

Aus dem Institut für Virologie der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg – Universität Mainz

# **Eigenschaften und Charakterisierung von CD8 Treg im Zusammenhang mit einer Cytomegalovirus-Infektion**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)“

am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

**Sara Hamdan**

geboren am 16.04.1995 in Marktredwitz

Mainz, Januar 2022

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Mai 2022

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, Sara Hamdan, dass ich meine Dissertation selbständig verfasst und keine andere als die angegeben schriftlichen und elektronischen Quellen sowie andere Hilfsmittel benutzt habe. Alle Ausführungen, die andere Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, habe ich kenntlich gemacht.

---

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift)

*Für meine Eltern*

*und*

*meine Familie in Liebe, Dankbarkeit und Stolz*

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>XI</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>XII</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>XIV</b>
<b>Summary</b>	<b>XV</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Familie der Herpesviridae</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Cytomegalovirus</b>	<b>2</b>
1.2.1. Morphologie und Genomstruktur des CMV-Virions	3
1.2.2. Penetration der Wirtszelle, Genexpression und Replikation der CMV	4
<b>1.3. Medizinische Relevanz der hCMV-Infektion</b>	<b>5</b>
1.3.1. Pathogenese in immunkompetenten Patienten	5
1.3.2. Pathogenese in immunsupprimierten Patienten	5
<b>1.4. Immunologische Kontrolle der CMV-Infektion</b>	<b>7</b>
1.4.1. Phase I: Die angeborene Immunantwort	8
1.4.1.1. Bedeutung von NK-Zellen	8
1.4.2. Phase II: Adaptive Immunantwort	9
1.4.2.1. Bedeutung von CD8 T-Zellen	9
1.4.3. Phase III: CMV-Latenz und seine Auswirkung auf das Immunsystem	10
<b>1.5. Zusammenhang von Treg und einer CMV-Infektion</b>	<b>10</b>
1.5.1. Entwicklung und Funktion der Treg	11
1.5.1.1. CD4 Treg	13
1.5.1.2. CD8 Treg	14
<b>1.6. mCMV-Infektion als Modellsystem für die hCMV-Infektion</b>	<b>18</b>
<b>1.7. Adoptive Immuntherapie</b>	<b>18</b>
<b>1.8. Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>20</b>
<b>2. Material</b>	<b>21</b>
<b>2.1. Allgemeine Laborausstattung und Reagenzien</b>	<b>21</b>

<b>2.2.</b>	<b>Plastikwaren und Verbrauchsmaterial</b>	<b>22</b>
<b>2.3.</b>	<b>Chemikalien und Lösungen</b>	<b>23</b>
<b>2.4.</b>	<b>Medien und Zusätze für die Zellkultur</b>	<b>24</b>
<b>2.5.</b>	<b>Zusammengesetzte Puffer und Lösungen</b>	<b>27</b>
2.5.1.	Puffer tierexperimenteller Methoden	27
2.5.2.	Puffer immunologischer Methoden	28
2.5.3.	Puffer für die Generierung von mCMV-Stocks	28
2.5.4.	Puffer und Lösungen histologischer Methoden	29
<b>2.6.</b>	<b>Kits</b>	<b>30</b>
<b>2.7.</b>	<b>Enzyme</b>	<b>30</b>
<b>2.8.</b>	<b>Antikörper</b>	<b>30</b>
2.8.1.	Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper	30
2.8.2.	Micro-Beads gekoppelte MACS und MagniSort Antikörper	31
2.8.3.	Für die Immunhistochemie verwendete Antikörper, Seren und Kits	31
<b>2.9.</b>	<b>Versuchstiere</b>	<b>33</b>
<b>2.10.</b>	<b>Viren</b>	<b>33</b>
<b>2.11.</b>	<b>Primäre Zellen und Zelllinien</b>	<b>34</b>
<b>2.12.</b>	<b>Statistik und Software</b>	<b>35</b>
<b>3.</b>	<b>Methoden</b>	<b>36</b>
<b>3.1.</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>36</b>
3.1.1.	Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen	36
3.1.2.	Ermittlung der Zellvitalität und der Zellzahl	37
3.1.3.	Anlage von murinen embryonalen Fibroblasten (MEF)	37
3.1.4.	Anlage dendritischer Zellen (DC) aus dem Knochenmark	39
<b>3.2.</b>	<b>Virologische Methoden</b>	<b>40</b>
3.2.1.	mCMV Produktion	40
3.2.2.	Virustiter-Bestimmung mittels <i>Plaque-Assay</i>	42
3.2.2.1.	Virustiter-Bestimmung eines Virusstocks	42
3.2.2.2.	Virustiter-Bestimmung in Organhomogenaten	43
<b>3.3.</b>	<b>Immunologische Methoden</b>	<b>44</b>
3.3.1.	Isolierung von CD8 und CD4 T-Zellen aus unterschiedlichen Organen	44
3.3.1.1.	Milz	44

3.3.1.2.	Thymus	45
3.3.1.3.	Lunge	46
3.3.1.4.	Blut	47
3.3.2.	Isolierung von T-Zellpopulationen mittels MACS	48
3.3.2.1.	Positiv-Selektion mittels MACS	48
3.3.2.2.	Negativ-Selektion mittels MACS	50
3.3.3.	Negativ-Selektion mittels MagniSort	51
3.3.4.	In <i>ex-vivo</i> Suppressions-Assay	53
3.3.5.	Nachweis der Zytokinsekretion	57
3.3.6.	<i>Next Generation Sequencing</i> (NGS)	60
<b>3.4.</b>	<b>Zytofluorometrische Methoden</b>	<b>62</b>
<b>3.5.</b>	<b>Immunhistochemie (IHC)</b>	<b>64</b>
3.5.1.	Einbetten und Schneiden der Organe	65
3.5.2.	Deparaffinierung, Rehydratisierung und Demaskierung	66
3.5.3.	Nachweis einer mCMV Infektion – mCMV-IE1	66
3.5.4.	Nachweis von CD8 Treg	68
<b>3.6.</b>	<b>Tierversuche</b>	<b>69</b>
3.6.1.	Immunsuppression	69
3.6.2.	Intraperitoneale Infektion	69
3.6.3.	Intraplantare Infektion	70
3.6.4.	Intravenöser Zelltransfer	70
3.6.5.	Adoptiver Transfer	70
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>74</b>
<b>4.1.</b>	<b>Prozentuale Verteilung der Treg</b>	<b>75</b>
<b>4.2.</b>	<b>Suppressives Potential von Treg nach einer mCMV-Infektion</b>	<b>77</b>
<b>4.3.</b>	<b>Suppressives Potential von Treg ohne mCMV-Infektion</b>	<b>80</b>
<b>4.4.</b>	<b>Verantwortliche Mechanismen für den suppressiven Effekt der Treg</b>	<b>84</b>
4.4.1.	Fas/FasL, CD28 und CTLA-4 Expression	84
4.4.2.	Zytokinsekretion	86
4.4.2.1.	Zytokinsekretion von Tresp und Treg aus mCMV-infizierten Mäusen	87
4.4.2.2.	Zytokinsekretion von Tresp und Treg aus naiven Mäusen	93
<b>4.5.</b>	<b>Genom-Datenbank der CD8 Treg</b>	<b>100</b>
4.5.1.	Zelltod	103
4.5.1.1.	Vergleich der Genexpression von CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten mit CD8 Treg Sub I aus naiven Mäusen	104

4.5.1.2.	Vergleich der Genexpression von CD8 Treg Sub I mit CD8 Treg Sub III aus mCMV-infizierten Mäusen	107
4.5.2.	Immun-Checkpoint	109
4.5.2.1.	Vergleich der Genexpression von CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten mit CD8 Treg Sub I aus naiven Mäusen	111
4.5.2.2.	Vergleich der Genexpression von CD8 Treg Sub I mit CD8 Treg Sub III aus mCMV-infizierten Mäusen	113
4.5.3.	Inflammatorische Zytokine und Chemokine	115
4.5.3.1.	Vergleich der Genexpression von CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten mit CD8 Treg Sub I aus naiven Mäusen	116
4.5.3.2.	Vergleich der Genexpression von CD8 Treg Sub I mit CD8 Treg Sub III aus mCMV-infizierten Mäusen	118
4.5.4.	Treg Marker und wichtige Regulatoren	120
4.5.4.1.	Vergleich der Genexpression von CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten mit CD8 Treg Sub I aus naiven Mäusen	120
4.2.1.1.	Vergleich der Genexpression von CD8 Treg Sub I mit CD8 Treg Sub III aus mCMV-infizierten Mäusen	122
<b>4.6.</b>	<b>Testen des suppressiven Potentials von CD8 Treg Subpopulationen</b>	<b>124</b>
<b>4.7.</b>	<b>Adoptiver Transfer der Treg</b>	<b>126</b>
4.7.1.	Transfer von CD4 und CD8 Treg	129
4.7.1.1.	Transfer von CD4 Treg	129
4.7.1.1.1.	Transfer von $5 \times 10^5$ CD4 Treg	129
4.7.1.1.2.	Transfer von $9 \times 10^5$ CD4 Treg	132
4.7.1.2.	Transfer von CD8 Treg	134
4.7.1.2.1.	Transfer von $5 \times 10^5$ CD8 Treg Sub I+IV	134
4.7.1.2.2.	Transfer von $9 \times 10^5$ CD8 Treg Sub I+IV	136
4.7.1.2.3.	Transfer von $5 \times 10^4$ CD8 Treg Sub I	139
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>142</b>
<b>5.1.</b>	<b>CD8 Treg und CD8 Treg Subpopulationen sind suppressiv <i>in vitro</i></b>	<b>142</b>
<b>5.2.</b>	<b>Suppressive Mechanismen der CD8 Treg</b>	<b>145</b>
5.2.1.	CTLA-4 Expression von CD4 und CD8 Treg	145
5.2.2.	Zytokinsekretion von CD4 und CD8 Treg	147
5.2.3.	Ausblick über suppressiven Mechanismen der Treg	149
<b>5.3.</b>	<b>CD8 Treg Subpopulationen unterscheiden sich signifikant in ihrer Genexpression</b>	<b>149</b>
5.3.1.	CD8 Treg Sub I exprimieren Gene, die Apoptose initiieren	150
5.3.2.	CD8 Treg Sub I exprimieren anti-inflammatorische Immune-Checkpoints	152

## Inhaltsverzeichnis

---

5.3.3.	CD8 Treg Sub I exprimieren inflammatorische Chemokine	153
5.3.4.	CD8 Treg Sub I exprimieren Aktivierungsmarker	154
5.3.5.	Fazit der Genexpressionsanalysen	154
<b>5.4.</b>	<b>CD4 und CD8 Treg sind <i>in vivo</i> nicht suppressiv</b>	<b>155</b>
5.4.1.	Fazit und Ausblick der Treg Suppression <i>in vivo</i>	157
<b>6.</b>	<b><i>Literatur</i></b>	<b>159</b>
<b>7.</b>	<b><i>Anhang</i></b>	<b>189</b>
<b>8.</b>	<b><i>Danksagung</i></b>	<b>204</b>
<b>9.</b>	<b><i>Lebenslauf</i></b>	<b>205</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A. bidest	<i>Aqua ad iniectabilia</i>
ABC	<i>Avidin-Biotin-Peroxidase-Färbung</i>
AIDS	<i>Aquired Immunodeficiency syndrome</i>
AIF	<i>Apoptose induzierenden Faktor</i>
APC	<i>Antigenpräsentierende Zelle, Allophycocyanin</i>
Areg	<i>Amphiregulin-Protein</i>
AT	<i>Adoptiver Transfer</i>
<i>BTLA</i>	<i>B- und T-Zell Attenuator</i>
<i>Casp3</i>	<i>Caspase-3</i>
CFDEA-SE	<i>5,6-Carboxylfluoreszein-Diacetat-Succinimidylester</i>
CFSE	<i>Carboxyfluoreszein-Succinimidyl-Ester</i>
CID	<i>Cytomegalic inclusion disease</i>
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i>
<i>CTLA-4</i>	<i>T-Lymphozyt assoziierte Antigen 4</i>
DAB	<i>Diaminobenzidin</i>
DC	<i>Dendritische Zelle</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DTR	<i>Diphtheria Toxin Rezeptor</i>
E	<i>Early</i>
EBV	<i>Epstein-Barr-Virus</i>
EDTA	<i>Dinatriumsalz-Dihydrat, Ethylendiamintetraessigsäure Tetranatriumsalz</i>
EGFR	<i>Ephithelial growth factor receptor</i>

ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMA	<i>Ethidiumbromid</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fötales Kälberserum</i>
FITC	<i>Fluoreszeinisothioyanat</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
GARP	<i>Glykoprotein-A-Wiederholungen</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
<i>Gsdmd</i>	<i>Gasdermin-D</i>
GvHD	<i>Graft versus host disease</i>
Gy	<i>Gray (unit)</i>
<i>Gzma</i>	<i>Granzym A</i>
<i>Gzmb</i>	<i>Granzym B</i>
<i>Gzmk</i>	<i>Granzym K</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<i>Wasserstoffperoxid</i>
hCMV	<i>Humanes Cytomegalovirus, Humanes Cytomegalovirus</i>
HHV	<i>Humane Herpesviren</i>
HIV	<i>Humanes Immundefizienz-Virus</i>
HSC	<i>Hämatopoetische Stammzelltransplantation</i>
HSPG	<i>Heparansulfat-Proteoglykan</i>
HSV-1	<i>Herpes-Simplex-Virus 1</i>
HSV-2	<i>Herpes-Simplex-Virus 2</i>
HVEM	<i>Herpesvirus-Eintrittsmediator</i>
i.f.	<i>intraplantare Infektion</i>
i.p.	<i>intraperitoneale Infektion</i>

i.v.	<i>intravenöser Transfer</i>
IC	<i>Immun-Checkpoint</i>
Icos	<i>Inducible T cell costimualtor</i>
IDO	<i>Indoleamine 2,3-dioxygenase</i>
IE	<i>Immediate early</i>
IFN-I	<i>Typ-I Interferon</i>
IFN $\gamma$	<i>Interferon-Gamma</i>
IHC	<i>Immunhistochemie</i>
Irf4	<i>Interferon regulatory factor 4</i>
iTreg	<i>Induced Treg</i>
KCl	<i>Kaliumchlorid</i>
KH $_2$ PO $_4$	<i>Kaliumhydrogenphosphat</i>
KLRG1	<i>Killer cell lectin-like receptor G1</i>
KSHV	<i>Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus</i>
L	<i>Late</i>
Lag3	<i>Lymphocyte activation gene 3</i>
LS-Säule	<i>Large cells columns for separation</i>
LT	<i>Lymphotoxin</i>
MACS	<i>Magnetic cell separation</i>
mCMV	<i>Murines Cytomegalovirus</i>
MEF	<i>Murine embryonale Fibroblasten</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MIEPE	<i>Major immediate early promoter enhancer</i>
Mik	<i>Mixed Lineage Kinase Domain-Like</i>
MOG	<i>Myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>

NaCl	<i>Natriumchlorid</i>
NaHCO <sub>3</sub>	<i>Natriumhydrogencarbonat</i>
NaOH	<i>Natriumhydroxid</i>
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NK	<i>Natürliche Killer Zellen</i>
p.A.	<i>pro Analysisi</i>
p.i.	<i>Post-Infektion</i>
<i>Parg</i>	<i>Poly [ADP-Ribose] Glykohydrolase</i>
<i>Parp1</i>	<i>Poly [ADP-Ribose] Polymerase 1</i>
PCA	<i>Principal component analysis</i>
PD-1	<i>Programmierter Tod</i>
pDC	<i>Plasmazytoide dendritische Zellen</i>
<i>Pdcd1</i>	<i>Programmed cell death protein 1</i>
<i>Pdcd111</i>	<i>Programmed cell death protein 1 ligand 1</i>
PE	<i>R-Phycoerythrin</i>
PE-Cy5	<i>Phycoerythrin-Cy5-Tandem-Konjugat</i>
PE-Cy7	<i>Phycoerythrin-Cy7-Tandem-Konjugat</i>
PFU	<i>Plaque forming unit</i>
PI	<i>Propidiumiodid</i>
<i>prf1</i>	<i>Perforin</i>
pTreg	<i>Peripherially derived Treg</i>
<i>RIP1</i>	<i>Rezeptor-interagierende Proteinkinase 1</i>
<i>RIP3</i>	<i>Rezeptor-interagierende Proteinkinase 3</i>
RPMI	<i>Rosewell Park Memorial Institute</i>
SA-PE	<i>Streptavidin-Phycoerythrin</i>
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>

Sek	<i>Sekunde</i>
SOCS	<i>Suppressors of cytokine signalling</i>
SPF	<i>Specified-pathogen-free</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
TARC	<i>Translational Animal Reserach Center</i>
TCR	<i>T-Zellrezeptor</i>
<i>Tigit</i>	<i>T-Zell-Imm unrezeptor mit Ig und ITIM Domänen</i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF	<i>Tumornekrosefaktor</i>
tnfsf18	<i>Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor protein G1TR</i>
Tresp	<i>Responder T-Zelle</i>
TRON	<i>Translationale Onkologie</i>
tTreg	<i>Thymus derived Treg</i>
ü.N.	<i>über Nacht</i>
VE	<i>Vollentsalztes Wasser</i>
<i>Visir</i>	<i>V-domain Ig Supressor der T-Zell Aktivierung</i>
VSP	<i>Virusstandardpuffer</i>
VZV	<i>Varicella Zoster Virus</i>
WT	<i>Wildtyp</i>
β-ME	<i>2-Mercaptoethanol</i>

## TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Klassifizierung humanpathogener Herpesviren. _____	1
Tab. 2: Titrationsschema des Suppression-Assays. _____	57
Tab. 3: Titration des Standards des LegendPlex-Assays. _____	59
Tab. 4: Absorptions- und Emissionsmaxima eingesetzter Fluorochrome. _____	63
Tab. 5: Antikörper Färbungen der Serienschnitte zum Nachweis der CD8 Treg. _____	69
Tab. 6: Gruppen des Zelltransfers eines ATs. _____	73
Tab. 7: CD8 Treg Phänotypen in den Suppression-Assays. _____	77
Tab. 8: Gruppierung der RNA-Sequenzierungsdaten. _____	101
Tab. 9: Pro und anti-inflammatorische Zytokin und Chemokin-Regulation. _____	115
Tab. 10: Gruppen des Transfers von CD8 T-Zellen mCMV-infizierter Donoren. _____	127
Tab. 11: Gruppen des Transfers von CD4 Treg und CD8 T-Zellen. _____	130
Tab. 12: Gruppen des Transfers von CD4 Treg und CD8 T-Zellen. _____	132
Tab. 13: Gruppen der transferierten CD8 Treg Sub I+IV und CD8 T-Zellkonzentration. _____	134
Tab. 14: Gruppen des Transfers von CD8 Treg Sub I+IV und CD8 T-Zellkonzentrationen. _____	137
Tab. 15: Gruppen des Transfers von CD8 Treg Sub I und CD8 T-Zellkonzentrationen. _____	139

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Immunhistochemische Färbung (IHC) infizierter Zellen nach einer mCMV-Infektion. ___	3
Abb. 2: Aufbau und Struktur eines hCMV-Virions. _____	4
Abb. 3: Drei Phasen einer CMV-Infektion. _____	7
Abb. 4: Unterdrückungsmechanismen der Treg. _____	13
Abb. 5: CD8 Treg Subpopulationen. _____	15
Abb. 6: Suppressive Mechanismen der CD8 Treg. _____	17
Abb. 7: Prinzip der positiv-Selektion mittels MACS. _____	49
Abb. 8: Prinzip der negativ-Selektion mittels MACS. _____	50
Abb. 9: Prinzip der negativ-Selektion mittels MagniSort. _____	51
Abb. 10: Prinzip des Suppression-Assays. _____	54
Abb. 11: Prinzip des ATs. _____	71
Abb. 12: Prozentuale Verteilung der Treg. _____	76
Abb. 13: Suppression-Assay nach mCMV-Infektion. _____	79
Abb. 14: Testen des suppressiven Potentials der CD4 Treg aus naiven Mäusen. _____	81
Abb. 15: Testen des suppressiven Potentials der CD8 Treg Sub I+IV aus naiven Mäusen. ___	83
Abb. 16: CD28 und CTLA-4 Interaktionen. _____	84
Abb. 17: Oberflächenexpression der Treg. _____	85
Abb. 18: Zytokinsekretion der Kokulturen von Tresp und Treg aus mCMV-infizierten Mäusen nach einem Suppression-Assay. _____	87
Abb. 19: Zytokinsekretion der Kokulturen von Tresp und Treg aus naiven Mäusen nach einem Suppression-Assay. _____	93
Abb. 20: Übersicht der RNA-Sequenzierungsdaten. _____	102
Abb. 21: Expression der am Zelltod beteiligten Gene in CD8 Treg Sub I mCMV-infizierter und naiver Mäuse. _____	106
Abb. 22: Expression der am Zelltod beteiligten Gene in CD8 Treg Sub I mit CD8 Treg Sub III mCMV-infizierter Mäuse. _____	107

Abb. 23: Expression der am Immun-Checkpoint beteiligten Genen in CD8 Treg Sub I mCMV-infizierter und naiver Mäuse. _____	111
Abb. 24: Expression der am Immun-Checkpoint beteiligten Gene der CD8 Treg Sub I und CD8 Treg Sub III aus mCMV-infizierten Mäusen. _____	114
Abb. 25: Zytokin und Chemokin-Expression von CD8 Treg Sub I mCMV-infizierter und naiver Mäuse. _____	116
Abb. 26: Zytokin und Chemokin-Expression von CD8 Treg Sub I und CD8 Treg Sub III. ____	119
Abb. 27: Expression von Treg Marker und wichtigen Regulatoren von CD8 Treg Sub I mCMV-infizierter und naiver Mäuse. _____	121
Abb. 28: Expression von Treg Marker und wichtigen Regulatoren von CD8 Treg Sub I und CD8 Treg Sub III. _____	123
Abb. 29: Testen des suppressiven Potentials von CD8 Treg Subpopulationen: _____	125
Abb. 30: Adoptiv transferierte CD8 T-Zellen mCMV-infizierter Donoren. _____	128
Abb. 31: Testen des suppressiven Potentials von $5 \times 10^5$ CD4 Treg in einem AT. _____	131
Abb. 32: Testen des suppressiven Potentials von $9 \times 10^5$ CD4 Treg in einem AT. _____	133
Abb. 33: Testen des suppressiven Potentials von $5 \times 10^5$ CD8 Treg Sub I+IV in einem AT. _	135
Abb. 34: Testen des suppressiven Potentials von $9 \times 10^5$ CD8 Treg Sub I+IV in einem AT. _	138
Abb. 35: Testen des suppressiven Potentials von $5 \times 10^4$ CD8 Treg Sub I in einem AT. ____	140
Abb. 36: Lokalisierung der CD8 Treg. _____	157

## ZUSAMMENFASSUNG

Regulatorische T-Zellen (Treg) können die Selbsttoleranz des Immunsystems regulieren, indem sie die angeborene und adaptive Immunantwort supprimieren. Ihre spezifische Rolle während einer murinen Cytomegalovirus (mCMV)-Infektion, insbesondere in Bezug auf ihrer Interaktion mit Effektor T-Zellen, ist noch unklar.

Die vorliegende Arbeit diente der Untersuchung der funktionellen und phänotypischen Eigenschaften von Treg – insbesondere der CD8 positiven Treg – im Zusammenhang mit einer mCMV-Infektion. Dabei wurde das suppressive Potential der CD4 und CD8 Treg in Bezug auf die Effektor T-Zellen *in vitro* und *in vivo* getestet. Es wurden auch die potenziell verantwortlichen suppressiven Mechanismen der Treg *in vitro* analysiert. Zudem wurden CD8 Treg mittels RNA-Sequenzierungen weiter charakterisiert.

Es konnte hier erstmals gezeigt werden, dass CD8 Treg mindestens so suppressiv *in vitro* sind, wie CD4 Treg. Das suppressive Potential wurde dabei durch eine mCMV-Infektion beeinflusst, jedoch konnte der suppressive Effekt von CD4 und CD8 Treg *in vivo* nicht bestätigt werden. Beide Treg Populationen sekretieren anti- und pro-inflammatorische Zytokine, die von einer mCMV-Infektion und den CD4 und CD8 Effektor T-Zellen abhängig ist. Eine weitere Erkenntnis der vorliegenden Arbeit war, dass die, im Rahmen dieser Arbeit definierten, CD8 Treg Subpopulationen sich in ihrer Genexpression voneinander unterscheiden.

## SUMMARY

Regulatory T cells (Treg) can regulate the self-tolerance of the immune system by suppressing the innate and adaptive immune response. Their specific role during a murine cytomegalovirus (mCMV) infection, especially their interaction with effector T cells, is still unclear.

The present study investigated the functional and phenotypical properties of Treg – in particular CD8 positive Treg – in the context of mCMV infection. In detail, the suppressive potential of CD4 and CD8 Treg on effector T cells was determined *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, the potentially responsible suppressive mechanisms of Treg were analysed *in vitro*. In addition, CD8 Treg were further characterized via RNA sequencing.

The present work showed for the first time, that CD8 Treg were at least as suppressive *in vitro* as their CD4-positive counterpart. The suppressive potential was influenced by an mCMV-infection; however, the suppressive effect could not be confirmed *in vivo*. It was further shown, that both Treg secrete anti- and pro-inflammatory cytokines, which were dependent on mCMV-infection as well as on CD4 and CD8 effector T cells. Another core finding was that the CD8 Treg subpopulations defined in this work differ significantly from each other in their gene expression profile

# 1. EINLEITUNG

Die vorliegende Arbeit diene der weiteren Untersuchung der funktionellen und phänotypischen Eigenschaften von CD8-positiven regulatorischen T-Zellen im Zusammenhang mit einer Cytomegalovirus-Infektion. In der Einleitung wird zunächst kurz die Familie der *Herpesviridae* (s. 1.1) und im Anschluss die Pathogenese, sowie die medizinische Relevanz der Cytomegaloviren (s. 1.2; 1.3) beschrieben. Danach wird näher auf die Immunkontrolle einer Cytomegalovirus-Infektion (s. 1.4) sowie auf die regulatorischen T-Zellen und deren Relevanz im Zusammenhang mit einer Cytomegalovirus-Infektion eingegangen (s. 1.5). Zusätzlich dazu wird näher auf die murine Cytomegalovirus-Infektion als Modell gegen das humane Cytomegalovirus (s. 1.6), sowie auf die adoptive Immuntherapie eingegangen (s. 1.7).

