

Modulation der iNKT-*(invariant natural killer T cells)* Zell-Antwort durch das murine Cytomegalovirus

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Franziska Blaum

Mainz, Dezember 2021

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 08.12.2021

Besser spät als nie! (Mr. Hobbs in: Der kleine Lord von Frances Hodgson Burnett)

Zusammenfassung

Die Rolle von iNKT-Zellen in der CMV-Infektion ist bisher wenig verstanden. Bekannt ist, dass die mCMV-Infektion iNKT-Zellen aktiviert und dass eine zusätzliche Aktivierung mit α GalCer einen positiven Effekt auf die Immunantwort vermittelt (Van Dommelen, S. L. H. et al. 2003). Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von iNKT-Zellen auf die mCMV-Infektion näher analysiert werden. Typ I NKT-Zellen (iNKTs) haben dabei die Fähigkeit, sowohl mit dem angeborenen als auch mit dem adaptiven Immunsystem zu interagieren und über ihre vielfältigen Effektorfunktionen die Immunantwort sowohl zu supprimieren als auch zu fördern. Ziel dieser Arbeit war es daher auch, den Einfluss von iNKTs auf andere, für die mCMV-Kontrolle notwendige, Zelltypen zu analysieren.

Es konnte dargelegt werden, dass es organspezifische Unterschiede in der iNKT-Kontrolle von mCMV gibt. Weitere Unterschiede ließen sich auf den Genotyp zurückführen. So führte ein (i)NKT-*knockout* in C57BL/6, in welchen es zu einer starken NK-Zellaktivierung kommt, zu einer leicht verbesserten Viruskontrolle. In BALB/c, welche die mCMV-Infektion insbesondere über CD8 T-Zellen kontrollieren, hatte ein NKT-*knockout* hingegen kaum Einfluss auf die Viruskontrolle. Die Aktivierung von iNKT-Zellen resultierte in einer frühen, starken IFN γ -Ausschüttung sowie Proliferation und zytotoxischen Aktivität gegen mCMV-infizierte Zellen, und in der Folge einer verbesserten Immunkontrolle. Nach Aktivierung der iNKT-Zellen mittels α GalCer konnte eine signifikante Erhöhung viraler Transkripte in den peripheren LK detektiert werden, zugleich jedoch deutlich verschlechterte CD8 T-Zellfrequenzen. Ein ähnliches Phänomen wurde bereits 2008 im Zusammenhang mit einer mCMV- Δ vRAP-Infektion beschrieben (Böhm et al. 2008b). In Anlehnung an dieses „Immunevasionsparadox“ wurde in dieser Arbeit das Modell postuliert, dass die Aktivierung von iNKT-Zellen zu einer früh verbesserten CD8 T-Zellantwort führt. Dies resultiert in einer früh verbesserten Viruskontrolle, wodurch jedoch die CD8 T-Zellexpansion reduziert wird, da nun weniger antigenes Material zur Verfügung steht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen iNKT-, NK- und CD8 T-Zellen in der mCMV-Infektion belegt werden. Dabei wurde erstmals festgestellt, dass aktivierte iNKT-Zellen neben einem eigenen, antiviralen Effekt, auch Einfluss auf die NK- sowie auf die CD8 T-Zellantwort haben.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass mCMV die CD1d-Expression in MEF reguliert, so dass vermutet werden kann, dass mCMV ein CD1d-regulierendes Immunevasin kodiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher ein einfacher Versuchsaufbau etabliert, um das mCMV-Genom auf dieses Immunevasin zu untersuchen.

Summary

The role of iNKT cells in CMV infection is poorly understood. It is known that mCMV infection activates iNKT cells and that additional activation with α GalCer mediates a positive effect on the immune response (Van Dommelen, S. L. H. et al. 2003). For this reason, the present study aimed to further analyze the influence of iNKT cells on mCMV infection. Type I NKT cells (iNKTs) have the ability to interact with both the innate and adaptive immune system. Their multiple effector functions enable them to both suppress and stimulate the immune response. Therefore, the aim of this work was also to analyze the influence of iNKTs on other cell types necessary for mCMV control.

This study could show, that there are organ-specific differences in iNKT control of mCMV. Further differences could be connected to the genotype. Thus, an (i)NKT knockout in C57BL/6, in which a strong NK cell activation occurs, resulted in slightly improved viral control. In contrast, in BALB/c, which control mCMV infection primarily via CD8 T cells, an NKT knockout had little effect on viral control. Activation of iNKT cells resulted in early, potent IFN γ release as well as proliferation and cytotoxic activity against mCMV-infected cells, and subsequently enhanced immune control. Furthermore, a significant increase in viral transcripts in the peripheral LK was detected after activation of the iNKT cells using α GalCer. At the same time, CD8 T-cell frequencies were significantly reduced. A similar phenomenon was already described in 2008 in the context of mCMV- Δ vRAP infection (Böhm et al. 2008b). Following this "immune evasion paradox", this work postulated the model that activation of iNKT cells leads to an early enhanced CD8 T cell response. This results in early enhanced viral control, however, reducing CD8 T cell expansion as less antigenic material is now available.

In this study, a link between iNKT, NK and CD8 T cells in mCMV infection was demonstrated. It was found for the first time that activated iNKT cells, in addition to their own antiviral effect, have an influence on the NK- as well as on the CD8 T cell response.

Furthermore, in this work, mCMV was shown to regulate CD1d expression in MEF, suggesting that mCMV encodes an immune evasion protein against mCMV. Therefore, a simple system was established to screen the mCMV genome for a CD1d-regulating immune evasin.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	X
1. Einleitung.....	1
1.1. Cytomegaloviren.....	1
1.2. Klinische Relevanz der HCMV-Infektion und Intervention	3
1.2.1. Epidemiologie	3
1.2.2. Pathogenese	3
1.2.3. Therapeutische Ansätze	4
1.3. Die mCMV-Infektion als Modellsystem für die HCMV-Infektion	5
1.4. Immunkontrolle der CMV-Infektion.....	6
1.4.1. Rolle des angeborenen Immunsystems in der CMV-Infektion.....	6
1.4.2. Rolle des adaptiven Immunsystems in der CMV-Infektion	7
1.5. NKT-Zellen	12
1.5.1. Typ I NKT-Zellen (iNKT-Zellen).....	12
1.5.2. Typ II NKT-Zellen (dNKT-Zellen)	17
1.5.3. CD1-Familie.....	18
1.5.4. Aktivierung von iNKT-Zellen	20
1.5.5. Immunantwort der iNKT-Zellen	21
1.5.6. iNKT-Zellen in Virusinfektionen.....	23
1.5.7. iNKT-Zellen in der mCMV-Infektion	24
1.5.8. Untersuchung von NKT-Zellen in der Maus	25
1.6. Ziel der Arbeit	25
2. Material.....	27
2.1. Allgemeine Laborgeräte.....	28

2.2.	Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien	30
2.3.	Chemikalien und andere Reagenzien	32
2.3.1.	Chemikalien.....	32
2.3.2.	Kits	34
2.3.3.	Enzyme	34
2.3.4.	Oligonukleotide.....	34
2.3.5.	Plasmide.....	37
2.3.6.	mCMV Peptide	37
2.3.7.	Antikörper	38
2.4.	Materialien für die Zellkultur	39
2.4.1.	Reagenzien und Medienzusätze.....	39
2.4.2.	Zellkulturmedien	41
2.4.3.	Zelllinien	42
2.5.	Bakterien	43
2.6.	Viren.....	43
2.6.1.	Wildtyp-Isolate	43
2.6.2.	Verwendete Virusrekombinanten	44
2.6.3.	Hergestellte Virusrekombinanten	44
2.7.	Versuchstiere.....	45
3.	Methoden.....	47
3.2.	Zellbiologische Methoden	47
3.2.1.	Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität.....	47
3.2.2.	Kryokonservierung und Reaktivierung von Zellen	47
3.2.3.	Gewinnung von Murinen Embryofetalen Fibroblasten (MEF).....	48
3.2.4.	Transfektion der BAC-Plasmid-DNA und Eliminierung der..... BAC-Vektor Sequenzen.....	49
3.3.	Virologische Methoden	49
3.3.1.	mCMV Produktion	49
3.3.2.	mCMV-Titer Bestimmung.....	50
3.3.3.	Zentrifugale Infektion von MEF	50

3.4.	Molekularbiologische Methoden.....	51
3.4.1.	Bakterien	51
3.4.2.	Transformation kompetenter Bakterien.....	52
3.4.3.	Isolierung von Nukleinsäuren.....	53
3.4.4.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	56
3.4.5.	Enzymatische Restriktion von Nukleinsäuren	56
3.4.6.	Native Gelelektrophorese	56
3.4.7.	Elution von DNA aus Agarosegelen.....	57
3.4.8.	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	57
3.4.9.	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	58
3.4.10.	Quantitative real-time PCR (qPCR).....	59
3.4.11.	Red-vermittelte markerlose DNA-Rekombination zur Generierung rekombinanter mCMV.....	60
3.5.	Tierexperimentelle Methoden	64
3.5.1.	<i>In vivo</i> Depletion von NK- und/oder CD8 T-Zellen	64
3.5.2.	Aktivierung von iNKT-Zellen in der Maus.....	65
3.5.3.	Infektion der Maus mit mCMV.....	65
3.5.4.	Organentnahme und Probenkonservierung	65
3.5.5.	Blutentnahme und Serumisolierung	65
3.6.	Immunologische Methoden.....	66
3.6.1.	Ex vivo Isolation von Lymphozyten aus Milz oder Lymphknoten.....	66
3.6.2.	Immunomagnetische Anreicherung von CD8 T-Zellen.....	66
3.6.3.	ELISpot (enzyme linked immuno spot) Assay	67
3.6.4.	Zytofluorometrische Analyse.....	67
3.6.5.	Maus Cytokin Array	70
3.6.6.	Maus IFN γ ELISA	70
3.7.	Immunhistochemie (IHC)	71
3.8.	Statistische Analyse.....	71
4.	Ergebnisse.....	72
4.1.	Einfluss von iNKT-Zellen auf die mCMV-Infektion in C57BL/6	72

4.1.1.	Aktivierung von iNKT-Zellen nach mCMV-Infektion.....	72
4.1.2.	Viruskontrolle in (i)NKT-defizienten Tieren (C57BL/6).....	75
4.2.	Einfluss von (i)NKT-Zellen auf die mCMV-Infektion in BALB/c.....	79
4.2.1.	mCMV-Replikation in NKT-defizienten Tieren.....	79
4.2.2.	Virale Transkription im drainierenden Lymphknoten	80
4.2.3.	CD8 T-Zellantwort in (i)NKT-defizienten Tieren	81
4.3.	Einfluss aktivierter iNKT-Zellen auf die mCMV-Infektion in BALB/c.....	82
4.3.1.	mCMV-Replikation nach Aktivierung von iNKT-Zellen	83
4.3.2.	Einfluss aktivierter iNKT-Zellen auf die Viruskontrolle bei zusätzlicher NK- und CD8 T-Zelldepletion.....	84
4.3.3.	Virale Transkripte nach Aktivierung von iNKT-Zellen	89
4.3.4.	Einfluss von aktivierten iNKT- auf CD8 T-Zellen	91
4.3.5.	Analyse der Zytokinkonzentration im Serum.....	93
4.3.6.	Einfluss aktivierter iNKT-Zellen in der Δ vRAP-Infektion	99
4.4.	iNKT-Immunevasion von mCMV.....	103
4.4.1.	Einfluss der mCMV-Infektion auf die CD1d-Zelloberflächenexpression.....	103
4.4.2.	Herstellung der Virusrekombinanten mCMV- Δ m01- Δ m10,	
	- Δ m11- Δ m19, - Δ m141- Δ m150 und - Δ m151- Δ m158	106
5.	Diskussion	112
5.1.	Einfluss von (i)NKT-Zellen auf die mCMV-Immunkontrolle.....	112
5.1.1.	iNKT- <i>knockout</i> zeigt unterschiedlichen Einfluss auf die	
	Viruskontrolle in verschiedenen Mausstämmen	112
5.1.2.	Aktivierte iNKT-Zellen unterstützen die mCMV-Kontrolle	116
5.1.3.	Aktivierte iNKT-Zellen führen zu reduzierten CD8 T-Zellfrequenzen	
	in BALB/c.....	117
5.1.4.	Die Aktivierung von iNKT-Zellen führt zu einer raschen Erhöhung	
	der IFN γ -Konzentration im Serum.....	118
5.1.5.	Kein therapeutischer Effekt von α GalCer nach Infektion mit	
	mCMV- Δ vRAP in der Milz.....	119
5.2.	mCMV-kodiertes iNKT-Immunevasin.....	122

5.2.1. CD1d wird nach mCMV-Infektion von der Oberfläche von	
MEFs runterreguliert	122
5.2.2. Großräumige mCMV-Deletionsmutanten konnten hergestellt werden.....	123
5.3. Fazit und Ausblick.....	124
6. Literaturverzeichnis.....	125
Danksagung	CLXI
Lebenslauf	CLXII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
Abb. 1.1	Entwicklung von iNKT-Zellen.	16
Abb. 3.1	Schematische Darstellung der Red-vermittelten markerlosen DNA-Rekombination.	62
Abb. 4.1	Interferon-Induktion von iNKT- und NK-Zellen nach mCMV-Infektion in der Milz.	73
Abb. 4.2	Interferon-Induktion von iNKT- und NK-Zellen nach mCMV-Infektion in der Leber.	74
Abb. 4.3	Virusreplikation in B6.WT-, B6.CD1d ^{-/-} - und B6.Ja18 ^{-/-} - Mäusen.	76
Abb. 4.4	Virale Transkripte in (i)NKT-defizienten Mausstämmen.	77
Abb. 4.5	mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort in B6.WT, B6.CD1d ^{-/-} und B6.Ja18 ^{-/-} .	78
Abb. 4.6	Virusreplikation in BALB/c- und BALB/c.CD1d ^{-/-} -Mäusen.	80
Abb. 4.7	Virale Transkripte in BALB/c- und BALB/c.CD1d ^{-/-} -Mäusen.	81
Abb. 4.8	mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort in NKT-defizienten BALB/c-Tieren.	82
Abb. 4.9	Virusreplikation in BALB/c- und BALB/c.CD1d ^{-/-} -Mäusen nach vorheriger Aktivierung der iNKT-Zellen mittels α GalCer.	84
Abb. 4.10	iNKT-Zellen und NK-Zellen nach Depletion mit α -asialo GM1.	86
Abb. 4.11	Experimentelles System zur Analyse des Einflusses von CD8 T- und NK-Zellen zur verbesserten mCMV-Kontrolle nach Aktivierung von iNKT-Zellen.	87
Abb. 4.12	Virusreplikation nach vorheriger NK- und/oder CD8 T-Zelldepletion und Aktivierung der iNKT-Zellen.	88
Abb. 4.13	Virale Transkripte nach vorheriger NK- bzw. CD8 T-Zelldepletion und Aktivierung der iNKT-Zellen.	90
Abb. 4.14	Virale Transkripte 72 Stunden nach Infektion und Aktivierung der iNKT-Zellen in BALB/c und BALB/c.CD1d ^{-/-} -Tieren.	91
Abb. 4.15	mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort in BALB/c.	92
Abb. 4.16	Analyse der IFN γ -Konzentration.	94
Abb. 4.17	Analyse der Serumzytokine in BALB/c.	96
Abb. 4.18	Organvirustiter nach Infektion mit mCMV-WT.BAC ^W bzw. mCMV- Δ vRAP bei vorheriger Aktivierung der iNKT-Zellen.	100
Abb. 4.19	Virale Replikation nach Infektion mit mCMV- Δ vRAP und zusätzlicher Aktivierung der iNKT-Zellen.	102
Abb. 4.20	CD1d-Oberflächenexpression.	104
Abb. 4.21	Virusrekombinanten.	106
Abb. 4.22	Herstellung der Virusrekombinanten.	109
Abb. 4.23	Chromatogramme der hergestellten mCMV-Deletionsmutanten.	110
Abb. 5.1	Modell des iNKT-Netzwerkes in der mCMV-Infektion.	115
Abb. 5.2	Modell des iNKT-Netzwerkes nach Aktivierung der iNKT-Zellen in der mCMV-Infektion.	121

Tabellenverzeichnis

Tabelle	Titel	Seite
Tab. 4.1	Übersicht über die Funktionen der iNKT-Zell-induzierten Zytokine.	97/98
Tab. 4.2	Bekannte Effekte der ORFs der m02- und m145-Genfamilien	107
Tab. 4.3	Oligonukleotide zur Überprüfung der BAC-Mutagenese	108
Tab. 4.4	Virusrekombinanten mit erfolgreicher Deletion nach Analyse im Agarosegel	109

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A	
Abb.	Abbildung
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
AP	Adapter Protein
APC	antigenpräsentierende Zellen
AS	Aminosäure
AT	Adoptiver Transfer
α GalCer	α -Galactosylceramid
B	
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
B6	C57BL/6
β 2m	β 2-Mikroglobulin
C	
C	Celsius
Cam	Chloramphenicol
cDC	konventionelle Dendritische Zelle
cDNA	komplementären DNA
CEI,	<i>Centrifugal Enhancemet of Infectivity</i>
CID	<i>cytomegalic inclusion disease</i>
CMV	Cytomegalovirus
CO ₂	Kohlendioxid
CTL	Zytotoxische T Lymphozyten
CTLL	Zytotoxische T Lymphozyten-Linie
D	
DAMPs	<i>damage-associated molecular patterns</i>
DC	Dendritische Zelle
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNKT	diverse Natürliche Killer T-Zellen
ds	doppelsträngig

E

e	<i>early</i>
EAE	Experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr Virus
EGFR	<i>Epidermal-Growth-Factor-Receptor</i>
ELISpot Assay	<i>Enzyme linked Immunospot-Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAAP	<i>ER aminopeptidase associated with antigen processing</i>
ERGiC	<i>ER/Golgi intermediate compartment</i>
E4BP4	E4-Promotor bindende Protein 4

F

FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> / Durchflusszytometrie
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

G

g	Erdbeschleunigung
gB	Glykoprotein B
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierende Faktor
GvHD	<i>Graft versus Host Disease</i>

H

h	hour
HAART	<i>highly active antiretroviral therapy</i>
HBV	Hepatitis B-Virus
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPV	Humanes Papillomavirus
HSV	Herpes-Simplex-Virus
H ₂ O	Wasser

I

IE	<i>Immediate Early</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNKT	Invariante Natürliche Killer T-Zellen
iNKT _{FH}	follikuläre iNKT-Helferzellen
i.p.	intraperitoneal

i.v.	intravenös
K	
Kan	Kanamycin
kbp	Kilo-Basenpaar
KMT	Knochenmarkstransplantation
KSHV	Kaposi Sarkom-assoziiertes Herpesvirus
kV	Kilovolt
L	
L	<i>Late</i>
LK	Lymphknoten
Log	Logarithmus
LT β R	Lymphotoxin- β -Rezeptors
M	
M	Molar
mCMV	murines Cytomegalovirus
MEF	murine embryonale Fibroblasten
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIEPE	<i>major immediate early promotor enhancer</i>
min	Minute
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MPN	<i>most probable number</i>
M Φ	Makrophage
N	
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
NKT	Natürliche Killer T-Zellen
NF κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
O	
ORF	<i>open reading frame,</i>
OD	Optische Dichte
P	
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>

PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFU	<i>Plaque Forming Unit</i>
p.i.	<i>post infection</i>
PLZF	<i>promyelocytic leukaemia zinc finger</i>
pMHC-I-Komplex	MHC-I gebundene Peptide
profAPC	professionelle antigenpräsentierende Zelle
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i>

Q

qPCR	<i>Real-time</i> quantitative PCR
------	-----------------------------------

R

RNA	Ribonukleinsäure
RORyt	<i>RAR-related orphan receptor</i>
RSV	Respiratorische Synzytial-Virus
RT-qPCR	Reverse Transkription qPCR
Runx1	<i>Runt-related transcription factor 1</i>

S

SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
S1P-R	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor

T

TAP	<i>transporter associated with antigen presentation</i>
TGF β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
TLR	<i>toll-like</i> Rezeptoren
TMEV	Theiler's murines Enzephalomyelitis Virus
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TZR	T-Zell-Rezeptor
T _{FH}	Follikuläre T-Helferzellen
T _H C	T-Helferzellen
T _{reg}	regulatorische T-Zellen

U

u.a.	unter anderem
------	---------------

Ü.N.	Über Nacht
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	ultraviolett
V	
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
vRAPs	<i>viral regulators of antigen presentation</i>
VZV	Varizella-Zoster Virus
W	
WT	Wildtyp
Z	
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
z.T.	Zum Teil
ZZ	Zellzahl

1. Einleitung

Die ubiquitär verbreitete Familie der *Herpesviridae* umfasst mehr als 200 beschriebene Spezies (Roizman et al. 1981). Neben einer einheitlicher Architektur des Viruspartikels (Plummer 1967; Roizmann et al. 1992) teilen ihre Mitglieder dabei vier signifikante biologische Eigenschaften:

- I. Kodierung spezifischer Enzyme, welche am Nukleinsäuremetabolismus (z.B. Thymidinkinase, dUTPase), bei der DNA-Synthese (z.B. DNA-Polymerase, Helikase) und Prozessierung (Proteinkinasen) beteiligt sind.
- II. Synthese von viraler DNA und Kapsiden im Nukleus.
- III. Lyse der infizierten Zelle während der produktiven Infektion.
- IV. Etablierung von Latenz. Diese ist definiert als das Überdauern viraler Genome in einem nicht-replikativen Zustand im Wirt nach Kontrolle der Primärinfektion (Pellett und Roizman 2007). Die Reaktivierung der viralen Genome aus der Latenz kann zu einer rekurrenten Infektion mit erneuter Virämie und Ausscheidung infektiöser Virionen führen (Roizman und Sears 1987; Roizman und Baines 1991).

Die Familie der *Herpesviridae* wird, basierend auf biologischen Eigenschaften wie Wirtsspektrum, Replikationszyklusdauer und Zelltropismus (Roizman et al. 1981) sowie den Vergleich der DNA-Sequenzen und viraler Proteine (Pellett und Roizman 2007) in die drei Subfamilien α -, β - und γ -*Herpesvirinae* unterteilt.

1.1. Cytomegaloviren

Cytomegaloviren (*human*: HCMV; *murin*: mCMV) sind große, Säugetier-infizierende DNA-Viren der Unterfamilie β -*Herpesvirinae*. Namensgebend war die beobachtete drastische Zellvergrößerung CMV-infizierter Zellen (Zytomegalie) (Weller et al. 1960).

Die Virionen (\emptyset 150 bis 200nm) von Cytomegaloviren besitzen den für die Familie der *Herpesviridae* typischen Aufbau: dsDNA, Nukleokapsid, Tegument sowie eine umhüllende Lipiddoppelschicht. Das lineare dsDNA-Genom im Inneren des Virions ist mit einer fibrillären Proteinmatrix komplexiert (*core*, \emptyset ~ 75nm) und wird von einem ikosaedrischen Nukleokapsid (\emptyset ~100nm) umhüllt (Roizmann et al. 1992; Chen et al. 1999a). Das Tegument besteht aus einer amorphen Proteinmatrix mit etwa 20-25 verschiedenen viralen Phosphoproteinen. Zusätzlich enthält das Tegument eine Reihe viraler und zellulärer RNA (Baldick und Shenk 1996; Gibson 1996; Terhune et al. 2004). Nach außen wird das Virion durch eine etwa 11nm dicke Lipid-Doppelschicht (*envelope*) abgegrenzt (Tooze et al. 1993).

In diese sind zelluläre und virale Glykoproteine eingelagert, wobei letztere das virale *Attachment* sowie die Penetration der Wirtszelle vermitteln. Weiterhin besitzen sie wichtige Funktionen bei der Virionreifung und der Induktion der CMV-spezifischen, humoralen Immunantwort (Britt und Mach 1996; Feire und Compton 2013; Mocarski et al. 2013).

Das dsDNA-Genom der Cytomegaloviren hat eine Länge von mehr als 230kbp. Die Proteinkodierende Kapazität von HCMV wird allgemein zwischen 165 (Dolan et al. 2004) bis ca. 200 (Novotny et al. 2001) angegeben. Für das mCMV-Genom werden mindestens 170 offene Leserahmen (*open reading frames*, ORFs) beschrieben (Rawlinson et al. 1996; Tang et al. 2006). In einer Studie von 2012 wurde allerdings unter Verwendung von *ribosome profiling* festgestellt, dass bei Berücksichtigung von alternativen Transkript-Startpunkten, die Kodierungskapazität von HCMV bei über 700 ORFs liegt (Stern-Ginossar et al. 2012). Den meisten ORFs und ihren Genprodukten konnte bisher noch keine Funktion zugeordnet werden. Die Homologien zwischen mCMV und HCMV erstrecken sich auf 78 homologe ORFs, die vorrangig im zentralen Bereich beider Genome lokalisiert sind. Diese können sowohl sequenz- als auch positionshomolog sein (Landolfo et al. 2003).

Wie bei allen Herpesviren ist die CMV-Genexpression kaskadenartig reguliert. Die dadurch entstehende, zeitliche Koordination der Genexpression erlaubt die Einteilung der CMV-Infektion in die Phasen *Immediate Early* (IE), *Early* (E) und *Late* (L) (Honess und Roizman 1974; Emery und Griffiths 1990; Mocarski et al. 2013). Unmittelbar nach dem Eintritt der viralen DNA in den Zellkern beginnt die IE-Phase. Zelluläre Transkriptionsfaktoren binden an den *major immediate early promotor enhancer* (MIEPE)-Komplex und initiieren die Transkription der IE-Gene *ie1*, *ie2* und *ie3* bei mCMV bzw. *ie1* und *ie2* bei HCMV (Stenberg et al. 1984; Meier und Stinski 2006; Mocarski et al. 2013). Die Transkription der IE-Gene erfolgt durch die zelluläre RNA-Polymerase II und ist daher unabhängig von der *de novo*-Synthese anderer viraler Proteine. Virale Tegumentproteine unterstützen diese erste Phase der Infektion (Mocarski et al. 2013). Die IE-Proteine modulieren den Wirtszellmetabolismus und steuern die koordinierte Expression der E-Gene (Keil et al. 1984; Bühler et al. 1990; Busche et al. 2008). In Fibroblasten beginnt etwa zwei Stunden nach mCMV- bzw. 4-24 Stunden nach HCMV-Infektion die E-Phase. Die Genprodukte der E-Phase, wie die virale DNA-Polymerase, sind für den Start der viralen DNA-Replikation notwendig mit deren Beginn die Infektion in die L-Phase übergeht, in der abschließend ein Großteil der Strukturproteine synthetisiert wird (Honess und Roizman 1974; Emery und Griffiths 1990). In Zellkultur beträgt die Dauer des viralen Infektionszyklus etwa 24 Stunden (mCMV) bzw. 48-72 Stunden (HCMV). Während dieser Zeit findet ein vollständiger Replikationszyklus von der Infektion bis zur Virusfreisetzung statt (Mocarski et al. 2013).

1.2. Klinische Relevanz der HCMV-Infektion und Intervention

1.2.1. Epidemiologie

Die Seroprävalenz des ubiquitär verbreiteten HCMV ist abhängig von Alter und sozioökonomischen Faktoren, wobei sich der Anteil der Infizierten umgekehrt proportional zu dem sozioökonomischen Status verhält (Staras et al. 2006; Enders et al. 2012). Für Deutschland ermittelten Lachmann und Mitarbeiter (Lachmann et al. 2018) eine Seroprävalenzrate von 56,7%, wohingegen in Entwicklungsländern die Durchseuchungsrate bereits im Kindesalter bei annähernd 100% liegen kann (zur Übersicht: Adland et al. 2015; Bates und Brantsaeter 2016). Grund für die unterschiedliche Prävalenz der HCMV-Infektion sind die viralen Übertragungswege, welche zumeist horizontal über direkten Körperkontakt als Tröpfchen- oder Schmierinfektion erfolgt. Infektiös sind Muttermilch, Speichel, Urin, Sperma, Zervixsekret sowie Blut. Weiterhin ist auch eine vertikale transplazentale Infektion eines Embryos oder Fetus möglich (Pass 1985; Gandhi und Khanna 2004; Cannon und Davis 2005; Mocarski et al. 2013).

1.2.2. Pathogenese

Im immunkompetenten Individuum wird die primäre HCMV-Infektion effizient und innerhalb kurzer Zeit durch die angeborene und adaptive Immunabwehr kontrolliert. Nur in seltenen Fällen ist eine Symptomatik, ähnlich der einer infektiösen Mononukleose zu beobachten (Kääriäinen et al. 1966; Klemola et al. 1970). Nach Terminierung der produktiven Infektion kommt es zur Etablierung lebenslanger Latenz, die von Reaktivierungsperioden unterbrochen sein kann. CMV-Genome persistieren dabei in Monozyten und Endothelzellen (Jarvis und Nelson 2002; Adland et al. 2015; Wills et al. 2015). Infektiöse Virionen können sowohl während der Primärinfektion als auch während der Reaktivierungsphasen, die ebenfalls meist klinisch inapparent verlaufen, ausgeschieden werden (zur Übersicht: Dupont und Reeves 2016). Demgegenüber kann die Infektion eines immunsupprimierten oder immunologisch unreifen Individuums zu schweren klinischen Manifestationen führen (Reddehase 2002):

Die kongenitale CMV-Infektion immunologisch unreifer Embryonen und Föten kann durch eine Primärinfektion der Mutter, durch die Reaktivierung einer latenten Infektion oder durch eine Superinfektion der seropositiven Mutter mit einem weiteren HCMV-Serotyp verursacht werden (Ross et al. 2006). Die Inzidenz liegt bei etwa 0,2-2,3% aller Schwangerschaften (Cannon und Pellett 2005; Boppana et al. 2011). Auch wenn das Risiko einer vertikalen Transmission mit etwa 30% nach einer Primärinfektion deutlich höher ist als im Vergleich

nach einer rekurrenten Infektion (Enders et al. 2011; Picone et al. 2013), ist davon auszugehen, dass etwa 75% der kongenitalen CMV-Infektionen durch eine rekurrente, maternale Infektion verursacht werden (Ross et al. 2006; Mussi-Pinhata et al. 2009; Wang et al. 2011; Britt 2015). Dies ist vor allem auf die hohe HCMV-Prävalenz in der Bevölkerung zurückzuführen (de Vries, J. J. C. et al. 2013; Leruez-Ville et al. 2017). In den meisten Fällen verläuft die CMV-Infektion asymptomatisch, nur etwa 10-15% der infizierten Neugeborenen zeigen Symptome. Dennoch ist die HCMV-Infektion die häufigste, virale kongenitale Infektion (Stagno et al. 1986; Ross et al. 2006; Britt 2011). Der Schweregrad der Symptomatik einer pränatalen CMV-Infektion hängt u.a. vom Zeitpunkt der Infektion ab. Die gravierendsten Folgen werden durch eine Infektion im ersten Trimenon verursacht, da die Organogenese in diesem Stadium noch nicht abgeschlossen ist (Ludwig und Hengel 2009; Britt 2011). Symptome sind Petechien der Haut, Ikterus, Hepatosplenomegalie, Thrombozytopenie, Pneumonie oder Chorioretinitis aber auch irreversible Schädigungen des zentralen Nervensystems (ZNS), in deren Folge lebenslang anhaltende neurologische Schädigungen wie Mikroenzephalie, Verlust des Seh- und/oder Hörvermögens und Entwicklungsstörungen auftreten können (Boppana et al. 1992; Dahle et al. 2000; Swanson und Schleiss 2013).

Eine symptomatische HCMV-Infektion kann auch bei Patienten mit angeborener (z.B. *severe combined immunodeficiency (SCID)-syndrome*) oder erworbener Immunschwäche (z.B. *acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*) (Moskowitz et al. 1985; Drew 1992) sowie bei Patienten unter immunsuppressiver Behandlung auftreten (Dowling et al. 1976; Neiman et al. 1977). Vor Einführung der HAART (*highly active antiretroviral therapy*) entwickelten 20-40% der erwachsenen AIDS-Patienten eine CMV-Erkrankung. Bis heute ist die HCMV-Infektion im Zusammenhang mit AIDS eine häufige opportunistische Infektion (Adland et al. 2015). Häufig auftretende Manifestationen sind interstitielle Pneumonie, Kolitis, Gastroenteritis, Hepatitis und Retinitis (Mocarski et al. 2013) bzw. eine signifikante Funktionsminderung des transplantierten Organs und sogar dessen Abstoßung (Waiser et al. 1998; Hartmann et al. 2006).

1.2.3. Therapeutische Ansätze

Bisher konnte noch kein wirksamer Impfstoff gegen eine HCMV-Infektion entwickelt werden. Medikamente, welche für eine therapeutische Intervention bei CMV-Infektion zugelassen sind, hemmen in der Regel die virale DNA-Replikation (Boeckh und Geballe 2011). Am häufigsten eingesetzt wird Ganciclovir. Durch die CMV-spezifische Kinase pUL97 wird dieses Nukleosidanalogen zu Ganciclovir-5'-Monophosphat phosphoryliert. Mithilfe zellulärer Kinasen entsteht das aktive Ganciclovirtriphosphat, welches von der

viralen DNA-Polymerase pUL54 als Substrat akzeptiert wird. Der Einbau dieses Guaninanalogen führt zum Abbruch der viralen DNA-Synthese und damit zu einer Reduktion der viralen Replikation (Michel et al. 2013). Weitere zugelassene Virostatika für die Behandlung einer HCMV-Infektion sind Foscarnet (blockiert nicht-kompetitiv die virale DNA-Polymerase durch Bindung an die Pyrophosphat-Bindungsstelle (Michel et al. 2013)) und Cidofovir (inhibiert kompetitiv die virale DNA-Polymerase pUL54 (Lalezari 1997)). Allen drei bisher genannten Virostatika ist, neben ihren starken Nebenwirkungen (z.B. Myelotoxizität, Nephrotoxizität (Wagstaff und Bryson 1994; Crumpacker 1996; Lalezari 1997)) gemein, dass bei langfristiger Gabe durch Mutationen an pUL54 (Ganciclovir, Foscarnet, Cidofovir) bzw. an pUL97 (Ganciclovir) Resistenzen entstehen (Chou 2001; Biron 2006). Letermovir wurde Ende 2017 von der US-amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) bzw. 2018 in der EU zugelassen. Verwendet wird es insbesondere als Prophylaxe von CMV-Infektionen im Zusammenhang mit allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantationen (HSCT). Letermovir hemmt auf bisher unbekannte Weise die Untereinheit pUL56 der viralen Terminase, welche die DNA-Konkatamere vor ihrer Verpackung in die Kapside schneidet. Dadurch wird die virale Replikation unterbrochen. An Nebenwirkungen wurden bisher unter anderem Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Durchfall oder periphere Ödeme beschrieben (Chemaly et al. 2014; Melendez und Razonable 2015; Marty et al. 2017). Bisher eher selten auftretende Resistenzbildungen konnten auf Varianten im CMV UL56 Gen zurückgeführt werden, welche mit einer reduzierten Suszeptibilität gegenüber Letermovir assoziiert waren (Douglas et al. 2020).

1.3. Die mCMV-Infektion als Modellsystem für die HCMV-Infektion

Aufgrund der strikten Speziespezifität aller CMVs, ist eine Untersuchung der HCMV-Infektion im Tiermodell nicht möglich. Das murine CMV teilt jedoch zahlreiche genetische, immunologische und strukturelle Eigenschaften mit seinem humanen Pendant (Rawlinson et al. 1996; Reddehase 2002). Neben zahlreichen homologen viralen Proteinen (Kattenhorn et al. 2004) und einem ähnlichen Gewebetropismus (Podlech et al. 1998; Sinzger et al. 2008), ist insbesondere die Pathogenese der Infektion sowohl im immunkompetenten als auch im immunsupprimierten Wirt gut vergleichbar (Reddehase et al. 1985; Alcamí und Koszinowski 2000; Podlech et al. 2000; Krmpotic et al. 2003). Beide Viren etablieren lebenslange Latenz, wobei Lunge und Speicheldrüse die Hauptzielorgane darstellen (Baltesen et al. 1993; Reddehase et al. 2002; Reddehase und Lemmermann 2019). Die Immunkontrolle der Infektion erfolgt für beide Viren mit vergleichbarer Kinetik und wird primär durch CD8 T-Zellen vermittelt (Reddehase 2002). Sowohl HCMV als auch mCMV modulieren dabei effizient die Immunantwort des Wirtes, insbesondere die CD8 T-Zell-

vermittelte Immunkontrolle (Reddehase 2002; Reddehase und Lemmermann 2018). Die hierfür kodierenden Immunevasionsgene beider Viren weisen zwar keine Homologien auf, es haben sich jedoch analoge Mechanismen entwickelt, die eine Übertragung der im Mausmodell erworbenen Erkenntnisse auf die HCMV-Infektion erlauben. Daher kann die Untersuchung der mCMV-Infektion der Maus als Modell für die klinisch relevante HCMV-Infektion dienen (Reddehase und Lemmermann 2018, 2019).

1.4. Immunkontrolle der CMV-Infektion

Die CMV-Primärinfektion wird im immunkompetenten Wirt effizient sowohl vom angeborenen als auch vom adaptiven Immunsystem kontrolliert. In den ersten Tagen der akuten CMV-Infektion erfolgt die immunologische Kontrolle vorrangig durch natürliche Killer (NK)-Zellen (Bukowski und Welsh 1985a; Arase et al. 2002; Jonjić et al. 2006; Vidal et al. 2013). Diese können die CMV-Infektion jedoch nicht dauerhaft kontrollieren, so dass die Etablierung einer adaptiven Immunantwort zwingend für die Terminierung und langfristige Kontrolle der Infektion notwendig ist (Reddehase 2002; Holtappels et al. 2006).

1.4.1. Rolle des angeborenen Immunsystems in der CMV-Infektion

Neben Makrophagen, Dendritischen Zellen (DC), Granulozyten und NK-Zellen gehören auch zahlreiche Zytokine, Chemokine und Plasmaproteine zum angeborenen Immunsystem. Als primäre Verteidigungslinie beeinflussen sie Wachstum und Dissemination von Pathogenen und können die adaptive Immunantwort regulieren. Mithilfe von *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) können diese Immunzellen infizierte oder transformierte Zellen erkennen, wobei die Detektion durch spezialisierte Rezeptoren, sog. *Pattern recognition receptors* (PRRs) erfolgt, die auf verschiedensten Zellen des Immunsystems exprimiert werden (Akira et al. 2006; Lotze et al. 2007). Die bekanntesten PRRs sind die sogenannten *toll-like* Rezeptoren (TLR). Über diese werden von Phagozyten und DCs in der frühen mCMV-Infektion virale Produkte erkannt, was zur Initiierung der frühen antiviralen Immunantwort führt. Diese beinhaltet die Freisetzung von Typ-I-Interferonen (IFN α : v.a. von Leukozyten exprimiert; IFN β : von nahezu allen kernhaltigen Zellen produziert) und inflammatorischen Zytokinen (z.B. Interleukin (IL)-12) (Nguyen et al. 2002), welche wiederum die frühe Interferon (IFN) γ -Produktion (Typ-II-IFN, u.a. von CD4 T-, CD8 T- und NK-Zellen exprimiert) und Zytolyse durch NK-Zellen anregen (zur Übersicht: Picarda und Benedict 2018). IFN induzieren zudem die *major histocompatibility complex class I* (MHC-I)-Genexpression (Bukowski und Welsh 1985b; Korber et al. 1987).

NK-Zellen sind die Haupteffektorzellen der angeborenen Immunantwort bei einer CMV-Infektion (Noda und Tanaka 2006). Sie vermitteln ihre antivirale Aktivität durch Sekretion von Zytokinen (u.a. IFN γ , TNF α , IL-5, IL-10, IL-13) und Chemokinen. Über die Exozytose von Perforin und Granzym (Loh et al. 2005) oder durch Aktivierung apoptotischer Signalwege (z.B. Fas/FasL-*Signaling*) sind NK-Zellen zur direkten Zytolyse von Zielzellen befähigt (Nagata 1997; Chávez-Galán et al. 2009). Auch sind sie an Initiation und Aufrechterhaltung der adaptiven Immunantwort beteiligt (Jonjić et al. 2006). Ihre Aktivierung unterliegt einem Zusammenspiel von inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren (Ortaldo und Young 2005; Kirwan und Burshtyn 2007; Tyznik et al. 2014).

Die effiziente NK-Zell-Kontrolle einer CMV-Infektion ist u.a. durch den Genotyp des Wirtes determiniert. Dies wird an der unterschiedlichen mCMV-Suszeptibilität von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen deutlich, welche sich auf das *CMV-1*-Allel (*CMV1r*) innerhalb des NK-Lokus zurückführen lässt (Allan und Shellam 1984; Scalzo et al. 1990). Im B6-Mausstamm kodiert dieses Allel für den aktivierenden NK-Zell-Rezeptor Ly49H (*Klra8*, *killer cell lectin-like receptor 8*) (Scalzo et al. 1990; Brown et al. 2001; Lee et al. 2001b). Dieser bindet an das Genprodukt des viralen ORFs *m157* und vermittelt so die Erkennung von mCMV-infizierten Zellen (Brown et al. 2001; Arase et al. 2002; Smith et al. 2002; Jonjić et al. 2006). Im mCMV-sensitiven Mausstamm BALB/c, welcher den Ly49H-Rezeptor nicht exprimiert (Brown et al. 2001; Lee et al. 2001b), werden während der akuten Infektionsphase deutlich höhere Virustiter und in der Latenz vermehrte Reaktivierungen nachgewiesen (Jonjić et al. 2006; Vidal und Lanier 2006). Ähnliches konnte in B6 auch nach Deletion von *m157* beobachtet werden (Bubić et al. 2004).

Beim Menschen konnte eine NK-Zell-Defizienz mit einem schwerwiegenderen Verlauf der HCMV-Primärinfektion und einer erhöhten Zahl an Reaktivierungen in Verbindung gebracht werden (Biron et al. 1989). In Transplantatrecipienten ist eine niedrige zytotoxische Aktivität der NK-Zellen mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Venema et al. 1994).

1.4.2. Rolle des adaptiven Immunsystems in der CMV-Infektion

1.4.2.1. B-Lymphozyten

Antikörper-sezernierende B-Zellen sind nur von untergeordneter Bedeutung für die Kontrolle einer CMV-Primärinfektion. Während einer rekurrenten Infektion limitieren die Antikörper aber die Virus-Dissemination und vermitteln Schutz gegen sekundäre CMV-Infektionen oder Reaktivierungen (Jonjić et al. 1994; Wirtz et al. 2008).

1.4.2.2. T-Lymphozyten

Bei T-Lymphozyten handelt es sich um hochspezifische Effektorzellen, welche eine wichtige Rolle bei der Kontrolle intrazellulärer Pathogene spielen. Auf ihrer Oberfläche exprimieren sie Rezeptoren, die antigene Peptide, die auf MHC-Molekülen präsentiert werden, erkennen. Die hohe Diversität der T-Zell-Rezeptoren (TZR) ermöglicht die Erkennung einer Vielzahl von antigenen Peptiden. Anhand der Zusammenstellung des TZR lassen sich T-Zellen in zwei Gruppen einteilen: $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen. Zu ersteren gehören die beiden großen Populationen der zytolytischen T-Zellen (CTL) und T-Helferzellen (T_HC), sowie regulatorische T-Zellen (T_{reg}). Auch NKT-Zellen (*natural killer* T-Zellen) exprimieren einen $\alpha\beta$ TZR. Ihre Zuordnung zum adaptiven oder angeborenen Immunsystem ist jedoch nicht eindeutig möglich, da NKT-Zellen auch Eigenschaften von NK-Zellen zeigen. Aus diesem Grund wird diese Zellpopulation in einem gesonderten Kapitel behandelt (1.5).

1.4.2.2.1. $\alpha\beta$ T-Zellen

Aufgrund der Expression des Co-Rezeptors CD8 werden CTLs auch als CD8 T-Zellen bezeichnet bzw. T_HC entsprechend CD4 T-Zellen. CD8 T-Zellen erkennen Peptid-beladene MHC-I-Moleküle, CD4 T-Zellen hingegen erkennen MHC-Klasse-II präsentierte Peptide (Germain 1994).

CD4 T-Zellen modulieren über die Sekretion von Zytokinen sowohl die humorale als auch die adaptive Immunantwort. Sie werden hinsichtlich ihrer sezernierten Zytokine in T_H1 - ($IFN\gamma$, IL-2, $TNF\alpha$) und T_H2 -Zellen (u.a. IL-4, IL-5) unterteilt. Wesentliche Funktionen sind die Regulation von Entzündungsreaktionen sowie die Stimulation von B-Zellen. In den ersten Monaten nach einer CMV-Primärinfektion können eine intensive virale Replikation und Ausscheidung detektiert werden, welche mit einer reduzierten Proliferation und IL-2 Produktion von CMV-spezifischen CD4 T-Zellen einhergeht. Dieser temporäre Funktionsverlust korreliert mit der Kontrolle der Virämie und dem Risiko einer Mutter-Fetus-Transmission von HCMV (Lilleri et al. 2007). In der Speicheldrüse ist die immunologische Kontrolle der Infektion, im Gegensatz zu anderen Organen, vorrangig von der Freisetzung von $IFN\gamma$ durch CD4 T-Zellen abhängig (Jonjić et al. 1989; Humphreys et al. 2007; Campbell et al. 2008; Walton et al. 2011).

CD8 T-Zellen sind die Haupteffektorzellen während der akuten CMV-Infektion. Sie terminieren die produktive Infektion in den Organen und vermitteln die langfristige antivirale Kontrolle. Ihre Antwort setzt nach etwa zwei bis drei Tagen ein und erreicht ihr Maximum nach zehn Tagen (Quinnan et al. 1978; Böhm et al. 2008a). Die Effektorfunktionen der CTL beinhalten die direkte zytolytische Aktivität (Doherty 1993) sowie die Sezernierung verschiedener Zytokine (z.B. TNF , $IFN\gamma$) und Chemokine (Harty et al. 2000). Zusätzlich

kommt es nach Aktivierung der CTL zur Bildung von *Memory* T-Zellen, die als Gedächtniszellen im Körper verbleiben und bei erneutem Kontakt mit dem entsprechenden Antigen in kürzester Zeit Effektorfunktionen ausbilden können (Stemberger et al. 2007a; Stemberger et al. 2007b).

Die CTL-vermittelte Immunantwort gegen CMV wird von bestimmten Peptid-Spezifitäten dominiert. Die Frequenzen der gegen diese Epitope gerichteten T-Zellen definieren die entsprechenden antigenen Peptide als dominant, intermediär oder subdominant. Das protektive Potential einer T-Zell-Spezifität korreliert dabei nicht mit der Immundominanz des antigenen Peptids (Holtappels et al. 1998; Holtappels et al. 2004; Holtappels et al. 2008a). In der BALB/c-Maus (Haplotyp H-2^d) sind bisher zwei immundominante Peptide beschrieben worden: das vom frühen regulatorischen IE1-Protein abgeleitete Peptid m123₁₆₈₋₁₇₆ (Reddehase und Koszinowski 1984; Reddehase et al. 1989) und ein Peptid aus dem ORF m164 (m164₂₅₇₋₂₆₅) (Holtappels et al. 2002a; Holtappels et al. 2002b). Für den Haplotyp H-2^b der B6-Maus sind mehrere immundominante Peptide beschrieben worden, u. a. M38₃₁₆₋₃₂₅, M45₉₈₅₋₉₉₃ und m139₄₁₉₋₄₂₆ (Munks et al. 2006a).

Die essenzielle Bedeutung der CTL-vermittelten Immunkontrolle der CMV-Infektion ist vielfach belegt (Quinnan et al. 1978; Reddehase et al. 1985; Reddehase et al. 1987). Bereits 1985 konnte gezeigt werden, dass ein präemptiver adoptiver Transfer (AT) von CD8 T-Lymphozyten immunsupprimierte BALB/c-Mäuse vor einer letalen mCMV-Infektion schützt (Reddehase et al. 1985). Auch im klinisch relevanten Modell der experimentellen, syngenen (Podlech et al. 1998; Holtappels et al. 1998; Podlech et al. 2000; Pahl-Seibert et al. 2005; Reddehase und Lemmermann 2018) als auch allogenen (Alterio de Goss et al. 1998) HSCT konnte gezeigt werden, dass die Rekonstitution der antiviralen CD8 T-Zellantwort nach Immunsuppression für die Kontrolle der mCMV-Infektion essenziell ist (Holtappels et al. 2008b; Ebert et al. 2012; Holtappels et al. 2013; Reddehase 2016). Auch klinische Studien bestätigten, dass die Schwere der CMV-Erkrankung nach KMT mit der Rekonstitution virusspezifischer CD8 T-Zellen korreliert (Reusser et al. 1991; Bronke et al. 2005). Entsprechend lässt sich durch den Transfer antiviraler CTL-Linien die Inzidenz einer CMV-Erkrankung nach KMT reduzieren (Riddell et al. 1992; Walter et al. 1995; Cobbold et al. 2005).

1.4.2.2.2. $\gamma\delta$ T-Zellen

$\gamma\delta$ T-Zellen besitzen sowohl Eigenschaften des angeborenen wie auch adaptiven Immunsystems. Sie sind nicht MHC restringiert und können ihre Effektorfunktionen sehr schnell ausüben. Liganden, die vom $\gamma\delta$ TZR erkannt werden, sind divers und beinhalten sowohl MHC-verwandte als auch nicht-verwandte Proteine, sowie niedermolekulare nicht-

peptide Liganden (Sciammas et al. 1994; zur Übersicht: Chien et al. 2014; Kabelitz und Déchanet-Merville 2015). Für die HCMV-Infektion ist, in gesunden seropositiven Individuen, eine $\gamma\delta$ T-Zell-Expansion belegt (Pitard et al. 2008). Zudem konnte in verschiedenen Modellen ein Zusammenhang zwischen der Expansion von zirkulierenden $\gamma\delta$ T-Zellen mit der Viruskontrolle festgestellt werden (zur Übersicht: Khairallah et al. 2015; Sell et al. 2015; Khairallah et al. 2017).

1.4.2.3. Immunevasion der MHC-I-vermittelten Antigenpräsentation

Wie viele andere Viren haben auch CMVs im Laufe des evolutionären Adaptationsprozesses Mechanismen entwickelt, um der Immunantwort ihres jeweiligen Wirtes zu entkommen (Berry et al. 2020). Sowohl HCMV als auch mCMV kodieren für Proteine, welche die CTL-Antwort durch Modulation der MHC-I-Expression beeinflussen (Reddehase 2002). Diese werden als Immunevasine oder, im Fall von mCMV, als vRAPs (*viral regulators of antigen presentation*) (Holtappels et al. 2006) bezeichnet. Obwohl die Immunevasin-kodierenden Gene beider Viren weder ortholog noch sequenzzhomolog sind, bedienen sie sich z.T. analoger Mechanismen, um die MHC-I-Expression infizierter Zellen zu vermindern (Tortorella et al. 2000; Reddehase 2002).

1.4.2.3.1. MHC-I-Peptidpräsentation

APCs präsentieren intrazellulär synthetisierte, prozessierte und an MHC-I-gebundene, antigene Peptide auf ihrer Zelloberfläche. Auf diese Weise wird kontinuierlich ein Abbild der zellulären Proteinexpression auf der Zelloberfläche abgebildet (Neefjes et al. 2011). Virale MHC-I-präsentierte Peptide können von virusspezifischen CD8 T-Zellen über deren TZR erkannt werden (zur Übersicht: Rock et al. 2002). Die MHC-I-Präsentation viraler Peptide wird von zwei unterschiedlichen Mechanismen gewährleistet: die direkte Antigenpräsentation durch infizierte Zellen (Neefjes et al. 2011) und die *cross*-Präsentation exogener Peptide, vermittelt durch nicht-infizierte APCs (zur Übersicht: Joffre et al. 2012). Der Mechanismus der *cross*-Präsentation ermöglicht die Initiation einer Immunantwort gegen Pathogene, welche nicht in professionellen APCs (profAPC: Zellen, welche T-Zellen ohne bisherigen Antigenkontakt aktivieren können; DCs, Makrophagen, Monozyten, B-Lymphozyten) replizieren oder Immunevasionsmechanismen entwickelt haben, um die Antigenpräsentation auf der Oberfläche von infizierten profAPCs zu verhindern.

1.4.2.3.2. Immunevasine

Bei den Immunevasinen des mCMV handelt es sich um Typ I Glykoproteine mit einer *early*-Expressionskinetik, welche von den ORFs *m04*, *m06* und *m152* kodiert werden (Kleijnen et al. 1997; Ziegler et al. 1997; Reusch et al. 1999; Reddehase 2002; Doom und Hill 2008).

m152/gp40 (m152) vermittelt die Retention und Akkumulation von mit frisch beladenen MHC-I Molekülen im ERGIC/cis-Golgi-Kompartiment (Ziegler et al. 1997; Lemmermann et al. 2012). Dies erfolgt über eine Interaktion der luminalen Domäne von *m152* in Assoziation mit einem MHC-I Moleküle an TMED10, einem Mitglied der p24-Familie, im ER (Ziegler et al. 2000; Ramnarayan et al. 2018; zur Übersicht: Berry et al. 2020). Dadurch kommt es zu einer Reduktion von viralen pMHC-I-Komplexen auf der Zelloberfläche infizierter Zellen, wodurch die Aktivierung antiviraler CD8 T-Zellen vermindert wird (del Val et al. 1992; Fink et al. 2012). Darüber hinaus reguliert das Protein noch weitere *MHC-like molecules*, wie z.B. Mitglieder der RAE1-Molekülfamilie, Liganden des aktivierenden NK-Zell-Rezeptors NKG2D (Krmpotić et al. 2002).

m06/gp48 (m06) bindet im ER stabil an pMHC-I-Komplexe und vermittelt deren Einschleusung in den endolysosomalen Abbauweg. Dadurch kommt es zu einer deutlichen Reduktion der pMHC-I-Oberflächenpräsentation. Das Dileucin-Motiv (EPLARLL) im zytoplasmatischen Teil des *m06* interagiert dabei mit den zellulären Adapterproteinen AP-1A/3A, wodurch der Übergang der *m06*-MHC-I-Komplexe von den frühen Endosomen in die späten Endosomen/Lysosomen vermittelt wird. Im Lysosom werden sowohl *m06* als auch die MHC-I-Moleküle abgebaut so dass eine erneute Einschleusung der pMHC-I Komplexe in den Zelloberflächentransport verhindert wird (Reusch et al. 1999; Reusch et al. 2002; Fink et al. 2019).

m04/gp34 (m04) bindet im ER stabil an pMHC-I Komplexe und kann zusammen mit diesen an der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Kleijnen et al. 1997). Es verhindert daher nicht die Präsentation und führt zu keiner Reduzierung der pMHC-I-Oberflächenexpression (Wagner et al. 2002). Die Klassifizierung von *m04* als Immunevasin beruht auf der Beobachtung, dass die Infektion mit einer *m04*-Deletionsmutante zu einer, im Vergleich zum Wildtyp (WT)-Virus, verbesserten Antigen-Präsentation führt (Holtappels et al. 2006; Pinto et al. 2006; Fink et al. 2012). Zusätzlich wird eine Rolle von *m04* als Immunevasin der NK-Zell-Erkennung diskutiert. So konnte gezeigt werden, dass die Oberflächenexpression von MHC-I im Komplex mit *m04* für ein NK-Zell-*Silencing* verantwortlich ist und das Fehlen des Proteins zu einer stark reduzierten Viruslast führt (Babić et al. 2010).

Auch wenn die stärkste Inhibition der Antigenpräsentation aus der Expression aller drei vRAPs (Holtappels et al. 2006) resultiert, kann dies nicht die effiziente Kontrolle der Infektion durch CD8 T-Zellen *in vivo* verhindern (zur Übersicht: Reddehase 2002). Eventuell ermöglichen sie aber, der CTL-Effektorfunktion so weit zu entkommen, dass virale Latenz im Organismus etabliert werden kann (Mocarski et al. 2013).

1.5. NKT-Zellen

Erstmals wurden NKT-Zellen als Effektoren einer Abstoßungsreaktion nach KMT in der C57BL/6-Maus beschrieben. Hierbei wurden sie als T-Zellen mit einem NK-Phänotyp charakterisiert (Yankelevich et al. 1989), da sie sowohl einen $\alpha\beta$ TZR als auch den NK-Zell-Marker NK1.1 exprimieren. Zusätzlich zeigen NKT-Zellen Eigenschaften des angeborenen und adaptiven Immunsystems (Birkholz und Kronenberg 2015). Da nicht alle NKT-Zellen NK-Zell-Marker exprimieren, erfolgt die Einordnung heute über ihre CD1d-Restriktion. Allgemein unterscheidet man zwischen Typ I (klassische) NKT-Zellen (auch invariante NKT-Zellen (iNKT)) und Typ II NKT-Zellen (auch diverse NKT-Zellen (dNKT)). Beide sind sowohl in der Maus als auch im Menschen nachweisbar (Godfrey et al. 2004; Berzofsky und Terabe 2008; Godfrey et al. 2010; Birkholz und Kronenberg 2015). NKT-Zellen spielen u.a. eine Rolle in mikrobiellen Infektionen (Tupin et al. 2007; Brigl und Brenner 2010), Autoimmunerkrankungen (Novak und Lehen 2011), Allergien (Meyer et al. 2007) und Krebs (Vivier et al. 2012). Aufgrund ihrer Fähigkeit eine Vielzahl immunregulatorischer Zytokine zu produzieren und ein breites Spektrum an Effektorfunktionen zu realisieren, können NKT-Zellen Immunreaktionen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen sowohl induzieren als auch unterdrücken (zur Übersicht: Birkholz und Kronenberg 2015).

1.5.1. Typ I NKT-Zellen (iNKT-Zellen)

Typ I NKT-Zellen oder invariante NKT-Zellen (iNKT) exprimieren einen invarianten TZR, welcher in der Maus aus einer $V\alpha 14J\alpha 18$ -Kette kombiniert mit einem limitierten β -Ketten Repertoire, normalerweise $V\beta 8.2$, $V\beta 7$ oder $V\beta 2$, besteht (Park et al. 2001; Godfrey et al. 2004; Godfrey et al. 2010). Der humane TZR der iNKT-Zellen besteht aus einer $V\alpha 24J\alpha 18$ -Kette gepaart mit einer $V\beta 11$ -Kette (Bendelac et al. 2007; Birkholz und Kronenberg 2015). Sowohl die α -Kette des TZR als auch die murine $V\beta 8$ - zu der humanen $V\beta 11$ -Kette sind homolog, mit der Konsequenz, dass die Spezifitäten von Maus und menschlichen iNKT-Zellen stark konserviert sind (Li et al. 2010). In der Maus exprimiert zusätzlich eine kleine Population der iNKT-Zellen eine $V\alpha 3.2J\alpha 9/V\beta 8$ oder $V\alpha 8/V\beta 8$ bzw. andere TZR-Kombinationen (Park et al. 2001).

Differenzierte iNKT-Zellen lassen sich u.a. im Knochenmark, Lymphknoten, gastrointestinalen Trakt und in der Haut nachweisen (Matsuda et al. 2000; Brennan et al. 2013). In der B6-Maus stellen iNKT-Zellen etwa 1-2,5% (Milz, mesenterische und pankreatische Lymphknoten, Thymus) bzw. bis zu 50% (Leber, Knochenmark) der Lymphozytenpopulation (Benlagha et al. 2000; Matsuda et al. 2000; Bendelac et al. 2007;

Godfrey et al. 2015). In der Lunge stellen nicht-zirkulierende iNKT-Zellen etwa 5% der residenten Lymphozyten dar. Sie etablieren sich sowohl im vaskulären als auch im interstitiellen Gewebe (Scanlon et al. 2011; Lee et al. 2015) Im Menschen schwankt die iNKT-Zellzahl im peripheren Blut zwischen 0,01-2% der peripheren mononuklearen Blutzellen (Lee et al. 2002; Gumperz et al. 2002; Montoya et al. 2007). In der Leber ist ihre Anzahl, mit etwa 3-5% der intrahepatischen T-Zellen, nur leicht erhöht (Syn et al. 2010; Santodomingo-Garzon und Swain 2011).

1.5.1.1. Antigene

Die bisher identifizierten, von iNKT-Zellen erkannten Antigene, kann man in zwei Kategorien einordnen: die ceramid-basierten Glykolipide (Glyosphingolipide) und die glycerol-basierten Lipide (z. B. Membran-Phospholipide) (Brennan et al. 2013). Sowohl murine V α 14- als auch humane V α 24-NKT Zellen erkennen das aus dem Meeresschwamm *Agelas mauritianus* isolierte **α -Galactosylceramid (α GalCer)** (Kawano et al. 1997; Brossay et al. 1998). α GalCer besteht aus einer Galactose-Kopfgruppe und einer verzweigten Kohlenstoffkette (18C-26C), die in α -Orientierung an die Zuckergruppe gebunden ist. Da Säugetiere normalerweise keine anomeren Kohlenhydrate mit Lipiden in α -Orientierung verbinden, stellt dies ein geeignetes Strukturmotiv für Fremdantigenität dar (Brennan et al. 2013). Die Präsentation von α GalCer auf CD1d bedarf keiner Internalisation, sondern kann auch an der Zelloberfläche stattfinden (Prigozy et al. 2001).

1.5.1.2. Entwicklung und Reifung von iNKT-Zellen

NKT-Zellen entwickeln sich im Thymus aus denselben Vorläuferzellen wie CD4⁺CD8⁺ doppelpositive Thymozyten. Der wichtigste Schritt bei der Entwicklung ist dabei die Entstehung des semi-invarianten CD1d-restringierten TZR, der durch die zufällige Rekombination von V-, (D)- und J-Genen generiert wird (Lantz und Bendelac 1994; Shimamura et al. 1997). Die Thymozyten, welche einen der invarianten TZR exprimieren (siehe 1.4.3.1.), werden über Interaktion mit CD1d und SLAM-Rezeptor exprimierenden doppelpositiven Thymozyten positiv selektioniert (Bendelac 1995; Nichols et al. 2005; Godfrey et al. 2010; Pellicci et al. 2020). Dafür ist die Präsentation eines noch nicht näher identifizierten glykolipiden Selbst-Antigens auf CD1d notwendig (Bendelac et al. 2007; Porubsky et al. 2007; Das et al. 2010; Pellicci et al. 2020). Es ist wahrscheinlich, dass NKT-Zellen, ähnlich wie T-Zellen, zu einem frühen Zeitpunkt der Entwicklung eine Negativselektion durchlaufen, um Selbstreaktivität zu verhindern. An dieser sind vermutlich CD1d⁺ DCs beteiligt (Chun et al. 2003; Pellicci et al. 2003; Godfrey et al. 2010). Nach positiver Selektion expandieren die unreifen iNKT-Zellen bis ins sogenannte Stadium 2 (siehe Abb.1.1). Die Mehrheit der iNKT-Zellen emigriert in die Peripherie und nur ein Teil

verbleibt im Thymus (Das et al. 2010). Anhand des exprimierten Zytokinprofils kann zwischen T_H1 - (iNKT1), T_H2 - (iNKT2) und T_H17 - (iNKT17) ähnlichen iNKT-Zellen unterschieden werden (Gumperz et al. 2002; Godfrey et al. 2004; Bendelac et al. 2007). Klassischerweise wurde die iNKT-Zell-Entwicklung in 3/4 Stadien eingeteilt, welche aber nach neueren Studien lediglich für iNKT1-Zellen zutreffend ist. Sowohl iNKT2 als auch iNKT17-Zellen sind vermutlich bereits im Stadium 2 im Thymus ausgereift. Zu beachten ist jedoch, dass der genaue Entwicklungsweg der verschiedenen iNKT-Subpopulation noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Hogquist und Georgiev 2020). Die Entwicklung und Ausreifung dieser iNKT-Zellen wird von zahlreichen Transkriptionsfaktoren, Zelloberflächenmolekülen und Zytokinen im Thymus kontrolliert und reguliert. Eine Übersicht der wichtigsten, bekannten Komponenten ist in Abbildung 1.1 dargestellt (zur Übersicht vergleiche auch: Das et al. 2010; Godfrey et al. 2010; Hu et al. 2011; Hogquist und Georgiev 2020).

iNKT1 Zellen können insbesondere in der Leber und der Milz aber auch im vaskulären Gewebe der Lunge und in Lymphknoten detektiert werden (Buechel et al. 2015). iNKT1 produzieren IFN γ und auch in geringerer Konzentration IL-4 (Thapa et al. 2017). In der Maus wird der NK-Zell-Rezeptor NK1.1 auf ausgereiften iNKT1-Zellen im Thymus und nach Exposition zu CD1d in der Peripherie exprimiert (Pellicci et al. 2002; Milpied et al. 2011). CD4 $^-$ iNKT1-Zellen exprimieren eher einen NK-Zell-ähnlichen Phänotyp, mit vermehrter Expression von NK-Zellrezeptoren und zytotoxischen Mediatoren (z.B. Granzym A und B sowie Perforin) (Georgiev et al. 2016). CD4 $^+$ iNKT1 exprimieren hingegen höhere Level an IL-4 und CD81. Insgesamt weisen iNKT1-Zellen die größten zytotoxischen Funktionen im Vergleich zu anderen iNKT-Subtypen auf (Crowe et al. 2005; Georgiev et al. 2016; Maas-Bauer et al. 2018).

iNKT2 können vor allem in der Lunge (vaskuläres Gewebe), im Darm und in den mesenterischen Lymphknoten detektiert werden, kommen aber in geringerer Zahl auch in Leber und Milz vor (Buechel et al. 2015; Crosby und Kronenberg 2018). Sie können in den peripheren Lymphknoten sehr schnell aktiviert werden und sekretieren dann IL-4 und IL-13 (Barral et al. 2010). Wichtige Transkriptionsfaktoren sind PLZF und Gata3 (Thapa et al. 2017). Die im Thymus verbleibenden iNKT2-Zellen erfüllen wichtige homöostatische Funktionen. So beeinflusst ihre IL-4 Produktion die Differenzierung der so genannten *natural memory* EOMES-exprimierenden CD8 T Zellen (Eberl et al. 2000; Weinreich et al. 2010). Zudem können sie bei GvHD (*graft-versus-host-disease*) eine schützende Funktion entwickeln (Maas-Bauer et al. 2018).

iNKT17 konnten bisher in den peripheren Lymphknoten, in der Lunge (interstitielles Kompartiment) und in der Haut nachgewiesen werden (Buechel et al. 2015; Lee et al. 2015;

Crosby und Kronenberg 2018). Nach Aktivierung produzieren sie IL-17A, -21 und -22 und ähneln damit im Zytokinprofil T_H17 -Zellen (Brennan et al. 2013). Zudem sind sie ROR γ ^t und PLZF^{med} (Thapa et al. 2017). Faktoren, welche die iNKT-Zellexpansion bzw. den spezifischen iNKT17-Phänotyp regulieren sind weitestgehend unbekannt. Eine Beteiligung von IL-6 sekretierenden DCs wird vermutet (Giorgi et al. 2018). Weiterhin konnten iNKT17 mit Typ1 Diabetes in Verbindung gebracht werden und können wie iNKT2, protektive Effekte bei GvHD haben (Giorgi et al. 2018; Maas-Bauer et al. 2018).

IL-10 produzierende iNKT10-Zellen zeigen ein ähnliches Zytokinexpressionprofil wie Typ 1 T_{regs} und sind v.a. im Fettgewebe zu finden (Sag et al. 2014; Wingender et al. 2015). Im Thymus der WT-Maus konnte dieser Zelltyp bisher nicht detektiert werden, Analysen in der TCR β ^{-/-}-Maus konnten jedoch IL-10-produzierende iNKT im Thymus nachweisen (Vieth et al. 2017). Im Unterschied zu anderen iNKT-Zellen zeigen iNKT10-Zellen einen regulativen Phänotyp und exprimieren vermehrt das E4-Promotor bindende Protein 4 (E4BP4 (auch NFIL3)), ein Transkriptionsfaktor, welcher die Expression von IL-10 reguliert (Motomura et al. 2011; Lynch et al. 2015). Weiterhin exprimieren iNKT10-Zellen IL-9 (Kim und Chung 2013) und IL-22 (Goto et al. 2009) und expandieren nach α GalCer-Gabe in der Maus (Wingender et al. 2015). Sie können die anti-tumorale Immunantwort beeinflussen und gegen eine Experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE) schützen (Sag et al. 2014).

Weitere iNKT-Subpopulationen konnten identifiziert werden. Diese differenzieren vermutlich erst nach Aktivierung und Antigenkontakt in der Peripherie aus und können daher nicht im Thymus detektiert werden, Dazu zählen FoxP3⁺iNKT-Zellen, welche nach α GalCer-Stimulation bzw. Exposition mit TGF β auftreten und in den drainierenden Lymphknoten des ZNS sowie in der Leber nachgewiesen werden konnten (Monteiro et al. 2010; Buechel et al. 2015).

