

**Einfluss immunevasiver Strategien des Humanen
Cytomegalovirus auf die MHC-Klasse-I-Präsentation
der viralen Antigene pp65 und IE1**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades

„DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN“

am

FACHBEREICH BIOLOGIE

der

Johannes Gutenberg - Universität

in Mainz

Katrin Besold

geboren am 18. Juli 1978

in Neustadt a. d. Weinstraße

Mainz, 2006

Zusammenfassung

Das Humane Cytomegalovirus (HCMV) stellt eine große Bedrohung für Patienten mit geschwächtem oder unausgereiftem Immunsystem dar. Bei immunkompetenten Personen hingegen werden schwere Erkrankungen insbesondere durch die Wirkung antiviraler zytotoxischer CD8⁺-T-Lymphozyten (CTL) weitgehend verhindert. Aus Zellkultur-Systemen war bekannt, dass virale Glykoproteine, welche in der US2-US11-Region des HCMV-Genoms kodiert werden, inhibitorisch in den MHC-Klasse-I-Präsentationsweg eingreifen und somit die entsprechende Präsentation durch infizierte Zellen behindern. Über die Bedeutung dieser US2-US11-vermittelten Immunevasion für die Präsentation viraler Antigene im Kontext der Virusinfektion war jedoch nichts bekannt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher der Einfluss der Immunevasion auf die MHC-Klasse-I-Präsentation der beiden wichtigsten CTL-Zielstrukturen von HCMV, dem Tegumentprotein pp65 und dem regulatorischen *immediate early* Protein IE1, untersucht werden. In Ergänzung dazu sollte das immunevasive Potential eines durch HCMV kodierten Homologs des immunmodulatorischen Zytokins Interleukin-10 (cmvIL-10) analysiert werden. Hierzu wurden über Peptidimmunisierung HLA-A2-transgener Mäuse CTL-Klone hergestellt, welche ausgesuchte Peptide aus pp65 und IE1 in Assoziation mit HLA-A2 mit hoher Spezifität und Sensitivität erkannten. Auf diese Weise konnte eine direkte Beeinflussung der MHC-Klasse-I-Präsentation durch cmvIL-10 falsifiziert und somit der Hypothese, dass das von infizierten Zellen freigesetzte Zytokin die MHC-Klasse-I-Präsentation nicht infizierter Nachbarzellen beeinflussen könnte, widersprochen werden. Mit Hilfe einer US2-US11-Deletionsmutante des Virus konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Präsentation von sowohl pp65 als auch IE1 durch die Immunevasion beeinträchtigt wird. Dabei war die Präsentation des IE1-Peptids zu jedem untersuchten Zeitpunkt nach Infektion vollständig unterdrückt. Die Präsentation des pp65-Peptids hingegen war noch bis zu 72 Stunden nach Infektion detektierbar. Diese anhaltende Präsentation wurde dabei durch MHC-Klasse-I-Komplexe hervorgerufen, die trotz der Expression der US2-US11-Region an die Zelloberfläche transportiert wurden. Anhand des pp65 konnte somit erstmals gezeigt werden, dass die Immunevasion von HCMV Bildung und Transport bestimmter MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe zwar beeinträchtigen, jedoch nicht vollständig blockieren kann. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Präsentation von IE1-Peptiden durch das Vorhandensein des pp65-Proteins nicht beeinflusst wurde. Damit konnten aus der Literatur bekannte Daten anderer widerlegt werden. Mit Hilfe einer weiteren Virusmutante konnte schließlich gezeigt werden, dass die Expression eines der Immunevasine, des gpUS11, hinreichend ist, die IE1-Präsentation vollständig zu unterdrücken, jedoch keinerlei messbaren Einfluss auf die Präsentation von pp65 ausübt. Die vorliegende Arbeit hat wichtige Erkenntnisse erbracht, die die Grundlage für weiterführende Untersuchungen zur Aufklärung der Bedeutung der einzelnen Immunevasionsgene für die Präsentation viraler Antigene im Rahmen der Virusinfektion darstellen.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Humane Cytomegalovirus (HCMV)	1
1.1.1	Morphologie	1
1.1.2	Genom	3
1.1.3	Replikation	3
1.1.4	Latenz und Reaktivierung	5
1.1.5	Infektionswege und Epidemiologie	6
1.1.6	Pathogenese	6
1.1.7	Antivirale Therapie	7
1.1.8	Impfstoffentwicklung	8
1.2	Immunologische Kontrolle einer HCMV-Infektion	8
1.2.1	CD8 ⁺ -T-Zell-Antwort	9
1.2.1.1	MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation	10
1.2.1.1.1	MHC-Klasse-I-Präsentation infizierter Zellen	10
1.2.1.1.2	Kreuzpräsentation	12
1.2.2	HCMV-spezifische CD8 ⁺ -T-Zell-Antwort	12
1.2.2.1	Antigenspezifität	13
1.2.2.1.1	Das Tegumentprotein pp65	13
1.2.2.1.2	Das <i>major immediate early 1</i> - Protein (IE1)	14
1.3	Immunevasion von HCMV	15
1.3.1	Unterdrückung der MHC-Klasse-I-restringierten Antigenpräsentation	15
1.3.2	Selektive Unterdrückung der MHC-Klasse-I-restringierten IE1-Präsentation durch das Tegumentprotein pp65	17
1.3.3	Freisetzung von cmvIL-10	18
1.4	Gegenstand der vorliegenden Arbeit	19
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Allgemeine Laborgeräte	21
2.2	Chemikalien	22
2.3	Bakterien und ihre Kultivierung	22
2.3.1	Bakterienstämme	22
2.3.2	Medien und Medienzusätze	22
2.3.2.1	Luria Bertani (LB) - Medium	22
2.3.2.2	LB-Agarplatten	23
2.3.2.3	Einfriermedium	23
2.3.2.4	Antibiotika und andere Medienzusätze	23
2.3.3	Kultivierung und Kryokonservierung	23
2.3.3.1	Flüssigkulturen	23
2.3.3.2	Kultivierung auf Agarplatten	23
2.3.3.3	Kryokonservierung (Glycerinkulturen)	23
2.3.4	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	24
2.3.4.1	Herstellung elektrokompenter Bakterien	24
2.3.4.2	Elektroporation kompetenter <i>E. coli</i>	24
2.4	Säugerzellen und ihre Kultivierung	24
2.4.1	Puffer und Lösungen	25
2.4.2	Medien und Medienzusätze	25
2.4.2.1	Antibiotika	26
2.4.2.2	Zytokine	26
2.4.3	Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität	26

2.4.4	Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen	26
2.4.5	Suspensionszellen	27
2.4.6	Adhärenz Zellen.....	27
2.4.7	Anlage muriner T-Zell-Linien (CTLL)	28
2.4.7.1	Peptide.....	28
2.4.7.2	Mäuse	29
2.4.7.3	Immunisierung	29
2.4.7.4	Herstellung von LPS-aktivierten B-Zellblasten	30
2.4.7.5	Anlage einer T-Zell-Primärkultur	30
2.4.7.6	Restimulierung	30
2.4.7.7	Klonierung.....	30
2.5	Viren und ihre Kultivierung	31
2.5.1	Virusstämme	31
2.5.2	Virus-Rekonstitution aus BACmiden.....	32
2.5.3	Infektion eukaryonter Zellen mit HCMV	32
2.5.4	Herstellung virushaltiger Überstände.....	33
2.5.5	Entfernung von Viruspartikeln aus virushaltigen Überständen.....	33
2.5.6	Bestimmung des Virustiters	33
2.5.7	Aufreinigung von Viruspartikeln aus Zellkultur-Überstand.....	34
2.6	Präparation, Analyse und Manipulation von DNA.....	35
2.6.1	Verwendete Plasmide	35
2.6.2	Isolierung von DNA	36
2.6.2.1	Isolierung von BACmid-/Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	36
2.6.2.2	Isolierung von Virus-DNA aus Zellkulturüberstand infizierter HFF	36
2.6.3	Fällung von DNA mit Isopropanol	36
2.6.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	37
2.6.5	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	37
2.6.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
2.6.6.1	Durchführung einer PCR	38
2.6.6.2	Gewinnung von <i>Template</i> -DNA aus Bakterienkolonien	38
2.6.6.3	Verwendete Oligonukleotide (<i>Primer</i>).....	38
2.6.6.4	Verwendete PCR-Programme	39
2.6.6.5	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	39
2.6.6.6	<i>Template</i> -Eliminierung	39
2.6.7	Manipulation des HCMV-Genoms über BAC-Mutagenese	40
2.6.7.1	Integration eines Selektionsmarkers über homologe Rekombination	40
2.6.7.1.1	Herstellung des PCR-Produkts zur homologen Rekombination.....	41
2.6.7.1.2	Deletion der viralen Zielsequenz durch Integration der Kanamycinresistenz-Kassette.....	41
2.6.7.2	Entfernung des Selektionsmarkers durch ortsspezifische Rekombination.....	42
2.7	Immunologische Methoden	42
2.7.1	Chromfreisetzungstest (CFT)	42
2.7.2	Elispot (Enzyme Linked Immuno spot assay).....	44
2.7.2.1	Puffer	44
2.7.2.2	Antikörper.....	45
2.7.2.3	Fixierung der Zielzellen.....	46
2.7.3	Entfernung von MHC-Klasse-I-gebundenen Peptiden von der Zelloberfläche durch Säurebehandlung („acid wash“)	46
2.8	Methoden zum spezifischen Proteinnachweis	47
2.8.1	Verwendete Antikörper	47
2.8.1.1	Primärantikörper	47
2.8.1.2	Sekundärantikörper.....	47
2.8.2	Durchflusszytometrie / Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS).....	48
2.8.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	48
2.8.4	Western Blot	49
2.8.5	Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse.....	51

3	ERGEBNISSE	52
3.1	Messung der MHC-Klasse-I-restringierten Antigenpräsentation mit Hilfe muriner CTL-Klone	52
3.1.1	Messung der MHC-Klasse-I-restringierten Antigenpräsentation	52
3.1.2	Herstellung pp65- und IE1-spezifischer CTL-Klone durch Peptidimmunisierung HLA-A2-transgener Mäuse	53
3.1.2.1	Herstellung eines pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen CTL-Klons	53
3.1.2.2	Herstellung eines IE1 ₂₉₇₋₃₀₅ -spezifischen CTL-Klons	54
3.1.3	Charakterisierung der CTL-Klone pp65-Klon 53 und IE1-Klon 12	55
3.2	Einfluss der US2-US11-Region auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression infizierter Fibroblasten	58
3.3	Einfluss der US2-US11-Region auf die MHC-Klasse-I-restringierte pp65-Präsentation infizierter Fibroblasten	61
3.3.1	Herstellung einer pp65-Deletionsmutante via BAC-Mutagenese	61
3.3.1.1	Austausch des pp65-Gens durch einen Selektionsmarker mittels homologer Rekombination	61
3.3.1.2	Entfernung des Selektionsmarkers mittels ortsspezifischer Rekombination	62
3.3.1.3	Rekonstitution des rekombinanten Δpp65-Virus	62
3.3.2	Charakterisierung der rekonstituierten pp65-Deletionsmutante Δpp65	64
3.3.2.1	Genomanalyse von Δpp65	64
3.3.2.2	Untersuchung der Viruspartikel von Δpp65	65
3.3.2.3	Untersuchung Δpp65-infizierter Fibroblasten	67
3.3.2.4	Nachweis der fehlenden Erkennung Δpp65-infizierter Zellen durch pp65-spezifische CTL	68
3.3.3	Einfluss der US2-US11-Region auf die pp65-Präsentation im Verlauf der Infektion	69
3.3.3.1	Untersuchung der „US2-US11-unabhängigen pp65-Präsentation“	70
3.3.3.1.1	Entfernung der MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe von der Oberfläche infizierter Fibroblasten	71
3.3.3.1.2	Ausmaß der US2-US11-vermittelten Beeinflussung der pp65-Präsentation	73
3.3.3.1.3	Kinetik der US2-US11-vermittelten Suppression der pp65-Präsentation	75
3.4	Beeinflussung der MHC-Klasse-I-restringierten IE1-Präsentation infizierter Fibroblasten	76
3.4.1	Einfluss der US2-US11-Region auf die MHC-Klasse-I-restringierte IE1-Präsentation infizierter Fibroblasten	76
3.4.2	Einfluss des Tegumentproteins pp65 auf die MHC-Klasse-I-restringierte IE1-Präsentation infizierter Fibroblasten	81
3.4.3	Kooperativer Einfluss von gpUS2-gpUS11 und pp65 auf die MHC-Klasse-I-restringierte IE1-Präsentation infizierter Fibroblasten	84
3.4.3.1	Herstellung einer ΔUS2-11_Δpp65-Doppelmutante	84
3.4.3.2	Charakterisierung der rekonstituierten ΔUS2-11_Δpp65-Doppelmutante	85
3.4.3.2.1	Genomanalyse von ΔUS2-11_Δpp65_GFP	85
3.4.3.2.2	Untersuchung der Viruspartikel von ΔUS2-11_Δpp65_GFP	87
3.4.3.2.3	Untersuchung der MHC-Klasse-I-restringierten Antigenpräsentation ΔUS2-11_Δpp65_GFP-infizierter Zellen	88
3.4.3.3	Kooperativer Einfluss von gpUS2-gpUS11 und pp65 auf die IE1-Präsentation zu sehr frühen Zeitpunkten nach Infektion	89
3.5	Einfluss des Immunevasins gpUS11 auf die MHC-Klasse-I-restringierte Präsentation von pp65 und IE1	92
3.6	Einfluss von cmvIL-10 auf die MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation nicht infizierter APCs	95

4	DISKUSSION	100
4.1	Messung der antigenspezifischen MHC-Klasse-I-Präsentation	101
4.2	Einfluss der US2-US11-Region auf die pp65-Präsentation	104
4.3	Einfluss der US2-US11-Region auf die IE1-Präsentation	107
4.4	Unterschiedliche Sensitivität von pp65- und IE1-Präsentation gegenüber US2-US11-vermittelter Immunevasion.....	112
4.5	Einfluss von cmvIL-10 auf die pp65- bzw. IE1-Präsentation nicht infizierter Zellen	113
5	LITERATUR.....	115
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	128

1 Einleitung

1.1 Das Humane Cytomegalovirus (HCMV)

Das Humane Cytomegalovirus (HCMV) gehört zur Familie der Herpesviren (*Herpesviridae*). Von dieser im Unterstamm der Vertebraten ubiquitär verbreiteten Virusfamilie sind bisher neun humanpathogene Vertreter bekannt, zu denen neben dem Humanen Cytomegalovirus unter anderem das Herpes Simplex Virus, das Varicella-Zoster-Virus und das Epstein-Barr-Virus gehören. Die Einordnung in die Familie der Herpesviren erfolgt traditionell nicht über Gemeinsamkeiten in der DNA-Sequenz, sondern anhand der charakteristischen Morphologie der Viruspartikel. Eine allen bisher bekannten Herpesviren gemeinsame Eigenschaft ist die Fähigkeit zur Ausbildung einer lebenslangen Latenz im Wirtsorganismus. Aufgrund verschiedener biologischer Eigenschaften werden die Herpesviren in die drei Unterfamilien α -, β -, und γ -Herpesviren eingeteilt. Die α -Herpesviren weisen ein breites Wirtsspektrum und einen kurzen Reproduktionszyklus auf und persistieren hauptsächlich in den Nervenzellen sensorischer Ganglien. Die β -Herpesviren hingegen zeichnen sich durch ein enges Wirtsspektrum, einen in Zellkultur sehr langsamen Vermehrungszyklus und eine charakteristische Vergrößerung der infizierten Zelle (Cytomegalie) aus. Latent infizierte Zellen können in sekretorischen Drüsen, der Milz, den Nieren oder anderen Geweben nachgewiesen werden. Auch die γ -Herpesviren haben ein sehr enges Wirtszellspektrum. *In vitro* ist eine Replikation vorwiegend in lymphoblastoiden Zellen zu beobachten, aber auch Epithelzellen und Fibroblasten können permissiv infiziert werden. Die Ausbildung der Latenz erfolgt hauptsächlich in lymphoidem Gewebe.

Aufgrund einer ausgeprägten Wirtsspezifität, einem *in vitro* vergleichsweise langsamen Replikationszyklus und der nach Infektion zu beobachtenden Cytomegalie stellt das Humane Cytomegalovirus einen typischen Vertreter der β -Herpesviren dar (zusammengefasst in (Roizman B. & Pellett E.P., 2001)).

1.1.1 Morphologie

Der Durchmesser der Viruspartikel von HCMV liegt zwischen 150 und 200 nm. Die Virionen weisen die für Herpesviren typische Morphologie auf (Abbildung 1). Zurzeit sind insgesamt 71 HCMV-kodierte und über 70 zelluläre Proteine bekannt, die am Aufbau des Viruspartikels beteiligt sind (Varnum *et al.*, 2004). Das etwa 235 kb große, doppelstängige DNA-Genom wird von einem aus 162 Kapsomeren zusammengesetzten ikosahedrischen Kapsid umgeben. Das Kapsid wird aus sieben verschiedenen Proteinen gebildet, wobei der Aufbau maßgeblich durch die vier als *major capsid* (pUL86), *minor capsid* (pUL85), *minor capsid binding* (pUL46) und *smallest capsid protein* (pUL48/49) bezeichneten Polypeptide beeinflusst wird. Nach außen ist das Virus durch eine von intrazellulären Membranen

abstammende Doppellipidschicht abgegrenzt, in welche viruskodierte Glykoproteine eingelagert sind. Bis vor kurzem galt das Glykoprotein B (gB, gpUL55) als vorherrschendes HCMV-Hüllprotein. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit jedoch konnte in der Virushülle von HCMV etwa zehnmal mehr Glykoprotein M (gM, gpUL100) nachgewiesen werden (Varnum *et al.*, 2004). Neben gB und gM sind noch die Glykoproteine H (gH, gpUL75), L (gL, gpUL115), O (gO, gpUL74) und N (gN, gpUL73) in relativ großen Mengen vorhanden. Die genannten Glykoproteine bilden zusammen drei verschiedene, innerhalb der Familie der Herpesviren hoch konservierte Glykoproteinkomplexe aus, welche entscheidend an der Virus-Zell-Interaktion während Adsorptions- und Penetrationsphase und der Übertragung des Virus durch direkten Zellkontakt beteiligt sind. Die viralen Glykoproteine stellen wichtige Zielstrukturen der Antikörper-vermittelten Immunantwort des Wirts gegen HCMV dar. Zwischen der Hülle und dem Kapsid befindet sich das so genannte Tegument, eine aus 20 bis 25 verschiedenen Proteinen bestehende Matrix. Die meisten Tegumentproteine sind phosphoryliert und stellen immunogene Zielstrukturen dar. Hauptstrukturkomponenten des Teguments sind die drei Phosphoproteine pp65 (ppUL83), pp150 (ppUL32) und pp71 (ppUL82), welche zusammen über 30% der Gesamt-Proteinmasse des Virions ausmachen (Varnum *et al.*, 2004). Einige Tegumentproteine, darunter das Phosphoprotein pp71, beeinflussen als Transaktivatoren die zelluläre und virale Genexpression und üben damit wichtige Funktionen im Rahmen der viralen Replikation aus (zusammengefasst in (Mocarski E.S. & Courcelle C.T., 2001; Landolfo *et al.*, 2003)).

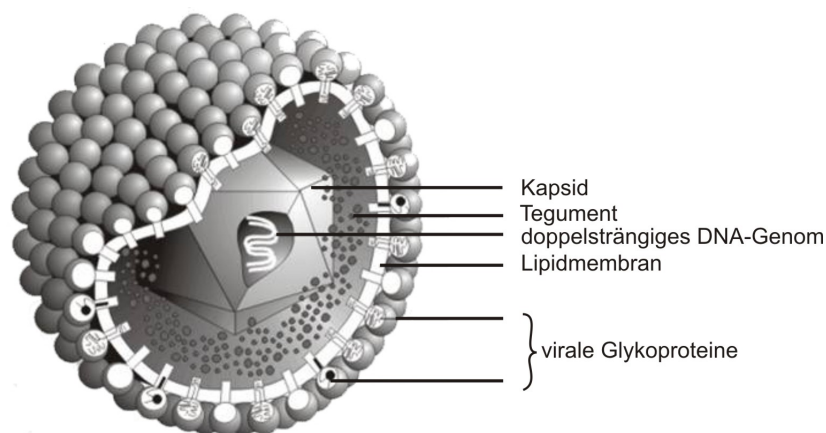


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines HCMV-Viruspartikels

Quelle: Dr. Marko Reschke, Marburg

1.1.2 Genom

Das lineare, doppelsträngige Genom von HCMV gehört zu den größten und komplexesten Genomen animaler Viren. Es weist einen hohen G+C-Anteil auf und ist in zwei Segmente unterteilt. Die mit jeweils einer Kopie vorliegenden Abschnitte werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Länge als *unique long* (U_L) - und *unique short* (U_S) - Region bezeichnet. Diese Elemente sind an beiden Enden von DNA-Abschnitten flankiert, welche sich gleichsinnig oder invertiert wiederholen (*repeats*). Da die beiden *unique*-Regionen unabhängig voneinander in zwei Orientierungen vorliegen können, existieren vier verschiedene Isomere des HCMV-Genoms (Abbildung 2). Die Nukleotidsequenz des Laborstamms Ad169 konnte 1990 von Chee und Kollegen bestimmt werden. In dem 230.283 bp umfassenden Genom konnten 225 ORFs identifiziert werden, die putative Proteine mit einer Länge von mindestens 100 Aminosäuren (AS) kodieren (Chee *et al.*, 1990; Novotny *et al.*, 2001). Vielen dieser ORFs konnte bisher keine Funktion während der Virusreplikation zugeordnet werden (zusammengefasst in (Mocarski E.S. & Courcelle C.T., 2001; Landolfo *et al.*, 2003)).

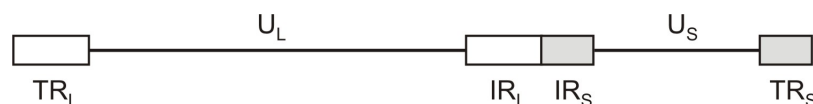


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Genoms von HCMV

Die jeweils in einer Kopie vorliegenden Genomabschnitte *unique long* (U_L) und *unique short* (U_S) sind als Linien, die jeweils in zwei Kopien vorkommenden Genomabschnitte zu beiden Enden des Genoms (*terminal repeats*, TR) und an der Verbindungsstelle der beiden *unique*-Regionen (*internal repeats*, IR) als Kästen dargestellt. Die in zwei Kopien vorkommenden Genomabschnitte der *unique long* - Region (TR_L , IR_L) sind weiß, die der *unique short* - Region (TR_S , IR_S) grau dargestellt.

1.1.3 Replikation

Im Verlauf der natürlichen Infektion kann eine produktive Replikation von HCMV in Fibroblasten, Makrophagen, glatten Muskelzellen sowie in Epithel- und Endothelzellen beobachtet werden (Sinzger *et al.*, 1995). Während das Virus *in vivo* also eine Vielzahl verschiedener Zell- und Gewebetypen infizieren kann, zeigt es in Zellkultur ein ausgesprochen enges Wirtszellspektrum. Obwohl in einer Reihe humaner und auch nicht humaner Zelltypen eine erfolgreiche Penetration der Viruspartikel stattfinden kann, ist eine anschließende produktive Replikation nur in einer sehr begrenzten Auswahl humaner Zellen nachweisbar (Nowlin *et al.*, 1991). Es wird vermutet, dass in nicht permissiven Zellen nach dem Eintritt der Viruspartikel die Translokation der viralen DNA in den Zellkern und damit die

virale Genexpression inhibiert wird (Sinzger *et al.*, 2000). Zur Kultivierung von HCMV sind primäre humane Haut- oder Lungen-Fibroblasten am besten geeignet (zusammengefasst in (Mocarski E.S. & Courcelle C.T., 2001)).

Der Kontakt zwischen HCMV und Zielzelle und die anschließende Penetration der Viruspartikel erfolgt in permissiven wie in nicht permissiven Zellen mit gleicher Effizienz (Nowlin *et al.*, 1991). Die initiale Interaktion zwischen Virus und Zielzelle wird durch eine niedrig-affine Bindung des viralen Hüllproteins gB an Heparansulfat-Proteoglykane der extrazellulären Matrix vermittelt (Compton *et al.*, 1993). Die zur erfolgreichen Penetration nötige Adsorption des Virus an die Zelloberfläche wird von Heparansulfat unabhängig durch noch unzureichend charakterisierte Rezeptoren vermittelt. Sowohl eine Beteiligung des EGF-Rezeptors (EGFR; Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors, *epidermal growth factor receptor*) (Wang *et al.*, 2003) als auch eine Beteiligung zellulärer β 1-Integrin-Heterodimere (Feire *et al.*, 2004) wurden postuliert. Jüngere Daten jedoch lassen eine Mitwirkung des EGFR an HCMV-Adsorption und daraus folgender Signalübertragung anzweifeln (Isaacson und Compton, 30th International Herpesvirus Workshop 2005, Turku, Finnland; persönliche Mitteilung). In Fibroblasten erfolgt die der Virusadsorption folgende Penetration durch pH-unabhängige Fusion von Virushülle und Zellmembran. Folge davon ist die Einschleusung des tegumentierten Nukleokapsids ins Zytoplasma (Compton *et al.*, 1992). Bei diesem Vorgang scheint der aus den viralen Glykoproteinen H, L und O zusammengesetzte Glykoproteinkomplex gCIII eine entscheidende Rolle zu spielen (Keay & Baldwin, 1991; Theiler & Compton, 2001). Im Gegensatz dazu erfolgt der Prozess der Penetration bei Epithel- und Endothelzellen über Endozytose (Bodaghi *et al.*, 1999; Ryckman *et al.*, 2006).

Unmittelbar nach der Penetration kommt es zur Initiation der viralen Genexpression. Wie bei allen Herpesviren kann diese in drei Phasen eingeteilt werden, welche kaskadenartig reguliert sind. Die sehr früh (*immediate early*, IE) nach Infektion exprimierten Gene kodieren hauptsächlich regulatorische Proteine, die nachfolgende Schritte der viralen Genexpression steuern. Ihre Transkription erfolgt unabhängig von der Neusynthese viraler Proteine. Die Produktion der IE-Proteine führt in der permissiv infizierten Zelle zur Expression der frühen (*early*, E) Gene. Den entsprechenden E-Proteinen kommen wichtige enzymatische und regulatorische Funktionen bei der Replikation der viralen DNA zu. Nach Beginn der viralen DNA-Replikation werden die späten (*late*, L) Gene exprimiert, die in erster Linie Strukturproteine des Virus kodieren (zusammengefasst in (Mocarski E.S. & Courcelle C.T., 2001)).

Ungefähr 16 Stunden nach Infektion beginnt die Replikation des HCMV-Genoms (Stinski, 1978). Das im Zellkern vorliegende lineare DNA-Genom wird dazu in eine zirkularisierte Form überführt und unter Mitwirkung verschiedener viraler und zellulärer Proteine nach dem

Prinzip des *rolling circle* repliziert (LaFemina & Hayward, 1983; McVoy & Adler, 1994). Pro Zelle können dabei mehrere tausend Genomkopien produziert werden (Stinski *et al.*, 1979). Die Bildung der Nukleokapside findet im Zellkern statt. Die neu synthetisierten Kapsidproteine werden hierzu aus dem Zytoplasma in den Kern transportiert und formieren sich dort autokatalytisch zu Kapsiden, welche die virale DNA umschließen. Bei der Knospung in den perinukleären Raum erhalten die Nukleokapside an der inneren Kernmembran eine primäre Umhüllung, welche sie allerdings bei der Freisetzung ins Zytoplasma an der äußeren Kernmembran wieder verlieren. Im Zytoplasma werden die Nukleokapside über einen komplexen und noch unzureichend aufgeklärten Mechanismus von dem Tegument umschlossen und die tegumentierten Nukleokapside anschließend durch Knospung in Vesikel des Golgi-Apparats von ihrer endgültigen Hülle umgeben. Durch einen Exozytose-ähnlichen Prozess werden die reifen Viruspartikel schließlich an der Zellmembran aus den Golgi-Vesikeln in das extrazelluläre Kompartiment freigesetzt (zusammengefasst in (Mocarski E.S. & Courcelle C.T., 2001; Mettenleiter, 2006; Landolfo *et al.*, 2003)).

HCMV-infizierte Fibroblasten produzieren in Zellkultur drei verschiedene Arten von Viruspartikeln. Neben den infektiösen Virionen werden nicht infektiöse umhüllte Partikel (*non infectious enveloped particles*, NIEPs) und *Dense Bodies* (DBs) freigesetzt. NIEPs ähneln in Struktur und Proteinzusammensetzung den Virionen, enthalten aber ein zusätzliches Protein (*assembly protein*) und keine DNA. DBs dahingegen enthalten weder DNA noch Kapsid. Sie bestehen aus Tegumentproteinen, die von einer Hüllmembran umgeben sind. Das pp65-Protein macht dabei etwa 60% des Gesamtprotein-Gehalts der subviralen Partikel aus (Varnum *et al.*, 2004). Das relative Verhältnis der drei Partikelformen zueinander ist vom Virusstamm und der Anzahl der Viruspassagen in Zellkultur abhängig (zusammengefasst in (Mocarski E.S. & Courcelle C.T., 2001)).

1.1.4 Latenz und Reaktivierung

Die üblicherweise asymptomatisch verlaufende Primärinfektion mit HCMV führt zu einer lebenslangen Persistenz des Erregers im Wirtsorganismus. Dabei werden Phasen der Latenz durch sporadische Reaktivierungen unterbrochen. Die Latenz zeichnet sich durch das Fehlen von Virusproduktion aus. Man nimmt an, dass das virale Genom in den latent infizierten Zellen in episomaler Form vorliegt. Zielzellen dieser viralen Latenz stellen hauptsächlich Vorläufer myeloider Zellen dar. HCMV-Genome können sowohl in CD34⁺-Vorläuferzellen im Knochenmark als auch in Monozyten im peripheren Blut mit einer Frequenz von 0,01% nachgewiesen werden. Mit Hilfe verschiedener *in vitro* - Modelle konnten einige Latenz-spezifische virale Transkripte nachgewiesen werden, deren Bedeutung für die Entstehung und Aufrechterhaltung der Latenz *in vivo* allerdings unklar ist. Die einer Reaktivierung zugrunde liegenden Mechanismen sind ebenfalls weitgehend

unaufgeklärt. Initiiert wird dieser Vorgang durch die Induktion der während der Latenz stumm geschalteten *immediate early* Genexpression. Dabei spielt die Differenzierung der latent infizierten myeloiden Vorläuferzellen zu Makrophagen oder reifen Dendritischen Zellen (DCs, *dendritic cells*), welche eine permissive HCMV-Infektion unterstützen, eine entscheidende Rolle (zusammengefasst in (Sinclair & Sissons, 2006)).

1.1.5 Infektionswege und Epidemiologie

Während der akuten Infektion mit HCMV werden infektiöse Viren über verschiedene Körperflüssigkeiten wie Speichel, Tränen, Zervikalsekrete, Sperma, Urin und Muttermilch ausgeschieden. Die Übertragung des Virus erfolgt daher in der Regel durch direkten Kontakt dieser infektiösen Sekrete mit dem Schleimhautepithel. Die anschließende Ausbreitung im Körper wird nach derzeitigem Kenntnisstand hauptsächlich hämatogen über infizierte Leukozyten oder über von der Gefäßwand abgelöste Endothelzellen vermittelt. Die Primärinfektion erfolgt zumeist in der frühen Kindheit durch prä-, peri- oder postnatale Übertragung von der Mutter auf das Kind. Eine zweite Häufung der Übertragungsereignisse im jungen Erwachsenenalter lässt sich auf vermehrte Sexualkontakte zurückführen. Eine Transmission des Virus ist darüber hinaus auch durch Organ- und Knochenmarkstransplantationen (KMT), sowie durch Bluttransfusionen möglich. Die weltweite Durchseuchung mit HCMV liegt je nach sozioökonomischem Status zwischen 40 und 100% (zusammengefasst in (Landolfo *et al.*, 2003)).

1.1.6 Pathogenese

Der klinische Verlauf einer HCMV-Infektion wird wesentlich durch die immunologische Abwehrlage bestimmt. Bei immunkompetenten Personen verläuft eine HCMV-Primärinfektion oder -Reaktivierung in der Regel asymptomatisch. Nur in seltenen Fällen treten Mononukleose-ähnliche Symptome wie Fieber, Muskelschmerzen und Lymphknotenschwellungen auf. Bei Patienten mit geschwächtem oder unausgereiftem Immunsystem dahingegen kann sowohl die Primärinfektion als auch die Reaktivierung aus der Latenz zu schwerwiegenden Erkrankungen führen. Besonders betroffen sind hierbei immunsupprimierte Empfänger von Organ- und Knochenmarkstransplantaten und AIDS-Patienten. Daneben stellt die pränatale Übertragung des HCMV ein erhebliches Risiko für embryofetale Schädigungen dar.

Fast jedes Organsystem kann von der Infektion betroffen sein. Nach allogener Knochenmarks- oder Lungentransplantation stellen durch HCMV verursachte interstitielle Pneumonien eine der Haupttodesursachen dar. Außerdem werden viele der HCMV-bedingten Komplikationen durch indirekte Effekte des Virus wie die Abstoßung des Transplantats oder die Infektion mit opportunistischen Pilzen, Protozoen oder Bakterien

hervorgerufen (zusammengefasst in (Fishman & Rubin, 1998; Reinke *et al.*, 1999; Ison & Fishman, 2005)).

Durch die Einführung der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) konnte bei AIDS-Patienten die Häufigkeit opportunistischer Infektionen und somit auch die Frequenz HCMV-assoziiierter Erkrankungen drastisch reduziert werden. Das Auftreten der HCMV-bedingten Entzündung der Netzhaut (Retinitis), die zuvor in etwa 40% aller Patienten beobachtet wurde, konnte zu über 80% reduziert werden. Trotz HAART kann es jedoch bei einem Absinken der CD4⁺-Zellzahl unter 100 Zellen pro mm³ erneut zu klinischen Manifestationen kommen (zusammengefasst in (Springer & Weinberg, 2004)).

Die intrauterine Übertragung des HCMV von der Mutter auf das Kind ist in den Industrieländern eine der häufigsten Ursachen pränataler Schädigungen. Hierbei spielt besonders die Primärinfektion der Mutter eine wesentliche Rolle. Die Inzidenz einer HCMV-Primärinfektion während der Schwangerschaft liegt bei 0,7% bis 4,1%. In 20% bis 40% dieser Fälle erfolgt dabei eine intrauterine Übertragung. Nur 10% bis 15% der infizierten Neugeborenen zeigen direkt nach der Geburt die typischen Symptome einer kongenitalen CMV-Infektion wie intrauterine Wachstumsretardierung, Mikrozephalie, Petechien, Hepatosplenomegalie und Anämie. Die Mortalitätsrate liegt dabei zwischen 10% und 30%, 10% der Kinder erholen sich vollständig und die restlichen entwickeln Folgeschäden, die sich erst im Verlauf der Kindheit manifestieren. Dazu zählen geistige Retardierung, sensorineuraler Gerhörverlust und Chorioretinitis (zusammengefasst in (Ornoy & Diav-Citrin, 2006)). 22% bis 65% der symptomatischen und 6% bis 23% der asymptomatischen Neugeborenen entwickeln im Lauf ihres Lebens eine Gehörschädigung (Fowler & Boppana, 2006).

1.1.7 Antivirale Therapie

Die Behandlungsmöglichkeiten einer HCMV-Infektion sind sehr beschränkt. Alle derzeit zugelassenen systemisch wirkenden Medikamente nutzen die virale DNA-Polymerase (UL54) als Zielstruktur und können somit zwar die Replikation des Virus hemmen, es aber nicht eliminieren. Das Nukleosidanalogon Ganciclovir (GCV) ist das Standardmedikament zur Behandlung einer HCMV-Infektion. Als Alternativen werden Cidofovir (DDV) und Foscarnet (PFA) verwendet. Zum Teil treten erhebliche Nebenwirkungen auf. Darüber hinaus kann die Anwendung über einen längeren Zeitraum hinweg zur Entwicklung von Resistenzen führen, welche durch Mutationen im UL54 oder im Falle von Ganciclovir zusätzlich auch durch Mutationen im Gen der viralen Phosphotransferase UL97 entstehen können. Durch die antivirale Therapie konnte bei vielen Transplantations- und AIDS-Patienten das Ausmaß an HCMV-bedingten Erkrankungen deutlich reduziert werden. Dabei sind generell präventive Maßnahmen Erfolg versprechender als die Behandlung einer bereits

vorliegenden Erkrankung (zusammengefasst in (Biron, 2006)). Bei kongenitalen HCMV-Erkrankungen konnte bisher durch antivirale Therapie keine eindeutige Verbesserung im Krankheitsverlauf beobachtet werden (zusammengefasst in (Ornoy & Diav-Citrin, 2006)).

1.1.8 Impfstoffentwicklung

1999 wurde der Entwicklung eines Impfstoffs zur Prävention kongenitaler HCMV-Infektionen vom „Institute of Medicine“ der „National Academy of Sciences“ höchste Priorität eingeräumt. Nach wie vor steht allerdings noch kein zugelassener Impfstoff zur Verfügung. Da sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort bei der Kontrolle einer HCMV-Infektion eine entscheidende Rolle spielen, sollte eine geeignete Vakzine optimalerweise beide Wege des adaptiven Immunsystems ansprechen. Die ersten Versuche wurden mit lebend-attenuierten Viren durchgeführt (zusammengefasst in (Plotkin, 2001)). Alternative Ansätze basierend auf rekombinanten Proteinen (Gonczol *et al.*, 1990; Pass *et al.*, 1999), viralen Vektoren (Adler *et al.*, 1999; Berencsi *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004), subviralen DBs (Pepperl-Klindworth *et al.*, 2002) oder viraler DNA (Endresz *et al.*, 2001) wurden vorgeschlagen und in präklinischen und teilweise auch klinischen Studien untersucht. Die Entwicklung eines Impfstoffs, der die unterschiedlichen Situationen einer HCMV-Infektion nach Transplantation bzw. einer kongenitalen Infektion gleichermaßen berücksichtigen kann, erweist sich als überaus schwierig und komplex (zusammengefasst in (Khanna & Diamond, 2006)).

1.2 Immunologische Kontrolle einer HCMV-Infektion

Für den Verlauf einer HCMV-Infektion spielt die Immunkompetenz des Wirts eine entscheidende Rolle. Sowohl das angeborene wie auch das adaptive Immunsystem sind an der Prävention bzw. Kontrolle der Infektion beteiligt. Vor der Induktion einer CMV-spezifischen Immunantwort erfolgt die erste Abwehr hauptsächlich über Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). An NK-Zell-defizienten oder -depletierten Mäusen konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass diesen Zellen des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle bei der Eindämmung der viralen Replikation in verschiedenen Geweben zukommt (Bukowski *et al.*, 1984; Welsh *et al.*, 1991; Shellam *et al.*, 1981; Shanley, 1990). Außerdem konnte der adoptive Transfer von NK-Zellen aus Zellkultur sowohl immunsupprimierte erwachsene wie auch neugeborene Tiere vor einer CMV-Erkrankung schützen (Bukowski *et al.*, 1985; Bukowski *et al.*, 1988). Obwohl NK-Zellen eine effiziente erste Abwehr gegen eine akute CMV-Infektion darstellen, ist die adaptive, HCMV-spezifische Immunantwort für die Kontrolle der viralen Replikation und damit für die Verhinderung HCMV-bedingter Erkrankungen entscheidend (Reddehase, 2002). Sowohl humorale als auch zelluläre Abwehrmechanismen übernehmen dabei wichtige Funktionen. Das humorale

Immunsystem scheint hauptsächlich die Ausbreitung des Virus nach Reaktivierung einzudämmen und darüber hinaus vor Sekundärinfektionen zu schützen. Hohe Titer neutralisierender Antikörper vermitteln bei KMT-Patienten Schutz vor schweren HCMV-assoziierten Erkrankungen (Schoppel *et al.*, 1998) und reduzieren die Häufigkeit von Sekundärinfektionen bei Müttern im gebärfähigen Alter (Adler *et al.*, 1995). Im murinen CMV-Modell konnte durch passive Immunisierung mit HCMV-spezifischen Antikörpern die Virusausbreitung begrenzt und Protektion vor einer tödlichen Infektionsdosis vermittelt werden (Rapp *et al.*, 1993; Jonjic *et al.*, 1994; Shanley *et al.*, 1981). Bereits 1981 war beobachtet worden, dass Antikörper, die von seropositiven Müttern auf ihre Kinder übertragen worden waren, die Kinder vor über Bluttransfusionen vermittelten HCMV-Infektionen schützen konnten (Yeager *et al.*, 1981). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das Risiko einer kongenitalen CMV-Infektion und -Erkrankung durch die Behandlung schwangerer Frauen mit HCMV-spezifischen Immunglobulinen stark reduziert werden kann (Nigro *et al.*, 2005). Derartige Beobachtungen hatten zuvor nur im Meerschweinchen-CMV-Modell gemacht werden können (Bratcher *et al.*, 1995). Schutz vor den Folgen einer Infektion mit HCMV wird allerdings im Wesentlichen durch die zelluläre Immunantwort vermittelt, wobei hauptsächlich das Vorhandensein zytotoxischer CD8⁺-T-Lymphozyten (CTL, *cytotoxic T-Lymphocytes*) eng mit dem Schutz vor schweren Krankheitsverläufen korreliert ist (siehe 1.2.1). Daneben scheint auch die CD4⁺-T-Helferzell-Antwort, unter anderem durch die Unterstützung der CD8⁺-T-Zell-Antwort, eine wichtige Rolle zu übernehmen. Bei Patienten nach Organtransplantation beispielsweise fand sich eine enge Korrelation zwischen der Entwicklung HCMV-assoziiierter Symptome und der Abnahme CMV-spezifischer CD4⁺-T-Zellen, die von einem parallelen Anstieg der Viruslast begleitet war (Sester *et al.*, 2005). Außerdem gibt es Hinweise, dass der adoptive Transfer CMV-spezifischer CD4⁺-T-Zellen nach Stammzelltransplantation die Expansion der virusspezifischen CD8⁺-T-Zell-Antwort fördert (Einsele *et al.*, 2002).

1.2.1 CD8⁺-T-Zell-Antwort

Die Aufgabe zytotoxischer CD8⁺-T-Lymphozyten ist die Detektion und anschließende Zerstörung infizierter oder maligne veränderter Zellen. Nach der Erkennung der Zielzelle durch den spezifischen T-Zell-Rezeptor erfolgt die Eliminierung der infizierten oder mutierten Zelle entweder über direkten Kontakt zwischen Zielzelle und CTL oder aber über die Freisetzung von Zytokinen. Die Zytotoxizität über direkten Zell-Zell-Kontakt ist streng auf die entsprechende Zielzelle beschränkt und wird durch die Sekretion zytotoxischer Granula, welche Perforin und Granzyme enthalten, oder durch Fas-Liganden-abhängige Apoptose vermittelt. Die Wirkung der freigesetzten Zytokine dahingegen ist weniger spezifisch. Während der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) in seinen Zielzellen Apoptose auslöst, erhöht

Interferon- γ (IFN- γ) die MHC-Klasse-I-Präsentation und die Fas-abhängige Lyse seiner Zielzellen. Das CD8-Oberflächenmolekül der CD8⁺-T-Zelle ist dabei als Korezeptor sowohl an der spezifischen Erkennung der Zielzelle wie auch an der intrazellulären Signalweiterleitung zur Induktion der zytotoxischen Effektorfunktionen beteiligt (zusammengefasst in (Andersen *et al.*, 2006)).

1.2.1.1 MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation

Um die durch Infektion oder Mutation bedingten Veränderungen im Innern der Zielzellen für zirkulierende CTL sichtbar zu machen, werden auf der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen des Organismus Abbauprodukte intrazellulärer Proteine präsentiert. Die Präsentation dieser Antigene erfolgt in Assoziation mit Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Klasse I (MHC-Klasse-I). Während Peptide körpereigener Proteine dabei durch die Selbsttoleranz der T-Zellen ignoriert werden, lösen mit MHC-Klasse-I assoziierte Antigene körperfremder oder mutierter Proteine durch Stimulation des entsprechenden T-Zell-Rezeptors die Lyse der antigenpräsentierenden Zelle (APC, *antigen presenting cell*) aus. Dabei reichen 10 bis 100 MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe auf der Oberfläche einer Zelle aus, um eine solche Reaktion auszulösen (Yewdell *et al.*, 2003). Die MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation ist das Resultat eines komplexen Prozessierungsweges, der im Folgenden näher erläutert werden soll (Abbildung 3).

1.2.1.1.1 MHC-Klasse-I-Präsentation infizierter Zellen

Klassischerweise werden über MHC-Klasse-I präsentierte Peptide aus in der präsentierenden Zelle neu synthetisierten Proteinen gewonnen. Infizierten Zellen stehen darüber hinaus auch die im Rahmen der Virusinfektion in die Zelle eingebrachten viralen Strukturproteine zur Verfügung (Yewdell *et al.*, 1988; Riddell *et al.*, 1991a; Laughlin-Taylor *et al.*, 1994). Gealterte oder fehlsynthetisierte bzw. fehlgefaltete Proteine (DRiPs, *defective ribosomal products*) werden durch die Konjugation mit Ubiquitin markiert und anschließend über das multikatalytische Proteasom in Peptide fragmentiert (Kisselev *et al.*, 1999), welche nach einer weiteren Degradation durch zytoplasmatische Aminopeptidasen zur Assoziation mit MHC-Klasse-I-Molekülen ins Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) eingeschleust werden (Reits *et al.*, 2003; Reits *et al.*, 2004; Stoltze *et al.*, 2000). Dieser ATP-abhängige Transport erfolgt über TAP (*transporter associated with antigen processing*), einen aus zwei Untereinheiten (TAP1 und TAP2) bestehenden ABC-Transporter in der ER-Membran (Trowsdale *et al.*, 1990; Spies & DeMars, 1991; Powis *et al.*, 1991). Beide Untereinheiten dieses heterodimeren Komplexes bestehen jeweils aus einer Transmembran und einer zytosolischen Domäne, wobei die Transmembran Domänen für Peptidbindung und -translokation und die zytosolischen Domänen für die ATP-Hydrolyse

zum Antrieb des Translokationsprozesses zuständig sind (Gorbulev *et al.*, 2001). MHC-Klasse-I-Moleküle sind Heterodimere aus einer transmembranen α -Kette und dem nicht-kovalent assoziierten β_2 -Mikroglobulin (β_2m). Die α -Kette wird aus 3 Domänen gebildet (α_1 , α_2 und α_3), von denen α_1 und α_2 für die Peptidbindung und α_3 für die Interaktion mit dem CD8-Korezeptor der T-Zelle verantwortlich sind. Neu synthetisierte α -Ketten werden im ER durch das Chaperon Calnexin in einem partiell gefalteten Zustand gehalten. Zur Assoziation mit β_2m dissoziiert die α -Kette vom Calnexin und wird mit Unterstützung der Chaperone Calreticulin, ERp57 und BiP (*immunoglobulin binding protein*) über das TAP-assoziierte Transmembranprotein Tapasin mit den beiden TAP-Untereinheiten verbunden. Der aus TAP1 und TAP2, Tapasin, Calreticulin, ERp57, der MHC-Klasse-I- α -Kette und dem β_2m gebildete Komplex katalysiert die Bindung eines durch TAP angelieferten Peptids an das MHC-Klasse-I-Molekül, welches durch die Peptidbindung stabilisiert und somit aus dem Chaperon-Komplex entlassen wird.

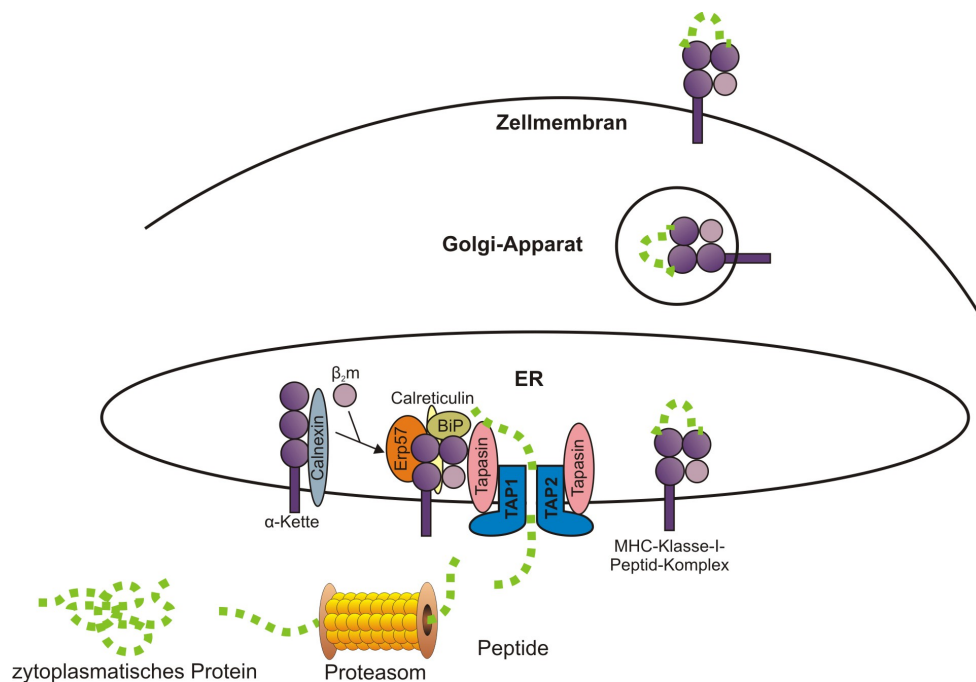


Abbildung 3: Schematische Darstellung des klassischen MHC-Klasse-I-Präsentationswegs

Zytoplasmatisch lokalisierte Proteine werden über das Proteasom degradiert und die entstehenden Peptide über den heterodimeren TAP-Komplex (TAP1, TAP2) in das ER transportiert. Dort werden geeignete Peptide auf bereits aus α -Kette und β_2m zusammengesetzte MHC-Klasse-I-Moleküle geladen. An diesem Prozess sind die Chaperone Calnexin, Calreticulin, BiP, ERp57 und Tapasin maßgeblich beteiligt. Die fertigen MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe werden anschließend über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert und dort präsentiert.

MHC-Klasse-I-Moleküle können 8 bis 12 AS lange Peptide binden, wobei abhängig vom jeweiligen MHC-Klasse-I-Allel C- und N-terminal positionierte Ankeraminoaciden zur Bindung erforderlich sind. Durch ER-residente Aminopeptidasen können die über TAP angelieferten Peptide N-terminal weiter „zurechtgeschnitten“ und somit an das jeweilige MHC-Klasse-I-Motiv angepasst werden (Serwold *et al.*, 2002; Saveanu *et al.*, 2005; Saric *et al.*, 2002). Die fertigen MHC-Klasse-I-Komplexe werden anschließend über den Golgi-Apparat vom ER zur Zellmembran transportiert und dort den zytotoxischen T-Lymphozyten präsentiert (zusammengefasst in (Koch & Tampe, 2006)).

1.2.1.1.2 Kreuzpräsentation

Eine Besonderheit professionell antigenpräsentierender Zellen aus dem Knochenmark (pAPC, *professional antigen presenting cell*) ist ihre Fähigkeit zur so genannten Kreuzpräsentation. Dabei werden Antigene auf unterschiedlichen Wegen aus der extrazellulären Umgebung aufgenommen, auf MHC-Klasse-I-Moleküle geladen und an der Zelloberfläche präsentiert. Resultiert aus diesem Prozess die Stimulation einer CTL-Antwort, wird dies als *Cross-Priming* bezeichnet. Dieser Vorgang scheint maßgeblich an der Induktion der CD8⁺-T-Zell-Immunität beteiligt zu sein. Das *Cross-Priming* wird *in vivo* im Wesentlichen durch DCs und Makrophagen vermittelt. Die hauptsächliche Quelle kreuzpräsentierter Antigene sind Proteine, die über Phago- oder Makropinozytose in die Zellen aufgenommen werden. Sie werden anschließend entweder durch Proteasen direkt in den Endosomen prozessiert oder über einen bisher unbekannten Mechanismus aus den Endosomen ins Zytosol transportiert und wie im klassischen MHC-Klasse-I-Präsentationsweg Proteasom- und TAP-abhängig weiter verarbeitet. Außerdem wurde vorgeschlagen, dass bereits prozessierte Peptide das Zytosol der pAPCs erreichen und ohne weitere Prozessierung kreuzpräsentiert werden könnten (zusammengefasst in (Shen & Rock, 2006; Groothuis & Neefjes, 2005)).

1.2.2 HCMV-spezifische CD8⁺-T-Zell-Antwort

Sowohl im Tiermodell (Reddehase *et al.*, 1985; Steffens *et al.*, 1998; Podlech *et al.*, 2000) als auch in Studien an immunsupprimierten Patienten konnte gezeigt werden, dass die Kontrolle einer CMV-Infektion hauptsächlich durch CD8⁺-T-Lymphozyten vermittelt wird. Nach allogener KMT korreliert die Rekonstitution zytotoxischer T-Lymphozyten mit dem Abklingen der HCMV-Infektion (Riddell *et al.*, 1991b; Reusser *et al.*, 1991). Der adoptive Transfer CMV-spezifischer CD8⁺-T-Zelllinien führt bei immunsupprimierten KMT- oder Stammzelltransplantations-Empfängern zur Rekonstitution der antiviralen zellulären Immunität und schützt effizient vor schweren HCMV-Erkrankungen (Riddell *et al.*, 1992; Walter *et al.*, 1995; Einsele *et al.*, 2002; Peggs *et al.*, 2003; Cobbold *et al.*, 2005). Bei

gesunden, HCMV-seropositiven Personen machen HCMV-spezifische CTL etwa 10% des gesamten CD8⁺-T-Zell-Repertoires im Blut aus (Khanna & Diamond, 2006). Wie es zu derart hohen Frequenzen virusspezifischer T-Lymphozyten kommt, ist bisher unklar.

1.2.2.1 Antigen-spezifität

Obwohl das Genom von HCMV über 200 Proteine kodiert, waren bis vor kurzem nur wenige CD8⁺-T-Zell-Antigene bekannt. Besondere Aufmerksamkeit wurde hierbei dem Tegumentprotein pp65 (Laughlin-Taylor *et al.*, 1994; Wills *et al.*, 1996; Boppana & Britt, 1996) und dem *major immediate early* Protein IE1 (Borysiewicz *et al.*, 1988a; Borysiewicz *et al.*, 1988b) geschenkt. In zahlreichen Studien konnten bei HCMV-seropositiven Spendern pp65- und/oder IE1-spezifische CTL-Antworten gefunden werden, die in Frequenz und Prävalenz miteinander vergleichbar waren (Kern *et al.*, 1999; Gyulai *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2002). Mit Hilfe modernerer Methodik konnte allerdings kürzlich gezeigt werden, dass die CD8⁺-T-Zell-Antwort gegen HCMV im Rahmen der natürlichen Infektion gegen ein deutlich breiteres Spektrum viraler Proteine gerichtet ist als bislang angenommen worden war. Somit musste die Vorstellung einer sehr fokussierten HCMV-spezifischen CTL-Antwort revidiert werden (Elkington *et al.*, 2003; Sylwester *et al.*, 2005). Sylwester und Kollegen konnten bei HCMV-seropositiven Spendern spezifische CD8⁺-T-Zellen gegen 50% der insgesamt 213 untersuchten ORFs von HCMV nachweisen. Erstaunlicherweise traten dabei CTL gegen das Tegumentprotein UL48 am häufigsten auf, allerdings dicht gefolgt von pp65- und IE1-spezifischen CTL. Obwohl also die HCMV-spezifische CD8⁺-T-Zell-Antwort entgegen der bisherigen Annahme gegen ein breites Spektrum an viralen Antigenen gerichtet ist, stellen pp65 und IE1 nach wie vor wichtige Zielstrukturen dieser zellulären Immunität gegen HCMV dar. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der adoptive Transfer von pp65- und IE1-spezifischen CTL nach allogener Transplantation die Viruslast im Blut stark reduzieren und Schutz vor HCMV-Erkrankungen vermitteln kann (Cobbold *et al.*, 2005).