## 1.1. Familie der *Herpesviridae*

Der Begriff „Herpes“ geht auf Hippokrates zurück, welcher abnorme Hautgeschwüre mit dem altgriechischen Wort „έρπειν“, latein.: „herpes“ beschrieb (Wagner & Bloom 1997). Dies bedeutet „schleichen / kriechen“. Erst Jahrhunderte später konnte festgestellt werden, dass es sich bei Herpes um eine kontagiöse Viruserkrankung handelt (Wagner & Bloom 1997). Es wurden bis *dato* mehr als 200 Spezies von Herpesviren bei Wirbel- und Säugetieren entdeckt, darunter sind acht humanpathogen (humane Herpesviren, HHV) (s. **Tab. 1**).

**Tab. 1: Klassifizierung humanpathogener Herpesviren.**

Unterfamilie	Genus	Virus	Synonym	Referenz
<b><i>α-Herpesvirinae</i></b>	Simplexvirus	HHV-1	Herpes-Simplex-Virus 1 (HSV-1)	(Grüter 1924, Schneweis 1962)
		HHV-2	Herpes-Simplex-Virus 2 (HSV-2)	(Schneweis 1962)
	Varicellovirus	HHV-3	Varicella Zoster Virus (VZV)	(Dumas et al. 1980)
<b><i>β-Herpesvirinae</i></b>	Cytomegalovirus	HHV-5	Humanes Cytomegalovirus (hCMV)	(SMITH 1956)
	Roseolovirus	HHV-6		(Frenkel et al. 1990)
		HHV-7		
<b><i>γ-Herpesvirinae</i></b>	Lymphocryptovirus	HHV-4	Epstein-Barr-Virus (EBV)	(EPSTEIN et al. 1965, Lindquister & Pellett 1991)
	Rhadinovirus	HHV-8	Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus (KSHV)	(Chang et al. 1994)

Alle Arten von Herpesviren weisen morphologische Gemeinsamkeiten auf. Unter anderem sind Mitglieder der *Herpesviridae* 124-235 Kilobasenpaare (kbp) große, behüllte Viren mit linearer doppelsträngiger DNA (100-200nm) (Roizman et al. 1981). Die Viren bestehen aus vier Hauptkomponenten: Lipidhülle, amorphe Tegument, ikosaedrisches Kapsid und das

DNA-Protein-Komplex (*core*) (Hay et al. 1987, Whitley 1996). Zudem werden alle Herpesviren durch Tröpfcheninfektion (z.B. Sprechen, Niesen, Husten), sowie durch direkte (z.B. Küssen, Geschlechtsverkehr) oder indirekte Schmierinfektion (z.B. Händeschütteln) übertragen. Auch eine diaplazentare Infektion von der Mutter auf das Kind ist möglich. Alle Mitglieder der Familie haben außerdem die Fähigkeit zur Etablierung der Latenz, d.h. die Viren verbleiben nach der Primärinfektion lebenslang in ihrem Wirt, können jedoch aufgrund von Immunsuppressionen oder z.B. Stress, UV-Strahlung etc. reaktiviert werden (Roizman & Baines 1991). Dabei verursachen folgende Viren die schwersten Krankheitsverläufe: Herpes-simplex-Virus 1 und 2 (HSV1 und HSV2), Epstein-Barr-Virus (EBV), Cytomegalovirus (CMV) und Varizella-Zoster-Virus VZV (Grinde 2013). Aufgrund der Kontagiösität sind nahezu 100% der Weltbevölkerung mit mindestens einem der Herpesviren infiziert (Grinde 2013). Herpesviren wurden aufgrund ihrer Strukturen, Pathogenität, Replikationsstrategien, sowie der Zytopathologie in drei Untergruppen eingeteilt:  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ - Subfamilien (Roizman et al. 1981).

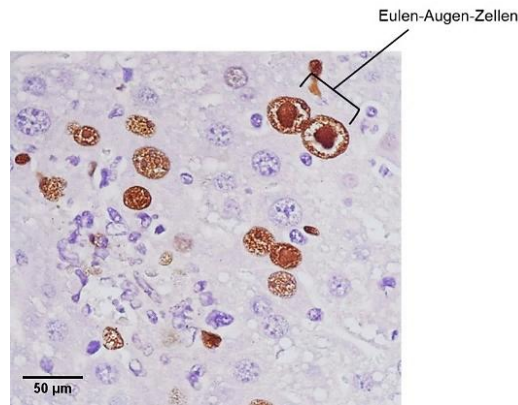
*$\alpha$ -Herpesviridae* zeichnen sich durch ihr breites Zell-Spektrum, einen kurzen Replikationszyklus, sowie der Latenz in Ganglienzellen aus (Wagner & Bloom 1997).

*$\beta$ -Herpesviridae* zeigen eine strikte Speziespezifität, lange Replikationszyklen und eine Etablierung der Latenz in Zellen des angeborenen sowie adaptiven Immunsystems (Grinde 2013). Näheres zu dieser Subfamilie folgt im nächsten Kapitel (s. 1.2).

*$\gamma$ -Herpesviridae* besitzen ein limitiertes Wirtsspektrum und etablieren ihre Latenz in B- und T-Lymphozyten (lymphoiden Geweben) (Roizmann et al. 1992, Pellet & Roizman 2007).

### 1.2. Cytomegalovirus

Das Cytomegalovirus (CMV) gehört zur Familie der *Herpesviridae* nach der Klassifikation des Internationalen Komitees für Virustaxonomie (Roizman et al. 1981). Namensgebend für das Virus war die charakteristische Vergrößerung infizierter Zellen, Zytomegalie (griech.  $\mu\epsilon\gamma\alpha\lambda\omicron\varsigma$ ; latein: *megalos*; riesig). Dieses Phänomen wird oftmals als Eulen-Augen-Zellen bzw. Riesenzellen bezeichnet, da nach einer CMV-Infektion die Zellkerne so stark vergrößert sind, dass diese Eulenaugen ähneln (s. **Abb. 1**) (Weller et al. 1960). Das Virus ist weltweit verbreitet, jedoch hängt seine Inzidenz sowohl vom Lebensalter als auch von sozioökonomischen Faktoren ab (Ho 2008). In Entwicklungsländern beträgt die Durchseuchungsrate nahezu 100%, während in Industrieländern nur etwa 50% der Bevölkerung mit dem humanen CMV (hCMV) infiziert ist (Ho 2008).



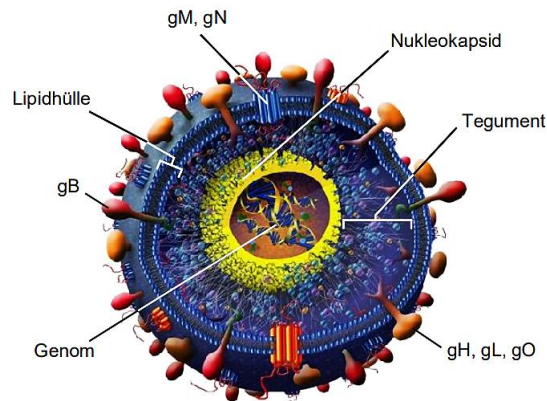
**Abb. 1: Immunhistochemische Färbung (IHC) infizierter Zellen nach einer mCMV-Infektion.** Die infizierten Zellen wurden mit einem Virusantigen-spezifischen Primärantikörper (IE1, Cr101) und einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt. Das Substrat dieser Färbung ist Diaminobenzidin (DAB; Bildung von braunen Präzipitaten). Die nicht-infizierten Zellkerne erschienen durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin blau. Die vergrößerten, braun gefärbten, infizierten Zellkerne werden aufgrund ihres Aussehens als Eulen-Augen-Zellen bezeichnet. Die Aufnahme zeigt eine 40x Vergrößerung. Der Marker repräsentiert 50µm.

Neben dem humanpathogenen Vertreter, hCMV, gibt es auch tierpathogene Spezies, unter anderem das murine CMV (mCMV), das CMV aus der Ratte oder dem Meerschweinchen (Reddehase 2002). Da das hCMV nicht in experimentellen Modellen untersucht werden kann, wurde die mCMV-Infektion bei Mäusen zudem am weitesten verbreiteten Modell für die Untersuchung der Prinzipien einer CMV-Infektion, sowie deren Pathogenese (Reddehase 2002, Reddehase 2013a). Weitere Details sind in Kapitel 1.6. erklärt.

### 1.2.1. Morphologie und Genomstruktur des CMV-Virions

Der Aufbau von CMV (s. **Abb. 2**) weist die klassische Morphologie der *Herpesviridae* auf (s. 1.1). Cytomegaloviren haben einen Durchmesser von 150-200nm mit einer linearen doppelsträngigen DNA (ca. 230kbp) (Reddehase 2013a). Dadurch enthält CMV das größte Genom im Vergleich zu den restlichen Viren innerhalb der Familie der Herpesviren (Reddehase 2013a). In etwa 170 offene Leserahmen (*open reading frames*; ORFs) konnten bei mCMV und 200 ORFs bei hCMV identifiziert werden (Chee et al. 1990, Cha et al. 1996, Rawlinson et al. 1996, Murphy et al. 2003, Dolan et al. 2004, Tang et al. 2006). Jedoch konnte den meisten ORFs noch keine definierte Funktion zugeordnet werden. Es wird davon ausgegangen, dass unter den 170 ORFs von mCMV ca. 78 eine starke Homologie zu den hCMV ORFs aufweisen (Reddehase 2013b). Das Kapsid hat einen Durchmesser von ca. 100nm und besteht aus 162 Kapsomeren die für den Aufbau und Reifung des Virions essentiell sind (Chen et al. 1999, Landolfo et al. 2003, Tomtishen 2012, Reddehase 2013a). Im Tegument befinden sich in etwa 20-25 virale Proteine, welche an der Virionenreifung, der viralen sowie zellulären Ereignissen während einer Infektion oder der Freisetzung viraler DNA beteiligt sein könnten (Landolfo et al. 2003, Reddehase

2013a). In der Lipidhülle befinden sich virale und zelluläre Glykoproteine welche essentiell für die Virionenreifung und Induktion einer CMV-spezifischen Immunantwort sind (Tooze et al. 1993, Varnum et al. 2004, Pellet & Roizman 2007).



**Abb. 2: Aufbau und Struktur eines hCMV-Virions.** Typischer Aufbau eines hCMV-Virions mit dreischichtiger Struktur, bestehend aus doppelsträngiger DNA, Kapsid, Tegument und Lipidhülle in die viralen Glykoproteine (gM, gN, gH, gL, gO, gB) eingelagert sind. Modifiziert nach Streblow et al. 2006.

### 1.2.2. Penetration der Wirtszelle, Genexpression und Replikation der CMV

CMV initiiert die Infektion über eine unspezifische Bindung viraler Glykoproteine (gM, gN, gB) an Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG). Dadurch wird die Adsorption eingeleitet (Compton et al. 1993). Anschließend, interagieren und binden virale Proteine an zelluläre Rezeptoren (*docking*). Mögliche Kandidaten sind vermutlich der *epithelial growth factor receptor* (EGFR), Annexin II, CD13 und/oder Integrine (Söderberg et al. 1993, Wright et al. 1994, Feire et al. 2004). Nach der Bindung kann die virale Lipidhülle mit der Zellmembran der Wirtszelle fusionieren, wodurch das Kapsid in das Zytoplasma der Wirtszelle gelangt (= Penetration). Dies geschieht bei CMV durch einen pH-unabhängigen Prozess (Compton et al. 1992, Compton et al. 1993). Das Tegument wird im Zytoplasma entfernt (*uncoating*), wodurch das virale Genom ins Nukleoplasma des Wirts abgegeben wird (Ojala et al. 2000).

Die CMV-Infektion in permissiven Wirtszellen wird kaskadenartig reguliert und besteht aus folgenden viralen Ereignissen: Viraler Eintritt; IE (*immediate early*)- und E (*early*)- Genexpression; DNA-Replikation, L (*late*)-Phase und zuletzt die virale Verpackung und Freigabe (Honess & Roizman 1974, Emery & Griffiths 1990, Mocarski et al. 2007, Martínez et al. 2014). Sobald nach dem viralen Eintritt zelluläre Transkriptionsfaktoren an den *major immediate early promoter enhancer* (MIEPE) binden, kann die Transkription der IE-Gene initiiert werden (Kropp et al. 2009). Die im Anschluss ablaufende E-Phase ist abhängig von der Expression der IE-Genprodukte. E-Proteine sind von besonderer Bedeutung für die DNA-Replikation des CMV

Genoms, welche den Beginn der L-Phase definieren. In dieser Phase werden Strukturproteine synthetisiert.

### **1.3. Medizinische Relevanz der hCMV-Infektion**

Die Übertragung von hCMV kann horizontal oder vertikal erfolgen. Die **horizontale Transmission** findet durch Schmier- oder Tröpfcheninfektion, Organtransplantationen oder Bluttransfusionen statt (Reddehase 2002, Mocarski et al. 2007). Die **vertikale Transmission** erfolgt diaplazentar, während der Geburt von der infizierten Mutter auf das ungeborene Kind, oder postnatal über die Muttermilch. hCMV gilt als die häufigste infektiöse Ursache für angeborene neurologische Erkrankungen durch eine diaplazentare Übertragung während der Schwangerschaft (Jean Beltran & Cristea 2014). Auf die Pathogenese der hCMV-Infektion wird in den Kapiteln 1.3.1 und 1.3.2 näher eingegangen.

#### **1.3.1. Pathogenese in immunkompetenten Patienten**

Die Primärinfektion von immunkompetenten Patienten mit hCMV läuft meist asymptomatisch ab, da das Immunsystem die Virusausbreitung kontrollieren kann (s. 1.4). Vereinzelt wird von einer Mononukleose-ähnlicher Symptomatik berichtet (Klemola et al. 1970). Eine hCMV-Infektion kann während des gesamten Lebens erfolgen. Trotz effizienter Immunkontrolle wird – wie bei allen Herpesviren – eine lebenslange **Latenz** etabliert. Während der Latenz ist das infektiöse Virus nicht nachweisbar. Eine Ausscheidung infektiöser Virionen erfolgt während der Primärinfektion sowie während einer **Rekurrenz** (Reaktivierung des viralen Genoms zur produktiven Infektion) (Mocarski et al. 2007). Das hCMV kann vor allem im Urin und Speichel nachgewiesen werden (Meyers et al. 1990).

#### **1.3.2. Pathogenese in immunsupprimierten Patienten**

Von besonderer Relevanz ist die CMV-Infektion in immunsupprimierten Patienten, sowie bei Neugeborenen und Ungeborenen mit nicht ausgereiftem Immunsystem, da die Infektion zu schwerer klinischer Manifestation führen, oder letal enden kann. Dabei lassen sich drei Risikogruppen unterscheiden:

##### ***I. Kongenital infizierte Embryonen oder Föten***

Schwerwiegende kongenitale Infektionen treten vor allem nach einer Primärinfektion oder Reinfektion auf, wodurch lebenslange neurologische Folgen wie zum Beispiel

mentale Retardation entstehen können (Fowler et al. 1992, Reddehase 2002, Mocarski et al. 2007). Die hervorgerufene Symptomatik wird als CID (*cytomegalic inclusion disease*) bezeichnet (Jahn et al. 1988). Der Name CID spiegelt zwei pathognomische zytopathologische Anzeichen einer CMV-Infektion wider: zum einen die Vergrößerung von infizierten Zellen (Zytomegalie) sowie die Bildung eines intranukleären Einschlusskörpers (Reddehase 2002). Es wurde beschrieben, dass ungefähr 1/3 der Schwangeren nach einer hCMV-Primärinfektion das Virus auf ihr Kind übertragen, wobei nur 10% der Kinder Symptome und 90% der Kinder keine Symptome aufweisen (Boppana et al. 1992, Fowler et al. 1992). Die Symptome der Kinder sind besonders schwerwiegend, wenn sich die Mutter in den ersten 16 Schwangerschaftswochen zum ersten Mal mit hCMV infiziert, da dort die Organentwicklung und neuronale Migration des Embryos stattfindet (Revello et al. 2006, Gibson et al. 2007, Hassan et al. 2007, La Rosa & Diamond 2012). Seronegative schwangere Frauen tragen ein 40%iges Risiko einer CMV-Übertragung auf ihren Fötus, wobei eine vertikale Transmission auch in seropositive Schwangeren auftreten kann (Revello et al. 2006).

### **II. Patienten mit immunsuppressiver Behandlung**

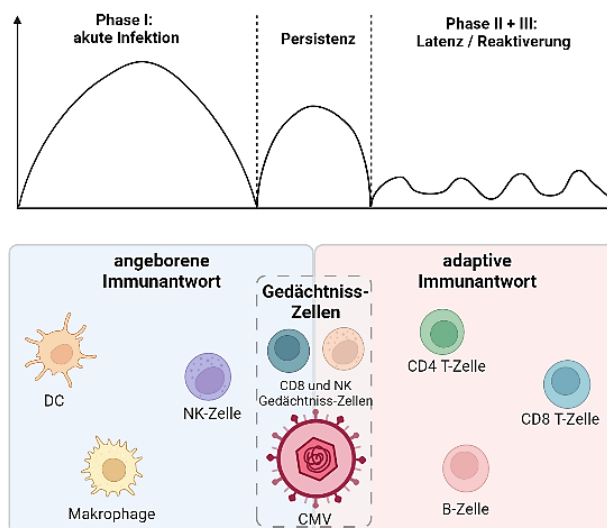
Zu dieser Risikogruppe gehören Empfänger nach hämatopoetischen Stammzell- (HSC) oder Organtransplantation sowie Krebspatienten (Dowling et al. 1976, Neiman et al. 1977, Singh et al. 1988). Der CMV-Serostatus von Transplantatdonoren und -rezipienten und/oder die Immunsuppression nach einer Transplantation beeinflussen die Erkrankung nach einer CMV-Infektion (Miller et al. 1991, Boeckh et al. 2003). Die häufigsten Organmanifestationen nach einer primären oder rekurrenten CMV-Infektion sind interstitielle Pneumonie, Kolitis, Gastroenteritis, Hepatitis und Retinitis (Moskowitz et al. 1985, Cheung & Teich 1999, Mocarski et al. 2007). Außerdem führt eine CMV-Infektion häufig zu einer Transplantationsabstoßung oder zu einer signifikanten Funktionsminderung (Duncan et al. 1994, Roberts et al. 1998, Waiser et al. 1998, Hartmann et al. 2006). Eine antivirale Chemotherapie limitiert die CMV-Infektion in den Patienten, doch die Anwendung führt zu einer erheblichen Toxizität wodurch Transplantatempfänger dem Risiko multipler Infektionen ausgesetzt sind (Limaye et al. 2006, Gratama et al. 2010). Wenn antivirale Medikamente abgesetzt werden, oder eine Immunschwäche weiterhin besteht, können Patienten immer noch eine spät einsetzende CMV-Erkrankung entwickeln, die oft mit einer Resistenz gegen Virostatika verbunden ist (La Rosa & Diamond 2012).

### **III. Patienten mit angeborener oder erworbener Immunschwächekrankheit**

Personen mit einer angeborenen (severe combined immunodeficiency, SCID) oder erworbenen (aquired immunodeficiency syndrome, AIDS) Immundefizienz, können durch eine hCMV-Primärinfektion, -Re-Infektion oder -Rekurrenz schwer erkranken (Moskowitz et al. 1985, Drew 1988). Es ist bekannt, dass bis zu 40% aller HIV Patienten mit hCMV infiziert sind (Sison et al. 1991, Cheung & Teich 1999). Eine AIDS-Symptomatik der Patienten wird häufig durch eine hCMV hervorgerufene Chorioretinitis (Entzündung der Netzhaut) drastisch verschlimmert (Sison et al. 1991).

### 1.4. Immunologische Kontrolle der CMV-Infektion

Für die Kontrolle einer CMV-Infektion spielen sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem eine essenzielle Rolle (Reddehase 2002, Paludan et al. 2011). Außerdem sind intrinsische Immunantworten sowie virale Gegenmaßnahmen essenziell um ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Wirt und Pathogen zu erhalten (Berry et al. 2020, Poole & Nevels 2021, Schilling et al. 2021). Eine CMV-Infektion kann zwar kontrolliert, das Virus jedoch nicht aus dem Körper eliminiert werden. Die immunologische Kontrolle einer CMV-Infektion durchläuft drei verschiedene Phasen (s. **Abb. 3**) (Picarda & Benedict 2018). In den folgenden Kapiteln werden diese Phasen näher beschrieben (s. 1.4.1; 1.4.2; 1.4.3).



**Abb. 3: Drei Phasen einer CMV-Infektion.** Die erste / akute Phase, während der angeborenen Immunantwort wird durch NK-Zellen, DC und Makrophagen einige Wochen nach einer CMV-Infektion kontrolliert. Die persistierende Replikationsphase kann Monate oder sogar Jahre andauern (bei Mäusen Wochen bis Monate). Phase II und III zeigen sowohl die Auswirkung des adaptiven Immunantwort als auch die latente Phase von CMV, in welcher weiterhin die T- und B-Lymphozyten Abwehrmechanismen formen. Diese Abbildung wurde von Picarda et. al 2018 entnommen und mit der Software BioRender modifiziert.

### 1.4.1. Phase I: Die angeborene Immunantwort

Im **angeborenen Immunsystem** spielen vor allem Natürliche Killer Zellen (NK und Typ-I Interferone (IFN-I) eine entscheidende Rolle für die Kontrolle der CMV-Infektion, wobei dies innerhalb der ersten drei Tagen primär von den NK-Zellen vermittelt wird (Bukowski et al. 1984, Biron et al. 1989, Arase et al. 2002, Jonjic et al. 2006). Da die hCMV-Primärinfektion bei immunkompetenten Menschen meist asymptomatisch verläuft, gibt es nur wenige Studien, die über die Immunkontrolle in der akuten Phase I berichten. Daher war es essenziell die Replikation von CMV in Tiermodellen wie in der Maus zu untersuchen. mCMV induziert zwei Phasen von IFN-I (Picarda & Benedict 2018). In der Anfangsphase wird dies in den ersten 10-12 Stunden von Milzstromazellen produziert, welches von der B-Zelle abgeleiteten Lymphotoxin (LT)  $\alpha$ -Signalgebung abhängig ist (Schneider et al. 2008, Picarda & Benedict 2018). Die zweite Phase tritt nach 36-48 Stunden auf und wird sowohl von plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) als auch von konventionellen dendritischen Zellen (DC) erzeugt (Picarda & Benedict 2018). Zusätzlich zu IFN-I produzieren die DC hohe Konzentrationen von IL-12 und IL-18, welches die NK-Zellaktivierung fördert (Biron 1998, Andrews et al. 2003, Picarda & Benedict 2018). Es wird angenommen, dass die angeborene Immunantwort auf eine CMV-Infektion durch Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen die Toll-like-Rezeptoren (TLRs) aktivieren, welches zur Freisetzung antiviraler und pro-inflammatorischer Zytokine führt (West et al. 2012, Zheng et al. 2020, Poole & Nevels 2021).

#### 1.4.1.1. Bedeutung von NK-Zellen

Die antivirale Aktivität der NK-Zellen beruht auf der Sezernierung verschiedener Zytokine und Chemokine (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-5, IL-10 und IL13) (Jonjic et al. 2006). NK-Zellen können durch Exozytose infizierter Zellen durch Perforin, Granzym oder durch die direkte Bindung an z.B. Fas, Apoptose induzieren (Biron et al. 1989, Nagata 1997, Tay & Welsh 1997, Smyth et al. 2003, van Dommelen et al. 2003, Loh et al. 2005, Chávez-Galán et al. 2009). In C57BL/6 Mäusen exprimieren ca. 50% der aus der Milz stammenden NK-Zellen den Ly49H Rezeptor, welcher an das mCMV m157 Protein bindet (Brown et al. 2001, Arase et al. 2002, Picarda & Benedict 2018). Das m157 Protein wird auf der Oberfläche infizierter Zellen exprimiert, welches von Ly49H effizient erkannt und lysiert werden kann (Brown et al. 2001, Daniels et al. 2001, Lee et al. 2001, Arase et al. 2002). Es gibt signifikante Unterschiede in der viralen Suszeptibilität zwischen verschiedenen Mausstämmen (Brown et al. 2001, Lee et al. 2001, Cheng et al. 2008). Während mCMV-resistente C57BL/6 Mäuse Ly49H exprimieren, fehlt mCMV-sensitiven BALB/c Mäusen

dieser Rezeptor (Brown et al. 2001, Lee et al. 2001, Cheng et al. 2008). Dadurch werden vor allem in der Milz der BALB/c Maus deutlich höhere Virustiter nachgewiesen als in der C57BL/6 Maus (Scalzo et al. 1992, Daniels et al. 2001).

Obgleich durch die Immunkontrolle des angeborenen Immunsystems eine CMV-Infektion kontrolliert werden kann, kann keine dauerhafte Kontrolle gewährleistet werden, weshalb das adaptive Immunsystem für die Terminierung der Infektion unerlässlich ist (Welsh et al. 1991, Reddehase et al. 1994).

### 1.4.2. Phase II: Adaptive Immunantwort

Die **adaptive Immunantwort** einer CMV-Infektion beinhaltet sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunität (van de Berg et al. 2008, Macagno et al. 2010, van de Berg et al. 2010, La Rosa & Diamond 2012). Die Entwicklung der adaptiven Immunantwort ist essenziell um die CMV-Primärinfektion zu kontrollieren (La Rosa & Diamond 2012). CMV-spezifische T-Zellen sind für die Dynamik der lebenslangen Interaktion zwischen Wirt und Virus verantwortlich (La Rosa & Diamond 2012). T-Zellen sind wichtig um die CMV Replikation zu hemmen und CMV-vermittelte Erkrankungen vorzubeugen – wobei T-Zellen weder das Virus aus dem Wirt eliminieren, noch eine Transmission der Virionen verhindern können (Sylwester et al. 2005, La Rosa & Diamond 2012). Antivirale-Antikörper, Virus-spezifische CD4 und CD8 T-Zellen, sowie die Gedächtnis (*memory*)-Zellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Terminierung der CMV-Infektion (Ahmed & Gray 1996). Die Antikörper vermittelte humorale Immunität spielt eine untergeordnete Rolle; CMV-spezifische Antikörper, können jedoch vor einer Sekundär-Infektion schützen (Jonjić et al. 1994, Reddehase et al. 1994).

