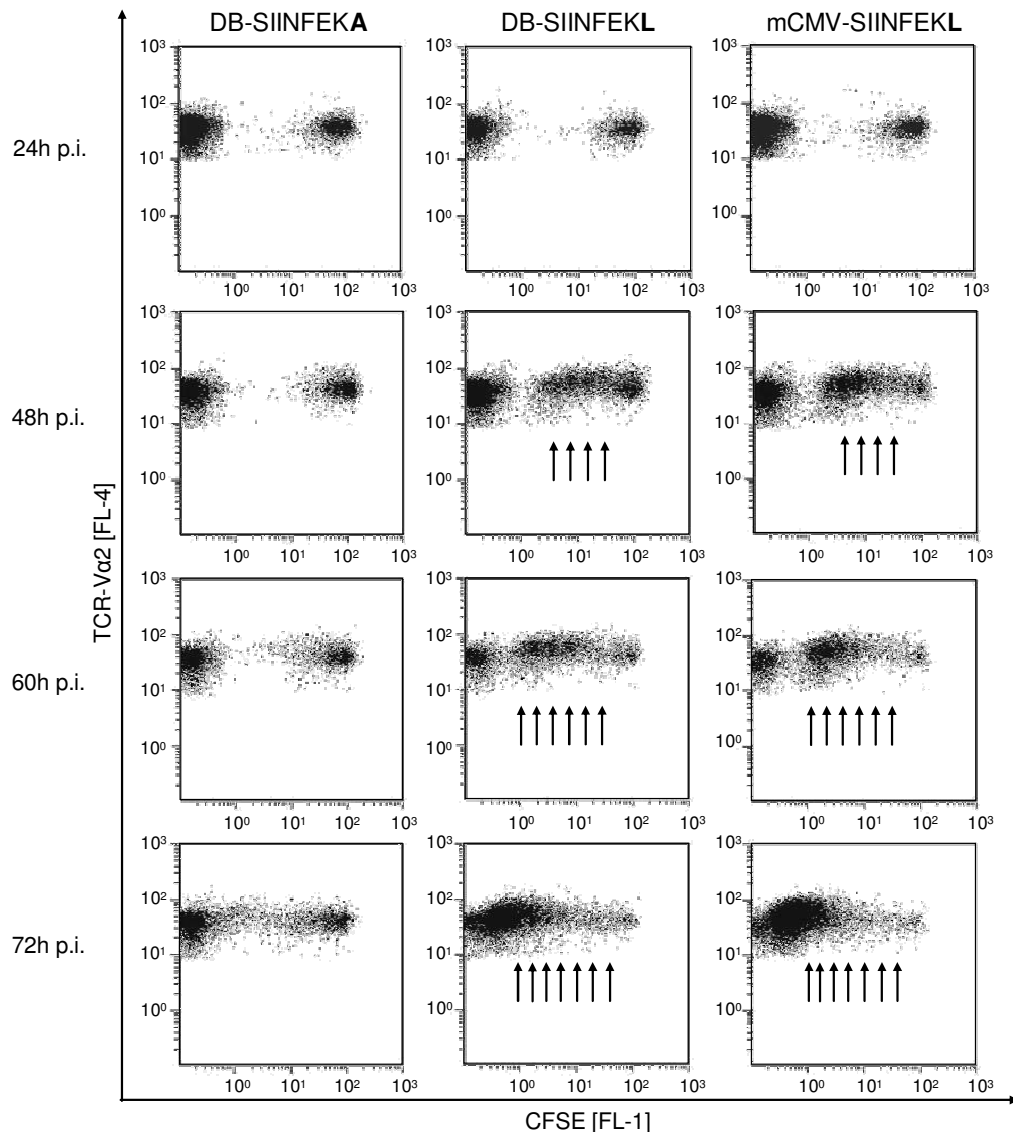


Abb. 4.20: Nachweis SIINFEKL-spezifischer T-Zell-Proliferation im poplitealen LK nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL. Die *in vivo* Proliferation transferierter OT-I Zellen nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL wurde im CFSE-Proliferations-Assay in einer Zeitkinetik verfolgt. Milzzellen der OT-I Maus wurden mit CFSE markiert und 2×10^7 Zellen i.v. in immunkompetente C57BL/6 Mäuse transferiert. Am Folgetag wurden die Rezipienten durch i.pl. Injektion von $20 \mu\text{g}$ DB-SIINFEKL bzw. $20 \mu\text{g}$ DB-SIINFEKA immunisiert. Zur Kontrolle der SIINFEKL-spezifischen Proliferation wurde eine Gruppe mit 1×10^5 PFU mCMV-SIINFEKL infiziert. Zu definierten Zeitpunkten (24h, 48h, 60h, 72h p.i.; 96h und 120h p.i. nicht gezeigt) wurden die poplitealen LK der Infektionsseite entnommen und aufgearbeitet. Die Einzelzellsuspension wurden mit Fluorochrom-markierten AK (PE-anti-CD8 und APC-anti-TCR-V α 2) inkubiert und der Ansatz wurde fluorometrisch analysiert. Es wurden jeweils 2×10^6 Zellen analysiert. Zunächst wurde auf Lymphozyten gegatet, diese wurden im Dot Plot CD8 vs. TCR-V α 2 dargestellt. Die CD8⁺/TCR-V α 2⁺ Zellen wurden anschließend im Dot Plot CFSE vs. TCR-V α 2 dargestellt. Die CFSE⁺ Zellen stellen die transferierten OT-I Zellen dar.

Nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL konnte in der Milz eine Proliferation der transferierten OT-I Zellen nachgewiesen werden, die vergleichbar mit der mCMV-SIINFEKL-induzierten

Proliferation war. Dabei konnten 72h p.i. sechs Zellteilungen dargestellt werden, dagegen konnte in den DB-SIINFEKA immunisierten Tieren keine Proliferation beobachtet werden (siehe Abb. 4.21).

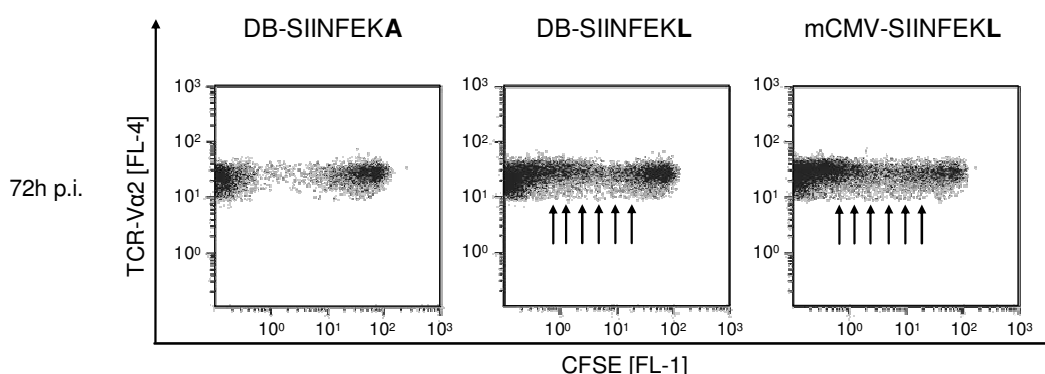


Abb. 4.21: Nachweis SIINFEKL-spezifischer T-Zell-Proliferation in der Milz nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL. Die *in vivo* Proliferation transferierter OT-I Zellen nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL wurde im CFSE-Proliferations-Assay verfolgt und erfolgte wie in 4.6.2.2. beschrieben. Gezeigt ist eine exemplarische Darstellung der Proliferation 72h p.i.

Im *in vivo* Proliferations-Assay konnte in den untersuchten Geweben die Proliferation transferierter OT-I Zellen nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL nachgewiesen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass diese Proliferation vergleichbar mit der nach mCMV-SIINFEKL Infektion war. Dies sowie die Tatsache, dass nach Immunisierung mit DB-SIINFEKA keine Proliferation zu detektieren war, zeigte, dass nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL die transferierten OT-I Zellen epitopspezifisch proliferierten.

4.6 Nachweis der protektiven Funktion adoptiv transferierter SIINFEKL-spezifischer T-Zellen

Die Entwicklung einer Kombinationstherapie bestehend aus AT und Vakzinierung zur Verbesserung der adoptiven Immuntherapie stand im Fokus dieser Arbeit. Die vorangegangenen *Priming*-Analysen sowie die Proliferations-Assay konnten zeigen, dass das SIINFEKL-Peptid *in vivo* nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL sowie nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL von Zellen präsentiert und von OT-I Zellen erkannt wird, was zur Aktivierung und zur Proliferation der T-Zellen führte. Bevor die OT-I Zellen im Modell der Kombinationstherapie eingesetzt werden konnten, sollte nun die protektive Wirkung der OT-I Zellen im AT nach Immunsuppression (siehe 3.6.9) untersucht werden. Bereits 1985 konnte gezeigt werden, dass ein AT CMV-spezifischer CD8 T-Zellen (experimentelle Zytoimmuntherapie) immunsupprimierte, mCMV-infizierte BALB/c (MHC Haplotyp H-2^d) Mäuse vor der mCMV-Erkrankung schützt (Reddehase et al., 1985).

Eine schematische Darstellung des AT nach Immunsuppression ist in Abb. 4.22 dargestellt. Für den AT wurden epitopspezifische CD8 T-Zellen (OT-I Zellen oder CTLL) in immunsupprimierte, mCMV-infizierte C57BL/6 Mäuse transferiert und zehn Tage nach Infektion wurde das protektive Potenzial der CTL erfasst.

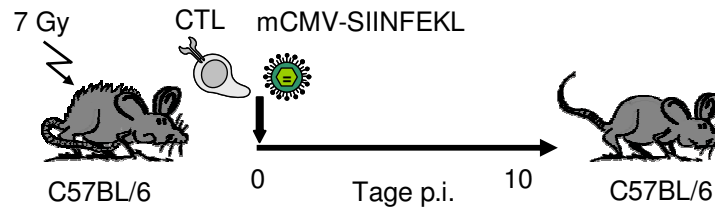


Abb. 4.22: Schematische Darstellung des AT nach Immunsuppression. Acht Wochen alte C57BL/6 Mäuse wurden durch γ -Bestrahlung immunsupprimiert, danach wurden ihnen CTL i.v. injiziert. Anschließend wurden die Rezipienten mit mCMV-SIINFEKL i.pl. infiziert und zehn Tage später die Organe entnommen. Die Schutzwirkung wurde mit dem *Plaque-Assay* bzw. mit Hilfe der IE1-spezifischen IHC überprüft.

4.6.1 Nachweis eines protektiven Potenzials adoptiv transferierter OT-I Zellen in mCMV-SIINFEKL infizierten Rezipienten

Im ersten Schritt sollte das protektive Potenzial von OT-I Zellen untersucht werden. Hierzu wurden die CD8 T-Zellen aus Milzen der OT-I Maus aufgereinigt und in acht Wochen alte, immunsupprimierte C57BL/6 Mäuse transferiert. Um die Korrelation zwischen transferierter Zellzahl und Protektion zu erfassen, wurden \log_{10} (1×10^2 - 1×10^6) titrierte OT-I Zellen transferiert. Die Rezipienten wurden in der Folge mit 1×10^5 PFU mCMV-SIINFEKL bzw. mCMV-SIINFEKA i.pl. infiziert. Als Vergleich wurde je eine infizierte Gruppe ohne AT mitgeführt. Am 10. Tag nach AT wurden die Organe entnommen, die Viruslast in der Milz sowie Lunge in der Organtitration (siehe 3.2.3) bestimmt und die infizierten Zellen in der Leber mit Hilfe der IE1-spezifischen IHC quantifiziert (siehe 3.5.1).

In allen untersuchten Organen konnten adoptiv transferierte OT-I Zellen einer Infektion mit mCMV-SIINFEKL entgegenwirken (siehe Abb. 4.23). In der Milz reduzierten bereits 1×10^2 transferierte OT-I Zellen die Viruslast in der Milz um 1,5 log-Stufen ($p=0,0001$). In der Leber konnte dagegen eine Reduktion der Zahl infizierter Zellen um etwa 2 log-Stufen nachgewiesen werden ($p=0,0001$). Eine weitere Erhöhung der transferierten Zellen führte nicht zu einer drastischen Verbesserung des Schutzes, so reduzierte in der Milz eine 10-fach erhöhte Zellzahl die Viruslast lediglich minimal und selbst bei 1×10^6 transferierten OT-I Zellen war weiterhin ein Organtiter von etwa 1×10^3 PFU vorhanden. Die Schutzwirkung erreichte somit ein Plateau. Dieser Effekt war ebenfalls in der Lunge zu beobachten, so konnte maximal die Reduktion um eine log-Stufe detektiert werden, sodass bei einer Zellzahl von 1×10^6 etwa 5×10^3 PFU ermittelt wurden. Nur in der Leber konnte der AT von OT-I Zellen die Zahl infizierter Zellen bis fast zum DL reduzieren. In den mit mCMV-SIINFEKA infizierten

Tieren konnten die OT-I Zellen der mCMV-Infektion nicht entgegenwirken, somit blieben die Virustiter und die Anzahl der infizierten Zellen in den untersuchten Organen bei jeder Zellzahl vergleichbar ($p > 0,05$).

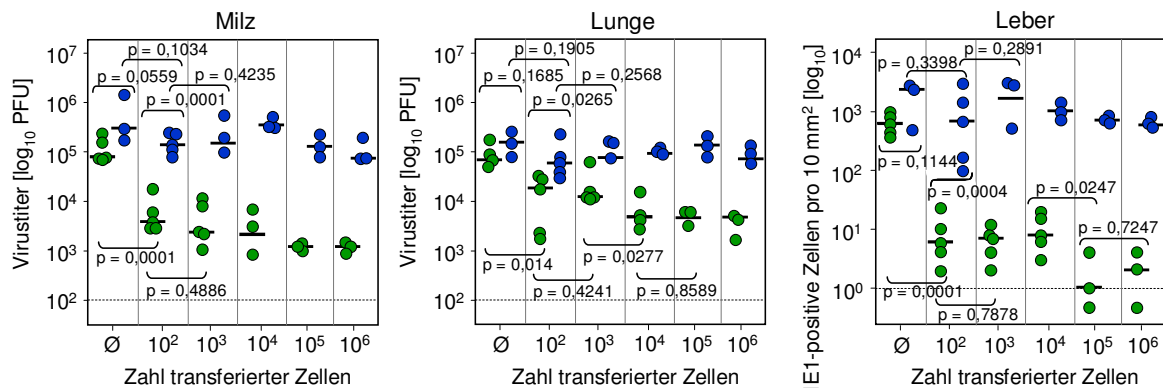


Abb. 4.23: Schutzwirkung adoptiv transferierter OT-I Zellen. Acht Wochen alte C57BL/6 Mäuse wurden durch γ -Bestrahlung immunsupprimiert. Die CD8 T-Zellen der OT-I Maus wurden aufgereinigt und definierte Zellzahlen i.v. den Rezipienten injiziert. Anschließend erfolgte eine i.pl. Infektion mit 1×10^5 PFU mCMV-SIINFEKL (●) bzw. mit mCMV-SIINFEKA (●). Zur Kontrolle wurde je eine Gruppe infiziert ohne zuvor Zellen zu transferieren. Zehn Tage nach AT wurden die Organe entnommen und in der Milz sowie Lunge wurde die Viruslast mit dem *Plaque*-Assay bestimmt. In der Leber wurde mit Hilfe der IE1-spezifischen IHC die Zahl infizierter Zellen quantifiziert. Die Mediane sind als horizontale Balken und das DL des jeweiligen Assay ist als gestrichelte Linie dargestellt. Die P-Werte der log-normal verteilten Titer wurden im *unpaired, two-tailed Student's t-Test* (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm?Format=C>) ermittelt. Ein P-Werte $< 0,05$ zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an.

Die Ergebnisse zeigen, dass OT-I Zellen infizierte Rezipienten vor der Infektion schützen können. Bereits 1×10^2 OT-I Zellen genügten für einen deutlichen Schutz, der durch Erhöhung der transferierten Zellzahlen nur geringfügig verbessert werden konnte. Die OT-I Zellen schützten epitopspezifisch und konnten somit in mCMV-SIINFEKA infizierten Tieren keine protektive Funktion ausüben.

4.6.2 Nachweis eines protektiven Potenzials adoptiv transferierter SIINFEKL-spezifischer CTLL in mCMV-SIINFEKL infizierten Rezipienten

Anhand des vorangegangenen AT konnte festgestellt werden, dass OT-I Zellen einer Infektion mit mCMV-SIINFEKL entgegenwirken, wobei bereits eine geringe Anzahl an transferierten Zellen einen deutlichen Schutz induzierte. Nun stellte sich die Frage, ob die Effizienz der OT-I Zellen vergleichbar mit der einer CTLL-SIINFEKL ist. Um diese Frage zu klären, sollte im ersten Schritt die Effizienz der CTLL-SIINFEKL mit der einer CMV-spezifischen CTLL verglichen werden.

Hierzu erfolgte zunächst die Generierung epitopspezifischer CTLL (siehe 4.4.2.3). Neben einer polyklonalen SIINFEKL-spezifischen CTLL (CTLL-SIINFEKL) wurde eine m139-spezifische CTLL (CTLL-m139) generiert (siehe 3.4.4). Für die Anlage der CTLL wurden die

CD8 T-Zellen aus drei mit mCMV-SIINFEKL infizierten *Memory*-Tieren aufgereinigt und diese mit einer entsprechenden Konzentration an synthetischem Peptid (SIINFEKL-Peptid 10^{-10} M bzw. m139-Peptid 10^{-9} M) stimuliert (siehe 3.4.4). Am Versuchstag wurden die CTL geerntet und definierte Zellzahlen (1×10^2 - 1×10^6) den zuvor bestrahlten, acht Wochen alten C57BL/6 Mäusen i.v. transferiert. Anschließend wurden die Tiere mit 1×10^5 PFU mCMV-SIINFEKL i.pl. infiziert, wobei Tiere einer Kontrollgruppe nur infiziert wurden. Am 10. Tag nach AT wurden die Organe entnommen, die Viruslast in der Milz sowie Lunge im *Plaque*-Assay bestimmt und die infizierten Zellen in der Leber mit Hilfe der IE1-spezifischen IHC quantifiziert.

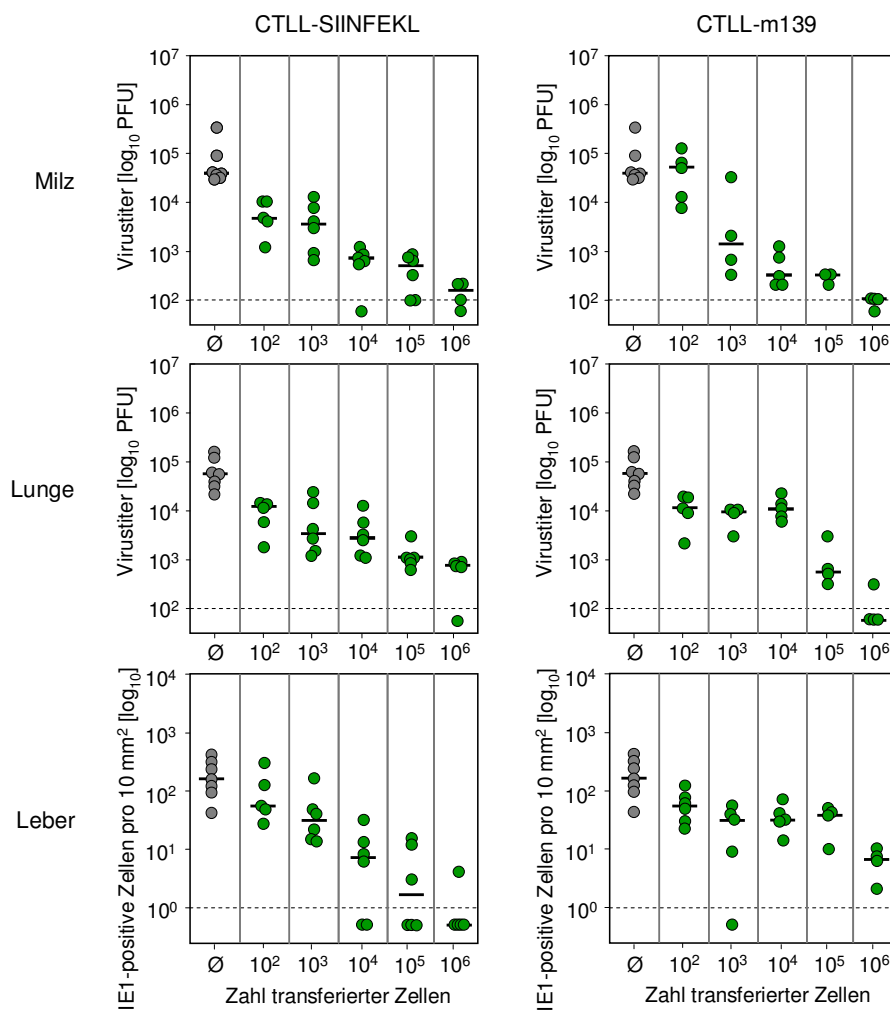


Abb. 4.24: Schutzwirkung adoptiv transferierter CTLL. Titrierte Zellzahlen an CTLL-SIINFEKL (10^{-10} M) bzw. CTLL-m139 (10^{-9} M) wurden in acht Wochen alte, immunsupprimierte C57BL/6 Mäuse adoptiv transferiert. Anschließend wurden die Rezipienten mit 1×10^5 PFU mCMV-SIINFEKL infiziert. Um die Viruslast ohne Schutzwirkung ermitteln zu können, wurde eine Gruppe mit mCMV infiziert ohne zuvor Zellen zu erhalten. Zehn Tage nach AT wurden die Organe entnommen, die Viruslast in der Milz sowie Lunge wurde mittels *Plaque*-Assay ermittelt und die Zahl infizierter Zellen wurde mit Hilfe der IE1-spezifischen IHC in der Leber bestimmt. Die Mediane sind als horizontale Balken und das DL des jeweiligen Assay ist als gestrichelte Linie dargestellt.

In allen untersuchten Organen konnten beide adoptiv transferierte CTLL der Infektion mit mCMV-SIINFEKL entgegenwirken. Dabei konnte für beide CTLL eine dosisabhängige

Protektion nachgewiesen werden. In der Milz reduzierten bereits 1×10^2 transferierte CTL-SIINFEKL die Viruslast um eine log-Stufe (siehe Abb. 4.24). Durch eine weitere Erhöhung der transferierten Zellen konnte der Schutz verbessert werden, wobei 1×10^6 transferierte CTL-SIINFEKL und 1×10^6 CTL-m139 in der Milz einen vergleichbaren Schutz induzierten. Hier erzielte der AT eine Reduktion des Virustiters um etwa 2,5 log-Stufen, sodass die *Plaque*-Anzahl auf das DL reduziert wurde. Während in der Lunge durch den AT von 1×10^6 CTL-m139 ebenfalls das DL erreicht wurde, reduzierten 1×10^6 CTL-SIINFEKL den Virustiter um lediglich 1,5 log-Stufen, somit war in der Lunge die Effizienz von 1×10^6 CTL-m139 im Vergleich zu 1×10^6 CTL-SIINFEKL höher. Im Vergleich zu 1×10^6 transferierten CTL-m139 konnte in der Leber nach dem Transfer von 10^6 CTL-SIINFEKL in der Mehrzahl der Rezipienten keine infizierten Zellen detektiert werden, was auf eine höhere Effizienz der CTLL-SIINFEKL in der Leber hindeutet.

Die Ergebnisse des AT zeigen, dass beide CTLL wie OT-I Zellen mCMV-SIINFEKL infizierte Rezipienten vor der Infektion schützten und beide CTLL ein vergleichbares protektives Potenzial besitzen, wobei bei hohen Zellzahlen die CTLL-m139 in der Lunge und die CTLL-SIINFEKL in der Leber einen etwas stärkeren Schutz erzeugten. Mit steigender CTL-Zahl nahm die Intensität der Protektion zu, dagegen konnte der Schutz durch Erhöhung der transferierten OT-I Zellen nur geringfügig verbessert werden und erreichte ein Plateau.

4.7 Nachweis von Protektion durch Immunisierung mit DB-SIINFEKL

Die vorangegangenen *Priming*-Analysen sowie die Proliferations-Assay zeigten, dass nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL CD8 T-Zellen *in vivo* spezifisch *geprimt* oder aktiviert werden können. Jetzt sollte das protektive Potenzial dieser *geprimten* SIINFEKL-spezifischen CD8 T-Zellen in einem *Challenge*-Modell (siehe 3.6.7) untersucht werden (siehe Abb. 4.25). Am Tag 1 erfolgte die Induktion des *Primings*, sieben Tage *post Priming* die *Challenge*-Infektion und am zehnten Tag die Organentnahme. Die Schutzwirkung wurde mit dem *Plaque-Assay* bzw. mit Hilfe der IE1-spezifischen IHC bestimmt.

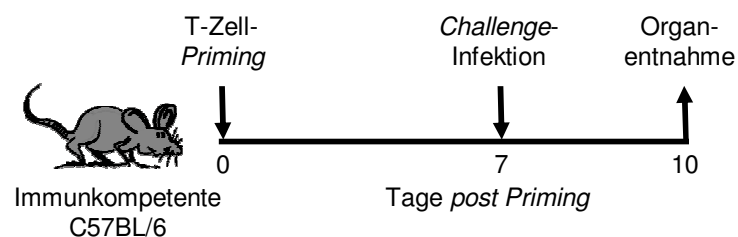


Abb. 4.25: Schematische Darstellung des Challenge-Modells. Immunkompetente C57BL/6 Mäuse wurden immunisiert. Sieben Tage später erfolgte eine *Challenge*-Infektion durch i.v. Injektion von 1×10^6 PFU mCMV. Zehn Tage *post Priming* wurden die Organe entnommen und die Organtiter mit dem *Plaque-Assay* bzw. die Zahl infizierter Zellen mit Hilfe der IE1-spezifischen IHC bestimmt.

4.7.1 Nachweis von Protektion durch Immunisierung mit DB-SIINFEKL nach *Challenge*-Infektion mit mCMV-SIINFEKL

Wie bereits dargelegt induziert eine Immunisierung mit 10µg DB-SIINFEKL i.pl. eine vergleichbare SIINFEKL-spezifische Immunantwort wie eine Infektion mit 1×10^2 PFU mCMV-SIINFEKL (siehe 4.7.3). Im *Challenge*-Modell sollte nun untersucht werden, ob diese beiden Konzentrationen für die Induktion von Schutz ausreichend sind. Es zeigte sich, dass in den untersuchten Organen, ausgenommen der Milz, nach Immunisierung mit 10µg DB-SIINFEKL kein sichtbarer Schutz nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund erfolgten die weiteren Immunisierungen durch i.pl. Injektion von 20µg DB-SIINFEKL oder zur Kontrolle mit 20µg DB-SIINFEKA. Für die Infektion wurden weiterhin 1×10^2 PFU mCMV-SIINFEKL appliziert. Sieben Tage nach dem *Priming* erfolgte die *Challenge*-Infektion (siehe 3.6.3) durch i.v. Injektion von 1×10^6 PFU mCMV-SIINFEKL bzw. mCMV-SIINFEKA und drei Tage danach wurden die Organe entnommen. Die Viruslast wurde in der Milz, Lunge sowie Speicheldrüse im *Plaque-Assay* (siehe 3.2.3) bestimmt und die Zahl infizierter Zellen in der Leber mit Hilfe der IE1-spezifischen IHC quantifiziert (siehe 3.5). Die einzelnen Versuchsgruppen sind in der Tabelle 4.5 aufgelistet und die Ergebnisse sind in der Abb. 4.26 dargestellt.

Nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL konnte nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL in allen untersuchten Organen eine Reduktion des Virustiters bzw. eine Abnahme der infizierten Zellen beobachtet werden. In der Milz ($p=0,0007$) sowie Leber ($p=0,0005$) konnte eine Reduktion von etwa 2,5 log-Stufen beobachtet werden. Dagegen war die Reduktion des Virustiters in der Lunge sowie in der Speicheldrüse deutlich geringer, wobei sie in der Lunge nicht signifikant war ($p=0,089$). Überraschenderweise war die Verringerung des Virustiters in der Speicheldrüse wieder statistisch signifikant ($p=0,002$). In den meisten Rezipienten war nach mCMV-SIINFEKL-induziertem *Priming* mit anschließender mCMV-SIINFEKL *Challenge*-Infektion in der Milz sowie in der Leber kein Virus nachzuweisen. In der Lunge und in der Speicheldrüse konnte nach mCMV-SIINFEKL *Priming* die Viruslast um etwa zwei log-Stufen verringert werden. Nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL und anschließender *Challenge*-Infektion mit mCMV-SIINFEKA konnte in allen untersuchten Organen keine Veränderung des Virustiters festgestellt werden ($p>0,05$). Im Vergleich dazu konnte ein mCMV-SIINFEKL-induziertes *Priming* gegen eine *Challenge*-Infektion mit mCMV-SIINFEKA schützen ($p\leq 0,02$). Eine Immunisierung mit DB-SIINFEKA konnte weder vor einer *Challenge*-Infektion mit mCMV-SIINFEKL noch vor einer *Challenge*-Infektion mit mCMV-SIINFEKA schützen ($p\geq 0,05$).

Tab. 4.5: Auflistung der im *Challenge-Modell* getesteten Gruppen

Gruppe		Priming	Challenge-Infektion
A	●	-	-
B	●	DB-SIINFEKL	mCMV-SIINFEKL
C	●	DB-SIINFEKA	mCMV-SIINFEKL
D	●	mCMV-SIINFEKL	mCMV-SIINFEKL
E	●	-	-
F	●	DB-SIINFEKL	mCMV-SIINFEKA
G	●	DB-SIINFEKA	mCMV-SIINFEKA
H	●	mCMV-SIINFEKL	mCMV-SIINFEKA

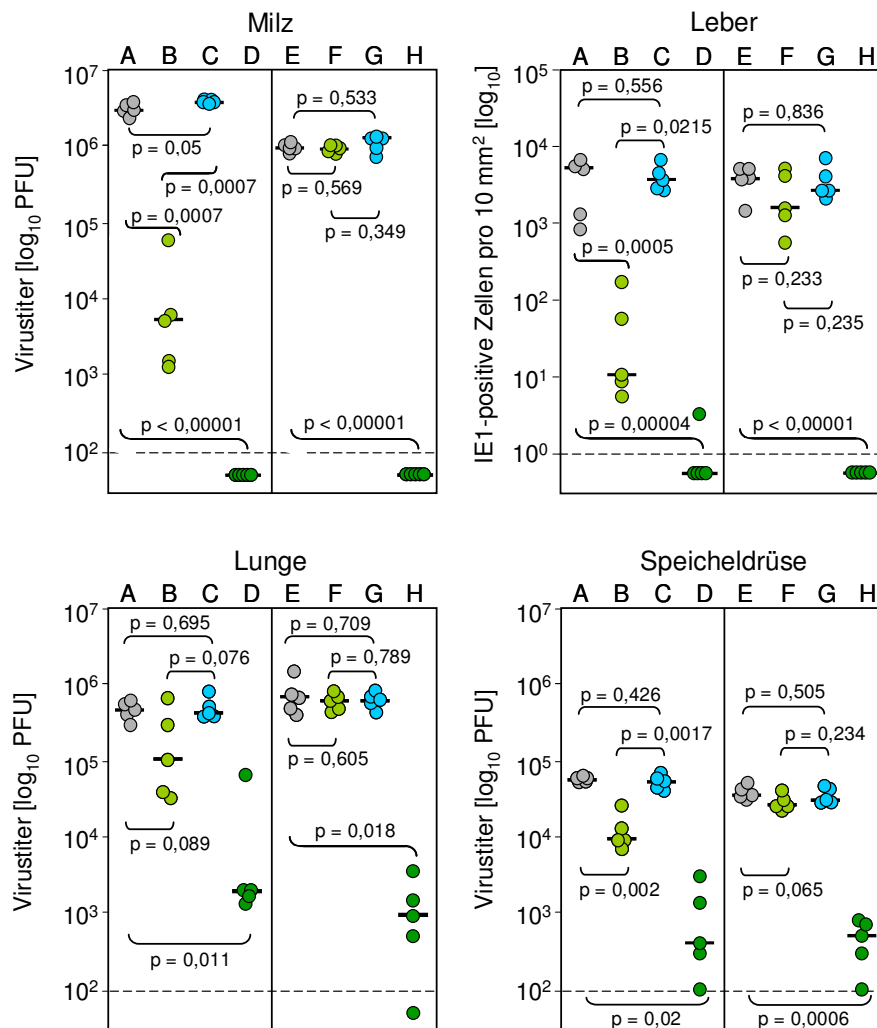


Abb. 4.26: Schutz gegen *Challenge*-Infektion nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL. Immunkompetente C57BL/6 Mäuse wurden i.p.l. mit 20 μ g DB-SIINFEKL bzw. mit 20 μ g DB-SIINFEKA immunisiert (siehe 3.6.4) oder mit 1x10² PFU mCMV-SIINFEKL infiziert (siehe 3.6.2). Sieben Tage später erfolgte eine *Challenge*-Infektion (siehe 3.6.3) mit mCMV-SIINFEKL bzw. mit mCMV-SIINFEKA. Als Kontrolle wurde je Virus eine Gruppe ohne vorangegangenes *Priming* mit 1x10⁶ PFU i.v. infiziert. Drei Tage nach der *Challenge*-Infektion wurden die Organe entnommen, die Virustiter in Milz, Lunge, Speicheldrüse im *Plaque-Assay* bestimmt und die infizierten Zellen in der Leber mit Hilfe der IE1-spezifischen IHC quantifiziert. Die statistische Signifikanz von experimentell ermittelten Unterschieden zwischen zwei Versuchsgruppen wurde anhand der log-normal verteilten Titer im *unpaired, two-tailed Student's t-Tests* (Microsoft Office; Exel) ermittelt. Ein P-Werte <0,05 zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an. Die Mediane sind als horizontale Balken dargestellt, die Symbole repräsentieren Einzeltierbestimmungen und die gestrichelte Linie markiert das DL.

Die Ergebnisse zeigen, dass ein DB-SIINFEKL-induziertes T-Zell-*Priming* epitopspezifisch vor einer *Challenge*-Infektion mit mCMV-SIINFEKL schützt. Das mCMV-SIINFEKL induzierte *Priming* erzielte ein stärkeres, protektives Potenzial als eine Immunisierung mit DB-SIINFEKL.

4.7.2 Die Protektion durch Immunisierung mit DB-SIINFEKL nach *Challenge*-Infektion ist abhängig von CD8 T-Zellen

Im vorangegangenen Experiment konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung mit DB-SIINFEKL Schutz gegenüber einer hoch dosierten *Challenge*-Infektion mit mCMV-SIINFEKL vermittelt. Nun sollte durch *in vivo* Depletion die Rolle der CD8 T-Zellen während der *Challenge*-Infektion (siehe 3.6.3) überprüft werden. Der Versuchsablauf ist in Abb. 4.27 schematisch dargestellt.

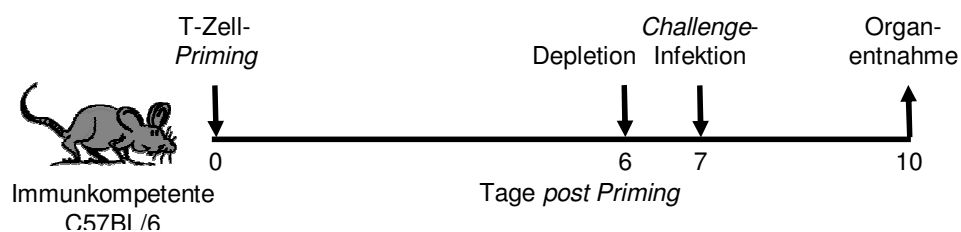


Abb. 4.27: Schematische Darstellung des *Challenge*-Modells mit *in vivo* Depletion der CD8 T-Zellen. Immunkompetente C57BL/6 Mäuse wurden immunisiert. 24h vor *Challenge*-Infektion erfolgte die *in vivo* Depletion. Zehn Tage *post Priming* wurden die Organe entnommen und die Organtiter im *Plaque-Assay* bzw. die Zahl infizierter Zellen mit Hilfe der IE1-spezifischen IHC quantifiziert.

Sechs Tage nach Immunisierung mit 20 μ g DB-SIINFEKL und 24h vor *Challenge*-Infektion mit mCMV-SIINFEKL wurden die CD8 T-Zellen *in vivo* Depletion depletiert (siehe 3.6.8). Hierfür wurden monoklonale anti-CD8 AK in einer Konzentration von 1mg/0,5ml PBS/Maus intraperitoneal injiziert. Am 10. Tag *post Priming* wurden die Organe entnommen und die Depletion zytofluorometrisch kontrolliert. Wie in Abb. 4.28 dargestellt, konnten CD8 T-Zellen durch gezielte *in vivo* Depletion erfolgreich depletiert werden.

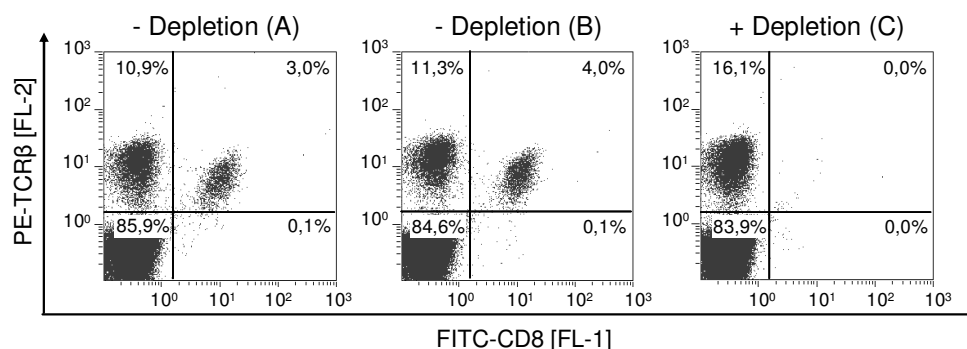


Abb. 4.28: Zytofluorometrischer Nachweis der *in vivo* Depletion. Am Tag der Organentnahme wurde ein Stück der Milz isoliert, die Milzstücke einer Gruppe zusammengefügt und ein gemeinsamer Ansatz hergestellt

(siehe 3.4.1). Die Zellen wurde mit Fluorochrom-markierten AK (FITC-anti-CD8 und PE-anti-TCR β) inkubiert und der Ansatz fluorometrisch analysiert. Es wurden etwa 3×10^5 Zellen analysiert. Zunächst wurde auf Lymphozyten gegatet und die Depletion im Dot Plot CD8 vs.TCR β dargestellt.

Die Viruslast wurde in der Milz, Lunge sowie Speicheldrüse im *Plaque-Assay* (siehe 3.2.3) bestimmt und die Zahl infizierter Zellen in der Leber mit Hilfe der IE1-spezifischen IHC quantifiziert (siehe 3.5). Die einzelnen Versuchsgruppen sind in der Tabelle 4.6 aufgelistet und die Ergebnisse sind in der Abb. 4.29 dargestellt.

Tab. 4.6: Auflistung der im *Challenge-Modell* getesteten Gruppen

Gruppe	Priming	Depletion	Challenge-Infektion
A	-	-	mCMV-SIINFEKL
B	DB-SIINFEKL	-	mCMV-SIINFEKL
C	DB-SIINFEKL	CD8 T-Zellen	mCMV-SIINFEKL

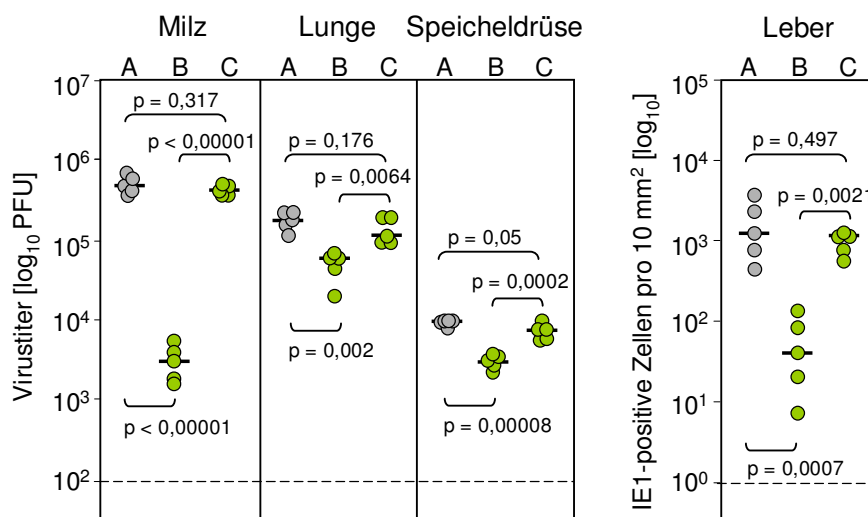


Abb. 4.29: Schutzwirkung durch Immunisierung mit DB-SIINFEKL ist abhängig von CD8 T-Zellen.

Immunkompetente C57BL/6 Mäuse wurden mit $20 \mu\text{g}$ DB-SIINFEKL immunisiert (siehe 3.6.4). Dazu wurde die DB-Konzentration mit PBS eingestellt und jeweils $50 \mu\text{l}$ der Lösung i.pl. in die rechte Hinterpfote injiziert. Sechs Tage später wurde die *in vivo* Depletion der CD8 T-Zellen (siehe 3.6.8) durchgeführt. Für die Depletion von CD8 T-Zellen wurden monoklonale anti-CD8 AK (Prof. Jonjic; Rijeka, Kroatien) in einer Konzentration von $1 \text{mg}/0,5 \text{ml}$ PBS/Maus intraperitoneal appliziert. Die Effizienz der Depletion wurde zytofluorometrisch analysiert. Eine Gruppe wurde als Kontrolle ohne vorangegangenes Priming mit 1×10^6 PFU i.v. infiziert. Drei Tage nach der *Challenge*-Infektion erfolgte die Organentnahme. In Milz, Lunge sowie Speicheldrüse wurden die Virustiter im *Plaque-Assay* bestimmt und in der Leber die infizierten Zellen immunhistochemisch quantifiziert. Die P-Werte der log-normal verteilten Titer wurden im *unpaired, two-tailed Student's t-Tests* (Microsoft Office; Excel) ermittelt. Ein P-Werte $< 0,05$ zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an. Die Mediane sind als horizontale Balken dargestellt, die Symbole repräsentieren Einzeltierbestimmungen und die gestrichelte Linie markiert das DL.

In allen untersuchten Organen konnte nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL eine signifikante Reduktion des Virustiters bzw. der Zahl der infizierten Zellen und somit ein deutlicher Schutz festgestellt werden (siehe Abb. 4.29). Nach zusätzlicher Depletion der CD8 T-Zellen war in allen Organen eine wesentliche Verringerung der Schutzwirkung zu beobachten. In der Lunge, Speicheldrüse und Leber konnte nach CD8 T-Zell-Depletion kein

Schutz mehr induziert werden ($p \geq 0,05$). In der Milz führte die Depletion von CD8 T-Zellen ebenfalls zur drastischen Verringerung der DB-SIINFEKL-induzierten Protektion und letztlich zur Aufhebung der Schutzwirkung ($p = 0,317$).

Die Ergebnisse zeigen, dass die protektive Wirkung der DB-SIINFEKL durch CD8 T-Zell-Depletion signifikant reduziert wurde, das heißt, dass der durch die DB-SIINFEKL-Immunisierung induzierte Schutz abhängig von CD8 T-Zellen ist.

4.8 *In vivo* Adjuvanseffekt durch DB-Immunisierung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Immunisierung mit DB-SIINFEKL vor einer *Challenge*-Infektion mit mCMV-SIINFEKL schützen kann, sollte in den folgenden Experimenten die Effektivität dieses Schutzes untersucht werden. Hierfür sollte der DB-vermittelte Schutz mit der durch Immunisierung mit OVA-Protein oder SIINFEKL-Peptid-induzierten Schutzwirkung verglichen werden.

In einem ersten Versuch (siehe Abb. 4.31) wurden immunsupprimierte C57BL/6 Mäuse mit 20 µg DB-SIINFEKL, 10 µg OVA oder mit einer Kombination aus 10 µg OVA und 20 µg natürlicher DB (WT-DB), i.pl. immunisiert (siehe 3.6.4). Die Menge an OVA wurde dabei so gewählt, dass in etwa die gleiche Menge an SIINFEKL-Peptid Molekülen verabreicht wurden, wie nach Immunisierung mit 20 µg DB-SIINFEKL. Die Berechnung der einzusetzenden OVA-Konzentration ist in Abb. 4.30 dargestellt.

Ein Molekül pp65 :	63000Da	=	63000 x 1,66 x 10 ⁻²⁷ kg (atomare Masse)
			1,046 x 10 ⁻²² kg
	Masse/Molekül	=	1,046 x 10⁻¹⁴µg
Anzahl der Moleküle pp65 pro µg pp65:			0,956 x 10¹³
Anteil von pp65 an DB: ca. 60% (Literatur: Varnum et al., 2004)			
1µg DB enthält 0,6 x 0,956 x 10¹³ Moleküle pp65 = 0,574 x 10¹³			
20µg DB enthalten somit 20 x 0,574 x 10¹³ Moleküle pp65 = 1,15 x 10¹⁴ Moleküle			
OVA:	44300Da	=	44300 x 1,66 x 10 ⁻²⁷ kg
			7,3538 x 1,66 x 10 ⁻²³ kg
	Masse/Molekül	=	7,3538 x 10⁻¹⁴ µg
Masse OVA / <u>1,15 x 10¹⁴</u> Moleküle: 1,15 x 10 ¹⁴ Moleküle x 7,3538 x 10 ⁻¹⁴ µg = 8,5µg			

Abb. 4.30: Berechnung der einzusetzenden OVA-Konzentration. Die Berechnung der benötigten OVA-Konzentration erfolgte über die Anzahl der pp65 Moleküle/20 µg DB. Da das SIINFEKL als Fusionsprotein pp65-SIINFEKL in den DB vorliegt und somit die Anzahl der pp65 Moleküle der Anzahl der SIINFEKL Moleküle entspricht, kann die einzusetzende OVA-Konzentration anhand des pp65 Moleküls ermittelt werden.

Sieben Tage nach Immunisierung wurde eine *Challenge*-Infektion mit 1×10^6 PFU mCMV-SIINFEKL durchgeführt. Drei Tage später wurden Organe entnommen, die Virustiter in der Milz, Lunge sowie Speicheldrüse im *Plaque-Assay* bestimmt und in der Leber die infizierten Zellen immunhistochemisch quantifiziert. In den untersuchten Organen konnte keine sichtbare Protektion nach einer Immunisierung mit $10 \mu\text{g}$ OVA festgestellt werden ($p > 0,05$), jedoch konnte nach Kombination mit WT-DB in der Milz ($p = 0,0005$), Speicheldrüse ($p = 0,036$) sowie in der Leber ($p = 0,028$) eine deutliche Titerreduktion beobachtet werden.

Tab. 4.7: Auflistung der im *Challenge*-Modell getesteten Gruppen

Gruppe	Priming	Challenge-Infektion
A	-	mCMV-SIINFEKL
B	DB-SIINFEKL	
C	OVA	
D	OVA + WT-DB	

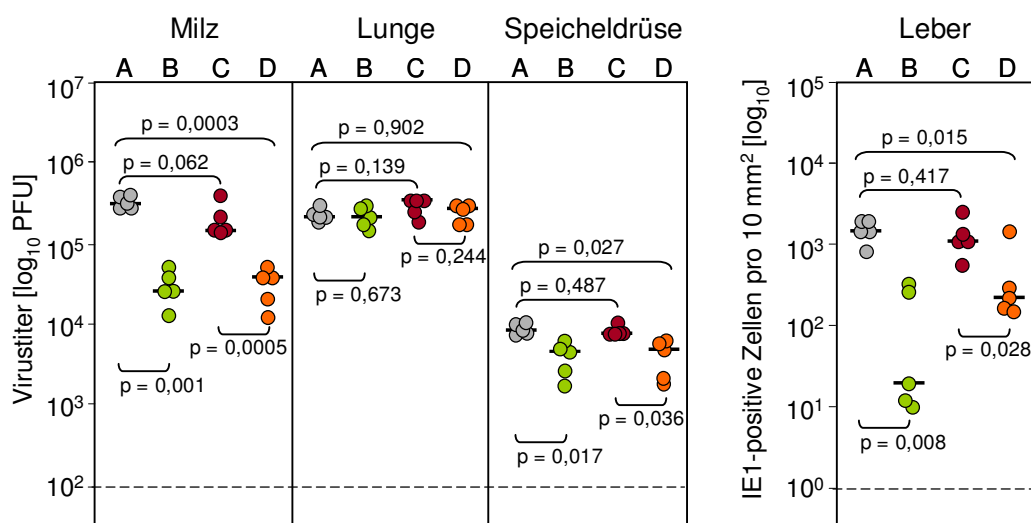


Abb. 4.31: DB-induzierter Adjuvaneffekt. Immunkompetente C57BL/6 Mäuse wurden wie folgt immunisiert. Die Immunisierung erfolgte durch i.pl. Injektion von $20 \mu\text{g}$ DB-SIINFEKL, $10 \mu\text{g}$ OVA oder einer Kombination aus $10 \mu\text{g}$ OVA und $20 \mu\text{g}$ WT-DB. Die jeweiligen Lösungen wurden in PBS angesetzt und jeweils $50 \mu\text{l}$ /Maus i.pl. appliziert. Sieben Tage nach Immunisierung wurden die Rezipienten mit 1×10^6 PFU mCMV-SIINFEKL i.v. infiziert (siehe 3.6.3). Eine Gruppe wurde jeweils als Kontrolle ohne vorangegangene Immunisierung mitgeführt. Drei Tage nach dieser *Challenge*-Infektion wurden die Organe entnommen, in Milz, Lunge, Speicheldrüse der Virustiter im *Plaque-Assay* bestimmt und in der Leber die infizierten Zellen mit Hilfe der IE1-spezifischen IHC quantifiziert. Die P-Werte der log-normal verteilten Titer wurden im *unpaired, two-tailed Student's t-Tests* (Microsoft Office; Excel) ermittelt. Ein P-Werte $< 0,05$ zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an. Die Mediane sind als horizontale Balken dargestellt, die Symbole repräsentieren Einzeltierbestimmungen und die gestrichelte Linie markiert das DL des jeweiligen Assays.

Im zweiten Versuch (siehe Abb. 4.32) wurden immunsupprimierte C57BL/6 Mäuse mit $20 \mu\text{g}$ DB-SIINFEKL, $20 \mu\text{g}$ DB-SIINFEKA oder mit einer Kombination aus $10 \mu\text{g}$ OVA und $20 \mu\text{g}$ DB-SIINFEKA i.pl. immunisiert (siehe 3.6.4). Sieben Tage *post Priming* erfolgte wieder der Virus-*Challenge* und am 10. Tag die Organentnahme. In den untersuchten Organen konnte kein sichtbarer Schutz nach Immunisierung mit $20 \mu\text{g}$ DB-SIINFEKA festgestellt werden ($p \geq 0,05$),

jedoch konnte in der Milz ($p=0,011$) sowie Speicheldrüse ($p=0,001$) eine signifikante Protektion nach kombinierter Immunisierung mit DB-SIINFEKA und OVA beobachtet werden. In der Lunge sowie Leber konnte kein signifikanter Schutz nachgewiesen werden, jedoch war in der Leber eine geringe Reduktion des Virustiters zu beobachten. Im Vergleich zur kombinierten Immunisierung mit DB-SIINFEKA und OVA war das DB-SIINFEKL induzierte, protektive Potenzial deutlich stärker.

Tab. 4.8: Auflistung der im Challenge-Modell getesteten Gruppen

Gruppe	Priming	Challenge-Infektion
A ○	-	mCMV-SIINFEKL
B ●	DB-SIINFEKL	
C ●	DB-SIINFEKA	
D ●	OVA + DB-SIINFEKA	

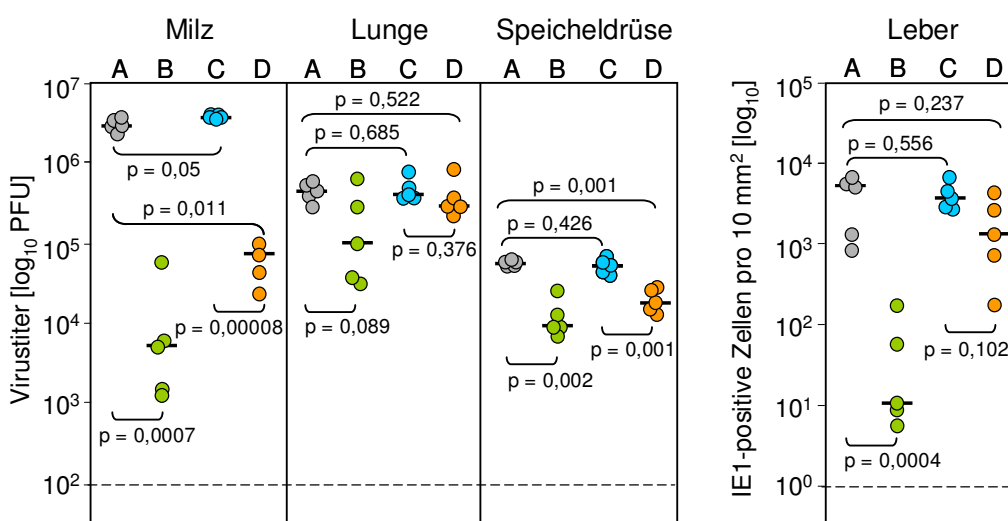


Abb. 4.32: DB-induzierter Adjuvaneffekt. Für die Immunisierung wurden $20 \mu\text{g}$ DB-SIINFEKL, $20 \mu\text{g}$ DB-SIINFEKA, $10 \mu\text{g}$ OVA oder eine Kombination aus $10 \mu\text{g}$ OVA und $20 \mu\text{g}$ DB-SIINFEKA eingesetzt. Die weitere Durchführung und Analyse erfolgte analog wie in Abb. 4.31 zuvor beschrieben.

Im dritten Versuch (siehe Abb. 3.34) wurden die immunsupprimierten C57BL/6 Mäuse mit $20 \mu\text{g}$ DB-SIINFEKL, $20 \mu\text{g}$ SIINFEKL-Peptid oder mit einer Kombination aus $20 \mu\text{g}$ SIINFEKL-Peptid und $20 \mu\text{g}$ DB-SIINFEKA immunisiert (siehe 3.6.4), wobei die verabreichte Menge an synthetischem SIINFEKL-Peptid 1000-fach höher gewählt war als in $20 \mu\text{g}$ DB-SIINFEKL. Die Berechnung der einzusetzenden SIINFEKL-Peptid-Konzentration ist in Abb. 4.33 dargestellt.

Ein Molekül SIINFEKL-Peptid :	1000Da =	1000	$\times 1,66 \times 10^{-27} \text{kg}$
			$1,66 \times 10^{-24} \text{kg}$
	Masse/Molekül =	1,66	$\times 10^{-16} \mu\text{g}$
20 μg DB enthalten $1,15 \times 10^{14}$ Moleküle pp65 bzw. SIINFEKL			
Masse SIINFEKL-Peptid / $1,15 \times 10^{14}$ Moleküle: $1,15 \times 10^{14}$ Moleküle $\times 1,66 \times 10^{-16} \mu\text{g} = 0,02 \mu\text{g}$			
1000-fach: $1000 \times 0,02 \mu\text{g} = \mathbf{20 \mu\text{g}}$			

Abb. 4.33: Berechnung der einzusetzenden SIINFEKL-Peptid-Konzentration. Die Berechnung der benötigten SIINFEKL-Peptid-Konzentration erfolgte über die Anzahl der pp65 Moleküle/20 μg DB. Da das SIINFEKL als Fusionsprotein pp65-SIINFEKL in den DB vorliegt und somit die Anzahl der pp65

Moleküle der Anzahl der SIINFEKL Moleküle entspricht, kann die einzusetzende SIINFEKL-Peptid-Konzentration anhand des pp65 Moleküls ermittelt werden.