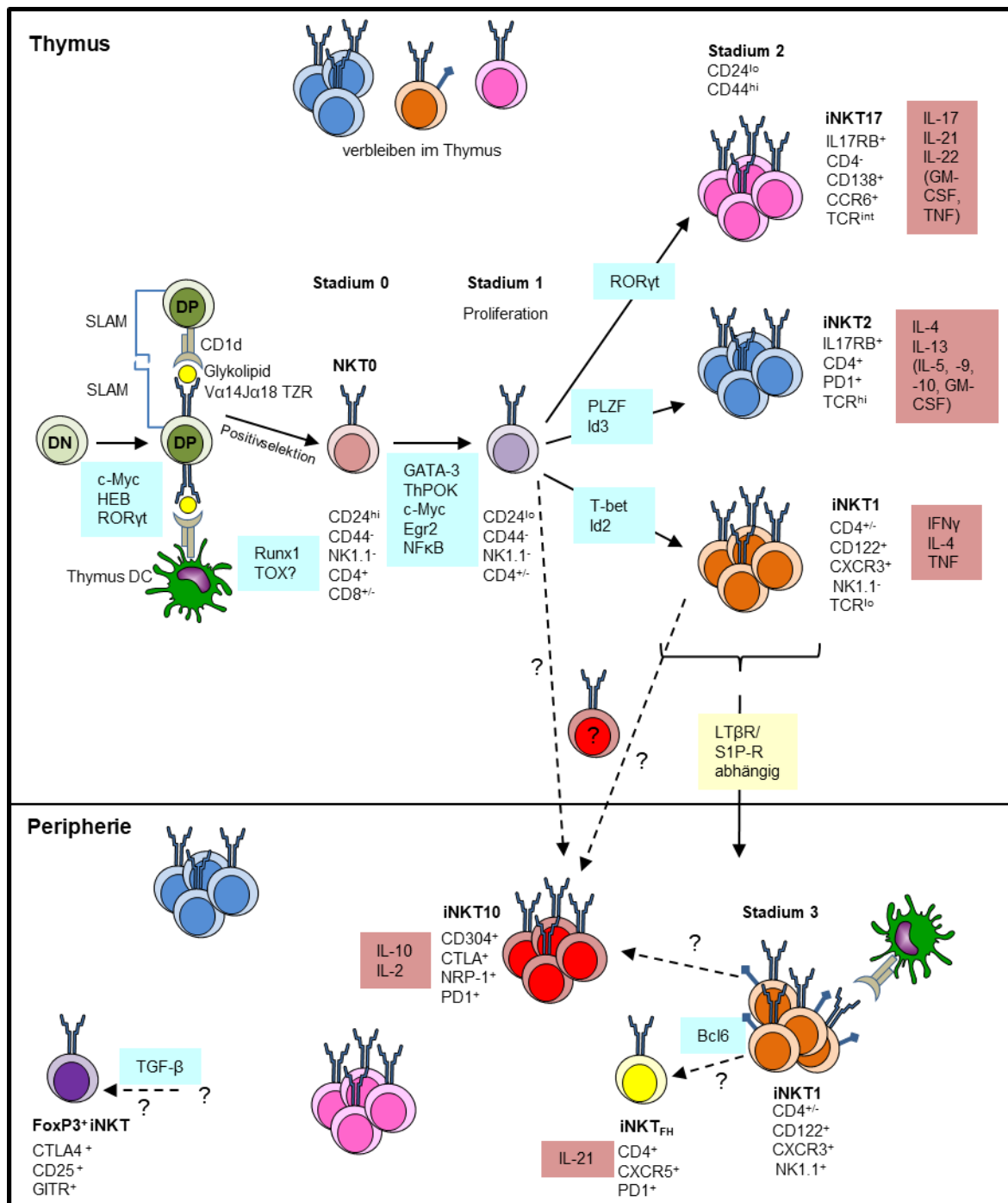


Abbildung 1.1: Entwicklung von iNKT-Zellen. NKT-Zellen entwickeln sich im Thymus aus CD4⁺CD8⁺ Thymozyten. Durch zufällige Rekombination von V-, (D)- und J-Genen entsteht der semi-invariante CD1d-restringierte TZR, welcher über Interaktion mit CD1d und einem noch nicht identifizierten Liganden positiv selektioniert wird. Unter Beteiligung des Transkriptionsfaktors Runx1 findet der Übergang ins Stadium 0 statt. Nach positiver (und vermutlich auch negativer) Selektion expandieren die unreifen iNKT-Zellen bis ins Stadium 2. Die meisten iNKT-Zellen emigrieren aus dem Thymus unter Beteiligung des Lymphotoxin-β-Rezeptors (LTβR) und Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptors (S1P-R) (gelb) und wandern in verschiedene Gewebe ein. Es kann zwischen T_H1- (iNKT1), T_H2- (iNKT2) und T_H17- (iNKT17) ähnlichen iNKT-Zellen unterschieden werden. Sowohl iNKT2 als auch iNKT17-Zellen sind vermutlich bereits im Stadium 2 im Thymus ausgereift. iNKT1 differenzieren erst im Stadium 3, sowohl im Thymus als auch in der Peripherie, und erwerben hier nach Kontakt mit CD1d die NK1.1-Expression. Nach Aktivierung in der Peripherie kommt es für alle iNKT-Subtypen zur Ausbildung ihrer spezifischen Effektorfunktionen. Weitere iNKT-Subtypen (FoxP3⁺iNKT- und iNKT_{FH}-Zellen) differenzieren aus unbekanntem Vorläufer im Gewebe. Die Entstehung von iNKT10 erfolgt vermutlich aus iNKT1-Zellen entweder in der Peripherie oder im Thymus. Transkriptionsfaktoren: hellblau; Zytokine: rot. Verändert nach: Bendelac et al. 2007; Das et al. 2010; Hogquist und Georgiev 2020; Pellicci et al. 2020).

Besonders in der Milz konnten sogenannte folliculäre iNKT-Helferzellen (iNKT_{FH}) detektiert werden. Ihre Entwicklung ist Bcl-6 abhängig, ein Transkriptionsfaktor, welcher sonst auch mit T_{FH}-Zellen assoziiert ist. Sie entstehen vermutlich bei Interaktion mit B-Zellen, während einer Infektion. Dabei ist zunächst ein Kontakt der iNKT-Zellen mit DCs erforderlich, welche die Aktivierung der Zellen induzieren. Erst dann führt eine Interaktion mit B-Zellen zu einer IL-21-abhängigen Affinitätsausreifung der Antikörper, Antikörperproduktion und Proliferation der B-Zellen (Chang et al. 2011; King et al. 2011; Lehuen und Fazilleau 2011; Bai et al. 2013; Buechel et al. 2015).

Faktoren, welche die periphere iNKT-Zell-Entwicklung und Homöostase sowie ihre Rekrutierung in die verschiedenen Gewebe regulieren, sind wenig verstanden. Im Gegensatz zu konventionellen T-Zellen, welche eine regelmäßige Interaktion mit MHC-I oder MHC-II brauchen, benötigen iNKT-Zellen keine andauernde Interaktion mit CD1d. Stattdessen scheint die iNKT-Zell-Homöostase stark von IL-15 (iNKT1) bzw. IL7 (iNKT17) abhängig zu sein (Matsuda et al. 2002; Ranson et al. 2003; McNab et al. 2005; Wei et al. 2005; Webster et al. 2014) und erinnert an NK- und *Memory* CD8 T-Zellen.

Humane NKT-Zellen durchlaufen insgesamt einen vergleichbaren Entwicklungsprozess (Berzins et al. 2005; Baev et al. 2004; Godfrey et al. 2010), allerdings findet die Ausreifung in Stadium 3 ausschließlich in der Peripherie statt (Berzins et al. 2005; Sandberg et al. 2004; Baev et al. 2004).

1.5.2. Typ II NKT-Zellen (dNKT-Zellen)

Auch die dNKT erkennen CD1d, ihre α -Kette des TZR ist jedoch vielfältiger (z.B. V α 3.2J α 9 oder V α 8 mit V β 8) (Godfrey et al. 2004). Der Hauptunterschied zu iNKT-Zellen besteht darin, dass bei Antigenen für dNKT-Zellen die anomere Kohlenstoffeinheit in β -Orientierung an den lipiden Schwanz gebunden ist (Dhodapkar und Kumar 2017). dNKT-Zellen erkennen eine Reihe von hydrophoben Antigenen unter anderem Phospholipide, Sulfatide (Jahng et al. 2004), Lysophosphatidylcholine (Chang et al. 2008) und sogar kleine aromatische (nicht lipide) Moleküle (van Rhijn et al. 2004; Godfrey et al. 2010). Sie haben ebenfalls die Fähigkeit die Immunantwort zu modulieren. Über Typ II NKT-Zellen ist wenig bekannt. Sie sind in der Lage nach Interaktion von verschiedenen TLR-Liganden mit DCs proinflammatorische Zytokine (darunter IL-15 und IL-18) sowie IFN γ zu produzieren (Park et al. 2001; Dhodapkar und Kumar 2017). dNKTs und iNKTs scheinen zudem antagonistische Effekte zu haben, wobei sowohl iNKT- als auch dNKT-Zellen proinflammatorische als auch entzündungshemmende Funktionen haben können (Singh et al. 2018). So konnte gezeigt werden, dass dNKT-Zellen die proinflammatorischen Funktionen von iNKT-, konventionellen CD8 T-Zellen sowie DCs hemmen bzw. iNKT-Zellen

sogar in den Zustand der Anergie überführen können. Dieses findet in der Leber über ein komplexes Zusammenspiel von verschiedenen Zelltypen statt, wobei der Hauptmechanismus darin besteht, pDCs zu aktivieren und deren CD1d-Expression zu stimulieren und gleichzeitig die Aktivität von cDCs runterzuregulieren, wodurch die iNKT-Zellen sowie die adaptive Immunität (insbesondere konventionelle T-Zellen), trotz Rekrutierung dieser Zellen über IL-12 und MIP-2 in die Leber, gehemmt werden (Halder et al. 2007; Kumar 2013; Marrero et al. 2015; Bandyopadhyay et al. 2016; Dasgupta und Kumar 2016). Daneben können auch Neutrophile sowie zahlreiche andere Zellen von aktivierten dNKT-Zellen beeinflusst werden. Ob dNKT-Zellen auch eine hemmende Wirkung auf NK-Zellen haben, beispielsweise über die IL-12 Sekretion ist bis dato nicht bekannt (Halder et al. 2007; Marrero et al. 2015; Bandyopadhyay et al. 2016; Dasgupta und Kumar 2016). Typ II NKT-Zellen sind in den Lebern von Mäusen (Jahng et al. 2004) als auch von Menschen (Exley et al. 2002) zahlreich vorhanden sind. Die Frequenzen der dNKT-Zell-Population in anderen Organen ist hingegen noch weitestgehend unbekannt (Singh et al. 2018) ebenso ob Typ II NKT-Zellen, ähnlich wie iNKT-Zellen, unterschiedliche Subtypen in Bezug auf die Zytokinsekretion und Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren ausbilden (Dhodapkar und Kumar 2017).

In einigen Krankheitsmodellen scheinen dNKTs eine größere Rolle zu spielen als iNKT-Zellen (Berzofsky und Terabe 2008). Ihre Aktivierung ist im Gegensatz zur iNKT-Zellaktivierung IL-12 unabhängig (Zeissig et al. 2012) und scheint hauptsächlich über den TZR-Signalweg nach Erkennung eines Lipid/CD1d-Komplexes vermittelt zu werden (Roy et al. 2008; Tatituri et al. 2013; zur Übersicht siehe auch: Dhodapkar und Kumar 2017).

1.5.3. CD1-Familie

Während die Maus nur CD1d exprimiert, finden sich im Menschen vier weitere CD1-Moleküle, welche lipide Antigene binden. CD1a, b und c bilden die Gruppe 1 und können lipide Antigene für weitere unkonventionelle $\alpha\beta$ T-Zellen präsentieren. CD1d ist der Gruppe 2 zugeordnet (Beckman et al. 1994; Birkholz und Kronenberg 2015; Godfrey et al. 2015). CD1e wird als separate Kategorie eingestuft, da es nicht auf der Zelloberfläche exprimiert wird, sondern nur intrazellulär für die Lipidprozessierung und -präsentation eine Rolle zu spielen scheint (Barral und Brenner 2007). CD1d wird auf zahlreichen hämatopoetischen Zellen inklusive B-Zellen, DCs, Makrophagen, Langerhans Zellen, Monozyten, T-Zellen und iNKT-Zellen exprimiert. Auch einige nicht-hämatopoetische Zellen wie Hepatozyten und intestinale Epithelzellen (Dougan et al. 2007) sowie Endothelzellen in/an den Lebersinoiden bzw. Kupffer-Zellen, exprimieren CD1d (Geissmann et al. 2005; Bendelac et al. 2007).

1.5.3.1. Struktur von CD1d und die CD1d-Lipid-TZR-Interaktion

In der Maus gibt es zwei CD1d-Varianten: CD1d1 und CD1d2, wobei die meisten Effektorfunktionen CD1d1 abhängig sind. Zudem kann CD1d2 nicht die NKT-Zell-Selektion unterstützen (Chen et al. 1999b). CD1d1 und CD1d2 sind zu 95% homolog (Bradbury et al. 1988). Das Kernprotein ist etwa 36kDa groß. Abhängig vom Glykolysierungsgrad hat es jedoch in der Regel eine Größe zwischen 49 und 55kDa (Mosser et al. 1991). Ähnlich wie MHC-I-Moleküle zeigt auch CD1d eine heterodimere Struktur mit einer schweren Kette, welche drei extrazelluläre Domänen aufweist, und eine konservierte, nicht-kovalent bindende, β 2m-Untereinheit (Zajonc und Kronenberg 2007). Die tiefe und enge Bindungsfurche bildet zwei Taschen (A' und F'), in die die hydrophoben Ketten von iNKT-Zell-Antigenen perfekt einhaken können (Koch et al. 2005; Zajonc et al. 2005; Barral und Brenner 2007; Bendelac et al. 2007), während die polare Kopfgruppe für die Erkennung des TZR von iNKT-Zellen präsentiert wird (Wang et al. 2010; Birkholz und Kronenberg 2015). Die Bindung zwischen dem TZR und CD1d ist dabei so angeordnet, dass insbesondere die invariante α -Kette des TZR direkt über der Kopfgruppe des lipiden Antigens sowie den umgebenden Regionen von CD1d liegt (Borg et al. 2007).

1.5.3.2. CD1d-Genesis

Die Faltung und Bindung von β 2m mit der schweren Kette von CD1d findet unter Beteiligung der Chaperone Calnexin, Calreticulin und ERp57 im ER statt (Kang und Cresswell 2002; Kim et al. 1999; Vartabedian et al. 2016). Die anschließende Bindung von endogenen Phospholipiden (Selbst-Antigen) erlaubt CD1d den Übergang ins endosomale Kompartiment (Barral und Brenner 2007). Die Mehrheit der CD1d-Moleküle verlässt das ER in Assoziation mit β 2m, allerdings ist dies keine Notwendigkeit. So ist CD1d auf der Zelloberfläche in der Lage, eine NKT-Zell-Antwort auch in Abwesenheit von β 2m hervorzurufen (Amano et al. 1998; Horst et al. 2012), allerdings im Menschen mit reduzierter Effizienz (Liu et al. 2010). Weiterhin schützt die Assoziierung von CD1d mit β 2m vor lysosomaler Degradation (Zhu et al. 2010).

Im endosomalen Kompartiment erfolgt der Austausch der Selbst-Antigene, welche im ER auf CD1d beladen wurden, mit exogenen oder auch endogenen Glykolipiden (Cernadas et al. 2003; Zhou et al. 2004). Teilweise kann dieser Austausch auch erst an der Zelloberfläche stattfinden (vgl. α GalCer) (Im et al. 2009). Über das Trans-Golgi-Netzwerk gelangt CD1d sehr rasch auf die Zelloberfläche (innerhalb von 30 Minuten nach der Biosynthese bzw. 1-2,5 Stunden nach Translation (Kim et al. 1999)) und unterliegt hier einer konstanten Internalisation und einem Recycling zwischen der Plasmamembran und den endosomalen/lysosomalen Kompartimenten. Dieses ist abhängig von einem Tyrosin-Motiv

(YXXZ) in der zytoplasmatischen Sequenz (Jayawardena-Wolf et al. 2001; Roberts et al. 2002; Sille et al. 2009). An dieses Motiv binden AP-2 und -3 (murin) (Cernadas et al. 2003; Lawton et al. 2005) bzw. AP-2 (human). In den endozytischen Kompartimenten kann CD1d erneut mit lipiden Antigenen beladen werden (Barral und Brenner 2007; Cho und Jun 2011).

1.5.4. Aktivierung von iNKT-Zellen

Für die Aktivierung von iNKT-Zellen ist in der Regel ein TZR- sowie ein Zytokinsignal notwendig (Brigl und Brenner 2010). Dabei kann die Aktivierung einerseits über ein starkes, von exogenen Glykolipiden vermitteltes, TZR-Signal und ein zusätzliches Zytokinsignal erfolgen, wobei letzteres von aktivierten pAPCs, bereitgestellt werden kann (Brigl et al. 2003; Paget et al. 2007). DCs sind die Hauptaktivatoren von iNKT-Zellen über exogene Glykolipide, jedoch können auch bestimmte Makrophagentypen Glykolipide präsentieren (Barral et al. 2010). Die zweite Möglichkeit der Aktivierung besteht über ein starkes Zytokinsignal, welches von aktivierten pAPCs generiert wird und die Ausschüttung von IL-12 beinhaltet (Brigl et al. 2003; Paget et al. 2007; Salio et al. 2007; Brennan et al. 2013). Das in den meisten Fällen auch hier erforderliche TZR-Signal kann durch schwach-affine mikrobielle oder endogene Antigene bereitgestellt werden. Auf diese Weise können iNKT-Zellen auch in Abwesenheit von pathogen-assoziierten lipiden Antigenen aktiviert werden. Dies ist beispielsweise bei viralen Infektionen, Krebs oder Autoimmunerkrankungen von Bedeutung, wenn keine Fremdlipide präsentiert werden (Horst et al. 2012). Virale Infektionen können dabei Veränderungen in der Lipidpräsentation induzieren, indem sie von endosomalen TLRs 3,7,8 und 9 erkannt werden (Bowie und Haga 2005; Brennan und Bowie 2010). Dies induziert eine erhöhte Synthese von antigenen Selbstlipiden (Horst et al. 2012; Muindi et al. 2010). Das am besten beschriebene aktivierende Zytokin ist IL-12, das nach bakteriellen oder viralen Infektionen von pAPCs produziert wird und dessen Rezeptoren stark auf iNKT-Zellen exprimiert werden (Kitamura et al. 1999; Brigl et al. 2003; Brennan et al. 2013). Weitere aktivierende Zytokine sind IL-18 (Leite-De-Moraes et al. 1999; Nagarajan und Kronenberg 2007; Horst et al. 2012), IL-23 (Rachitskaya et al. 2008) und IL-25 (Terashima et al. 2008; Stock et al. 2009). Die zytokinvermittelte Aktivierung in Abwesenheit eines dominanten TZR-Signals führt dabei zur Produktion von IFN γ , andere Zytokine werden hingegen nicht sekretiert. Im Gegensatz dazu induziert die iNKT-Aktivierung mittels eines starken TZR-Signals eine schnelle, robuste Sekretion einer Reihe von Zytokinen. Welche dabei dominieren ist davon abhängig, welche iNKT-Zellsubpopulation aktiviert wurde. Daher haben die verschiedenen Gewebepreferenzen der iNKT-Subpopulationen starken Einfluss, wie die iNKT-Zell-Aktivierung die lokale Immunantwort beeinflusst (Crosby und Kronenberg 2018).

1.5.5. Immunantwort der iNKT-Zellen

Die iNKT-Immunantwort wird durch ihre Interaktion mit verschiedenen Zelltypen und deren löslichen Faktoren reguliert. NKT-Zellen können die Immunantwort dabei sowohl fördern als auch supprimieren. Ein Kennzeichen der iNKT-Aktivierung ist - neben einer verstärkten CD40L-Expression - die rasche Produktion von Zytokinen und Chemokinen, darunter IFN γ , TNF α , TGF β , GM-CSF, IL-2, -4, -5, -6, -10, -13, -17, -21, Rantes/CCL5, Eotaxin-1/CCL11, MIP1 α und - β (zur Übersicht: Matsuda et al. 2008; Tessmer et al. 2009). Neben einer massiven Produktion von IFN γ sind ausgereifte iNKT-Zellen auch in der Lage IL-4 in großer Menge auszuschütten. Diese Fähigkeit ist einzigartig unter Lymphozyten (Yoshimoto und Paul 1994). Auch für die inhibitorischen und aktivatorischen NK-Rezeptoren der iNKT-Zellen (beispielsweise NKG2D) wurden regulatorische Eigenschaften beschrieben (Champsaur und Lanier 2010; Kuylenstierna et al. 2011). In der Regel ist die iNKT-Zell-Aktivierung dabei protektiv. Chronische Infektionen oder Entzündungen können jedoch zu einer exzessiven iNKT-Zell-Aktivierung führen, in deren Folge es zu schwerwiegenden Gewebeschäden kommt (Santodomingo-Garzon und Swain 2011; Crosby und Kronenberg 2018).

1.5.5.1. Das iNKT-Zell-Netzwerk

Über die Interaktion des TZR mit einem auf DCs über CD1d präsentierten Lipids sowie der Bindung von CD40/CD40L und der Freisetzung von Zytokinen (IFN γ oder IL-4), können iNKT-Zellen die Aktivierung und Ausreifung von DCs fördern. Diese produzieren in der Folge vermehrt IL-12 sowie weitere stimulatorische Lipide für iNKT-Zellen. Auf diese Weise transaktivieren DCs iNKT-Zellen, sodass eine positive Rückkopplung für die IFN γ -Produktion entsteht. Weiterhin transaktivieren DCs über IL-12 sehr schnell NK-Zellen, wodurch Proliferation, IFN γ -Sekretion und Zytotoxizität induziert wird (Carnaud et al. 1999; Kitamura et al. 1999; Eberl und MacDonald 2000; Bendelac et al. 2007). iNKT-Zell-aktivierte DCs können auch Zytokine produzieren, welche die NK-Zell-Lyse von Tumoren fördert (Biron 1999; Carnaud et al. 1999). Zusätzlich sind iNKT-Zellen selbst in der Lage, eine spezifische Lyse von Tumorzellen, abhängig von der CD1d-Lipid-Antigenpräsentation zu vermitteln (Bassiri et al. 2014). Umstritten ist, ob dies nur die über Hochregulation von FasL (Wingender et al. 2010) oder auch über Perforin bzw. Granzym B möglich ist (Bassiri et al. 2014). Gesichert ist, dass iNKT-Zellen durch die Expression von Granzym B, Perforin, *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) und FasL Zytolyse vermitteln können (Nieda et al. 2004; Matsuda et al. 2006; Diao et al. 2008; Horst et al. 2012).

Die Hochregulation von CD40L, die Sekretion von T_H1- und T_H2-Zytokinen, Chemokinen und die Aktivierung von DCs führt weiterhin zur Verbesserung der MHC-I- und MHC-II-

vermittelten Antigenpräsentation und des *cross priming*, wodurch das *Priming* von CD4 T- und CD8 T-Zellen gefördert wird (Fujii et al. 2003; Hermans et al. 2003; Fujii et al. 2004; Semmling et al. 2010; Bassiri et al. 2014).

CD1d wird sowohl auf naiven als auch *Memory* B-Zellen sowie Plasmazellen und B-regulatorischen Zellen exprimiert (Allan et al. 2011; Mauri und Bosma 2012). Durch die Produktion von IL-4, -5, -6, -13 und -21 und die Expression von CD40L können iNKT-Zellen die B-Zell-Funktion beeinflussen (Coquet et al. 2008), indem sie bei der Immunglobulinproduktion (frühe IgM und IgG) und Affinitätsentwicklung unterstützen (Chang et al. 2011; Brennan et al. 2013). Insbesondere iNKT_{FH}-Zellen können daran beteiligt sein (siehe auch 1.5.1.2.).

Für CD169⁺ Makrophagen im subkapsulären Sinus der Lymphknoten (Barral et al. 2010) sowie Kupffer- und Ito-Zellen in der Leber (Schmiege et al. 2005; Winau et al. 2007) konnte gezeigt werden, dass diese Lipide für iNKT-Zellen präsentieren. In bidirektionaler Weise können hier aktivierte iNKT-Zellen den Phänotyp der Makrophagen beeinflussen (Nieuwenhuis et al. 2002).

iNKT-Zellen können weiterhin bei Interaktion mit Neutrophilen, deren Phänotyp von einem regulatorischen in einen proinflammatorischen Phänotyp verändern. Über diesen Mechanismus sind iNKT-Zellen möglicherweise in der Lage, neben Tumorbekämpfung auch die Verteidigung gegen mikrobielle Pathogene zu unterstützen (Santo et al. 2010). So spielen iNKT-Zellen in einigen Infektionen (z.B. bei pulmonalen Infektionen mit *S. pneumoniae*) durch die Sekretion von CXCL2 (MIP-2) eine Schlüsselrolle in der Rekrutierung von Neutrophilen zum infizierten Gewebe (Nieuwenhuis et al. 2002; Kawakami et al. 2003).

1.5.5.2. Immunantwort von iNKT-Zellen nach Aktivierung durch α GalCer

Nach Gabe von α GalCer regulieren iNKT1-Zellen sowohl NK1.1. als auch den TZR innerhalb von zwei bis vier Stunden runter (Benlagha et al. 2002; Gadue und Stein 2002; Pellicci et al. 2002). Die tatsächliche Zahl an iNKT-Zellen verändert sich jedoch nicht. In den folgenden 24-72 Stunden normalisiert sich die Expression von NK1.1. und TZR, und die iNKT-Zellen beginnen zu proliferieren, insbesondere in der Milz und dem Knochenmark. Es folgt eine Kontraktionsphase in der sich die iNKT-Zellzahl wieder reduziert.

Die Expansionsphase ist assoziiert mit der Produktion von T_H1-Zytokinen. So führt die Gabe von α GalCer zu einem frühen Anstieg von IL-4 im Serum gefolgt von einer, mindestens drei Tage anhaltenden, Ausschüttung von IFN γ (Crowe et al. 2003; Oki et al. 2004; Bendelac et al. 2007). α GalCer aktivierte iNKT-Zellen können die Aktivierung von NK-, B-, CD4 T-, CD8

T-Zellen und DCs vermitteln (Carnaud et al. 1999; Kitamura et al. 1999; Eberl und MacDonald 2000; Kitamura et al. 2000; Nishimura et al. 2000). Insbesondere NK-Zellen werden nach Stimulation der iNKT-Zellen mit α GalCer sehr rasch transaktiviert. Als früher Aktivierungsmarker wird CD69 von zahlreichen Immunzellen hochreguliert (Carnaud et al. 1999). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass die Aktivierung mittels mit α GalCer zu einer erhöhten Extravasation von iNKT-Zellen vom Blut ins Gewebe führt (Hill et al. 2015; Thanabalasuriar et al. 2016).

1.5.6. iNKT-Zellen in Virusinfektionen

iNKT-Zellen sind an Immunantworten gegen zahlreiche virale Infektionen, insbesondere auch gegen Herpesviren, beteiligt. So konnte eine höhere Suszeptibilität gegenüber Virusinfektionen sowohl in Patienten mit einer iNKT-Zell-Defizienz (EBV (Rigaud et al. 2006)) als auch in NKT-defizienten Mäusen (HSV-1 (Grubor-Bauk et al. 2003; Grubor-Bauk et al. 2008), HSV-2 (Ashkar und Rosenthal 2003), Respiratorische Synzytial-Virus (RSV) (Johnson et al. 2002), Influenza A-Virus (Ishikawa et al. 2010)) beobachtet werden. Zudem konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass die Aktivierung von iNKT-Zellen durch α GalCer zu einem Schutz gegen verschiedene Viren führt (mCMV (Van Dommelen, S. L. H. et al. 2003), RSV (Johnson et al. 2002), Influenza A-Virus (Ho et al. 2008; Ishikawa et al. 2010) sowie Hepatitis B-Virus (HBV) (Kakimi et al. 2000)).

Die Bedeutung von iNKT-Zellen in der Immunantwort gegen Viren wird auch dadurch unterstrichen, dass zahlreiche Viren Mechanismen entwickelt haben, die CD1d-vermittelte Lipidpräsentation mittels Immunevasion zu blockieren. So kodiert beispielsweise das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) mindestens zwei Proteine (Nef und Vpu), welche die CD1d-vermittelte Antigenpräsentation inhibieren. Nef vermittelt dabei über ein Tyrosin-Motiv in der zytoplasmatischen Sequenz von CD1d eine erhöhte Internalisierung von CD1d und die anschließende Retention im trans-Golgi-Netzwerk (TGN) (Cho et al. 2005; Chen et al. 2006; Schaefer et al. 2008). Vpu hingegen verhindert das Recycling von CD1d aus dem endosomalen Kompartiment zur Zelloberfläche, indem die Moleküle in den frühen Endosomen zurückgehalten werden (Moll et al. 2010). Das HSV-1 inhibiert mittels Glykoprotein B (gB) und US3 das CD1d-Recycling durch eine erhöhte Relokalisation von CD1d im TGN (Rao et al. 2011) und das Humane Papillomavirus (HPV) kodiert für das HPV E5-Protein, welches in Interaktion mit Calnexin den Austritt der CD1d-Moleküle aus dem ER ins TGN verhindert. Stattdessen werden die Moleküle ins Zytosol transferiert und hier durch das Proteasom degradiert (Miura et al. 2010). KSHV kodiert MIR-Proteine (MIR1 und MIR2), welche CD1d ubiquitinieren können, was zu einer Verringerung der CD1d-Oberflächenpräsentation führt, jedoch nicht zu dessen Degradation (Sanchez et al. 2005).

1.5.7. iNKT-Zellen in der mCMV-Infektion

Allgemein werden murine iNKT-Zellen nach mCMV-Infektion auch dann aktiviert, wenn keine CD1d-Expression vorhanden oder diese blockiert ist (Tyznik et al. 2008). Allerdings sind insbesondere Typ-I-IFN und IL-12 für die Aktivierung notwendig (Tyznik et al. 2008; Wesley et al. 2008). Dabei gibt es Hinweise, dass während der mCMV-Infektion iNKT-Zellen vorrangig über Zytokine aktiviert werden (Tyznik et al. 2008). iNKT-Zellen zeigen, nach Aktivierung durch eine mCMV-Infektion, eine verstärkte Expression von CD24 sowie eine starke Produktion von IFN γ (Wesley et al. 2008; Tyznik et al. 2008).

Van Dommelen folgerte 2003, dass iNKT-Zellen keine kritische Rolle in der Kontrolle der frühen mCMV-Infektion haben, da B6.WT und B6.J α 18^{-/-} das Virus in den Organen vergleichbar kontrollieren. Hingegen konnte in BALB/c und B6 nach Aktivierung der iNKT-Zellen mit α GalCer eine reduzierte virale Replikation in den viszeralen Organen (Milz und Leber) festgestellt werden (Van Dommelen, S. L. H. et al. 2003). Die Autoren führen diese antiviralen Effekte von α GalCer vor allem auf die Transaktivierung von NK-Zellen sowie deren Perforin- und IFN γ -Ausschüttung zurück. So zeigte sich kein α GalCer-Effekt in Perforin^{-/-}, IFN γ ^{-/-} und Perforin^{-/-}/IFN γ ^{-/-}-Mäusen (Van Dommelen, S. L. H. et al. 2003; Van Dommelen, S. L. H. und Degli-Esposti 2004). Bekannt ist jedoch mittlerweile, dass auch iNKT-Zellen über die Expression von Granzym B, Perforin, *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) und FasL Zytolyse vermitteln können (Nieda et al. 2004; Matsuda et al. 2006; Diao et al. 2008; Horst et al. 2012). Eine Untersuchung von BALB/c.J α 18^{-/-} im Vergleich zu WT-Mäusen ergab zudem, dass die iNKT-*knockout* Tiere das Virus, insbesondere in der Leber, schlechter kontrollierten, ein Effekt der durch eine NK-Zell-Depletion verstärkt wurde. Insgesamt war der NK-Zell-Beitrag zur Viruskontrolle dabei ähnlich hoch wie der von iNKT-Zellen, was darauf schließen lässt, dass iNKT-Zellen und NK-Zellen eigene Rollen in der antiviralen Antwort der Maus haben (Tyznik et al. 2014).

In BALB/c-Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine einmalige Gabe von α GalCer während der Infektion nicht nur die viralen Titer reduziert, sondern auch die Kinetik der inflammatorischen Antwort beeinflusst. So erhöht α GalCer Frequenz und Zahl von virus-spezifischen *Memory* CD8 T-Zellen (neun Wochen nach Infektion), obwohl die CD8 T-Zellzahl an Tag 7 nicht wesentlich beeinflusst ist (Reilly et al. 2012). Zudem beeinflusst die zeitgleiche Gabe von α GalCer mit einer mCMV-Infektion die Zytokinproduktion. So induziert mCMV die Produktion von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (IL-12p70, IFN γ , TNF α , MIP1 α , IL-6, MCP-1), mit einem Peak zwischen 24 und 40 Stunden (Krug et al. 2004). Die zusätzliche Gabe von α GalCer reduziert hingegen IFN γ , IL12p70, IL-6, TNF α MCP-1 und MIP1 α deutlich (Reilly et al. 2012).

Immunevasion ist eine bewährte Strategie des Cytomegalovirus der Immunkontrolle zu entkommen. Für iNKT-Zellen ist bisher noch kein Immunevasin in der mCMV-Infektion bekannt. Für HCMV wurde hingegen beschrieben, dass es die Gruppe 1 der CD1-Moleküle (CD1a-c (teils e)) sowohl auf transkriptioneller als auch auf post-transkriptioneller Ebene blockiert (Raftery et al. 2008). Für HCMV hingegen konnte bereits ein Immunevasin charakterisiert werden, welches die Aktivität von iNKT-Zellen herunterreguliert (Han et al. 2013). Dabei kommt es jedoch nicht zu einer Runterregulation von CD1d von der Zelloberfläche. Stattdessen interagieren die HCMV-Proteine US2 und US11 mit der $\alpha 3$ -Domäne des unausgereiften hCD1d im ER und führen zu dessen proteosomalen Degradation. Zusätzlich führt US2 zu einer Runterregulation der iNKT-Zell-Aktivität und dies obwohl die hCD1d-Expression nicht wesentlich verändert ist (Han et al. 2013).

1.5.8. Untersuchung von NKT-Zellen in der Maus

Da für die intakte Entwicklung von NKT-Zellen die Expression des CD1d-restringierten TZR von entscheidender Bedeutung ist (Bendelac 1995), fehlen diese Zellen (iNKT- und dNKT-Zellen) vollständig in der CD1d-defizienten Maus (Chen et al. 1997). In $J\alpha 18$ -defizienten Mäusen sind hingegen lediglich iNKT-Zellen abwesend (Cui et al. 1997). Zudem gibt es Unterschiede in der iNKT-Population zwischen den verschiedenen Mausstämmen. So sind in Wildtyp BALB/c mehrheitlich iNKT2-Zellen vorhanden (Lee et al. 2013), wo sie reichlich in den mesenterischen Lymphknoten lokalisiert sind. In C57BL/6-Mäusen dominieren hingegen iNKT1-Zellen (Lee et al. 2015).

1.6. Ziel der Arbeit

Eine HCMV-Infektion kann im immunsupprimierten Patienten schwerwiegende Folgen haben. Bis heute steht jedoch kein effizienter Impfstoff zur Verfügung. iNKT-Zellen haben die Fähigkeit, sowohl mit dem angeborenen als auch mit dem adaptiven Immunsystem zu interagieren. Ihre zahlreichen Effektorfunktionen ermöglichen ihnen dabei, die Immunantwort sowohl zu supprimieren als auch zu fördern. Daher gelten iNKT-Zellen als ein vielversprechendes Ziel für Immuntherapien vor allem auch, da CD1d nicht polymorph ist daher davon auszugehen ist, dass transferrierte iNKT-Zellen keine GvHD verursachen. Diskutiert werden iNKT-Zellen auch im Zusammenhang mit einer Impfantwort, bei der sie durch ihre raschen Effektorantworten möglicherweise eine Adjuvanz-ähnliche Stimulation leisten könnten (zur Übersicht: Crosby und Kronenberg 2018). Die Rolle von iNKT-Zellen in der CMV-Infektion ist bisher nur wenig verstanden. Aufgrund der zahlreichen Fähigkeiten von iNKT-Zellen sind diese jedoch ein attraktiver Kandidat um in die Immunkontrolle

einzugreifen. Aus diesem Grund soll die vorliegende Arbeit einen Beitrag zu einem grundlegenden Verständnis der Rolle von iNKT-Zellen in der mCMV-Infektion leisten. Ziel dieser Arbeit war es dabei, neben der Analyse der direkten Effektorfunktionen von iNKT-Zellen, auch ihren Einfluss auf andere, für die mCMV-Kontrolle wichtige Zelllinien zu analysieren.

2. Material

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

Firma	Sitz	Firma	Sitz
Aesculap	Tuttlingen	JPT Peptide Technologies	Berlin
Allied Vision Technologies	Stadtroda	Kern & Sohn	Balingen
AppliChem	Darmstadt	Keutz	Reiskirchen
Applied Biosystems/ Thermo Scientific	Foster City, USA	Labotec	Wiesbaden
Bachofer	Reutlingen	Leica	Wetzlar
Beckman Coulter	Krefeld	Life technologies/ Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
Becton Dickinson, (BD)	Heidelberg	LOLaborotechnik	Bad Homburg
Biochrom	Berlin	Mabtech	Hamburg
Biomers	Ulm	Machery & Nagel	Düren
Biometra	Jena	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG	Lauda-Königshofen
BioRad	München	Merck	Darmstadt
Biozym	Hessisch Oldendorf	Metabion	Martinsried
Braun	Melsungen	Millipore/ Merck	Schwalbach
Buchler	Braunschweig	Miltenyi Biotech	Bergisch-Gladbach
Cellular Technology Limited (CTL)	Cleveland, USA	Molsgaard Medical	Dänemark
Duran Group	Wertheim	New England Biolabs (NEB)	Frankfurt/Main
eBioscience/ Thermo Fisher Scientific	Wien, Österreich	Nikon	Düsseldorf
ELMI	Riga, Lettland	Olympus	Hamburg
Eppendorf	Hamburg	Operon Biotechnologies	Köln
Erlab	Köln	Pharmacia	Erlangen
Falcon/BD	Heidelberg	Pharmigen/ BD	Heidelberg
Funokoshi Co., Ltd.	Tokio, Japan	Rainin/ Mettler Toledo	Gießen
GFL	Burgwedel	Retsch	Haan
Gibco/ Thermo Scientific	Karlsruhe	R&D Systems	Wiesbaden
Gilson	Limburg	Roche	Mannheim
GMI	Ramsey, Minnesota USA	Roth	Karlsruhe
Grant/ VWR	Wien	Sarstedt	Nümbrecht

Greiner Bio One	Frickenhausen	Sartorius	Göttingen
Hammacher	Solingen	Scientific Industries	New York, USA
Hedinger	Stuttgart	Inc.	
Heraeus	Hanau	Serva	Heidelberg
Honeywell	Schönaich	Sharp	Ettlingen
IKA-Werke	Staufen	Sigma-Aldrich	Steinheim
Immudex	Kopenhagen, Dänemark	Chemie/ Merck	
INTEGRA Biosciences	Fernwald	WAKO Chemicals	Neuss
Invitrogen/ Thermo Scientific	Darmstadt	Vector Laboratories, Inc.	Burlingame, USA
		Vogel Histo-Comp	Gießen
Janier Labs	Le Genest-Saint-Isle, Frankreich	VWR International	Darmstadt
		Zeiss	Jena
Janke & Kunkel	Staufen		

2.1. Allgemeine Laborgeräte

Gerät	Typ, Hersteller
Brutschrank (Bakterien)	B6 und B12 Heraeus, Thermo Scientific
Brutschrank (Zellen)	B6 und Hera Cell 240 Heraeus, Thermo Scientific
ChemiDoc	XRS+, BioRad
Durchflusszytometer	Cytomics FC500, Beckman Coulter BD FACSCanto II, BD Biosciences
Electrophoresis Power Supply	EBS 301, Pharmacia EBS 600, Pharmacia
Elektroporator	Gene Pulser™, BioRad
Geldokumentationsanlage	Marlin F-145B2 IRF, Allied Vision Technologies Polaroid Land Camera MP-4 mit Polaroidfil Typ 667
Gelelektrophoresekammern	Keutz Thermo Scientific
Glaswaren	Laborglas Duran Group Thermo Scientific
Hand-Homogenisator	Dounce, B. Braun AG
Heizplatte/Magnetrührer	IKA Combimag RET-GS, Janke & Kunkel IKA RCTbasic, Janke & Kunkel
ImmunoSpot Reader	S6, Cellular Technology Limited (CTL), Cleveland, USA
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec GmbH
Mikroskope	Mikroskop: Se-Ph-3, Nikon Axio Lab, Zeiss Invertmikroskop: DM IL LED, Leica CKX31, Olympus

Mikrowelle	Sharp
Mikrotom	RM 2255, Leica
Mikroplatten Photometer	Multiskan FC, Thermo Scientific
Multikanalpipetten	Biohit, Sartorius Eppendorf Rainin/ Mettler Toledo
Paraffinerhitzer	HistoTAPlus, Leica
PCR Thermal <i>Cycler</i>	GenAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystems/ Thermo Scientific 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems/ Thermo Scientific
Photometer	BioPhotometer, Eppendorf Nanodrop ND-1000; Thermo Scientific
Pipetten	Eppendorf XLS, Rainin/ Mettler Toledo
Pipettierhilfe	Pipetboy, INTEGRA Biosciences, Easypet 3, Eppendorf
<i>real-time</i> PCR System	ABI Prism 7500 <i>Real Time</i> PCR System, Applied Biosystems
Schüttelinkubator	Certomat N, Labotec MaxQ 4000, Thermo Scientific
Schüttelwasserbad	OLS 200, Grant/ VWR
Schwingmühle	Mixer Mill MM300, Retsch GmbH
Sezierbesteck	Hammacher GmbH, Solingen
Standzentrifuge	<i>Superspeed</i> zentrifuge Sorvall RV 6 Plus, Thermo Scientific
Sterile Werkbank	HERA <i>safe</i> HS 12/2 und 15/2, Heraeus Sicherheitswerkbank HB 2472, Heraeus
Template Tamer	Captair bio, Erlab
Thermoschüttler	Thermomixer 5436, Eppendorf Thermomixer compact, Eppendorf
Tischzentrifugen	Centrifuge 5417R, Eppendorf Labofuge 400R, Heraeus Megafuge 2.0, Heraeus Multifuge 3 S-R, Heraeus Mikrofuge: CM07M Fugamix™ 7000, ELMI <i>Mini Centrifuge</i> C-1200, VWR International
Ultrazentrifuge	Sorvall Combi Plus, ThermoScientific
UV-Transilluminatoren	UVstar 312nm, Biometra
Varipette	Repeater Plus, Eppendorf
Vortex-Mixer	MS1 Minishaker und MS3 basic, IKA-Werke Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc.
Wasserbad	GFL
Waagen	Kern FCB 30K1, Kern & Sohn GmbH

	Kern 510, Kern & Sohn GmbH
	Kern 572, Kern & Sohn GmbH
Zählkammern	Neubauer- <i>improved</i> , LOLaboroptik GmbH

2.2. Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien

Deckglas	12mm Ø, Marienfeld Lab. Glassware (Nr. 011152)
Durchflusszytometerröhrchen	<i>Round-Bottom</i> Tube 12x75mm, BD Falcon (Nr. 352008)
Einfrierröhrchen	2ml CRYO.S PP, Greiner (Nr. 126263)
Einmal-Filterpipettenspitzen	LTS 20µL Filter 960/10 GP-L10F, Rainin/ Mettler Toledo (Nr. 17002429) LTS 200µL Filter 960/10 GP-L200F, Rainin/ Mettler Toledo (Nr. 17002428) LTS 1000µL Filter 768/8 GP-L1000F, Rainin/ Mettler Toledo (Nr. 17002426)
Einmal-Pipettenspitzen	Tips LTS 20 GP-L10, Rainin/ Mettler Toledo (Nr. 17002424) Tips LTS 250µL GP-L250S, Rainin/ Mettler Toledo (Nr. 17002431) Tips LTS 1000µL GP-L1000, Rainin/ Mettler Toledo (Nr. 17002423)
Einmal-Plastikpipetten	5ml, Greiner (Nr. 606180) 10ml, Greiner (Nr. 607180) 25ml, Greiner (Nr. 760180)
Einmal-Röhrchen	PP, 5ml, Greiner (Nr. 115261)
Einmal-Skalpelle	Aesculap AG & Co. KG (Nr. 5518075)
Einmal-Spritzen	1ml, Braun (Nr. 9166017V) 2ml, Braun (Nr. 4606027V) 5ml, BD (Nr. 309050) 10ml, BD (Nr. 309110) 20ml, BD (Nr. 300296)
Einmal-Stepperspitzen	DistriTip Maxi 12,5ml Gilson, (Nr. 7-4386) DistriTip Micro 125µl Gilson, (Nr. 7-4381)
Elektroporations-Küvetten	<i>Gene Pulser</i> Küvetten 0,1cm Spaltbreite, BioRad (Nr. 1652089)
ELISpot-Mikrotiterplatten	MultiScreen ^{HTS} Filter Plates, Millipore/ Merck (Nr. MSIPN455)
Kanülen	0,4x12mm, 27G, Braun (Nr. 4665406) 0,45x12mm, 26G, Braun (Nr. 4665457) 0,6x25mm, 23G, Braun (Nr. 4657667) 0,4x22mm, 27G, Braun (Nr. 4657705)
MACS Säulen	MS Columns, Miltenyi Biotech (Nr. 130-042-201)
Mikrotiterplatten	96 <i>well</i> -Flachbodenplatten, BD Falcon (Nr. 353072) 96- <i>well</i> Rundbodenplatte PS, Greiner (Nr. 6550101)

Objektträger	76x26mm Mikroskopobjektträger, geschnitten, Thermo Scientific (Nr. 12114682)
Petrischalen	steril, 60x15mm, Greiner (Nr. 628161) steril, 100x20mm, Greiner (Nr. 663102)
Reaktionsgefäße	1,5ml, Sarstedt (Nr. 72.690.001) 2,0ml <i>SafeSeal</i> , Sarstedt (Nr. 72.695.500)
Reaktionsgefäße (PCR)	0,2ml PCR Tube, Greiner (Nr. 683271) PCR Streifen 1x8 Gefäße 0,2ml, Greiner (Nr. 673210) Strip Caps für 1x8 Gefäße Flachdeckel 0,2ml, Thermo Scientific (Nr. AB-0784)
Serumröhrchen	Microtainer SST Tubes, BD (Nr. 365951)
Spritzenvorsatzfilter	Spritzenvorsatzfilter 0,45µm, VWR International (Nr. 514-0063)
Vakuum Filtrationssystem	250ml Stericup-GP 0,22µm, Millipore/ Merck (Nr. SCGPU02RE) 500ml Stericup Quick Release-GP 0,22µm, Millipore/ Merck (Nr. SCGPU05RE)
Zellenfilter	40µm, BD Falcon (Nr. 352340) 100µm, BD Falcon (Nr. 352360)
Zellkulturflaschen	25cm ² , Greiner (Nr. 690 160) 75cm ² , Greiner (Nr. 658 170) 25cm ² , BD Falcon (Nr. 35108)
Zellkulturplatten	6- <i>well</i> -TC-Flachbodenplatten beschichtet, Sarstedt (Nr. 83.390) 24- <i>well</i> -Flachbodenplatten beschichtet, Greiner (Nr. 677180) 48- <i>well</i> -Flachbodenplatten beschichtet, BD Falcon (Nr. 353078) 96- <i>well</i> -Flachbodenplatten beschichtet, Greiner (Nr. 655180) 6- <i>well</i> -Flachbodenplatten für Suspensionskultur, Greiner (Nr. 657185) 24- <i>well</i> -Flachbodenplatten für Suspensionskultur, Greiner (Nr. 662102)
Zellkulturschalen	60/15mm, BD Falcon (Nr. 353004) 100/20mm, Greiner (Nr. 664140) 100/20mm, BD (Nr. 353003) 150/25mm, Sarstedt (Nr. 83.3903)
Zellschaber	<i>Cell Scraper</i> , BD Falcon (Nr. 353087)
Zentrifugenröhrchen	15ml Spitzboden PP, Greiner (Nr. 188271) 50ml Spitzboden PP, Greiner (Nr. 227261)

2.3. Chemikalien und andere Reagenzien

Die aufgelisteten Chemikalien und Reagenzien wurden, wenn nicht anders vermerkt, in p.a. Qualität (analysenrein) bezogen. Für die Herstellung von Puffern und Lösungen wurde in der Regel VE-Wasser ($\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$, Millipore/ Merck) verwendet. Nur bei bestimmten Ansätzen wurde auf $\text{Aqua}_{\text{bidest}}$ (*Aqua ad iniectabilia*, Braun) zurückgegriffen.

2.3.1. Chemikalien

<i>Aqua</i> _{bidest} . (<i>Aqua</i> B. Braun)	B. Braun AG (Nr. 82479E)
α -Galactosylceramid	Funakoshi Co., Ltd. (Nr. KRN7000)
Agarose (Biozym LE)	Biozym (Nr. 840004)
Bacto Agar	BD (Nr. 214010)
BCIP/NBTplus Substrat	Mabtech (Nr. 3650-10)
Brefeldin A	5mg/ml, R&D (Nr. 1231/5)
Borsäure	Roth (Nr. 6943.1)
Bovines Serumalbumin (BSA)	BSA Fraction V USA origin, PAA Laboratories (Nr. K45-001)
Bromphenolblau Natriumsalz	Roth (Nr. A512.1)
Chloramphenicol (Cam)	34mg/ml, Roth (Nr. 3886.2)
DAB (3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid)	Sigma/Merck (Nr. D5637)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Nr. 4720.2)
DNA-Längenstandard	1 kb ⁺ DNA Ladder, Invitrogen/ Thermo Scientific (Nr. 10787018)
DPBS	Dulbecco's <i>Phosphate Buffered Saline</i> , Gibco/ Thermo Scientific (Nr. 14190)
DPBS++	Dulbecco's <i>Phosphate Buffered Saline</i> + Kalzium und Magnesium, Gibco/ Thermo Scientific (Nr. 14040133)
D(+)-Saccharose	Roth (Nr. 4621.1)
Erythrozyten-Lysepuffer	<i>Red Blood Cell Lysing Buffer</i> , Sigma/ Merck (Nr. R7757)
Ethanol 70% vergällt	Roth (Nr. T913.1)
Ethanol absolut	Honeywell (Nr. 24194-1L)
Ethylendiamin-tetraessigsäure-Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Applichem (Nr. A3553,1000) Roth (Nr. 3619.1) Roth (Nr. 8043.3)
Essigsäure (100%)	Roth (Nr. 3738.5)
Formalin 37% (v/v)	Merck (Nr. 1040035000)
D (+)-Glucose	Roth (Nr. X997.2)

Glycerin (86%)	Roth (Nr. 7533.3)
HD Green plus Safe DNA Dye	Intas (Nr. ISII-HDGreen Plus)
Isopropanol	Hedinger, (Nr. GH 05001)
Kaliumacetat (KAc)	Roth (Nr. 4986.1)
Kaliumchlorid (KCl)	Roth (Nr. 6781.1)
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Roth (Nr. P748.1)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth (Nr 3904.1)
Kanamycin	10mg/ml, Roth (Nr. T832.2)
L(+)-Arabinose	Roth (Nr. 5118.2)
L-Glutamin	200mM, Gibco/ Thermo Scientific (Nr. 25030-024)
Mayer's Hämatoxylin	Sigma/ Merck (Nr. MHS80)
2-Mercaptoethanol (β-ME)	Roth (Nr. 4227.1)
Methylzellulose	VWR international, BDH Prolabo (Nr. 25499.182) Sigma (Nr. MG512-250G)
Natriumacetat (NaAc)	C ₂ H ₃ NaO ₂ x 3H ₂ O Roth (Nr. 6779.2)
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Roth (Nr. 8563.1)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Nr. 3957.1)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Nr.CN30.1)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Roth (Nr. 6885.1)
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth (Nr. 6771.2)
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth (Nr. P030.2)
Paraffin	Vogel-Histo Comp (Nr. V0-5-1002)
Percoll	Sigma/ Merck (Nr. GE 17-0891-019)
Penicillin/Streptomycin	10.000U/ml, Gibco/ Thermo Scientific (Nr. 15140122)
Polyoxoethylensorbitan Monolaurat (Tween®20)	Sigma/ Merck (Nr. P1379)
Salzsäure (HCl)	25%, AppliChem (Nr. 133378)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth (Nr. 4855.3)
Triton X-100 (Iso-octylphenoxy-polyethoxyethanol)	Roth (Nr. 3051.3)
Trypsin	Sigma/ Merck (Nr. T7409)
Trypsin/EDTA 0,05%	Gibco, Life Technologies (Nr. 15400-054)
Trypton	Oxoid™ Trypton, Thermo Scientific (Nr. CM0129)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	30% (v/v), Roth (Nr. 8070.1)
Xylol	Millipore/Merck (Nr. 108684)
Yeast extract SERVABACTER	Serva (Nr. 24540.03)

2.3.2. Kits

Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Solution Kit with BD GolgiPlug	BD (Nr. 555028)
Dneasy Blood and Tissue Kit	Qiagen (Nr. 69506)
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Roche (Nr. 11858874001)
HotStar HiFidelity Polymerase Kit	Qiagen (Nr. 202602)
NucleoBond PC 500 Kit	Macherey & Nagel (Nr. 740574)
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen (Nr. 210212)
Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Nr. 12163)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Nr. 28706)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Nr. 28106)
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen (Nr. 204143)
RNase-Free DNase Set	Qiagen (Nr. 79254)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Nr. 74106)
VECTASTAIN® ABC-Peroxidase-Kit	Vector Laboratories, Inc. (Nr. PK-4000)

2.3.3. Enzyme

Dnase I	3mg/ml, Sigma/Merck (Nr. DN-25)
<i>EcoRI</i>	NEB (Nr. R0101L)
Kollagenase D	Sigma/Merck (Nr. 11088858001)
RNase	DNase frei, Qiagen (Nr. 19101)
Streptavidin-ALP	Mabtech AB (Nr. 3310-10)

2.3.4. Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden als Lyophilisate von den Firmen Metabion, Operon Biotechnologies oder Biomers bezogen. Nach Lieferung wurden die Oligonukleotide in sterilem H₂O_{bidest} bzw. die TaqMan-Sonden in TRIS-Puffer (10mM, pH 8,0) gelöst und bei -20°C gelagert. Die Positionsangaben für mCMV-Sequenzen erfolgen nach Rawlinson et al., 1996 (GenBank Accession No.: NC_004065). Die Sequenzen der *Primer* sind in 5'-3' Orientierung angegeben.

2.3.4.1. Oligonukleotide zur PCR-vermittelten Mutagenese von rekombinanten mCMV-BAC

Die *Primer* für die PCR-vermittelte Mutagenese enthalten einen homologen Bereich zum mCMV-Genom, welcher den Deletionsbereich umgibt (rot, blau bzw. gelb, grün; siehe Abb. 3.1) und eine Bindungstelle zum Plasmid pori6KanRIT (zur Übersicht siehe 3.3.11.).

<i>Primer</i>	5' -> 3'	Position
pori6KanRIT_rev _short	gtgaccacgctcgtggaatgc	
Δ m01- Δ m10_for	ACGCGCACGTGTTAGCATAGGAATCCAGACGCGC GCTCGCCTGAGATGACTCAACAGTGAATAAACGC TGgacgcatcgtggccgatctc	435-479_10.501- 10.526
Δ m01- Δ m10_rev	CAAATTATTTTGTCCGAAACAGCGTTTTATTCACTG TTGAGTCATCTCAGGCGAGCGCGCTGTGGgtgacc acgctcgtggaatgc	10.501- 10.545_459-479
Δ m01- Δ m10_short_for	ACGCGCACGTGTTAGCATAGGAATC	435-459
Δ m11- Δ m19_for	GGTAGATCACACTCTGCTCAAGGCAGGTAAGATC CCGTACAGCACCAGAGAGGGTGATGGCGATCGC CCgacgcatcgtggccgatctc	10.666- 10.714_20.782- 20.802
Δ m11- Δ m19_rev	CGAGTCTTCGGAGCTGTACGCTAGGGCGATCGCC ATCACCTCTCTCGGTGCTGTACGGGATCTTACCT gtgaccacgctcgtggaatgc	20.782- 20.825_10.690- 10.714
Δ m11- Δ m19_short_for	GGTAGATCACACTCTGCTCAAGGC	10.666-1.0689
Δ m141- Δ m150_for	GATCTGATGCTGTTAGTGAGCTAGGTGGAGATGAT AATGCCGCTGTTTTATTAGACCCGCCGACAATCAG gacgcatcgtggccgatctc	197.627- 197.671_208.789 -208.813
Δ m141- Δ m150_rev	CCACAGCGAGCTCAGCTTTCGATAACTGATTGTCCG GCGGTCTAATAAAAACAGCGGCATTATCATCTCCA Cgtgaccacgctcgtggaatgc	208.789- 208.838_197.651 -197.671
Δ m141- Δ m150_short_for	GATCTGATGCTGTTAGTGAGCTAG	197.627-297.650
Δ m151- Δ m158_for	CGCGACAATACACATTTTTATTAGACCGCCGACAA TCAGTTATCGTCACAACCTGACTATTCCCCGgacgc atcgtggccgatctc	208.775- 208.818_218.003- 218.024
Δ m151- Δ m158_rev	GTCGTGTGCCGCTATTTCTATCGCGCGTTCCGGG AATAGTCAGGTTGTGACGATAACTGATTGTCCGCG GTgtgaccacgctcgtggaatgc	218.004- 218.054_208.799- 208.818
Δ m151- Δ m158_short_for	CGCGACAATACACATTTTTATTAG	208.775-208.798

2.3.4.2. Oligonukleotide zur Überprüfung der Mutationen im mCMV-BAC

Primer	5' -> 3'	Position
Δ m01- Δ m10flk_for	CGCGTTCTGCTAGTTAGG	246-263
Δ m01- Δ m10flk_rev	GCTGTACGGGATCTTACC	10.691-10.708
Δ m11- Δ m19flk_for	TCCGATCCGCTGAATTCC	10.461-10.478
Δ m11- Δ m19flk_rev	CTACTCCTGCGTCTTCAC	20.986-21.003
Δ m141- Δ m150flk_for	CTGTTCTCCTGGCAGTAATC	19.6942-196.961
Δ m141- Δ m150flk_rev	GTTCTACTCGTCGTGCTATC	20.8926-208.945
Δ m151- Δ m158flk_for	CACCGACGATCGAATGACAC	207.950-207.970
Δ m151- Δ m158flk_rev	TCGAAATCTGTGCCCTCTC	218.150-218.169

2.3.4.3. Oligonukleotide zur Quantifizierung von viralen Genomen in Organhomogenaten

Primer	5' -> 3'	Position
LCgB_for3	GAAGATCCGCATGTCCTTCAG	84.017-84.037
LCgB_rev3	AATCCGTCCAACATCTTGTCG	84.151-84.131
		GenBank Accession No.: AH003058.2
LCPTHrP_for2	GGTATCTGCCCTCATCGTCTG	327-307
LCPTHrP_rev 2	CGTTTCTTCCTCCACCATCTG	186-206

2.3.4.4. Oligonukleotide zur absoluten Quantifizierung von Transkripten

Primer	5' -> 3'	Position
		GenBank Accession No.: NM_007393
β -actin_For1	GACGGCCAGGTCATCACTATTG	809-830
β -actin_Rev1	CACAGGATTCCATACCCAAGAAGG	896-873
β -actin_P1	[6~FAM]AACGAGCGGTTCCGATGCC[6~FAM]	833-852
		mCMV
E1_Intron1_For1	TCGAAGAGGAATGTTCTCCACG	163.878-163889 (Exon 1)
		163983-163992 (Exon 2)
E1_Intron2_Rev1	TTGTTGTCCTCCATCGCTGA	164496-164486 (Exon 3)
		164159-164151 (Exon 2)
E1_Taq_P2	[6~FAM]AGCCCAAGCGCCAGAAGACCCA [TAMRA~6~FAM]	164004-164025
IE1_Taq_For1	TGGCTGATTGATAGTTCTGTTTTATCA	181184-181210
IE1_Taq_Rev1	CTCATGGACCGCATCGCT	181438-181421
IE1_Taq_P1	[6~FAM]AACGCTCCTCACTGCAGCATGCTTG [TAMRA~6~FAM]	181239-181249 (Exon 4)
		181372-181385 (Exon 3)

2.3.5. Plasmide

Plasmid	Bemerkung	Referenz
pDRIVE-gB-PTHrP-BAC	Standard zur absoluten Quantifizierung in <i>real-time</i> PCR, enthält Sequenzen des BAC-Vektors sowie der Gene <i>M55/gB</i> und <i>PTHrP</i> .	(Lemmermann et al. 2010b)
pori6Kan_RIT	Verwendet zur Herstellung von rekombinanten Viren, enthält eine Kanamycin-Kassette und die Schnittstelle der <i>Homing-Endonuklease I-SceI</i> .	Zur Verfügung gestellt von M. Messerle, MH Hannover (Hammer et al. 2018)

2.3.6. mCMV Peptide

Die in dieser Arbeit verwendeten MHC-Klasse-I-präsentierten antigenen mCMV-Peptide wurden von der Firma JPT Peptide Technologies GmbH synthetisiert. Die HPLC-gereinigten Peptide wurden als Lyophilisate mit einer Reinheit von ~80% bezogen. Für den weiteren Gebrauch wurden die Peptide in 1% DMSO oder 1M Acetonitril (v/v) (Cystein-, Tryptophan- oder Methionin-haltige Peptide) gelöst, mit PBS auf eine Konzentration von 10^{-3} M oder 10^{-4} M eingestellt und bei -70°C gelagert. Die antigenen Peptide wurden zur Restimulation mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen und zur Beladung Antigen-präsentierender Zellen (APC) im ELISpot Assay eingesetzt. Die Position der Aminosäuren bezieht sich auf die nach Rawlinson et al. (1996) definierten ORFs.

ORF	Peptidsequenz	MHC-I-Restriktion	Referenz
antigene mCMV-Peptide im Haplotyp H-2 ^d			
M105	²⁰⁷ TYWPVVSDI ²¹⁵	K	(Holtappels et al. 2008a)
m123 (IE1)	¹⁶⁸ YPHFMPTNL ¹⁷⁶	L	(Reddehase et al. 1989)
m145	⁴⁵¹ CYYASRTKL ⁴⁵⁹	K	(Holtappels et al. 2008a)
m164	²⁵⁷ AGPPRYSRI ²⁶⁵	D	(Holtappels et al. 2002b)
antigene mCMV-Peptide im Haplotyp H-2 ^b			
M45	⁹⁸⁵ HGIRNASFI ⁹⁹³	D	(Munks et al. 2006a; Munks et al. 2006b)
M57	⁸¹⁶ SCLEFWQRV ⁸²⁴	K	(Munks et al. 2006a; Munks et al. 2006b)
m139	⁴¹⁹ TVYGFCLL ⁴²⁶	K	(Munks et al. 2006a; Munks et al. 2006b)
m141	¹⁶ VIDAFSRL ²³	K	(Munks et al. 2006a; Munks et al. 2006b)

2.3.7. Antikörper

2.3.7.1. Antikörper und MHC-Multimere für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Klon	Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
Goat anti rabbit IgG Alexa Fluor-488			1:500	Invitrogen/ Thermo Scientific
CD1d-APC	1B1	Ratte IgG2b	1:40	eBioscience
CD1d1 Dextramer-PE			10µl/ 10 ⁶ Zellen	Immudex
CD3ε-APC/Cy7	17A2	Ratte IgG2b	1:100	BD Pharmingen
CD3ε-FITC	145-2C11	Hamster IgG1	1:100	Beckman Coulter
CD3ε-PerCP/Cy5.5	17A2	Ratte IgG2b	1:100	BD Pharmingen
CD3ε-PECy7	145-2C11	Hamster IgG1	1:200	BioLegend
CD8-APC	53-6.7	Ratte IgG2a	1:200	eBioscience
CD8α-PE	53-6.7	Ratte IgG2a	1:200	BioLegend
CD16/CD32 (Fc Block)	93	Ratte IgG2a	1:50	eBioscience
CD45.2-v500	104	Mouse SJL IgG2a	1:200	BD Horizon
H-2K ^d -PE	SF1-1.1	Maus IgG2a	1:100	BD Pharmingen
IE1-Multimer H2-L ^d			10µl/ 10 ⁶ Zellen	Immudex
IFNγ-APC	XMG1.2	Ratte IgG1	1:300	BD Pharmingen
Live/Dead-v450 (FVS450)			1:1000	BD Horizon
m164/gp36.5	Pep2_7	Kaninchen	1:20	(Holtappels et al. 2006)
NK1.1- PECy7	PK136	Maus IgG2a	1:200	BD Pharmingen
NKp46-APC	A291.4	Ratte IgG2a	1:200	BioLegend
NKp46-PerCP/Cy5.5	A291.4	Ratte IgG2a	1:100	BioLegend

2.3.7.2. Antikörper für den ELISpot-Assay

Bezeichnung	Klon	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
Primärantikörper: α-Maus IFNγ	RMMG-1	Ratte	5µg/ml	Millipore (Nr. MAB1152)
Sekundärantikörper: α-Maus IFNγ (biotingekoppelt)	XMG1.2	Ratte	0.5mg/ml	BD Pharmingen (Nr. 18112D)

2.3.7.3. Microbeads-gekoppelte Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
α -Maus CD8 (Ly2) <i>Microbeads</i>	Ratte	10 μ l/10 ⁷ Zellen	Miltenyi Biotech (Nr. 130-049-401)

2.3.7.4. Antikörper für *in vivo* Depletion von Lymphozyten

Bezeichnung	Klon	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
α -Maus anti-asialo GM1	polyklonal	Kaninchen	20 μ l/Maus	WAKO Chemicals GmbH (Nr. 986-10001)
α -CD8 <i>Ascites</i>	YTS 169.4	Ratte	1,2mg/Maus	Prof. Dr. Stipan Jonjić, University of Rijeka, (Kroatien)

2.3.7.5. Antikörper für die Immunhistochemie

Bezeichnung	Klon	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
α -IE1	Croma 101	Maus	1:250	Prof. Dr. Stipan Jonjić, University of Rijeka, (Kroatien)
α -mouse (Fab)-biotin	polyklonal	Ziege	1:200	Sigma/ Merck (Nr. B0529)

2.4. Materialien für die Zellkultur

Alle Medien, Lösungen und Zusätze für die Zellkultur wurden, soweit nicht anders vermerkt, mit H₂O_{deion} angesetzt und bei Bedarf durch einen 40 μ m Membranfilter steril filtriert. Die Lagerung erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 4°C.

2.4.1. Reagenzien und Medienzusätze

β -ME (2-Mercaptoethanol) Roth

Das Reduktionsmittel wurde in einer Stocklösung von 100 μ l β -ME pro 100ml H₂O_{bidest} angesetzt, aliquotiert (10ml) und bei -20°C aufbewahrt. Als Oxidationsschutz diverser Inhaltstoffe wurde es den entsprechenden Medien (End[c]: 5x10⁻⁵M) zugesetzt.

Fötales Kälberserum (FCS, *fetal calf serum*) PAA Laboratories

Als Zusatz für Zellkulturmedien diente steriles und auf Mycoplasmen getestetes FCS. Vor Gebrauch wurde das FCS bei 4°C aufgetaut und anschließend zur Komplement-Inaktivierung für 30min bei 56°C im Wasserbad inkubiert. Das inaktivierte FCS wurde in 50ml Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

HEPES (Hydroxyethylpiperazinyl-Ethansulfonsäure) Gibco/ Thermo Scientific

Die im physiologischen pH-Bereich wirksame Puffersubstanz wurde Zellkulturmedien besonders schnell wachsender Kulturen hinzugefügt, um den pH-Wert stabil zu halten. Die Pufferkapazität von HEPES liegt zwischen pH 6,8 und pH 8,2. Die bezogene 1M Lösung wurde in einer Endkonzentration von 10mM dem Medium hinzugefügt.

L-Glutamin Gibco/ Thermo Scientific

Die Stocklösung (200mM in 0,9% (w/v) NaCl) wurde aliquotiert (5ml) und bei -20°C gelagert. Für die Verwendung wurde das L-Glutamin frisch aufgetaut, bei 37°C in Lösung gebracht und in einer Endkonzentration von 20nM dem Medium zugesetzt.

Methylzellulose-Medium *VWR International*

Methylzellulose	8,8g
H ₂ O _{bidest.}	360ml

autoklavieren und ü.N. bei 4°C unter Rühren lösen. Vor Gebrauch Zugabe von:

10x MEM	40ml
L-Glutamin	2mM
Penicillin	100U/ml
Streptomycin	0,1mg/ml
FCS	5% (v/v)

mit NaHCO₃ (Stocklösung 55g/l) auf pH 7,5 einstellen, Lagerung bei 4°C.