1.2.2.1.1 Das Tegumentprotein pp65

Das Tegumentprotein pp65 ist das mit Abstand am intensivsten untersuchte CTL-Antigen von HCMV. Das durch den viralen ORF UL83 kodierte Phosphoprotein von 65 kDa ist als Hauptbestandteil des viralen Teguments sowohl in infektiösen Virionen wie auch in subviralen DBs in relativ großen Mengen vertreten (Varnum *et al.*, 2004). Erstaunlicherweise ist es aber für die virale Replikation in Fibroblastenkulturen nicht essentiell (Schmolke *et al.*, 1995b). Wie die meisten viralen Strukturproteine wird es im Verlauf der Infektion überwiegend spät (*leaky late*) exprimiert. Aufgrund starker nukleärer Lokalisationssequenzen wird das Protein direkt nach der Infektion in den Kern transportiert (Gallina *et al.*, 1996; Schmolke *et al.*, 1995a). Mit dem Tegumentprotein ist eine Serin/Threonin-Kinase-Aktivität

assoziiert (Britt & Auger, 1986). Kürzlich wurde vorgeschlagen, dass der nukleäre Export von pp65, der für den reibungslosen Ablauf der Tegumentation während der Virus-Morphogenese als entscheidend angesehen wird, durch die virale Proteinkinase ppUL97 vermittelt wird (Prichard *et al.*, 2005). Außerdem gibt es Hinweise, dass pp65 die antivirale Immunantwort durch Hemmung der Induktion der antiviralen Interferon-Antwort (Browne & Shenk, 2003), Unterdrückung der NK-Zell-Zytotoxizität (Arnon *et al.*, 2005) und selektive Verhinderung der IE1-Präsentation (siehe 1.3.2) inhibiert.

Als Zielstruktur der HCMV-spezifischen CTL-Antwort wurde pp65 zum ersten Mal 1994 von McLaughlin-Taylor und Kollegen beschrieben (Laughlin-Taylor *et al.*, 1994). In den folgenden Jahren konnten zahlreiche CD8⁺-T-Zell-Epitope unterschiedlicher HLA-Restriktion innerhalb des Proteins identifiziert werden (zusammengefasst in (Reddehase, 2002)). Als Hauptbestandteil des viralen Teguments wird pp65 bei der Penetration der Viruspartikel in die Zelle eingebracht und kann somit direkt ohne *de novo* Proteinsynthese in den MHC-Klasse-I-Präsentationsweg eingeschleust und an der Zelloberfläche präsentiert werden (Laughlin-Taylor *et al.*, 1994; Riddell *et al.*, 1991a; Pepperl *et al.*, 2000; Pepperl-Klindworth *et al.*, 2003).

1.2.2.1.2 Das *major immediate early* 1 - Protein (IE1)

Das *major immediate early* Protein IE1 (pUL123) von HCMV wird während des gesamten Verlaufs der Infektion exprimiert und ist das während der sehr frühen Phase der Infektion (*immediate early*) am stärksten exprimierte virale Protein (Stamminger *et al.*, 1991). Das nukleäre 72 kDa Phosphoprotein wird von den Exons 2 bis 4 der *major immediate early* - Region von HCMV kodiert. Während das Protein bei einer Infektion mit hoher *Multiplicity of Infection (moi)* in Zellkultur nicht essentiell ist, scheint es bei niedriger *moi* für eine effiziente Replikation erforderlich zu sein. Neben IE2 ist IE1 der wichtigste virale Transaktivator der frühen und späten viralen Genexpression (Greaves & Mocarski, 1998).

Als wichtige Zielstruktur der HCMV-spezifischen CTL-Antwort wurde IE1 zum ersten Mal 1988 von Borysiewicz und Kollegen beschrieben (Borysiewicz *et al.*, 1988a; Borysiewicz *et al.*, 1988b). Aufgrund der intensiven Untersuchung der CTL-Antwort gegen pp65 und der Feststellung, dass infizierte Fibroblasten durch IE1-spezifische CTL kaum erkannt werden können (Gilbert *et al.*, 1993; Gilbert *et al.*, 1996) geriet das IE1-Protein als Antigen zunächst in Vergessenheit. Seine Bedeutung für die HCMV-spezifische zelluläre Immunantwort wurde erst in den letzten Jahren wieder neu entdeckt (Kern *et al.*, 1999; Gyulai *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2002). So konnte kürzlich bei Herz- und Lungen-Transplantationspatienten gezeigt werden, dass hohe Frequenzen IE1-, nicht jedoch pp65-spezifischer CTL Schutz vor einer CMV-Erkrankung bieten (Bunde *et al.*, 2005).

1.3 Immunevasion von HCMV

Im Laufe der Evolution haben zahlreiche Viren Mechanismen entwickelt, die geeignet sind, der immunologischen Kontrolle des Wirts zu entfliehen. Wie fast alle Herpesviren kodiert HCMV eine Reihe von Proteinen, welche die infizierte Zelle dazu befähigen, die NK-, CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zell-vermittelte Immunkontrolle zu umgehen. Um der für die Kontrolle der HCMV-Infektion entscheidenden Erkennung und daraus folgenden Lyse durch CD8⁺-T-Lymphozyten zu entgehen, hat das Virus Mechanismen entwickelt, die Präsentation viraler Antigene über MHC-Klasse-I an der Oberfläche der infizierten Zellen zu verhindern. Die damit verbundene Verringerung der MHC-Klasse-I-Präsentation schützt die Zellen zwar vor der Erkennung durch CD8⁺-T-Zellen, sensibilisiert sie aber gleichzeitig gegenüber der Erkennung durch NK-Zellen. Daher sind im Gegenzug Strategien notwendig, auch der NK-Zell-vermittelten Lyse zu entgehen (zusammengefasst in (Braud *et al.*, 2002)). Auch die CD4⁺-T-Zell-Immunität kann durch HCMV-kodierte Proteine unterdrückt werden. Erstaunlicherweise wird dabei die Evasion der MHC-Klasse-II-Präsentation durch Komponenten vermittelt, welche auch an der Evasion der MHC-Klasse-I-Präsentation beteiligt sind (zusammengefasst in (Johnson & Hegde, 2002)).

1.3.1 Unterdrückung der MHC-Klasse-I-restringierten Antigenpräsentation

Eine effiziente Methode, infizierte Zellen vor der CD8⁺-T-Zell-vermittelten Erkennung zu schützen, stellt die Unterdrückung der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation dar. Von besonderer Bedeutung sind hierbei die in der US2-US11-Region des HCMV-Genoms kodierten Glykoproteine gpUS2, gpUS3, gpUS6 und gpUS11. Diese als Immunevasine bezeichneten Typ I - Transmembranproteine werden sequentiell im Verlauf der Infektion exprimiert und greifen an unterschiedlichen Stellen des MHC-Klasse-I-Wegs im ER in den Prozess der Antigenpräsentation ein (Abbildung 4). Die Folge ist eine Reduktion der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression auf den infizierten Zellen (Jones *et al.*, 1995; Barnes & Grundy, 1992). Das während der *immediate early* - Phase der Infektion exprimierte gpUS3 (Tenney & Colberg-Poley, 1991; Weston, 1988; Ahn *et al.*, 1996) inhibiert durch Interaktion mit dem TAP-assoziierten Chaperon Tapasin die Peptidbeladung der MHC-Klasse-I-Moleküle und verhindert dadurch den Export peptidbeladener MHC-Klasse-I-Komplexe aus dem ER (Jones *et al.*, 1996; Ahn *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2004). Eine Ausnahme stellen hierbei MHC-Klasse-I-Allele dar, welche Tapasin-unabhängig mit Peptid beladen werden können; diese können auch in Gegenwart von gpUS3 an der Zelloberfläche präsentiert werden (Jones *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2004). Die *early* bzw. *early-late* exprimierten Glykoproteine gpUS11 (Wiertz *et al.*, 1996a; Ahn *et al.*, 1996) und gpUS2 (Wiertz *et al.*, 1996b; Jones & Sun, 1997) nutzen den ER-assoziierten Proteindegradationsweg (ERAD, *ER-associated protein degradation*), um neu synthetisierte MHC-Klasse-I- α -Ketten

zusammen mit fehlgefalteten Proteinen, vermutlich über den Sec61-Porenkomplex, aus dem ER ins Zytosol zu transportieren und dort der proteasomalen Degradation zuzuführen. Dabei unterscheiden sich die von gpUS2 bzw. gpUS11 verwendeten Translokations-Mechanismen in verschiedenen Punkten voneinander. Während beide Proteine ein funktionsfähiges Ubiquitinierungssystem benötigen (Kikkert *et al.*, 2001; Shamu *et al.*, 2001; Hassink *et al.*, 2006), ist nur die gpUS2-vermittelte Translokation von einer direkten Ubiquitinierung der MHC-Klasse-I- α -Kette abhängig (Hassink *et al.*, 2006). Darüber hinaus stellt das ERAD-assoziierte Protein Derlin-1 eine Schlüsselkomponente des gpUS11-, nicht aber des gpUS2-Weges dar (Lilley & Ploegh, 2004), wohingegen die ER-ansässige Signalpeptid-Peptidase (SPP) für die gpUS2-, nicht aber die gpUS11-vermittelte MHC-Klasse-I-Translokation erforderlich zu sein scheint (Loureiro *et al.*, 2006). Darüber hinaus konnte kürzlich gezeigt werden, dass gpUS11, aber nicht gpUS2, den normalerweise durch die Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen im ER ausgelösten UPR (*Unfolded Protein Response*) - Signalweg induzieren kann (Tirosh *et al.*, 2005). Weiterhin unterscheiden sich gpUS2 und gpUS11 in ihrer MHC-Klasse-I-Allel-Spezifität (Barel *et al.*, 2003a; Barel *et al.*, 2003b; Barel *et al.*, 2006; Gewurz *et al.*, 2001).

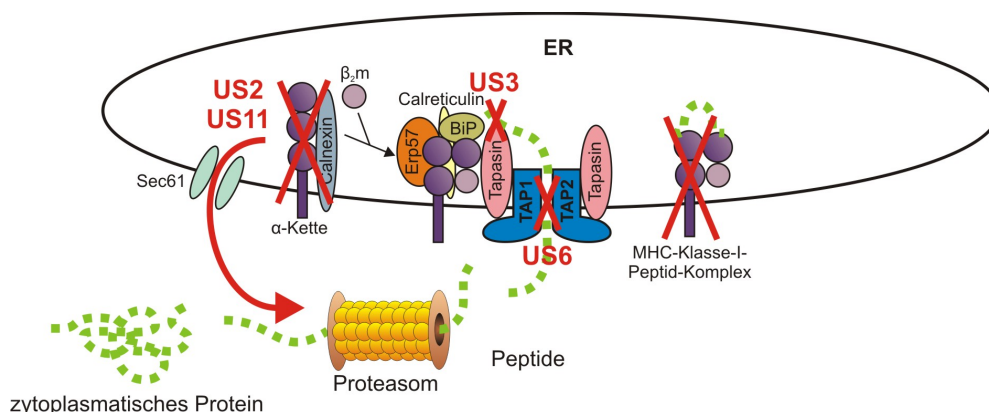


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Interaktion von gpUS2, gpUS3, gpUS6 und gpUS11 mit dem MHC-Klasse-I-Präsentationsweg im ER

Die sequenziell im Verlauf der Infektion mit HCMV exprimierten Immunevasine gpUS2, gpUS3, gpUS6 und gpUS11 greifen an unterschiedlichen Stellen des MHC-Klasse-I-Präsentationswegs in den Prozess der Antigenpräsentation ein und verhindern somit die Bildung fertiger MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe. Während das IE exprimierte gpUS3 durch Interaktion mit dem TAP-assoziierten Chaperon Tapasin die Peptidbeladung von MHC-Klasse-I-Molekülen verhindert, induzieren die E bzw. E-L exprimierten Glykoproteine gpUS11 und gpUS2 eine Translokation von MHC-Klasse-I- α -Ketten aus dem ER ins Zytosol zur anschließenden Degradation durch das Proteasom. Das ebenfalls E-L exprimierte gpUS6 dahingegen verhindert den Peptidtransport ins ER durch Interaktion mit dem TAP-Komplex.

Das *early-late* exprimierte Glykoprotein gpUS6 (Jones & Muzithras, 1991) inhibiert den Peptidtransport aus dem Zytosol ins ER durch Interaktion mit dem TAP-Transporter (Ahn *et al.*, 1997; Lehner *et al.*, 1997; Hengel *et al.*, 1997). Durch die Bindung von gpUS6 an TAP1 und TAP2 im ER-Lumen wird eine normalerweise durch die zytosolische Peptidbindung hervorgerufene Konformationsänderung des TAP unterdrückt, wodurch die ATP-Bindung an TAP-1 und in Folge dessen die Peptid-Translokation verhindert wird (Hewitt *et al.*, 2001; Kyritsis *et al.*, 2001; Halenius *et al.*, 2006). Die Peptidbindung an TAP wird dabei durch gpUS6 nicht beeinflusst (Ahn *et al.*, 1997; Lehner *et al.*, 1997; Hengel *et al.*, 1997). Eine TAP-unabhängige Peptidbeladung von im ER abgetrennten Signalpeptiden kann der Inhibition durch gpUS6 entgehen und eine MHC-Klasse-I-Präsentation in Anwesenheit von gpUS6 hervorrufen (Wei & Cresswell, 1992).

Außerdem konnte bei zwei weiteren in der US2-US11-Region von HCMV kodierten Glykoproteinen eine Interaktion mit MHC-Klasse-I-Molekülen im ER nachgewiesen werden. Während für gpUS8 bisher nur die Bindung von MHC-Klasse-I-Molekülen gezeigt werden konnte (Tirabassi & Ploegh, 2002), wurde gpUS10 darüber hinaus eine verzögernde Wirkung auf den MHC-Klasse-I-Transport aus dem ER zugeschrieben (Furman *et al.*, 2002). Allerdings war keines der beiden Proteine alleine in der Lage, die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression in messbarer Weise zu beeinflussen (Jones *et al.*, 1995; Tirabassi & Ploegh, 2002).

Neuerlich gibt es Hinweise darauf, dass auch ein außerhalb der US-Region kodiertes Protein an der Reduktion der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression beteiligt ist. Das im Verlauf der Virusreplikation *late* exprimierte pp71 (UL82) hält MHC-Klasse-I-Moleküle im ER bzw. Golgi-Apparat zurück und vermindert so die MHC-Klasse-I-Oberflächenpräsentation (Trgovcich *et al.*, 2006).

1.3.2 Selektive Unterdrückung der MHC-Klasse-I-restringierten IE1-Präsentation durch das Tegumentprotein pp65

Das IE1-Protein von HCMV wird während des gesamten Infektionsverlaufs in großen Mengen exprimiert und stellt somit ein potentiell attraktives Antigen zur Entwicklung einer protektiven T-Zell-Antwort dar. Arbeiten von Gilbert und Kollegen aus den 90er Jahren konnten allerdings auf infizierten Fibroblasten keine MHC-Klasse-I-Präsentation von IE1-Peptiden nachweisen, während sie in den selben Zellen eine effiziente Präsentation von Peptiden anderer viraler Proteine wie pp65 und gB zeigen konnten. IE1 schien also im Rahmen der Virusinfektion selektiv von der MHC-Klasse-I-Präsentation ausgeschlossen zu werden (Gilbert *et al.*, 1993). Eine Erklärung lieferte die Beobachtung, dass eine MHC-Klasse-I-Präsentation von IE1 nur in Abwesenheit des Tegumentproteins pp65 möglich war. Sowohl in Koinfektionsexperimenten mit rekombinanten Vakzinia-Konstrukten als auch in

Experimenten mit einer HCMV-pp65-Deletionsmutante war die Gegenwart des pp65-Proteins ausreichend, die Präsentation von IE1-Peptiden durch MHC-Klasse-I zu verhindern. Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass eine mit pp65 assoziierte Kinaseaktivität die Threonin-Phosphorylierung des IE1 erhöhen und damit die Unterdrückung seiner Präsentation bewirken konnte (Gilbert *et al.*, 1996).

1.3.3 Freisetzung von cmvIL-10

Die Expression von Proteinen, welche zu zellulären Zytokinen oder Zytokinrezeptoren homolog sind, stellt eine für Viren typische Strategie dar, sich vor der Immunabwehr des Wirtsorganismus zu schützen und damit die eigenen Überlebenschancen zu verbessern. Einige Vertreter der Herpesviren kodieren ein Protein, welches zu dem zellulären Zytokin Interleukin-10 (IL-10) homolog ist. IL-10 ist ein multifunktionales Zytokin, welches unterschiedliche immunmodulatorische Effekte auf Zellen hämatopoetischen Ursprungs ausübt und dadurch einen wichtigen Regulator für immunologische und inflammatorische Prozesse darstellt. Während sich IL-10 als Wachstums- und Differenzierungsfaktor für Mastzellen und B-Lymphozyten stimulierend auf die humorale Immunität auswirkt, hat es durch die Inhibition wichtiger Funktionen von pAPCs auf die zelluläre Immunantwort eine eher supprimierende Wirkung (Moore *et al.*, 2001). Die von IL-10 ausgelöste Signalübertragung erfolgt über einen aus zwei Untereinheiten zusammengesetzten Rezeptorkomplex. Beide Untereinheiten gehören der Familie der Klasse II - Zytokinrezeptoren an und weisen jeweils eine extrazelluläre, eine transmembrane und eine intrazelluläre Domäne auf (Ho *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1994; Lutfalla *et al.*, 1993; Gibbs & Pennica, 1997). Während für die Bindung des Liganden die IL-10R1-Untereinheit ausreichend ist, erfordert die Signalweiterleitung eine zusätzliche Interaktion mit der IL-10R2-Untereinheit (Kotenko *et al.*, 1997; Spencer *et al.*, 1998). Der am besten charakterisierte IL-10-Signaltransduktionsweg erfolgt über das JAK/STAT-System. Die Bindung von IL-10 an seinen Rezeptorkomplex führt zur Phosphorylierung der mit IL-10R1 bzw. IL-10R2 assoziierten Janus-Tyrosin-Kinasen Jak1 bzw. Tyk2, was zu einer Aktivierung der zytoplasmatischen STAT-Transkriptionsfaktoren führt (Larner *et al.*, 1993; Lehmann *et al.*, 1994; Finbloom & Winestock, 1995; Ho *et al.*, 1995; Weber-Nordt *et al.*, 1996; Wehinger *et al.*, 1996). In allen bekannten IL-10-vermittelten Immunreaktionen scheint dabei die Aktivierung von Stat3 essentiell, für anti-inflammatorische Effekte alleine allerdings nicht ausreichend zu sein (O'Farrell *et al.*, 1998; Riley *et al.*, 1999).

Das erste virale IL-10-Homolog wurde im Genom des Epstein-Barr-Virus (EBV) entdeckt (ebvIL-10) (Moore *et al.*, 1990; Hsu *et al.*, 1990). Auch HCMV besitzt ein zu IL-10 homologes Protein (cmvIL-10). Es wird durch den offenen Leserahmen UL111a kodiert und weist mit einer durch zwei Introns unterbrochenen Sequenz eine unter den verschiedenen IL-10-

Genen einzigartige Exon-Intron-Struktur auf. Die Expressionskinetik des ORFs UL111a im Verlauf der Infektion entspricht der eines späten Gens. Im Überstand infizierter Fibroblasten kann cmvIL-10 parallel mit der Freisetzung extrazellulärer Viruspartikel detektiert werden. Eine Steigerung der Proteinmenge ist trotz einer ab Tag 5 nach Infektion kaum noch ansteigenden Virusproduktion bis zu Tag 8 nach Infektion zu beobachten (Chang *et al.*, 2004). Während andere virale IL-10-Homologe zu 67 bis 90% mit dem zellulären IL-10 ihres jeweiligen Wirts übereinstimmen, zeigen die IL-10-Homologe aller Primaten-CMV's nur eine 25 bis 28%ige Sequenzübereinstimmung (Kotenko *et al.*, 2000; Lockridge *et al.*, 2000). Dennoch bindet das cmvIL-10 mit einer mit humanem IL-10 vergleichbaren Affinität an den IL-10-Rezeptorkomplex und aktiviert damit den für IL-10 bekannten Signalübertragungsweg (Jones *et al.*, 2002; Kotenko *et al.*, 2000). Wie zelluläres IL-10 hemmt rekombinantes cmvIL-10 Proliferation und Zytokinsynthese Mitogen-stimulierter PBMCs und reduziert die Expression von MHC-Klasse-I- und -II-Molekülen auf der Oberfläche LPS-stimulierter Monozyten (Spencer *et al.*, 2002). Auch DCs werden in Reifung und Funktion durch cmvIL-10 beeinträchtigt (Chang *et al.*, 2004; Raftery *et al.*, 2004). Außerdem kann cmvIL-10 genau wie zelluläres IL-10 die durch CMV-Infektion induzierte Produktion des T-Zell-Lockstoffs CXCL10 durch Mikrogliazellen im ZNS hemmen und dadurch vermutlich die Immunreaktion des Wirts hemmen (Cheeran *et al.*, 2003). Obwohl cmvIL-10 also eine Reihe potentiell immunsuppressiver Funktionen aufweist, war zu Beginn der vorliegenden Arbeit über die direkten Auswirkungen auf Antigenpräsentation und CD8⁺-T-Zell-Erkennung und/oder -Stimulation im Kontext der Virusinfektion nichts bekannt.

1.4 Gegenstand der vorliegenden Arbeit

Während eine HCMV-Infektion bei immunkompetenten Personen in der Regel sehr effizient durch das Immunsystem kontrolliert werden kann, ist sie bei immunsupprimierten Patienten mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden (siehe 1.1.6). Da die Möglichkeiten zur therapeutischen, antiviralen Intervention sehr beschränkt sind (siehe 1.1.7), besteht ein großes Interesse an der Entwicklung eines geeigneten Impfstoffs (siehe 1.1.8). Eine wichtige Voraussetzung hierfür stellt das Verständnis der immunologischen Kontrolle der Infektion dar. Es ist bekannt, dass HCMV-spezifischen, zytotoxischen T-Lymphozyten dabei eine zentrale Bedeutung zukommt. Sie sind in hoher Frequenz im Blut gesunder, HCMV-seropositiver Spender nachweisbar und können nach adoptivem Transfer immunsupprimierte Patienten effizient vor HCMV-bedingten Erkrankungen schützen (siehe 1.2.2). Diese offensichtlich protektive antivirale CD8⁺-T-Zell-Antwort steht dabei im Widerspruch zu der *in vitro* beobachteten Fähigkeit des Virus, durch verschiedene immunevasive Strategien die MHC-Klasse-I-Präsentation zu verhindern und somit einer Erkennung durch zytotoxische T-Zellen zu entgehen (siehe 1.3). Aus dem Modell der

MCMV-Infektion der Maus ist bekannt, dass die MHC-Klasse-I-Präsentation viraler Antigene auch *in vivo* durch die CMV-vermittelte Immunevasion verhindert werden kann (Holtappels *et al.*, 2004). Unweigerlich stellt sich somit die Frage, wie trotz dieser virusvermittelten Immunevasion eine CD8⁺-T-Zell-Antwort stimuliert und vom Wirt zur effizienten Erkennung und Eliminierung infizierter Zellen eingesetzt werden kann.

Wichtige Zielstrukturen der HCMV-spezifischen CD8⁺-T-Zellantwort sind hauptsächlich das Strukturprotein pp65 und das regulatorische *major immediate early* Protein IE1 (siehe 1.2.2.1). Obwohl vermutlich CTL beider Spezifitäten maßgeblich an der Kontrolle der HCMV-Infektion beteiligt sind (Riddell *et al.*, 1992; Walter *et al.*, 1995; Bunde *et al.*, 2005; Cobbold *et al.*, 2005), unterscheidet sich die MHC-Klasse-I-Präsentation dieser beiden Proteine durch *in vitro* - infizierte Fibroblasten grundlegend voneinander. Während infizierte Zellen sehr effizient durch pp65-spezifische CTL erkannt werden können (Laughlin-Taylor *et al.*, 1994), ist eine Erkennung durch IE1-spezifische CTL nicht oder nur kaum zu beobachten (Gilbert *et al.*, 1993; Gilbert *et al.*, 1996; Khan *et al.*, 2002). Diese Diskrepanz wurde bisher durch eine selektive Unterdrückung der IE1-Präsentation durch das Tegumentprotein pp65 erklärt ((Gilbert *et al.*, 1996), siehe 1.3.2).

Trotz des großen Interesses, welches der US2-US11-vermittelten Immunevasion entgegen gebracht wird (siehe 1.3.1), war zu Beginn der vorliegenden Arbeit nichts über die Wirkung dieser Immunevasine auf die Präsentation von pp65 und IE1 im Kontext von MHC-Klasse-I bekannt. Aus diesem Grunde sollten die Auswirkungen der US2-US11-vermittelten Immunevasion auf die pp65- bzw. IE1-spezifische MHC-Klasse-I-Präsentation untersucht und ein möglicher Zusammenhang mit der von Gilbert und Kollegen beobachteten Unterdrückung der IE1-Präsentation durch pp65 geprüft werden. Darüber hinaus sollte der Einfluss des durch HCMV kodierten und durch infizierte Zellen freigesetzten cmvIL-10 (siehe 1.3.3) auf die MHC-Klasse-I-Präsentation von pp65 und IE1 analysiert werden.

Da die Auswirkungen der verschiedenen Immunevasionsstrategien auf die MHC-Klasse-I-Präsentation im Rahmen der Virusinfektion untersucht werden sollten, mussten verschiedene Deletionsmutanten von HCMV herangezogen und zum Teil auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch BAC-Mutagenese neu hergestellt werden. Die Detektion der MHC-Klasse-I-Präsentation sollte mit der Hilfe pp65- bzw. IE1-spezifischer CTL-Klone erfolgen, welche durch Peptidimmunisierung HLA-A2-transgener Mäuse generiert werden sollten.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine Laborgeräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
γ -Counter	Cobra II	Packard Bioscience, Dreieich
Analysenwaage	BP61	Sartorius, Göttingen
Binokular	SZX-12	Olympus, Hamburg
Brutschrank	B12	Heraeus, Hanau
CO ₂ -Inkubator	Steri-Cult 200 Incubator	Forma Scientific, Egelsbach
Digitalkamera	Power Shot G5	Canon Deutschland, Krefeld
Durchflusszytometer	FACSort	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektroblot-Apparatur	Trocken-Blotter	Hölzel, Wörth/Hörlkofen
Elektroporations-Apparatur	Gene Pulser II	Bio-Rad, München
Fluoreszenzmikroskope	Axiophot	Zeiss, Jena
	DM IRB	Leitz, Wetzlar
Folienschweißgerät	Polystar 583	Rische & Herforth, Hamburg
Gelapparaturen	DNA-Gelelektrophorese	Keutz, Reiskirchen
	Protein-Gelelektrophorese	Hoefer/Pharmacia Biotech, Freiburg
Heizrührer	RCT BASIC	IKA-Labortechnik, Staufen
Heizschüttler	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Laborwaage	LP5200P	Sartorius, Göttingen
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss, Jena
Netzgeräte	Elektrophoresis	Pharmacia Biotech, Freiburg
	Power Supply 600	
PCR-Cycler	<i>Tpersonal</i>	Biometra, Göttingen
pH-Meter	CG 842	Schott, Mainz
Photometer	- Ultrospec III	Pharmacia Biotech, Freiburg
	- Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg
	- Multiskan EX (96-Well-Platten-Reader)	Thermo, Vantaa (Finnland)
Pipetten, verstellbar	2, 20, 200, 1000 μ l	Gilson, Langenfeld
Pipettierhilfen	Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald
Schüttelinkubator	Cellstar	Nunc, Wiesbaden
Schüttelwasserbad	OLS 200	Grant, Cambridge (GB)

Schüttler	HS501 digital	IKA-Labortechnik, Staufen
Sterilbank	Herasafe	Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge	Sorvall Combi Plus	Sorvall, Hanau
Vortex	MS1 Minishaker	IKA-Labortechnik, Staufen
Wasserbad mit Thermostat		Memmert, Schwabach
Zentrifugen	- Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
	- Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
	- Megafuge 2.0	Heraeus, Hanau
	- RC5C Plus (Rotoren SLA1500, SS34)	Sorvall, Hanau
	- Ultrazentrifuge Sorvall Combi Plus	Sorvall, Hanau

2.2 Chemikalien

Soweit nicht anders erläutert wurden alle Chemikalien von Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen. Zum Ansetzen von Puffern und Lösungen wurde autoklaviertes bidestilliertes Wasser verwendet.

2.3 Bakterien und ihre Kultivierung

2.3.1 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Literatur
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ lacX74 deoR <i>recA1 endA1 araD139</i> Δ (<i>ara</i> , <i>leu</i>) 7649 <i>galU galK rspL nupG</i>	(Grant <i>et al.</i> , 1990)
<i>E. coli</i> EL250	DH10B [λ c857 (<i>cro-bioA</i>) < > <i>araC</i> -P _{BAD} flpe] ^b	(Lee <i>et al.</i> , 2001)

2.3.2 Medien und Medienzusätze

2.3.2.1 Luria Bertani (LB) - Medium

10 g Trypton; 5 g Hefe-Extrakt; 5 g NaCl in 1 l H₂O; pH-Wert mit NaOH auf 7,5 einstellen und autoklavieren.

2.3.2.2 LB-Agarplatten

LB-Medium + 1,5% (w/v) Agar, autoklavieren.

Die Zugabe von Antibiotika erfolgte nach dem Autoklavieren nach Abkühlen der Lösung auf 50 bis 60°C.

2.3.2.3 Einfriermedium

LB-Medium mit 30% Glycerin

2.3.2.4 Antibiotika und andere Medienzusätze

Lagerung bei -20°C

Chloramphenicol Stock 34 mg/ml in Ethanol absolut; Endkonzentration 15 µg/ml

Kanamycin Stock 10 mg/ml in H₂O, sterilfiltriert; Endkonzentration 15 µg/ml

L(+) Arabinose Stock 10% in H₂O; Endkonzentration 0,1%

2.3.3 Kultivierung und Kryokonservierung

2.3.3.1 Flüssigkulturen

Zur Anzucht von Bakterien in Flüssigkultur wurde steriles LB-Medium, gegebenenfalls mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen, mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator mit 200 Umdrehungen pro Minute (Upm) bei 32°C bzw. 37°C inkubiert.

2.3.3.2 Kultivierung auf Agarplatten

Zur Anzucht von Bakterien auf einer Agarplatte wurden die Bakterien aus einer Glycerinkultur mit einer sterilen Impföse auf einer LB-Agarplatte mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen ausgestrichen und über Nacht bei 32°C bzw. 37°C inkubiert.

2.3.3.3 Kryokonservierung (Glycerinkulturen)

Zur Kryokonservierung von Bakterien einer LB-Flüssigkultur wurden diese kurz vor dem Eintritt in die stationäre Wachstums-Phase mit 30% sterilem Glycerin versetzt, gut gemischt und anschließend bei -80°C eingefroren. Die Zugabe von Glycerin vermindert die Bildung von Eiskristallen, die die Bakterien schädigen können und ermöglicht somit eine nahezu unbegrenzte Haltbarkeit der eingefrorenen Bakterienkultur.

2.3.4 Transformation von *E.coli* mit Plasmid-DNA

2.3.4.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis bzw. in einer Kühlzentrifuge bei 4°C durchgeführt. Eine 200 ml Flüssigkultur von *E. coli* EL250 wurde in LB-Medium ohne Zusätze bei 32°C bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,6 angezogen und nach Erreichen der gewünschten OD_{600} direkt auf Eis überführt. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen auf zwei Zentrifugen-Röhrchen aufgeteilt und durch zehnminütige Zentrifugation mit 6000 Upm bei 4°C pelletiert. Die Pellets wurden in je 250 ml eiskaltem H₂O resuspendiert, erneut zentrifugiert und anschließend in insgesamt 5 ml eiskaltem Glycerin (10%) vereinigt. Nach erneutem Waschen mit 5 ml Glycerin (10%) wurden die Zellen nach Zentrifugation in 3 bis 4 ml eiskaltem Glycerin (10%) resuspendiert und auf Eis zu je 30 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

2.3.4.2 Elektroporation kompetenter *E. coli*

30 µl elektrokompetente *E. coli* - Zellen wurden mit 2 bis 10 µl DNA versetzt und 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in eine vorgekühlte Kuvette überführt und der Elektroporation mit Pulsbedingungen von 200 Ω, 2,5 kV und 25 µF unterzogen. Unmittelbar nach dem Puls wurde 1 ml kaltes LB-Medium zugegeben. Nach einer einstündigen Regenerationszeit im Schüttler bei 32°C bzw. 37°C wurden die Bakterien mit einem Drygalski-Spatel auf geeignetem Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 32°C bzw. 37°C inkubiert.

2.4 Säugerzellen und ihre Kultivierung

Um Kontaminationen mit Pilzsporen und Bakterien zu verhindern, wurden sämtliche Arbeiten an einer sterilen Werkbank unter Verwendung von sterilen Glas- und Plastikwaren durchgeführt. Alle Zellen wurden bei 37°C, einem CO₂-Gehalt von 5% und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Zur Kultivierung wurden 25, 75 oder 175 cm² Zellkulturflaschen von BD Falcon (Heidelberg) verwendet. Sterile Zellkulturschalen und 6-, 24-, 48- und 96-Well-Platten wurden ebenfalls von BD Falcon bezogen. Zur Kultivierung der T-Zell-Klone wurden 24-Well-Platten von Costar Corning (Wiesbaden) verwendet. Sterile Einmalplastikpipetten wurden von der Firma Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

Soweit nicht anders angegeben, erfolgte das Pelletieren der Zellen durch Zentrifugation bei RT in der Megafuge 2.0 für 4 min bei 1500 Upm.

Alle Zellkulturen wurden in regelmäßigen Abständen mit Hilfe des „Mykoplasmen Detection Kit“ von Roche (Mannheim) auf Mykoplasmenkontaminationen getestet. Bei positivem Testergebnis wurden die befallenen Zellen mit der Antibiotika-Kombination BM Cyclin (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben behandelt.

2.4.1 Puffer und Lösungen

Dulbecco's PBS (Invitrogen, Karlsruhe)

(Phosphate Buffered Saline)

136 mM NaCl; 26 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄

Trypanblau (Sigma, Deisenhofen)

0,4% in 85% Kochsalzlösung → 1:4-Verdünnung in PBS (Endkonzentration: 0,1%)

Trypsin/EDTA (PAA, Cölbe)

0,5 g/l Trypsin; 0,2 g/l EDTA

2.4.2 Medien und Medienzusätze

Alle Zellkulturmedien und Medienzusätze wurden, wenn nicht anders angegeben, von PAA (Cölbe) bezogen. Das verwendete fötale Kälber Serum (FKS) stammte von der Firma Biochrom (Berlin).

Als pH-Indikatorfarbstoff enthielten sämtliche Zellkulturmedien Phenolrot.

MEM 5/10%	Minimum Essential Medium mit 5/10% hitze-inaktiviertem FKS; 2 mM L-Glutamin; 50 mg/l Gentamycin; 0,5 ng/ml bFGF (<i>basic fibroblast growth factor</i>) (Invitrogen, Karlsruhe)
RPMI 10%	RPMI 1640 Medium mit 10% hitze-inaktiviertem FKS; 2 mM L-Glutamin; 50 mg/l Gentamycin; 5 µM β-Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe)
Ham's F12 5%	Ham's F12 Medium mit 5% hitze-inaktiviertem FKS; 2 mM L-Glutamin; 50 mg/l Gentamycin
Einfriermedium	90% FKS; 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) (Roth, Karlsruhe)

2.4.2.1 Antibiotika

Antibiotikum	Wirkspektrum	Stammlösung	Endkonzentration
Amphotericin B (PAA, Cölbe)	Pilze	0,25 mg/ml	2,5 µg/ml
BM Cyclin (1) (2) (Roche, Mannheim)	Bakterien, insbesondere Mykoplasmen	2,5 mg/ml 1,25 mg/ml	10 µg/ml 5 µg/ml
Geneticin (G418) (PAA, Cölbe)	Pro- und Eukaryonten	50 mg/ml	280 bis 600 µg/ml
Gentamycin (PAA, Cölbe)	Bakterien (auch Mykoplasmen)	50 mg/ml	50 µg/ml

2.4.2.2 Zytokine

Rekombinantes cmvIL-10

R&D-Systems (Wiesbaden), 10 µg/ml in PBS + 0,5% BSA (Lagerung bei -20°C)

2.4.3 Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität

Während lebende Zellen für den Vitalfarbstoff Trypanblau undurchlässig sind, dringt dieser bereits nach kurzzeitiger Inkubation durch die Zellmembran toter Zellen hindurch, was zu einer deutlichen Blaufärbung der entsprechenden Zellen führt. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die Zellsuspensionen 1:2 mit Trypanblau verdünnt, in eine Neubauer-Zählkammer überführt und anschließend unter dem Mikroskop gezählt. Milzzellen wurden vor dem Zählen im Verhältnis 1:1:2 mit Trypanblau und 4% Essigsäure versetzt. Die Essigsäure lysiert Erythrozyten, welche das Zählergebnis beeinflussen.

Die Berechnung der Zellzahl/ml erfolgte nach folgender Formel:

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

N = Anzahl gezählter lebender Zellen; n = Anzahl ausgezählter Grossquadrate;

V = Verdünnungsfaktor, 10^4 = Kammerfaktor

2.4.4 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Zellen können in speziellem Einfriermedium in flüssigem Stickstoff bei -172°C über mehrere Jahre aufbewahrt und bei Bedarf wieder neu in Kultur genommen werden. Zur Lagerung wurden 1×10^6 bis 5×10^6 Zellen pelletiert, in 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert und in Kryoampullen überführt. Diese wurden zunächst in einem Einfriergefäß über Nacht bei -80°C langsam herunter gekühlt und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Durch die Verwendung eines Einfriergefäßes, welches ein gleichmäßiges Absinken der Temperatur um

1 K/min gewährleistet, wird die Bildung von Eiskristallen beim Einfrieren vermindert. Der Zusatz von DMSO zum Einfriermedium soll Zellschädigungen durch dennoch entstehende Eiskristalle verhindern.

Zur Rekultivierung wurden die Zellen bei 37°C möglichst zügig aufgetaut, in angewärmtes Medium überführt, pelletiert und in frischem Medium ausgesät. Das rasche Auftauen vermindert die zytotoxische Wirkung von dem im Einfriermedium enthaltenen DMSO.

2.4.5 Suspensionszellen

Suspensionszellen wurden bei Farbumschlag des Kulturmediums von rot nach gelb je nach Wachstum und Bedarf 1:2 bis 1:20 gesplittet.

T2 (174 x CEM.T2); ATCC CRL-1992

T2 sind TAP-defiziente Hybride aus humanen B- und T-Zell-Lymphomen; HLA-A*0201 (Salter *et al.*, 1985).

Medium: RPMI 10%

JA2

JA2 sind stabile Transfektanten der humanen T-Zell-Linie Jurkat (ATCC TIB-152; (Schneider *et al.*, 1977)); sie tragen das HLA-A*0201-Gen (Irwin *et al.*, 1989).

Medium: RPMI 10% + 280 µg/ml Geneticin (G418)

THP-1; ATCC TIB-202

THP-1 ist eine humane Monozyten-Zelllinie; HLA-A*0201 (Tsuchiya *et al.*, 1980).

Medium: RPMI 10%

JY-LCL

Epstein-Barr-Virus (EBV) - transformierte lymphoblastoide Zelllinie (B-LCL); HLA-A*0201.

Medium: RPMI 10%

2.4.6 Adhärenzte Zellen

Adhärenz wachsende Zellen wurden gesplittet, sobald ein konfluenter Zellrasen vorlag. Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend zum Ablösen vom Boden des Kulturgefäßes 5 min mit Trypsin-EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:5 auf neue Kulturflaschen ausgesät.

HFF (primäre humane Vorhautfibroblasten)

Zur Isolierung von HFF werden nach operativen Eingriffen zur Verfügung gestellte Vorhäute von Neugeborenen oder Kleinkindern mechanisch zerkleinert. Durch 30-minütiges Rühren bei 37°C mit 0,5% Trypsin/0,2% EDTA und Glasperlen werden die Zellen aus dem

Gewebeverband gelöst, anschließend durch sterilen Mull filtriert und nach mehrmaligem Waschen in MEM 5% in Zellkulturflaschen ausgesät.

Eine derartige Isolierung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit allerdings nicht durchgeführt. Die verwendeten HFF stammten aus bereits länger zurückliegenden Präparationen. Sie wurden zwischen Passage 6 und Passage 20 für Experimente verwendet.

HFF sind in Zellkultur für HCMV permissiv.

Medium: MEM 5/10%, je nach Wachstum der Zellen

16-9

16-9 ist eine *Chinese hamster ovary* (CHO-K1) - Hybridzelllinie, die eine Translokation des langen Arms des humanen Chromosoms 6 enthält und stabil mit dem humanen HLA-B7 transfiziert ist (Soh *et al.*, 1993; Kotenko *et al.*, 1997).

Medium: Ham's F12 5%

16-9(IL-10R1/ γ R1/IL-10R2)

16-9(IL-10R1/ γ R1/IL-10R2) sind stabile Transfektanten der 16-9-Zellen, die zum einen einen chimären Rezeptor aus extrazellulärer Domäne der humanen IL-10R1-Kette (Ligandenbindender Teil des humanen IL-10-Rezeptors) und transmembraner und intrazellulärer Domäne der humanen IFN- γ R1-Kette und zum anderen die IL-10R2-Kette (CRFB4) enthalten (Kotenko *et al.*, 1997).

Medium: Ham's F12 5% + 450 μ g/ml Geneticin (G418)

2.4.7 Anlage muriner T-Zell-Linien (CTLL)

Die Herstellung muriner CTLL erfolgte in Zusammenarbeit mit der AG Theobald, Hämatologie und Onkologie, 3. Medizinische Klinik, Universität Mainz, über Peptidimmunisierung transgener Mäuse. Alle verwendeten transgenen Mäuse wurden ausgehend von dem Mausstamm C57BL/6 gezüchtet.

2.4.7.1 Peptide

Die verwendeten Peptide wurden von der Firma JPT Peptide Technologies (Berlin) bezogen. Sie wurden mit einer Reinheit von > 80% synthetisiert und trugen am C-Terminus eine freie Carboxyl-Gruppe.

Protein	Aminosäureposition	Aminosäuresequenz
pp65	495-503	NLVPMVATV
IE1	297-305	TMYGGISLL

2.4.7.2 Mäuse

Die verwendeten Versuchstiere wurden in der ZVTE (Zentrale Versuchstiereinrichtung) der Johannes Gutenberg - Universität unter SPF (*specified pathogen free*) - Bedingungen gehalten.

CD8xA2 (C57BL/6-Hintergrund)

Diese doppelt transgenen Mäuse sind heterozygot für das humane HLA-A*0201 und die α - und β -Kette des humanen CD8-Moleküls und homozygot für das murine H-2^b-Gen. Die Mäuse wurden freundlicherweise von Dr. L. Sherman, San Diego, über Dr. M Theobald, Mainz, zur Verfügung gestellt und zur Etablierung der pp65-spezifischen CTLL verwendet. Diese CTLL stand zu Beginn der vorliegenden Arbeit bereits zur Verfügung. Sie wurde im Rahmen der Promotion von Dr. Nadine Frankenberg hergestellt (Frankenberg, 2002).

CD8xCyA2K^b (C57BL/6-Hintergrund)

Diese doppelt transgenen Mäuse sind heterozygot für die α - und β -Kette des humanen CD8-Moleküls und für ein chimäres MHC-Klasse I-Molekül, das aus der α_1 - und α_2 -Domäne des humanen HLA-A2 und aus der α_3 -Domäne des murinen K^b besteht (Sherman *et al.*, 1992). Sie sind homozygot für das murine H-2^b-Gen. Die Mäuse wurden freundlicherweise von Dr. L. Sherman, San Diego, über Dr. M Theobald, Mainz, zur Verfügung gestellt und im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Herstellung der IE1-spezifischen CTLL verwendet.

C57BL/6

Diese Mäuse weisen den H-2^b-Haplotyp auf.

2.4.7.3 Immunisierung

Zur Herstellung einer IE1-spezifischen murinen CTLL wurden doppelt transgene CD8xCyA2K^b-Mäuse im Alter von 8 bis 10 Wochen mit dem nonameren IE1-Peptid IE1₂₉₇₋₃₀₅ immunisiert. Dazu wurden den Mäusen 100 μ l einer auf Eis hergestellten Emulsion aus 100 μ g IE1-Peptid, 120 μ g HBV Core₁₂₈₋₁₄₀ (T-Helfer-Peptid; bindet an das murine MHC-Klasse-II-Molekül I-A^b) und 50 μ l inkomplettem Freund'schen Adjuvans (IFA; DIFCO, Detroit) subkutan in die Schwanzwurzel injiziert (Theobald *et al.*, 1995). Durch Zugabe des IFA wurde das lösliche Peptidantigen in eine partikuläre Form umgewandelt, wodurch die Stabilität des Antigens im Körper erhöht und die Aufnahme durch pAPCs wie z.B. DCs oder Makrophagen gefördert wurde. Da dennoch die Möglichkeit bestand, dass die Immunisierung nicht zu der gewünschten CTL-Antwort führte, wurden mehrere Mäuse pro Ansatz verwendet.

2.4.7.4 Herstellung von LPS-aktivierten B-Zellblasten

Lipopolysaccharide (LPS) sind ein wichtiger Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien. Indem sie die Synthese und Sekretion von wachstumsfördernden Faktoren wie z. B. Interleukinen induzieren, üben sie eine starke immunstimulatorische Wirkung aus.

Als antigenpräsentierende Stimulatorzellen zur Anlage von T-Zell-Primärkulturen wurden LPS-aktivierte B-Zellblasten verwendet. Drei Tage vor Anlage der Primärkultur wurden Milzen naiver Mäuse des immunisierten Stammes (CD8xCyA2K^b) entnommen, zerrieben und durch ein Sieb filtriert. Die auf diese Weise gewonnenen Milzzellen wurden zweimal mit RPMI 10% gewaschen, gezählt und mit einer Zelldichte von $1 \times 10^6/\text{ml}$ in RPMI 10% unter Zugabe von 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS (aus *Salmonella typhosa*, Sigma, Deisenhofen) und 7 mg/ml Dextransulfat (Pharmacia Biotech, Freiburg) bis zum Anlegen der Primärkultur inkubiert.

2.4.7.5 Anlage einer T-Zell-Primärkultur

Zehn Tage nach Immunisierung wurden die Mäuse getötet, die Milzen entnommen und diese getrennt voneinander homogenisiert. Nach zweimaligem Waschen wurden 7×10^6 dieser Milzzellen mit 3×10^6 Stimulatorzellen in einem Gesamtvolumen von 2 ml pro *Well* in einer 24-*Well*-Platte ausgesät. Mit 3000 rad in einer Cäsium-Quelle bestrahlte LPS-Blasten, die in einem Volumen von 1 ml für 35 min mit 5 μg IE1-Peptid und 5 μg humanem $\beta_2\text{m}$ (Sigma, Deisenhofen) beladen worden waren, dienten dabei nach zweimaligem Waschen als Stimulatorzellen (Vitiello *et al.*, 1991; Sherman *et al.*, 1992; Theobald *et al.*, 1995). Nach 6 bis 8 Tagen wurde die Aktivität dieser Kulturen in einem Zytotoxizitätstest untersucht.

2.4.7.6 Restimulierung

Bei der Restimulierung einer CTL-Kultur wurde diese je nach Wachstum 1:2 oder 1:3 gesplittet und darüber hinaus mit neuen Stimulatorzellen versorgt, um ihre Antigenspezifität zu erhalten. Die peptidspezifischen CTLL wurden einmal pro Woche restimuliert. Dazu wurden mit 20.000 rad bestrahlte JA2-Zellen für 35 min mit 5 μg Peptid und 5 μg humanem $\beta_2\text{m}$ beladen und anschließend zweimal gewaschen. Die T-Lymphozyten wurden zusammen mit 5×10^5 peptidbeladenen JA2-Zellen und 6×10^6 mit 3000 rad bestrahlten C57BL/6-Milzzellen in einem Gesamtvolumen von 2 ml/*Well* in einer 24-*Well*-Platte ausgesät. Zusätzlich wurde den Ansätzen je nach Wachstum 5 bzw. 10% (v/v) Überstand aus dem Kulturmedium Concanavalin A (aus *Canavalia ensiformis*, Invitrogen, Karlsruhe) - aktivierter Milzzellen von Lewis-Ratten zugesetzt (Irwin *et al.*, 1989).

2.4.7.7 Klonierung

Zur Erhöhung der Spezifität der generierten CTLL wurde diese über die Methode des *limiting dilution* kloniert. Dazu wurde die T-Zell-Population in 8 verschiedenen Verdünnungsstufen

von 300 Zellen/*Well* bis 0,1 Zellen/*Well* in 96-*Well*-Platten ausgesät und in einem Volumen von insgesamt 200 µl pro *Well* restimuliert. Um letztlich den bestmöglichen CTL-Klon zu erhalten, wurden die bezüglich ihres Wachstums und ihrer Peptidspezifität besten Klone wöchentlich restimuliert. Nach Etablierung eines CTL-Klons wurde dieser genau wie eine CTLL einmal pro Woche passagiert.

2.5 Viren und ihre Kultivierung

2.5.1 Virusstämme

Ad169

Dieser HCMV-Laborstamm wurde 1956 von Rowe isoliert (ROWE *et al.*, 1956) und diente als Grundlage für die Sequenzierung des HCMV-Genoms (Chee *et al.*, 1990).

pHB15

Dieser rekombinante HCMV-Stamm wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Rekonstitution des BACs pHB15 ((Hobom *et al.*, 2000); pHB15 heißt hier Ad169-BAC) in HFF generiert. Das Virus enthält das komplette Ad169-Genom. Der BAC-Vektor wurde durch ortsspezifische Rekombination durch die *Cre*-Rekombinase aus dem HCMV-Genom entfernt.

pHB5

Dieser rekombinante HCMV-Stamm wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Rekonstitution des BACs pHB5 (Borst *et al.*, 1999) in HFF generiert. Der BAC-Vektor ist zwischen US1 und US7 in das Genom von Ad169 integriert. Dem Virus fehlt somit die Genomregion von US2 bis US6.

Δpp65

Dieser rekombinante HCMV-Stamm wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Rekonstitution des BACs pHB15_Δpp65 (wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt) in HFF generiert. Die das virale Tegumentprotein pp65 kodierende UL83-Region ist deletiert. Das Virus produziert keine DBs.

ΔUS2-11 und ΔUS2-11_GFP

Diese beiden rekombinanten HCMV-Stämme wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Rekonstitution des BACs pΔUS2-11-(EGFP-loxP) (Falk *et al.*, 2002) in HFF generiert. Den Viren fehlt die gesamte Region von US2 bis US11.

Bei ΔUS2-11 wurde der BAC-Vektor durch ortsspezifische Rekombination durch die *Cre*-Rekombinase aus der Sequenz entfernt, bei ΔUS2-11_GFP ist die BAC-EGFP-Kassette noch zwischen den flankierenden loxP-*sites* im Genom enthalten.

Δ US2-11_App65_GFP

Dieser rekombinante HCMV-Stamm wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Rekonstitution des BACs p Δ US2-11_App65-(EGFP-loxP) (wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt) in HFF generiert. Dem Virus fehlen sowohl die Region von US2 bis US11 als auch das UL83-Gen. Die BAC-EGFP-Kassette ist noch zwischen den flankierenden loxP-sites im Virus-Genom enthalten. Das Virus produziert keine DBs.

RVAdIL10C

Dieser rekombinante HCMV-Stamm wurde von Dr. Sandra Pepperl-Klindworth hergestellt. Im Genom von Ad169 wurde durch homologe Rekombination die kodierende Sequenz des cmvIL-10 von AS 49 bis AS 174 deletiert (Pepperl-Klindworth *et al.*, 2006).

2.5.2 Virus-Rekonstitution aus BACmiden

Um aus HCMV-BACmiden (siehe 2.6.7) Virus zu rekonstituieren, wurden die BACmide in HFF transfiziert und diese anschließend so lange passagiert, bis ausreichend Plaques infizierter Zellen zu sehen waren. Die virushaltigen Überstände dieser Kulturen wurden dann zur Passage auf nicht infizierte HFF überführt.

Die BAC-DNA wurde über den „Plasmid DNA Purification“-Kit der Firma Macherey & Nagel (Düren) aus *E. coli* aufgereinigt und anschließend mit Hilfe der SuperFect-Methode von Qiagen (Hilden) in HFF transfiziert. Am Tag vor der Transfektion wurden dazu 1×10^5 HFF pro Well in einer 6-Well-Platte ausgesät. Bei einer Konfluenz der Zellen von 40% bis 80% erfolgte die Transfektion nach Herstellerangaben (Protokoll zur transienten Transfektion von adhären Zellen), wobei pro Ansatz verschiedene DNA-Mengen (2 μ l, 5 μ l, 10 μ l und 20 μ l) ausgetestet wurden. Zur Entfernung des BAC-Vektors aus dem Virus-Genom wurden 0,5 μ g des die Cre-Rekombinase exprimierenden Plasmids pBRep-cre (siehe 2.6.1) kotransfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen unter für HFF geeigneten Bedingungen kultiviert. Nach zwei bis drei Wochen konnte man in der Regel die ersten Plaques infizierter Zellen im Zellrasen erkennen. Die Zellen wurden weiter passagiert, bis genügend infizierte Zellen verfügbar waren, um virushaltigen Überstand zu erhalten.

2.5.3 Infektion eukaryonter Zellen mit HCMV

Zur Infektion mit HCMV wurde von subkonfluent wachsenden HFF das Medium abgezogen und Virusüberstand je nach gewünschter *moi* in einem geringen Volumen zugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C zur Virus-Zell-Adsorption wurde ausreichend Wachstumsmedium zugegeben und die infizierten Zellen wurden bis zur Verwendung weiter bei 37°C inkubiert.