Tab. 4.9: Auflistung der im *Challenge-Modell* getesteten Gruppen

Gruppe	Priming	Challenge-Infektion
A	-	mCMV-SIINFEKL
B	DB-SIINFEKL	
C	SIINFEKL-Peptid	
D	SIINFEKL-Peptid + DB-SIINFEKA	

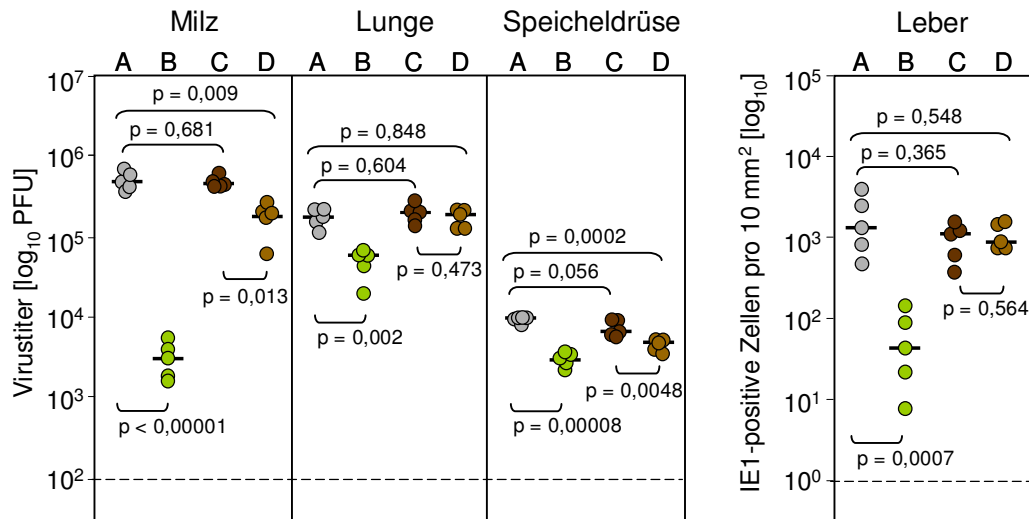


Abb. 4.34: DB-induzierter Adjuvaneffekt. Für die Immunisierung wurden 20µg DB-SIINFEKL, 20µg SIINFEKL-Peptid oder eine Kombination aus 20µg SIINFEKL-Peptid und 20µg DB-SIINFEKA verwendet. Die weitere Durchführung und Analyse erfolgte analog wie in Abb. 4.31 zuvor beschrieben.

Auch dieser Versuch erfolgte analog zu den bisherigen. Eine Immunisierung mit SIINFEKL-Peptid allein führte in keinem der untersuchten Organe zu einer Reduktion des Virustiters (siehe Abb. 4.34). Eine Kombination mit DB-SIINFEKA hingegen reduzierte den Virustiter in der Milz ($p=0,009$) und in der Speicheldrüse ($p=0,0002$) signifikant. In der Lunge ($p=0,848$) sowie Leber ($p=0,548$) konnte nach Immunisierung mit SIINFEKL-Peptid keine Protektion durch eine Kombination mit DB-SIINFEKA nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Immunisierung mit OVA oder SIINFEKL-Peptid alleine keine Protektion induzieren. Demgegenüber führt eine kombinierte Immunisierung mit OVA und DB-SIINFEKA bzw. SIINFEKL-Peptid und DB-SIINFEKA zu einem antiviralen Schutz in Milz, Speicheldrüse sowie Leber. Dieser Schutz ist im Vergleich zu einer Immunisierung mit DB-SIINFEKL jedoch deutlich schwächer.

4.9 Verbesserung des protektiven Potenzials adoptiv transferierter epitopspezifischer T-Zellen durch therapeutische Vakzinierung mit DB-SIINFEKL

Bisher konnte gezeigt werden, dass durch DB-Immunisierung C57BL/6 Mäuse vor einer hochdosierten *Challenge*-Infektion geschützt werden und adoptiv transferierte OT-I *in vivo* proliferieren. Außerdem konnte im AT beobachtet werden, dass transferierte OT-I Zellen Rezipienten vor einer mCMV-SIINFEKL Infektion schützen. Anhand dieser Vorkenntnisse sollte nun überprüft werden, ob eine zusätzliche Vakzinierung das protektive Potenzial adoptiv transferierter CTL im immunsupprimierten Rezipienten verbessert und dadurch die für den Schutz benötigten Zellzahlen reduziert werden können. Das experimentelle Vorgehen ist in Abb. 4.35 schematisch dargestellt.

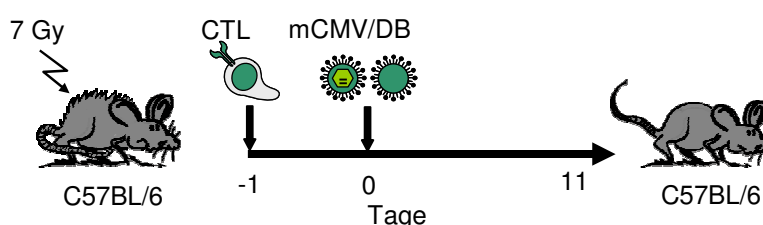


Abb. 4.35: Schematische Darstellung des Kombinations-Modells. C57BL/6 Mäuse wurden durch γ -Bestrahlung immunsupprimiert und CTL in definierter Zahl i.v. injiziert. Am nächsten Tag wurden die Rezipienten mit 1×10^5 PFU mCMV-SIINFEKL i.pl. infiziert bzw. zusätzlich noch mit DB vakziniert. Am 11. Tag p.i. wurden die Organe entnommen und die Organtiter im *Plaque-Assay* bestimmt.

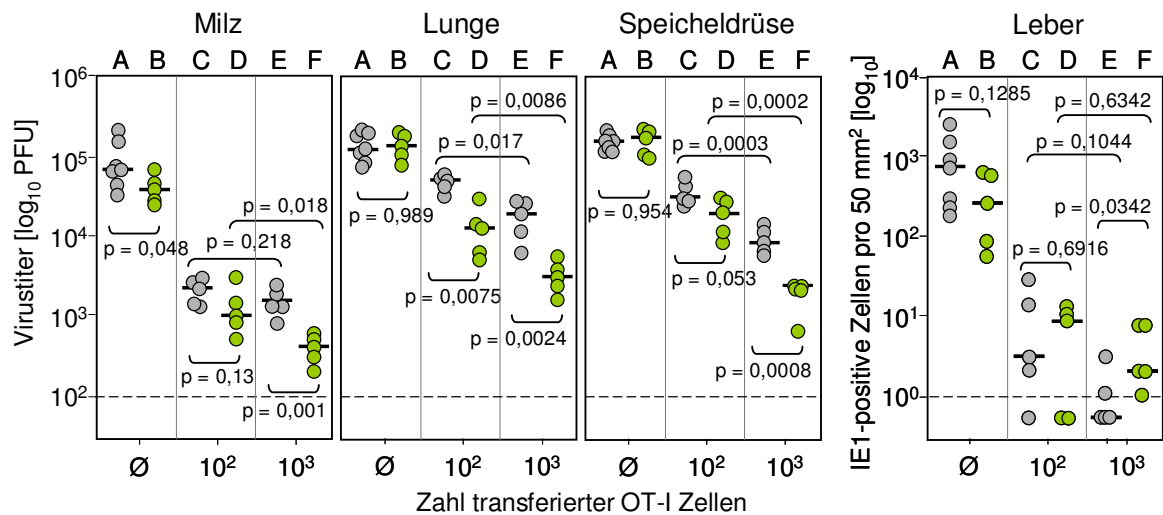
Im Gegensatz zu der DB-Immunisierung, die im *Challenge*-Modell vor der Infektion erfolgte, wurden bei der therapeutischen Vakzinierung die DB zeitgleich mit dem Virus in die Maus injiziert. Durch Vakzinierung der Rezipienten mit DB-SIINFEKL sollte der AT um eine zusätzliche *in vivo* Expansion der adoptiv transferierten OT-I Zellen ergänzt werden. Als CTL kamen OT-I Zellen oder eine SIINFEKL-spezifische Kurzzeit-CTL zum Einsatz. Die transferierte Zellzahl wurde so gewählt, dass ihre Schutzwirkung noch einen Spielraum zur Verbesserung ließ. Anhand der vorangegangenen Schutzversuche (siehe 4.9) wurden deshalb 1×10^2 bzw. 1×10^3 CTL transferiert. Ein Tag nach AT wurden die Rezipienten mit 1×10^5 PFU mCMV-SIINFEKL i.pl. infiziert (siehe 3.6.2) und zum Teil zusätzlich mit $20 \mu\text{g}$ DB-SIINFEKL vakziniert (siehe 3.6.4.1). Als Kontrollen wurde je eine Gruppe ohne AT bzw. ohne AT mit DB-SIINFEKL Immunisierung mit mCMV-SIINFEKL injiziert. Elf Tage p.i. wurden die Organe entnommen und die Virustiter in Milz, Lunge sowie Speicheldrüse im *Plaque-Assay* bestimmt.

Ein AT von OT-I Zellen ohne Vakzinierung führte zur Reduktion des Virustiters in allen untersuchten Organen, wobei der Schutz bei Transfer von 1×10^3 Zellen in Milz, Lunge und Speicheldrüse stärker ausgeprägt war (siehe Abb. 4.36 A).

Tab. 4.10: Auflistung der im Kombinations-Modell getesteten Gruppen

Gruppe	transferierte Zellzahl	Vakzinierung	Infektion
A	○	-	-
B	●	-	DB-SIINFEKL
C	○	1×10^2	-
D	●	1×10^2	DB-SIINFEKL
E	○	1×10^3	-
F	●	1×10^3	DB-SIINFEKL

A: OT-I



B: CTLL-SIINFEKL

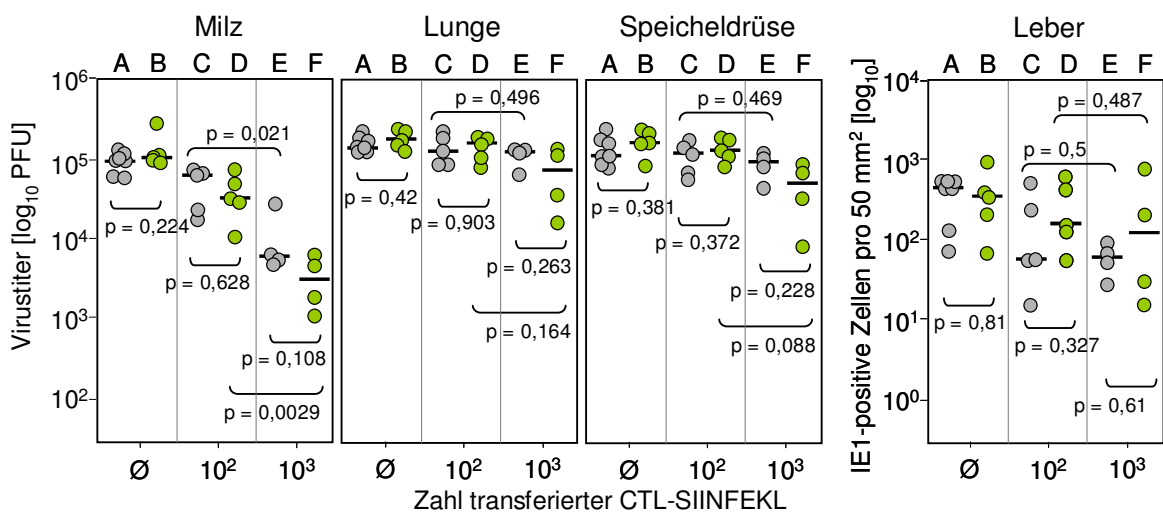


Abb. 4.36: Verbesserung des protektiven Potenzials adoptiv transferierter SIINFEKL-spezifischer CD8 T-Zellen durch Vakzinierung mit DB-SIINFEKL. Acht Wochen alten immunsupprimierten C57BL/6 Mäusen wurden SIINFEKL-spezifische CD8 T-Zellen adoptiv transferiert. **A:** 1×10^2 bzw. 1×10^3 aufgereinigte OT-I Zellen wurden i.v. appliziert. **B:** 1×10^2 bzw. 1×10^3 CTL-SIINFEKL wurden i.v. appliziert. Ein Tag nach Zelltransfer wurden die Rezipienten mit 1×10^5 PFU mCMV-SIINFEKL infiziert und die Hälfte der Transfergruppen zusätzlich mit $20 \mu\text{g}$ DB-SIINFEKL vakziniert. Zur Kontrolle wurde je eine Gruppe ohne vorangegangenen Zelltransfer infiziert bzw. mit DB-SIINFEKL vakziniert sowie infiziert. Elf Tage p.i. wurden die Organe entnommen, die Virustiter im *Plaque*-Assay in der Milz, Lunge sowie Speicheldrüse bestimmt und die Zahl infizierter Zellen wurde mit Hilfe der IE1-spezifischen IHC in der Leber ermittelt. Die P-Werte der log-normal verteilten Titer wurden im *unpaired, two-tailed Student's t-Tests* (Microsoft Office; Excel) ermittelt. Ein P-Werte $< 0,05$ zeigt einen statistisch signifikanten

Unterschied an. Die Mediane sind als horizontale Balken dargestellt, die Symbole repräsentieren die Virustiter in einzelnen Rezipienten und das DL ist als gestrichelte Linie dargestellt.

In der Milz konnten 1×10^2 OT-I Zellen den Virustiter etwa um 1,5 log-Stufen reduzieren, in der Lunge um 0,6 log-Stufen, in der Speicheldrüse um 0,8 log-Stufen bzw. in der Leber um 2,5 log-Stufen. Eine Erhöhung der Zellzahl verbesserte in der Milz ($p=0,218$) und in der Leber ($p=1044$) den Effekt nicht signifikant, während in der Lunge ($p=0,017$) und in der Speicheldrüse ($p=0,0003$) eine weitere Titerreduktion nachweisbar war. Im Vergleich zu den Ergebnissen ohne Vakzinierung konnte eine zusätzliche Vakzinierung in den untersuchten Organen, außer in der Leber, das protektive Potenzial beider Zellkonzentrationen wesentlich verbessern, wobei in der Lunge bereits bei 1×10^2 transferierten Zellen ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden konnte ($p=0,0075$). Die Verstärkung des Schutzes war nach Transfer von 1×10^3 OT-I Zellen in Milz, Lunge und Speicheldrüse signifikant ($p \leq 0,0024$). Dagegen konnte nach weiterer Erhöhung der Zellzahl keine Verbesserung des Schutzes in der Leber festgestellt werden ($p=0,487$). In keinen der untersuchten Organe konnte die Kombination aus therapeutischer Vakzinierung und Infektion ohne AT *in vivo* einen Schutz induzieren.

Im Vergleich zu den OT-I Ergebnissen konnte nach Transfer von 1×10^2 CTL-SIINFEKL kein Schutz in den getesteten Organen detektiert werden (siehe Abb. 4.36 B). In der Milz führte die Erhöhung auf 1×10^3 Zellen zur Verbesserung der Protektion ($p=0,021$). Nach zusätzlicher Vakzinierung konnte in der Milz keine Verbesserung der Protektion von transferierten 1×10^2 CTL-SIINFEKL nachgewiesen werden ($p=0,628$). Durch Erhöhung der Zellzahl auf 10^3 wurde das protektive Potenzial transferierter CTL-SIINFEKL in der Milz deutlich verbessert ($p=0,0029$). Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied nach Transfer von 10^3 CTL-SIINFEKL zwischen den beiden Gruppen, ohne bzw. mit zusätzlicher Vakzinierung, festgestellt werden ($p=0,108$). In den anderen Organen konnte zwischen den einzelnen Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine therapeutische Vakzinierung mit DB-SIINFEKL das protektive Potenzial adoptiv transferierter OT-I Zellen verbessern kann und somit die Reduktion der Anzahl der transferierten Zellen ermöglicht. Die Schutzwirkung einer polyklonalen CTLL, konnte hingegen bei den getesteten Zellzahlen nicht signifikant verbessert werden.

4.10 Verbesserung der adoptiven T-Zell Therapie durch Vakzinierung mit DB-SIINFEKL nach KMT

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Kombinationstherapie zur Optimierung der adoptiven Immuntherapie für die das etablierte murine KMT-Modell (Holtappels et al., 2008; 2013; Ebert et al., 2012) als Basis diente. Dafür sollte eine KMT mit dem AT von antiviralen CD8 T-Zellen und einer therapeutischen Vakzinierung kombiniert werden. Die Vakzinierung erfolgte hierbei mit DB-SIINFEKL und sollte die Effizienz der transferierten, protektiven T-Zellen im HSCT-Rezipienten verbessern. Die vorangegangenen Ergebnisse haben bereits gezeigt, dass eine Vakzinierung mit DB-SIINFEKL das protektive Potenzial adoptiv transferierter OT-I Zellen verbessert. Nun sollte getestet werden, ob eine Vakzinierung ebenfalls die Effizienz antiviraler transferierter Zellen im HSCT-Rezipienten verbessern kann. Das experimentelle Vorgehen ist in Abb. 4.37 schematisch dargestellt.

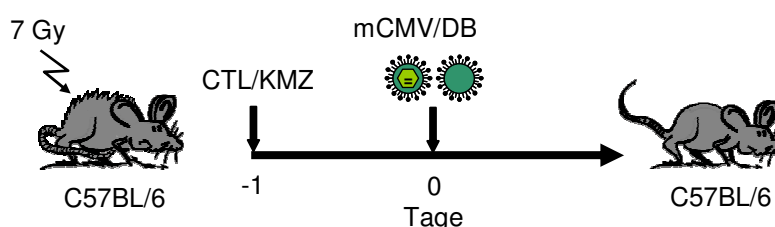


Abb. 4.37: Schematische Darstellung der Kombinationstherapie. C57BL/6 Mäuse wurden durch γ -Bestrahlung immunosupprimiert und CTL zusammen mit KMZ in definierter Zahl i.v. injiziert. Am nächsten Tag wurden die Rezipienten mit 1×10^5 PFU mCMV-SIINFEKL i.pl. infiziert bzw. zusätzlich noch mit DB vakziniert. Zu definierten Zeiten (2, 4, 6, 8 Wochen) *post* KMT wurden die Organe entnommen und die Organtiter im *Plaque-Assay* bestimmt.

Für die Kombinationstherapie (siehe 3.6.11) wurden acht Wochen alten, immunosupprimierten C57BL/6 Mäusen eine Kombination aus KMZ und *ex vivo* isolierten OT-I Zellen i.v. appliziert, wobei die Zellen auf eine Konzentration von 1×10^2 OT-I Zellen/ 5×10^6 KMZ/0,5ml PBS eingestellt waren. Die für die KMT benötigten KMZ wurden aus 19-21 Wochen alten Mäusen isoliert. Anschließend wurden die CD8- sowie CD4 T-Zellen immunomagnetisch aus den KMZ depletiert (siehe 3.4.3), um sicherzustellen, dass die eventuelle Protektion durch die adoptiv transferierten OT-I Zellen herbeigefügt wird. Die Effizienz der CD8- und CD4 T-Zellen Depletion sowie die Reinheit der aufgereinigten OT-I Zellen wurde zytofluorometrisch kontrolliert.

In zytofluorometrischen Analysen konnte neben der erfolgreichen Depletion der CD8- und CD4 T-Zellen aus dem KM (siehe Abb. 4.38) eine >95%-ige Reinheit der OT-I Zellen (siehe Abb. 4.39) nachgewiesen werden.

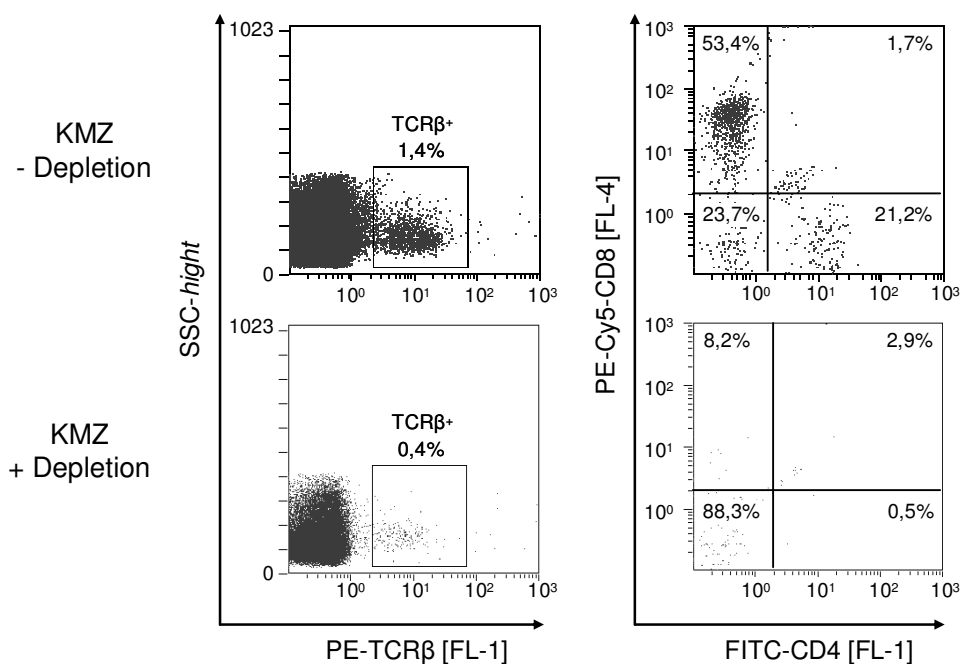


Abb. 4.38: Zytofluorometrischer Nachweis der Depletion von CD8- und CD4 T-Zellen aus KMZ. Nach Isolierung der KMZ und immunmagnetischer Depletion der CD8- und CD4 T-Zellen wurden die KMZ mit Fluorochrom-markierten AK (FITC-anti-CD4, PE-anti-TCR β , PE-Cy5-anti-CD8) inkubiert und die Probe fluorometrisch analysiert. Es wurden etwa 3×10^5 Zellen analysiert. Zunächst wurde auf Lymphozyten und anschließend auf TCR β^+ gated und die Effizienz der Depletion im *Dot Plot* CD8 vs. CD4 dargestellt.

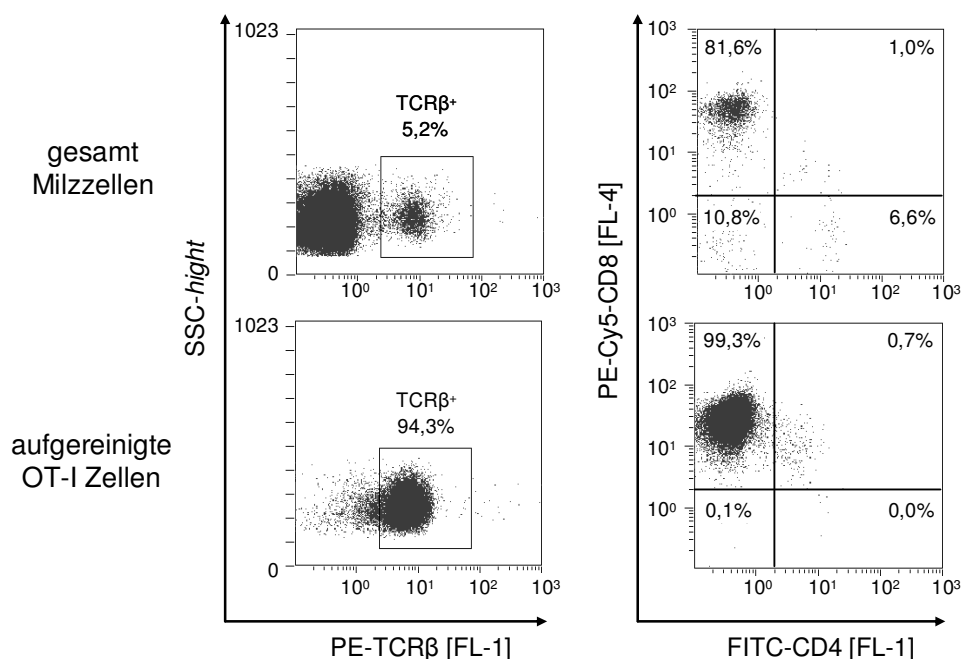


Abb. 4.39: Zytofluorometrische Überprüfung der Reinheit isolierter OT-I Zellen. Nach der Aufreinigung der OT-I Zellen wurden diese mit Fluorochrom-markierten AK (FITC-anti-CD4, PE-anti-TCR β und PE-Cy5-anti-CD8) inkubiert und die Reinheit der Probe wurde fluorometrisch analysiert. Es wurden etwa 3×10^5 Zellen analysiert. Zunächst wurde auf Lymphozyten, danach auf TCR β^+ gated und die Reinheit im *Dot Plot* CD8 vs. CD4 dargestellt.

Zusätzlich wurden die CD8 T-Zellen der OT-I Maus charakterisiert. Unter Verwendung unterschiedlicher Antikörperkombinationen (siehe Tab. 4.11) können naive Zellen, T_{CM} (*central-memory t cells*), T_{EM} (*effector-memory t cells*), EEC (*early effector cells*) und SLEC (*short-lived effector cells*) unter den CD8 T-Zellen identifiziert werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.40 dargestellt.

Tab. 4.11: Auflistung der Antikörperkombinationen zur Charakterisierung der CD8 T-Zellen

	naiv	T_{CM}	T_{EM}	EEC	SLEC
CD8	+	+	+	+	+
KLRG1	low	low	low	low	high
CD62L	high	high	low	low	low
CD127	high	high	high	low	low
CD44	low	high	high	high	high

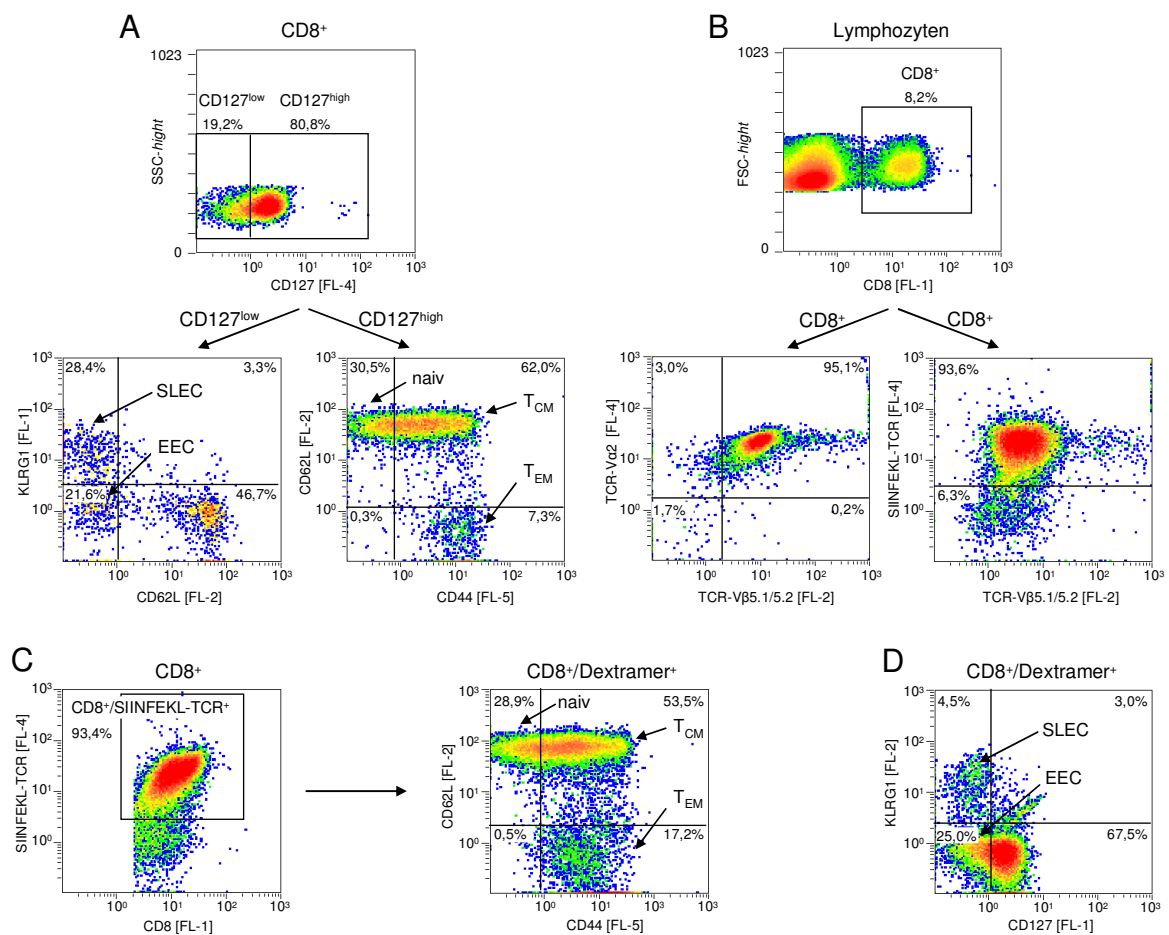


Abb. 4.40: Charakterisierung der CD8 T-Zellen aus der Milz einer OT-I Maus. Aufgearbeitete Milzzellen der OT-I Maus wurden mit unterschiedlichen Kombinationen an Fluorochrom-markierten AK inkubiert [A: FITC-anti-KLRG1, PE-anti-CD62L, ECD-anti-CD8, PE-Cy5-anti-CD127, PE-Cy7-anti-CD44; B: FITC-anti-CD8, PE-anti-TCR-Vβ5.1/5.2, APC-anti-TCR-Vα2; C: FITC-anti-CD8, PE-anti-CD62L, PE-Cy7-anti-CD44, SIINFEKL-spezifischer TCR (APC); D: FITC-anti-CD127, PE-anti-KLRG1, PE-Cy7-anti-CD8, SIINFEKL-spezifischer TCR (APC)]. Die Proben wurden anschließend fluorometrisch analysiert. Es wurden etwa 3×10^5 Zellen analysiert. Die Darstellung erfolgte im *colour-coded Density Plot*. **A:** Zunächst wurde auf Lymphozyten gegatet, diese wurden im *Plot* SSC-high vs. CD8 dargestellt. Zur weiteren Charakterisierung wurden die CD8⁺ Zellen mit Hilfe des anti-CD127 AK analysiert (dargestellt im *Plot* SSC-high vs. CD127). Unter den CD127^{high} Zellen kann mit Kombination der AK KLRG1 und CD62L zwischen SLEC und EEC unterschieden werden. Die

CD127^{low} Zellen lassen sich mit Hilfe von CD62L und CD44 in naive Zellen, T_{CM} und T_{EM} einteilen. **B:** Zuerst wurde auf Lymphozyten gegatet, diese wurden im *Plot* FSC-*height* vs. CD8 dargestellt. Die CD8⁺ Zellen wurden anschließend im *Plot* TCR-Vα2 vs. TCR-Vβ5.1/5.2 oder SIINFEKL-spezifischer TCR vs. TCR-Vβ5.1/5.2 dargestellt. **C:** Zunächst wurde auf Lymphozyten gegatet, diese wurden im *Plot* FSC-*height* vs. CD8 analysiert. Die CD8⁺ Zellen wurden anschließend im *Plot* CD8 vs. SIINFEKL-spezifischer TCR dargestellt. Im *Plot* CD62L vs. CD44 können die SIINFEKL-spezifischen CD8⁺ Zellen in naive Zellen, T_{CM} und T_{EM} eingeteilt werden. **D:** Die gegateten Lymphozyten wurden im *Plot* FSC-*height* vs. CD8 dargestellt. Anschließend wurden die CD8⁺ Zellen im *Plot* CD8 vs. SIINFEKL-spezifischer TCR dargestellt. Im *Plot* KLRG1 vs. CD127 können die SLEC und EEC in den SIINFEKL-spezifischen CD8 T-Zellen ermittelt werden.