Penicillin/Streptomycin (P/S) Gibco/ Thermo Scientific

Zur Antibiotika-Prophylaxe gegen grampositive und gramnegative Bakterien wurde die Kombination Penicillin/Streptomycin eingesetzt. Die Stocklösung aus 10.000U Penicillin und 10mg/ml Streptomycin in 0,9% (w/v) NaCl wurde in 5ml Aliquots bei -20°C gelagert und bei Bedarf dem Kulturmedium zugesetzt (Endkonzentration: 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin).

PolyFect Reagenz Qiagen

Diese aus sphärischen, positiv-geladenen Dendrimern bestehende Substanz wurde zur Transfektion von BAC-Plasmiden verwendet. Die Dendrimere interagieren mit der negativgeladenen DNA und bilden mit dieser kompakte Komplexe. Diese werden anschließend endozytiert und die DNA in der Zelle freigesetzt.

Trypanblau

Biochrom/ Merck

Eine Gebrauchslösung dieses Vitalfarbstoffs (0,1% (w/v) in PBS) wurde zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen verwendet.

TÜRK's Lösung

Merck

Die Lösung dient zum Anfärben der Zellkerne mononukleärer Zellen bei gleichzeitiger Hämolyse der Erythrozyten durch die in der Lösung enthaltene Essigsäure.

Trypsin/EDTA (pH 7,0-7,5)

Gibco/ Thermo Scientific

Die zum Ablösen von adhärenenten Zellen verwendete Lösung wurde vor Gebrauch 1:10 mit PBS verdünnt (Endkonzentration: 0,5g/l Trypsin, 0,2g/l EDTA, pH 7,0-7,5).

2.4.2. Zellkulturmedien

Die sterilen Zellkulturmedien wurden von der Firma Gibco/ Thermo Fisher Scientific bezogen und bei 4°C gelagert. Soweit nicht anders vermerkt, wurden in dieser Arbeit nur GlutaMAX™ Medien mit einer stabilisierten Dipeptid-Form von L-Glutamin (L-Alanyl-L-Glutamin) verwendet. Weitere Medienzusätze wurden bei Bedarf zugesetzt.

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

Nr. 61965026

FCS 10% (v/v)

Penicillin 100U/ml

Streptomycin 0,1mg/ml

MEM α (*Minimal Essential Medium alpha*) **+10% FCS/ + 7,5% FCS**

Nr. 32561029

FCS 10% (v/v) oder 7,5% (v/v)

Penicillin 100U/ml

Streptomycin 0,1mg/ml

 β -ME $5 \times 10^{-5} \text{M}$

HEPES 10mM

MEM 1x (-) (*Minimum Essential Medium*) ohne Glutamin

Nr. 11090081

MEM 1x (*Minimum Essential Medium*)

Nr. 41090028

FCS 10% (v/v)

Penicillin 100U/ml

Streptomycin 0,1mg/ml

MEM 10x (*Minimum Essential Medium*), ohne Glutamin

Nr. 21430020

RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) Medium 1640

Nr. 61870010

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

2.4.3. Zelllinien

Murine Embryofetale Fibroblasten (MEF)

Diese primären, adhärenenten Zellen wurden, wie unter 3.1.5. beschrieben, isoliert (Passage 1). Die Kultivierung der MEF erfolgte auf Zellkulturschalen. Nach Erreichen der Konfluenz konnten die Zellen nach einem Waschschrift (PBS), mit Trypsin/EDTA (pH 7,4; 1ml/Schale) abgelöst und für die weitere Kultivierung 1:3 oder 1:4 gesplittet werden. Die MEF wurden ausschließlich bis Passage 3 zur Rekonstitution rekombinanter Viren nach Transfektion von mCMV-BAC-DNA, zur mCMV-Produktion, für Virustiterbestimmungen und Infektionsstudien genutzt. Die Permissivität dieser Zellen für mCMV ist hoch und die Plauebildung gut verfolgbar.

Kulturmedium: 1x MEM

EL4

Nr. TIB-39™, ATCC

Die ursprünglich aus der C57BL/6 Maus isolierte, immortalisierte T-Zell Lymphom-Zelllinie besitzt den MHC-Haplotyp H-2^b (MHC-I-Moleküle: D^b, K^b). Die Suspensionszellen sind MHC-Klasse II negativ und wurden als APC im Zytolysetest sowie im ELISpot eingesetzt.

Kulturmedium: DMEM

P815

Nr. TIB-64™, ATCC

Diese immortalisierte Mastozytom-Zelllinie wurde ursprünglich aus der DBA/2-Maus isoliert und besitzt den MHC-Haplotyp H-2^d (MHC-I-Moleküle: D^d, K^d, L^d). Die Suspensionszelllinie ist MHC-II negativ und wurde als APC im ELISpot-Assay eingesetzt.

Kulturmedium: RPMI

2.5. Bakterien

Die molekularbiologischen Arbeiten wurden vorrangig in *E. coli* des Stamms GS1783 durchgeführt. Dieser leitet sich vom Stamm DY380 ab, welcher sich wiederum vom *E. coli* Stamm DH10B ableitet. Dieser ist besonders für Transformation und Propagierung von großen bis sehr großen DNA-Fragmenten geeignet. Der Stamm GS1783 kodiert für das Rekombinationssystem des λ -Phagen mit den Genen *exo*, *bet* und *gam*, die unter der Kontrolle des temperatursensitiven *ci*-Repressors stehen, so dass die Genexpression bei 32°C aus- und bei 42°C angeschaltet sind. Zusätzlich kodieren GS1783 für die *Homingendonuklease* I-*SceI*, welche durch Arabinose induzierbar ist (zur Übersicht: (Warming et al. 2005).

Stamm	Genotyp	Referenz
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	(Grant et al. 1990; Durfee et al. 2008)
DY380	DH10B [lc1857 (cro-bioA) \leftrightarrow Tet] galK+gal490	(Lee et al. 2001a)
GS1783	DY380 \leftrightarrow araC-PBADI- <i>SceI</i>	(Tischer et al. 2006)

2.6. Viren

2.6.1. Wildtyp-Isolate

WT.Smith: Dieser Laborstamm des murinen Cytomegalovirus wurde 1954 isoliert (mCMV, *Smith strain*, (Smith 1954; Smith und Smith 1956) ATCC VR-194; neue Bezeichnung VR-1399) und ist die Grundlage für die genomweite Sequenzierung von mCMV durch William Rawlinson (Rawlinson et al. 1996).

MW97.01 (mCMV-WT.BAC^{Wagner}): Die chimäre mCMV-Rekombinante wurde aus dem Genom des Laborstammes ATCC VR-1399 sowie einem Anteil (*HindIII*-E-Fragment) des mCMV-Laborstammes K181 generiert. Sie zeigt *in vivo* keine Unterschiede in den biologischen Eigenschaften zu mCMV-WT.Smith (Wagner et al. 1999). Zur Verfügung gestellt wurde uns mCMV-WT.BAC^{Wagner} freundlicherweise von Prof. Dr. Ulrich H. Koszinowski (Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München).

pSMfr-MCK-2fl 3.3 (mCMV-WT.BAC^{Adler}): Im Wildtyp-Isolat mCMV-WT.Smith wird das mCMV-Protein MCK-2, codiert von den ORFs m129 und m131, sowohl in einer verkürzten, als auch in einer verlängerten Version translatiert. Dieses CC(β)- Chemokinomolog ist an der Rekrutierung von Leukozyten beteiligt und beeinflusst die virale Dissimination. Die

verkürzte Variante entsteht durch die Deletion eines T-A Basenpaares an Position 187786 (Positionsangabe nach: (Rawlinson et al. 1996); *GenBank Accession No.*: NC_004065), da diese eine *frameshift*-Mutation auslöst, welche zu einem Stop-Codon im Leserahmen des Chemokinhomolog MCK-2 führt. Im mCMV-WT.BAC^{Wagner} ist lediglich die verkürzte Version des MCK-2 Proteins codiert. Die Folge ist eine reduzierte Dissemination in die Speicheldrüsen (Jordan et al. 2011). Im mCMV-WT.BAC^{Adler} wurde diese Mutation durch die Insertion des Basenpaares mittels markerloser BAC-Mutagenese (Tischer et al. 2006) „repariert“, so dass das 280AS lange Protein vollständig translatiert wird. Die Infektion mit diesem Virus führt zur Wiederherstellung von hohen Virustitern in den Speicheldrüsen (Jordan et al. 2011). Zur Verfügung gestellt wurde uns mCMV-WT.BAC^{Adler} freundlicherweise von Dr. Barbara Adler (Max von Pettenkofer-Institut für Virologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München).

2.6.2. Verwendete Virusrekombinanten

Die folgenden verwendeten Viren wurden uns freundlicherweise von U.H. Koszinowski (Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München) zur Verfügung gestellt.

mCMV- Δ vRAP: Mittels PCR-basierter BAC-Mutagenese wurden die ORFs der drei Immunevasine m152, m06 und m04 deletiert (Wagner et al. 2002).

mCMV- Δ 157: In dieser Virusrekombinante wurde der ORF des Gens m157 deletiert, dessen Genprodukt an den aktivierenden NK-Zell-Rezeptor Ly49H bindet. Dieser NK-Zell-Rezeptor wird jedoch nur von in C57BL/6 kodiert, was zu einer verbesserten, frühen NK-Zell-Kontrolle im Vergleich zu BALB/c führt. Die Verwendung von mCMV- Δ 157 führt zu einer ähnlichen Immunkontrolle in C57BL/6- und BALB/c-Tieren (Bubić et al. 2004).

2.6.3. Hergestellte Virusrekombinanten

Die in dieser Arbeit generierten mCMV-Deletionsmutanten wurden basierend auf dem mCMV-WT.BAC^{Wagner}-Plasmid (Wagner et al. 1999) und mCMV-WT.BAC^{Adler}-Plasmid (Jordan et al. 2011) mit Hilfe der markerlosen BAC-Mutagenese generiert ((Tischer et al. 2006); siehe 3.3.11.). Die Positionsangaben erfolgen nach (Rawlinson et al. 1996); *GenBank Accession No.*: NC_004065.

mCMV- Δ m01- Δ m10^{Wagner} und mCMV- Δ m01- Δ m10^{Adler}: Diesen Deletionsmutanten fehlen die ORFs der Gene m01 bis einschließlich m10 (Nukleotide n459-10.526).

mCMV- Δ m11- Δ m19^{Wagner} und mCMV- Δ m11- Δ m19^{Adler}: Diesen Deletionsmutanten fehlen die ORFs der Gene m11 bis einschließlich m19 (Nukleotide n10.690-20.802).

mCMV- Δ 141- Δ 150^{Wagner}: Dieser Deletionsmutante fehlen die ORFs der Gene m141 bis einschließlich m150 (Nukleotide n197.651-208.813).

mCMV- Δ 151- Δ 158^{Wagner}: Dieser Deletionsmutante fehlen die ORFs der Gene m151 bis einschließlich m158 (Nukleotide n208.799-218.024).

Anmerkung: In dieser Arbeit werden die Viren wie folgt abgekürzt: mCMV-BAC.WT^{Wagner} als WT^W, mCMV- Δ vRAP als Δ vRAP, usw. Für die Infektion der Versuchstiere wurden ausschließlich aufgereinigte Virus-Stocks aus Zellkulturen verwendet.

2.7. Versuchstiere

BALB/cJ: Haplotyp H-2^d MHC-Klasse-I-Moleküle K^d, D^d und L^d

C57BL/6J: Haplotyp H-2^b MHC-Klasse-I-Moleküle K^b, D^b

Die Versuchstiere der Inzuchtstämme BALB/cJ bzw. C57BL/6 wurden von Janvier Labs bezogen.

CD1d^{-/-}: Beim CD1d^{-/-}-Stamm (genaue Allelbezeichnung CD1^{tm1Gru}) wurden die meisten codierenden Sequenzen der CD1d1 und CD1d2 Gene (alternative Bezeichnung CD1.1, CD1.2) deletiert. Dabei wurde der Leserahmen des CD1d1 Locus durch eine Neomycin-Resistenzkassette ersetzt. Die zwischen den Genen liegenden DNA-Sequenzen wurden erhalten. Homozygoten Mutanten fehlt die NKT-Zellpopulation. Dieser *knockout* wurde sowohl auf C57BL/6 (Exley et al. 2003) als auch auf BALB/cJ (Smiley et al. 1997) Hintergrund genutzt.

J α 18^{-/-}: Im J α 18^{-/-}-Stamm (alternative Bezeichnung: J α 281^{-/-}) wurde das ca. 1kb große Clal-Fragment des J α 18-Locus durch eine Neomycin-Resistenz-Kassette ersetzt. Die offizielle Bezeichnung des Allels lautet Tcra-Jtm1Tgi (T-cell receptor alpha, joining region; targeted mutation 1, Masaru Taniguchi). Der genetische Hintergrund ist B6 (Cui et al. 1997).

Ein BALB/c.CD1d^{-/-} (Cd1^{tm1Gru}/Cd1^{tm1Gru}) Zuchtpaar wurde von *Jackson Laboratories* bezogen (Nr. 002962/ CD1⁻). Die *knockout* Tiere auf C57/BL/6-Hintergrund wurden von Dr. Uwe Klemm (Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin) über Univ.-Prof. Dr. med. Esther von Stebut-Borschitz (Universitätsmedizin Mainz) bezogen. Die genetisch veränderten Tiere BALB/c.CD1d^{-/-}, B6.CD1d^{-/-} und B6.J α 18^{-/-} wurden in der zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter SPF (*specified pathogen free*) Bedingungen gezüchtet und gehalten. Die Arbeit erfolgte mit der

Genehmigung der Bezirksregierung Rheinhessen-Pfalz (Genehmigungsnummer AZ 23 177-07/G 10-1-052 und 23 177-07/G 14-1-015).

3. Methoden

Die verwendeten Medien und ihre Zusätze sind unter 2.4. aufgeführt. Weitere Zusätze für bestimmte Anwendungen sind jeweils explizit für die jeweilige Methode aufgeführt.

3.2. Zellbiologische Methoden

Alle Zellkulturarbeiten wurden zur Vermeidung von Kontaminationen mit Luftkeimen (Pilzsporen/Bakterien), unter Verwendung steriler Glas- und Plastikwaren, an einer Steril-Werkbank durchgeführt. Die Zellen wurden in CO₂-Inkubatoren (37°C, 5% CO₂ (v/v)) unter gesättigter Wasserdampfatmosphäre (95% (v/v) relative Luftfeuchte) kultiviert.

3.2.1. Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde eine Färbung mit Trypanblau durchgeführt. Zellmembranen lebender Zellen sind für einige Minuten für den Farbstoff impermeabel. Ein Aliquot der zu bestimmenden Zellsuspension wurde in geeigneter Verdünnung mit Trypanblau gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Nach dem Auszählen von vier Großquadraten wurde die Zellzahl wie folgt bestimmt:

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

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

Zur Bestimmung von Leukozytenzahlen in Erythrozyten-haltigen Proben wurde mit TÜRKs Lösung gefärbt. Durch das Methylviolett werden kernhaltige Zellen angefärbt (z.B. Leukozyten) während die Erythrozyten durch die enthaltene Essigsäure lysiert werden.

3.2.2. Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

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

Die Langzeitlagerung von eukaryotischen Zellen erfolgte bei -196°C in flüssigem Stickstoff (Kryokonservierung). Zur Verhinderung von Zellschädigungen durch Bildung von Eiskristallen beim Einfrieren besteht das Einfriermedium aus 90% (v/v) FCS und 10% (v/v) DMSO. Zuvor pelletierte Zellen wurden mit einer Zelldichte von $1-5 \times 10^6$ Z/ml in 4°C kaltem Einfriermedium aufgenommen und je 1ml in eisgekühlte Kryoröhrchen überführt. Anschließend wurden sie mit einer isolierenden Umhüllung (Zellstoff) bei -70°C langsam eingefroren. Nach 24-48 Stunden konnten die Aliquots in flüssigen Stickstoff überführt

werden, wo sie über Jahre ohne Vitalitätsverlust gelagert werden können. Zur Reaktivierung wurden die Zellen bei 37°C im Wasserbad rasch aufgetaut und in ein 50ml Zentrifugenröhrchen mit ca. 20ml Kulturmedium überführt. Während des Waschschrattes, bei dem die Zellen bei 300xg, 5min (Megafuge 2.0, Heraeus) wieder pelletiert werden, wird das zytotoxische DMSO entfernt. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und auf Kulturgefäße verteilt.

3.2.3. Gewinnung von Murinen Embryofetalen Fibroblasten (MEF)

<u>Medium:</u>	1x MEM +10% FCS	
<u>Trypsin/EDTA (pH 6,4):</u>	Trypsin 250	1,25g
	EDTA×2H ₂ O (3,4mM)	1,25g
	ad PBS 1000ml	
	mit 1M NaOH auf pH 6,4 einstellen, steril filtrieren und bei 4°C lagern.	

Einer trächtigen Maus (BALB/c- bzw. BALB/c.CD1d^{-/-}; Haplotyp H-2^d) wurden am vierzehnten Schwangerschaftstag die Embryonen steril entnommen. Nach Entfernung der Fruchtblase und Plazenta wurden die Embryonen von Organen, Gehirn und Augenanlagen befreit. Das restliche Gewebe wurde möglichst fein zerkleinert und anschließend mit je 15ml PBS und 15ml Trypsin/EDTA (pH 6,4) in einen sterilen, mit Glaskugeln (Ø1-2mm) und Magnetrührfisch vorbereiteten, Erlenmeyerkolben überführt. Die Inkubation erfolgte für 30min bei 37°C auf einem Magnetrührer. Anschließend wurde noch zweimal 15ml PBS und 15ml Trypsin/EDTA (pH 6,4) hinzugegeben und jeweils 30 Minuten weiter inkubiert. Über ein Metallsieb wurde die Einzelzellsuspension in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 10min bei 300xg (Megafuge 2.0, Heraeus) zentrifugiert. Das Pellet wurde ein weiteres Mal mit 50ml Kulturmedium gewaschen und anschließend in 10ml Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde über ein Zellsieb (100µm) gegeben und anschließend die Zellzahl bestimmt (siehe 3.1.1.). Die MEF wurden mit einer Dichte von $1,5 \cdot 10^7$ Zellen/14,5cm Zellkulturschale in 25ml Kulturmedium ausgesät und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Zum Entfernen nicht-adhärenter Zellen wurden die Zellen am folgenden Tag drei Mal mit PBS gespült und anschließend mit 30ml frischem Medium supplementiert. Die Inkubation im Brutschrank bei 37°C erfolgte solange, bis der Zellrasen konfluent angewachsen war. Das Medium wurde entfernt, die MEF mit PBS gespült und mit 3ml Trypsin/EDTA (pH 7,4) von der Zellkulturplatte gelöst. Nach Überführung der Zellen in ein Zentrifugenröhrchen wurden diese 5min bei 400xg (Megafuge 2.0, Heraeus) pelletiert und zur Langzeitlagerung in Einfriermedium weggefroren (siehe 3.1.2.).

3.2.4. Transfektion der BAC-Plasmid-DNA und Eliminierung der BAC-Vektor Sequenzen.

Die Rekonstitution rekombinanter mCMV erfolgte über die Transfektion von aufgereinigter BAC-DNA (siehe 3.3.3.4.) mit Hilfe von PolyFect (Qiagen). War nach 7 Tagen keine Plaquebildung sichtbar, wurde der Ansatz wiederholt. Zur Entfernung der BAC-DNA aus rekombinanten mCMV wurden die Viren mehrmals in MEF passagiert. Dabei werden in den Zellen die, die BAC-Vektor-Sequenz flankierenden, viralen Sequenz-Wiederholungen vom eukaryotischen Rekombinationssystem (Sugawara et al. 2000) erkannt und die BAC-Vektor-Sequenzen durch homologe Rekombination aus dem viralen Genom entfernt. Die nun auf ihre ursprüngliche Länge verkürzten mCMV-Genome werden während des *Packaging* bevorzugt in die viralen Kapside verpackt (Wagner et al. 1999). Durch wiederholte Passagierung des Virus (mindestens 4-5 mal) entsteht so ein Virusüberstand, welcher weitestgehend BAC-frei ist. Transfektion und BAC-Vektor-Eliminierung wurden wie bei Simon et al. 2006 beschrieben durchgeführt.

Zur Überprüfung der rekombinanten mCMV auf eventuell noch verbleibende BAC-Sequenzen wurde diese mit Hilfe einer quantitativen *real-time* PCR (qPCR; siehe 3.3.10.) mit BAC-spezifischen Oligonukleotiden nachgewiesen. Gleichzeitig erfolgte eine Quantifizierung von Virusgenome über eine M55/gB-spezifische qPCR. Wenn weniger als 10^2 BAC-Sequenzen / 10^6 Virusgenome nachweisbar sind, wird der Virusstock als BAC-frei definiert. Der Überstand der letzten Passage wird anschließend für die Herstellung hochreiner Virusstocks (siehe 3.2.1.) verwendet.

3.3. Virologische Methoden

3.3.1. mCMV Produktion

Die Generierung hochreiner mCMV-Virusstocks erfolgte wie bei (Podlech et al. 2002) beschrieben. In Kürze: auf ca. 40 Zellkulturschalen (\varnothing 14,5 cm) konfluent angewachsene MEF wurden mit je 1×10^5 pfu mCMV / Schale infiziert und im Brutschrank bei 37°C für 4-5 Tage inkubiert, bis sich ca. 80% der Zellen abgekugelt oder gelöst hatten. Noch adhärente Zellen wurden mit einem Zellschaber gelöst und zusammen mit dem Überstand pelletiert. Der Überstand wurde gesammelt und bei 4°C gelagert, während das Zellpellet in Medium mithilfe eines Homogenisator aufgeschlossen wurde. Das Homogenat wurde erneut für 20min bei 3.600xg, 4°C (Sorvall RC 6+, Rotor F12(S)_6x500LEX) pelletiert und der Überstand mit dem Vorherigen vereint. Anschließend wurden die Virionen für drei Stunden bei 4°C, 28.000xg (Sorvall RC 6+, Rotor F14_6x250y) zentrifugiert. Das Pellet wurde über

Nacht bei 4°C in etwa 1ml Medium gelöst. Am nächsten Tag wurden die Vironen über ein 15%-iges VSP-Saccharose-Kissen (1h, 52.000×g, 4°C; Sorvall Combi Plus; Rotor AH-629) gegeben. Das aufgereinigte Virus wurde in 15%-iger VSP-Saccharose-Lösung homogenisiert und abschließend aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -70°C. Für die spätere Verwendung wurde der Virustiter mittels Plaquetest bestimmt (siehe 3.2.2.). Die gereinigte Virusstock-Lösung wurde maximal drei Mal aufgetaut, um einen gleichbleibenden Virustiter zu gewährleisten.

3.3.2. mCMV-Titer Bestimmung

Die Zahl infektiöser mCMV-Virionen in einer Suspension wurde mit dem Plaquetest bestimmt. Der Virustiter wird dabei in *plaque forming unit* (PFU) angegeben. Definiert ist eine PFU als die Menge an Virionen, die benötigt wird, um auf permissiven Zellen einen einzelnen Plaque zu erzeugen. Die Bestimmung der Virustiter hochreiner Virusstocks oder von Zellkulturüberständen mittels Plaque-Assay erfolgte wie bei (Podlech et al. 2002) beschrieben. Die Titer-Bestimmung wurde dabei immer in zwei unabhängigen Wiederholungen durch unterschiedliche Personen vorgenommen. Die Berechnung des Virustiters erfolgte über folgende Formel:

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

3.3.2.1. Virustiter-Bestimmung aus Organhomogenaten

Medium: 1x MEM + 10% FCS

Entnommene Organe (siehe 3.4.6.) wurden in einem Wasserbad bei 37°C rasch aufgetaut und anschließend auf Eis gehalten. Mithilfe eines sterilen Metallsiebes und des Stempels einer Einmalspritze wurden die Organe homogenisiert und das Sieb anschließend mit 2ml Medium nachgespült. 100µl der Organsuspension wurden in einer log₁₀-Verdünnungsreihe mit 6 Verdünnungsstufen, als Duplikate auf konfluent gewachsenen MEF der 3. Passage (auf 48-well Zellkulturplatten), gegeben. Die MEF wurden zentrifugal infiziert, wodurch die Sensitivität des Assays erhöht wird (siehe 3.2.3.). Anschließend wurden die infizierten MEF mit 500µl Methylcellulose überschichtet. Die Auswertung erfolgte nach 4 Tagen durch Auszählen der Plaques im Invertmikroskop und Berechnung des Organtiters als PFU/Organ.

3.3.3. Zentrifugale Infektion von MEF

Medium: 1x MEM + 10% FCS

Die Infektion permissiver Zellen mit mCMV kann durch Zentrifugation (abhängig von der g-Zahl) um etwa den Faktor 20 verstärkt werden (CEI, *Centrifugal Enhancement of Infectivity*) (Osborn und Walker 1968; Hudson et al. 1976; Podlech et al. 2002). MEF der 2. oder 3. Passage wurden in 6-, 24- oder 48-*well* Zellkulturplatten oder in Zellkulturschalen (Ø 10cm) ausgesät. Nachdem diese konfluent waren, wurden sie mit PBS gewaschen, nach Bedarf die Zellzahl bestimmt (siehe 3.1.1.) und anschließend die entsprechend verdünnte Viruslösung in MEF-Medium zugegeben. Die Platten wurden für 5min bei 760xg (Megafuge 2.0, Heraeus) anzentrifugiert. Nach Drehung der Platten um 180° wurde für weitere 25min zentrifugiert. Es folgte die Supplementierung von Medium oder Überschichtung mit Methylcellulose und anschließende Inkubation der Platten im Brutschrank. Die benötigte Virusmenge für eine MOI (*multiplicity of infection*) von 4 berechnet sich folgendermaßen:

$$\frac{\text{Zellzahl} \times 0,2\text{PFU}}{c_{\text{Virusstock}} \left[\frac{\text{PFU}}{\text{ml}} \right]} = \text{benötigte ml des Virusstocks}$$

Zellzahl x 0,2PFU = benötigte Menge des Virusstocks, c = Konzentration

3.4. Molekularbiologische Methoden

3.4.1. Bakterien

Zur Vermeidung von Kontaminationen mit anderen Bakterien oder Pilzen wurde auf eine sterile Handhabung geachtet. Alle Medien und Lösungen wurden autoklaviert oder steril filtriert. Folgende Antibiotika kamen zusätzlich zu Einsatz:

Antibiotikum	gelöst in	cStock	Verdünnung	cEnd
Chloramphenicol	100% EtOH	34mg/ml	1:2000	100µg/ml
Kanamycin	H ₂ O	10mg/ml	1:400	25µg/ml

3.4.1.1. Flüssigkulturen

LB-Medium:

- 10g NaCl
- 10g Bacto-Trypton
- 5g Hefeextrakt
- ad 1l H₂O
- mit NaOH auf pH 7,5 einstellen, autoklavieren

Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde eine Kolonie von einer Plattenkultur (siehe 3.3.1.2.) in 5ml LB-Medium überführt. Unter ständigem Schütteln (220U/min) wurde die Flüssigkultur über Nacht bei geeigneter Temperatur inkubiert. Für größere Volumina an Flüssigkulturen

(>10ml) wurde über Tag eine 5ml Vorkultur herangezogen. Aus dieser wurde anschließend das größere Volumen (1:1000) angeimpft und über Nacht inkubiert.

3.4.1.2. Plattenkulturen

LB-Agar: 300ml LB-Medium (siehe 3.3.1.1.)
15g Bacto-Agar

Plattenkulturen dienen zur Selektion von Transformanten und zur Lagerung von Bakterienkulturen bis zu zwei Wochen. Angelegt wurden die Plattenkulturen aus Flüssigkulturen (siehe 3.3.1.1.) durch Ausstreichen mit einer Impföse oder eines Drigalski-Spatels und anschließender Inkubation im Brutschrank bei geeigneter Temperatur, bis einzelne Kolonien gut erkennbar waren. Die Lagerung der Bakterienplatten, die zuvor mit Parafilm abgedichtet wurden, erfolgte bei 4°C.

3.4.1.3. Herstellung von Dauerkulturen

Dauerkulturen wurden zur stabilen Lagerung von Bakterienklonen über längere Zeiträume angelegt. 750µl einer frischen Flüssigkultur wurden hierfür mit 750µl 86%igem Glycerin gemischt und anschließend bei -80°C gelagert.

3.4.2. Transformation kompetenter Bakterien

3.4.2.1. Herstellung elektrokompetenter Bakterien

LB-Medium: siehe 3.3.1.1.

Glycerinlösung: 10% (v/v) Glycerin in *Aqua bidest.*, bei 4°C vorkühlen

Ausgehend von einer frischen Plattenkultur wurde eine Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 5ml LB-Medium (+Antibiotikum) über Nacht unter Schütteln bei geeigneter Temperatur inkubiert. Am folgenden Tag wurden 200ml LB-Medium 1:200 mit der Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₅₉₅ von 0,5-0,7 in einem Glaskolben kultiviert. Anschließend wurde die Suspension für 15min in Eiswasser abgekühlt. Die Bakterien wurden durch eine 10minütige Zentrifugation bei 400xg (4°C Labofuge 400R, Heraeus) sedimentiert und anschließend das Pellet in 50ml 10%igen Glycerin resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt drei Mal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in maximal 2ml eiskaltem 10%igen Glycerin aufgenommen. Die Zellen wurden in Aliquots à 50µl in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und in der Regel direkt für eine Transformation (siehe 3.3.2.2.) verwendet.

3.4.2.2. Transformation elektrokompeter Bakterien

LB-Medium: siehe 3.3.1.1.

LB-Agar: siehe 3.3.1.2.

100-500ng der zu transformierenden DNA wurde zu 50µl elektrokompeter Bakterien (siehe 3.3.2.1) gegeben und 1min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das DNA-Bakterien-Gemisch in eine vorgekühlte Elektroporation-Küvette überführt und mit 2,5kV, 400Ohm und 25µF perforiert (Gene Pulser, BioRad). Die transformierten Bakterien wurden sofort in 1ml LB-Medium aufgenommen und für mindestens 45min bei geeigneter Temperatur unter Schütteln inkubiert. Der Ansatz wurde auf Agarplatten (+Antibiotikum) ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

3.4.3. Isolierung von Nukleinsäuren

Die Isolierung von Plasmid- oder BAC-DNA erfolgte nach einer modifizierten Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly 1979). Die Bakterien werden zunächst lysiert und die in der Probe enthaltenen Proteine und die DNA denaturiert. Nach Zugabe von Kaliumacetat ist die Plasmid-DNA in Lösung, während chromosomale DNA und Proteinbestandteile präzipitiert und durch Zentrifugation pelletiert werden können. Die Plasmid-DNA kann anschließend gefällt oder über eine Silicagel-Matrix aufgereinigt werden.

3.4.3.1. Schnellpräparation von Plasmid-DNA

TE-Puffer: 10mM Tris
1mM EDTAx2H₂O
ad H₂O_{demin.}
mit HCl auf pH 8,0 einstellen, autoklavieren.

Puffer 1 (P1): Tris 50mM 6,06g
Na₂EDTAx2H₂O 10mM 3,72g
ad 1l H₂O_{demin.}
mit HCl auf pH 8,0 einstellen, autoklavieren
100mg RNase zugeben, Lagerung 4°C

Puffer 2 (P2): NaOH 200 mM 8g
20% (v/v) SDS 50ml
ad 1l H₂O_{demin.}
mit HCl auf pH 8,0 einstellen, autoklavieren
Lagerung 20-22°C

<u>Puffer 3 (P3):</u>	KAc 3M	294,5g
	ad 1l H ₂ O _{demin.}	
	mit Eisessig auf pH 5,5 einstellen, autoklavieren	
	Lagerung 4°C	

5ml LB-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie beimpft (siehe 3.3.1.1.) und bei geeigneter Temperatur über Nacht unter Schütteln kultiviert. Am folgenden Tag wurden 2ml der Flüssigkultur in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt und für 10min bei 2.150xg sedimentiert (*Centrifuge* 5417R, Eppendorf). Das Pellet wurde in 250µl P1 resuspendiert und nach Zugabe von 250µl P2 für 5min bei 20-22°C inkubiert. Anschließend wurden 350µl P3 hinzugegeben, die Probe durch mehrmaliges Invertieren gemischt und für 10min auf Eis inkubiert. Es folgte eine 30minütige Zentrifugation bei 20.800xg und 4°C (*Centrifuge* 5417R, Eppendorf). Der Überstand wurde in ein neues 2ml Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 600µl Isopropanol gefällt (20.800xg, 30min, 4°C; *Centrifuge* 5417R, Eppendorf). Nach einem Waschschrift mit 250µl 70%igen Ethanol (20.800xg, 5min, 4°C; *Centrifuge* 5417R, Eppendorf) wurde die DNA kurz getrocknet und das Pellet in 50µl TE-Puffer aufgenommen.

3.4.3.2. Schnellpräparation von BAC-DNA

Aufgrund der Größe des mCMV-BAC-Genoms besteht bei der Isolierung die Gefahr, dass durch Scherung die DNA geschädigt werden kann. Aus diesem Grund wurden bei der Präparation und beim Umgang mit BAC-DNA nur abgeschnittene Pipettenspitzen genutzt und ausschließlich durch vorsichtiges Invertieren gemischt.

Puffer: P1, P2 und P3 (siehe 3.3.3.1.)

TE-Puffer: (siehe 3.3.3.1.)

Eine Einzelkolonie wurde in 10ml LB-Medium (+ Antibiotikum) überführt und über Nacht bei entsprechender Temperatur unter Schütteln inkubiert. 750µl der Kultur wurden zur Anlage eines Glycerinstocks (siehe 3.3.1.3.) entnommen und der Rest bei 4000xg (Labofuge 400R, Heraeus) für 10min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250µl P1 resuspendiert und in ein 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur alkalischen Lyse der Bakterien wurde 350µl P2 zugegeben und der Ansatz durch Invertieren vorsichtig gemischt. Nach 5minütiger Inkubation bei 20-22°C wurden 350µl P3 zugegeben und die Probe 10min auf Eis inkubiert. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 4°C mit 20.800xg (*Centrifuge* 5417R, Eppendorf) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß übertragen, mit 700µl Isopropanol versetzt und erneut für 25min bei 4°C mit 20.800xg (*Centrifuge* 5417R, Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Präzipitat mit 1ml eiskaltem 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen (10min, 20.800xg), luftgetrocknet und abschließend in

100µl TE-Puffer mit RNase (0,1mg/ml) aufgenommen. Die Lagerung der BAC-DNA erfolgte bei 4°C.

3.4.3.3. Isolierung von Nukleinsäuren mithilfe von Hersteller-Kits

Die Isolierung hochreiner Nukleinsäuren wurde mithilfe käuflicher Kits durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen)

Zur Aufreinigung von hochreiner DNA in größerer Menge.

<https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=c164c4ce-3d6a-4d18-91c4-f5763b6d4283&lang=en>

Nucleobond Kit PC 500 (Macherey & Nagel)

Zur Isolierung größerer Mengen hochreiner BAC-DNA. Aus einer frischen Vorkultur wurden 500ml LB-Medium 1:500 angeimpft und für 18-20h inkubiert. Eine zusätzliche Klärung des bakteriellen Lysates erfolgte durch Filtration über einen angefeuchteten Faltenfilter. Die isolierte BAC-DNA wurde in ca. 200µl TE-Puffer mit RNase (0,1mg/ml) aufgenommen und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

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

High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche)

Zur Isolierung von viraler DNA aus Zellkulturüberständen.

<https://www.lifescience.roche.com/content/dam/RMS/lifescience/Documents/PDF/High-Pure-Viral-Nucleic-Acid-Kit.pdf>

DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen)

Zur Isolierung viraler Genome aus Organhomogenaten (siehe 3.2.2.2.). Für die Aufreinigung wurden 250µl Organhomogenat eingesetzt, die Elution der DNA erfolgte in 100µl AE-Puffer.

<https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=6b09dfb8-6319-464d-996c-79e8c7045a50&lang=en>

RNeasy Mini Kit (Qiagen)

Die Isolation der Gesamt-RNA aus Lymphknoten erfolgte mithilfe des *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN). Dafür wurde das Organ in 350µl RLT-Puffer (+1% β-ME) aufgenommen und in einer Schwingmühle (Frequenz 30Hz, 3min) homogenisiert. Die Zelltrümmer wurden anschließend bei 20.800xg für 5min pelletiert (*Centrifuge* 5417R, Eppendorf). Die weitere Isolation erfolgte nach Herstellerangaben. Zusätzlich wurde für den enzymatischen Abbau residualer DNA 80µl DNase für 15min bei 20-22°C auf die Säule gegeben (*RNase-free DNase Set* (Qiagen)). Die Elution erfolgte in 30µl RNase-freiem H₂O.

<https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/rna/total-rna/rneasy-mini-kit/#resources>

3.4.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung von Konzentration und Qualität einer Nukleinsäurelösung erfolgte durch die spektrometrische Messung der Absorption bei 260nm im Nanodrop (Peqlap, Erlangen), wobei hohe Konzentrationen immer in TE-Puffer verdünnt wurden. Der Konzentrationsberechnung wurde folgender Wert zugrunde gelegt:

$$c_{\text{DNA}}[\mu\text{g/ml}] = A_{260\text{nm}} \times 50 \qquad c_{\text{RNA}}[\mu\text{g/ml}] = A_{260\text{nm}} \times 40$$

Über den Extinktionsquotient der Extinktionen E_{260}/E_{280} lässt sich zudem die residuale Proteinkontamination bestimmen. Der Quotient gibt dabei das Verhältnis zwischen Nukleinsäure und Protein an. Proteinfreie DNA-Lösungen weisen ein Verhältnis von 1,8 bis 2,0 auf, für RNA sollte der Quotient über 2,0 liegen (Sambrook und Russell 2001).

3.4.5. Enzymatische Restriktion von Nukleinsäuren

Zur Überprüfung der Integrität des BAC-Plasmides wurden 12 μ l einer Maxi-Präparation (3.3.3.4.) oder 50 μ l einer Mini-Präparation (3.3.3.2.) enzymatisch mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut. Dies schneidet die DNA an definierten, palindromen Erkennungssequenzen und wurde in der Regel mit einer Aktivität von 20U in einem Gesamtvolumen von 60-80 μ l im geeigneten Puffer eingesetzt. Der Restriktionsansatz wurde anschließend 2-16h bei 37°C inkubiert. Die Analyse der restringierten Plasmide erfolgte anschließend über ein Agarosegel (siehe 3.3.6.)

3.4.6. Native Gelelektrophorese

<u>50x TAE-Puffer:</u>	400mM Tris 50mM EDTAx2H ₂ O ad 1l H ₂ O _{demin.} mit Eisessig auf pH 8,0 einstellen, autoklavieren
Gebrauchslösung:	1x TAE-Puffer in H ₂ O _{demin.}
<u>10x TBE-Puffer:</u>	450mM Tris 10mM EDTAx2H ₂ O 450mM Borsäure ad 1l H ₂ O _{demin.} mit Eisessig auf pH 8,3 einstellen, autoklavieren
Gebrauchslösung:	1x TBE-Puffer in H ₂ O _{demin.}

10x Probenpuffer: Saccharose 67% (w/v)
Bromphenolblau 0,05% (w/v)

Die native Gelelektrophorese diente zur Auftrennung von Plasmiden und PCR-Produkten anhand ihrer Größe, so dass auf diese Weise sowohl eine Größenabschätzung von DNA-Fragmenten, die Exzision von linearen DNA-Fragmenten definierter Größe als auch Intaktheitsprüfungen von Nukleinsäuren durchgeführt werden konnten. Standardmäßig erfolgte die Auftrennung der DNA-Moleküle in 1%igen TAE-Agarosegelen. Für restringierte BAC-Plasmide mit Fragment-Größen zwischen 1-30kbp wurden 0,7%ige TBE-Agarosegele verwendet. Die Auftrennung erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern in 1×TAE bzw. für die linearisierte BAC-DNA über Nacht bei 4°C in 1×TBE (höhere Pufferkapazität im Vergleich zu TAE) als Laufpuffer. Die angelegte Spannung (0,5-5 V/cm Elektrodenabstand) richtet sich nach Fragment- bzw. Gel-Größe (Gelherstellung siehe Gassen et al. 1999). Um das Einsinken der Nukleinsäuren in die Geltaschen zu erleichtern, wurden die Proben vor dem Auftragen mit 1/10-Volumen Probenpuffer versetzt. Zur Visualisierung der DNA wurde dem Agarosegel das DNA-interkalierende Fluorophor HD Green Plus (Intas) (1:100) zugesetzt. Durch Anregung des interkalierten Fluorophors mit UV-Licht konnten die DNA-Banden sichtbar gemacht werden. Die Dokumentation erfolgte mit einer Sofortbildkamera (Polaroid Land Camera MP-4 mit Polaroidfilm Typ 667) oder einer CCD-Kamera (Marlin F-145B2 IRF, Allied Vision Technologies).

3.4.7. Elution von DNA aus Agarosegelen

Kit: *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen)

Zur Extraktion und Reinigung von bis zu 10µg DNA-Fragment mit einer Größe von 70bp-10kbp aus Agarosegelen wurde das *QIAquick Gel Extraction Kit* gemäß den Herstellerangaben verwendet.

<https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/dna-clean-up/qiaquick-gel-extraction-kit/#resources>

3.4.8. Aufreinigung von PCR-Produkten

Kit: *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen)

Das verwendete *QIAquick PCR Purification Kit* entfernt alle Kontaminanten wie Primer, Salze oder Proteine aus einer DNA-Probe. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerprotokoll:

<https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/dna-clean-up/qiaquick-pcr-purification-kit/#resources>

3.4.9. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Kit: *HotStarTaq Master Mix Kit* (Qiagen)
HotStar HiFidelity Polymerase Kit (Qiagen)

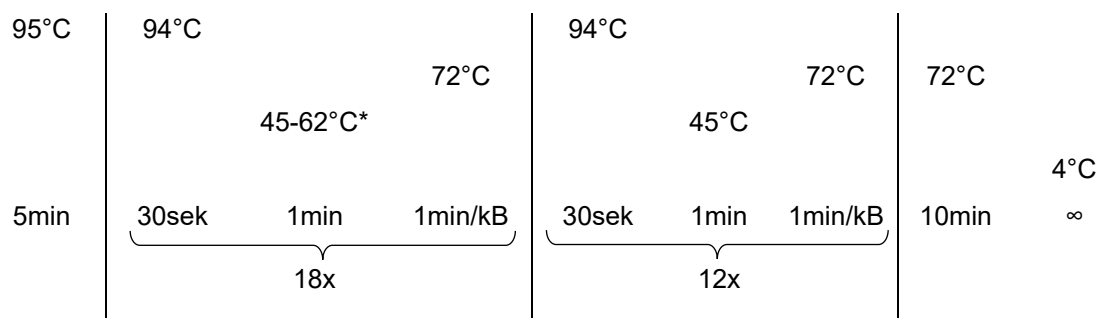
Mithilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR) können definierte DNA-Abschnitte selektiv amplifiziert werden (Mullis und Faloona 1987). Sequenzspezifische Oligonukleotide (*Primer*) definieren dabei die jeweiligen Enden des zu vervielfältigenden DNA-Abschnitts. Bei der Auswahl der *Primer*-Sequenzen ist auf ausreichende Sequenzspezifität (Länge von 16-20 Nukleotiden) und auf bestmögliche Hybridisierung am 3'-Ende durch ein Guanin oder Cytosin zu achten. Weiterhin sollten zueinander komplementäre Sequenzen innerhalb der Oligonukleotide vermieden werden, da diese zur Ausbildung von Sekundärstrukturen führen können, welche das *Annealing* negativ beeinflussen. Für Sequenzierungen und sonstige Überprüfungen von PCR-Produkten wurde in der Regel die *HotStar Taq* DNA-Polymerase (Qiagen) verwendet. Um Amplifikationsfehler durch Basenfehlpaarungen zu minimieren kann die *HotStar HiFidelity* DNA Polymerase (Qiagen) mit einer zusätzlichen 3'→5'Exonukleaseaktivität, die auch als *Proof-Reading*-Funktion bezeichnet wird, eingesetzt werden. Diese wurde zur Herstellung der PCR-Produkte für die BAC-Mutagenese (3.3.11.) verwendet. Die Amplifikate können anschließend mittels Gelelektrophorese auf ihre Größe überprüft und mittels Gelextraktion (siehe 3.3.7.) isoliert werden.

Herstellerprotokolle: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=53e71936-cf64-4a9b-a9d2-fccee4868aa7&lang=en>

<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=4ae801b5-9be2-411a-8551-ca7f758d2dcd&lang=en>

3.4.9.1. Touchdown PCR

Um bei der Amplifikation schwieriger Sequenzabschnitte oder beim Einsatz langer Primer unspezifische Amplifikation zu reduzieren, kann eine Touchdown-PCR verwendet werden. Dabei wird in einem ersten Syntheszyklus die *Annealing*-Temperatur so gewählt, dass sie knapp über der berechneten Schmelztemperatur der *Primer* liegt. Da diese in der Regel nicht mit der tatsächlichen Schmelztemperatur übereinstimmt, wird durch die Touchdown-PCR ermöglicht, dass die *Primer* bei einer für sie optimalen Temperatur an die *Template*-DNA binden. Auf diese Weise entstehen deutlich weniger Nebenprodukte aus unspezifischen Bindungen. Für die darauffolgenden Syntheszyklen wird die Temperatur schrittweise gesenkt, so dass es jetzt zu einer Verstärkung der unspezifischen Bindungen kommen kann, was jedoch durch die erhöhte Anzahl an spezifischen *Template*-DNA-Abschnitten im Ansatz kompensiert wird. Dieses Profil wurde insbesondere bei der Herstellung des PCR-Produktes für die BAC-Mutagenese (siehe 3.3.11.) verwendet.

Touchdown PCR-Profil:

*pro Zyklus ein Grad runter

3.4.10. Quantitative real-time PCR (qPCR)

Die quantitative *real-time* PCR ermöglicht es, Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge des nachzuweisenden DNA-Templates zu ziehen. Dabei wird jeder Zyklus der PCR, in *real time* verfolgt. Während der exponentiellen Phase kann eine Reaktionseffizienz von 100% angenommen werden, d.h. diese Phase zeichnet sich durch eine exakte Verdopplung des Amplikons aus. Die Detektion kann dabei entweder sequenzunspezifisch mit einem Nukleinsäure-interkalierenden Fluorochrom (z.B. *SYBR Green*; siehe 3.3.10.1.) oder sequenzspezifisch mit Fluorochrom-gekoppelten Sonden (z.B. *TaqMan* Sonden; siehe 3.3.10.2.) erfolgen. Wird ein definierter Standard mitgeführt, kann, durch die Proportionalität von Fluoreszenzsignal und Kopienzahl des PCR-Produktes, eine direkte Mengenbestimmung der zu untersuchenden Probe durchgeführt werden. Die Quantifizierung erfolgt dabei über die Formel:

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

N = Anzahl der amplifizierten Moleküle, N_0 =initiale Menge der Moleküle, E = PCR-Effizienz, n =Anzahl der Zyklen

3.4.10.1. Absolute Quantifizierung mit SYBR Green

Kit: *QuantiTect SYBR Green I PCR Kit* (Qiagen)

Zur Überprüfung der BAC-Freiheit von mCMV-Rekombinanten oder der Analyse viraler Genome in Organhomogenaten wurde eine *SYBR Green* qPCR durchgeführt. Während der DNA-Synthese interkaliert *SYBR Green* in die dsDNA und emittiert ein fluoreszierendes Signal mit einem Emissionsmaximum bei 521nm, das detektiert werden kann. Für eine absolute Quantifizierung wurde ein linearisierter Plasmidstandard (pDrive-gB-PTHrP-BAC) mit definierter Teilchenzahl mitgeführt. Das Plasmid enthält das mCMV-Gen M55/gB, das zelluläre Gen *pTHrP* (*parathyroid hormone-related peptide encoding gene*) sowie die BAC-

Sequenz (Lemmermann et al. 2010b). Die Quantifizierung des zellulären Gens *pTHrP* ermöglicht dabei eine Normierung der viralen Genome auf eine definierte Zellzahl. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde der *Mastermix* (beinhaltet Polymerase, Puffer, *Primer*) in einem separaten Raum unter einem *Tamer* (Oncor Appligen, Heidelberg) angesetzt und jeweils 18µl des *Mastermixes* in die PCR-Gefäße vorgelegt. Die Zugabe der zu analysierenden DNA erfolgte anschließend in einem anderen Raum.

Herstellerprotokoll: <https://www.qiagen.com/us/shop/pcr/real-time-pcr-enzymes-and-kits/two-step-qrt-pcr/quantitect-sybr-green-pcr-kits/#resources>

3.4.10.2. Quantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)

Kit: *OneStep RT-PCR Kit (Qiagen)*

Für die Quantifizierung von Transkripten wurde die quantitative Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR) verwendet. Bei dieser Methode synthetisiert zunächst eine RNA-abhängige DNA Polymerase (Reverse Transkriptase; RT) aus der im Ansatz enthaltenen RNA einen komplementären DNA-Strang (cDNA). Dieser dient für die anschließende quantitative PCR mit sequenzspezifischen *TaqMan*-Sonden (siehe 2.2.3.4.) als Matrize. Die verwendeten *TaqMan*-Sonden sind am 5'-Ende mit einem Fluoreszenz-Reporter und am 3'-Ende mit einem *Quencher* markiert, welcher das Fluoreszenzsignal unterdrückt. Nach sequenzspezifischer Bindung der Sonde an die ssDNA kommt es durch die 5'→3'-Exonukleasefunktion der Polymerase zum Abbau der Sonde. Dies führt zur räumlichen Trennung von Reporter und Quencher wodurch der Reporter nun seine Fluoreszenz emittieren kann. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität ist dabei direkt proportional zum gebildeten PCR-Produkt. Die Verwendung des *OneStep RT-PCR Kits* ermöglicht dabei sowohl die cDNA-Synthese als auch die *real time* PCR in einem Reaktionsansatz durchzuführen, da sowohl RT als auch die DNA-Polymerase im Ansatz enthalten sind. Für eine absolute Quantifizierung wurden als externe Standards *in vitro* Transkripte mit einer Teilchenanzahl von 10^6 bis 10^1 im Ansatz mitgeführt (Simon et al. 2006).

Herstellerprotokoll: <https://www.qiagen.com/us/shop/pcr/end-point-pcr-enzymes-and-kits/one-step-rt-pcr/qiagen-onestep-rt-pcr-kit/#orderinginformation>

3.4.11. Red-vermittelte markerlose DNA-Rekombination zur Generierung rekombinanter mCMV

Die Red-vermittelte markerlose DNA-Rekombination (Tischer et al. 2006) ermöglicht es, Deletionen, Insertionen oder Punktmutationen in BAC-Plasmide einzubringen, ohne dass

Reste von Fremd-DNA im Genom verbleiben, die unter Umständen zu unerwünschten Nebeneffekten bei der Proteinsynthese oder -expression führen könnten. Mithilfe einer PCR wird dafür ein positiver Selektionsmarker (Kanamycin-Kassette) amplifiziert. Dieser ist im Fall einer Deletion von zum Exzisionsbereich umgebenden, homologen Sequenzen flankiert. Das PCR-Produkt enthält zusätzlich eine Schnittstelle der *Homing-Endonuklease I-SceI*. Das hergestellte PCR-Produkt wird in elektrokompetente GS1783, welche das mCMV-BAC-Plasmid enthalten, transformiert und kann über das aktivierte Red-Rekombinasesystem in die BAC-DNA eingebaut werden. Durch eine anschließende Arabinose-induzierte *I-SceI* Expression wird ein Doppelstrangbruch herbeigeführt, dessen Enden eine weitere Red-Rekombination ermöglichen. Hierbei wird der Selektionsmarker aus der BAC-DNA entfernt. Das Endprodukt ist eine BAC-DNA mit der gewünschten Deletion ohne überzählige Sequenzreste (siehe auch Abb. 3.1, Darstellung einer Deletion).

Herstellung und Aufreinigung des PCR-Fragments

Aus dem Plasmid *pori6KanRIT* (Hammer et al. 2018), wurde das Kanamycin-Resistenzgen sowie die *I-SceI*-Schnittstelle mittels PCR amplifiziert. Die dazu verwendeten *Primer* bestehen aus 70-120 Nukleotiden und tragen an ihren 3' Enden die jeweilige *Primer*-Bindestelle am Plasmid und an ihren 5' Enden die homologe Sequenz am jeweiligen Ende des Deletionsbereiches im mCMV-Genom (siehe Abb. 3.1: *Target_for_long*; *Target_rev_long*). Beim Design der *Primer* ist zu beachten, dass für die spätere homologe Rekombination zwischen PCR-Fragment und mCMV-BAC-DNA ein Homologiebereich von mindestens 40 Nukleotiden vorhanden ist. Die nach diesen Merkmalen konstruierten *Primer* (siehe 2.3.4.1.), haben aufgrund ihrer Länge eine erhöhte Wahrscheinlichkeit Sekundärstrukturen bzw. Dimere auszubilden, was zu einer schlechten PCR-Fragment-Ausbeute führen kann. Aus diesem Grund wurden zwei aufeinanderfolgende Reaktionen durchgeführt. Dabei wurde zunächst ein langes Oligonukleotid mit Homologiebereich zum mCMV-BAC und Bindestelle an *pori6KanRIT* (*Target_for_long*), und als Gegenpart ein etwa 20 Nukleotid kurzer *Primer*, mit Bindungsstelle ausschließlich am Plasmid (*pori6KanRIT_rev*), verwendet. Nach der Amplifizierung wurden 5µl des PCR-Ansatzes in einem 1%igen Agarosegel überprüft (siehe 3.3.6.) und der Rest des PCR-Ansatzes mithilfe des *QIAquick PCR Purification Kit* (siehe 3.3.8.) aufgereinigt. Anschließend wurden das aufgereinigte PCR-Fragment als *Template* für die zweite PCR eingesetzt, in welcher das zweite *Primer*paar verwendet wurde (*Target_rev_long*; *Target_for_short*; vgl. Abb. 3.1). Diese PCR wurde in 5 Ansätzen angesetzt. Für beide PCR wurde das *HotStar HiFidelity* Polymerase Kit verwendet, jeweils 100ng Template-DNA (*pori6KanRIT* bzw. PCR-Fragment 1) eingesetzt und das Temperaturprofil einer *Touchdown-PCR* verwendet (siehe 3.3.9.1.). Nach der zweiten PCR wurden die 5 Ansätze vereinigt, auf ein 1% Agarosegel

aufgetragen, überprüft sowie eine Gel-Extraktion (siehe 3.3.7.) durchgeführt. Lag die DNA-Konzentration unter 100ng/μl, wurde eine Ethanolfällung durchgeführt.

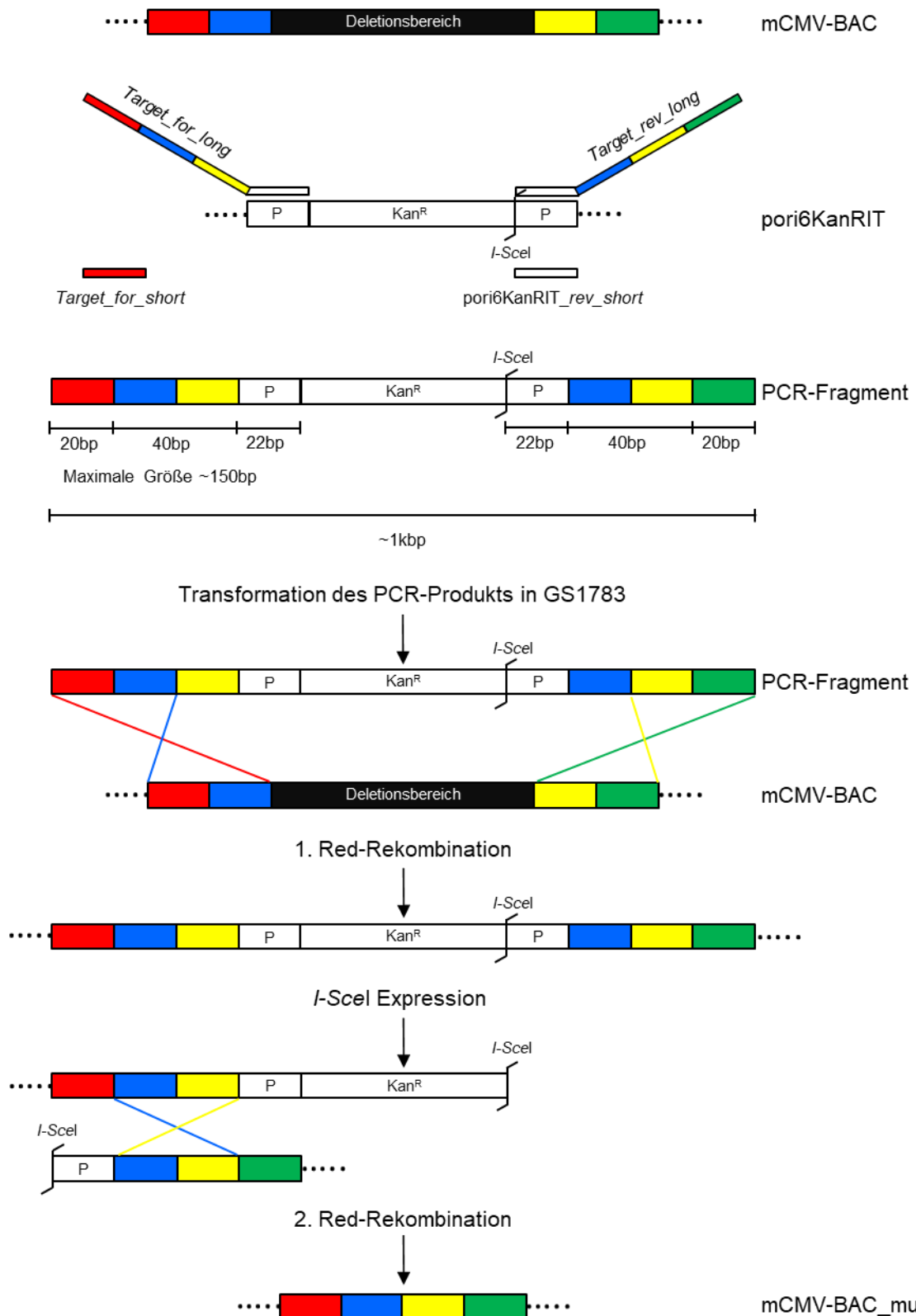


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Red-vermittelten markerlosen DNA-Rekombination. Aus dem Plasmid pori6KanRIT, wird das Kanamycin-Resistenzgen sowie die I-SceI-Schnittstelle amplifiziert. Die verwendeten Primer, bestehend aus 70-120 Nukleotiden, tragen an ihren 3' Enden die jeweilige Bindestelle an

Plasmid und an ihren 5' Enden die homologe Sequenz am jeweiligen Ende des Deletionsbereiches im mCMV-Genom (*Target_for_long*; *Target_rev_long*). Für eine bessere Ausbeute werden zudem kurze *Primer* designt (*pori6KanRIT_rev_short*; *Target_for_short*) und in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen eingesetzt. Die erste PCR erfolgt mit *Target_for_long* und *pori6KanRIT_rev_short*, das entstandene PCR-Fragment wird für die zweite PCR mit *Target_rev_long* und *Target_for_short* eingesetzt. Es entsteht ein PCR-Fragment, bei der die homologen Sequenzen des Endes der Deletionsbereiche im mCMV-Genom die Kanamycin-Resistenzkassette und die *I-SceI*-Schnittstelle flankieren. Es folgt die Transformation des PCR-Produktes in elektrokompetente GS1783, welche das mCMV-BAC-Plasmid enthalten. Während der ersten Red-Rekombination kommt es zur homologen Rekombination von PCR-Fragment und Deletionsbereich. Nach Selektionierung auf den positiven Selektionsmarker Kanamycin wird durch eine anschließende Arabinose-induzierte *I-SceI*-Expression ein DNA-Doppelstrangbruch herbeigeführt, mit dessen Produkten eine weitere Red-Rekombination möglich ist. Das Endprodukt ist eine BAC-DNA mit der gewünschten Mutation ohne weitere Überreste des positiven Selektionsmarkers (nach: Tischer et al. 2006).

Ethanol-fällung

Für die Konzentrierung von DNA wurde die PCR-Ansätze mit 1/10 Volumen des PCR-Ansatzes 3M NaAc (pH 5,2) und zwei Volumina des PCR-Ansatzes eiskaltem 100% EtOH gemischt und anschließend für 30-60min bei -70°C gefällt. Nach Zentrifugation bei 20.800xg für 20min (*Centrifuge* 5417R, Eppendorf) wurde das Pellet mit eiskaltem 80% (v/v) EtOH gewaschen, erneut zentrifugiert und für 15min bei 20-22°C luftgetrocknet. Die DNA wurde in 15µl dH₂O aufgenommen.

Induktion der Red-Rekombinase

Der Bakterienstamm GS1783 (Lee et al. 2001a; Tischer et al. 2006) kodieren für die Gene des Red-Rekombinationssystems, deren Expression bei 42°C induziert wird. Zudem kodieren sie auch für die *Homing-Endonuklease I-SceI*, deren Expression durch Arabinose induziert wird. Von Einzelkolonien GS1783 mit entsprechendem BAC-Plasmid wurden 5ml ü.N.-Kulturen in LB-Medium (+Cam) angesetzt. Am folgenden Tag wurden 50ml frisches LB-Medium (+Cam) mit 1:20 bis 1:50 Verdünnungen der ü.N.-Kulturen angeimpft und bei 32°C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5-0,7 erreicht war (ca. 3h). Die Induktion der Red-Gene erfolgte durch 15minütige Inkubation der Kulturen bei 42°C im Wasserbad. Die weiteren Schritte erfolgten wie unter 3.3.2.1. beschrieben. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Bakterienpellet in 10%iger Glycerinlösung resuspendiert und je 50µl direkt für die Elektroporation verwendet.

Elektroporation und erste Red-Rekombination

50µl frische, elektrokompetente GS1783 wurden mit unterschiedlichen Volumina des gereinigten linearen PCR-Produkts (100-300ng) transformiert (siehe 3.3.2.2.). Nach 90-120min Inkubation bei 32°C unter Schütteln wurden 100µl der Bakterien direkt auf LB-Agar-Platten (+Cam/Kan) ausplattiert. Der restliche Bakterienüberstand wurde pelletiert und in ca. 50µl Restvolumen resuspendiert und ebenfalls ausplattiert. 24-48h später wurden aus den Kanamycin-resistenten Einzelkolonien 10-20 Flüssigkulturen angesetzt und diese über Nacht unter Schütteln bei 32°C inkubiert. Es folgte die Anlage von Dauerkulturen (3.3.1.3)

sowie die Isolierung der BAC-DNA (BAC-Minipräparation siehe 3.3.3.2.) zur Überprüfung der BAC-DNA-Integrität im Agarosegel (siehe 3.3.6.).

Zweite Red-Rekombination und Integratauflösung

3ml LB-Medium (+Cam/Kan) wurden mit einer Kan-resistenten Dauerkultur mit intakter BAC-DNA (siehe oben) angeimpft und über Nacht bei 32°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 2ml LB-Medium (+Cam) mit 100µl der ü.N.-Kultur angeimpft und bei 32°C (230U/min) für 3h inkubiert. Zur Arabinose-Induktion der *I-SceI* Endonuklease wurden 2ml vorgewärmtes LB-Medium + Cam + 1% L-(+)-Arabinose hinzugefügt und für exakt 1h bei 32°C (230U/min) inkubiert. Durch die Expression von *I-SceI* kommt es an ihrer Schnittstelle zu einem Doppelstrangbruch. Für die Induktion der Red-Gene wurden die Kulturen anschließend im vorgeheizten Wasserbad bei 42°C (230U/min) für exakt 25min geschüttelt und anschließend weitere 3h bei 32°C (230U/min) inkubiert. Nach Verdünnung der Kulturen 1:10 und 1:100 wurden jeweils 20µl auf LB-Platten (Cam+1% L-(+)-Arabinose) mittels Drei-Ösenausstrich ausplattiert und ü.N. bei 32°C im Brutschrank inkubiert. Zur Überprüfung der Einzelkolonien auf ihre Kan-Sensitivität (Kan-Kassette wurde während der 2. Red-Rekombination entfernt; siehe Abb. 3.1.), wurden diese auf Replikplatten übertragen. Zu diesem Zweck wurde eine Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und zuerst Zellen auf eine LB-Agar-Platte mit den Antibiotika Cam und Kan und anschließend auf eine LB-Agar-Platte nur mit Cam übertragen. Nach Inkubation bei 32°C ü.N. konnten die Kan-sensitiven Kolonien isoliert werden. Von 10-20 Kan-sensitiven Kolonien wurde anschließend die BAC-DNA aufgereinigt (siehe 3.3.3.2.) und deren Integrität mittels *EcoRI*-Verdau und nativer Gelelektrophorese überprüft (siehe 3.3.5. und 3.3.6.). Zur Bestätigung einer korrekten Mutation wurde der Bereich der Mutation mithilfe einer PCR und entsprechenden, die Mutation umgebenden, *Primern* amplifiziert (siehe 2.3.4.2., 3.3.9.), aufgereinigt (siehe 3.3.8) und zur Überprüfung sequenziert (GATC, Konstanz).

3.5. Tierexperimentelle Methoden

3.5.1. *In vivo* Depletion von NK- und/oder CD8 T-Zellen

Die Depletion von NK- und/oder CD8 T-Zellen *in vivo* erfolgte durch Gabe spezifischer Antikörper, welche, nach Bindung an ihr jeweiliges Zielgen, eine Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) oder eine Komplement-vermittelte Zytolyse der Zielzellen vermittelten.

Antikörper: anti-*asialo* GM1 Antiserum (WAKO Chemicals GmbH, Japan)
anti-CD8 *ascites* Antikörper (Stipan Jonjic, Kroatien)

Um eine Restaktivität der depletierten Zellpopulation auf die Infektion auszuschließen, erfolgte die Depletion 24h vor einer Infektion. Zur Depletion von NK-Zellen wurden 20µl α -asialo GM1 Antiserum in 500µl PBS/Tier i.v. verabreicht. CD8 T-Zellen wurden mit 1,2mg [Stock: 26mg/ml] (entspricht 46µl/Tier) monoklonalem anti-CD8 α -Antikörper in 500µl PBS/Tier i.v. depletiert. Die Antikörper und das Antiserum konnten auch zusammen in einem Ansatz gegeben werden, wenn sowohl NK- als auch CD8 T-Zellen depletiert werden sollten. Anti-asialo GM1 depletiert dabei selektiv NK-Zellen, jedoch nicht iNKT-Zellen (Smyth et al. 2001).

3.5.2. Aktivierung von iNKT-Zellen in der Maus

Die Aktivierung von iNKT-Zellen *in vivo* erfolgte mithilfe von 15-20µg α -Galactosylceramid i.p.. Der Zeitpunkt der Aktivierung hing vom jeweiligen Versuchsaufbau ab, sie erfolgte in der Regel zeitgleich mit der mCMV-Infektion.

3.5.3. Infektion der Maus mit mCMV

Die intraplantare Infektion in die linke Hinterpfote der Maus erfolgte mit 1×10^5 PFU Virus in 25µl PBS/Tier. Der Virusansatz wurde zuvor stets auf Eis gehalten. Für die i.v. Applikation wurden 2×10^5 - 1×10^6 PFU Virus in 500µl PBS/Tier angesetzt und in die Schwanzvene injiziert.

3.5.4. Organentnahme und Probenkonservierung

Die Tiere wurden durch CO₂-Exposition getötet und anschließend Lymphknoten, Milz, Lunge und/oder Leber entnommen und nach Bedarf verarbeitet.

Organtiterbestimmung: Lagerung in Medium bei -70°C, siehe 3.2.2.1.

Histologische Schnitte: Fixierung in 4% Formalin über Nacht, siehe 3.6.

Aufarbeitung von Lymphozyten: Aufnahme in Medium und sofortige Weiterverarbeitung, siehe 3.5.1. und 3.5.4.

Isolierung von RNA: Schockfrierung in flüssigem Stickstoff; weitere Lagerung bei -70°C, siehe 3.3.3.3.

3.5.5. Blutentnahme und Serumisolierung

24 bzw. 36 Stunden nach Behandlung wurde aus der Schwanzvene (24h) oder nach dem Töten aus dem Herz (36h) Blut entnommen. Für die Isolierung wurden *Microtainer SST Tubes* (BD) verwendet. Durch 2minütige Zentrifugation bei 15.000-20.800xg (*Centrifuge*

5417R, Eppendorf) wird das Serum von anderen Blutbestandteilen abgetrennt und kann nun bei -70°C gelagert werden.

3.6. Immunologische Methoden

3.6.1. Ex vivo Isolation von Lymphozyten aus Milz oder Lymphknoten

Medium: RPMI

Nach der Organentnahme (siehe 3.4.6.) wurden Milzen oder Lymphknoten in RPMI aufgenommen. Für die Herstellung einer Einzelzellsuspension wurden die Organe mit dem Stempel einer 2ml Spritze über einem sterilen Metallsieb homogenisiert, die Zellsuspension in 20ml RPMI aufgenommen und abzentrifugiert (530xg, 5min; Megafuge 2.0, Heraeus). Das Zellpellet wurde in 5ml PBS resuspendiert und über ein Zellsieb (Milz 100 μm , Lymphknoten 40 μm) filtriert. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und die Milz ein weiteres Mal über ein 40 μm Zellsieb filtriert. Die Zellzahl wurde mithilfe von TÜRKs-Lösung (siehe 3.1.1.) bestimmt. Die Einzelzellsuspension konnten für die zytofluorometrische Zellcharakterisierung (siehe 3.5.4) oder die immunomagnetische Isolierung von CD8 T-Zellen (siehe 3.5.3.) verwendet werden.