#### 1.4.2.1. Bedeutung von CD8 T-Zellen

Obwohl NK-Zellen in der frühen post-Infektionsphase eine wichtige Rolle spielen, werden T-Lymphozyten, vor allem CD8 T-Zellen, für die Kontrolle der Infektion und Etablierung der Latenz benötigt (Krmpotić et al. 2003). Dabei sind zytotoxische CD8 T-Zellen (CTLs, *cytotoxic T lymphocytes*) für die langfristige Kontrolle der CMV-Infektion verantwortlich. Zu den Funktionen von CTLs zählt – ähnlich wie bei den NK-Zellen – die Sezernierung von Zytokinen und Chemokinen, sowie deren zytolytische Aktivität (Harty et al. 2000). Die ursprüngliche protektive Kapazität von CD8 T-Zellen zur Kontrolle einer mCMV-Infektion wurde durch den adoptiven Transfer von CD8 T-Zellen mCMV-infizierter Donoren in syngene subletal  $\gamma$ -bestrahlte Rezipienten gezeigt (Reddehase et al. 1985, Reddehase et al. 1988). Diese Studien zeigten,

dass T-Lymphozyten aus dem drainierenden Lymphknoten akut infizierter immunkompetenter Mäuse, sowie Gedächtnis T-Zellen aus latent infizierten Mäusen, die Mortalität von CMV verhindern und die Virusreplikation in verschiedenen Organen limitieren können (Krpmotic et al. 2003). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die antivirale Wirkung von T-Lymphozyten eine Funktion der CD8 T-Zellen war, während CD4 T-Zellen ineffizient schützen (Krpmotic et al. 2003). Eine Ausnahme stellt die Immunkontrolle in der Speicheldrüse dar, denn diese ist von den CD4 T-Zellen und deren IFN $\gamma$  Freisetzung abhängig (Debes et al. 2006, Humphreys et al. 2007). Diese Erkenntnis konnte durch den Transfer von *in vitro* generierten mCMV-Peptid spezifischen CTL-Linien bestätigt werden (Holtappels et al. 2000, Holtappels et al. 2001, Holtappels et al. 2002). Studien konnten zeigen, dass durch murine Knochenmarktransplantationen eine Rekonstitution von CD8 T-Zellen unerlässlich für die Terminierung einer mCMV-Infektion ist (Alterio de Goss et al. 1998, Holtappels et al. 1998, Podlech et al. 1998, Podlech et al. 2000). Dies konnte ebenfalls nach einer hCMV-Erkrankung in immungeschwächten Patienten nach einer Knochenmarktransplantation nachgewiesen werden (Riddell et al. 1992, Walter et al. 1995, Einsele et al. 2002, Feuchtinger et al. 2010, Peggs et al. 2011).

### **1.4.3. Phase III: CMV-Latenz und seine Auswirkung auf das Immunsystem**

Die Latenz wurde für das hCMV fast ausschließlich in hämatopoetischen Vorläufer- und Myeloischen-Linienzellen untersucht, da zum einen diese Zellen relativ leicht zugänglich sind und zum anderen beherbergen diese Zellen ein latentes virales Genom in seropositiven Menschen (Goodrum 2016, Forte et al. 2020). Studien zeigten, dass sobald die 3. Phase erreicht wird, die kooperativen Funktionen von Lymphozyten, einschließlich NK-, CD4-, CD8 T-Zellen und CMV-spezifischen Antikörpern, die Produktion des Virus von latenten Pools aus Milz und Lunge verhindern (Polić et al. 1998, Almanan et al. 2017).

### **1.5. Zusammenhang von Treg und einer CMV-Infektion**

Wie bereits in Kapitel 1.4. erwähnt, wird eine CMV-Infektion sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen durch die adaptive Immunität kontrolliert. Dennoch kann das Virus nicht eliminiert werden, wodurch eine lebenslange Latenz etabliert wird (Almanan et al. 2017). Es ist bis *dato* unklar welche immunologischen Mechanismen für die Kontrolle von Latenz verantwortlich sind. Regulatorischen T-Zellen (Treg) sind in der Lage die angeborene und adaptive Immunantwort zu supprimieren und somit die Selbsttoleranz des Immunsystems zu regulieren (Berod et al.

2012, Mayer et al. 2012, Lindenberg et al. 2014). Ihre spezifische Rolle während einer mCMV-Infektion, insbesondere in Bezug auf ihre Interaktion mit Effektor T-Zellen oder NK-Zellen ist noch unklar. Interessanterweise konnte jedoch gezeigt werden, dass die Depletion von CD4 Treg nach einer mCMV-Infektion, starke Konsequenzen für die latente mCMV-Infektion hatte (Almanan et al. 2017). Schwele und Kollegen konnten zeigen, dass eine rezidivierende CMV-Reaktivierung mit einem gleichzeitigen Anstieg der CD4 Treg sowie deren suppressiven Eigenschaften einher ging (Schwele et al. 2012). Während CD4 Treg zwar mit einer viralen Reaktivierung in Verbindung gebracht wurde, konnte die Ursache für die Kontrolle der Latenz von hCMV sowie mCMV noch nicht nachgewiesen werden (Almanan et al. 2017). Es ist bekannt, dass die angeborene und adaptive Immunität durch CD4 Treg moduliert werden kann, während die Bedeutung und der Phänotyp von CD8 Treg immer noch umstritten sind

### 1.5.1. Entwicklung und Funktion der Treg

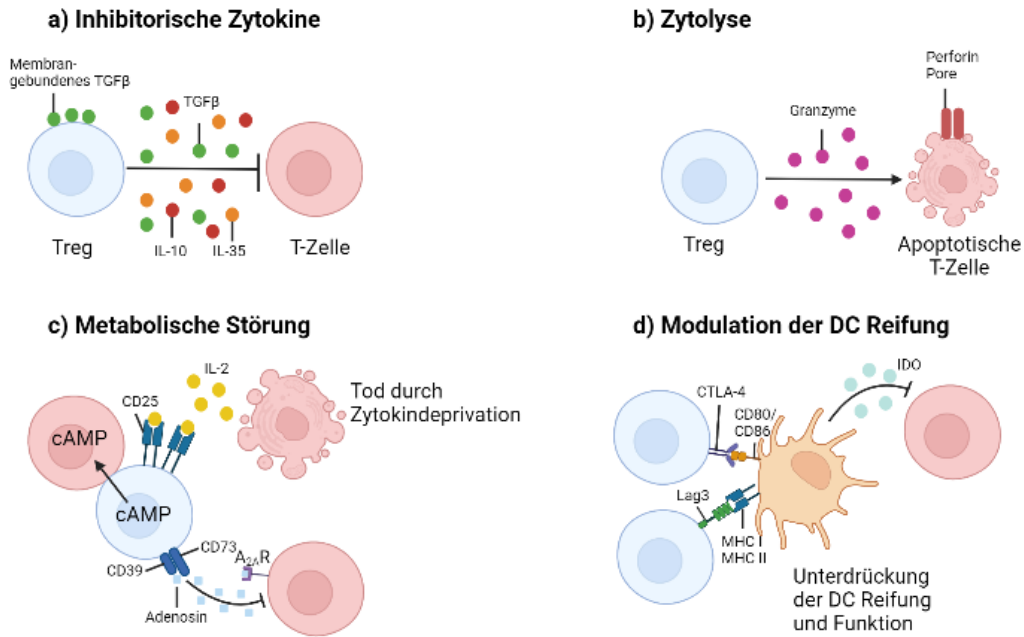
Treg sind seit den frühen 1970er Jahren bekannt, denn Gershon und Kondo machten die bahnbrechende Erkenntnis, dass T-Zellen Immunantworten nicht nur verstärken sondern auch schwächen (Gershon & Kondo 1970). Letzteres wird von Treg vermittelt, welche sich grundlegend von T-Helferzellen unterscheiden (Gershon & Kondo 1970). Durch diese Funktion sind Treg essenzielle Kontrolleure eines ausbalancierten Immunsystems (Polansky & Huehn 2007). Fehlen die Treg, kommt es zu Autoimmunerkrankungen. Im Gegensatz dazu, können Treg Immunantworten gegen Tumore oder Krankheitserregern unterdrücken (Polansky & Huehn 2007). Da Treg antigenspezifisch wirken können, ist die Zellpopulation sehr vielversprechend für die Therapie von Autoimmunkrankheiten, *graft versus host disease* (GvHD), oder Allotransplantationen (Polansky & Huehn 2007).

Die Charakterisierung der Treg war jedoch bis in die frühen 2000er Jahren ein Problem durch das Fehlen phänotypischer Treg-Marker, die Vielfalt an suppressiven Mechanismen und der Schwierigkeit Antigen-spezifische Treg Klone für eine subtilere zelluläre und molekulare Analyse zu generieren (Almeida et al. 2002, Malek et al. 2002, Shevryev & Tereshchenko 2019). Anfang der 2000er wurde gezeigt, dass IL-2 und seine Rezeptoren (IL-2R $\alpha$  und IL-2R $\beta$ ) entscheidend für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Treg sind (Almeida et al. 2002, Malek et al. 2002).

Treg sind eine heterogene Population sowohl in Bezug auf das T-Zellrezeptor (TCR)-Repertoire, als auch auf die Funktion. Treg können zahlreiche physiologische Prozesse wie beispielsweise die Toleranz gegenüber dem Embryo (Aluvihare et al. 2004, Jasper et al. 2006, Kahn & Baltimore 2010, Shima et al. 2010, Rowe et al. 2011, Rowe et al. 2012, Samstein et al. 2012,

Teles et al. 2013, Shevach & Thornton 2014), Keimzelltoleranz (Tung et al. 2017), Stammzellendifferenzierung in der Haut (Ali et al. 2017), Muskelreparatur (Burzyn et al. 2013b), Adipozytenhomöostase und -Funktion (Feuerer et al. 2009, Cipolletta et al. 2012, Bapat et al. 2015, Kolodin et al. 2015, Li et al. 2018a), sowie Netzhautentzündung (Deliyanti et al. 2017), regulieren. Darüber hinaus sind Treg in der Lage Immunantworten in Krankheitszuständen wie beispielsweise Keimzentrumsreaktionen zu regulieren (Chung et al. 2011, Linterman et al. 2011), überschießende T-Zellreaktionen während einer Infektion zu hemmen (Suvas et al. 2003, Suvas et al. 2004, Lanteri et al. 2009, Oldenhove et al. 2009, Schmitz et al. 2013, Arpaia et al. 2015), Effektor T-Zellendifferenzierung sowie Gedächtnisbildung gegenüber Krankheitserregern zu verbessern (Chen et al. 2011, Pandiyan et al. 2011, Laidlaw et al. 2015), sowie Tumormunität zu inhibieren (Shimizu et al. 1999, Shrikant et al. 1999). Die Entwicklung der Treg ist durch ihre Ontogenese definiert. Primär entwickelten sie sich im Thymus (tTreg), können aber auch außerhalb des Thymus in der Peripherie (pTreg) oder aus der Zellkultur (iTreg) in Gegenwart von transformierendem Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) induziert werden (Caramalho et al. 2015, Owen et al. 2019, Shevryev & Tereshchenko 2019).

In den letzten Jahren wurden erhebliche Fortschritte in Bezug auf die Mechanismen der Treg Funktionen erzielt. Aus funktioneller Sicht können die verschiedenen potenziellen Unterdrückungsmechanismen in vier Gruppen eingeteilt werden. a) Unterdrückung durch hemmende Zytokine; b) Unterdrückung durch Zytolyse; c) Unterdrückung durch metabolische Störungen und d) Unterdrückung durch Modulation der DC Reifung (Vignali et al. 2008) (s. **Abb. 4**).



**Abb. 4: Unterdrückungsmechanismen von Treg.** Die suppressive Mechanismen können grundsätzlich in vier Gruppen eingeteilt werden. **a)** Inhibitorische Zytokine wie IL-10, IL-35 und TGF $\beta$  sind membranständig und können die Effektor T-Zellen supprimieren. **b)** Zytolytische Prozesse umfassen *Granzym-A* und *Granzym-B* abhängige sowie *Perforin*-abhängige Mechanismen, welche Apoptose initiieren können. **c)** Metabolische Störungen umfassen hochaffine CD25 (IL-2R $\alpha$ )-abhängige Zytokin-vermittelte Apoptose, eine cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*) vermittelte Inhibition der T-Zellen und eine CD39- und/oder CD73 generierte Adenosinrezeptor 2A (A<sub>2A</sub>R) vermittelte Immunsuppression. **d)** Unterdrückung der DC Reifung und Funktion durch das *Lag3* (*lymphocyte activation gene 3*)- MHC-II Komplex. Die Bindung von *CTLA-4* kann *IDO* (*indoleamine 2,3-dioxygenase*) induzieren, welches ein immunsuppressives Molekül ist und von DCs produziert wird. Diese Graphik wurde von Vignali et al. 2008 übernommen und mit BioRender modifiziert.

### 1.5.1.1. CD4 Treg

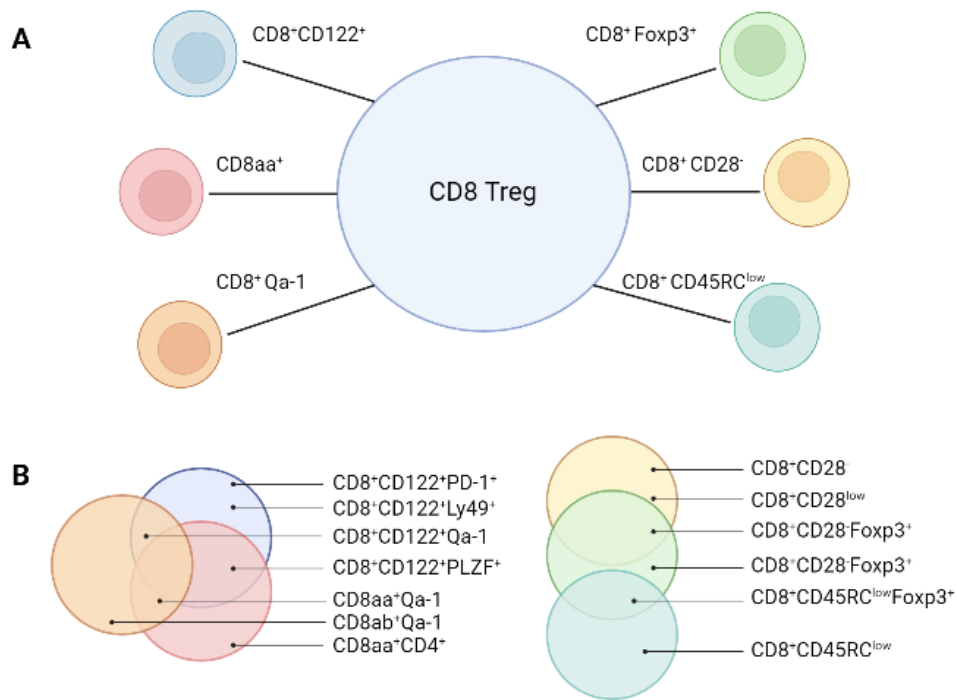
Unter den Treg sind die CD4 Treg die am besten untersuchte Gruppe. Eine Studie von Sakaguchi und Kollegen entdeckte 1995, dass CD25<sup>+</sup> Zellen notwendig und zugleich ausreichend sind, um eine Autoimmunreaktion zu supprimieren (Sakaguchi et al. 1995). Die Identifizierung von CD25 als Marker für unterdrückende CD4 T-Zellen war entscheidend, um dem Feld Legitimität zu verleihen (Sakaguchi et al. 1995). In Untersuchungen bei Menschen mit Immundysregulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie, X-chromosomalem Syndrom sowie bei Mäusen, konnte eine essenzielle Rolle für den Transkriptionsfaktor Foxp3 in CD4 Treg identifiziert werden (Asano et al. 1996, Bennett et al. 2001, Brunkow et al. 2001, Wildin et al. 2001). Dies führte zur Generierung einer Reihe von Reporter-mäusen, um die Foxp3 Expression in lebenden Zellen verfolgen zu können, wodurch funktionelle Treg-Transferexperimente ermöglicht wurden (Wildin et al. 2001, Fontenot et al. 2005, Wan & Flavell 2005, Haribhai et al. 2007). Darüber hinaus wurden Protokolle zum Nachweis von intrazellulärem Foxp3 durch durchflusszytometrische Analysen entwickelt, welche die Quantifizierung von CD4 Treg in Maus und Mensch ermöglicht (Roncador et al. 2005). Die Identifizierung von CD25 und Foxp3 als

Marker von CD4 Treg führte zu zahlreichen Studien um die Entwicklung und Funktion von Treg verstehen zu können (Owen et al. 2019). Der Transkriptionsfaktor Foxp3 ist vor allem von entscheidender Bedeutung, denn der Marker scheint eine Voraussetzung für die Stabilisierung der CD4 Treg zu sein (Hori et al. 2003, Huehn & Beyer 2015). Ein Verlust von Foxp3 beeinträchtigt das suppressive Potential der CD4 Treg (Bennett et al. 2001, Fontenot et al. 2003, Zheng & Rudensky 2007).

Im Kontext einer CMV-Infektion zeigten Almanan und Kollegen, dass CD4 Treg eine mCMV-Infektion organspezifisch kontrollieren können (Almanan et al. 2017). In der Milz können CD4 Treg die CD8 T-Zell Effektorfunktion antagonisieren, sowie die Viruspersistenz fördern, während CD4 Treg in der Speicheldrüse die Produktion von IL-10 verhindern und die virale Reaktivierung und Replikation limitieren können (Almanan et al. 2017). Eine CD4 Treg-Depletion in der Maus nach einer mCMV-Infektion führt zu einer erhöhten Anzahl an CD4 und CD8 T-Zellen (Almanan et al. 2017). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass CD4 Treg im Zusammenhang mit einer mCMV-Infektion die CMV induzierte T-Zellproliferation und-aktivierung verringert, sowie Apoptose über den Programmierten Tod (PD-1) Signalweg induziert (Tovar-Salazar & Weinberg 2020). Letzteres kann durch das Blockieren von PD-1 verhindert werden (Tovar-Salazar & Weinberg 2020).

### **1.5.1.2. CD8 Treg**

Im Vergleich zu den CD4 Treg sind CD8 Treg kaum erforscht. Ähnlich wie CD4 Treg wurden in den 1970er Jahren die CD8 T-Zellen, welche eine suppressives Potential aufwiesen, untersucht (Gershon & Kondo 1970). Allerdings führte das Fehlen von spezifischen Markern und Genexpressionsregulatoren dazu, dass die Untersuchung von CD8 Treg nicht weiter verfolgt wurde (Sakaguchi et al. 1995). Ihre Existenz ist umstritten, welches ein Hauptproblem für die Charakterisierung von CD8 Treg darstellt (Niederlova et al. 2021). Einerseits wird in Studien beschrieben, dass CD8 Treg eine heterogene Gruppe repräsentieren, welche Zellen unterschiedlicher Herkunft, Phänotypen und Eigenschaften umfasst (s. **Abb. 5**), während andererseits CD8 Treg als nicht heterogen beschrieben werden (Vieyra-Lobato et al. 2018, Yu et al. 2018, Niederlova et al. 2021).



**Abb. 5: CD8 Treg Subpopulationen.** **A)** Graphische Darstellung von CD8 Treg Subpopulationen mit verschiedenen phänotypischen Eigenschaften und immunregulatorischen Kapazitäten. **B)** Einige dieser CD8 Treg Untergruppen überlappen durch gemeinsame Marker. Es ist noch unklar, ob die Regulationskapazität für alle Subpopulationen gleich ist, oder ob nur eine Teilpopulation immunregulatorische Eigenschaften besitzt. Diese Abbildungen wurde von Niederlova et. al. 2021 übernommen und mit BioRender modifiziert.

Basierend auf den CD4 Treg Kriterien sollten folgende Kriterien von den CD8 Treg erfüllt werden (Niederlova et al. 2021):

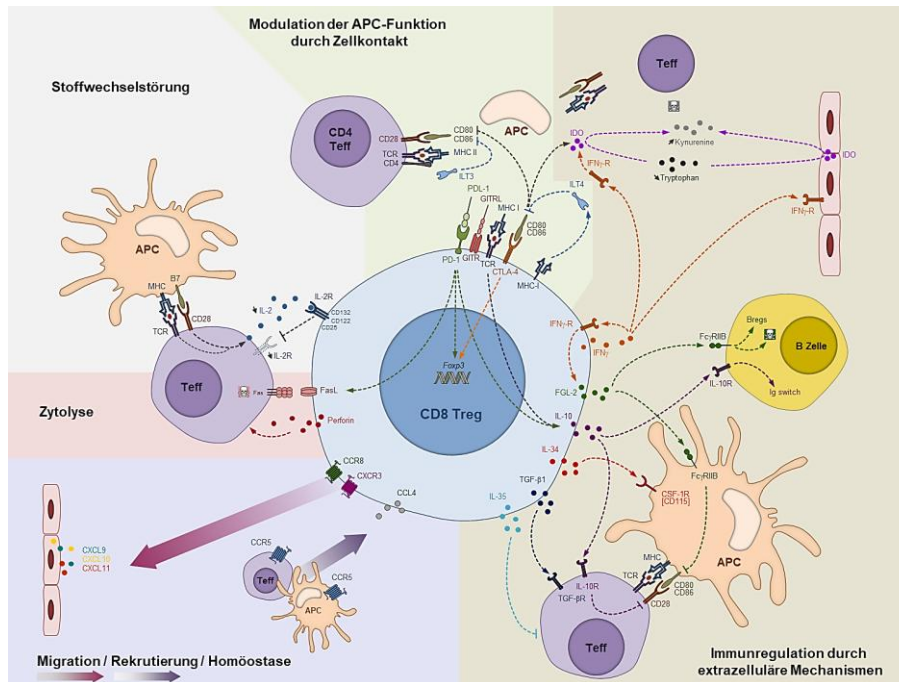
- a) Treg können als definierte T-Zelluntergruppe *in vivo* erkannt werden.
- b) Treg sind in der Lage inflammatorische Immunantworten zu unterdrücken.
- c) Treg vermittelter suppressive Mechanismus ist bekannt.
- d) Treg sind nicht pro-inflammatorisch

Es konnte gezeigt werden, dass die meisten CD8 Treg Untergruppen (s. **Abb. 5**) die Effektor T-Zellen supprimieren können. Die Suppression konnte anhand einer Proliferations-Unterdrückung und/oder Produktion von IFN $\gamma$  (Schlüsselmarker von Treg) gemessen werden (Niederlova et al. 2021). Obgleich Suppression-Assays wichtige Beweise für die immunsuppressive Rolle von Treg liefern, kann nicht zwischen einer aktiven Suppression und stimulierenden Faktoren unterschieden werden (Kedia-Mehta & Finlay 2019). Zudem können *in vitro* Modelle nur eingeschränkt die Komplexe *in vivo* Situation widerspiegeln (Klein et al. 2003). Studien zeigten, dass CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> Zellen auch Treg Eigenschaften besitzen, da sie die T-Zellhomöostase aufrechterhalten sowie Effektor T-Zellen unterdrücken können (Rifa'i et al. 2004, Endharti et al. 2005, Chen et al. 2008, Shi et al. 2008). CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> können dadurch den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen gleichgestellt werden, zumal CD122 die  $\beta$ -Untereinheit und CD25 die

$\alpha$ -Untereinheit des IL-2 Rezeptors darstellt (Sakaguchi et al. 1995). Paradoxerweise wurden CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> Zellen ebenfalls als Gedächtnis T-Zellen beschrieben, wodurch es essenziell war diese Zellen weiter zu charakterisieren (Zhang et al. 1998, Ku et al. 2000, Judge et al. 2002, Dai et al. 2010). PD-1 ist ein negativ kostimulierendes Molekül welches entscheidend für die Suppression von Autoimmunität ist, wobei die lokale Überexpression seines Liganden (PD-L1) auch eine Immunstörung induzieren kann (Nishimura et al. 2001, Ansari et al. 2003, Gao et al. 2003, Subudhi et al. 2004, Keir et al. 2006, Haspot et al. 2008, Koehn et al. 2008, Francisco et al. 2009). Dai und Kollegen berichteten, dass CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> Zellen sowohl PD-1<sup>+</sup> als auch PD-1<sup>-</sup> Zellen beinhalten, allerdings konnte nur die Zellpopulation CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> die T-Zellantworten *in vitro* und *in vivo* supprimieren (Dai et al. 2010). Die Suppression hing dabei weitgehend von ihrer IL-10 Produktion ab (Dai et al. 2010). CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> exprimierten kein Foxp3, wodurch sie sich von den CD4 Treg unterscheiden (Dai et al. 2010). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Foxp3 kaum in CD8 T-Zellen, im Vergleich zu CD4 T-Zellen, in Maus, Ratte und Mensch exprimiert wird (Bézie et al. 2017). Eine PD-1 Expression von CD8 T-Zellen ist vor allem für deren Erschöpfung während einer chronischen Virusinfektion verantwortlich, welches allerdings durch eine PD-1 Blockade wiederhergestellt werden kann (Barber et al. 2006, Petrovas et al. 2006, Blackburn et al. 2009, Velu et al. 2009). Zudem konnte gezeigt werden, dass CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> weitgehend CD127 (IL-7Ra) negativ sind, während über 50% der CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup> Zellen CD127 positiv sind (Dai et al. 2010). Da auch CD4 Treg CD127 negativ sind, könnten CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> als die wahren CD8 Treg beschrieben werden, da sie sich auch von den Gedächtniszellen unterscheiden (Seddiki et al. 2006, Dai et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurden die CD8 Treg nach Dai und Kollegen als CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Treg definiert.

Der Einfluss von CD8 Treg auf die Immunkontrolle nach einer CMV-Infektion ist bislang nicht untersucht. Allerdings gibt es immer mehr Studien, die Daten über die suppressiven Mechanismen der CD8 Treg zeigen (s. **Abb. 6**).



**Abb. 6: Suppressiver Mechanismus der CD8 Treg.** Diese Abbildung wurde von Bézie et al. 2018 übernommen und mit BioRender modifiziert.