In den CD8 T-Zellen, die CD127 nur gering exprimieren, konnten mit Hilfe des anti-KLRG1 AK und des anti-CD62L-AK die SLEC von den EEC getrennt werden (siehe Abb. 4.40-A). Unter den CD8⁺/CD127^{low} T-Zellen konnten 28,4% SLECS und 21,6% EEC identifiziert werden. In der CD8⁺/CD127^{high} Population wurden die naiven T-Zellen, die T_{CM} und die T_{EM} ermittelt werden. Erstaunlicherweise konnten in der naiven OT-I Maus 62% aller CD8⁺/CD127^{high} T-Zellen als T_{CM} identifiziert werden. Dagegen konnten nur 30,5% naive T-Zellen und 7,3% T_{EM} ermittelt werden. Mit Hilfe des SIINFEKL-spezifischen TCR AK konnte festgestellt werden, dass 95% aller CD8 T-Zellen den SIINFEKL-spezifischen TCR tragen (siehe Abb. 4.40-C). Unter diesen CD8⁺/SIINFEKL-spezifischer TCR⁺ positiven Zellen konnten naive T-Zelle (28,9%), T_{CM} (53,5%) und T_{EM} (17,2%) sowie SLEC (4,5%) und EEC (25%) identifiziert werden (siehe Abb. 4.40-C und-D). Der klonale K^b-SIINFEKL spezifische TCR der CD8 T-Zellen der OT-I Maus besitzt die variablen Ketten Vα2 und Vβ5 (Hogquist et al., 1994). Daher wurden in einem Ansatz die AK anti-TCR-Vα2 und TCR-Vβ5.1/5.2 verwendet. 95% aller CD8 T-Zellen sind doppeltpositiv für TCR-Vα2 und TCR-Vβ5.1/5.2. Zudem konnte festgestellt werden, dass die SIINFEKL-spezifischen TCR⁺ CD8 T-Zellen auch den TCR-Vβ5.1/5.2 besitzen. Lediglich 6,3% der CD8 T-Zellen besitzen TCR mit anderer Spezifität.

Vor dem Zelltransfer wurden die T-Zell depletierten KMZ mit OT-I Zellen versetzt, um diese zeitgleich zu transferieren. Ein Tag nach Zelltransfer wurden die Rezipienten mit 1x10⁵ PFU mCMV-SIINFEKL infiziert, wobei eine Transfergruppe zusätzlich mit 20μg DB-SIINFEKL bzw. mit 20μg DB-SIINFEKA vakziniert wurde. Um die Viruslast ohne Einfluss der OT-I Zellen feststellen zu können, wurden einer Versuchsgruppe KMZ ohne OT-I Zellen vor der mCMV-Infektion i.v. transferiert. Zu den Zeitpunkten 2, 4, 6, 8 Wochen *post* KMT wurden die Organe entnommen und in der Milz, Lunge, Speicheldrüse sowie Leber der Virustiter im *Plaque-Assay* bestimmt. Zusätzlich wurde in der Leber die Zahl infizierter Zellen mit Hilfe der IE-1-spezifischen IHC ermittelt. Die einzelnen Versuchsgruppen sind in der Tabelle 4.12 aufgelistet und die Ergebnisse in der Abb. 4.41 dargestellt.

Tab. 4.12: Auflistung der in der Kombinationstherapie getesteten Gruppen

Gruppe	transferierte KMZ	transferierte OT-I Zellen	Vakzinierung	Infektion
A	○	5×10^6	-	-
B	●	5×10^6	1×10^2	DB-SIINFEKL
C	●	5×10^6	1×10^2	DB-SIINFEKA
D	●	5×10^6	1×10^2	-

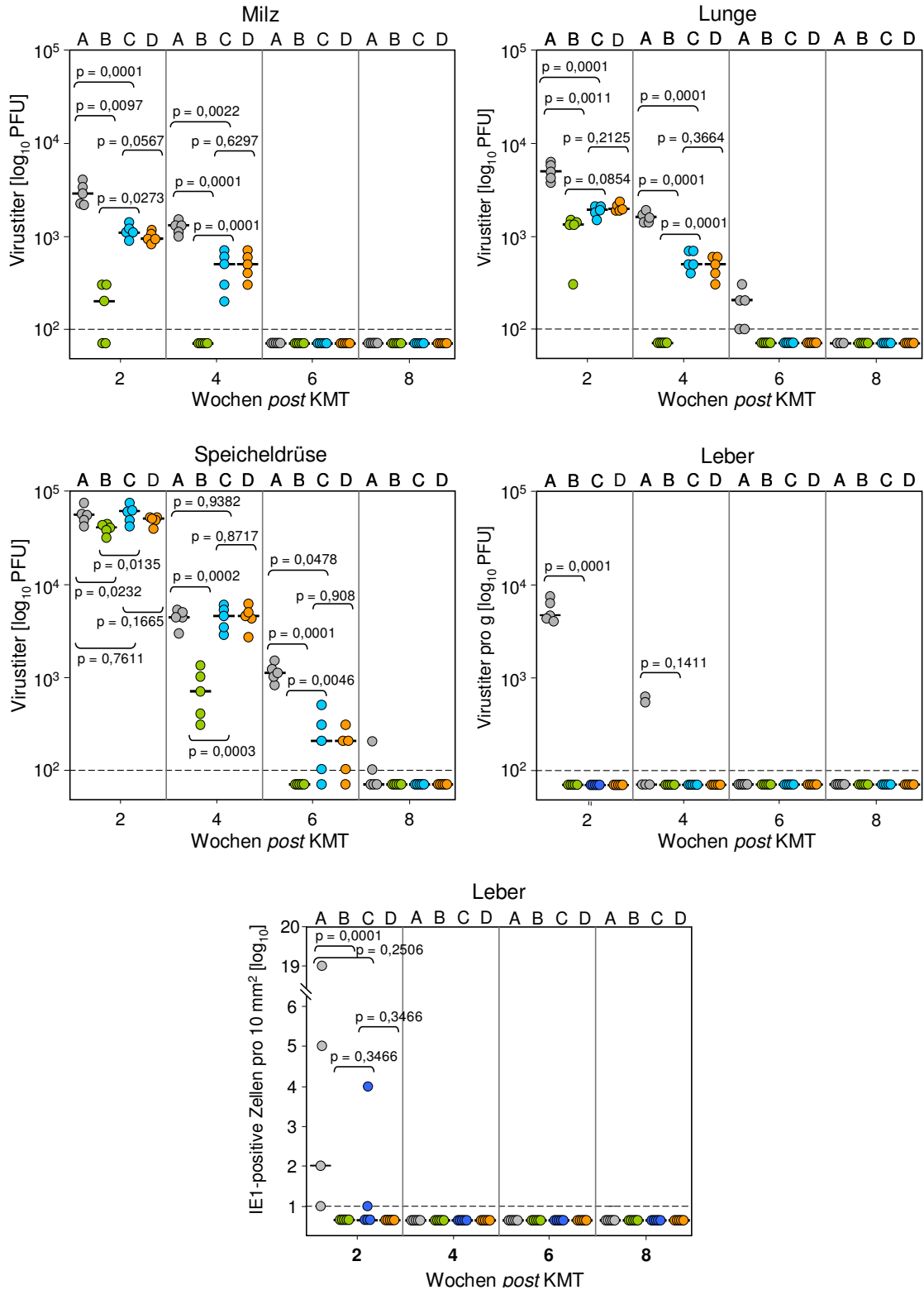


Abb. 4.41: Verbesserung des protektiven Potenzials adoptiv transferierter OT-I Zellen durch Vakzinierung mit DB-SIINFEKL im HSCT-Rezipienten. Acht Wochen alten, immunsupprimierten C57BL/6 Mäusen wurden

5×10^6 CD8- und CD4-depletierte KMZ zusammen mit 1×10^2 aufgereinigten OT-I -Zellen i.v. appliziert. Die für die KMT benötigten KMZ wurden aus 19-21 Wochen alten Mäusen isoliert (siehe 3.4.2). Einen Tag nach Zelltransfer wurden die Rezipienten mit 1×10^5 PFU mCMV-SIINFEKL i.pl. infiziert, wobei eine Transfergruppe zusätzlich mit 20µg DB-SIINFEKL bzw. mit 20µg DB-SIINFEKA vakziniert wurde. Um die Viruslast ohne Schutzwirkung der OT-I Zellen ermitteln zu können, wurden einer Gruppe KMZ ohne OT-I Zellen vor der mCMV-Infektion appliziert. Zu den Zeitpunkten 2, 4, 6, 8 Wochen *post* KMT wurden die Organe entnommen. In der Milz, Lunge, Speicheldrüse sowie Leber wurden die Virustiter im *Plaque-Assay* ermittelt und die Zahl infizierter Zellen wurde mit Hilfe der IE1-spezifischen IHC in der Leber bestimmt.. Die P-Werte der log-normal verteilten Titer wurden im *unpaired, two-tailed Student's t-Test* (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm?Format=C>) ermittelt. Ein P-Werte $<0,05$ zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an. Die Mediane sind als horizontale Balken dargestellt, die Symbole repräsentieren die Virustiter in einzelnen Rezipienten und das DL ist als gestrichelte Linie dargestellt.

Der AT von OT-I Zellen ohne Vakzinierung führte zur Reduktion des Virustiters in allen untersuchten Organen, wobei eine Kombination aus AT und DB-SIINFEKA-Vakzinierung einen vergleichbaren Effekt erzielte (siehe Abb. 4.41). In der Milz sowie den Lungen konnten nach Transfer von 10^2 OT-I Zellen bereits zwei Wochen *post* KMT eine signifikante Reduktion infektiöser Partikel nachgewiesen werden. In der Leber konnte eine Verstärkung der Protektion im *Plaque-Assay* und mit der IE-1 spezifischen IHC festgestellt werden. In der Speicheldrüse war dieses erst sechs Wochen *post* KMT zu beobachten. Im Vergleich zur Kombination aus AT und DB-SIINFEKA-Vakzinierung konnte durch Kombination aus Zelltransfer und Vakzinierung mit DB-SIINFEKL das protektive Potenzial in allen Organen signifikant verbessert werden. Dieser Effekt war in Milz, Leber und Speicheldrüse bereits zwei Wochen *post* KMT zu beobachten, dagegen trat in der Lunge erst vier Wochen *post* KMT eine signifikante Verbesserung ein. Während in der Leber in fast allen Versuchsgruppen bereits zwei Wochen *post* KMT kein infektiöses Virus bzw. infizierte Zellen mehr nachzuweisen war, konnte sechs Wochen *post* KMT in der Milz in allen vier Versuchsgruppen und in den Lungen in den Gruppen B bis D kein Virustiter mehr festgestellt werden. In der Speicheldrüse konnten im Vergleich zu den anderen Organen erst acht Wochen *post* KMT keine *Plaques* mehr detektiert werden.

Die Ergebnisse der Kombinationstherapie zeigen, dass der AT von OT-I Zellen ohne Vakzinierung den Virustiter in allen untersuchten Organen reduzierte. Eine zusätzliche Vakzinierung mit DB-SIINFEKA erzielte dabei keinen signifikanten Unterschied. Im Vergleich dazu konnte eine Kombination aus Zelltransfer und Vakzinierung mit DB-SIINFEKL das protektive Potenzial antiviraler, transferierter Zellen signifikant verbessern. Eine zusätzliche Vakzinierung mit DB-SIINFEKL ermöglicht somit die Reduktion der Anzahl der für den Schutz benötigten Zellen.

Um die Effizienz der Kombinationstherapie einordnen zu können, wurde im Folgeversuch der Schutz, der nach kombinierter Therapie aus AT und Vakzinierung erzielt wurde mit dem, der nach adoptiver Immuntherapie mit titrierten Zahlen an OT-I Zellen erreicht wurde verglichen.

Hierzu wurden acht Wochen alten, immunsupprimierten C57BL/6 Mäusen eine Kombination aus 5×10^6 KMZ und titrierte Zellzahlen an *ex vivo* isolierten OT-I Zellen (1×10^2 - 1×10^5) i.v. appliziert. Die KMZ wurden wie zuvor beschrieben aufgearbeitet. Ein Tag nach Zelltransfer wurden die Rezipienten mit 1×10^5 PFU mCMV-SIINFEKL infiziert. Dabei erhielt eine Transfergruppe zusätzlich $20 \mu\text{g}$ DB-SIINFEKL bzw. $20 \mu\text{g}$ DB-SIINFEKA. Einer Versuchsgruppe wurden KMZ ohne OT-I Zellen vor der mCMV-Infektion i.v. transferiert, um die Viruslast ohne Einfluss der OT-I Zellen feststellen zu können. Zu den Zeitpunkten 2, 4, Wochen *post* KMT wurden die Organe entnommen und in der Milz, Lunge, Speicheldrüse sowie Leber der Virustiter im *Plaque-Assay* ermittelt. Zusätzlich wurde in der Leber die Zahl infizierter Zellen mit Hilfe der IE-1-spezifischen IHC bestimmt. Die einzelnen Versuchsgruppen sind in der Tabelle 4.13 aufgelistet und die Ergebnisse in der Abb. 4.42 dargestellt.

Der AT von 10^2 OT-I Zellen ohne Vakzinierung führte zur Reduktion des Virustiters in allen untersuchten Organen, wobei eine Kombination aus AT und DB-SIINFEKA-Vakzinierung, wie bereits in Abb. 4.41 dargestellt, einen vergleichbaren Effekt erzielte (siehe Abb. 4,42). In der Milz sowie den Lungen konnte durch Erhöhung der transferierten Zellzahlen bereits zwei Wochen *post* KMT eine stetige Reduktion infektiöser Partikel nachgewiesen werden. Dagegen konnte in der Speicheldrüse keine Verbesserung des Schutzes erreicht werden ($>0,05$). In der Leber konnten zwei Wochen *post* KMT weder infektiöses Virus noch infizierte Zellen in den OT-I behandelten Rezipienten festgestellt werden. Vier Wochen *post* KMT konnten in Milz und in der Lunge in den meisten Gruppen kein Virustiter mehr nachgewiesen werden. In der Speicheldrüse konnte zwar eine Reduktion der Virustiter ermittelt werden, jedoch lag der Titer noch bei etwa 5×10^3 PFU. Eine Kombinationstherapie erzielte in der Milz und in der Lunge einen deutlich besseren Schutz als 10^2 oder 10^3 transferierte OT-I Zellen. Sie erreichte jedoch nicht die Protektion, die nach Transfer von 10^4 Zellen vermittelt wurde. In der Speicheldrüse konnte nach Kombinationstherapie ein stärkerer Schutz festgestellt werden als nach adoptiver Immuntherapie mit 10^5 OT-I Zellen.

Tab. 4.13: Auflistung der in der Kombinationstherapie getesteten Gruppen

Gruppe		transferierte KMZ	transferierte OT-I Zellen	Vakzinierung	Infektion
A	○	5×10^6	-	-	
B	●	5×10^6	1×10^2	DB-SIINFEKL	
C	●	5×10^6	1×10^2	DB-SIINFEKA	mCMV-SIINFEKL
D	●	5×10^6	1×10^2	-	
E	●	5×10^6	1×10^3	-	
F	●	5×10^6	1×10^4	-	
G	●	5×10^6	1×10^5	-	

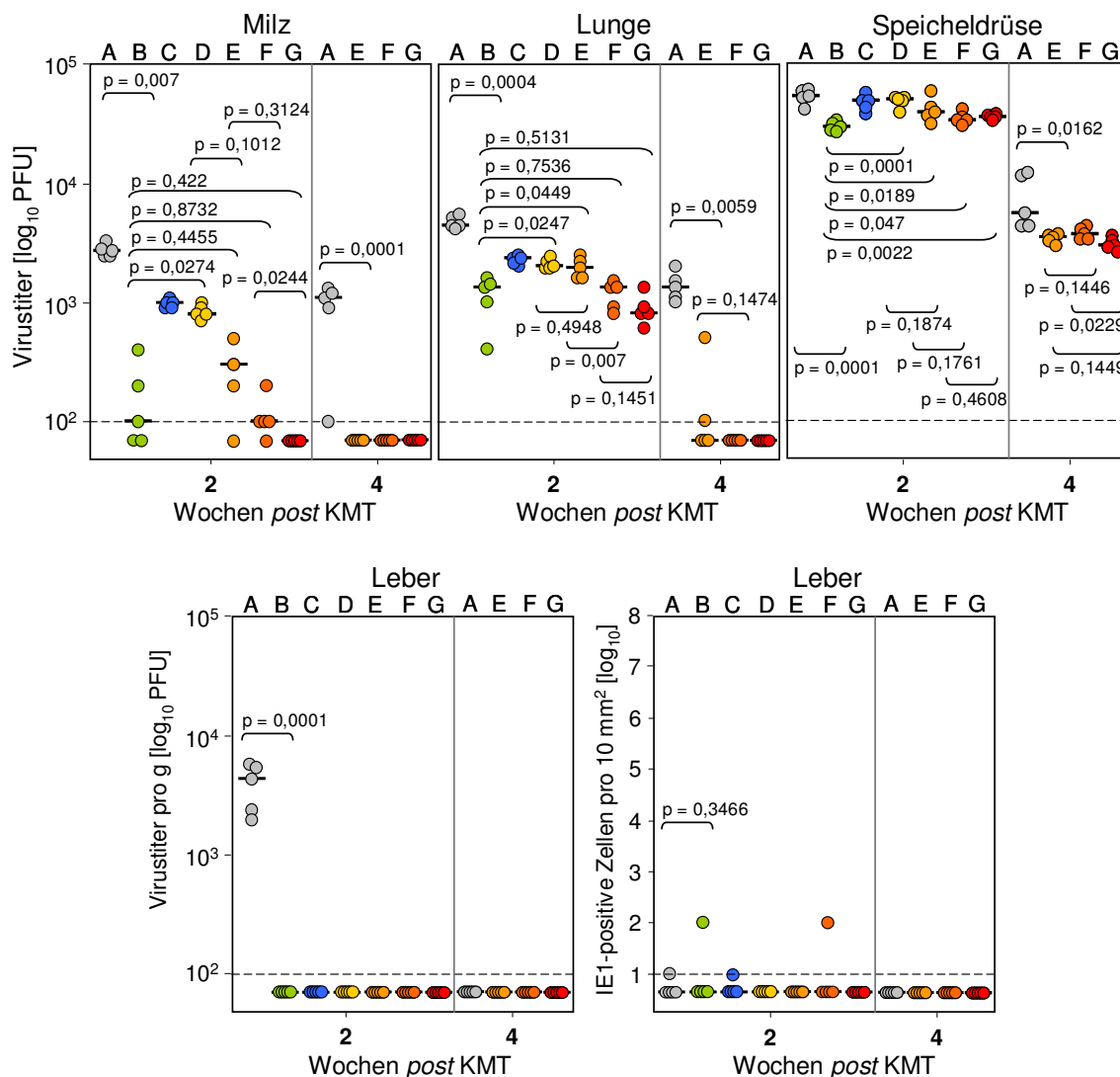


Abb. 4.42: Vergleich des protektiven Potenzials nach Kombinerter Immuntherapie und nach AT mit titrierten Zahlen an OT-I Zellen im HSCT-Rezipienten. Acht Wochen alten, immunsupprimierten C57BL/6 Mäusen wurden 5×10^6 CD8- und CD4-depletierte KMZ zusammen mit titrierten Zahlen (1×10^2 - 10^5) aufgereinigten OT-I-Zellen i.v. appliziert. Die für die KMT benötigten KMZ wurden aus 19-21 Wochen alten Mäusen isoliert (siehe 3.4.2). Einen Tag nach Zelltransfer wurden die Rezipienten mit 1×10^5 PFU mCMV-SIINFEKL i.pl. infiziert, wobei eine Transfergruppe zusätzlich mit $20 \mu\text{g}$ DB-SIINFEKL bzw. mit $20 \mu\text{g}$ DB-SIINFEKA vakziniert wurde. Um die Viruslast ohne Schutzwirkung der OT-I Zellen ermitteln zu können, wurden einer Gruppe KMZ ohne OT-I Zellen vor der mCMV-Infektion appliziert. Zu den Zeitpunkten 2, 4 Wochen *post* KMT wurden die Organe entnommen und in der Milz, Lunge, Speicheldrüse sowie Leber wurden die Virustiter im *Plaque-Assay* ermittelt. Zusätzlich wurde die Zahl infizierter Zellen mit Hilfe der IE1-spezifischen IHC in der Leber bestimmt. Die P-Werte der log-normal verteilten Titer wurden im *unpaired, two-tailed Student's t-Test* (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm?Format=C>) ermittelt. Ein P-Werte $< 0,05$ zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an. Die Mediane sind als horizontale Balken dargestellt, die Symbole repräsentieren die Virustiter in einzelnen Rezipienten und das DL ist als gestrichelte Linie dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass der AT von 10^2 OT-I Zellen ohne Vakzinierung einen Schutz erzielt, der in Milz und Lunge durch Erhöhung der Transferzahl verbessert wird. Eine Kombination aus Zelltransfer und Vakzinierung mit DB-SIINFEKL erreichte in Milz und Lunge

einen stärkeren Schutz als ein AT mit 10^2 oder 10^3 T-Zellen, damit verstärkt die zusätzliche Vakzinierung das protektive Potenzial der transferierten Zellen um das etwa 100-fache. Eine Kombinationstherapie ermöglicht somit die Reduktion der Anzahl der für den Schutz benötigten Zellen und erhöht die Effizienz der adoptiven Immuntherapie.

5 Diskussion

Die akute hCMV-Infektion immundefizienter Patienten wie beispielsweise HSCT-Rezipienten ist von hoher klinischer Relevanz, da sie lebensbedrohende Auswirkungen haben kann (Hebart und Einsele, 2004). Die derzeitig verfügbaren Virostatika zur antiviralen Therapie sind aufgrund ihrer erheblichen Nebenwirkungen (Hauptmeier und Rohde, 2010; Berger et al., 2011), ihrer begrenzten Wirksamkeit sowie ihres Resistenzrisikos (Erice, 1999; Chou, 2001) nur eingeschränkt geeignet den hCMV-bedingten Komplikationen nach HSCT entgegenzuwirken. Die adoptive Immuntherapie stellt neben der antiviralen Therapie einen alternativen Therapie-Ansatz dar, der auf der Beobachtung basiert, dass die Rekonstitution virusspezifischer CD8 T-Zellen im HSCT-Patienten mit dem Ausmaß der hCMV-Erkrankung korreliert (Einsele et al., 1993; Ksouri et al., 2007). Es wurden daher Strategien zur Verbesserung der Rekonstitution einer CMV-spezifischen Immunabwehr nach HSCT durch AT virusspezifischer CD8 T-Zellen entwickelt (Reddehase et al., 1987; Riddell et al., 1992; Holtappels et al., 2006; 2008). Dieser Ansatz eignet sich dazu, die akute CMV-Infektion zu behandeln, die Rekonstitution antiviraler CD8 T-Zellen zu beschleunigen sowie die Rekurrenz der viralen Infektion zu verhindern (Leen und Heslop, 2008; Peggs et al., 2009; Steffens et al., 1998). Ein limitierender Faktor der adoptiven Immuntherapie ist jedoch die hohe Anzahl benötigter hCMV-spezifischer CD8 T-Zellen. Aufgrund dessen ist es notwendig die adoptive Immuntherapie für die regelmäßige klinische Anwendung zu optimieren.

Eine mögliche Option der Optimierung des AT sowie zur Verbesserung der Rekonstitution antiviraler Immunität nach HSCT könnte die Kombination einer hCMV-Vakzine mit dem AT sein (Herr und Plachter, 2009). Die Entwicklung einer Vakzine zur Prävention der hCMV-Infektionen wurde vom *Institute of Medicine of the National Academy of Science* mit hoher Priorität eingestuft (Stratton et al., 2001; Sung und Schleiss, 2010), jedoch steht trotz vielfältiger, experimenteller Ansätze noch kein zugelassener Impfstoff zur Verfügung (Schleiss und Heineman, 2005; Schleiss, 2008). Ein erfolgreicher Impfstoff sollte eine möglichst breite antigene Zusammensetzung besitzen. Ein potentieller Impfstoffkandidat, der diese Forderung erfüllt, könnten subvirale DB sein (Pepperl-Klindworth und Plachter, 2006; Becke et al., 2010). DB enthalten in ihrer natürlichen Form dominante T-Zellantigene, jedoch fehlen ihnen einzelne Antigene der hCMV-spezifischen T-Zell-Antwort (Varnum et al., 2004). Allerdings konnte gezeigt werden, dass diese in rekombinanten DB supplementiert werden können (Mersseman et al., 2008a; b).

Ein Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines murinen Modells einer Kombinationstherapie aus AT und Vakzinierung nach HSCT. In diesem soll durch Vakzinierung mit DB die *in vivo* Proliferation adoptiv transferierter CD8 T-Zellen induziert und damit die Zahl der zum Schutz benötigten CD8 T-Zellen reduziert werden.