3.6.2. Immunomagnetische Anreicherung von CD8 T-Zellen

Mittels immunomagnetischer Zellseparation (Miltenyi et al. 1990) wurden CD8 T-Zellen aus Einzelzellsuspensionen von Milz oder Lymphknoten isoliert (siehe 3.5.1.) und anschließend als Effektoren im ELISpot-Assay eingesetzt (siehe 3.5.3.).

Medium: MEM α + 7,5% FCS

5x MACS-Puffer: EDTA Na₂x2H₂O 10mM 1,86g

BSA 2,5% (w/v) 12,5g

ad 500ml PBS,

pH 7,2 mit NaOH einstellen und steril filtrieren

vor Gebrauch 1:5 mit sterilem PBS verdünnen

1x10⁷ Zellen einer Einzelzellsuspension aus Milz oder Lymphknoten (siehe 3.5.1.) wurden mit 90 μl 1x MACS-Puffer und 10 μl *Microbeads* versetzt. Die Zellen wurden für 15min bei 4 $^{\circ}\text{C}$ unter gelegentlichem Schwenken inkubiert und anschließend mit 20ml MACS-Puffer gewaschen (300xg, 10min; Megafuge 2.0, Heraeus). Das Pellet wurde in 500 μl MACS-Puffer aufgenommen und auf die mit 500 μl MACS-Puffer im Magnetfeld äquilibrierte MS-Säule gegeben. Nach dreimaligem Waschen der Säule mit je 500 μl MACS-Puffer erfolgte

die Elution der Zielzellen in 500µl MACS-Puffer. Das Eluat wurde mit Medium gewaschen (530xg LK / 300xg Milz, 5min), das Pellet in 1ml Medium resuspendiert und die Zellzahl mit Trypanblau bestimmt (siehe 3.1.1.).

3.6.3. ELISpot (enzyme linked immuno spot) Assay

Der ELISpot-Assay ermöglicht die Quantifizierung von Zytokin-sezernierenden Zellen auf Einzelzellebene. Das Prinzip beruht dabei auf einem klassischen Sandwich-ELISA (Czerkinsky et al. 1983; Czerkinsky et al. 1988; Miyahira et al. 1995). Der ELISpot-Assay wurde verwendet, um Frequenzen IFN γ -sekretierender, virus-spezifischer CD8 T-Zellen nach Infektion mit mCMV in verschiedenen Mausstämmen zu vergleichen. Durchgeführt wurde der Assay wie zuvor beschrieben (Wilhelmi et al. 2008). Als APC dienen im Haplotyp H-2^d P815 und im Haplotyp H-2^b EL-4. Beide Zelllinien wurden mit entsprechenden synthetischen Peptiden (Endkonzentration: 10⁻⁶M) exogen beladen. Als Effektoren wurden CD8 T-Zellen aus Milz oder Lymphknoten frisch aufgearbeitet (siehe 3.5.1.) und immunomagnetisch angereichert (siehe 3.5.2.) verwendet. Die Effektoren wurden in einem Konzentrationsbereich von 5x10³ bis 4x10⁴ als Triplikate ausgesät und je 1x10⁵ exogen beladener APC zugefügt. Die Auswertung erfolgte mithilfe des ImmunoSpot Reader S6 (CTL). Mittels Regressionsanalyse wurden die Frequenzen der IFN γ -sezernierenden Zellen errechnet. Die Effektorzellzahl bildete dabei die unabhängige Variable x (Abszisse) und die Spotfrequenzen der Triplikate die abhängige Variable y (Ordinate). Die berechnete Gerade ermöglicht die Ermittlung der *most probable number* (MPN) der Spotfrequenzen. Die 95% Konfidenzintervalle bezeichnen den Bereich, der die ermittelte Spotfrequenz mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% beinhaltet. Die Berechnungen wurden mit der Software *Mathematica V8.0 Statistics* „Linear Regression“ (Wolfram Research Inc., Champaign, Illinois, USA) durchgeführt.

3.6.4. Zytofluorometrische Analyse

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse von Oberflächenantigenen oder intrazellulärer Proteine auf Einzelzellebene, durch Färbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern. Für diese Arbeit wurde in der Regel das Durchflusszytometer FC500 von Beckman Coulter mit der Gerätesoftware CXP, alternativ der FACS Canto II (BD) mit der Gerätesoftware BD FACSCanto™ II Cell Analyzer der AG Gasteiger und hier zur Auswertung die Software FlowJo genutzt.

3.6.4.1. Aufarbeitung der Milz für die Durchflusszytometrie

FACS-Puffer (1%):

PBS + 1% FCS

MACS-Puffer: siehe 3.5.2.

Die Aufarbeitung der Milz erfolgte wie unter 3.5.1. beschrieben, mit dem Unterschied, dass statt PBS FACS-Puffer verwendet wurde. Erfolgte eine Dextramer-Färbung wurde MACS-Puffer verwendet und es musste zusätzlich eine Erythrozytenlyse durchgeführt werden. Dafür wurde nach dem ersten Waschschrift 2ml *Red Blood Cell Lysing Buffer* (Sigma)/Milz zugegeben und der Ansatz für 1-2 Minuten bei 20-22°C unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurden das 50ml Röhrchen mit MACS-Puffer aufgefüllt und gewaschen. Die weiteren Schritte erfolgten wie in 3.5.1. beschrieben.

3.6.4.2. Aufarbeitung der Leber für die Durchflusszytometrie

FACS-Puffer (2%): PBS + 2% FCS

MACS-Puffer: siehe 3.5.2.

Medium: RPMI

Vor Entnahme der Leber wurde diese mit PBS perfundiert. Hierzu wurde der Bauchraum einer mit CO₂ getöteten Maus geöffnet und die *Vena portae* freigelegt. Mit einer Kanüle wurde diese punktiert und der Durchlauf der Peristaltikpumpe auf 5ml/min eingestellt. Gleichzeitig wurde die *Vena cava caudalis* durchtrennt. Anschließend konnte die Durchflussgeschwindigkeit erhöht werden. Die Leber wurde etwa eine Minute mit PBS perfundiert, bevor sie entnommen und in RPMI aufgenommen wurde. Das Organ wurde mit einer sterilen Schere zerkleinert und in ein 15ml Falcon überführt. Anschließend wurden 5ml DPBS⁺⁺ + 2mg/ml Kollagenase D + 0,07mg/ml DNase I pro Leber zugegeben und diese 40min bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Reaktion wurde mit FACS-Puffer (2%) abgestoppt und der Ansatz bei 680xg (Multifuge 2.0, Heraeus) 7min zentrifugiert. Mithilfe des Stempels einer 2ml Spritze wurde das Organ durch ein Metallsieb gedrückt und über ein 100µm Sieb in ein 50ml Röhrchen überführt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde 5ml Erythrozytenlysepuffer pro Leber zugeben und diese für 2-3 Minuten unter gelegentlichem Schwenken bei 20-22°C inkubiert. Nach Zugabe von 25ml PBS + 2% FCS wurde die Suspension über ein 40µm Sieb filtriert und erneut bei 530xg, 7min zentrifugiert. In einem 50ml Röhrchen wurde ein Dichtegradient mit Percoll-Lösung in PBS verdünnt vorgelegt. 5ml 80%ige Percoll-Lösung wurden dafür mit 7ml 40%iger Percoll-Lösung überschichtet und anschließend vorsichtig 5ml der Einzelzellsuspension darüber pipettiert. Es folgte die Zentrifugation bei 1282xg für 20min bei 20-22°C, wobei das Abstoppen der Zentrifugation ohne Bremse erfolgte. Anschließend wurde das schwimmende Gewebefett abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit der Pasteurpipette in RPMI überführt. Nach einem Waschschrift (680xg, 7min) wurden die Zellen gezählt (siehe 3.1.1.) und auf 1x10⁶ Zellen pro Ansatz eingestellt. Es folgte eine Inkubation mit Brefeldin A (1µg/ml) in Medium für drei

Stunden bei 37°C, wodurch Proteine (beispielsweise IFN γ) im ER akkumulieren. Abschließend wurden die Zellen drei Mal mit PBS + 2% FCS gewaschen.

3.6.4.3. Färbung von Oberflächenmolekülen

Die Färbung von Oberflächenantigenen wurde für die Unterscheidung und Charakterisierung von Zellpopulationen verwendet, welche aus Milzen oder Lebern gewonnen wurden, sowie zur Detektion der CD1d- und MHC-I-Expression auf MEF. Die verwendeten Antikörper sind unter 2.3.7.1. aufgelistet.

<u>MACS-Puffer:</u>	siehe 3.5.2.
<u>FACS-Puffer (1%):</u>	PBS + 1% FCS
<u>Medium:</u>	1x MEM + 10% FCS

MEF

MEF der dritten Passage wurden zentrifugal mit mCMV infiziert (siehe 3.2.3.). Nach 16h wurden die MEF mit Trypsin/EDTA (pH= 7,4) gelöst und zweimal mit je 10ml Medium gewaschen (400xg, 5min; Megafuge 2.0, Heraeus). Die Zellen wurden in 1ml FACS-Puffer (1%) aufgenommen und mit Trypanblau gezählt (siehe 3.1.1.). Für die zytofluorometrischen Analysen wurden je Ansatz 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen eingesetzt. Zur Reduzierung von antigen-unspezifischen Antikörperbindungen wurden die Zellen zunächst mit 2 μ l Fc-Block in 98 μ l FACS-Puffer für 5-10min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die benötigten Antikörper hinzugegeben und mit den Zellen für 20min bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen mit 1ml FACS-Puffer (1%) (300xg, 5min; Megafuge 3 S-R, Heraeus) wurden diese in 500 μ l FACS-Puffer (1%) aufgenommen und im Durchflusszytometer gemessen.

Milz und Leber

Lymphozyten wurden, wie unter 3.5.4.1. bzw. 3.5.4.2. beschrieben, isoliert und $1-2 \times 10^6$ Zellen pro Ansatz eingesetzt. Antigen-unspezifische Antikörperbindungen wurden durch Zugabe von 2 μ l Fc-Block in 98 μ l MACS-Puffer und Inkubation für 5min bei 20-22°C reduziert. Anschließend wurden die Zellen mit 1ml MACS-Puffer (300xg, 5min; Megafuge 3 S-R, Heraeus) gewaschen und 10 μ l CD1d-Dextramer auf das Pellet gegeben. Nach 10minütiger Inkubation bei 20-22°C wurden die Antikörper zur Oberflächenfärbung für die Phänotypisierung der mCMV-spezifischen CD8 T-, iNKT- bzw. NK-Zellen hinzugegeben und für 20min bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen mit 1ml MACS-Puffer (300xg, 5min) wurden diese in 500 μ l FACS-Puffer (1%) aufgenommen und für die zytofluorometrische Messung eingesetzt.

3.6.4.4. Färbung intrazellulärer Proteine

Kit: *Cytofix/Cytoperm Fixation/Permabilization Solution Kit*

Die Färbung intrazellulärer Proteine für die Analyse der CD1d-Expression in infizierten MEF erfolgte für das virale Protein m164/gp36,5. In NK- bzw. NKT-Zellen, welche aus Milz bzw. Leber isoliert wurden, wurde intrazelluläres IFN γ gefärbt. Für die Färbung wurden jeweils $1-2 \times 10^6$ Zellen eingesetzt. Nach Zugabe von 2 μ l Fc-Block und anschließender Inkubation mit den Antikörpern für die Oberflächenfärbung (siehe 3.5.4.3.) erfolgte die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen mithilfe des *Cytofix/Cytoperm Fixation/Permabilization Solution Kit*. Dafür wurden die Zellen in 100 μ l *Cytofix/Cytoperm* aufgenommen und für 30min bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 1ml *PermWash*-Puffer (300xg, 5min; Megafuge 3 S-R, Heraeus), wurden die Antikörper für die intrazellulären Proteine zugeben und für 30min bei 4°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde nach Bedarf der Zweitantikörper (m164) zugegeben und erneut für 30min bei 4°C inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 500 μ l FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer detektiert.

3.6.5. Maus Cytokin Array

Kit: *Mouse Cytokine Array Panel A* (R&D Systems)

Zur Analyse der Cytokine aus dem Serum infizierter Mäuse wurde der *Mouse Cytokine Array* von R&D Systems verwendet. Die Serumentnahme und Aufarbeitung erfolgten wie in 3.4.5. beschrieben. Die weiteren Schritte wurden gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt:

<https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/ary006.pdf>

Die Detektion der Spots erfolgte mittels des ChemiDoc XRS+ (BioRad) und die *pixel Density* der einzelnen Spots wurde mit der Software *Image J* ermittelt.

3.6.6. Maus IFN γ ELISA

Kit: Maus IFN γ ELISA (Thermo Scientific)

Die Serumentnahme erfolgte wie in 3.4.7. beschrieben. Die weiteren Schritte erfolgten gemäß Herstellerprotokoll:

<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/BMS606.pdf>

Die Messung bei 450nm und 550nm wurde mit dem BioPhotometer von Eppendorf durchgeführt und die Regressionsanalyse mit *Excel* (Microsoft) erstellt.

3.7. Immunhistochemie (IHC)

Für die Leber wurde eine Immunhistochemie gegen das mCMV-codierte IE1-Peptid durchgeführt. Ziel war es mCMV-infizierte Zellen auch *in situ* identifizieren zu können. Die einzelnen Schritte können (Podlech et al. 2002) entnommen werden.

3.8. Statistische Analyse

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen zwei unabhängigen Versuchsgruppen wurden mit dem t-Test unter Verwendung der Welch-Korrektur ungleicher Varianz ermittelt. Die Berechnungen wurden mit einer *online* zur Verfügung stehenden Software durchgeführt (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>; GraphPad Software, Inc., La Jolla, Kalifornien, USA). Dabei wurden P-Werte $<0,05$ als statistisch signifikant betrachtet. Zu beachten ist, dass bei einem exponentiellen Ausgangsereignis (z.B. Bestimmung von Virustitern, Transkripten oder Zahl infizierter Zellen) die Daten log-normalverteilt und demzufolge logarithmiert in den Test einzusetzen sind.

4. Ergebnisse

4.1. Einfluss von iNKT-Zellen auf die mCMV-Infektion in C57BL/6

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von iNKT-Zellen auf die mCMV-Kontrolle näher untersucht werden. Der Verlauf einer mCMV-Infektion ist abhängig von der Dosis, der Injektionsroute sowie der Herkunft des verwendeten Virus (Zellkultur oder Speicheldrüse). Auch ist der genetische Hintergrund der Maus sowie ihr Immunstatus zum Zeitpunkt der Infektion von Bedeutung (Krmptotic et al. 2003). Dass insbesondere der genetische Hintergrund einen Einfluss auf die iNKT-vermittelte Viruskontrolle haben könnte, war bereits aus vorherigen Untersuchungen bekannt. Während iNKT-defiziente BALB/c.J α 18^{-/-} im Vergleich zu BALB/c.WT Mäusen (Haplotyp H-2^d) die mCMV-Infektion in der Leber an Tag 5 schlechter kontrollieren (Tyznik et al. 2014), konnte dies für C57BL/6 (Haplotyp H-2^b) nicht in dieser Deutlichkeit gezeigt werden (Van Dommelen, S. L. H. et al. 2003) (siehe auch 1.4.8.). Aus diesem Grund wurden die Analysen in dieser Arbeit sowohl auf BALB/c- als auch auf C57BL/6-Hintergrund durchgeführt. Die mCMV-Kontrolle in C57BL/6-Tieren ist dabei insbesondere durch eine frühe, effiziente NK-Kontrolle gekennzeichnet, welche auf dem aktivierenden NK-Rezeptor Ly49H beruht. Dieser bindet an das mCMV-Protein m157 und initiiert auf diese Weise eine starke NK-Immunantwort (Arase et al. 2002; Smith et al. 2002). Das Fehlen dieser Interaktion in BALB/c führt hingegen zu einer reduzierten NK-Antwort, da hier die Zellen nicht über m157 aktiviert werden. Dies resultiert in höheren Virustitern in den viszeraleen Organen zu frühen Zeitpunkten der Infektion. Erst die ab etwa Tag 3 einsetzende T-Zellantwort führt zur Viruskontrolle in der BALB/c Maus (Reddehase 2002; Sumaria et al. 2009). Für C57BL/6 (Haplotyp H-2^b) standen als Mausmodelle CD1d^{-/-} sowie J α 18^{-/-}-Tiere zur Verfügung (4.1.). Für BALB/c (Haplotyp H-2^d) waren nur CD1d^{-/-}-Tiere vorhanden (4.2. und 4.3.). Für die intakte Entwicklung von NKT-Zellen ist die Entstehung des CD1d-restringierten TZRs von entscheidender Bedeutung (Bendelac 1995). Daher fehlen diese Zellen vollständig in der CD1d-defizienten Maus (Chen et al. 1997). In J α 18-defizienten Mäusen sind hingegen lediglich iNKT-Zellen abwesend, während dNKT-Zellen weiterhin vorhanden sind (Cui et al. 1997) (siehe auch 1.5.).

4.1.1. Aktivierung von iNKT-Zellen nach mCMV-Infektion

IFN γ ist ein wichtiges Effektormolekül von iNKT-Zellen. In einem ersten Schritt wurde daher die IFN γ -Induktion von iNKT-Zellen nach mCMV-Infektion analysiert. Zu diesem Zweck wurden immunkompetente C57BL/6-Tiere mit mCMV-WT.BAC^W infiziert und nach 36 Stunden Milz und Leber entnommen. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte Tiere. Die

Lymphozyten wurden isoliert und anschließend im Durchflusszytometer die iNKT- sowie die NK-Zellen analysiert (siehe auch 3.4.4., 3.4.6., 3.5.6.). Die Ergebnisse sind beispielhaft für je eine Maus dargestellt.

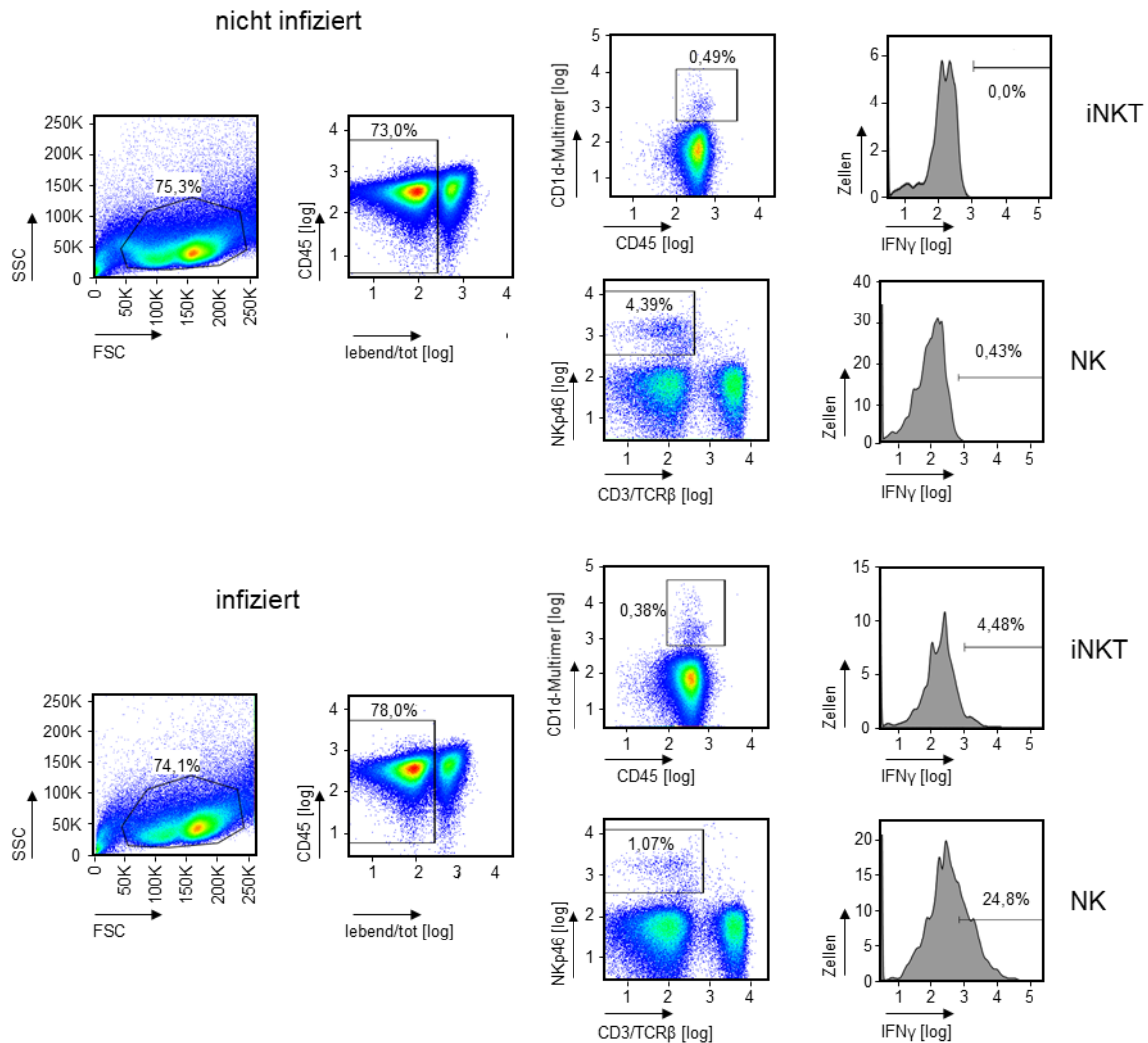


Abbildung 4.1: Interferon-Induktion von iNKT- und NK-Zellen nach mCMV-Infektion in der Milz. C57BL/6-Mäuse wurden mit 2×10^5 PFU mCMV-WT.BAC^W i.v. in die Schwanzvene infiziert. Die Milz wurde 36 Stunden nach Infektion entnommen. Anschließend wurden die Lymphozyten isoliert (siehe 3.5.6.) und CD45.2 (1:200; V500-gekoppelt), CD1d1-Multimer (1:10; Dextramer-PE-gekoppelt), CD3/TCRβ (1:100; APC-Cy7-gekoppelt) sowie NKp46 (1:100, PerCP-Cy5.5-gekoppelt) an der Oberfläche sowie intrazelluläres IFN γ (1:300; APC-gekoppelt) detektiert. Die Messung erfolgte im FACS CANTO II (BD). Die Daten wurde mithilfe der Software FlowJo analysiert.

Sowohl in der Milz (Abb. 4.6) als auch in der Leber (Abb. 4.7) waren iNKT-Zellen auch ohne Infektion detektierbar. Dabei zeigten sie keine nennenswerte IFN γ -Ausschüttung. Bereits 36 Stunden nach Infektion konnte hingegen eine deutliche IFN γ -Induktion in den detektierten iNKT-Zellen gemessen werden. Dies zeigt, dass die mCMV-Infektion zur Aktivierung von iNKT-Zellen führt und eine Zytokinantwort auslöst.

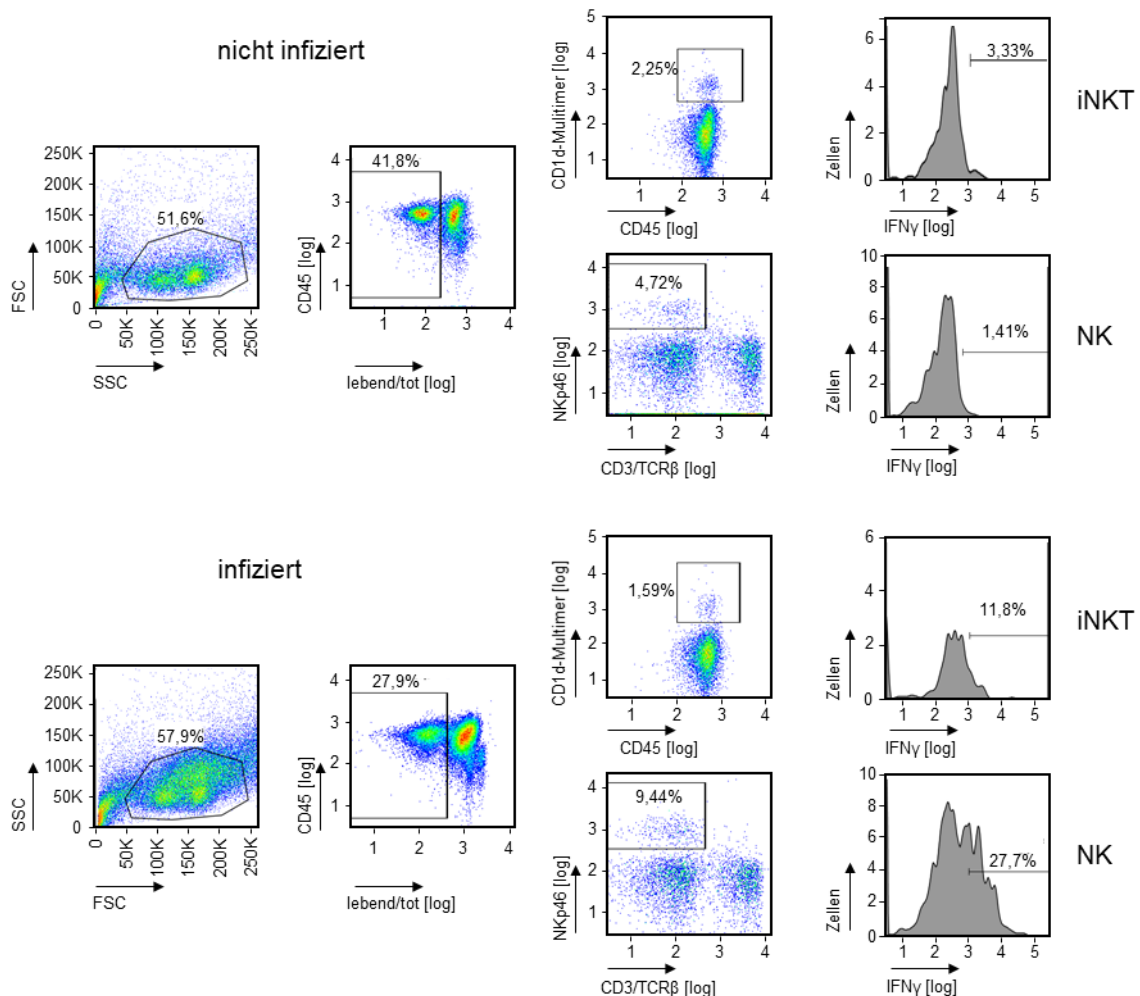


Abbildung 4.2: IFN γ -Induktion von iNKT- und NK-Zellen nach mCMV-Infektion in der Leber. C57BL/6-Mäuse wurden mit 2×10^5 PFU mCMV-WT.BAC^W i.v. in die Schwanzvene infiziert. Die Leber wurde 36 Stunden nach Infektion entnommen. Anschließend wurden die Lymphozyten isoliert (siehe 3.5.6.) und CD45.2 (1:200; V500-gekoppelt), CD1d1-Multimer (1:10; Dextramer-PE-gekoppelt), CD3/TCR β (1:100; APC-Cy7-gekoppelt) sowie NKp46 (1:100; PerCP-Cy5.5-gekoppelt) an der Oberfläche sowie intrazelluläres IFN γ (1:300; APC-gekoppelt) detektiert. Die Messung erfolgte im FACS CANTO II (BD). Die Daten wurde mithilfe der Software FlowJo analysiert.

IFN γ gilt zusätzlich als eines der Haupteffektormoleküle, welches NK-Zellen sekretieren, um die mCMV-Infektion zu kontrollieren (Orange et al. 1995; Tay und Welsh 1997). So konnte auch in dieser Arbeit eine IFN γ -Induktion von NK-Zellen nach mCMV-Infektion gezeigt werden. Weiterhin kommt es in der Leber nach mCMV-Infektion zur Ausschüttung von MIP-1 α , welches die NK-Zellrekrutierung in die infizierte Leber fördert (Jonjić et al. 2006). Die gemessene, deutlich erhöhte NK-Zellanzahl nach Infektion in der Leber entspricht diesen publizierten Daten.

Zusammenfassung: In der C57BL/6-Maus führt die Infektion mit mCMV zur Aktivierung von iNKT-Zellen sowie NK-Zellen, welche in der Folge IFN γ sekretieren.

4.1.2. Viruskontrolle in (i)NKT-defizienten Tieren (C57BL/6)

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von iNKT-Zellen in der mCMV-Infektion näher zu analysieren. Dafür sollten zunächst verschiedene Aspekte der Viruskontrolle in (i)NKT-defizienten Tieren des Haplotyps H-2^b (C57BL/6) untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die Virusreplikation in den verschiedenen Mausstämmen nach mCMV-Infektion miteinander verglichen (4.1.2.1.). Weiterhin wurde die virale Transkription im drainierenden Lymphknoten zu frühen Zeitpunkten der Infektion quantifiziert (4.1.2.2.) und die Frequenzen virus-spezifischer CD8 T-Zellen an Tag 7 nach Infektion analysiert (4.1.2.3.).

4.1.2.1. mCMV-Replikation in (i)NKT-defizienten Tieren

Die Untersuchung der Virusreplikation in C57BL/6- (B6.WT), B6.CD1d^{-/-}- und B6.Jα18^{-/-}-Tieren erfolgte an Tag 2, 4, 6 und 8 für verschiedene Organe. Die Tiere wurden jeweils mit mCMV-WT.Smith i.v. infiziert (siehe 3.4.4.) und der Virustiter in der Milz mithilfe eines Virus-*Plaque-Assays* (siehe 3.2.2. und 3.4.6.) an den genannten Tagen bestimmt (Abb. 4.3A). Aus Lungen- und Leberhomogenaten wurden parallel virale Genome mittels M55/gB-spezifischer qPCR absolut quantifiziert (Abb. 4.3B und C). Zusätzlich wurde für die Leber eine Immunhistochemie gegen das virale mCMV-Protein IE1 zur *in situ*-Darstellung von infizierten Zellen im Gewebe durchgeführt (siehe 3.6.) (Abb. 4.3C).

Weder in der Milz noch in der Lunge konnten signifikante Unterschiede in den mCMV-Virustitern zwischen dem B6.WT und den zwei *knockout*-Stämmen detektiert werden. In der Leber (Abb. 4.3C) zeigte sich hingegen eine signifikant verbesserte virale Kontrolle in beiden (i)NKT-defizienten Mausstämmen im Vergleich zum B6.WT. Dabei zeigte die Auszählung der infizierten Zellen (IE1+) eine signifikant verbesserte Kontrolle der mCMV-Infektion bereits an Tag 2 der Infektion in den B6.CD1d^{-/-}-Mäusen im Vergleich zum B6.WT. Auch an Tag 4 war diese noch verbessert, allerdings nicht mehr signifikant (P=0,0971). An Tag 6 und 8 waren in der Leber in keinem Mausstamm noch IE1-positive Zellen detektierbar. Die Quantifizierung der viralen Genome zeigte an Tag 4 nach Infektion in B6.CD1d^{-/-}-Tieren eine knapp signifikante Reduktion der viralen Genome im Vergleich zum B6.WT (P=0,0458). Gleiches konnte auch an Tag 8 in der Leber für beide *knockout*-Stämme gezeigt werden (B6.CD1d^{-/-}: P= 0,0049; B6.Jα18^{-/-}: P= 0,0243).

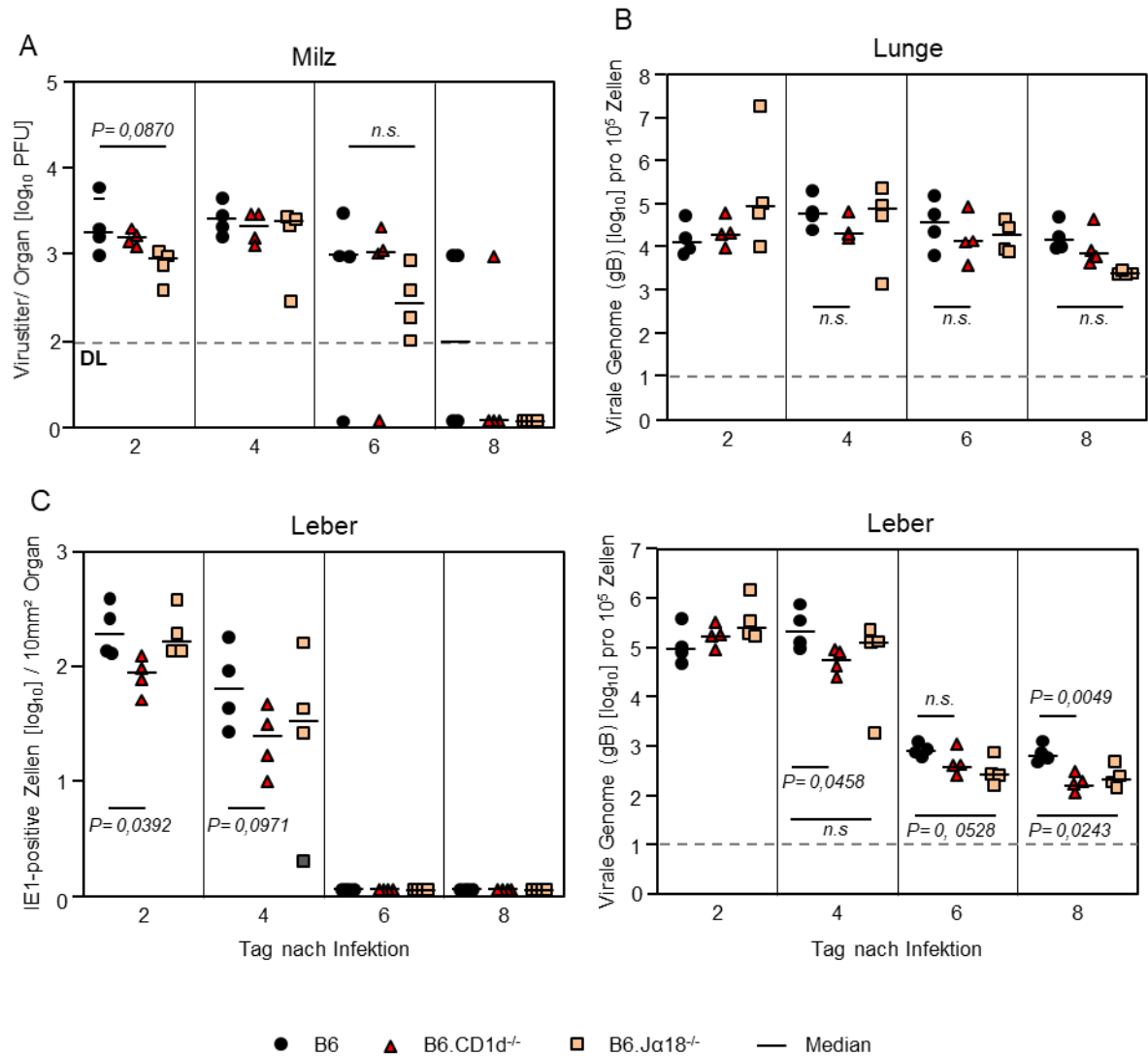


Abbildung 4.3: Virusreplikation in B6.WT-, B6.CD1d^{-/-}- und B6.Jα18^{-/-}-Mäusen. B6.WT-, B6.CD1d^{-/-}- bzw. B6.Jα18^{-/-}-Tiere wurden mit 1×10^6 PFU mCMV-WT.Smith i.v. infiziert. Die dargestellten Organe wurden an den angegebenen Tagen entnommen. (A) Mittels Virus-Plaque-Assay wurde der Virustiter aus Milzhomogenaten ermittelt. (B) Aus Lungenhomogenaten wurde mittels RTqPCR eine absolute Quantifizierung viraler Genome (M55/gB) vorgenommen und auf das zelluläre pThrP-Gen normiert. (C) Für die Leber wurden ebenfalls die viralen Genome bestimmt sowie mittels einer IE1-spezifischen Immunhistochemie infizierte Zellen nachgewiesen. Die Zahl der IE1-positiven Zellen ist pro 10mm^2 Gewebefläche angegeben. Es sind Einzeltiere dargestellt, die Mediane sind als horizontale Balken eingezeichnet. Ein statistischer Unterschied zwischen zwei Gruppen wurde durch den *unpaired t-test* mit Welch Korrektur ungleicher Varianz berechnet. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das Detektionslimit.

Während in der Milz und Lunge (i)NKT-Zellen keinen großen Einfluss auf die Viruskontrolle zu haben scheinen, war in der Leber eine verbesserte Kontrolle in den (i)NKT-defizienten Tieren messbar, wobei diese in B6.CD1d^{-/-}-Tieren schon zu früheren Zeitpunkten als in B6.Jα18^{-/-} detektierbar war.

4.1.2.2. Virale Transkription im drainierenden Lymphknoten

iNKT-Zellen können nach ihrer Aktivierung sehr rasch ihre Effektorfunktionen ausüben (zur Übersicht: Matsuda et al. 2008; Tessmer et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass es 36 Stunden nach mCMV-Infektion zu einer IFN γ -Induktion in den iNKT-Zellen in Milz und Leber kommt (Abb. 4.1 und 4.2). Aus diesem Grund sollte nun überprüft werden, ob iNKT-Zellen nach mCMV-Infektion einen Einfluss auf die frühe virale Transkription haben. Mithilfe einer qRT-PCR (3.3.10.) ist es möglich, die intranodale Genexpression des *ie1*- und *e1*-Gens schon zu einem frühen Zeitpunkt sehr sensitiv zu detektieren. Tiere der unterschiedlichen Mausstämmen wurden hierfür intraplantar mit mCMV-WT.Smith infiziert, 48 Stunden nach Infektion der popliteale Lymphknoten entnommen und die IE1- und E1-Transkripte detektiert. Für eine absolute Quantifizierung der viralen Transkripte wurden als externe Standards *in vitro*-Transkripte mit einer Teilchenanzahl von 10^6 bis 10^1 pro Ansatz mitgeführt (Simon et al., 2006). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.4 dargestellt.

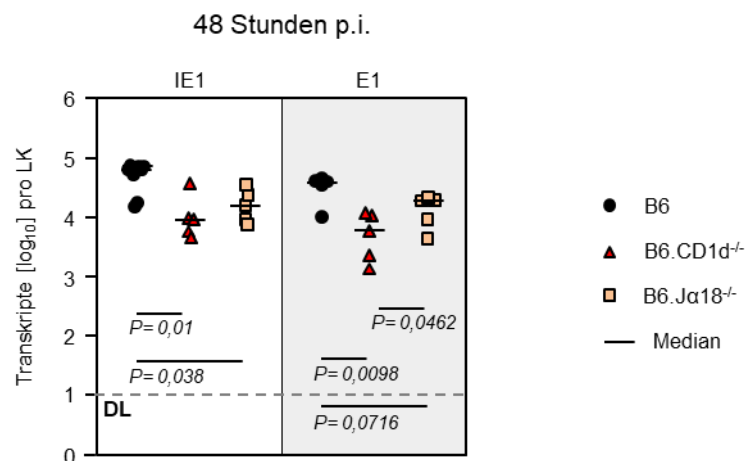


Abbildung 4.4: Virale Transkripte in (i)NKT-defizienten Mausstämmen. Die Quantifizierung viraler Transkripte erfolgte 48 Stunden nach intraplantarer Infektion mit 1×10^5 PFU mCMV-WT.Smith. Gesamt-RNA wurde aus dem poplitealen Lymphknoten isoliert und anschließend 500ng RNA für die IE1- bzw. E1-spezifische RT-qPCR (siehe 3.3.10.) eingesetzt. Es sind Einzeltiere dargestellt, die Mediane sind als horizontale Balken eingezeichnet. Ein statistischer Unterschied zwischen zwei Gruppen wurde durch den *unpaired t-test* mit Welch Korrektur ungleicher Varianz berechnet. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das Detektionslimit.

Die Quantifizierung der viralen Transkription 48 Stunden nach Infektion zeigte für die (i)NKT-defizienten Mäusen eine signifikant reduzierte IE1-Transkription im Vergleich zum Wildtyp. Dieser Unterschied konnte auch für das E1-Transkript detektiert werden, wobei hier die virale E1-Transkription von B6.CD1d $^{-/-}$ auch gegenüber B6.J α 18 $^{-/-}$ -Tieren signifikant reduziert war. In beiden *knockout*-Stämmen konnte somit bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion eine signifikant reduzierte *ie1*-Genexpression nachgewiesen werden, wobei die Reduktion der IE1- bzw. E1-Transkripte in B6.CD1d $^{-/-}$ am stärksten ausgeprägt war.

4.1.2.3. CD8 T-Zellantwort in (i)NKT-defizienten Tieren

In mehreren Publikationen wird ein Zusammenhang zwischen erhöhter Viruslast und in der Folge eine dadurch vermehrte Bereitstellung viraler Antigene für ein verbessertes CD8 T-Zellpriming diskutiert (Böhm et al. 2008b; Andrews et al. 2010; Mitrović et al. 2012; Redeker et al. 2017). Die geringere virale Transkription im Lymphknoten der (i)NKT-defizienten Tiere könnte daher auch Einfluss auf die CD8 T-Zellfrequenzen haben. Aus diesem Grund wurde als nächstes das CD8 T-Zellpriming in diesen Tieren analysiert. Dabei wurden die Frequenzen Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen im drainierenden Lymphknoten 7 Tage nach Infektion im ELISpot bestimmt. Zunächst wurden B6.WT-, B6.CD1d^{-/-} und B6.Jα18^{-/-}-Mäusen mit mCMV-WT.Smith intraplantar infiziert und 7 Tage nach Infektion der popliteale Lymphknoten entnommen. Als APC dienten EL4-Zellen, welche exogen mit synthetischen Peptiden (M45, M57, m139 und m141) beladen wurden (siehe auch 3.5.3.-3.5.5.).

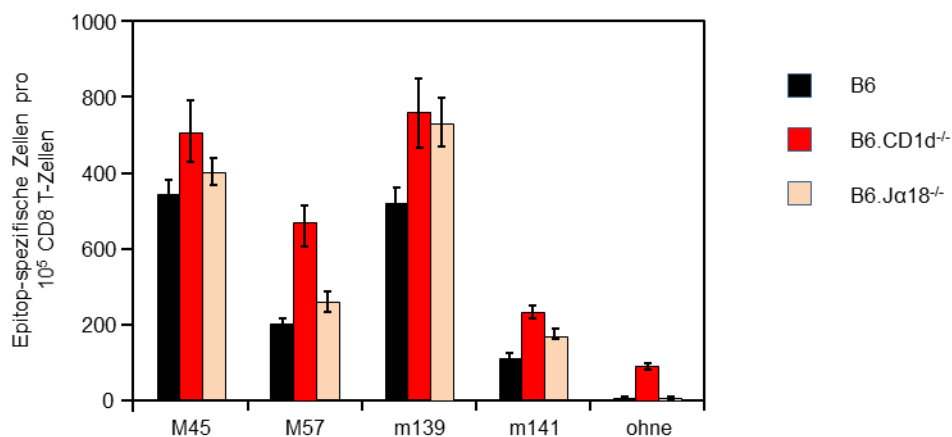


Abbildung 4.5: mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort in B6.WT, B6.CD1d^{-/-} und B6.Jα18^{-/-}. Die verschiedenen Mausstämme wurden mit je 1×10^5 PFU mCMV-WT.Smith intraplantar infiziert. 7 Tage nach Infektion wurde der popliteale Lymphknoten entnommen und die Lymphozyten aus einem Pool von je drei Tieren isoliert (siehe 3.5.3.). Nach einer immunmagnetischen Anreicherung der CD8 T-Zellen (siehe 3.5.4.) wurden diese als Effektorzellen im ELISpot-Assay eingesetzt (siehe 3.5.5.). Als APC wurden peptidbeladene EL4-Zellen (M45, M57, m139 und m141) eingesetzt. Mittels Regressionsanalyse wurden die Frequenzen der IFN γ -sezernierenden Zellen errechnet. Die Balken kennzeichnen den Bereich der 95% Konfidenzintervalle.

Insbesondere für B6.CD1d^{-/-} konnte eine leicht verbesserte CD8 T-Zellantwort im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden (Abb. 4.5), welche jedoch nicht für alle Peptide gleich stark ausgeprägt war. Ein Trend in diese Richtung konnte jedoch in 3 weiteren unabhängigen Analysen bestätigt werden. Die geringere transkriptionelle Aktivität im Lymphknoten von iNKT-defiziente Mäusen führte daher nicht zu einem verschlechterten mCMV-spezifischen CD8 T-Zellpriming.

Zusammenfassung: Sowohl B6.CD1d^{-/-}- als auch B6.Jα18^{-/-}-Mäuse sind in der Lage, die mCMV-Infektion effizient zu kontrollieren. Während in Milz und in Lunge keine Unterschiede in der viralen Replikation detektiert werden konnten, zeigte sich in der Leber eine signifikant reduzierte Replikation in B6.CD1d^{-/-} (Tag 2, 4, 8 p.i.) sowie B6.Jα18^{-/-} (Tag 8 p.i.) im

Vergleich zum Wildtyp. Zudem konnte für beide Mausstämme eine signifikant verringerte IE1- und E1-Transkription detektiert werden. Die Analyse der CD8 T-Zellfrequenzen hingegen zeigte für B6.CD1d^{-/-} eine leicht verbesserte CD8 T-Zellantwort im Vergleich zum Wildtyp.

4.2. Einfluss von (i)NKT-Zellen auf die mCMV-Infektion in BALB/c

Wie bereits ausgeführt (4.1.), hat der genetische Hintergrund der infizierten Maus Einfluss auf die NK- und möglicherweise auch auf die (i)NKT-Kontrolle der mCMV-Infektion. Aus diesem Grund wurde die Analyse des Einflusses von (i)NKT-Zellen auf die mCMV-Infektion auch in BALB/c durchgeführt. Auf diesem genetischen Hintergrund standen jedoch nur CD1d^{-/-}-Tiere zur Verfügung. Auch in diesem Modellsystem wurden Virustiter, frühe virale Transkription und das CD8 T-Zell*priming* nach Infektion von BALB/c und BALB/c.CD1d^{-/-} verglichen (4.2.1.-4.2.3.).

4.2.1. mCMV-Replikation in NKT-defizienten Tieren

Für die Untersuchung der Viruskontrolle in BALB/c- und BALB/c.CD1d^{-/-}-Tieren wurden diese, aufgrund ihrer höheren mCMV-Suszeptibilität mit 2x10⁵PFU mCMV-WT.Smith i.v. infiziert und Milz, Leber und Lunge an Tag 2, 4, 6, 8 und 10 entnommen. Der Virustiter in Milz und Lunge wurde mittels *Virus-Plaque-Assay* ermittelt. Für die Leber wurde eine Immunhistochemie gegen das virale mCMV-Protein IE1 durchgeführt.

Wie in Abbildung 4.6 dargestellt, zeigten BALB/c.CD1d^{-/-} und BALB/c vergleichbare Virustiter in allen Organen. Lediglich an Tag 4 nach Infektion ist eine leichte Verschlechterung der Viruskontrolle in BALB/c.CD1d^{-/-} sichtbar, die jedoch nicht statistisch signifikant war. In der Milz und der Leber wurde in beiden Gruppen über den Zeitverlauf eine deutliche Reduktion der viralen Titer detektiert, so dass die mCMV-Infektion effizient kontrolliert wurde. Die Ergebnisse stehen im Gegensatz zur signifikant verbesserten Kontrolle der B6.CD1d^{-/-} (Tag 2,4,8 p.i.) und B6.J α 18^{-/-} (Tag 8 p.i.) in der Leber im Vergleich zum B8.WT.

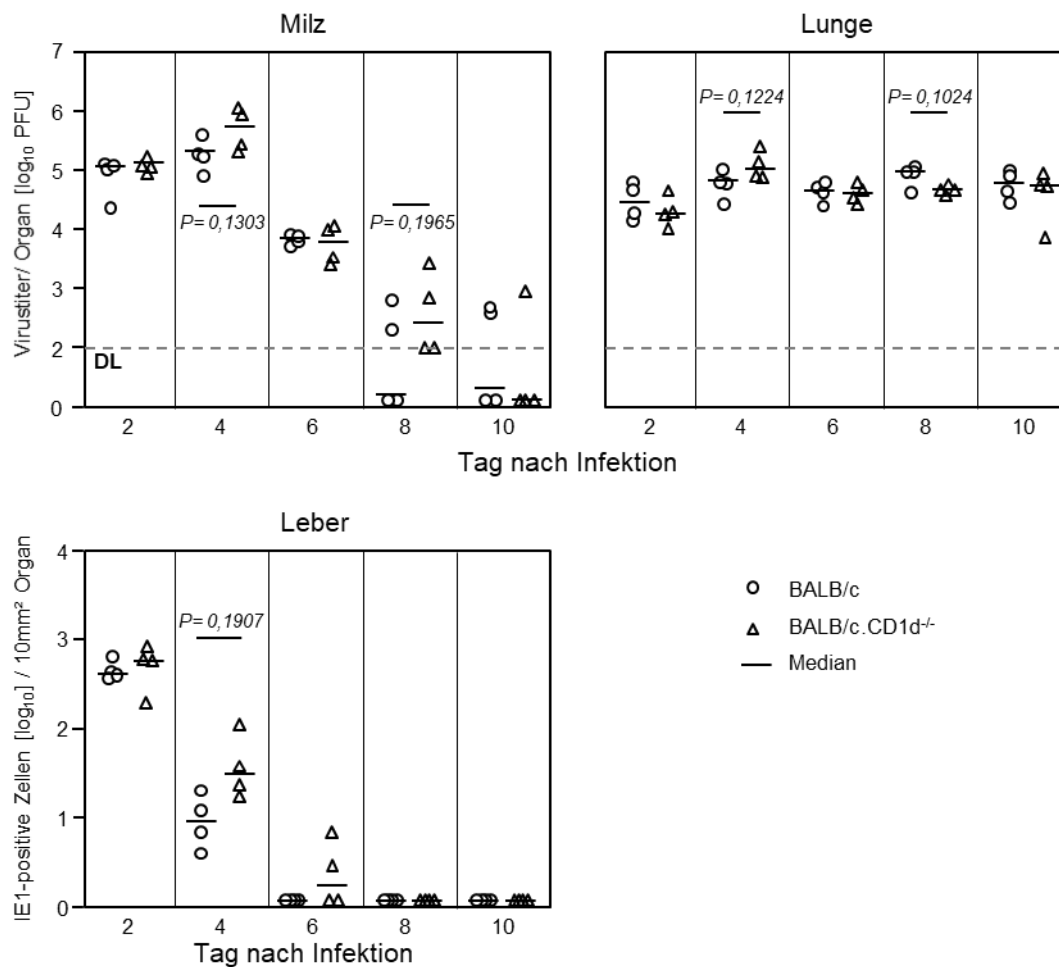


Abbildung 4.6: Virusreplikation in BALB/c- und BALB/c.CD1d^{-/-}-Mäusen. BALB/c- bzw. BALB/c.CD1d^{-/-}-Tieren wurden i.v. mit 2×10^5 PFU mCMV-WT.Smith infiziert. Die dargestellten Organe wurden an den angegebenen Tagen entnommen. Mittels eines Virus-Plaques-Assays wurde der Virustiter aus Milz- und Lungenhomogenaten ermittelt. Für die Leber wurden einer IE1-spezifischen Immunhistochemie infizierte Zellen nachgewiesen. Die Zahl der IE1-positiven Zellen ist pro 10mm² Gewebefläche angegeben. Es sind Einzeltiere dargestellt, die Mediane sind als horizontale Balken eingezeichnet. Ein statistischer Unterschied zwischen zwei Gruppen wurde mit dem *unpaired t-test* mit Welch Korrektur ungleicher Varianz berechnet. P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das Detektionslimit.

4.2.2. Virale Transkription im drainierenden Lymphknoten

Auch für das BALB/c-Modell wurde die intranodale Genexpression als Surrogate für die frühe virale Replikation gemessen, um mögliche Einflüsse von (i)NKT-Zellen zu erkennen. Dazu wurde die Genexpression des *ie1*- und *e1*-Gens 48 Stunden nach Infektion mittels qRT-PCR (3.3.10.) bestimmt. BALB/c und BALB/c.CD1d^{-/-} wurden intraplantar mit mCMV-WT.Smith infiziert, 48 Stunden nach Infektion wurde der popliteale Lymphknoten entnommen, Gesamt-RNA aufgereinigt und die IE1- bzw. E1-Transkripte bestimmt. Für eine absolute Quantifizierung wurden als externe Standards *in vitro*-Transkripte mit einer Teilchenanzahl von 10^6 bis 10^1 pro Ansatz mitgeführt (Simon et al., 2006). Abbildung 4.7 fasst die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen zusammen.

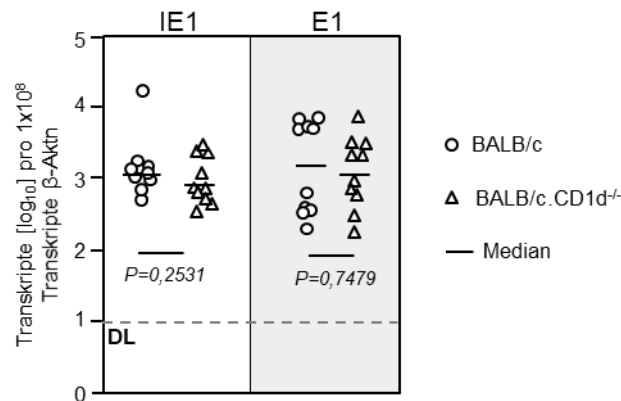


Abbildung 4.7: Virale Transkripte in BALB/c- und BALB/c.CD1d^{-/-}-Mäusen. Die Quantifizierung viraler Transkripte erfolgte 48 Stunden nach intraplantarer Infektion mit 1×10^5 PFU mCMV-WT.Smith. Gesamt-RNA wurde aus dem poplitealen Lymphknoten isoliert und anschließend 500ng RNA für die IE1- E1- bzw. β -Aktin-spezifische RT-qPCR (siehe 3.3.10.) eingesetzt. Es sind Einzeltiere aus zwei unabhängigen Versuchen dargestellt, die Mediane sind als horizontale Balken eingezeichnet. Ein statistischer Unterschied zwischen zwei Gruppen wurde durch den *unpaired t-test* mit Welch Korrektur ungleicher Varianz berechnet. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das Detektionslimit.

Zwischen BALB/c und BALB/c.CD1d^{-/-} konnte kein signifikanter Unterschied in der IE1- sowie E1-Transkription festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnte in B6.CD1d^{-/-} und B6.J α 18^{-/-} im Vergleich zum B6.WT eine signifikant verringerte virale Transkription detektiert werden.

4.2.3. CD8 T-Zellantwort in (i)NKT-defizienten Tieren

Weiterhin wurde auch in diesem Mausmodell das CD8 T-Zell*priming* untersucht (siehe auch 3.5.3.-3.5.5.). Hierfür wurden BALB/c.CD1d^{-/-} und BALB/c mit mCMV-WT.Smith intraplantar infiziert. 7 Tage nach Infektion wurde der popliteale Lymphknoten entnommen, die Lymphozyten aus einem Pool von je drei Tieren isoliert und diese als Effektorzellen im ELISpot-Assay eingesetzt. Als APC dienten P815-Zellen, welche exogen mit synthetischen IE1-, m164-, M105- oder m145-Peptiden beladen wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.8 dargestellt.

Die Analyse der T-Zellfrequenzen ergab keinen eindeutigen Unterschied im CD8 T-Zell*priming* zwischen (i)NKT-defizienten und -kompetenten Tieren nach mCMV.WT-Infektion. Interessanterweise steht auch dies im Gegensatz zu den Ergebnissen im C57BL/6-Stamm. Sowohl für B6.CD1d^{-/-} als auch für B6.J α 18^{-/-} konnte eine leicht verbesserte CD8 T-Zellantwort im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden (siehe Abb. 4.5).

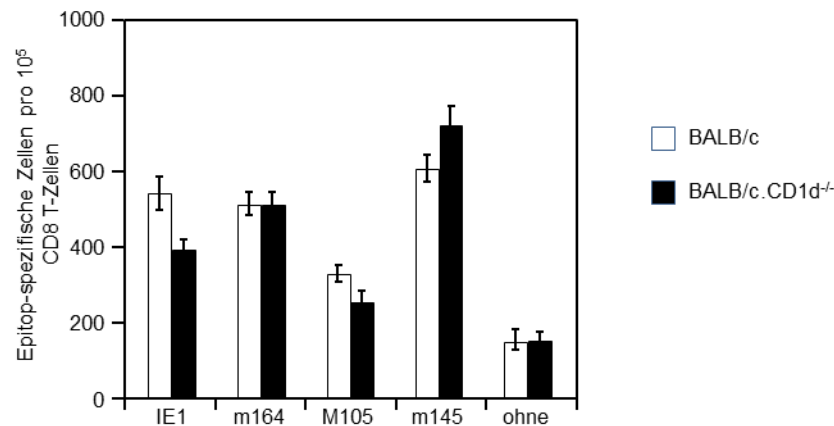


Abbildung 4.8: mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort von NKT-defizienten BALB/c-Tieren. BALB/c und BALB/c.CD1d^{-/-} wurden mit je 1×10^5 PFU mCMV-WT.Smith intraplantar infiziert. 7 Tage nach Infektion wurde der popliteale Lymphknoten entnommen und die Lymphozyten aus einem Pool von je drei Tieren isoliert (siehe 3.5.3.). Nach einer immunmagnetischen Anreicherung der CD8 T-Zellen (siehe 3.5.4.) wurden diese als Effektorzellen im ELISpot-Assay eingesetzt (siehe 3.5.5.). Als APC wurden peptidbeladene P815-Zellen (IE1, m164, M105 und m145) eingesetzt. Mittels Regressionsanalyse wurden die Frequenzen der IFN γ -sezernierenden Zellen errechnet. Die Balken kennzeichnen den Bereich der 95% Konfidenzintervalle.

Zusammenfassung: BALB/c.CD1d^{-/-} sind in der Lage die mCMV-Infektion effizient zu kontrollieren. So konnten keine signifikanten Unterschiede in der Viruskontrolle, in der viralen Transkription im poplitealen Lymphknoten sowie im CD8 T-Zellpriming festgestellt werden. Dies steht im Gegensatz zur signifikant verbesserten Kontrolle der B6.CD1d^{-/-} (Tag 2, 4, 8 p.i.) und B6.J α 18^{-/-} (Tag 8 p.i.) in der Leber im Vergleich zum B6.WT sowie der signifikant verringerten viralen Transkription im Lymphknoten der (i)NKT-defizienten Tiere des Haplotyp H-2^b und den leicht verbesserten T-Zellfrequenzen.

4.3. Einfluss aktivierter iNKT-Zellen auf die mCMV-Infektion in BALB/c

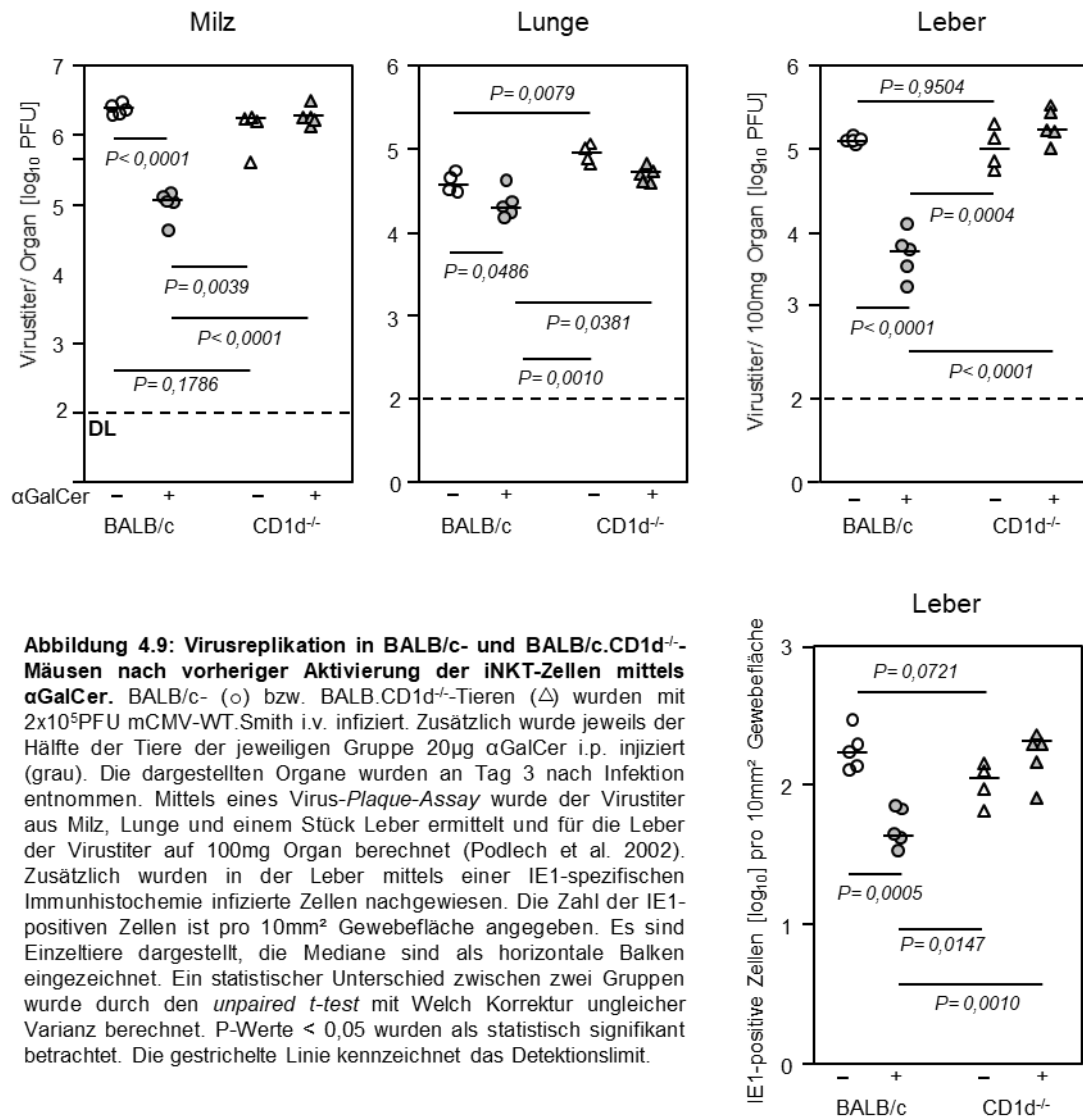
Van Dommelen konnte in einer früheren Publikation zeigen, dass eine Aktivierung von iNKT-Zellen mithilfe von α GalCer in mCMV-infizierten BALB/c- und C57BL/6-Tieren zu reduzierten viralen Titern in den viszerale Organen (Milz und Leber) führt (Van Dommelen, S. L. H. et al. 2003). CD1d-präsentiertes α GalCer wird dabei von iNKT-Zellen erkannt, wobei die Präsentation keinerlei Internalisation bedarf, sondern α GalCer auch an der Zelloberfläche direkt auf CD1d geladen werden kann (Prigozy et al. 2001; Brennan et al. 2013). Van Dommelen führte den therapeutischen Effekt von α GalCer auf eine Transaktivierung der NK-Zellen sowie deren Perforin- und IFN γ -Ausschüttung zurück (Van Dommelen, S. L. H. et al. 2003; Van Dommelen, S. L. H. und Degli-Esposti 2004). Tyznik et al. hingegen betonten die Bedeutung der direkten antiviralen Antwort von iNKT-Zellen (Tyznik et al. 2014) (siehe auch 1.4.8). Daher wurde in dieser Arbeit zunächst getestet, ob der positive Einfluss von α GalCer von uns reproduzierbar ist (4.3.1.). Weiterhin wurde der

Beitrag von CD8 T- und NK-Zellen zur Viruskontrolle nach Aktivierung der iNKT-Zellen analysiert (4.3.2.). Hierzu wurde neben der viralen Transkription (4.3.3.) und den CD8 T-Zellfrequenzen (4.3.4.) auch eine Analyse des Zytokinprofils im Serum nach mCMV-Infektion mit Schwerpunkt auf die IFN γ -Expression durchgeführt (4.3.5.). Weiterhin wurde der Einfluss von iNKT-Zellen auf die Infektion mit der Virusmutante mCMV- Δ vRAP (siehe auch 2.6.) untersucht (4.3.6.).

4.3.1. mCMV-Replikation nach Aktivierung von iNKT-Zellen

Um zunächst zu untersuchen, ob der von Van Dommelen gezeigte antivirale Effekt von α GalCer reproduzierbar ist, wurden BALB/c- bzw. BALB/c.CD1d^{-/-}-Mäuse mit mCMV-WT.Smith i.v. infiziert und zeitgleich die iNKT-Zellen durch intraperitoneale Gabe von α GalCer aktiviert. Es ist beschrieben, dass die Aktivierung mit α GalCer innerhalb von 24-72 Stunden zu einer Proliferation der iNKT-Zellen in Milz und Knochenmark führt. Die Expansion ist assoziiert mit einer T_H1-Zytokinproduktion (Carnaud et al. 1999). Zudem konnte ein positiver Effekt von α GalCer auf die Viruskontrolle an Tag 2 und Tag 4 nach Infektion gezeigt werden. Daher erfolgte die Organentnahme in dem hier dargestellten Versuch an Tag 3 nach Infektion, da an diesem Tag ein möglicher Einfluss von α GalCer messbar sein sollte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.9 dargestellt.

In diesem Versuch konnte ein signifikant reduzierter Virustiter in Milz, Lunge und Leber nach Aktivierung der iNKT-Zellen in BALB/c-Mäusen festgestellt werden. Zusätzlich konnte für die Lunge eine signifikante Reduktion der viralen Replikation in BALB/c im Vergleich zu BALB/c.CD1d^{-/-} auch ohne vorherige Aktivierung der iNKT-Zellen detektiert werden. Schon in Abbildung 4.6 war an Tag 4 nach Infektion ist eine leichte Verschlechterung der Viruskontrolle in BALB/c.CD1d^{-/-} sichtbar, diese war jedoch nicht statistisch signifikant. Möglicherweise haben iNKT-Zellen in der Lunge nur in einem sehr kurzen Zeitfenster um Tag 3 einen positiven Einfluss, der im Verlauf der Infektion anderweitig kompensiert werden kann. In BALB/c.CD1d^{-/-} war hingegen wie erwartet kein therapeutischer Effekt von α GalCer zu detektieren. Damit konnte der positive Effekt von aktivierten iNKT-Zellen auf die Immunkontrolle der mCMV-Infektion auch in dieser Arbeit bestätigt werden.



4.3.2. Einfluss aktivierter iNKT-Zellen auf die Viruskontrolle bei zusätzlicher NK- und CD8 T-Zelldepletion

iNKT-Zellen interagieren mit zahlreichen Zelltypen, deren Aktivierung sie unterstützen oder supprimieren können. Neben B-Zellen (Mauri und Bosma 2012), Makrophagen (Barral et al. 2010) oder Neutrophilen (Santo et al. 2010) besteht dabei auch eine Verbindung zu DCs und über diese indirekt, aber auch direkt ein Einfluss auf NK-Zellen (Carnaud et al. 1999; Kitamura et al. 1999; Eberl und MacDonald 2000) und CD4- und CD8 T-Zellen (Fujii et al. 2003; Hermans et al. 2003) (siehe auch 1.4.6.1.). Da die mCMV-Kontrolle über NK-Zellen sowie die etwa an Tag 3 einsetzende CD8 T-Zellkontrolle vermittelt wird (Reddehase 2002; Böhm et al. 2008b), sollte im Folgenden untersucht werden, ob die verbesserte Immunantwort von BALB/c-Mäusen bei vorheriger Aktivierung der iNKT-Zellen über CD8 T- und/oder NK-Zellen oder von den iNKT-Zellen selbst vermittelt wird. Hierfür wurden CD8

T- und NK-Zellen vor der mCMV-Infektion mit Antikörpern depletiert und der Virustiter in den Zielorganen der Infektion nach Aktivierung der iNKT-Zellen bestimmt.

4.3.2.1. Einfluss einer NK-Depletion auf iNKT-Zellen

Es ist bekannt, dass polyklonale α -asialo GM1 Antikörper selektiv NK- jedoch nicht iNKT-Zellen (Smyth et al. 2001) depletieren. Dennoch sollte in einem Vorversuch untersucht werden, ob dieser Antikörper auch keinen Einfluss auf aktivierte iNKT-Zellen hat. Zu diesem Zweck wurden NK-Zellen in BALB/c-Mäusen mit Hilfe von α -asialo GM1 24h vor Infektion oder 24h nach mCMV-Infektion depletiert. Der Hälfte der Tiere wurde zusätzlich zum Zeitpunkt der Infektion α GalCer intraperitoneal injiziert. Als Kontrolle wurden unbehandelte BALB/c.CD1d^{-/-}-Tiere infiziert. An Tag 3 nach Infektion wurden die Lymphozyten wie unter 3.5.6. beschrieben aus der Milz isoliert und die NK- sowie iNKT-Zellen zytofluorometrisch analysiert. In Abbildung 4.10A und B ist beispielhaft je eine Messung für die verschiedenen Gruppen dargestellt. In 4.10C werden die Ergebnisse zusammengefasst.