Die am häufigsten verwendeten Oberflächenmarker wie CD25, CD127, GITR, CD39, Lag3 und CTLA-4 werden in verschiedenen Kontexten verwendet, um einerseits CD8 Treg identifizieren zu können und andererseits ihr suppressives Potential *in vitro* und *in vivo* bei Autoimmunerkrankungen, Krebs und während Schwangerschaften analysieren zu können (Bézie et al. 2018, Vieyra-Lobato et al. 2018). Die suppressiven Mechanismen von CD8 Treg konnten durch eine Kombination der oben genannten Oberflächenmarker verstärkt zum Beispiel bei einer Autoimmun-Enzephalomyelitis (Najafian et al. 2003, Yu et al. 2014, Saligrama et al. 2019), bei Multipler Sklerose (Liu et al. 2007, Aristimuño et al. 2010, Negrini et al. 2017), systemischer Lupus erythematoses (SLE) (Zhang et al. 2009, Zhang et al. 2013), Gallenweg Zirrhose (Bernuzzi et al. 2010), Humanem Immundefizienz-Virus und Epstein-Barr-Virus (Popescu et al. 2007, Boer et al. 2014, Boer et al. 2015, Fenoglio et al. 2018) oder Transplantationen bei Maus, Ratte und Mensch (Boor et al. 2011, Beres et al. 2012, Robb et al. 2012, Zheng et al. 2013b, Bézie et al. 2017) beobachtet werden.

Es konnte gezeigt werden, dass CD4 und CD8 Treg ähnliche suppressive Mechanismen einsetzen (s. **Abb. 6**). Allerdings ist bis heute unklar, ob die Treg einen einzigen oder ein Arsenal aus verschiedenen suppressiven Mechanismen gleichzeitig benutzen (Shevach 2009, Schmidt et al. 2012, Vieyra-Lobato et al. 2018). Es ist zudem unklar, nach welchen Kriterien Treg welchen Mechanismus anwenden und ob er von einem zum anderen wechselt oder mehrere Mechanismen gleichzeitig angewendet werden (Schmidt et al. 2012). Weitere detaillierte

Analysen sind nötig, um CD8 Treg besser definieren und um ihre Regulationsmechanismen besser verstehen zu können (Vieyra-Lobato et al. 2018). Dies könnte Zelltherapien, die Prävention und Heilung von Infektions- und Autoimmunerkrankungen, sowie Krebs und GvHD (Vieyra-Lobato et al. 2018) ermöglichen.

### **1.6. mCMV-Infektion als Modellsystem für die hCMV-Infektion**

Aufgrund der strikten Speziespezifität der Cytomegaloviren, ist eine Untersuchung von hCMV in tierexperimentellen Modellen nicht möglich. Mausmodelle sind die häufigsten Tiermodelle, die zur Untersuchung von CMV verwendet werden, da Mäuse in vielen strukturellen, biologischen und genetischen Eigenschaften dem Menschen ähnlich sind (Reddehase et al. 1985, Rawlinson et al. 1996, Wynn & Khanna 2006, Reeves & Sinclair 2008). Einerseits unterscheiden sich mCMV und hCMV bezüglich Gensequenz, sowie Pathophysiologie (Rawlinson et al. 1996, Reddehase 2002, Reeves & Sinclair 2008). Andererseits führt eine mCMV-Infektion ähnlich wie eine hCMV-Infektion nach subletaler  $\gamma$ -Bestrahlung zu einer rapiden Organerkrankung wie interstitielle Pneumonie, Adrenitis und Knochenmarkversagen. (Reddehase et al. 1985, Mutter et al. 1988, Reddehase et al. 1988, Reeves & Sinclair 2008). Zusätzlich dazu kommt es zu einem massiven Anstieg der Virusproduktivität und schließlich zum Tod von Tier und Mensch (Jordan et al. 1978, Reddehase et al. 1985). Im Gegensatz zu hCMV kann mCMV nicht diaplaszental übertragen werden, wodurch das Mausmodell nicht geeignet ist, diesen Aspekt der CMV-Infektion zu untersuchen (Johnson 1969). Allerdings haben Tsutsui und Kollegen ein Mausmodell zur Untersuchung der neurologischen Auswirkungen einer angeborenen CMV-Infektion entwickelt, in welchem mCMV direkt in die Plazenta eingeführt wird, um eine *in utero*-Infektion zu induzieren (Tsutsui et al. 2005). mCMV wurde zudem erfolgreich für die Untersuchung der zellulären und humoralen Immunantworten gegen CMV, sowie für die Analysen von Signalwegen im Kontext von Primär- und Sekundärinfektionen eingesetzt (Reeves & Sinclair 2008). Auch das von unserer Arbeitsgruppe etablierte Knochenmarktransplantationsmodell mit konkurrierender mCMV-Infektion stellt ein kliniknahes Modellsystem dar, welches essenzielle Erkenntnisse hinsichtlich viraler Latenz und Pathogenese während einer Immunsuppression liefern konnte (Holtappels et al. 2006).

### **1.7. Adoptive Immuntherapie**

Eine CMV-Infektion bleibt eine schwerwiegende Komplikation nach einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT), da es zu einer Reaktivierung des latenten hCMV führen kann

(Hebart & Einsele 2004, Mehdizadeh et al. 2021). Unter diesen Umständen kann eine unkontrollierte virale Vermehrung des Virus, assoziiert mit Organmanifestationen zu potenziell tödlichen Komplikationen, führen (Peggs 2009). Die Konsequenz einer allogenen HSCT nach einer CMV-Infektion stellt die akute oder chronische GvHD dar (Ljungman et al. 2006, Ljungman et al. 2011). Eine neue Studie besagt, dass CMV und GvHD in einer bidirektionale Beziehung zueinander stehen (Jakharia et al. 2021). Zum einen induzieren CMV-infizierte Zellen die Produktion von IL-6, welches eine Inflammation induzieren und somit zu einer GvHD führen kann (Jakharia et al. 2021). Zum anderen kann eine GvHD sowie Immunsuppressiva das Risiko für eine CMV-Reaktivierung erhöhen (Jakharia et al. 2021). Um das GvHD-Risiko zu verringern, werden T-Lymphozyten aus dem Transplantat des Spenders depletiert, welches allerdings die CMV bedingte Mortalität und Morbidität erhöht (Craddock et al. 2001). Virostatika können nur eingeschränkt bei hCMV-bedingten Komplikationen nach einer HSCT, aufgrund der schwerwiegenden Nebenwirkungen, entgegen wirken (Berger et al. 2011).

Während einer HSCT ist die T-Zellantwort bei der Kontrolle einer CMV-Infektion oder -Reaktivierung (Mehdizadeh et al. 2021) essenziell. Die adoptive Immuntherapie durch den Transfer von CD8 T-Zellen von einem seropositivem Spender zum Empfänger kann die virusspezifische Immunrekonstitution beschleunigen (Mehdizadeh et al. 2021). Die adoptive Immuntherapie basiert darauf, dass Patienten, welche eine schnelle Immunrekonstitution aufweisen, ein deutlich geringeres Risiko besitzen eine hCMV-Erkrankung zu entwickeln (Reusser et al. 1991, Einsele et al. 1993, Mehdizadeh et al. 2021). Demnach ist die adoptive Immuntherapie ein alternativer Ansatz um die schützende antivirale T-Zell Immunität bei Patienten wiederherzustellen (Reusser et al. 1991, Mehdizadeh et al. 2021). Es konnte gezeigt werden, dass eine CD8 T-Zell Therapie nach einer HSCT und mCMV-Infektion, die CMV-Erkrankung verhindert und die Genomlast reduziert, wodurch das Risiko einer Rekurrenz deutlich gesenkt werden konnte (Steffens et al. 1998). Auch durch Epitop-spezifische CD8 T-Zellen konnte die Reaktivierung einer latenten mCMV-Infektion verhindert werden (Simon et al. 2006). Obgleich im Mausmodell eine adoptive Immuntherapie große Erfolge zeigte, hat dieser Therapieansatz bislang keinen Eingang in die klinische Routine gefunden. Das liegt einerseits an den benötigten hohen Zellzahlen an hCMV-spezifischen CD8 T-Zellen (Therapie:  $1 \times 10^7$  T-Zellen/m<sup>2</sup> Körperoberfläche; Prophylaxe:  $1 \times 10^9$  T-Zellen/m<sup>2</sup> Körperoberfläche), andererseits am hohen Aufwand ihrer Herstellung (Walter et al. 1995, Einsele et al. 2002). Studien postulieren, dass anti-CMV Vakzine zur Optimierung des adoptiven Transfers hCMV-spezifischer T-Lymphozyten verwendet werden sollten, wodurch die Rekonstitution

antiviraler Immunität nach einer HSCT verbessert werden könnte (Schleiss & Heineman 2005, Herr & Plachter 2009, Gergely et al. 2021).

### 1.8. Zielsetzung der Arbeit

Eine hCMV-Infektion ist die Ursache für Morbidität und Mortalität in immunsupprimierten Patienten. Eine Reaktivierung des hCMV führt zu lebensbedrohlichen Komplikationen nach HSCT. Die Inzidenz einer CMV-Erkrankung kann durch antivirale CD8 T-Zellen reduziert werden, wobei aufgrund von benötigt hohen Zellzahlen, eine CD8 T-Zelltherapie noch nicht im klinischen Alltag angewandt wird. Treg sind in der Lage die angeborene und adaptive Immunantwort zu supprimieren und somit die Selbsttoleranz des Immunsystems zu regulieren. Allerdings ist ihre spezifische Rolle während einer mCMV-Infektion, insbesondere in Bezug auf ihre Interaktion mit Effektor T-Zellen, noch unklar. Aus diesem Grund war das Ziel dieser Arbeit, das suppressive Potential der Treg, insbesondere von CD8 Treg, auf Effektor T-Zellen, *in vitro* und *in vivo* zu ermitteln, sowie die die Eigenschaften und Charakterisierung von CD8 Treg im Zusammenhang mit einer CMV-Infektion weiter zu analysieren.

Dabei sollte ein *in vitro* Suppression-Assay etabliert werden, sodass das suppressive Potential von CD4 und CD8 Treg aus mCMV-infizierten Mäusen, auf Effektor T-Zellen untersucht werden kann. Zu Beginn der Arbeit war bekannt, dass CD4 Treg *in vitro* suppressiv sind. Somit war zu klären, ob CD8 Treg ebenfalls ein suppressives Potential aufweisen und inwiefern sich dies von den CD4 Treg unterscheidet. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob eine mCMV-Infektion das suppressive Potential von CD4 und CD8 Treg beeinflusst. Um zu verstehen welche Mechanismen für den suppressiven Effekt von CD8 Treg verantwortlich sind, sollte einerseits die Zytokinsekretion aus den Überständen der Suppression-Assay Kulturen ermittelt, und andererseits die *CD28*, *CTLA-4* und *FasL* Oberflächenexpression im Vergleich zu den CD4 Treg analysiert werden. Für weitere Analysen der Charakterisierung und Eigenschaften von CD8 Treg sollten RNA-Sequenzierungen durchgeführt werden. Dabei sollte vor allem das Augenmerk auf den Vergleich von CD8 Treg aus naiven mit CD8 Treg aus mCMV-infizierten Mäusen gelegt werden, um Genexpressionsunterschiede im Hinblick dieser beiden Gruppen zu erhalten. Um das suppressive Potential von CD4 und CD8 Treg *in vivo* bestimmen zu können, sollte in der vorliegenden Arbeit ein adoptiver Transfer durchgeführt werden. Treg und CD8 T-Zellen sollten dabei aus mCMV-infizierten Donoren in syngene subletal  $\gamma$ -bestrahlte mCMV-infizierte Rezipienten transferiert werden.

## 2. MATERIAL

### 2.1. Allgemeine Laborausstattung und Reagenzien

CO <sub>2</sub> - Inkubator	Hera Cell 240 (Heraeus Holding GmbH, Hanau)
Durchflusszytometer	Cytomics FC500 (Beckman Coulter, Krefeld)
Flüssigstickstofftank	Taylor Wharton XL-160 (Tec-Lab, Königsstein)
Heizplatte / Magnetrührer	Variomag Multipoint HP15 (H&P, München)
MACS Ministand	(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
MACS Multistand	(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
MagniSort Magneten	(Thermo Fischer Scientific, Carlsbad, USA)
Mikroskope	Invertmikroskop: Leica DM IRB SL; Leica DM Phasenmikroskop: Se-Ph3 Nikon; Düsseldorf
Mikrotom	RM2255 (Leica, Buffalo; USA)
Mikrowelle	L16M (Sharp, Frankfurt)
Multikanalpipetten	Discovery Comfort (ABIMED GmbH, Langenfeld)
Multistepper	DistriMan (Gilson, Inc., Middleton, USA) Repeater Plus (Eppendorf, Hamburg)
Orbitalschüttler	NeoLab, Nr. 7-0031 (500U/min)
Paraffinerhitzer	WTC binder B28
Pipetten	VWR
Pipettiergerät	Pipetboy (INTEGRA Biosciences, Fernwald)
Sterile Werkbank	NFX44-201: Typ 2, Kategorie 2 (Heraus, Hanau)
Tischzentrifugen	Multifuge 3S-R (Heraus, Germany) Megafuge 2.0. (Heraus, Germany)
UV-Lampe	Vilber VL-315G
Vollschutz-Kleintier- Bestrahlungsanlage (Cäsium-Quelle: Cs <sup>137</sup> )	Typ OB 58-BA (Buchler, Braunschweig)
Vortexer-Mixer	MS3 basic (IKA, USA)
Waagen	BP61 (Sartorius, Göttingen) UW2200HV (Shimadzu, Japan)
Wasserbad	(Mettler GmbH, Schwabach)

## 2.2. Plastikwaren und Verbrauchsmaterial

48-Well-Platten	für adhärenente Zellen: (Sarstedt, Nr. 83.3920)
96-Well-Rundbodenplatten	für adhärenente Zellen: (Greiner, Nr. 655180)
96-Well-V-Platten	für Suspensionszellen: (Greiner, Nr. 651201)
Deckglas	12mm Ø (Marienfeld Lab, Nr. 011152)
Einfrierröhrchen	1,8ml Cryo Tube Vials (Greiner, Nr. E18043D0) 1,8ml Cryo Tube Vials (Sarstedt, Nr. 9084211)
Einmal-Pipettenspitzen	10µl Pipette (Brand, Nr. 732004) 200µl Pipette (Roth, Nr. 8156.1) 1000µl Pipette (Greiner, Nr. 686290)
Einmal-Plastikpipetten	5ml (Greiner, Nr. 606180) 10ml (Greiner, Nr. 607180) 25ml (Greiner, Nr. 760180)
Einmal-Spritzen	1ml (Braun, Nr. 9166017V) 2ml (Braun, Nr. 4606027V)
FACS-Röhrchen	5ml Rundboden 12x75mm Polystyren (Falcon®, Nr. 352052)
Kanülen	0,40mm x 12mm (Braun, Nr. 4665406) 0,55mm x 25mm (Braun, Nr. 4657675)
MACS Säulen	MS <i>Columns</i> (Miltenyi Biotec, Nr.130-042-201) LS <i>Columns</i> (Miltenyi Biotec, Nr.130-042-401) LD <i>Columns</i> (Miltenyi Biotec, Nr.130-042-901)
Mikrotiterplatten	96 Well-Rundbodenplatten (Greiner, Nr. 650101)
Neubauer Zählkammer <i>improved</i>	(LO Laboroptik GmbH, Nr. 1100000)
Objektträger	76 x 26mm Menzel GmbH & CoKG (Thermo Fischer Scientific, Nr. 8037/1)
Reaktionsgefäße	0,5ml PCR Tube (Greiner, Nr.682281) 1,5ml (Sarstedt, Nr. 72.690) 1,5ml Protein LoBind Tubes (Eppendorf, 0030108116)
Skalpell	PFM Medical (Feather, Nr. 02.001.30.021)
Sezierbesteck	Aesculap (Braun)

## Material

---

Sterilfilter	500ml Stericup Quick release 0,22µm (Milliore Express Plus Nr. S2GPU05RE) 250ml Stericup Quick release 0,22µm (Milliore Express® Plus Nr. S2GPU02RE)
Zellkulturflaschen	25cm <sup>2</sup> (Sarstedt, Nr.83.3910.502) 75cm <sup>2</sup> (Greiner, Nr. 658170)
Zellkulturschalen	Für adhärenente Zellen: 10cm (Sarstedt, Nr. 83.3902) 14,5cm (Sarstedt, Nr. 83.3903) Für Suspensionszellen: 6cm (Greiner, Nr. 628161) 10cm (Greiner; Nr. 227261)
Zell-Nylonsiebe	40µm (Becton Dickinson, Nr. 352340) 100µm (Becton Dickinson, Nr. 352360)
Zentrifugenröhrchen	15ml Spitzboden Polypropylen (Greiner, Nr. 188271) 50ml Spitzboden Polypropylen (Greiner, Nr.227261)

### 2.3. Chemikalien und Lösungen

Alle unten aufgelisteten und verwendete Chemikalien und Reagenzien wurden – sofern nicht anders vermerkt – in p.A. Qualität bezogen. Zum Ansetzen von Lösungen und Puffern wurde ausschließlich A. bidest. (Aqua ad iniectionabilia; Braun, Melsungen) verwendet.

Ammonium-Nickel-Sulfat-Hexahydrat	Fluka, Buchs, Nr. 09885
Aqua ad iniectionabilia	Ampuwa, Fresenius KABI, Nr. B230672
Bovines Serum Albumin (BSA)	Für MACS und SORT Puffer: PAA Laboratories, Nr. K45-001 Für Histologie: Sigma-Aldrich GmbH, Nr. A-7906-5
Carboxyfluoreszein-Succinimidyl-Ester (CFSE)	Thermo Fischer Scientific, Nr. 65-0850
Coulter Clenz	Beckman Coulter, Nr. 8448222
DAB (3,3'-Diaminobenzidin)	Sigma-Aldrich GmbH, Nr. D5637
Dimethylsulfoxid (DMSO)	PanReac AppliChem, Nr. A3672
Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	AppliChem, Nr. A3553
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (1x)	Thermo Fischer Scientific, Nr. 14190-094
Erythrozyten-Lysepuffer	Sigma-Aldrich GmbH, Nr. R7757

## Material

---

Essigsäure	Roth, Nr. 3738.1
Ethanol 99,6% (v/v)	Roth, Nr. P076.1
Ethanol 70% vergällt	Roth, Nr. T913.1
Ethylendiamintetraessigsäure	Roth, Nr. 3619.1
Tetranatriumsalz (EDTA)	
Formalin 37%ig (v/v) für Histologie	Roth, Nr. P7331
Fötales Kälberserum (FCS)	Thermo Fischer Scientific, Nr. 10270
Hämatoxylin Lösung nach Gill II	Roth, Nr. T864.1
HEPES	Sigma-Aldrich GmbH, Nr. H0887
<i>IsoFlow Sheat Fluid</i>	Beckman Coulter, Nr. 8546859
Isopropanol	Hedinger, Nr. GH05001
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich GmbH, Nr. P8041
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth, Nr. 3904.1
L-Glutamin	Sigma-Aldrich GmbH, Nr. G7513
2-Mercaptoethanol (β-ME)	Thermo Fischer Scientific, Nr.21985-023
Methanol	PanReac Applichem, Nr. 131091.1211
Methylzellulose	Sigma-Aldrich GmbH, Nr. M0512-250G
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich GmbH, Nr. A9434-500G
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Roth, Nr. 6885.1
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Nr. 6771.2
Neoclear	Merck KGaA, Nr. 1.09843.5000
Paraffin	HistoComp; Vogel, Nr. VO-5-1001)
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich GmbH, Nr. P0781
Saccharose	Roth, Nr. 4621.1
Salzsäure (HCL) 25%	PanReac Applichem, Nr. 133378.1211
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Roth, Nr.3580.1
Tris	Roth, Nr. 4621.1
Trypanblau	Sigma-Aldrich GmbH, Nr. T8154
Trypsin	Difco, Nr. 15400-054
Trypsin-EDTA 10x	Thermo Fischer Scientific, Nr. 15400-054
Türk's Lösung	Merck KGaA, Nr. 1.09277.0100
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 30%	Roth, Nr. 8070.1

### 2.4. Medien und Zusätze für die Zellkultur

Für die Zellkultur wurden alle Medien steril von der Firma Thermo Fischer Scientific bezogen, bei 4°C gelagert und mit den aufgeführten Zusätzen supplementiert. Die aufgeführten Medien enthalten bereits eine L-Glutaminquelle in Form von L-Glutamax (als Energiequelle für das optimale Wachstum der Zellen) – sofern nicht anders vermerkt.

**DMEM + GlutaMAX™ (Dulbecco's modified eagle medium)** Nr. 61965-062

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

**MEM + GlutaMAX™ (Minimum Essential Medium)** Nr. 41090-028

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

**RPMI + GlutaMAX™ (Roswell Park Memorial Institute)** Nr. 61870-010

Penicillin	100U/ml
Streptomycin	0,1 g/ml
β-Mercaptoethanol	5x10 <sup>-5</sup> M
HEPES	10mM
FCS	10% (v/v)

**Fötales Kälberserum (FCS):** wurde von der Firma Thermo Fischer Scientific bezogen und bei -20°C gelagert. FCS ist ein essenzielles Supplement vieler Zellkulturmedien, da es einen hohen Anteil an Wachstumsfaktoren und Hormonen beinhaltet. Für den Gebrauch wurde das FCS bei 4°C aufgetaut, um eine Ausfällung von Lipoproteinen zu verhindern. Anschließend wurden die im Serum enthaltenen Komplementbestandteile durch eine 30-minütige Inkubation bei 56°C im Wasserbad inaktiviert. Das Serum wurde bei 4°C aufbewahrt und je nach Bedarf den Kulturmedien in der jeweils angegebenen Konzentration dazugegeben.

**Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE):** wurde von der Firma Thermo Fischer Scientific als 10mM Stocklösung bezogen und bei -80°C gelagert. Vor Verwendung wurde das CFSE in DMSO gelöst, aliquotiert und bei -80°C gelagert (Endkonzentration: 5mM). Nach dem Auftauen wurden die Aliquots nicht mehr eingefroren, sondern direkt verworfen. Der Farbstoff CFSE dient zum Nachweis der Zellproliferation. Das CFSE ist außerhalb der Zelle nicht fluoreszierend. Erst wenn es lebensfähige Zellen passiert und darin hydrolysiert wird, kommt es zur Freisetzung des fluoreszierenden Farbstoffs.

**HEPES:** wurde von der Firma Sigma-Aldrich GmbH als 1M Lösung bezogen und bei 4°C gelagert. HEPES ist ein membrandurchlässiges, zwitterionisches und organisches Puffermittel, welches in Zellkulturmedien für zusätzliche Pufferkapazität sorgt, wenn sich die Medien für

längere Zeit außerhalb des CO<sub>2</sub>-Inkubators befinden. Durch HEPES wird eine Ansäuerung des Mediums minimiert, da dessen Pufferkapazität im physiologischen Bereich zwischen pH 7,0 und pH 7,6 liegt. Es wurden pro 500ml Kulturmedium 5ml HEPES zugesetzt (Endkonzentration: 10mM).

**β-Mercaptoethanol (β-ME):** wurde von Thermo Fischer Scientific (1000x) als 55mM Lösung in DPBS bezogen und bei 4°C gelagert. Es verhindert die Oxidation von SH-Gruppen in Proteinen und ist somit ein starkes Reduktionsmittel. Es wurden pro 500ml Kulturmedium 0,5ml β-ME zugesetzt (Endkonzentration 5x10<sup>-5</sup>M).

**Methylzellulose:** wurde zum Übersichten infizierter Zellrasen für die Bestimmung von Virustitern eingesetzt. Für 500ml Methylzellulose-Medium wurden in einer 500ml Flasche 8,8g Methylzellulose mit 360ml A. bidest gemischt. Im Anschluss wurde die Flasche mit einem Magnetrührfisch autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde die Methylzellulose durch ständiges Rühren (ü.N.) gelöst und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. In dieser Form kann die Methylzellulose über mehrere Monate aufbewahrt werden. Bevor das Medium zum Übersichten von Zellen verwendet werden kann, müssen folgende Zusätze hinzugefügt werden:

MEM 10x (Thermo Fischer Nr 21430-020)	40ml
Penicillin	100U/ml
Streptomycin	0,1mg/ml
L-Glutamin	2mM
FCS	4% (v/v)
Mit NaHCO <sub>3</sub> auf pH 7,5 einstellen	

**Penicillin / Streptomycin:** wurde von Sigma-Aldrich GmbH als Stocklösung 10.000U Penicillin + 10mg/ml Streptomycin bezogen und in Aliquots à 5ml oder 10ml bei -20°C gelagert. Die Antibiotika wirken gegen gram-positive- und gram-negative Bakterien. Es wurden 5ml-Aliquots zu 500ml Kulturmedium gegeben (Endkonzentration 100U/ml Penicillin und 0,1mg/ml Streptomycin).

**Dulbecco Phosphate Buffered Saline (DPBS):** wurde von der Firma Thermo Fischer bezogen. DPBS ist eine ausgewogene Salzlösung für den Transport von Zellen oder Gewebeproben, das Verdünnen von Zellen oder das Waschen von Zellen. Das DPBS ist sterilfiltriert und enthält kein Calcium, Magnesium oder Phenolrot.

**Trypanblau:** wurde von Sigma-Aldrich GmbH als 0,4%ige Stocklösung bezogen und dient der Bestimmung der Lebendzellzahl in Organhomogenaten- sowie Zellkultursuspensionen. Es kann

die Zellmembran lebender (intakter) Zellen nicht passieren. In toten Zellen gelangt es ins Zytosol und geht dort eine Bindung mit Proteinen ein, wodurch die Zellen blau erscheinen. Vor Gebrauch wurde Trypanblau 1:3 mit DPBS (Endkonzentration 0,13%) verdünnt.

**Türks Lösung:** wurde von MERCK KGaA bezogen und für die Zellzahlbestimmung von Lymphozyten in Organpräparationen oder Knochenmarksuspensionen verwendet. Die Lösung enthält einerseits eine 3%ige Essigsäure, welche Erythrozyten hämolysiert. Andererseits werden durch den enthaltenen Farbstoff Kristallviolett, die Zellkerne mononukleärer Zellen angefärbt. Eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen (im Gegensatz zu Trypanblau) ist damit nicht möglich.

**Trypsin / EDTA:** wurde von der Firma Thermo Fischer Scientific als Stocklösung 0,5% (10x) bezogen und dient zum Ablösen adhärenter Zellen. Trypsin ist ein Verdauungsenzym, wodurch die extrazellulären Matrixproteine gespalten werden. Die adhärenen Zellen lösen sich dadurch leicht vom Boden einer Zellkulturschale ab. Vor Verwendung wurde Trypsin / EDTA mit DPBS 1:10 (Endkonzentration: 0,5g/L Trypsin, 0,2g/L EDTA, pH: 7,4-7,6) verdünnt.