Integration des Modell-Peptids SIINFEKL in das mCMV-Genom

In der vorliegenden Arbeit wurde auf das H-2K^b präsentierte Peptid SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) als Modellantigen für AT, Vakzinierung und Infektion zurückgegriffen. Die Integration der SIINFEKL-kodierenden Sequenz in das mCMV-Genom und damit die endogene Präsentation des Peptids ermöglicht die Verwendung SIINFEKL-basierter Systeme, wie beispielsweise der transgenen OT-I Maus (Hoquist et al., 1994). Die Integration der SIINFEKL-kodierenden Sequenz erfolgte im ORF 164 an der Position des H-2D^d präsentierte Peptids m164₂₅₇₋₂₆₅ (siehe Abb. 4.1) (Däubner et al., 2010; Lemmermann et al., 2010a; 2011). Dieser orthotope Peptidaustausch, d.h. die Integration der SIINFEKL-kodierenden Sequenz an eine natürliche Position eines antigenen Peptides, ist der konservativste Austausch und reduziert damit mögliche Beeinflussungen der viralen Replikation. Ein weiterer Vorteil dieser Position ist die Tatsache, dass es sich beim E-Phase Glykoprotein gp36,5/m164 um ein nicht-essentielles Protein handelt, das aber eine immundominante T-Zellantwort induziert.

In dieser Arbeit wurde alternativ auch die Sequenz des nicht-antigenen Peptids SIINFEKA (OVA_{257-264L→A}), in dem die Ankeraminosäure L gegen A ausgetauscht ist, in das virale Genom integriert. Wie bereits in Lemmermann et al. (2010a) beschrieben, führt der Austausch L → A zur Deletion einer proteasomalen Schnittstelle und damit zur Verhinderung der endogenen Prozessierung.

Die Generierung der mCMV-Rekombinanten mit dem orthotopen Peptidaustausch m164₂₅₇₋₂₆₅ → SIINFEKL erfolgte mit der Zwei-Schritt-BAC-Mutagenese (Messerle et al., 1997; Borst et al., 1999; 2004a; b; Wagner et al., 1999). Für die homologe Rekombination wurden die bereits generierten *Shuttle*-Plasmide pST76K_m164-SIINFEKL sowie pST76K_m164-SIINFEKA (Lemmermann et al., 2010a) und der BAC-Vektor mCMV-BAC-Δm157Luc (Klenovsek et al., 2007) verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei mCMV-Rekombinanten erfolgreich generiert werden:

1. mCMV-Δm157Luc/m164-SIINFEKL (mCMV-SIINFEKL)
2. mCMV-Δm157Luc/m164-SIINFEKA (mCMV-SIINFEKA)

Der orthotope Peptidaustausch hat keinen Einfluss auf die Expression des Trägerproteins sowie auf den viralen Replikationszyklus

Eine Manipulation des viralen Genoms wie beispielsweise die Integration von DNA-Sequenzen, die für nicht-virale bzw. „fremde“ Peptide kodieren, kann die biologischen Eigenschaften des Virus negativ beeinflussen. Um die Wahrscheinlichkeit eines Einflusses zu verringern, wurde die Integration der SIINFEKL-kodierenden Sequenz der Integration einer längeren Sequenz bzw. der Integration der gesamten OVA-Sequenz vorgezogen.

Selbst durch den konservativen orthotopen Peptidaustausch kann es aber zu Veränderungen der biologischen Eigenschaften des Trägerproteins gp36,5/m164 kommen. In Lemmermann et al. (2010a) konnte bereits gezeigt werden, dass der Austausch m164₂₅₇₋₂₆₅ → SIINFEKL keinen Einfluss auf die Eigenschaften des Trägerproteins hat und sich der Integrationsort m164₁₅₀₋₁₅₈ für die Expression nicht-viraler bzw. „fremder“ Peptide eignet. Um sicherzustellen, dass der orthotope Peptidaustausch auch in dieser Arbeit die Intaktheit des gp36,5/m164 Proteins nicht beeinträchtigt, wurden MEF mit den generierten Viren infiziert und die intrazelluläre Lokalisation des gp36,5/m164 Proteins geprüft. Die Ergebnisse zeigten, dass das gp36,5/m164 Protein exprimiert wird und in der Zelle an seiner natürlichen Lokalisation, dem ER, nachweisbar ist (siehe Abb. 4.5).

Des Weiteren galt es zu überprüfen, ob sich der orthotope Peptidaustausch negativ auf die virale Replikation auswirkt. Für die beiden generierten mCMV-Rekombinanten konnte gezeigt werden, dass diese im Vergleich zu ihrem Ursprungsvirus (mCMV-Δm157Luc) ein sehr ähnliches Genom-zu-PFU-Verhältnis von etwa 500:1 besitzen (siehe Tab. 4.4). Demzufolge benötigen sie *in vitro* etwa die gleiche Anzahl an viralen Genomen, um ein infektiöses, *Plaque*-bildendes Ereignis zu induzieren. Anhand der Ergebnisse wurde zudem das von Kurz et al. (1997) veröffentlichte Genom-zu-PFU-Verhältnis von 500:1 für mCMV.WT bestätigt.

Außerdem zeigten die *in vivo* Replikationskinetiken in immunsupprimierten C57BL/6 Mäusen, dass beide Rekombinanten in den untersuchten Organen vergleichbar ihrem Ursprungsvirus replizieren (siehe Abb. 4.6).

Induktion eines SIINFEKL-spezifischen CD8 T-Zell *Primings* nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL und nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL

Durch Integration einer Antigen-kodierenden Sequenz in das virale Genom durch orthotopen Peptidaustausch können nicht-virale Peptide von professionellen APC präsentiert und eine epitopspezifische T-Zell-Antwort induziert werden. Um die antigene Integration der SIINFEKL-Sequenz und eine intakte Prozessierung sowie Präsentation des Peptids SIINFEKL nachzuweisen, wurde die *in vivo* Immunogenität des mCMV-SIINFEKL überprüft. Im IFN-γ *ELISpot*-Assay konnten sieben Tage nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL in immunkompetenten C57BL/6 Mäusen SIINFEKL-spezifische CD8 T-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.7). Dies zeigt, dass das im gp36,5/m164 transportierte Peptid prozessiert sowie funktionell präsentiert wird. Die SIINFEKL-Frequenz ordnet sich außerdem in das Frequenzmuster „natürlicher“ mCMV-Spezifitäten (Munks et al., 2006a; b) ein. Nach Infektion mit mCMV-SIINFEKA konnten wie erwartet keine SIINFEKL-spezifischen CD8 T-Zellen, bei gleichzeitigem Nachweis mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen, detektiert werden.

In dieser Arbeit sollten zur Optimierung des AT rekombinante DB als Vakzine eingesetzt werden. Pepperl und Kollegen (2000) haben gezeigt, dass eine Immunisierung von HLA-A2 transgenen Mäusen mit hCMV-DB zur Bildung von neutralisierenden AK und zur Induktion einer spezifischen CD8 T-Zell-Antwort führt. In weiteren *in vivo* Studien mit rekombinanten DB, die ein Fusionsprotein pp65-IE1 beinhalten (DB-IE1), konnte nachgewiesen werden, dass rekombinante DB virale bzw. Fremdpeptide transportieren können, die *in vivo* eine epitopspezifische CD8 T-Zell-Antwort gegen nicht-Strukturproteine induzieren (Mersseman et al., 2008a; b; Becke et al., 2010).

In dieser Arbeit wurden rekombinante DB, die entweder ein pp65-SIINFEKL Fusionsprotein (DB-SIINFEKL) bzw. ein pp65-SIINFEKA Fusionsprotein (DB-SIINFEKA) tragen, verwendet. Nach Fusion der DB-Hülle mit der Zellmembran sollte das Fusionsprotein pp65-SIINFEKL im Zytoplasma prozessiert und das Peptid SIINFEKL über MHC-Klasse-I Moleküle präsentiert werden. Im Gegensatz hierzu kann aus DB-SIINFEKA kein Peptid prozessiert und präsentiert werden. Bevor die DB als Vakzine eingesetzt werden konnten, war es notwendig ihre *in vivo* Immunogenität zu überprüfen. Sieben Tage nach intraplantarer Immunisierung mit DB-SIINFEKL wurden im IFN- γ *ELISpot-Assay* SIINFEKL-spezifische CD8 T-Zellen nachgewiesen (siehe Abb. 4.12). Dies zeigt die erfolgreiche Prozessierung und Präsentation des Peptids SIINFEKL nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL. Wie zu erwarten war, konnte nach Immunisierung mit DB-SIINFEKA kein spezifisches CD8 T-Zell-*Priming* nachgewiesen werden. In einer Titration der DB-SIINFEKL zeigte sich, dass die *Priming*-Frequenz dosisabhängig ist (siehe Abb. 4.13). Das stärkste CD8 T-Zell-*Priming* wurde mit einer Dosis von 15 μ g erreicht. Allerdings lag das Niveau der *Priming*-Frequenzen nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL unterhalb dessen, welches durch eine Infektion mit 1×10^3 - 1×10^5 PFU mCMV-SIINFEKL induziert wurde (siehe Abb. 4.14).

Interessanterweise lagen die *Priming*-Frequenzen, die nach Immunisierung mit 5 μ g DB-SIINFEKL erreicht wurden, mit 0,2% wesentlich höher, als die durch DB-IE1 induzierten *Priming*-Frequenzen IE1-spezifischer CD8 T-Zellen von etwa 0,075% (Becke et al., 2010). Möglicherweise ist trotz identischen Integrationsorts die *Priming*-Effizienzen auch vom Zielpeptid abhängig sind. Ein weiterer Faktor stellt auch die unterschiedliche Applikation der DB dar. Während die in Becke et al. (2010) veröffentlichten Daten auf der intraperitonealen Applikation von DB basieren, wurden die DB-SIINFEKL in der vorliegenden Arbeit intraplantar verabreicht. Eine intraperitoneale Applikation von 6 μ g DB-SIINFEKL konnte gleichfalls lediglich *Priming*-Frequenzen von 0,05% SIINFEKL-spezifischer CD8 T-Zellen induzieren (Becke, unveröffentlichte Daten). Nach intraperitonealer Applikation von DB werden Antigene über MHC-Moleküle auf professionellen APC, wie peritoneale Makrophagen oder DC, präsentiert. Nach intraplantarer Injektion fungieren wahrscheinlich überwiegend die in der Haut befindlichen Langerhanszellen als professionelle APC. Diese

Zellen liegen zunächst inaktiv vor. Nach Antigenkontakt wandern sie in die ableitenden LK, präsentieren Antigen als MHC-Peptid-Komplex Lymphozyten bei zeitgleicher Ausschüttung ko-stimulierender Faktoren (u.a. TNF α und Chemokine) und induzieren damit eine spezifische Immunantwort bzw. verstärken diese (Banchereau und Steinman, 1998; Bousso und Robey, 2003). Möglicherweise ist die Dichte der Langerhanszellen in der Haut im Vergleich zu der Dichte professioneller APC im Peritoneum größer, sodass nach intraplantarer Applikation prozentual mehr professionelle APC Antigen über Cross-Präsentation präsentieren und damit mehr CD8 T-Zellen epitopspezifisch *geprimt* werden können. Dass die epidermalen Langerhanszellen regelmäßig, jedoch in unterschiedlicher Dichte über die gesamte Körperoberfläche verteilt sind, konnte bereits gezeigt werden (Bergstresser et al., 1980). Bei BL/6 Mäusen finden sich beispielsweise unter der Fußsohle 820 Langerhanszellen/cm², dagegen ist die Dichte der Zellen mit 470 Langerhanszellen/cm² in der Ohrhaut und mit 110 Langerhanszellen/cm² am Schwanz deutlich niedriger.

Immunisierung mit DB-SIINFEKL induziert Schutz gegen *Challenge*-Infektion mit mCMV-SIINFEKL

In den *Priming*-Analysen zeigte sowohl die Infektion mit mCMV-SIINFEKL als auch die Immunisierung mit DB-SIINFEKL ein epitopspezifisches CD8 T-Zell-*Priming*. Mit Hilfe eines *Challenge*-Modells sollte nun das protektive Potenzial DB-SIINFEKL *geprimter* CD8 T-Zellen überprüft werden. Nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL und anschließender Hoch-Dosis *Challenge*-Infektion mit mCMV-SIINFEKL konnte in allen untersuchten Organen eine deutliche Reduktion der Viruslast bzw. der Zahl infizierter Zellen beobachtet werden (siehe Abb. 4.26). Die Epitopspezifität dieses Schutzes zeigte sich durch das Fehlen eines Schutzes nach Immunisierung mit DB-SIINFEKA. Im Vergleich zur DB-SIINFEKL-Immunisierung induzierte die Infektion mit 1×10^2 PFU mCMV-SIINFEKL einen stärkeren Schutz gegenüber der *Challenge*-Infektion. Während nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL das Peptid SIINFEKL als einziges, virales Antigen für das T-Zell-*Priming* zur Verfügung steht, werden nach Immunisierung mit mCMV-SIINFEKL eine Vielzahl von mCMV-Epitopen auf professionellen APC präsentiert. Demzufolge ist der nach DB-SIINFEKL-Immunisierung beobachtete Schutz durch SIINFEKL-spezifische CD8 T-Zellen vermittelt, während nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL CD8 T-Zellen mit unterschiedlichen Spezifitäten Schutz gegen mCMV-SIINFEKL und mCMV-SIINFEKA vermitteln können.

Nach *in vivo* Depletion der CD8 T-Zellen konnte kein Schutz beobachtet werden (siehe Abb. 4.29). Dies zeigt, dass der durch die DB-SIINFEKL-Immunisierung induzierte Schutz abhängig von CD8 T-Zellen ist.

Um die Effektivität einer DB-SIINFEKL-Immunisierung einordnen zu können, wurde der durch DB-SIINFEKL induzierte Schutz mit der durch Immunisierung mit OVA bzw. synthetischem SIINFEKL-Peptid erzielten Schutzwirkung verglichen. Nach Immunisierung mit OVA, bei der die vergleichbare Anzahl an SIINFEKL-Molekülen wie bei der DB-SIINFEKL-Immunisierung verabreicht wurde, konnte kein Schutz beobachtet werden (siehe Abb. 4.31). Eine Immunisierung mit synthetischem Peptid, bei der die 1000-fache Menge an SIINFEKL-Molekülen verabreicht wurde, induzierte ebenfalls keine messbare Protektion (siehe Abb. 4.34).

Ein wesentlicher Unterschied zwischen einer Immunisierung mit DB und einer mit Protein bzw. synthetischem Peptid ist, dass die DB-Hülle fusionsaktiv ist und der Inhalt der DB, d.h. die in den DB transportierten Proteine bzw. Peptide, direkt und effektiv ins Zytoplasma der Zielzelle entleert wird. Dagegen müssen extrazelluläre Antigene *via* Endozytose in Zellen aufgenommen werden (Muro et al., 2004). Im Zytosol werden die Antigene proteasomal prozessiert, in den Antigenpräsentationsweg eingebracht und in Assoziation mit MHC-Klasse-I Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert (Rock and Shen, 2005; Raghavan et al., 2008).

Durch Immunisierung mit OVA bzw. synthetischem SIINFEKL-Peptid wurde kein Schutz induziert. Eine Möglichkeit hierfür ist, dass die Menge an aufgenommenem und präsentiertem Antigen unterhalb der für die T-Zell-Aktivierung bzw. das T-Zell-*Priming* benötigten Mindestkonzentration liegt. Eine andere Erklärung für einen fehlenden Schutz nach Immunisierung mit Protein oder Peptid ist, dass die Präsentation von Antigen alleine nicht ausreicht, um CD8 T-Zellen zu *primen*. Wie bereits erwähnt werden zur Stimulation naiver T-Zellen neben präsentiertem Peptid zusätzliche Signale wie ko-stimulatorische Moleküle und Ausschüttung von Zytokinen benötigt (Banchereau und Steinman 1998; Celluzzi und Falo, 1997). Die Endozytose von Proteinen führt alleine nicht zur Induktion dieser Faktoren. Im Gegensatz hierzu sind DB in der Lage die DC zu aktivieren. DB besitzen eine den Virionen ähnelnde Hüllmembran, die virale Glycoproteine wie gB beinhaltet (Varnum et al., 2004). Compton und Kollegen (2003) haben gezeigt, dass UV-inaktivierte Virionen eine Toll-like Rezeptor (TLR)-2-abhängige Antwort auslösen können. Dies deutete darauf hin dass Strukturkomponenten des Virions für die Aktivierung des TLR2 ausreichen. Glycoproteine, wie gB, des hCMV werden von TLR2, vermutlich zusammen mit TLR1, erkannt (Boehme et al., 2006). Dies führt zur *downstream* Aktivierung des *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B) (Yurochko et al., 1997) und damit zur Bildung proinflammatorischer Zytokine (Wang et al., 2005). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von löslichem gB mit Zelloberflächenrezeptoren die Transkription von IFN-stimulierenden Genen herbeiführt (Simmen et al., 2001). Demzufolge

ist es wahrscheinlich, dass DB ebenfalls hierzu in der Lage sind. Um diese Hypothese zu bestätigen könnte das *Priming* von DB in TLR Ko-Mäusen getestet werden.

Die kombinierte Immunisierung mit OVA und DB-SIINFEKA bzw. synthetischem SIINFEKL-Peptid und DB-SIINFEKA induziert einen sichtbaren Schutz (siehe Abb. 4.32; 4.34). Allerdings ist der Schutz nach kombinierter Immunisierung geringer als die Protektion, die nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL erzeugt wurde. Dieser Adjuvanz-Effekt könnte durch die Fusionseigenschaft der DB begründet sein. Möglicherweise wird durch Fusion der DB-Hülle mit der Zellmembran die Endozytose-Aktivität erhöht, sodass extrazelluläre Bestandteile vermehrt in das Zytoplasma der Zellen gelangen. Demzufolge ist die intrazelluläre Konzentration an OVA bzw. an synthetischem SIINFEKL-Peptid erhöht. Die Menge an präsentiertem Antigen liegt nun oberhalb der Sensitivitätsgrenze, d.h. über der zur T-Zell-Aktivierung bzw. zum T-Zell-*Priming* benötigten Mindestkonzentration. Ein entscheidender Faktor ist jedoch die Aktivierung der DCs durch Glykoproteine der DB-Hülle und damit die Bildung ko-stimulatorischer Signale, die für die Aktivierung und das *Priming* von T-Zellen essentiell sind.

Vergleich der funktionellen Avidität von OT-I Zellen mit der von SIINFEKL-spezifischen CTL

Ein Ziel dieser Arbeit war die Evaluierung einer Kombinationstherapie aus AT einer limitierten Anzahl an SIINFEKL-spezifischen CD8 T-Zellen und deren *in vivo* Proliferation durch therapeutische Vakzinierung mit DB-SIINFEKL. Für den AT wurden CD8 T-Zellen der OT-I Maus verwendet. Diese Zellen exprimieren einen transgenen SIINFEKL-spezifischen TCR (Hoquist et al., 1994) und können damit eine monoklonale CTLL ersetzen. Bevor diese T-Zellen für die Transferversuche verwendet wurden, sollte ihre funktionelle Avidität untersucht werden. Die Avidität ist das Produkt aus der Affinität eines Rezeptors und der Anzahl der beteiligten Bindungen und wird somit durch Änderung der Affinität sowie durch Änderung der Anzahl der Bindungen beeinflusst (Kedl et al., 2003; Stone et al., 2009). Die Avidität der T-Zellen wird über die Funktionalität der Zellen definiert und wird daher als funktionelle Avidität bezeichnet. Während in geringer Zahl präsentiertes Peptid nur von CD8 T-Zellen mit hoher funktioneller Avidität erkannt wird, können in großer Menge präsentierte Peptide auch von CD8 T-Zellen mit niedrigerer Avidität erkannt werden (Alexander-Miller et al., 1996; 2005). Die für die T-Zell-Aktivierung benötigte Antigenmenge stellt daher ein Maß für die Avidität der Interaktion dar.

Im IFN- γ *ELISpot*-Assay wurde die funktionelle Avidität *ex vivo* isolierter OT-I Zellen mit der einer CTLL-SIINFEKL und *ex vivo* isolierten CD8 T-Zellen verglichen. Hinsichtlich der Aviditätenverteilungen lag die Grenzavidität der OT-I Zellen für SIINFEKL bei 10^{-10} M (siehe

Abb. 4.9) und war damit mit der von *in vivo* geprimten SIINFEKL-spezifischen CD8 T-Zellen (siehe Abb. 4.8) vergleichbar. Dem gegenüber lag die Grenzavidität der CTLL-SIINFEKL bei 10^{-11} M (siehe Abb. 4.11), d.h. die CTLL war lediglich eine log-Stufe sensitiver als die OT-I Zellen.

Eine weitere Beobachtung in den Aviditätsstudien betraf die unterschiedliche SIINFEKL-spezifische Aktivierung der getesteten CTL. Während 100% der CTL-SIINFEKL aktiviert wurden, zeigten die OT-I Zellen lediglich einen Aktivierungslevel von 30%. Dieses stand im Gegensatz zu unseren Erwartungen, da die OT-I Zellen einen transgenen SIINFEKL-spezifischen TCR besitzen und sich hierdurch wie eine monoklonale CTLL verhalten sollten. Ein wesentlicher Unterschied beider CTL ist, dass die OT-I Zellen ohne vorangegangenen Stimulus im IFN- γ *ELISpot-Assay* eingesetzt wurden, während die CTL-SIINFEKL *in vitro* mit Peptid stimuliert wurden. Sie sind daher bei erneutem Antigenkontakt besser aktivierbar.

Im Gegensatz zu OT-I Zellen und CTL-SIINFEKL, die SIINFEKL-spezifische TCR besitzen, besteht die Gesamtheit der CD8 T-Zellen nach mCMV-SIINFEKL-Infektion aus T-Zellen mit unterschiedlichen Spezifitäten. Daher ist es nicht verwunderlich, dass lediglich 0,7% aller CD8 T-Zellen SIINFEKL-spezifisch waren. Dieser Wert stimmt mit denen in Abb. 4.7 gezeigten und mit bereits veröffentlichten Daten überein (Lemmermann et al., 2010a).

In den Aviditätsstudien konnte zusätzlich gezeigt werden, dass OT-I Zellen auch durch exogen mit SIINFEKA-Peptid beladene APC aktivierbar sind (siehe Abb. 4.9). Im Vergleich zum SIINFEKL wurde lediglich eine um etwa zwei log-Stufen erniedrigte Avidität der OT-I Zellen gegenüber dem Peptid SIINFEKA festgestellt. Im Gegensatz hierzu zeigten vorangegangene Aviditätsstudien mit dem IE1-Peptid (YPHFMPNTL), dass durch die Substitution des Leucin mit Alanin die Sensitivität IE1-spezifischer CTL gegenüber dem IE1_{L→A}-Peptid im Vergleich zum IE1-Peptid um etwa fünf log-Stufen, d.h. von 10^{-11} M auf 10^{-6} M erniedrigt ist (Simon et al., 2006). Ein wesentlicher Unterschied zwischen dem IE1_{L→A}-Peptid und dem Peptid SIINFEKA ist, dass die Peptide über verschiedene MHC-Klasse-I Moleküle präsentiert werden. Während das IE1_{L→A}-Peptid an das H-2L^d Molekül bindet, wird das Peptid SIINFEKA über das H-2K^b Molekül präsentiert. Zudem erfolgt die Bindung des IE1-Peptids an das H-2L^d Molekül über zwei Bindestellen (Reddehase et al., 1991b), dagegen wird das Peptid SIINFEKL über drei Bindestellen an das H-2K^b Molekül gebunden (Jameson und Bevan, 1992). Dieses könnte die Bindung des Peptids SIINFEKA an das MHC-Molekül stabilisieren.

Zusätzlich ist die Reduktion der Peptiderkennung auch von der Verteilung der funktionellen Aviditäten in der verwendeten CD8 T-Zell-Population abhängig. So konnte für das IE1_{L→A}-Peptid gezeigt werden, dass hochavide Effektoren durch in geringer Menge präsentiertes Peptid aktiviert werden, während niederavide inaktiv bleiben (Simon et al., 2006). Die Tatsache, dass es sich bei OT-I Zellen um hochavide CD8 T-Zellen handelt könnte daher

eine weitere Erklärung für den geringen Unterschied zwischen der Avidität gegenüber dem Peptid SIINFEKL und dem Peptid SIINFEKA sein. Für die *in vivo* Versuche ist dies jedoch nicht von Bedeutung, da die endogene Prozessierung des Peptids SIINFEKA durch Deletion der proteasomalen Schnittstelle verhindert wird (Lemmerman et al., 2010a).

SIINFEKL-spezifische *in vivo* Proliferation adoptiv transferierter OT-I Zellen nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL und Vakzinierung mit DB-SIINFEKL

Wie zuvor beschrieben, werden sowohl nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL als auch nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL SIINFEKL-spezifische CD8 T-Zellen *geprint*. Die Frage, ob transferierte OT-I Zellen *in vivo* nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL bzw. nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL proliferieren, konnte im CFSE-Proliferations-Assay geklärt werden.

Diese Methode basiert auf der effektiven und für längere Zeit stabilen Markierung von Zellen mit CFSE und kann zur Verfolgung der *in vitro* und der *in vivo* Proliferation von Lymphozyten verwendet werden (Lyons et al., 1994; Parish et al., 2009; Quad et al., 2007; 2010).

Für den Proliferations-Assay wurden immunkompetenten C57BL/6 Mäusen CFSE-markierte Milzzellen der OT-I Maus i.v. transferiert und 24h später die Versuchstiere mit DB immunisiert oder mCMV-SIINFEKL infiziert. Die OT-I Zellen waren 24h nach Infektion im LK nachweisbar (siehe Abb. 4.16; 4.20). Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich im LK sowie in der Milz (siehe Abb. 4.18) keine Proliferation. Das „*Homing*“ der transferierten Zellen in die LK der Rezipienten erfolgte in unbehandelten Rezipienten auch ohne vorherige Konditionierung. *Homing* bezeichnet die Rückkehr immunkompetenter Lymphozyten über die Lymphbahnen in die Lymphknoten bzw. über die Blutbahn in die Milz, nachdem sie alle Gewebe durchstreift haben, um Antigene aufzuspüren. Das *Homing* erfolgt Wechselwirkung von Zellanhänsionsmolekülen auf den Lymphozyten, den sog. *Homing*-Rezeptoren und solchen auf dem Endothel. Naive T-Zellen exprimieren L-Selektin, aktivierte Effektor- und Memory-T-Zellen dagegen E- und P-Selektin-Liganden sowie Integrine.

Nach 48h waren im LK vier Zellteilungen zu beobachten (siehe Abb. 4.16; 4.20). Im Vergleich zur Milz wird im drainierenden (poplitealen) LK der Infektionsseite die Proliferation der OT-I Zellen nach Immunisierung mit DB-SIINFEKL bzw. nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL bereits etwa 10h früher sichtbar. Da die CD8 T-Zellen im ableitenden LK aktiviert werden und erst anschließend in die Peripherie wandern, erklärt dies die zeitliche Diskrepanz der Proliferation. Im Gegensatz zu veröffentlichten Daten, die zeigten, dass nach Stimulation der Rezipienten mit HEL-OVA *in vivo* ein Teilungszyklus von transferierten OT-I Zellen etwa 16h dauert (Quah und Parish, 2012), konnte in beiden Organen eine Dauer von etwa 5h für einen Teilungszyklus beobachtet werden. Es ist bekannt, dass die Stärke der

Stimulierung die Dauer der Teilung beeinflussen kann (Hasbold et al., 1999; Quah und Parish, 2012). In einer Kinetik konnte festgestellt werden, dass die Proliferation nach DB-SIINFEKL-Immunisierung in beiden Organen vergleichbar mit der nach mCMV-SIINFEKL-Infektion ist, demnach scheint die Intensität der Stimulation von T-Zellen nach Infektion und DB-Immunisierung gleich zu sein.

In der Kontrollgruppe, bei der den Versuchstieren ausschließlich markierte Zellen appliziert wurden, wurde keine Proliferation detektiert d.h. der Transfer führt zu keiner Expansion der OT-I Zellen. Die epitopspezifische Induktion der Proliferation konnte durch Immunisierung mit mCMV-SIINFEKA bzw. DB-SIINFEKA bestätigt werden. Nach Infektion mit mCMV-SIINFEKA war zwar eine Proliferation nachweisbar, diese setzte aber deutlich später ein als nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL. Diese zeitversetzte, unspezifische Proliferation wird vermutlich durch andere Parameter wie beispielsweise ein durch die Infektion verändertes Zytokin-Milieu induziert. Aktivierte CD8 T-Zellen synthetisieren eine Vielzahl an Proteinen, die für ihre Differenzierung und Proliferation benötigt werden. So wird beispielsweise nach Aktivierung die Bildung von IL-2 erhöht und die Expression des hochaffinen IL-2-Rezeptors verstärkt (Malek, 2008). Die Interaktion von IL-2 mit dem IL-2-Rezeptor verstärkt die Proliferation und fördert die Differenzierung der T-Zellen. D'Souza und Kollegen (2003) haben gezeigt, dass zwar die frühe Proliferationsphase antigenspezifischer CD8 T-Zellen nach *Priming* mit entsprechendem Antigen IL-2 unabhängig, jedoch die späte Phase der Zellteilung IL-2 abhängig ist. Demzufolge könnte die zeitversetzte, unspezifische Proliferation der adoptiv transferierten OT-I Zellen nach Infektion mit mCMV-SIINFEKA durch sezerniertes IL-2 induziert werden. Dieses Ergebnis belegt den Wert der „SIINFEKA-Kontrolle“, die mit Ausnahme der Expression des Epitops alle Parameter der Infektion in das System einbringt. Im Gegensatz zur Infektion mit mCMV-SIINFEKA führte eine Immunisierung mit DB-SIINFEKA zu keiner Proliferation.