2.5.4 Herstellung virushaltiger Überstände

Zur Herstellung virushaltiger Überstände wurden subkonfluent wachsende HFF mit einer *moi* von 1 bis 10 infiziert und bei 37°C inkubiert. Je nach zytopathischem Effekt (CPE) wurde 6 bis 8 Tage nach Infektion der virushaltige Überstand entnommen, durch zehninütige Zentrifugation bei 3000 Upm von Zelltrümmern befreit und anschließend in 1,5 bis 5 ml Aliquots bei -80°C eingefroren.

2.5.5 Entfernung von Viruspartikeln aus virushaltigen Überständen

Über Amicon Ultra - 15-Filter (Millipore Billerica, MA) wurden infektiöse Viruspartikel aus virushaltigen Überständen entfernt. Aufgrund der 100.000 kDa großen Poren können HCMV-Viruspartikel diese Filter nicht durchdringen, wohingegen kleinere im Überstand enthaltene Moleküle den Filter passieren können. Die erfolgreiche Entfernung infektiöser Viruspartikel wurde über indirekte Immunfluoreszenz „infizierter“ HFF mit einem IE1-spezifischen Antikörper überprüft.

2.5.6 Bestimmung des Virustiters

Reagenzien

AEC-Stammlösung	400 mg AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol; Sigma (Deisenhofen)) in 100 ml DMF (Dimethylformamid)
Acetat-Puffer	6,8 g Natriumacetat in 2,88 ml Eisessig, pH 4,7

Der Virustiter eines virushaltigen Überstandes ist ein Maß für die Anzahl an infektiösen Partikeln in einem vorgegebenen Volumen Zellkulturüberstand. Zur Bestimmung des Virustiters wurden 5×10^3 HFF pro *Well* einer 96-*Well*-Platte ausgesät und am darauf folgenden Tag mit 100 µl des zu untersuchenden Virusüberstandes im Achtfachansatz infiziert. Der Virusüberstand wurde dazu 10^{-3} und 10^{-4} mit Medium verdünnt. 48h nach Infektion wurden die Zellen für 20 min mit 96% Ethanol bei RT fixiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden zur Detektion von IE1-exprimierenden Zellen 50 µl Hybridomüberstand des IE1-spezifischen monoklonalen Antikörpers p63-27 pro *Well* zugegeben und 1h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Detektion des gebundenen Primärantikörpers mit Hilfe eines HRP (Meerrettichperoxidase, *horseradish peroxidase*) - gekoppelten Sekundärantikörpers (anti-Maus IgG). Derart markierte Zellen konnten durch eine AEC-Färbung sichtbar gemacht werden (deutliche Braunfärbung der IE1-positiven Zellkerne). Dazu wurde die AEC-Stammlösung 1:20 in Acetatpuffer verdünnt, filtriert und mit 1:1000 Volumen H_2O_2 (30%) versetzt. Von dieser Färbelösung wurden 100 µl pro *Well* zugegeben. Nach einer

einstündigen Inkubation der 96-Well-Platte im Dunkeln bei 37°C wurde die Farbreaktion durch Waschen mit PBS abgestoppt. Danach wurde unter dem Mikroskop die Anzahl der IE1-positiven Kerne (entspricht infizierten Zellen) pro Well ermittelt. Pro Virus und Verdünnung wurden 8 Wells ausgezählt und davon der Mittelwert gebildet. Hieraus errechnete sich der Virustiter folgendermaßen:

Anzahl infektiöser Partikel pro ml Virusüberstand = $N \times V \times 10$

N Anzahl an IE1-positiven Zellen pro Well (Mittelwert von 8 Wells)

V Verdünnungsfaktor des Virusüberstands

x 10 Es wurde mit 100 µl Virusüberstand pro Well infiziert; der Virustiter aber soll für 1 ml Überstand berechnet werden

2.5.7 Aufreinigung von Viruspartikeln aus Zellkultur-Überstand

Reagenzien

0,04 M Na-Phosphatpuffer	1,1 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1 \text{ H}_2\text{O}$; 5,7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ auf 1 l H_2O ; pH 7,4
35% Na-Tartrat	207,5 g Na-Tartrat in 325 ml 0,04 M Na-Phosphatpuffer; autoklaviert
15% Na-Tartrat/ 30% Glycerin	88,9% Na-Tartrat; 150 ml Glycerin; 275 ml 0,04 M Na-Phosphatpuffer; autoklaviert

Unter Verwendung eines positiven Dichte- / negativen Viskositäts-Gradienten - Systems wurden die bei der Infektion entstehenden unterschiedlichen HCMV-Partikel (Virionen, DBs und NIEPs) aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt (Talbot & Almeida, 1977; Irmieri & Gibson, 1983). Bei einem CPE von mindestens 90% wurde der Überstand der infizierten HFF zunächst durch zehnmündige Zentrifugation bei 3000 Upm von Zellen und Zelltrümmern befreit und anschließend die Viruspartikel durch Ultrazentrifugation im SW28 Rotor für 70 min bei 23.000 Upm und 4°C pelletiert. Sollte keine Auftrennung der unterschiedlichen Partikelfractionen erfolgen, wurde das Pellet an dieser Stelle bereits in PBS resuspendiert und bei -80°C gelagert. Für eine Trennung von Virionen, DBs und NIEPs wurde das Pellet hingegen in 1 ml 0,04 M Na-Phosphatpuffer resuspendiert und anschließend in je 2 ml - Aliquots auf einen Gradienten geschichtet, der aus 4 ml 35% Na-Tartrat und 5 ml 15% Na-Tartrat aufgebaut wurde. Die Auftrennung der verschiedenen Partikel erfolgte entsprechend ihrer Dichte durch Ultrazentrifugation für 60 min bei 23.000 Upm ohne Bremse. Nach diesem Zentrifugationsschritt war im Durchlicht ein distinktes Bandenmuster zu erkennen: die DBs lieferten eine breite, relativ diffuse Bande, darüber sammelten sich die Virionen in einer dünnen, sehr scharfen Bande und darüber die NIEPs, ebenfalls in einer dünnen, klar abgegrenzten Bande. Diese Banden wurden mit Hilfe von Kanülen abgezogen und für

70 min bei 23.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden in PBS gelöst und bei -80°C gelagert.

2.6 Präparation, Analyse und Manipulation von DNA

2.6.1 Verwendete Plasmide

pBRep-Cre

Expression der *Cre*-Rekombinase nach Transfektion in HFF

⇒ Herausschneiden des BAC-Vektors aus dem HCMV-Genom durch ortsspezifische Rekombination an *loxP-sites*

(pBRep-Cre wurde von Dr. Wolfram Brune, Würzburg, kloniert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt; Beschreibung siehe (Hobom *et al.*, 2000))

pCP-IE1

Ein auf pCP15 (Cherepanov & Wackernagel, 1995) basierendes Plasmid; enthält ein von FRT-*sites* flankiertes Kanamycinresistenz-Gen

⇒ Amplifikation des von FRT-*sites* flankierten Kanamycinresistenz-Gens zur Herstellung eines zur homologen Rekombination verwendbaren PCR-Produkts zur BAC-Mutagenese

pHB15

BAC, welches das komplette Ad169-Genom enthält ((Hobom *et al.*, 2000); pHB15 heißt hier Ad169-BAC).

pHB5

BAC, welches das Ad169-Genom enthält. Der BAC-Vektor wurde zwischen US1 und US7 in das Virusgenom integriert; die dazwischen liegenden Sequenzen (US2 bis US6) wurden dabei entfernt (Borst *et al.*, 1999).

pΔUS2-11-(EGFP-loxP)

Auf pHB5 basierendes BAC. Die gesamte virale Sequenz zwischen US1 und US12 (US2 bis US11) ist deletiert (Falk *et al.*, 2002).

pHB15_Δpp65

Auf pHB15 basierendes BAC. Die virale UL83-Region (pp65-Gen) ist deletiert. Dieses BAC wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellt.

pΔUS2-11_Δpp65-(EGFP-loxP)

Auf ΔUS2-11-(EGFP-loxP) basierendes BAC. Die virale UL83-Region (pp65-Gen) ist deletiert. Dieses BAC wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellt.

2.6.2 Isolierung von DNA

2.6.2.1 Isolierung von BACmid-/Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Aufreinigung kleiner Mengen BACmid- bzw. Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte aus 2 ml Übernachtskultur nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Sambrook J. & Russell D.W., 2001). Es wurden Puffer des „High Purity Plasmid Purification“-Systems von Marligen Bioscience (wurde über BioCat, Heidelberg, bezogen) verwendet. Zunächst wurden die Bakterien durch einminütige Zentrifugation bei 6000 Upm pelletiert und anschließend in 200 µl Suspensionspuffer (E1) resuspendiert. Durch mehrmaliges invertieren des Gefäßes wurde die Zellsuspension vorsichtig mit 200 µl alkalischem Lysepuffer (E2) vermischt, anschließend mit 200 µl Neutralisationspuffer, pH 5,5, (E3) versetzt und erneut vorsichtig gemischt. Die durch diese Behandlung ausgefallene chromosomale DNA wurde anschließend durch zehnminütige Zentrifugation mit 14.000 Upm bei 4°C entfernt und die im Überstand befindliche Plasmid-DNA mit Isopropanol gefällt und schließlich in 50 µl H₂O aufgenommen. Größere DNA-Mengen von *high-copy-number*-Plasmiden wurden aus 100 ml Übernachtskultur mit Hilfe des „High Purity Plasmid Purification“-Systems von Marligen Bioscience isoliert, entsprechende DNA-Mengen von *low-copy-number*-BACmid-DNA aus 200 ml Übernachtskultur mit Hilfe des „Plasmid DNA Purification“-Kits von Macherey & Nagel (Düren). Die Durchführung erfolgte nach den jeweiligen Angaben des Herstellers. Die DNA-Konzentration wurde durch die Messung der optischen Dichte bei 260 nm ermittelt. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA in H₂O.

2.6.2.2 Isolierung von Virus-DNA aus Zellkulturüberstand infizierter HFF

Die Isolierung von HCMV-DNA aus Zellkulturüberstand wurde mit Hilfe des „High Pure Viral Nucleic Acid“-Kits von Roche (Mannheim) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die auf diese Weise isolierte Virus-DNA wurde als *Template* zur Amplifikation von ausgesuchten Genombereichen eingesetzt (siehe 2.6.6).

2.6.3 Fällung von DNA mit Isopropanol

Zur Entfernung von Salzen und Erhöhung der DNA-Konzentration wurde die DNA mit 1,5 M NaCl versetzt und nach Zugabe von 0,8 Volumen Isopropanol 20 min auf Eis inkubiert. Nach

zehnminütiger Zentrifugation bei 14.000 Upm in einer Eppendorffzentrifuge wurde das entstandene Pellet zur Entfernung restlicher Salze mit 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und das getrocknete Pellet in einem geeigneten Volumen H₂O gelöst.

2.6.4 Agarose-Gelelektrophorese

Puffer

TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	89 mM Tris-Borat; 2 mM EDTA (pH 8,0)
Auftragspuffer für DNA-Gele	50 mg Bromphenolblau; 100 mg Xylencyanol; 1 mM EDTA; 25 g Saccharose; ad 50 ml mit H ₂ O

Zur Analyse oder Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurden diese mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Je nach Molekulargewicht der zu untersuchenden DNA-Fragmente wurden Agarosekonzentrationen von 0,7 bis 2% (w/v) eingesetzt. Die Agarose wurde durch Aufkochen in TBE-Puffer gelöst und nach Zugabe von 0,5 mg/ml Ethidiumbromid in die entsprechende Gelapparatur gegeben. Vor dem Auftragen der DNA-Proben auf das Gel wurden diese 1:6 mit Auftragspuffer gemischt. Die Auftrennung der DNA erfolgte, je nach Größe der verwendeten Gelkammer, bei Spannungen zwischen 80 und 140 Volt. Als Molekulargewichtsmarker wurden 0,5 µg „1kb-DNA-Ladder“ von PeqLab (Erlangen) verwendet. Durch den in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid konnten die aufgetrennten Fragmente mit UV-Licht sichtbar gemacht und anschließend photographiert werden.

2.6.5 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte nach Angaben des Herstellers über das „QIAquick Gel Extraction Kit Protocol“ von Qiagen (Hilden) unter Verwendung einer Mikrozentrifuge. Mit dieser Methode konnten DNA-Fragmente zwischen 70 bp und 10 kb aufgereinigt werden.

2.6.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) stellt eine hochempfindliche Methode zur exponentiellen Amplifikation definierter DNA-Sequenzen *in vitro* dar (Saiki *et al.*, 1988). Selbst kleinste Mengen genetischen Materials können so weit vervielfältigt werden, dass sie mit herkömmlichen molekularbiologischen Analysemethoden nachweisbar werden. Zur Amplifikation des gewünschten DNA-Bereichs werden zwei Oligonukleotide (*Primer*) benötigt, welche komplementär zu den die Zielsequenz stromauf- und stromabwärts begrenzenden Regionen auf der DNA-Matrize (*Template*) sind.

2.6.6.1 Durchführung einer PCR

Eine Standard-PCR wurde in einem Endvolumen von 50 µl folgendermaßen durchgeführt: 0,1 bis 200 ng *Template*-DNA wurden in 1x PCR-Puffer unter Zugabe von je 0,4 µM *Primer*, 200 µM dNTPs (Invitrogen, Karlsruhe), 2 U *Taq*-DNA-Polymerase von PeqLab (Erlangen) bzw. 2,6 U „Expand High Fidelity Enzyme Mix“ von Roche (Penzberg) und 1,5 mM MgCl₂ in die Reaktion eingesetzt. Einem initialen Denaturierungsschritt (3 min, 95°C) folgten 30 bis 35 Zyklen mit je 1 min Denaturierung bei 95°C, 1 min Hybridisierung der *Primer* (Richtwert für Hybridisierungstemperatur: 5°C niedriger als Schmelztemperatur der *Primer*) und je nach Länge der zu amplifizierenden *Template*-DNA 45 sec bis 1 min 30 sec Elongation bei 72°C (Richtwert: 1 min pro 1000 bp). Den Anschluss stellte eine zehnminütige terminale Elongation bei 72°C dar. Zur Bestimmung der Ausbeute und Überprüfung der Größe des jeweiligen PCR-Produkts wurden 5 µl der Probe durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Während analytische PCR-Reaktionen mit der *Taq*-DNA-Polymerase von PeqLab durchgeführt wurden, wurde das zur BAC-Mutagenese verwendete PCR-Produkt (siehe 2.6.7.1) mit Hilfe des eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität aufweisenden „Expand High Fidelity Enzyme Mix“ von Roche hergestellt.

2.6.6.2 Gewinnung von *Template*-DNA aus Bakterienkolonien

Um den Erfolg einer gewünschten DNA-Modifikation in einer Vielzahl von *E. coli* - Kolonien schnell und effizient überprüfen zu können, wurde die Region von Interesse einer PCR-Amplifikation unterzogen. Die hierfür verwendete *Template*-DNA wurde direkt aus den zu untersuchenden Kolonien isoliert: Einzelkolonien wurden gepickt und in 10 µl sterilem H₂O gelöst. Durch fünfminütiges Aufkochen bei 100°C wurden die Zellen aufgebrochen, die Zelltrümmer anschließend durch Zentrifugation entfernt und 5 µl des DNA-enhaltenden Überstandes wurden als *Template* in einen 50 µl - PCR-Ansatz eingesetzt.

2.6.6.3 Verwendete Oligonukleotide (*Primer*)

Alle in dieser Arbeit verwendeten *Primer* wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen. Oligonukleotide mit mehr als 40 Basen wurden einer HPLC-Reinigung unterzogen.

BamHIRreverse2	5' GCC TGA GAC ATT GCG AAG GCG GG 3'
pp65_rev	5' GTC ACC TAT CAC CTG CAT CTT G 3'
SR8	5' CGG TTG TCT CTG TGT AGA ACG 3'

***pp65-frt_fwd** 5' GCT GCC GCA CGA GAC GCG ACT CCT GCA GAC GGG TAT
 CCA CGT ACG CGT GAG **GTA CCC GGG GAT CTT G** 3'

***pp65-frt_rev** 5' GGA CGT GGG TTT TTA TAG AGT CGT CCT AAG CGC GTG
 CGG CGG GTG GCT CAT **CGA GAA ACG CAG CTT C** 3'

* Diese *Primer* wurden zur BAC-Mutagenese verwendet. Der jeweils fettgedruckte Anteil des *Primers* bindet an die *Template*-DNA. Der normal gedruckte Anteil stellt den zur Zielregion im Virusgenom homologen Bereich dar.

2.6.6.4 Verwendete PCR-Programme

Programm 1

95°C	3 min	35 Zyklen
95°C	1 min	
70°C	1 min	
72°C	1.30 min	
72°C	10 min	
4°C	unendlich	

Programm 2

95°C	3 min	35 Zyklen
95°C	1 min	
60°C	1 min	
72°C	45 sec	
72°C	10 min	
4°C	unendlich	

2.6.6.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

Zur Aufreinigung von doppelstängigen PCR-Produkten in der Größe von 100 bp bis 10 kb wurde der „QIAquick PCR Purification Kit“ von Qiagen (Hilden) verwendet. Nach Herstellerangaben wurden die PCR-Produkte über das „QIAquick PCR Purification Kit Protocol“ unter Benutzung einer Mikrozentrifuge von im Ansatz enthaltenen *Primern*, Nukleotiden, Enzymen und Salzen befreit.

2.6.6.6 *Template*-Eliminierung

Zur Entfernung der *Template*-DNA nach erfolgter PCR wurde das aufgereinigte PCR-Produkt einer Restriktion mit dem Enzym *Dpn* I unterzogen. Dieses Restriktionsenzym zerstört die methylierte *Template*-DNA; die nicht methylierten PCR-Produkte bleiben dabei unversehrt. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben (New England Biolabs, Frankfurt am Main) bei 37°C für 4 Stunden oder über Nacht durchgeführt.

2.6.7 Manipulation des HCMV-Genoms über BAC-Mutagenese (Zwei-Schritt-Rekombination)

Bacterial artificial chromosomes (BACmide, BACs) sind auf dem *E. coli* - F-Plasmid basierende Vektoren, welche über 300 kb große Fragmente eukaryontischer DNA stabil enthalten können (Shizuya *et al.*, 1992). Die Verwendung dieser BACmide ermöglicht die Vermehrung und Manipulation des Genoms großer DNA-Viren in *E. coli*. Verschiedene, das HCMV-Genom enthaltende BACs sind in der Literatur beschrieben (Borst *et al.*, 1999; Hobom *et al.*, 2000).

Zur Herstellung rekombinanter Viren wurde das in einem BAC enthaltene HCMV-Genom mittels einer von Lee und Kollegen veröffentlichten Methode gezielt modifiziert (Lee *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zur Deletion des UL83-Gens von HCMV verwendet. In einem ersten Schritt wurde die zu deletierende Sequenz mittels homologer Rekombination durch einen Selektionsmarker ersetzt, welcher anschließend in einem zweiten Schritt mittels ortsspezifischer Rekombination wieder entfernt wurde. Die homologe Rekombination erfolgte hierbei zwischen den die zu deletierende Sequenz im Virusgenom flankierenden Bereichen und den dazu homologen Enden eines über PCR hergestellten linearen DNA-Fragments, welches einen durch FRT-sites flankierten Selektionsmarker kodierte. Durch das *double crossover* zwischen den zueinander homologen Bereichen wurden die dazwischen liegenden Regionen gegeneinander ausgetauscht. Der nun anstelle der Zielsequenz im Virusgenom vorliegende Selektionsmarker wurde anschließend durch ortsspezifische Rekombination an den flankierenden FRT-sites wieder entfernt.

Um die Rekombination zwischen BACmid und linearem PCR-Produkt in *E. coli* zu ermöglichen, wurde der Bakterienstamm *E. coli* EL250 verwendet. Dieser Stamm enthält chromosomal einen modifizierten λ -Prophagen, welcher das λ -Rekombinationssystem (*gam*, *exo* und *beta*) unter der Kontrolle eines temperatursensitiven Repressors exprimiert. Während *gam* durch Hemmung der *E. coli* RecBCD - Nuclease die Degradation des transformierten linearen PCR-Produkts verhindert, erhöhen *exo* und *beta* die Rekombinationsrate linearer DNA (Yu *et al.*, 2000). Außerdem kodiert dieser *E. coli* - Stamm, ebenfalls chromosomal, eine Flp-Rekombinase (*flpe*), deren Expression durch Arabinose induziert werden kann. Nach entsprechender Induktion katalysiert diese *flpe* die Entfernung des Selektionsmarkers durch ortsspezifische Rekombination an den flankierenden FRT-sites.

2.6.7.1 Integration eines Selektionsmarkers über homologe Rekombination

Durch die homologe Rekombination zwischen HCMV-BAC und PCR-Produkt wurde die zu deletierende Zielsequenz im Virusgenom durch ein von FRT-sites flankiertes

Kanamycinresistenz-Gen ersetzt. Die Rekombination erfolgte hierbei zwischen den die Zielsequenz flankierenden Sequenzen im Virusgenom und den dazu homologen Bereichen zu beiden Seiten des von *FRT-sites* eingerahmten Selektionsmarkers an den Enden des PCR-Produkts.

2.6.7.1.1 Herstellung des PCR-Produkts zur homologen Rekombination

Die Herstellung eines zur homologen Rekombination nutzbaren PCR-Produkts erforderte die Verwendung speziell konstruierter *Primer*. Das 5'-Ende der verwendeten *Primer* wies etwa 50 Basen lange Überhänge auf, welche homolog zu den die auszutauschende Region auf der Zielsequenz flankierenden Bereichen waren. Das resultierende PCR-Produkt bestand also aus der vom *Template* amplifizierten Sequenz, die zu beiden Seiten durch etwa 50 bp HCMV-Sequenz flankiert war.

Als *Template* zur Amplifikation der Kanamycinresistenz-Kassette wurde das Plasmid pCP-IE1 verwendet, als *Primer* dienten *pp65-frt_fwd* und *pp65-frt_rev*. Nach erfolgreicher PCR wurde das erhaltene Produkt aufgereinigt, zur Eliminierung restlicher *Template*-DNA einem *Dpn I* - Verdau unterzogen, und schließlich nach elektrophoretischer Auftrennung aus einem 1,5%igen Agarosegel eluiert. Nach einer darauf folgenden Isopropanolfällung wurde die DNA in einem möglichst kleinen Volumen H₂O aufgenommen und die Konzentration im Photometer bestimmt.

2.6.7.1.2 Deletion der viralen Zielsequenz durch Integration der Kanamycinresistenz-Kassette

Das zu modifizierende BACmid wurde zunächst aus *E. coli* DH10B isoliert und anschließend über Elektroporation in kompetente *E. coli* EL250 überführt. Um eine unkontrollierte Expression der λ -Rekombinationsgene zu vermeiden, wurde *E. coli* EL250 immer bei 32°C kultiviert. Die Selektion BACmid-haltiger EL250-Klone erfolgte mit Chloramphenicol. Mit einer Einzelkolonie wurde eine 5 ml Übernachtskultur in LB-Medium mit Chloramphenicol (LB-Cm) angeimpft und am nächsten Tag 50 ml LB-Cm mit 1 ml dieser Übernachtskultur versetzt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 kultiviert. Danach wurde die Kultur aufgeteilt. 10 ml wurden in einen vorgewärmten Erlenmeyer-Kolben überführt und 15 min mit 200 Upm bei 42°C im Wasserbad geschüttelt. In diesem Schritt wurde das λ -Rekombinationssystem von *E. coli* EL250 induziert. Durch die Temperaturerhöhung auf 42°C wurde der temperatursensitive Repressor inaktiviert und dadurch die Expression der Rekombinationsgene *gam*, *exo* und *beta* ermöglicht. Ein Parallelansatz diente als Negativkontrolle und wurde während der 15-minütigen Inkubation auf 32°C belassen. Nach diesem Temperatur-Schritt wurden die beiden Ansätze identisch weiter behandelt. Die Zellen wurden durch Schütteln im Eiswasserbad schnell gekühlt und dann 10 bis 40 min auf Eis inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit

jeweils 1 ml eiskaltem H₂O wurde das Pellet nach dem letzten Zentrifugationsschritt in 100 µl eiskaltem H₂O resuspendiert.

50 µl dieser nun elektrokompenten *E. coli* - Zellen wurden anschließend mit 500 ng des im vorherigen Abschnitt beschriebenen PCR-Produkts transformiert, anschließend für 90 min in LB-Medium ohne Zusätze im Schüttler bei 32°C inkubiert und schließlich in geeigneten Verdünnungen auf LB-Platten mit Chloramphenicol und Kanamycin ausplattiert. Durch die Zugabe von Kanamycin wurden die Klone selektioniert, die die Kanamycinresistenz-Kassette durch erfolgreiche homologe Rekombination ins Genom integriert hatten.

2.6.7.2 Entfernung des Selektionsmarkers durch ortsspezifische Rekombination

Das über homologe Rekombination ins Virusgenom integrierte Kanamycinresistenz-Gen sollte anschließend wieder aus der Sequenz entfernt werden. Dies erfolgte durch ortsspezifische Rekombination an den das Resistenzgen flankierenden FRT-*sites* durch Induktion der *E. coli* EL250 - kodierten Flp-Rekombinase (*flpe*).

Mit einer Einzelkolonie eines aus 2.6.7.1 hervorgegangenen Klons wurde zunächst eine 5 ml Übernachtskultur in LB-Medium mit Chloramphenicol und Kanamycin (LB-Cm/Kana) angeimpft. Am nächsten Tag wurde 1 ml dieser Übernachtskultur auf eine neue 10 ml Kultur überimpft und diese bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 32°C kultiviert. Durch die darauf folgende Zugabe von 0,1% L (+) Arabinose wurde die Expression der *flpe* induziert. Nach einstündiger Inkubation bei 32°C wurde die Kultur in geeigneten Verdünnungen parallel auf LB-Cm/Kana und LB-Cm ausplattiert und bei 32°C über Nacht inkubiert. Die *flpe*-vermittelte Entfernung des Kanamycinresistenz-Gens resultierte in Kanamycin-sensitiven Bakterienklonen.

2.7 Immunologische Methoden

2.7.1 Chromfreisetzungstest (CFT)

Mit Hilfe des CFT können Spezifität und lytische Aktivität von zytotoxischen T-Zellen gemessen werden. Dazu werden Zielzellen mit radioaktivem Chrom (Na⁵¹CrO₄) markiert und mit Effektorzellen kokultiviert. Vitale Zellen nehmen ⁵¹Cr³⁺ auf, setzen es aber nur nach Zerstörung der Zellmembran wieder frei. Im Überstand messbare Chromaktivität ist demnach proportional zur Anzahl der lysierten Zellen und somit ein Maß für die Aktivität der T-Zellen.

Radioaktivität

Na⁵¹CrO₄ (Perkin Elmer, Zaventem, Belgien)

5×10^5 Zielzellen wurden pelletiert und nach vollständiger Entfernung des Überstands in 20 μl FKS resuspendiert. Sollten peptidbeladene Zellen als Zielzellen eingesetzt werden, wurde die Zellsuspension an dieser Stelle mit der entsprechenden Peptidverdünnung auf die gewünschte Peptidkonzentration (10^{-6}M bis 10^{-10}M) eingestellt. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 100 μCi ^{51}Cr für 90 min bei 37°C radioaktiv markiert. Nach dreimaligem Waschen zur Entfernung überschüssiger Radioaktivität wurden die Zellen in 10 ml RPMI 10% aufgenommen und 5×10^3 Zellen in 100 μl Medium pro *Well* einer 96-*Well*-Platte ausgesät. Die Effektorzellen wurden gezählt, gewaschen und je nach maximalem Effektor- zu Zielzellverhältnis (E/Z) mit RPMI 10% auf die entsprechende Zellzahl/ml eingestellt. Diese T-Zellsuspension wurde anschließend in 5 Schritten jeweils 1:3 verdünnt. Von jeder Verdünnung wurden 100 μl pro *Well* in Duplikaten zu den bereits vorgelegten Zielzellen gegeben. Anschließend wurden die Platten für 4 h (bei peptidbeladenen Zielzellen) bzw. 5,5 h (bei infizierten Zielzellen) bei 37°C inkubiert und nach Pelletierung der Zellen durch Zentrifugation mit 1300 Upm bei 4°C ohne Bremse aus jedem *Well* 100 μl Überstand entnommen und die ^{51}Cr -Aktivität in einem γ -Counter gemessen.

Als Kontrolle wurde zusätzlich für jede Zielzelle in Vierfachwerten die Maximal- und die Spontanlyse bestimmt. Während die Maximallyse direkt aus 100 μl Zielzellsuspension gemessen wurde, wurde die Spontanlyse aus 100 μl Zielzell-Überstand ohne Effektorzellen ermittelt. Mit den gemessenen Werten konnte anschließend für jede Zielzelle die durch eine bestimmte T-Zell-Spezifität hervorgerufene spezifische Lyse bestimmt werden.

Die Berechnung der spezifischen Lyse in % erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{gemessene } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{Spontanlyse}}{\text{Maximallyse} - \text{Spontanlyse}} \times 100 = \text{spezifische Lyse in \%}$$

Als gemessene ^{51}Cr -Freisetzung einer Probe wurde der Mittelwert aus 2 identischen Ansätzen verwendet. Während die Maximallyse die gesamte ^{51}Cr -Inkorporation durch die Zielzellen darstellte, zeigte die Spontanlyse die Zielzelllyse in Abwesenheit von Effektorzellen an. Sie betrug in der Regel weniger als 20% der Maximallyse. Die zur Bestimmung der spezifischen Lyse verwendeten Werte für Maximal- und Spontanlyse waren Mittelwerte aus jeweils 4 identischen Ansätzen.

2.7.2 Elispot (Enzyme Linked Immuno spot assay)

Mit Hilfe einer Elispot-Analyse können Zytokin-sezernierende Zellen quantifiziert werden. Werden zytotoxische T-Zellen durch ihr spezifisches Antigen stimuliert, sezernieren sie eine Reihe verschiedener Zytokine, unter anderem Interferon- γ (IFN- γ). In der vorliegenden Arbeit wurde der Elispot dazu verwendet, die Anzahl der durch einen bestimmten Stimulus zur IFN- γ -Produktion angeregten CTL zu bestimmen. Dazu wurden Effektor- und Zielzellen in einer mit einem spezifischen IFN- γ -Antikörper beschichteten 96-Well-Platte mit Nylonmembranboden kokultiviert. Das dabei durch die CTL sezernierte Zytokin konnte anschließend durch eine enzymatische Farbreaktion auf der Membran nachgewiesen werden. Die Anzahl der Spots entsprach dabei der Anzahl der IFN- γ -sezernierenden T-Zellen (Abbildung 5) (Taguchi *et al.*, 1990; Miyahira *et al.*, 1995).

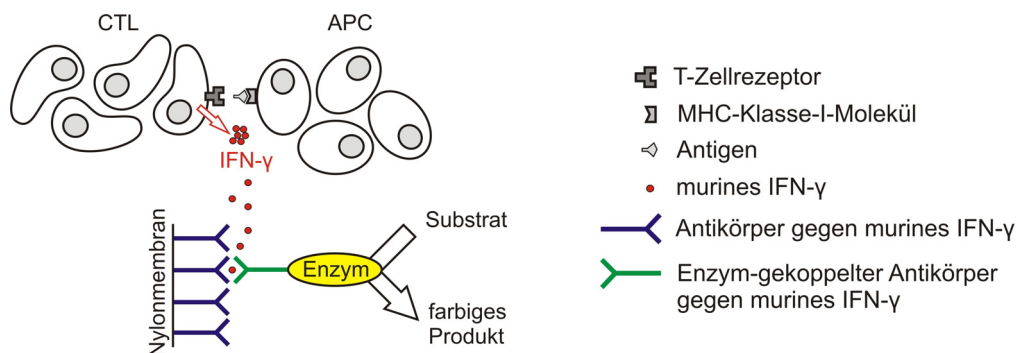


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen APC und CTL im IFN- γ -Elispot

Das durch die APC über ein entsprechendes MHC-Klasse-I-Molekül präsentierte Antigen wird von dem spezifischen T-Zellrezeptor der zytotoxischen T-Zelle erkannt, was zur Freisetzung von IFN- γ durch die T-Zelle führt. Dieses IFN- γ wird im Elispot durch einen auf eine Nylonmembran aufgetragenen Antikörper gebunden und anschließend erneut mit einem diesmal Enzym-gekoppelten Antikörper detektiert. Durch das an den Antikörper gebundene Enzym wird ein zugesetztes Substrat in ein farbiges Produkt umgewandelt.

2.7.2.1 Puffer

Waschpuffer

PBS + 0,25% (v/v) Tween-20

Puffer für Primärantikörper

Stammlösung A: 1,59 g Na_2CO_3 auf 100 ml H_2O

Stammlösung B: 2,93 g NaHCO_3 auf 100 ml H_2O

Direkt vor dem Versuch wurde je 1 ml beider Stammlösungen mit H_2O auf 10 ml aufgefüllt und der pH-Wert mit Stammlösung B auf 9,6 eingestellt.

Puffer für Sekundärantikörper

PBS + 1% (v/v) BSA-Lösung (23,3%; Ortho Diagnostic Systems, Neckargemünd)

50 mM Na-Acetatpuffer, pH 5,0

74 ml 0,2 M Essigsäure (11,55 ml Eisessig/l) + 176 ml 0,2 M NaAcetat (27,2 g Na-Acetat x 3 H₂O/l) auf 1 l H₂O

2.7.2.2 Antikörper

	Bezeichnung	Quelle	Endkonzentration
Primärantikörper	Ratte α -Maus-IFN- γ Klon RMMG-1	Biosource Europe, Solingen	10 μ g/ml
Sekundärantikörper	Biotin-gekoppelter Ratte α -Maus-IFN- γ Klon XMG 1.2	Becton Dickinson, Heidelberg	1 μ g/ml

Zunächst wurde die Membran einer 96-Well-Nylonmembran-Platte von Nunc (Wiesbaden) mit 50 μ l pro Well einer 10 μ g/ml Primärantikörperlösung beschichtet und die Platte anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde die Platte viermal jeweils für 15 min mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit 200 μ l RPMI 10% pro Well für mindestens eine Stunde blockiert. Die APCs wurden gezählt, gewaschen und auf eine Zellzahl von 2×10^6 /ml eingestellt. Auch die Effektorzellen wurden gezählt und gewaschen und auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. In der Regel wurden 200 oder 500 Effektorzellen pro Well verwendet.

Nach der Blockierung wurde die Platte ausgeschlagen und 50 μ l RPMI 10% pro Well vorgelegt. Danach wurden jeweils 50 μ l der APCs und der Effektorzellen zugegeben und für 18 bis 22 h im Brutschrank bei 37°C kokultiviert. Im Falle einer Peptidbeladung wurde das Peptid in der gewünschten Konzentration zugegeben und verblieb während der Inkubationszeit im Ansatz. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt.

Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen durch zehnmaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Anschließend wurde die Platte mit 50 μ l Sekundärantikörperlösung pro Well für 2 h bei RT inkubiert, danach fünf Mal gewaschen und mit 50 μ l pro Well eines HRP-Streptavidin-Konjugats von Dianova (Hamburg), das zuvor 1:250 in Waschpuffer mit 5% (v/v) FKS verdünnt worden war, erneut für 2 h bei RT inkubiert. Die Färbung der Spots erfolgte durch Zugabe des HRP-Substrats AEC. Dazu wurden 20 mg AEC in 2,5 ml DMF gelöst, mit 47,5 ml 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,0, gemischt, filtriert und mit 25 μ l 30%igem H₂O₂ versetzt. Pro Well wurden 50 μ l pipettiert. Die Farbreaktion wurde nach ca. 10 min durch Waschen mit H₂O gestoppt. Schließlich wurde die Membran von der Platte abgezogen und getrocknet. Die Auswertung erfolgte bei zehnfacher Vergrößerung in einem Binokular.

2.7.2.3 Fixierung der Zielzellen

Fixierungslösung

2% Paraformaldehyd-Stocklösung (in PBS)

Um die Antigenpräsentation von Zellen zu einem ganz bestimmten Zeitpunkt nach einer durchgeführten Behandlung untersuchen zu können, mussten diese Zellen vor dem Einsetzen in den Elispot fixiert werden. Die Fixierung wurde in diesem Fall mit 0,5% Paraformaldehyd (PFA) durchgeführt, welches Proteine miteinander vernetzt und somit die Oberflächenstruktur der behandelten Zellen weitgehend erhält.

Die benötigte Anzahl an Zellen wurde zunächst einmal mit 5 ml PBS gewaschen, anschließend in 150 µl PBS resuspendiert, gevortext und mit 50 µl der Fixierungslösung auf eine Endkonzentration von 0,5% PFA eingestellt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei RT wurden die fixierten Zellen mit 10 ml PBS, anschließend mit 10 ml RPMI 10% gewaschen und schließlich in einem geeigneten Volumen RPMI 10% aufgenommen und in den Elispot eingesetzt.

2.7.3 Entfernung von MHC-Klasse-I-gebundenen Peptiden von der Zelloberfläche durch Säurebehandlung („acid wash“)

Durch die Säurebehandlung von Zellen mit pH 3 werden MHC-Klasse-I-gebundene Peptide von der Oberfläche entfernt. Während die α -Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls mit der Zellmembran assoziiert bleibt, wird das β_2m durch die Säurebehandlung entfernt, was zur Freisetzung des zuvor an das MHC-Klasse-I-Molekül gebundenen Peptids führt (Sugawara *et al.*, 1987).

„acid wash“-Lösung

0,263 M Zitronensäure + 0,123 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ in H_2O (pH 2,9)

Die Behandlung von adhärenenten Zellen erfolgte in 10 cm Zellkulturschalen. Nach dem Entfernen des Mediums wurden die Zellen zunächst zweimal mit je 5 ml PBS gespült und dann mit 2 ml „acid wash“-Lösung für genau 1 min inkubiert. Während der Säurebehandlung wurde die Platte geschwenkt, um die „acid wash“-Lösung gleichmäßig zu verteilen. Anschließend wurde die „acid wash“-Lösung zügig dekantiert und zweimal mit je 10 ml MEM ohne Zusätze gespült. Nach der Behandlung wurden die Zellen entweder direkt weiter verarbeitet oder nach Zugabe des zuvor abgenommenen Mediums weiter inkubiert.

2.8 Methoden zum spezifischen Proteinnachweis

2.8.1 Verwendete Antikörper

2.8.1.1 Primärantikörper

Spezifität	Bezeichnung	Modifikation	Herkunft	Hersteller	Verdünnung		
					FACS	WB	IF
HLA-ABC	Klon W6/32	-	Maus	Dako (Hamburg)	1:15	-	-
HLA-A2	Klon BB7.2	FITC	Maus	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:30	-	-
F _C -Region des IgG _{2b} der Ratte	RG7/11.1 (Isotypkontrolle zu Klon BB7.2)	FITC	Maus	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:60	-	-
gB	Klon 27-287		Maus	(Utz <i>et al.</i> , 1989)	-	1:2	-
pp65	Klon 65-33	-	Maus	Dr. W. Britt, Birmingham	-	1:2000	uv
pp71	polyklonales Kaninchen- Antiserum gegen ein prokaryont exprimiertes Peptid aus pp71 (SA 1815)	-	Kaninchen	Eurogentec (Seraing, Belgien)	-	1:50	-
IE1	Klon 63-27	-	Maus	(Andreoni <i>et al.</i> , 1989)	-	-	uv
humaner IL-10- Rezeptor	Klon 37607.11	-	Maus	R&D Systems (Wiesbaden)	1:3	-	-

2.8.1.2 Sekundärantikörper

Sekundärantikörper werden zum Nachweis der spezifischen Bindung des Primärantikörpers an das Antigen eingesetzt. Sie erkennen spezifisch den Primärantikörper und sind mit einem detektierbaren Marker gekoppelt.

Spezifität	Modifikation	Herkunft	Hersteller	Verdünnung		
				FACS	WB	IF
Maus IgG, IgA und IgM	FITC	Kaninchen	Dako (Hamburg)	1:15	-	1:50
Maus IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA und IGM	HRP	Kaninchen		-	1:10000	-
Kaninchen Immunglobuline	HRP	Schwein		-	1:5000	-

2.8.2 Durchflusszytometrie / Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Bei der Durchflusszytometrie können Partikel in einem Flüssigkeitsstrom gezählt und gleichzeitig auf physikalische und molekulare Eigenschaften untersucht werden. Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern können Oberflächenmoleküle und intrazelluläre Proteine quantitativ nachgewiesen werden. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge gebundener Antikörper pro Zelle. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns usw.) der Zellen gewonnen.

FACS-Puffer

PBS

+ 0,4% (w/v) BSA; 0,03% (w/v) NaN_3 ; 10 mM EDTA; 20 mM HEPES (sterilfiltriert)

Zur FACS-Analyse wurden 1×10^5 bis 5×10^5 Zellen in FACS-Puffer gewaschen und anschließend für 30 min in 30 μl Primärantikörperlösung auf Eis inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde im Anschluss durch einmaliges Waschen mit FACS-Puffer entfernt. War der verwendete Primärantikörper nicht direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, erfolgte daraufhin eine erneut 30-minütige Inkubation auf Eis mit 30 μl einer entsprechenden Sekundärantikörperlösung. Nach einem abschließenden Waschschrift wurden die Zellen in 500 μl FACS-Puffer resuspendiert und am Durchflusszytometer analysiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der CellQuest Software.

2.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteingemischen nach Molekulargewicht wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) verwendet. Durch Anlagerung des anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Proteine zum einen denaturiert und zum anderen negativ geladen. Die ursprüngliche Eigenladung der Proteine wird hierbei durch das stark im Überschuss vorliegende SDS überdeckt, so dass die darauf folgende Auftrennung im elektrischen Feld entsprechend dem Molekulargewicht der Proteine erfolgt. Zudem wird das Wanderungsverhalten der Proteine durch den Gehalt an

Acrylamid d.h. den Vernetzungsgrad des Gels beeinflusst. Je höher der Acrylamid-Gehalt in einem Gel, umso langsamer können Proteine hindurch wandern.

Reagenzien

SDS-Laufpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer	125 mM Tris; 2% (v/v) β -Mercaptoethanol; 10% (v/v) Glycerin; 1 mM EDTA; 0,005% (w/v) Bromphenolblau; 2% (w/v) SDS
10% Trenngel	8,3 ml Gel 30 (Acrylamid:Bisacrylamid-Verhältnis 37:1); 10 ml H ₂ O; 6,25 ml Tris 1,5 M (pH 8,8); 250 μ l 10% (w/v) SDS; 250 μ l 10% (w/v) APS; 15 μ l TEMED
Sammelgel	2,1 ml Gel 30; 8,65 ml H ₂ O; 1,5 ml Tris 1,0 M (pH 6,8); 125 μ l 10% (w/v) SDS; 125 μ l 10% (w/v) APS; 15 μ l TEMED

Nach Polymerisation des Gels wurden die Proteinproben 1:2 mit SDS-Probenpuffer verdünnt, 10 min bei 95°C aufgekocht und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 50 Volt über Nacht. Zur Abschätzung der Proteingrößen wurde zusätzlich ein vorgefärbter Molekulargewichtsstandard (PeqGOLD Protein Marker IV) von PeqLab (Erlangen) mit auf das Gel aufgetragen.

Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine zur weiteren Analyse auf eine PVDF-Membran transferiert (Western Blot).

2.8.4 Western Blot

Der spezifische Nachweis von über SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen erfolgte über einen Western Blot. Hierzu wurden die Proteine aus dem Polyacrylamidgel zunächst durch „Elektroblotting“ (600 V, 400 mA, 1h 15 min) auf eine PolyScreen®Polyvinylidenfluorid (PVDF) - Membran von Perkin Elmer (Zaventem, Belgien) transferiert. PVDF-Membranen sind hydrophob und besitzen eine hohe Bindekapazität für Biomoleküle. Die verwendete Membran wies eine Porengröße von 0,45 μ m auf und war somit für Proteine >10 kDa geeignet.

Puffer

Western Blot Transferpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol
PBS-Tween	PBS + 0,1% (v/v) Tween-20

Die PVDF-Membran wurde auf Gelgröße zugeschnitten, für 5 min in Methanol p.a. äquiliibriert und anschließend in Transferpuffer geschwenkt. Dabei wurde darauf geachtet, die Membran nur am Rand vorsichtig mit einer Pinzette oder mit Handschuhen zu berühren. Sechs Lagen auf Gelgröße zugeschnittenes Whatman-Papier wurden ebenfalls in Transferpuffer äquiliibriert. Anschließend wurde die Blotapparatur unter Vermeidung von Blasenbildung wie folgt zusammen gebaut.

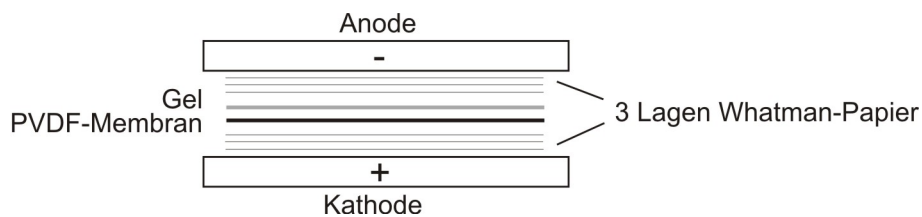


Abbildung 6: Aufbau einer Western Blot - Apparatur

Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte bei einer Stromstärke von 400 mA für 75 min. Durch die Verwendung eines vorgefärbten Molekulargewichtsstandards (PeqGOLD Protein Marker IV) von PeqLab (Erlangen) konnte die Vollständigkeit des Transfers auf die Membran kontrolliert werden.

Anschließend wurde die Membran für mindestens 2 h in 5% (w/v) Milchpulver in PBS-Tween inkubiert, um freie Membranstellen zu blockieren. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Die jeweilige Antikörperverdünnung wurde mit 5% (w/v) Milchpulver in PBS-Tween hergestellt. Anschließend wurde durch viermaliges Waschen mit PBS-Tween für jeweils 20 min überschüssiger Antikörper entfernt.

Die Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte unter Schütteln für 1 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween für jeweils 20 min wurde der Blot abschließend für 20 min mit PBS gewaschen und danach mit Hilfe des Chemilumineszenzreagenz ECL+™ von Amersham Biosciences (Freiburg) nach Herstellerangaben entwickelt.

Die Exposition gegen Biomax Röntgenfilme von Kodak, Sigma (Deisenhofen) erfolgte je nach Stärke des Signals für 2 sec bis 15 min.

2.8.5 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz-Analyse können in Zellen vorliegende Proteine über spezifische Antikörper mikroskopisch nachgewiesen werden.

Dazu wurden adhärente Zellen auf mit Aceton gereinigten Deckgläschen angezogen und je nach Bedarf behandelt. Zum gewünschten Zeitpunkt wurden die Zellen für 20 min bei RT (alternativ über Nacht bei 4°C) in 90% Aceton fixiert, anschließend viermal mit PBS + 0,1% Triton gewaschen und dann für 1 h bei 37°C mit einem für das nachzuweisende Protein spezifischen Primärantikörper inkubiert. Nach dem Entfernen überschüssigen Antikörpers durch viermaliges Waschen mit PBS + 0,1% Triton wurden die Zellen erneut für 1 h bei 37°C mit einem geeigneten, FITC-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Der FITC-gekoppelte Sekundärantikörper wurde zur Gegenfärbung mit Evans Blau in einer 1:50-Verdünnung versetzt. Abschließend wurde das Präparat erneut mehrmals gewaschen (zweimal mit PBS + 0,1% Triton, einmal mit H₂O), mit Eindeckmittel auf einen Objektträger überführt und schließlich im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

3 Ergebnisse

Alle in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Ergebnisse konnten in mindestens zwei unabhängigen Experimenten bestätigt werden und sind, soweit nicht anders angegeben, jeweils durch repräsentative Experimente dargestellt.

3.1 Messung der MHC-Klasse-I-restringierten Antigenpräsentation mit Hilfe muriner CTL-Klone

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit galten das Tegumentprotein pp65 (Laughlin-Taylor *et al.*, 1994) und das *major immediate early* Protein IE1 (Borysiewicz *et al.*, 1988a; Borysiewicz *et al.*, 1988b) als vorherrschende Zielstrukturen der HCMV-spezifischen CD8⁺-T-Zell-Antwort. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass diese entgegen der bisherigen Vorstellung gegen eine Vielzahl viraler Antigene gerichtet und HCMV somit mit einem breiten Spektrum an immunogenen Proteinen ausgestattet ist (Elkington *et al.*, 2003; Sylwester *et al.*, 2005). Prävalenz und Frequenz pp65- und IE1-spezifischer CTL bei seropositiven Spendern und der Nachweis einer schützenden Wirkung dieser CTL-Spezifitäten nach adoptivem Transfer (Cobbold *et al.*, 2005) identifizieren diese beiden viralen Proteine allerdings nach wie vor als wichtige Zielstrukturen der HCMV-spezifischen CTL-Antwort.

3.1.1 Messung der MHC-Klasse-I-restringierten Antigenpräsentation

Die Messung der pp65- bzw. IE1-spezifischen MHC-Klasse-I-Präsentation sollte mit Hilfe antigenspezifischer CD8⁺-T-Zell-Klone erfolgen. Die T-Zell-Rezeptor-vermittelte Erkennung eines bestimmten MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexes auf Oberfläche einer APC führt zur Aktivierung der zytotoxischen Effektorfunktionen (siehe 1.2.1), die in ihrem Ausmaß vom jeweiligen Antigenstimulus abhängen und daher als Maß für Qualität und Quantität der MHC-Klasse-I-Präsentation der Zielzelle herangezogen werden können. Durch geeignete Antigenstimulation können CTL-Aktivitäten wie die Freisetzung von Zytokinen oder die spezifische Lyse der entsprechenden Zielzellen *in vitro* induziert und anschließend gemessen werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in diesem Zusammenhang der IFN- γ -Elispot und der CFT herangezogen, um antigenstimulierte CTL-Reaktionen wie IFN- γ -Freisetzung oder Lyse der entsprechenden Zielzellen zu erfassen.

3.1.2 Herstellung pp65- und IE1-spezifischer CTL-Klone durch Peptidimmunisierung HLA-A2-transgener Mäuse

Die zur Untersuchung der pp65- bzw. IE1-spezifischen Antigenpräsentation benötigten CTL-Klone sollten ihr entsprechendes Antigen mit hoher Spezifität erkennen und diese Fähigkeit auch über einen längeren Kultivierungszeitraum erhalten können. Aus peripherem Blut isolierte humane T-Zellen weisen in Kultur meist nur eine Lebensdauer von wenigen Wochen auf und sind zudem in ihrer Qualität stark vom genetischen Hintergrund und der jeweiligen Konstitution des Spenders abhängig. Daher können aus verschiedenen Spendern oder zu verschiedenen Zeitpunkten aus demselben Spender isolierte T-Zellen qualitativ sehr unterschiedlich sein. Um dennoch geeignete CTL zu erhalten, wurden diese durch Peptidimmunisierung von HLA (*human leucocyte antigen*) - transgenen Mäusen generiert. Der Vorteil besteht darin, dass murine CTL-Linien über mehrere Jahre ohne Qualitätsverlust in Zellkultur gehalten werden können.

Da HLA-A*0201 (HLA-A2) mit einer Frequenz von 30% eines der häufigsten Allomorphe in der weißen Bevölkerung darstellt (Schipper *et al.*, 1997), sollte die Analyse der pp65- und IE1-spezifischen Antigenpräsentation vor diesem genetischen Hintergrund durchgeführt werden. Aus beiden Proteinen waren HLA-A2-restringierte CTL-Epitope bekannt. Zur Herstellung der pp65-spezifischen CTL wurde das immundominante pp65-Epitop von AS 495 bis AS 503 (pp65₄₉₅₋₅₀₃) (Wills *et al.*, 1996; Diamond *et al.*, 1997), zur Herstellung der IE1-spezifischen CTL das IE1-Epitop von AS 297 bis AS 305 (IE1₂₉₇₋₃₀₅) (Gallez-Hawkins *et al.*, 2003) verwendet. Obwohl in der Sequenz des IE1-Proteins bereits verschiedene, HLA-A2-restringierte CTL-Epitope identifiziert werden konnten (Retiere *et al.*, 2000; Frankenberg *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2002; Gallez-Hawkins *et al.*, 2003), konnte noch keines davon als in diesem Zusammenhang eindeutig immundominant beschrieben werden. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete IE1₂₉₇₋₃₀₅-Peptid konnte in HLA-A2-transgenen Mäusen nach Immunisierung mit der IE1-DNA-Sequenz eine spezifische CTL-Antwort induzieren. Auch in seropositiven Spendern wurden CTL der entsprechenden Spezifität detektiert (Gallez-Hawkins *et al.*, 2003).

3.1.2.1 Herstellung eines pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen CTL-Klons

Ein pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischer CTL-Klon (pp65-Klon 53) war in unserer Arbeitsgruppe bereits im Rahmen einer Promotion hergestellt worden und stand somit für die in der vorliegenden Arbeit geplanten Experimente zur Verfügung (Frankenberg, 2002).

Pp65-Klon 53 wurde durch Peptidimmunisierung von CD8x⁺A2 doppelt transgenen Mäusen (Abbildung 7 A, links) und anschließender Klonierung der daraus resultierenden CTL-Linie über *limiting dilution* hergestellt.

3.1.2.2 Herstellung eines IE1₂₉₇₋₃₀₅-spezifischen CTL-Klons

Zur Herstellung eines IE1₂₉₇₋₃₀₅-spezifischen CTL-Klons wurden CD8xCyA2K^b doppelt transgene Mäuse eingesetzt. Da diese Mäuse ein chimäres MHC-Klasse-I-Molekül aus α_1 - und α_2 -Domäne des humanen HLA-A2 und α_3 -Domäne des murinen K^b exprimierten, war die Präsentation des HLA-A2-restringierten IE1-Peptids und damit die erfolgreiche Stimulation einer spezifischen CTL-Antwort gewährleistet (Abbildung 7 A). Durch die zusätzliche Expression des humanen CD8-Moleküls wurde die für die geplanten Experimente erforderliche Interaktion zwischen der murinen T-Zelle und einer humanen APC ermöglicht (Abbildung 7 B).

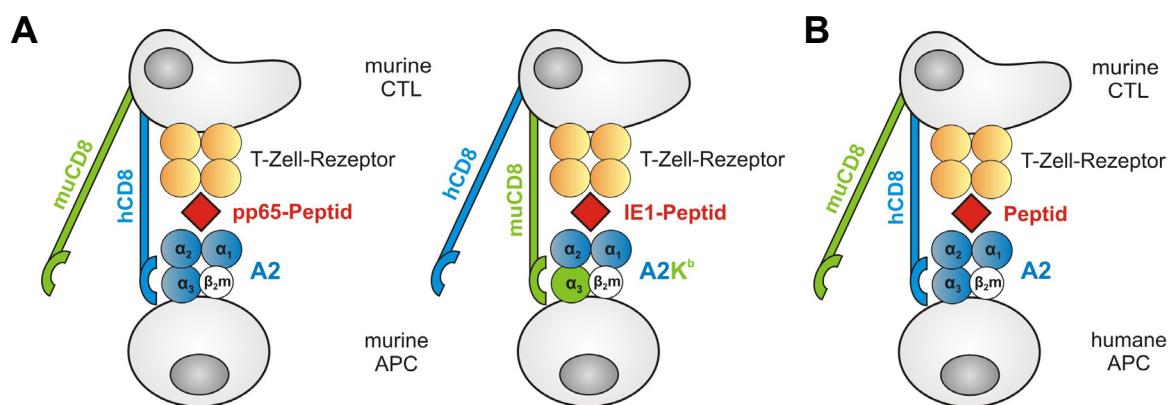


Abbildung 7: Herstellung peptidspezifischer muriner CTL-Klone

A: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen CTL und APC zur Stimulation der pp65- (links) bzw. der IE1- (rechts) spezifischen CTL-Antwort in CD8xA2 (links) bzw. CD8xCyA2K^b (rechts) doppelt transgenen Mäusen.