Es ist zu erkennen, dass α -asialo GM1 in keinem *Setting* Einfluss auf (aktivierte) iNKT-Zellen hat. Weiterhin kam es ohne NK-Zelldepletion zu einer relativen prozentualen Erhöhung sowohl der iNKT- als auch NK-Zellen nach iNKT-Zellaktivierung. Dies reproduziert bereits veröffentlichte Daten. So ist die Proliferation von iNKT-Zellen 24-72 Stunden nach Gabe von α GalCer beschrieben (Bendelac et al. 2007). Zudem können NK-Zellen von aktivierten iNKT-Zellen zur Proliferation angeregt werden (Carnaud et al. 1999), was neben der Infiltration in die Milz die Erhöhung der NK-Zellen erklären könnte.. Interessanterweise führt auch die alleinige Depletion von NK-Zellen (ohne α GalCer) zu einer relativen prozentualen Erhöhung der iNKT-Zellen. So ist im Unterschied zu nicht-depletierten Tieren die iNKT-Zellzahl in Tieren, welche an Tag -1 depletiert wurden, erhöht. Hierbei handelt es sich jedoch nur um einen Einzelbefund, welcher daher noch weiterer Analyse bedarf. Dennoch könnte dies auf eine verstärkte Stimulation der iNKT-Zellen während der mCMV-Infektion hinweisen, ausgelöst durch einen vermehrten Kontakt mit viralen Antigenen aufgrund der fehlenden NK-Zellkontrolle. Für die BALB/c.CD1d^{-/-}-Tiere konnte eine normale NK-Zellzahl detektiert werden. iNKT-Zellen waren wie erwartet nicht vorhanden.

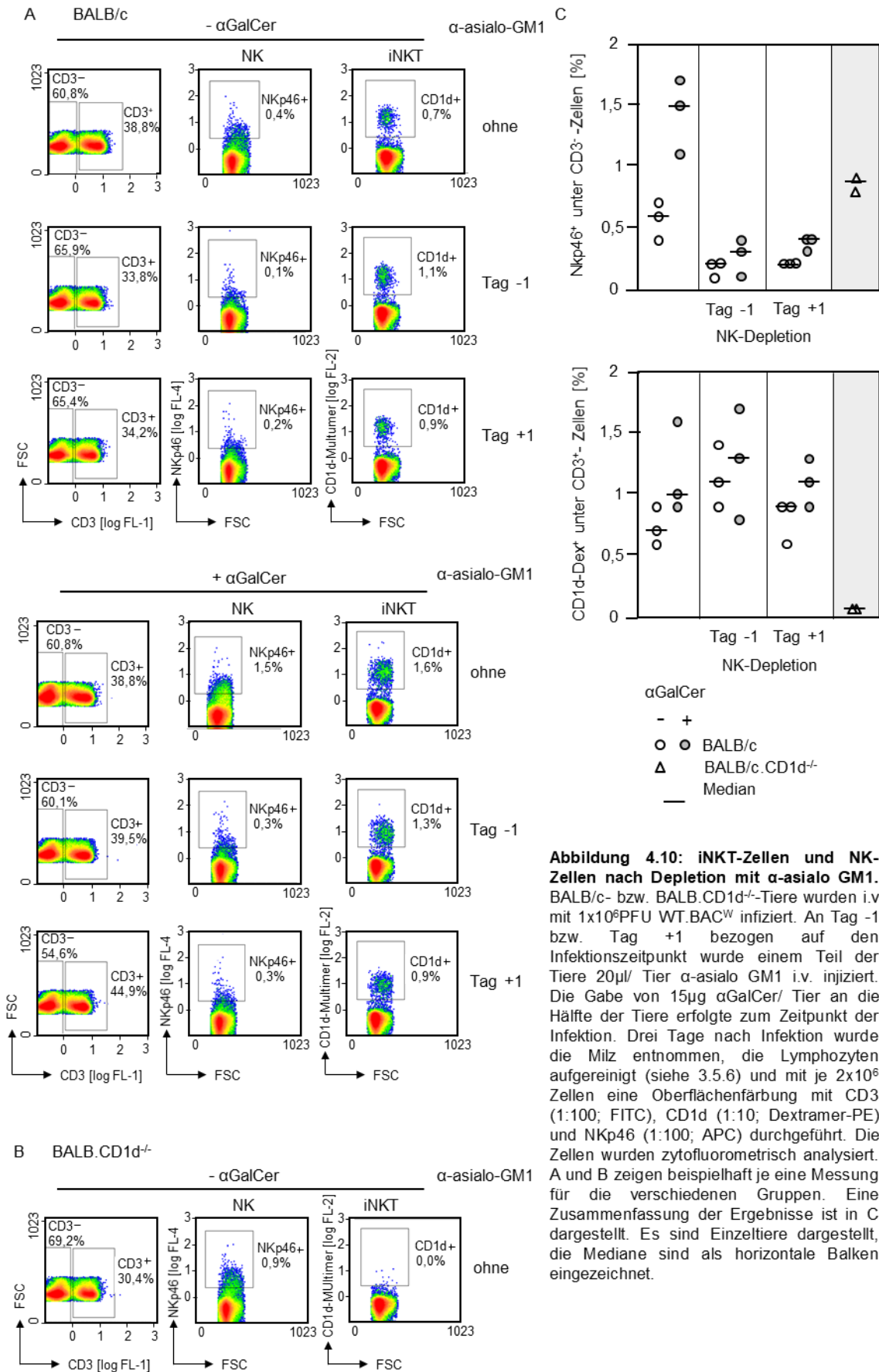


Abbildung 4.10: iNKT-Zellen und NK-Zellen nach Depletion mit α-asialo GM1. BALB/c- bzw. BALB.CD1d^{-/-}-Tiere wurden i.v. mit 1x10⁶PFU WT.BAC^W infiziert. An Tag -1 bzw. Tag +1 bezogen auf den Infektionszeitpunkt wurde einem Teil der Tiere 20μl/ Tier α-asialo GM1 i.v. injiziert. Die Gabe von 15μg αGalCer/ Tier an die Hälfte der Tiere erfolgte zum Zeitpunkt der Infektion. Drei Tage nach Infektion wurde die Milz entnommen, die Lymphozyten aufgereinigt (siehe 3.5.6) und mit je 2x10⁶ Zellen eine Oberflächenfärbung mit CD3 (1:100; FITC), CD1d (1:10; Dextramer-PE) und NKp46 (1:100; APC) durchgeführt. Die Zellen wurden zytofluorometrisch analysiert. A und B zeigen beispielhaft je eine Messung für die verschiedenen Gruppen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in C dargestellt. Es sind Einzeltiere dargestellt, die Mediane sind als horizontale Balken eingezeichnet.

4.3.2.2. Virusreplikation nach Aktivierung von iNKT-Zellen bei vorheriger NK- und/oder CD8 T-Zelldepletion

Wie in 4.3.1. dargestellt, führt die Aktivierung von iNKT-Zellen zu einer signifikanten Reduzierung der viralen Titer in Milz und Leber. Ob sich dies auf direkte Effekte von iNKT-Zellen oder auf transaktivierte CD8 T- bzw. NK-Zellen zurückführen lässt, sollte im Folgenden untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden NK-Zellen und/oder CD8 T-Zellen 24 Stunden vor Infektion depletiert (siehe 3.4.2.). Nach Infektion mCMV-WT.BAC^W wurden die iNKT-Zellen von jeweils der Hälfte der Tiere einer Gruppe mit α GalCer aktiviert (siehe 3.4.3.). 48 Stunden nach Infektion wurde zur Analyse der viralen Transkription (siehe 3.3.10.) der popliteale Lymphknoten (Abb. 4.13). entnommen oder drei Tage nach Infektion Milz, Lunge und Leber entnommen (Abb. 4.12) und der Virustiter mittels Virus-*Plaque*-Assay (siehe 3.2.2.1) analysiert. Abbildung 4.11 zeigt eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.

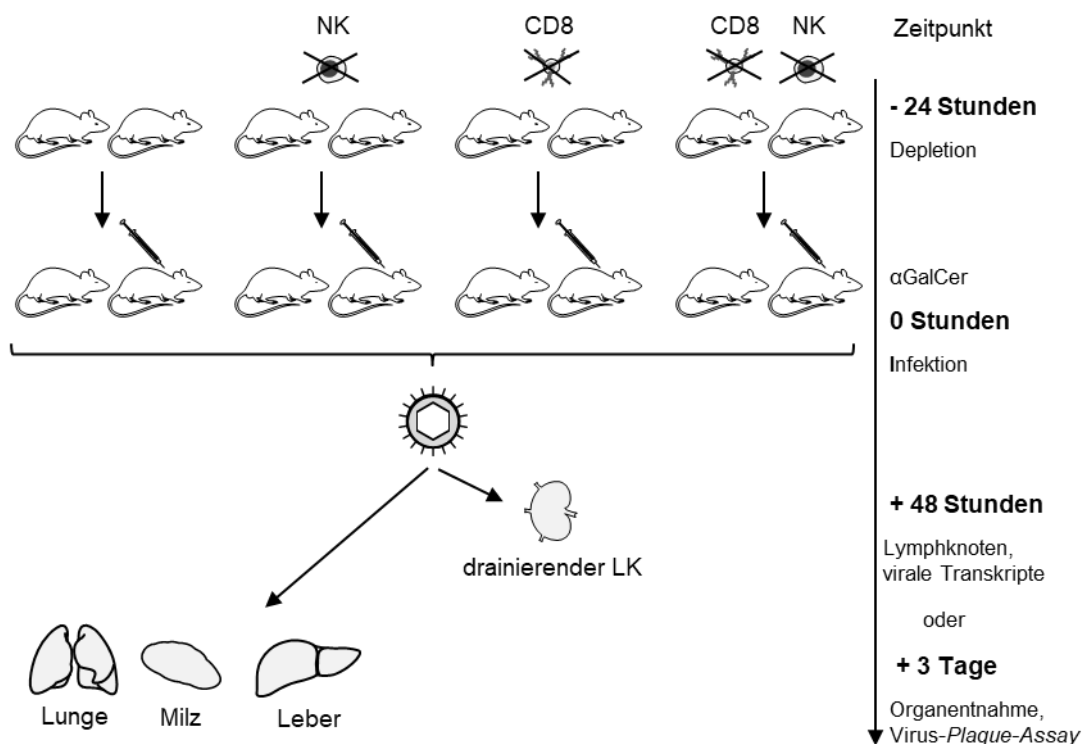


Abbildung 4.11: Experimentelles System zur Analyse des Einflusses von CD8 T- und NK-Zellen zur verbesserten mCMV-Kontrolle nach Aktivierung von iNKT-Zellen. BALB/c werden an Tag -1 entweder die NK-Zellen und/oder die CD8 T-Zellen depletiert, an Tag 0 alle Tiere mit mCMV-WT.BAC^W infiziert sowie einem Teil der Tiere zusätzlich α GalCer injiziert. Mittels qRT-PCR (3.3.10.) wird 48 Stunden nach Infektion die intranodale Genexpression des *ie1*- und *e1*-Gens qRT-PCR im poplitealen Lymphknoten bestimmt. Die Ermittlung des Virustiters in Milz, Lunge und Leber erfolgt an Tag 3 nach Infektion mithilfe des Virus-*Plaque*-Assay (3.2.2.1.).

Abbildung 4.12A zeigt die Ergebnisse in Milz, Lunge und Leber nach NK- bzw. CD8 T-Zelldepletion. In der Milz und der Leber führt die Aktivierung der iNKT-Zellen dabei unabhängig von der Depletion immer zu einer signifikant verbesserten Viruskontrolle.

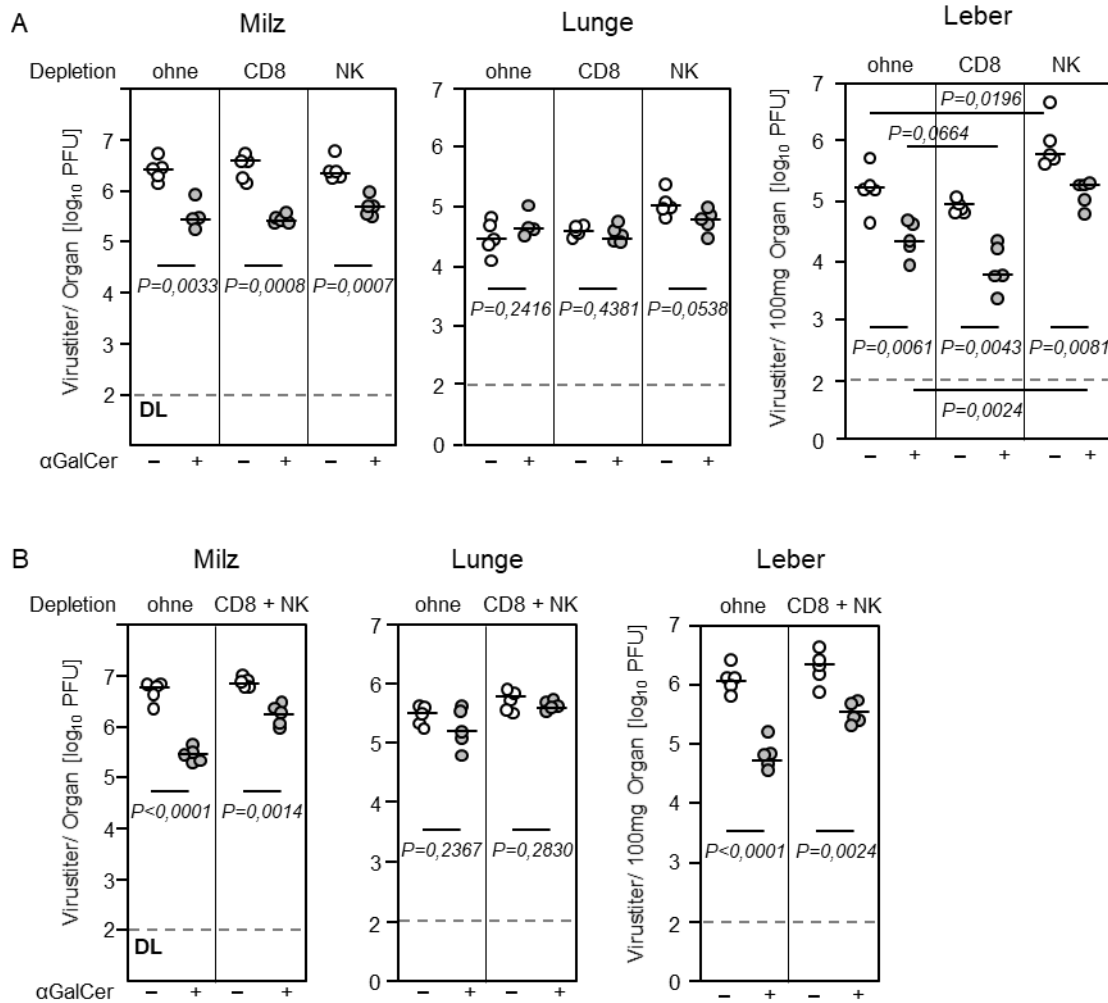


Abbildung 4.12: Virusreplikation nach vorheriger NK- und/oder CD8 T-Zelldepletion und Aktivierung der iNKT-Zellen. BALB/c wurden an Tag -1 bezogen auf den Infektionszeitpunkt die NK-Zellen oder die CD8 T-Zellen (A) oder beide Zelllinien (B) depletiert (siehe .3.4.2.). Als Kontrolle dienten nicht behandelte Tiere. An Tag 0 wurden die Tiere mit 2×10^5 PFU mCMV-WT.BAC^W i.v. infiziert. Zusätzlich wurden jeweils der Hälfte der Tiere der jeweiligen Gruppe $20 \mu\text{g}$ αGalCer intraperitoneal injiziert (grau). Die dargestellten Organe wurden an Tag 3 nach Infektion entnommen. Mittels eines *Virus-Plaque-Assays* wurde der Virustiter aus Milz, Lunge und einem Stück Leber ermittelt und für die Leber der Virustiter auf 100mg Organ berechnet (Podlech et al. 2002). Es sind Einzeltiere dargestellt, die Mediane sind als horizontale Balken eingezeichnet. Ein statistischer Unterschied zwischen zwei Gruppen wurde durch den *unpaired t-test* mit Welch Korrektur ungleicher Varianz berechnet. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das Detektionslimit.

In der Milz blieb der Unterschied unabhängig von der Depletion konstant (ca. 1 log-Stufe). Auch in der Leber war eine verbesserte Immunkontrolle nach Aktivierung der iNKT-Zellen um etwa 1 log-Stufe sowohl ohne Depletion als auch bei Depletion der CD8 T-Zellen detektierbar. Bei NK-Zelldepletion hingegen verbesserte sich die Kontrolle nur noch um etwa eine halbe log-Stufe nach Aktivierung der iNKT-Zellen. Dies lässt vermuten, dass zumindest ein Teil der verbesserten Kontrolle auf eine Transaktivierung der NK-Zellen zurückzuführen ist. Zusätzlich konnte in der Leber eine signifikant höhere virale Replikation nach NK-Zelldepletion (ohne αGalCer ; $P = 0,0196$) detektiert werden.

Für die Lunge konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Jedoch war bei NK-Zelldepletion die Verbesserung der Immunkontrolle nach iNKT-Aktivierung nur knapp nicht signifikant ($P=0,0538$).

Um auszuschließen, dass die verbesserte Immunkontrolle durch kompensatorische Effekte der jeweils nicht-depletierten Zelllinie initiiert wird, wurde in einem weiteren Versuch eine Doppeldepletion von NK- und CD8 T-Zellen durchgeführt (Abb. 4.12B). Auch in dieser Versuchsanordnung konnten sowohl für Milz als auch Leber signifikant reduzierte Virustiter nach Aktivierung der iNKT-Zellen detektiert werden. Die verringerte virale Replikation war jedoch nicht mehr so ausgeprägt. In der Lunge war weiterhin kein Unterschied messbar.

Der Versuch zeigt, dass iNKT-Zellen im BALB/c-Stamm nach Aktivierung einen eigenen Effekt auf die Viruskontrolle haben können und die verbesserte Immunkontrolle insbesondere in der Milz nicht ausschließlich über eine Transaktivierung der NK- bzw. CD8 T-Zellen zustande kommt. In der Leber hingegen ist die verbesserte Kontrolle zumindest teilweise auf eine Transaktivierung der NK-Zellen zurückzuführen. In der Lunge hat die Gabe von α GalCer hingegen keinen Effekt.

4.3.3. Virale Transkripte nach Aktivierung von iNKT-Zellen

Der Nachweis von viralen Transkripten kann als Surrogate für die Virusreplikation dienen. Daher sollte die in Abbildung 4.12 gezeigte, verbesserte Viruskontrolle nach Aktivierung der iNKT-Zellen auch zu einer reduzierten viralen Transkription im Lymphknoten führen. Um dies zu zeigen wurde erneut die intranodale Genexpression des *ie1*- und *e1*-Gens 48 Stunden nach Infektion mittels qRT-PCR (siehe 3.3.10.) bestimmt. BALB/c wurden intraplantar mit mCMV-WT.Smith infiziert sowie die iNKT-Zellen durch α GalCer aktiviert. Zusätzlich wurden einem Teil der Tiere CD8 T- bzw. NK-Zellen 24 Stunden vor Infektion depletiert (siehe auch Abb. 4.11). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.13 dargestellt.

Überraschenderweise konnte, trotz verbesserter Viruskontrolle nach Aktivierung der iNKT-Zellen, eine signifikant erhöhte virale Transkription im Lymphknoten sowohl für das IE1- als auch für das E1-Transkript festgestellt werden. Dieser Effekt zeigte sich auch nach Depletion der CD8 T-Zellen. Nach Depletion der NK-Zellen hingegen konnte der Unterschied in der viralen Transkription nach Aktivierung der iNKT-Zellen nicht nachgewiesen werden. Dabei fällt insbesondere für die IE1-Transkription auf, dass diese bereits bei alleiniger NK-Depletion gegenüber den nicht-depletierten Tieren signifikant erhöht ist. Möglicherweise wird hier der Einfluss aktivierter iNKT-Zellen auf die virale Transkription durch die bereits erhöhte virale Transkription nach Depletion der NK-Zellen

kaschiert. Die Aktivierung von iNKT-Zellen mittels α GalCer hat also einen deutlichen Einfluss auf die virale Transkription im peripheren Lymphknoten.

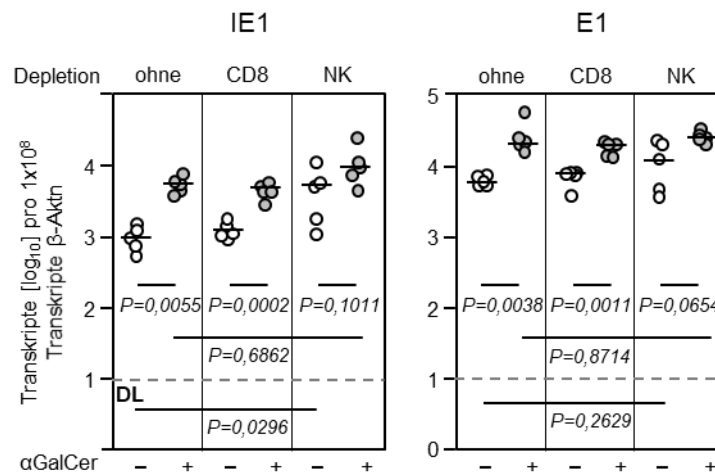


Abbildung 4.13: Virale Transkripte nach vorheriger NK- bzw. CD8 T-Zelldepletion und Aktivierung der iNKT-Zellen. BALB/c wurden 24 Stunden vor Infektion die NK-Zellen oder die CD8 T-Zellen depletiert (siehe 3.4.2). Als Kontrolle wurden einige Tiere nicht depletiert. Zum Zeitpunkt 0 wurden alle Tiere mit 1×10^5 PFU mCMV-WT.Smith intraplantar infiziert. Der Hälfte der Tiere wurde $20 \mu\text{g}$ α GalCer intraperitoneal injiziert (grau). 48 Stunden nach Infektion wurde die Gesamt-RNA aus dem poplitealen Lymphknoten isoliert und eine IE1- bzw. E1- bzw. β -Aktin-spezifische RT-qPCR durchgeführt (siehe 3.3.10.) (siehe auch Abb. 4.11). Es sind Einzeltiere dargestellt, die Mediane sind als horizontale Balken eingezeichnet. Ein statistischer Unterschied zwischen zwei Gruppen wurde durch den *unpaired t-test* mit Welch Korrektur ungleicher Varianz berechnet. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das Detektionslimit.

Ob diese erhöhte virale Transkription nach iNKT-Zellaktivierung auch über einen längeren Zeitraum erhalten bleibt, sollte im Folgenden untersucht werden. So wurde die virale IE1 und E1-Transkription im peripheren Lymphknoten nach Aktivierung der iNKT-Zellen auch nach 72 Stunden bestimmt. Zusätzlich wurden BALB/c.CD1d^{-/-}-Tiere mitgeführt (Abb. 4.14). Diese zeigten 48 Stunden nach Infektion keine Unterschiede in der viralen Transkription im Vergleich zum WT (Abb. 4.7).

72 Stunden nach Infektion konnte kein Unterschied mehr in der viralen Transkription zwischen iNKT-aktivierten und nicht-aktivierten Tieren festgestellt werden. Weiterhin war auch zu diesem späteren Zeitpunkt kein Unterschied in der viralen Transkription zwischen BALB/c und BALB/c.CD1d^{-/-}-Tieren zu detektieren. Daraus lässt sich folgern, dass die Aktivierung von iNKT-Zellen nur zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Infektion die virale Transkription im peripheren LK beeinflusst.

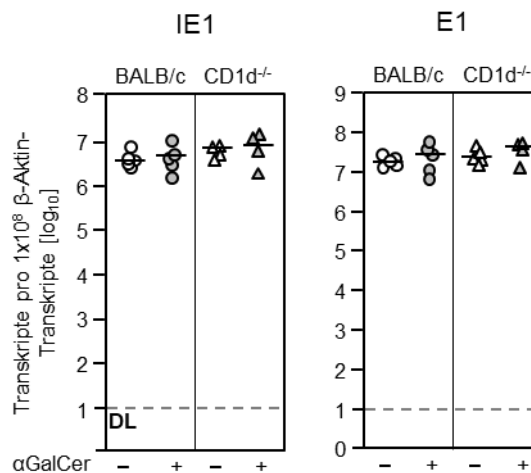


Abbildung 4.14: Virale Transkripte 72 Stunden nach Infektion und Aktivierung von iNKT-Zellen in BALB/c- und BALB-CD1d^{-/-}-Tieren. BALB/c- bzw. BALB-CD1d^{-/-}-Mäuse wurden mit 1×10^5 PFU mCMV-WT.BAC^W intraplantar infiziert. Der Hälfte der Tiere wurde 20 μ g aGalCer intraperitoneal injiziert (grau). 72 Stunden nach Infektion wurde die Gesamt-RNA aus dem poplitealen Lymphknoten isoliert und eine IE1 bzw. E1- bzw. β -Aktin spezifische RT-qPCR durchgeführt (siehe 3.3.10.). Es sind Einzeltiere dargestellt, die Mediane sind als horizontale Balken eingezeichnet. Ein statistischer Unterschied zwischen zwei Gruppen wurde durch den *unpaired t-test* mit Welch Korrektur ungleicher Varianz berechnet. P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das Detektionslimit.

Zusammenfassung: Es konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung der iNKT-Zellen zu einer relativen prozentualen Erhöhung sowohl der iNKT- als auch NK-Zellen führt. Zudem zeigte die Depletion von NK-Zellen keinen negativen Einfluss auf aktivierte iNKT-Zellen. Zusätzlich führt die Aktivierung der iNKT-Zellen drei Tage nach Infektion zu einer signifikant verbesserten Viruskontrolle in Milz und Leber, welche sowohl bei NK- als auch bei CD8 T- sowie Doppeldepletion erhalten bleibt. Die Ergebnisse legen nahe, dass iNKT-Zellen in der BALB/c-Maus einen eigenen Beitrag zur Viruskontrolle haben, wobei in der Leber die Transaktivierung der NK-Zellen zumindest teilweise für die verbesserte Viruskontrolle verantwortlich ist. Trotz der reduzierten Virusreplikation nach Aktivierung der iNKT-Zellen waren erhöhte virale Transkripte im drainierenden Lymphknoten 48 Stunden nach Infektion detektierbar. Die Depletion von NK-Zellen hob diesen Effekt auf. 72 Stunden nach Infektion war kein Unterschied mehr in der viralen Transkription zwischen iNKT-Zell-aktivierten und nicht-aktivierten Tieren detektierbar.

4.3.4. Einfluss von aktivierten iNKT- auf CD8 T-Zellen

In den vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von iNKT-Zellen zu reduzierten viralen Titern im immunkompetenten Tier (Abb. 4.9 und 4.12) sowie einer erhöhten viralen Transkription 48 Stunden nach Infektion im poplitealen Lymphknoten führt (Abb. 4.13). Wie bereits erwähnt, wird in verschiedenen Publikationen ein Zusammenhang zwischen erhöhter Viruslast und in der Folge einer dadurch vermehrten Bereitstellung viraler Antigene und einem verbesserten CD8 T-Zell*priming* hergestellt (Böhm et al. 2008b;

Andrews et al. 2010; Mitrović et al. 2012). Zudem konnte in B6.CD1d^{-/-} als auch für B6.β₂microglobulin^{-/-} eine leicht verbesserte CD8 T-Zellantwort im Vergleich zum B6.WT festgestellt werden (Abb. 4.5), obwohl in den (i)NKT-defizienten Tieren eine signifikant verringerte IE1-Transkription 48 Stunden nach Infektion detektiert wurde (Abb. 4.4). Weiterhin gelten CD8 T-Zellen in BALB/c-Mäusen als die Haupteffektorzellen während der akuten CMV-Infektion. Daher sollte im Folgenden das CD8 T-Zell*priming* nach iNKT-Zellaktivierung näher untersucht werden. Mithilfe eines IFN γ -ELISpot wurden dabei die Frequenzen Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen im drainierenden Lymphknoten 7 Tage nach Infektion bestimmt.

BALB/c-Tiere wurden mit mCMV-WT.Smith intraplantar infiziert und der Hälfte der Tiere zusätzlich α GalCer injiziert. 7 Tage nach Infektion wurde der popliteale Lymphknoten entnommen und die Lymphozyten isoliert. Als APC dienten P815-Zellen, welche exogen mit synthetischen Peptiden (IE1, m164, M105 und m145) beladen wurden (siehe 3.5.3.-3.5.5.).

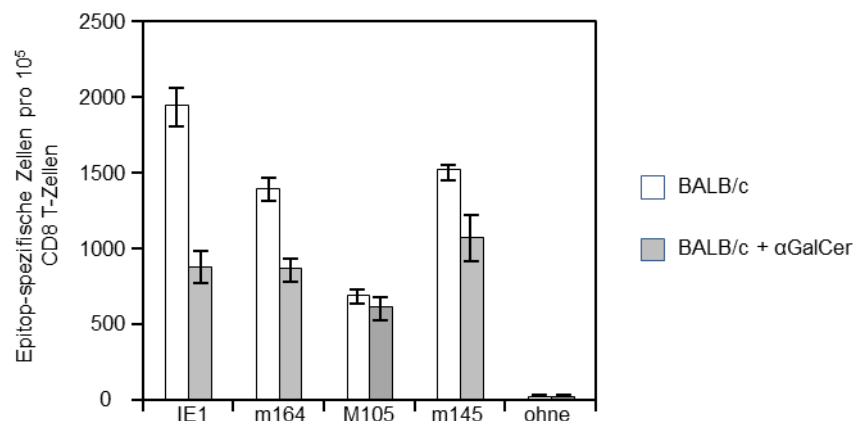


Abbildung 4.15: mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort in BALB/c. BALB/c wurden mit 1×10^5 PFU mCMV-WT.Smith intraplantar infiziert. Einem Teil der BALB/c-Tiere wurde $20 \mu\text{g}$ α GalCer intraperitoneal injiziert. 7 Tage nach Infektion wurde der popliteale Lymphknoten entnommen und die Lymphozyten aus einem Pool von je drei Tieren isoliert (siehe 3.5.3.). Nach einer immunmagnetischen Anreicherung der CD8 T-Zellen (siehe 3.5.4.) wurden diese als Effektorzellen im ELISpot-Assay eingesetzt (siehe 3.5.5.). Als APC wurden peptidbeladene P815-Zellen (IE1, m164, M105 und m145) eingesetzt. Mittels Regressionsanalyse wurden die Frequenzen der IFN γ -sezernierenden Zellen errechnet. Die Balken kennzeichnen den Bereich der 95% Konfidenzintervalle.

Wie in Abbildung 4.15 dargestellt, führt die Aktivierung von iNKT-Zellen überraschenderweise zu deutlich reduzierten mCMV-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen im BALB/c-Stamm. Dies konnte für alle getesteten Peptidspezifitäten in drei unabhängigen Versuchen bestätigt werden. Während das Fehlen von iNKT-Zellen also keinen Einfluss auf das CD8 T-Zell*priming* hat (Abb. 4.8), führt die Gabe von α GalCer, trotz erhöhter Bereitstellung von viralen Transkripten im Lymphknoten (Abb. 4.13), zu einer Reduktion der mCMV-spezifischen T-Zellfrequenzen.

Zusammenfassung: Nach Aktivierung der iNKT-Zellen wurden für verschiedene virale Epitope reduzierte CD8 T-Zellfrequenzen detektiert. Die Aktivierung von iNKT-Zellen führt trotz erhöhter viraler Transkription (Abb. 4.13), zu einer reduzierten CD8 T-Zellantwort.

4.3.5. Analyse der Zytokinkonzentration im Serum

In den vorherigen Versuchen konnte ein positiver Einfluss von aktivierten iNKT-Zellen auf die virale Replikation in der BALB/c-Maus detektiert werden. Wie bereits beschrieben (1.4.6.), regulieren iNKT-Zellen zahlreiche Effektorfunktionen über Zytokine. So führt die Gabe von α GalCer zu einem frühen Anstieg von IL-4 im Serum gefolgt von einer, mindestens drei Tage anhaltenden, Ausschüttung von IFN γ (Crowe et al. 2003; Oki et al. 2004; Bendelac et al. 2007). Daher sollte im Folgenden zunächst eine Analyse der IFN γ -Konzentration im Serum von BALB/c-Tieren nach mCMV-Infektion und zusätzlicher Aktivierung der iNKT-Zellen untersucht werden.

4.3.5.1. IFN γ -Ausschüttung nach iNKT-Aktivierung und mCMV-Infektion

Reilly et al. konnten zeigen, dass die Gabe von α GalCer bereits 4 Stunden nach Injektion zu einem Anstieg von IFN γ und IL-4 sowie weiterer Zytokine im Serum von C57BL/6-Mäusen führt. Eine zeitgleiche Gabe von α GalCer mit einer mCMV-Infektion beeinflusst jedoch die Zytokinproduktion so, dass IFN γ 38 Stunden nach Infektion deutlich reduziert bis hin zu nicht detektierbar war (Reilly et al. 2012). Daher wurde in dieser Arbeit die Serumkonzentration von IFN γ nach Aktivierung der iNKT-Zellen in BALB/c mittels IFN γ -ELISA bestimmt (siehe 3.5.8.). Hierbei wurden BALB/c und BALB/c.CD1d^{-/-} mit und ohne Infektion sowie mit und ohne iNKT-Aktivierung verglichen. Die Serumgewinnung aus jeweils 3-4 Mäusen erfolgte 0, 24 und 36 Stunden nach Infektion. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.16 dargestellt.

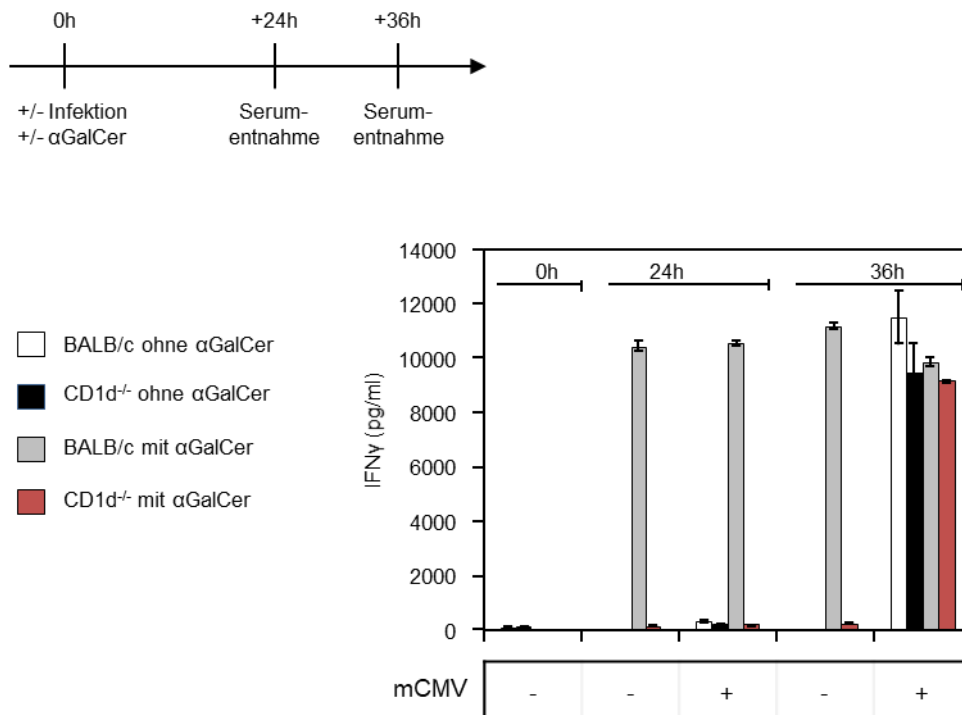


Abbildung 4.16: Analyse der IFN γ -Konzentration. Pro Gruppe wurden je 3 BALB/c- bzw. BALB/c.CD1d^{-/-}-Tiere zum Zeitpunkt 0 mit 1x10⁶PFU mCMV-WT.BAC^W i.v. infiziert und/oder 15 μ g α GalCer intraperitoneal injiziert. Die Blutentnahme erfolgte 24 und 36 Stunden nach Infektion. Das Serum wurde isoliert (siehe 3.4.7.), aus den drei Tieren gepoolt und die IFN γ -Konzentration mithilfe des *Mouse IFN γ ELISA Kit* von *Thermo Scientific* nach Herstellerangaben in Duplikaten detektiert. Die Messung erfolgte im Mikroplatten Photometer Multiskan FC Thermo Scientific, die Datenanalyse mithilfe von *Microsoft Excel*.

Wie erwartet, führte die Aktivierung von iNKT-Zellen in BALB/c zu einer Erhöhung der IFN γ -Konzentration in Serum 24 Stunden und 36 Stunden nach α GalCer-Injektion. Bei alleiniger mCMV-Infektion konnte sowohl in BALB/c- als auch in BALB/c.CD1d^{-/-}-Tieren 36 Stunden nach Infektion eine Induktion von IFN γ nachgewiesen werden. BALB/c.CD1d^{-/-} zeigten dabei eine leicht verringerte IFN γ -Serumkonzentration im Vergleich zu BALB/c. Die Kombination von α GalCer und mCMV-Infektion war vergleichbar zur alleinigen Gabe von α GalCer, wobei die Serumkonzentration von IFN γ in BALB/c nach 36 Stunden auf dem Niveau von BALB/c.CD1d^{-/-}-Tieren lag. Somit zeigte sich auch hier eine gewisse Reduktion der IFN γ -Induktion 36 Stunden nach Infektion und Gabe von α GalCer. Diese war jedoch nicht so deutlich wie in der von Reilly et al. analysierten C57BL/6-Maus, in der zu diesem Zeitpunkt nahezu kein IFN γ mehr detektiert werden konnte (Reilly et al. 2012).

4.3.5.2. Zytokinausschüttung nach iNKT-Aktivierung und mCMV-Infektion

Nach mCMV-Infektion und iNKT-Aktivierung erfolgt in BALB/c eine frühere, stärkere IFN γ -Ausschüttung als nach mCMV-Infektion alleine (Abb. 4.16). Zudem ist beschrieben, dass die mCMV-Infektion die Produktion von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (IL-12p70, IFN γ , TNF α , MIP1 α , IL-6, MCP-1), welche zwischen 24 und 40 Stunden nach Infektion im Blut einen Höhepunkt erreichen, fördert (Krug et al. 2004). Weiterhin konnte

bereits gezeigt werden, dass eine zeitgleiche mCMV-Infektion und Applikation von α GalCer die Zytokinproduktion dahingehen beeinflusst, dass IFN γ , IL12p70, IL-6, TNF α , MCP-1 und MIP1 α 38 Stunden nach Infektion im Serum der C57BL/6-Maus deutlich reduziert bis hin zu nicht messbar waren. IL-4, IL-10, IL-21, IL-17A und GM-CSF waren ebenfalls nicht mehr detektierbar (Reilly et al. 2012).

Daher sollten im Folgenden die Zytokinlevel im Serum der BALB/c-Maus untersucht werden. Um ausschließlich den Effekt von iNKT-Zellen auf die Zytokinlevel der BALB/c Maus zu analysieren, wurden NK-Zellen und CD8 T-Zellen 24 Stunden vor Infektion depletiert. Anschließend wurden die Tiere mit mCMV-WT.BAC^W infiziert und die iNKT-Zellen durch α GalCer aktiviert. Auf diese Weise sollten insbesondere durch iNKT-Zellen induzierte Zytokine während der mCMV-Infektion erfasst werden. 24 und 36 Stunden nach Infektion wurde Serum isoliert (3.4.7.) und im *mouse Cytokine Array Panel A* von R&D Systems die Serumzytokinlevel relativ quantifiziert (siehe 3.5.7.).

Deutlich zu erkennen ist in Abbildung 4.17, dass die Aktivierung der iNKT-Zellen, einen starken Einfluss auf verschiedene Zytokine hat. Dabei führt die Aktivierung der iNKT-Zellen bei den meisten Zytokinen zu einem früheren Auftreten und/oder einer erhöhten Konzentration gegenüber dem Serumlevel von Tieren, die kein α GalCer erhalten hatten. Der stärkste Effekt trat dabei für die Zytokine CXCL10, CCL2-MCP1, CCL12-MCP5, MIG-CXCL9 und Timp-1 auf.

Auch in diesem Assay konnte gezeigt werden, dass die IFN γ -Sekretion bei zusätzlicher iNKT-Zellaktivierung früher einsetzt und verstärkt ist. Interessanterweise wurde hier jedoch 36 Stunden nach Infektion und Aktivierung der iNKT-Zellen eine sehr deutliche Erhöhung des IFN γ -Levels im Serum detektiert. Im Vergleich dazu konnte im vorherigen Versuch ohne Depletion der NK- und CD8 T-Zellen eine leichte Reduktion 36 Stunden nach Infektion und α GalCer-Injektion detektiert werden (Abb. 4.16).

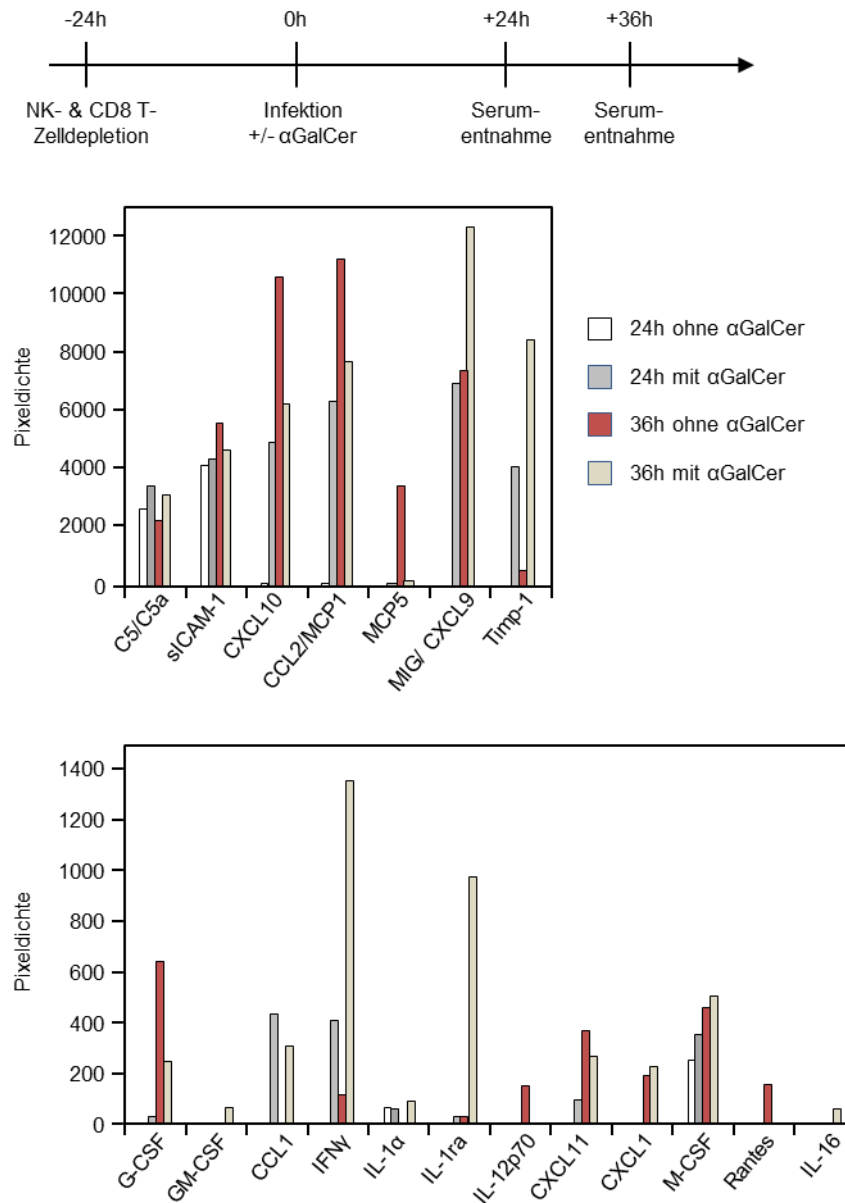


Abbildung 4.17: Analyse der Serumzytokine in BALB/c. BALB/c wurden 24 Stunden vor Infektion die NK- und CD8 T-Zellen (20 μ l α -asialo GM1 + 1,2mg anti-CD8 *ascites* Antikörper in 500 μ l PBS/Tier) depletiert. Die Infektion erfolgte mit 1x10⁶PFU mCMV-WT.BAC^W i.v. in die Schwanzvene. Zusätzlich wurden jeweils der Hälfte der Tiere der jeweiligen Gruppe 20 μ g α GalCer intraperitoneal injiziert. Die Blutentnahme erfolgte 24 und 36 Stunden nach Infektion. Das Serum wurde isoliert (siehe 3.4.7.) und die Zytokine mithilfe des *mouse Cytokine Array Panel A* von R&D Systems nach Herstellerangaben detektiert. Die Datenerfassung erfolgte mithilfe der Detektion im ChemiDoc XRS+ (BioRad), die anschließende relative Quantifizierung der einzelnen Spots mit der Software *Image J*.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Serumkonzentration der Zytokine C5/C5 α , M-CSF, IFN γ , MIG, Timp-1 und IL-1 α 24 und 36 Stunden nach Infektion deutlich gegenüber den nicht- α GalCer behandelten Tieren erhöht war. Die Expression von G-CSF, CXCL10, CXCL11, CCL2-MCP1 und CCL12-MCP5 war in α GalCer-behandelten Tieren bereits 24 Stunden nach Infektion induziert, nahm aber anschließend im Vergleich zu den nicht-behandelten Tieren 36 Stunden nach Infektion ab. Einige Zytokine treten ausschließlich nach zusätzlicher Aktivierung der iNKT-Zellen auf, wie GM-CSF, CCL1 und

IL-16, Rantes und IL12p20 treten hingegen nur bei nicht-behandelten Tieren 36 Stunden nach Infektion auf. Die Serumkonzentration von sICAM-1 ist 36 Stunden nach Infektion in den iNKT-Zellaktivierten Tieren leicht verringert. Bei IL-1 α führt die Aktivierung zu einer anhaltenden Serumkonzentration, während ohne α GalCer-Injektion IL-1 α nicht detektierbar war.

In Tabelle 4.1 sind die wichtigsten Funktionen der beeinflussten Zytokine aufgeführt.

Zytokin	Funktion	Referenzen
C5/C5 α	ist eine Komponente des Komplementsystems. Stimuliert und aktiviert Makrophagen und neutrophile Granulozyten.	(Ward 2009)
CCL1 (TCA3)	wird von aktivierten T _H 2-Zellen sekretiert und dient als Chemoattraktant von Monozyten, NK-, B-Zellen und DCs.	(Qu et al. 2004; Gombert et al. 2005)
CCL2 (MCP1)	wird in zahlreichen Organen als Antwort auf eine Infektion produziert und ist an der Entzündungsreaktion beteiligt. Induziert unter anderem den Austritt von Monozyten aus dem Knochenmark und erhöht damit die Verfügbarkeit von Vorläuferzellen für inflammatorische DCs und Makrophagen.	(Serbina und Pamer 2006; Tsou et al. 2007)
CCL12 (MCP5)	ist an Embryogenese, Hämatopoese, Angiogenese und Inflammation beteiligt. Aktiviert die meisten Leukozyten und fördert deren Migration ins Gewebe.	(Janssens et al. 2018)
CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP10) CXCL11 (ITAC)	diese drei verwandten Chemokine sind Liganden für die 2 Isoformen des Chemokinrezeptors CXCR3, welcher auf aktivierten T _H 1-, CD8- und NK-Zellen exprimiert wird. Sie induzieren insbesondere eine T _H 1-Antwort und Chemoattraktion von T-Zellen.	(Balashov et al. 1999; Hancock et al. 2000; Padovan et al. 2002; Lasagni et al. 2003; Qian et al. 2007)
GM-CSF	wurde ursprünglich als hämatopoetischer Wachstumsfaktor beschrieben. Wird von Epithel-, Endothelzellen, Fibroblasten, Stroma- und hämatopoetischen Zellen produziert. Fördert die Differenzierung von Vorläuferzellen des Knochenmarks in Granulozyten, DCs und Makrophagen. Bei Entzündung dient GM-CSF als Kommunikationsleitung zwischen gewebeintretende Lymphozyten und myeloide Zellen.	(Becher et al. 2016)
G-CSF	regt insbesondere die Bildung von Granulozyten an.	(Metcalf und Nicola 1983)
IFN γ	wird von APCs, sowie NK- und T-Zellen sekretiert. Die Produktion ist insbesondere abhängig von IL-12 und IL-18. Führt zur Hochregulation von MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche. Weitere Effekte sind die Induktion von Untereinheiten des Immunoproteasom und die Verbesserung der Präsentation antigener Peptide. Antivirale Effekte werden vor allem über die Aktivierung der Protein-Kinase-R (PKR) ausgelöst, welche unter anderem die virale Proteinsynthese inhibiert. Zusätzlich hat IFN γ antiproliferative und apoptotische Effekte und ist an antimikrobiellen Mechanismen, der Immunmodulation, T _H -Entwicklung und Leukozytenbewegung beteiligt. Induziert die Gen-/Proteinexpression von IL-12, CXCL10, CCL2, CXCL9, MIP-1 α , MIP-1 β (CCL3, CCL4), RANTES, ICAM-1, B7.2.	(Schroder et al. 2004)

Zytokin	Funktion	Referenzen
IL-1 α	wird konstitutiv in zahlreichen Geweben exprimiert. Die Expression steigt als Antwort auf Wachstumsfaktoren, proinflammatorischen oder stress-assoziierten Stimuli. Es kommt zur Zytokinausschüttung (z.B. IL-6, CXCL1/2), Aktivierung anderer Immunzellen und Chemoattraktion von Neutrophilen, Makrophagen und Leukozyten zum Ort der Entzündung. IL-1 α -abhängige Entzündung ist für die Elimination von virusinfizierten Zellen notwendig.	(Di Paolo et al. 2009; Garlanda et al. 2013; Di Paolo und Shayakhmetov 2016)
IL-1ra	antiinflammatorisches Zytokin, welches durch Bindung an den IL-1-Rezeptor als ein Inhibitor von IL-1 wirkt und so dessen inflammatorischen Effekte reduziert. Wird als Gegenreaktion zu einer überschießenden Immunreaktion ausgelöst.	(Volarevic et al. 2010)
IL12p70	produziert von Monozyten, Makrophagen und DCs als Antwort auf eine Infektion. Resultiert in der Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen und ist notwendig für die IFN γ -Sekretion.	(Gee et al. 2009)
IL-16	ist ein Ligand für CD4 oder CD9. Dient als Modulator für die CD4 T-Zell-Rekrutierung und -Aktivierung zum inflammatorischen Gewebe. Weitere Funktionen im T-Zellwachstum und Induktion von Zellbeweglichkeit.	(Cruikshank et al. 2000; Richmond et al. 2014)
M-CSF	stimuliert und aktiviert Makrophagen.	(Becher et al. 2016)
Rantes (CCL5)	rekrutiert Leukozyten zum inflammatorischen Gewebe und induziert die Leukozytenmigration. Interagiert neben den klassischen lymphoiden Zellen auch mit Basophilen, Eosinophilen, NK-Zellen, DCs, Mastzellen uvm. Während der Entzündung vor allem von CD8 T-Zellen Epithelzellen, Fibroblasten und Thrombozyten produziert.	(Schall 1991; Appay und Rowland-Jones 2001; Meurer et al. 1993)
sICAM-1	repräsentiert die zirkulierende Form von ICAM, welches konstitutiv oder induziert auf der Zelloberfläche verschiedener Zelllinien exprimiert wird. Die Interaktion zwischen ICAM-1 und LFA-1 auf Endothelzellen erleichtert die Leukozytenadhäsion und Migration durch das Endothelium.	(Witkowska und Borawska 2004)
TIMP-1	hemmt die Degradation der Matrix und stimuliert das Zellwachstum verschiedener Zelltypen. Hemmt zusätzlich die Apoptose in B-Zellen.	(Guedez et al. 1998; Gaudin et al. 2000),

Tabelle 4.1: Übersicht über die Funktionen der iNKT-Zell-induzierten Zytokine.

Die veränderten Expressionsmuster der gemessenen Zytokine lassen sich dabei zumindest teilweise auf die frühere und verstärkte IFN γ -Ausschüttung nach iNKT-Aktivierung zurückführen, da IFN γ die Sekretion von weiteren Zytokinen (u.a. IL-12, CCL2, CXCL9, CXCL10, MIP-1 α , MIP-1 β (CCL3, CCL4), RANTES, ICAM-1, B7.) fördert.

Zusammenfassung: Nach Aktivierung der iNKT-Zellen können zahlreiche Zytokine bereits 24 Stunden nach Infektion im Serum detektiert werden. Zudem ist ihre Serumkonzentration gegenüber Tieren, die kein α GalCer erhalten haben, zum Teil erhöht. Die durch α GalCer-aktivierte iNKT-Zellen sekretieren dabei zahlreiche Zytokine, welche das Komplementsystem sowie T_H1-, T_H2, CD8 T- und NK-Zellen sowie zahlreiche andere Zelltypen aktivieren und rekrutieren können. Der stärkste Effekt trat für die Zytokine

CXCL10, CCL2-MCP1, CCL12-MCP5, MIG-CXCL9 und Timp-1 auf. Weiterhin führt die Aktivierung von iNKT-Zellen in BALB/c zu einer früheren erhöhten IFN γ -Ausschüttung. Für CD1d^{-/-}-Tiere konnte eine leicht verringerte IFN γ -Serumkonzentration im Vergleich zur BALB/c-Maus gemessen werden. Die Aktivierung von iNKT-Zellen in mCMV-infizierten BALB/c führte zudem nach 36 Stunden zu einer leichten Reduktion der IFN γ -Konzentration im Serum auf das Niveau der CD1d^{-/-}-Tiere bzw. des 24 Stunden-Wertes. Bei zusätzlicher Depletion der NK- und CD8 T-Zellen kam es hingegen 36 Stunden nach Infektion und α GalCer-Gabe zu einer sehr deutlichen, weiteren Erhöhung des IFN γ -Levels im Serum.

4.3.6. Einfluss aktivierter iNKT-Zellen in der Δ vRAP-Infektion

Bisher konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Aktivierung von iNKT-Zellen zu einer verbesserten mCMV.WT-Kontrolle in der immunkompetenten BALB/c-Maus (Abb. 4.9) sowie zu erhöhten viralen Transkripten 48 Stunden nach Infektion im poplitealen Lymphknoten führt (Abb. 4.13). Die bisherigen Depletionsversuche (Abb. 4.12) zeigten, dass insbesondere die NK-Zellkontrolle von der Aktivierung der iNKT-Zellen profitiert. Die Analyse der T-Zellfrequenzen zeigte hingegen eine reduzierte CD8 T-Zellantwort für alle getesteten Peptidspezifitäten (Abb. 4.15). Letzteres könnte bedeuten, dass iNKT-Zellen einen negativen Einfluss auf die CD8 T-Zellantwort nehmen. Daher sollte im Folgenden die Infektion mit der Virusrekombinante mCMV- Δ vRAP nach Aktivierung der iNKT-Zellen näher untersucht werden. BALB/c-Tiere zeigen bei Infektion mit dieser Virusrekombinante, in welcher die drei Immunevasine m04, m06 und m152 nicht mehr exprimiert werden, eine verbesserte CD8 T-Zellkontrolle, was in niedrigeren Organvirustitern resultiert (Fink et al. 2012).

4.3.6.1. Immunkontrolle nach Δ vRAP-Infektion und Aktivierung der iNKT-Zellen

Zur näheren Analyse des Einflusses von iNKT-Zellen auf die T-Zellantwort wurde in dem unter 4.3.2.2. gezeigten Versuch zusätzlich eine Gruppe von BALB/c mit mCMV- Δ vRAP infiziert (Abb. 4.12A). Dabei wurden in der Hälfte der Tiere die iNKT-Zellen durch intraperitoneale Gabe von α GalCer aktiviert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.18 dargestellt.

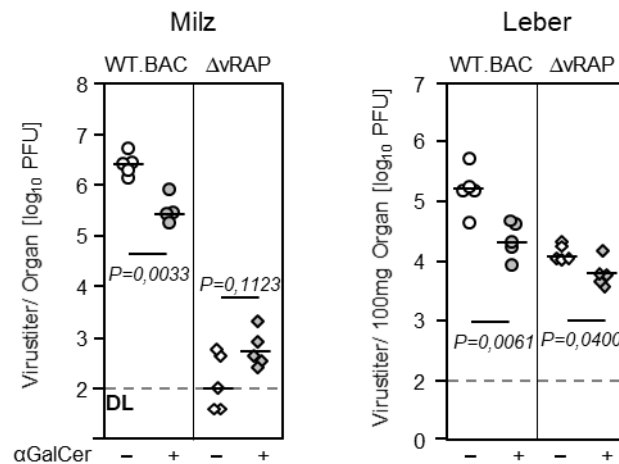


Abbildung 4.18: Organvirustiter nach Infektion mit mCMV-WT.BAC^W bzw. mCMV-ΔvRAP bei vorheriger Aktivierung der iNKT-Zellen. BALB/c wurden mit 2×10^5 PFU mCMV-WT.BAC^W (○) bzw. mCMV-ΔvRAP (◊) i.v. in die Schwanzvene infiziert. Zusätzlich wurden jeweils der Hälfte der Tiere der jeweiligen Gruppe 20 μg αGalCer intraperitoneal injiziert (grau). Die dargestellten Organe wurden an Tag 3 nach Infektion entnommen. Mittels eines Virus-Plaques-Assays wurde der Virustiter aus Milz und einem Stück Leber ermittelt und für die Leber der Virustiter auf 100mg Organ berechnet (Podlech et al. 2002). Es sind Einzeltiere dargestellt, die Mediane sind als horizontale Balken eingezeichnet. Ein statistischer Unterschied zwischen zwei Gruppen wurde durch den *unpaired t-test* mit Welch Korrektur ungleicher Varianz berechnet. P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das Detektionslimit.

Während es nach mCMV-WT.BAC^W-Infektion in αGalCer-behandelten Tieren zu einem signifikant erniedrigten Virustiter in der Milz kam, wurde dieser Effekt bei Infektion mit mCMV-ΔvRAP aufgehoben. In der Leber hingegen war sowohl bei WT.BAC- als auch bei ΔvRAP-Infektion eine verbesserte Viruskontrolle nach iNKT-Aktivierung zu erkennen. Während der Unterschied bei WT.BAC-Infektion jedoch knapp 1 log-Stufe betrug (P=0,0061), war dieser Unterschied in der ΔvRAP-Infektion auf > 0,5 log-Stufe gesunken (P=0,04). So kommt es hier zu einer Reduktion des therapeutischen Effektes von αGalCer.

Die Aufhebung der positiven Wirkung von aktivierten iNKT-Zellen in der Milz könnte dabei auf die, durch das Fehlen der vRAPs verbesserte, CD8 T-Zellkontrolle zurückzuführen sein, welche einen möglichen αGalCer-Effekt kaschiert. Da die Viruskontrolle durch das Nichtvorhandensein der Immunevasine in dieser Virusmutante sehr effizient ist, könnte daher kein zusätzlicher Beitrag von aktivierten iNKT-Zellen detektierbar sein. Eine Depletion der CD8 T-Zellen sollte daher den therapeutischen Effekt von aktivierten iNKT-Zellen wieder herstellen.

4.3.6.2. Analyse der mCMV-ΔvRAP-Infektion in CD1d^{-/-}-Tieren sowie nach Depletion von CD8 T- und NK-Zellen

Die Frage, ob iNKT-Zellen in der ΔvRAP-Infektion insbesondere in der Milz einen Beitrag leisten oder ob die Aufhebung des αGalCer-Effektes lediglich auf die effizientere CD8 T-Zellkontrolle zurückzuführen ist, sollte im Folgenden überprüft werden. Zu diesem Zweck

wurde der in Abbildung 4.11 dargestellte Versuch analog mit Infektion von mCMV- Δ vRAP durchgeführt. Dabei wurden CD8 T-Zellen sowie NK-Zellen depletiert, um zu ermitteln, ob durch den Wegfall der sehr effizienten CD8 T-Zellkontrolle, der Einfluss von aktivierten iNKT-Zellen im immunkompetenten Tier auch nach mCMV- Δ vRAP-Infektion wieder detektierbar wird. Weiterhin wurden BALB/c.CD1d^{-/-}-Tiere mitgeführt. Diese zeigten bei mCMV.WT-Infektion eine weitestgehend vergleichbare Viruskontrolle zu BALB/c.WT (Abb. 4.6).

Der in Abbildung 4.19 dargestellte Versuch bestätigte, dass die Infektion mit mCMV- Δ vRAP den Effekt von α GalCer in der Milz aufhebt. Zudem war der Virustiter nach CD8 T-Zelldepletion im Vergleich zu den nicht-depletierten Tieren mit knapp 2 log-Stufen deutlich erhöht. Dies zeigt, dass CD8 T-Zellen einen signifikanten Anteil an der Kontrolle der Δ vRAP-Infektion haben. Bei zusätzlicher Aktivierung der iNKT-Zellen war zwar weiterhin ein erhöhter Virustiter nach CD8 T-Zelldepletion messbar, dieser war jedoch mit $< 0,5$ log-Stufe nicht so ausgeprägt im Vergleich zur nicht-iNKT-aktivierten Gruppe. Weiterhin ist erkennbar, dass auch NK-Zellen einen Beitrag zur frühen Kontrolle der Δ vRAP-Infektion leisten, da der Organvirustiter ohne Aktivierung der iNKT-Zellen bei NK-Depletion im Vergleich zu nicht-depletierten Tieren in der Milz signifikant erhöht war. Weiterhin konnte die verbesserte Viruskontrolle nach Aktivierung der iNKT-Zellen zwar nach Depletion der CD8 T-Zellen (knapp 2 log-Stufen) wiederhergestellt werden, jedoch nicht nach NK-Depletion ($P=0,3868$). Auch nach Doppeldepletion war ein positiver Einfluss der aktivierten iNKT-Zellen erkennbar (< 1 log-Stufe), jedoch nicht so deutlich wie bei alleiniger CD8 T-Zelldepletion. Dies zeigt, dass der therapeutische Effekt von α GalCer in der mCMV- Δ vRAP-Infektion in der Milz vermutlich durch die sehr effiziente CD8 T-Zellkontrolle kaschiert wird. Der Vergleich des Virustiters in der Milz von BALB/c.CD1d^{-/-}-Tieren mit BALB/c.WT ergab eine signifikante Erhöhung nach Δ vRAP-Infektion. Dies ist insofern interessant, da bei Infektion mit mCMV.WT.BAC keine signifikante Verschlechterung der Viruskontrolle in BALB/c.CD1d^{-/-} festgestellt werden konnte (Abb. 4.6).

In der Leber konnte für alle Gruppen ein signifikanter Unterschied hin zu einer verbesserten Viruskontrolle bei iNKT-Aktivierung festgestellt werden. Während dieser jedoch ohne Depletion bei < 1 log-Stufe lag, reduzierte sich dieser auf $< 0,5$ log-Stufe bei zusätzlicher Depletion der NK- und/oder CD8 T-Zellen. Weiterhin konnte in der Leber im Gegensatz zur Milz kein signifikanter Unterschied in der Viruskontrolle zwischen BALB/c.CD1d^{-/-}- und BALB/c-Tieren festgestellt werden. In der Lunge war in keinem Vergleich ein Unterschied zu detektieren.

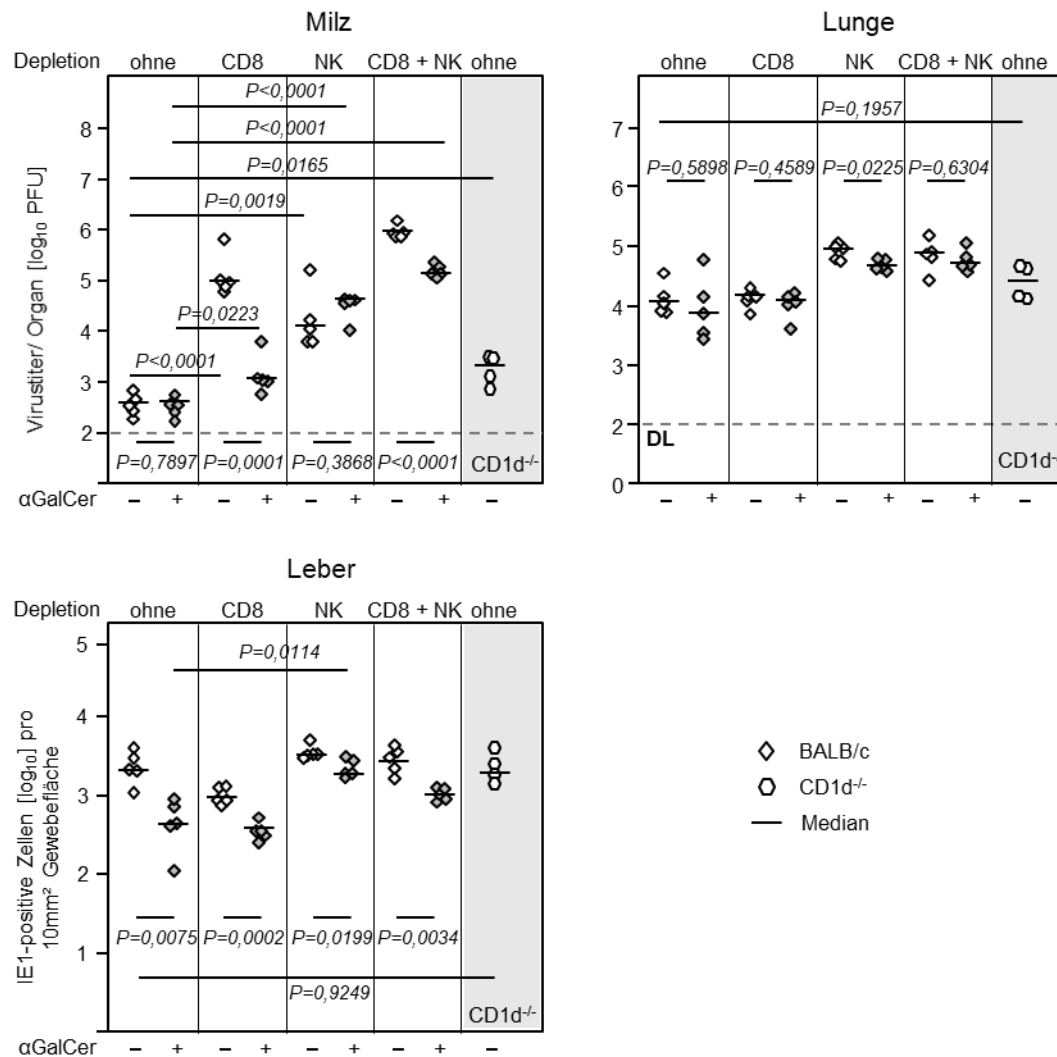


Abbildung 4.19: Virale Replikation nach Infektion mit mCMV- Δ vRAP und zusätzlicher Aktivierung der iNKT-Zellen. BALB/c wurden 24 Stunden vor Infektion die NK-Zellen oder die CD8 T-Zellen oder beide Zelllinien depletiert (siehe 3.4.2). Als Kontrolle dienten nicht behandelte Tiere. Zusätzlich wurden BALB/c.CD1d^{-/-} mitgeführt. An Tag 0 wurden die Tiere mit 2×10^5 PFU mCMV- Δ vRAP i.v. infiziert. Zusätzlich wurden jeweils der Hälfte der Tiere der jeweiligen Gruppe $20 \mu\text{g}$ α GalCer intraperitoneal injiziert (grau). Die dargestellten Organe wurden an Tag 3 nach Infektion entnommen. Mittels eines Virus-Plaques-Assays wurde der Virustiter aus Milz- und Lungenhomogenaten ermittelt (Podlech et al. 2002). Für die Leber wurde eine Immunhistochemie gegen das virale mCMV-Protein IE1 durchgeführt. Die Zahl der IE1-positiven Zellen ist pro 10mm^2 Gewebefläche angegeben (Podlech et al. 2002). Es sind Einzeltiere dargestellt, die Mediane sind als horizontale Balken eingezeichnet. Ein statistischer Unterschied zwischen zwei Gruppen wurde durch den *unpaired t-test* mit Welch Korrektur ungleicher Varianz berechnet. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das Detektionslimit.