## 2.5. Zusammengesetzte Puffer und Lösungen

### 2.5.1. Puffer tierexperimenteller Methoden

#### **PBS/Heparin-Lösung für die Lungenperfusion:**

Heparin-Natrium 2500	0,1% (v/v)	500µl	ad 500ml DPBS
----------------------	------------	-------	---------------

Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

#### **Trypsin/EDTA für die MEF Herstellung:**

Trypsin	1,25g (w/v)		
EDTA x 2H <sub>2</sub> O	3,4mM	1,25g	ad 1000ml A. bidest

Die Lösung wurde mit 1M NaOH auf pH 6,4 eingestellt und vor Gebrauch sterilfiltriert.

#### **PBS/EDTA Lösung für die Blutentnahme:**

EDTA	30mM	ad 50µl PBS
------	------	-------------

Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

## 2.5.2. Puffer immunologischer Methoden

### MACS Puffer:

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

Nach vollständigem Lösen der Bestandteile auf einem Magnetrührer, wurde die Lösung sterilfiltriert und vor Gebrauch 1:5 mit sterilem DPBS verdünnt und als 1x Puffer verwendet.

### MagniSort Puffer:

FCS	3% (v/v)		
EDTA	10mM		ad 500ml DPBS

Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

### FACS Puffer:

FCS	1% (v/v)		ad 500ml DPBS
-----	----------	--	---------------

Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

### DC-Anlage Puffer:

FCS	2% (v/v)		ad 500ml DPBS
-----	----------	--	---------------

Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

### Sort Puffer:

FCS	1% (v/v)		
EDTA	2mM (w/v)		ad 50ml DPBS

Die Lösung wurde bei 4°C gelagert. Bei tierexperimentellen Versuchen sowie für das NGS wurde anstelle des Sort Puffers der MACS Puffer verwendet.

## 2.5.3. Puffer für die Generierung von mCMV-Stocks

### Virusstandardpuffer (VSP):

Tris	10mM	6,1g	
Na-EDTA	5mM	1,86g	
KCl	12mM	0,895g	ad 500ml DPBS

### VSP + 15% Saccharose:

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

#### 2.5.4. Puffer und Lösungen histologischer Methoden

##### Gepufferte 4%ige Formalinlösung, pH 7,4:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	66mM	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	84mM	
Formalin	37% (v/v)	ad 1000ml A. bidest.

Die Lösung wurde vor Gebrauch mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

##### Endogene Peroxidase Blockierung:

Methanol		30ml
DPBS		30ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30% (v/v)	

##### Demaskierungslösung, pH 6,0:

Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat Puffer:	10mM	2,941g	ad 1000ml A. bidest
-------------------------------------	------	--------	---------------------

Die Lösung wurde vor Gebrauch mit NaOH auf pH 6,0 eingestellt.

##### 10x TBS-Puffer Stammlösung, pH7,4:

NaCl	1,5mM	87,6g	
Tris	1M	121,1g	ad 1000ml A. bidest

Die Lösung wurde vor Gebrauch mit HCl auf pH 7,4 eingestellt. Vor Gebrauch wurde der Puffer 1:10 mit VE-Wasser verdünnt und als 1x TBS Puffer verwendet.

##### 10x BSA-TBS Stammlösung:

BSA	10%		ad 1000ml A. bidest.
-----	-----	--	----------------------

Die Lösung wurde vor Gebrauch 1:10 mit 1x TBS verdünnt.

##### 10x Trypsin Puffer:

EDTA	3mM	1,25g
KCl	2,7mM	0,2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5mM	0,2g
NaCl	137mM	8g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,1mM	1,15g

Die Lösung wurde vor Gebrauch autoklaviert.

## 2.6. Kits

LEGENDplex custom mouse 5-plex panel	BioLegend, Nr. B3301837
MagniSort mouse CD8 T-cell enrichment kit	eBioscience, Nr. 8804-6822-74
MagniSort mouse CD4 T-cell enrichment kit	eBioscience, Nr. 8804-6821-74
CD4 <sup>+</sup> T-cell isolation kit	Miltenyi Biotec, Nr. 130-104-454
CD8 <sup>+</sup> T-cell isolation kit	Miltenyi Biotec, Nr. 130-104-075

## 2.7. Enzyme

Die Enzyme wurden bei den vom Hersteller angegebenen Temperaturen gelagert und mit dem jeweiligen mitgelieferten Puffer verwendet.

DNase I für Aufarbeitung von Lungenzellen	Sigma-Aldrich GmbH, Nr. DN25-1G
Kollagenase A	Roche, Nr. 35830422
Heparin-Natrium 25000	Ratiopharm GmbH, Nr. A69867

## 2.8. Antikörper

### 2.8.1. Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper

Bezeichnung	Klon	Wirt Isotyp	Endkonzentration [mg/ml] pro 10 <sup>6</sup> Zellen	Hersteller
APC α-Maus CD279	29F.1A12	Ratte IgG2a	0,2	BioLegend Nr.135210
APC α-Maus CD8	53-6.7	Ratte IgG2a	0,2	eBioscience Nr. 17-0081-82
APC α-Maus MHC II	M5/114.15.2	Ratte IgG2b	0,2	eBioscience Nr.17-5321-81
BV421 α-Maus CD127	A7R34	Ratte IgG2a	0,2	BioLegend Nr. 135027
FITC α-Maus CD86	GL-1	Ratte IgG2a	0,5	BD Biosciences Nr.553691
FITC α-Maus CD8a	53-6.7	Ratte IgG2a	0,5	BD Biosciences Nr.553031
PE α-Maus CD122	5H4	Ratte IgG2a	0,2	BioLegend Nr. 105906

Bezeichnung	Klon	Wirt Isotyp	Endkonzentration [mg/ml] pro 10 <sup>6</sup> Zellen	Hersteller
PE α-Maus CD90.1	HIS51	Maus IgG2a	0,2	eBioscience Nr. 12-0900-83
PE α-Maus CD11c	N418	Hamster IgG	0,2	BioLegend Nr.117308
PE α-Maus CD122	TM-beta1	Ratte IgG2b	0,2	eBioscience Nr. 12-1222-83
PE α-Maus CD25	PC61	Ratte IgG1	0,2	eBioscience Nr.12-0251-81
PE α-Maus CD8	53-6.7	Ratte IgG2a	0,2	eBioscience Nr. 17-0081-82
PE α-Maus CD4	GK1.5	Ratte IgG2b	0,2	BioLegend Nr. 100410
PE-Cy5 α- Maus CD8	53-6.7	Ratte IgG2a	0,2	BD Bioscience Nr. 553034
PE-Cy5 α- Maus CD4	RM4-5	Ratte IgG2a	0,2	BD Biosciences Nr. 553050
PE-Cy7 α- Maus CD3	145-2C11	Hamster IgG1	0,2	BioLegend Nr. 100320
PE-Cy7 α- Maus TCRβ	H57-597	Hamster IgG	0,2	BD Biosciences Nr. 560729
CD16/CD32 FC-Block	93	Ratte IgG2a	0,5	eBioscience Nr. 14-0161-82

### 2.8.2. Micro-Beads gekoppelte MACS und MagniSort Antikörper

Bezeichnung	Klon	Wirt Isotyp	Endkonzentration	Hersteller
α-Maus CD8 (Ly2) Microbeads	Keine Angabe vom Hersteller	Ratte IgG2a	10µl / 10 <sup>7</sup> Zellen	Miltenyi Biotec, Nr. 130-049-401

### 2.8.3. Für die Immunhistochemie verwendete Antikörper, Seren und Kits

Bezeichnung	Klon	Wirt Isotyp	Hersteller
Normalserum Kaninchen	polyklonal	-	Life Technologies; Nr. 16120099

Material

<b>Bezeichnung</b>	<b>Klon</b>	<b>Wirt Isotyp</b>	<b>Hersteller</b>
Normalserum Ziege	polyklonal	-	Life Technologies; Nr. 16210064
$\alpha$ -Maus CD8	4SM15	Ratte IgG2a	Thermo Fischer Scientific, Nr. 14-0808-82
$\alpha$ -Maus CD122	polyklonal	Kaninchen IgG	Bioss, Nr. Bs1959R-A488
$\alpha$ -Maus PD-1	polyklonal	Ziege IgG	R&D; Nr. AF-1021-SP
$\alpha$ -mCMV IE1	Croma 101	IgG1	Prof. S. Jonjic, Universität Rijeka
$\alpha$ -Ratte Biotin	polyklonal	Ziege Ig	Biosciences Pharmingen, Nr. 554014
$\alpha$ -Maus - Alkalische Phosphatase	polyklonal	Ziege IgG	BioRAD Laboratories Nr. OBT1172
$\alpha$ -Ziege Biotin	polyklonal	Esel IgG	Jackson ImmunoResearch, Nr. 705-065-147
$\alpha$ -Kaninchen Biotin	polyklonal	Ziege IgG	Vector Laboratories, Nr. BA-1000
ABC Peroxidase KIT Standard	-	-	Vector Laboratories, Nr. PK-6100
ABC alkalische Phosphatase KIT Standard	-	-	Vector Laboratories, Nr. AK-5000
Fuchsin-Substrat-System	-	-	Dako, Nr. K0625
<i>HPR Green Solution Set</i>	-	-	Nr. S-99055-103 oder 1030
Vector TrueView Autofluorescence Quenching Kit	-	-	Vector Laboratories, Nr. SP-8400

## 2.9. Versuchstiere

Alle verwendeten Versuchsmäuse wurden unter *specified-pathogen-free* (SPF) Bedingungen gezüchtet und / oder beherbergt beim *Translational Animal Research Center* (TARC) der Universitätsmedizin Mainz. Alle tierexperimentellen Arbeiten erfolgten mit der Genehmigung der Bezirksregierung Rheinland-Pfalz (Genehmigungs-Nummer 177-07/G14-1-015 und 177-07/G14-1-049). Folgende Versuchstiere wurden verwendet:

### **C57BL/6 JRj**

Dieser Mausstamm wurde von Janvier Labs bezogen und ist ein Inzuchtstamm (Haplotyp H-2<sup>b</sup>; CD90.2). In allen Versuchen wurde dieser Mausstamm als Wildtyp (WT) bezeichnet.

### **DEREG-C57BL/6**

Diese Mäuse wurden in unserem Tierstall selbst gezüchtet und ist ein transgener Mausstamm (Haplotyp H-2<sup>b</sup>; CD90.2). Die Mäuse exprimieren ein Fusionsprotein bestehend aus dem Diphtheria Toxin Rezeptors (DTR) und dem *Green Fluorescent Protein* (GFP). Das Fusionsgen steht unter der transkriptionellen Regulation des Foxp3 Promoters. Die DEREK-C57BL/6 Mäuse exprimieren das DTR/GFP Fusionsprotein spezifisch in CD4-positiven Treg und werden deshalb zum Nachweis von CD4 Treg verwendet.

### **C57BL/6-Thy1.1**

Dieser kongener Mausstamm trägt das T-Lymphozyten-spezifische Thy1a (Thy1.1) Allel (Haplotyp H-2<sup>b</sup>; CD90.1). Der Mausstamm wurde in unserem Tierstall mit dem Inzuchtstamm C57BL/6 durch die Einkreuzung, nachfolgende Selektion der Nachkommen und regelmäßige Rückkreuzung mit dem Inzuchtstamm selbst gezüchtet. Die Expression des Thy1.1 Allels lässt sich durch durchflusszytometrische Analysen oder durch histologische Färbungen nachweisen.

## 2.10. Viren

Die Infektion der Versuchstiere erfolgte mit folgenden Viren:

### **mCMV-WT.Smith (Strain Smith; ATCC VR-1399)**

Alle verwendeten Viren in dieser Arbeit gehen auf den von der ATCC (*American Type Culture Collection*) erworbenen Wildtyp-Stamm (*Smith strain*, 1954) mCMV-WT ATCC VR-194 (neue Bezeichnung VR-1399) zurück. Dieser WT-Stamm war Grundlage für die komplette Sequenzierung des mCMV-Genoms durch William Rawlinson (Rawlinson et al. 1996). Für die

Infektion der Mäuse wurden ausschließlich Zellkultur gereinigte Virus-Stocks verwendet. Mit diesem Virus wurden alle Mäuse infiziert – sofern nicht anders beschrieben – die für die Durchführung der Suppression-Assays (s. 3.3.4) verwendet wurden. Auch die Donoren des adoptiven Transfers (s. 3.6.5) wurden mit diesem Stamm infiziert.

### **mCMV-Δ157**

Dieser Deletionsmutante fehlt der ORF des m157 Genprodukts (Bubić et al. 2004). mCMV-resistente C57BL/6 Mäuse exprimieren den aktivierenden NK-Rezeptor Ly49H, welcher mit dem m157-Liganden auf der Oberfläche infizierter Zellen interagiert. Um zu verhindern, dass NK Zellen das mCMV kontrollieren, wurden die Mäuse mit der Mutante mCMV-Δm157 infiziert um die Stimulation des Ly49H Rezeptors zu verhindern. Mit diesem Virus wurden alle Rezipienten Mäuse des adoptiven Transfers (s. 3.6.5) infiziert.

## **2.11. Primäre Zellen und Zelllinien**

### **Murine embryofetale Fibroblasten (MEF)**

Diese adhären, primären Zellen wurden aus ca. 14 Tage alten Embryonen aus dem Inzuchtstamm C57BL/6 JRj (s. 2.9) isoliert (s. 3.1.3) (Passage 1) und für die weitere Verwendung entweder erneut passagiert oder kryokonserviert (s. 3.1.1). Aufgrund ihrer Permissivität für mCMV wurden Fibroblasten für die Bestimmung von Virustitern mittels Plaque-Assay (s. 3.2.2) sowie für die *in vitro* Vermehrung von mCMV (s. 3.2.1) verwendet.

Die Kultivierung der MEFs erfolgte auf 10cm Zellkulturschalen in MEM + 10% (v/v) FCS (10ml/Schale). Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit DPBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA (2ml/Schale) abgelöst und anschließend im Verhältnis 1:3 oder 1:4 geteilt (abhängig von der Konfluenz des Zellrasens). Für alle Versuche wurden die MEFs ausschließlich in Passage 3 eingesetzt.

### **Aus dem Knochenmark gewonnene dendritische Zellen (DC)**

Diese primären, adhären Zellen wurden aus dem Knochenmark von weiblichen C57BL/6 JRj Mäusen gewonnen (s. 3.1.4). Nach 6-tägiger Kultivierung wurden die Zellen kryokonserviert (s. 3.1.1). Für die Aktivierung von T-Zellen wurden die DC als Antigenpräsentierende Zellen (APCs) in den *in ex-vivo* Suppression-Assay eingesetzt (s. 3.3.4).

Die Kultivierung der DC erfolgte auf 10cm Zellkulturschalen in DMEM + 10% (v/v) FCS oder RPMI + 10% (v/v) FCS (10ml/Schale) mit zugesetztem GM-CSF. Letzteres wurde 1980 als Zytokin entdeckt, welches Granulozyten und Makrophagen im Knochenmark von Mäusen zum

Wachstum anregt (Burgess & Metcalf 1980). GM-CSF ist ein Glykoprotein das von T- und B-Zellen, Makrophagen und Fibroblasten gebildet wird. Es beschleunigt die Reifung der DC und stimuliert die Differenzierung von Granulozyten und Makrophagen von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (Burgess & Metcalf 1980). Es ist darauf zu achten, dass pro Schale ca.  $1 \times 10^7$  DC ausgesät werden müssen. Nach 2-tägiger Kultivierung wurde der Überstand in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert, 3x mit Medium abzentrifugiert ( $360 \times g$  / 7min /  $4^\circ\text{C}$ ) und auf eine passende Zellzahl eingestellt.

### 2.12. Statistik und Software

Die statistische Signifikanz von experimentell ermittelten Unterschieden zwischen zwei Versuchsgruppen wurde mit dem Zweistichproben t-Test ermittelt. Die p-Werte  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant betrachtet. Um zu ermitteln, ob die Varianzen gleich oder ungleich sind, wurde der F-Wert berechnet und der p(F)-Wert mittels folgender Website ermittelt: <https://www.statology.org/f-distribution-calculator/>

Neben den Standard MS Office Programmen wurden folgende Software verwendet.

---

<b>Software</b>	<b>Firma</b>
BioRender	BioRender
CXP	Beckman Coulter FC-500
Graphpad 8.4	Graphpad
ImageJ	Open Source
Kaluza	Beckman Coulter FC-500
LegendPlex	BioLegend

---

### **3. METHODEN**

#### **3.1. Zellbiologische Methoden**

Alle Arbeiten mit kultivierten Zellen, wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt, um Kontaminationen mit Pilzsporen und/oder Bakterien zu vermeiden. Für Zellkulturarbeiten wurden ausschließlich sterile Glas- und Plastikwaren verwendet. Die Zellen wurden in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator (37°C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub>) in gesättigter Wasserdampfatmosphäre (95% (v/v) Luftfeuchtigkeit) kultiviert.

##### **3.1.1. Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen**

Der Begriff Kryokonservierung bedeutet das Aufbewahren von Zellen oder Geweben in flüssigem Stickstoff (-196°C). Die Vitalität der Zellen kann dadurch nahezu unbegrenzt aufrechterhalten werden. Dem Einfriermedium wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt, welches die Bildung von Eiskristallen und damit eine Zellschädigung verhindert.

##### Material:

- Einfriermedium: 10% (v/v) DMSO, 90% (v/v) FCS
- Kulturmedium: DMEM + 10% (v/v) FCS; RPMI + 10% (v/v) FCS
- 100% FCS (v/v)
- Kryogefäße (1,5ml)
- Wasserbad

##### Durchführung:

Für eine Kryokonservierung wurden mindestens  $1 \times 10^6$  Zellen/ml im Einfriermedium aufgenommen und in Aliquots von je 1ml in Kryogefäße pipettiert. Sowohl die Zellen als auch alle verwendeten Gefäße mussten dabei stets gekühlt sein. Die Zellen wurden zuerst für ca. 48 Stunden bei -80°C eingefroren, bevor sie im flüssigen Stickstoff weggefroren wurden. Zur Rekultivierung wurden die Zellen durch gleichmäßige Hände-Reibe-Bewegung oder bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Zur Verdünnung des toxischen DMSO wurden die Zellen schnellstmöglich in einem Zentrifugenröhrchen mit ca. 3-4ml FCS (100%) überführt, mit Kulturmedium aufgefüllt und anschließend abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Medium resuspendiert, auf eine passende Zellzahl eingestellt und in Zellkulturschalen oder Zellkulturflaschen bei 37°C kultiviert.

### 3.1.2. Ermittlung der Zellvitalität und der Zellzahl

Die Zellen wurden mit Trypanblau oder Türks Lösung angefärbt und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer mikroskopisch ermittelt. Sollten lebende von toten Zellen unterschieden werden, so wurde Trypanblau verwendet. Der anionische Farbstoff wird direkt von perforierten Zellen, durch die effiziente Bindung an Proteine, aufgenommen und färbt tote Zellen dunkelblau. Lebende Zellen hingegen sind für den Farbstoff nicht permissiv. Für eine Differenzierung von Leukozyten und Erythrozyten wurde Türks Lösung verwendet. Der Unterschied dieser Lösung zu Trypanblau ist, dass die Türks Lösung durch den enthaltenen Farbstoff Kristallviolett ausschließlich die Zellkerne mononukleärer Zellen anfärbt und dadurch nicht zum Nachweis der Zellvitalität benutzt werden kann.

#### Material:

- Neubauer-Zählkammer
- Lichtmikroskop
- Trypanblau
- Türks Lösung

#### Durchführung:

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurde jeweils ein geringes Volumen der Zellsuspensionen in einem definierten Verhältnis mit einer der beiden Farbstoffe gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer (Kammertiefe: 0,1mm) überführt. Unter dem Lichtmikroskop wurde anschließend mindestens ein Großquadrat ausgezählt und die Zellzahl mit Hilfe folgender Formel berechnet:

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

N = Zahl gezählter Zellen

n = Zahl gezählter Großquadraten

V = Verdünnungsfaktor

$10^4$  = Kammerfaktor

### 3.1.3. Anlage von murinen embryonalen Fibroblasten (MEF)

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

#### Material:

- Zellkulturschalen (10cm; 14cm)
- Zellkulturmedium: MEM + 10% (v/v) FCS

- Trypsin (MEF-Zellkultur): Trypsin-EDTA (10x) 0,5%, pH: 7,4
- Trypsin (MEF-Herstellung) (s. 2.5.1)
- DPBS
- Steriles Sezierbesteck
- Eis und Kühlplatten (aus -80°C)
- Sterilen Erlenmeyerkolben (300ml) mit Glasperlen (Durchmesser 1-2mm)
- Steriler Magnetstab
- Sterile Metallsiebe
- Zentrifugenröhrchen (50ml)
- Zell-Nylonsiebe (100µm)
- Zentrifuge
- Kryoröhrchen (1,5ml)

### Durchführung:

Die MEF Anlage wurde durchgeführt wie bereits beschrieben (Podlech et al. 2002). Es wurden nach 14 Tagen *post conceptionem* die Embryonen aus C57BL/6 Mäusen entnommen und auf einer Petrischale von Plazenta, Fruchtsack- und blase, Innereien, Augenanlagen und dem Gehirn befreit. Es war darauf zu achten, dass alles auf gekühlten Platten gelagert und auf Eis gearbeitet wurde. Das restliche Gewebe wurde mit einer Schere zu einer homogenen Masse verarbeitet. Letzteres wurde in einem sterilen Erlenmeyerkolben mit Glasperlen und Magnetstab überführt und 30ml Trypsin / EDTA hinzugegeben. Diese Zellsuspension wurde für 30min unter ständigem Rühren bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde zu der Gewebesuspension zusätzlich 30ml Trypsin / EDTA hinzugegeben und für weitere 30min bei 37°C inkubiert. Der letzte Schritt wurde nochmals wiederholt.

Die Gewebesuspension wurde in insgesamt vier 50ml Zentrifugenröhrchen über je ein steriles Metallsieb verteilt, um verbliebende Gewebestückchen zu entfernen. Der Erlenmeyerkolben wurde dabei gründlich mit DPBS abgespült, um Zellverluste zu minimieren. Die Zentrifugenröhrchen wurden für 10min bei 360xg bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium resuspendiert, auf zwei 50ml Zentrifugenröhrchen verteilt und für 10min bei 360xg bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium aufgenommen, in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt und nochmals für 10min bei 360xg bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet mit 5ml Kulturmedium über ein 100µm Zell-Nylonsieb gegeben und nochmals mit 5ml Kulturmedium nachgespült, um den Verlust von Zellen zu minimieren. Zuletzt wurde die Zellzahl bestimmt.

Anschließend wurden die Zellen für eine Kultivierung auf eine Dichte von  $2-3 \times 10^7$  pro 14er Petrischale (Ø 14,5cm) eingestellt, ausgesät und bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium entfernt und der Zellrasen vorsichtig dreimal mit 10ml DPBS gespült. Danach

wurden 30ml frisches Kulturmedium hinzugegeben und solange weiter bei 37°C kultiviert, bis ein konfluenter Zellrasen erreicht wurde. Die Zellen wurden dann mit Hilfe von Trypsin von der Petrischale gelöst und vor einer weiteren Kultivierung im Verhältnis 1:3 bis 1:4 geteilt (Passage 2) oder in Einfriermedium überführt und kryokonserviert (3-4 Aliquots / 14,5cm Petrischale) (Passage 1). MEFs können bis max. Passage 4 verwendet werden.

### 3.1.4. Anlage dendritischer Zellen (DC) aus dem Knochenmark

Für die Aktivierung von T-Zellen wurden die DC als APCs in den *in ex-vivo* Suppressions-Assay eingesetzt (s. 3.3.4).

#### Material:

- Kulturmedium: DMEM + 10% (v/v) FCS oder RPMI + 10% (v/v) FCS
- FACS Puffer (s. 2.5.2)
- DC Puffer: (s. 2.5.2)
- DPBS
- Steriles Sezierbesteck
- Ethanol 70% (v/v)
- Spritze (1ml) + Kanüle (27G 0,4x12mm)
- Zell-Nylonsieb (100µm)
- RBC Lyse Puffer
- GM-CSF (20ng/ml)
- FACS Antikörper: (s. 2.8.1.1.)
- Zentrifuge
- Durchflusszytometer (Beckman Coulter; FC-500)

#### Durchführung:

Die DC-Anlage wurde durchgeführt wie bereits beschrieben (Mayer & Sparwasser 2014). Die DC wurden aus 10-16 Wochen alten weiblichen C57BL/6 Mäusen gewonnen. Dazu wurden die Mäuse durch CO<sub>2</sub>-Begasung getötet und durch Eintauchen in Ethanol 70% (v/v) desinfiziert. Die Hinterbeine sowie deren Fell wurden entfernt. Dabei war zu beachten, dass die Hinterbeine über dem Becken-Hüftgelenk abgetrennt wurden. Anschließend wurde die Tibia vom Kniegelenk abgeschnitten, sodass Femur und Tibia getrennt voneinander wurden. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurden Femur und Tibia in DC Puffer überführt, durch ein Skalpell frei vom Muskelgewebe präpariert und die Epiphysen vorsichtig abgeschnitten. Femur und Tibia wurden mit Hilfe einer 1ml Spritze (+ Kanüle) mit DC Puffer durchgespült und die dabei gelösten Knochenmarkzellen in einem frischen 50ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Das wurde so lange wiederholt bis die Knochen vollständig weiß erschienen.

Die Knochenmarkzellen wurden für 7min bei 360xg bei 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5ml DPBS aufgenommen und über einen 100µm Zell-Nylonsieb gegeben. Um den Zellverlust zu minimieren, wurden sowohl das 50ml Zentrifugenröhrchen sowie das Nylonsieb mit 5ml DPBS nachgespült. Anschließend wurde auf 50ml mit DPBS aufgefüllt und für 7min bei 360xg bei 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 3ml RBC Lyse Puffer resuspendiert, für 2min inkubiert und anschließend 27ml kaltes (wichtig!) DC Puffer hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde dann für 7min bei 360xg bei 4°C abzentrifugiert, das Zellpellet in 15ml vorgewärmten Kulturmedium aufgenommen und die Zellzahl ermittelt. Dabei wurden ca.  $2-4 \times 10^6$  Zellen in 10ml Kulturmedium mit 20ng/ml GM-CSF in einer 10cm Petrischale ausgesät und bei 37°C inkubiert.