B: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen murinen CTL und humanen APCs. β_2m : β_2 -Mikroglobulin, hCD8: humanes CD8-Molekül, mCD8: murines CD8-Molekül, A2: humanes MHC-Klasse-I-Allomorph HLA-A2, A2K^b: Chimäres MHC-Klasse-I-Molekül (α_1 - und α_2 -Domäne des humanen MHC-Allomorphs HLA-A2, α_3 -Domäne des murinen MHC-Allomorphs H-2K^b).

Zehn Tage nach Immunisierung wurden die Mäuse getötet, die Milzen entnommen, homogenisiert und mit peptidbeladenen Stimulatorzellen kokultiviert. Durch wöchentliche Restimulation konnte so eine IE1₂₉₇₋₃₀₅-spezifische CTL-Linie generiert werden. Um die Qualität der erhaltenen CTL-Linie zu verbessern, wurde sie über die Methode des *limiting dilution* kloniert und der Klon mit der höchsten Sensitivität und Spezifität für weitere Experimente verwendet. Dieser IE1₂₉₇₋₃₀₅-spezifische CTL-Klon wurde im Folgenden als IE1-Klon 12 bezeichnet.

3.1.3 Charakterisierung der CTL-Klone pp65-Klon 53 und IE1-Klon 12

Bevor die CTL-Klone zur Messung der pp65- bzw. IE1-spezifischen MHC-Klasse-I-Präsentation herangezogen werden konnten, musste zunächst ihre Qualität überprüft werden. In einem ersten Schritt sollte die jeweilige Antigenspezifität getestet werden. Als Zielzellen dienten dabei TAP-defiziente T2-Zellen, welche in einer Konzentration von 10^{-7} M mit pp65- bzw. IE1-Peptid exogen beladen worden waren. Aufgrund der TAP-Defizienz kann diese Zelllinie nur wenig zelleigenes Peptid auf ihrer Oberfläche präsentieren und daher sehr effizient mit synthetischem Peptid exogen beladen werden. Sowohl die dadurch induzierte IFN- γ -Freisetzung wie auch die finale Lyse der Zielzellen wurden anschließend im IFN- γ -Elispot bzw. CFT gemessen.

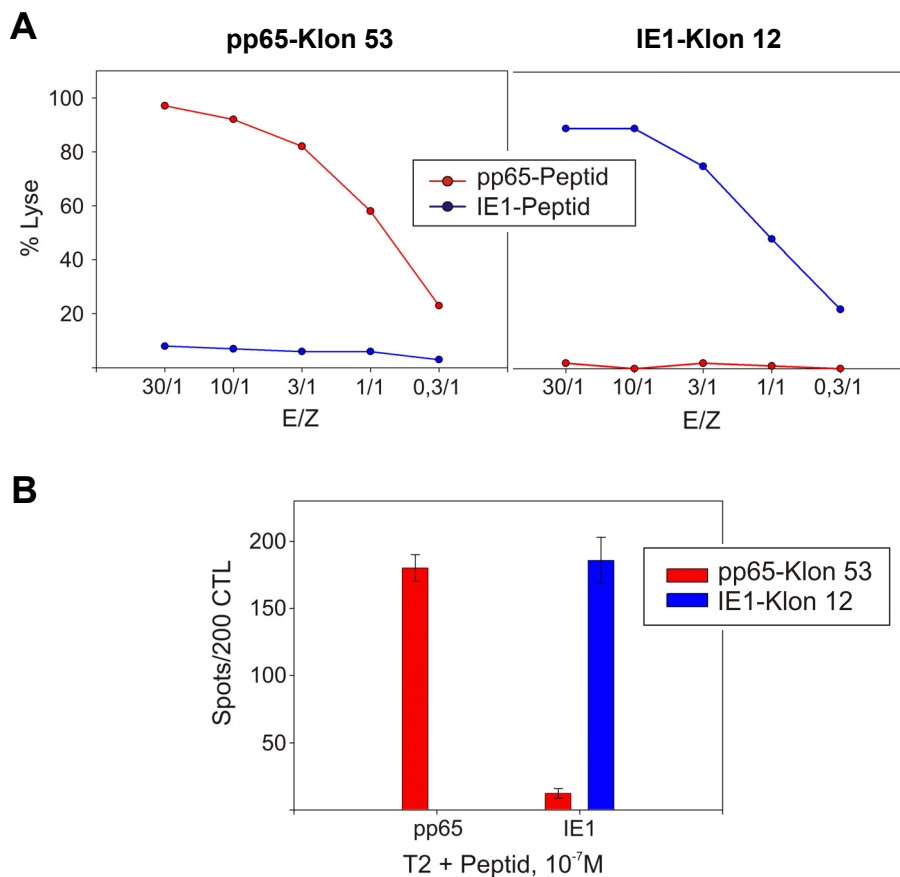


Abbildung 8: Antigenspezifität von pp65-Klon 53 und IE1-Klon 12

TAP-defiziente T2-Zellen wurden in einer Konzentration von 10^{-7} M mit pp65- bzw. IE1-Peptid beladen und als Zielzellen in einen 4 Stunden CFT **(A)** bzw. IFN- γ -Elispot **(B)** eingesetzt. Als Effektorzellen dienten pp65-Klon 53 und IE1-Klon 12 in den angegebenen E/Z **(A)** bzw. mit einer Zellzahl von 200 CTL/Well **(B)**. In **(A)** sind Mittelwerte von Doppelwerten, in **(B)** Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten angegeben.

Während beide CTL-Klone mit dem entsprechenden Peptid beladene T2-Zellen sehr effizient lysieren konnten, zeigten sie gegenüber Zellen, die mit dem jeweils anderen Peptid beladenen worden waren, keine lytische Aktivität. Die CTL-Klone wurden in verschiedenen Effektor- zu Zielzellverhältnissen (E/Z) eingesetzt. Erwartungsgemäß nahm die Lyseaktivität mit sinkender CTL-Konzentration ab (Abbildung 8 A).

Diese im CFT beobachtete Antigenspezifität der beiden CTL-Klone konnte anschließend auch im IFN- γ -Elispot bestätigt werden (Abbildung 8 B). Hier musste allerdings beobachtet werden, dass die pp65-spezifischen CTL eine schwache Erkennung IE1-beladener Zielzellen zeigten. Im Gegensatz dazu konnte keinerlei Erkennung pp65-beladener Zellen durch die IE1-spezifischen CTL beobachtet werden. Während IE1-Klon 12 also hochspezifisch nur sein eigenes Antigen zu erkennen schien, zeigte pp65-Klon 53 eine geringe Hintergrund-Erkennung von Fremdanigen.

In einem weiteren Schritt sollte die Antigensensitivität der beiden CTL-Klone überprüft werden. Dazu wurden T2-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der beiden Peptide beladen und als Zielzellen in einen CFT bzw. IFN- γ -Elispot eingesetzt. Bei einem E/Z von 30 zu 1 wurden mit dem entsprechenden Peptid beladene Zielzellen bei Peptidkonzentrationen von 10^{-6} M und 10^{-7} M von pp65-Klon 53 und IE1-Klon 12 zu 90 bis 100% lysiert. Bei einer Peptidkonzentration von 10^{-8} M zeigten beide CTL-Klone eine Lyse von etwa 70%. Erst bei einer Peptidkonzentration von 10^{-9} M zeigte sich ein Unterschied in der Sensitivität der beiden CTL-Klone. Während pp65-Klon 53 10^{-9} M mit pp65-Peptid beladene T2 noch zu 20% lysieren konnte, zeigte IE1-Klon 12 bei dieser Peptidkonzentration bereits keine Lyse mehr. Bei einer Peptidkonzentration von 10^{-10} M war bei beiden CTL-Klonen keine spezifische Lyse mehr zu beobachten (Abbildung 9 A). Ein ähnliches Ergebnis lieferte der IFN- γ -Elispot. Bei Peptidkonzentrationen von 10^{-6} M und 10^{-7} M wurden bei beiden CTL-Klonen 100% der in den Elispot eingesetzten CTL zur IFN- γ -Sekretion aktiviert. Im Unterschied zu dem zuvor beschriebenen CFT zeigte sich hier der Sensitivitätsunterschied zwischen den beiden CTL-Klonen allerdings schon bei einer Peptidkonzentration von 10^{-8} M. Während pp65-Klon 53 T2-Zellen bei dieser Peptidkonzentration noch immer zu 100% erkennen konnte, zeigte IE1-Klon 12 hier bereits eine Reduktion der Zielzell-Erkennung auf etwa 60%. Während IE1-Klon 12 bei einer Peptidkonzentration von 10^{-9} M quasi keine IFN- γ -Sekretion mehr zeigte, konnte pp65-Klon 53 von dieser Peptidkonzentration noch zu etwa 50% stimuliert werden. Bei einer Peptidkonzentration von 10^{-10} M konnte aber auch pp65-Klon 53 die Zielzellen nur noch in einem Ausmaß erkennen, das der in Abbildung 8 B dargestellten Hintergrund-Erkennung entsprach (Abbildung 9 B).

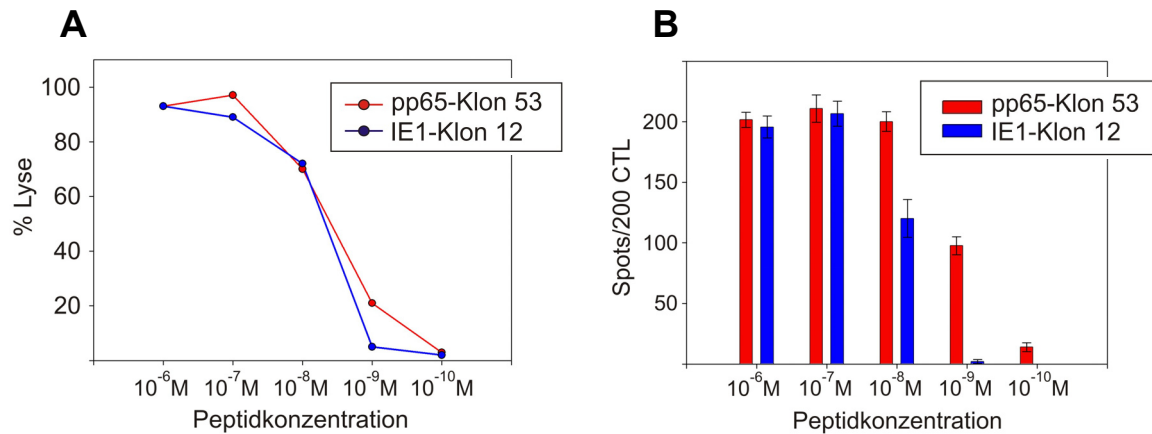


Abbildung 9: Antigen sensitivität von pp65-Klon 53 und IE1-Klon 12

A: Mit verschiedenen Konzentrationen an pp65- bzw. IE1-Peptid beladene T2-Zellen wurden als Zielzellen in einen 4 Stunden CFT eingesetzt. Als Effektorzellen wurden pp65-Klon 53 bzw. IE1-Klon 12 in einem E/Z von 30:1 verwendet.

B: Mit verschiedenen Konzentrationen an pp65- bzw. IE1-Peptid beladene T2-Zellen wurden als Zielzellen in einen IFN- γ -Elispot eingesetzt. Als Effektorzellen dienten pp65-Klon 53 bzw. IE1-Klon 12 mit einer Zellzahl von 200 CTL//Well. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von Sechsfach-Werten.

Zur Überprüfung der HLA-Restriktion der beiden CTL-Klone, wurden HLA-A2-positive (HLA-A2+) und HLA-A2-negative (HLA-A2-) HFF mit einer *moi* von 5 mit dem HCMV-Stamm Δ US2-11 infiziert und 24 Stunden nach Infektion als Zielzellen in einen IFN- γ -Elispot eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten identische Ansätze, welche allerdings statt mit Virusüberstand mit einem entsprechenden Volumen Medium behandelt worden waren (*mock*). Während die HCMV-infizierten HLA-A2+ Zellen sowohl von pp65- als auch von IE1-spezifischen CTL gut erkannt wurden, konnte keinerlei Erkennung von HLA-A2- HFF beobachtet werden. Die beiden CTL-Klone zeigten somit strikte HLA-A2-Restriktion. Während IE1-Klon 12 weder durch *mock*-infizierte HLA-A2+ noch durch *mock*-infizierte HLA-A2- Zellen zu einer IFN- γ -Produktion stimuliert werden konnte, zeigte pp65-Klon 53 erneut eine geringe Hintergrund-Erkennung *mock*-infizierter Zellen. Diese Hintergrund-Erkennung konnte allerdings nur bei HLA-A2-positiven und nicht bei HLA-A2-negativen HFF beobachtet werden (Abbildung 10).

Die CTL-Klone pp65-Klon 53 und IE1-Klon 12 zeigten also eine hohe Spezifität für ihr entsprechendes Antigen und darüber hinaus strikte HLA-A2-Restriktion. In ihrer Antigen sensitivität unterschieden sie sich allerdings um etwa einen Faktor 10 voneinander: Während pp65-Klon 53 peptidbeladene Zielzellen bis zu einer Konzentration von 10^{-9} M erkennen konnte, war eine Erkennung durch IE1-Klon 12 nur bei einer Peptidkonzentration von mindestens 10^{-8} M gewährleistet.

In allen folgenden Experimenten wurden zur Detektion der pp65- bzw. IE1-spezifischen Antigenpräsentation diese beiden CTL-Klone verwendet.

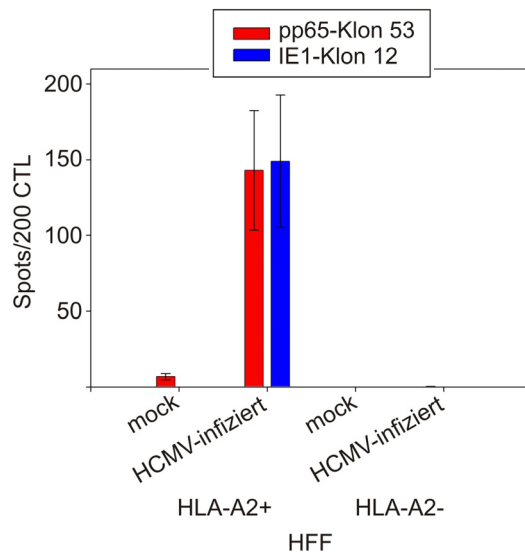


Abbildung 10: Elispot-Analyse zur Austestung der HLA-A2-Restriktion von pp65-Klon 53 und IE1-Klon 12

HLA-A2+ und HLA-A2- HFF wurden mit einer *moi* von 5 mit dem HCMV-Stamm Δ US2-11 infiziert und 24h nach Infektion (*post infection*, p.i.) als Zielzellen in einen IFN- γ -Elispot eingesetzt. Als Effektorzellen dienten pp65-Klon 53 und IE1-Klon 12 mit einer Zellzahl von 200 CTL/Well. Als Negativkontrollen wurden *mock*-infizierte HFF verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

3.2 Einfluss der US2-US11-Region auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression infizierter Fibroblasten

Die Infektion mit HCMV bewirkt auf den infizierten Zellen eine deutliche Reduktion der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression (Barnes & Grundy, 1992). Da eine Deletion der viralen US2-US11-Region die beobachtete Reduktion verhindern kann, scheint diese durch die in dieser Region kodierten Immunevasine gpUS2, gpUS3, gpUS6 und gpUS11 vermittelt zu werden (Jones *et al.*, 1995; Falk *et al.*, 2002). Bevor mit der im Rahmen der vorliegenden Arbeit geplanten Untersuchung des Einflusses dieser virusvermittelten Immunevasion auf die pp65- bzw. IE1-spezifische MHC-Klasse-I-Präsentation begonnen werden konnte, sollte zunächst geprüft werden, ob die US2-US11-vermittelte Reduktion der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression auch in dem hier untersuchten System zu beobachten war. Dazu wurde die Virusmutante Δ US2-11 verwendet, welche aufgrund einer Deletion im Genom die Immunevasine gpUS2-gpUS11 nicht mehr exprimieren konnte (Falk *et al.*, 2002). Als Vergleichskontrolle wurde der Stamm pHB15 ((Hobom *et al.*, 2000); pHB15 heißt hier Ad169-BAC) verwendet. pHB15 enthält wie der Laborstamm Ad169 den kompletten US2-US11-Bereich, basiert aber auf dem gleichen genetischen Hintergrund wie Δ US2-11. pHB15 und Δ US2-11 wurden beide durch BAC-Mutagenese des HCMV-BACs pHB5 (Borst *et al.*, 1999) hergestellt. Die US2-US11-Region von pHB15 und Δ US2-11 ist in Abbildung 11 schematisch dargestellt.

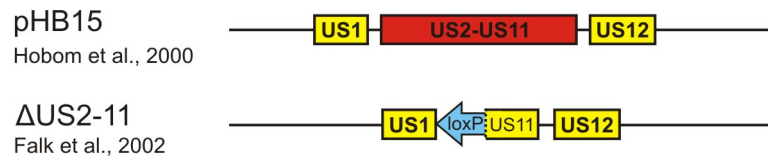


Abbildung 11: Schematische Darstellung der genomischen Region US2-US11 der HCMV-Stämme pHB15 und ΔUS2-11

Das Genom des Stammes pHB15 kodiert die komplette Immunevasionsregion von US2 bis US11 (in rot dargestellt). Im Stamm ΔUS2-11 ist dieser Bereich deletiert. Der blaue Pfeil markiert die Position einer Erkennungssequenz für die Cre-Rekombinase (loxP-site).

HFF wurden mit einer *moi* von 10 mit pHB15 bzw. ΔUS2-11 infiziert und anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion im FACS auf ihre MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression überprüft. Übereinstimmend mit bereits publizierten Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen zeigten die mit pHB15 infizierten Zellen im Verlauf der Infektion eine starke Reduktion der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression, wohingegen nach ΔUS2-11-Infektion keine Veränderung der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression zu beobachten war. In Übereinstimmung mit den Daten von Yamashita und Kollegen (Yamashita *et al.*, 1993) zeigten pHB15-infizierte HFF 24 Stunden nach Infektion keine Reduktion, sondern vielmehr eine leichte Erhöhung ihrer MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression. Erst ab 48 Stunden nach Infektion konnte in diesem Zusammenhang eine deutliche Reduktion beobachtet werden (Abbildung 12 A).

Da jedes der US2-US11-kodierten Immunevasine eine spezielle HLA-Allel-Spezifität aufweist (Wei & Cresswell, 1992; Machold *et al.*, 1997; Gewurz *et al.*, 2001), konnte die beobachtete Reduktion der Gesamt-MHC-Klasse-I-Expression eventuell nicht den Verlauf der im Rahmen der vorliegenden Arbeit entscheidenden HLA-A2-Expression widerspiegeln. Daher sollte zusätzlich der Einfluss von US2-US11 auf die HLA-A2-Oberflächenexpression infizierter HFF untersucht werden. Dazu wurden HLA-A2-positive HFF mit einer *moi* von 2 mit den HCMV-Stämmen Ad169 bzw. ΔUS2-11 infiziert und die Zellen erneut zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion im FACS auf ihre HLA-A2-Oberflächenexpression überprüft. Da HLA-A2 nur einen Teil der Gesamt-MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression der Zellen darstellt, war bereits die Basal-Expression dieses Allomorphs auf *mock*-infizierten Zellen sehr niedrig. Somit konnte die im Verlauf der Infektion auftretende zusätzliche Reduktion nur sehr schwer verfolgt werden. Aufgrund dessen wurde in Abbildung 12 B nur die HLA-A2-Oberflächenexpression infizierter Zellen 24 Stunden und 96 Stunden nach Infektion im Vergleich zu *mock*-infizierten Zellen dargestellt. Wie die Gesamt-MHC-Klasse-I-Expression zeigte auch die HLA-A2-Oberflächenexpression nach Infektion mit dem US2-US11-positiven Stamm Ad169 im Verlauf der Infektion eine deutliche Reduktion, die allerdings erneut

24 Stunden nach Infektion noch nicht zu erkennen war. Dahingegen war in Δ US2-11-infizierten Fibroblasten im Verlauf der Infektion keine Reduktion, sondern vielmehr eine Erhöhung der HLA-A2-Oberflächenexpression zu beobachten. Dieses Phänomen war bereits aus der Literatur bekannt (Falk *et al.*, 2002) und ist vermutlich auf im Zuge der Virusinfektion freigesetzte Typ I - Interferone zurückzuführen (Steinmassl & Hamprecht, 1994).

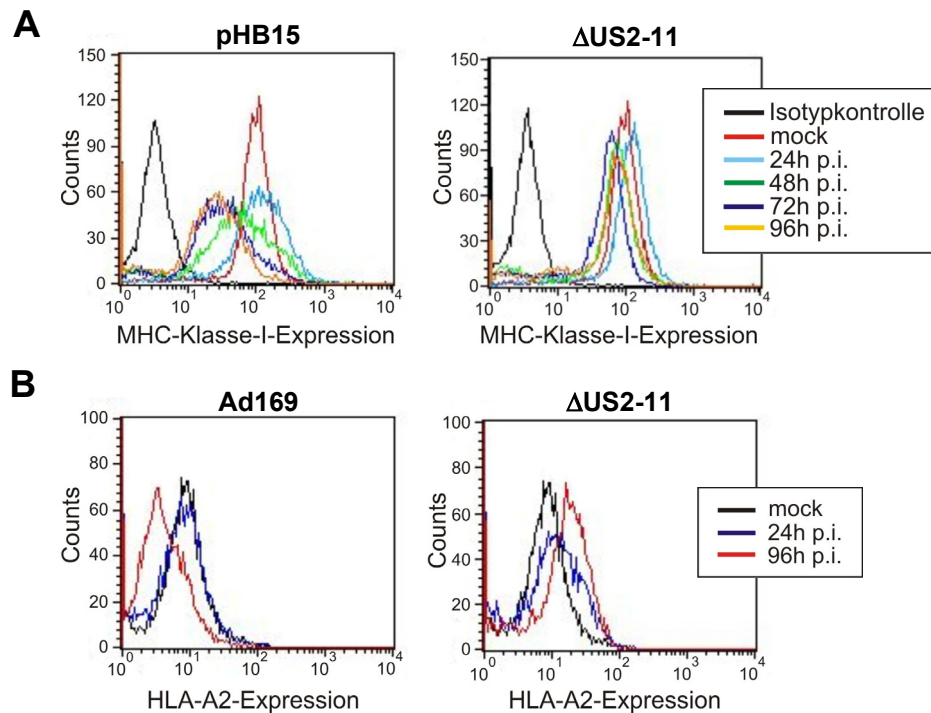


Abbildung 12: FACS-Analyse der US2-US11-vermittelten Reduktion der MHC-Klasse-I-Präsentation infizierter HFF

A: HFF wurden mit einer *moi* von 10 mit pHB15 bzw. Δ US2-11 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten p.i. wurde die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression mit Hilfe eines MHC-Klasse-I-spezifischen Antikörpers (W6/32) im FACS gemessen. *Mock*-infizierte HFF dienten als Kontrolle. Die Detektion des gebundenen Erstantikörpers erfolgte über einen FITC-gekoppelten Zweitantikörper. Die unspezifische Bindung des Zweitantikörpers ist durch die Isotypkontrolle dargestellt.

B: HLA-A2-positive HFF wurden mit einer *moi* von 2 mit den Stämmen Ad169 bzw. Δ US2-11 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten p.i. wurde die HLA-A2-Oberflächenexpression gemessen. Dazu wurde ein HLA-A2-spezifischer, FITC-gekoppelter Antikörper (BB7.2) verwendet. Als Isotypkontrolle diente ein ebenfalls FITC-gekoppelter Antikörper des gleichen Isotyps. *Mock*-infizierte Zellen dienen als Kontrolle.

3.3 Einfluss der US2-US11-Region auf die MHC-Klasse-I-restringierte pp65-Präsentation infizierter Fibroblasten

3.3.1 Herstellung einer pp65-Deletionsmutante *via* BAC-Mutagenese

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der US2-US11-Region von HCMV auf die MHC-Klasse-I-Präsentation von pp65 näher analysiert werden. Zu Kontrollzwecken sollte hierbei zunächst eine Mutante des Virus hergestellt werden, in der das Gen für pp65 deletiert war. Dabei war darauf zu achten, dass die Expression benachbarter, essentieller Gene des Virus nicht beeinträchtigt wurde. Das flankierend zu pp65 kodierte Tegumentprotein pp71 spielt für die Regulation der viralen *immediate early* - Genexpression und der Virusreplikation eine wichtige Rolle (Liu & Stinski, 1992; Homer *et al.*, 1999; Bresnahan & Shenk, 2000; Hofmann *et al.*, 2002; Cantrell & Bresnahan, 2005). Da die Gene für pp65 (UL83) und pp71 (UL82) von einer bizistronischen RNA translatiert werden (Ruger *et al.*, 1987), bestand die Gefahr, dass bei einer Deletion der gesamten pp65-Sequenz die Expression von pp71 reduziert und somit die Replikationsfähigkeit des resultierenden Virusstammes beeinträchtigt wurde. Um eine Deletion von regulatorischen Elementen der pp71-Transkription zu vermeiden, sollten daher die ersten 151 bp der UL83-Region in der Sequenz des rekombinanten Δ pp65-Virus erhalten bleiben. Die Herstellung der pp65-Deletionsmutante erfolgte wie bereits unter 2.6.7 beschrieben über BAC-Mutagenese in dem Bakterienstamm *E. coli* EL250 (Lee *et al.*, 2001). Als Ausgangs-BACmid wurde dazu pHB15 verwendet (Hobom *et al.*, 2000).

3.3.1.1 Austausch des pp65-Gens durch einen Selektionsmarker mittels homologer Rekombination

Im ersten Schritt der Zwei-Schritt-Rekombination zur Herstellung der pp65-Deletionsmutante sollte die gewünschte pp65-Sequenz durch einen Selektionsmarker ersetzt werden. Dazu wurde ein Kanamycinresistenz-Gen (Kana^R) verwendet. Die genaue Vorgehensweise ist unter 2.6.7.1 beschrieben.

Zunächst wurde das von FRT-sites flankierte Kana^R (FRT- Kana^R -FRT) mit Hilfe der *Primer* *pp65-frt_fwd* und *pp65-frt_rev* aus dem Plasmid pCP-IE1 über PCR-Programm 1 amplifiziert. Die verwendeten *Primer* wiesen dabei an ihren 5'-Enden jeweils etwa 50 Basen lange Überhänge auf (Abbildung 13 A). Diese Überhänge waren zu den DNA-Sequenzen homolog, welche den zu deletierenden Bereich im HCMV-Genom unmittelbar flankierten. Die Enden des dabei resultierenden PCR-Produkts waren somit zu den an die zu entfernende Zielsequenz zu beiden Seiten angrenzenden 50 bp homolog (Abbildung 13 A).

Das PCR-Produkt wurde in *E. coli* EL250 transformiert und das λ -Rekombinationssystem durch eine Temperaturerhöhung auf 42°C induziert. Durch die daraus resultierende

homologe Rekombination zwischen PCR-Produkt und pHB15-BAC wurde das pp65-Gen punktgenau an der gewünschten Position aus der viralen Sequenz entfernt und durch die FRT-Kana^R-FRT-Kassette ersetzt (Abbildung 13 B). UL83-negative BAC-Klone wurden anschließend mit Kanamycin selektioniert. Die resultierenden BAC-Klone wurden als BAC_Δpp65_Kana^R bezeichnet. Einer dieser Klone wurde über DNA-Sequenzierung auf den korrekten Einbau der FRT-Kana^R-FRT-Kassette hin verifiziert und für die weiteren Arbeiten verwendet.

3.3.1.2 Entfernung des Selektionsmarkers mittels ortsspezifischer Rekombination

Zur Entfernung von Kana^R aus dem BAC_Δpp65_Kana^R wurde im nächsten Schritt, wie unter 2.6.7.2 beschrieben, ortsspezifische Rekombination mittels Flp-Rekombination eingesetzt (Abbildung 13 B). Durch die Induktion der Flp-Rekombinase wurde das Resistenzgen zusammen mit einer der beiden FRT-sites aus der Sequenz von BAC_Δpp65_Kana^R entfernt. Zurück blieben die ersten 150 bp und das Stop-Codon des pp65-Gens. Diese Reste des pp65-Gens wurden von einer FRT-site unterbrochen. Um die Resistenz der erhaltenen Bakterienklone zu überprüfen, wurden sie parallel auf Kanamycin-haltigem und Kanamycin-freiem Medium ausgestrichen. Alle getesteten Klone zeigten Sensitivität gegenüber Kanamycin. Ein über DNA-Sequenzierung des entsprechenden Bereichs überprüfter BAC_Δpp65-Klon wurde anschließend zur Rekonstitution des rekombinanten Virus verwendet.

3.3.1.3 Rekonstitution des rekombinanten Δpp65-Virus

Zur Rekonstitution des mit Δpp65 bezeichneten Virus wurden Fibroblasten mit pHB15_Δpp65 transfiziert. Dabei sollte im gleichen Schritt der von loxP-sites flankierte BAC-Vektor über ortsspezifische Rekombination aus dem rekombinanten Virus entfernt werden. Hierzu wurde das die Cre-Rekombinase exprimierende Plasmid pBRep-cre kotransfiziert. Als Kontrolle wurde auch das Ausgangs-BAC pHB15 in einem Parallelansatz mit pBRep-cre in HFF kotransfiziert. Die Zellen wurden nach Transfektion so lange passagiert, bis ausreichend virushaltige Plaques im Zellrasen zu sehen waren. Der virushaltige Kulturüberstand wurde bei -80°C konserviert und anschließend für weitere Untersuchungen verwendet.

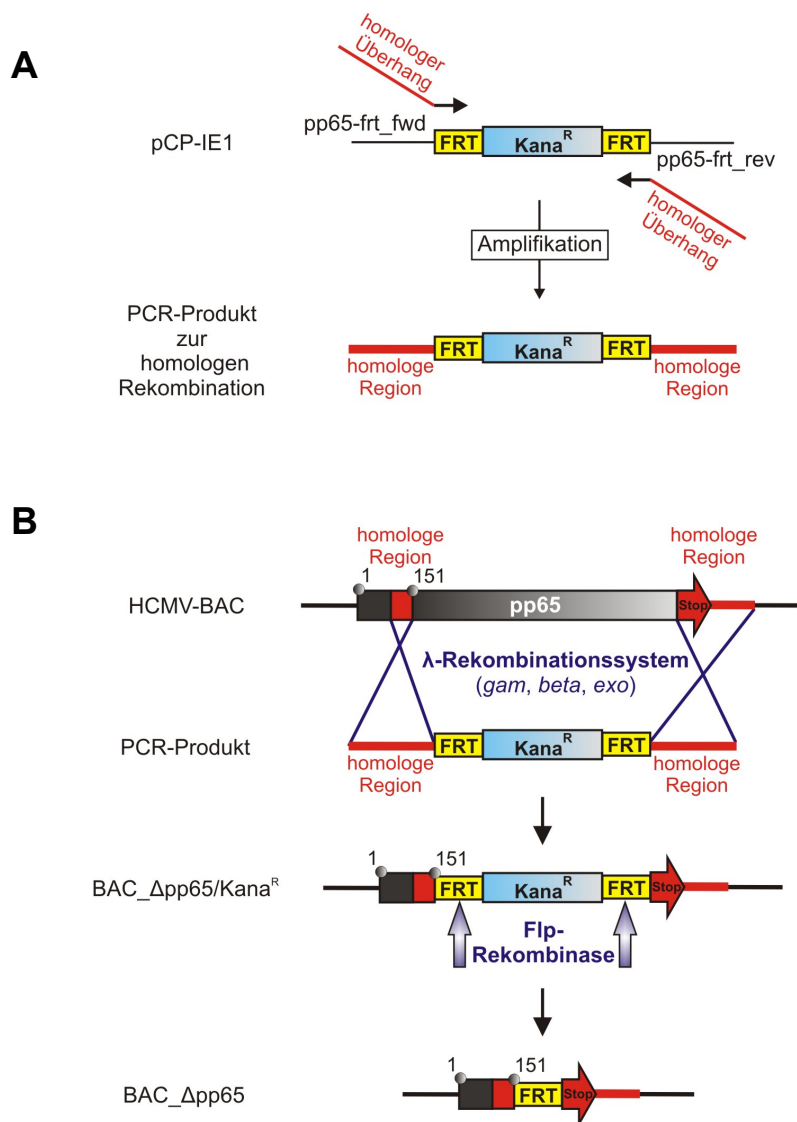


Abbildung 13: Herstellung der pp65-Deletionsmutante via BAC-Mutagenese

A: Amplifikation von FRT-Kana^R-FRT aus dem Plasmid pCP-IE1 mit Hilfe der Primer *pp65-frt_fwd* und *pp65-frt_rev*. Die schwarzen Pfeile stellen die an die *Template*-DNA bindenden Bereiche, die roten Anhänge die an den 5'-Enden vorliegenden homologen Überhänge der Primer dar. Das aus der Amplifikation resultierende PCR-Produkt FRT-Kana^R-FRT weist an seinen Enden entsprechende homologe Regionen auf.

B: Zwei-Schritt-Rekombination zur Deletion des gewünschten Bereichs des pp65-Gens im HCMV-BAC pHB15. Durch homologe Rekombination zwischen den Regionen im HCMV-BAC, welche die zu deletierende pp65-Sequenz flankieren und den dazu homologen Enden des PCR-Produkts wurde die FRT-Kana^R-FRT-Kassette in die pp65-Region integriert. Dieses durch das λ-Rekombinationssystem ermöglichte *crossing over* zwischen den rot dargestellten homologen Regionen ist durch die blauen, sich überkreuzenden Linien dargestellt. Das Kana^R wurde anschließend aus dem resultierenden BAC_Δpp65/Kana^R über ortsspezifische Rekombination an den flankierenden FRT-sites wieder entfernt. Die Angriffspunkte der katalysierenden Flp-Rekombinase sind mit blauen Pfeilen im Schema markiert.

Die ersten 151 Nukleotide am N-Terminus sowie das Stop-Codon des pp65-Gens wurden nicht deletiert. Die Positionen der Nukleotide 1 und 151 sind als graue Punkte, das Stop-Codon als roter Pfeil im Schema dargestellt.

3.3.2 Charakterisierung der rekonstituierten pp65-Deletionsmutante Δ pp65

Um die pp65-Deletionsmutante Δ pp65 für weitere Experimente nutzen zu können, musste sichergestellt werden, dass kein pp65-Protein mehr exprimiert wurde. Hierzu wurden verschiedene Verfahren eingesetzt. Als Kontrolle diente das aus dem Ausgangs-BAC pHB15 rekonstituierte Virus, welches eine normale pp65-Expression aufweisen sollte.

3.3.2.1 Genomanalyse von Δ pp65

Der Virusstamm Δ pp65 wurde zunächst mittels PCR näher charakterisiert. Hierzu wurden unterschiedliche *Primer*-Kombinationen eingesetzt. Alle hier aufgeführten PCR-Reaktionen wurden mit dem PCR-Programm 2 durchgeführt. Als Kontrolle wurden diese Untersuchungen parallel auch mit dem eine unveränderte pp65-Region aufweisenden Virus pHB15 durchgeführt. Aus Zellkulturüberstand infizierter Zellen wurde Virus-DNA isoliert und als *Template* in die PCR-Reaktionen eingesetzt. Zunächst wurde überprüft, ob das pp65-Gen in der Δ pp65-Mutante tatsächlich deletiert war. Zu diesem Zweck wurde der entsprechende Bereich amplifiziert. Es wurden *Primer* verwendet, von denen der eine (*SR8*) stromaufwärts des pp65-Gens und der andere (*pp65_rev*) im pp65-Gen selbst binden konnte. Eine Amplifikation war in diesem Fall also nur möglich, wenn das pp65-Gen noch im Genom enthalten war (Abbildung 14 A). Während die Amplifikation der pHB15-DNA eine deutliche Bande in erwarteter Größe zeigte, konnte mit dieser *Primer*-Kombination von der Δ pp65-DNA kein PCR-Produkt erhalten werden (Abbildung 14 B, links). Damit konnte gezeigt werden, dass die pp65-Region im Genom der Δ pp65-Mutante nicht mehr vorhanden war.

Um die genaue DNA-Sequenz der Δ pp65-Mutante in diesem Bereich untersuchen zu können, sollte anschließend mit Hilfe der stromaufwärts bzw. stromabwärts des pp65-Gens bindenden *Primer* *SR8* und *BamHIRreverse2* die ehemalige pp65-Region amplifiziert und das entstandene PCR-Produkt sequenziert werden (Abbildung 14 A). Während unter Verwendung der pHB15-DNA als *Template* der gesamte pp65-Bereich amplifiziert wurde, lieferte die Δ pp65-DNA ein deutlich kürzeres Produkt in erwarteter Größe (Abbildung 14 B, rechts). Durch Sequenzierung dieses PCR-Produkts mit dem *Primer* *SR8* konnte die Deletion des pp65-Gens bestätigt werden.

Zusätzlich wurde überprüft, ob der BAC-Vektor bei der Rekonstitution der beiden Viren pHB15 und Δ pp65 erfolgreich aus dem Virusgenom entfernt worden war. Die PCR-*Primer* wurden so gewählt, dass einer der beiden im BAC-Vektor selbst, der andere stromaufwärts davon binden konnte. Während die Kontroll-Reaktionen mit den entsprechenden BACmiden Produkte erwarteter Größe lieferten, konnte mit dieser *Primer*-Kombination von den

zugehörigen Viren keine Amplifikation erreicht werden. Der BAC-Vektor war also erfolgreich aus der Sequenz der Viren pHB15 und Δ pp65 entfernt worden (Daten nicht gezeigt).

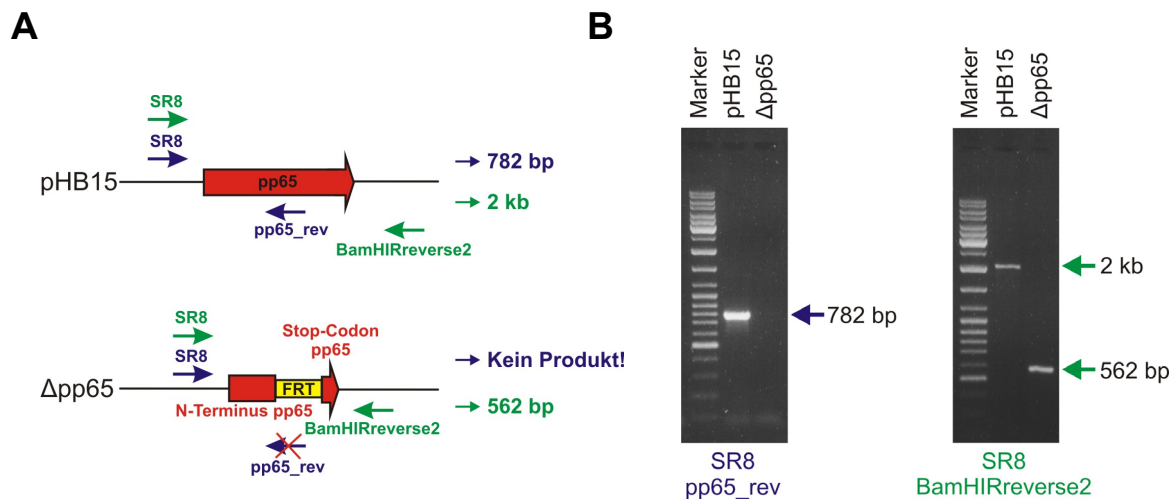


Abbildung 14: Genomanalyse der Viren pHB15 und Δ pp65

Aus Kulturüberständen pHB15- bzw. Δ pp65-infizierter HFF wurde Virus-DNA isoliert und als *Template* zur Amplifikation mit den angegebenen *Primer*-Kombinationen eingesetzt.

A: Schematische Darstellung der pp65-Region im Genom der Viren pHB15 und Δ pp65. Die Bindungsstellen der verschiedenen *Primer* sind mit Pfeilen markiert. Die Größe des entstehenden PCR-Produkts ist für jedes Virus und jede *Primer*-Kombination rechts im Schema angegeben.

B: Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte. Als Molekulargewichtsmarker wurde ein „1-kb-DNA-Ladder“ verwendet. Die Pfeile markieren die Lage der jeweiligen Produkte im Gel. Die zugehörigen Größen sind angegeben.

3.3.2.2 Untersuchung der Viruspartikel von Δ pp65

Das Fehlen des Tegumentproteins pp65 in den Viruspartikeln von Δ pp65 sollte im Western Blot mit Hilfe eines pp65-spezifischen Antikörpers bestätigt werden. Als Kontrolle wurden in einem Parallel-Ansatz auch die Viruspartikel des pHB15-Virus auf ihren pp65-Gehalt untersucht. Dazu wurden HFF mit einer *moi* zwischen 5 und 10 mit pHB15 bzw. Δ pp65 infiziert. Sechs Tage nach Infektion wurden die virushaltigen Überstände geerntet, die Viruspartikel durch Ultrazentrifugation pelletiert und das Pellet anschließend in PBS resuspendiert. Nach der Auftrennung über SDS-PAGE wurde der pp65-Gehalt der Viruspartikel im Western Blot untersucht. Dazu wurde der pp65-spezifische monoklonale Antikörper 65-33 verwendet. Zur Normierung der aufgetragenen Menge an Viruspartikeln wurde zusätzlich mit einem für das Glykoprotein B (gB) spezifischen Antikörper (27-287) gefärbt (Abbildung 15 A).

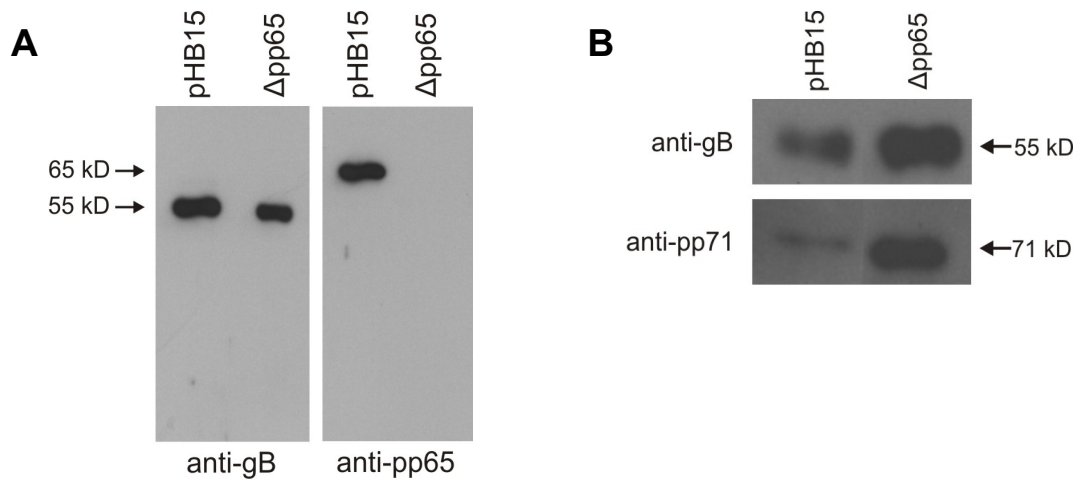


Abbildung 15: Analyse der Viruspartikel von pHB15 und Δpp65 mittels Western Blot

Viruspartikel der Stämme pHB15 bzw. Δpp65 wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western Blot mit Hilfe des Chemilumineszenzreagenzes ECLTM (Amersham Biosciences, Freiburg) auf ihren pp65- und pp71-Gehalt untersucht. Die Menge an jeweils aufgetragenen Viruspartikeln wurde durch eine zusätzliche Färbung mit dem gB-spezifischen Antikörper 27-287 kontrolliert.

A: Der pp65-Gehalt der Viruspartikel wurde durch Färbung mit dem pp65-spezifischen Antikörper 65-33 bestimmt (rechts). Dargestellt ist außerdem die Kontrollfärbung auf gB (links). Die Belichtungszeit der dargestellten Filme betrug 2 Sekunden.

B: Die Bestimmung des pp71-Gehalts der Viruspartikel erfolgte durch Färbung mit polyklonalem Kaninchen-Antiserum (unten). Dargestellt ist außerdem die Kontrollfärbung auf gB (oben). Die Belichtungszeit der dargestellten Filme betrug 30 Sekunden.

Die Größen der detektierten Proteine sind an den Markierungspfeilen angegeben.

Mit der gB-Färbung konnte gezeigt werden, dass vergleichbare Mengen an Viruspartikeln in den Western Blot eingesetzt worden waren. Während in den Viruspartikeln von pHB15 bereits nach einer Belichtungszeit von zwei Sekunden große Mengen an pp65-Protein detektiert werden konnten, zeigten die Partikel der pp65-Deletionsmutante Δpp65 auch nach einer Verlängerung der Belichtungszeit auf bis zu zehn Minuten keinerlei pp65-Signal.

Um ausschließen zu können, dass durch die Deletion des pp65-Gens die Expression des in der Transkriptionseinheit stromabwärts angeordneten Transaktivators pp71 beeinträchtigt worden war, sollten die Viruspartikel von pHB15 und Δpp65 auch auf ihren pp71-Gehalt hin untersucht werden. Erneut wurden die aufgereinigten Partikel über SDS-PAGE aufgetrennt und einer Western Blot - Analyse unterzogen. Da kein monoklonaler Antikörper gegen pp71 zur Verfügung stand, wurde zur Färbung dieses Tegumentproteins ein polyklonales Kaninchen-Antiserum verwendet. Da dieses Antiserum mit anderen viralen Antigenen kreuzreagierte, wiesen die Membranen nach der Färbung zahlreiche Hintergrund-Banden auf. Aus diesem Grund wurden die entsprechenden Banden hier gesondert vom Rest der Membran dargestellt. Als Kontrolle für die Menge an aufgetragenen Partikeln diente erneut

eine Färbung auf gB (Abbildung 15 B). Es konnte gezeigt werden, dass der pp71-Gehalt im Viruspartikel der Δ pp65-Mutante nicht geringer war als im Viruspartikel von pHB15.

3.3.2.3 Untersuchung Δ pp65-infizierter Fibroblasten

Die fehlende Expression von pp65 in Δ pp65-infizierten Zellen im Verlauf der Infektion sollte mittels indirekter Immunfluoreszenz infizierter Fibroblasten bestätigt werden. Dazu wurden HFF mit einer *moi* von 5 mit Δ pp65 infiziert und 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Infektion mit dem pp65-spezifischen Antikörper 65-33 auf ihren pp65-Gehalt hin untersucht. In einem Parallelansatz wurde auch der pp65-Gehalt pHB15-infizierter Zellen überprüft. Zur Kontrolle der Infektionsstärke wurden parallele Ansätze mit einem Antikörper gegen das *immediate early* Protein IE1 angefärbt. Zu allen Analysezeitpunkten zeigten dabei jeweils über 90% der Zellen eine spezifische Kernfluoreszenz (Daten nicht gezeigt).

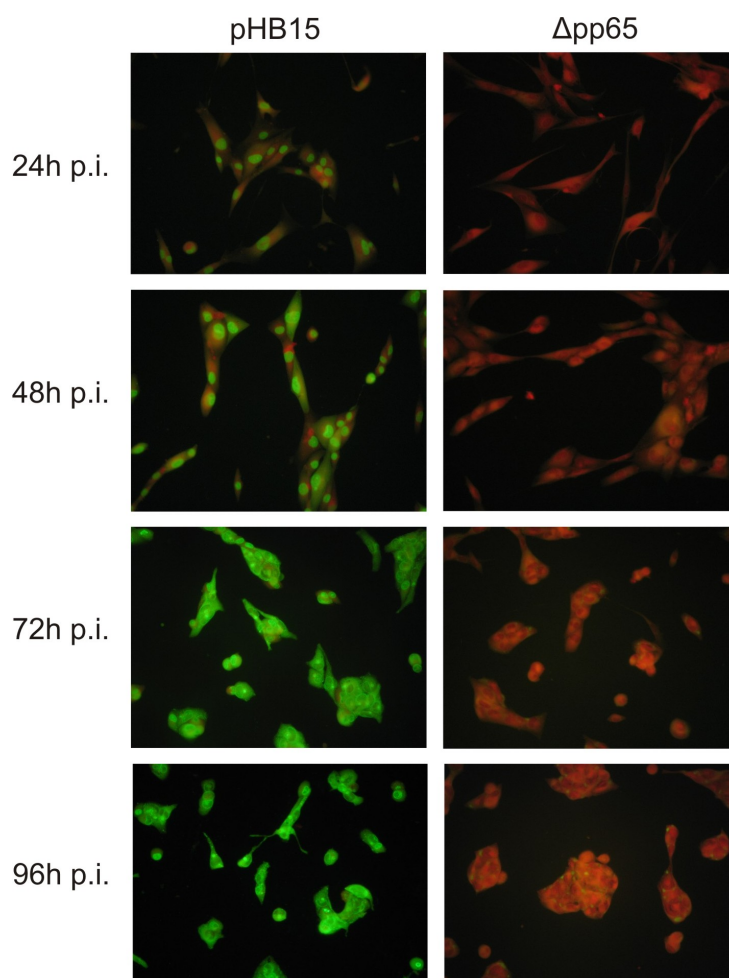


Abbildung 16: Analyse des pp65-Gehalts pHB15- bzw. Δ pp65-infizierter HFF mittels indirekter Immunfluoreszenz

HFF wurden mit einer *moi* von 5 mit pHB15 bzw. Δ pp65 infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten p.i. mit einem pp65-spezifischen Antikörper (65-33) gefärbt. Zur Detektion wurde ein FITC-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet. Die Gegenfärbung mit „Evans Blau“ markiert dabei pp65-negative Zellen rot. Während pp65 24h p.i. noch ausschließlich im Kern nachzuweisen war, konnte im Verlauf der Infektion auch eine Färbung des Zytoplasmas beobachtet werden.

Während in pHB15-infizierten HFF zu allen untersuchten Zeitpunkten nach Infektion pp65 nachgewiesen werden konnte, war in Δ pp65-infizierten Zellen zu keinem der untersuchten Zeitpunkte pp65 zu detektieren (Abbildung 16). Erfahrungsgemäß war dabei das 24 Stunden nach Infektion noch rein nukleär vorliegende pp65 im Verlauf der Infektion zunehmend auch im Zytoplasma nachzuweisen (Britt & Vugler, 1987; Landini *et al.*, 1987).

3.3.2.4 Nachweis der fehlenden Erkennung Δ pp65-infizierter Zellen durch pp65-spezifische CTL

Da gezeigt werden konnte, dass Δ pp65-infizierte Zellen wie gewünscht kein pp65 mehr exprimierten, sollte abschließend überprüft werden, ob durch das Fehlen des pp65-Proteins auch die Erkennung der infizierten Zellen durch pp65-spezifische CTL verhindert werden konnte. Zu diesem Zweck wurden HFF mit pHB15 bzw. Δ pp65 infiziert und 24 Stunden nach Infektion als Stimulatorzellen in einen IFN- γ -Elispot eingesetzt. *Mock*-infizierte Zellen dienten dabei als Negativkontrolle. Als Effektorzellen wurden pp65-Klon 53 mit einer Zellzahl von 200 CTL/*Well* eingesetzt (Abbildung 17). Während pHB15-infizierte Zellen pp65-Klon 53 zu einer deutlichen IFN- γ -Antwort stimulieren konnten, wurden Δ pp65-infizierte HFF von pp65-Klon 53 nur mit dem auch bei *mock*-infizierten Zellen beobachteten Hintergrund erkannt.

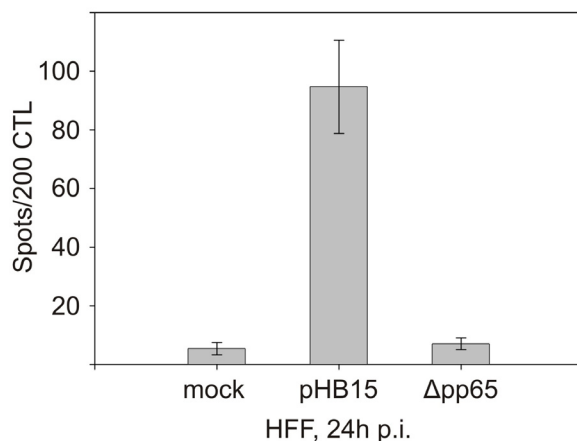


Abbildung 17: IFN- γ -Elispot zum Nachweis der fehlenden pp65-Präsentation Δ pp65-infizierter HFF

HFF wurden mit einer *moi* von 5 mit pHB15 bzw. Δ pp65 infiziert und 24h p.i. als Stimulatorzellen in einen IFN- γ -Elispot eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten *mock*-infizierte Zellen. Pp65-Klon 53 wurden mit einer Zellzahl von 200 CTL/*Well* als Effektorzellen verwendet. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus Triplikaten errechnet.

Die pp65-Deletionsmutante Δ pp65 zeigte demnach weder in ihren Partikeln noch nach Infektion in permissiv infizierten Fibroblasten nachweisbare Mengen an pp65. Die Infektion führte darüber hinaus nicht zu einer messbaren Stimulation von pp65-spezifischen CTL. Außerdem konnte aufgrund der unbeeinflussten pp71-Expression eine Beeinträchtigung der Replikation im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp-Virus ausgeschlossen werden. Somit stellte die erhaltene Δ pp65-Mutante ein geeignetes Werkzeug zur Herstellung pp65-defizienter, permissiv infizierter Zielzellen dar.

3.3.3 Einfluss der US2-US11-Region auf die pp65-Präsentation im Verlauf der Infektion

Zu Beginn der Arbeit war nichts über eine eventuelle Beeinflussung der MHC-Klasse-I-restringierten pp65-Präsentation durch US2-US11 bekannt. Als Hauptbestandteil von Virionen und subviralen DBs (Varnum *et al.*, 2004) wird das Tegumentprotein im Zuge der Viruspenetration in großen Mengen in die infizierten Zellen eingebracht und kann direkt ohne *de novo* Proteinsynthese in den MHC-Klasse-I-Präsentationsweg eingeschleust und an der Zelloberfläche präsentiert werden (Laughlin-Taylor *et al.*, 1994; Riddell *et al.*, 1991a; Pepperl *et al.*, 2000; Pepperl-Klindworth *et al.*, 2003). Außerdem konnte gezeigt werden, dass HCMV-infizierte Fibroblasten bis zu 66 Stunden nach Infektion durch pp65-spezifische CTL erkannt und effizient lysiert werden können (Laughlin-Taylor *et al.*, 1994). Um zu überprüfen, ob die pp65-Präsentation infizierter Fibroblasten tatsächlich durch US2-US11 unbeeinträchtigt stattfinden konnte, wurden HFF mit einer *moi* von 5 mit pHB15 bzw. Δ US2-11 infiziert und 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Infektion mit pp65-Klon 53 im IFN- γ -Elispot auf ihre pp65-Präsentation überprüft. Als Negativkontrolle dienten mit Δ pp65 infizierte HFF (Abbildung 18).