In dieser Arbeit konnte so erstmals der Beweis erbracht werden, dass eine Immunisierung mit DB-SIINFEKL zur Aktivierung von adoptiv transferierten OT-I Zellen führt.

Protektive Wirkung adoptiv transferierter OT-I Zellen

Wie bereits gezeigt, induzieren mCMV-SIINFEKL als auch DB-SIINFEKL die epitopspezifische Aktivierung und Expansion adoptiv transferierter OT-I Zellen. Um das antivirale, protektive Potenzial der OT-I Zellen zu beurteilen, wurde nun die Effizienz des Schutzes der OT-I Zellen mit der einer CTLL-SIINFEKL sowie mit einer mCMV-spezifischen CTLL verglichen. Hierfür wurden immunsupprimierten C57BL/6 Mäusen titrierte Zellzahlen an CD8 T-Zellen injiziert und die Rezipienten anschließend infiziert. Die adoptiv

transferierten OT-I Zellen reduzierten in allen untersuchten Organen die Infektion mit mCMV-SIINFEKL (siehe Abb. 4.23).

Wie bereits gezeigt werden konnte, spielen antivirale CD8 T-Zellen während der Kontrolle der akuten mCMV-Infektion eine entscheidende Rolle. Sie sind zudem für die langfristige Kontrolle der Infektion sowie für die Terminierung der produktiven Infektion verantwortlich (Reddehase, 2002; Holtappels, 2006; 2008). Die protektive Wirkung adoptiv transferierter CD8 T-Zellen gegen eine mCMV-Infektion konnte sowohl nach präventivem als auch therapeutischem AT im BALB/c-Modell gezeigt werden (Reddehase, 1985; Pahl-Seibert et al., 2005). Wie erwartet konnten adoptiv transferierte OT-I Zellen der Infektion mit mCMV-SIINFEKA nicht entgegenwirken. Dieses Ergebnis bestätigt die epitopspezifische Protektion der OT-I Zellen.

In allen untersuchten Organen konnten die CTLL-SIINFEKL und die CTLL-m139 ähnlich wie OT-I Zellen die Infektion mit mCMV-SIINFEKL kontrollieren (siehe Abb. 4.24). Dabei zeigten beide CTLL ein vergleichbares, protektives Potenzial. Während mit steigender Zahl transferierter CTL die Intensität des Schutzes stetig zunahm, konnten bereits 1×10^2 OT-I Zellen einen deutlichen Schutz induzieren, der durch weitere Erhöhung der Transferzahl nur geringfügig verbessert werden konnte und ein Plateau erreichte.

Dieser Unterschied lässt sich anhand der verschiedenen Aviditäten der CTL erklären. OT-I Zellen exprimieren einen transgenen SIINFEKL-spezifischen TCR der eine bestimmte Affinität besitzt (Hoquist et al., 1994) und verhalten sich daher wie eine monoklonale CTLL. Wie bereits gezeigt, liegt die Grenzavidität der OT-I Zellen gegenüber dem Peptid SIINFEKL bei 10^{-10} M (siehe Abb. 4.9). Jedoch scheint die Avidität dieser CD8 T-Zellen nicht ausreichend zu sein, gering präsentiertes Peptid zu erkennen, sodass trotz erhöhter Transferzahl eine geringe Restinfektiosität detektiert werden kann. Im Gegensatz hierzu ist die CTLL-SIINFEKL polyklonal. Die Zellen besitzen ein breites Spektrum an SIINFEKL-spezifischen TCR mit unterschiedlichen Aviditäten. Durch Erhöhung der Zellzahlen werden mehr CTL mit hoher Avidität transferiert, die in der Lage sind gering präsentiertes SIINFEKL-Peptid zu erkennen. Die Varianz der TCR sowie die Tatsache, dass die CTLL-SIINFEKL um eine log-Stufe avider gegenüber dem Peptid SIINFEKL ist, ermöglicht bei hohen Transferzahlen die Reduktion der Viruslast unter das Detektionslimit des Assay (siehe Abb. 4.11).

Das die Avidität der adoptiv transferierten CTL ausschlaggebend für die Intensität des vermittelten Schutzes ist wird durch Arbeiten unserer Arbeitsgruppe bestätigt (Ebert et al., 2012). Im AT-Modell konnte in allen getesteten Organen eine deutlich stärkere Protektion nach Transfer von hoch-aviden CTL nachgewiesen werden als nach AT nieder-aviden CTL. Die Tatsache, dass bereits geringe Anzahlen an transferierten OT-I Zellen einen deutlichen Schutz vermittelten, weist darauf hin, dass sie ein hohes protektives Potenzial besitzen.

Allerdings besitzen sie eine um etwa 10-fach niedrigere Avidität als eine generierte SIINFEKL-spezifische CTLL. Demnach scheint für den hohen Schutz bei geringer Transferzahl an OT-I Zellen die Avidität nicht ausschlaggebend zu sein. Die Intensität des Schutzes ist zwar von der Avidität der adoptiv transferierten CD8 T-Zellen abhängig, jedoch scheint der Reifungs- sowie der Aktivierungs-Zustand der CD8 T-Zellen für das protektive Potenzial eine übergeordnete Rolle zu spielen (Ebert et al., 2012). Pahl-Seibert und Kollegen (2005) zeigten, dass bereits geringe Anzahlen an transferierten *ex vivo* sortierten IE1-spezifischen CD8 T-Zellen einen deutlichen Schutz vermitteln. Dagegen schützt eine Kurzzeit-CTLL erst nach Transfer hoher Zellzahlen und weist eine breite Verteilung von CD8 und TCR Expression auf. Unter den CTL der Kurzzeit-CTLL sind zwei Aktivierungszustände primär vertreten. Der Phänotyp $\text{KLRG1}^{\text{low}}\text{CD127}^{\text{high}}\text{CD62L}^{\text{low}}$, der dem Phänotyp der T_{EM} (*effector-memory cells*) ähnelt (Obar et al., 2010c; d), und der $\text{KLRG1}^{\text{high}}\text{CD127}^{\text{high}}\text{CD62L}^{\text{low}}$ Phänotyp, für den es *in vivo* kein entsprechendes Gegenstück gibt, da sie sich durch die Expression des CD127 von den SLEC und durch $\text{KLRG}^{\text{high}}$ und $\text{CD127}^{\text{high}}$ von den EEC (*early effector cells*) unterscheiden (Obar et al., 2010c; d). Da sich generierte CTLL in ihrem Phänotyp von *in vivo* vorkommenden CTL unterscheiden, ist es fraglich ob eine CTLL für den adoptiven Transfer bzw. die Immuntherapie optimal eignet ist (Ebert et al., 2010).

OT-I Zellen unterschieden sich hinsichtlich ihres Phänotyps von einer CTLL. Während die Mehrheit der OT-I Zellen die Aktivierungsmarker von T_{CM} tragen, sind ein Hauptbestandteil der *in vivo* kultivierten CTLL Zellen, die den Phänotyp von T_{EM} besitzen.

Der Phänotyp der T_{CM} (*central-memory cells*) $\text{CD44}^{\text{high}}\text{KLRG1}^{\text{low}}\text{CD127}^{\text{high}}\text{CD62L}^{\text{high}}$ scheint für die Protektion eine entscheidende Rolle zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass aufgereinigte IE1-spezifische *ex vivo* sortierte *memory* CD8 T-Zellen, die primär aus T_{EM} und T_{CM} bestehen, um etwa 100-fach effektiver schützten, als eine IE1-spezifische Kurzzeit-CTLL (Böhm et al., 2008; Holtappels et al., 2008, Pahl-Seibert et al., 2005). Dies zeigt, dass trotz des gleichen Ursprungs (*Memory* T-Zellen) die Intensität der Schutzwirkung unterschiedlich ist. Bereits drei Runden der *in vitro* Restimulierung reduzierten das protektive Potenzial der generierten CTLL, wobei die Polyklonalität sowie die Expression des CD8 Ko-Rezeptors unverändert blieb (Pahl-Seibert et al., 2005).

Die Intensität des Schutzes ist zwar von der Avidität der transferierten Zellen abhängig, da jedoch gezeigt werden konnte, dass die Avidität der *ex vivo* sortierten IE1-spezifischen CD8 T-Zellen eine 10-fach niedrigere funktionelle Avidität als eine generierte IE1-spezifische CTLL besitzen, aber eine 100-fach höhere Schutzeffizienz aufweisen (Pahl-Seibert et al., 2005), scheint der Phänotyp der transferierten CTL für die Effizienz des Schutzes eine übergeordnete Rolle zu spielen.

Da sich OT-I Zellen und *ex vivo* sortierte mCMV-spezifischen CD8 T-Zellen in ihrem protektiven Potenzial sowie ihrem Phänotyp ähneln, eignen sich OT-I Zellen, im Gegensatz zu einer generierten CTLL, als Modell für immuntherapeutische Ansätze.

Verstärkung der protektiven Wirkung adoptiv transferierter OT-I Zellen durch zusätzliche Vakzinierung mit DB-SIINFEKL

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen wurde nun die mögliche Verbesserung des Schutzes im immunsupprimierten Rezipienten durch Kombination von OT-I Transfer und DB-SIINFEKL-Immunsierung untersucht. Den Rezipienten wurden OT-I Zellen adoptiv transferiert und einen Tag später erfolgte die Infektion mit zeitgleicher Vakzinierung. Wie erwartet führte der Transfer von OT-I Zellen ohne Vakzinierung zur Reduktion des Virustiters in allen untersuchten Organen (siehe Abb. 4.36-A). Die zusätzliche Vakzinierung verbesserte das protektive Potenzial der OT-I Zellen um den Faktor 5. Die Verbesserung des Schutzes war nach Transfer von 1×10^3 Zellen in allen Organen signifikant.

Eine Erklärung für die verstärkte Protektion nach zusätzlicher Vakzinierung ist, dass nach Vakzinierung möglicherweise insgesamt mehr SIINFEKL-präsentierende Zellen bzw. mehr präsentiertes Antigen für die T-Zell-Aktivierung und für die folgende *in vivo* Expansion bereit stehen.

Im Vergleich zu den OT-I Zellen konnte durch Vakzinierung mit DB-SIINFEKL die protektive Wirkung der CTLL-SIINFEKL um einen Faktor 2 verbessert werden (siehe Abb. 4.36-B). Damit konnte mit OT-I Zellen nach Vakzinierung ein stärkerer Schutz erzielt werden als mit einer CTLL-SIINFEKL. Dies ist jedoch nicht verwunderlich, da die AT-Ergebnisse bereits zeigten, dass die verwendeten Transferzahlen an CTL-SIINFEKL nicht den Schutz erzielten wie entsprechende Zellzahlen an OT-I Zellen. Bei geringer Transferzahl ist der prozentuale Anteil hochavidier CTL sehr gering, sodass trotz zusätzlicher Vakzinierung und damit verstärktem Vorhandensein SIINFEKL-präsentierender Zellen nicht mehr CTL aktiviert werden als ohne Vakzinierung. Demzufolge reicht die verwendete Zahl an CTL-SIINFEKL nicht aus, um zum einen ohne Vakzinierung einen stärkeren Schutz zu erzielen und zum anderen eine erhöhte Schutzwirkung nach Vakzinierung aufzuzeigen. Der Einsatz höherer Zellzahlen könnte daher den Unterschied verstärken.

Anhand der Daten konnte erstmals gezeigt werden, dass eine Kombination aus AT und Vakzinierung die *in vivo* Expansion fördert, damit die protektive Wirkung der adoptiv transferierten OT-I Zellen verstärkt und somit die Reduktion der Anzahl transferierter, protektiver CD8 T-Zellen ermöglicht.

Verbesserung der adoptiven Immuntherapie durch Vakzinierung mit DB-SIINFEKL nach KMT

Ein Ziel dieser Arbeit war die präklinische Entwicklung eines Mausmodells zur Verbesserung der adoptiven Immuntherapie nach experimenteller KMT. Zusätzlich zur KMT sollte ein AT von antiviralen CD8 T-Zellen mit einer therapeutischen DB-Vakzinierung kombiniert werden. Für die Kombinationstherapie wurde eine Kombination aus *ex vivo* isolierten OT-I Zellen und T-Zell depletiertem KM in Rezipienten injiziert. Durch die T-Zell-Depletion konnte sichergestellt werden, dass der frühe Schutz nur durch adoptiv transferierte OT-I Zellen induziert wird. Im Anschluß an die KMT wurden die Rezipienten infiziert und mit rekombinanten DB immunisiert.

Wie zu erwarten war wurde auch in den Tieren, die nur KMZ erhielten, die mCMV-Infektion kontrolliert. In einem syngenen HSCT-Modell (Ebert et al., 2012; Holtappels et al., 1998; 2008; 2013; Podlech et al., 1998, 2000) konnte gezeigt werden, dass die endogene Rekonstitution der CD8 T-Zellen die akute Infektion terminiert. Im Vergleich der untersuchten Organe zeigte sich eine zeitliche Diskrepanz in der Kontrolle der Infektion. Während die Kontrolle in der Leber schnell erfolgte, so dass bereits vier Wochen *post* KMT in der Mehrzahl der Versuchstiere die Viruslast unter dem Detektionslimit lag, benötigte die Kontrolle der Infektion in der Milz und der Lunge sechs Wochen und in der Speicheldrüse sogar acht.

Wie erwartet reduzierten bereits 1×10^2 adoptiv transferierte OT-I Zellen auch im Modell der experimentellen KMT den Virustiter in allen untersuchten Organen (siehe Abb. 4.41). Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte in Milz und Lunge zwei Wochen nach KMT und AT eine Reduktion der Viruslast um etwa 0,5 log-Stufen festgestellt werden. Ein wesentlicher Unterschied zwischen KMT und adoptiver Immuntherapie ist, dass bei der experimentellen KMT neben HSC unreife Vorläuferzellen transferiert werden. Nach dem Transfer wandern die unreifen Vorläuferzellen im Rezipienten zunächst in das KM ein, anschließend reifen sie im Thymus aus und erst nach dem Einwandern in die lymphatischen Organe werden sie im infizierten Rezipienten *geprimt*. Dagegen werden im System der adoptiven Immuntherapie zusätzlich *geprimte Memory* CD8 T-Zellen in hämatoablativ behandelte Rezipienten transferiert, die direkt nach Transfer und somit während der Rekonstitutionsphase des KM der mCMV-Infektion entgegenwirken können. Demnach ist es nicht verwunderlich, dass eine adoptive Immuntherapie den Schutz nach KMT verbessert.

Der durch die transferierten OT-I Zellen erzielte Schutz bestätigte die in Steffens et al. (1998) veröffentlichten Daten im BALB/c-Modell, die zeigten, dass eine Kombination aus endogener Rekonstitution durch HSCT und AT mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen die Kontrolle der mCMV-Infektion verbessert. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass nach allogener HSCT Patienten mit akuter Adenovirusinfektion, oder bei denen die Infektion durch

Immunsuppression reaktivierte, durch AT virusspezifischer T-Zellen erfolgreich therapiert werden konnten. Dabei konnte eine Korrelation zwischen Transferzahl und Viruskontrolle festgestellt werden (Feuchtinger et al., 2006).

Wie zuvor gezeigt, wird *in vivo* die Proliferation transferierter OT-I Zellen nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL induziert. So ist anzunehmen, dass die transferierten OT-I Zellen nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL im HSCT-Rezipienten aktiviert werden und proliferieren. Diese Annahme wird durch die veröffentlichten Daten von Feuchtinger und Kollegen (2006) unterstützt, die zeigten, dass im infizierten Patienten nach allogener HSCT adoptiv transferierte adenoviruspezifische T-Zellen proliferieren (Feuchtinger et al., 2006).

Neben der protektiven Wirkung adoptiv transferierter CD8 T-Zellen nach AT oder experimenteller KMT (Reddehase, 1985; Pahl-Seibert et al., 2005; Böhm et al., 2008) konnte zudem im immunsupprimierten Rezipienten nach Infektion und Rekonstitution der CD8 T-Zell-Antwort durch AT bzw. KMT der Einfluss von Immunevasionsproteinen auf die Kontrolle der mCMV-Infektion nachgewiesen werden (Böhm et al. 2008). Der deutliche Schutz der durch Transfer der OT-I Zellen erzielt wurde zeigt, dass trotz Immunevasion das Peptid SIINFEKL erfolgreich präsentiert wurde und folglich die infizierten Zellen von den CD8 T-Zellen erkannt und lysiert werden konnten.

Die zusätzliche Vakzinierung der HSCT-Rezipienten mit DB-SIINFEKL konnte den Schutz in den untersuchten Organen signifikant verbessern. Wie gezeigt, wird die *in vivo* Proliferation transferierter OT-I Zellen nach Vakzinierung mit DB-SIINFEKL und nach Infektion mit mCMV-SIINFEKL angeregt. Die Proliferation wird somit durch zwei Faktoren, Infektion und Vakzinierung, induziert. Durch die zusätzliche Vakzinierung mit DB-SIINFEKL stehen prozentual mehr SIINFEKL-präsentierende Zellen bereit. Infolgedessen wird die Proliferation bzw. die klonale Expansion der transferierten, antiviralen T-Zellen verstärkt und damit die Kontrolle der mCMV-Infektion signifikant verbessert. Eine Vakzinierung mit DB-SIINFEKA konnte den durch die transferierten OT-I Zellen erzielten Schutz nicht erhöhen.

Die Ergebnisse der Kombinationstherapie bestätigen die im AT-Modell gewonnene Erkenntnis, dass durch Vakzinierung mit DB der Schutz durch T-Zellen signifikant verbessert werden kann.

Mit Hilfe titrierter Zahlen an OT-I Zellen konnte die Effizienz der Kombinationstherapie eingeordnet werden. Die Kombination aus Zelltransfer und Vakzinierung mit DB-SIINFEKL erreichte in Milz und Lunge einen stärkeren Schutz als ein AT mit 10^2 oder 10^3 T-Zellen (Abb. 4.42). Damit verstärkt die zusätzliche Vakzinierung das protektive Potenzial der transferierten Zellen um das etwa 100-fache.

Es konnte somit im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine zusätzliche Vakzinierung des HSCT-Rezipienten mit DB die Reduktion der Anzahl der für den Schutz

benötigten Zellen ermöglicht und somit die Effizienz der adoptiven Immuntherapie deutlich erhöht.

Fazit/Ausblick

In dieser Arbeit konnte erstmals eine präklinische Kombinationstherapie bestehend aus AT und therapeutischer Vakzinierung des HSCT-Rezipienten im Mausmodell getestet werden. In diesem gelang es nachzuweisen, dass eine therapeutische DB-Vakzinierung des HSCT-Rezipienten den Schutz eines AT gegen eine mCMV-Infektion verstärkt. Diese Verbesserung kann die Reduktion der für den Schutz benötigten Anzahl an antiviralen CD8 T-Zellen ermöglichen und damit die Effektivität der adoptiven Immuntherapie verbessern.

Zur Testung der protektiven Wirkung dieser Kombinationstherapie wurde ein murines Modell auf der Grundlage von rekombinanten mCMV etabliert, die das Modellantigen SIINFEKL bzw. das nicht-antigene Peptid SIINFEKA anstelle des Peptids m164₂₅₇₋₂₆₅ exprimieren. Nach Infektion von immunkompetenten C57BL/6 Mäusen mit mCMV-SIINFEKL wird eine epitopspezifische Immunantwort induziert, die vergleichbar mit der eines „natürlichen“ mCMV-Peptids ist. Parallel hierzu konnte erstmals gezeigt werden, dass rekombinante DB-SIINFEKL *in vivo* ein epitopspezifisches CD8 T-Zell-*Priming* induzieren und diese *geprimten* T-Zellen gegen eine mCMV-SIINFEKL-Infektion schützen. Zudem konnte im Proliferations-Assay eine durch DB-Immunsierung induzierte *in vivo* Proliferation adoptiv transferierter T-Zellen nachgewiesen werden. In dieser Arbeit konnte außerdem zum ersten Mal gezeigt werden, dass nach AT eine zusätzliche Vakzinierung mit DB den Schutz gegen eine mCMV-Infektion deutlich verbessert. Dies wurde ebenfalls für das Modell der experimentellen KMT bestätigt.

Die erhöhte Protektion gegen eine mCMV-Infektion nach zusätzlicher Vakzinierung des HSCT-Rezipienten ist wahrscheinlich durch die verstärkte, Expansion der transferierten, antiviralen CD8 T-Zellen bedingt. In weiteren Experimenten der Kombinationstherapie könnte daher zum einen der Einfluss einer Vakzinierung auf die *in vivo* Proliferation adoptiv transferierter T-Zellen und zum anderen die Etablierung eines nachhaltigen und möglicherweise verbesserten immunologischen *Memory* überprüft werden. Die Frequenz SIINFEKL-spezifischer CD8 T-Zellen in den HSCT-Rezipienten könnte zytofluorometrisch mittels K^b-SIINFEKL-Dextrameren im Zeitverlauf beobachtet und die Funktionalität der T-Zellen zytofluorometrisch und parallel im IFN- γ -*ELISpot*-Assay abgefragt werden.

Im Modell der experimentellen KMT konnte nach adoptiver Immuntherapie und nach zusätzlicher Vakzinierung ein deutlicher Schutz nachgewiesen werden. Im Reaktivierungs-Assay könnte weiterhin überprüft werden, ob der verbesserte Schutz nach Kombinations-

therapie mit einer effizienteren Auslöschung infizierter Zellen, somit mit einer Reduktion der viralen Genome-Last, und einer Verringerung der Reaktivierungs-Ereignisse korreliert.

Im Modell der Kombinationstherapie können die klonalen Nachkommen der adoptiv transferierten OT-I Zellen anhand der Expression des $V\alpha 2/V\beta 5$ TCR von den endogen, rekonstituierten CD8 T-Zellen unterschieden werden. Bei der zytofluorometrischen Quantifizierung muss jedoch beachtet werden, dass ein Anteil der endogen T-Zellen ebenfalls $V\alpha 2/V\beta 5$ TCR positiv sind. Um eine eindeutige Unterscheidung zu gewährleisten können CD8 T-Zellen der OT-IxThy1.1 (CD90.1) in C57BL/6 (Thy1.2/CD90.2) Rezipienten adoptiv transferiert werden.

Wie gezeigt werden konnte ähneln sich OT-I Zellen und *ex vivo* sortierte mCMV-spezifische CD8 T-Zellen in ihrem protektiven Potenzial sowie Phänotyp. Um der klinischen Immuntherapie näher zu kommen, könnten in weiteren Ansätzen der Kombinationstherapie anstelle von OT-I Zellen *ex vivo* sortierte SIINFEKL-spezifische CD8 T-Zellen adoptiv transferiert werden.

Die in dieser Arbeit generierten mCMV-Rekombinanten ermöglichen die Anwendung der SIINFEKL-basierenden Techniken im mCMV-Modell. Durch Deletion des *m157* Gens im mCMV-Genom ist die C57BL/6 Maus wie die BALB/c Maus suszeptibel gegenüber der mCMV-Infektion. Die im BALB/c-Modell etablierten Verfahren sowie die gewonnenen Erkenntnisse lassen sich somit besser auf das C57BL/6-Modell übertragen.

Weiterhin könnten die mCMV-Rekombinanten zur Untersuchung von T-Zell-Proliferation während der Latenz bzw. der Reaktivierung des latenten Virus dienen. Während der Latenz werden Antigene durch stetige *low-level*-Reaktivierungen über MHC-Moleküle präsentiert und führen zur Aktivierung und Proliferation von antigenspezifischen CD8 T-Zellen. Diese induzierte Proliferation wird als *memory inflation* bezeichnet. Zum Nachweis einer Präsentation des Peptids SIINFEKL können CFSE-markierte OT-I Zellen während der Latenz in mCMV-SIINFEKL infizierte C57BL/6 Mäuse adoptiv transferiert und die Induktion einer *in vivo* Proliferation zytofluorometrisch beobachtet werden.

Literaturverzeichnis

Adler, H., M. Messerle, and U. H. Koszinowski. 2001. Virus reconstituted from infectious bacterial artificial chromosome (BAC)-cloned murine gammaherpesvirus 68 acquires wildtype properties in vivo only after excision of BAC vector sequences. *J. Virol.* **75**:5692-5696.

Alexander-Miller, M. A., G. R. Leggatt, and J. A. Berzofsky. 1996. Selective expansion of high- or low-avidity cytotoxic lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:4102-4107.

Alexander-Miller, M. A. 2005. High-avidity CD8+ T cells: optimal soldiers in the war against viruses and tumors. *Immunol. Res.* **31**:13-24.

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, K. P., M. C. Fox, V. Brown-Driver, M. J. Martin, and R. F. Azad. 1996. Inhibition of human cytomegalovirus immediate-early gene expression by an antisense oligonucleotide complementary to immediate-early RNA. In: *Antimicrob. Agents. Chemother.* Bd. 40, S. 2004-2011.

Arase, H., E. S. Mocarski, A. E. Campbell, A. B. Hill, L. L. Lanier. 2002. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* **296**:1323-1326.

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.

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.

Banchereau, J., und R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* **392**:245-252.

Bantug, G. R., 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., M. A. Johnson, and G. Janossy. 2000. Cytopathology or immunopathology? The puzzle of cytomegalovirus pneumonitis revisited. *Bone Marrow Transplant.* **26**:591-597.

- Basta, S., and A. Alatery.** 2007. The cross-priming pathway: a portrait of an intricate immune system. *Scand. J. Immunol.* **65**:311-319.
- Becke, S., S. Aue, D. Thomas, S. Schader, J. Podlech, T. Bopp, T. Sedmak, U. Wolfrum, B. Plachter, S. Reyda.** 2010. Optimized recombinant dense bodies of human cytomegalovirus efficiently prime virus specific lymphocytes and neutralizing antibodies without the addition of adjuvant. *Vaccine* **28**:6191-6198.
- Becker, C., H. Pohla, B. Frankenberger, T. Schüler, M. Assenmacher, D. J. Schendel, and T. Blankenstein.** 2001. Adoptive tumor therapy with T lymphocytes enriched through an IFN-gamma capture assay. *Nat. Med.* **7**:1159-1162.
- Berger, A., A. Reitter, P. N. Harter, H. Buxmann, R. Allwinn, F. Louwen, and H. W. Doerr.** 2011. Problems and challenges in the diagnosis of vertical infection with human cytomegalovirus (CMV): lessons from two accidental cases. *J. Clin. Virol.* **51**:285-298.
- Bergstresser, P. R., C. R. Fletcher, and J. W. Streilein.** 1980. Surface densities of Langerhans cells in relation to rodent epidermal sites with special immunologic properties. *J. Invest. Dermatol.* **74**:77-80.
- Biron, K. K., R. J. Harvey, S. C. Chamberlain, S. S. Good, A. A. 3rd Smith, M. G. Davis, C. L., W. H. Miller, R. Ferris, R. E. Dornsife, S. C. Stanat, J. C. Drach, L. B. Townsend, and G. W. Kozalka.** 2002. Potent and selective inhibition of human cytomegalovirus replication by 1263W94, a benzimidazole L-riboside with a unique mode of action. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **46**:2365-2372.
- Boehme, K. W., and T. Compton.** 2006. Virus entry and activation of innate immunity. p.63-89. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Böhm, V., C. O. Simon, J. Podlech, C. K. Seckert, D. Gendig, P. Deegen, D. Gillert-Marien, N. A. W. Lemmermann, R. Holtappels, and M. J. Reddehase.** 2008. The Immune evasion paradox: immunoevasins of murine cytomegalovirus enhance priming of CD8 T cells by preventing negative feed-back regulation. *J. Virol.* **82**:11637-11650.
- 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., 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., I. Crnkovic-Mertens, and M. Messerle.** 2004a. Cloning of beta-herpesvirus genomes as bacterial artificial chromosomes. *Methods Mol. Bio.* **256**:221-239.
- Borst, E. M., G. Pósfai, F. Pogoda, and M. Messerle.** 2004b. Mutagenesis of herpesvirus BACs by allele replacement. p 269-280, In S. Zhao, and M. Stodolsky (ed.). *Methods Mol. Biol., Bacterial Artificial Chromosomes.* Vol. 256. Humana Press Totowa, NJ, USA.
- Boulanger, D., Y. Dieng, B. Cisse, F. Remoue, F. Capuano, J. L. Dieme, T. Ndiaye, C. Sokhna, J. F. Trape, B. Greenwood, and F. Simondon.** 2007. Antischistosomal efficacy of artesunate combination therapies administered as curative treatments for malaria attacks. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **101**:113-116.
- Bousso, P. und Robey, E.** 2003. Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. In: *Nat Immunol.* **6**:579-585.
- Boyle, K. A., and T. Compton.** 1998. Receptorbinding properties of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B. *J. Virol.* **72**:1826-1833.
- Britt, W..** 2006. Human cytomegalovirus infections and mechanisms of disease, p. 1-28. In: M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecula biology and immunology.* Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Britt, W. J., and M. Mach.** 1996. Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirolgy* **39**:401-412.
- Brunner, K. T., J. Mael, J. C. 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. F., J. F. Warner, G. Dennert, and R. M. Welsh.** 1985. Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo. *J. Ex .Med.* **161**:40-52.
- Bukowski, J. F., B. A. Woda, and R. M. Welsh.** 1984. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *J. Virol.* **52**:119-128.
- Cantrell, D. A., and K. A. Smith.** 1984. The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model. *Science* **224**:1312-1326.