Zusammenfassung: Die Aktivierung von iNKT-Zellen in der BALB/c-Maus, führte nach Infektion mit mCMV- Δ vRAP zu keiner verbesserten Viruskontrolle in der Milz. Erst nach Depletion der CD8 T-Zellen war der positive Effekt von aktivierten iNKT-Zellen wieder sichtbar. Bei NK-Depletion konnte hingegen weiterhin keine verbesserte Kontrolle detektiert werden. Dies bestätigt die Hypothese, dass der therapeutische Effekt von α GalCer in der mCMV- Δ vRAP-Infektion vermutlich durch die sehr effiziente CD8 T-Zellkontrolle kaschiert wird. In der Leber konnte für alle Gruppen ein signifikanter Unterschied hin zu einer verbesserten Viruskontrolle bei iNKT-Aktivierung festgestellt werden. In der Lunge wurde

in keinem *Setting* ein Unterschied bei Aktivierung der iNKT-Zellen detektiert. Weiterhin konnte in der Milz, jedoch nicht in Leber oder Lunge eine verbesserte Viruskontrolle von BALB/c-Mäusen im Vergleich zu BALB/c.CD1d^{-/-}-Tieren festgestellt werden.

4.4. iNKT-Immunevasion von mCMV

Alle CMVs sind dafür bekannt, die Immunantwort ihres Wirtes zu modulieren (Reddehase 2002). In den vergangenen Jahren standen dabei insbesondere Immunevasionstrategien von NK- und CD8 T-Zellen im Fokus der Forschung. Die Rolle von iNKT-Zellen in der mCMV-Infektion ist demgegenüber bisher nur wenig untersucht. (siehe auch 1.4.2.4.). Da iNKT-Zellen jedoch sowohl Eigenschaften von T- als auch von NK-Zellen aufweisen und ihre Aktivierung unter anderem über das MHC-I-homologe Molekül CD1d erfolgt (Birkholz und Kronenberg 2015), liegt die Vermutung nahe, dass auch gegen diesen Zelltyp ein Immunevasionsprotein exprimiert wird. Weiterhin konnte für HCMV bereits ein Immunevasin charakterisiert werden (US2), welches die Aktivität von iNKT-Zellen herunterreguliert (Han et al. 2013). Aufgrund der zahlreichen Homologien zwischen HCMV und mCMV (Reddehase 2002) unterstützt dies die These eines durch mCMV kodierten Immunevasins für iNKT-Zellen (siehe auch 1.3. und 1.4.2.4.).

Die Immunevasion von mCMV zu CD8 T-Zellen erfolgt zu einem wesentlichen Teil über die Regulation der Expression von MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten zwischen MHC-I und CD1d liegt es nahe, dass ein mögliches Immunevasin für NKT-Zellen einen ähnlichen Mechanismus nutzt. In einem ersten Schritt sollte daher zunächst der Einfluss einer mCMV-Infektion auf die CD1d-Expression von Zellen untersucht werden.

4.4.1. Einfluss der mCMV-Infektion auf die CD1d-Zelloberflächenexpression

Um die Frage zu beantworten, ob mCMV in der Lage ist die CD1d-Oberflächenexpression zu beeinflussen, bedurfte es zunächst einer mCMV-permissiven Zelllinie, welche CD1d auf ihrer Zelloberfläche exprimiert, so dass eine mögliche Regulation des Moleküls durch ein mCMV-kodiertes Immunevasin detektiert werden kann. Zu diesem Zweck wurden embryonale Fibroblastenzellen (MEF) aus BALB/c- sowie BALB/c.CD1d^{-/-}-Mäusen isoliert (siehe 3.1.4.) und ihre CD1d-Expression im Durchflusszytometer analysiert.

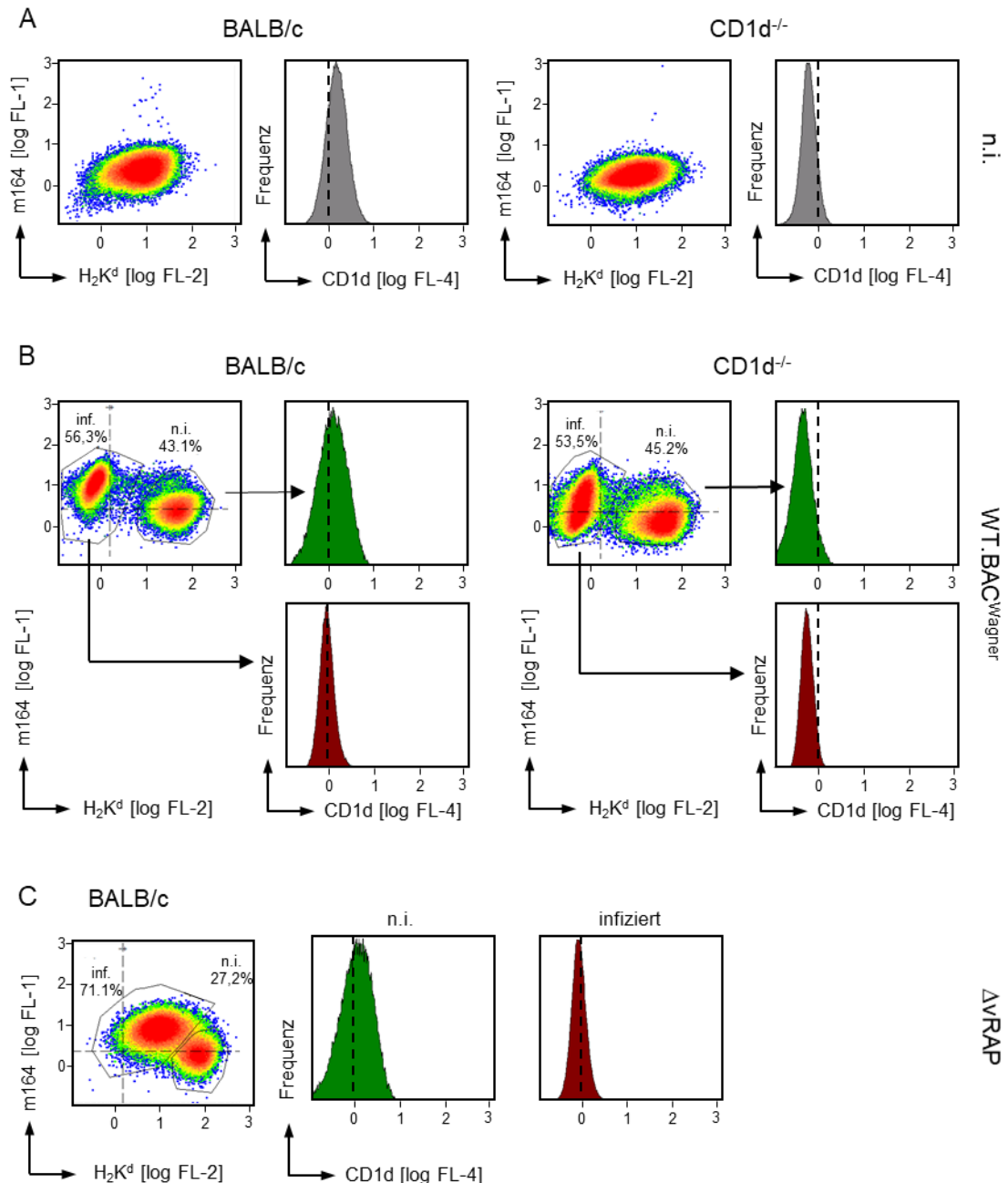


Abbildung 4.20: CD1d-Oberflächenexpression. A: Analyse der CD1d-Expression auf MEF, isoliert aus BALB/c- bzw. BALB/c.CD1d^{-/-}-Tieren. Färbung gegen CD1d (1:500, APC-gekoppelt). B und C: BALB/c- bzw. BALB/c.CD1d^{-/-}-MEF wurden zentrifugal (MOI=4) mit den angegebenen Viren infiziert. 16h p.i. wurde MHC-Klasse-I-K^d (1:1000; PE-gekoppelt) sowie CD1d (1:500; APC-gekoppelt) an der Oberfläche und intrazelluläres m164/gp36.5 (1:20; Zweitantikörper AF-488, 1:500) im Durchflusszytometer detektiert. WT.BAC^W ist das 1999 aus dem Laborstamm ATCC VR-1399 generierte Wildtyp-Virus, welches eine BAC-Sequenz enthält (Wagner et al. 1999). Auf diesem beruhend wurde die ΔvRAP-Mutante hergestellt, in welcher die drei vRAPs m04, m06 und m152 deletiert sind (Wagner et al. 2002). n.i.= nicht infiziert (grün); infiziert (rot).

Wie in Abbildung 4.20A deutlich zu erkennen ist, exprimieren BALB/c.CD1d^{-/-}-MEF wie erwartet kein CD1d. Im Gegensatz dazu ist auf MEF, welche aus BALB/c-Mäusen isoliert wurden, eine Expression von CD1d detektierbar.

Zur Untersuchung der CD1d-Expression nach mCMV-Infektion wurden BALB/c- sowie BALB/c.CD1d^{-/-}-MEF mit mCMV-WT.BAC^W infiziert (MOI 4 nach Zentrifugation) (siehe 3.2.3). Nach Inkubation über Nacht (16h) wurde die CD1d-Expression zytofluorometrisch

analysiert. Nach Infektion mit mCMV regulieren die Zellen aufgrund der bekannten Immunevasine m04, m06 und m152 die MHC-I-Oberflächenexpression herunter. Weiterhin ist bekannt, dass durch die Expression einer Typ-I-Interferon Antwort die nicht-infizierten Zellen MHC-I-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche hochregulieren. Daher können mithilfe einer Färbung gegen das mCMV-Protein m164 sowie gegen MHC-I-Moleküle auf der Zelloberfläche deutlich zwei Zellpopulationen unterschieden werden, was die Auftrennung in infizierte und nicht-infizierte Zellen ermöglicht (Fink et al. 2012). Die Färbung der Proben erfolgte mit Antikörpern gegen MHC-I-K^d und CD1d (siehe 3.5.6.3. und 2.3.7.1.) sowie zur eindeutigen Identifizierung von infizierten Zellen in der Probe mit einem Antikörper gegen das virale, intrazelluläre m164/gp36.5 (siehe 3.5.6.4 und 2.3.7.1).

Wie in Abbildung 4.20B dargestellt, war mithilfe von m164/gp36.5 und MHC-I-K^d eine klare Auftrennung der Zellen in eine infizierte und eine nicht-infizierte Population möglich. Dies gestattet die separate Analyse der CD1d-Oberflächenexpression in den zwei Zellpopulationen. Zu erkennen ist, dass infizierte MEF (rot) der BALB/c-Maus die CD1d-Oberflächenexpression herunterregulieren. In BALB/c.CD1d^{-/-}-MEF hat die mCMV-Infektion mit WT.BAC^W hingegen wie erwartet keinen Effekt, da kein CD1d exprimiert wird. Diese Ergebnisse zeigen, dass die mCMV-Infektion Einfluss auf die CD1d-Zelloberflächenexpression nimmt.

4.4.1.1. CD1d-Expression nach Infektion mit mCMV- Δ vRAP

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten zwischen CD1d- und MHC-I-Molekülen, sollte als nächstes getestet werden, ob nicht eines der bekannten MHC-I-Immunevasine, auch für die verringerte Expression von CD1d verantwortlich ist. Zu diesem Zweck wurde der in 4.5.1. gezeigte Versuch wiederholt, wobei MEF in einem weiteren Ansatz mit mCMV- Δ vRAP (Wagner et al. 2002) infiziert wurden. Durch das Fehlen der drei Immunevasine m04, m06 und m152 ist die MHC-I-Regulation deutlich verringert (Fink et al. 2012). Dennoch lässt sich auch hier, über die Detektion von m164- und MHC-I, klar eine infizierte Zellpopulation von der nicht-Infizierten unterscheiden (Abb. 4.20C). Die Analyse der CD1d-Oberflächenexpression zeigte jedoch, dass diese auch bei Infektion mit Δ vRAP reduziert wird, so dass davon auszugehen ist, dass die drei Immunevasine wahrscheinlich nicht an der Regulation der CD1d-Expression auf der Zelloberfläche beteiligt sind.

Zusammenfassung: In mCMV-WT.BAC^W infizierten MEF ist die Oberflächenexpression von CD1d im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen reduziert. Dies ist auch bei einer Infektion mit mCMV- Δ vRAP zu detektieren. Daraus folgt, dass die mCMV-Infektion die CD1d-Expression auf Zellen herunterreguliert, jedoch keines der bekannten mCMV-Immunevasine gegen MHC-I zusätzlich als CD1d-regulierendes Immunevasin fungiert.

4.4.2. Herstellung der Virusrekombinanten mCMV- Δ m01- Δ m10, - Δ m11- Δ m19, - Δ m141- Δ m150 und - Δ m151- Δ m158

Wie in 4.4.1. dargestellt, führt die Infektion von MEF mit mCMV zu einer verminderten CD1d-Expression auf deren Zelloberfläche. Da die bekannten Immunevasine m04, m06 und m152 MHC-I Moleküle regulieren und aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten von MHC-I und CD1d, liegt die Vermutung nahe, dass ein den bekannten MHC-I-Immunevasinen verwandtes Protein für die Regulation von CD1d verantwortlich sein könnte. Durch Duplikationen sind im Genom von mCMV zahlreiche Genfamilien entstanden. Die MHC-I-Immunevasine m04 und m06 sind dabei in der m02-Genfamilie lokalisiert, das Immunevasin m152 gehört zur m145-Genfamilie (Abb. 4.21). Um das CD1d regulierende Gen näher einzugrenzen sollten großräumige Deletionsmutanten (m02-Genfamilie: mCMV- Δ m01- Δ m10, - Δ m11- Δ m19 bzw. m145-Genfamilie: mCMV- Δ m141- Δ m150 und - Δ m151- Δ m158, siehe auch Abb. 4.21) mittels BAC-Mutagenese hergestellt werden.

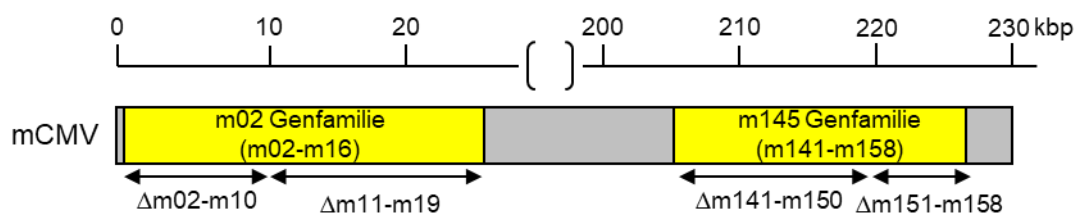


Abbildung 4.21: Virusrekombinanten. Dargestellt ist das mCMV-Genom mit der m02- und m145-Genfamilie (gelb). Die Pfeile symbolisieren die mittels markerloser BAC-Mutagenese herzustellenden Virusrekombinanten.

Ein Problem bei der Herstellung großer Deletionsmutanten ist, dass u.U. Gene deletiert werden, die für den viralen Replikationszyklus essentiell sind, so dass keine Virusrekonstitution der hergestellten Rekombinanten mehr möglich ist. In Tabelle 4.2 ist aufgelistet, was über die ORFs in diesen Genregionen bisher bekannt ist.

Ein weiteres Problem bei der Herstellung von Virusrekombinanten ist, dass die BAC-Vektor Sequenz, aufgrund von flankierenden Sequenz-Wiederholungen, vom prokaryotischen Rekombinationssystem erkannt und aus dem viralen Genom entfernt werden kann. Dies kann eine erfolgreiche Mutagenese verhindern, da hierfür eine intakte BAC-Sequenz essentiell ist.

ORF	Zielprotein/Funktion	Referenz
m02	m02-knockout führt zu keinem veränderten Phänotyp.	(Oliveira et al. 2002)
m03 m03.5	In verschiedenen mCMV-Isolaten einzeln oder gemeinsam vorkommend. Die kodierten Proteine werden an der Zelloberfläche exprimiert.	(Corbett et al. 2007)
m04	Zusammen mit MHC-I an der Zelloberfläche detektierbar. Verhindert u.a. die Aktivierung von NK-Zellen via <i>missing-self</i> . Unterstützt zusammen mit m06 und m152 die MHC-I-Runterregulation von der Zelloberfläche.	(Kleijnen et al. 1997) (Holtappels et al. 2006) (Babić et al. 2010; Fink et al. 2015)
m06	Vermittelt die Einschleusung der pMHC-I-Komplexe aus dem ER in den endolysosomalen Abbauweg.	(Reusch et al. 1999; Fink et al. 2019)
m09	Transposon-Insertion führt zu keiner Veränderung in der Virulenz im Vergleich zum WT-Virus. CD4 T-Zellen erkennen das m09 ₁₃₃₋₁₄₇ -Peptid.	(Zhan et al. 2000) (Arens et al. 2008)
m12	Viraler Ligand sowohl für inhibitorische als auch aktivierende NK-Rezeptoren (NKR-P1B, NKR-P1A/C).	(Aguilar et al. 2017)
m141	Deletion führt zu einer beeinträchtigten mCMV-Replikation in Makrophagen und in Milzgewebe.	(Hanson et al. 2001)
m142/m143	Wirken zusammen; binden an dsRNA und verhindern die Proteinkinase R-induzierte Protein-Synthese.	(Ménard et al. 2003; Valchanova et al. 2006)
m144	Beteiligt an der Immunevasion der NK-Zell-Antwort.	(Farrell et al. 1997)
m145	Das kodierte Glykoprotein reduziert MULT-1 auf der Plasmamembran und verhindert so die Bindung dieses Liganden an NKG2D.	(Krmpotić et al. 2005)
m147.5	Reguliert die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86.	(Loewendorf et al. 2004)
m152	Vermittelt die Retention und Akkumulation von MHC-I-Molekülen im ERGIC/cis-Golgi-Kompartiment. Reguliert zudem Mitglieder der RAE1-Molekülfamilie (RAE1 α , β , γ , δ und ϵ), Liganden des aktivierenden NK-Zell-Rezeptors NKG2D, indem es die Ausreifung von neu-synthetisierten Molekülen im ER beeinflusst.	(Ziegler et al. 1997) (Krmpotić et al. 2002) (Arapović et al. 2009; Lemmermann et al. 2010a)
m153	Kristallstruktur wurde aufgeklärt.	(Mans et al. 2007)
m154	Führt zur proteolytischen Degradation von CD48. Als hochaffiner Ligand für NK-Zellen und den CTL-Rezeptor CD244 beeinflusst es die Immunantwort.	(Zarama et al. 2014)
m155	Induziert eine posttranskriptionale Inhibition von CD40, welches T-Zellen kostimuliert. Reguliert H60, einen hochaffinen Liganden für NKG2D auf der Zelloberfläche.	(Loewendorf et al. 2011) (Lodoen et al. 2004) (Hasan et al. 2005)
m157	Der aktivierende NK-Zell-Rezeptor Ly49H bindet an das Genprodukt und vermittelt so die NK-Zell-Erkennung von mCMV-infizierten Zellen.	(Arase et al. 2002) (Brown et al. 2001) (Smith et al. 2002)

Tabelle 4.2: Bekannte Effekte der ORFs der m02- und m145-Genfamilie.

Die Viren mCMV- Δ m01- Δ m10 und mCMV- Δ m11- Δ m19 wurden jeweils auf dem Hintergrund des mCMV-WT.BAC^W (Wagner et al. 1999) sowie mCMV-WT.BAC^A generiert (Jordan et al.

2011) (siehe auch 2.6.). mCMV- Δ m141- Δ m150 und - Δ m151- Δ m158 wurden hingegen zunächst lediglich auf dem WT.BAC^W-Hintergrund generiert. Der Unterschied zwischen beiden Virusvarianten liegt in der Länge des kodierten CC(β) Chemokinhomolog MCK-2 (m131/m129). Dieses ist an der Rekrutierung von Leukozyten beteiligt, die wiederum die virale Dissemination beeinflussen. Im Wildtyp-Isolat mCMV-WT.Smith wird MCK-2 sowohl in einer verkürzten als auch in einer verlängerten Version kodiert. Im mCMV-WT.BAC^W wird durch einen *frameshift* lediglich das verkürzte MCK-2-Protein kodiert mit der Folge, dass es zu einer verschlechterten Dissemination in die Speicheldrüsen kommt. Im mCMV-WT.BAC^A wurde diese Mutation „repariert“, so dass das 280AS lange Protein translatiert wird. Die Infektion mit diesem Virus führt zur Wiederherstellung der Dissemination in die Speicheldrüsen (Jordan et al. 2011). Für die Herstellung der mCMV-Rekombinanten wurde das Prinzip der Zwei-Schritt-Red-vermittelten Rekombination für die markerlose BAC-Mutagenese verwendet (Tischer et al. 2006). Diese ermöglicht die markerlose Mutation kleiner als auch größerer Genabschnitte (siehe 2.5., 3.3.11.; zur Übersicht: Abb. 3.1; nach Tischer et al. 2006). Zur Überprüfung der erfolgreichen Deletion wurde die BAC-DNA isoliert und der Bereich der Mutation mithilfe einer PCR amplifiziert (siehe 3.3.3.2., 3.3.9. *HotStarTaq* Master Mix Kit und 2.3.4.2.). Das PCR-Produkt wurde zur Analyse auf ein Agarosegel (3.3.6.) aufgetragen und abschließend sequenziert. Die verwendeten *Primer* sowie die erwarteten Amplifikatgrößen bei erfolgreicher Deletion sind für die jeweilige Virusrekombinante in Tabelle 4.3 aufgeführt.

Virusmutante	Primer	Größe bei erfolgreicher Deletion
mCMV- Δ m01- Δ m10	Δ m01- Δ m10flk_for Δ m01- Δ m10flk_rev	394bp
mCMV- Δ m11- Δ m19	Δ m11- Δ m19flk_for Δ m11- Δ m19flk_rev	428bp
mCMV- Δ m141- Δ m150	Δ m141- Δ m150flk_for Δ m141- Δ m150flk_rev	817bp
mCMV- Δ m151- Δ m158	Δ m151- Δ m158flk_for Δ m151- Δ m158flk_rev	940bp

Tabelle 4.3: Oligonukleotide zur Überprüfung der BAC-Mutagenese. Aufgeführt ist zudem die erwartete Größe des jeweiligen Amplifikats bei erfolgreicher Deletion.

In Abbildung 4.22 sind die nach Größe aufgetrennten PCR-Amplifikate der hergestellten Viren nach der zweiten Red-Rekombination in einem Agarosegel dargestellt. Für alle Deletionsmutanten konnten PCR-Produkte der erwarteten Größe amplifiziert werden.

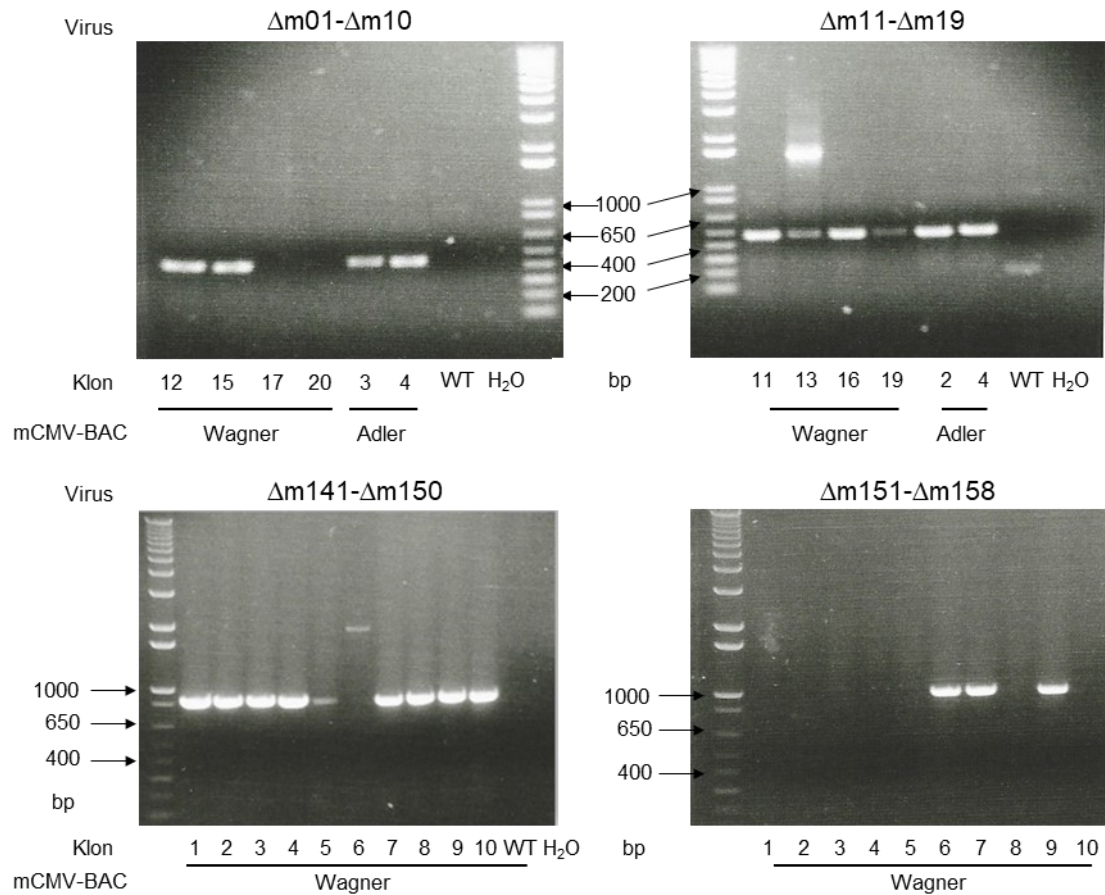


Abbildung 4.22: Herstellung der Virusrekombinanten. Dargestellt sind die PCR-Amplifikate der hergestellten Viren nach der zweiten Red-Rekombination. Die BAC-DNA wurde mittels BAC-Minipräparation isoliert und der Bereich der Deletion anschließend mit entsprechend gewählten Oligonukleotiden amplifiziert ($\Delta m01$ -m10flk_for: CGCGTTCTGCTAGTTAGG; $\Delta m01$ -m10flk_rev: GCTGTACGGGATCTTACC; $\Delta m11$ -m19flk_for: TCCGATCCGCTGAATTCC; $\Delta m11$ -m19flk_rev: CTA CTCTGCGTCTTCAC; $\Delta m141$ -m150flk_for: CTGTTCTCCTGGCAGTAATC; $\Delta m141$ -m150flk_rev: GTTCTACTCGTCGTGCTATC; $\Delta m151$ -m158flk_for: CACCGACGATCGAATGACAC; $\Delta m151$ -m158flk_rev: TCGAAATCTGTCCCTCTC). Zur Analyse wurde das PCR-Produkt auf ein 1% Agarosegel aufgetragen.

Die positiven Klone sind in Tabelle 4.4 aufgeführt.

Virus	Positive Klone
$\Delta m01$ - $\Delta m10^W$	12, 15
$\Delta m01$ - $\Delta m10^A$	3, 4
$\Delta m11$ - $\Delta m19^W$	11, 16, 19
$\Delta m11$ - $\Delta m19^A$	2, 4
$\Delta m141$ - $\Delta m150^W$	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10
$\Delta m151$ - $\Delta m158^W$	6, 7, 9

Tabelle 4.4: Virusrekombinanten mit erfolgreicher Deletion nach Analyse im Agarosegel.

Die Sequenzierung erfolgte bei GATC (Konstanz) mit den jeweiligen Sequenzier-Oligonukleotiden $\Delta m01$ -m10flk_for, $\Delta m11$ -m19flk_for, $\Delta m141$ -m150flk_for und $\Delta m151$ -m158flk_rev (siehe 2.3.4.2.). In Abbildung 4.23 sind die Ergebnisse der Sequenzierung in Form von Chromatogrammen für jeweils einen exemplarischen Klon dargestellt. Die Pfeile

markieren den Beginn bzw. Endbereich der Deletion, in der Regel eine *untranslated region* (UTR). Sofern der nächstfolgende ORF mit sequenziert wurde, ist dieser ebenfalls gelb dargestellt. Anhand der Sequenzierung konnte eine erfolgreiche Deletion für alle Viren bestätigt werden.

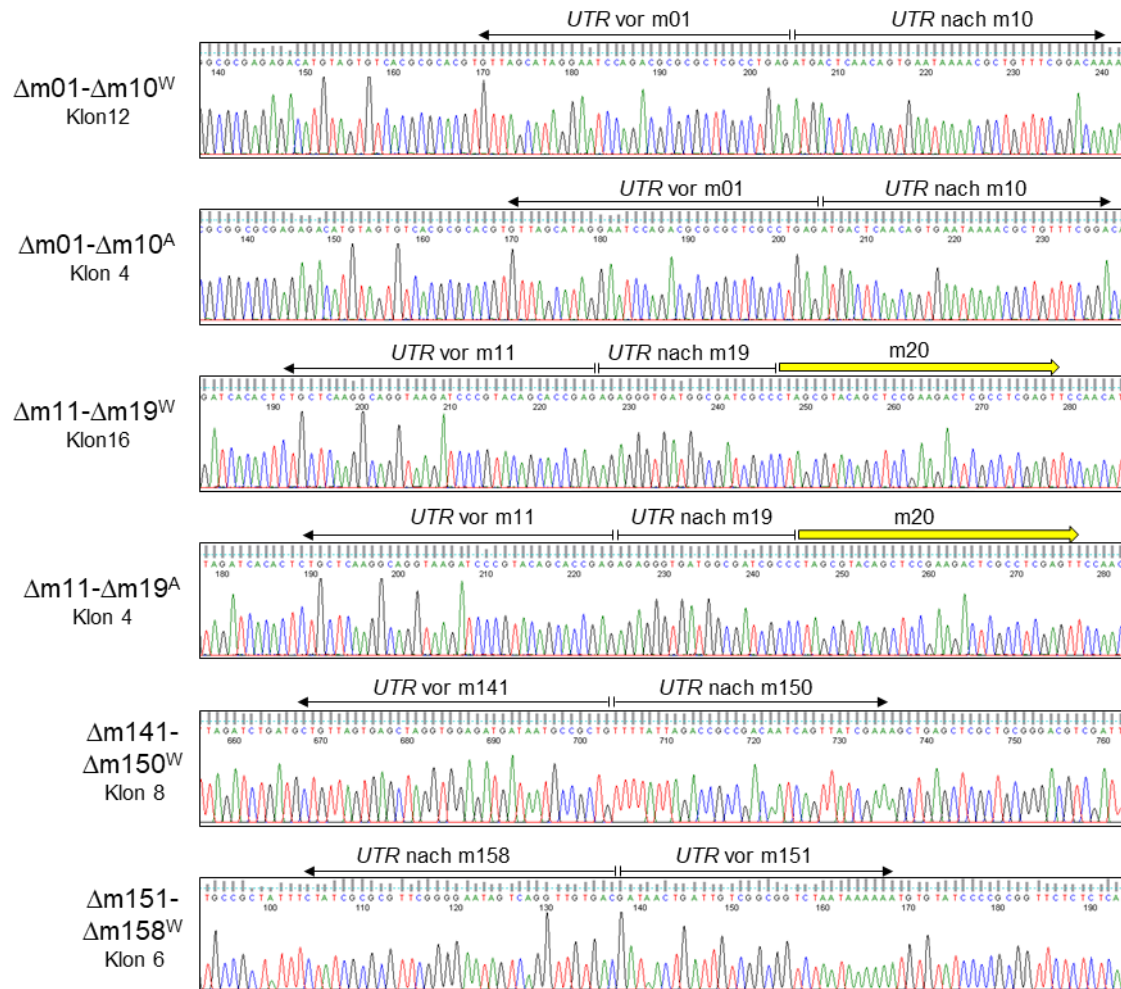


Abbildung 4.23: Chromatogramme der hergestellten mCMV-Deletionsmutanten. Zur Überprüfung der hergestellten Virusrekombinanten erfolgte die Sequenzierung von PCR-Produkten rund um den Deletionsbereich bei GATC (Konstanz) mit den jeweiligen Sequenzier-Oligonukleotiden $\Delta m01-\Delta m10\text{flk}_{for}$, $\Delta m11-\Delta m19\text{flk}_{for}$, $\Delta m141-\Delta m150\text{flk}_{for}$ und $\Delta m151-\Delta m158\text{flk}_{rev}$ (siehe 2.3.4.2.). Dargestellt sind die erhaltenen Chromatogramme der Sequenzierung für je einen Klon. Die schwarzen Pfeile markieren den Beginn bzw. das Ende der Deletion. Gelb: Beginn des nächsten jeweiligen ORFs, sofern dieser mit sequenziert wurde; UTR= *untranslated region*; A= Adler, W= Wagner.

Im Anschluss an die Sequenzierung wurde aus den GS1783 die BAC-DNA von $\Delta m01-\Delta m10^W$ Klon 12, $\Delta m11-\Delta m19^W$ Klon 16, $\Delta m141-\Delta m150^W$ Klon 8 und $\Delta m151-\Delta m158^W$ Klon 6 mittels BAC-Maxipräparation (siehe 3.3.3.3.) isoliert. Die Rekonstitution der rekombinanten mCMVs erfolgte nach Transfektion der aufgereinigten BAC-DNA in BALB/c-MEF (siehe 3.1.3.). Bei erfolgreicher Transfektion waren nach vier bis sechs Tagen die ersten Plaques sichtbar. Sowohl $\Delta m01-\Delta m10^W$, $\Delta m11-\Delta m19^W$ als auch $\Delta m151-\Delta m158^W$ konnten dabei zum Zeitpunkt dieser Arbeit erfolgreich rekonstituiert werden.

Zusammenfassung: Anhand der Sequenzierdaten konnte die erfolgreiche Herstellung der mCMV.BACs $\Delta m01-\Delta m10^W$, $\Delta m11-\Delta m19^W$, $\Delta m141-\Delta m150^W$ und $\Delta m151-\Delta m158^W$ bestätigt werden. $\Delta m01-\Delta m10^W$, $\Delta m11-\Delta m19^W$ und $\Delta m151-\Delta m158^W$ wurden zum Zeitpunkt dieser Arbeit erfolgreich rekonstituiert.

5. Diskussion

Über eine Vielzahl an Subtypen und Reaktionsmöglichkeiten beteiligen sich iNKT-Zellen an der Immunreaktion gegen zahlreiche Infektionen. Dabei können sie die Immunantwort sowohl unterstützen als auch supprimieren. Gegenüber Virusinfektionen konnte eine höhere Suszeptibilität sowohl in Patienten mit einer iNKT-Zelldefizienz (EBV (Rigaud et al. 2006)) als auch in NKT-defizienten Mäusen (HSV-1 (Grubor-Bauk et al. 2003; Grubor-Bauk et al. 2008), HSV-2 (Ashkar und Rosenthal 2003), Respiratorisches Synzytial-Virus (RSV) (Johnson et al. 2002) oder Influenza A-Virus (Ishikawa et al. 2010)) beobachtet werden. Die Bedeutung von iNKT-Zellen in der Immunantwort gegen Virusinfektionen wird auch dadurch unterstrichen, dass zahlreiche Viren Mechanismen entwickelt haben, die CD1d-vermittelte Lipidpräsentation zu blockieren, beispielsweise HIV, HSV-1, HPV oder KSHV (siehe auch 1.5.6.). Auch für HCMV konnte ein Protein charakterisiert werden, welches die Aktivierung von iNKT-Zellen beeinflusst (Han et al. 2013). Für die mCMV-Infektion ist die Rolle der iNKT-Zellen bisher nur wenig erforscht. So wurde noch kein von mCMV-kodiertes iNKT-spezifisches Immunevasin beschrieben. Es ist jedoch bekannt, dass murine iNKT-Zellen nach mCMV-Infektion aktiviert werden (Wesley et al. 2008; Tyznik et al. 2008) und nach Aktivierung durch α GalCer einen positiven Effekt auf die Immunkontrolle vermitteln können (Van Dommelen, S. L. H. et al. 2003; Tyznik et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit sollte daher der Einfluss von iNKT-Zellen auf die mCMV-Infektion näher untersucht werden.

5.1. Einfluss von (i)NKT-Zellen auf die mCMV-Immunkontrolle

5.1.1. iNKT-*knockout* zeigt unterschiedlichen Einfluss auf die Viruskontrolle in verschiedenen Mausstämmen

In mehreren Publikationen konnte gezeigt werden, dass der genetische Hintergrund des verwendeten Mausstammes Einfluss auf die iNKT-Kontrolle der mCMV-Infektion hat (Van Dommelen, S. L. H. et al. 2003; Reilly et al. 2012; Tyznik et al. 2014). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die iNKT-vermittelte Immunantwort sowohl im Stamm BALB/c (MHC-I Haplotyp H-2^d) als auch im Stamm C57BL/6 (MHC-I Haplotyp H-2^b) und den jeweilig abgeleiteten (i)NKT-*knockout*-Stämmen untersucht.

Der Vergleich viraler Titer zwischen WT und (i)NKT-*knockout* Tieren auf C57BL/6-Hintergrund zeigte insbesondere für die Leber eine signifikant verringerte Viruslast an Tag 4 und 8 nach Infektion für B6.CD1d^{-/-}- sowie an Tag 8 für B6.J α 18^{-/-}-Tiere (Abb. 4.3). Schon van Dommelen et al. beschrieben, dass iNKT-Zellen keine kritische Rolle in der frühen

mCMV-Infektion spielen. Die Autoren konnten jedoch in ihrer Studie an Tag 10 nach Infektion eine verbesserte Kontrolle in B6.WT im Vergleich zu B6.J α 18^{-/-} zeigen (Van Dommelen, S. L. H. et al. 2003). In der hier vorliegenden Arbeit konnte hingegen an Tag 8 nach Infektion kein Unterschied im Virustiter in der Leber zwischen B6.WT und B6.J α 18^{-/-}-Tieren festgestellt werden. Da der Verlauf einer mCMV-Infektion abhängig von der Dosis, dem Virusstamm sowie der Injektionsroute ist (Krpmotic et al. 2003), lassen sich diese Unterschiede möglicherweise dadurch erklären (Van Dommelen, S. L. H. et al. 2003: 10⁴PFU i.p. Laborstamm mCMV-WT K181; aus Speicheldrüse isoliert; in der vorliegenden Arbeit: 10⁶PFU i.v. mCMV-WT ATCC VR-1399 (*Smith strain* 1954); aus Zellkultur isoliert).

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen auch, dass es organbedingte Unterschiede in der Viruskontrolle durch (i)NKT-Zellen gibt (Abb. 4.3, 4.9, 4.12, 4.19). Ähnliches wurde bereits in den späten 1990er-Jahren für NK-Zellen in C57BL/6-Mäusen beschrieben (siehe hierzu Milz: Tay und Welsh 1997; Leber: Biron et al. 1996; Tay und Welsh 1997; Jonjić et al. 2006; Lunge: Lueder et al. 2018). Für iNKT-Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass sich ihre Anzahl in den verschiedenen Organen unterscheidet. In der C57BL/6-Maus beträgt der Anteil an iNKT-Zellen in der Milz, Thymus sowie den mesenterischen und pankreatischen Lymphknoten etwa 1-2,5% der Lymphozyten; in Leber und Knochenmark können sie hingegen einen Anteil von bis zu 50% der Lymphozytenpopulation ausmachen (Benlagha et al. 2000; Matsuda et al. 2000; Bendelac et al. 2007; Godfrey et al. 2015). In der Lunge stellen nicht-zirkulierende iNKT-Zellen etwa 5% der residenten Lymphozyten dar (Scanlon et al. 2011; Lee et al. 2015). Zudem weisen die zahlreichen iNKT-Zell-Subpopulationen unterschiedliche Organpräferenzen auf, was entsprechend zu Organ-spezifischen Effektorfunktionen, vermittelt durch die jeweilige iNKT-Subpopulation führt (siehe auch 1.5.1.). Während in der Leber vorwiegend iNKT1-Zellen residieren, konnten in der Milz neben iNKT1- auch zahlreiche iNKT_{FH}-Zellen detektiert werden (Buechel et al. 2015; Georgiev et al. 2016). In der Lunge und in den peripheren Lymphknoten finden sich vorwiegend iNKT2- und iNKT17-Zellen (Buechel et al. 2015; Crosby und Kronenberg 2018). Die detektierten Organ-spezifischen Unterschiede in der CMV-Kontrolle durch (i)NKT-Zellen lassen sich daher vermutlich auf die unterschiedliche Präsenz der verschiedenen iNKT-Subpopulationen zurückführen.

Die weiteren Analysen der mCMV-Infektion im C57BL/6-Hintergrund in dieser Arbeit zeigten, dass die viralen IE1-Transkripte 48 Stunden nach Infektion sowohl in B6.CD1d^{-/-}- als auch in B6.J α 18^{-/-}-Tieren signifikant im Vergleich zum B6.WT erniedrigt waren (Abb. 4.4). Die verbesserte Immunkontrolle in den iNKT-defizienten Tieren (Abb. 4.3) könnte die erniedrigten viralen Transkripte im LK erklären. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass dies der einzige Grund für diese sehr deutliche Reduktion ist. Eine weitere Erklärung könnten iNKT17 Zellen liefern, welche neben iNKT2-Zellen insbesondere in den peripheren LK

residieren. Aktivierte iNKT17-Zellen sezernieren dort unter anderem IL-17A (Brennan et al. 2013), ein hochwirksames Chemoattraktant, das bei der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten sowie Makrophagen eine wichtige Rolle spielt (Maddur et al. 2012; Miossec und Kolls 2012). Zudem konnte gezeigt werden, dass in der frühen Phase der mCMV-Infektion 80% der infizierten Zellen im LK Makrophagen sind (Hsu et al. 2009). Das Fehlen von iNKT-Zellen könnte daher zu einer verschlechterten Rekrutierung von Makrophagen in den Lymphknoten führen und hier die Zahl der infizierten Zellen und der viralen Transkripte verringern.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen zudem leichte Unterschiede in der mCMV-Kontrolle zwischen B6.J α 18^{-/-} und B6.CD1d^{-/-} (Abb. 4.3-4.5). Während in der CD1d-defizienten Maus sowohl iNKT- als auch dNKT-Zellen fehlen (Chen et al. 1997), sind in J α 18-defizienten Mäusen lediglich iNKT-Zellen abwesend (Cui et al. 1997). Zwar zeigten beide Stämme einen Trend zu einer verbesserten Viruskontrolle, diese war jedoch in B6.CD1d^{-/-} stärker ausgeprägt als in B6.J α 18^{-/-}. Dies zeigte sich sowohl bei der E1-Transkription (Abb. 4.4) als auch der Virusreplikation. So konnte insbesondere in der B6.CD1d^{-/-}-Leber früher (Tag 4) eine reduzierte Viruslast detektiert werden (Abb. 4.3). Dies lässt vermuten, dass dNKT-Zellen antiviral wirkende Zelltypen hemmen. Für Typ I NKT- und Typ II NKT-Zellen wurden antagonistische Effekte beschrieben, wobei beide Zellpopulationen sowohl proinflammatorische als auch entzündungshemmende Funktionen aufweisen (Singh et al. 2018). dNKT-Zellen sind dabei in der Lage, die proinflammatorischen Funktionen sowohl von iNKT- (Halder et al. 2007), als auch von konventionellen CD8 T-Zellen (Dhodapkar und Kumar 2017) sowie DCs (Halder et al. 2007; Marrero et al. 2015; Dhodapkar und Kumar 2017) über ein komplexes Netzwerk zu hemmen (siehe auch 1.5.2.). Daneben können auch Neutrophile sowie zahlreiche andere Zellen von aktivierten dNKT-Zellen beeinflusst werden (Bandyopadhyay et al. 2016). Ob dNKT-Zellen eine hemmende Wirkung auf NK-Zellen haben ist nicht bekannt. Da dNKT-Zellen jedoch auch in der Lage sind, die CD8 T-Zellantwort zu hemmen (Dhodapkar und Kumar 2017), könnte ihr Fehlen in B6.CD1d^{-/-} auch die leicht verbesserten T-Zellfrequenzen (Abb. 4.5) erklären.

Während im C57BL/6-Stamm eine (i)NKT-Defizienz Einfluss auf die mCMV-Immunantwort hat, zeigte sich im BALB/c-Hintergrund zwischen WT und CD1d^{-/-} eine vergleichbare mCMV-Kontrolle (virale Transkription, T-Zellfrequenzen, virale Titer in Lunge, Leber, Milz; Abb. 4.6-4.8). Lediglich zwischen Tag 4 und 6 konnten leicht erhöhte Organvirustiter in BALB/c.CD1d^{-/-} gemessen werden (Abb. 4.6). Dies deckt sich mit Ergebnissen von Tyznik et al. (2014), welche für BALB/c.J α 18^{-/-} an Tag 5 nach Infektion eine verschlechterte Viruskontrolle, insbesondere in der Leber nachweisen konnten. Dies könnte auf einen direkten Beitrag der iNKT-Zellen zur mCMV-Kontrolle hinweisen. Vorversuche zu dieser

Arbeit sowie bereits publizierte Daten (Johnson et al. 2002) zeigen zudem eine Reduktion der Zahl von CD8 T-Zellen in der $CD1d^{-/-}$ -Maus. Die Autoren der Studie postulierten in diesem Zusammenhang eine mögliche, $CD1d$ -abhängige Rolle der NKT-Zellen in der Expansion von CD8 T-Zellen (Johnson et al. 2002). Im BALB/c-Hintergrund sind vorrangig CD8 T-Zellen an der Kontrolle der mCMV-Infektion beteiligt. So könnte die im BALB/c-Stamm detektierte leicht verschlechterte Viruskontrolle auch auf die fehlende iNKT-Unterstützung für die CD8 T-Zellen zurückzuführen sein.

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse auf ein komplexes Netzwerk der NKT-Zellen in der mCMV-Kontrolle schließen. Ein mögliches Modell, welches die bisherigen Ergebnisse erklärt, ist in Abbildung 5.1 dargestellt.

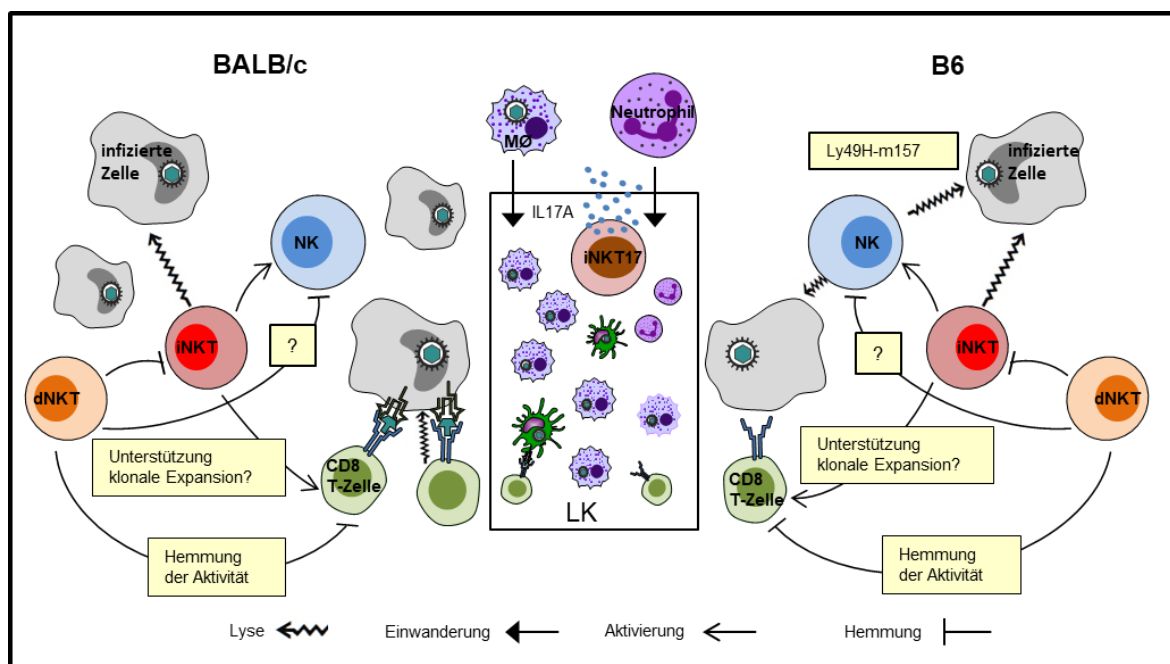


Abbildung 5.1: Modell des iNKT-Netzwerkes in der mCMV-Infektion. iNKT-Zellen lysieren mCMV-infizierte Zellen. In B6 kommt es zusätzlich zu einem Ly49H-m157-vermittelten effizienten NK-Zellkilling. dNKT-Zellen sind in der Lage, die CD8 T-Zellantwort sowie möglicherweise auch NK-Zellen zu hemmen. In den peripheren LK residieren insbesondere iNKT17-Zellen. Aktivierte iNKT17-Zellen exprimieren unter anderem IL-17A, welches die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten sowie Makrophagen fördert. In der frühen Phase der mCMV-Infektion sind dabei 80% der infizierten Zellen im LK Makrophagen. In BALB/c kontrollieren hauptsächlich CD8 T-Zellen die Infektion.

Im C57BL/6-Hintergrund erfolgt über die Ly49H-m157 vermittelte NK-Aktivierung ein effizientes *Killing* von mCMV-infizierten Zellen. Zusätzlich lysieren in Leber und Milz vermutlich auch iNKT1-Zellen direkt infizierte Zellen, da diese Subpopulation dort starke zytotoxische Aktivität zeigt (Crowe et al. 2005; Maas-Bauer et al. 2018). Dadurch kommt es zu einer frühen Reduktion von virusinfizierten Zellen, was wiederum in einer verminderten NK-Zellaktivierung resultiert. Das Fehlen der iNKTs führt hingegen zu einer im Vergleich früh erhöhten Viruslast, wodurch NK-Zellen verbessert aktiviert und mCMV-infizierte Zellen effizient eliminieren können. Dies ist in der B6.Jα18^{-/-}-Maus geringer ausgeprägt als in der

B6.CD1d^{-/-}-Maus. Eine zusätzliche Hemmung der NK-Zellen durch dNKT-Zellen über einen bisher unbekanntem Mechanismus wäre hier eine Erklärung. Zudem lassen sich so die organabhängigen Unterschiede erklären, da dNKT-Zellen zahlreich in der Leber vorkommen (Jahng et al. 2004). Weiterhin sind dNKT-Zellen in der Lage, die CD8 T-Zellantwort zu hemmen, so dass ihr Fehlen in der B6.CD1d^{-/-} auch die leicht verbesserten T-Zellfrequenzen sowie die verbesserte Immunkontrolle von B6.CD1d^{-/-} gegenüber B6.Jα18^{-/-}-Tieren erklären kann.

5.1.2. Aktivierte iNKT-Zellen unterstützen die mCMV-Kontrolle

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass αGalCer-aktivierte iNKT-Zellen zu einer signifikanten Verbesserung der Viruskontrolle in BALB/c führen (Abb. 4.9). Diese Beobachtung reproduziert publizierte Daten (Van Dommelen, S. L. H. et al. 2003). Die Autoren der Studie führten diesen Effekt auf die iNKT-vermittelte Transaktivierung von NK-Zellen und deren Perforin- und IFNγ-Expression zurück. Diese Schlussfolgerung beruhte u.a. auf der Beobachtung, dass die viralen Titer an Tag 4 in der Milz und Leber nach alleiniger αGalCer-Gabe deutlich reduziert waren im Vergleich zu einer NK-Zelldepletierten Gruppe. Allerdings ist zu bedenken, dass schon die alleinige NK-Zelldepletion zu einer verschlechterten viralen Kontrolle führt. Der Vergleich innerhalb der NK-Zelldepletierten Gruppen zeigte daher auch in dieser Studie für Milz und Leber einen therapeutischen Effekt der αGalCer-Gabe (Van Dommelen, S. L. H. et al. 2003). Daneben wurde gezeigt, dass die Aktivierung von iNKT-Zellen keinen Effekt in Perforin^{-/-}, IFNγ^{-/-} und Perforin^{-/-}/IFNγ^{-/-}-Mäusen hatte (Van Dommelen, S. L. H. et al. 2003; Van Dommelen, S. L. H. und Degli-Esposti 2004). Bekannt ist jedoch mittlerweile, dass auch iNKT-Zellen über die Expression von Granzym B, Perforin, *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) und FasL Zytolyse vermitteln (Nieda et al. 2004; Matsuda et al. 2006; Diao et al. 2008; Horst et al. 2012).

Um zu prüfen, ob der therapeutische Effekt von αGalCer lediglich auf die Transaktivierung von NK- und/oder von CD8 T-Zellen zurückzuführen ist, wurden in der hier vorgestellten Arbeit beide Zelltypen depletiert. Für alle Kombinationen der Depletion konnte eine verbesserte Viruskontrolle in Leber und Milz, jedoch nicht in der Lunge nach Aktivierung der iNKT-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.12). Dies zeigt, dass aktivierte iNKT-Zellen nicht ausschließlich über eine Transaktivierung der NK- bzw. CD8 T-Zellen wirken.

5.1.3. Aktivierte iNKT-Zellen führen zu reduzierten CD8 T-Zellfrequenzen in BALB/c

In BALB/c führte die Aktivierung der iNKT-Zellen überraschenderweise zu einer deutlichen Reduktion der virus-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen an Tag 7 nach Infektion (Abb. 4.15). Eine Erklärung für dieses verschlechterte *Priming* könnte die früh erhöhte Transkription im LK nach iNKT-Zellaktivierung liefern (Abb. 4.13). Ein vergleichbarer Effekt wurde bereits 2008 beschrieben. In der damaligen Studie konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit der Immunevasionsmutante mCMV- Δ vRAP zu einem reduzierten CD8 T-Zell*priming* führt (Böhm et al. 2008b). Bei diesem als Immunevasionparadox beschriebenen Phänomen kommt es durch die Verringerung der Immunevasion zu einer früh verbesserten Antigenpräsentation und entsprechend zu einem früheren *Priming* von CD8 T-Zellen, die ihrerseits die Infektion nun früh kontrollieren. In der Folge reduziert sich die virale Replikation im Lymphknoten und es steht für eine spätere Expansion der virus-spezifischen CD8 T-Zellen weniger antigenes Material zur Verfügung. Aus diesem Grund ist die Expansion der CD8 T-Zellen in der mCMV- Δ vRAP-Infektion weniger stark. Im Gegensatz dazu wird bei Expression der Immunevasine nach WT-Infektion eine frühe, effiziente CD8 T-Zellkontrolle verhindert und dadurch die Infektion zu Beginn schlechter kontrolliert. Dies führt zu einer erhöhten viralen Replikation, wodurch während der Expansionsphase mehr antigenes Material zur Stimulation der virus-spezifischen CD8 T-Zellen zu Verfügung steht. Daher sind die CD8 T-Zellfrequenzen bei funktionierender Immunevasion höher (Böhm et al. 2008b).

Auch für C57BL/6 konnte ein positiver Zusammenhang zwischen viraler Transkription und T-Zellfrequenzen festgestellt werden (Mitrović et al. 2012). So wurde bei Infektion mit der Virusrekombinante mCMV- Δ 157, bei der es zu keiner Ly49H-vermittelten NK-Aktivierung kommt, eine stärkere virale Transkription im LK detektiert. Gleichzeitig zeigte sich eine deutlich verbesserte CD8 T-Zellantwort (Mitrović et al. 2012).

Für die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse könnte dies wie folgt übertragbar sein: Die Aktivierung von iNKT-Zellen führt 48 Stunden nach Infektion zu erhöhten viralen Transkripten (Abb. 4.13) und damit zu einem verbesserten CD8 T-Zell*priming*. Diese Zellen kontrollieren die Infektion und führen analog zu Böhm et al. (2008) zu einer Reduzierung von antigenem Material und zu reduzierter Expansion der CD8 T-Zellen, so dass an Tag 7 geringere CD8 T-Zellfrequenzen detektiert werden. Unterstützt wird diese These dadurch, dass die viralen Transkripte 48 Stunden nach Infektion in iNKT-aktivierten Tieren zwar erhöht waren, 72 Stunden nach Infektion aber bereits ein vergleichbares Niveau zu den nicht-iNKT-aktivierten BALB/c-Mäusen aufwiesen (Abb. 4.13 und 4.14).

Eine Quelle für die erhöhten viralen Transkripte könnte in der verstärkten Rekrutierung von Makrophagen in den LK durch iNKT17-Zellen liegen (siehe auch 5.1.1.). Weiterhin aktivieren iNKT-Zellen nach α GalCer-Gabe insbesondere hepatische cDCs (Halder et al. 2007), ein Zelltyp der in der Lage ist, das *Priming* von CD8 T-Zellen gegen mCMV effizient zu initiieren (Mathys et al. 2003; Andrews et al. 2010). So produzieren aktivierte cDCs Zytokine wie IL-12, IL-15 und IL-18, wobei IL-12 für die Induktion von T_H1 -Zellantworten mittels cDCs notwendig ist. Diese wiederum unterstützen die effiziente CTL-Antwort (Altfeld et al. 2011). Die frühe Aktivierung von cDCs über aktivierte iNKTs könnte daher ebenfalls zu einem früh verbesserten CD8 T-Zell*priming* beitragen.

5.1.4. Die Aktivierung von iNKT-Zellen führt zu einer raschen Erhöhung der IFN γ -Konzentration im Serum

Ein möglicher Mechanismus über den iNKT-Zellen CD8 T-Zellen beeinflussen können ist direkt oder indirekt über DCs mittels Ausschüttung verschiedener Zytokine (z.B. IFN γ , IL-10, IL-12, IL-17A). Insbesondere IFN γ moduliert die Antigenpräsentation infizierter Zellen durch die Induktion des Immunoproteasoms (Kloetzel 2004) sowie einer verbesserten Antigenprozessierung und -präsentation (Saric et al. 2002; zur Übersicht: Zhou 2009). So konnte gezeigt werden, dass IFN γ in der Lage ist die Evasionsmechanismen von mCMV zu überwinden und so die Antigenpräsentation zu fördern (Hengel et al. 1994; Fink et al. 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde in BALB/c.WT nach mCMV-Infektion und iNKT-Aktivierung eine frühere (bereits nach 24 Stunden) und erhöhte IFN γ -Ausschüttung detektiert. Die alleinige mCMV-Infektion führte hingegen sowohl im WT als auch in CD1d^{-/-} erst 36 Stunden nach Infektion zu einer deutlichen Erhöhung des IFN γ -Levels im Serum. Auffällig war, dass in BALB/c.CD1d^{-/-} die IFN γ -Serumkonzentration leicht verringert war. Gleiches war nach Aktivierung von iNKT-Zellen auch im WT 36 Stunden nach Infektion erkennbar (Abb.4.16). Diese Ergebnisse bestätigen publizierte Daten für C57BL/6 (Reilly et al. 2012). Während in BALB/c allerdings nur eine Reduktion erkennbar war, konnte in C57BL/6 zu diesem Zeitpunkt fast kein IFN γ mehr detektiert werden (Reilly et al. 2012). Die Frage, welchen Einfluss die frühere IFN γ -Induktion auf die Antigenpräsentation und das CD8 T-Zell*priming* hat, konnte in dieser Arbeit nicht abschließend beantwortet werden. Es kann jedoch spekuliert werden, dass eine frühe Überwindung der Immunevasion die frühe Erkennung der infizierten Zellen im LK analog zu dem bereits beschriebenen Immunevasionsparadox verbessert (siehe 5.1.3.). Dass die IFN γ -Expression von iNKT-Zellen im normalen Verlauf der mCMV-Immunkontrolle ohne zusätzliche Aktivierung keinen nennenswerten Einfluss auf die Überwindung der mCMV-Immunevasion hat zeigte sich jedoch darin, dass ein NKT-*knockout* keinen Einfluss auf die T-Zellfrequenzen hatte (Abb. 4.6). Möglicherweise ist die

ausgeschüttete Menge an IFN γ durch mCMV-aktivierte iNKT-Zellen zu gering, als dass ein Einfluss auf das CD8 T-Zell*priming* vermittelt durch eine IFN γ -induzierte Überwindung der vRAP-Schranke detektierbar wäre.

Zusätzlich vermittelt das von NKT-Zellen sekretierte IFN γ eine erhöhte Perforin-vermittelte Zytotoxizität sowie eine stärkere Produktion von IFN γ durch NK-Zellen (Eberl und MacDonald 2000; Hayakawa et al. 2001; Smyth et al. 2002). Perforin und IFN γ sind die Haupteffektormoleküle, die von NK-Zellen während der mCMV-Infektion produziert werden (Orange et al. 1995; Tay und Welsh 1997). Die rasche Induktion der IFN γ -Ausschüttung nach α GalCer-Gabe könnte daher auch die frühe Kontrolle der mCMV-Infektion durch NK-Zellen verbessern.

5.1.5. Kein therapeutischer Effekt von α GalCer nach Infektion mit mCMV- Δ vRAP in der Milz

Wie in dieser Arbeit gezeigt, reduziert eine α GalCer-Gabe den Virustiter von mCMV-WT.BAC^W in der Milz signifikant (Abb. 4.9). Interessanterweise wurde dieser Effekt bei einer Infektion mit mCMV- Δ vRAP aufgehoben (Abb. 4.19). Da die Depletion von CD8 T-Zellen nicht jedoch von NK-Zellen, den α GalCer-Effekt wiederherstellte, ist es wahrscheinlich, dass die effizientere CD8 T-Zellkontrolle bei Fehlen der vRAPs den Effekt überlagert und daher kein zusätzlicher Beitrag aktivierter iNKT-Zellen detektiert werden konnte. Das auch nach Doppeldepletion von CD8 T- und NK-Zellen ein positiver Einfluss der iNKT-Zellen erkennbar war zeigt dabei erneut, dass zumindest in der Milz aktivierte iNKT-Zellen einen eigenen Beitrag zur mCMV-Kontrolle leisten. In der Leber konnte immer eine signifikante Reduktion der Virustiter nach iNKT-Aktivierung nachgewiesen werden. Eine Depletion der NK- und/oder CD8 T-Zellen reduzierte jedoch den α GalCer-Effekt auf < 0,5 log-Stufe. Dies weist daraufhin, dass in der Leber auch die CD8 T-Zellen von der Aktivierung der iNKT-Zellen nach mCMV- Δ vRAP-Infektion profitieren. So wird die verbesserte Immunkontrolle nach Aktivierung der iNKT-Zellen anders als bei Van Dommelen, S. L. H. et al. vermutet, nicht ausschließlich über eine Transaktivierung der NK-Zellen vermittelt (Van Dommelen, S. L. H. et al. 2003; Van Dommelen, S. L. H. und Degli-Esposti 2004).

Im Zusammenhang mit der mCMV- Δ vRAP-Infektion konnten zudem signifikant erhöhte Virustiter in der Milz von Balb/c.CD1d^{-/-} an Tag 3 nach Infektion detektiert werden (Abb. 4.19). Bei Infektion mit mCMV.WT hatte der NKT-*knockout* hingegen kaum Einfluss auf die mCMV-Kontrolle (Abb. 4.6 und Abb. 4.9). Wie bereits unter 5.1.1. diskutiert, konnte in naiven CD1d^{-/-}-Mäusen eine reduzierte Zahl von CD8 T-Zellen detektiert werden sowie eine vermutlich dadurch beeinflusste Kontrolle einer RSV-Infektion (Johnson et al. 2002). So

liegt es nahe, dass die verschlechterte Kontrolle von mCMV- Δ vRAP auf diese Reduktion der CD8 T-Zellen in CD1d^{-/-}-Mäusen zurückzuführen ist.

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit einen direkten Zusammenhang zwischen der Aktivierung von iNKT-Zellen und einer verbesserten mCMV-Immunkontrolle herstellen. Abbildung 5.2. zeigt dabei mögliches ein Modell zu den verschiedenen Effekten der iNKT-Aktivierung. Der positive Effekt von α GalCer wird dabei von iNKT-Zellen sowie zumindest in der Leber zusätzlich auch über eine Transaktivierung der NK-Zellen vermittelt. Weiterhin führt die Aktivierung von iNKT-Zellen zu einer erhöhten viralen Transkription im LK was vermutlich in einer frühen effizienteren CD8 T-Zellkontrolle resultiert. Dies hat eine verringerte Bereitstellung von viralen Antigenen und eine reduzierte CD8 T-Zellexpansion zur Folge. Ob diese Hypothese greift muss jedoch noch durch Untersuchungen zur Kinetik der CD8 T-Zellfrequenzen, zur viralen Transkription im LK sowie zur viralen Replikation bestätigt werden. Die Aktivierung von iNKT-Zellen sollte dabei zu Beginn der Infektion zu erhöhten viralen Transkripten führen, welche im Verlauf der Zeit deutlich abnehmen. Gleichzeitig sollte früh ein verbessertes CD8 T-Zell*priming* sichtbar sein. Die Viruslast zu späteren Zeitpunkten wäre zudem geringer, begründet durch die früh einsetzende T-Zellkontrolle. Im Gegensatz dazu sollten ohne iNKT-Aktivierung die viralen Transkripte erst zu einem späteren Zeitpunkt ansteigen. Die CD8 T-Zellfrequenzen und die virale Replikation wären im Vergleich erhöht (siehe Abb. 5.2.).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass aktivierte iNKT-Zellen den Verlauf einer mCMV-Infektion beeinflussen können. Neben einer eigenen, direkten Wirkung konnte auch ein Einfluss auf die NK-Zell- (insbesondere in der Leber) als auch auf die CD8 T-Zellantwort gezeigt werden. Das in dieser Arbeit postulierte Modell (Abb. 5.2.), welches an die Befunde von Böhm et al. 2008b sowie Mitrović et al. 2012 anknüpft, muss dabei durch weitere Versuche verifiziert werden.

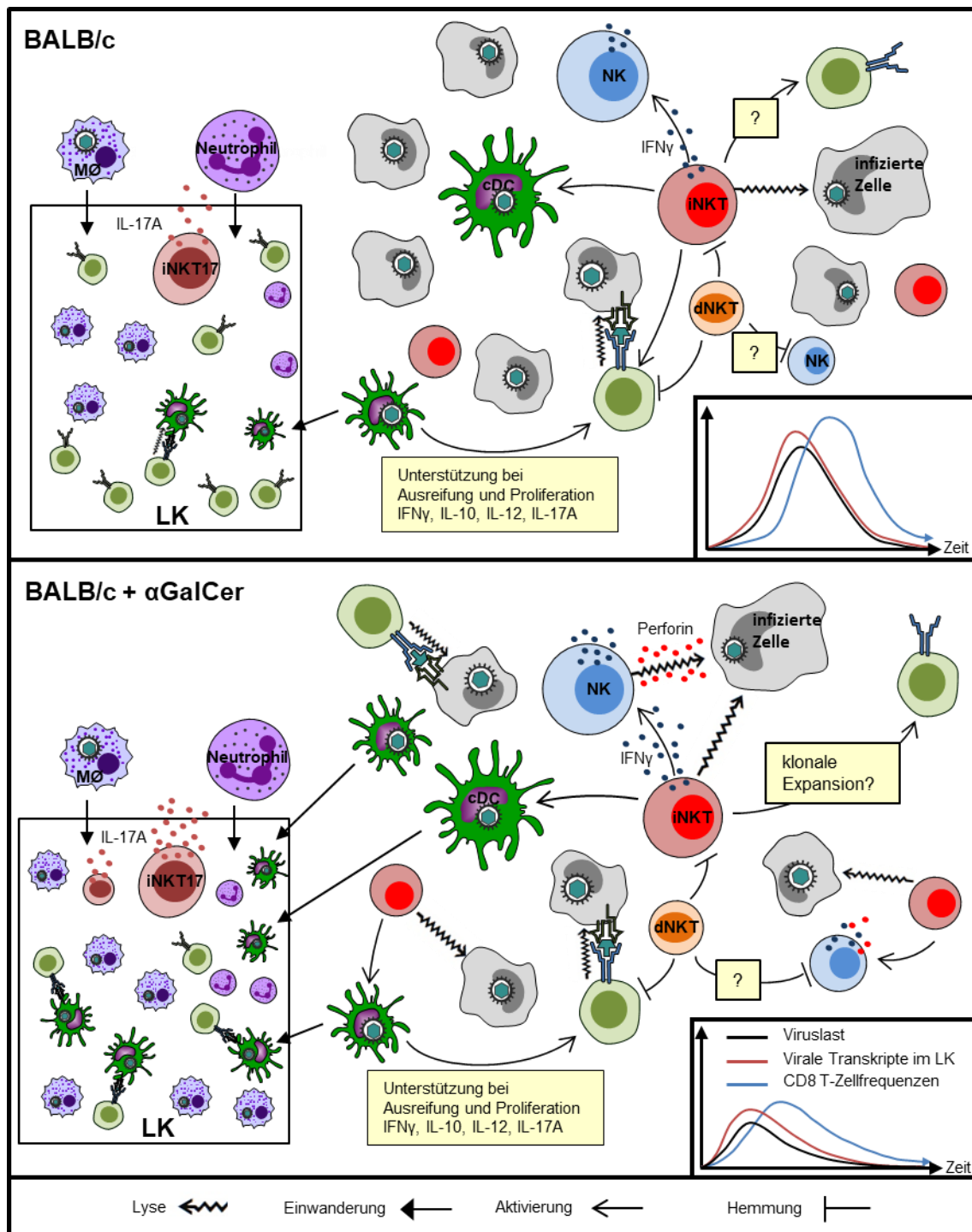


Abbildung 5.2: Modell des iNKT-Netzwerkes nach Aktivierung der iNKT-Zellen in der mCMV-Infektion.