Am zweiten Tag wurden 10ml vorgewärmtes Kulturmedium zu den Zellen hinzugegeben und zwei weitere Tage bei 37°C inkubiert. Am vierten Tag wurden 10ml aus den Petrischalen (nicht resuspendieren!) in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 7min bei 360xg bei 4°C abzentrifugiert, um einen Zellverlust zu minimieren. Das Zellpellet wurde in 10ml frischem vorgewärmten Kulturmedium resuspendiert, GM-CSF dazu pipettiert und in die ursprüngliche Petrischale gegeben. Die Zellen wurden zwei weitere Tage bei 37°C inkubiert. Am sechsten Tag wurden die nicht-adhärenenten Zellen von allen Petrischalen in 50ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und für 7min bei 360xg bei 4°C abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden gepoolt, resuspendiert und mit 15ml Kulturmedium aufgefüllt. Anschließend wurde die Zellzahl ermittelt und ca.  $5 \times 10^6$  DC in Aliquots von je 1ml in Kryogefäße pipettiert und kryokonserviert.

Vor und nach einer Kryokonservierung wurden die DC durchflusszytometrisch analysiert (s. 3.4). Dabei war drauf zu achten, dass nicht mehr als 70% der Zellen  $CD11c^+$ , sowie unter den  $CD11c^+$  nicht mehr als 30%  $MHC II^{high} CD86^{high}$  sein sollten (Mayer & Sparwasser 2014).

## 3.2. Virologische Methoden

### 3.2.1. mCMV Produktion

Alle verwendeten Viren in dieser Arbeit wurden ausschließlich aus infizierten MEFs der 3. Passage aufgereinigt und für die Infektionen verwendet (Lemmermann et al. 2010).

#### Material:

- MEF (3. Passage)
- Zellkulturmedium: MEM + 10% (v/v) FCS
- Virusstandardpuffer (VSP): (s 2.5.3)
- VSP + 15% (w/v) Saccharose: (s. 2.5.3)

- Zellkulturschalen (14cm)
- Zellschaber
- Sterile Zentrifugenbecher (500ml, 250ml, 50ml)
- Sterile Polyallomer Ultrazentrifugenröhrchen (36ml)
- *Dounce*-Homogenisatoren
- Eis

### Durchführung:

#### **1. Infektion der MEFs**

MEF der 3. Passage wurden bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Um eine hohe Virusausbeute zu erzielen, wurden ~60 Petrischalen (Ø14,5cm) infiziert. Die Infektion erfolgte mit jeweils  $1 \times 10^5$  PFU in 5ml Medium pro Petrischale unter mehrmaligem Schwenken bei Raumtemperatur. Danach wurden 20ml Kulturmedium dazu pipettiert und für ca. 4 Tage bei 37°C inkubiert. Der zytopathische Effekt (Abkuglung und Ablösen der Zellen) war bis dahin stark ausgeprägt, sodass sich ca. 80% der Zellen im Überstand befanden.

#### **2. Virusaufreinigung**

Die Zellen wurden mit Hilfe eines sterilen Zellschabers vorsichtig in sterilen 500ml Zentrifugenbechern gesammelt. Um den Zellverlust zu minimieren, wurden die Petrischalen nochmals mit 10ml Kulturmedium gespült und ebenso in den Zentrifugenbechern gesammelt. Wichtig ist hier zu vermerken, dass ab diesem Punkt alle Arbeiten auf Eis erfolgen mussten sowie die 4°C gekühlten Zentrifugen benutzt wurden. Die 500ml Zentrifugenbecher wurden mit Kulturmedium austariert und für 20min bei 6.400xg bei 4°C zentrifugiert (Sorvall RC 5C Plus: Rotor SLA-3000 F12(S)\_6x500LEX). Die Überstände wurden in sterile 250ml Zentrifugenbecher gesammelt. Die Pellets in den 500ml Zentrifugenbecher wurden mit je 10ml kaltem frischem MEM (ohne FCS) resuspendiert und in je 5ml Aliquots in sterile *Dounce*-Homogenisatoren überführt. Um Zellverluste zu minimieren, wurden die Zentrifugenbecher nochmals mit Kulturmedium ausgespült und ebenfalls im *Dounce*-Homogenisator homogenisiert. Die Zellhomogenate wurden in 50ml Zentrifugenröhrchen vereint und für 20min bei 3.670xg bei 4°C abzentrifugiert (Sorvall RC 5C Plus: Rotor SS-34 F21\_8x50y). Die Zellüberstände der 50ml Zentrifugenbecher wurden mit den bereits in den 250ml Zentrifugenbechern gesammelten Überständen vereint. Die Pellets der 50ml Zentrifugenbechern wurden verworfen. Anschließend wurden die 250ml Zentrifugenbecher austariert und für 3h bei 28.000xg bei 4°C abzentrifugiert (Sorvall RC 5C Plus: Rotor SLA-1500; F14(S)\_6x250y). Der letzte Schritt

fürhte zur Sedimentation der Viruspartikel. Die Überstände wurde dekantiert, die Pellets mit etwas Medium bedeckt und über Nacht im Kühlraum auf Eis gelagert, sodass sich die Pellets lösen konnten. Am nächsten Morgen wurden die Pellets im verbliebenen Volumen resuspendiert und mit einem *Dounce*-Homogenisator homogenisiert (ca. 20x). Anschließend wurde das Homogenat in einem Puffer-zu-Virus Volumenverhältnis von 10:1 (27ml Puffer + 3ml Viruslösung) auf ein 15%-iges (w/v) Saccharose/VSP-Kissen in 30ml Polyallomer-Röhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden für 1h bei 52.800xg bei 4°C abzentrifugiert (Sorvall Combi Plus: Rotor AH629). Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, das Pellet mit je 500µl eiskaltem VSP/Saccharose überschichtet und zum Lösen für 4h auf Eis gestellt. Das Pellet wurde resuspendiert und die Suspension in einem kleinen *Dounce*-Homogenisator homogenisiert. Die Röhrchen wurden dabei, um einen Zellverlust gering zu halten, mit weiteren 500µl VSP/Saccharose ausgespült und nochmals mittels des *Dounce*-Homogenisator homogenisiert. Die Virussuspension wurde in einem 50ml Zentrifugenröhrchen gesammelt, aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Das aufgereinigte Virus sollte nicht öfter als viermal aufgetaut werden, um eine Verminderung des Virustiters zu vermeiden.

### **3.2.2. Virustiter-Bestimmung mittels *Plaque-Assay***

Die Bestimmung der Virustiter mittels *Plaque-Assay* wurde durchgeführt wie bereits beschrieben (Lemmermann et al. 2010). Diese Methode ist eine Standardmethode für den Nachweis der Infektiosität von infiziertem Material. Hierfür wurden MEF (C57BL/6 JRj; Passage 3) auf 48-Well-Platten ausgesät und mit den aufgereinigten Viren infiziert. Nach 4-5 Tagen wurde der Zytotoxische Effekt (CPE) des Virus sichtbar (Veränderung der Zellmorphologie nach einer Virusinfektion). Im Zellrasen entstanden mikroskopisch sichtbare Löcher, welche als *Plaque* bezeichnet werden. Der Virustiter wird dabei immer in PFU (*plaque forming unit*) angegeben (1 *Plaque* entspricht 1 PFU). Jeder *Plaque* ist auf mindestens ein infektiöses Viruspartikel zurückzuführen. Die entstandenen *Plaques* im Zellrasen wurden anschließend mit Hilfe eines Invertmikroskops ausgezählt und der Virustiter ermittelt.

#### **3.2.2.1. Virustiter-Bestimmung eines Virusstocks**

##### Material:

- Steriles Sezierbesteck
- Sterile Metallsiebe
- Petrischalen (6cm)

- Zell-Nylonsieb (100µm, 40µm)
- Einmalspritzen (2ml)
- Kryoröhrchen (1.5ml)
- Zellkulturmedium: MEM + 10% (v/v) FCS
- MEF (3. Passage)
- 48-Well Zellkulturplatten
- Methylzellulose

### Durchführung:

Es wurden ca. 6-8 Verdünnungsstufen ( $\log_{10}$ ) des Virusstocks in Triplikaten für 1h bei 37°C auf konfluenten MEF inkubiert. Nach der Infektion wurden die Zellen mit 500µl Methylzellulose überschichtet und für 4 Tage bei 37°C inkubiert. Die *Plaques* wurden mit Hilfe eines Invertmikroskops ausgezählt und der Virustiter ermittelt, indem die Triplikate ausgezählt und als Mittelwert in die Formel eingesetzt wurden (entspricht der Plaquezahl). Die errechneten Werte entsprechen dem Virustiter pro ml (Reddehase et al. 1985).

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

### **3.2.2.2. Virustiter-Bestimmung in Organhomogenaten**

#### Durchführung:

##### **1. Organentnahme**

Organe aus infizierten C57BL/6 Mäusen nach adoptiven Transfer (siehe 3.6.5), wurden steril entnommen, in 1ml Kulturmedium überführt und bei -80°C bis zur Aufarbeitung der Organe gelagert.

##### **2. Aufarbeitung der Organe**

Die eingefrorenen Organe wurden schnellstmöglich im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurden die einzelnen Organe auf je ein steriles Metallsieb gegeben, mit Hilfe eines 2ml Spritzenstempels zerrieben und in 2ml Kulturmedium aufgenommen. Es wurde von jedem Organhomogenat eine  $\log_{10}$  Verdünnungsreihe in Kulturmedium hergestellt (sechs Verdünnungsstufen) und davon je 100µl auf die MEFs als Duplikate in 48-Well-Platten überführt. Die Platten wurden dann 30min bei 760xg bei Raumtemperatur zentrifugal infiziert. Durch die zentrifugale Infektion kommt es zu einer Verstärkung der Infektion um einen Faktor 20 (Hudson et al. 1976). Die Kulturen wurden mit 500µl Methylzellulosemedium überschichtet und für 4-5 Tage bei 37°C inkubiert. Die entstandenen *Plaques* wurden anschließend mit einem Invertmikroskop ausgezählt und der Virustiter bestimmt. Der berechnete Virustiter wurde

als PFU/Organ angegeben. Dementsprechend musste das Volumen von 2ml, in welchem jedes Organ aufgenommen wurde, mit in die Formel einbezogen werden:

Virustiter (PFU/Organ) = Summe der gezählten Plaques x Verdünnungsfaktor x 10 x 2

### Anmerkungen:

Während der zentrifugalen Infektion wurden die Platten zuerst für 5min bei 760xg bei Raumtemperatur zentrifugiert, um 180° gedreht und für weitere 25min bei 760xg zentrifugiert. So können die Viruspartikel besser in die MEF eindringen. Eine zentrifugale Infektion erfolgte nur bei der Virustiter-Bestimmung der Organhomogenaten und nie bei der Virusproduktion oder der Virustiter-Bestimmung von Virusstocks.

## **3.3. Immunologische Methoden**

### **3.3.1. Isolierung von CD8 und CD4 T-Zellen aus unterschiedlichen Organen**

#### **3.3.1.1. Milz**

Die Milzzellen dienten zur Isolierung von CD8- und CD4 T-Zellen, welche später in den in *ex-vivo* Suppressions-Assay (s. 3.3.4) sowie in den adoptiven Transfer (s. 3.6.5) eingesetzt wurden. Zusätzlich dazu, wurden die Milzzellen zytofluorometrisch analysiert.

#### Material:

- Kulturmedium: DMEM + 10% (v/v) FCS
- Steriles Sezierbesteck
- Sterile Metallsiebe
- Einmalspritzen (2ml)
- Petrischalen (6cm)
- Zell-Nylonsiebe (100µm, 40µm)
- Zentrifugenröhrchen (50ml)
- Erythrozyten-Lysepuffer
- Türks Lösung

#### Durchführung:

Die Milzen der Mäuse (je nach Versuch: C57BL/6; DREG-C57BL/6; C57BL/6-Thy1.1.) wurden steril entnommen und in Kulturmedium überführt. Anschließend wurden die Milzen über ein steriles Metallsieb gegeben und mit Hilfe eines 2ml Spritzenstempels in einer Petrischale (Ø 6cm) zerrieben. Dabei wurde das Metallsieb mit Kulturmedium gründlich abgespült. Das Gewebehomogenat wurde über ein 100µm Nylon-Zellsieb in ein 50ml Zentrifugenröhrchen

gegeben. Dabei wurde die Petrischale nochmals mit Kulturmedium ausgespült, um den Zellverlust minimal zu halten. Das Zentrifugenröhrchen wurde auf 50ml mit Kulturmedium aufgefüllt und für 7min bei 360xg bei 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10ml Kulturmedium resuspendiert und über ein 40µm Nylon-Zellsieb in ein frisches 50ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Dabei wurde das vorherige Röhrchen gründlich mit Kulturmedium abgespült und die Suspension ebenso über das Nylon-Zellsieb gegeben. Anschließend wurde auf 50ml mit Kulturmedium aufgefüllt und für 7min bei 360xg bei 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium aufgenommen (pro Milz je 1ml Kulturmedium), die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt und auf die benötigte Konzentration eingestellt.

Anmerkung: Je nach Versuch wurde zusätzlich zu den oben genannten Schritten eine Lyse der Erythrozyten durchgeführt. Hier wurde das Zellpellet nach der ersten Zentrifugation in 2ml Erythrozyten-Lysepuffer aufgenommen und für 2min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lyse durch Zugabe eines Zellkulturmediums gestoppt und die Zellsuspension über ein 40µm Nylon-Zellsieb gegeben (alle weiteren Schritte sind identisch wie oben beschrieben).

Erwartete Zellzahl bei naiven Mäusen: ca.  $5 \times 10^7$  –  $1 \times 10^8$  Zellen pro Milz

Erwartete Zellzahl nach intraperitonealer Infektion: ca.  $1.5 \times 10^8$  –  $2 \times 10^8$  Zellen pro Milz

### 3.3.1.2. Thymus

Die isolierten Zellen aus dem Thymus dienen zum Nachweis von CD4 und CD8 Treg durch durchflusszytometrische Analysen.

#### Material:

- Kulturmedium: DMEM + 10% (v/v) FCS
- Steriles Sezierbesteck
- Sterile Metallsiebe
- Einmalspritzen (2ml)
- Petrischalen (6cm)
- Zell-Nylonsiebe (100µm)
- Zentrifugenröhrchen (50ml)
- Türks Lösung

#### Durchführung:

Die Lymphozyten wurden aus dem Thymus von akut infizierten oder naiven Mäusen steril isoliert und in Kulturmedium überführt. Anschließend wurde der Thymus über ein steriles Metallsieb

gegeben und mit Hilfe eines 2ml Spritzenstempels in einer Petrischale ( $\varnothing$  6cm) zerrieben. Dabei wurde das Metallsieb mit Kulturmedium gründlich abgespült. Das Gewebehomogenat wurde über ein 100 $\mu$ m Nylon-Zellsieb in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt. Dabei wurde die Petrischale nochmals mit Kulturmedium ausgespült, um einen Zellverlust minimal zu halten. Das 50ml Zentrifugenröhrchen wurde auf 50ml mit Kulturmedium aufgefüllt und für 7min bei 360xg bei 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium aufgenommen, (pro Thymus je 1ml Kulturmedium) die Zellzahl bestimmt und auf die benötigte Konzentration eingestellt.

Erwartete Zellzahl bei naiven Mäusen: ca.  $5 \times 10^7$  –  $1 \times 10^8$  Zellen pro Thymus

Erwartete Zellzahl nach intraperitonealer Infektion: ca.  $6 \times 10^7$  –  $1 \times 10^8$  Zellen pro Thymus

### 3.3.1.3. Lunge

Die isolierten Zellen aus der Lunge dienten zum Nachweis von CD4 und CD8 Treg durch durchflusszytometrische Analysen.

#### Material:

- Kulturmedium: DMEM + 10% (v/v) FCS
- PBS/Heparin Lösung: (s. 2.5.1.)
- Steriles Sezierbesteck
- Sterile Metallsiebe
- Einmalspritzen (2ml)
- Petrischalen (6cm)
- Zell-Nylonsiebe (100 $\mu$ m)
- Zentrifugenröhrchen (50ml)
- Sterile Erlenmeyerkolben (100ml)
- DNase I: Stock: 3mg/ml
- Kollagenase A: Stock 0,239 U/mg
- Wasserbad
- Türks Lösung

#### Durchführung:

##### 1. *Lungenperfusion*

Von einer mit CO<sub>2</sub> getöteten und durch das Eintauchen in Ethanol 70% (v/v) desinfizieren Maus, wurde der Bauchraum sowie der Halsbereich freigelegt. Anschließend wurden die *Vena-* und *Arteria subclavia*, *Aorta abdominalis* sowie *Vena cava inferior* geöffnet, sodass das Herz punktiert werden konnte. Dabei wurde PBS/Heparin mit einer 2ml Spritze aufgezogen, mit der daran befestigten Kanüle in die rechte Herzkammer gestochen und solange gespült, bis die Lunge vollständig weiß erschien. Die Lunge wurde entnommen und in ein mit Medium gefülltes Röhrchen überführt.

### 2. Lungenaufarbeitung

Je eine Lunge wurde in eine 10cm Petrischale gegeben. Mit Hilfe von Pinzetten wurden die hilären Lymphknoten, Trachea und Bronchien entfernt. Die Lunge wurde mit Hilfe einer Schere in sehr kleine Stücke geschnitten und in einem 50ml Zentrifugenröhrchen überführt (1 Lunge pro Röhrchen). Die Petrischale, Schere und Pinzette wurden mit insgesamt 5ml DMEM abgespült und ebenso in dem Zentrifugenröhrchen gesammelt. Zum Verdau des Bindegewebes wurden 100µl DNase und 333µl Kollagenase pro Lunge hinzugefügt (Holt et al. 1985). Nach einer Inkubation von 1h im Wasserbad bei 37°C unter ständigem Schütteln, wurde die Zellsuspension über ein 100µm Nylon-Zellsieb gegeben, mit dem Stempel einer 2ml Spritze das restliche Gewebe zerrieben und in einem frischen 50ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Der Stempel sowie das Zentrifugenröhrchen wurden, um den Zellverlust minimal zu halten, nochmals mit 20ml DMEM gespült und die Lösung ebenso im frischen 50ml Röhrchen gesammelt. Anschließend wurde die Suspension bei 681xg für 7min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde in einem frischen 50ml Röhrchen gesammelt und das Zellpellet in 20ml frischen Medium resuspendiert. Die zwei 50ml Röhrchen wurden dann vereint (insgesamt 40ml) und bei 681xg für 7min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1ml Lyse Puffer resuspendiert und für 2min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 5ml DMEM dazu pipettiert, die gesamte Zellsuspension über ein frisches 100µm Nylon-Zellsieb gegeben und in einem frischen 50ml Röhrchen gesammelt. Das vorherige Röhrchen wurde mit 20ml Medium nachgespült und ebenso über das 100µm Nylon-Zellsieb gegeben. Danach wurde die Zellsuspension bei 360xg für 7min bei Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2ml Medium resuspendiert. Ein Aliquot wurde für die Zellzählung steril entnommen und die Zellzahl mit Türks Lösung bestimmt.

Erwartete Zellzahl bei naiven Mäusen: ca.  $5 \times 10^6$  –  $1 \times 10^7$  Zellen pro Lunge

Erwartete Zellzahl nach intraperitonealer Infektion: ca.  $1.5 \times 10^7$  –  $2 \times 10^7$  Zellen pro Lunge

#### 3.3.1.4. Blut

Aus dem Blut wurden CD4 und CD8 Treg zytofluorometrisch analysiert.

##### Material:

- Medium: PBS-EDTA (30mM)
- Eppendorfgefäße (1.5ml)

- Sterile Metallsiebe

### Durchführung:

Es wurden 50µl 30mM PBS-EDTA in 1,5ml Eppendorfgefäße vorgelegt (dies reicht für ca. 100-200µl Vollblut), bevor das Blut entnommen wurde.

Von einer mit CO<sub>2</sub> getöteten Maus, die durch Eintauchen in Ethanol 70% (v/v) desinfiziert wurde, wurde der Bauchraum sowie der Halsbereich freigelegt. Anschließend wurde die *Vena-* und *Arteria subclavia*, *Aorta abdominalis* sowie *Vena cava inferior* geöffnet. Das Blut wurde mit einer 200µl Pipette in die Eppendorfgefäße pipettiert, welche bis zur Weiterverarbeitung im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert wurden. Details zur zytofluorometrischen Analyse sind in Kapitel 3.4 erklärt.

### **3.3.2. Isolierung von T-Zellpopulationen mittels MACS**

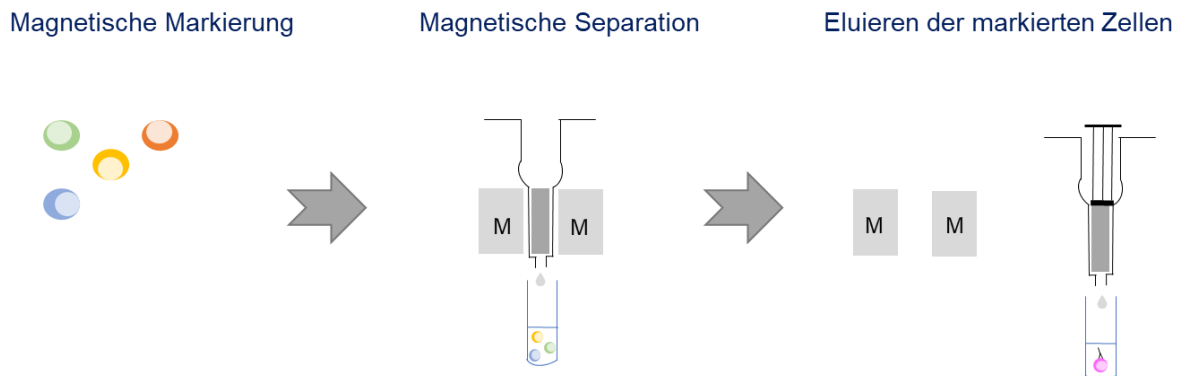
Das *magnetic cell separation* (MACS) System von Miltenyi Biotech, dient zur Isolierung bestimmter Zellpopulationen aus einer Zellsuspension (Miltenyi et al. 1990). Die Markierung erfolgt mit paramagnetischen *Microbeads* (ca. 50nm), welche an Antikörper gebunden sind und an Zellen binden, die das entsprechende Antigen präsentieren. Die Säule wird in ein Magnetfeld eingebracht und Zellsuspension auf die Säulen aufgetragen, welche aus Metallkugeln besteht. Generell wird zwischen positiv- (s. 3.3.2.1) und negativ-Selektion (s. 3.3.2.2) unterschieden (Miltenyi et al. 1990). Essenziell für alle Arbeiten mit dem MACS-System ist das Arbeiten auf Eis und die Verwendung von gekühltem MACS Puffer.

Für den Suppression-Assay oder adoptiven Transfer (s. 3.3.4; 3.6.5), wurden die Milzen aus akut infizierten oder naiven Mäusen entnommen und zu einer Einzelzell-Suspension aufgearbeitet (s. 3.3.1.1). Die gewonnenen Zellen wurden in MACS Puffer (1ml pro Milz) aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Aus der Milzsuspension wurden dann die CD8 und/oder CD4 T-Zellen mittels MACS isoliert. Für den Suppression-Assay wurde die negativ-Selektion- und für den adoptiven Transfer die positiv-Selektion eingesetzt.

#### **3.3.2.1. Positiv-Selektion mittels MACS**

Positiv-Selektion bedeutet, dass der gewünschte Zelltyp durch die *Microbeads*, innerhalb eines Magnetfeldes, in der Separations-Säule zurückgehalten wird. Danach wird die Säule aus dem Magnetfeld entnommen, auf ein 15ml Zentrifugenröhrchen gelegt und die markierten Zellen durch Druck von der Säule eluiert (s. **Abb. 7**). In dieser Arbeit wurden CD8 T-Zellen

mCMV-infizierter Donoren für einen adoptiven Transfer mittels positiv-Selektion gewonnen (s. 3.6.5).



**Abb. 7: Prinzip der positiv-Selektion mittels MACS.** Im ersten Schritt wurden die Zellen mit Microbeads magnetisch markiert. Danach wurden die Zellen auf einer Säule gegeben, welche in einem Magneten eingespannt war. Die nicht-markierten Zellen – der unerwünschte Zelltyp – kann ungehindert passieren und bei Interesse in einem Zentrifugenröhrchen aufgefangen werden. Da bei der positiv-Selektion die markierten Zellen von dem Magneten in der Säule zurückgehalten werden, wurde die Säule aus dem Magneten entfernt, und die Zellen mit einem Stempel aus der Säule gedrückt. Um eine Reinheit von >95% zu erreichen, wurde die Säule dreimal mit Puffer gewaschen. Diese Abbildung wurde aus der MACS-Produktbeschreibung von Miltenyi Biotech entnommen und modifiziert.

### Material:

- Manuelles MACS-System
- Separationssäulen (MS Columns, LS Columns)
- CD8a (Ly-2) Microbeads
- MACS Puffer: (s. 2.5.2)
- DPBS
- Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)

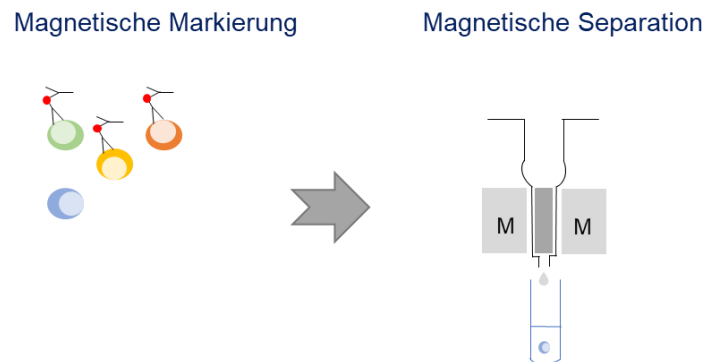
### Durchführung:

Nach der Milzpräparation (s. 3.3.1.1) wurden  $1 \times 10^8$  Milzzellen bei  $300 \times g$  für 10min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in  $900 \mu\text{l}$  MACS Puffer resuspendiert ( $90 \mu\text{l}$  MACS Puffer pro  $10^7$  Gesamtzellen). Anschließend wurden  $100 \mu\text{l}$  CD8 (Ly-2) Microbeads dazu pipettiert ( $10 \mu\text{l}$  pro  $10^7$  Gesamtzellen) und für 10min bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Danach wurde eine LS-Säule (*large cells columns for separation*) im Magneten angebracht und mit 3ml MACS Puffer zum Äquilibrieren gewaschen. Die markierte Zellsuspension wurde anschließend auf die Säule überführt und der Durchfluss, die CD8 negativen T-Zellen, in ein 15ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Um eine höhere Reinheit zu erzielen, wurde die LS-Säule 3x mit 3ml MACS Puffer gewaschen und der Durchlauf im selben 15ml Röhrchen aufgefangen. Um die CD8-positiven Zellen zu erhalten, wurde die LS-Säule von dem Magneten entfernt, auf ein frisches 15ml Röhrchen gesetzt und die Zellen mit 5ml MACS Puffer eluiert. Die eluierten CD8-positiven Zellen, sowie der Durchfluss (CD8-negativen Zellen)

wurden bei 360xg für 7min bei 4°C abzentrifugiert, die Pellets in DPBS oder MACS Puffer aufgenommen und je ein Aliquot steril für die Zellzahlbestimmung entnommen.