- Castellino, F., A. Y. Huang, G. Altan-Bonnet, S. Stoll, C. Scheinecker, and R. N. Germain.** 2006. Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8⁺ T cells to sites of CD4⁺ T cell-dendritic cell interaction. *Nature*. **440**:890-895.
- Celluzzi, C. M., and L. D. Falo Jr.** 1997. Epidermal dendritic cells induce potent antigen-specific CTL-mediated immunity. *J Invest Dermatol*. **108**:716-720.
- Chen, D. H., H. Jiang, M. Lee, F. Liu, and Z. H. Zhou.** 1999. Three-dimensional visualization of tegument / capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. *Virology* **260**:10-16.
- Chou, S. W.** 2001. Cytomegalovirus drug resistance and clinical implications. *Transpl. Infect. Dis.* 3 Suppl. **2**:20-24.
- Cobbold, M., N. Khan, B. Pourgheysari, S. Tauro, D. McDonald, H. Osman, M. Assenmacher, L. Billingham, C. Steward, C. Crawley, E. Olavarria, J. Goldman, R. Chakraverty, P. Mahendra, C. Craddock, and P. A. Moss.** 2005. Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J. Exp. Med.* **202**:379-386.
- Cohen, J. I., and G. R. Corey.** 1985. Cytomegalovirus infection in the normal host. *Medicine (Baltimore)* **64**:100-114.
- Collins, T., C. Pomeroy, and M. C. Jordan.** 1993. Detection of latent cytomegalovirus DNA in diverse organs of mice. *J. Infect. Dis.* **168**:725-729.
- Compton, T., E. A. Kurt-Jones, K. W. Boehme, J. Belko, E. Latz, D. T. Golenbock, and R. W. Finberg.** 2003. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J. Virol.* **77**:4588-4596.
- Compton, T., D. M. Nowlin, and N. R. Cooper.** 1993. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* **193**:834-841.
- Craddock, C., R. M., Szydlo, F. Dazzi, E. Olavarria, K. Cwynarski, A. Yong, P. Brookes, J. de la Fuente, E. Kanfer, J. F. Apperley, and J. M. Goldman.** 2001. Cytomegalovirus seropositivity adversely influences outcome after T- depleted unrelated donor transplant in patients with chronic myeloid leukaemia: the case for tailored graft-versus-host disease prophylaxis. *Br. J. Haematol.* **112**:228-236.
- Craighead, J. E., R. E. Kanich, and J. D. Almeida.** 1972. Nonviral microbodies with viral antigenicity produced in cytomegalovirus-infected cells. *J. Virol.* **10**:766-775.

- Cresswell, P., A. L. Ackerman, A. Giodini, D. R. Peaper, and P. A. Wearsch.** 2005. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol. Rev.* **207**:145-157.
- Crumpacker, C. S.** 1992. Mechanism of action of foscarnet against viral polymerases. *Am J Med.* **92**:3S-7S.
- Crute, J. J., C. A. Grygon, K. D. Hargrave, B. Simoneau, A.-M. Faucher, G. Bolger, P. Kibler, M. Liuzzi, and M. G. Cordingley.** 2002. Herpes simplex virus helicase–primase inhibitors are active in animal models of human disease. *Nat. Med.* **8**:386-391.
- Czerkinsky, C., G. Andersson, H. P. Ekre, L. A. Nilsson, L. Klareskog, and O. Uchterlony.** 1988. Reverse ELISPOT Assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. *J. Immunol. Methods* **110**:29-36.
- Däubner, T., A. Fink, A. Seitz, S. Tenzer, J. Müller, D. Strand, C. K. Seckert, C. Janssen, A. Renzaho, N. K. Grzimek, C. O. Simon, S. Ebert, M. J. Reddehase, S. A. Oehrlein-Karpi, and N. A. Lemmermann.** 2010. A novel transmembrane domain mediating retention of a highly motile herpesvirus glycoprotein in the endoplasmic reticulum. *J Gen Virol.* **91**:1524-1534.
- Davison, A. J.** 2003. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J. Gen. Virol.* **84**:17-28.
- Davison A. J., R. Eberle, B. Ehlers, G. S. Hayward, D. J. McGeoch, A. C. Minson, P. E. Pellett, B. Roizman, M. J. Studdert and E. Thiry.** 2008. The order *Herpesvirales*. *Archives of Virology* **154**:171-177.
- Del-Val, M., H. J. Schlicht, H. Volkmer, M. Messerle, M. J. Reddehase, U. H. and Koszinowski.** 1991. Protection against lethal cytomegalovirus infection by a recombinant vaccine containing a single nonameric T-cell epitope. *J. Virol.* **65**:3641-3646.
- Diefenbach, R. J., M. Miranda-Saksena, E. Diefenbach, D. J. Holland, R. A. Boadle, P. J. Armati, and A. L. Cunningham.** 2002. Herpes simplex virus tegument protein US11 interacts with conventional kinesin heavy chain. *J. Virol.* **76**:3282-3291.
- Doherty, P. C.** 1993. Cell-mediated cytotoxicity. *Cell.* **75**:607-612.
- Dohner, K., and B. Sodeik.** 2004. The role of the cytoplasm during viral infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **285**:67-108.
- Dolan, A., C. Cunningham, R. D. Hector, A. F. Hassan-Walker, L. Lee, C. Addison, D. J. Dargan, D. J. McGeoch, D. Gatherer, V. C. Emery, P. D. Griffiths, C. Sinzger, B. P.**

- McSharry, G. W. Wilkinson, and A. J. Davison.** 2004. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* **85**:1301-1312.
- Dowling, J. N., A. R. Saslow, J. A. Armstrong, and M. Ho.** 1976. Cytomegalovirus infection in patients receiving immunosuppressive therapy for rheumatologic disorders. *J. Infect. Dis.* **133**:399-408.
- Drew, W. L.** 1992. Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* **14**:608-615.
- D'Souza, W. N., and L. Lefrançois.** 2003. IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion. *J Immunol.* **171**:5727-5735.
- Dunkley, M., R. G. Miller, and K. Shortman.** 1974. A modified ⁵¹Cr release assay for cytotoxic lymphocytes. *J. Immunol. Methods* **6**:39-51.
- Dunn, W., C. Chou, H. Li, R. Hai, D. Patterson, V. Stolc, H. Zhu, and F. Liu.** 2003. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:14223-14228.
- 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.* [Epub ahead of print]
- Eickmann, M., D. Gicklhorn, and K. Radsak.** 2006. Glycoprotein trafficking in virion morphogenesis, p. 245-264. In: M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Eid, A. J., and R. R. Razonable.** 2010. New developments in the management of cytomegalovirus infection after solid organ transplantation. *Drugs.* **70**:965-981.
- Einsele, H., G. Ehninger, M. Steidle, I. Fischer, S. Bihler, F. Gerneth, A. Vallbracht, H. Schmidt, H. D. Waller, and C. A. Muller.** 1993. Lymphocytopenia as an unfavourable prognostic factor in patients with cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *Blood* **82**:1672-1678.
- Einsele, H., and K. Hamprecht.** 2003. Immunotherapy of cytomegalovirus infection after stem-cell transplantation: a new option? *Lancet* **362**:1343-1344.
- Einsele, H. E. Roosnek, N. Rufer, C. Sinzger, S. Rieger, J. Löffler, U. Grigoleit, A. Moris, H. G. Rammensee, L. Kanz, A. Kleihauer, F. Frank, G. Jahn, and H. Hebart.** 2002. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* **99**:3916-3922.

- Emery, V. C., and P. D. Griffiths.** 1990. Current status review molecular biology of cytomegalovirus. *Int. J. Exp. Pathol.* **71**:905-918.
- Erice, A..** 1999. Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drugs. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**:286-297.
- Feire, A. L., 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.
- Feuchtinger, T., S. Matthes-Martin, C. Richard, T. Lion, M. Fuhrer, K. Hamprecht, R. Handgretinger, C. Peters, F. R. Schuster, R. Beck, M. Schumm, R. Lotfi, G. Jahn, and P. Lang.** 2006. Safe adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* **134**:64-76.
- Field, H. J., and S. Biswas.** 2011. Antiviral drug resistance and helicase-primase inhibitors of herpes simplex virus. *Drug Resist. Updat.* **14**:45-51.
- Fitzgerald, N. A., J. M. Papadimitriou, and G. R. Shellam.** 1990. Cytomegalovirus-induced pneumonitis and myocarditis in newborn mice. A model for perinatal human cytomegalovirus infection. *Arch. Virol.* **115**:75-88.
- Fortunato, E. A., and D. H. Spector.** 1999. Regulation of human cytomegalovirus gene expression. *Adv. Virus Res.* **54**:61-128.
- Gassen, H. G., und G. Schrimpf.** 1999. Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin.
- Gibson, W..** 2006. Assembly and maturation of the capsid. p.231-244. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Gold, M. C., M. W. Munks, M. Wagner, C. W. McMahon, A. Kelly, D. G. Kavanagh, M. K. Slifka, U. H. Koszinowski, D. H. 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. L..** 2003. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* **426**:895-899.

- Hamann, D., P. A. Baars, M. H. Rep, B. Hooibrink, S. R. Kerkhof-Garde, M. R. Klein, and R. A. van Lier.** 1997. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells..J. Exp. Med. **186**:1407-18.
- Hammer, G. E., F. Gonzalez, M. Champsaur, D. Cado, and N. Shastri.** 2006. The aminopeptidase ERAAP shapes the peptide repertoire displayed by major histocompatibility complex class I molecules. Nat. Immunol. **7**:103-112.
- Harty, J. T., A. R. Tvinnereim, and D. W. White.** 2000. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. Annu. Rev. Immunol. **18**:275-308.
- Haroon, N., and R.D. Inman.** 2010. Endoplasmic reticulum aminopeptidases: Biology and pathogenic potential. Nat. Rev. Rheumatol. **6**:461-467.
- Hasbold, J., A. V. Gett, J. S. Rush, E. Deenick, D. Avery, J. Jun, and P. D. Hodgkin.** 1999. Quantitative analysis of lymphocyte differentiation and proliferation in vitro using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. Immunol Cell Biol. **77**:516-522.
- Hauptmeier, B.M., and G. Rohde.** 2010. Respiratorische Viren. Internistische Intensivmedizin **6**:201-210.
- Hebart, H., and H. Einsele.** 2004. Clinical aspects of CMV infection after stem cell transplantation. Hum. Immunol. **65**:432-436.
- Herr, W., and B. Plachter.** 2009. Cytomegalovirus and varicella-zoster virus vaccines in hematopoietic stem cell transplantation. Expert. Rev. Vaccines **8**:999-1021.
- Ho, M.** 2008. The history of cytomegalovirus and its diseases. Med. Microbiol. Immunol. **197**:65-73. **Marks, J. R., and D. H. Spector.** 1988. Replication of the murine cytomegalovirus genome: structure and role of the termini in the generation and cleavage of concatenes. Virology **162**:98-107.
- Hodgkin, P. D., A. A. Scalzo, N. Swaminathan, P. Price., and G. R. Shellam.** 1988. Murine cytomegalovirus binds reversibly to mouse embryo fibroblasts: implications for quantitation, and explanation of centrifugal enhancement. J. Virol. Methods **22**:215-230.
- Hogquist, K. A., S. C. Jameson, W. R. Heath, J. L. Howard, M. J. Bevan, and F. R. Carbone.** 1994. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. Cell **76**:17-27.
- Honess, R.W., and B. Roizman.** 1974. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. J. Virol. **14**:8-19.

- Holtappels, R., V. Böhm, J. Podlech, and M. J. Reddehase.** 2008. CD8 T-cell-based immunotherapy of cytomegalovirus infection: "proof of concept" provided by the murine model. *Med. Microbiol. Immunol.* **197**:125-134.
- Holtappels, R., S. Ebert, J. Podlech, A. Fink, V. Böhm, N. A.W. Lemmermann, K. Freitag, A. Renzaho, D. Thomas, and M. J. Reddehase.** 2013. Murine Model for Cytoimmunotherapy of CMV Disease after Hematopoietic Cell Transplantation. In: Reddehase M. J. (ed) *Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention*, Volume I, Chapter 2. Caister Academics Press, Norfolk (in press).
- Holtappels, R., N. K. A. Grzimek, C. O. Simon, D. Thomas, D. Dreis, and M. J. Reddehase.** 2002. Processing and presentation of murine cytomegalovirus pORF m164-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.** 2006. CD8 T cell-based immunotherapy of cytomegalovirus in the mouse model of the immunocompromised bone marrow transplantation recipient. In: M.J. Reddehase, ed., N.A. Lemmermann, ass. ed., *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Wymondham, Norfolk, United Kingdom: Caister Academic Press. pp. 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, M. F. Pahl-Seibert, M. Juech, D. Thomas, C. O. Simon, M. Wagner, and M. J. Reddehase.** 2004. Cytomegalovirus misleads its host by priming of CD8 T cells specific for an epitope not presented in infected tissues. *J. Exp. Med.* **199**:131-136.
- Holtappels, R., C.O. Simon, M.W. Munks, D. Thomas, P. Deegen, B. Kühnapfel, T. Däubner, S.F. Emde, J. Podlech, N.K. Grzimek, S.A. Oehrlein-Karpi, A.B. Hill, and M.J. Reddehase.** 2008b. Subdominant CD8 T-cell epitopes account for protection against cytomegalovirus independent of immunodomination. *J. Virol.* **82**:5781-5796.
- Huang, Y. H., J. Rönnelid, and J. Frostegård.** 1995. Oxidized LDL induces enhanced antibody formation and MHC class II-dependent IFN-gamma production in lymphocytes from healthy individuals. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**:1577-1583.
- Huber, M. T., and T. Compton.** 1999. Intracellular formation and processing of the heterotrimeric gH-gL-gO (gCIII) glycoprotein envelope complex of human cytomegalovirus. *J. Virol.* **73**:3886-3892.

- Hudson, J. B., V. Misra., and T. R. Mosmann.** 1976. Cytomegalovirus infectivity: analysis of the phenomenon of centrifugal enhancement of infectivity. *Virology* **72**:235-243.
- Irmiere, A., and W. Gibson.** 1983. Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology* **130**:118-133.
- Isaacson, M. K., A. L. Feire, and T. Compton.** 2007. Epidermal growth factor receptor Is not required for human cytomegalovirus entry or signaling. *J. Virol.* **81**:6241-6247.
- Jameson, S. C., and M. J. Bevan.** 1992. Dissection of major histocompatibility complex (MHC) and T cell receptor contact residues in a Kb-restricted ovalbumin peptide and an assessment of the predictive power of MHC-binding motifs. **22**:2663-2667.
- Jelinek, D. F., and P. E. Lipsky.** 1987. Regulation of human B lymphocyte activation, proliferation, and differentiation. *Adv. Immunol.* **40**:1-59.
- Jonjic, S., I. Bubic, and A. Krmpotic.** 2006. Innate immunity to cytomegaloviruses. p.285-320. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- 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.
- Jonjic, S., W. Mutter, F. Weiland, M. J. Reddehase, and U. H. Koszinowski.** 1989. Site-restricted persistent cytomegalovirus infection after selective long-term depletion of CD4+ T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **169**:1199-1212.
- Jonjic, S., I. Pavic, P. Lucin, D. Rukavina, and U. H. Koszinowski.** 1990. Efficacious control of cytomegalovirus infection after long-term depletion of CD8+ T lymphocytes. *J. Virol.* **64**:5457-5464.
- Jordan, M. C., W. Rousseau, J. A. Stewart, G. R. Noble, and T. D. Chin.** 1973. Spontaneous cytomegalovirus mononucleosis. Clinical and laboratory observations in nine cases. *Ann. Intern. Med.* **79**:153-160.
- Kalia, V., S. Sarkar, S. Subramaniam, W. N. Haining, K. A. Smith, and R. Ahmed.** 2010. Prolonged interleukin-2R α expression on virus-specific CD8+ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. *Immunity* **32**:91-103.
- Kari, B., and R. Gehrz.** 1992. A human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II is a major heparin-binding component of the envelope. *J. Virol.* **66**:1761-1764.

- Kedl, R. M., J. W. Kappler, and P. Marrack.** 2003. Epitope dominance, competition and T cell affinity maturation. *Curr. Opin. Immunol.* **15**:120-127.
- 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.
- Kendle, J. B. , and P. Fan-Havard.** 1998. Cidofovir in the treatment of cytomegaloviral disease. *Ann. Pharmacother.* **32**:1181-1192.
- Kleymann, G., R. Fischer, U. A. Betz, M. Hendrix, W. Bender, U. Schneider, G. Handke, P. Eckenberg, G. Hewlett, V. Pevzner, J. Baumeister, O. Weber, K. Henninger, J. Keldenich, A. Jensen, J. Kolb, U. Bach, A. Popp, J. Mäben, I. Frappa, D. Haebich, O. Lockhoff, and H. Rübsamen-Waigmann.** 2002. New helicase–primase inhibitors as drug candidates for the treatment of herpes simplex disease. *Nat. Med.* **8**:392-398.
- Klemola, E., R. von Essen, G. Henle, W. Henle.** 1970. Infectious mononucleosis like disease with negative heterophil agglutination test, clinical features in relation to Epstein Barr virus and cytomegalovirus antibodies. *J. Infect. Dis.* **121**:608-614.
- Klenovsek, K., F. Weisel, A. Schneider, U. Appelt, S. Jonjic, M. Messerle, B. Bradel-Tretheway, T. H. Winkler, and M. Mach.** 2007. Protection from CMV infection in immunodeficient hosts by adoptive transfer of memory B cells. *Blood* **110**:3472-3479.
- Kloetzel, P. M..** 2001. Antigen processing by the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**:179-187.
- Kloetzel, P. M..** 2004. Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat. Immunol.* **5**:661-669.
- Klotman, M. E., S. C. Henry, R. C. Greene, P. C. Brazy, P. E. Klotman, and J. D. Hamilton.** 1990. Detection of mouse cytomegalovirus nucleic acid in latently infected mice by in vitro enzymatic amplification. *J. Infect. Dis.* **161**:220-225.
- Koffron, A. J., B. K. Patterson, Yan, S., D. B. Kaufman, J. P. Fryer, F. P. Stuart, and M. I. Abecassis.** 1997. Latent human cytomegalovirus: a functional study. *Transplant. Proc.* **29**: 793-795.
- Koszinowski, U. H., M. Del Val, and M. J. Reddehase.** 1990. Cellular and molecular basis of the protective immune response to cytomegalovirus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **154**:189-220.
- Krmpotic, A., I. Bubic, B. Polic, P. Lucin, S. Jonjic.** 2003. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. *Microbes Infect.* **5**:1263-1277.

- Kropp, K. A., C.O. Simon, A. Fink, A. Renzaho, B. Kühnapfel, J. Podlech, M. J. Reddehase, and N. K. 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.
- Ksouri, H., H. Eljed, A. Greco, A. Lakhal, L. Torjman, A. Abdelkefi, T. Ben Othmen, S. Ladeb, A. Slim, B. Zouari, A. Abdeladhim, A. Ben Hassen.** 2007. Analysis of cytomegalovirus (CMV) viremia using the pp65 antigenemia assay, the amplicor CMV test, and a semi-quantitative polymerase chain reaction test after allogeneic marrow transplantation. *Transpl. Infect. Dis.* **9**:16-21.
- Kurz, S., H. P. Steffens, A. Mayer, J. R. Harris, and M. J. Reddehase.** 1997. Latency versus persistence or intermittent recurrences: evidence for a latent state of murine cytomegalovirus in the lungs. *J. Virol.* **71**:2980-2987.
- Landolfo, S., M. Gariglio, G. Gribaudo, and D. Lembo.** 2003. The human cytomegalovirus. *Pharmacol. Ther.* **98**:269-297.
- Lee, S.H., S. Girard, D. Macina, M. Busà, A. Zafer, A. Belouchi, P. Gros, and S.M. Vidal.** 2001. Susceptibility to mouse cytomegalovirus is associated with deletion of an activating natural killer cell receptor of the C-type lectin superfamily. *Nat. Genet.* **28**:42-45.
- Lee, S. H., A. Zafer, Y. de Repentigny, R. Kothary, M. L. Tremblay, P. Gros, P. Duplay, J. R. Webb, and S. M. Vidal.** 2003. Transgenic expression of the activating natural killer receptor Ly49H confers resistance to cytomegalovirus in genetically susceptible mice. *J. Exp. Med.* **197**:515-526.
- Leen, A.M., and H. E. Heslop.** 2008. Cytotoxic T lymphocytes as immune-therapy in haematological practice. *Br. J. Haematol.* **143**:169-179.
- Leen, A. M., T. Tripic, and C. M. Rooney.** 2010. Challenges of T cell therapies for virus-associated diseases after hematopoietic stem cell transplantation. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **10**:337-351.
- Lemmermann, N. A. W., 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. W., J. Podlech, C. K. Seckert., K. A. Kropp, N. K. A. Grzimek, M. J. Reddehase, and R. Holtappels.** 2010b. CD8 T-Cell Immunotherapy of cytomegalovirus disease in the murine model. In S.H.E. Kaufmann and D. Kabelitz (ed.), *Methods in*

Microbiology, Immunology of Infection, 3rd ed., vol. 37. Academic Press, London and San Diego, Cal.

Lemmermann, N. A., K. A. Kropp , C. K. Seckert , N. K. Grzimek , and M. J. Reddehase . 2011. Reverse genetics modification of cytomegalovirus antigenicity and immunogenicity by CD8 T-cell epitope deletion and insertion. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**:812742.

Li, L., J. A. Nelson, and W. J. Britt. 1997. Glycoprotein H-related complexes of human cytomegalovirus: identification of a third protein in the gCIII complex. *J. Virol.* **71**:3090-3097.

Ljungman P., J. Aschan, I. Lewensohn-Fuchs, S. Carlens, K. Larsson, B. Lönnqvist, J. Mattsson, E. Sparrelid, J. Winiarski, and O. Ringdén. 1998. Results of different strategies for reducing cytomegalovirus-associated mortality in allogeneic stem cell transplant recipients. *Transplantation* **66**:1330-1334.

Loh, J., D. T. Chu, A. K. O'Guin, W. M. Yokoyama, and H. W. Virgin 4th. 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.

Lyons, A. B., and C. R. Parish. 1994. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **171**:131-137.

Mach, M. 2006. Antibody-mediated neutralization of infectivity. In: Reddehase MJ (ed) *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Norfolk (UK), pp 265-283.

Malek, T. R. 2008. The Biology of Interleukin-2 *Review of Immunology* **26**:453-479. Annual

Marshall, B. C. and W. C. Koch . 2009. Antivirals for cytomegalovirus infection in neonates and infants: focus on pharmacokinetics, formulations, dosing, and adverse events. *Paediatr Drugs* **11**:309-321.

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

Marty, F. M., P. Ljungman, G. A. Papanicolaou, D. J. Winston, R. F. Chemaly, L. Strasfeld, J. A. Young, T. Rodriguez, J. Maertens, M. Schmitt, H. Einsele, A. Ferrant, J. H. Lipton, S. A. Villano, H. Chen, and M. Boeckh; Maribavir 1263-300 Clinical Study Group. 2011. Maribavir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem-cell transplants: a phase 3, double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet Infect. Dis.* **11**:284-292.

- Masopust, D., V. Vezys, A. L. Marzo, and L. Lefrançois.** 2001. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science*. **291**:2413-2417.
- Masur, H., S. M. Whitcup, and C. Cartwright.** 1996. Advances in the management of AIDS related CMV retinitis. *Ann. Internal. Med.* **125**:125-136.
- Matthews, J.T., B.J. Terry, and A.K Field.** 1993. The structure and function of the HSV DNA replication proteins: defining novel antiviral targets. *Antivir. Res.* **20**:89-114.
- Mersseman, V., K. Besold, M. J. Reddehase, U. Wolfrum, D. Strand, B. Plachter, and S. Reyda.** 2008a. Exogenous introduction of an immunodominant peptide from the non-structural IE1 protein of human cytomegalovirus into the MHC class I presentation pathway by recombinant dense bodies. *J. Gen. Virol.* **89**:369-379.
- Mersseman, V., V. Bohm, R. Holtappels, P. Deegen, U. Wolfrum, B. Plachter, and S. Reyda.** 2008b. Refinement of strategies for the development of a human cytomegalovirus dense body vaccine. *Med. Microbiol. Immunol.* **197**:97-107.
- Mescher, M. F., P. Agarwal, K. A. Casey, C. D. Hammerbeck, Z. Xiao, and J. M. Curtsinger.** 2007. Molecular basis for checkpoints in the CD8 T cell response: tolerance versus activation. *Semin. Immunol.* **19**:153-161.
- Messerle, M., B. Bühler, G. M. Keil, and U. H. Koszinowski.** 1992. Structural organization, expression, and functional characterization of the murine cytomegalovirus immediate-early 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.
- Mettenleiter, T. C., B. C. Klupp, and H. Granzow.** 2006. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**:423-429.
- Meyer, P. R., W. Rutvisuttinunt, S. E. Matsuura, A. G. So, and W. A. Scott.** 2007. Stable complexes formed by HIV-1 reverse transcriptase at distinct positions on the primer-template controlled by binding deoxynucleoside triphosphates or foscarnet.. *J. Mol. Biol.* **369**:41-54.
- Meyers, J. D., P. Ljungman, and L. D. Fischer.** 1990. Cytomegalovirus excretion as a predictor of cytomegalovirus disease after marrow transplantation: importance of cytomegalovirus viremia. *J. Infect. Dis.* **162**:373-380.
- Meyer-Wittkopf, M., H. Buxmann, M. Gonser, and K. Hamprecht.** 2009. Neues zur prä- und perinatalen Cytomegalovirus-Infektion. *FRAUENARZT* **50**:524-527.