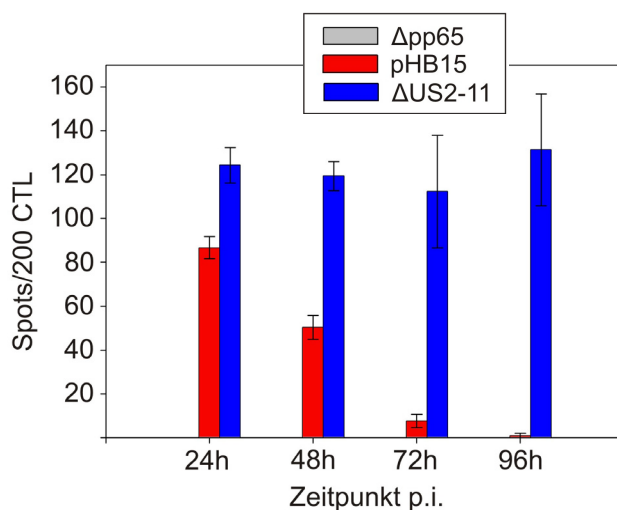


Abbildung 18: IFN- γ -Elispot zur Analyse des Einflusses von US2-US11 auf die pp65-Präsentation im Verlauf der Infektion

HLA-A2-positive HFF wurden mit einer *moi* von 5 mit Δ pp65, pHB15 oder Δ US2-11 infiziert und 24h, 48h, 72h und 96h p.i. als Zielzellen in einen IFN- γ -Elispot eingesetzt. Als Effektorzellen dienten pp65-Klon 53 mit einer Zellzahl von 200 CTL/Well. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus Triplikaten errechnet.

Während Δ US2-11-infizierte Zellen zu jedem der untersuchten Zeitpunkte nach Infektion mit gleich bleibender Effizienz erkannt wurden, nahm die Erkennung der pHB15-infizierten HFF im Verlauf der Infektion schrittweise ab. Dies erfolgte in Übereinstimmung mit der in der FACS-Analyse beobachteten Abnahme der MHC-Klasse-I-Präsentation im Verlauf der pHB15-Infektion (siehe Abbildung 12 A, links). Bereits 48 Stunden nach Infektion konnte nur noch etwa die Hälfte der 24 Stunden nach Infektion messbaren Erkennung beobachtet werden. Weitere 48 Stunden später wurde quasi keine pp65-spezifische Erkennung der pHB15-infizierten Zellen mehr beobachtet. Δ pp65-infizierte HFF wurden zu keinem der untersuchten Zeitpunkte durch pp65-Klon 53 erkannt. Um sicher zu gehen, dass der mit

pHB15 beobachtete Effekt wirklich auf die Expression der Immunevasine, und nicht auf eine Stamm-spezifische Besonderheit von pHB15 zurückzuführen war, wurde das gleiche Experiment mit Ad169 statt pHB15 wiederholt. Genau wie pHB15-infizierte HFF zeigten auch Zellen, die mit dem Laborstamm Ad169 infiziert waren, eine stufenartige Reduktion der MHC-Klasse-I-restringierten pp65-Präsentation im Verlauf der Infektion (Daten nicht gezeigt). Die Gegenwart der US2-US11-Region führte also im Verlauf der Infektion zu einer Abnahme der pp65-Präsentation, welche durch die Deletion dieser Genomregion kompensiert werden konnte. Die US2-US11-vermittelte Immunevasion konnte die pp65-Präsentation also nicht vollständig verhindern, sondern nur schrittweise reduzieren, wodurch zwischen 24 und 72 Stunden nach Infektion eine „US2-US11-unabhängige pp65-Präsentation“ auf den Zellen zu detektieren war. Erst 96 Stunden nach Infektion schien die pp65-Präsentation vollständig durch US2-US11 unterdrückt zu werden.

3.3.3.1 Untersuchung der „US2-US11-unabhängigen pp65-Präsentation“

Die Dissoziationsgeschwindigkeit von MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexen ist abhängig von der Affinität des beteiligten Peptids zum präsentierenden MHC-Allomorph und bestimmt maßgeblich die Stabilität des Komplexes an der Zelloberfläche. Die in zahlreichen bio- bzw. immunochemischen Studien untersuchte Halbwertszeit dieser Komplexe variiert je nach experimentellen Bedingungen zwischen 30 Minuten und 200 Stunden, wobei funktionelle Detektionsmethoden auf durchschnittliche Halbwertszeiten von 5 bis 10 Stunden schließen lassen ((Eberl *et al.*, 1996) und darin angegebene Referenzen). Dabei wird die Immunogenität eines bestimmten Peptids maßgeblich durch die Stabilität des Komplexes mit MHC-Klasse-I bestimmt (Chen *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2004; Kambayashi *et al.*, 2004). Obwohl das pp65₄₉₅₋₅₀₃-Peptid eine hohe Bindekapazität für das HLA-A2-Allomorph aufweist (Wills *et al.*, 1996; Diamond *et al.*, 1997), ist bisher nichts über die Stabilität der aus dem pp65-Peptid und HLA-A2 gebildeten Komplexe an der Zelloberfläche bekannt. Da das Tegumentprotein pp65 bereits vor dem Beginn der viralen Proteinexpression effizient in den MHC-Klasse-I-Weg eingeschleust werden kann, ist die Möglichkeit gegeben, dass peptidbeladene MHC-Klasse-I-Komplexe an die Zelloberfläche gelangen, bevor die US-kodierten Immunevasionsgene exprimiert werden. Es sollte geklärt werden, ob die 48 und 72 Stunden nach Infektion beobachtete Präsentation des pp65-Peptids durch langlebige MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe auf der Zelloberfläche begründet war, oder ob trotz Immunevasion peptidbeladene Komplexe an die Oberfläche gelangen konnten. Dazu musste ein experimenteller Ansatz gefunden werden, der nicht nur die Messung der Gesamt-pp65-Präsentation zu einem gegebenen Zeitpunkt ermöglichte, sondern auch Aussagen über die Kinetik des Transports von MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexen in infizierten Zellen erlaubte. Zu definierten Zeitpunkten nach Infektion wurden hierzu die MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe

durch Säurebehandlung ("acid wash") von der Oberfläche der infizierten Zellen entfernt. Die Regeneration der MHC-Klasse-I-vermittelten Präsentation von pp65 in dem darauf folgenden Zeitraum von 24 Stunden wurde anschließend mittels IFN- γ -Elispot-Analyse gemessen.

3.3.3.1.1 Entfernung der MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe von der Oberfläche infizierter Fibroblasten

MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe an der Zelloberfläche setzen sich aus einer mit der Zellmembran assoziierten α -Kette, dem nicht kovalent angelagerten β_2m und dem an die Peptidbindungsstelle der α -Kette gebundenen Peptid zusammen. Durch eine Behandlung mit pH 3 („acid wash“) wird das β_2m aus dem Komplex entfernt und dadurch das zuvor gebundene Peptid freigesetzt. Zurück bleibt die nach wie vor mit der Membran assoziierte α -Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls (Sugawara *et al.*, 1987; Storkus *et al.*, 1993) (Abbildung 19 A). Während die Detektion der intakten MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe durch den MHC-Klasse-I-spezifischen Antikörper W6/32 erfolgen kann, ist eine Bindung dieses konformationsabhängigen Antikörpers an die nach „acid wash“ allein stehenden α -Ketten nicht mehr möglich (Malik *et al.*, 1999) (Abbildung 19 B).

Bevor eine solche „acid wash“-Behandlung für weitere Experimente eingesetzt werden konnte, musste zunächst geklärt werden, ob sie in unserem System tatsächlich zu einer Entfernung der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression der Zielzellen führte und die Zellen darüber hinaus nach der Behandlung noch in der Lage waren, ihre MHC-Klasse-I-restringierte Oberflächenexpression zu regenerieren. Zu diesem Zweck wurden HFF mit einer *moi* von 5 mit Δ US2-11 infiziert und 24 Stunden nach Infektion einer „acid wash“-Behandlung unterzogen. Anschließend wurde die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression der behandelten Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach „acid wash“ mit Hilfe des konformationsabhängigen MHC-Klasse-I-spezifischen Antikörpers W6/32 im FACS gemessen. Die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression *mock*-behandelter Zellen 24 Stunden nach Infektion diente als Positivkontrolle (Abbildung 19 C). Durch die „acid wash“-Behandlung konnte die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression der Zielzellen um über 90% reduziert werden. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass die Zellen innerhalb der auf die „acid wash“-Behandlung folgenden 24 Stunden ihre MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression wieder auf das Niveau *mock*-behandelter Zellen regenerieren konnten. Bereits eine Stunde nach Behandlung war die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression der Zellen wieder auf 40% des Ausgangswerts angestiegen, weitere fünf Stunden später auf 80%. Die „acid wash“-Behandlung konnte demnach die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression infizierter HFF um 90% reduzieren und ließ darüber hinaus innerhalb der folgenden 24 Stunden eine vollständige Regeneration dieser Oberflächenexpression zu.

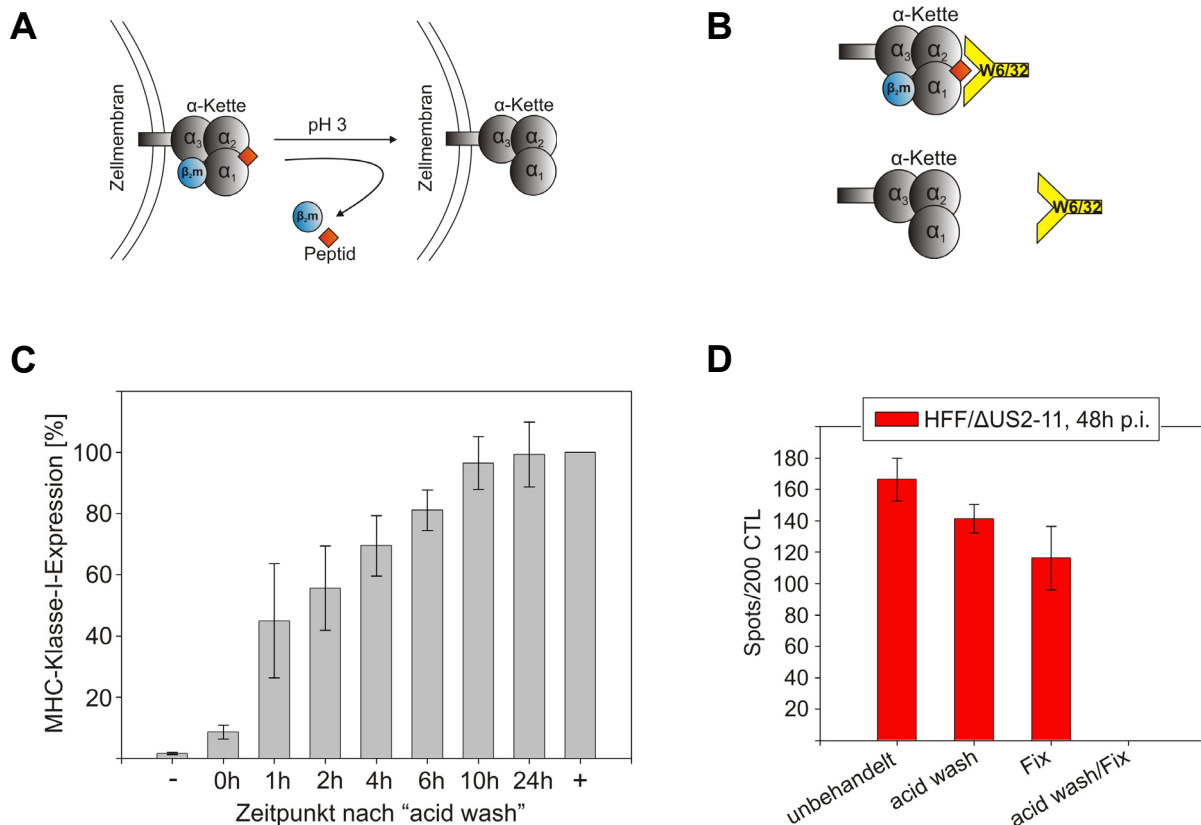


Abbildung 19: Entfernung der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression durch „acid wash“-Behandlung

A: Schematische Darstellung der Dissoziation von MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexen durch pH 3 während der „acid wash“-Behandlung.

B: Schematische Darstellung der Bindung des konformationsabhängigen MHC-Klasse-I-spezifischen Antikörpers W6/32 an ein intaktes MHC-Klasse-I-Molekül (oben) bzw. an eine nach „acid wash“-Behandlung zurück bleibende α-Kette (unten).

C: FACS-Analyse der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression ΔUS2-11-infizierter HFF zu den angegebenen Zeitpunkten nach „acid wash“-Behandlung. HFF wurden mit einer *moi* von 5 mit ΔUS2-11 infiziert und 24h p.i. einer „acid wash“-Behandlung unterzogen. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach „acid wash“ wurde die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression per FACS gemessen. Dazu wurden der MHC-Klasse-I-spezifische Antikörper W6/32 und zur Detektion ein FITC-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet. Die bei der FACS-Messung erhaltenen MFI (*mean fluorescence intensities*) sind in Prozent MHC-Klasse-I-Expression angegeben, wobei die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression *mock*-behandelter Zellen 24h p.i. 100% entspricht (+). Die unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers stellt die Negativkontrolle dar (-). Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus 3 unabhängigen Experimenten ermittelt.

D: Analyse der pp65-Präsentation im IFN-γ-Elispot. ΔUS2-11-infizierte HFF wurden 48h p.i. den auf der X-Achse angegebenen Behandlungen unterzogen und als Zielzellen in einen IFN-γ-Elispot eingesetzt. Die Fixierung erfolgte mit 0,5% PFA. Als Effektorzellen dienten pp65-Klon 53 mit einer Zellzahl von 200 CTL/*Well*. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus Triplikaten errechnet.

Um die Effizienz der „acid wash“-Behandlung auch spezifisch für pp65 zeigen zu können, sollte die pp65-Präsentation nach „acid wash“-Behandlung mittels pp65-Klon 53 in einem IFN- γ -Elispot untersucht werden. Dazu wurden Δ US2-11-infizierte HFF 48 Stunden nach Infektion einer „acid wash“-Behandlung unterzogen und anschließend entweder direkt oder nach einer Fixierung mit 0,5% Paraformaldehyd (PFA) als Zielzellen in einen IFN- γ -Elispot eingesetzt (Abbildung 19 D). Durch die PFA-Fixierung wurde dabei die Regeneration der MHC-Klasse-I-Präsentation während der Elispot-Inkubation verhindert und somit der Zustand direkt nach der „acid wash“-Behandlung konserviert. Um zu überprüfen, ob die Erkennung durch pp65-Klon 53 *per se* durch die PFA-Fixierung beeinflusst wurde, sollte zusätzlich die Erkennung Δ US2-11-infizierter HFF nach PFA-Fixierung überprüft werden. Als Positivkontrolle dienten Δ US2-11-infizierte Zellen ohne zusätzliche Behandlung. Δ US2-11-infizierte HFF wurden 48 Stunden nach Infektion sehr effizient durch pp65-Klon 53 erkannt. Durch die Fixierung mit 0,5% PFA wurde diese Erkennung zwar um etwa 30% verringert, jedoch nicht verhindert. Eine „acid wash“-Behandlung mit direkt anschließender Fixierung dahingegen verhinderte eine Erkennung durch pp65-Klon 53 vollständig. Erstaunlicherweise konnten Δ US2-11-infizierte HFF nach einer „acid wash“-Behandlung ohne Fixierung fast genauso effizient erkannt werden wie die unbehandelten Zellen. Dies zeigte, dass während der 20-stündigen Elispot-Inkubation die ursprüngliche pp65-Präsentation fast vollständig regeneriert werden konnte. Die pp65-Präsentation Δ US2-11-infizierter HFF konnte also durch die „acid wash“-Behandlung zunächst vollständig entfernt, dann aber während der folgenden 20 Stunden wieder fast auf Ausgangsniveau regeneriert werden.

3.3.3.1.2 Ausmaß der US2-US11-vermittelten Beeinflussung der pp65-Präsentation

pHB15-infizierte Zellen zeigten 24 Stunden nach Infektion eine starke „US2-US11-unabhängige pp65-Präsentation“ (siehe Abbildung 18). Um die Frage zu klären, ob die im weiteren Verlauf der Infektion beobachtete „US2-US11-unabhängige pp65-Präsentation“ durch langlebige oder neu an die Oberfläche transportierte MHC-Klasse-I-pp65-Komplexe begründet war, wurden HFF wie unter 3.3.3 beschrieben mit einer *moi* von 5 mit pHB15 bzw. Δ US2-11 infiziert und 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Infektion mit pp65-Klon 53 auf ihre pp65-Präsentation hin im Elispot untersucht (Abbildung 20). Parallel hierzu wurden Zellen für 24, 48 und 72 Stunden infiziert und anschließend einer Säurebehandlung unterzogen. Nach einer Regenerationsphase von 24 Stunden wurden auch diese Zellen einer IFN- γ -Elispot-Analyse unterzogen. Als Negativkontrolle dienten Δ pp65 infizierte HFF. In Abbildung 20 ist die Vorgehensweise zur Herstellung der verschiedenen Zielzellen unterhalb der Elispot-Ergebnisse schematisch dargestellt.

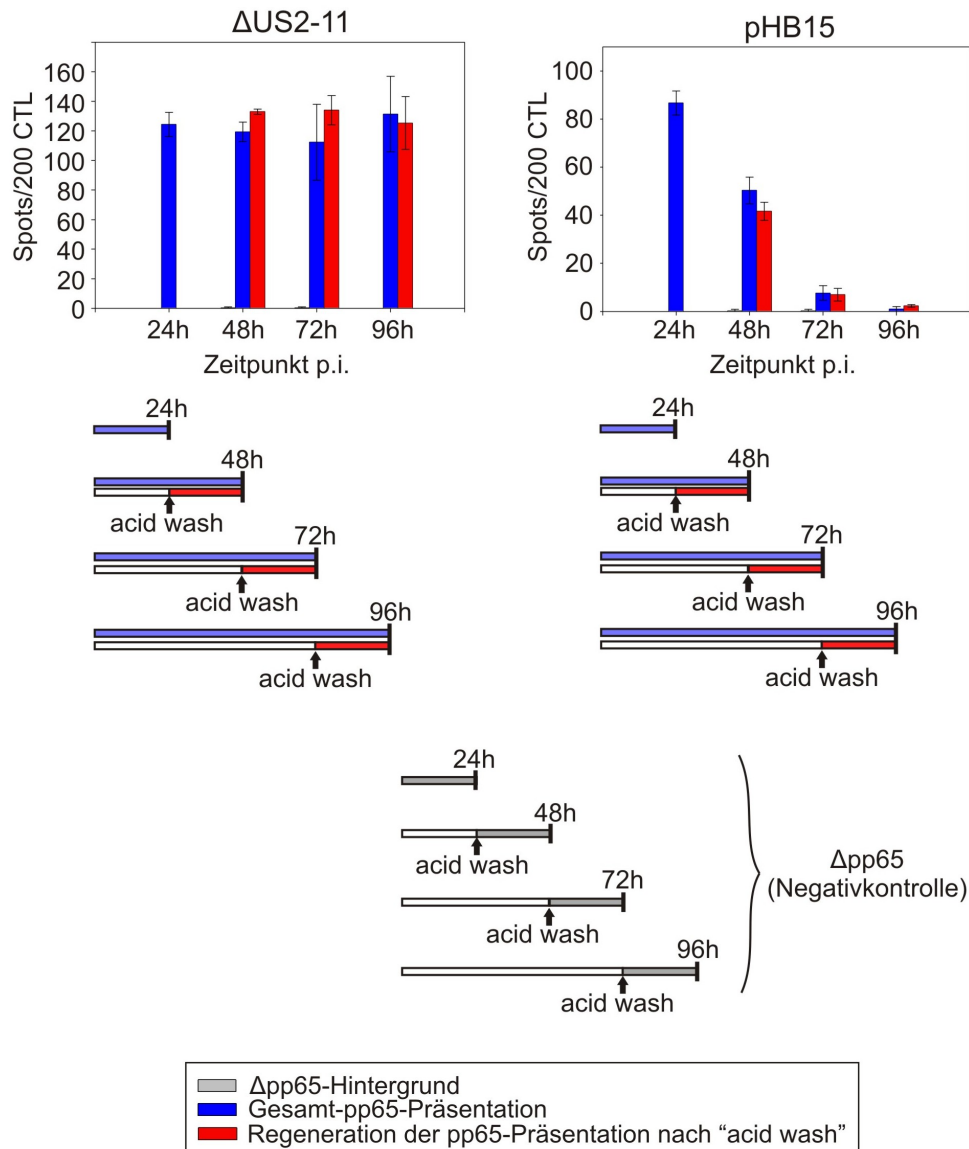


Abbildung 20: IFN- γ -Elispot-Analyse der Regeneration der pp65-Präsentation auf infizierten Zellen nach „acid wash“

Die Regeneration der pp65-Präsentation im Verlauf der Infektion mit Δ US2-11 bzw. pHB15 wurde mit Hilfe eines IFN- γ -Elispots gemessen. Als Effektorzellen wurden pp65-Klon 53 mit einer Zellzahl von 200 CTL/Well eingesetzt. HFF wurden mit einer *moi* von 5 mit Δ US2-11 bzw. pHB15 infiziert und die Gesamt-pp65-Präsentation zu den angegebenen Zeitpunkten p.i. gemessen (blaue Balken). In einem Parallelansatz wurde auch die pp65-Präsentation von infizierten Zellen 48, 72 und 96h p.i. gemessen, die jeweils 24h vor der Messung einer „acid wash“-Behandlung unterzogen worden waren (rote Balken). Δ pp65-infizierte Zellen dienten als Negativkontrolle. Auch hier war jeweils 24h vor der Messung eine „acid wash“-Behandlung durchgeführt worden. Unter diesen Bedingungen wurde keine Hintergrund-Erkennung von Δ pp65-infizierten Zellen beobachtet (graue Balken). Die Vorgehensweise zur Herstellung der verschiedenen Zielzellen ist unterhalb der Elispot-Ergebnisse schematisch dargestellt. Die dargestellten Ergebnisse stellen Mittelwerte und Standardabweichungen aus Triplikaten eines repräsentativen Experiments dar.

Zellen, welche mit Δ US2-11 infiziert worden waren, zeigten zu allen untersuchten Zeitpunkten nach Infektion eine vergleichbare Gesamt-pp65-Präsentation. Diese Präsentation wurde unabhängig vom Zeitpunkt der jeweiligen Säurebehandlung in den darauf folgenden 24 Stunden vollständig regeneriert (Abbildung 20, links). Zellen, welche mit dem gpUS2-gpUS11 exprimierenden Stamm pHB15 infiziert worden waren, zeigten im Gegensatz hierzu eine im Verlauf der Infektion abnehmende Präsentation des pp65-Peptids. Die 24 bzw. 48 Stunden nach Infektion durchgeführte Säurebehandlung erlaubte während der folgenden 24-stündigen Erholungsphase eine fast vollständige Regeneration der Peptidpräsentation, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen (Abbildung 20, rechts). Diese Ergebnisse zeigten, dass die bei pHB15-infizierten HFF beobachtete „US2-US11-unabhängige pp65-Präsentation“ 48 und 72 Stunden nach Infektion in der Tat zu wesentlichen Anteilen durch MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe begründet ist, die trotz Expression der Immunevasine in der infizierten Zelle an die Zelloberfläche transportiert werden.

3.3.3.1.3 Kinetik der US2-US11-vermittelten Suppression der pp65-Präsentation

Bereits 24 Stunden nach Infektion konnte bei pHB15-infizierten Zellen im Vergleich zu Δ US2-11-infizierten Zellen eine deutlich geringere pp65-Präsentation beobachtet werden (siehe Abbildung 18). Die US2-US11-vermittelte Beeinträchtigung der pp65-Prozessierung musste demnach bereits zu einem früheren Zeitpunkt begonnen haben. Um den Beginn des Einflusses von US2-US11 auf die Prozessierung von pp65 zeitlich festlegen zu können, sollte die Regenerationsfähigkeit der pp65-Präsentation zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 1 Stunde und 24 Stunden nach Infektion in Abhängigkeit von US2-US11 untersucht werden. Dazu wurden HFF mit einer *moi* von 5 mit pHB15 bzw. Δ US2-11 infiziert und 24 Stunden nach Infektion als Zielzellen in einen IFN- γ -Elispot eingesetzt. Als Effektorzellen wurden pp65-Klon 53 verwendet. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion wurden die Zellen einer „acid wash“-Behandlung unterzogen bzw. zur Kontrolle unbehandelt belassen. Die genaue Vorgehensweise ist in Abbildung 21 A schematisch dargestellt. Die jeweils im IFN- γ -Elispot nachweisbare pp65-Präsentation stellte dabei ein Maß für die Fähigkeit der Zellen dar, nach der Säurebehandlung MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe an die Zelloberfläche zu translozieren. Während Δ US2-11 infizierte Zellen unabhängig vom Zeitpunkt der „acid wash“-Behandlung ihre pp65-Präsentation bis 24 Stunden nach Infektion wieder auf das Niveau der unbehandelten Zellen regenerieren konnten, zeigten pHB15-infizierte HFF bereits 16 Stunden nach Infektion eine eingeschränkte Regenerationsfähigkeit.

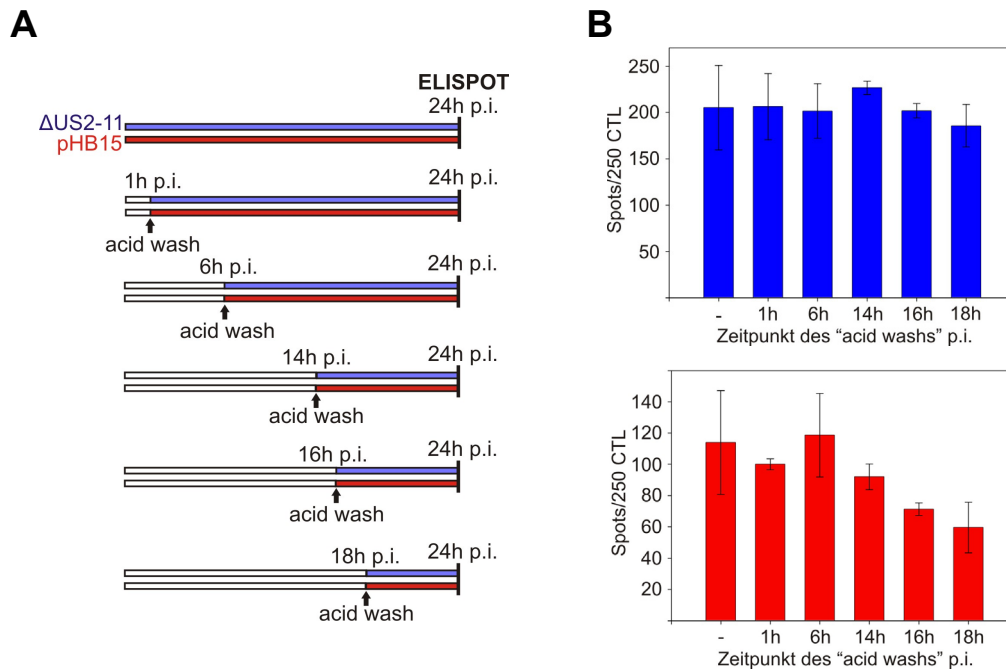


Abbildung 21: IFN- γ -Elispot-Analyse der Regeneration von pp65-Präsentation auf infizierten HFF nach „acid wash“ bis 24h p.i.

HFF wurden mit einer *moi* von 5 mit Δ US2-11 (blau Balken) bzw. pHB15 (rote Balken) infiziert und 24h nach Infektion als Zielzellen in einen IFN- γ -Elispot eingesetzt. Die Ansätze wurden entweder unbehandelt belassen (-), oder zu den angegebenen Zeitpunkten p.i. einer „acid wash“-Behandlung unterzogen. Die Vorgehensweise ist in **(A)** schematisch dargestellt. Als Effektorzellen wurden pp65-Klon 53 mit einer Zellzahl von 250 CTL/Well eingesetzt. Die Ergebnisse des Elispots sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Triplikaten in **(B)** dargestellt.

3.4 Beeinflussung der MHC-Klasse-I-restringierten IE1-Präsentation infizierter Fibroblasten

3.4.1 Einfluss der US2-US11-Region auf die MHC-Klasse-I-restringierte IE1-Präsentation infizierter Fibroblasten

Das *immediate early* Protein IE1 ist das während der sehr frühen Phase der Infektion am stärksten exprimierte virale Protein. Seine Synthese beginnt unabhängig von der *de novo* Synthese viraler Proteine während der ersten Stunde nach Infektion, erreicht zwischen sechs bis acht Stunden p.i. ihr Maximum und sinkt dann im weiteren Verlauf der Infektion langsam wieder ab (Stamminger *et al.*, 1991). Über Immunfluoreszenz-Analysen mit einem IE1-spezifischen Antikörper konnten 24 Stunden nach Infektion in HCMV-infizierten Fibroblasten große Mengen an IE1-Protein nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Erstaunlicherweise konnten diese Zellen aber weder im IFN- γ -Elispot noch im CFT durch IE1-spezifische CTL

erkannt werden. Im Gegensatz dazu konnte zu diesem Zeitpunkt jeweils eine deutliche pp65-spezifische Erkennung derselben Zellen beobachtet werden (Abbildung 22).

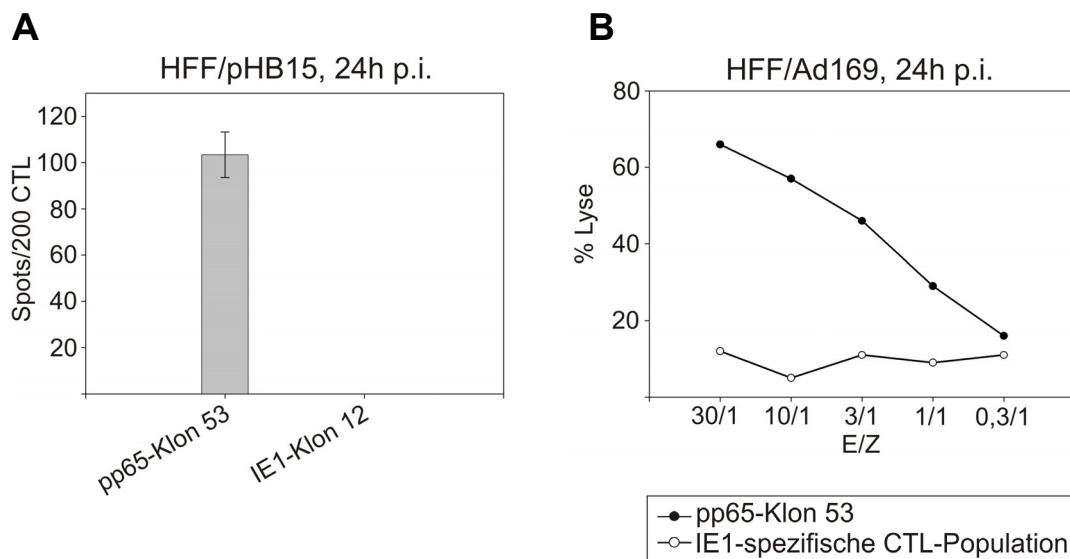


Abbildung 22: Analyse der Präsentation des IE1-Peptids auf HCMV-infizierten HFF 24h p.i.

HFF wurden mit einer *moi* von 5 mit pHB15 (**A**) bzw. Ad169 (**B**) infiziert und 24h p.i. als Zielzellen in einen IFN- γ -Elispot (**A**) bzw. einen CFT (**B**) eingesetzt.

A: Als Effektorzellen dienten pp65-Klon 53 und IE1-Klon 12 mit einer Zellzahl von jeweils 200 CTL/Well. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus Triplikaten errechnet.

B: Als Effektorzellen dienten pp65-Klon 53 und die IE1-spezifische CTL-Population, welche als Grundlage zur Klonierung von IE1-Klon 12 verwendet worden war. Die Effektorzellen wurden in den angegebenen E/Z eingesetzt.

Während die Detektion der pp65-Präsentation sowohl im IFN- γ -Elispot als auch im CFT mit pp65-Klon 53 erfolgte, wurde die IE1-Präsentation im Elispot mit IE1-Klon 12, im CFT allerdings ausnahmsweise mit der IE1-Klon 12 zugrunde liegenden IE1-spezifischen CTL-Population untersucht. Diese Population zeigte eine ähnliche Antigenspezifität und -sensitivität wie IE1-Klon 12 (Daten nicht gezeigt). Die Beobachtung, dass HCMV-infizierte Fibroblasten 24 Stunden nach Infektion nicht durch IE1-spezifische CTL erkannt werden konnten, deckte sich mit den Ergebnissen anderer, die ebenfalls keine oder kaum IE1-spezifische Erkennung *in vitro* - infizierter Fibroblasten nachweisen konnten (Gilbert *et al.*, 1993; Gilbert *et al.*, 1996; Khan *et al.*, 2002). Die Tatsache, dass die IE1-Präsentation in diesen Arbeiten durch eine IFN- γ -Vorbehandlung der Zellen etwas erhöht werden konnte, deutet auf eine eventuelle Beteiligung der Immunevasine gpUS2-gpUS11 bei der beobachteten Unterdrückung der IE1-Präsentation hin, da der durch US2-US11 bewirkten Reduktion der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression durch IFN- γ entgegen gewirkt werden

könnte. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit lagen hierzu jedoch keinerlei Untersuchungen vor. Aus diesem Grund sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Einfluss der US2-US11-Region auf die IE1-Präsentation im Verlauf der Infektion analysiert werden. Dazu wurden HFF mit einer *moi* von 5 mit pHB15 bzw. Δ US2-11 infiziert und 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Infektion im IFN- γ -Elispot auf ihre IE1-Präsentation untersucht. Als Kontrolle wurde zusätzlich jeweils auch die entsprechende pp65-Präsentation gemessen. Die Detektion der MHC-Klasse-I-Präsentation erfolgte mit IE1-Klon 12 bzw. pp65-Klon 53. Als Negativkontrolle wurden für IE1-Klon 12 *mock*-infizierte, für pp65-Klon 53 Δ pp65-infizierte Zellen verwendet. Die Erkennung sowohl Δ pp65-, als auch pHB15- und Δ US2-11-infizierter Zellen durch pp65-Klon 53 zeigte den aus Abbildung 18 bekannten Verlauf (Abbildung 23, links; Hintergrund-Erkennung von Δ pp65-infizierten HFF ist nicht gezeigt). Dahingegen konnten pHB15-infizierte HFF weder, wie bereits in Abbildung 22 A gezeigt, 24 Stunden nach Infektion, noch zu einem anderen der untersuchten Zeitpunkte durch IE1-Klon 12 erkannt werden. Überraschenderweise aber konnten Δ US2-11-infizierte HFF zu allen Untersuchungszeitpunkten mit hoher Effizienz von IE1-Klon 12 erkannt werden (Abbildung 23, rechts). *Mock*-infizierte Zellen wurden wie pHB15-infizierte Zellen nicht erkannt (Daten nicht gezeigt). Es konnte also erst durch die Deletion der US2-US11-Region eine IE1-Präsentation HCMV-infizierter Zellen beobachtet werden.

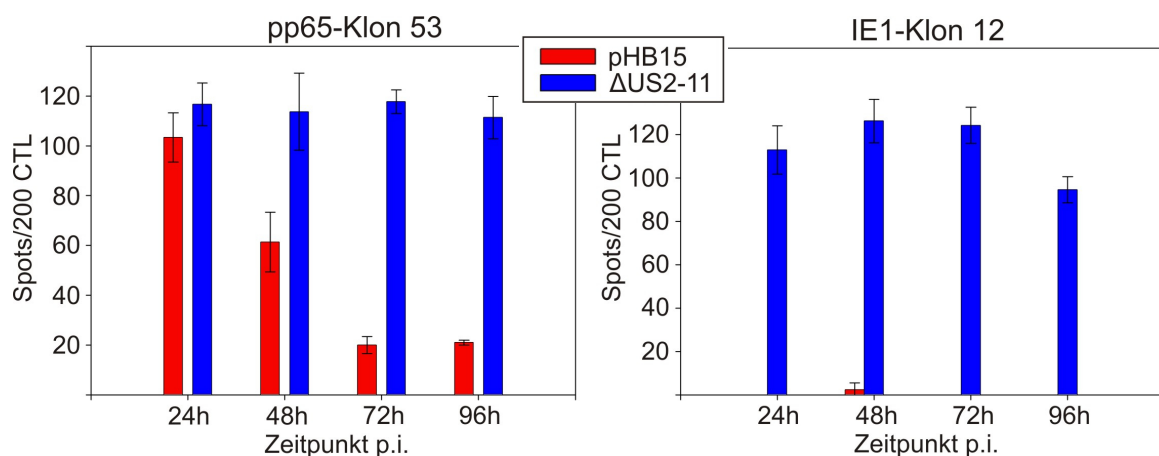


Abbildung 23: IFN- γ -Elispot-Analyse des Einflusses von US2-US11 auf die IE1-Präsentation im Verlauf der Infektion

HFF wurden mit einer *moi* von 5 mit pHB15 bzw. Δ US2-11 infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten p.i. als Zielzellen in einen IFN- γ -Elispot eingesetzt. Als Effektorzellen dienen pp65-Klon 53 und IE1-Klon 12 mit einer Zellzahl von 200 CTL/Well. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus Triplikaten errechnet.

Die Expression von IE1 beginnt unabhängig von der *de novo* Proteinsynthese während der ersten Stunde nach Infektion (Stamminger *et al.*, 1991). Von den Immunevasinen wird lediglich das gpUS3 ebenfalls zu diesen sehr frühen Zeitpunkten nach Infektion exprimiert. Es war somit offen, ob die Immunevasion die Prozessierung und Präsentation von IE1 bereits zu derart frühen Zeitpunkten nach Infektion beeinträchtigen konnte. Um dies zu prüfen, wurden HFF mit einer *moi* von 5 mit pHB15 bzw. Δ US2-11 infiziert und 1 sowie 3 Stunden nach Infektion als Zielzellen in einen IFN- γ -Elispot eingesetzt. *Mock*-infizierte HFF dienten hierbei als Negativkontrolle. Als Effektorzellen wurden IE1-Klon 12 und zur Kontrolle pp65-Klon 53 eingesetzt. Da man zu diesen sehr frühen Zeitpunkten nach Infektion mit einer relativ schwachen IE1-Präsentation zu rechnen hatte, wurde die Zahl der eingesetzten IE1-spezifischen CTL auf 500 CTL/Well erhöht. Während sowohl pHB15- als auch Δ US2-11-infizierte HFF 1 Stunde und 3 Stunden nach Infektion sehr effizient durch pp65-Klon 53 erkannt werden konnten, wurde eine IE1-spezifische Erkennung durch IE1-Klon 12 nur nach Infektion mit Δ US2-11 beobachtet (Abbildung 24). *Mock*-infizierte Zellen wurden erfahrungsgemäß durch IE1-Klon 12 nicht erkannt (Daten nicht gezeigt). Da die Δ US2-11-infizierten HFF im Gegensatz zu den pHB15-infizierten HFF sehr deutlich durch IE1-Klon 12 erkannt werden konnten, war die fehlende Erkennung pHB15-infizierter Zellen nicht auf eine noch zu geringe IE1-Expression zu diesen sehr frühen Zeitpunkten nach Infektion zurückzuführen, sondern eindeutig auf das Vorhandensein der US2-US11-Region. Den bisherigen Ergebnissen nach wurde die IE1-Präsentation also im gesamten Verlauf der Infektion durch die Anwesenheit der US2-US11-Region vollständig unterdrückt.

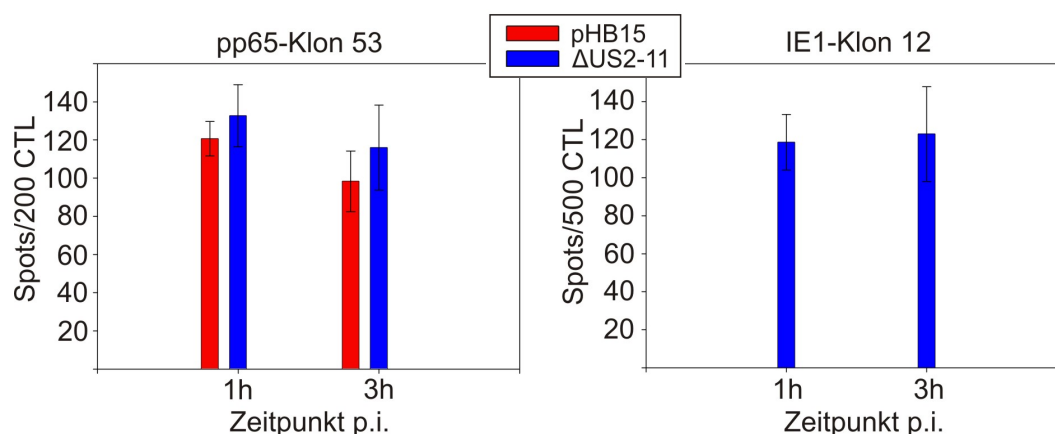


Abbildung 24: IFN- γ -Elispot-Analyse des Einflusses von US2-US11 auf die IE1-Präsentation zu sehr frühen Zeitpunkten p.i.

HFF wurden mit einer *moi* von 5 mit pHB15 bzw. Δ US2-11 infiziert und 1h und 3h p.i. als Zielzellen in einen IFN- γ -Elispot eingesetzt. Als Effektorzellen wurden IE1-Klon 12 mit einer Zellzahl von 500 CTL/Well und als Kontrolle pp65-Klon 53 mit einer Zellzahl von 200 CTL/Well verwendet. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus Triplikaten errechnet.

Die Untersuchung des US2-US11-vermittelten Einflusses auf die IE1-Präsentation im Verlauf der Infektion wurde mit Hilfe von IFN- γ -Elispot-Analysen durchgeführt. Dabei wurden die infizierten Zellen ab dem gewünschten Untersuchungszeitpunkt nach Infektion für 20 Stunden mit den Effektorzellen kokultiviert und anschließend die durch Interaktion zwischen Zielzelle und Effektorzelle induzierte IFN- γ -Freisetzung detektiert. Während dieser 20-stündigen Inkubation konnte sich dabei aber vermutlich auch die MHC-Klasse-I-Präsentation auf den Zielzellen verändern und somit nicht mehr den Zustand zum gewünschten Untersuchungszeitpunkt widerspiegeln. Eine in Gegenwart der US2-US11-Region nur sehr früh nach Infektion entstehende IE1-Präsentation könnte demnach je nach Stabilität des entsprechenden MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexes während der 20-stündigen Inkubation bereits dissoziiert und somit über die anschließende Detektion nicht mehr nachweisbar sein. Um solche MHC-Klasse-I-IE1-Komplexe nicht aufgrund von Restriktionen der Methode zu übersehen, sollte im Folgenden die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression der infizierten Zielzellen zu den gewünschten Zeitpunkten nach Infektion mit PFA fixiert und anschließend im IFN- γ -Elispot untersucht werden. In einem ersten Versuch wurden HFF mit einer *moi* von 5 mit Δ US2-11 infiziert, zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion mit 0,5% PFA fixiert und anschließend als Zielzellen in einen IFN- γ -Elispot eingesetzt. Als Effektorzellen wurden erneut IE1-Klon 12 und zur Kontrolle pp65-Klon 53 verwendet (Abbildung 25).

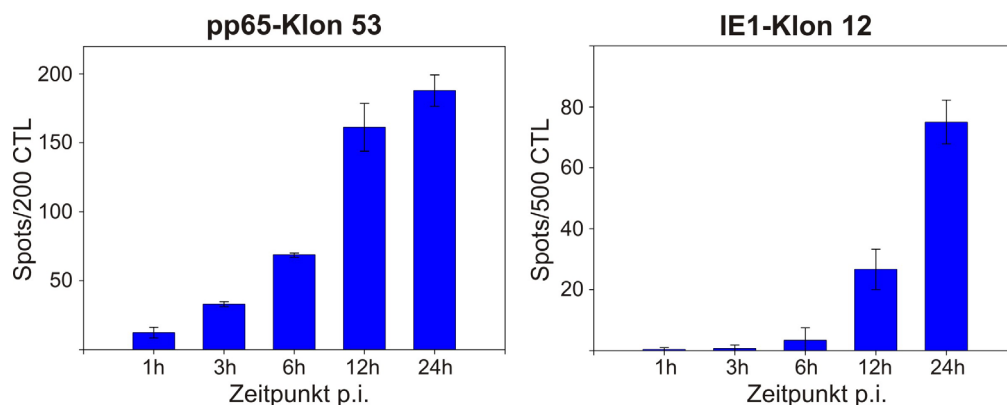


Abbildung 25: IFN- γ -Elispot-Analyse der MHC-Klasse-I-restringierten Erkennung Δ US2-11-infizierter HFF zu sehr frühen Zeitpunkten p.i. nach Fixierung mit 0,5% PFA

HFF wurden mit einer *moi* von 5 mit Δ US2-11 infiziert, zu den angegebenen Zeitpunkten p.i. mit 0,5% PFA fixiert und dann als Zielzellen in einen IFN- γ -Elispot eingesetzt. Als Effektorzellen dienten pp65-Klon 53 (Zellzahl von 200 CTL/Well) und IE1-Klon 12 (Zellzahl von 500 CTL/Well). Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus Triplikaten errechnet.

Zur Kontrolle, dass HFF nach der Fixierung noch durch pp65-Klon 53 und IE1-Klon 12 erkannt werden konnten, wurden die Zellen mit pp65- bzw. IE1-Peptid in einer Konzentration von 10^{-5} M beladen, anschließend mit 0,5% PFA fixiert und dann ihre Erkennung durch pp65-Klon 53 und IE1-Klon 12 im Elispot untersucht. Sowohl pp65- als auch IE1-beladene HFF konnten nach Fixierung sehr effizient durch pp65-Klon 53 bzw. IE1-Klon 12 erkannt werden (Daten nicht gezeigt). Sowohl die pp65- wie auch die IE1-Präsentation stiegen im Verlauf der Infektion deutlich an und erreichten 24 Stunden nach Infektion einen Maximalwert. Während die pp65-Präsentation allerdings bereits 3 Stunden nach Infektion über dem Hintergrund-Niveau detektiert werden konnte (Abbildung 25, links), war der Nachweis einer IE1-spezifischen Präsentation erst ab 12 Stunden nach Infektion möglich (Abbildung 25, rechts). Da demnach zu sehr frühen Zeitpunkten nach Infektion noch nicht einmal die Deletion der US2-US11-Region eine IE1-Präsentation hervorrufen konnte, war es nicht verwunderlich, dass pHb15-infizierte HFF nach der gleichen Behandlung zu keinem der untersuchten Zeitpunkte durch IE1-Klon 12 erkannt werden konnten (Daten nicht gezeigt).

In Gegenwart von US2-US11 schienen also zu keinem Zeitpunkt nach Infektion nachweisbare Mengen MHC-Klasse-I-präsentierten IE1-Peptids auf der Oberfläche infizierter HFF vorzuliegen. Selbst nach Deletion von US2-US11 konnten infizierte Zellen frühestens 12 Stunden nach Infektion durch IE1-Klon 12 detektiert werden. Somit musste die fehlende IE1-Präsentation zu diesen sehr frühen Zeitpunkten nach Infektion entweder auf eine noch nicht ausreichende Expression des Proteins oder aber auf eine von US2-US11 unabhängige Unterdrückung zurückgeführt werden.

3.4.2 Einfluss des Tegumentproteins pp65 auf die MHC-Klasse-I-restringierte IE1-Präsentation infizierter Fibroblasten

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit lagen keine Informationen über die Auswirkungen der US2-US11-Region auf die IE1-Präsentation infizierter Zellen vor. Demgegenüber war in einer Arbeit von Gilbert und Kollegen gezeigt worden, dass die IE1-Präsentation HCMV-infizierter Zellen *in vitro* selektiv durch eine mit pp65 assoziierte Kinaseaktivität inhibiert werden kann. Mit Hilfe einer pp65-Deletionsmutante konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Anwesenheit des Tegumentproteins zu einer Unterdrückung der IE1-Präsentation, nicht aber der Präsentation anderer HCMV-Antigene führt (Gilbert *et al.*, 1993; Gilbert *et al.*, 1996). Inzwischen konnte sowohl im Rahmen der vorliegenden Arbeit als auch von anderen (Manley *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2005) eine Unterdrückung der IE1-Präsentation durch die Immunevasine gpUS2-gpUS11 nachgewiesen werden. In Western Blot- und Immunfluoreszenz-Analysen konnte gezeigt werden, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete US2-US11-Deletionsmutante hinsichtlich ihrer pp65-Expression im Vergleich zu pHb15 nicht beeinträchtigt war (Daten nicht gezeigt). Da die durch das Fehlen

der US2-US11-Region ermöglichte IE1-Präsentation somit also in Gegenwart von pp65 stattfand, wurde sie offensichtlich nicht durch das Tegumentprotein unterdrückt. Da für diese Diskrepanz bisher keine Erklärung gefunden werden konnte, sollte in der vorliegenden Arbeit nach einer eventuellen Kooperation von pp65 und gpUS2-gpUS11 bei der Unterdrückung der IE1-Präsentation gesucht werden. Dabei sollte zunächst nach einem Einfluss des Tegumentproteins auf die IE1-Präsentation zu späteren Zeitpunkten nach Infektion gesucht werden, wo inzwischen bereits eine Unterdrückung durch die Immunevasine gpUS2-gpUS11 hatte festgestellt werden können. Dazu wurden HFF mit einer *moi* von 5 mit den Stämmen pHB15 bzw. Δ pp65 infiziert und 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Infektion als Zielzellen in einen IFN- γ -Elispot eingesetzt. Δ US2-11-infizierte HFF dienten als Positivkontrolle. Als Effektorzellen wurden IE1-Klon 12 und zusätzlich als Kontrolle pp65-Klon 53 eingesetzt. Die im Rahmen dieser Experimente beobachtete pp65-Präsentation entsprach den Erwartungen; Δ US2-11-infizierte Zellen wurden zu jedem der untersuchten Zeitpunkte mit gleich bleibender Effizienz durch pp65-Klon 53 erkannt, die Erkennung von pHB15-infizierten Zellen nahm im Verlauf der Infektion erwartungsgemäß ab und Δ pp65-infizierte Zellen wurden zu keinem der untersuchten Zeitpunkte durch pp65-Klon 53 erkannt (Daten nicht gezeigt). Unter Verwendung von IE1-Klon 12 konnte eine entsprechende Peptidpräsentation auch in diesem Ansatz nur auf Δ US2-11-infizierten Zellen nachgewiesen werden. Dagegen war keinerlei Erkennung von pHB15- oder Δ pp65-infizierten Zellen zu beobachten (Abbildung 26 A). Diese Ergebnisse zeigten, dass eine IE1-Präsentation zu diesen eher späten Zeitpunkten nach Infektion nur dann möglich war, wenn die Genomregion des infizierenden Virus von US2 bis US11 deletiert war. Die alleinige Deletion des pp65-Gens dahingegen hatte keinerlei stimulierende Wirkung auf die IE1-Präsentation. Um zu testen, ob eine Erhöhung des IE1-Gehalts in den Δ pp65-infizierten Zellen eventuell doch zu einer Erkennung durch IE1-spezifische CTL führen konnte, wurden HFF mit ansteigenden Mengen an Virus infiziert und 24 Stunden nach Infektion im Elispot auf ihre IE1-Präsentation hin untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigten jedoch, dass selbst nach Infektion mit einer *moi* von 25 Δ pp65-infizierte HFF keine IE1-Präsentation aufweisen konnten (Daten nicht gezeigt). Wiederholt konnte inzwischen gezeigt werden, dass selbst nach Deletion von US2-US11 infizierte Zellen frühestens 12 Stunden nach Infektion durch IE1-spezifische CTL erkannt werden können ((Manley *et al.*, 2004), Abbildung 25). Dahingegen konnte gezeigt werden, dass andere IE-Proteine durch US2-US11-negative Zellen bereits 2 Stunden nach Infektion effizient präsentiert werden können (Manley *et al.*, 2004). Das Fehlen einer entsprechenden Präsentation des sehr abundanten IE1-Proteins zu diesen sehr frühen Zeitpunkten nach Infektion sollte demnach nicht durch eine noch limitierende Proteinmenge verursacht worden sein.

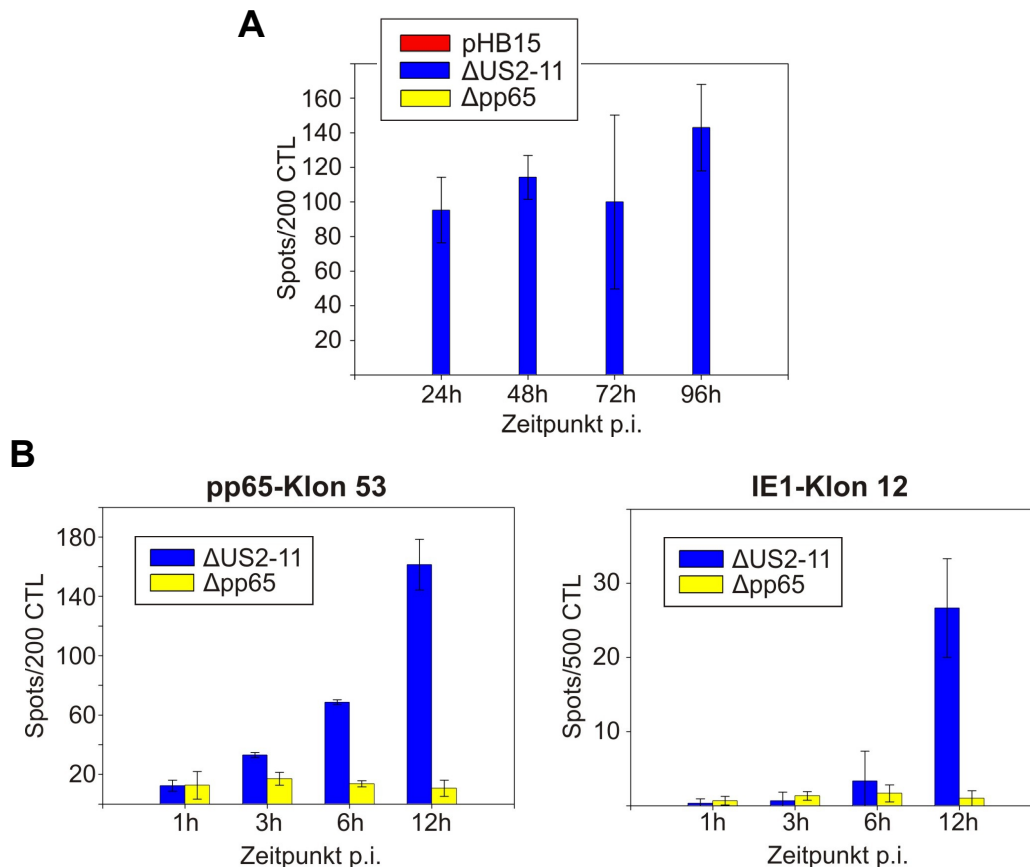


Abbildung 26: IFN- γ -Elispot-Analyse des Einflusses von pp65 auf die IE1-Präsentation im Verlauf der Infektion

A: HFF wurden mit einer *moi* von 5 mit pHB15, Δ US2-11 oder Δ pp65 infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten p.i. als Zielzellen in einen IFN- γ -Elispot eingesetzt. Als Effektorzellen dienten IE1-Klon 12 mit einer Zellzahl von 200 CTL/Well.