### 3.3.2.2. Negativ-Selektion mittels MACS

Negativ-Selektion bedeutet, dass bestimmte Zellpopulationen aus einer Zellsuspension entfernt werden, um die Zielpopulation zu erhalten. Dazu werden die zu entfernenden Zellen mit *Microbeads* markiert und in der Säule, durch das Magnetfeld, zurückgehalten. Die nicht-markierten Zellen entsprechen der Zielpopulation, welche die Säule ungehindert passieren können (s. **Abb. 8**). In dieser Arbeit wurden mittels negativ-Selektion, CD8- und CD4 T-Zellen aus Milzen isoliert und für weitere Aufreinigungen von CD4 und CD8 Treg für den Einsatz im Suppression-Assay eingesetzt (s. 3.3.4).



**Abb. 8: Prinzip der negativ-Selektion mittels MACS.** Im ersten Schritt wurden die unerwünschten Zellen magnetisch markiert. Danach wurden die Zellen auf eine Säule aufgetragen, welche in einem Magneten eingespannt war. Die unerwünschten Zellen bleiben an der Säule hängen, während die Zielpopulation ungehindert passieren und aufgefangen werden kann. Diese Abbildung wurde aus der MACS-Produktbeschreibung von Miltenyi Biotech entnommen und modifiziert.

#### Material:

- Manuelles MACS-System
- Separationssäulen (MS Columns, LS Columns)
- CD4 bzw. CD8 T cell isolation kit
- MACS Puffer: (s. 2.5.2)
- DPBS
- Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)

#### Durchführung:

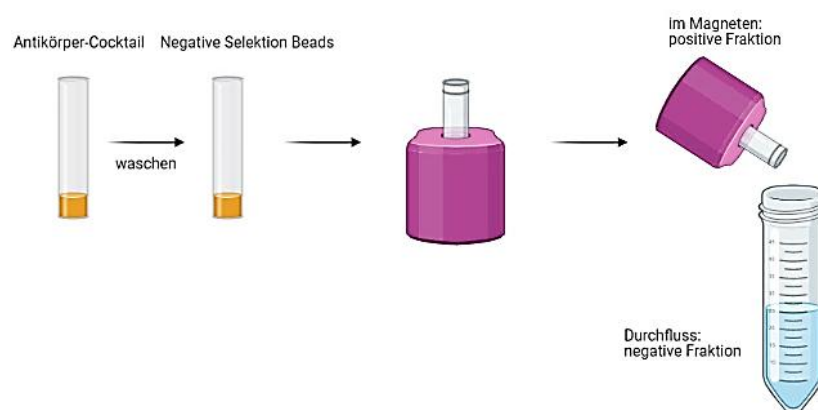
Nach Zellzahlbestimmung der gepoolten Milzen (s. 3.3.1.1), wurden  $2 \times 10^8$  Milzzellen, für die Isolierung der CD4 T-Zellen und  $3 \times 10^8$  Milzzellen für die Isolierung der CD8 T-Zellen (da die Ausbeute von CD8 T-Zellen geringer ist als bei den CD4 T-Zellen), bei 300xg für 10min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 800µl (CD4 T-Zellen) oder 1200µl (CD8 T-Zellen) MACS Puffer resuspendiert (40µl MACS Puffer pro  $10^7$

Gesamtzellen). Anschließend wurden 200µl *CD4 Biotin Antibody Cocktail* bzw. 300µl *CD8 Biotin Antibody Cocktail* hinzugegeben und für 5min bei 4°C inkubiert (10µl *Biotin Antibody Cocktail* pro  $10^7$  Gesamtzellen). Es wurden 600µl (CD4 T-Zellen) oder 900µl (CD8 T-Zellen) MACS-Puffer hinzu pipettiert (30µl MACS-Puffer pro  $10^7$  Gesamtzellen). Anschließend wurden 400µl (CD4 T-Zellen) oder 600µl (CD8 T-Zellen) anti-Biotin *Microbeads* hinzugegeben (20µl anti-Biotin *Microbeads* pro  $10^7$  Gesamtzellen) und für 10min bei 4°C inkubiert.

Für die Isolierung der CD4 T-Zellen und/oder CD8 T-Zellen wurde je eine MS- oder LS-Säule in den Magneten eingebracht und zum Äquilibrieren mit 500µl oder 3ml MACS Puffer gewaschen. Die markierte Zellsuspension wurde anschließend auf die Säulen überführt und der Durchfluss, CD4- oder CD8 positiven T-Zellen, in separate 15ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Um eine höhere Reinheit zu erzielen, wurde die LS-Säule 3x mit 3ml und die MS-Säule 3x mit 500µl MACS Puffer gewaschen. Es wurde je ein Aliquot für die Zellzahlbestimmung steril entnommen.

### 3.3.3. Negativ-Selektion mittels MagniSort

Das MagniSort-System von Thermo Fischer Scientific, ähnelt der negativ-Selektion mittels MACS, mit dem Unterschied, dass das MagniSort-System eine säulenfreie magnetische Trennplattform für Zellanreicherung darstellt (s. **Abb. 9**). In dieser Arbeit wurde das MagniSort-System genutzt um die CD4- und/oder CD8 T-Zellen anzureichern, welches die Basis für CD4 und/oder CD8 Effektor T-Zellen (*Responder T cells*; Tresp) im Suppressions-Assay darstellte (s. 3.3.4).



**Abb. 9: Prinzip der negativ-Selektion mittels MagniSort.** Im ersten Schritt wurden die unerwünschten Zellen durch einen biotinylierten Antikörpermix mit Streptavidin-beschichteten *Microbeads* gebunden. Die Zellsuspension wurde in ein 4ml Zentrifugenröhrchen gegeben und in einen Magneten überführt, wodurch die unerwünschten Zellen durch den Magneten sequestriert wurden. Die Zielpopulation konnte dadurch in ein 50ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen werden. Diese Abbildung wurde aus der MagniSort-Produktbeschreibung von Thermo Fischer Scientific entnommen und mit der Software BioRender modifiziert.

### Material:

- MagniSort Magneten
- CD8 bzw. CD4 *mouse T-cell enrichment kit*
- MagniSort Puffer: (s. 2.5.2)
- DPBS
- Zentrifugenröhrchen (4ml, 50ml)
- Vortexer

### Durchführung:

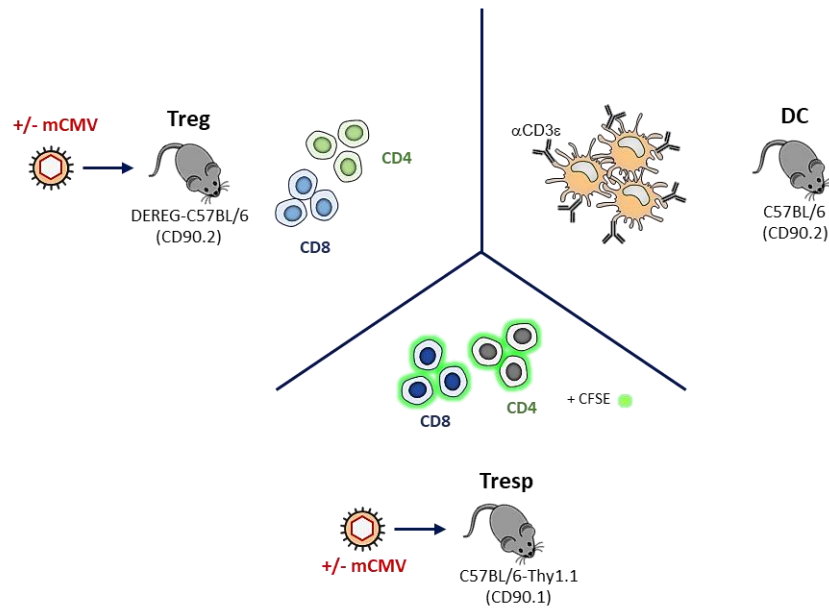
Nach Zellzahlbestimmung der gepoolten Milzen (s. 3.3.1.1) wurden  $2 \times 10^8$  Milzzellen für CD4 T-Zellen und  $4 \times 10^8$  Milzzellen für CD8 T-Zellen in frische 4ml Zentrifugenröhrchen pipettiert (da die Ausbeute von CD8 T-Zellen geringer ist als von den CD4 T-Zellen). Es war darauf zu achten, dass pro Magnet nur  $2 \times 10^8$  Zellen markiert werden können. Dementsprechend mussten die CD8 T-Zellen auf zwei 4ml Röhrchen mit je  $2 \times 10^8$  Zellen aufgeteilt werden. Die Zellen wurden dann bei 300xg für 10min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Zellpellet in je 2000µl MagniSort Puffer resuspendiert (100µl MagniSort Puffer pro  $10^7$  Gesamtzellen). Anschließend wurden 400µl *MagniSort Enrichment Antibody-Cocktail* dazu gegeben, 5x *pulse* gevortext und für 10min bei Raumtemperatur inkubiert (20µl *MagniSort Enrichment Antibody-Cocktail* pro  $10^7$  Gesamtzellen). Die 4ml Röhrchen wurden mit je 4ml MagniSort Puffer aufgefüllt und bei 300xg für 5min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt, das Zellpellet in das Ausgangsvolumen von 2000µl MagniSort Puffer aufgenommen und eine Einzelsuspension hergestellt. Danach wurden 400µl *MagniSort Negative Selection Beads* dazu gegeben, 5x *pulse* gevortext und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert (20µl *MagniSort Negative Selection Beads* pro  $10^7$  Gesamtzellen). Sollte das Gesamtvolumen der Röhrchen nicht 2,5ml betragen, musste mit MagniSort Puffer aufgefüllt werden. Die Einzelsuspensionen wurden mit einer 1000µl Pipette nochmals resuspendiert – 3x auf und ab pipettieren (es darf nicht gevortext werden). Anschließend wurden die 4ml Zentrifugenröhrchen in den Magneten eingeführt und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Magnet wurde vorsichtig in gleichmäßiger Bewegung mit dem 4ml Röhrchen angehoben und der Überstand in ein frisches 50ml Zentrifugenröhrchen abgekippt. Es war sehr wichtig darauf zu achten, dass der letzte Tropfen im 4ml Röhrchen des Magneten nicht abgetropft wird, um mögliche Unreinheiten zu verhindern. Das 4ml Röhrchen wurde dann aus dem Magneten entfernt und auf 2,5ml mit MagniSort Puffer aufgefüllt. Dabei wurde die Zellsuspension 3x mit einer 1000µl Pipette resuspendiert, (unter gar keinen Umständen vortexen) das Röhrchen wieder in den Magneten eingeführt und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Magnet wurde dann wieder angehoben und den Durchfluss in dasselbe 50ml Röhrchen gesammelt. Das ganze Prozedere

wurde ein weiteres Mal wiederholt, sodass insgesamt 3 Durchläufe in einem 50ml Röhrchen gesammelt wurden. Anschließend wurde ein Zellaliquot steril entnommen und die Zellzahl mittels Trypanblau bestimmt.

### 3.3.4. In *ex-vivo* Suppressions-Assay

Die ersten *in vitro* Suppression-Assays zur Messung der suppressiven Aktivität von Treg wurden von (Takahashi et al. 1998) und (Thornton & Shevach 1998) beschrieben. Über die Jahre entwickelte sich dieser Assay zur Standardmethode, um die Fähigkeit von Treg zu messen, welcher die T-Zellproliferation von Tresp unterdrückt. Dafür werden die Tresp polyklonal stimuliert und mit verschiedenen Treg Konzentrationen kokultiviert.

In dieser Arbeit wurden die Tresp mit  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$  beladenen DC stimuliert. Um die Proliferation der Tresp messen zu können, wurden die Tresp mit 5,6-Carboxyfluoreszein-Diacetat-Succinimidylester (CFDEA-SE) markiert. Dieser Farbstoff wird generell für den Nachweis von Zellproliferation verwendet (Quah et al. 2007). Innerhalb der Zellen wandelt sich das CFDEA-SE zu Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) um. Das CFDEA-SE kann ungestört in die Zellen diffundieren und kovalent an Proteine binden. Teilt sich eine CFSE-markierte Zelle, gehen jeweils die Hälfte aller markierten Proteine auf die Tochtergeneration über, was zu einer Abnahme der Farbstoffintensität führt (Parish 1999). Dementsprechend kann die Zellteilung dadurch gemessen werden, dass sich die daraus resultierende Intensität der Fluoreszenz von CFSE halbiert (Quah et al. 2007). In dieser Arbeit basiert der Suppressions-Assay auf drei Komponenten: Tresp, Treg und DC (s. **Abb. 10**). Die DREG-C57BL/6 (CD90.2) Mäuse wurden für die Isolierung der Treg und der kongene Mausstamm C56BL/6-Thy1.1 (CD90.1) für die Isolierung der Tresp verwendet. Die Proliferation der Tresp wurde durchflusszytometrisch (Beckman Coulter FC-500) gemessen.



**Abb. 10: Prinzip des Suppression-Assays.** Der Assay bestand aus 3 Hauptkomponenten: Treg, Tresp und DC. CD8 und CD4 Tresp wurden aus den Milzen von naiven oder akut infizierten C57BL/6-Thy1.1 Mäusen immunomagnetisch isoliert und mit CFSE markiert. Für eine polyklonale Stimulation wurden die Tresp mit  $\alpha$ CD3 $\epsilon$  beladenen DC markiert. Die Treg wurden aus den Milzen von naiven oder akut infizierten DEREK-C57BL/6 Mäusen durch eine Kombination aus immunomagnetische und zytofluorometrische Zellsortierung isoliert und mit den Tresp und DC für 4-5 Tage kokultiviert. Die Proliferation der Tresp wurde zytofluorometrisch bestimmt.

#### Material:

- MagniSort Puffer: (s. 2.5.2)
- MACS Puffer: (s. 2.5.2)
- Kulturmedium: RPMI + 10% (v/v) FCS oder DMEM + 10% (v/v) FCS
- FACS Puffer: (s. 2.5.2)
- CFSE Stocklösung: 10mM vor Gebrauch 1:2000 mit DPBS verdünnen (Endkonzentration: 5 $\mu$ M)
- GM-CSF (20ng/ml)
- DPBS
- Steriles Sezierbesteck
- Petrischalen (6cm, 10cm)
- Zell-Nylonsiebe (100 $\mu$ m, 40 $\mu$ m)
- Sterile Metallsiebe
- Einmalspritzen (2ml)
- Zentrifugenröhrchen (4ml, 15ml, 50ml)
- CD4 und CD8 *T-cell isolation kit* (Miltenyi Biotec)
- CD4 und CD8 *T-cell enrichment kit* (MagniSort)
- MagniSort Magneten
- Separationssäulen (MS *Columns*, LS *Columns*)
- 96-Well- U-Boden Platten
- Vortexer
- FACS-Röhrchen
- FACS Antikörper (s. 2.8.1.1.)

### Durchführung:

#### **1. Isolierung der Treg**

Eine Woche nach einer mCMV-Infektion oder aus naiven DREG-C57BL/6 oder C57BL/6 Mäusen, wurden die CD4 und/oder CD8 Treg aus einem Pool von Gesamtmilzen isoliert (s. 3.3.1.1). Dabei wurden jeweils die CD4 und CD8 T-Zellen mittels immunomagnetischer negativ-Selektion MagniSort (s. 3.3.3) angereichert, gefolgt von einer zytofluorometrischen Zellsortierung (s. 3.4) von CD4 Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>) und/oder von CD8 Treg Subpopulationen (CD8 Sub I: CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>), (CD8 Treg Sub II: CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>), (CD8 Treg Sub III: CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>-</sup>PD-1<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>), (CD8 Treg Sub IV: CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup>CD127<sup>-</sup>), (CD8 Treg Sub V: CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>) und (CD8 Treg Sub I+IV: CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+/-</sup>CD27<sup>+</sup>) (s. 3.4). Die Zellzahl der Treg wurden je nach Titration (s. **Tab. 2**) entsprechend eingestellt.

#### **2. Isolierung der Tresp**

Die Tresp wurden eine Woche nach mCMV-Infektion oder aus naiven C57BL/6-Thy1.1 (CD90.1) Mäusen aus einem Pool von Gesamtmilzen isoliert (s. 3.3.1.1). Dabei wurden jeweils die CD4 und CD8 T-Zellen mittels immunomagnetischer negativ-Selektion durch MagniSort (s. 3.3.3) isoliert, gefolgt von einer immunomagnetischer negativ-Selektion MACS (s. 3.3.2.2) zum Erhalt der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (CD4 Tresp) sowie CD8<sup>+</sup>CD122<sup>-</sup> (CD8 Tresp).

#### **3. CFSE-Markierung Tresp**

Für die CFSE-Markierung wurden die Zentrifugenröhrchen der CD4 und CD8 Tresp mit DPBS aufgefüllt und bei 360xg für 7min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und die Pellets in DPBS resuspendiert – die Zellen wurden dabei auf eine Zellzahl von 1x10<sup>7</sup>/ml eingestellt. Das CFSE wurde in einer Konzentration von 5µM mit einer Verdünnung von 1:10 mit DPBS, zu den Tresp pipettiert. Nach einer exakt 7-minütigen Inkubation bei 37°C wurde der Markierungsvorgang durch die Zugabe von dem 10-fachem Volumen an Kulturmedium gestoppt und sofort auf Eis für 5min inkubiert. Für eine bessere zytofluorometrische Abtrennung der Tresp Populationen wurden die Zellen anschließend gewaschen. Dabei wurden die Zellen je 3x bei 360xg für 7min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde dabei stets abgekippt, die Zellepellets in Kulturmedium aufgenommen und die Röhrchen vor einer weiteren Zentrifugation mit Medium aufgefüllt.

#### **4. *Einstellung der DC***

Die DC wurden zwei Tage vor dem Suppression-Assay in einem 15ml Zentrifugenröhrchen mit vorgelegtem FCS aufgetaut, mit Kulturmedium aufgefüllt und bei 360xg für 7min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Zellpellet in 10ml Kulturmedium mit zugesetztem GM-CSF (Konzentration: 0,1mg / ml) resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine 10cm Petrischale gegeben und für 2 Tage bei 37°C inkubiert. Am Tag des Suppression-Assays, wurde die Zellsuspension aus der Petrischale in ein frisches 50ml Röhrchen pipettiert, mit Kulturmedium aufgefüllt und bei 360xg für 7min bei 4°C abzentrifugiert. Die DC wurden noch zweimal gewaschen, um das GM-CSF zu reduzieren. Die Zellzahl wurde anschließend ermittelt und die DC eingestellt (s. **Tab. 2**). Das  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$  wurde mit Kulturmedium angesetzt (Konzentration: 4 $\mu$ g / ml).

#### **5. *Kokultur der 3 Komponenten***

Es wurden 96-Well U-Boden Platten vorbereitet, meist zwei Platten für die CD4 Tresp und zwei Platten für die CD8 Tresp. Es wurden zuerst die DC in die Platte pipettiert, anschließend das  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$ , welches dann zusammen mit den DC 15min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Danach wurden jeweils die Tresp, Treg und schließlich das Medium dazu pipettiert (s. **Tab. 2**). Es war darauf zu achten, dass die Tresp Zellzahl stets konstant blieb und das Gesamtvolumen pro Well 200 $\mu$ l betrug. Alles wurde, wenn möglich, in Quadruplikaten durchgeführt. Es gab immer 5 Negativkontrollen sowie 4 Positivkontrollen pro Platte. Nach 4-5 Tagen Kokultivierung der Treg, Tresp und DC, wurde die Proliferation von den CD4 und/oder CD8 Tresp zytofluorometrisch gemessen.

**Tab. 2: Titrationsschema des Suppression-Assays.** Der Suppression-Assay bestand aus folgenden Komponenten: Tresp; DC; Treg;  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$  und Medium. Jede 96-Well U-Boden Platte beinhaltete Negativkontrollen [Tresp + DC], Positivkontrollen [Tresp + DC +  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$ ], Treg Kontrollen [Treg + DC +  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$ ] sowie Tresp:Treg Titrationen [1:1; 1:0,5; 1:0,2; 1:0,1]. Das Gesamtvolumen jedes Well betrug 200 $\mu$ l.

	Tresp [1x10 <sup>6</sup> / ml]	DC [6x10 <sup>4</sup> /ml]	Treg [1x10 <sup>6</sup> /ml]	$\alpha$ -CD3 $\epsilon$ [4 $\mu$ g/ml]	Medium
Negativkontrolle	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	-	-	100 $\mu$ l
Positivkontrolle	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	-	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Treg Kontrolle	-	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Tresp : Treg (1 : 1)	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	-
Tresp : Treg (1 : 0,5)	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	25 $\mu$ l	50 $\mu$ l	25 $\mu$ l
Tresp : Treg (1 : 0,2)	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	10 $\mu$ l	50 $\mu$ l	40 $\mu$ l
Tresp : Treg (1 : 0,1)	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	5 $\mu$ l	50 $\mu$ l	45 $\mu$ l

### 3.3.5. Nachweis der Zytokinsekretion

Um nachzuweisen, welche Mechanismen für den suppressiven Effekt der Treg verantwortlich sind, wurden anti- und pro-inflammatorische Zytokine der Tresp und Treg gemessen. Dafür wurden die Überstände aus den Suppression-Assay Kokulturen (s. 3.3.4) am zweiten, vierten und fünften Tag in jeweils frische 96Well-Platten überführt und direkt bei -80°C gelagert. Für den Nachweis der Zytokinsekretion wurde der *LegendPlex-Assay* angewandt (s. 2.6). Dieser Assay basiert auf dem gleichen Prinzip wie der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) und verwendet fluoreszenzkodierte *Mikrobeads* mit Erfassungsantikörpern (*capture beads*), welche kovalent an deren Oberflächen binden (Lehmann et al. 2017). Es wird zwischen zwei *Bead*-Populationen unterschieden. Diese weisen nicht nur unterschiedliche Größen auf, sondern auch unterschiedliche APC Fluoreszenzwerte, sodass die *Bead*-Populationen deutlich voneinander unterschieden werden können. Jeder dieser *Beads* ist mit einem spezifischen biotinylierten Antikörper auf der Oberfläche konjugiert und fungiert als *capture bead*. Anschließend wird Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) zugesetzt, welches an die biotinylierten Detektionsantikörper bindet und fluoreszierende Signale mit Intensitäten im Verhältnis zur Menge der gebundenen Antikörper abgibt. Für jede *Bead* Population wird die PE-Signalfuoreszenzintensität mit einem Durchflusszytometer quantifiziert. Die Konzentration eines bestimmten Zytokins wird anhand einer bekannten Standardkurve (durch vorgegebene Target-Standardkonzentrationen der Firma BioLegend) mit der Datenanalysesoftware

LEGENDplex bestimmt. Es wurden folgende Zytokine getestet: IL-10; IFN $\gamma$ ; IL-34; IL-2, TGF- $\beta$ 1. Dabei haben die Zytokine IL-10; IFN $\gamma$ ; IL-2 und TGF $\beta$ -1 eine Target-Standardkonzentration von 10.000pg/ml und IL-34 von 50.000pg/ml (Die Target-Standardkonzentrationen sind von der Firma BioLegend vorgegeben).

### Material:

- Suppression-Assay Überstände (4°C)
- LEGENDplex Kit
- Orbitalschüttler
- Zentrifuge
- Eppendorfgefäße (0,5ml; 1,5ml)
- FACS-Röhrchen
- FACS Puffer (s. 2.5.2)
- DPBS

### Durchführung:

#### **1. Vorbereitung der Reagenzien:**

Die *custom pre-mixed capture beads* wurden für 1min bei Raumtemperatur gevortext. Vor Gebrauch der *Beads* wurde dies für 30sek wiederholt. Um den *wash buffer* (20x PBS mit 1% Tween-20), welcher in dem Kit enthalten ist anzusetzen, wurde eine Lösung mit 273,5ml destilliertem Wasser und 12,5ml 20x *wash buffer* hergestellt.

#### **2. Vorbereitungen der Standards:**

Der lyophilisierte *mouse custom panel standard cocktail* wurde mit 250 $\mu$ l *assay buffer* gelöst, was die höchste Standardkonzentration C7 darstellt. Anschließend wurden 6x 1,5ml Eppendorfgefäße wie folgt beschriftet: C6; C5; C4; C3; C2; C1. In jedes Eppendorfgefäß wurden 37,5 $\mu$ l *assay buffer* vorgelegt. Danach wurden 12,5 $\mu$ l aus C7 direkt in die 96-Well-Platte als Duplikate pipettiert. Anschließend wurde der Standard mit je einer 1:4 Verdünnung titriert (s. **Tab. 3**). Für den Standard C0, wurden 50 $\mu$ l *assay buffer* direkt in die 96Well Platte in Duplikaten pipettiert. Der verbliebene C7 Standard wurde in 4x 0,5ml Eppendorfgefäße à 40 $\mu$ l aliquotiert und bei -80°C gelagert. Allerdings war hier zu beachten, dass nach Rekonstitution des Standards, dieser innerhalb eines Monats verwendet werden muss und nur einmal aufgetaut werden darf.

**Tab. 3: Titration des Standards des LegendPlex-Assays.** Der Standard wurde mit einer stetigen 1:4 Verdünnung mit dem *assay buffer* (C7-C0) titriert. Dafür wurden Eppendorfgefäße beschriftet (C6-C1) und mit je 37,5µl *assay buffer* vorgelegt. Anschließend wurde aus dem aufgelösten Lyophilisat *mouse custom panel standard cocktail* (C7) 12,5µl in das C6 Eppendorfgefäß pipettiert. Nach einem Spitzenwechsel wurde die Suspension in C6 gemischt und 12,5µl aus C6 in C5 pipettiert. Dieses Prozedere wurde bis zum Eppendorfgefäß C1 weitergeführt. Die Target-Standardkonzentration der einzelnen Zytokine muss dabei für spätere Analysen berücksichtigt werden.