- Michel, D., and T. Mertens.** 2006. Antiviral intervention, resistance, and perspectives. p.573-590. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Milbradt, J., S. Auerochs, K. Korn, and M. Marschall.** 2009. Sensitivity of human herpesvirus 6 and other human herpesviruses to the broad-spectrum anti-infective drug artesunate. *J. Clin. Virol.* **46**:24-28. **Marshall, B. C., and W. C. Koch.** 2009. Antivirals for cytomegalovirus infection in neonates and infants: focus on pharmacokinetics, formulations, dosing, and adverse events. *Paediatr. Drugs.* **11**:309-321.
- 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. R. Rodriguez, M. Esteban, M. 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. S., and C. T. Courcelle.** 2001. Cytomegaloviruses and their replication, pp 2629-2674. In: D. M. Knipe and P. M. Howley (eds.), *Fields virology*, 4th ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
- Mocarski, E. S., T. Shenk, and R. F. Pass.** 2006. Cytomegaloviruses. p.2701-2772. IN: D. M. Knipe and P. M. Howley (eds.), *In Fields Virology*, 5th ed., vol. 2. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa.
- Moosmann, A., I. Bigalke, J. Tischer, L. Schirrmann, J. Kasten, S. Tippmer, M. Leeping, D. Prevalsek, G. Jaeger, G. Ledderose, J. Mautner, W. Hammerschmidt, D.J. Schendel, and H.J. Kolb.** 2010. Effective and long-term control of EBV PTLD after transfer of peptide-selected T cells. *Blood* **115**:2960-2970.
- Moskowitz, L., G. T. Hensley, J. C. Chan, and K. Adams.** 1985. Immediate causes of death in acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **109**:735-738.
- Mulamba, G. B., A. Hu, R. F. Azad, K. P. Anderson, and D. M. Coen.** 1998. Human Cytomegalovirus Mutant with Sequence-Dependent Resistance to the Phosphorothioate Oligonucleotide Fomivirsen (ISIS 2922). *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:971-973.
- Mullis, K. B., and F. A. Faloona.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* **155**:335-350.
- Munks, M. W., K.S. Cho, A. K. Pinto, S. Sierro, P. Klenerman, and A. B. Hill.** 2006a. Four distinct patterns of memory CD8 T cell responses to chronic murine cytomegalovirus infection. *J. Immunol.* **177**:450-458.

- Munks, M. W., M. C. Gold, A. L. Zajac, C. M. Doom, C. S. Morello, D. H. Spector, and A. B. Hill.** 2006b. Genome-wide analysis reveals a highly diverse CD8 T cell response to murine cytomegalovirus. *J. Immunol.* **176**:3760-3766.
- Muro, S., M. Koval, and V. Muzykantov.** 2004. Endothelial endocytic pathways: gates for vascular drug delivery. *Curr Vasc Pharmacol.* **2**:281-299.
- Mutter, W., M. J. Reddehase, F. W. Busch, H. J. Bühring, and U. H. Koszinowski.** 1988. Failure in generating hemopoietic stem cells is the primary cause of death from cytomegalovirus disease in the immunocompromised host. *J. Exp. Med.* **167**:1645-1658.
- Murphy, E., D. Yu, J. Grimwood, J. Schmutz, M. Dickson, M. Jarvis, G. Hahn, J. Nelson, R. Myers, and T. Shenk.** 2003. Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100**:14976-14981.
- Nagata, S.** 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* **88**:355-365.
- Navarro, D., P. Paz, S. Tugizov, K. Topp, J. La Vail, and L. Pereira.** 1993. Glycoprotein B of human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. *Virology* **197**:143-158.
- Neimann, P. E., W. Reeves, G. Ray, N. Flournoy, K. G. Lerner, G. E. Sale, and E. D. Thomas.** 1977. A prospective analysis of interstitial pneumonia and opportunistic viral infections among recipients of allogeneic bone marrow grafts. *J. Infect. Dis.* **136**:754-767.
- Nisbet, A. D., R. H. Saundry, A. J. Moir, L. A. Fothergill, and J. E. Fothergill.** 1981. The complete amino acid sequence of hen ovalbumin. *Eur. J. Biochem.* **115**:335-345.
- Nixon, D. E. and M. A. McVoy.** 2002. Terminally repeated sequences on a herpesvirus genome are deleted following circularization but are reconstituted by duplication during cleavage and packaging of concatemeric DNA. *J. Virol.* **76**:2009-2013.
- Norbury, C. C., D. Malide, J. S. Gibbs, J. R. Bennink, and J. W. Yewdell.** 2002. Visualizing priming of virus-specific CD8⁺ T cells by infected dendritic cells in vivo. *Nat. Immunol.* **3**:265-271.
- Obar, J. J., and L. Lefrançois.** 2010a. Early signals during CD8 T cell priming regulate the generation of central memory cells. *J. Immunol.* **185**:263-72.
- Obar, J. J., and L. Lefrançois.** 2010c. Early events governing memory CD8⁺ T-cells differentiation. *Int. Immunol.* **22**:619-625.
- Obar, J. J., and L. Lefrançois.** 2010d. Memory CD8⁺ T cell differentiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1183**:251-266.

- Obar, J. J., M. J. Molloy, E. R. Jellison, T. A. Stoklasek, W. Zhang, E. J. Usherwood, and L. Lefrançois.** 2010b. CD4⁺ T cell regulation of CD25 expression controls development of short-lived effector CD8⁺ T cells in primary and secondary responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **107**:193-198.
- Oberg, B..** 1982. Antiviral effects of phosphonoformate (PFA, foscarnet sodium). *Pharmacol Ther.* **19**:387-415.
- Oberg, B..** 1989. Antiviral effects of phosphonoformate (PFA, foscarnet sodium). *Pharmacol Ther.* **40**:213-285.
- O'Connor, M., M. Peifer, and W. Bender.** 1989. Construction of large DNA segments in *Escherichia coli*. *Science* **244**:1307-1312.
- Ogawa-Goto, K., K. Tanaka, W. Gibson, E. Moriishi, Y. Miura, T. Kurata, S. Irie, and T. Sata.** 2003. Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *J. Virol.* **77**:8541-8547.
- Osborn, J. E., and Walker, D. L.** 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 T cells purified by T-cell receptor-based cell sorting. *J. Virol.* **79**:5400-5413.
- Parish, C. R., M. H. Glidden, B. J. Quah, and H. S. Warren.** 2009. Use of the intracellular fluorescent dye CFSE to monitor lymphocyte migration and proliferation. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan [et al. Chapter 4, Unit 49]*.
- Paya, C., A. Humar, E. Dominguez, K. Washburn, E. Blumberg, B. Alexander, R. Freeman, N. Heaton, and M. D. Pescovitz.** 2004. Efficacy and safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am. J. Transplant.* **4**:611-620.
- Peggs, K.S., S. Verfuether, A. Pizzey, S. L. Chow, K. Thomson, and S. Mackinnon.** 2009. Cytomegalovirus-specific T cell immunotherapy promotes restoration of durable functional antiviral immunity following allogeneic stem cell transplantation. *Clin. Infect. Dis.* **49**:1851-1860.
- Peggs, K. S., S. Verfuether, A. Pizzey, N. Khan, M. Guiver, P. A. Moss, and S. Mackinnon.** 2003. Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines. *Lancet* **362**:1375-1377.

- Pellett, P. E., and B. Roizman.** 2006. The family Herpesviridae: A brief introduction. pp. 2479-2500. In: D. M. Knipe and P. M. Howley (eds.), *Fields Virology* 5th ed., vol. 2. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa.
- Peperzak, V., Y. Xiao, E. A. Veraar, and J. Borst.** 2010. CD27 sustains survival of CTLs in virus-infected nonlymphoid tissue in mice by inducing autocrine IL-2 production. *J. Clin. Invest.* **120**:168-78.
- Pepperl, S., J. Münster, M. Mach, J.R. 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**:75.
- Pepperl-Klindworth, S., N. Frankenberg, S. Riegler, and B. Plachter.** 2003. Protein delivery by subviral particles of human cytomegalovirus. *Gene Ther.* **10**:278-284.
- Pepperl-Klindworth, S. and B. Plachter.** 2006. Current perspectives in vaccine development. In *Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology*, M. J. Reddehase, ed. (Caister Academic Press Ltd, Wymondham, Norfolk, U.K.), pp.551-572.
- Perry, C. M., and J. A. Balfour.** 1999. Fomivirsen. *Drugs* **57**:375-380.
- Pipkin, M. E., J. A. Sacks, F. Cruz-Guilloty, M. G. Lichtenheld, M. J. Bevan, and A. Rao.** 2010. Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity.* **32**:79-90.
- Plosker, G. L., and S. Noble.** 1999. Cidofovir: a review of its use in cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. *Drugs.* **58**:325-345.
- Plummer, G.** 1967. Comparative virology of the herpes group. *Prog. Med. Virol.* **9**:302-340.
- Podlech, J., R. Holtappels, N. K. A. Grzimek, and M. J. Reddehase.** 2002. Animal models: murine cytomegalovirus, p.493-525. In S. H. E. Kaufmann and D. Kabelitz (ed.), *Methods in Microbiology, Immunology of Infection*, 2nd ed., vol. 32. Academic Press, London and San Diego, Cal.
- Podlech, J., R. Holtappels, M.-F. Pahl-Seibert, H. P. Steffens, and M. J. Reddehase.** 2000. Murine model of interstitial cytomegalovirus pneumonia in syngeneic bone marrow transplantation: persistence of protective pulmonary CD8-T-cell infiltrates after clearance of acute infection. *J. Virol.* **74**:7496-7507.

- Podlech, J., R. Holtappels, N. Wirtz, H.-P. Steffens, and M. J. Reddehase.** 1998. Reconstitution of CD8 T cells is essential for the prevention of multiple-organ cytomegalovirus histopathology after bone-marrow transplantation. *J. Gen. Virol.* **79**:2099-2104.
- Porgador, A., J. W. Yewdell, Y. Deng, J. R. Bennink, and R. N. Germain.** 1997. Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody. *Immunity* **6**:715-726.
- Prlic, M., G. Hernandez-Hoyos, and M. J. Bevan.** 2006. Duration of the initial TCR stimulus controls the magnitude but not functionality of the CD8+ T cell response. *J. Exp. Med.* **203**:2135-2143.
- Quah, B. J., H. S. Warren, and C. R. Parish.** 2007. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nature Protocols* **2**:2049-2056.
- Quah, B. J., and C. R. Parish.** 2010. The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation. *J. Vis. Exp.* **44**: pii: 2259.
- Quah, B. J., and C. R. Parish.** 2012. New and improved methods for measuring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo using CFSE-like fluorescent dyes. *J Immunol Methods.* **379**:1-14.
- 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.
- Rammensee, H. G., K. Falk, and O. Rötzschke.** 1993. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **11**:213-244.
- Rawlinson, W. D., H. E. Farrell, and B. G. Barrell.** 1996. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J. Virol.* **70**:8833-8849.
- Reddehase, M. J.** 1991. Bone marrow dysfunction in irradiated, cytomegalovirus-infected mice. *Transplant. Proc.* 3 Suppl. **23**:8-11.
- Reddehase, M. J.** 2002. Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat. Rev. Immunol.* **2**:831-844.
- Reddehase, M. J., M. Balthesen, 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. and U. H. Koszinowski.** 1984. Significance of herpesvirus immediate early gene expression in cellular immunity to cytomegalovirus infection. *Nature* **312**:369-371.
- Reddehase M. J. and U. H. Koszinowski.** 1991b. Redistribution of critical major histocompatibility complex and T cell receptor-binding functions of residues in an antigenic sequence after biterminal substitution. *European Journal of Immunology* **21**:1697-1701.
- Reddehase, M. J., W. Mutter, K. Münch, H. J. Bühring, and U. H. Koszinowski.** 1987. CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *J. Virol.* **61**:3102-3108.
- Reddehase, M. J., 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.
- Reinke P., S. Prösch, F. Kern, and H. D. Volk.** 1999. Mechanisms of human cytomegalovirus (HCMV) (re)activation and its impact on organ transplant patients. *Transpl. Infect. Dis.* **1**:157-164.
- Reinhardt, R. L., A. Khoruts, R. Merica, T. Zell, and M. K. Jenkins.** 2001. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature.* **410**:101-115.
- René, E., C. Marche, T. Chevalier, C. Rouzioux, B. Regnier, A. G. Saimot, Y. Negesse, S. Matheron, C. Leport, B. Wolff, B. Moriniere, C. Katlama, B. Godeberge, B. Vittecoq, F. Bricaire, C. Brun-Vesinet, B. Pangon, A. M. Deluol, J. P. Coulaud, J. Modal, J. Frottier, Vilde, J. L., F. Vachon, M. Mignon, and S. Bonfils.** 1988. Cytomegalovirus colitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Dig. Dis. Sci.* **33**:741-750.
- Reusser, P., S. R. Riddell, J. D. Meyers, and P. D. Greenberg.** 1991. Cytotoxic T lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* **78**:1373-1380.
- Riddell, S. R., K. S. Watanabe, J. M. Goodrich, C. R. Li, M. E. Agha, and P. D. Greenberg.** 1992. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* **257**:238-241.
- Rock, K. L., and A. L. Goldberg.** 1999. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* **17**:739-779.
- Rock, K. L., and L. Shen.** 2005. Crosspresentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol. Rev.* **207**:166-183.

- Rock, K. L., I. A. York, and A. L. Goldberg.** 2004. Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nat. Immunol.* **5**:670-677.
- Rock, K. L., I. A. York, T. Saric, and A. L. Goldberg.** 2002. Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv. Immunol.* **80**:1-70.
- Roizman, B., and J. Baines.** 1991. The diversity and unity of Herpesviridae. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **14**:63-79.
- Roizman, B., L. E. Carmichael, F. Deinhardt, G. de-The, A. J. Nahmias, W. Plowright, F. Rapp, P. Sheldrick, M. Takahashi, and K. Wolf.** 1981. Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The herpesvirus study group, the international committee on taxonomy of viruses. *Intervirology* **16**:201-217.
- Rolle, M., and A. Mayr.** 2002. Herpesviridae, pp. 177-179. *In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 7th ed., Enke Verlag, Stuttgart.
- Röttschke, O., K. Falk, S. Stevanović, G. Jung, P. Walden, and H. G. Rammensee.** 1991. Exact prediction of a natural T cell epitope. *Eur. J. Immunol.* **21**:2891-2894.
- Rudolph, M. G., R. L. Stanfield, and I. A. Wilson.** 2006. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu. Rev. Immunol.* **24**:419-466.
- Ryckman, B. J., M. C. Chase, and D. C. Johnson.** 2008. HCMV gH / gL / UL128-131 interferes with virus entry into epithelial cells: evidence for cell type-specific receptors. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **105**:14118-14123.
- Sacre, K., S. Nguyen, C. Deback, G. Carcelain, J. P. Vernant, V. Leblond, B. Autran, and N. Dhedin.** 2008. Expansion of human cytomegalovirus (HCMV) immediate-early 1-specific CD8⁺ T cells and control of HCMV replication after allogeneic stem cell transplantation. *J. Virol.* **82**:10143-10152.
- Saiki, R. K., P. S. Walsh, C. H. Levenson, and H. A. Erlich.** 1989. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**:6230-6234.
- Saleh, A. J, F. Al Mohareb, F. Al Rabiah, N. Chaudhri, F. Al Sharif, H. Al Zahrani, S. Y. Mohamed, M. Patel, W. Rasheed, Z. Nurgat, M. Bakr, S. Ahmed, S. Zaidi, A. Nasser, K. Ibrahim, H. Al Abdely, M. Aljurf.** 2010. High efficacy and low toxicity of short-course oral valganciclovir as pre-emptive therapy for hematopoietic stem cell transplant cytomegalovirus infection. *Hematol. Oncol. Stem Cell Ther.* **3**:116-120.

- Sallusto, F., D. Lenig, R. Förster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia.** 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. **401**:708-712.
- Sambrook, J., and D. W. Russel.** 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual* 3rd ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saric, T., S.-C. Chang, A. Hattori, I. A. York, S. Markant, K. L. Rock, M. Tsujimoto, and A. L. Goldberg.** 2002. An IFN- γ -induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat. Immunol.* **3**:1169-1176.
- Sarov, I., and I. Abady.** 1975. The morphogenesis of human cytomegalovirus. Isolation and polypeptide characterization of cytomegalovirions and dense bodies. *Virology* **66**:464-473.
- Saveanu L., O. Carroll, Y. Hassainya, and P. Van Endert.** 2005a. Complexity, contradictions, and conundrums: studying post-proteasomal proteolysis in HLA class I antigen presentation. *Immunol. Rev.* **207**:42-59.
- Saveanu L., O. Carroll, V. Lindo, M. Del Val, D. López, Y. Lepelletier, F. Greer, L. Schomburg, D. Fruci, G. Niedermann, and P. M. Van Endert.** 2005b. Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat. Immunol.* **6**:689-697.
- Scalzo, A. A., N. A. Fitzgerald, A. Simmons, A. B. La Vista, and G. R. Shellam.** 1990. *Cmv1*, a genetic locus that controls murine cytomegalovirus replication in the spleen. *J. Exp. Med.* **171**:1469-1483.
- Scalzo, A. A., and W. M. Yokoyama.** 2008. *Cmv1* and natural killer cell responses to murine cytomegalovirus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **321**:101-122.
- Schleiss, M. R..** 2008. Cytomegalovirus vaccine development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **325**:361-382.
- Schleiss, M. R. and T. C. Heineman.** 2005. Progress toward an elusive goal: current status of cytomegalovirus vaccines. *Expert. Rev. Vaccines* **4**:381-406.
- Semmling, V., V. Lukacs-Kornek, C. A. Thaiss, T. Quast, K. Hochheiser, U. Panzer, J. Rossjohn, P. Perlmutter, J. Cao, D. I. Godfrey, P. B. Savage, P. A. Knolle, W. Kolanus, I. Förster, and C. Kurts.** 2010. Alternative cross-priming through CCL17-CCR4-mediated attraction of CTLs toward NKT cell-licensed DCs. *Nat. Immunol.* **11**:313-320.
- 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.

- Shaffer, D. R., C. M. Rooney, and S. Gottschalk.** 2010. Immunotherapeutic options for Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease following transplantation. *Immunotherapy* **2**:663-671.
- Shahinian, A., K. Pfeffer, K. P. Lee, T. M. Kündig, K. Kishihara, A. Wakeham, K. Kawai, P. S. Ohashi, C. B. Thompson, and T. W. Mak.** 1993. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science*. **261**:609-612.
- Sharland, M., S. Luck, P. Griffiths, and M. Cotton.** 2011. Antiviral therapy of CMV disease in children. *Adv. Exp. Med. Biol.* **697**:243-260.
- Shen, L., and K. L. Rock.** 2006. Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class I molecules. *Curr. Opin. Immunol.* **18**:85-91.
- Sigal, L. J., S. Crotty, R. Andino, and K. L. Rock.** 1999. Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* **398**:77-80.
- Simmen, K. A., J. Singh, B.G. Luukkonen, M. Lopper, A. Bittner, N. E. Miller, M. R. Jackson, T. Compton, and K. Fruh.** 2001. Global modulation of cellular transcription by human cytomegalovirus is initiated by viral glycoprotein B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**:7140-7145.
- Simon, C. O., C. K. Seckert, D. Dreis, M. J. Reddehase, and N. K. A. Grzimek.** 2005. Role for tumor necrosis factor alpha in murine cytomegalovirus transcriptional reactivation in latently infected lungs. *J. Virol.* **79**:326-340.
- Simon, C. O., R. Holtappels, H.-M. Tervo, V. Böhm, T. Däubner, S. A. Oehrlein-Karpi, B. Kühnapfel, A. Renzaho, D. Strand, J. Podlech, M. J. Reddehase, and N. K. Grzimek.** 2006. CD8 T cells control cytomegalovirus latency by epitope-specific sensing of transcriptional reactivation. *J. Virol.* **80**:10436-10456.
- Singh, N.** 2006a. Cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: new challenges and their implications for preventive strategies. *J. Clin. Virol.* **35**:474-477.
- Singh, N.** 2006b. Antiviral drugs for cytomegalovirus in transplant recipients: advantages of preemptive therapy. *Rev. Med. Virol.* **16**:281-297.
- Singh, N., J. S. Dummer, S. Kusne, M. K. Breinig, J. A. Armstrong, L. Makowka, M. Startzl, and M. Ho.** 1988. Infections with cytomegalovirus and other herpesviruses in 121 liver transplant recipients: transmission by donated organ and the effect of OKT3 antibodies. *J. Infect. Dis.* **158**:124-131.
- Smith, K. A.** 1984. Interleukin 2. *Annu. Rev. Immunol.* **2**:319-333.

- Smith, K. A.** 1988. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* **240**:1169-1176.
- Smith, H. R. C., J. W. Heusel, I. K. Mehta, K. Sungjin, B. G. Dorner, O. V. Naidenko, K. Iizuka, H. Furukawa, D. L. Beckman, J. T. Pingel, A. A. Scalzo, D. H. Fremont, and W. M. Yokoyama.** 2002. Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **99**:8826-8831.
- Smyth, M. J., K. Takeda, Y. Hayakawa, J. J. Peschon, M. R. van den Brink, and H. Yagita.** 2003. Nature's TRAIL – on a path to cancer immunotherapy. *Immunity* **18**:1-6.
- Snydman, D. R.** 2011. Why did maribavir fail in stem-cell transplants? *Lancet Infect Dis.* **11**:255-257.
- Sodeik B., M. W. Ebersold, and A. Helenius.** 1997. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J. Cell. Biol.* **136**:1007-1021.
- Stagno, S., R. F. Pass, M. E. Dworsky, R. E. Henderson, E. G. Moore, P. D. Walton, and C. A. Alford.** 1982. Congenital cytomegalovirus infection: The relative importance of primary and recurrent maternal infection. *N. Engl. J. Med.* **306**:945-949.
- 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.
- Steininger, C.** 2007. Novel therapies for cytomegalovirus disease. *Recent Pat Antiinfect DrugDiscov* **2**:53-72.
- Stemberger, C., M. Neuenhahn, V. R. Buchholz, and D. H. Busch.** 2007a. Origin of CD8+ effector and memory T cell subsets. *Cell. Mol. Immunol.* **4**:399-405.
- Stemberger, C., and A. Single.** 2007b. Naive CD8+ T Cell Precursor Can Develop into Diverse Effector and Memory Subsets. *Immunity* **27**:985-997.
- Stone, J. D., A. S. Chervin, and D. M. Kranz.** 2009. T-cell receptor binding affinities and kinetics: impact on T-cell activity and specificity. *Immunology* **126**:165-176.
- Stratton, K. R., Durch, J. S., and Lawrence, R. S.** 2001. Vaccines for the 21st Century. A Tool for Decisionmaking. *National Academy press.*
- Streblow, D, S. M. Varnum, R. D. Smith, and J. A. Nelson.** 2006. A proteomics analysis of human cytomegalovirus particles, p.63-89. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses:*

molecular biology and immunology. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.

Sullivan, V., C. L. Talarico, S. C. Stanat, M. Davis, D. M. Coen, and K. K. Biron. 1992. A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells. *Nature* **359**:162-164.

Sung, H, and MR Schleiss. 2010. Update on the current status of cytomegalovirus vaccines. *Expert. Rev. Vaccines* **9**:1303-1314.

Sylwester, A. W., B. L. Mitchell, J. B. Edgar, C. Taormina, C. Pelte, F. Ruchti, P.R. Sleath, K.H. Grabstein, N.A. Hosken, F. Kern, J.A. Nelson, and L.J. Picker. 2005. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J. Exp. Med.* **202**:673-685.

Tang, Q., E. A. 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.

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.

Thäle, R., U. Szepan, H. Hengel, G. Geginat, P. Lucin, and U.H. Koszinowski. 1995. Identification of the mouse cytomegalovirus genomic region affecting major histocompatibility complex class I molecule transport. *J. Virol.* **69**:6098-6105.

Tun, N., N. London, M. K. Kyaw, F. Smithuis, N. Ford, T. Margolis, W. L. Drew, S. Lewallen, and D. Heiden. 2011. CMV retinitis screening and treatment in a resource-poor setting: three-year experience from a primary care HIV/AIDS programme in Myanmar. *J. Int. AIDS Soc.* **14**:41.

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

Varnum, S. M., D. N. Streblow, M. E. Monroe, P. Smith, K. J. Auberry, L. Pasa-Tolic, D. Wang, D. G. Camp, K. Rodland, S. Wiley, W. Britt, T. Shenk, R. D. Smith, and J. A. Nelson. 2004. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J. Virol.* **78**:10960-10966.

ViroPharma:Maribavir Phase III Study Missed Goal;Shares Plunge, CNN Money, February 09, 2009.

- 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.
- Waller, E.C., E. Day, J. G. Sissons, and M. R. Wills.** 2008. Dynamics of T cell memory in human cytomegalovirus infection. *Med. Microbiol. Immunol.* **197**:83-96.
- Walter, E. A., P. D. Greenberg, M. J. Gilbert, R. J. Finch, K. S. Watanabe, E. D. Thomas, and S. R. Riddell.** 1995. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N. Engl. J. Med.* **333**:1038-1044.
- Wang, X., S. M. Huong, M. L. Chiu, N. Raab-Traub, and E. S. Huang.** 2003. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* **424**:456-461.
- Wang, J. P., E. A. Kurt-Jones, O. S. Shin, M. D. Manchak, M. J. Levin, and R. W. Finberg.** 2005. Varicella-zoster virus activates inflammatory cytokines in human monocytes and macrophages via Toll-like receptor 2. *J. Virol.* **79**:12658-12666.
- Wang, D., and T. Shenk.** 2005. Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:18153-18158.
- Webb, J. R., S. H. Lee, and S. M. Vidal.** 2002. Genetic control of innate immune responses against cytomegalovirus: MCMV meets its match. *Genes and Immunity* **3**:250-262.
- Weller, T. H., J. B. Hanshaw, and D. E. 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.
- Whitley, R. J..** 2004. Congenital cytomegalovirus infection: epidemiology and treatment. *Adv. Exp. Med. Biol.* **549**:155-160.
- Wiesel, M., S. Walton, K. Richter, and A. Oxenius.** 2009. Virus-specific CD8 T cells: activation, differentiation and memory formation. *APMIS.* **117**:356-381.
- Wilfinger, W. W., M. 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.

Yurochko, A. D., E. S. Hwang, L. Rasmussen, S. Keay, L. Pereira, and E. S. Huang. 1997. The human cytomegalovirus UL55 (gB) and UL75 (gH) glycoprotein ligands initiate the rapid activation of Sp1 and NF-kappaB during infection. *J. Virol.* **71**:5051-5059.

Publikationen

Paper:

Lemmermann, N. A. W., K. Gergely, V. Böhm, P. Deegen, T. Däubner, and M. J. Reddehase. 2010. Immune evasion proteins of murine cytomegalovirus preferentially affect cell surface display of recently generated peptide presentation complexes. *J Virol.* **84**:1221-1236.

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.* (in preparation).

Abstracts:

Lemmermann, N., K. Gergely, V. Böhm, P. Deegen, M. J. Reddehase, and N. K. Grzimek. 2008. Quantitation and imaging of cytomegalovirus immune evasion. 18. Jahrestagung Gesellschaft für Virologie, Heidelberg, Germany. (oral presentation N. Lemmermann).

Gergely, K. M., S. I. Schader, M. Messerle M. J. Reddehase, and N. A. W. Lemmermann. 2009. Establishment of a murine challenge model for the optimization of immunotherapy and prophylaxis of cytomegalovirus disease. 19. Jahrestagung Gesellschaft für Virologie, Leipzig, Germany. (poster presentation).

K. M. Gergely, S. Becke, S. Aue, N. Büscher, S. Reyda, B. Plachter, M. J. Reddehase, R. Holtappels, and N. A. W. Lemmermann. 2010. Optimization of Immunotherapy of cytomegalovirus disease by combining T cell transfer and vaccination. 4th European Congress of Virology, Cernobbio, Italy. (poster presentation).

K. M. Gergely, S. Becke, B. Plachter, R. Holtappels, M. J. Reddehase, and N. A. W. Lemmermann. 2011. Immunization with recombinant Dense Bodies protects mice from cytomegalovirus infection. 13th International CMV/Betaherpesvirus Workshop, Nürnberg, Germany. (oral presentation).

K. M. Gergely, S. Becke, B. Plachter, R. Holtappels, M. J. Reddehase, and N. A. W. Lemmermann. 2011. Immunization with recombinant Dense Bodies protects mice from cytomegalovirus infection. 9th Annual Meeting of Association for Cancer Immunotherapy, Mainz, Germany. (poster presentation).

Lemmermann N. A. W., K. M. Gergely, B. Plachter, and M. J. Reddehase. 2012. *In vivo* expansion of CMV-specific CD8 T cells by therapeutic vaccination enhances viral control in recipients of hematopoietic stem cell transplantation. 37th Annual International Herpesvirus Workshop, Calgary, Canada. (oral presentation).

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Etablierung eines Challenge-Modells zur Optimierung der Immuntherapie von Cytomegalovirus-Erkrankungen“ am Institut für Virologie der Johannes-Gutenberg Universität Mainz unter Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. Matthias J. Reddehase selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form noch nicht veröffentlicht und noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt worden.

Kerstin Gergely

Mainz, Oktober 2012

Danksagung

Lebenslauf