B: HFF wurden mit einer *moi* von 5 mit Δ US2-11 bzw. Δ pp65 infiziert, zu den angegebenen Zeitpunkten p.i. mit 0,5% PFA fixiert und als Zielzellen in einen IFN- γ -Elispot eingesetzt. Als Effektorzellen dienten pp65-Klon 53 mit einer Zellzahl von 200 CTL/Well und IE1-Klon 12 mit einer Zellzahl von 500 CTL/Well.

Die in **(A)** und **(B)** dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden jeweils aus Triplikaten errechnet.

Das Tegumentprotein pp65 wird im Zuge der Infektion in großen Mengen in die Zelle eingebracht. Es wäre daher denkbar, dass es die Unterdrückung der IE1-Präsentation zu diesen sehr frühen Zeitpunkten nach Infektion hervorruft. Um dies zu testen, sollten Δ pp65-infizierte Zellen unmittelbar nach Infektion auf ihre IE1-Präsentation hin untersucht werden. Dazu wurden HFF mit einer *moi* von 5 mit Δ pp65 und zur Kontrolle mit Δ US2-11 infiziert und 1, 3, 6 sowie 12 Stunden nach Infektion mit 0,5% PFA fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen als Zielzellen in einen IFN- γ -Elispot mit IE1-Klon 12 als Effektorzellen eingesetzt. Zur Kontrolle wurde zusätzlich die pp65-Präsentation der Zielzellen zu den angegebenen Zeitpunkten durch pp65-Klon 53 überprüft (Abbildung 26 B). Während

Δ US2-11-infizierte HFF nach Fixierung sowohl die erwartete pp65- als auch die erwartete IE1-Präsentation zeigten, konnten Δ pp65-infizierte Zellen zu keinem der untersuchten Zeitpunkte nach Infektion durch pp65-Klon 53 oder IE1-Klon 12 erkannt werden. Diese Ergebnisse zeigten, dass das Fehlen einer messbaren IE1-Präsentation auch zu diesen sehr frühen Zeitpunkten nach Infektion nicht durch pp65 vermittelt wird.

3.4.3 Kooperativer Einfluss von gpUS2-gpUS11 und pp65 auf die MHC-Klasse-I-restringierte IE1-Präsentation infizierter Fibroblasten

Da offensichtlich weder die Immunevasine gpUS2-gpUS11 noch das pp65-Protein alleine für die fehlende IE1-Präsentation zu sehr frühen Zeitpunkten nach Infektion verantwortlich gemacht werden konnten, sollte in einem letzten Versuch nach eventuellen kooperativen Effekten zwischen gpUS2-gpUS11 und pp65 bei der Beeinflussung der IE1-Präsentation gesucht werden. Dazu musste eine Virusmutante hergestellt werden, welche neben gpUS2-gpUS11 auch kein pp65 mehr exprimieren konnte.

3.4.3.1 Herstellung einer Δ US2-11_ Δ pp65-Doppelmutante

Die Herstellung der Δ US2-11_ Δ pp65-Doppelmutante erfolgte analog zu der unter 3.3.1 beschriebenen Konstruktion der pp65-Deletionsmutante Δ pp65. Über BAC-Mutagenese wurde die pp65-Region im HCMV-BAC p Δ US2-11-(EGFP-loxP) (Falk *et al.*, 2002) deletiert (vgl. Abbildung 13). Anschließend wurde die entsprechende Virusmutante durch Transfektion des resultierenden BACs p Δ US2-11_ Δ pp65-(EGFP-loxP) in HFF rekonstituiert. Da dabei eine vollständige Entfernung des BAC-Vektors aus der HCMV-Sequenz nicht erreicht werden konnte, wurde die Rekonstitution ohne das die Cre-Rekombinase exprimierende Plasmid pBRep-cre durchgeführt. Der nach Rekonstitution etablierte Stamm Δ US2-11_ Δ pp65 enthielt somit zwischen den Genen US1 und US12 als Integrat den BAC-Vektor und zusätzlich dazu eine zusammen mit dem BAC-Vektor durch loxP-sites flankierte GFP-Expressionskassette. Die Δ US2-11_ Δ pp65-Doppelmutante wurde daher im Folgenden als Δ US2-11_ Δ pp65_GFP bezeichnet. Mit Δ US2-11_ Δ pp65_GFP infizierte Zellen zeigten eine auf GFP basierende grüne Fluoreszenz (Daten nicht gezeigt). Eine entsprechende Δ US2-11-Einzelmutante konnte durch ebenfalls Cre-Rekombinase-freie Rekonstitution des parentalen BACs p Δ US2-11-(EGFP-loxP) (Falk *et al.*, 2002) erhalten werden. Wie Δ US2-11_ Δ pp65_GFP enthielt der resultierende Stamm in seiner genomischen Sequenz zwischen US1 und US12 das BAC-Vektor-Integrat mit GFP-Expressionskassette. Die Infektion einer Zelle mit diesem Virus konnte somit ebenfalls durch grüne Fluoreszenz nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Um diese GFP-positive Δ US2-11-Mutante von Δ US2-11 zu

unterscheiden, wurde sie im Folgenden als Δ US2-11_GFP bezeichnet. In Abbildung 27 A sind US2-US11- und pp65-Region von Δ US2-11_GFP und Δ US2-11_Δpp65_GFP schematisch dargestellt.

3.4.3.2 Charakterisierung der rekonstituierten Δ US2-11_Δpp65-Doppelmutante

Wie zuvor für die pp65-Deletionsmutante Δpp65 (siehe 3.3.2) musste auch für Δ US2-11_Δpp65_GFP die fehlende pp65-Expression verifiziert werden. Als Kontrolle diente dabei das aus dem Ausgangs-BAC pΔUS2-11-(EGFP-loxP) rekonstituierte rekombinante Virus Δ US2-11_GFP.

3.4.3.2.1 Genomanalyse von Δ US2-11_Δpp65_GFP

Zur Verifikation der pp65-Deletion im Genom von Δ US2-11_Δpp65_GFP wurden zunächst PCR-Analysen durchgeführt. Als Kontrolle diente dabei der Stamm Δ US2-11_GFP. Die PCR-Reaktionen wurden wie unter 3.3.2.1 für pHb15 und Δpp65 beschrieben durchgeführt. Die Bindungsstellen der *Primer* in der Sequenz von Δ US2-11_GFP bzw. Δ US2-11_Δpp65_GFP sind in Abbildung 27 B angegeben. Während die Amplifikation der DNA von Δ US2-11_GFP mit den *Primern* SR8 und pp65_rev eine deutliche Bande in erwarteter Größe zeigte, konnte mit dieser *Primer*-Kombination aus der Δ US2-11_Δpp65_GFP-DNA kein PCR-Produkt erhalten und somit gezeigt werden, dass die pp65-Region im Genom der Δ US2-11_Δpp65_GFP-Mutante deletiert war (Abbildung 27 C, links). Um die genaue DNA-Sequenz der Δ US2-11_Δpp65_GFP-Mutante in diesem Bereich untersuchen zu können, sollte anschließend mit Hilfe der stromaufwärts bzw. stromabwärts des pp65-Gens bindenden *Primer* SR8 bzw. BamHIRreverse2 die Deletionsstelle innerhalb der pp65-Region amplifiziert und das entstandene PCR-Produkt sequenziert werden. Während unter Verwendung der Δ US2-11_GFP-DNA als *Template* der gesamte pp65-Bereich amplifiziert werden konnte, lieferte die Δ US2-11_Δpp65_GFP-DNA ein deutlich kürzeres Produkt in erwarteter Größe (Abbildung 27 C, rechts). Durch Sequenzierung dieses PCR-Produkts mit dem *Primer* SR8 konnte die korrekte Deletion des pp65-Gens bestätigt werden.

Zusätzlich konnte mit Hilfe von *Primern*, welche innerhalb der BAC-Vektor-Sequenz bzw. stromaufwärts davon binden konnten, gezeigt werden, dass beide Viren den BAC-Vektor zwischen US1 und US12 in ihrer Sequenz enthielten (Daten nicht gezeigt).

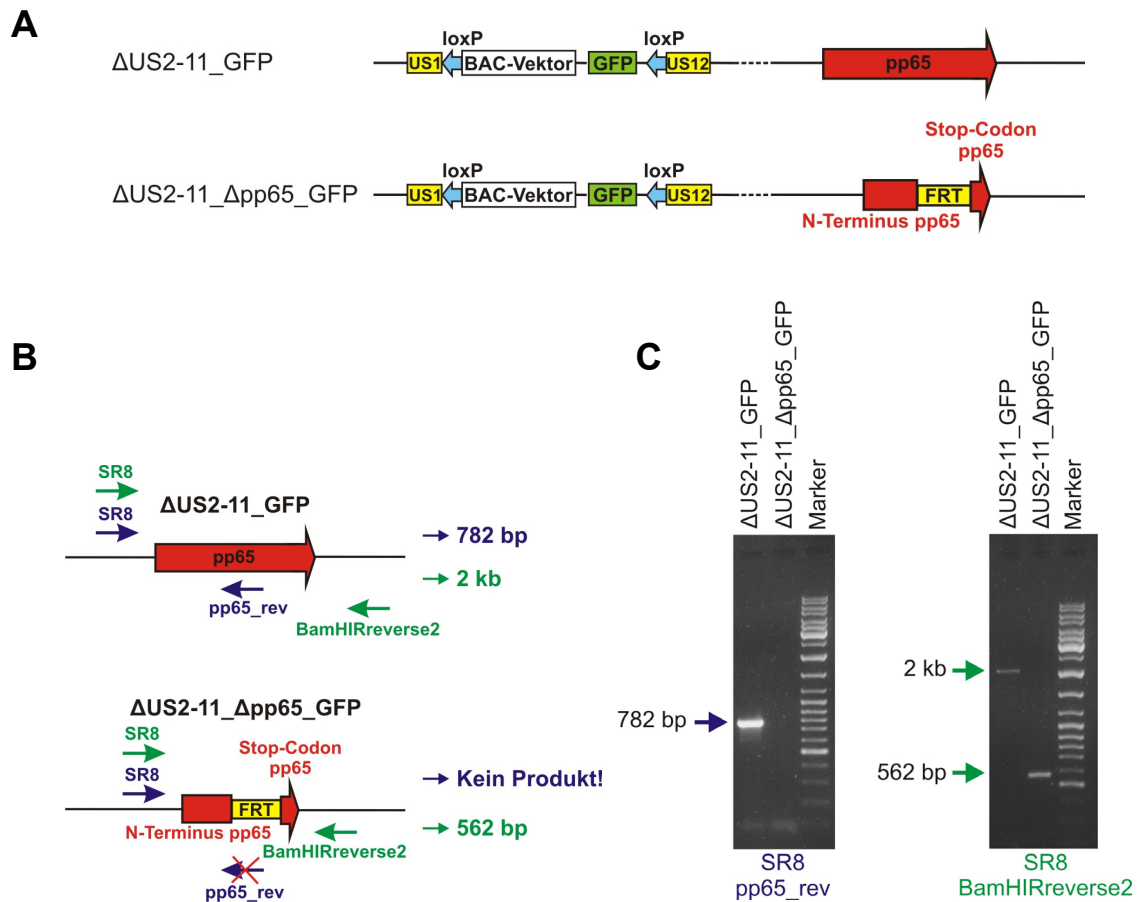


Abbildung 27: Genomanalyse der Viren Δ US2-11_GFP und Δ US2-11_Δpp65_GFP

A: Schematische Darstellung der US2-US11- und der pp65-Region der Viren Δ US2-11_GFP und Δ US2-11_Δpp65_GFP. Der US2-US11-Bereich wurde bei beiden Viren durch den von loxP-sites flankierten BAC-Vektor ersetzt. Zusätzlich tragen die Genome beider Viren eine ebenfalls zwischen den beiden loxP-sites lokalisierte GFP-Expressionskassette.

B: Schematische Darstellung der pp65-Region im Genom der Viren Δ US2-11_GFP und Δ US2-11_Δpp65_GFP. Die Bindungsstellen der verschiedenen *Primer* sind mit Pfeilen markiert. Die Größe des jeweils entstehenden PCR-Produkts ist für jedes Virus und jede *Primer*-Kombination rechts im Schema angegeben.

C: PCR-Analyse der genomischen Struktur der pp65-Region der rekombinanten Viren. Aus Kulturüberständen Δ US2-11_GFP- bzw. Δ US2-11_Δpp65_GFP-infizierter HFF wurde Virus-DNA isoliert und als *Template* zur Amplifikation mit den angegebenen *Primer*-Kombinationen eingesetzt. Dargestellt ist die Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte. Als Molekulargewichtsmarker wurde ein „1-kb-DNA-Ladder“-Mix verwendet. Die Pfeile markieren die jeweiligen Produkte im Gel. Die zugehörigen Größen sind angegeben.

3.4.3.2.2 Untersuchung der Viruspartikel von Δ US2-11_ Δ pp65_GFP

Analog zu der unter 3.3.2.2 beschriebenen Analyse der Viruspartikel von Δ pp65, sollten auch die Viruspartikel von Δ US2-11_ Δ pp65_GFP mittels Western Blot auf das Fehlen des pp65-Proteins hin untersucht werden. Als Kontrolle dienten in diesem Fall die Viruspartikel des Δ US2-11_GFP-Virus, welche einen den Partikeln von pHB15 entsprechenden pp65-Gehalt aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Analog zur der unter 3.3.2.2 für pHB15 und Δ pp65 beschriebenen Vorgehensweise wurden die Viruspartikel von Δ US2-11_GFP und Δ US2-11_ Δ pp65_GFP isoliert, über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit Hilfe des pp65-spezifischen Antikörpers 65-33 bzw. eines pp71-spezifischen polyklonalen Kaninchen-Antiserums auf ihren pp65- bzw. pp71-Gehalt hin untersucht. Zur Normierung der aufgetragenen Menge an Viruspartikeln wurde zusätzlich mit einem gB-spezifischen Antikörper (27-287) gefärbt.

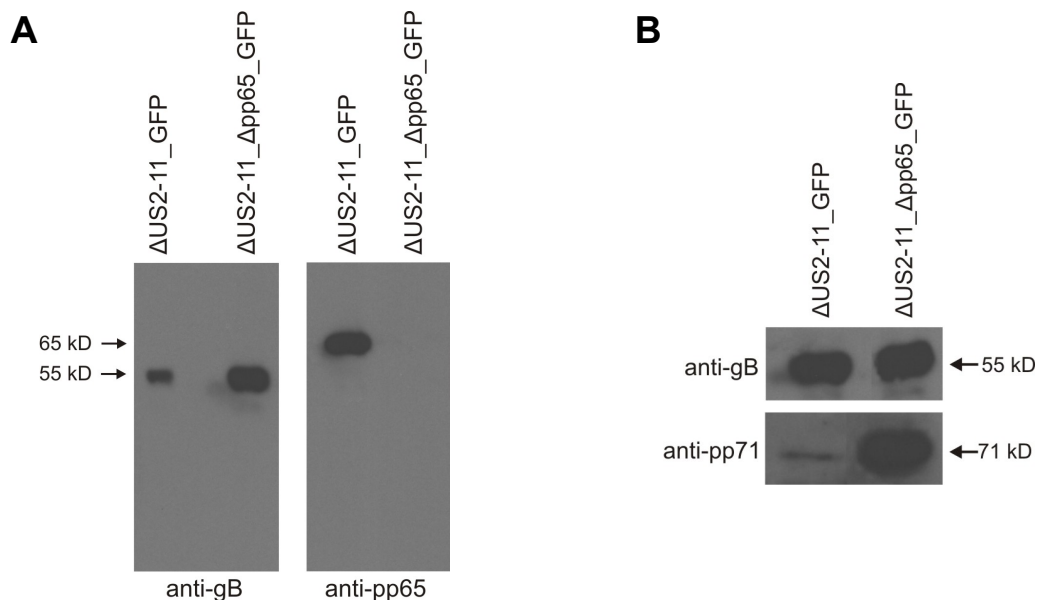


Abbildung 28: Analyse der Viruspartikel von Δ US2-11_GFP und Δ US2-11_ Δ pp65_GFP mittels Western Blot

Viruspartikel von Δ US2-11_GFP bzw. Δ US2-11_ Δ pp65_GFP wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western Blot auf ihren pp65- und pp71-Gehalt hin untersucht. Die Menge an jeweils aufgetragenen Viruspartikeln wurde durch eine Färbung mit dem gB-spezifischen Antikörper 27-287 kontrolliert.

A: Der pp65-Gehalt der Viruspartikel wurde durch Färbung mit dem pp65-spezifischen Antikörper 65-33 bestimmt (rechts). Dargestellt ist außerdem die Kontrollfärbung auf gB (links). Die Belichtungszeit der dargestellten Filme betrug 10 Sekunden.

B: Die Bestimmung des pp71-Gehalts der Viruspartikel erfolgte durch Färbung mit polyklonalem Kaninchen-Antiserum (unten). Dargestellt ist außerdem die Kontrollfärbung auf gB (oben). Die Belichtungszeit der dargestellten Filme betrug 30 Sekunden.

Die Größen der detektierten Proteine sind an den Markierungspfeilen angegeben.

In Abbildung 28 A ist der Nachweis von pp65 dargestellt. Wie man an der gB-Kontrolle deutlich sehen kann, waren für die pp65-Färbung mehr Viruspartikel von Δ US2-11_Δpp65_GFP als von Δ US2-11_GFP in den Western Blot eingesetzt worden. Dennoch konnten bei einer Belichtungszeit von zehn Sekunden in den Viruspartikeln von Δ US2-11_GFP große Mengen an pp65-Protein nachgewiesen werden, während die Viruspartikel von Δ US2-11_Δpp65_GFP keinerlei pp65-Signal zeigten. Auch nach einer Verlängerung der Belichtungszeit auf zehn Minuten konnte in den Δ US2-11_Δpp65_GFP-Partikeln kein pp65 detektiert werden. In Abbildung 28 B ist die Färbung auf pp71 dargestellt. Wie bereits unter 3.3.2.2 erklärt, zeigt das verwendete polyklonale Antiserum eine Kreuzreaktivität mit anderen viralen Antigenen, so dass die Membranen nach der Färbung zahlreiche Hintergrund-Banden aufwiesen. Aus diesem Grund wurden die entsprechenden Banden hier gesondert vom Rest der Membran dargestellt. Mit der gB-spezifischen Färbung konnte gezeigt werden, dass von Δ US2-11_GFP und Δ US2-11_Δpp65_GFP vergleichbare Mengen Viruspartikel in den Western Blot eingesetzt worden waren. Der Gehalt an pp71 hingegen schien in den Partikeln von Δ US2-11_Δpp65_GFP sogar deutlich höher zu sein als in den Partikeln von Δ US2-11_GFP. Warum hier mehr pp71 nachgewiesen werden konnte ist unklar. Da aber auf keinen Fall eine Reduktion des pp71-Gehalts in den Partikeln der Δ US2-11_Δpp65_GFP-Doppelmutante beobachtet werden konnte, konnte davon ausgegangen werden, dass das rekombinante Virus keine Beeinträchtigung der pp71-vermittelten Transaktivierung aufwies.

3.4.3.2.3 Untersuchung der MHC-Klasse-I-restringierten Antigenpräsentation Δ US2-11_Δpp65_GFP-infizierter Zellen

Es sollte zunächst verifiziert werden, dass Δ US2-11_Δpp65_GFP-infizierte Zellen nicht mehr durch pp65-spezifische CTL erkannt werden konnten. Zu diesem Zweck wurden HFF mit einer *moi* von 5 mit Δ US2-11_GFP bzw. Δ US2-11_Δpp65_GFP infiziert und 24 Stunden nach Infektion als Stimulatorzellen in einen IFN- γ -Elispot eingesetzt. Δpp65-infizierte Zellen dienten dabei als Negativkontrolle. Als Effektorzellen wurden pp65-Klon 53 mit einer Zellzahl von 200 CTL/Well eingesetzt. Während Δ US2-11_GFP-infizierte Zellen 24 Stunden nach Infektion eine deutliche IFN- γ -Antwort induzieren konnten, wurden Δ US2-11_Δpp65_GFP-infizierte HFF nur mit dem auch bei Δpp65-infizierten Zellen beobachteten Hintergrund erkannt (Abbildung 29 A).

In der Folge sollte geprüft werden, ob Δ US2-11_Δpp65_GFP-infizierte Zellen effizient durch IE1-spezifische CTL erkannt werden konnten. Dazu wurden HFF mit einer *moi* von 5 mit Δ US2-11_GFP bzw. Δ US2-11_Δpp65_GFP infiziert und 24 Stunden nach Infektion als Zielzellen in einen IFN- γ -Elispot mit IE1-Klon 12 als Effektorzellen eingesetzt. Δpp65-infizierte Zellen dienten dabei erneut als Negativkontrolle. Während Δpp65-infizierte Zellen

erwartungsgemäß nicht durch IE1-Klon 12 erkannt werden konnten, wurden Δ US2-11_App65_GFP-infizierte Zellen 24 Stunden nach Infektion durch IE1-Klon 12 deutlich erkannt. Auffällig war dabei allerdings, dass die Δ US2-11_App65_GFP-infizierten Zellen nur etwa halb so viele Effektorzellen zur IFN- γ -Sekretion induzieren konnten wie die Δ US2-11-GFP-infizierten HFF (Abbildung 29 B).

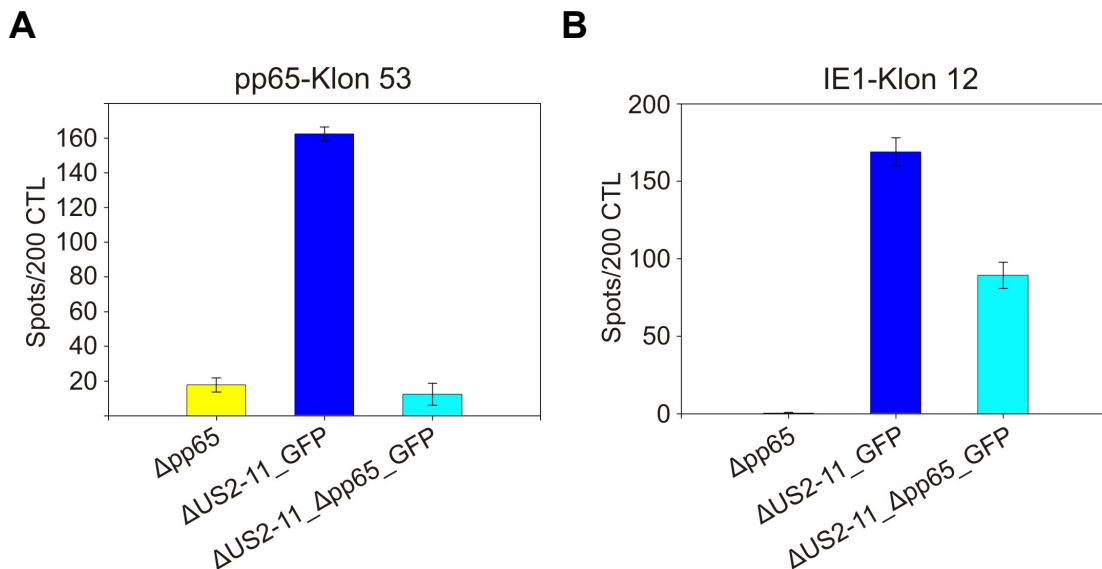


Abbildung 29: IFN- γ -Elispot-Analyse der MHC-Klasse-I-restringierten Präsentation durch Δ US2-11_App65_GFP-infizierte HFF

HFF wurden mit einer *moi* von 5 mit Δ pp65, Δ US2-11_GFP bzw. Δ US2-11_App65_GFP infiziert und 24h p.i. als Stimulatorzellen in einen IFN- γ -Elispot eingesetzt. Als Effektorzellen dienten pp65-Klon 53 (**A**) bzw. IE1-Klon 12 (**B**) mit einer Zellzahl von jeweils 200 CTL/Well. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus Triplikaten errechnet.

Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass der Stamm Δ US2-11_App65_GFP ein geeignetes Werkzeug war, kooperative Effekte von gpUS2-gpUS11 und pp65 bei der Unterdrückung der IE1-Präsentation zu sehr frühen Zeitpunkten nach Infektion zu detektieren.

3.4.3.3 Kooperativer Einfluss von gpUS2-gpUS11 und pp65 auf die IE1-Präsentation zu sehr frühen Zeitpunkten nach Infektion

Um zu klären, ob die Unterdrückung der IE1-Präsentation innerhalb des Zeitraums von 1 bis 12 Stunden nach Infektion eventuell durch eine kooperative Wirkung zwischen der US2-US11-Region und dem Tegumentprotein pp65 herbei geführt wurde, sollte die IE1-Präsentation von Δ US2-11_App65_GFP-infizierten Zellen nach Fixierung im IFN- γ -Elispot überprüft werden. HFF wurden mit einer *moi* von 5 mit Δ pp65, Δ US2-11_GFP oder

Δ US2-11_ Δ pp65_GFP infiziert und 1, 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Infektion mit 0,5% PFA fixiert. Die anschließende Detektion der jeweils vorliegenden IE1-Präsentation erfolgte im IFN- γ -Elispot mit IE1-Klon 12 als Effektorzellen (Abbildung 30 A, links). Als Kontrolle wurde parallel dazu die pp65-Präsentation mit pp65-Klon 53 überprüft. Die beobachtete pp65-Präsentation entsprach zu allen Untersuchungszeitpunkten den Erwartungen. Während Δ pp65- und Δ US2-11_ Δ pp65_GFP-infizierte HFF nicht durch pp65-Klon 53 erkannt werden konnten, zeigten Δ US2-11_GFP-infizierte Zellen ab 3 Stunden nach Infektion eine detektierbare pp65-Präsentation, welche sich, wie bereits nach Δ US2-11-Infektion beobachtet (vgl. Abbildung 25, links), bis zu 24 Stunden nach Infektion schrittweise steigerte (Daten nicht gezeigt). Während die durch Δ pp65 und Δ US2-11-GFP verursachte IE1-Präsentation den bereits in vorherigen Experimenten erhaltenen Ergebnissen entsprach, zeigten Δ US2-11_ Δ pp65_GFP-infizierte Zellen entgegen der Erwartungen zu keinem der untersuchten Zeitpunkte nach Infektion eine stärkere IE1-Präsentation als Δ US2-11-GFP-infizierte Zellen. Vielmehr wurden Δ US2-11_ Δ pp65_GFP-infizierte Zellen deutlich schlechter erkannt als Δ US2-11-GFP-infizierte Zellen. Während Δ US2-11-GFP-infizierte Zellen 12 und 24 Stunden nach Infektion eine deutliche IE1-Präsentation zeigten, konnte zur gleichen Zeit fast keine IE1-Präsentation Δ US2-11_ Δ pp65_GFP-infizierter Zellen beobachtet werden.

Um einen Eindruck von der IE1-Präsentation Δ US2-11_ Δ pp65_GFP-infizierter Zellen zu späteren Zeitpunkten nach Infektion zu gewinnen, wurden daraufhin Fibroblasten erneut mit Δ pp65, Δ US2-11_GFP oder Δ US2-11_ Δ pp65_GFP infiziert und 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Infektion als Zielzellen in einen IFN- γ -Elispot eingesetzt (Abbildung 30 A, rechts). Als Effektorzellen dienten IE1-Klon 12 und zur Kontrolle pp65-Klon 53. Erwartungsgemäß zeigten Δ pp65- und Δ US2-11_ Δ pp65_GFP-infizierte Zellen zu keinem der Untersuchungszeitpunkte pp65-Präsentation, wohingegen Δ US2-11_GFP-infizierte Zellen zu jedem der untersuchten Zeitpunkte nach Infektion eine vergleichbar hohe pp65-Präsentation aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls den Erwartungen entsprach die beobachtete IE1-Präsentation Δ pp65- und Δ US2-11_GFP-infizierter HFF. Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte wurden Δ pp65-infizierte Zellen durch IE1-Klon 12 erkannt, wohingegen Δ US2-11_GFP-infizierte Zellen bis zu 96 Stunden nach Infektion mit ähnlicher Effizienz detektiert werden konnten. Auch Δ US2-11_ Δ pp65_GFP-infizierte Zellen wurden zu jedem der untersuchten Infektionszeitpunkte durch IE1-Klon 12 erkannt, allerdings immer deutlich schlechter als die Δ US2-11_GFP-infizierten Zellen.

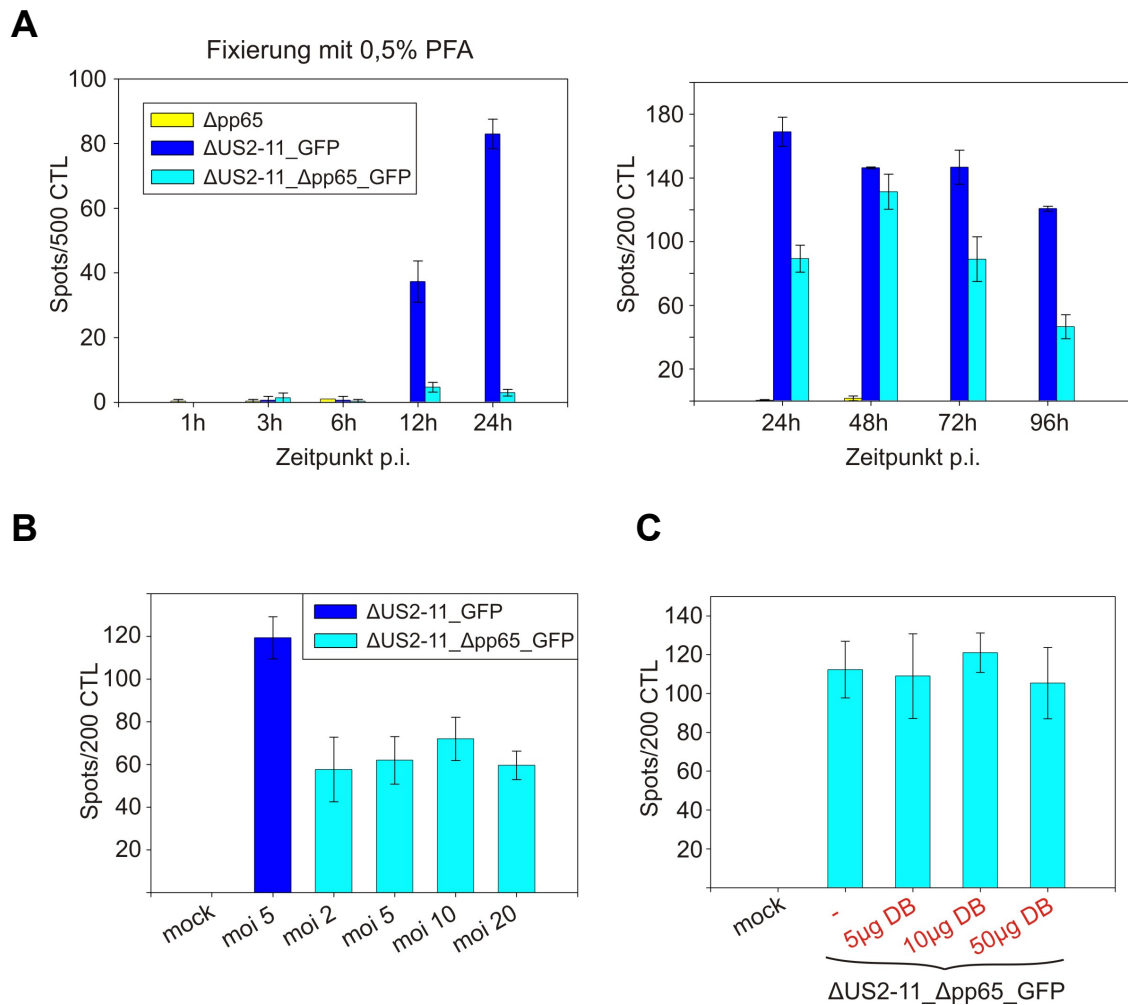


Abbildung 30: Kooperativer Einfluss von gpUS2-gpUS11 und pp65 auf die IE1-Präsentation

A: HFF wurden mit einer *moi* von 5 mit Δ pp65, Δ US2-11_GFP bzw. Δ US2-11_Δpp65_GFP infiziert, zu den angegebenen Zeitpunkten p.i. mit 0,5% PFA fixiert (links) bzw. unbehandelt belassen (rechts) und als Zielzellen in einen IFN- γ -Elispot eingesetzt. Als Zielzellen dienten IE1-Klon 12 mit einer Zellzahl von 500 CTL/Well (links) bzw. 200 CTL/Well.

B: HFF wurden mit den angegebenen *mois* mit Δ US2-11_GFP bzw. Δ US2-11_Δpp65_GFP infiziert und 24h p.i. als Zielzellen in einen IFN- γ -Elispot eingesetzt. Als Effektorzellen dienten IE1-Klon 12 mit einer Zellzahl von 200 CTL/Well.

C: HFF wurden mit einer *moi* von 5 mit Δ US2-11_Δpp65_GFP infiziert und gleichzeitig mit den angegebenen Mengen an DBs versetzt. Nach 24h wurden die unterschiedlich behandelten Zellen als Zielzellen in einen IFN- γ -Elispot mit IE1-Klon 12 als Effektorzellen eingesetzt. Mock-infizierte Zellen dienten als Negativkontrolle. Die Effektorzellen wurden in einer Zellzahl von 200 CTL/Well eingesetzt.

Die in **(A)**, **(B)** und **(C)** dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden jeweils aus Triplikaten errechnet.

Um zu klären, ob diese zu allen untersuchten Zeitpunkten nach Infektion beobachtete Differenz in der IE1-Präsentation Δ US2-11_GFP- und Δ US2-11_ Δ pp65_GFP-infizierter Zellen durch eine Erhöhung der Infektionsdosis aufgehoben werden konnte, wurden HFF mit einer *moi* von 5 mit Δ US2-11_GFP und mit verschiedenen Infektionsdosen von Δ US2-11_ Δ pp65_GFP infiziert und 24 Stunden nach Infektion als Zielzellen in einen IFN- γ -Elispot eingesetzt. Mock-infizierte HFF dienten als Negativkontrolle. Als Effektorzellen wurden IE1-Klon 12 verwendet (Abbildung 30 B). Eine Erhöhung der *moi* konnte die IE1-Präsentation Δ US2-11_ Δ pp65_GFP-infizierter Zellen 24 Stunden nach Infektion jedoch nicht signifikant erhöhen. Um abschließend zu überprüfen, ob das pp65-Protein eventuell entgegen den Erwartungen einen positiven Effekt auf die IE1-Präsentation ausüben könnte und daher Δ US2-11_ Δ pp65_GFP-infizierte Zellen im gesamten Verlauf der Infektion deutlich schlechter als Δ US2-11_GFP-infizierte Zellen erkannt werden konnten, wurden Fibroblasten mit einer *moi* von 5 mit Δ US2-11_ Δ pp65_GFP infiziert und nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an pp65 in Form subviraler DBs 24 Stunden nach Infektion bzw. DB-Beladung im IFN- γ -Elispot untersucht. Als Effektorzellen dienten IE1-Klon 12 (Abbildung 30 C). Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe subviraler DBs zu Δ US2-11_ Δ pp65_GFP-infizierten Zellen die IE1-Präsentation nicht erhöhen und somit das Fehlen von pp65 in den Δ US2-11_ Δ pp65_GFP-infizierten Zellen nicht die Erklärung für die reduzierte IE1-Präsentation sein konnte.

Δ US2-11_ Δ pp65_GFP-infizierte Zellen wurden also im gesamten Verlauf der Infektion deutlich schlechter erkannt als Δ US2-11_GFP-infizierte Zellen. Eine Erklärung hierfür konnte mit Hilfe der hier durchgeführten Experimente nicht gefunden werden. Die ursprüngliche Idee allerdings, dass die zusätzliche Entfernung von pp65 in dem bereits US2-US11-negativen Kontext die fehlende IE1-Präsentation zwischen 1 und 12 Stunden nach Infektion regenerieren könnte, konnte anhand der links in Abbildung 30 A dargestellten Ergebnisse falsifiziert werden.

3.5 Einfluss des Immunevasins gpUS11 auf die MHC-Klasse-I-restringierte Präsentation von pp65 und IE1

Obwohl über die molekularen Wirkmechanismen der einzelnen Immunevasine in transienten Transfektionssystemen relativ viel bekannt ist (siehe 1.3.1), gibt es kaum Informationen über ihre Bedeutung für die Antigenpräsentation im Rahmen einer HCMV-Infektion. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl die pp65- als auch die IE1-Präsentation infizierter Zellen durch US2-US11 beeinträchtigt wird, wobei sich allerdings das Ausmaß der Beeinflussung deutlich unterscheidet. Da dabei nur die gesamte US2-US11-

Region untersucht werden konnte, war eine Beurteilung der Bedeutung einzelner Immunevasine in diesem Zusammenhang nicht möglich. Um dies an einem ersten Beispiel zu versuchen, sollte eine Virusmutante verwendet werden, welche von den vier Immunevasinen gpUS2, gpUS3, gpUS6 und gpUS11 nur noch das gpUS11 exprimieren konnte. Zur Herstellung einer solchen Virusmutante wurde das HCMV-BAC pHB5 verwendet, dessen US2-US6-Region durch den BAC-Vektor ersetzt worden war (Borst *et al.*, 1999). Das aus pHB5 rekonstituierte Virus enthielt also nur noch den US7-US11-Bereich der entsprechenden Immunevasionsregion und konnte daher zur Untersuchung der Funktion des Immunevasins gpUS11 herangezogen werden. Dazu sollte zunächst der Einfluss von gpUS11 auf die HLA-A2-Oberflächenexpression HCMV-infizierter Zellen im Verlauf der Infektion untersucht und mit dem der gesamten US2-US11-Region verglichen werden. Wie unter 3.2 bereits für Ad169 und Δ US2-11 beschrieben, wurden hierzu HLA-A2-positive HFF mit einer *moi* von 2 mit pHB5 infiziert und ihre HLA-A2-Oberflächenexpression 24 und 96 Stunden nach Infektion im FACS bestimmt. Als Kontrolle dienten *mock*-infizierte HFF. Die im Verlauf der Infektion mit pHB5 beobachtete Reduktion der HLA-A2-Oberflächenexpression war mit der in Abbildung 12 B dargestellten Reduktion der HLA-A2-Oberflächenexpression nach Ad169-Infektion vergleichbar (Abbildung 31 A). Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass gpUS11 alleine ausreichend war, eine Reduktion der HLA-A2-Oberflächenexpression zu bewirken, die mit der gpUS2-gpUS11-vermittelten Reduktion vergleichbar war.

Hierauf aufbauend wurde der Stamm pHB5 verwendet, um den Einfluss von gpUS11 auf die pp65- bzw. IE1-spezifische MHC-Klasse-I-Präsentation zu untersuchen. In einem ersten Versuch wurden HFF mit einer *moi* von 5 mit pHB15, Δ US2-11 und pHB5 infiziert und 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Infektion die MHC-Klasse-I-restringierte pp65- bzw. IE1-Präsentation in einem IFN- γ -Elispot untersucht. Pp65-Klon 53 und IE1-Klon 12 dienten dabei als Effektorzellen. Als Negativkontrolle wurden Δ pp65-infizierte HFF herangezogen, da diese weder durch pp65- noch durch IE1-spezifische CTL erkannt werden können (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 31 B ist die US2-US11-Region von pHB15, pHB5 und Δ US2-11 schematisch dargestellt. Während pHB15 die gesamte Immunevasionsregion enthält, ist diese bei Δ US2-11 vollständig und bei pHB5 bis auf die Region von US7 bis US11 deletiert. Somit werden durch pHB15-infizierte Zellen gpUS2, gpUS3, gpUS6 und gpUS11 exprimiert, wohingegen pHB5-infizierte Zellen nur das gpUS11 und Δ US2-11-infizierte Zellen keines dieser vier Immunevasine exprimieren können.

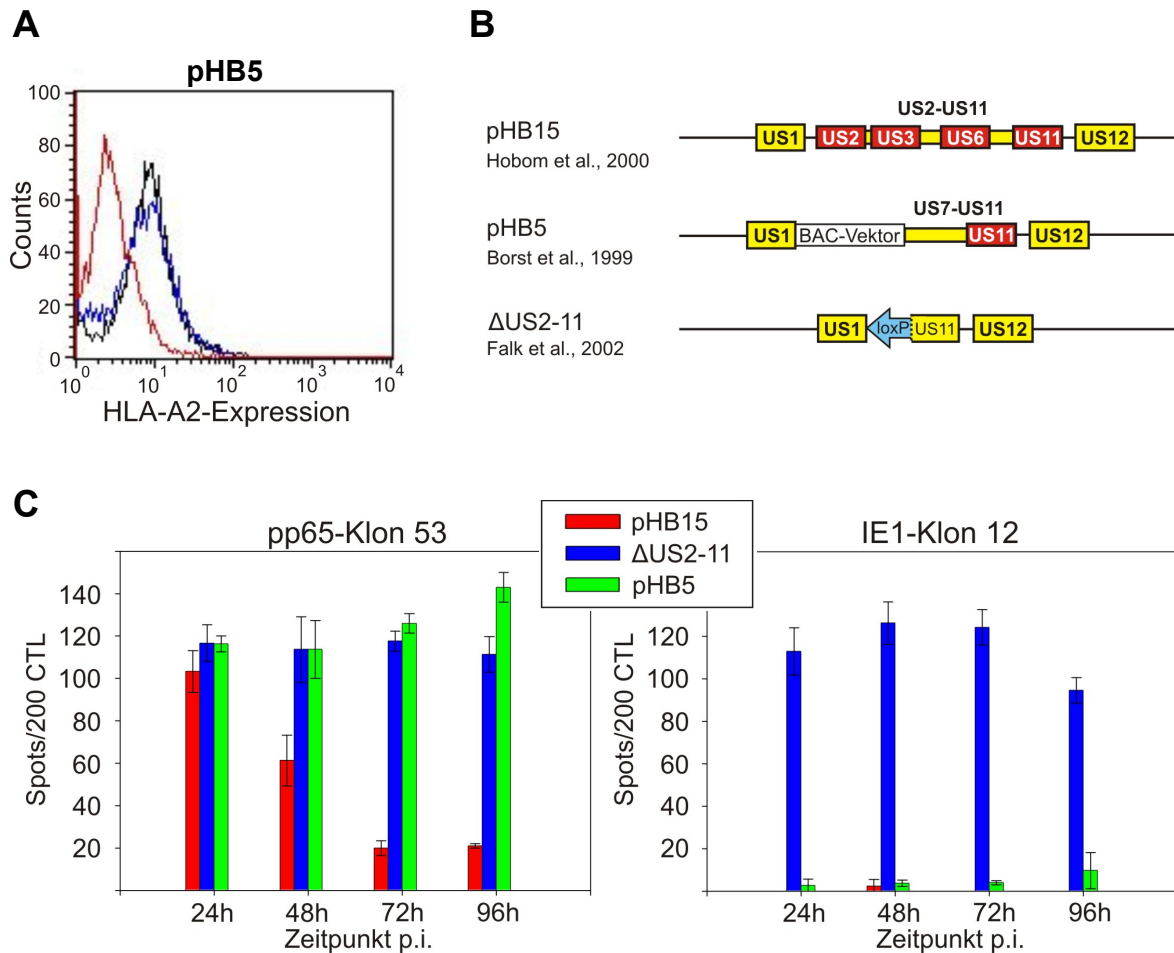


Abbildung 31: Einfluss des Immunevasins gpUS11 auf die MHC-Klasse-I-restringierte pp65- und IE1-Präsentation im Verlauf der Infektion

A: HLA-A2-positive HFF wurden mit einer *moi* von 2 mit pHB5 infiziert und ihre HLA-A2-Oberflächenexpression zu den angegebenen Zeitpunkten p.i. im Vergleich zu *mock*-infizierten HFF im FACS bestimmt. Dazu wurde ein HLA-A2-spezifischer, FITC-gekoppelter Antikörper (BB7.2) verwendet. Als Isotypkontrolle diente ein ebenfalls FITC-gekoppelter Antikörper des gleichen Isotyps.

B: Schematische Darstellung der Immunevasionsregion von pHB15, pHB5 und Δ US2-11. Intakte Immunevasionsgene sind rot markiert.

C: HFF wurden mit einer *moi* von 5 mit pHB15, Δ US2-11 oder pHB5 infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten p.i. als Zielzellen in einen IFN- γ -Elispot eingesetzt. Als Effektorzellen wurden pp65-Klon 53 bzw. IE1-Klon 12 mit einer Zellzahl von 200 CTL/Well verwendet. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus Triplikaten errechnet.

pHB15- und Δ US2-11-infizierte Zellen wurden sowohl von pp65-Klon 53 als auch von IE1-Klon 12 erwartungsgemäß erkannt. Überraschenderweise konnten die Zellen nach Infektion mit pHB5 zu allen untersuchten Zeitpunkten mit gleich bleibend hoher Effizienz durch pp65-Klon 53 erkannt werden, wohingegen keinerlei Erkennung pHB5-infizierter HFF durch IE1-Klon 12 beobachtet werden konnte (Abbildung 31 C).

Während das von pHb5-infizierten Zellen exprimierte gpUS11 also keinerlei Einfluss auf die pp65-Präsentation zu haben schien, war es offensichtlich ausreichend, die IE1-Präsentation vollständig zu unterdrücken. Erwartungsgemäß lies sich auch nach Fixierung der pHb5-infizierten Zellen zu Zeitpunkten zwischen 1 Stunde und 24 Stunden nach Infektion keinerlei IE1-Präsentation nachweisen (Daten nicht gezeigt). Das Immunevasin gpUS11 war also in der Lage, die IE1-Präsentation infizierter Zellen im gesamten Verlauf der Infektion vollständig zu unterdrücken, konnte die pp65-Präsentation dahingegen aber zu keinem der untersuchten Zeitpunkte beeinflussen.

3.6 Einfluss von cmvIL-10 auf die MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation nicht infizierter APCs

Die bisher in der vorliegenden Arbeit untersuchten Immunevasionsmechanismen waren in ihrer Wirkungsweise auf HCMV-infizierte Zellen beschränkt und konnten daher die für die Stimulation einer HCMV-spezifischen CTL-Antwort wichtige Kreuzpräsentation viraler Antigene durch nicht infizierte pAPCs (Arrode *et al.*, 2000; Arrode *et al.*, 2002; Pepperl *et al.*, 2000; Tabi *et al.*, 2001) nicht beeinflussen. Zur effizienten Verhinderung einer CD8⁺-T-Zell-Antwort wären daher immunevasive Mechanismen des Virus erforderlich, die die MHC-Klasse-I-restringierte Erkennung nicht infizierter Nachbarzellen verhindern könnten. Das durch HCMV kodierte Homolog des humanen Zytokins IL-10 (cmv-IL10) stellt einen hierfür geeigneten Kandidaten dar. Es wird von infizierten Zellen freigesetzt (Kotenko *et al.*, 2000) und akkumuliert im Verlauf der Infektion im Kulturüberstand (Chang *et al.*, 2004). Obwohl das virale IL-10 nur eine 27%ige Übereinstimmung mit dem humanen IL-10 aufweist, erfolgt die Signalübertragung über den humanen IL-10-Rezeptorkomplex (Jones *et al.*, 2002; Kotenko *et al.*, 2000). Ähnlich wie dem humanen IL-10 konnten auch dem cmvIL-10 bereits verschiedene immunsuppressive Funktionen zugeschrieben werden (Spencer *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2004; Raftery *et al.*, 2004). Von besonderer Bedeutung für eine eventuelle Suppression der CD8⁺-T-Zell-Erkennung war hierbei die Beobachtung, dass in einigen Fällen durch rekombinantes cmvIL-10 eine Reduktion der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression LPS-stimulierter Monozyten hervorgerufen werden konnte (Spencer *et al.*, 2002). Eventuelle Auswirkungen dieser Reduktion auf die MHC-Klasse-I-restringierte Antigenerkennung und damit auf die T-Zell-Stimulation wurden in diesem Zusammenhang allerdings nicht untersucht. Darüber hinaus ließ die rekombinante Expression des viralen IL-10-Homologs keine Schlüsse über die Funktion des Zytokins im Kontext einer Virusinfektion zu. Infizierte Zellen setzen neben dem cmvIL-10 eine Reihe von löslichen Mediatoren wie beispielsweise Interferone frei, welche geeignet sind, den durch cmvIL-10 induzierten Effekt zu beeinflussen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher der Einfluss von cmvIL-10 auf die MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation nicht infizierter Zellen im Kontext der Virusinfektion untersucht werden. In Vorarbeiten von Frau Dr. Pepperl-Klindworth konnte auf dem Hintergrund des HCMV-Laborstamms Ad169 eine cmvIL-10-Deletionsmutante hergestellt werden, in der die für Rezeptorbindung und Signalübertragung essentielle Region des cmvIL-10 zerstört worden war. Die entsprechende Region der resultierenden cmvIL-10-Deletionsmutante RVAdIL10C ist in Abbildung 32 schematisch dargestellt.



Abbildung 32: Schematische Darstellung der cmvIL-10-Region (UL111a) im Genom der Stämme Ad169 bzw. RVAdIL10C.

A: Schematische Darstellung der cmvIL-10-Region (UL111a). Die drei Exons des cmvIL-10-Gens sind als gelbe Balken dargestellt, die gestrichelten Linien stellen die Introns dar. Die blauen Punkte markieren die AS, welche den Bereich des cmvIL-10 flankieren, der zur Herstellung von RVAdIL10C deletiert wurde. Die genauen Positionen sind angegeben. Die Exon-Intron Struktur der mRNA des cmvIL-10-Gens ist oberhalb des UL111a-Bereichs als Pfeil dargestellt. Die gestrichelten Linien stellen erneut die Introns dar.

B: Schematische Darstellung der cmvIL-10-Region im Genom von Ad169 bzw. RVAdIL10C. Der Bereich zwischen den mit blauen Punkten markierten AS 49 und AS 174 wurde zur Herstellung der IL-10-Deletionsmutante RVAdIL10C deletiert.

Die erfolgreiche Entfernung des cmvIL-10 konnte in Northern Blot - Analysen bestätigt werden. Während 96 Stunden nach Infektion aus Ad169-infizierten Fibroblasten große Mengen an cmvIL-10-RNA isoliert werden konnten, zeigten RVAdIL10C-infizierte Zellen zum untersuchten Zeitpunkt keine entsprechende RNA-Bande. Anschließend durchgeführte Wachstumskinetiken zeigten keinerlei Unterschied zwischen der cmvIL-10-Deletionsmutante und dem entsprechenden parentalen Virusstamm (Pepperl-Klindworth *et al.*, 2006). Mit Hilfe dieser cmvIL-10-Deletionsmutante sollte nun der Einfluss von cmvIL-10 auf die Antigenpräsentation durch nicht infizierte Zellen untersucht werden. Da die Analyse des durch cmvIL-10 induzierten Effekts auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression primärer hämatopoetischer Zellen aufgrund der Variabilität der unterschiedlichen Spender kein eindeutiges Ergebnis liefern konnte (Spencer *et al.*, 2002), sollte in der vorliegenden Arbeit die humane Monozyten-Zelllinie THP-1 verwendet werden. In der Vergangenheit konnte bereits gezeigt werden, dass THP-1-Zellen eine IL-10-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion aufweisen (Murthy *et al.*, 2000). Aufgrund der großen Heterogenität verschiedener THP-1-Zell-Klone sollte allerdings im Rahmen der vorliegenden Arbeit

dennoch überprüft werden, ob die verwendeten Zellen den humanen IL-10-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimierten. In einer FACS-Analyse mit dem für den humanen IL-10-Rezeptor spezifischen Antikörper Klon 37607.11 konnte die IL-10-Rezeptor-Expression auf der Oberfläche der verwendeten THP-1-Zellen verifiziert werden (Abbildung 33). Die ausgesuchte Zelllinie sollte also in der Lage sein, durch IL-10-Rezeptor-vermittelte Signalübertragung auf cmvIL-10 zu reagieren.

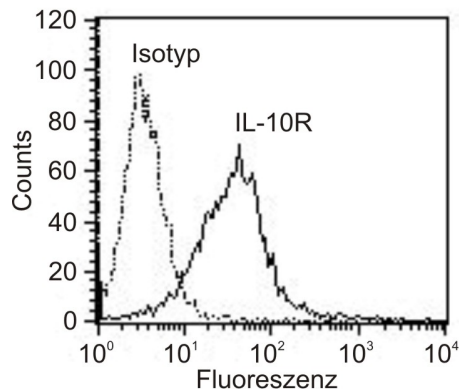


Abbildung 33: FACS-Analyse der Oberflächenexpression des humanen IL-10-Rezeptors auf THP-1-Zellen

THP-1-Zellen wurden mit dem IL-10-Rezeptor-spezifischen Antikörper Klon 37607.11 gefärbt und anschließend im FACS untersucht. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte mit einem FITC-markierten Sekundärantikörper. Die Isotypkontrolle ist dargestellt.

IL-10R: IL-10-Rezeptor

Um definierte experimentelle Bedingungen zu schaffen, wurden Kulturüberstände von Fibroblasten, die mit der cmvIL-10-Deletionsmutante RVAdIL10C infiziert worden waren, mit definierten Mengen an rekombinantem cmvIL-10 versetzt. Die so konditionierten Kulturüberstände wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf die MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation durch THP-1-Zellen untersucht. Die biologische Aktivität des verwendeten rekombinanten cmvIL-10 wurde zuvor mit Hilfe der Zelllinie 16-9(IL-10R1/ γ R1/IL-10R2) überprüft. Diese Zellen wurden uns freundlicherweise von Dr. Kotenko, Newark, New Jersey, USA, zur Verfügung gestellt. Um die Detektion einer durch IL-10 induzierten biologischen Aktivität zu erleichtern, war diese auf 16-9-Hamsterzellen basierende Zelllinie stabil mit einem Fusionsprotein aus der IL-10-Bindedomäne des IL-10-Rezeptors und der transmembranen und intrazellulären Domäne der R1-Kette des IFN- γ -Rezeptors transfiziert worden (Kotenko *et al.*, 1997). Durch die Aktivierung dieses modifizierten Rezeptors wurde in den Zellen eine IFN- γ -Antwort ausgelöst, welche unter anderem eine Erhöhung der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression beinhaltete (Kotenko *et al.*, 1997; Kotenko *et al.*, 2000). 16-9(IL-10R1/ γ R1/IL-10R2)-Zellen wurden für 24 Stunden mit 100 pg/ml bzw. 10 ng/ml rekombinantem cmvIL-10 behandelt und anschließend ihre MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression mit dem MHC-Klasse-I-spezifischen Antikörper W6/32 untersucht. Als Kontrolle dienten *mock*-behandelte Zellen. Die in Abhängigkeit von der jeweiligen cmvIL-10-Konzentration ansteigende MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression der 16-9(IL-10R1/ γ R1/IL-10R2)-Zellen entsprach der erwarteten IFN- γ -Antwort und konnte somit

als Beweis der IL-10-Rezeptor-vermittelten Wirkungsweise des rekombinanten cmvIL-10 herangezogen werden (Abbildung 34).