Die Aktivierung von iNKT-Zellen führt zur Proliferation sowie einer stärkeren zytotoxischen Aktivität gegen mCMV-infizierte Zellen, was in einer verbesserten frühen Immunkontrolle resultiert. Die Ausschüttung von IFN γ durch iNKT-Zellen führt dabei vermutlich, insbesondere in der Leber, auch zu einer Transaktivierung der NK-Zellen und einer erhöhten Perforin-vermittelten Zytotoxizität. Weiterhin führt die Aktivierung von iNKT-Zellen zu einer erhöhten viralen Transkription im peripheren Lymphknoten. Unter anderem kann dabei die Aktivierung von iNKT17-Zellen im LK und deren Expression von IL17A, welches die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in den LK fördert, zu der erhöhten viralen Transkription beitragen. Zudem aktivieren iNKT-Zellen cDCs, welche eine wichtige Quelle von infektiösem Virus sind, was die CD8 T-Zellausreifung stimuliert. Auch beeinflussen aktivierte iNKT-Zellen möglicherweise positiv die frühe CD8 T-Zell-expansion. Dies resultiert in einem früh verbesserten CD8 T-Zell-priming. All dies führt zu einer effizienteren frühen Viruskontrolle. Die daraus resultierende verringerten Bereitstellung von Antigenen über professionelle APCs führt zudem zu einer verringerten CD8 T-Zell-expansion zu späteren Zeitpunkten der Infektion, was in reduzierten T-Zellfrequenzen messbar ist.

5.2. mCMV-kodiertes iNKT-Immunevasin

Cytomegaloviren sind dafür bekannt, Immunantworten ihres jeweiligen Wirtes zu modulieren. So kodieren sie für immunevasive Proteine, welche der effektiven Immunkontrolle des Wirtes entgegenwirken (Reddehase 2002). Sowohl für NK- als auch CD8 T-Zellen konnten bereits verschiedene Immunevasionsstrategien beschrieben werden (siehe 1.4.). Dass iNKT-Zellen Einfluss auf die mCMV-Kontrolle haben, zeigt die vorliegende Arbeit. Zudem haben iNKT-Zellen Eigenschaften von T- als auch von NK-Zellen, so dass die Vermutung nahe liegt, dass auch gegen die iNKT-Zellen ein Immunevasionsprotein exprimiert wird. Weiterhin konnte für HCMV ein Immunevasin charakterisiert werden, welches die Aktivität von iNKT-Zellen reguliert (Han et al. 2013). Aufgrund der zahlreichen Homologien zwischen HCMV und mCMV (Reddehase 2002) unterstützt das Vorhandensein eines durch HCMV-kodierten Immunevasins für iNKT-Zellen die These, dass ein solches auch von mCMV kodiert wird (siehe auch 1.3., 1.4., 1.5.6. und 1.5.7.). Für die HCMV-Infektion wurde bisher noch keine Regulation der CD1d-Expression beschrieben, jedoch konnte für die humanen Gruppe 1 CD1-Moleküle (CD1a, CD1b und CD1c) eine Regulation durch HCMV nachgewiesen werden (Rafferty et al. 2008). Zudem haben andere Viren Mechanismen entwickelt, die CD1d-vermittelte Lipidpräsentation mittels Immunevasion zu blockieren, beispielsweise HIV, HSV-1, HPV oder KSHV (siehe auch 1.5.6.). So handelt es sich bei der Modulation des intrazellulären Transports von Immunrezeptoren um ein bekanntes Immunevasionsprinzip. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Einfluss einer mCMV-Infektion auf die CD1d-Expression untersucht.

5.2.1. CD1d wird nach mCMV-Infektion von der Oberfläche von MEFs runterreguliert

CD1d wird konstitutiv von zahlreichen Zelltypen exprimiert (Brigl und Brenner 2004). Interessanterweise führte die Infektion von MEFs mit mCMV zu einer Reduktion der CD1d-Expression von der Zelloberfläche (siehe Abb. 4.20). In der Literatur wurde bisher für die mCMV-Infektion eine größere Bedeutung der Zytokin-vermittelten Aktivierung von iNKT-Zellen zugeschrieben (Wesley et al. 2008; Tyznik et al. 2008). Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, dass mCMV eine effiziente Regulation von CD1d von der Zelloberfläche initiiert, wodurch dieser Aktivierungsweg verhindert wird. Nicht auszuschließen ist zudem, dass die CD1d-Expression, ähnlich wie die MHC-I-Präsentation, auf infizierten MEFs erhöht wird, diese aber durch die Expression eines Immunevasins wieder kaschiert wird. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des CD1d-Moleküls mit dem MHC-I-Molekül wurde überprüft, ob eines der drei bekannten vRAPs *m04*, *m06* und *m152* auch die Präsentation des CD1d-Moleküls auf der Zelloberfläche von MEFs beeinflusst.

Dabei zeigte sich, dass die drei bekannten MHC-I Immunevasionsproteine keinen Einfluss auf die CD1d-Oberflächenpräsentation hatten (Abb. 4.20).

5.2.2. Großräumige mCMV-Deletionsmutanten konnten hergestellt werden

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten des CD1d- zum MHC-Molekül liegt es nahe, dass ein mögliches CD1d-regulierendes Immunevasin ähnliche Funktionen und einen ähnlichen Aufbau besitzt, wie die MHC-I regulierenden vRAPs. Um den Genort eines möglichen CD1d-regulierenden Immunevasins näher einzuschränken wurden daher großräumige Deletionsmutanten für die Genfamilien m02 und m145, in welchen die drei vRAPs kodiert werden, hergestellt (siehe auch Abb. 4.21). Zum Zeitpunkt dieser Arbeit konnten alle hergestellten Virusrekombinanten bis auf mCMV- Δ m141-m150 in MEF rekonstituiert werden. Für die Deletion von m141 wurde eine reduzierte Replikation in Makrophagen und der Milz beschrieben (Hanson et al. 2001), was ein möglicher Grund für die erschwerte Rekonstitution sein könnte.

Da die auf MEF detektierte CD1d-Expression nicht sehr stark ist, ist das in dieser Arbeit entwickelte System fehleranfällig. Für MHC-I-Moleküle ist bekannt, dass durch IFN γ die MHC-I-Expression verstärkt wird. IFN γ ist dabei alleine für eine optimale MHC-Expression ausreichend (Boehm et al. 1997; Kloetzel 2004; Fink et al. 2012). Auch die CD1d-Expression kann durch IFN γ verstärkt werden, für eine optimale Expression wird jedoch ein weiteres Signal in Form von mikrobiellen Antigenen oder des proinflammatorischen Zytokins TNF benötigt (Sköld et al. 2005). Möglicherweise gelingt eine Steigerung der CD1d-Oberflächenpräsentation auf MEFs durch vorherige Stimulation mit IFN γ und TNF. Dies könnte eine Regulation der CD1d-Expression durch mCMV deutlich sichtbarer und so das hier entwickelte System robuster machen.

Eine weitere Möglichkeit nach einem CD1d-regulierenden Immunevasin zu *screenen*, ist die Herstellung von stabil CD1d-überexprimierenden COS7- oder NIH3T3-Zellen. In solchen Zelllinien wäre zudem das *Screenen* mit der mCMV-ORF-*Library* (Munks et al. 2006b) möglich, mit dem Vorteil dass so alle ORFs des mCMV-Genoms einzeln auf ihren Einfluss auf die CD1d-Expression analysiert werden könnten. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit konnte eine solch stabil transfizierte Zelllinie jedoch nicht erfolgreich hergestellt werden (Daten nicht gezeigt).

In dieser Arbeit wurden die Grundlagen geschaffen, um ein mögliches CD1d-regulierendes Immunevasin zu identifizieren. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass mCMV auch ein Immunevasin kodiert, welches sich zwar auf den Aktivierungsstatus von iNKT-Zellen

auswirkt, nicht jedoch auf die CD1d-Expression. Da ein auf diese Weise wirkendes Immunevasin mit dem in dieser Arbeit etablierten System nicht erfasst werden würde, sollten zukünftige Arbeiten auch einen Versuchsaufbau für die Erfassung des Aktivierungsstatus der iNKT-Zellen berücksichtigen.

5.3. Fazit und Ausblick

iNKT-Zellen sind aufgrund ihrer Fähigkeit sowohl mit dem angeborenen als auch mit dem adaptiven Immunsystem in Kontakt zu treten ein attraktiver Kandidat, um die Immunantwort gegen die CMV-Infektion zu modulieren. Über ihre Vielfalt an Subtypen und Effektorfunktionen sind iNKT-Zellen in der Lage, sich an der Immunreaktion gegen zahlreiche Infektionen zu beteiligen, wobei sie diese sowohl supprimieren als auch fördern können. In dieser Arbeit konnten grundlegende Erkenntnisse über den Einfluss von iNKT-Zellen auf die mCMV-Immunkontrolle gewonnen werden. Das dabei entwickelte Modell zeigt ein mögliches Zusammenspiel zwischen den verschiedenen Zelltypen. Eine Bestätigung dieses Modells bleibt dabei Aufgabe zukünftiger Arbeiten. Auch die Frage nach einem mCMV-kodierten Immunevasin konnte nicht abschließend beantwortet werden.

Insbesondere in immunsupprimierten Patienten kann die HCMV-Infektion schwerwiegende Auswirkungen haben. In klinischen Studien wurde dabei gezeigt, dass die Kontrolle der HCMV-Infektion nach KMT mit der Rekonstitution virusspezifischer CD8 T-Zellen korreliert (Reusser et al. 1991). Eine noch zu beantwortende Fragestellung ist, inwieweit in diesem Patientenkollektiv die Aktivierung von radioresistenten iNKT-Zellen vor einer CMV-Infektion schützen und so helfen würde den Zeitraum zu überbrücken bis CD8 T-Zellen rekonstituiert sind. Zu beachten ist jedoch, dass eine iNKT-Zellaktivierung protektiv ist, eine chronische oder exzessive Überaktivierung aber zu schwerwiegenden Gewebeschäden führen kann (Santodomingo-Garzon und Swain 2011).

Diskutiert wurden iNKT-Zellen auch im Zusammenhang mit einer Impfantwort, bei der sie möglicherweise eine Adjuvanz-ähnliche Stimulation leisten könnten (zur Übersicht: Crosby und Kronenberg 2018). Es bleibt offen, inwieweit eine in dieser Arbeit diskutierte früh verbesserte T-Zellantwort Einfluss auf das T-Zell-Memory-Kompartiment hat und damit für die langfristige Immunität gegen CMV von Bedeutung ist.

Die vorliegende Arbeit gibt nähere Einblicke, wie das iNKT-Zell-Netzwerk in die Immunkontrolle gegen mCMV eingreift. Inwieweit davon auch zukünftige Therapien bis hin zu einer Impfung profitieren können, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen. Dennoch sind iNKT-Zellen ein interessanter Kandidat für die weitere CMV-Immuntherapie.

6. Literaturverzeichnis

- Adland, E.; Klenerman, P.; Goulder, P.; Matthews, P. C. (2015): Ongoing burden of disease and mortality from HIV/CMV coinfection in Africa in the antiretroviral therapy era. In: *Frontiers in microbiology* 6, S. 1016. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01016.
- Aguilar, O. A.; Berry, R.; Rahim, M. M. A.; Reichel, J. J.; Popović, B.; Tanaka, M. et al. (2017): A Viral Immuno-evasin Controls Innate Immunity by Targeting the Prototypical Natural Killer Cell Receptor Family. In: *Cell* 169 (1), 58-71.e14. DOI: 10.1016/j.cell.2017.03.002.
- Akira, S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O. (2006): Pathogen recognition and innate immunity. In: *Cell* 124 (4), S. 783–801. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.015.
- Alcami, A.; Koszinowski, U. H. (2000): Viral mechanisms of immune evasion. In: *Trends in microbiology* 8 (9), S. 410–418. DOI: 10.1016/s0966-842x(00)01830-8.
- Allan, J. E.; Shellam, G. R. (1984): Genetic control of murine cytomegalovirus infection. Virus titres in resistant and susceptible strains of mice. In: *Archives of virology* 81 (1-2), S. 139–150. DOI: 10.1007/BF01309303.
- Allan, L. L.; Stax, A. M.; Zheng, D.-J.; Chung, B. K.; Kozak, F. K.; Tan, R.; van den Elzen, P. (2011): CD1d and CD1c expression in human B cells is regulated by activation and retinoic acid receptor signaling. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 186 (9), S. 5261–5272. DOI: 10.4049/jimmunol.1003615.
- Alterio de Goss, M.; Holtappels, R.; Steffens, H. P.; Podlech, J.; Angele, P.; Dreher, L. et al. (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. In: *Journal of virology* 72 (10), S. 7733–7744. DOI: 10.1128/JVI.72.10.7733-7744.1998.
- Altfeld, M.; Fadda, L.; Frleta, D.; Bhardwaj, N. (2011): DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1. In: *Nature reviews. Immunology* 11 (3), S. 176–186. DOI: 10.1038/nri2935.
- Amano, M.; Baumgarth, N.; Dick, M. D.; Brossay, L.; Kronenberg, M.; Herzenberg, L. A.; Strober, S. (1998): CD1 expression defines subsets of follicular and marginal zone B cells in the spleen: beta 2-microglobulin-dependent and independent forms. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 161 (4), S. 1710–1717.
- Andrews, D. M.; Estcourt, M. J.; Andoniou, C. E.; Wikstrom, M. E.; Khong, A.; Voigt, V. et al. (2010): Innate immunity defines the capacity of antiviral T cells to limit persistent infection. In: *The Journal of experimental medicine* 207 (6), S. 1333–1343. DOI: 10.1084/jem.20091193.
- Appay, V.; Rowland-Jones, S. L. (2001): RANTES: a versatile and controversial chemokine. In: *Trends in immunology* 22 (2), S. 83–87. DOI: 10.1016/S1471-4906(00)01812-3.
- Arapović, J.; Lenac Roviš, T.; Reddy, A. B.; Krmpotić, A.; Jonjić, S. (2009): Promiscuity of MCMV immuno-evasin of NKG2D. M138/fcr-1 down-modulates RAE-1epsilon in addition to MULT-1 and H60. In: *Molecular immunology* 47 (1), S. 114–122. DOI: 10.1016/j.molimm.2009.02.010.

- Arase, H.; Mocarski, E. S.; Campbell, A. E.; Hill, A. B.; Lanier, L. L. (2002): Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. In: *Science (New York, N.Y.)* 296 (5571), S. 1323–1326. DOI: 10.1126/science.1070884.
- Arens, R.; Wang, P.; Sidney, J.; Loewendorf, A.; Sette, A.; Schoenberger, S. P. et al. (2008): Cutting edge. Murine cytomegalovirus induces a polyfunctional CD4 T cell response. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180 (10), S. 6472–6476. DOI: 10.4049/jimmunol.180.10.6472.
- Ashkar, A. A.; Rosenthal, K. L. (2003): Interleukin-15 and natural killer and NKT cells play a critical role in innate protection against genital herpes simplex virus type 2 infection. In: *Journal of virology* 77 (18), S. 10168–10171. DOI: 10.1128/jvi.77.18.10168-10171.2003.
- Babić, M.; Pyzik, M.; Zafirova, B.; Mitrović, M.; Butorac, V.; Lanier, L. L. et al. (2010): Cytomegalovirus immunoevasin reveals the physiological role of "missing self" recognition in natural killer cell dependent virus control in vivo. In: *The Journal of experimental medicine* 207 (12), S. 2663–2673. DOI: 10.1084/jem.20100921.
- Baev, D. V.; Peng, Xi.-H.; Song, L.; Barnhart, J. R.; Crooks, G. M.; Weinberg, K. I.; Metelitsa, L. S. (2004): Distinct homeostatic requirements of CD4+ and CD4- subsets of Valpha24-invariant natural killer T cells in humans. In: *Blood* 104 (13), S. 4150–4156. DOI: 10.1182/blood-2004-04-1629.
- Bai, L.; Deng, S.; Reboulet, R.; Mathew, R.; Teyton, L.; Savage, P. B.; Bendelac, A. (2013): Natural killer T (NKT)-B-cell interactions promote prolonged antibody responses and long-term memory to pneumococcal capsular polysaccharides. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (40), S. 16097–16102. DOI: 10.1073/pnas.1303218110.
- Balashov, K. E.; Rottman, J. B.; Weiner, H. L.; Hancock, W. W. (1999): CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (12), S. 6873–6878. DOI: 10.1073/pnas.96.12.6873.
- Baldick, C. J.; Shenk, T. (1996): Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles. In: *Journal of virology* 70 (9), S. 6097–6105. DOI: 10.1128/JVI.70.9.6097-6105.1996.
- Balthesen, M.; Messerle, M.; Reddehase, M. J. (1993): Lungs are a major organ site of cytomegalovirus latency and recurrence. In: *Journal of virology* 67 (9), S. 5360–5366. DOI: 10.1128/JVI.67.9.5360-5366.1993.
- Bandyopadhyay, K.; Marrero, I.; Kumar, V. (2016): NKT cell subsets as key participants in liver physiology and pathology. In: *Cellular & molecular immunology* 13 (3), S. 337–346. DOI: 10.1038/cmi.2015.115.
- Barral, D. C.; Brenner, M. B. (2007): CD1 antigen presentation: how it works. In: *Nature reviews. Immunology* 7 (12), S. 929–941. DOI: 10.1038/nri2191.
- Barral, P.; Polzella, P.; Bruckbauer, A.; van Rooijen, N.; Besra, G. S.; Cerundolo, V.; Batista, F. D. (2010): CD169(+) macrophages present lipid antigens to mediate early activation of iNKT cells in lymph nodes. In: *Nature immunology* 11 (4), S. 303–312. DOI: 10.1038/ni.1853.

- Bassiri, H.; Das, R.; Guan, P.; Barrett, D. M.; Brennan, P. J.; Banerjee, P. P. et al. (2014): iNKT cell cytotoxic responses control T-lymphoma growth in vitro and in vivo. In: *Cancer immunology research* 2 (1), S. 59–69. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0104.
- Bates, M.; Brantsaeter, A. B. (2016): Human cytomegalovirus (CMV) in Africa: a neglected but important pathogen. In: *Journal of virus eradication* 2 (3), S. 136–142. DOI: 10.1016/S2055-6640(20)30456-8.
- Becher, B.; Tugues, S.; Greter, M. (2016): GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. In: *Immunity* 45 (5), S. 963–973. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.10.026.
- Beckman, E. M.; Porcelli, S. A.; Morita, C. T.; Behar, S. M.; Furlong, S. T.; Brenner, M. B. (1994): Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. In: *Nature* 372 (6507), S. 691–694. DOI: 10.1038/372691a0.
- Bendelac, A. (1995): Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. In: *The Journal of experimental medicine* 182 (6), S. 2091–2096. DOI: 10.1084/jem.182.6.2091.
- Bendelac, A.; Savage, P. B.; Teyton, L. (2007): The biology of NKT cells. In: *Annual review of immunology* 25, S. 297–336. DOI: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711.
- Benlagha, K.; Kyin, T.; Beavis, A.; Teyton, L.; Bendelac, A. (2002): A thymic precursor to the NK T cell lineage. In: *Science (New York, N.Y.)* 296 (5567), S. 553–555. DOI: 10.1126/science.1069017.
- Benlagha, K.; Weiss, A.; Beavis, A.; Teyton, L.; Bendelac, A. (2000): In vivo identification of glycolipid antigen-specific T cells using fluorescent CD1d tetramers. In: *The Journal of experimental medicine* 191 (11), S. 1895–1903. DOI: 10.1084/jem.191.11.1895.
- Berry, R.; Watson, G. M.; Jonjic, S.; Degli-Esposti, M. A.; Rossjohn, J. (2020): Modulation of innate and adaptive immunity by cytomegaloviruses. In: *Nature reviews. Immunology* 20 (2), S. 113–127. DOI: 10.1038/s41577-019-0225-5.
- Berzins, S. P.; Cochrane, A. D.; Pellicci, D. G.; Smyth, M. J.; Godfrey, D. I. (2005): Limited correlation between human thymus and blood NKT cell content revealed by an ontogeny study of paired tissue samples. In: *European journal of immunology* 35 (5), S. 1399–1407. DOI: 10.1002/eji.200425958.
- Berzofsky, J. A.; Terabe, M. (2008): NKT cells in tumor immunity: opposing subsets define a new immunoregulatory axis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180 (6), S. 3627–3635. DOI: 10.4049/jimmunol.180.6.3627.
- Birkholz, A. M.; Kronenberg, M. (2015): Antigen specificity of invariant natural killer T-cells. In: *Biomedical journal* 38 (6), S. 470–483. DOI: 10.1016/j.bj.2016.01.003.
- Birnboim, H. C.; Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. In: *Nucleic acids research* 7 (6), S. 1513–1523. DOI: 10.1093/nar/7.6.1513.
- Biron, C. A. (1999): Initial and innate responses to viral infections--pattern setting in immunity or disease. In: *Current opinion in microbiology* 2 (4), S. 374–381. DOI: 10.1016/s1369-5274(99)80066-6.
- Biron, C. A.; Byron, K. S.; Sullivan, J. L. (1989): Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. In: *The New England journal of medicine* 320 (26), S. 1731–1735. DOI: 10.1056/NEJM198906293202605.

- Biron, C. A.; Su, H. C.; Orange, J. S. (1996): Function and Regulation of Natural Killer (NK) Cells during Viral Infections. Characterization of Responses in Vivo. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 9 (2), S. 379–393. DOI: 10.1006/meth.1996.0043.
- Biron, K. K. (2006): Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. In: *Antiviral research* 71 (2-3), S. 154–163. DOI: 10.1016/j.antiviral.2006.05.002.
- Boeckh, M.; Geballe, A. P. (2011): Cytomegalovirus. Pathogen, paradigm, and puzzle. In: *The Journal of clinical investigation* 121 (5), S. 1673–1680. DOI: 10.1172/JCI45449.
- Boehm, U.; Klamp, T.; Groot, M.; Howard, J. C. (1997): Cellular responses to interferon-gamma. In: *Annual review of immunology* 15, S. 749–795. DOI: 10.1146/annurev.immunol.15.1.749.
- Böhm, V.; Podlech, J.; Thomas, D.; Deegen, P.; Pahl-Seibert, M.-F.; Lemmermann, N. A. W. et al. (2008a): Epitope-specific in vivo protection against cytomegalovirus disease by CD8 T cells in the murine model of preemptive immunotherapy. In: *Medical Microbiology and Immunology* 197 (2), S. 135–144. DOI: 10.1007/s00430-008-0092-3.
- Böhm, V.; Simon, C. O.; Podlech, J.; Seckert, C. K.; Gendig, D.; Deegen, P. et al. (2008b): The immune evasion paradox. Immuno-evasins of murine cytomegalovirus enhance priming of CD8 T cells by preventing negative feedback regulation. In: *Journal of virology* 82 (23), S. 11637–11650. DOI: 10.1128/JVI.01510-08.
- Boppana, S. B.; Pass, R. F.; Britt, W. J.; Stagno, S.; Alford, C. A. (1992): Symptomatic congenital cytomegalovirus infection. Neonatal morbidity and mortality. In: *The Pediatric infectious disease journal* 11 (2), S. 93–99. DOI: 10.1097/00006454-199202000-00007.
- Boppana, S. B.; Ross, S. A.; Shimamura, M.; Palmer, A. L.; Ahmed, A.; Michaels, M. G. et al. (2011): Saliva polymerase-chain-reaction assay for cytomegalovirus screening in newborns. In: *The New England journal of medicine* 364 (22), S. 2111–2118. DOI: 10.1056/NEJMoa1006561.
- Borg, N. A.; Wun, K. S.; Kjer-Nielsen, L.; Wilce, M. C. J.; Pellicci, D. G.; Koh, R. et al. (2007): CD1d-lipid-antigen recognition by the semi-invariant NKT T-cell receptor. In: *Nature* 448 (7149), S. 44–49. DOI: 10.1038/nature05907.
- Bowie, A. G.; Hago, I. R. (2005): The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. In: *Molecular immunology* 42 (8), S. 859–867. DOI: 10.1016/j.molimm.2004.11.007.
- Bradbury, A.; Belt, K. T.; Neri, T. M.; Milstein, C.; Calabi, F. (1988): Mouse CD1 is distinct from and co-exists with TL in the same thymus. In: *The EMBO journal* 7 (10), S. 3081–3086. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1988.tb03173.x.
- Brennan, K.; Bowie, A. G. (2010): Activation of host pattern recognition receptors by viruses. In: *Current opinion in microbiology* 13 (4), S. 503–507. DOI: 10.1016/j.mib.2010.05.007.
- Brennan, P. J.; Brigl, M.; Brenner, M. B. (2013): Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. In: *Nature reviews. Immunology* 13 (2), S. 101–117. DOI: 10.1038/nri3369.
- Brigl, M.; Brenner, M. B. (2004): CD1: antigen presentation and T cell function. In: *Annual review of immunology* 22, S. 817–890. DOI: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104608.
- Brigl, M.; Brenner, M. B. (2010): How invariant natural killer T cells respond to infection by recognizing microbial or endogenous lipid antigens. In: *Seminars in immunology* 22 (2), S. 79–86. DOI: 10.1016/j.smim.2009.10.006.

- Brigl, M.; Bry, L.; Kent, S. C.; Gumperz, J. E.; Brenner, M. B. (2003): Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. In: *Nature immunology* 4 (12), S. 1230–1237. DOI: 10.1038/ni1002.
- Britt, W. (2015): Controversies in the natural history of congenital human cytomegalovirus infection. The paradox of infection and disease in offspring of women with immunity prior to pregnancy. In: *Medical Microbiology and Immunology* 204 (3), S. 263–271. DOI: 10.1007/s00430-015-0399-9.
- Britt, W. J.; Mach, M. (1996): Human cytomegalovirus glycoproteins. In: *Intervirology* 39 (5-6), S. 401–412. DOI: 10.1159/000150510.
- Britt, W. J. (2011): Cytomegalovirus. In: Remington J. S. et al. (eds.): *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn*. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; chapter 23, S. 707–745.
- Bronke, C.; Palmer, N. M.; Jansen, C. A.; Westerlaken, G. H. A.; Polstra, A. M.; Reiss, P. et al. (2005): Dynamics of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells in HIV-1-infected individuals progressing to AIDS with CMV end-organ disease. In: *The Journal of infectious diseases* 191 (6), S. 873–880. DOI: 10.1086/427828.
- Brossay, L.; Chioda, M.; Burdin, N.; Koezuka, Y.; Casorati, G.; Dellabona, P.; Kronenberg, M. (1998): CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution. In: *The Journal of experimental medicine* 188 (8), S. 1521–1528. DOI: 10.1084/jem.188.8.1521.
- Brown, M. G.; Dokun, A. O.; Heusel, J. W.; Smith, H. R.; Beckman, D. L.; Blattenberger, E. A. et al. (2001): Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. In: *Science (New York, N.Y.)* 292 (5518), S. 934–937. DOI: 10.1126/science.1060042.
- Bubić, I.; Wagner, M.; Krmpotić, A.; Saulig, T.; Kim, S.; Yokoyama, W. M. et al. (2004): Gain of virulence caused by loss of a gene in murine cytomegalovirus. In: *Journal of virology* 78 (14), S. 7536–7544. DOI: 10.1128/JVI.78.14.7536-7544.2004.
- Buechel, H. M.; Stradner, M. H.; D'Cruz, L. M. (2015): Stages versus subsets: Invariant Natural Killer T cell lineage differentiation. In: *Cytokine* 72 (2), S. 204–209. DOI: 10.1016/j.cyto.2014.12.005.
- Bühler, B.; Keil, G. M.; Weiland, F.; Koszinowski, U. H. (1990): Characterization of the murine cytomegalovirus early transcription unit e1 that is induced by immediate-early proteins. In: *Journal of virology* 64 (5), S. 1907–1919. DOI: 10.1128/JVI.64.5.1907-1919.1990.
- Bukowski, J. F.; Welsh, R. M. (1985a): Inability of interferon to protect virus-infected cells against lysis by natural killer (NK) cells correlates with NK cell-mediated antiviral effects in vivo. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 135 (5), S. 3537–3541.
- Bukowski, J. F.; Welsh, R. M. (1985b): Interferon enhances the susceptibility of virus-infected fibroblasts to cytotoxic T cells. In: *The Journal of experimental medicine* 161 (1), S. 257–262. DOI: 10.1084/jem.161.1.257.
- Busche, A.; Angulo, A.; Kay-Jackson, P.; Ghazal, P.; Messerle, M. (2008): Phenotypes of major immediate-early gene mutants of mouse cytomegalovirus. In: *Medical Microbiology and Immunology* 197 (2), S. 233–240. DOI: 10.1007/s00430-008-0076-3.

- Campbell, A. E.; Cavanaugh, V. J.; Slater, J. S. (2008): The salivary glands as a privileged site of cytomegalovirus immune evasion and persistence. In: *Medical Microbiology and Immunology* 197 (2), S. 205–213. DOI: 10.1007/s00430-008-0077-2.
- Cannon, M. J.; Davis, K. F. (2005): Washing our hands of the congenital cytomegalovirus disease epidemic. In: *BMC Public Health* 5, S. 70. DOI: 10.1186/1471-2458-5-70.
- Cannon, M. J.; Pellett, P. E. (2005): Risk of congenital cytomegalovirus infection. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 40 (11), 1701-2; author reply 1702-3. DOI: 10.1086/430172.
- Carnaud, C.; Lee, D.; Donnars, O.; Park, S. H.; Beavis, A.; Koezuka, Y.; Bendelac, A. (1999): Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 163 (9), S. 4647–4650.
- Cernadas, M.; Sugita, M.; van der Wel, N.; Cao, X.; Gumperz, J. E.; Maltsev, S. et al. (2003): Lysosomal localization of murine CD1d mediated by AP-3 is necessary for NK T cell development. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 171 (8), S. 4149–4155.
- Champsaur, M.; Lanier, L. L. (2010): Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. In: *Immunological reviews* 235 (1), S. 267–285. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2010.00893.x.
- Chang, D. H.; Deng, H.; Matthews, P.; Krasovsky, J.; Ragupathi, G.; Spisek, R. et al. (2008): Inflammation-associated lysophospholipids as ligands for CD1d-restricted T cells in human cancer. In: *Blood* 112 (4), S. 1308–1316. DOI: 10.1182/blood-2008-04-149831.
- Chang, P.-P.; Barral, P.; Fitch, J.; Pratama, A.; Ma, C. S.; Kallies, A. et al. (2011): Identification of Bcl-6-dependent follicular helper NKT cells that provide cognate help for B cell responses. In: *Nature immunology* 13 (1), S. 35–43. DOI: 10.1038/ni.2166.
- Chávez-Galán, L.; Arenas-Del Angel, M. C.; Zenteno, E.; Chávez, R.; Lascurain, R. (2009): Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. In: *Cellular & molecular immunology* 6 (1), S. 15–25. DOI: 10.1038/cmi.2009.3.
- Chemaly, R. F.; Ullmann, A. J.; Stoelben, S.; Richard, M. P.; Bornhäuser, M.; Groth, C. et al. (2014): Letermovir for cytomegalovirus prophylaxis in hematopoietic-cell transplantation. In: *The New England journal of medicine* 370 (19), S. 1781–1789. DOI: 10.1056/NEJMoa1309533.
- Chen, D. H.; Jiang, H.; Lee, M.; Liu, F.; Zhou, Z. H. (1999a): Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. In: *Virology* 260 (1), S. 10–16. DOI: 10.1006/viro.1999.9791.
- Chen, N.; McCarthy, C.; Drakesmith, H.; Li, D.; Cerundolo, V.; McMichael, A. J. et al. (2006): HIV-1 down-regulates the expression of CD1d via Nef. In: *European journal of immunology* 36 (2), S. 278–286. DOI: 10.1002/eji.200535487.
- Chen, Y. H.; Chiu, N. M.; Mandal, M.; Wang, N.; Wang, C. R. (1997): Impaired NK1+ T cell development and early IL-4 production in CD1-deficient mice. In: *Immunity* 6 (4), S. 459–467. DOI: 10.1016/s1074-7613(00)80289-7.
- Chen, Y. H.; Wang, B.; Chun, T.; Zhao, L.; Cardell, S.; Behar, S. M. et al. (1999b): Expression of CD1d2 on thymocytes is not sufficient for the development of NK T cells in CD1d1-deficient mice. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 162 (8), S. 4560–4566.

- Chien, Y.-H.; Meyer, C.; Bonneville, M. (2014): $\gamma\delta$ T cells. First line of defense and beyond. In: *Annual review of immunology* 32, S. 121–155. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120216.
- Cho, S.; Jun, Y. (2011): Human CD1d molecules are resistant to human cytomegalovirus US2- and US11-mediated degradation. In: *Biochemical and biophysical research communications* 413 (4), S. 616–622. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.09.013.
- Cho, S.; Knox, K. S.; Kohli, L. M.; He, J. J.; Exley, M. A.; Wilson, S. B.; Brutkiewicz, R. R. (2005): Impaired cell surface expression of human CD1d by the formation of an HIV-1 Nef/CD1d complex. In: *Virology* 337 (2), S. 242–252. DOI: 10.1016/j.virol.2005.04.020.
- Chou, S. W. (2001): Cytomegalovirus drug resistance and clinical implications. In: *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society* 3 Suppl 2, S. 20–24. DOI: 10.1034/j.1399-3062.2001.00004.x.
- Chun, T.; Page, M. J.; Gapin, L.; Matsuda, J. L.; Xu, H.; Nguyen, H. et al. (2003): CD1d-expressing dendritic cells but not thymic epithelial cells can mediate negative selection of NKT cells. In: *The Journal of experimental medicine* 197 (7), S. 907–918. DOI: 10.1084/jem.20021366.
- Cobbold, M.; Khan, N.; Pourgheysari, B.; Tauro, S.; McDonald, D.; Osman, H. et al. (2005): Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. In: *The Journal of experimental medicine* 202 (3), S. 379–386. DOI: 10.1084/jem.20040613.
- Coquet, J. M.; Chakravarti, S.; Kyparissoudis, K.; McNab, F. W.; Pitt, L. A.; McKenzie, B. S. et al. (2008): Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (32), S. 11287–11292. DOI: 10.1073/pnas.0801631105.
- Corbett, A. J.; Forbes, C. A.; Moro, D.; Scalzo, A. A. (2007): Extensive sequence variation exists among isolates of murine cytomegalovirus within members of the m02 family of genes. In: *The Journal of general virology* 88 (Pt 3), S. 758–769. DOI: 10.1099/vir.0.82623-0.
- Crosby, C. M.; Kronenberg, M. (2018): Tissue-specific functions of invariant natural killer T cells. In: *Nature reviews. Immunology* 18 (9), S. 559–574. DOI: 10.1038/s41577-018-0034-2.
- Crowe, N. Y.; Coquet, J. M.; Berzins, S. P.; Kyparissoudis, K.; Keating, R.; Pellicci, D. G. et al. (2005): Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo. In: *The Journal of experimental medicine* 202 (9), S. 1279–1288. DOI: 10.1084/jem.20050953.
- Crowe, N. Y.; Uldrich, A. P.; Kyparissoudis, K.; Hammond, K. J. L.; Hayakawa, Y.; Sidobre, S. et al. (2003): Glycolipid antigen drives rapid expansion and sustained cytokine production by NK T cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 171 (8), S. 4020–4027. DOI: 10.4049/jimmunol.171.8.4020.
- Cruikshank, W. W.; Kornfeld, H.; Center, D. M. (2000): Interleukin-16. In: *Journal of leukocyte biology* 67 (6), S. 757–766. DOI: 10.1002/jlb.67.6.757.
- Crumpacker, C. S. (1996): Ganciclovir. In: *The New England journal of medicine* 335 (10), S. 721–729. DOI: 10.1056/NEJM199609053351007.

- Cui, J.; Shin, T.; Kawano, T.; Sato, H.; Kondo, E.; Toura, I. et al. (1997): Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. In: *Science (New York, N.Y.)* 278 (5343), S. 1623–1626. DOI: 10.1126/science.278.5343.1623.
- Czerkinsky, C.; Andersson, G.; Ekre, H. P.; Nilsson, L. A.; Klareskog, L.; Ouchterlony, O. (1988): Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. In: *Journal of immunological methods* 110 (1), S. 29–36. DOI: 10.1016/0022-1759(88)90079-8.
- Czerkinsky, C. C.; Nilsson, L. A.; Nygren, H.; Ouchterlony, O.; Tarkowski, A. (1983): A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. In: *Journal of immunological methods* 65 (1-2), S. 109–121. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90308-3.
- Dahle, A. J.; Fowler, K. B.; Wright, J. D.; Boppana, S. B.; Britt, W. J.; Pass, R. F. (2000): Longitudinal investigation of hearing disorders in children with congenital cytomegalovirus. In: *Journal of the American Academy of Audiology* 11 (5), S. 283–290.
- Das, R.; Sant'Angelo, D. B.; Nichols, K. E. (2010): Transcriptional control of invariant NKT cell development. In: *Immunological reviews* 238 (1), S. 195–215. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00962.x.
- Dasgupta, S.; Kumar, V. (2016): Type II NKT cells: a distinct CD1d-restricted immune regulatory NKT cell subset. In: *Immunogenetics* 68 (8), S. 665–676. DOI: 10.1007/s00251-016-0930-1.
- de Vries, J. J. C.; van Zwet, E. W.; Dekker, F. W.; Kroes, A. C. M.; Verkerk, P. H.; Vossen, A. C. T. M. (2013): The apparent paradox of maternal seropositivity as a risk factor for congenital cytomegalovirus infection: a population-based prediction model. In: *Reviews in medical virology* 23 (4), S. 241–249. DOI: 10.1002/rmv.1744.
- del Val, M.; Hengel, H.; Häcker, H.; Hartlaub, U.; Ruppert, T.; Lucin, P.; Koszinowski, U. H. (1992): Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide-loaded major histocompatibility complex class I molecules into the medial-Golgi compartment. In: *The Journal of experimental medicine* 176 (3), S. 729–738. DOI: 10.1084/jem.176.3.729.
- Dhodapkar, M. V.; Kumar, V. (2017): Type II NKT Cells and Their Emerging Role in Health and Disease. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 198 (3), S. 1015–1021. DOI: 10.4049/jimmunol.1601399.
- Di Paolo, N. C.; Miao, E. A.; Iwakura, Y.; Murali-Krishna, K.; Aderem, A.; Flavell, R. A. et al. (2009): Virus binding to a plasma membrane receptor triggers interleukin-1 alpha-mediated proinflammatory macrophage response in vivo. In: *Immunity* 31 (1), S. 110–121. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.04.015.
- Di Paolo, N. C.; Shayakhmetov, D. M. (2016): Interleukin 1 α and the inflammatory process. In: *Nature immunology* 17 (8), S. 906–913. DOI: 10.1038/ni.3503.
- Diao, H.; Iwabuchi, K.; Li, L.; Onoe, K.; van Kaer, L.; Kon, S. et al. (2008): Osteopontin regulates development and function of invariant natural killer T cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (41), S. 15884–15889. DOI: 10.1073/pnas.0806089105.
- Doherty, P. C. (1993): Cell-mediated cytotoxicity. In: *Cell* 75 (4), S. 607–612. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90480-e.

- Dolan, A.; Cunningham, C.; Hector, R. D.; Hassan-Walker, A. F.; Lee, L.; Addison, C. et al. (2004): Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. In: *The Journal of general virology* 85 (Pt 5), S. 1301–1312. DOI: 10.1099/vir.0.79888-0.
- Doom, C. M.; Hill, A. B. (2008): MHC class I immune evasion in MCMV infection. In: *Medical Microbiology and Immunology* 197 (2), S. 191–204. DOI: 10.1007/s00430-008-0089-y.
- Dougan, S. K.; Kaser, A.; Blumberg, R. S. (2007): CD1 expression on antigen-presenting cells. In: *Current topics in microbiology and immunology* 314, S. 113–141. DOI: 10.1007/978-3-540-69511-0_5.
- Douglas, C. M.; Barnard, R.; Holder, D.; Leavitt, R.; Levitan, D.; Maguire, M. et al. (2020): Letermovir Resistance Analysis in a Clinical Trial of Cytomegalovirus Prophylaxis for Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. In: *The Journal of infectious diseases* 221 (7), S. 1117–1126. DOI: 10.1093/infdis/jiz577.
- Dowling, J. N.; Saslow, A. R.; Armstrong, J. A.; Ho, M. (1976): The relationship of immunosuppression to cytomegalovirus infection. In: *The Yale journal of biology and medicine* 49 (1), S. 77–82.
- Drew, W. L. (1992): Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. In: *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 14 (2), S. 608–615. DOI: 10.1093/clinids/14.2.608-a.
- Dupont, L.; Reeves, M. B. (2016): Cytomegalovirus latency and reactivation: recent insights into an age old problem. In: *Reviews in medical virology* 26 (2), S. 75–89. DOI: 10.1002/rmv.1862.
- Durfee, T.; Nelson, R.; Baldwin, S.; Plunkett, G.; Burland, V.; Mau, B. et al. (2008): The complete genome sequence of Escherichia coli DH10B. Insights into the biology of a laboratory workhorse. In: *Journal of bacteriology* 190 (7), S. 2597–2606. DOI: 10.1128/JB.01695-07.
- Eberl, G.; Brawand, P.; MacDonald, H. R. (2000): Selective bystander proliferation of memory CD4+ and CD8+ T cells upon NK T or T cell activation. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 165 (8), S. 4305–4311. DOI: 10.4049/jimmunol.165.8.4305.
- Eberl, G.; MacDonald, H. R. (2000): Selective induction of NK cell proliferation and cytotoxicity by activated NKT cells. In: *European journal of immunology* 30 (4), S. 985–992. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4141(200004)30:4<985::AID-IMMU985>3.0.CO;2-E.
- Ebert, S.; Podlech, J.; Gillert-Marien, D.; Gergely, K. M.; Büttner, J. K.; Fink, A. et al. (2012): Parameters determining the efficacy of adoptive CD8 T-cell therapy of cytomegalovirus infection. In: *Medical Microbiology and Immunology* 201 (4), S. 527–539. DOI: 10.1007/s00430-012-0258-x.
- Emery, V. C.; Griffiths, P. D. (1990): Molecular biology of cytomegalovirus. In: *International journal of experimental pathology* 71 (6), S. 905–918.
- Enders, G.; Daiminger, A.; Bäder, U.; Exler, S.; Enders, M. (2011): Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. In: *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 52 (3), S. 244–246. DOI: 10.1016/j.jcv.2011.07.005.
- Enders, G.; Daiminger, A.; Lindemann, L.; Knotek, F.; Bäder, U.; Exler, S.; Enders, M. (2012): Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in pregnant women, bone marrow donors

and adolescents in Germany, 1996-2010. In: *Medical Microbiology and Immunology* 201 (3), S. 303–309. DOI: 10.1007/s00430-012-0232-7.

Exley, M. A.; Bigley, N. J.; Cheng, O.; Shaulov, A.; Tahir, S. M. A.; Carter, Q. L. et al. (2003): Innate immune response to encephalomyocarditis virus infection mediated by CD1d. In: *Immunology* 110 (4), S. 519–526. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2003.01779.x.

Exley, M. A.; He, Q.; Cheng, O.; Wang, R.-J.; Cheney, C. P.; Balk, S. P.; Koziel, M. J. (2002): Cutting edge: Compartmentalization of Th1-like noninvariant CD1d-reactive T cells in hepatitis C virus-infected liver. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 168 (4), S. 1519–1523. DOI: 10.4049/jimmunol.168.4.1519.

Farrell, H. E.; Vally, H.; Lynch, D. M.; Fleming, P.; Shellam, G. R.; Scalzo, A. A.; Davis-Poynter, N. J. (1997): Inhibition of natural killer cells by a cytomegalovirus MHC class I homologue in vivo. In: *Nature* 386 (6624), S. 510–514. DOI: 10.1038/386510a0.

Feire, A. L.; Compton, T. (2013): Virus entry and activation of innate defence. In: M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom., S. 125–140.

Fink, A.; Blaum, F.; Babic Cac, M.; Ebert, S.; Lemmermann, N. A. W.; Reddehase, M. J. (2015): An endocytic YXX Φ (YRRF) cargo sorting motif in the cytoplasmic tail of murine cytomegalovirus AP2 'adapter adapter' protein m04/gp34 antagonizes virus evasion of natural killer cells. In: *Medical Microbiology and Immunology* 204 (3), S. 383–394. DOI: 10.1007/s00430-015-0414-1.

Fink, A.; Lemmermann, N. A. W.; Gillert-Marien, D.; Thomas, D.; Freitag, K.; Böhm, V. et al. (2012): Antigen presentation under the influence of 'immune evasion' proteins and its modulation by interferon-gamma. Implications for immunotherapy of cytomegalovirus infection with antiviral CD8 T cells. In: *Medical Microbiology and Immunology* 201 (4), S. 513–525. DOI: 10.1007/s00430-012-0256-z.

Fink, A.; Mikuličić, S.; Blaum, F.; Reddehase, M. J.; Florin, L.; Lemmermann, N. A. W. (2019): Function of the cargo sorting dileucine motif in a cytomegalovirus immune evasion protein. In: *Medical Microbiology and Immunology* 208 (3-4), S. 531–542. DOI: 10.1007/s00430-019-00604-x.

Fujii, S.-I.; Liu, K.; Smith, C.; Bonito, A. J.; Steinman, R. M. (2004): The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. In: *The Journal of experimental medicine* 199 (12), S. 1607–1618. DOI: 10.1084/jem.20040317.

Fujii, S.-I.; Shimizu, K.; Smith, C.; Bonifaz, L.; Steinman, R. M. (2003): Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein. In: *The Journal of experimental medicine* 198 (2), S. 267–279. DOI: 10.1084/jem.20030324.

Gadue, P.; Stein, P. L. (2002): NK T cell precursors exhibit differential cytokine regulation and require Itk for efficient maturation. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169 (5), S. 2397–2406. DOI: 10.4049/jimmunol.169.5.2397.

Gandhi, M. K.; Khanna, R. (2004): Human cytomegalovirus. Clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. In: *The Lancet. Infectious diseases* 4 (12), S. 725–738. DOI: 10.1016/S1473-3099(04)01202-2.

- Garlanda, C.; Dinarello, C. A.; Mantovani, A. (2013): The interleukin-1 family: back to the future. In: *Immunity* 39 (6), S. 1003–1018. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.11.010.
- Gassen, H. G.; Schrimpf, G.; Aigner, A. (Hg.) (1999): *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor.* 2. Aufl. Heidelberg: Spektrum.
- Gaudin, P.; Trocmé, C.; Berthier, S.; Kieffer, S.; Boutonnat, J.; Lamy, C. et al. (2000): TIMP-1/MMP-9 imbalance in an EBV-immortalized B lymphocyte cellular model: evidence for TIMP-1 multifunctional properties. In: *Biochimica et biophysica acta* 1499 (1-2), S. 19–33. DOI: 10.1016/s0167-4889(00)00084-7.
- Gee, K.; Guzzo, C.; Che Mat, N. F.; Ma, W.; Kumar, A. (2009): The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. In: *Inflammation & allergy drug targets* 8 (1), S. 40–52. DOI: 10.2174/187152809787582507.
- Geissmann, F.; Cameron, T. O.; Sidobre, S.; Manlongat, N.; Kronenberg, M.; Briskin, M. J. et al. (2005): Intravascular immune surveillance by CXCR6+ NKT cells patrolling liver sinusoids. In: *PLoS biology* 3 (4), S. e113. DOI: 10.1371/journal.pbio.0030113.
- Georgiev, H.; Ravens, I.; Benarafa, C.; Förster, R.; Bernhardt, G. (2016): Distinct gene expression patterns correlate with developmental and functional traits of iNKT subsets. In: *Nature communications* 7, S. 13116. DOI: 10.1038/ncomms13116.
- Germain, R. N. (1994): MHC-dependent antigen processing and peptide presentation. Providing ligands for T lymphocyte activation. In: *Cell* 76 (2), S. 287–299. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90336-0.
- Gibson, W. (1996): Structure and assembly of the virion. In: *Intervirology* 39 (5-6), S. 389–400. DOI: 10.1159/000150509.
- Giorgi, L. de; Sorini, C.; Cosorich, I.; Ferrarese, R.; Canducci, F.; Falcone, M. (2018): Increased iNKT17 Cell Frequency in the Intestine of Non-Obese Diabetic Mice Correlates With High Bacteroidales and Low Clostridiales Abundance. In: *Frontiers in immunology* 9, S. 1752. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01752.
- Godfrey, D. I.; MacDonald, H. R.; Kronenberg, M.; Smyth, M. J.; van Kaer, L. (2004): NKT cells: what's in a name? In: *Nature reviews. Immunology* 4 (3), S. 231–237. DOI: 10.1038/nri1309.
- Godfrey, D. I.; Stankovic, S.; Baxter, A. G. (2010): Raising the NKT cell family. In: *Nature immunology* 11 (3), S. 197–206. DOI: 10.1038/ni.1841.
- Godfrey, D. I.; Uldrich, A. P.; McCluskey, J.; Rossjohn, J.; Moody, D. B. (2015): The burgeoning family of unconventional T cells. In: *Nature immunology* 16 (11), S. 1114–1123. DOI: 10.1038/ni.3298.
- Gombert, M.; Dieu-Nosjean, M.-C.; Winterberg, F.; Bünemann, E.; Kubitz, R. C.; Da Cunha, L. et al. (2005): CCL1-CCR8 interactions: an axis mediating the recruitment of T cells and Langerhans-type dendritic cells to sites of atopic skin inflammation. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174 (8), S. 5082–5091. DOI: 10.4049/jimmunol.174.8.5082.
- Goto, M.; Murakawa, M.; Kadoshima-Yamaoka, K.; Tanaka, Y.; Nagahira, K.; Fukuda, Y.; Nishimura, T. (2009): Murine NKT cells produce Th17 cytokine interleukin-22. In: *Cellular immunology* 254 (2), S. 81–84. DOI: 10.1016/j.cellimm.2008.10.002.

- Grant, S. G.; Jessee, J.; Bloom, F. R.; Hanahan, D. (1990): Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (12), S. 4645–4649. DOI: 10.1073/pnas.87.12.4645.
- Grubor-Bauk, B.; Arthur, J. L.; Mayrhofer, G. (2008): Importance of NKT cells in resistance to herpes simplex virus, fate of virus-infected neurons, and level of latency in mice. In: *Journal of virology* 82 (22), S. 11073–11083. DOI: 10.1128/JVI.00205-08.
- Grubor-Bauk, B.; Simmons, A.; Mayrhofer, G.; Speck, P. G. (2003): Impaired clearance of herpes simplex virus type 1 from mice lacking CD1d or NKT cells expressing the semivariant V alpha 14-J alpha 281 TCR. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 170 (3), S. 1430–1434. DOI: 10.4049/jimmunol.170.3.1430.
- Guedez, L.; Stetler-Stevenson, W. G.; Wolff, L.; Wang, J.; Fukushima, P.; Mansoor, A.; Stetler-Stevenson, M. (1998): In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. In: *The Journal of clinical investigation* 102 (11), S. 2002–2010. DOI: 10.1172/JCI2881.
- Gumperz, J. E.; Miyake, S.; Yamamura, T.; Brenner, M. B. (2002): Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. In: *The Journal of experimental medicine* 195 (5), S. 625–636. DOI: 10.1084/jem.20011786.
- Halder, R. C.; Aguilera, C.; Maricic, I.; Kumar, V. (2007): Type II NKT cell-mediated anergy induction in type I NKT cells prevents inflammatory liver disease. In: *The Journal of clinical investigation* 117 (8), S. 2302–2312. DOI: 10.1172/JCI31602.
- Hammer, Q.; Rückert, T.; Borst, E. M.; Dunst, J.; Haubner, A.; Durek, P. et al. (2018): Peptide-specific recognition of human cytomegalovirus strains controls adaptive natural killer cells. In: *Nature immunology* 19 (5), S. 453–463. DOI: 10.1038/s41590-018-0082-6.
- Han, J.; Rho, S. B.; Lee, J. Y.; Bae, J.; Park, S. H.; Lee, S. et al. (2013): Human cytomegalovirus (HCMV) US2 protein interacts with human CD1d (hCD1d) and down-regulates invariant NKT (iNKT) cell activity. In: *Molecules and cells* 36 (5), S. 455–464. DOI: 10.1007/s10059-013-0221-8.
- Hancock, W. W.; Lu, B.; Gao, W.; Csizmadia, V.; Faia, K.; King, J. A. et al. (2000): Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection. In: *The Journal of experimental medicine* 192 (10), S. 1515–1520. DOI: 10.1084/jem.192.10.1515.
- Hanson, L. K.; Slater, J. S.; Karabekian, Z.; Ciocco-Schmitt, G.; Campbell, A. E. (2001): Products of US22 genes M140 and M141 confer efficient replication of murine cytomegalovirus in macrophages and spleen. In: *Journal of virology* 75 (14), S. 6292–6302. DOI: 10.1128/JVI.75.14.6292-6302.2001.
- Hartmann, A.; Sagedal, S.; Hjelmesaeth, J. (2006): The natural course of cytomegalovirus infection and disease in renal transplant recipients. In: *Transplantation* 82 (2 Suppl), S. 15–7. DOI: 10.1097/01.tp.0000230460.42558.b0.
- Harty, J. T.; Tvinnereim, A. R.; White, D. W. (2000): CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. In: *Annual review of immunology* 18, S. 275–308. DOI: 10.1146/annurev.immunol.18.1.275.
- Hasan, M.; Krmpotic, A.; Ruzsics, Z.; Bubic, I.; Lenac, T.; Halenius, A. et al. (2005): Selective down-regulation of the NKG2D ligand H60 by mouse cytomegalovirus m155 glycoprotein. In: *Journal of virology* 79 (5), S. 2920–2930. DOI: 10.1128/JVI.79.5.2920-2930.2005.

- Hayakawa, Y.; Takeda, K.; Yagita, H.; Kakuta, S.; Iwakura, Y.; van Kaer, L. et al. (2001): Critical contribution of IFN-gamma and NK cells, but not perforin-mediated cytotoxicity, to anti-metastatic effect of alpha-galactosylceramide. In: *European journal of immunology* 31 (6), S. 1720–1727.
- Hengel, H.; Lucin, P.; Jonjić, S.; Ruppert, T.; Koszinowski, U. H. (1994): Restoration of cytomegalovirus antigen presentation by gamma interferon combats viral escape. In: *Journal of virology* 68 (1), S. 289–297. DOI: 10.1128/JVI.68.1.289-297.1994.
- Hermans, I. F.; Silk, J. D.; Gileadi, U.; Salio, M.; Mathew, B.; Ritter, G. et al. (2003): NKT cells enhance CD4+ and CD8+ T cell responses to soluble antigen in vivo through direct interaction with dendritic cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 171 (10), S. 5140–5147. DOI: 10.4049/jimmunol.171.10.5140.
- Hill, T. M.; Gilchuk, P.; Cicek, B. B.; Osina, M. A.; Boyd, K. L.; Durrant, D. M. et al. (2015): Border Patrol Gone Awry: Lung NKT Cell Activation by Francisella tularensis Exacerbates Tularemia-Like Disease. In: *PLoS pathogens* 11 (6), e1004975. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004975.
- Ho, L-P; Denney, L.; Luhn, K.; Teoh, D.; Clelland, C.; McMichael, A. J. (2008): Activation of invariant NKT cells enhances the innate immune response and improves the disease course in influenza A virus infection. In: *European journal of immunology* 38 (7), S. 1913–1922. DOI: 10.1002/eji.200738017.
- Hogquist, K.; Georgiev, H. (2020): Recent advances in iNKT cell development. In: *F1000Research* 9. DOI: 10.12688/f1000research.21378.1.
- Holtappels, R.; Ebert, S.; Podlech, J.; Fink, A.; Böhm, V.; Lemmermann, N. A. W. et al. (2013): Murine model for cytoimmunotherapy of CMV disease after haematopoietic cell transplantation. In: *Cytomegaloviruses: From Molecular Pathogenesis to Intervention* 2, S. 352–379.
- Holtappels, R.; Grzimek, N. K. A.; Simon, C. O.; Thomas, D.; Dreis, D.; Reddehase, M. J. (2002a): Processing and presentation of murine cytomegalovirus pORFm164-derived peptide in fibroblasts in the face of all viral immunosubversive early gene functions. In: *Journal of virology* 76 (12), S. 6044–6053. DOI: 10.1128/jvi.76.12.6044-6053.2002.
- Holtappels, R.; Podlech, J.; Geginat, G.; Steffens, H. P.; Thomas, D.; Reddehase, M. J. (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. In: *Journal of virology* 72 (9), S. 7201–7212. DOI: 10.1128/JVI.72.9.7201-7212.1998.
- Holtappels, R.; Podlech, J.; Pahl-Seibert, M.-F.; Jülch, M.; Thomas, D.; Simon, C. O. et al. (2004): Cytomegalovirus misleads its host by priming of CD8 T cells specific for an epitope not presented in infected tissues. In: *The Journal of experimental medicine* 199 (1), S. 131–136. DOI: 10.1084/jem.20031582.
- Holtappels, R.; Simon, C. O.; Munks, M. W.; Thomas, D.; Deegen, P.; Kühnapfel, B. et al. (2008a): Subdominant CD8 T-cell epitopes account for protection against cytomegalovirus independent of immunodomination. In: *Journal of virology* 82 (12), S. 5781–5796. DOI: 10.1128/JVI.00155-08.
- Holtappels, R.; Thomas, D.; Podlech, J.; Reddehase, M. J. (2002b): Two antigenic peptides from genes m123 and m164 of murine cytomegalovirus quantitatively dominate CD8 T-cell

- memory in the H-2d haplotype. In: *Journal of virology* 76 (1), S. 151–164. DOI: 10.1128/jvi.76.1.151-164.2002.
- Holtappels, Rafaela; Böhm, Verena; Podlech, Jürgen; Reddehase, Matthias J. (2008b): CD8 T-cell-based immunotherapy of cytomegalovirus infection. "proof of concept" provided by the murine model. In: *Medical Microbiology and Immunology* 197 (2), S. 125–134. DOI: 10.1007/s00430-008-0093-2.
- Holtappels, Rafaela; Gillert-Marien, Dorothea; Thomas, Doris; Podlech, Jürgen; Deegen, Petra; Herter, Sylvia et al. (2006): Cytomegalovirus encodes a positive regulator of antigen presentation. In: *Journal of virology* 80 (15), S. 7613–7624. DOI: 10.1128/JVI.00723-06.
- Honess, R. W.; Roizman, B. (1974): Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. In: *Journal of virology* 14 (1), S. 8–19. DOI: 10.1128/JVI.14.1.8-19.1974.
- Horst, D.; Geerdink, R. J.; Gram, A. M.; Stoppelenburg, A. J.; Rensing, M. E. (2012): Hiding lipid presentation: viral interference with CD1d-restricted invariant natural killer T (iNKT) cell activation. In: *Viruses* 4 (10), S. 2379–2399. DOI: 10.3390/v4102379.
- Hsu, K. M.; Pratt, J. R.; Akers, W. J.; Achilefu, S. I.; Yokoyama, W. M. (2009): Murine cytomegalovirus displays selective infection of cells within hours after systemic administration. In: *The Journal of general virology* 90 (Pt 1), S. 33–43. DOI: 10.1099/vir.0.006668-0.
- Hu, T.; Gimferrer, I.; Alberola-Ila, J. (2011): Control of early stages in invariant natural killer T-cell development. In: *Immunology* 134 (1), S. 1–7. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2011.03463.x.
- Hudson, J. B.; Misra, V.; Mosmann, T. R. (1976): Cytomegalovirus infectivity. Analysis of the phenomenon of centrifugal enhancement of infectivity. In: *Virology* 72 (1), S. 235–243. DOI: 10.1016/0042-6822(76)90326-3.
- Humphreys, I. R.; Trez, C. de; Kinkade, A.; Benedict, C. A.; Croft, M.; Ware, C. F. (2007): Cytomegalovirus exploits IL-10-mediated immune regulation in the salivary glands. In: *The Journal of experimental medicine* 204 (5), S. 1217–1225. DOI: 10.1084/jem.20062424.
- Im, J. S.; Arora, P.; Bricard, G.; Molano, A.; Venkataswamy, M. M.; Baine, I. et al. (2009): Kinetics and cellular site of glycolipid loading control the outcome of natural killer T cell activation. In: *Immunity* 30 (6), S. 888–898. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.03.022.
- Ishikawa, H.; Tanaka, K.; Kutsukake, E.; Fukui, T.; Sasaki, H.; Hata, A. et al. (2010): IFN-gamma production downstream of NKT cell activation in mice infected with influenza virus enhances the cytolytic activities of both NK cells and viral antigen-specific CD8+ T cells. In: *Virology* 407 (2), S. 325–332. DOI: 10.1016/j.virol.2010.08.030.
- Jahng, A.; Maricic, I.; Aguilera, C.; Cardell, S.; Halder, R. C.; Kumar, V. (2004): Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide. In: *The Journal of experimental medicine* 199 (7), S. 947–957. DOI: 10.1084/jem.20031389.
- Janssens, R.; Struyf, S.; Proost, P. (2018): The unique structural and functional features of CXCL12. In: *Cellular & molecular immunology* 15 (4), S. 299–311. DOI: 10.1038/cmi.2017.107.

- Jarvis, M. A.; Nelson, J. A. (2002): Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages. In: *Current opinion in microbiology* 5 (4), S. 403–407. DOI: 10.1016/S1369-5274(02)00334-X.
- Jayawardena-Wolf, J.; Benlagha, K.; Chiu, Y. H.; Mehr, R.; Bendelac, A. (2001): CD1d endosomal trafficking is independently regulated by an intrinsic CD1d-encoded tyrosine motif and by the invariant chain. In: *Immunity* 15 (6), S. 897–908. DOI: 10.1016/s1074-7613(01)00240-0.
- Joffre, O. P.; Segura, E.; Savina, A.; Amigorena, S. (2012): Cross-presentation by dendritic cells. In: *Nature reviews. Immunology* 12 (8), S. 557–569. DOI: 10.1038/nri3254.
- Johnson, T. R.; Hong, S.; van Kaer, L.; Koezuka, Y.; Graham, B. S. (2002): NK T cells contribute to expansion of CD8(+) T cells and amplification of antiviral immune responses to respiratory syncytial virus. In: *Journal of virology* 76 (9), S. 4294–4303. DOI: 10.1128/jvi.76.9.4294-4303.2002.
- Jonjić, S.; Bubic, I.; Krmpotić, A. (2006): Innate Immunity to Cytomegaloviruses. In: Matthias J. Reddehase (Hg.): *Cytomegaloviruses. Molecular biology and immunology*. Norfolk: Caister, S. 285–319.
- Jonjić, S.; Mutter, W.; Weiland, F.; Reddehase, M. J.; Koszinowski, U. H. (1989): Site-restricted persistent cytomegalovirus infection after selective long-term depletion of CD4+ T lymphocytes. In: *The Journal of experimental medicine* 169 (4), S. 1199–1212. DOI: 10.1084/jem.169.4.1199.
- Jonjić, S.; Pavić, I.; Polić, B.; Crnković, I.; Lucin, P.; Koszinowski, U. H. (1994): Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. In: *The Journal of experimental medicine* 179 (5), S. 1713–1717. DOI: 10.1084/jem.179.5.1713.
- Jordan, S.; Krause, J.; Prager, A.; Mitrovic, M.; Jonjic, S.; Koszinowski, U. H.; Adler, B. (2011): Virus progeny of murine cytomegalovirus bacterial artificial chromosome pSM3fr show reduced growth in salivary Glands due to a fixed mutation of MCK-2. In: *Journal of virology* 85 (19), S. 10346–10353. DOI: 10.1128/JVI.00545-11.
- Kääriäinen, L.; Klemola, E.; Paloheimo, J. (1966): Rise of cytomegalovirus antibodies in an infectious-mononucleosis-like syndrome after transfusion. In: *British medical journal* 1 (5498), S. 1270–1272. DOI: 10.1136/bmj.1.5498.1270.
- Kabelitz, D.; Déchanet-Merville, J. (2015): Editorial. "Recent Advances in Gamma/Delta T Cell Biology: New Ligands, New Functions, and New Translational Perspectives". In: *Frontiers in immunology* 6, S. 371. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00371.
- Kakimi, K.; Guidotti, L. G.; Koezuka, Y.; Chisari, F. V. (2000): Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. In: *The Journal of experimental medicine* 192 (7), S. 921–930. DOI: 10.1084/jem.192.7.921.
- Kang, S.-J.; Cresswell, P. (2002): Calnexin, calreticulin, and ERp57 cooperate in disulfide bond formation in human CD1d heavy chain. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (47), S. 44838–44844. DOI: 10.1074/jbc.M207831200.
- Kattenhorn, L. M.; Mills, R.; Wagner, M.; Lomsadze, A.; Makeev, V.; Borodovsky, M. et al. (2004): Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions. In: *Journal of virology* 78 (20), S. 11187–11197. DOI: 10.1128/JVI.78.20.11187-11197.2004.

- Kawakami, K.; Yamamoto, N.; Kinjo, Y.; Miyagi, K.; Nakasone, C.; Uezu, K. et al. (2003): Critical role of Valpha14+ natural killer T cells in the innate phase of host protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. In: *European journal of immunology* 33 (12), S. 3322–3330. DOI: 10.1002/eji.200324254.
- Kawano, T.; Cui, J.; Koezuka, Y.; Taura, I.; Kaneko, Y.; Motoki, K. et al. (1997): CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. In: *Science (New York, N.Y.)* 278 (5343), S. 1626–1629. DOI: 10.1126/science.278.5343.1626.
- Keil, G. M.; Ebeling-Keil, A.; Koszinowski, U. H. (1984): Temporal regulation of murine cytomegalovirus transcription and mapping of viral RNA synthesized at immediate early times after infection. In: *Journal of virology* 50 (3), S. 784–795. DOI: 10.1128/JVI.50.3.784-795.1984.
- Khairallah, C.; Déchanet-Merville, J.; Capone, M. (2017): $\gamma\delta$ T Cell-Mediated Immunity to Cytomegalovirus Infection. In: *Frontiers in immunology* 8, S. 105. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00105.
- Khairallah, C.; Netzer, S.; Villacreces, A.; Juzan, M.; Rousseau, B.; Dulanto, S. et al. (2015): $\gamma\delta$ T cells confer protection against murine cytomegalovirus (MCMV). In: *PLoS pathogens* 11 (3), e1004702. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004702.
- Kim, H. S.; Chung, D. H. (2013): IL-9-producing invariant NKT cells protect against DSS-induced colitis in an IL-4-dependent manner. In: *Mucosal immunology* 6 (2), S. 347–357. DOI: 10.1038/mi.2012.77.
- Kim, H. S.; Garcia, J.; Exley, M.; Johnson, K. W.; Balk, S. P.; Blumberg, R. S. (1999): Biochemical characterization of CD1d expression in the absence of beta2-microglobulin. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (14), S. 9289–9295. DOI: 10.1074/jbc.274.14.9289.
- King, I. L.; Fortier, A.; Tighe, M.; Dibble, J.; Watts, G. F. M.; Veerapen, N. et al. (2011): Invariant natural killer T cells direct B cell responses to cognate lipid antigen in an IL-21-dependent manner. In: *Nature immunology* 13 (1), S. 44–50. DOI: 10.1038/ni.2172.
- Kirwan, S. E.; Burshtyn, D. N. (2007): Regulation of natural killer cell activity. In: *Current opinion in immunology* 19 (1), S. 46–54. DOI: 10.1016/j.coi.2006.11.012.
- Kitamura, H.; Iwakabe, K.; Yahata, T.; Nishimura, S.; Ohta, A.; Ohmi, Y. et al. (1999): The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. In: *The Journal of experimental medicine* 189 (7), S. 1121–1128. DOI: 10.1084/jem.189.7.1121.
- Kitamura, H.; Ohta, A.; Sekimoto, M.; Sato, M.; Iwakabe, K.; Nakui, M. et al. (2000): alpha-galactosylceramide induces early B-cell activation through IL-4 production by NKT cells. In: *Cellular immunology* 199 (1), S. 37–42. DOI: 10.1006/cimm.1999.1602.
- Kleijnen, M. F.; Huppa, J. B.; Lucin, P.; Mukherjee, S.; Farrell, H.; Campbell, A. E. et al. (1997): A mouse cytomegalovirus glycoprotein, gp34, forms a complex with folded class I MHC molecules in the ER which is not retained but is transported to the cell surface. In: *The EMBO journal* 16 (4), S. 685–694. DOI: 10.1093/emboj/16.4.685.
- Klemola, E.; Essen, R. von; Henle, G.; Henle, W. (1970): Infectious-mononucleosis-like disease with negative heterophil agglutination test. Clinical features in relation to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus antibodies. In: *The Journal of infectious diseases* 121 (6), S. 608–614. DOI: 10.1093/infdis/121.6.608.