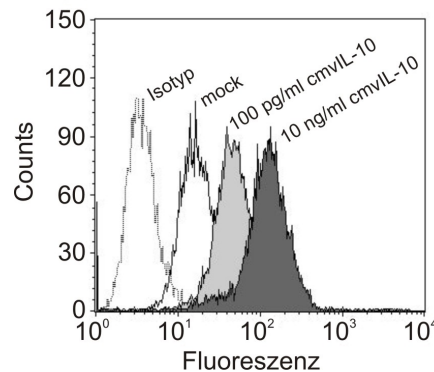


Abbildung 34: FACS-Analyse zur Untersuchung der biologischen Aktivität des rekombinanten cmvIL-10

16-9 Hamsterzellen, welche einen chimären Rezeptor aus extrazellulärer Domäne des IL-10-Rezeptors und transmembraner und intrazellulärer Domäne des IFN- γ -Rezeptors exprimieren (16-9(IL-10R1/ γ R1/IL-10R2)-Zellen) wurden für 24 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen an rekombinatem cmvIL-10 behandelt und anschließend per FACS auf ihre MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression untersucht. Dazu wurde der MHC-Klasse-I-spezifische Antikörper W6/32 verwendet. *Mock*-behandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte mit einem FITC-markierten Sekundärantikörper. Der Anstieg der MHC-Klasse-I-Expression nach cmvIL-10-Behandlung wird durch eine durch den chimären Rezeptor ausgelöste IFN- γ -Antwort hervorgerufen.

Um den von cmvIL-10 hervorgerufenen Effekt vor dem Hintergrund der anderen, ebenfalls durch HCMV-infizierte Zellen freigesetzten Substanzen untersuchen zu können, wurden Überstände RVAdIL10C-infizierter HFF sieben Tage nach Infektion mit unterschiedlichen Mengen an rekombinatem cmvIL-10 versetzt und anschließend zur Behandlung von THP-1-Zellen eingesetzt. Da die MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation nicht infizierter Zellen untersucht werden sollte, musste gewährleistet werden, dass die verwendeten THP-1-Zellen durch die Zugabe der Virusüberstände nicht infiziert worden waren. Obwohl diese Zellen für die Replikation von HCMV nicht permissiv sind (Daten nicht gezeigt und (Weinshenker *et al.*, 1988)), wurden die verwendeten RVAdIL10C-Virusüberstände dennoch vor der Zugabe des cmvIL-10 durch Filtration von infektiösen Viruspartikeln befreit. Die erfolgreiche Entfernung infektiöser Viruspartikel konnte anschließend über eine Immunfluoreszenz-Analyse von mit diesem Überstand infizierten HFF bestätigt werden. 48 Stunden nach „Infektion“ konnten keine IE1-positiven Zellen nachgewiesen werden, während Zellen, die mit dem Original-Überstand infiziert worden waren, zu fast 100% ein deutliches IE1-Signal zeigten (Daten nicht gezeigt). Die THP-1-Zellen wurden für 48 Stunden mit dem mit cmvIL-10 versetzten virusfreien RVAdIL10C-Überstand behandelt, anschließend mit pp65- bzw. IE1-Peptid in einer Konzentration von 10^{-6} M beladen und direkt als Zielzellen in

einen vier Stunden CFT eingesetzt. Als Effektorzellen wurden pp65-Klon 53 bzw. IE1-Klon 12 in einem E/Z von 30:1 verwendet. Unbeladene THP-1-Zellen dienten jeweils als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurden mit RVAdIL10C-Überstand behandelte THP-1-Zellen eingesetzt, welche zuvor mit dem jeweiligen Peptid beladen worden waren (Abbildung 35).

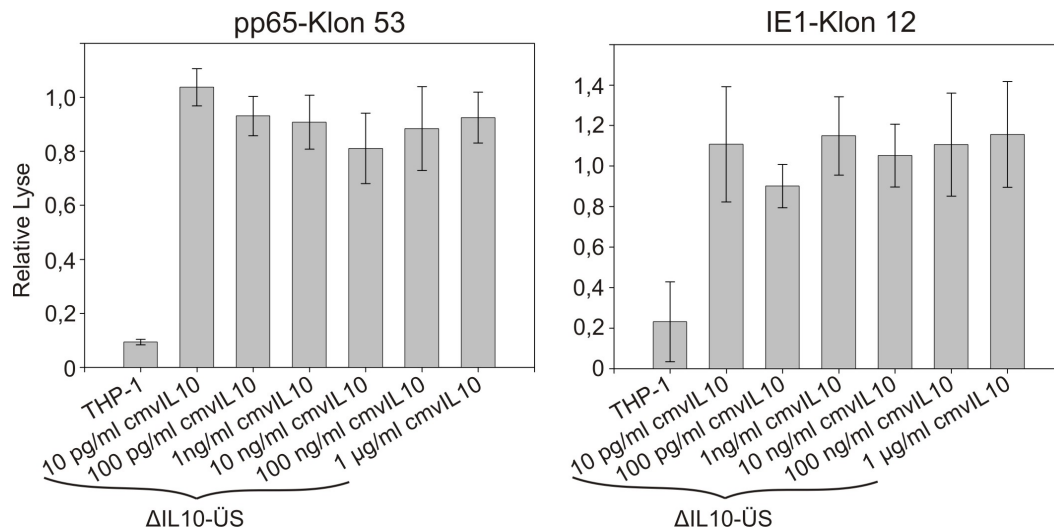


Abbildung 35: CFT zur Analyse des Einflusses von cmvIL-10 auf die MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation nicht infizierter THP-1-Zellen

THP-1-Zellen wurden für 48 Stunden mit virusfreiem Überstand RVAdIL10C-infizierter HFF (Δ IL10-ÜS) behandelt. Dieser Überstand war 7 Tage nach Infektion der HFF gewonnen worden. Während der 48-stündigen Inkubation wurde der Δ IL10-ÜS mit den angegebenen Konzentrationen an rekombinantem cmvIL-10 versetzt. Anschließend wurden die behandelten Zellen mit pp65- bzw. IE1-Peptid in einer Konzentration von 10^{-6} M beladen und als Zielzellen in einen 4 Stunden CFT eingesetzt. Pp65-Klon 53 (links) bzw. IE1-Klon 12 (rechts) dienten in einem E/Z von 30:1 als Effektorzellen. Die nach Behandlung mit Δ IL10-ÜS ohne Zugabe von cmvIL-10 beobachtete Lyse peptidbeladener THP-1-Zellen wurde als 100% definiert. Die nach Zugabe von verschiedenen Mengen des cmvIL-10 auftretende Lyse wurde als dazu relative Lyse angegeben. Als Hintergrund ist jeweils die Lyse unbehandelter THP-1-Zellen ohne Peptid dargestellt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus 3 unabhängigen Experimenten ermittelt.

Durch die Zugabe von cmvIL-10 konnte keine signifikante Veränderung der Erkennung der Zellen durch pp65- bzw. IE1-spezifische CTL beobachtet werden. Weder die pp65- noch die IE1-Präsentation der THP-1-Zellen wurde demnach durch die Behandlung mit cmvIL-10 dergestalt beeinflusst, dass es sich in einer veränderten CTL-Erkennung bemerkbar gemacht hätte. Diese Ergebnisse deuten zusammen mit anderen in der Arbeitsgruppe zuvor erhaltenen Ergebnissen (Pepperl-Klindworth *et al.*, 2006) darauf hin, dass cmvIL-10 im Rahmen der Virusinfektion keinen direkten Einfluss auf die MHC-Klasse-I-restringierte Erkennung von nicht infizierten pAPCs hat.

4 Diskussion

Das Humane Cytomegalovirus (HCMV) ist ein Erreger von großer klinischer Bedeutung. Während eine Infektion bei immunkompetenten Personen in der Regel sehr effizient durch das Immunsystem kontrolliert und damit die Entwicklung von Krankheitssymptomen verhindert werden kann, kommt es bei Patienten mit geschwächtem oder unausgereiftem Immunsystem trotz antiviraler Therapie oft zu schwerwiegenden Erkrankungen. Bei der immunologischen Kontrolle einer Infektion mit HCMV spielen besonders CD8⁺-T-Zellen eine entscheidende Rolle (Riddell *et al.*, 1991b; Reusser *et al.*, 1991; Riddell *et al.*, 1992; Walter *et al.*, 1995; Einsele *et al.*, 2002; Peggs *et al.*, 2003). Obwohl diese gegen ein breites Spektrum an viralen Zielstrukturen gerichtet zu sein scheinen (Elkington *et al.*, 2003; Sylwester *et al.*, 2005), wurde in diesem Zusammenhang den HCMV-Proteinen pp65 und IE1 bisher besondere Aufmerksamkeit geschenkt. CTL dieser beiden Spezifitäten werden im Blut gesunder, HCMV-seropositiver Spender mit hohen Prävalenzen und Frequenzen gefunden (Laughlin-Taylor *et al.*, 1994; Wills *et al.*, 1996; Boppana & Britt, 1996; Borysiewicz *et al.*, 1988a; Borysiewicz *et al.*, 1988b; Kern *et al.*, 1999; Gyulai *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2002). Außerdem scheinen sie maßgeblich an der Vermittlung von Schutz vor HCMV-bedingten Erkrankungen beteiligt zu sein (Riddell *et al.*, 1992; Walter *et al.*, 1995; Bunde *et al.*, 2005; Cobbold *et al.*, 2005). Diese offensichtlich protektive HCMV-spezifische CD8⁺-T-Zell-Antwort steht dabei im Widerspruch zu der in *in vitro* - Systemen beobachteten Fähigkeit des Virus, durch verschiedene immunevasive Strategien die MHC-Klasse-I-Präsentation zu verhindern und somit einer Erkennung durch zytotoxische T-Zellen zu entgehen. Die Möglichkeit, dass diese *in vitro* beobachtete Unterdrückung der MHC-Klasse-I-Präsentation auf die Präsentation viraler Antigene *in vivo* gar keinen Einfluss haben könnte, erscheint aufgrund einer kürzlich veröffentlichten Arbeit aus dem HCMV-System eher unwahrscheinlich. Hier hatte gezeigt werden können, dass die MHC-Klasse-I-Präsentation viraler Antigene auch *in vivo* durch die CMV-vermittelte Immunevasion verhindert werden kann (Holtappels *et al.*, 2004). Trotz des großen Interesses, welches einerseits der US2-US11-vermittelten Immunevasion und andererseits der pp65- bzw. IE1-spezifischen antiviralen CD8⁺-T-Zell-Antwort entgegen gebracht wurde, war über die Auswirkungen der Immunevasion auf die Präsentation dieser beiden am besten untersuchten Zielantigene von HCMV zu Beginn der vorliegenden Arbeit nichts bekannt. Stattdessen wurde das mehrfach beobachtete Fehlen einer IE1-spezifischen Erkennung HCMV-infizierter Fibroblasten *in vitro* (Gilbert *et al.*, 1993; Khan *et al.*, 2002) durch eine selektive Unterdrückung der IE1-Präsentation durch das Tegumentprotein pp65 erklärt (Gilbert *et al.*, 1996).

Gegenstand der vorliegenden Arbeit sollte es daher sein, die Auswirkungen der US2-US11-vermittelten Immunevasion auf die pp65- bzw. IE1-spezifische MHC-Klasse-I-Präsentation zu untersuchen und darüber hinaus die von Gilbert und Kollegen beobachtete Unterdrückung

der IE1-Präsentation durch pp65 zu überprüfen und in den Kontext einer möglichen US2-US11-vermittelten Unterdrückung der IE1-Präsentation einzuordnen.

Die US2-US11-vermittelte Immunevasion ist in ihrer Wirkungsweise auf infizierte Zellen beschränkt und kann daher die MHC-Klasse-I-Präsentation nicht infizierter Nachbarzellen nicht beeinflussen. In Zellkultur-Systemen konnte jedoch gezeigt werden, dass virales Antigen von HCMV-infizierten Zellen durch nicht permissive pAPCs wie DCs oder Makrophagen aufgenommen und effizient über MHC-Klasse-I präsentiert werden kann (Arrode *et al.*, 2000; Arrode *et al.*, 2002; Tabi *et al.*, 2001). Dieses als Kreuzpräsentation bezeichnete Phänomen stellt nach bisherigem Kenntnisstand einen wesentlichen Mechanismus für die effiziente Stimulation einer CD8⁺-T-Zell-Antwort *in vivo* dar. Um nun diesen alternativen Weg der T-Zell-Aktivierung ebenfalls zu unterwandern, wäre eine immunevasive Funktion des Virus erforderlich, welche die MHC-Klasse-I-Präsentation nicht infizierter Nachbarzellen und damit die Kreuzpräsentation mit daraus folgender Stimulation einer CTL-Antwort durch pAPCs verhindern kann. Ein Kandidat hierfür ist das von HCMV kodierte IL-10-Homolog cmvIL-10 (Kotenko *et al.*, 2000; Lockridge *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit sollte daher nach einem möglichen Einfluss dieses viralen Zytokins auf die MHC-Klasse-I-Kreuzpräsentation viraler Antigene im Kontext einer HCMV-Infektion gesucht werden.

Die Messung der antigenspezifischen MHC-Klasse-I-Präsentation sollte mit Hilfe pp65- bzw. IE1-spezifischer CTL-Klone erfolgen, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Peptidimmunisierung von HLA-A2-transgenen Mäusen mit immundominanten, HLA-A2-restringierten Peptiden aus pp65 bzw. IE1 generiert werden sollten.

4.1 Messung der antigenspezifischen MHC-Klasse-I-Präsentation

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen der pp65- bzw. IE1-spezifischen MHC-Klasse-I-Präsentation wurden mit Hilfe antigenspezifischer CTL-Klone durchgeführt. Aufgrund ihrer Langlebigkeit unter Zellkulturbedingungen wurden hierzu murine CTL-Klone verwendet, welche durch Peptidimmunisierung HLA-A2-transgener Mäuse etabliert werden konnten. Zur Immunisierung wurden das pp65-Peptid von AS 495 bis 503 (Wills *et al.*, 1996; Diamond *et al.*, 1997) und das IE1-Peptid von AS 297 bis 305 (Gallez-Hawkins *et al.*, 2003) ausgewählt. Spezifische CTL gegen das verwendete pp65-Peptid können im peripheren Blut HLA-A2-positiver Spender mit einer Prävalenz von über 70% (Kern *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2002) und Frequenzen von bis zu 5% (Gillespie *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2002) nachgewiesen werden. Für das verwendete IE1-Peptid ist dies hingegen weniger genau untersucht. In der Vergangenheit konnten verschiedene HLA-A2-restringierte Epitope aus IE1 identifiziert und entsprechende CTL-Spezifitäten im Blut seropositiver Spender nachgewiesen werden (Retiere *et al.*, 2000; Frankenberg *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2002;

Gallez-Hawkins *et al.*, 2003). CTL gegen das in der vorliegenden Arbeit ausgewählte IE1-Peptid konnten dabei in einer Studie in 2 von 4 untersuchten seropositiven Spendern detektiert werden (Gallez-Hawkins *et al.*, 2003). Während der entsprechende pp65-spezifische CTL-Klon bereits verfügbar war (Frankenberg, 2002), musste ein IE1-spezifischer CTL-Klon im Rahmen der vorliegenden Arbeit noch etabliert werden.

Neben dem genannten IE1-Peptid von AS 297 bis 305 (Gallez-Hawkins *et al.*, 2003) ist ein weiteres, ebenfalls HLA-A2-restringiertes Peptid aus IE1 bekannt, welches in verschiedenen Studien als immundominantes CTL-Epitop dieses Proteins beschrieben worden ist (Khan *et al.*, 2002; Hebart *et al.*, 2003). Auch gegen dieses, die AS 316 bis 324 umfassende Epitop, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein spezifischer CTL-Klon etabliert, der hohe Antigenspezifität und -sensitivität aufwies. Aufgrund einer besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit den IE1₂₉₇₋₃₀₅-spezifischen CTL allerdings wurden alle in der vorliegenden Arbeit gezeigten Experimente mit dem CTL-Klon dieser Spezifität durchgeführt.

Die beiden über Peptidimmunisierung HLA-A2-transgener Mäuse und anschließende Klonierung über *limiting dilution* hergestellten CTL-Klone pp65-Klon 53 und IE1-Klon 12 zeigten eine hohe Spezifität für ihr entsprechendes Antigen im Kontext von HLA-A2. Dabei zeigte nur pp65-Klon 53 auch eine geringgradige Erkennung von pp65-negativen, HLA-A2-positiven Zellen (Abbildungen 8 und 10). Durch die zur Kultivierung notwendigen wöchentlichen Restimulierungen mit HLA-A2-positiven Zellen schien dabei also eine von dem pp65-Peptid unabhängige Spezifität für ein zelluläres, im Kontext von HLA-A2 präsentierte Peptid selektioniert worden zu sein. Die Eliminierung dieser ungewollten Spezifität über einen zusätzlichen Klonierungsschritt erschien dabei nicht Erfolg versprechend, da davon auszugehen war, dass sich in der Folge der unumgänglichen Restimulierungen im Kontext von HLA-A2 eine derartige Spezifität erneut ausbilden würde. Durch eine in allen durchgeführten Experimenten mitgeführte Negativkontrolle aber konnte diese pp65-unabhängige Erkennung von der pp65-spezifischen Erkennung klar unterschieden werden. Ein entsprechendes Peptid, welches im Kontext von HLA-A2 durch den T-Zell-Rezeptor von IE1-Klon 12 erkannt werden konnte, schien nicht zu existieren, da durch IE1-Klon 12 eine solche Kreuzreaktivität nicht entwickelt wurde (Abbildung 10).

Darüber hinaus wurde zwischen den beiden CTL-Klonen ein Sensitivitätsunterschied festgestellt, der sich besonders deutlich im IFN- γ -Elispot zeigte (Abbildung 9). Während pp65-Klon 53 peptidbeladene Zielzellen hier bis zu einer Konzentration von 10^{-9} M erkennen konnte, war eine Erkennung durch IE1-Klon 12 nur bei einer Peptidkonzentration von mindestens 10^{-8} M gewährleistet. Die beiden CTL-Klone unterschieden sich also in der Sensitivität für ihr entsprechendes Antigen um etwa einen Faktor 10. Dies könnte sich daraus erklären, dass für die Etablierung der beiden CTL-Klone unterschiedliche transgene Mausstämme verwendet worden waren. Während pp65-Klon 53 in CD8 α A2 doppelt

transgenen Mäusen hergestellt worden war, waren zur Etablierung von IE1-Klon 12 CD8xCyA2K^b doppelt transgene Mäuse verwendet worden. In beiden Mausstämmen kann das jeweilige Peptid durch die Expression der α_1 - und α_2 -Domäne des humanen HLA-A2-Moleküls effizient präsentiert werden. Somit war die wichtigste Voraussetzung für die Stimulation einer CTL-Antwort gegeben. Während die CD8-vermittelte Kostimulation dabei im Falle von pp65 durch die Interaktion des humanen CD8-Rezeptors mit der α_3 -Domäne des humanen HLA-A2 gewährleistet wurde, musste diese im Falle von IE1 durch Interaktion des murinen CD8-Moleküls mit der murinen α_3 -Domäne des chimären MHC-Klasse-I-Moleküls A2K^b erfolgen (Abbildung 7 A). Im Falle von IE1-Klon 12 unterschied sich also der für die Erkennung der humanen APCs in den anschließenden Zellkulturexperimenten benötigte humane CD8-Korezeptor von dem zum *Priming* verwendeten entsprechenden murinen Molekül. Im Falle von pp65-Klon 53 dahingegen wurde sowohl zum *Priming* als auch zur anschließenden Erkennung der humanen Kulturzellen der humane CD8-Korezeptor verwendet (Abbildung 7). Eventuell war also die unterstützende Kostimulation durch den humanen CD8-Rezeptor im Falle von IE1-Klon 12 schwächer und daher dieser CTL-Klon weniger sensitiv als der entsprechende pp65-spezifische Klon.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit für die weniger sensitive Erkennung von mit IE1-Peptid beladenen Zellen wäre, dass nicht die CTL-Klone unterschiedliche Sensitivitäten für ihr Antigen, sondern die verschiedenen HLA-A2-Peptid-Komplexe an der Zelloberfläche unterschiedliche Stabilitäten aufwiesen. Zur Überprüfung der Sensitivität der CTL wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit humane T2-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Peptid beladen und anschließend ihre Erkennung durch pp65-Klon 53 und IE1-Klon 12 überprüft. Die verwendeten Peptidkonzentrationen bezogen sich dabei nicht auf das nach der Beladung tatsächlich mit HLA-A2 assoziierte Peptid, sondern lediglich auf die Menge an zugegebenem Peptid. Dieses synthetische Peptid kann entweder direkt an der Zelloberfläche an HLA-A2-Moleküle binden, oder aber von den Zellen internalisiert und in den MHC-Klasse-I-Präsentationsweg eingeschleust werden (Townsend *et al.*, 1985; Townsend *et al.*, 1986; Townsend *et al.*, 1989). Dabei ist die Affinität des jeweiligen Peptids zu HLA-A2 für die Stabilität des entstehenden MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexes ((Eberl *et al.*, 1996) und darin angegebene Referenzen) und somit für die tatsächlich auf der Oberfläche der beladenen Zellen vorliegende HLA-A2-assozierte Peptidkonzentration entscheidend. Tatsächlich zeigte das verwendete IE1-Peptid in HLA-A2-Stabilisierungs-Assays eine nur etwa halb so starke Affinität zu HLA-A2 wie das verwendete pp65-Peptid (Gallez-Hawkins *et al.*, 2003; Hebart *et al.*, 2003).

Obwohl also durchaus die Möglichkeit bestand, dass pp65-Klon 53 und IE1-Klon 12 ihr mit HLA-A2-assoziertes Antigen mit vergleichbarer Sensitivität erkennen konnten und lediglich die Peptidkonzentration auf der Oberfläche nach exogener Peptidbeladung aufgrund der

unterschiedlichen Affinitäten der beiden Peptide zu HLA-A2 variierte, musste für alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente die eventuell geringere Sensitivität von IE1-Klon 12 in die Interpretation der Ergebnisse mit einbezogen werden.

4.2 Einfluss der US2-US11-Region auf die pp65-Präsentation

Obwohl die HCMV-spezifische CTL-Antwort offensichtlich gegen eine Vielzahl von viralen Zielantigenen gerichtet ist (Elkington *et al.*, 2003; Sylwester *et al.*, 2005), nimmt das Tegumentprotein pp65 in diesem Zusammenhang eine Sonderstellung ein. In gesunden, HCMV-seropositiven Spendern können pp65-spezifische CTL-Antworten in hohen Frequenzen gemessen werden (Laughlin-Taylor *et al.*, 1994; Wills *et al.*, 1996; Boppana & Britt, 1996; Khan *et al.*, 2002) und der adoptive Transfer entsprechender T-Zell-Linien schützt KMT- oder Stammzelltransplantations-Patienten vor HCMV-bedingten Erkrankungen (Riddell *et al.*, 1992; Walter *et al.*, 1995; Cobbold *et al.*, 2005). Trotz des großen Interesses, welches dem pp65-Protein in seiner Funktion als Zielantigen der HCMV-vermittelten CTL-Antwort seit mehr als 20 Jahren entgegen gebracht wird, war zu Beginn der vorliegenden Arbeit über eine eventuelle Beeinflussung der pp65-spezifischen MHC-Klasse-I-Präsentation durch die US2-US11-vermittelte Immunevasion von HCMV nichts bekannt. Frühere Studien hatten gezeigt, dass *in vitro* - infizierte Fibroblasten über einen Zeitraum von 2 bis 66 Stunden nach Infektion durch pp65-spezifische CTL erkannt werden können (Laughlin-Taylor *et al.*, 1994). Demgegenüber wurde kürzlich beobachtet, dass die pp65-Präsentation infizierter Zellen durch die Expression von gpUS2-gpUS11 beeinträchtigt wird; in zwei unabhängigen Studien konnte gezeigt werden, dass Ad169-infizierte Fibroblasten 24 Stunden nach Infektion deutlich schlechter erkannt werden als Zellen, die mit einer US2-US11-Deletionsmutante infiziert worden waren (Manley *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2005).

Durch die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse konnten diese Beobachtungen zum einen bestätigt und zum anderen auf den gesamten Verlauf der Infektion erweitert werden. In Übereinstimmung mit den von McLaughlin-Taylor und Kollegen veröffentlichten Daten (Laughlin-Taylor *et al.*, 1994) konnte gezeigt werden, dass HCMV-infizierte Fibroblasten das pp65-Peptid bis 72 Stunden nach Infektion präsentieren können. Das Ausmaß der Präsentation nahm dabei allerdings im Verlauf der Infektion deutlich ab. 96 Stunden nach Infektion war kein MHC-Klasse-I-präsentiertes pp65-Peptid mehr auf der Oberfläche der infizierten Zellen nachweisbar (Abbildung 18). Da dieser Effekt durch die Verwendung der US2-US11-Deletionsmutante Δ US2-11 (Falk *et al.*, 2002) vollständig kompensiert werden konnte, musste die beobachtete Abnahme der pp65-Präsentation im Verlauf der Infektion durch die US2-US11-kodierte Immunevasion vermittelt worden sein (Abbildung 18). Die Präsentation von pp65 fand demnach weder völlig unabhängig von US2-US11 statt, noch wurde sie zu einem Zeitpunkt vor 96 Stunden nach Infektion durch die

Immunevasion vollständig unterdrückt. Vielmehr schien sie durch die Expression von gpUS2-gpUS11 im Verlauf der Infektion schrittweise reduziert zu werden. Eine mögliche Erklärung für diese bis 72 Stunden nach Infektion zu beobachtende „US2-US11-unabhängige pp65-Präsentation“ wurde durch den Befund geliefert, dass das im Zuge der Viruspenetration in großen Mengen ins Zytosol eingebrachte Tegumentprotein direkt ohne *de novo* Proteinsynthese in den MHC-Klasse-I-Präsentationsweg der infizierten Zellen eingeschleust und an der Zelloberfläche präsentiert werden kann (Laughlin-Taylor *et al.*, 1994; Riddell *et al.*, 1991a; Pepperl *et al.*, 2000; Pepperl-Klindworth *et al.*, 2003). Es war demnach vorstellbar, dass dieses Partikel-assoziierte pp65 unmittelbar nach Infektion prozessiert und, bevor die Immunevasine ihre Wirkung in der infizierten Zelle entfalten konnten, bereits in Assoziation mit MHC-Klasse-I an der Oberfläche präsentiert werden konnte. Um solche MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe allerdings bis zu 72 Stunden nach Infektion noch auf der Oberfläche der Zellen nachweisen zu können, müssten die Komplexe dort außergewöhnlich langlebig sein. Die Stabilität von MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexen an der Zelloberfläche wird hauptsächlich durch ihre Dissoziationsgeschwindigkeit und damit durch die Affinität des beteiligten Peptids zum präsentierenden MHC-Allomorph determiniert. Darüber hinaus wird auch die Immunogenität eines bestimmten Peptids maßgeblich durch die Stabilität seines Komplexes mit MHC-Klasse-I bestimmt (Chen *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2004; Kambayashi *et al.*, 2004). Da das verwendete pp65-Peptid eine hohe Bindekapazität für das HLA-A2-Allomorph aufweist (Wills *et al.*, 1996; Diamond *et al.*, 1997) und gleichzeitig eines der immundominanten CTL-Epitope von HCMV darstellt, war eine stabile Komplexierung mit HLA-A2 durchaus nahe liegend. Eine direkte Untersuchung der Stabilität der resultierenden Oberflächenkomplexe wurde allerdings bisher nicht durchgeführt. Um den in der vorliegenden Arbeit beobachteten Effekt zu erhalten (Abbildung 18), wäre eine Halbwertszeit der entsprechenden MHC-Komplexe von etwa 24 Stunden zu fordern. Tatsächlich ist eine derartige Stabilität von MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexen nicht unrealistisch ((Eberl *et al.*, 1996) und darin angegebene Referenzen).

Alternativ könnte die verlängerte Präsentation von pp65 damit erklärt werden, dass trotz der Expression von gpUS2-gpUS11 MHC-Klasse-I-pp65-Peptid-Komplexe in einem Ausmaß auf die Zelloberfläche transportiert werden, welches die Erkennung der infizierten Zellen bis zu 72 Stunden nach Infektion zulässt. Mit Hilfe einer Säurebehandlung war es möglich, die MHC-Klasse-I-gebundenen Peptide von der Oberfläche infizierter Zellen zu entfernen. Mittels dieser Methode konnte nachgewiesen werden, dass trotz der Expression der US2-US11-Region bis zu 72 Stunden nach Infektion noch Prozessierung und Präsentation von pp65 stattfand. Nur ein geringer Teil der jeweils nachweisbaren pp65-Präsentation schien dabei auf stabilen Komplexen zu beruhen, die bereits 24 Stunden zuvor auf der Oberfläche der Zellen detektierbar waren (Abbildung 20). Ob das zu späteren Zeitpunkten nach Infektion

prozessierte pp65 dabei aus Partikel-assoziiertem oder *de novo* synthetisiertem Protein stammte, konnte mit den hier gewählten experimentellen Ansätzen nicht geklärt werden. Das über Viruspartikel in die Zelle eingebrachte pp65 ist bei fehlender viraler Genexpression noch bis zu 96 Stunden nach Infektion in den entsprechenden Zellen nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Während der Infektion werden in der gleichen Zeitspanne große Mengen des Proteins neu synthetisiert. Somit stellen sowohl das Partikel-assoziierte als auch das *de novo* synthetisierte Protein mögliche Quellen für die pp65-Prozessierung und -Präsentation in Gegenwart der Immunevasion dar.

In Übereinstimmung mit der aktuellen Literatur (Manley *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2005) konnte in der vorliegenden Arbeit bereits 24 Stunden nach Infektion eine Beeinträchtigung der pp65-Präsentation durch US2-US11 nachgewiesen werden (Abbildung 18). Somit musste die Beeinflussung durch die US2-US11-Region bereits zu einem Zeitpunkt vor 24 Stunden nach Infektion begonnen haben. Um den Beginn des Einflusses von US2-US11 auf die Präsentation von pp65 zeitlich festlegen zu können, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 1 und 24 Stunden nach Infektion die MHC-Klasse-I-Komplexe von der Oberfläche der infizierten Zellen entfernt und dann die Regenerationsfähigkeit der pp65-Präsentation in Abhängigkeit von US2-US11 untersucht. Als Kontrolle dienten dabei Zellen, welche 24 Stunden zuvor infiziert, jedoch unbehandelt belassen worden waren. Während die infizierten Zellen unter US2-US11-negativen Bedingungen ihre pp65-Präsentation unabhängig vom Zeitpunkt der Entfernung jeweils wieder auf das Niveau der Kontrollzellen regenerieren konnten, zeigten die Zellen in Gegenwart von US2-US11 eine zwischen 14 und 16 Stunden nach Infektion einsetzende Verminderung dieser Regenerationsfähigkeit (Abbildung 21). Da bis zu diesem Zeitpunkt eine vollständige Regeneration der pp65-Präsentation möglich zu sein schien, konnte davon ausgegangen werden, dass die US2-US11-vermittelte Beeinträchtigung der MHC-Klasse-I-Beladung erst zu einem Zeitpunkt zwischen 14 und 16 Stunden nach Infektion eingesetzt hatte. Die Tatsache, dass Partikel-assoziiertes Protein bei der Infektion in die Zellen gelangt und daher noch vor der Expression der US2-US11-Region in den MHC-Klasse-I-Weg eingeschleust werden kann, liefert eine nahe liegende Erklärung für die US2-US11-unabhängige pp65-Präsentation sehr früh nach Infektion. Warum allerdings zu frühen und sogar späten Zeitpunkten nach Infektion immer noch neu prozessiertes pp65-Peptid in Assoziation mit MHC-Klasse-I an die Oberfläche transportiert und dort präsentiert werden kann, lässt sich damit nicht erklären.

Die Präsentation des pp65-Peptids erinnert an die Präsentation eines D^d-restringierten Peptids aus dem m164-Protein des MCMV. Dieses Peptid wird trotz der Expression der immunmodulatorischen Proteine m152/gp40, m06/gp48 und m04/gp34 des MCMV während der frühen Phase der Infektion effizient präsentiert. Im Falle des m164-Peptids lieferte die Beobachtung, dass die intrazelluläre Konzentration dieses Peptids in der frühen Phase der

Infektion zehnfach höher war als die von Peptiden, die zum gleichen Zeitpunkt nicht präsentiert wurden, eine mögliche Erklärung für seine Immunevasions-unabhängige Präsentation (Holtappels *et al.*, 2002). Obwohl über die Molarität des untersuchten pp65-Peptids in infizierten Zellen nichts bekannt ist, könnte eine besonders effiziente Prozessierung dieses Peptids eine mögliche Erklärung für seine Präsentation trotz Immunevasion liefern. Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um diese Hypothese zu prüfen.

4.3 Einfluss der US2-US11-Region auf die IE1-Präsentation

Neben pp65 stellt das *major immediate early* Protein IE1 ein weiteres Zielantigen der HCMV-spezifischen CD8⁺-T-Zell-Antwort dar, welches in der Vergangenheit sehr intensiv untersucht worden ist. Bereits 1988 wurde es als wichtige Zielstruktur der antiviralen CTL-Antwort beschrieben (Borysiewicz *et al.*, 1988a; Borysiewicz *et al.*, 1988b). Inzwischen konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass IE1-spezifische CTL bei seropositiven Spendern in Frequenzen nachzuweisen sind, die mit den Frequenzen pp65-spezifischer CTL vergleichbar sind (Kern *et al.*, 1999; Gyulai *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2002; Sylwester *et al.*, 2005). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass IE1-spezifische CTL nach allogener Transplantation am Schutz vor HCMV-bedingten Erkrankungen beteiligt sind (Cobbold *et al.*, 2005). Eine Studie an Herz- und Lungen-Transplantationspatienten besagt sogar, dass die Rekonstitution von IE1- und nicht pp65-spezifischen CTL Schutz vor einer HCMV-Erkrankung vermittelt (Bunde *et al.*, 2005). Obwohl die Expression des Proteins *in vitro* bereits unmittelbar nach Infektion beginnt und während des gesamten Infektionsverlaufs aktiv bleibt (Stamminger *et al.*, 1991), können infizierte Zellen nicht oder nur sehr schlecht von IE1-spezifischen CTL erkannt werden (Gilbert *et al.*, 1993; Gilbert *et al.*, 1996; Khan *et al.*, 2002). Trotz des großen wissenschaftlichen Interesses, welches der US2-US11-vermittelten Immunevasion von HCMV entgegen gebracht wurde, war bis zum Beginn der vorliegenden Arbeit eine eventuelle Beteiligung von gpUS2-gpUS11 in diesem Zusammenhang nie untersucht worden. Vielmehr wurde die fehlende IE1-Präsentation *in vitro* - infizierter Zellen mit der selektiven Unterdrückung durch das Tegumentprotein pp65 erklärt (Gilbert *et al.*, 1996).

In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass infizierte Zellen, welche sehr effizient durch pp65-spezifische CTL erkannt werden, IE1-spezifische CTL nicht aktivieren können (Abbildung 22). Sowohl im Rahmen der vorliegenden Arbeit, als auch in kürzlich veröffentlichten Arbeiten anderer konnte beobachtet werden, dass durch die Deletion der US2-US11-Region dieser Effekt kompensiert und eine effiziente IE1-Präsentation der infizierten Zellen erreicht werden kann (Manley *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2005). In der frühen wie auch in der späten Phase der Infektion wurde die Unterdrückung der IE1-Präsentation

durch die Deletion der US2-US11-Region vollständig kompensiert. Unter diesen Bedingungen wurde das IE1-Peptid in einem Maß präsentiert, das mit dem der pp65-Präsentation vergleichbar war (Abbildung 23).

Obwohl die IE1-Expression unmittelbar nach Infektion ohne vorherige *de novo* Synthese anderer viraler Proteine beginnt (Stamminger *et al.*, 1991) und das Protein somit bereits vor der vollständigen Expression der US2-US11-Region in den MHC-Klasse-I-Präsentationsweg eingeschleust werden könnte, konnte auch zu sehr frühen Zeitpunkten nach Infektion keinerlei IE1-Präsentation in US2-US11-positiven Zellen beobachtet werden. Allerdings konnte auch nach Deletion der US2-US11-Region erst ab einem Zeitpunkt von 12 Stunden nach Infektion auf den infizierten Zellen IE1-Präsentation nachgewiesen werden. Die gleichen Zellen konnten jedoch bereits 3 Stunden nach Infektion durch pp65-Klon 53 erkannt werden (Abbildung 25). Auch Manley und Kollegen hatten beobachten können, dass mit einer US2-US11-Deletionsmutante infizierte Fibroblasten durch IE1-spezifische CTL frühestens 12 Stunden nach Infektion lysiert werden können. Andere *immediate early* Proteine hingegen konnten bereits 2 Stunden nach Infektion als Zielantigene von CTL-Klonen dienen, die von seropositiven Spendern etabliert worden waren (Manley *et al.*, 2004). Unklar blieb dabei, warum IE1 zu diesen sehr frühen Zeitpunkten nach Infektion selektiv von der MHC-Klasse-I-Präsentation ausgeschlossen zu werden schien. Da IE1 in dieser sehr frühen Infektionsphase ausgesprochen stark exprimiert wird, konnte eine limitierende Antigenkonzentration nicht als Erklärung herangezogen werden. Eine mögliche Erklärung hingegen bot die Annahme, dass eine von US2-US11 unabhängige Inhibition, die spezifisch auf die IE1-Präsentation wirkte, zu sehr frühen Zeitpunkten nach Infektion die Präsentation dieses Antigens unterdrückte. In diesem Zusammenhang schien die aus der Literatur bekannte Beobachtung, dass pp65 die Präsentation von IE1 selektiv unterdrücken konnte, eine attraktive Erklärungsmöglichkeit zu bieten (Gilbert *et al.*, 1996). Diese pp65-vermittelte Hemmung der IE1-Präsentation war im Kontext der HCMV-Infektion nur unter *immediate early* Bedingungen untersucht worden. Über eine derartige Hemmung der IE1-Präsentation zu späteren Infektionszeitpunkten war daher bisher nichts bekannt. Die Beobachtung, dass die US2-US11-vermittelte Hemmung der IE1-Präsentation erst ab 12 Stunden nach Infektion zu wirken schien (Abbildung 25, (Manley *et al.*, 2004)) eröffnete somit die Möglichkeit, einen Zusammenhang zwischen der von Gilbert und Kollegen beobachteten Unterdrückung der IE1-Präsentation durch pp65 (Gilbert *et al.*, 1996) und der in letzter Zeit mehrfach beobachteten Unterdrückung dieser Präsentation durch die Immunevasine gpUS2-gpUS11 ((Manley *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2005), diese Arbeit) herzustellen. Um den Einfluss des pp65-Proteins auf die IE1-Präsentation zu sehr frühen Zeitpunkten nach Infektion überprüfen zu können, wurde eine im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellte pp65-Deletionsmutante verwendet. Trotz des Fehlens von pp65 in den mit dieser Mutante

infizierten Zellen war zu keinem Zeitpunkt nach Infektion eine IE1-spezifische Erkennung zu beobachten (Abbildung 26). Das Tegumentprotein konnte also als möglicher Inhibitor der IE1-Präsentation zu diesen sehr frühen Zeitpunkten nach Infektion neben gpUS2-gpUS11 ebenfalls ausgeschlossen werden.

Um in einem letzten Versuch nach eventuellen kooperativen Effekten zwischen gpUS2-gpUS11 und pp65 bei der Unterdrückung der IE1-Präsentation zwischen 1 und 12 Stunden nach Infektion zu suchen, wurde eine zweite Virusmutante hergestellt, der sowohl die US2-US11-Region als auch das pp65-Gen fehlten. Sollte die IE1-Präsentation in der sehr frühen Phase nach Infektion nur durch das Zusammenwirken dieser beiden Regionen unterdrückt werden können, sollten mit dieser Mutante infizierte Zellen durch IE1-spezifische CTL erkannt werden. Eine solche Erkennung war jedoch nicht zu beobachten (Abbildung 30 A, links). Vielmehr war die IE1-Erkennung von mit dieser Doppelmutante infizierten Zellen in allen Experimenten, und dabei zu allen untersuchten Zeitpunkten nach Infektion, schlechter als die Erkennung der entsprechenden Δ US2-11-Einzelmutante (Abbildung 30 A). Die Vermutung, dass das Tegumentprotein entgegen der bisherigen Ansicht die IE1-Präsentation sogar unterstützt und nicht inhibiert, musste verworfen werden, da sich die IE1-Präsentation von Zellen, die mit der Doppelmutante infiziert worden waren, durch die Zugabe von pp65 in Form von subviralen DBs nicht erhöhen ließ (Abbildung 30 C). Auch eine Erhöhung der Infektionsdosis konnte die verminderte IE1-Erkennung in diesem Zusammenhang nicht kompensieren (Abbildung 30 B). Eventuell war die Doppelmutante aufgrund eines während BAC-Mutagenese oder Rekonstitution entstandenen Defekts im HCMV-Genom in ihrer Replikation und damit verbunden auch in ihrer Expression des IE1-Gens eingeschränkt und konnte daher nicht die von der entsprechenden Δ US2-11-Einzelmutante erreichte IE1-Präsentation zeigen. Eine Einschränkung der *immediate early* Genexpression durch eine beeinträchtigte Expression des Transaktivators pp71 konnte in diesem Zusammenhang ausgeschlossen werden, da in den Viruspartikeln der Doppelmutante sogar eine deutlich höhere Konzentration an pp71 nachgewiesen werden konnte als in der entsprechenden Δ US2-11-Einzelmutante (Abbildung 28 B). Da dieser Effekt bereits bei der Δ pp65-Einzelmutante in etwas abgeschwächter Form beobachtet werden konnte (Abbildung 15 B), schien er eine Folge der Entfernung des pp65-Gens zu sein. Das Fehlen von pp65 verhindert während der Virusproduktion die Herstellung subviraler DBs. Da DBs und Virionen sich in ihrem relativen pp65-Gehalt deutlich voneinander unterscheiden (Varnum *et al.*, 2004), könnte das von einer erhöhten Produktion intakter Virionen begleitete Wegfallen der DBs zu einem höheren Gehalt an pp71 in der Gesamt-Viruspartikel-Präparation der pp65-Deletionsmutanten führen. Alternativ ist denkbar, dass das Fehlen von pp65 im Viruspartikel durch einen erhöhten Einbau des pp71 kompensiert wird. In diesem Fall würden die Partikel der Δ pp65-Mutanten in der Tat mehr pp71 enthalten als die Partikel

der entsprechenden Ausgangsviren. Ein erhöhter pp71-Gehalt in den Partikeln von Δ US2-11_Δpp65_GFP könnte eventuell eine Erklärung für die reduzierte IE1-Erkennung von mit dieser Mutante infizierten Fibroblasten liefern. Jüngste Daten weisen nämlich darauf hin, dass das im Verlauf der Virusreplikation exprimierte *early-late* Protein pp71 MHC-Klasse-I-Moleküle im ER bzw. Golgi-Apparat zurück hält und somit neben gpUS2-gpUS11 an der Reduktion der MHC-Klasse-I-Oberflächenpräsentation der infizierten Zellen beteiligt ist. Dieser Effekt wurde allerdings überwiegend zu späten Infektionszeitpunkten und somit durch neu synthetisiertes pp71 ausgelöst (Trgovcich *et al.*, 2006). Eine durch Partikel-assoziiertes pp71 verursachte Hemmung der Antigenpräsentation infizierter Zellen kann aber dennoch nicht völlig ausgeschlossen werden. Dies gilt insbesondere deshalb, da in der beschriebenen Arbeit mögliche Auswirkungen der pp71-vermittelten Reduktion der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression auf die virale Antigenpräsentation nicht untersucht wurden. Die nach Infektion mit Δ US2-11_Δpp65_GFP beobachtete Reduktion der IE1-Präsentation könnte somit eventuell auf einen erhöhten Gehalt von pp71 in den Partikeln dieser Virusmutante zurückgeführt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in HCMV-infizierten Zellen die IE1-Präsentation im gesamten Verlauf der Infektion effizient unterdrückt wird. Als einziger Auslöser dieser Unterdrückung wurde dabei die US2-US11-Region identifiziert. Während der sehr frühen Phase der Infektion allerdings konnte auch in Abwesenheit dieser virusvermittelten Immunevasion bis zu 12 Stunden nach Infektion keine IE1-Präsentation beobachtet werden. Diese Beobachtungen deckten sich mit Ergebnissen anderer (Manley *et al.*, 2004, Khan *et al.*, 2005). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass pp65 nicht für die sehr frühe Unterdrückung der IE1-Präsentation verantwortlich zu machen ist. In Anbetracht der Tatsache, dass andere IE-Proteine offensichtlich bereits zu sehr frühen Zeitpunkten nach Infektion von US2-US11-negativen, infizierten Zellen präsentiert werden können, sollte das Fehlen einer Präsentation des sehr abundanten IE-Proteins IE1 in dieser Phase der Infektion nicht auf eine noch zu geringe Proteinmenge zurückzuführen sein (Manley *et al.*, 2004). Vielmehr scheint die Unterdrückung der IE1-Präsentation durch einen von gpUS2-gpUS11 und pp65 unabhängigen Mechanismus zu erfolgen. Vorstellbar wäre dabei, dass die proteasomale Prozessierung dieses Proteins deutlich weniger effizient erfolgt als die Prozessierung anderer IE-Proteine. Eine Präsentation von aus IE1 stammenden Peptiden wäre demnach erst nach einer verlängerten Prozessierungsphase möglich.

Alternativ dazu könnte natürlich auch die Sensitivität des in der vorliegenden Arbeit verwendeten IE1-spezifischen CTL-Klons nicht ausgereicht haben, um eine eventuell in der sehr frühen Phase der Infektion noch verhältnismäßig schwache IE1-Präsentation zu detektieren. Da allerdings auch die Daten anderer (Manley *et al.*, 2004) mit den im Rahmen

der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen übereinstimmen, erscheint dies eher unwahrscheinlich.

In Anbetracht der Tatsache, dass HCMV-infizierte Zellen *in vitro* ihre IE1-Präsentation während des gesamten Verlaufs der Infektion effizient unterdrücken, ist der Modus der Entstehung einer entsprechenden CTL-Antwort *in vivo* weitgehend unklar. Die Induktion von CTL-Antworten gegen Proteine, die durch infizierte Zellen nicht präsentiert werden können, kann über Kreuzpräsentation dieser Antigene durch nicht infizierte pAPCs wie DCs oder Makrophagen erfolgen. Da IE1 zumindest *in vitro* erfolgreich durch DCs kreuzpräsentiert werden kann (Tabi *et al.*, 2001), stellt dies einen potentiellen Mechanismus zur Stimulation einer IE1-spezifischen CTL-Antwort *in vivo* dar. Darüber hinaus ist aus dem MCMV-Modell ein D^b-restringiertes CTL-Epitop aus dem m164-Protein bekannt, welches in Gegenwart des murinen Immunevasins m152 von *in vitro* - infizierten Zellen nicht präsentiert wird, *in vivo* aber sehr wohl eine deutliche CTL-Antwort induziert (Gold *et al.*, 2002). Das Schutzpotential solcher CTL ist dabei allerdings nach wie vor unklar. Hinweise, die in diesem Zusammenhang gegen eine protektive Wirkung sprechen, stammen erneut aus dem MCMV-Modell. Hier konnte kürzlich gezeigt werden, dass die höchstwahrscheinlich über Kreuzpräsentation induzierten CTL gegen das von Gold und Kollegen identifizierte D^b-Epitop *in vivo* - infizierte Gewebezellen nicht erkennen und somit die Infektion mit MCMV nicht kontrollieren können (Holtappels *et al.*, 2004). Es bleibt also unklar, wie der durch IE1-spezifische CTL beobachtete Schutz nach allogener Transplantation (Bunde *et al.*, 2005; Cobbold *et al.*, 2005) vermittelt werden kann. Vorstellbar wäre in diesem Zusammenhang, dass IE1-spezifische CTL aus der Latenz reaktivierende Zellen effizient erkennen und somit die Hauptquelle der nach Transplantation auftretenden HCMV-Infektionen eliminieren können. Durch die Aktivierung der während der Latenz stumm geschalteten *immediate early* Genexpression (Sinclair & Sissons, 2006) könnte IE1 noch vor dem Einsetzen der Immunevasion über MHC-Klasse-I präsentiert und die reaktivierende Zelle somit für IE1-spezifische CTL sichtbar gemacht werden. Einen ersten Hinweis hierauf liefert erneut das MCMV-Modell. Hier konnte gezeigt werden, dass ein aus dem murinen IE1-Protein stammendes Peptid zwar in Gegenwart der MCMV-vermittelten Immunevasion *in vitro* nicht präsentiert werden kann (Holtappels *et al.*, 2002), entsprechende CTL aber die erste Instanz bei der Kontrolle der Reaktivierung in der Lunge darstellen (Simon *et al.*, 2006).

Zusammenfassend kann man aus den dargestellten Experimenten ableiten, dass die IE1-Präsentation infizierter Zellen im gesamten Verlauf der Infektion unterdrückt wird. Ab 12 Stunden nach Infektion wird diese Unterdrückung sehr effizient durch die Immunevasionsregion US2-US11 vermittelt. Der Modus der Unterdrückung zu früheren Infektionszeitpunkten bleibt allerdings weiterhin unklar. Das Tegumentprotein pp65 kann

dabei sowohl alleine als auch in Kooperation mit gpUS2-gpUS11 als Inhibitor ausgeschlossen werden.

4.4 Unterschiedliche Sensitivität von pp65- und IE1-Präsentation gegenüber US2-US11-vermittelter Immunevasion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl die pp65- wie auch die IE1-Präsentation infizierter Zellen durch US2-US11 beeinträchtigt wird. Das Ausmaß der jeweiligen Beeinflussung unterschied sich dabei allerdings deutlich. Während pp65 in seiner Präsentation erst ab einem Zeitpunkt zwischen 14 und 16 Stunden nach Infektion durch US2-US11 beeinträchtigt, dennoch aber bis zu 72 Stunden nach Infektion erfolgreich prozessiert und präsentiert werden konnte, wurde IE1 offenbar während des gesamten Verlaufs der Infektion in seiner Präsentation unterdrückt. Obwohl die Expression des *immediate early* Proteins unmittelbar nach Infektion beginnt und anschließend während des gesamten Verlaufs der Infektion erhalten bleibt (Stamminger *et al.*, 1991), ist das Protein aufgrund der im Verlauf der Infektion während IE-, E- und L-Phase sequenziell exprimierten Immunevasine zu keinem Zeitpunkt „unbeaufsichtigt“ und kann daher nicht erfolgreich über MHC-Klasse-I an der Oberfläche der infizierten Zellen präsentiert werden (Abbildung 23). Ähnliches ist auch mit dem IE1-Protein von MCMV zu beobachten, welches ein dem HCMV-IE1 entsprechendes Expressionsmuster aufweist (Holtappels *et al.*, 2002). Ein L^d-restringiertes Peptid aus diesem murinen IE1-Protein wird trotz der während des gesamten Infektionsverlaufs effizienten Prozessierung durch das Proteasom nur in der IE-Phase der Infektion präsentiert, wo noch keine Expression der MCMV-Immunevasine stattfindet. Eine weitere Präsentation wird dabei durch die ab der E-Phase der Infektion exprimierten Immunevasine unterdrückt. Das D^d-restringierte m164-Peptid dahingegen kann in diesem Zusammenhang trotz Immunevasion während E- und L-Phase der Infektion effizient präsentiert werden. Für diese unterschiedliche Sensitivität gegenüber der viralen Immunevasion schienen Konzentrationsunterschiede zwischen den beiden Peptiden in der frühen Phase der Infektion verantwortlich zu sein (Holtappels *et al.*, 2002). Obwohl bisher über die Prozessierungseffizienz der im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Peptide aus pp65 bzw. IE1 und damit über ihre Konzentration in infizierten Zellen nichts bekannt ist, erinnert das beschriebene Beispiel aus dem MCMV-System stark an die Situation von pp65 und IE1. Die unterschiedliche Sensitivität gegenüber der viralen Immunevasion könnte also auch hier unter anderem auf die unterschiedliche Prozessierungseffizienz der beiden untersuchten Peptide zurückzuführen sein. Hierfür spricht auch die Beobachtung, dass infizierte Zellen, die nur eines der 4 Immunevasine exprimieren können, eine uneingeschränkte pp65-Präsentation, hingegen aber eine vollständig unterdrückte IE1-Präsentation aufweisen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit

konnte gezeigt werden, dass das pp65-Peptid während des gesamten Infektionsverlaufs wie nach vollständiger Deletion des US2-US11-Bereichs mit gleich bleibender Effizienz präsentiert werden kann. Dahingegen war wie in Gegenwart der gesamten US2-US11-Region zu keinem Zeitpunkt nach Infektion eine Präsentation des IE1-Peptids zu beobachten (Abbildung 31 C). Während das durch die infizierten Zellen exprimierte Immunevasin gpUS11 somit die IE1-Präsentation sehr effizient zu unterdrücken schien, konnte in diesem Zusammenhang keinerlei Beeinflussung der pp65-Präsentation beobachtet werden. Das Immunevasin gpUS11 greift in den MHC-Klasse-I-Präsentationsweg ein, indem es neu synthetisierte MHC-Klasse-I- α -Ketten aus dem ER ins Zytosol transportiert und damit den im ER vorliegenden Peptiden den für die erfolgreiche Präsentation nötigen Bindungspartner entzieht (Wiertz *et al.*, 1996a; Ahn *et al.*, 1996). Die Wirkungsweise des gpUS11 weist dabei eine typische HLA-Allel-Spezifität auf (Barel *et al.*, 2003a; Barel *et al.*, 2006). Da allerdings sowohl das pp65- wie auch das IE1-Peptid über HLA-A2 präsentiert werden, konnte ihre unterschiedliche Sensitivität gegenüber gpUS11 nicht durch die HLA-Spezifität des Immunevasins erklärt werden. Vielmehr schien auch hier eine unterschiedliche Konzentration der beiden Peptide eine passende Erklärungsmöglichkeit zu liefern. Durch die Wirkung von gpUS11 werden die im ER zur Peptidbeladung zur Verfügung stehenden MHC-Klasse-I- α -Ketten reduziert, so dass nur noch eine limitierte Menge an Peptiden auf restliche MHC-Klasse-I-Moleküle geladen und an die Zelloberfläche transportiert werden kann. Es ist anzunehmen, dass unter diesen Umständen die Peptide, welche in großen Mengen vorliegen, einen Vorteil gegenüber den Peptiden haben, die von der Zelle in geringeren Molaritäten hergestellt werden. Ob tatsächlich Molaritätsunterschiede zwischen den beiden viralen Peptiden für die unterschiedliche Sensitivität gegenüber gpUS11 verantwortlich sind, muss durch zukünftige Analysen verifiziert werden.

4.5 Einfluss von cmvIL-10 auf die pp65- bzw. IE1-Präsentation nicht infizierter Zellen

Die Unterdrückung der MHC-Klasse-I-Präsentation stellt einen für CMV wichtigen Mechanismus dar, die antivirale CD8⁺-T-Zell-Antwort zu schwächen und damit die vollständige Kontrolle der Infektion zu verhindern (zusammengefasst in (Reddehase, 2002)). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Immunevasine gpUS2-gpUS11 sind in ihrer Wirkungsweise auf infizierte Zellen beschränkt und können daher die MHC-Klasse-I-Präsentation nicht infizierter Nachbarzellen nicht beeinflussen. Sowohl in Zellkultur-Systemen (Arrode *et al.*, 2000; Arrode *et al.*, 2002; Tabi *et al.*, 2001), wie auch in Tierversuchen (Pepperl *et al.*, 2000) konnte gezeigt werden, dass HCMV-Antigene wie pp65 und IE1 in effizienter Weise durch nicht infizierte pAPCs kreuzpräsentiert werden können. Es ist somit davon auszugehen, dass das *Priming* der HCMV-spezifischen CD8⁺-T-Zell-Antwort

in vivo zumindest teilweise durch nicht infizierte pAPCs vermittelt wird und somit der US2-US11-kodierten Immunevasion nicht unterliegt.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde spekuliert, dass das durch infizierte Zellen freigesetzte cmvIL-10 die MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation nicht infizierter pAPCs in unmittelbarer Umgebung infizierter Gewebezellen reduzieren und somit die Kreuzpräsentation viraler Antigene verhindern könnte. Von besonderer Bedeutung war hierbei die Beobachtung, dass die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression LPS-stimulierter Monozyten durch die Behandlung mit rekombinantem cmvIL-10 deutlich reduziert werden konnte (Spencer *et al.*, 2002). Eventuell resultierende Veränderungen der Antigenpräsentation wurden in dem gewählten experimentellen Ansatz allerdings nicht abgefragt. Darüber hinaus ermöglichte die Verwendung von rekombinantem cmvIL-10 keine Aussage über die Funktion des Zytokins im Kontext einer Virusinfektion, bei der Interferone und andere, von infizierten Zellen freigesetzte Faktoren dem durch cmvIL-10 induzierten Effekt entgegen wirken könnten.

Daher sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, welchen Einfluss cmvIL-10 unter Infektionsbedingungen auf die MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation nicht infizierter Zellen ausübt. Ziel dieser Untersuchung war es, die Funktion des cmvIL-10 als potentiell Immunevasin der MHC-Klasse-I-restringierten Antigenpräsentation zu überprüfen. Durch verschiedene Ansätze sollte sich dabei an das Zytokin-Milieu, dem Zellen *in vivo* in der Umgebung einer infizierten Zelle ausgesetzt sind, best möglich angenähert werden. Weder die Behandlung von THP-1-Zellen mit cmvIL-10-konditionierten Kulturüberständen (Abbildung 35) noch die Kokultivierung von JY-Zellen mit HCMV-infizierten Fibroblasten (Pepperl-Klindworth *et al.*, 2006) konnten eine Beeinflussung der MHC-Klasse-I-restringierten Antigenpräsentation hervorrufen. Da sowohl die pp65- wie auch die IE1-Präsentation eine Reaktion auf die beschriebene Behandlung gleichermaßen vermissen ließen, schien dies nicht peptidspezifisch und somit auch auf andere Antigene übertragbar zu sein.

Durch die hemmende Wirkung von cmvIL-10 auf Reifung und Funktion von DCs kann die Fähigkeit dieser Zellen zur Kreuzpräsentation viraler Antigene über MHC-Klasse-I höchstwahrscheinlich indirekt beeinflusst werden (Chang *et al.*, 2004; Raftery *et al.*, 2004). Ein direktes Einwirken des im Kontext einer Virusinfektion freigesetzten cmvIL-10 auf die MHC-Klasse-I-Präsentation hämatopoetischer Zellen jedoch konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden.

5 Literatur

- Adler, S. P., Plotkin, S. A., Gonczol, E. & other authors (1999).** A canarypox vector expressing cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B primes for antibody responses to a live attenuated CMV vaccine (Towne). *J Infect Dis* **180**, 843-846.
- Adler, S. P., Starr, S. E., Plotkin, S. A., Hempfling, S. H., Buis, J., Manning, M. L. & Best, A. M. (1995).** Immunity induced by primary human cytomegalovirus infection protects against secondary infection among women of childbearing age. *J Infect Dis* **171**, 26-32.
- Ahn, K., Angulo, A., Ghazal, P., Peterson, P. A., Yang, Y. & Fruh, K. (1996).** Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10990-10995.
- Ahn, K., Gruhler, A., Galocha, B., Jones, T. R., Wiertz, E. J., Ploegh, H. L., Peterson, P. A., Yang, Y. & Fruh, K. (1997).** The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. *Immunity* **6**, 613-621.
- Andersen, M. H., Schrama, D., Thor, S. P. & Becker, J. C. (2006).** Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol* **126**, 32-41.
- Andreoni, M., Faircloth, M., Vugler, L. & Britt, W. J. (1989).** A rapid microneutralization assay for the measurement of neutralizing antibody reactive with human cytomegalovirus. *J Virol Methods* **23**, 157-167.
- Arnon, T. I., Achdout, H., Levi, O. & other authors (2005).** Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat Immunol* **6**, 515-523.
- Arrode, G., Boccaccio, C., Abastado, J. P. & Davrinche, C. (2002).** Cross-presentation of human cytomegalovirus pp65 (UL83) to CD8+ T cells is regulated by virus-induced, soluble-mediator-dependent maturation of dendritic cells. *J Virol* **76**, 142-150.
- Arrode, G., Boccaccio, C., Lule, J., Allart, S., Moinard, N., Abastado, J. P., Alam, A. & Davrinche, C. (2000).** Incoming human cytomegalovirus pp65 (UL83) contained in apoptotic infected fibroblasts is cross-presented to CD8(+) T cells by dendritic cells. *J Virol* **74**, 10018-10024.
- Barel, M. T., Pizzato, N., Le, B. P., Wiertz, E. J. & Lenfant, F. (2006).** Subtle sequence variation among MHC class I locus products greatly influences sensitivity to HCMV US2- and US11-mediated degradation. *Int Immunol* **18**, 173-182.
- Barel, M. T., Pizzato, N., van, L. D., Bouteiller, P. L., Wiertz, E. J. & Lenfant, F. (2003a).** Amino acid composition of alpha1/alpha2 domains and cytoplasmic tail of MHC class I molecules determine their susceptibility to human cytomegalovirus US11-mediated down-regulation. *Eur J Immunol* **33**, 1707-1716.
- Barel, M. T., Rensing, M., Pizzato, N., van, L. D., Le, B. P., Lenfant, F. & Wiertz, E. J. (2003b).** Human cytomegalovirus-encoded US2 differentially affects surface expression of MHC class I locus products and targets membrane-bound, but not soluble HLA-G1 for degradation. *J Immunol* **171**, 6757-6765.
- Barnes, P. D. & Grundy, J. E. (1992).** Down-regulation of the class I HLA heterodimer and beta 2-microglobulin on the surface of cells infected with cytomegalovirus. *J Gen Virol* **73** (Pt 9), 2395-2403.
- Berencsi, K., Gyulai, Z., Gonczol, E. & other authors (2001).** A canarypox vector-expressing cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 induces long-lasting cytotoxic T cell responses in human CMV-seronegative subjects. *J Infect Dis* **183**, 1171-1179.
- Biron, K. K. (2006).** Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res* **71**, 154-163.
- Bodaghi, B., Slobbe-van Drunen, M. E., Topilko, A. & other authors (1999).** Entry of human cytomegalovirus into retinal pigment epithelial and endothelial cells by endocytosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**, 2598-2607.
- Boppana, S. B. & Britt, W. J. (1996).** Recognition of human cytomegalovirus gene products by HCMV-specific cytotoxic T cells. *Virology* **222**, 293-296.

- Borst, E. M., Hahn, G., Koszinowski, U. H. & Messerle, M. (1999).** Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *J Virol* **73**, 8320-8329.
- Borysiewicz, L. K., Graham, S., Hickling, J. K., Mason, P. D. & Sissons, J. G. (1988a).** Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells: their precursor frequency and stage specificity. *Eur J Immunol* **18**, 269-275.
- Borysiewicz, L. K., Hickling, J. K., Graham, S., Sinclair, J., Cranage, M. P., Smith, G. L. & Sissons, J. G. (1988b).** Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells. Relative frequency of stage-specific CTL recognizing the 72-kD immediate early protein and glycoprotein B expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Exp Med* **168**, 919-931.
- Bratcher, D. F., Bourne, N., Bravo, F. J., Schleiss, M. R., Slaoui, M., Myers, M. G. & Bernstein, D. I. (1995).** Effect of passive antibody on congenital cytomegalovirus infection in guinea pigs. *J Infect Dis* **172**, 944-950.
- Braud, V. M., Tomasec, P. & Wilkinson, G. W. (2002).** Viral evasion of natural killer cells during human cytomegalovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* **269**, 117-129.
- Bresnahan, W. A. & Shenk, T. E. (2000).** UL82 virion protein activates expression of immediate early viral genes in human cytomegalovirus-infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14506-14511.
- Britt, W. J. & Auger, D. (1986).** Human cytomegalovirus virion-associated protein with kinase activity. *J Virol* **59**, 185-188.
- Britt, W. J. & Vugler, L. (1987).** Structural and immunological characterization of the intracellular forms of an abundant 68,000 Mr human cytomegalovirus protein. *J Gen Virol* **68** (Pt 7), 1897-1907.
- Browne, E. P. & Shenk, T. (2003).** Human cytomegalovirus UL83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11439-11444.
- Bukowski, J. F., Warner, J. F., Dennert, G. & Welsh, R. M. (1985).** Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo. *J Exp Med* **161**, 40-52.
- Bukowski, J. F., Woda, B. A. & Welsh, R. M. (1984).** Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *J Virol* **52**, 119-128.
- Bukowski, J. F., Yang, H. & Welsh, R. M. (1988).** Antiviral effect of lymphokine-activated killer cells: characterization of effector cells mediating prophylaxis. *J Virol* **62**, 3642-3648.
- Bunde, T., Kirchner, A., Hoffmeister, B. & other authors (2005).** Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *J Exp Med* **201**, 1031-1036.
- Cantrell, S. R. & Bresnahan, W. A. (2005).** Interaction between the human cytomegalovirus UL82 gene product (pp71) and hDaxx regulates immediate-early gene expression and viral replication. *J Virol* **79**, 7792-7802.
- Chang, W. L., Baumgarth, N., Yu, D. & Barry, P. A. (2004).** Human cytomegalovirus-encoded interleukin-10 homolog inhibits maturation of dendritic cells and alters their functionality. *J Virol* **78**, 8720-8731.
- Chee, M. S., Bankier, A. T., Beck, S. & other authors (1990).** Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol* **154**, 125-169.
- Cheeran, M. C., Hu, S., Sheng, W. S., Peterson, P. K. & Lokensgard, J. R. (2003).** CXCL10 production from cytomegalovirus-stimulated microglia is regulated by both human and viral interleukin-10. *J Virol* **77**, 4502-4515.
- Chen, Z. W., Craiu, A., Shen, L., Kuroda, M. J., Iroku, U. C., Watkins, D. I., Voss, G. & Letvin, N. L. (2000).** Simian immunodeficiency virus evades a dominant epitope-specific cytotoxic T lymphocyte response through a mutation resulting in the accelerated dissociation of viral peptide and MHC class I. *J Immunol* **164**, 6474-6479.
- Cherepanov, P. P. & Wackernagel, W. (1995).** Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**, 9-14.

- Cobbold, M., Khan, N., Pourghesari, B. & other authors (2005).** Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J Exp Med* **202**, 379-386.
- Compton, T., Nepomuceno, R. R. & Nowlin, D. M. (1992).** Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology* **191**, 387-395.
- Compton, T., Nowlin, D. M. & Cooper, N. R. (1993).** Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* **193**, 834-841.
- Diamond, D. J., York, J., Sun, J. Y., Wright, C. L. & Forman, S. J. (1997).** Development of a candidate HLA A*0201 restricted peptide-based vaccine against human cytomegalovirus infection. *Blood* **90**, 1751-1767.
- Eberl, G., Widmann, C. & Corradin, G. (1996).** The functional half-life of H-2Kd-restricted T cell epitopes on living cells. *Eur J Immunol* **26**, 1993-1999.
- Einsele, H., Roosnek, E., Rufer, N. & other authors (2002).** Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* **99**, 3916-3922.
- Elkington, R., Walker, S., Crough, T., Menzies, M., Tellam, J., Bharadwaj, M. & Khanna, R. (2003).** Ex vivo profiling of CD8+-T-cell responses to human cytomegalovirus reveals broad and multispecific reactivities in healthy virus carriers. *J Virol* **77**, 5226-5240.
- Endresz, V., Burian, K., Berencsi, K. & other authors (2001).** Optimization of DNA immunization against human cytomegalovirus. *Vaccine* **19**, 3972-3980.
- Falk, C. S., Mach, M., Schendel, D. J., Weiss, E. H., Hilgert, I. & Hahn, G. (2002).** NK cell activity during human cytomegalovirus infection is dominated by US2-11-mediated HLA class I down-regulation. *J Immunol* **169**, 3257-3266.
- Feire, A. L., Koss, H. & Compton, T. (2004).** Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15470-15475.
- Finbloom, D. S. & Winestock, K. D. (1995).** IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *J Immunol* **155**, 1079-1090.
- Fishman, J. A. & Rubin, R. H. (1998).** Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* **338**, 1741-1751.
- Fowler, K. B. & Boppana, S. B. (2006).** Congenital cytomegalovirus (CMV) infection and hearing deficit. *J Clin Virol* **35**, 226-231.
- Frankenberg, N. (2002).** Analyse molekularer Mechanismen der Immundominanz MHC Klasse I-präsentierter Antigene bei Humaner Cytomegalovirus-Infektion. Dissertation am Institut für Virologie, Johannes Gutenberg - Universität, Mainz.
- Frankenberg, N., Pepperl-Klindworth, S., Meyer, R. G. & Plachter, B. (2002).** Identification of a conserved HLA-A2-restricted decapeptide from the IE1 protein (pUL123) of human cytomegalovirus. *Virology* **295**, 208-216.
- Furman, M. H., Dey, N., Tortorella, D. & Ploegh, H. L. (2002).** The human cytomegalovirus US10 gene product delays trafficking of major histocompatibility complex class I molecules. *J Virol* **76**, 11753-11756.
- Gallez-Hawkins, G., Villacres, M. C., Li, X., Sanborn, M. C., Lomeli, N. A. & Zaia, J. A. (2003).** Use of transgenic HLA A*0201/Kb and HHD II mice to evaluate frequency of cytomegalovirus IE1-derived peptide usage in eliciting human CD8 cytokine response. *J Virol* **77**, 4457-4462.
- Gallina, A., Percivalle, E., Simoncini, L., Revello, M. G., Gerna, G. & Milanesi, G. (1996).** Human cytomegalovirus pp65 lower matrix phosphoprotein harbours two transplantable nuclear localization signals. *J Gen Virol* **77** (Pt 6), 1151-1157.
- Gewurz, B. E., Wang, E. W., Tortorella, D., Schust, D. J. & Ploegh, H. L. (2001).** Human cytomegalovirus US2 endoplasmic reticulum-lumenal domain dictates association with major histocompatibility complex class I in a locus-specific manner. *J Virol* **75**, 5197-5204.

- Gibbs, V. C. & Pennica, D. (1997).**CRF2-4: isolation of cDNA clones encoding the human and mouse proteins. *Gene* **186**, 97-101.
- Gilbert, M. J., Riddell, S. R., Li, C. R. & Greenberg, P. D. (1993).**Selective interference with class I major histocompatibility complex presentation of the major immediate-early protein following infection with human cytomegalovirus. *J Virol* **67**, 3461-3469.
- Gilbert, M. J., Riddell, S. R., Plachter, B. & Greenberg, P. D. (1996).**Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature* **383**, 720-722.
- Gillespie, G. M., Wills, M. R., Appay, V. & other authors (2000).**Functional heterogeneity and high frequencies of cytomegalovirus-specific CD8(+) T lymphocytes in healthy seropositive donors. *J Virol* **74**, 8140-8150.
- Gold, M. C., Munks, M. W., Wagner, M., Koszinowski, U. H., Hill, A. B. & Fling, S. P. (2002).**The murine cytomegalovirus immunomodulatory gene m152 prevents recognition of infected cells by M45-specific CTL but does not alter the immunodominance of the M45-specific CD8 T cell response in vivo. *J Immunol* **169**, 359-365.
- Gonczol, E., Ianacone, J., Ho, W. Z., Starr, S., Meignier, B. & Plotkin, S. (1990).**Isolated gA/gB glycoprotein complex of human cytomegalovirus envelope induces humoral and cellular immune-responses in human volunteers. *Vaccine* **8**, 130-136.
- Gorbulev, S., Abele, R. & Tampe, R. (2001).**Allosteric crosstalk between peptide-binding, transport, and ATP hydrolysis of the ABC transporter TAP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3732-3737.
- Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R. & Hanahan, D. (1990).**Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4645-4649.
- Greaves, R. F. & Mocarski, E. S. (1998).**Defective growth correlates with reduced accumulation of a viral DNA replication protein after low-multiplicity infection by a human cytomegalovirus ie1 mutant. *J Virol* **72**, 366-379.
- Groothuis, T. A. & Neefjes, J. (2005).**The many roads to cross-presentation. *J Exp Med* **202**, 1313-1318.
- Gyulai, Z., Endresz, V., Burian, K. & other authors (2000).**Cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses to human cytomegalovirus pp65, IE1-Exon4, gB, pp150, and pp28 in healthy individuals: reevaluation of prevalence of IE1-specific CTLs. *J Infect Dis* **181**, 1537-1546.
- Halenius, A., Momburg, F., Reinhard, H., Bauer, D., Lobigs, M. & Hengel, H. (2006).**Physical and functional interactions of the cytomegalovirus US6 glycoprotein with the transporter associated with antigen processing. *J Biol Chem* **281**, 5383-5390.
- Hassink, G. C., Barel, M. T., van Voorden, S. B., Kikkert, M. & Wiertz, E. J. (2006).**Ubiquitination of MHC class I heavy chains is essential for dislocation by human cytomegalovirus-encoded US2 but not US11. *J Biol Chem* **281**, 30063-30071.
- Hebart, H., Rauser, G., Stevanovic, S. & other authors (2003).**A CTL epitope from human cytomegalovirus IE1 defined by combining prediction of HLA binding and proteasomal processing is the target of dominant immune responses in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hematol* **31**, 966-973.
- Hengel, H., Koopmann, J. O., Flohr, T., Muranyi, W., Goulmy, E., Hammerling, G. J., Koszinowski, U. H. & Momburg, F. (1997).**A viral ER-resident glycoprotein inactivates the MHC-encoded peptide transporter. *Immunity* **6**, 623-632.
- Hewitt, E. W., Gupta, S. S. & Lehner, P. J. (2001).**The human cytomegalovirus gene product US6 inhibits ATP binding by TAP. *EMBO J* **20**, 387-396.
- Ho, A. S., Liu, Y., Khan, T. A., Hsu, D. H., Bazan, J. F. & Moore, K. W. (1993).**A receptor for interleukin 10 is related to interferon receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11267-11271.
- Ho, A. S., Wei, S. H., Mui, A. L., Miyajima, A. & Moore, K. W. (1995).**Functional regions of the mouse interleukin-10 receptor cytoplasmic domain. *Mol Cell Biol* **15**, 5043-5053.
- Hobom, U., Brune, W., Messerle, M., Hahn, G. & Koszinowski, U. H. (2000).**Fast screening procedures for random transposon libraries of cloned herpesvirus genomes: mutational analysis of human cytomegalovirus envelope glycoprotein genes. *J Virol* **74**, 7720-7729.

- Hofmann, H., Sindre, H. & Stamminger, T. (2002). Functional interaction between the pp71 protein of human cytomegalovirus and the PML-interacting protein human Daxx. *J Virol* **76**, 5769-5783.
- Holtappels, R., Grzimek, N. K., Simon, C. O., Thomas, D., Dreis, D. & Reddehase, M. J. (2002). Processing and presentation of murine cytomegalovirus pORFm164-derived peptide in fibroblasts in the face of all viral immunosubversive early gene functions. *J Virol* **76**, 6044-6053.
- Holtappels, R., Podlech, J., Pahl-Seibert, M. F., Julch, M., Thomas, D., Simon, C. O., Wagner, M. & Reddehase, M. J. (2004). Cytomegalovirus misleads its host by priming of CD8 T cells specific for an epitope not presented in infected tissues. *J Exp Med* **199**, 131-136.
- Homer, E. G., Rinaldi, A., Nicholl, M. J. & Preston, C. M. (1999). Activation of herpesvirus gene expression by the human cytomegalovirus protein pp71. *J Virol* **73**, 8512-8518.
- Hsu, D. H., de Waal, M. R., Fiorentino, D. F., Dang, M. N., Vieira, P., de, V. J., Spits, H., Mosmann, T. R. & Moore, K. W. (1990). Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Science* **250**, 830-832.
- Irmieri, A. & Gibson, W. (1983). Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology* **130**, 118-133.
- Irwin, M. J., Heath, W. R. & Sherman, L. A. (1989). Species-restricted interactions between CD8 and the alpha 3 domain of class I influence the magnitude of the xenogeneic response. *J Exp Med* **170**, 1091-1101.
- Ison, M. G. & Fishman, J. A. (2005). Cytomegalovirus pneumonia in transplant recipients. *Clin Chest Med* **26**, 691-705, viii.
- Johnson, D. C. & Hegde, N. R. (2002). Inhibition of the MHC class II antigen presentation pathway by human cytomegalovirus. *Curr Top Microbiol Immunol* **269**, 101-115.
- Jones, B. C., Logsdon, N. J., Josephson, K., Cook, J., Barry, P. A. & Walter, M. R. (2002). Crystal structure of human cytomegalovirus IL-10 bound to soluble human IL-10R1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9404-9409.
- Jones, T. R., Hanson, L. K., Sun, L., Slater, J. S., Stenberg, R. M. & Campbell, A. E. (1995). Multiple independent loci within the human cytomegalovirus unique short region down-regulate expression of major histocompatibility complex class I heavy chains. *J Virol* **69**, 4830-4841.
- Jones, T. R. & Muzithras, V. P. (1991). Fine mapping of transcripts expressed from the US6 gene family of human cytomegalovirus strain AD169. *J Virol* **65**, 2024-2036.
- Jones, T. R. & Sun, L. (1997). Human cytomegalovirus US2 destabilizes major histocompatibility complex class I heavy chains. *J Virol* **71**, 2970-2979.
- Jones, T. R., Wiertz, E. J., Sun, L., Fish, K. N., Nelson, J. A. & Ploegh, H. L. (1996). Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11327-11333.
- Jonjic, S., Pavic, I., Polic, B., Crnkovic, I., Lucin, P. & Koszinowski, U. H. (1994). Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J Exp Med* **179**, 1713-1717.
- Kambayashi, T., Kraft-Leavy, J. R., Dauner, J. G., Sullivan, B. A., Laur, O. & Jensen, P. E. (2004). The nonclassical MHC class I molecule Qa-1 forms unstable peptide complexes. *J Immunol* **172**, 1661-1669.
- Keay, S. & Baldwin, B. (1991). Anti-idiotypic antibodies that mimic gp86 of human cytomegalovirus inhibit viral fusion but not attachment. *J Virol* **65**, 5124-5128.
- Kern, F., Faulhaber, N., Frommel, C. & other authors (2000). Analysis of CD8 T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides. *Eur J Immunol* **30**, 1676-1682.
- Kern, F., Surel, I. P., Faulhaber, N., Frommel, C., Schneider-Mergener, J., Schonemann, C., Reinke, P. & Volk, H. D. (1999). Target structures of the CD8(+)-T-cell response to human cytomegalovirus: the 72-kilodalton major immediate-early protein revisited. *J Virol* **73**, 8179-8184.

- Khan, N., Bruton, R., Taylor, G. S., Cobbold, M., Jones, T. R., Rickinson, A. B. & Moss, P. A. (2005).** Identification of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro is greatly enhanced by the use of recombinant virus lacking the US2 to US11 region or modified vaccinia virus Ankara expressing individual viral genes. *J Virol* **79**, 2869-2879.
- Khan, N., Cobbold, M., Keenan, R. & Moss, P. A. (2002).** Comparative analysis of CD8+ T cell responses against human cytomegalovirus proteins pp65 and immediate early 1 shows similarities in precursor frequency, oligoclonality, and phenotype. *J Infect Dis* **185**, 1025-1034.
- Khanna, R. & Diamond, D. J. (2006).** Human cytomegalovirus vaccine: time to look for alternative options. *Trends Mol Med* **12**, 26-33.
- Kikkert, M., Hassink, G., Barel, M., Hirsch, C., van der Wal, F. J. & Wiertz, E. (2001).** Ubiquitination is essential for human cytomegalovirus US11-mediated dislocation of MHC class I molecules from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Biochem J* **358**, 369-377.
- Kisselev, A. F., Akopian, T. N., Woo, K. M. & Goldberg, A. L. (1999).** The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem* **274**, 3363-3371.
- Koch, J. & Tampe, R. (2006).** The macromolecular peptide-loading complex in MHC class I-dependent antigen presentation. *Cell Mol Life Sci* **63**, 653-662.
- Kotenko, S. V., Krause, C. D., Izotova, L. S., Pollack, B. P., Wu, W. & Pestka, S. (1997).** Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. *EMBO J* **16**, 5894-5903.
- Kotenko, S. V., Saccani, S., Izotova, L. S., Mirochnitchenko, O. V. & Pestka, S. (2000).** Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1695-1700.
- Kyritsis, C., Gorbulev, S., Hutschenreiter, S., Pawlitschko, K., Abele, R. & Tampe, R. (2001).** Molecular mechanism and structural aspects of transporter associated with antigen processing inhibition by the cytomegalovirus protein US6. *J Biol Chem* **276**, 48031-48039.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LaFemina, R. L. & Hayward, G. S. (1983).** Replicative forms of human cytomegalovirus DNA with joined termini are found in permissively infected human cells but not in non-permissive Balb/c-3T3 mouse cells. *J Gen Virol* **64** (Pt 2), 373-389.
- Landini, M. P., Severi, B., Furlini, G. & Badiali De, G. L. (1987).** Human cytomegalovirus structural components: intracellular and intraviral localization of p28 and p65-69 by immunoelectron microscopy. *Virus Res* **8**, 15-23.
- Landolfo, S., Gariglio, M., Gribaudo, G. & Lembo, D. (2003).** The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther* **98**, 269-297.
- Larner, A. C., David, M., Feldman, G. M., Igarashi, K., Hackett, R. H., Webb, D. S., Sweitzer, S. M., Petricoin, E. F., III & Finbloom, D. S. (1993).** Tyrosine phosphorylation of DNA binding proteins by multiple cytokines. *Science* **261**, 1730-1733.
- Laughlin-Taylor, E., Pande, H., Forman, S. J., Tanamachi, B., Li, C. R., Zaia, J. A., Greenberg, P. D. & Riddell, S. R. (1994).** Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Med Virol* **43**, 103-110.
- Lee, E. C., Yu, D., Martinez, d., V, Tessarollo, L., Swing, D. A., Court DL, Jenkins, N. A. & Copeland, N. G. (2001).** A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* **73**, 56-65.
- Lehmann, J., Seegert, D., Strehlow, I., Schindler, C., Lohmann-Matthes, M. L. & Decker, T. (1994).** IL-10-induced factors belonging to the p91 family of proteins bind to IFN-gamma-responsive promoter elements. *J Immunol* **153**, 165-172.

- Lehner, P. J., Karttunen, J. T., Wilkinson, G. W. & Cresswell, P. (1997).** The human cytomegalovirus US6 glycoprotein inhibits transporter associated with antigen processing-dependent peptide translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6904-6909.
- Lilley, B. N. & Ploegh, H. L. (2004).** A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* **429**, 834-840.
- Liu, B. & Stinski, M. F. (1992).** Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP-1 cis-acting elements. *J Virol* **66**, 4434-4444.
- Liu, Y., Wei, S. H., Ho, A. S., de Waal, M. R. & Moore, K. W. (1994).** Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *J Immunol* **152**, 1821-1829.
- Lockridge, K. M., Zhou, S. S., Kravitz, R. H., Johnson, J. L., Sawai, E. T., Blewett, E. L. & Barry, P. A. (2000).** Primate cytomegaloviruses encode and express an IL-10-like protein. *Virology* **268**, 272-280.
- Loureiro, J., Lilley, B. N., Spooner, E., Noriega, V., Tortorella, D. & Ploegh, H. L. (2006).** Signal peptide peptidase is required for dislocation from the endoplasmic reticulum. *Nature* **441**, 894-897.
- Lutfalla, G., Gardiner, K. & Uze, G. (1993).** A new member of the cytokine receptor gene family maps on chromosome 21 at less than 35 kb from IFNAR. *Genomics* **16**, 366-373.
- Machold, R. P., Wiertz, E. J., Jones, T. R. & Ploegh, H. L. (1997).** The HCMV gene products US11 and US2 differ in their ability to attack allelic forms of murine major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chains. *J Exp Med* **185**, 363-366.
- Malik, P., Baba, E. & Strominger, J. L. (1999).** Biotinylation of class I MHC molecules abrogates recognition by W6/32 antibody. *Tissue Antigens* **53**, 576-579.
- Manley, T. J., Luy, L., Jones, T., Boeckh, M., Mutimer, H. & Riddell, S. R. (2004).** Immune evasion proteins of human cytomegalovirus do not prevent a diverse CD8⁺ cytotoxic T-cell response in natural infection. *Blood* **104**, 1075-1082.
- McVoy, M. A. & Adler, S. P. (1994).** Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J Virol* **68**, 1040-1051.
- Mettenleiter, T. C. (2006).** Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: the herpesvirus assembly puzzle. *Vet Microbiol* **113**, 163-169.
- 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. *J Immunol Methods* **181**, 45-54.
- Mocarski E.S. & Courcelle C.T. (2001).** Cytomegaloviruses and Their Replication. In *Fields Virology*, 4th edn, pp. 2629-2673. Edited by Knipe D.M. & Howley P.M.
- Moore, K. W., de Waal, M. R., Coffman, R. L. & O'Garra, A. (2001).** Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* **19**, 683-765.
- Moore, K. W., Vieira, P., Fiorentino, D. F., Trounstein, M. L., Khan, T. A. & Mosmann, T. R. (1990).** Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* **248**, 1230-1234.
- Murthy, P. K., Dennis, V. A., Lasater, B. L. & Philipp, M. T. (2000).** Interleukin-10 modulates proinflammatory cytokines in the human monocytic cell line THP-1 stimulated with *Borrelia burgdorferi* lipoproteins. *Infect Immun* **68**, 6663-6669.
- Nigro, G., Adler, S. P., La, T. R. & Best, A. M. (2005).** Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* **353**, 1350-1362.
- Novotny, J., Rigoutsos, I., Coleman, D. & Shenk, T. (2001).** In silico structural and functional analysis of the human cytomegalovirus (HHV5) genome. *J Mol Biol* **310**, 1151-1166.
- Nowlin, D. M., Cooper, N. R. & Compton, T. (1991).** Expression of a human cytomegalovirus receptor correlates with infectibility of cells. *J Virol* **65**, 3114-3121.

- O'Farrell, A. M., Liu, Y., Moore, K. W. & Mui, A. L. (1998). IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways. *EMBO J* **17**, 1006-1018.
- Ornoy, A. & Diav-Citrin, O. (2006). Fetal effects of primary and secondary cytomegalovirus infection in pregnancy. *Reprod Toxicol* **21**, 399-409.
- Park, B., Kim, Y., Shin, J., Lee, S., Cho, K., Fruh, K., Lee, S. & Ahn, K. (2004). Human cytomegalovirus inhibits tapasin-dependent peptide loading and optimization of the MHC class I peptide cargo for immune evasion. *Immunity* **20**, 71-85.
- Pass, R. F., Duliege, A. M., Boppana, S., Sekulovich, R., Percell, S., Britt, W. & Burke, R. L. (1999). A subunit cytomegalovirus vaccine based on recombinant envelope glycoprotein B and a new adjuvant. *J Infect Dis* **180**, 970-975.
- Peggs, K. S., Verfuere, S., Pizzey, A., Khan, N., Guiver, M., Moss, P. A. & Mackinnon, S. (2003). Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines. *Lancet* **362**, 1375-1377.
- Pepperl, S., Munster, J., Mach, M., Harris, J. R. & Plachter, B. (2000). Dense bodies of human cytomegalovirus induce both humoral and cellular immune responses in the absence of viral gene expression. *J Virol* **74**, 6132-6146.
- Pepperl-Klindworth, S., Besold, K., Frankenberg, N., Farkas, M., Kuball, J., Theobald, M. & Plachter, B. (2006). Cytomegalovirus interleukin-10 expression in infected cells does not impair MHC class I restricted peptide presentation on bystander antigen-presenting cells. *Viral Immunol* **19**, 92-101.
- Pepperl-Klindworth, S., Frankenberg, N. & Plachter, B. (2002). Development of novel vaccine strategies against human cytomegalovirus infection based on subviral particles. *J Clin Virol* **25 Suppl 2**, S75-S85.
- Pepperl-Klindworth, S., Frankenberg, N., Riegler, S. & Plachter, B. (2003). Protein delivery by subviral particles of human cytomegalovirus. *Gene Ther* **10**, 278-284.
- Plotkin, S. A. (2001). Vaccination against cytomegalovirus. *Arch Virol Suppl*, 121-134.
- 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. *J Virol* **74**, 7496-7507.
- Powis, S. J., Townsend, A. R., Deverson, E. V., Bastin, J., Butcher, G. W. & Howard, J. C. (1991). Restoration of antigen presentation to the mutant cell line RMA-S by an MHC-linked transporter. *Nature* **354**, 528-531.
- Prichard, M. N., Britt, W. J., Daily, S. L., Hartline, C. B. & Kern, E. R. (2005). Human cytomegalovirus UL97 Kinase is required for the normal intranuclear distribution of pp65 and virion morphogenesis. *J Virol* **79**, 15494-15502.
- Raftery, M. J., Wieland, D., Gronewald, S., Kraus, A. A., Giese, T. & Schonrich, G. (2004). Shaping phenotype, function, and survival of dendritic cells by cytomegalovirus-encoded IL-10. *J Immunol* **173**, 3383-3391.
- Rapp, M., Messerle, M., Lucin, P. & Koszinowski, U. H. (1993). In vivo protection studies with MCMV glycoproteins gB and gH expressed by vaccinia virus. In *Multidisciplinary Approach to understanding Cytomegalovirus Disease (Proceedings of the fourth International Cytomegalovirus Workshop, Paris, France, 19-21 April, 1993)*, pp. 327-332. Edited by Michelson, S. & Plotkin S.A.: Excerpta Medica.
- Reddehase, M. J. (2002). Antigens and immuno-evasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat Rev Immunol* **2**, 831-844.
- Reddehase, M. J., Weiland, F., Munch, K., Jonjic, S., Luske, A. & Koszinowski, U. H. (1985). Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *J Virol* **55**, 264-273.
- Reinke, P., Prosch, S., Kern, F. & Volk, H. D. (1999). Mechanisms of human cytomegalovirus (HCMV) (re)activation and its impact on organ transplant patients. *Transpl Infect Dis* **1**, 157-164.

- Reits, E., Griekspoor, A., Neijssen, J. & other authors (2003).**Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity* **18**, 97-108.
- Reits, E., Neijssen, J., Herberts, C., Benckhuijsen, W., Janssen, L., Drijfhout, J. W. & Neefjes, J. (2004).**A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity* **20**, 495-506.
- Retiere, C., Prod'homme, V., Imbert-Marcille, B. M., Bonneville, M., Vie, H. & Hallet, M. M. (2000).**Generation of cytomegalovirus-specific human T-lymphocyte clones by using autologous B-lymphoblastoid cells with stable expression of pp65 or IE1 proteins: a tool to study the fine specificity of the antiviral response. *J Virol* **74**, 3948-3952.
- 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. *Blood* **78**, 1373-1380.
- Riddell, S. R., Rabin, M., Geballe, A. P., Britt, W. J. & Greenberg, P. D. (1991a).**Class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of cells infected with human cytomegalovirus does not require endogenous viral gene expression. *J Immunol* **146**, 2795-2804.
- Riddell, S. R., Reusser, P. & Greenberg, P. D. (1991b).**Cytotoxic T cells specific for cytomegalovirus: a potential therapy for immunocompromised patients. *Rev Infect Dis* **13 Suppl 11**, S966-S973.
- 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. *Science* **257**, 238-241.
- Riley, J. K., Takeda, K., Akira, S. & Schreiber, R. D. (1999).**Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J Biol Chem* **274**, 16513-16521.
- Roizman B. & Pellett E.P. (2001).**The Family Herpesviridae: A Brief Introduction. In *Fields Virology*, 4th edn, pp. 2381-2397. Edited by Knipe D.M. & Howley P.M.
- ROWE, W. P., HARTLEY, J. W., WATERMAN, S., TURNER, H. C. & HUEBNER, R. J. (1956).**Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc Soc Exp Biol Med* **92**, 418-424.
- Ruger, B., Klages, S., Walla, B., Albrecht, J., Fleckenstein, B., Tomlinson, P. & Barrell, B. (1987).**Primary structure and transcription of the genes coding for the two virion phosphoproteins pp65 and pp71 of human cytomegalovirus. *J Virol* **61**, 446-453.
- Ryckman, B. J., Jarvis, M. A., Drummond, D. D., Nelson, J. A. & Johnson, D. C. (2006).**Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. *J Virol* **80**, 710-722.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988).**Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Salter, R. D., Howell, D. N. & Cresswell, P. (1985).**Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics* **21**, 235-246.
- Sambrook J. & Russell D.W. (2001).***Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Saric, T., Chang, S. C., Hattori, A., York, I. A., Markant, S., Rock, K. L., Tsujimoto, M. & Goldberg, A. L. (2002).**An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat Immunol* **3**, 1169-1176.
- Saveanu, L., Carroll, O., Lindo, V. & other authors (2005).**Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat Immunol* **6**, 689-697.
- Schipper, R. F., D'Amaro, J., Bakker, J. T., Bakker, J., van Rood, J. J. & Oudshoorn, M. (1997).**HLA gene haplotype frequencies in bone marrow donors worldwide registries. *Hum Immunol* **52**, 54-71.

- Schmolke, S., Drescher, P., Jahn, G. & Plachter, B. (1995a).** Nuclear targeting of the tegument protein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus: an unusual bipartite nuclear localization signal functions with other portions of the protein to mediate its efficient nuclear transport. *J Virol* **69**, 1071-1078.
- Schmolke, S., Kern, H. F., Drescher, P., Jahn, G. & Plachter, B. (1995b).** The dominant phosphoprotein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus is dispensable for growth in cell culture. *J Virol* **69**, 5959-5968.
- Schneider, U., Schwenk, H. U. & Bornkamm, G. (1977).** Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* **19**, 621-626.
- Schoppel, K., Schmidt, C., Einsele, H., Hebart, H. & Mach, M. (1998).** Kinetics of the antibody response against human cytomegalovirus-specific proteins in allogeneic bone marrow transplant recipients. *J Infect Dis* **178**, 1233-1243.
- Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R. & Shastri, N. (2002).** ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* **419**, 480-483.
- Sester, U., Gartner, B. C., Wilkens, H. & other authors (2005).** Differences in CMV-specific T-cell levels and long-term susceptibility to CMV infection after kidney, heart and lung transplantation. *Am J Transplant* **5**, 1483-1489.
- Shamu, C. E., Flierman, D., Ploegh, H. L., Rapoport, T. A. & Chau, V. (2001).** Polyubiquitination is required for US11-dependent movement of MHC class I heavy chain from endoplasmic reticulum into cytosol. *Mol Biol Cell* **12**, 2546-2555.
- Shanley, J. D. (1990).** In vivo administration of monoclonal antibody to the NK 1.1 antigen of natural killer cells: effect on acute murine cytomegalovirus infection. *J Med Virol* **30**, 58-60.
- Shanley, J. D., Jordan, M. C. & Stevens, J. G. (1981).** Modification by adoptive humoral immunity of murine cytomegalovirus infection. *J Infect Dis* **143**, 231-237.
- Shellam, G. R., Allan, J. E., Papadimitriou, J. M. & Bancroft, G. J. (1981).** Increased susceptibility to cytomegalovirus infection in beige mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 5104-5108.
- Shen, L. & Rock, K. L. (2006).** Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* **18**, 85-91.
- Sherman, L. A., Hesse, S. V., Irwin, M. J., La, F. D. & Peterson, P. (1992).** Selecting T cell receptors with high affinity for self-MHC by decreasing the contribution of CD8. *Science* **258**, 815-818.
- Shizuya, H., Birren, B., Kim, U. J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y. & Simon, M. (1992).** Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8794-8797.
- Simon, C. O., Holtappels, R., Tervo, H. M. & other authors (2006).** CD8 T cells control cytomegalovirus latency by epitope-specific sensing of transcriptional reactivation. *J Virol* **80**, 10436-10456.
- Sinclair, J. & Sissons, P. (2006).** Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* **87**, 1763-1779.
- Sinzger, C., Grefte, A., Plachter, B., Gouw, A. S., The, T. H. & Jahn, G. (1995).** Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol* **76** (Pt 4), 741-750.
- Sinzger, C., Kahl, M., Laib, K., Klingel, K., Rieger, P., Plachter, B. & Jahn, G. (2000).** Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is determined by a post-entry step dependent on efficient translocation to the nucleus. *J Gen Virol* **81**, 3021-3035.
- Soh, J., Donnelly, R. J., Mariano, T. M., Cook, J. R., Schwartz, B. & Pestka, S. (1993).** Identification of a yeast artificial chromosome clone encoding an accessory factor for the human interferon gamma receptor: evidence for multiple accessory factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8737-8741.
- Spencer, J. V., Lockridge, K. M., Barry, P. A., Lin, G., Tsang, M., Penfold, M. E. & Schall, T. J. (2002).** Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus-encoded interleukin-10. *J Virol* **76**, 1285-1292.

- Spencer, S. D., Di, M. F., Hooley, J., Pitts-Meek, S., Bauer, M., Ryan, A. M., Sordat, B., Gibbs, V. C. & Aguet, M. (1998).**The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the interleukin 10 receptor. *J Exp Med* **187**, 571-578.
- Spies, T. & DeMars, R. (1991).**Restored expression of major histocompatibility class I molecules by gene transfer of a putative peptide transporter. *Nature* **351**, 323-324.
- Springer, K. L. & Weinberg, A. (2004).**Cytomegalovirus infection in the era of HAART: fewer reactivations and more immunity. *J Antimicrob Chemother* **54**, 582-586.
- Stamminger, T., Puchtler, E. & Fleckenstein, B. (1991).**Discordant expression of the immediate-early 1 and 2 gene regions of human cytomegalovirus at early times after infection involves posttranscriptional processing events. *J Virol* **65**, 2273-2282.
- Steffens, H. P., Kurz, S., Holtappels, R. & Reddehase, M. J. (1998).**Preemptive CD8 T-cell immunotherapy of acute cytomegalovirus infection prevents lethal disease, limits the burden of latent viral genomes, and reduces the risk of virus recurrence. *J Virol* **72**, 1797-1804.
- Steinmassl, M. & Hamprecht, K. (1994).**Double fluorescence analysis of human cytomegalovirus (HCMV) infected human fibroblast cultures by flow cytometry: increase of class I MHC expression on uninfected cells and decrease on infected cells. *Arch Virol* **135**, 75-87.
- Stinski, M. F. (1978).**Sequence of protein synthesis in cells infected by human cytomegalovirus: early and late virus-induced polypeptides. *J Virol* **26**, 686-701.
- Stinski, M. F., Mocarski, E. S. & Thomsen, D. R. (1979).**DNA of human cytomegalovirus: size heterogeneity and defectiveness resulting from serial undiluted passage. *J Virol* **31**, 231-239.
- Stoltze, L., Schirle, M., Schwarz, G. & other authors (2000).**Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat Immunol* **1**, 413-418.
- Storkus, W. J., Zeh, H. J., III, Salter, R. D. & Lotze, M. T. (1993).**Identification of T-cell epitopes: rapid isolation of class I-presented peptides from viable cells by mild acid elution. *J Immunother* **14**, 94-103.
- Sugawara, S., Abo, T. & Kumagai, K. (1987).**A simple method to eliminate the antigenicity of surface class I MHC molecules from the membrane of viable cells by acid treatment at pH 3. *J Immunol Methods* **100**, 83-90.
- Sylwester, A. W., Mitchell, B. L., Edgar, J. B. & other authors (2005).**Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med* **202**, 673-685.
- Tabi, Z., Moutaftsi, M. & Borysiewicz, L. K. (2001).**Human cytomegalovirus pp65- and immediate early 1 antigen-specific HLA class I-restricted cytotoxic T cell responses induced by cross-presentation of viral antigens. *J Immunol* **166**, 5695-5703.
- Taguchi, T., McGhee, J. R., Coffman, R. L., Beagley, K. W., Eldridge, J. H., Takatsu, K. & Kiyono, H. (1990).**Detection of individual mouse splenic T cells producing IFN-gamma and IL-5 using the enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay. *J Immunol Methods* **128**, 65-73.
- Talbot, P. & Almeida, J. D. (1977).**Human cytomegalovirus: purification of enveloped virions and dense bodies. *J Gen Virol* **36**, 345-349.
- Tenney, D. J. & Colberg-Poley, A. M. (1991).**Human cytomegalovirus UL36-38 and US3 immediate-early genes: temporally regulated expression of nuclear, cytoplasmic, and polysome-associated transcripts during infection. *J Virol* **65**, 6724-6734.
- Theiler, R. N. & Compton, T. (2001).**Characterization of the signal peptide processing and membrane association of human cytomegalovirus glycoprotein O. *J Biol Chem* **276**, 39226-39231.
- Theobald, M., Biggs, J., Dittmer, D., Levine, A. J. & Sherman, L. A. (1995).**Targeting p53 as a general tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11993-11997.
- Tirabassi, R. S. & Ploegh, H. L. (2002).**The human cytomegalovirus US8 glycoprotein binds to major histocompatibility complex class I products. *J Virol* **76**, 6832-6835.

- Tirosh, B., Iwakoshi, N. N., Lilley, B. N., Lee, A. H., Glimcher, L. H. & Ploegh, H. L. (2005).** Human cytomegalovirus protein US11 provokes an unfolded protein response that may facilitate the degradation of class I major histocompatibility complex products. *J Virol* **79**, 2768-2779.
- Townsend, A., Ohlen, C., Bastin, J., Ljunggren, H. G., Foster, L. & Karre, K. (1989).** Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* **340**, 443-448.
- Townsend, A. R., Gotch, F. M. & Davey, J. (1985).** Cytotoxic T cells recognize fragments of the influenza nucleoprotein. *Cell* **42**, 457-467.
- Townsend, A. R., Rothbard, J., Gotch, F. M., Bahadur, G., Wraith, D. & McMichael, A. J. (1986).** The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell* **44**, 959-968.
- Trgovcich, J., Cebulla, C., Zimmerman, P. & Sedmak, D. D. (2006).** Human cytomegalovirus protein pp71 disrupts major histocompatibility complex class I cell surface expression. *J Virol* **80**, 951-963.
- Trowsdale, J., Hanson, I., Mockridge, I., Beck, S., Townsend, A. & Kelly, A. (1990).** Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature* **348**, 741-744.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T. & Tada, K. (1980).** Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* **26**, 171-176.
- Utz, U., Britt, W., Vugler, L. & Mach, M. (1989).** Identification of a neutralizing epitope on glycoprotein gp58 of human cytomegalovirus. *J Virol* **63**, 1995-2001.
- Varnum, S. M., Streblow, D. N., Monroe, M. E. & other authors (2004).** Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol* **78**, 10960-10966.
- Vitiello, A., Marchesini, D., Furze, J., Sherman, L. A. & Chesnut, R. W. (1991).** Analysis of the HLA-restricted influenza-specific cytotoxic T lymphocyte response in transgenic mice carrying a chimeric human-mouse class I major histocompatibility complex. *J Exp Med* **173**, 1007-1015.
- 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. *N Engl J Med* **333**, 1038-1044.
- Wang, X., Huong, S. M., Chiu, M. L., Raab-Traub, N. & Huang, E. S. (2003).** Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* **424**, 456-461.
- Wang, Z., La, R. C., Maas, R. & other authors (2004).** Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing a soluble form of glycoprotein B causes durable immunity and neutralizing antibodies against multiple strains of human cytomegalovirus. *J Virol* **78**, 3965-3976.
- Weber-Nordt, R. M., Riley, J. K., Greenlund, A. C., Moore, K. W., Darnell, J. E. & Schreiber, R. D. (1996).** Stat3 recruitment by two distinct ligand-induced, tyrosine-phosphorylated docking sites in the interleukin-10 receptor intracellular domain. *J Biol Chem* **271**, 27954-27961.
- Wehinger, J., Gouilleux, F., Groner, B., Finke, J., Mertelsmann, R. & Weber-Nordt, R. M. (1996).** IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the promoters of selected genes. *FEBS Lett* **394**, 365-370.
- Wei, M. L. & Cresswell, P. (1992).** HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain signal sequence-derived peptides. *Nature* **356**, 443-446.
- Weinshenker, B. G., Wilton, S. & Rice, G. P. (1988).** Phorbol ester-induced differentiation permits productive human cytomegalovirus infection in a monocytic cell line. *J Immunol* **140**, 1625-1631.
- Welsh, R. M., Brubaker, J. O., Vargas-Cortes, M. & O'Donnell, C. L. (1991).** Natural killer (NK) cell response to virus infections in mice with severe combined immunodeficiency. The stimulation of NK cells and the NK cell-dependent control of virus infections occur independently of T and B cell function. *J Exp Med* **173**, 1053-1063.
- Weston, K. (1988).** An enhancer element in the short unique region of human cytomegalovirus regulates the production of a group of abundant immediate early transcripts. *Virology* **162**, 406-416.

- Wiertz, E. J., Jones, T. R., Sun, L., Boggyo, M., Geuze, H. J. & Ploegh, H. L. (1996a).**The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* **84**, 769-779.
- Wiertz, E. J., Tortorella, D., Boggyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T. R., Rapoport, T. A. & Ploegh, H. L. (1996b).**Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* **384**, 432-438.
- Wills, M. R., Carmichael, A. J., Mynard, K., Jin, X., Weekes, M. P., Plachter, B. & Sissons, J. G. (1996).**The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol* **70**, 7569-7579.
- Yamashita, Y., Shimokata, K., Mizuno, S., Yamaguchi, H. & Nishiyama, Y. (1993).**Down-regulation of the surface expression of class I MHC antigens by human cytomegalovirus. *Virology* **193**, 727-736.
- Yeager, A. S., Grumet, F. C., Hafleigh, E. B., Arvin, A. M., Bradley, J. S. & Prober, C. G. (1981).**Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infections in newborn infants. *J Pediatr* **98**, 281-287.
- Yewdell, J. W., Bennink, J. R. & Hosaka, Y. (1988).**Cells process exogenous proteins for recognition by cytotoxic T lymphocytes. *Science* **239**, 637-640.
- Yewdell, J. W., Reits, E. & Neefjes, J. (2003).**Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat Rev Immunol* **3**, 952-961.
- Yu, D., Ellis, H. M., Lee, E. C., Jenkins, N. A., Copeland, N. G. & Court DL (2000).**An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5978-5983.
- Yu, Z., Theoret, M. R., Touloukian, C. E., Surman, D. R., Garman, S. C., Feigenbaum, L., Baxter, T. K., Baker, B. M. & Restifo, N. P. (2004).**Poor immunogenicity of a self/tumor antigen derives from peptide-MHC-I instability and is independent of tolerance. *J Clin Invest* **114**, 551-559.

6 Abkürzungsverzeichnis

β_2m	β_2 -Mikroglobulin
ABC-Transporter	<i>ATP Binding Cassette</i> - Transporter
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol
AIDS	erworbenes Immundefektsyndrom (<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>)
APC	Antigenpräsentierende Zelle (<i>Antigen Presenting Cell</i>)
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CFT	Chromfreisetzungstest
CPE	zytopathischer Effekt (<i>Cytopathic Effect</i>)
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten (<i>Cytotoxic T-Lymphocytes</i>)
CTLL	zytotoxische T-Lymphozyten-Linie (<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Line</i>)
DBs	<i>Dense Bodies</i>
DC	Dendritische Zelle (<i>Dendritic Cell</i>)
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRiPs	defekte ribosomale Produkte (<i>Defective Ribosomal Products</i>)
E	früh nach Infektion (<i>Early</i>)
E/Z	Effektor- zu Zielzellverhältnis
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
EGFR	EGF-Rezeptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
gp	Glykoprotein
GFP	grün-fluoreszierendes Protein (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
h	Stunde(n)
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie (<i>Highly Active Anti-Retroviral Therapy</i>)
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HFF	Humane Vorhautfibroblasten (<i>Human Foreskin Fibroblasts</i>)
HLA	humanes Leukozyten-Antigen (<i>Human Leucocyte Antigen</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horseradish Peroxidase</i>)

IE	sehr früh nach Infektion (<i>Immediate Early</i>)
IF	Immunfluoreszenz
IFN- γ	Interferon- γ
IL-10	Interleukin-10
KMT	Knochenmarkstransplantation
L	spät nach Infektion (<i>Late</i>)
LPS	Lipopolysaccharide
MCMV	Murines Cytomegalovirus
MIF	<i>Mean Fluorescence Intensity</i>
min	Minute(n)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
<i>mock</i>	Negativkontrolle bei Infektionsexperimenten
<i>moi</i>	Infektionsdosis (<i>multiplicity of infection</i>)
NIEPs	nicht infektiöse, umhüllte HCMV-Partikel (<i>Non Infectious Enveloped Particles</i>)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (<i>Open Reading Frame</i>)
p.i.	nach Infektion (<i>post infection</i>)
pAPC	professionell antigenpräsentierende Zelle (<i>professional Antigen Presenting Cell</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PFA	Paraformaldehyd
pp	Phosphoprotein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TAP	<i>Transporter Associated with Antigen Processing</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen (<i>volume/volume</i>)
w/v	Gewicht/Volumen (<i>weight/volume</i>)
WB	Western Blot

International übliche Terminologie in Englisch wurde beibehalten und zur Kennzeichnung *kursiv* gesetzt.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Experimente wurden in der Zeit von November 2002 bis August 2006 am Institut für Virologie der Johannes Gutenberg - Universität Mainz, Institutsleiter Prof. Dr. Matthias Reddehase, unter der Betreuung von Prof. Dr. Bodo Plachter durchgeführt.

Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 490 „Invasion und Persistenz bei Infektionen“ unterstützt.

Teilaspekte der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Pepperl-Klindworth, S., Besold, K., Frankenberg, N., Farkas, M., Kuball, J., Theobald, M. & Plachter, B.

Cytomegalovirus interleukin-10 expression in infected cells does not impair MHC class I restricted peptide presentation on bystanding antigen-presenting cells.

2006. *Viral Immunology*, **19**, 92-101.