- Kloetzel, P. M. (2004): The proteasome and MHC class I antigen processing. In: *Biochimica et biophysica acta* 1695 (1-3), S. 225–233. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2004.10.004.
- Koch, M.; Stronge, V. S.; Shepherd, D.; Gadola, S. D.; Mathew, B.; Ritter, G. et al. (2005): The crystal structure of human CD1d with and without alpha-galactosylceramide. In: *Nature immunology* 6 (8), S. 819–826. DOI: 10.1038/ni1225.
- Korber, B.; Hood, L.; Stroynowski, I. (1987): Regulation of murine class I genes by interferons is controlled by regions located both 5' and 3' to the transcription initiation site. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (10), S. 3380–3384. DOI: 10.1073/pnas.84.10.3380.
- Krmpotic, A.; Bubic, I.; Polic, B.; Lucin, P.; Jonjic, S. (2003): Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. In: *Microbes and infection* 5 (13), S. 1263–1277. DOI: 10.1016/j.micinf.2003.09.007.
- Krmpotic, A.; Hasan, M.; Loewendorf, A.; Saulig, T.; Halenius, A.; Lenac, T. et al. (2005): NK cell activation through the NKG2D ligand MULT-1 is selectively prevented by the glycoprotein encoded by mouse cytomegalovirus gene m145. In: *The Journal of experimental medicine* 201 (2), S. 211–220. DOI: 10.1084/jem.20041617.
- Krmpotić, A.; Busch, D. H.; Bubić, I.; Gebhardt, F.; Hengel, H.; Hasan, M. et al. (2002): MCMV glycoprotein gp40 confers virus resistance to CD8+ T cells and NK cells in vivo. In: *Nature immunology* 3 (6), S. 529–535. DOI: 10.1038/ni799.
- Krug, A.; French, A. R.; Barchet, W.; Fischer, J. A. A.; Dzionek, A.; Pingel, J. T. et al. (2004): TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. In: *Immunity* 21 (1), S. 107–119. DOI: 10.1016/j.immuni.2004.06.007.
- Kumar, Vipin (2013): NKT-cell subsets: promoters and protectors in inflammatory liver disease. In: *Journal of hepatology* 59 (3), S. 618–620. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.02.032.
- Kuylensstierna, C.; Bjorkstrom, N. K.; Andersson, S. K.; Sahlstrom, P.; Bosnjak, L.; Paquin-Proulx, D. et al. (2011): NKG2D performs two functions in invariant NKT cells: direct TCR-independent activation of NK-like cytotoxicity and co-stimulation of activation by CD1d. In: *European journal of immunology* 41 (7), S. 1913–1923. DOI: 10.1002/eji.200940278.
- Lachmann, R.; Loenenbach, A.; Waterboer, T.; Brenner, N.; Pawlita, M.; Michel, A. et al. (2018): Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in the adult population of Germany. In: *PloS one* 13 (7), e0200267. DOI: 10.1371/journal.pone.0200267.
- Lalezari, J. P. (1997): Cidofovir: a new therapy for cytomegalovirus retinitis. In: *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association* 14 Suppl 1, S. 22-6. DOI: 10.1097/00042560-199700001-00005.
- Landolfo, S.; Gariglio, M.; Griboudo, G.; Lembo, D. (2003): The human cytomegalovirus. In: *Pharmacology & therapeutics* 98 (3), S. 269–297. DOI: 10.1016/s0163-7258(03)00034-2.
- Lantz, O.; Bendelac, A. (1994): An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. In: *The Journal of experimental medicine* 180 (3), S. 1097–1106. DOI: 10.1084/jem.180.3.1097.
- Lasagni, L.; Francalanci, M.; Annunziato, F.; Lazzeri, E.; Giannini, S.; Cosmi, L. et al. (2003): An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell

- growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. In: *The Journal of experimental medicine* 197 (11), S. 1537–1549. DOI: 10.1084/jem.20021897.
- Lawton, A. P.; Prigozy, T. I.; Brossay, L.; Pei, B.; Khurana, A.; Martin, D. et al. (2005): The mouse CD1d cytoplasmic tail mediates CD1d trafficking and antigen presentation by adaptor protein 3-dependent and -independent mechanisms. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174 (6), S. 3179–3186. DOI: 10.4049/jimmunol.174.6.3179.
- Lee, E. C.; Yu, D.; Martinez de Velasco, J.; Tessarollo, L.; Swing, D. A.; Court, D. L. et al. (2001a): A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. In: *Genomics* 73 (1), S. 56–65. DOI: 10.1006/geno.2000.6451.
- Lee, Peter T.; Putnam, Amy; Benlagha, Kamel; Teyton, Luc; Gottlieb, Peter A.; Bendelac, Albert (2002): Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis. In: *The Journal of clinical investigation* 110 (6), S. 793–800. DOI: 10.1172/JCI15832.
- Lee, S. H.; Girard, S.; Macina, D.; Busà, M.; Zafer, A.; Belouchi, A. et al. (2001b): Susceptibility to mouse cytomegalovirus is associated with deletion of an activating natural killer cell receptor of the C-type lectin superfamily. In: *Nature genetics* 28 (1), S. 42–45. DOI: 10.1038/88247.
- Lee, Y. J.; Wang, H.; Starrett, G. J.; Phuong, V.; Jameson, S. C.; Hogquist, K. A. (2015): Tissue-Specific Distribution of iNKT Cells Impacts Their Cytokine Response. In: *Immunity* 43 (3), S. 566–578. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.06.025.
- Lee, You Jeong; Holzappel, Keli L.; Zhu, Jinfang; Jameson, Stephen C.; Hogquist, Kristin A. (2013): Steady-state production of IL-4 modulates immunity in mouse strains and is determined by lineage diversity of iNKT cells. In: *Nature immunology* 14 (11), S. 1146–1154. DOI: 10.1038/ni.2731.
- Lehuen, A.; Fazilleau, N. (2011): Innate iNKT cell help to B cells: fast but does not last. In: *Nature immunology* 13 (1), S. 11–13. DOI: 10.1038/ni.2186.
- Leite-De-Moraes, M. C.; Hameg, A.; Arnould, A.; Machavoine, F.; Koezuka, Y.; Schneider, E. et al. (1999): A distinct IL-18-induced pathway to fully activate NK T lymphocytes independently from TCR engagement. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 163 (11), S. 5871–5876.
- Lemmermann, N. A. W.; Fink, A.; Podlech, J.; Ebert, S.; Wilhelmi, V.; Böhm, V. et al. (2012): Murine Cytomegalovirus immune evasion proteins operative in the MHC class I pathway of antigen processing and presentation: state of knowledge, revisions and questions. In: *Medical Microbiology and Immunology* 201, S. 497–512.
- Lemmermann, N. A. W.; Gergely, K.; Böhm, V.; Deegen, P.; Daubner, T.; Reddehase, M. J. (2010a): Immune evasion proteins of murine cytomegalovirus preferentially affect cell surface display of recently generated peptide presentation complexes. In: *Journal of virology* 84 (3), S. 1221–1236. DOI: 10.1128/JVI.02087-09.
- Lemmermann, N. A. W.; Podlech, J.; Seckert, C. K.; Kropp, K. A.; Grzimek, N. K. A.; Reddehase, M. J.; Holtappels, R. (2010b): CD8 T-Cell Immunotherapy of Cytomegalovirus Disease in the Murine Model. In: *Immunology of Infection*, Bd. 37: Elsevier (Methods in Microbiology), S. 369–420.
- Leruez-Ville, M.; Magny, J.-F.; Couderc, S.; Pichon, C.; Parodi, M.; Bussièrès, L. et al. (2017): Risk Factors for Congenital Cytomegalovirus Infection Following Primary and

- Nonprimary Maternal Infection. A Prospective Neonatal Screening Study Using Polymerase Chain Reaction in Saliva. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 65 (3), S. 398–404. DOI: 10.1093/cid/cix337.
- Li, Y.; Girardi, E.; Wang, J.; Yu, E. D.; Painter, G. F.; Kronenberg, M.; Zajonc, D. M. (2010): The Valpha14 invariant natural killer T cell TCR forces microbial glycolipids and CD1d into a conserved binding mode. In: *The Journal of experimental medicine* 207 (11), S. 2383–2393. DOI: 10.1084/jem.20101335.
- Lilleri, D.; Fornara, C.; Furione, M.; Zavattoni, M.; Revello, M. G.; Gerna, G. (2007): Development of human cytomegalovirus-specific T cell immunity during primary infection of pregnant women and its correlation with virus transmission to the fetus. In: *The Journal of infectious diseases* 195 (7), S. 1062–1070. DOI: 10.1086/512245.
- Liu, J.; Shaji, D.; Cho, S.; Du, W.; Gervay-Hague, J.; Brutkiewicz, R. R. (2010): A threonine-based targeting signal in the human CD1d cytoplasmic tail controls its functional expression. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184 (9), S. 4973–4981. DOI: 10.4049/jimmunol.0901448.
- Lodoen, M. B.; Abenes, G.; Umamoto, S.; Houchins, J. P.; Liu, F.; Lanier, L. L. (2004): The cytomegalovirus m155 gene product subverts natural killer cell antiviral protection by disruption of H60-NKG2D interactions. In: *The Journal of experimental medicine* 200 (8), S. 1075–1081. DOI: 10.1084/jem.20040583.
- Loewendorf, A.; Krüger, C.; Borst, E. M.; Wagner, M.; Just, U.; Messerle, M. (2004): Identification of a mouse cytomegalovirus gene selectively targeting CD86 expression on antigen-presenting cells. In: *Journal of virology* 78 (23), S. 13062–13071. DOI: 10.1128/JVI.78.23.13062-13071.2004.
- Loewendorf, A. I.; Steinbrueck, L.; Peter, C.; Busche, A.; Benedict, C. A.; Kay-Jackson, P. C. (2011): The mouse cytomegalovirus glycoprotein m155 inhibits CD40 expression and restricts CD4 T cell responses. In: *Journal of virology* 85 (10), S. 5208–5212. DOI: 10.1128/JVI.02178-10.
- Loh, J.; Chu, D. T.; O'Guin, A. K.; Yokoyama, W. M.; Virgin, H. W. (2005): Natural killer cells utilize both perforin and gamma interferon to regulate murine cytomegalovirus infection in the spleen and liver. In: *Journal of virology* 79 (1), S. 661–667. DOI: 10.1128/JVI.79.1.661-667.2005.
- Lotze, M. T.; Deisseroth, A.; Rubartelli, A. (2007): Damage associated molecular pattern molecules. In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 124 (1), S. 1–4. DOI: 10.1016/j.clim.2007.02.006.
- Ludwig, A.; Hengel, H. (2009): Epidemiological impact and disease burden of congenital cytomegalovirus infection in Europe. In: *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 14 (9), S. 26–32. DOI: 10.2807/ese.14.09.19140-en.
- Lueder, Y.; Heller, K.; Ritter, C.; Keyser, K. A.; Wagner, K.; Liu, X. et al. (2018): Control of primary mouse cytomegalovirus infection in lung nodular inflammatory foci by cooperation of interferon-gamma expressing CD4 and CD8 T cells. In: *PLoS pathogens* 14 (8), e1007252. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007252.
- Lynch, L.; Michelet, X.; Zhang, S.; Brennan, P. J.; Moseman, A.; Lester, C. et al. (2015): Regulatory iNKT cells lack expression of the transcription factor PLZF and control the

- homeostasis of T(reg) cells and macrophages in adipose tissue. In: *Nature immunology* 16 (1), S. 85–95. DOI: 10.1038/ni.3047.
- Maas-Bauer, K.; Simonetta, F.; Hirai, T.; Wenokur, A.; Fazal, F.; Kambham, N. et al. (2018): Invariant Natural Killer T Cell Subsets Have Diverse Functions: iNKT2 and iNKT17 Protect from Graft-Versus-Host-Disease, Whereas iNKT1 Have Antitumor Potential. In: *Blood* 132 (Supplement 1), S. 475. DOI: 10.1182/blood-2018-99-113673.
- Maddur, Mohan S.; Miossec, Pierre; Kaveri, Srini V.; Bayry, Jagadeesh (2012): Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. In: *The American journal of pathology* 181 (1), S. 8–18. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.03.044.
- Mans, J.; Natarajan, K.; Balbo, A.; Schuck, P.; Eikel, D.; Hess, S. et al. (2007): Cellular expression and crystal structure of the murine cytomegalovirus major histocompatibility complex class I-like glycoprotein, m153. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (48), S. 35247–35258. DOI: 10.1074/jbc.M706782200.
- Marrero, I.; Ware, R.; Kumar, V. (2015): Type II NKT Cells in Inflammation, Autoimmunity, Microbial Immunity, and Cancer. In: *Frontiers in immunology* 6, S. 316. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00316.
- Marty, F. M.; Ljungman, P.; Chemaly, R. F.; Maertens, J.; Dadwal, S. S.; Duarte, R. F. et al. (2017): Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. In: *The New England journal of medicine* 377 (25), S. 2433–2444. DOI: 10.1056/NEJMoa1706640.
- Mathys, S.; Schroeder, T.; Ellwart, J.; Koszinowski, U. H.; Messerle, M.; Just, U. (2003): Dendritic cells under influence of mouse cytomegalovirus have a physiologic dual role: to initiate and to restrict T cell activation. In: *The Journal of infectious diseases* 187 (6), S. 988–999. DOI: 10.1086/368094.
- Matsuda, J. L.; Gapin, L.; Sidobre, S.; Kieper, W. C.; Tan, J. T.; Ceredig, R. et al. (2002): Homeostasis of V alpha 14i NKT cells. In: *Nature immunology* 3 (10), S. 966–974. DOI: 10.1038/ni837.
- Matsuda, J. L.; Mallevaey, T.; Scott-Browne, J.; Gapin, L. (2008): CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system. In: *Current opinion in immunology* 20 (3), S. 358–368. DOI: 10.1016/j.coi.2008.03.018.
- Matsuda, J. L.; Naidenko, O. V.; Gapin, L.; Nakayama, T.; Taniguchi, M.; Wang, C. R. et al. (2000): Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. In: *The Journal of experimental medicine* 192 (5), S. 741–754. DOI: 10.1084/jem.192.5.741.
- Matsuda, J. L.; Zhang, Q.; Ndonge, R.; Richardson, S. K.; Howell, A. R.; Gapin, L. (2006): T-bet concomitantly controls migration, survival, and effector functions during the development of Valpha14i NKT cells. In: *Blood* 107 (7), S. 2797–2805. DOI: 10.1182/blood-2005-08-3103.
- Mauri, C.; Bosma, A. (2012): Immune regulatory function of B cells. In: *Annual review of immunology* 30, S. 221–241. DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-074934.
- McNab, F. W.; Berzins, S. P.; Pellicci, D. G.; Kyparissoudis, K.; Field, K.; Smyth, M. J.; Godfrey, D. I. (2005): The influence of CD1d in postselection NKT cell maturation and homeostasis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175 (6), S. 3762–3768. DOI: 10.4049/jimmunol.175.6.3762.

- Meier, J. F.; Stinski, M. F. (2006): Major immediate-early enhancer and its gene products. In: M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom., p.151-166.
- Melendez, D. P.; Razonable, R. R. (2015): Letermovir and inhibitors of the terminase complex. A promising new class of investigational antiviral drugs against human cytomegalovirus. In: *Infection and drug resistance* 8, S. 269–277. DOI: 10.2147/IDR.S79131.
- Ménard, C.; Wagner, M.; Ruzsics, Z.; Holak, K.; Brune, W.; Campbell, A. E.; Koszinowski, U. H. (2003): Role of murine cytomegalovirus US22 gene family members in replication in macrophages. In: *Journal of virology* 77 (10), S. 5557–5570. DOI: 10.1128/jvi.77.10.5557-5570.2003.
- Metcalf, D.; Nicola, N. A. (1983): Proliferative effects of purified granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on normal mouse hemopoietic cells. In: *Journal of cellular physiology* 116 (2), S. 198–206. DOI: 10.1002/jcp.1041160211.
- Meurer, R.; van Riper, G.; Feeney, W.; Cunningham, P.; Hora, D.; Springer, M. S. et al. (1993): Formation of eosinophilic and monocytic intradermal inflammatory sites in the dog by injection of human RANTES but not human monocyte chemoattractant protein 1, human macrophage inflammatory protein 1 alpha, or human interleukin 8. In: *The Journal of experimental medicine* 178 (6), S. 1913–1921. DOI: 10.1084/jem.178.6.1913.
- Meyer, E. H.; DeKruyff, R. H.; Umetsu, D. T. (2007): iNKT cells in allergic disease. In: *Current topics in microbiology and immunology* 314, S. 269–291. DOI: 10.1007/978-3-540-69511-0_11.
- Michel, D.; Chevillotte, M.; Mertens, T. (2013): Antiviral therapy, drug resistance and comuted resistance profiling. Kapitel II.42. In: *Reddehase M. J. (ed.), Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom., S. 400–421.
- Milpied, P.; Massot, B.; Renand, A.; Diem, S.; Herbelin, A.; Leite-de-Moraes, M. et al. (2011): IL-17-producing invariant NKT cells in lymphoid organs are recent thymic emigrants identified by neuropilin-1 expression. In: *Blood* 118 (11), S. 2993–3002. DOI: 10.1182/blood-2011-01-329268.
- Miltenyi, S.; Müller, W.; Weichel, W.; Radbruch, A. (1990): High gradient magnetic cell separation with MACS. In: *Cytometry* 11 (2), S. 231–238. DOI: 10.1002/cyto.990110203.
- Miossec, P.; Kolls, J. K. (2012): Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. In: *Nature reviews. Drug discovery* 11 (10), S. 763–776. DOI: 10.1038/nrd3794.
- Mitrović, M.; Arapović, J.; Jordan, S.; Fodil-Cornu, N.; Ebert, S.; Vidal, S. M. et al. (2012): The NK cell response to mouse cytomegalovirus infection affects the level and kinetics of the early CD8(+) T-cell response. In: *Journal of virology* 86 (4), S. 2165–2175. DOI: 10.1128/JVI.06042-11.
- Miura, S.; Kawana, K.; Schust, D. J.; Fujii, T.; Yokoyama, T.; Iwasawa, Y. et al. (2010): CD1d, a sentinel molecule bridging innate and adaptive immunity, is downregulated by the human papillomavirus (HPV) E5 protein: a possible mechanism for immune evasion by HPV. In: *Journal of virology* 84 (22), S. 11614–11623. DOI: 10.1128/JVI.01053-10.
- Miyahira, Y.; Murata, K.; Rodriguez, D.; Rodriguez, J. R.; Esteban, M.; Rodrigues, M. M.; Zavala, F. (1995): Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay.

- In: *Journal of immunological methods* 181 (1), S. 45–54. DOI: 10.1016/0022-1759(94)00327-s.
- Mocarski, E. S.; Shenk, T.; Pass, R. F. (2013): Cytomegaloviruses. In: Knipe, D. M.; Howley P. M. (eds.): *Fields of Virology* (6th). Philadelphia, USA: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Moll, M.; Andersson, S. K.; Smed-Sorensen, A.; Sandberg, J. K. (2010): Inhibition of lipid antigen presentation in dendritic cells by HIV-1 Vpu interference with CD1d recycling from endosomal compartments. In: *Blood* 116 (11), S. 1876–1884. DOI: 10.1182/blood-2009-09-243667.
- Monteiro, M.; Almeida, C. F.; Caridade, M.; Ribot, J. C.; Duarte, J.; Agua-Doce, A. et al. (2010): Identification of regulatory Foxp3+ invariant NKT cells induced by TGF-beta. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185 (4), S. 2157–2163. DOI: 10.4049/jimmunol.1000359.
- Montoya, C. J.; Pollard, D.; Martinson, J.; Kumari, K.; Wasserfall, C.; Mulder, C. B. et al. (2007): Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. In: *Immunology* 122 (1), S. 1–14. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2007.02647.x.
- Moskowitz, L.; Hensley, G. T.; Chan, J. C.; Adams, K. (1985): Immediate causes of death in acquired immunodeficiency syndrome. In: *Archives of pathology & laboratory medicine* 109 (8), S. 735–738.
- Mosser, D. D.; Duchaine, J.; Martin, L. H. (1991): Biochemical and developmental characterization of the murine cluster of differentiation 1 antigen. In: *Immunology* 73 (3), S. 298–303.
- Motomura, Y.; Kitamura, H.; Hijikata, A.; Matsunaga, Y.; Matsumoto, K.; Inoue, H. et al. (2011): The transcription factor E4BP4 regulates the production of IL-10 and IL-13 in CD4+ T cells. In: *Nature immunology* 12 (5), S. 450–459. DOI: 10.1038/ni.2020.
- Muindi, K.; Cernadas, M.; Watts, G. F. M.; Royle, L.; Neville, D. C. A.; Dwek, R. A. et al. (2010): Activation state and intracellular trafficking contribute to the repertoire of endogenous glycosphingolipids presented by CD1d corrected. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (7), S. 3052–3057. DOI: 10.1073/pnas.0915056107.
- Mullis, K. B.; Faloona, F. A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: *Methods in enzymology* 155, S. 335–350. DOI: 10.1016/0076-6879(87)55023-6.
- Munks, M. W.; Cho, K. S.; Pinto, A. K.; Sierro, S.; Klenerman, P.; Hill, A. B. (2006a): Four distinct patterns of memory CD8 T cell responses to chronic murine cytomegalovirus infection. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177 (1), S. 450–458. DOI: 10.4049/jimmunol.177.1.450.
- Munks, M. W.; Gold, M. C.; Zajac, A. L.; Doom, C. M.; Morello, C. S.; Spector, D. H.; Hill, A. B. (2006b): Genome-wide analysis reveals a highly diverse CD8 T cell response to murine cytomegalovirus. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 176 (6), S. 3760–3766. DOI: 10.4049/jimmunol.176.6.3760.
- Mussi-Pinhata, M. M.; Yamamoto, A. Y.; Moura Brito, R. M.; Lima Isaac, M. de; de Carvalho e Oliveira, P. F.; Boppana, S.; Britt, W. J. (2009): Birth prevalence and natural history of congenital cytomegalovirus infection in a highly seroimmune population. In: *Clinical*

- infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 49 (4), S. 522–528. DOI: 10.1086/600882.
- Nagarajan, N. A.; Kronenberg, M. (2007): Invariant NKT cells amplify the innate immune response to lipopolysaccharide. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178 (5), S. 2706–2713. DOI: 10.4049/jimmunol.178.5.2706.
- Nagata, S. (1997): Apoptosis by death factor. In: *Cell* 88 (3), S. 355–365. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81874-7.
- Neefjes, J.; Jongstra, M. L. M.; Paul, P.; Bakke, O. (2011): Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. In: *Nature reviews. Immunology* 11 (12), S. 823–836. DOI: 10.1038/nri3084.
- Neiman, P. E.; Reeves, W.; Ray, G.; Flournoy, N.; Lerner, K. G.; Sale, G. E.; Thomas, E. D. (1977): A prospective analysis interstitial pneumonia and opportunistic viral infection among recipients of allogeneic bone marrow grafts. In: *The Journal of infectious diseases* 136 (6), S. 754–767. DOI: 10.1093/infdis/136.6.754.
- Nguyen, K. B.; Salazar-Mather, T. P.; Dalod, M. Y.; van Deusen, J. B.; Wei, X.-Q.; Liew, F. Y. et al. (2002): Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169 (8), S. 4279–4287. DOI: 10.4049/jimmunol.169.8.4279.
- Nichols, K. E.; Hom, J.; Gong, S.-Y.; Ganguly, A.; Ma, C. S.; Cannons, J. L. et al. (2005): Regulation of NKT cell development by SAP, the protein defective in XLP. In: *Nature medicine* 11 (3), S. 340–345. DOI: 10.1038/nm1189.
- Nieda, M.; Okai, M.; Tazbirkova, A.; Lin, H.; Yamaura, A.; Ide, K. et al. (2004): Therapeutic activation of V α 24+V β 11+ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity. In: *Blood* 103 (2), S. 383–389. DOI: 10.1182/blood-2003-04-1155.
- Nieuwenhuis, E. E. S.; Matsumoto, T.; Exley, M.; Schleipman, R. A.; Glickman, J.; Bailey, D. T. et al. (2002): CD1d-dependent macrophage-mediated clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from lung. In: *Nature medicine* 8 (6), S. 588–593. DOI: 10.1038/nm0602-588.
- Nishimura, T.; Kitamura, H.; Iwakabe, K.; Yahata, T.; Ohta, A.; Sato, M. et al. (2000): The interface between innate and acquired immunity: glycolipid antigen presentation by CD1d-expressing dendritic cells to NKT cells induces the differentiation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. In: *International immunology* 12 (7), S. 987–994. DOI: 10.1093/intimm/12.7.987.
- Noda, Satoshi; Tanaka, Kazuo (2006): Immune responses in CMV infection. In: *Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine* 64 Suppl 3, S. 404–414.
- Novak, J.; Lehuen, A. (2011): Mechanism of regulation of autoimmunity by iNKT cells. In: *Cytokine* 53 (3), S. 263–270. DOI: 10.1016/j.cyto.2010.11.001.
- Novotny, J.; Rigoutsos, I.; Coleman, D.; Shenk, T. (2001): In silico structural and functional analysis of the human cytomegalovirus (HHV5) genome. In: *Journal of molecular biology* 310 (5), S. 1151–1166. DOI: 10.1006/jmbi.2001.4798.
- Oki, S.; Chiba, A.; Yamamura, T.; Miyake, S. (2004): The clinical implication and molecular mechanism of preferential IL-4 production by modified glycolipid-stimulated NKT cells. In: *The Journal of clinical investigation* 113 (11), S. 1631–1640. DOI: 10.1172/JCI20862.

- Oliveira, S. A.; Park, S.-H.; Lee, P.; Bendelac, A.; Shenk, T. E. (2002): Murine cytomegalovirus m02 gene family protects against natural killer cell-mediated immune surveillance. In: *Journal of virology* 76 (2), S. 885–894. DOI: 10.1128/jvi.76.2.885-894.2002.
- Orange, J. S.; Wang, B.; Terhorst, C.; Biron, C. A. (1995): Requirement for natural killer cell-produced interferon gamma in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration. In: *The Journal of experimental medicine* 182 (4), S. 1045–1056. DOI: 10.1084/jem.182.4.1045.
- Ortaldo, J. R.; Young, H. A. (2005): Mouse Ly49 NK receptors. Balancing activation and inhibition. In: *Molecular immunology* 42 (4), S. 445–450. DOI: 10.1016/j.molimm.2004.07.024.
- Osborn, J. E.; Walker, D. L. (1968): Enhancement of infectivity of murine cytomegalovirus in vitro by centrifugal inoculation. In: *Journal of virology* 2 (9), S. 853–858. DOI: 10.1128/JVI.2.9.853-858.1968.
- Padovan, E.; Spagnoli, G. C.; Ferrantini, M.; Heberer, M. (2002): IFN-alpha2a induces IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 production in monocyte-derived dendritic cells and enhances their capacity to attract and stimulate CD8+ effector T cells. In: *Journal of leukocyte biology* 71 (4), S. 669–676. DOI: 10.1189/jlb.71.4.669.
- Paget, C.; Mallewaey, T.; Speak, A. O.; Torres, D.; Fontaine, J.; Sheehan, K. C. F. et al. (2007): Activation of invariant NKT cells by toll-like receptor 9-stimulated dendritic cells requires type I interferon and charged glycosphingolipids. In: *Immunity* 27 (4), S. 597–609. DOI: 10.1016/j.immuni.2007.08.017.
- Pahl-Seibert, M.-F.; Juelch, M.; Podlech, J.; Thomas, D.; Deegen, P.; Reddehase, M. J.; Holtappels, R. (2005): Highly protective in vivo function of cytomegalovirus IE1 epitope-specific memory CD8 T cells purified by T-cell receptor-based cell sorting. In: *Journal of virology* 79 (9), S. 5400–5413. DOI: 10.1128/JVI.79.9.5400-5413.2005.
- Park, S. H.; Weiss, A.; Benlagha, K.; Kyin, T.; Teyton, L.; Bendelac, A. (2001): The mouse CD1d-restricted repertoire is dominated by a few autoreactive T cell receptor families. In: *The Journal of experimental medicine* 193 (8), S. 893–904. DOI: 10.1084/jem.193.8.893.
- Pass, R. F. (1985): Epidemiology and transmission of cytomegalovirus. In: *The Journal of infectious diseases* 152 (2), S. 243–248. DOI: 10.1093/infdis/152.2.243.
- Pellett, P. E.; Roizman, B. (2007): The family Herpesviridae: a brief introduction. In: Knipe, D. M.; Fields, B. N. (Hg.): *Fields of Virology*. 5th. New York, USA: Lippincott Williams and Wilkins.
- Pellicci, D. G.; Hammond, K. J. L.; Uldrich, A. P.; Baxter, A. G.; Smyth, M. J.; Godfrey, D. I. (2002): A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1(-)CD4(+) CD1d-dependent precursor stage. In: *The Journal of experimental medicine* 195 (7), S. 835–844. DOI: 10.1084/jem.20011544.
- Pellicci, D. G.; Koay, H.-F.; Berzins, S. P. (2020): Thymic development of unconventional T cells: how NKT cells, MAIT cells and $\gamma\delta$ T cells emerge. In: *Nature reviews. Immunology*. DOI: 10.1038/s41577-020-0345-y.
- Pellicci, D. G.; Uldrich, A. P.; Kyparissoudis, K.; Crowe, N. Y.; Brooks, A. G.; Hammond, K. J. L. et al. (2003): Intrathymic NKT cell development is blocked by the presence of alpha-galactosylceramide. In: *European journal of immunology* 33 (7), S. 1816–1823. DOI: 10.1002/eji.200323894.

- Picarda, G.; Benedict, C. A. (2018): Cytomegalovirus: Shape-Shifting the Immune System. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 200 (12), S. 3881–3889. DOI: 10.4049/jimmunol.1800171.
- Picone, O.; Vauloup-Fellous, C.; Cordier, A. G.; Guitton, S.; Senat, M. V.; Fuchs, F. et al. (2013): A series of 238 cytomegalovirus primary infections during pregnancy. Description and outcome. In: *Prenatal diagnosis* 33 (8), S. 751–758. DOI: 10.1002/pd.4118.
- Pinto, A. K.; Munks, M. W.; Koszinowski, U. H.; Hill, A. B. (2006): Coordinated function of murine cytomegalovirus genes completely inhibits CTL lysis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177 (5), S. 3225–3234. DOI: 10.4049/jimmunol.177.5.3225.
- Pitard, V.; Roumanes, D.; Lafarge, X.; Couzi, L.; Garrigue, I.; Lafon, M.-E. et al. (2008): Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. In: *Blood* 112 (4), S. 1317–1324. DOI: 10.1182/blood-2008-01-136713.
- Plummer, G. (1967): Comparative virology of the herpes group. In: *Progress in medical virology. Fortschritte der medizinischen Virusforschung. Progres en virologie medicale* 9, S. 302–340.
- Podlech, J.; Holtappels, R.; Pahl-Seibert, M. F.; Steffens, H. P.; Reddehase, M. J. (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. In: *Journal of virology* 74 (16), S. 7496–7507. DOI: 10.1128/jvi.74.16.7496-7507.2000.
- Podlech, J.; Holtappels, R.; Wirtz, N.; Steffens, H. P.; Reddehase, M. J. (1998): Reconstitution of CD8 T cells is essential for the prevention of multiple-organ cytomegalovirus histopathology after bone marrow transplantation. In: *The Journal of general virology* 79 (Pt 9), S. 2099–2104. DOI: 10.1099/0022-1317-79-9-2099.
- Podlech, Jürgen; Holtappels, Rafaela; Grzimek, Natascha K.A; Reddehase, Matthias J. (2002): Animal models. Murine cytomegalovirus. In: *Immunology of Infection*, Bd. 32: Elsevier (Methods in Microbiology), 493-IN11.
- Porubsky, S.; Speak, A. O.; Luckow, B.; Cerundolo, V.; Platt, F. M.; Grone, H.-J. (2007): Normal development and function of invariant natural killer T cells in mice with isoglobotrihexosylceramide (iGb3) deficiency. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (14), S. 5977–5982. DOI: 10.1073/pnas.0611139104.
- Prigozy, T. I.; Naidenko, O.; Qasba, P.; Elewaut, D.; Brossay, L.; Khurana, A. et al. (2001): Glycolipid antigen processing for presentation by CD1d molecules. In: *Science (New York, N.Y.)* 291 (5504), S. 664–667. DOI: 10.1126/science.291.5504.664.
- Qian, C.; An, H.; Yu, Y.; Liu, S.; Cao, X. (2007): TLR agonists induce regulatory dendritic cells to recruit Th1 cells via preferential IP-10 secretion and inhibit Th1 proliferation. In: *Blood* 109 (8), S. 3308–3315. DOI: 10.1182/blood-2006-08-040337.
- Qu, C.; Edwards, E. W.; Tacke, F.; Angeli, V.; Llodrá, J.; Sanchez-Schmitz, G. et al. (2004): Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes. In: *The Journal of experimental medicine* 200 (10), S. 1231–1241. DOI: 10.1084/jem.20032152.

- Quinnan, G. V.; Manischewitz, J. E.; Ennis, F. A. (1978): Cytotoxic T lymphocyte response to murine cytomegalovirus infection. In: *Nature* 273 (5663), S. 541–543. DOI: 10.1038/273541a0.
- Rachitskaya, A. V.; Hansen, A. M.; Horai, R.; Li, Z.; Villasmil, R.; Luger, D. et al. (2008): Cutting edge: NKT cells constitutively express IL-23 receptor and RORgammat and rapidly produce IL-17 upon receptor ligation in an IL-6-independent fashion. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180 (8), S. 5167–5171. DOI: 10.4049/jimmunol.180.8.5167.
- Raftery, M. J.; Hitzler, M.; Winau, F.; Giese, T.; Plachter, B.; Kaufmann, S. H. E.; Schonrich, G. (2008): Inhibition of CD1 antigen presentation by human cytomegalovirus. In: *Journal of virology* 82 (9), S. 4308–4319. DOI: 10.1128/JVI.01447-07.
- Ramnarayan, V. R.; Hein, Z.; Janßen, L.; Lis, N.; Ghanwat, S.; Springer, S. (2018): Cytomegalovirus gp40/m152 Uses TMED10 as ER Anchor to Retain MHC Class I. In: *Cell reports* 23 (10), S. 3068–3077. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.05.017.
- Ranson, T.; Vosshenrich, C. A. J.; Corcuff, E.; Richard, O.; Laloux, V.; Lehuen, A.; Di Santo, J. P. (2003): IL-15 availability conditions homeostasis of peripheral natural killer T cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (5), S. 2663–2668. DOI: 10.1073/pnas.0535482100.
- Rao, P.; Pham, H. T.; Kulkarni, A.; Yang, Y.; Liu, X.; Knipe, D. M. et al. (2011): Herpes simplex virus 1 glycoprotein B and US3 collaborate to inhibit CD1d antigen presentation and NKT cell function. In: *Journal of virology* 85 (16), S. 8093–8104. DOI: 10.1128/JVI.02689-10.
- Rawlinson, W. D.; Farrell, H. E.; Barrell, B. G. (1996): Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. In: *Journal of virology* 70 (12), S. 8833–8849. DOI: 10.1128/JVI.70.12.8833-8849.1996.
- Reddehase, M. J. (2002): Antigens and immunoevasins. Opponents in cytomegalovirus immune surveillance. In: *Nature reviews. Immunology* 2 (11), S. 831–844. DOI: 10.1038/nri932.
- Reddehase, M. J. (2016): Mutual Interference between Cytomegalovirus and Reconstitution of Protective Immunity after Hematopoietic Cell Transplantation. In: *Frontiers in immunology* 7, S. 294. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00294.
- Reddehase, M. J.; Koszinowski, U. H. (1984): Significance of herpesvirus immediate early gene expression in cellular immunity to cytomegalovirus infection. In: *Nature* 312 (5992), S. 369–371. DOI: 10.1038/312369a0.
- Reddehase, M. J.; Lemmermann, N. A. W. (2018): Mouse Model of Cytomegalovirus Disease and Immunotherapy in the Immunocompromised Host: Predictions for Medical Translation that Survived the "Test of Time". In: *Viruses* 10 (12). DOI: 10.3390/v10120693.
- Reddehase, M. J.; Lemmermann, N. A. W. (2019): Cellular reservoirs of latent cytomegaloviruses. In: *Medical Microbiology and Immunology* 208 (3-4), S. 391–403. DOI: 10.1007/s00430-019-00592-y.
- Reddehase, M. J.; Mutter, W.; Münch, K.; Bühring, H. J.; Koszinowski, U. H. (1987): CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. In: *Journal of virology* 61 (10), S. 3102–3108. DOI: 10.1128/JVI.61.10.3102-3108.1987.

- Reddehase, M. J.; Podlech, J.; Grzimek, N. K. A. (2002): Mouse models of cytomegalovirus latency: overview. In: *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 25 Suppl 2, S23-36. DOI: 10.1016/s1386-6532(02)00087-2.
- Reddehase, M. J.; Rothbard, J. B.; Koszinowski, U. H. (1989): A pentapeptide as minimal antigenic determinant for MHC class I-restricted T lymphocytes. In: *Nature* 337 (6208), S. 651–653. DOI: 10.1038/337651a0.
- Reddehase, M. J.; Weiland, F.; Münch, K.; Jonjic, S.; Lüske, A.; Koszinowski, U. H. (1985): Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. In: *Journal of virology* 55 (2), S. 264–273. DOI: 10.1128/JVI.55.2.264-273.1985.
- Redeker, A.; Remmerswaal, E. B. M.; van der Gracht, E. T. I.; Welten, S. P. M.; Höllt, T.; Koning, F. et al. (2017): The Contribution of Cytomegalovirus Infection to Immune Senescence Is Set by the Infectious Dose. In: *Frontiers in immunology* 8, S. 1953. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01953.
- Reilly, E. C.; Thompson, E. A.; Aspeslagh, S.; Wands, J. R.; Elewaut, D.; Brossay, L. (2012): Activated iNKT cells promote memory CD8+ T cell differentiation during viral infection. In: *PloS one* 7 (5), S. e37991. DOI: 10.1371/journal.pone.0037991.
- Reusch, U.; Bernhard, O.; Koszinowski, U.; Schu, P. (2002): AP-1A and AP-3A lysosomal sorting functions. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 3 (10), S. 752–761. DOI: 10.1034/j.1600-0854.2002.31007.x.
- Reusch, U.; Muranyi, W.; Lucin, P.; Burgert, H. G.; Hengel, H.; Koszinowski, U. H. (1999): A cytomegalovirus glycoprotein re-routes MHC class I complexes to lysosomes for degradation. In: *The EMBO journal* 18 (4), S. 1081–1091. DOI: 10.1093/emboj/18.4.1081.
- Reusser, P.; Riddell, S. R.; Meyers, J. D.; Greenberg, P. D. (1991): Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. In: *Blood* 78 (5), S. 1373–1380. DOI: 10.1182/blood.V78.5.1373.1373.
- Richmond, J.; Tuzova, M.; Cruikshank, W.; Center, D. M. (2014): Regulation of cellular processes by interleukin-16 in homeostasis and cancer. In: *Journal of cellular physiology* 229 (2), S. 139–147. DOI: 10.1002/jcp.24441.
- Riddell, S. R.; Watanabe, K. S.; Goodrich, J. M.; Li, C. R.; Agha, M. E.; Greenberg, P. D. (1992): Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. In: *Science (New York, N.Y.)* 257 (5067), S. 238–241. DOI: 10.1126/science.1352912.
- Rigaud, S.; Fondaneche, M. C.; Lambert, N.; Pasquier, B.; Mateo, V.; Soulas, P. et al. (2006): XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. In: *Nature* 444 (7115), S. 110–114. DOI: 10.1038/nature05257.
- Roberts, T. J.; Sriram, V.; Spence, P. M.; Gui, M.; Hayakawa, K.; Bacik, I. et al. (2002): Recycling CD1d1 molecules present endogenous antigens processed in an endocytic compartment to NKT cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 168 (11), S. 5409–5414. DOI: 10.4049/jimmunol.168.11.5409.
- Rock, K. L.; York, I. A.; Saric, T.; Goldberg, A. L. (2002): Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. In: *Advances in immunology* 80, S. 1–70. DOI: 10.1016/s0065-2776(02)80012-8.

- Roizman, B.; Baines, J. (1991): The diversity and unity of Herpesviridae. In: *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 14 (2), S. 63–79. DOI: 10.1016/0147-9571(91)90122-t.
- Roizman, B.; Carmichael, L. E.; Deinhardt, F.; de-The, G.; Nahmias, A. J.; Plowright, W. et al. (1981): Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. In: *Intervirology* 16 (4), S. 201–217. DOI: 10.1159/000149269.
- Roizman, B.; Sears, A. E. (1987): An inquiry into the mechanisms of herpes simplex virus latency. In: *Annual review of microbiology* 41, S. 543–571. DOI: 10.1146/annurev.mi.41.100187.002551.
- Roizmann, B.; Desrosiers, R. C.; Fleckenstein, B.; Lopez, C.; Minson, A. C.; Studdert, M. J. (1992): The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. In: *Archives of virology* 123 (3-4), S. 425–449. DOI: 10.1007/BF01317276.
- Ross, D. S.; Dollard, S. C.; Victor, M.; Sumartojo, E.; Cannon, M. J. (2006): The epidemiology and prevention of congenital cytomegalovirus infection and disease. Activities of the Centers for Disease Control and Prevention Workgroup. In: *Journal of women's health* (2002) 15 (3), S. 224–229. DOI: 10.1089/jwh.2006.15.224.
- Roy, K. C.; Maricic, I.; Khurana, A.; Smith, T. R. F.; Halder, R. C.; Kumar, V. (2008): Involvement of secretory and endosomal compartments in presentation of an exogenous self-glycolipid to type II NKT cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180 (5), S. 2942–2950. DOI: 10.4049/jimmunol.180.5.2942.
- Sag, D.; Krause, P.; Hedrick, C. C.; Kronenberg, M.; Wingender, G. (2014): IL-10-producing NKT10 cells are a distinct regulatory invariant NKT cell subset. In: *The Journal of clinical investigation* 124 (9), S. 3725–3740. DOI: 10.1172/JCI12308.
- Salio, M.; Speak, A. O.; Shepherd, D.; Polzella, P.; Illarionov, P. A.; Veerapen, N. et al. (2007): Modulation of human natural killer T cell ligands on TLR-mediated antigen-presenting cell activation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (51), S. 20490–20495. DOI: 10.1073/pnas.0710145104.
- Sambrook, J.; Russell, D. W. (2001): Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez, D. J.; Gumperz, J. E.; Ganem, D. (2005): Regulation of CD1d expression and function by a herpesvirus infection. In: *The Journal of clinical investigation* 115 (5), S. 1369–1378. DOI: 10.1172/JCI24041.
- Sandberg, J. K.; Stoddart, C. A.; Brilot, F.; Jordan, K. A.; Nixon, D. F. (2004): Development of innate CD4+ alpha-chain variable gene segment 24 (Valpha24) natural killer T cells in the early human fetal thymus is regulated by IL-7. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (18), S. 7058–7063. DOI: 10.1073/pnas.0305986101.
- Santo, C. de; Arscott, R.; Booth, S.; Karydis, I.; Jones, M.; Asher, R. et al. (2010): Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A. In: *Nature immunology* 11 (11), S. 1039–1046. DOI: 10.1038/ni.1942.
- Santodomingo-Garzon, T.; Swain, M. G. (2011): Role of NKT cells in autoimmune liver disease. In: *Autoimmunity reviews* 10 (12), S. 793–800. DOI: 10.1016/j.autrev.2011.06.003.

- Saric, T.; Chang, S.-C.; Hattori, A.; York, I. A.; Markant, S.; Rock, K. L. et al. (2002): An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. In: *Nature immunology* 3 (12), S. 1169–1176. DOI: 10.1038/ni859.
- Scalzo, A. A.; Fitzgerald, N. A.; Simmons, A.; La Vista, A. B.; Shellam, G. R. (1990): Cmv-1, a genetic locus that controls murine cytomegalovirus replication in the spleen. In: *The Journal of experimental medicine* 171 (5), S. 1469–1483. DOI: 10.1084/jem.171.5.1469.
- Scanlon, S. T.; Thomas, S. Y.; Ferreira, C. M.; Bai, L.; Krausz, T.; Savage, P. B.; Bendelac, A. (2011): Airborne lipid antigens mobilize resident intravascular NKT cells to induce allergic airway inflammation. In: *The Journal of experimental medicine* 208 (10), S. 2113–2124. DOI: 10.1084/jem.20110522.
- Schaefer, M. R.; Wonderlich, E. R.; Roeth, J. F.; Leonard, J. A.; Collins, K. L. (2008): HIV-1 Nef targets MHC-I and CD4 for degradation via a final common beta-COP-dependent pathway in T cells. In: *PLoS pathogens* 4 (8), S. e1000131. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000131.
- Schall, T. J. (1991): Biology of the RANTES/SIS cytokine family. In: *Cytokine* 3 (3), S. 165–183. DOI: 10.1016/1043-4666(91)90013-4.
- Schmieg, J.; Yang, G.; Franck, R. W.; van Rooijen, N.; Tsuji, M. (2005): Glycolipid presentation to natural killer T cells differs in an organ-dependent fashion. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (4), S. 1127–1132. DOI: 10.1073/pnas.0408288102.
- Schroder, K.; Hertzog, P. J.; Ravasi, T.; Hume, D. A. (2004): Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. In: *Journal of leukocyte biology* 75 (2), S. 163–189. DOI: 10.1189/jlb.0603252.
- Sciammas, R.; Johnson, R. M.; Sperling, A. I.; Brady, W.; Linsley, P. S.; Spear, P. G. et al. (1994): Unique antigen recognition by a herpesvirus-specific TCR-gamma delta cell. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 152 (11), S. 5392–5397.
- Sell, S.; Dietz, M.; Schneider, A.; Holtappels, R.; Mach, M.; Winkler, T. H. (2015): Control of murine cytomegalovirus infection by $\gamma\delta$ T cells. In: *PLoS pathogens* 11 (2), e1004481. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004481.
- Semmling, V.; Lukacs-Kornek, V.; Thaiss, C. A.; Quast, T.; Hochheiser, K.; Panzer, U. et al. (2010): Alternative cross-priming through CCL17-CCR4-mediated attraction of CTLs toward NKT cell-licensed DCs. In: *Nature immunology* 11 (4), S. 313–320. DOI: 10.1038/ni.1848.
- Serbina, N. V.; Pamer, E. G. (2006): Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. In: *Nature immunology* 7 (3), S. 311–317. DOI: 10.1038/ni1309.
- Shimamura, M.; Ohteki, T.; Beutner, U.; MacDonald, H. R. (1997): Lack of directed V alpha 14-J alpha 281 rearrangements in NK1+ T cells. In: *European journal of immunology* 27 (6), S. 1576–1579. DOI: 10.1002/eji.1830270638.
- Sille, F. C. M.; Boxem, M.; Sprengers, D.; Veerapen, N.; Besra, G.; Boes, M. (2009): Distinct requirements for CD1d intracellular transport for development of V(alpha)14 iNKT cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183 (3), S. 1780–1788. DOI: 10.4049/jimmunol.0901354.

- Simon, C. O.; Holtappels, R.; Tervo, H.-M.; Böhm, V.; Däubner, T.; Oehrlein-Karpi, S. A. et al. (2006): CD8 T cells control cytomegalovirus latency by epitope-specific sensing of transcriptional reactivation. In: *Journal of virology* 80 (21), S. 10436–10456. DOI: 10.1128/JVI.01248-06.
- Singh, A. K.; Tripathi, P.; Cardell, S. L. (2018): Type II NKT Cells: An Elusive Population With Immunoregulatory Properties. In: *Frontiers in immunology* 9, S. 1969. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01969.
- Sinzger, C.; Digel, M.; Jahn, G. (2008): Cytomegalovirus Cell Tropism. In: R.W. Compans; M.D. Cooper; H. Tasuku; H. Koprowski; F. Melchers; Oldstone M.B.A. et al. (Hg.): *Human Cytomegalovirus*, Springer Berlin Heidelberg (Current topics in Microbiology and Immunology), Bd. 325, S. 63–83.
- Sköld, M.; Xiong, X.; Illarionov, P. A.; Besra, G. S.; Behar, S. M. (2005): Interplay of cytokines and microbial signals in regulation of CD1d expression and NKT cell activation. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175 (6), S. 3584–3593. DOI: 10.4049/jimmunol.175.6.3584.
- Smiley, S. T.; Kaplan, M. H.; Grusby, M. J. (1997): Immunoglobulin E production in the absence of interleukin-4-secreting CD1-dependent cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 275 (5302), S. 977–979. DOI: 10.1126/science.275.5302.977.
- Smith, H. R. C.; Heusel, J. W.; Mehta, I. K.; Kim, S.; Dorner, B. G.; Naidenko, O. V. et al. (2002): Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (13), S. 8826–8831. DOI: 10.1073/pnas.092258599.
- Smith, M. G. (1954): Propagation of salivary gland virus of the mouse in tissue cultures. In: *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* 86 (3), S. 435–440. DOI: 10.3181/00379727-86-21123.
- Smith, M. G.; Smith, M. G. (1956): Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. In: *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* 92 (2), S. 424–430. DOI: 10.3181/00379727-92-22498.
- Smyth, M. J.; Crowe, N. Y.; Godfrey, D. I. (2001): NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. In: *International immunology* 13 (4), S. 459–463. DOI: 10.1093/intimm/13.4.459.
- Smyth, M. J.; Crowe, N. Y.; Pellicci, D. G.; Kyparissoudis, K.; Kelly, J. M.; Takeda, K. et al. (2002): Sequential production of interferon-gamma by NK1.1(+) T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of alpha-galactosylceramide. In: *Blood* 99 (4), S. 1259–1266. DOI: 10.1182/blood.v99.4.1259.
- Stagno, S.; Pass, R. F.; Cloud, G.; Britt, W. J.; Henderson, R. E.; Walton, P. D. et al. (1986): Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. In: *JAMA* 256 (14), S. 1904–1908. DOI: 10.1001/jama.1986.03380140074025.
- Staras, S. A. S.; Dollard, S. C.; Radford, K. W.; Flanders, W. D.; Pass, R. F.; Cannon, M. J. (2006): Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 43 (9), S. 1143–1151. DOI: 10.1086/508173.

- Stemberger, C.; Huster, K. M.; Koffler, M.; Anderl, F.; Schiemann, M.; Wagner, H.; Busch, D. H. (2007a): A single naive CD8+ T cell precursor can develop into diverse effector and memory subsets. In: *Immunity* 27 (6), S. 985–997. DOI: 10.1016/j.immuni.2007.10.012.
- Stemberger, C.; Neuenhahn, M.; Buchholz, V. R.; Busch, D. H. (2007b): Origin of CD8+ effector and memory T cell subsets. In: *Cellular & molecular immunology* 4 (6), S. 399–405.
- Stenberg, R. M.; Thomsen, D. R.; Stinski, M. F. (1984): Structural analysis of the major immediate early gene of human cytomegalovirus. In: *Journal of virology* 49 (1), S. 190–199. DOI: 10.1128/JVI.49.1.190-199.1984.
- Stern-Ginossar, N.; Weisburd, B.; Michalski, A.; Le, V. T. K.; Hein, M. Y.; Huang, S.-X. et al. (2012): Decoding human cytomegalovirus. In: *Science (New York, N.Y.)* 338 (6110), S. 1088–1093. DOI: 10.1126/science.1227919.
- Stock, P.; Lombardi, V.; Kohlrantz, V.; Akbari, O. (2009): Induction of airway hyperreactivity by IL-25 is dependent on a subset of invariant NKT cells expressing IL-17RB. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182 (8), S. 5116–5122. DOI: 10.4049/jimmunol.0804213.
- Sugawara, N.; Ira, G.; Haber, J. E. (2000): DNA length dependence of the single-strand annealing pathway and the role of *Saccharomyces cerevisiae* RAD59 in double-strand break repair. In: *Molecular and cellular biology* 20 (14), S. 5300–5309. DOI: 10.1128/mcb.20.14.5300-5309.2000.
- Sumaria, N.; Van Dommelen, S. L. H.; Andoniou, C. E.; Smyth, M. J.; Scalzo, A. A.; Degli-Esposti, M. A. (2009): The roles of interferon-gamma and perforin in antiviral immunity in mice that differ in genetically determined NK-cell-mediated antiviral activity. In: *Immunology and cell biology* 87 (7), S. 559–566. DOI: 10.1038/icb.2009.41.
- Swanson, E. C.; Schleiss, M. R. (2013): Congenital cytomegalovirus infection. New prospects for prevention and therapy. In: *Pediatric clinics of North America* 60 (2), S. 335–349. DOI: 10.1016/j.pcl.2012.12.008.
- Syn, W.-K.; Oo, Y. H.; Pereira, T. A.; Karaca, G. F.; Jung, Y.; Omenetti, A. et al. (2010): Accumulation of natural killer T cells in progressive nonalcoholic fatty liver disease. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 51 (6), S. 1998–2007. DOI: 10.1002/hep.23599.
- Tang, Q.; Murphy, E. A.; Maul, G. G. (2006): Experimental confirmation of global murine cytomegalovirus open reading frames by transcriptional detection and partial characterization of newly described gene products. In: *Journal of virology* 80 (14), S. 6873–6882. DOI: 10.1128/JVI.00275-06.
- Tatituri, R. V. V.; Watts, G. F. M.; Bhowruth, V.; Barton, N.; Rothchild, A.; Hsu, F.-F. et al. (2013): Recognition of microbial and mammalian phospholipid antigens by NKT cells with diverse TCRs. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (5), S. 1827–1832. DOI: 10.1073/pnas.1220601110.
- Tay, C. H.; Welsh, R. M. (1997): Distinct organ-dependent mechanisms for the control of murine cytomegalovirus infection by natural killer cells. In: *Journal of virology* 71 (1), S. 267–275. DOI: 10.1128/JVI.71.1.267-275.1997.
- Terashima, A.; Watarai, H.; Inoue, S.; Sekine, E.; Nakagawa, R.; Hase, K. et al. (2008): A novel subset of mouse NKT cells bearing the IL-17 receptor B responds to IL-25 and contributes to airway hyperreactivity. In: *The Journal of experimental medicine* 205 (12), S. 2727–2733. DOI: 10.1084/jem.20080698.

- Terhune, S. S.; Schröer, J.; Shenk, T. (2004): RNAs are packaged into human cytomegalovirus virions in proportion to their intracellular concentration. In: *Journal of virology* 78 (19), S. 10390–10398. DOI: 10.1128/JVI.78.19.10390-10398.2004.
- Tessmer, M. S.; Fatima, A.; Paget, C.; Trottein, F.; Brossay, L. (2009): NKT cell immune responses to viral infection. In: *Expert opinion on therapeutic targets* 13 (2), S. 153–162. DOI: 10.1517/14712590802653601.
- Thanabalasuriar, A.; Neupane, A. S.; Wang, J.; Krummel, M. F.; Kubes, P. (2016): iNKT Cell Emigration out of the Lung Vasculature Requires Neutrophils and Monocyte-Derived Dendritic Cells in Inflammation. In: *Cell reports* 16 (12), S. 3260–3272. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.07.052.
- Thapa, P.; Manso, B.; Chung, J. Y.; Sinibaldo R. A.; Xue, H.-H.; Sant' Angelo, D. B.; Shapiro-Smith V. (2017): The differentiation of ROR- γ t expressing iNKT17 cells is orchestrated by Runx1. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 7018. DOI: 10.1038/s41598-017-07365-8.
- Tischer, B. K.; Einem, J. von; Kaufer, B.; Osterrieder, N. (2006): Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. In: *BioTechniques* 40 (2), S. 191–197. DOI: 10.2144/000112096.
- Tooze, J.; Hollinshead, M.; Reis, B.; Radsak, K.; Kern, H. (1993): Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. In: *European journal of cell biology* 60 (1), S. 163–178.
- Tortorella, D.; Gewurz, B.; Schust, D.; Furman, M.; Ploegh, H. (2000): Down-regulation of MHC class I antigen presentation by HCMV; lessons for tumor immunology. In: *Immunological investigations* 29 (2), S. 97–100. DOI: 10.3109/08820130009062289.
- Tsou, C.-L.; Peters, W.; Si, Y.; Slaymaker, S.; Aslanian, A. M.; Weisberg, S. P. et al. (2007): Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. In: *The Journal of clinical investigation* 117 (4), S. 902–909. DOI: 10.1172/JCI29919.
- Tupin, E.; Kinjo, Y.; Kronenberg, M. (2007): The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. In: *Nature reviews. Microbiology* 5 (6), S. 405–417. DOI: 10.1038/nrmicro1657.
- Tyznik, A. J.; Tupin, E.; Nagarajan, N. A.; Her, M. J.; Benedict, C. A.; Kronenberg, M. (2008): Cutting edge: the mechanism of invariant NKT cell responses to viral danger signals. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 181 (7), S. 4452–4456.
- Tyznik, A. J.; Verma, S.; Wang, Q.; Kronenberg, M.; Benedict, C. A. (2014): Distinct requirements for activation of NKT and NK cells during viral infection. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 192 (8), S. 3676–3685. DOI: 10.4049/jimmunol.1300837.
- Valchanova, R. S.; Picard-Maureau, M.; Budt, M.; Brune, W. (2006): Murine cytomegalovirus m142 and m143 are both required to block protein kinase R-mediated shutdown of protein synthesis. In: *Journal of virology* 80 (20), S. 10181–10190. DOI: 10.1128/JVI.00908-06.
- Van Dommelen, S. L. H.; Degli-Esposti, M. A. (2004): NKT cells and viral immunity. In: *Immunology and cell biology* 82 (3), S. 332–341. DOI: 10.1111/j.0818-9641.2004.01261.x.

- Van Dommelen, S. L. H.; Tabarias, H. A.; Smyth, M. J.; Degli-Esposti, M. A. (2003): Activation of natural killer (NK) T cells during murine cytomegalovirus infection enhances the antiviral response mediated by NK cells. In: *Journal of virology* 77 (3), S. 1877–1884. DOI: 10.1128/jvi.77.3.1877-1884.2003.
- van Rhijn, I.; Young, D. C.; Im, J. S.; Levery, S. B.; Illarionov, P. A.; Besra, G. S. et al. (2004): CD1d-restricted T cell activation by nonlipidic small molecules. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (37), S. 13578–13583. DOI: 10.1073/pnas.0402838101.
- Vartabedian, V. F.; Savage, P. B.; Teyton, L. (2016): The processing and presentation of lipids and glycolipids to the immune system. In: *Immunological reviews* 272 (1), S. 109–119. DOI: 10.1111/imr.12431.
- Venema, H.; van den Berg, A. P.; van Zanten, C.; van Son, W. J.; van der Giessen, M.; The, T. H. (1994): Natural killer cell responses in renal transplant patients with cytomegalovirus infection. In: *Journal of medical virology* 42 (2), S. 188–192. DOI: 10.1002/jmv.1890420216.
- Vidal, S.; Krmpotic, A.; Pyzik, M.; Jonjić, S.: Innate immunity to cytomegalovirus in the murine model. Kapitel II.32. p.191-213. In: Reddehase MJ (ed.), *Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Vidal, S. M.; Lanier, L. L. (2006): NK cell recognition of mouse cytomegalovirus-infected cells. In: *Current topics in microbiology and immunology* 298, S. 183–206. DOI: 10.1007/3-540-27743-9_10.
- Vieth, J. A.; Das, J.; Ranaivoson, F. M.; Comoletti, D.; Denzin, L. K.; Sant'Angelo, D. B. (2017): TCR α -TCR β pairing controls recognition of CD1d and directs the development of adipose NKT cells. In: *Nature immunology* 18 (1), S. 36–44. DOI: 10.1038/ni.3622.
- Vivier, E.; Ugolini, S.; Blaise, D.; Chabannon, C.; Brossay, L. (2012): Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. In: *Nature reviews. Immunology* 12 (4), S. 239–252. DOI: 10.1038/nri3174.
- Volarevic, V.; Al-Qahtani, A.; Arsenijevic, N.; Pajovic, S.; Lukic, M. L. (2010): Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) and IL-1Ra producing mesenchymal stem cells as modulators of diabetogenesis. In: *Autoimmunity* 43 (4), S. 255–263. DOI: 10.3109/08916930903305641.
- Wagner, M.; Gutermann, A.; Podlech, J.; Reddehase, M. J.; Koszinowski, U. H. (2002): Major histocompatibility complex class I allele-specific cooperative and competitive interactions between immune evasion proteins of cytomegalovirus. In: *The Journal of experimental medicine* 196 (6), S. 805–816. DOI: 10.1084/jem.20020811.
- Wagner, M.; Jonjic, S.; Koszinowski, U. H.; Messerle, M. (1999): Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. In: *Journal of virology* 73 (8), S. 7056–7060. DOI: 10.1128/JVI.73.8.7056-7060.1999.
- Wagstaff, A. J.; Bryson, H. M. (1994): Foscarnet. A reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunocompromised patients with viral infections. In: *Drugs* 48 (2), S. 199–226. DOI: 10.2165/00003495-199448020-00007.
- Waiser, J.; Budde, K.; Schreiber, M.; Korn, K.; Stenglein, S.; Drenckhahn, J. T. et al. (1998): Effectiveness of deferred therapy with ganciclovir in renal allograft recipients with

- cytomegalovirus disease. In: *Transplantation proceedings* 30 (5), S. 2083–2085. DOI: 10.1016/s0041-1345(98)00547-8.
- Walter, E. A.; Greenberg, P. D.; Gilbert, M. J.; Finch, R. J.; Watanabe, K. S.; Thomas, E. D.; Riddell, S. R. (1995): Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. In: *The New England journal of medicine* 333 (16), S. 1038–1044. DOI: 10.1056/NEJM199510193331603.
- Walton, S. M.; Mandaric, S.; Torti, N.; Zimmermann, A.; Hengel, H.; Oxenius, A. (2011): Absence of cross-presenting cells in the salivary gland and viral immune evasion confine cytomegalovirus immune control to effector CD4 T cells. In: *PLoS pathogens* 7 (8), e1002214. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002214.
- Wang, C.; Zhang, X.; Bialek, S.; Cannon, M. J. (2011): Attribution of congenital cytomegalovirus infection to primary versus non-primary maternal infection. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 52 (2), e11-3. DOI: 10.1093/cid/ciq085.
- Wang, J.; Li, Y.; Kinjo, Y.; Mac, T.-T.; Gibson, D.; Painter, G. F. et al. (2010): Lipid binding orientation within CD1d affects recognition of *Borrelia burgdorferi* antigens by NKT cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (4), S. 1535–1540. DOI: 10.1073/pnas.0909479107.
- Ward, P. A. (2009): Functions of C5a receptors. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 87 (4), S. 375–378. DOI: 10.1007/s00109-009-0442-7.
- Warming, S.; Costantino, N.; Court, D. L.; Jenkins, N. A.; Copeland, N. G. (2005): Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. In: *Nucleic acids research* 33 (4), e36. DOI: 10.1093/nar/gni035.
- Webster, K. E.; Kim, H-O; Kyparissoudis, K.; Corpuz, T. M.; Pinget, G. V.; Uldrich, A. P. et al. (2014): IL-17-producing NKT cells depend exclusively on IL-7 for homeostasis and survival. In: *Mucosal immunology* 7 (5), S. 1058–1067. DOI: 10.1038/mi.2013.122.
- Wei, D. G.; Lee, H.; Park, S.-H.; Beaudoin, L.; Teyton, L.; Lehuen, A.; Bendelac, A. (2005): Expansion and long-range differentiation of the NKT cell lineage in mice expressing CD1d exclusively on cortical thymocytes. In: *The Journal of experimental medicine* 202 (2), S. 239–248. DOI: 10.1084/jem.20050413.
- Weinreich, M. A.; Odumade, O. A.; Jameson, S. C.; Hogquist, K. A. (2010): T cells expressing the transcription factor PLZF regulate the development of memory-like CD8+ T cells. In: *Nature immunology* 11 (8), S. 709–716. DOI: 10.1038/ni.1898.
- Weller, T. H.; Hanshaw, J. B.; Scott, D. E. (1960): Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. In: *Virology* 12, S. 130–132. DOI: 10.1016/0042-6822(60)90156-2.
- Wesley, J. D.; Tessmer, M. S.; Chaukos, D.; Brossay, L. (2008): NK cell-like behavior of Valpha14i NK T cells during MCMV infection. In: *PLoS pathogens* 4 (7), S. e1000106. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000106.
- Wilhelmi, V.; Simon, C. O.; Podlech, J.; Böhm, V.; Däubner, T.; Emde, S. et al. (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. In: *Journal of virology* 82 (20), S. 9900–9916. DOI: 10.1128/JVI.00928-08.

- Wills, M. R.; Poole, E.; Lau, B.; Krishna, B.; Sinclair, J. H. (2015): The immunology of human cytomegalovirus latency: could latent infection be cleared by novel immunotherapeutic strategies? In: *Cellular & molecular immunology* 12 (2), S. 128–138. DOI: 10.1038/cmi.2014.75.
- Winau, F.; Hegasy, G.; Weiskirchen, R.; Weber, S.; Cassan, C.; Sieling, P. A. et al. (2007): Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. In: *Immunity* 26 (1), S. 117–129. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.11.011.
- Wingender, G.; Krebs, P.; Beutler, B.; Kronenberg, M. (2010): Antigen-specific cytotoxicity by invariant NKT cells in vivo is CD95/CD178-dependent and is correlated with antigenic potency. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185 (5), S. 2721–2729. DOI: 10.4049/jimmunol.1001018.
- Wingender, G.; Sag, D.; Kronenberg, M. (2015): NKT10 cells: a novel iNKT cell subset. In: *Oncotarget* 6 (29), S. 26552–26553. DOI: 10.18632/oncotarget.5270.
- Wirtz, N.; Schader, S. I.; Holtappels, R.; Simon, C. O.; Lemmermann, N. A. W.; Reddehase, M. J.; Podlech, J. (2008): Polyclonal cytomegalovirus-specific antibodies not only prevent virus dissemination from the portal of entry but also inhibit focal virus spread within target tissues. In: *Medical Microbiology and Immunology* 197 (2), S. 151–158. DOI: 10.1007/s00430-008-0095-0.
- Witkowska, A. M.; Borawska, M. H. (2004): Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview. In: *European cytokine network* 15 (2), S. 91–98.
- Yankelevich, B.; Knobloch, C.; Nowicki, M.; Dennert, G. (1989): A novel cell type responsible for marrow graft rejection in mice. T cells with NK phenotype cause acute rejection of marrow grafts. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 142 (10), S. 3423–3430.
- Yoshimoto, T.; Paul, W. E. (1994): CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. In: *The Journal of experimental medicine* 179 (4), S. 1285–1295. DOI: 10.1084/jem.179.4.1285.
- Zajonc, D. M.; Cantu, C. 3rd; Mattner, J.; Zhou, D.; Savage, P. B.; Bendelac, A. et al. (2005): Structure and function of a potent agonist for the semi-invariant natural killer T cell receptor. In: *Nature immunology* 6 (8), S. 810–818. DOI: 10.1038/ni1224.
- Zajonc, D. M.; Kronenberg, M. (2007): CD1 mediated T cell recognition of glycolipids. In: *Current opinion in structural biology* 17 (5), S. 521–529. DOI: 10.1016/j.sbi.2007.09.010.
- Zarama, A.; Pérez-Carmona, N.; Farré, D.; Tomic, A.; Borst, E. M.; Messerle, M. et al. (2014): Cytomegalovirus m154 hinders CD48 cell-surface expression and promotes viral escape from host natural killer cell control. In: *PLoS pathogens* 10 (3), e1004000. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004000.
- Zeissig, S.; Murata, K.; Sweet, L.; Publicover, J.; Hu, Z.; Kaser, A. et al. (2012): Hepatitis B virus-induced lipid alterations contribute to natural killer T cell-dependent protective immunity. In: *Nature medicine* 18 (7), S. 1060–1068. DOI: 10.1038/nm.2811.
- Zhan, X.; Lee, M.; Xiao, J.; Liu, F. (2000): Construction and characterization of murine cytomegaloviruses that contain transposon insertions at open reading frames m09 and M83. In: *Journal of virology* 74 (16), S. 7411–7421. DOI: 10.1128/jvi.74.16.7411-7421.2000.

Zhou, D.; Cantu, C. 3rd; Sagiv, Y.; Schrantz, N.; Kulkarni, A. B.; Qi, X. et al. (2004): Editing of CD1d-bound lipid antigens by endosomal lipid transfer proteins. In: *Science (New York, N.Y.)* 303 (5657), S. 523–527. DOI: 10.1126/science.1092009.

Zhou, F. (2009): Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. In: *International reviews of immunology* 28 (3-4), S. 239–260. DOI: 10.1080/08830180902978120.

Zhu, Y.; Zhang, W.; Veerapen, N.; Besra, G.; Cresswell, P. (2010): Calreticulin controls the rate of assembly of CD1d molecules in the endoplasmic reticulum. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (49), S. 38283–38292. DOI: 10.1074/jbc.M110.170530.

Ziegler, H.; Muranyi, W.; Burgert, H. G.; Kremmer, E.; Koszinowski, U. H. (2000): The luminal part of the murine cytomegalovirus glycoprotein gp40 catalyzes the retention of MHC class I molecules. In: *The EMBO journal* 19 (5), S. 870–881. DOI: 10.1093/emboj/19.5.870.

Ziegler, H.; Thale, R.; Lucin, P.; Muranyi, W.; Flohr, T.; Hengel, H. et al. (1997): A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/cis-Golgi compartments. In: *Immunity* 6 (1), S. 57–66. DOI: 10.1016/s1074-7613(00)80242-3.

Danksagung

Lebenslauf