Standard ID	<i>assay buffer</i> [µl]	Titration [µl]	Verdünnung	Konzentration für IL-10; IFN $\gamma$ ; IL-2; TGF- $\beta$ 1 [pg/ml]	Konzentration für IL-34 [pg/ml]
C7	-	-	-	10,000	50,000
C6	37,5	12,5 von C7	1:4	2500	12,500
C5	37,5	12,5 von C6	1:16	625	3125
C4	37,5	12,5 von C5	1:64	156,3	781,3
C3	37,5	12,5 von C4	1:256	39,1	195,3
C2	37,5	12,5 von C3	1:1024	9,8	48,8
C1	37,5	12,5 von C2	1:4096	2,4	12,2
C0	50	-	-	0	0

### 3. Versuchsablauf:

Je 12,5µl der Standards (C6-C1) wurde auf die 96-Well Platte in Duplikaten pipettiert. Beginnend mit C1 bis C6. Anschließend wurden 12,5µl von den Zellkulturüberständen in die 96-Well Platte mit ständigem Spitzenwechsel nach jeder Probe überführt. Danach wurden je 12,5µl der *custom pre-mixed capture beads* auf den Standard sowie auf die Zellkulturüberstände pipettiert. Die 96-Well-Platten wurden mit einer Versiegelungsfolie (im Kit enthalten) und Alufolie verschlossen und auf dem Orbitalschüttler ü.N. bei 250rpm bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Orbitalschüttler mit den Platten bei Raumtemperatur gelagert. Die Folien wurden entfernt, je 200µl *wash buffer* pro Well pipettiert und bei 900xg für 5min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der *wash buffer* wurde in ein Waschbecken abgekippt und die Platten auf Tüchern getrocknet. Es war wichtig darauf zu achten, dass nicht nachgeklopft wurde. Die pelletierten *Beads* wurden

durch das Klopfen mit einem Stift am Rand der Platten gelöst. Die Wells wurden nochmals mit dem *wash buffer* gewaschen, abzentrifugiert und die pelletierten *Beads* gelöst. Anschließend wurden 12,5µl *custom mouse plex detection antibody* pro Well pipettiert – auch auf den Standard – die Platten mit der Versieglungs- sowie Aluminiumfolie verschlossen und auf dem Orbitalschüttler auf 250rpm für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden sofort 12,5µl SA-PE pro Well pipettiert, die Platten wieder mit den Folien verschlossen und auf dem Orbitalschüttler auf 250rpm für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Platten mit 200µl *wash buffer* pro Well gewaschen, bei 900xg für 5min bei Raumtemperatur abzentrifugiert, in ein Waschbecken abgekippt und die Pellets gelöst. Der letzte Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt und anschließend 150µl *wash buffer* pro Well pipettiert. Der Durchflusszytometer wurde vor Datenerfassung mit FACS-*Beads* eingerichtet (enthalten im Kit). Es wurden 100µl *wash buffer* pro FACS-Röhrchen vorgelegt und die *Beads* pro Well (aus den 96-Well Platten) nach mehrmaligem Resuspendieren in das entsprechende Röhrchen pipettiert. Die Standards (C0-C7) wurden zuerst gemessen und danach die Proben.

### 3.3.6. **Next Generation Sequencing (NGS)**

NGS ist ein Sequenzierverfahren, welches die Sequenzprofilierung von Genomen, Transkriptomen und DNA-Protein-Wechselwirkungen ermöglicht (Slatko et al. 2018). Es ist eine Sequenziermethode die zahlreiche Gene parallel sequenzieren kann. Diese Methode beruht auf der Sanger-Sequenzierung, bei der die Basenabfolge definierter DNA-Moleküle analysiert wird. Zum Vergleich, mit dem NGS Verfahren kann innerhalb eines Tages das gesamte menschliche Genom sequenziert werden, während dies mit der Sanger-Sequenzierung über ein Jahrzehnt dauern würde (Behjati & Tarpey 2013). Das Grundprinzip des NGS basiert auf 4 Schritten: Fragmentation, Adaption, Amplifikation und der Datenanalyse.

In dieser Arbeit wurde das Verfahren des NGS benutzt, um eine detaillierte phänotypische Charakterisierung der CD8 Treg zu erhalten. Es wurde dabei eine Genom-Datenbank mit folgenden CD8 Treg Subpopulationen generiert:

CD8 Treg Subpopulation I (CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>)

CD8 Treg Subpopulation II (CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>)

CD8 Treg Subpopulation III (CD8<sup>+</sup>CD122<sup>-</sup>PD-1<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>)

### Material:

- MagniSort Puffer: (s. 2.5.2)
- MACS Puffer: (s. 2.5.2)
- DPBS
- Steriles Sezierbesteck
- Petrischalen (6cm)
- Zell-Nylonsiebe (100µm, 40µm)
- Sterile Metallsiebe
- Einmalspritzen (2ml)
- Zentrifugenröhrchen (4ml,15ml, 50ml)
- CD8 *mouse T-cell enrichment kit* (MagniSort)
- MagniSort Magneten
- Vortexer
- Eppendorfggefäße *LoBind tubes* (1,5ml)

### Durchführung:

Eine Woche nach einer mCMV-Infektion oder aus naiven C57BL/6 Mäusen wurde die Zellzahl aus einem Pool von Gesamtmilzen bestimmt (s. 3.3.1.1). Anschließend wurden mittels immunomagnetischer negativ-Selektion MagniSort (s. 3.3.3) die CD8 T-Zellen isoliert, gefolgt von einer zytofluorometrischen Zellsortierung der verschiedenen CD8 Treg Subpopulationen (s. 3.4.). Nach Erhalt der Zellpopulationen wurden diese bei 311xg für 20min bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig dekantiert und das Zellpellet in DPBS resuspendiert. Die Zellzahl der jeweiligen Gruppen wurde steril bestimmt, die Zellen in 1,5ml *LoBind* Eppendorfggefäße überführt und bei 420xg für 7min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Dabei war darauf zu achten, dass jede Probe mindestens  $1 \times 10^5$  Zellen enthielt. Es wurde vorsichtig der Überstand abpipettiert, sodass am Ende nur noch das Pellet in dem Eppendorfggefäß zurückblieb (*dry pellet*). Dieses wurde dann zügig bei -80°C eingefroren und für den Transport auf Trockeneis gelagert. Die Sequenzierung und RNA Datenbankgenerierung wurde von der Translationalen Onkologie (TRON) an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

### Anmerkung:

Für die zytofluorometrische Zellsortierung müssen 4ml Zentrifugenröhrchen benutzt werden, welche 500µl MACS Puffer enthalten. Werden an dieser Stelle 15ml Röhrchen benutzt, verlieren die Proben bei der Datenbank Generierung an Reinheit. Es muss zudem unbedingt MACS Puffer verwendet werden, da dieses Medium kaum Protein enthält und mit DPBS im Anschluss verdünnt wird (jegliche Proteine sorgen für Unreinheiten im NGS Verfahren).

### 3.4. Zytofluorometrische Methoden

Die Zytometrie ist ein Prozess, in welchem physikalische und/oder chemische Eigenschaften einzelner Zellen oder Partikel gemessen werden können. Dabei fließen die Zellen durch eine Messkammer (Flusszelle bzw. flow cell). In dieser Kammer werden die einzelnen Zellen von einem Laser angeregt, welcher für jeden Zelltyp ein charakteristisches Streulicht (light scatter) erzeugt (Shapiro 2003). Durch dieses Streulicht kann eine Aussage über die Anzahl und Verteilung der verschiedenen Zelltypen getroffen werden. Es wird zwischen dem Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) und dem Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) unterschieden. Ersteres ist ein Maß für die Beugung des Lichts und richtet sich nach dem Volumen der Zellen. Das Seitwärtsstreulicht ist ein Maß für die Brechung des Lichts und wird unter anderem von der Zellgröße und Struktur beeinflusst (Shapiro 2003). Darüber hinaus, kann ein Durchflusszytometer Fluoreszenzlicht messen, indem bestimmte Oberflächenantigene der Zellen mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern gebunden werden (Shapiro 2003). Die Fluoreszenzintensität ist proportional zu den gebundenen Fluorochromen, welche ein definiertes Absorptions- sowie Emissionsspektrum besitzen und bestimmte Eigenschaften von Zellen/Zellpopulationen auf Einzellebene dokumentieren können (Shapiro 2003). Der Energiebereich des Lichtes, über den eine fluoreszierende Verbindung angeregt werden kann, wird als Absorptionsspektrum bezeichnet, während der Bereich der emittierten Wellenlängen einer fluoreszierenden Verbindung als Emissionsspektrum bezeichnet wird (Shapiro 2003). Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse wird als FACS (*fluorescence activated cell sorting*) bezeichnet. Zudem können gleichzeitig zytofluorometrische Analysen mit unterschiedlichen Fluorochromen durchgeführt werden, wenn die Farbstoffe unterschiedliche Emissionsspektren verfügen (s. **Tab. 4**). Überlappen die Emissionsbereiche von Fluorochromen, muss dies während der Analyse kompensiert werden. Durch die Kompensation werden die überlappenden Spektren voneinander subtrahiert. Es können bestimmte Zelltypen und/oder Subpopulationen identifiziert werden, indem Fluoreszenzfarbstoffe an monoklonalen Antikörpern gebunden sind. In dieser Arbeit wurde mit dem Durchflusszytometer FC-500 von Beckman Coulter gearbeitet, welches vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig unterscheiden kann.

**Tab. 4: Absorptions- und Emissionsmaxima eingesetzter Fluorochrome.** Die aufgeführten Fluoreszenzfarbstoffe unterscheiden oder überlappen sich, welches während einer Messung stets berücksichtigt und im Falle einer Überlappung kompensiert werden muss. Fluoreszierende Verbindungen absorbieren Lichtenergie, was als Fluoreszenz bezeichnet wird. Die Auswahl der Fluorochrome ist von der Anregungsmöglichkeit sowie der jeweiligen Anwendung abhängig.

Fluorochrom	Absorptionsmax. [nm]	Emmissionsmax. [nm]
Fluoreszeinisothioyanat (FITC)	459	519
R-Phycoerythrin (PE)	480; 565	578
Allophycocyanin (APC)	650	660
Phycoerythrin-Cy5 Tandem-Konjugat (PE-Cy5)	496	667
Phycoerythrin-Cy7 Tandem-Konjugat (PE-Cy7)	496	785

Material:

- FACS Röhrchen
- FACS Puffer: (s. 2.5.2)
- MACS Puffer: (s. 2.5.2)
- Sort Puffer: (s. 2.5.2)
- FACS Antikörper (s. 2.8.1)

Durchführung:

**1. Allgemeine zytofluorometrische Analysen**

Es wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in einem FACS-Röhrchen in FACS Puffer aufgenommen, bei 300xg für 5min bei 4°C abzentrifugiert und mit Fc-Block (1µg / 100µl) für 10min bei 4°C inkubiert. Der Fc-Block dient zur Blockierung von unspezifischen Fc-Rezeptor-Bindungen. Anschließend wurden die Antikörper (s. 2.8.1) in der jeweiligen Konzentration als Mix hinzugegeben und 15-20min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1ml FACS Puffer gewaschen (300xg für 5min bei 4°C), in FACS Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert.

**2. Analyse von T-Zellen aus dem Blut**

Um Blutproben (s. 3.3.1.4) zytofluorometrisch zu analysieren, wurde zunächst Fc-Block (1µg / 100µl) in FACS Puffer pro FACS-Röhrchen vorgelegt. Anschließend wurden je 100µl Blut aus den Eppendorfgläsern in die schon vorbereiteten FACS-Röhrchen mit Fc-Block überführt und für 10min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei war darauf zu achten, dass kein Blut am Rand der Röhrchen hing. Für die prozentuale Bestimmung von CD4 und/oder CD8 Treg im Blut, wurden die Antikörper als Mix in FACS Puffer pro FACS-Röhrchen hinzugegeben und für 20min im Dunkeln bei

Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde je 1ml FACS Puffer dazu pipettiert und bei 300xg für 5min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, pro Röhrchen 1ml Lyse-Puffer dazu pipettiert und für ca. 5-10min bei Raumtemperatur inkubiert, bis die Suspension transparent und nicht mehr trüb erschien. Danach wurde pro Röhrchen 2ml FACS Puffer hinzugegeben und bei 300xg für 5min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet vorsichtig gevortext, mit 500µl FACS Puffer resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

### **3. Zytofluorometrische Zellsortierung**

Hierfür wurden die markierten Zellen einer *FACS Core Facility* (TRON) übergeben. Um die CD8 Treg (Sub I-V) zytofluorometrisch zu sortieren, wurden die CD8 T-Zellen mittels immunomagnetischer negativ-Selektion MagniSort (s. 3.3.3) aus den Milzzellen isoliert und mit Antikörpern (s. 2.8.1) zur Identifizierung von CD8 Treg Subpopulationen markiert. Dafür wurden die CD8 T-Zellen bei 360xg für 7min bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet mit 500µl Sort Puffer in 15ml Zentrifugenröhrchen (wichtig!) resuspendiert. Anschließend wurden die Antikörper hinzugegeben und für 15min bei 4°C inkubiert. Die Zentrifugenröhrchen wurden mit Sort Puffer aufgefüllt und bei 360xg für 7min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Zellpellet in das passende Volumen mit Sort Puffer resuspendiert (Einstellen zum Sort auf  $1 \times 10^7$ /ml in Sort Puffer; bspw.  $3 \times 10^7$  Zellen in 3ml Sort Puffer). Es war darauf zu achten, dass die Zentrifugenröhrchen (4ml, 15ml) auf Eis transportiert wurden. Für den Sort von CD4 Treg wurden die CD4 T-Zellen nicht mit Antikörper markiert, da durch die Verwendung des DEREK-C57BL/6 Mausstammes direkt auf CD4<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> Zellen sortiert werden kann. Nach Erhalt der Treg wurden diese stets bei 311xg für 20min bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in dem jeweiligen Puffer resuspendiert, die Zellzahl ermittelt und eingestellt.

### **3.5. Immunhistochemie (IHC)**

Es wurden immunhistologische Methoden angewandt um infizierte Zellen in Lebern nach adoptivem Transfer (s. 3.6.5) und zur Bestimmung der Lokalisation von CD8 Treg aus infizierten Lebern nachzuweisen. Alle Organe wurden in Paraffin eingebettet, da diese im Vergleich zur Kryokonservierung eine bessere Gewebekonservierung gewährleistet. Um spezifische Antigene in Organschnitten in der IHC nachweisen zu können, muss das Gewebe mit einem antigenspezifischen Primärantikörper und einem Peroxidase-gekoppelten oder einem alkalischen-Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert werden. Im Falle einer

Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörpers, kann die Färbung mit Hilfe einer Avidin-Biotin-Peroxidase-Färbung (ABC) nachgewiesen werden. Das Substrat der Färbung ist Diaminobenzidin (DAB; Bildung von braunen Präzipitaten). Die Färbung wird durch den Zusatz von Nickelsulfat noch intensiviert (Bildung von schwarzen Präzipitaten). Im Falle eines alkalische Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörpers, ist das Substrat der Färbung Neufuchsin (Bildung von roten Präzipitaten) (Podlech et al. 2002).

### 3.5.1. Einbetten und Schneiden der Organe

#### Material:

- Leber
- 4%ige Formalinlösung (gepuffert): (s. 2.5.4)
- Isopropanol; Neoclear
- Schüttler
- Paraffin
- Mikrotom
- VE-Wasser

#### Durchführung:

Die Leberstückchen, die immunhistologisch analysiert werden sollten, wurden direkt nach Entnahme in eine 4%-ige (v/v) wässrige Formalinlösung gegeben und ü.N. bei Raumtemperatur auf einen Schüttler fixiert. Am nächsten Tag wurden die Organe für 2h in Leitungswasser gespült und wie folgt entwässert (aufsteigende Alkoholreihe):

Isopropanol 20% (v/v)	45min
Isopropanol 40% (v/v)	45min
Isopropanol 60% (v/v)	45min
Isopropanol 80% (v/v)	45min
Isopropanol 90% (v/v)	45min
Isopropanol 100% (v/v)	3x45min

Nach vollständiger Dehydrierung wurden die Organe für 3h in Neoclear überführt (dabei wurden nach je 1h die Organe in frisches Neoclear überführt) und in Paraffin wie folgt eingebettet:

55°C	1h
55°C	ü.N.
55°C	4h

Die Gewebestücke sind danach bei Raumtemperatur fast unbegrenzt lagerungsfähig. Zur Herstellung von Gewebeschnitten, wurden die eingebetteten Organe einen Tag vorher bei -20°C eingefroren und mit Hilfe des Mikrotoms, mit einer Schnittdicke von 2µm geschnitten. Die

Schnitte wurden unverzüglich im Wasserbad (VE-Wasser; 20°C) aufgefangen und im Warmwasserbad (VE-Wasser; 40°C) gestreckt. Anschließend wurde die Schnitte auf silanisierte Objektträger überführt und für 18h bei 37°C getrocknet.

### 3.5.2. Deparaffinierung, Rehydratisierung und Demaskierung

#### Material:

- Isopropanol
- Schüttler
- Neoclear
- VE-Wasser
- Zentrifugenröhrchen (50ml)
- Silanisierte Objektträger

#### Durchführung:

Vor einer IHC-Färbung muss das verbliebende Paraffin aus den Gewebeschnitten entfernt werden. Dafür wurden die Objektträger mit den Schnitten zuerst mit Neoclear deparaffiniert und anschließend in einer absinkenden Alkoholreihe wie folgt rehydratisiert:

Neoclear 100% (v/v)	3x5min
Isopropanol 100% (v/v)	2x3min
Isopropanol 90% (v/v)	3min
Isopropanol 70% (v/v)	3min
Isopropanol 50% (v/v)	3min
VE-Wasser	2min

Durch den Vorgang der Formalinfixierung sowie der Paraffineinbettung geht oftmals die Immunreaktivität verloren. Durch eine Antigen-Demaskierung (*antigen-retrieval*) kann dies in den Organschnitten wiederhergestellt werden. Dafür wurden die Gewebeschnitte auf den silanisierten Objektträger in ein 50ml Zentrifugenröhrchen mit vorgelegtem Puffer (45ml) gelegt (max. 2 Schnitte pro 50ml Röhrchen) und in einer Mikrowelle für 1-3sek erhitzt. Es war darauf zu achten, dass in der Mitte des Deckels des 50ml Röhrchens, ein kleines Loch war (Explosionsgefahr).

### 3.5.3. Nachweis einer mCMV Infektion – mCMV-IE1

Der Nachweis von mCMV-spezifischen Zellen erfolgt mit einem  $\alpha$ -mCMV-IE1 (Croma 101) Antikörper (Reddehase et al. 1984, Reddehase et al. 1989).

#### Material:

- Isopropanol

- Schüttler
- Neoclear
- VE-Wasser
- Demaskierungslösung (s. 2.5.4)
- Zentrifugenröhrchen (50ml)
- Endogene Peroxidase Blockierung: (s. 2.5.4)
- Feuchtekammer
- Neomount
- Trypsin-Lösung (s. 2.5.4)
- 1% BSA-TBS (w/v) (s. 2.5.4)
- Antikörper und Seren für die Histologie (s. 2.8.3)

### Durchführung:

Die Leberschnitte wurden deparaffiniert und rehydratisiert (s. 3.5.2.). Zur Permeabilisierung der Gewebeschnitte wurden diese in einer Trypsin-Lösung für 18min bei 37°C inkubiert und anschließend mit VE-Wasser gewaschen. Die Schnitte wurden in 10mM Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat-Puffer in 50ml Röhrchen demaskiert und für 45min abgekühlt. Danach wurden die Schnitte für die Inhibition der endogenen Peroxidase für 30min bei Raumtemperatur in Methanol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. Nach zweimaligem Waschen (je 1min) in TBS wurden unspezifische Antikörper-Bindungsstellen durch eine 20-minütige Präinkubation mit 1:10 verdünntem Kaninchen-Normalserum bei Raumtemperatur blockiert. Die Leberschnitte wurden mit dem IE1-spezifischen Antikörper Croma 101 (1:200 verdünnt in 1% (v/v) BSA-TBS) in einer Feuchtekammer über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die nichtgebundenen Antikörper durch zweimaliges Waschen mit TBS (je 1min) entfernt. Im Anschluss wurden die Objektträger mit dem alkalischen-Phosphatase gekoppelten Sekundäntikörper ( $\alpha$ -Maus; 1:300 verdünnt in 1% (v/v) BSA-TBS) für 25min bei Raumtemperatur in einer Feuchtekammer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBS (je 1min) erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit dem nach Angaben des Herstellers angesetzten Avidin-Biotin-Komplex (ABC). Nach dreimaligem Waschen mit TBS (je 10min) wurde die Färbelösung mit dem Substrat hinzugegeben (Fuchsin Substrat System KIT) und für ca. 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Leberschnitte wurden kurz mit Leitungswasser gewaschen und zum Anfärben der Zellkerne nicht-infizierter Zellen für 3-5sek mit Hämatoxylin (1:3 verdünnt in aqua. dest. Wasser) inkubiert. Die Schnitte wurden getrocknet und zur dauerhaften Konservierung in das synthetische Einschlussmittel Neomount eingebettet. Mit Hilfe des Durchlichtmikroskops konnte die Zahl der IE1 positiven Zellen/10mm<sup>2</sup> der Schnitte bestimmt werden. Für weitere Details siehe (Podlech et al. 2002).

### 3.5.4. Nachweis von CD8 Treg

Die Lokalisation der CD8 Treg erfolgte durch Serienschnitte mit je einer Doppelfärbung von  $\alpha$ -Maus CD8 +  $\alpha$ -mCMV-IE1 (Croma 101),  $\alpha$ -Maus PD-1 +  $\alpha$ -mCMV-IE1 (Croma 101) und  $\alpha$ -Maus CD122 +  $\alpha$ -mCMV-IE1 (Croma 101). Die Schnitte wurden unter einem Durchlichtmikroskop analysiert. Die Stellen, an denen sich im Gewebe alle drei Antikörper (CD8, CD122 und PD-1) überlappen, wurden als CD8 Treg definiert.

#### Material:

- Isopropanol
- Schüttler
- Neoclear
- VE-Wasser
- Demaskierungslösung (s. 2.5.4)
- Zentrifugenröhrchen (50ml)
- Endogene Peroxidase Blockierung (s. 2.5.4)
- Feuchtekammer
- Neomount
- Trypsin-Lösung (s. 2.5.4)
- 1% BSA-TBS (w/v) (s. 2.5.4)
- Antikörper und Seren für die Histologie (s. 2.8.3)

#### Durchführung:

Die Leberschnitte wurden deparafiniert und rehydriert (s. 3.5.2.) Zur Permeabilisierung der Gewebeschnitte wurden diese in einer Trypsin-Lösung für 18min bei 37°C inkubiert und anschließend mit VE-Wasser gewaschen. Die Schnitte wurden in einem 50ml Röhrchen mit 10mM Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat-Puffer demaskiert und für 45min abgekühlt. Für die Inhibition der endogenen Peroxidasen wurde die Schnitte anschließend für 30min bei Raumtemperatur in Methanol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. Nach zweimaligem Waschen (je 1min) in TBS wurden mit Hilfe des Avidin/Biotin Kit alle Biotin-Rezeptoren sowie Avidin-Bindungsstellen blockiert, welche nicht spezifisch an Gewebe oder Proteine binden (je 20min bei Raumtemperatur). Anschließend wurden die Schnitte gründlich mit TBS gewaschen und unspezifische Antikörper-Bindungsstellen durch Präinkubation von 20min bei Raumtemperatur, mit 1:10 verdünntem Ziege-Normalserum blockiert. Im nächsten Schritt wurden die Serienschnitte jeweils mit den Primäantikörpern in einer Feuchtekammer ü.N. bei 4°C inkubiert (s. **Tab. 5**). Am nächsten Tag wurden die nichtgebundenen Antikörper durch zweimaliges Waschen mit TBS (je 1min) entfernt. Im Anschluss wurden die einzelnen Serienschnitte mit den Sekundäantikörpern für 25min bei Raumtemperatur in einer Feuchtekammer inkubiert (s. **Tab. 5**). Nach zweimaligem Waschen mit TBS (je 1min) erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit dem nach Angaben des Herstellers

angesetzten ABC. Nach dreimaligem Waschen mit TBS (je 10min) wurde die Färbelösung mit dem Substrat hinzugegeben und die Substratreaktion nach ca. 20min bei Raumtemperatur gestoppt (s. **Tab. 5**). Zum Anfärben der Zellkerne der nicht-infizierten Zellen wurden die Schnitte für 3-5sek mit Hämatoxylin inkubiert. Die Schnitte wurden getrocknet und zur dauerhaften Konservierung in das synthetische Neomount eingebettet.

**Tab. 5: Antikörper Färbungen der Serienschnitte zum Nachweis der CD8 Treg.**

Serienschnitt	Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung	Färbung
1	Croma 101	1:200	$\alpha$ -Maus AP	1:300	Rot
	$\alpha$ -Maus CD8	1:100	$\alpha$ -Ratte Biotin	1:100	Schwarz
2	Croma 101	1:200	$\alpha$ -Maus AP	1:300	Rot
	$\alpha$ -Maus PD-1	1:100	$\alpha$ -Ziege Biotin	1:100	Grün
3	Croma 101	1:200	$\alpha$ -Maus AP	1:300	Rot
	$\alpha$ -Maus CD122	1:50	$\alpha$ -Kaninchen Biotin	1:500	Braun

### 3.6. Tierversuche

#### 3.6.1. Immunsuppression

Wie auch beim Menschen mit der Infektion des hCMV, ist eine Immunsuppression die Voraussetzung für die mCMV-Reaktivierung aus der Latenz (Gardner et al. 1974, Jordan et al. 1977) und für die Infektion der Lunge (Brody & Craighead 1974). Deshalb wurden immunsupprimierte Mäuse mit mCMV infiziert, um die Pathogenese der mCMV-Infektion in Abwesenheit der Immunkontrolle des Wirtes besser zu verstehen. Es wurden C57BL/6 Mäuse mit 7.5Gy, einer subletalen  $\gamma$ -Bestrahlung, in einer Kleintierbestrahlungsanlage bestrahlt (Typ OB 58-BA; Cäsium-Quelle: Cs<sup>137</sup>). Die Dosis wurde monatlich mit Hilfe des Zerfallsgesetzes neu berechnet: Halbwertszeit ( $T_{1/2}=30a$ ); Aktivität zum Zeitpunkt  $T_0$  ( $A_0=0,708Gy/min$ ).

#### 3.6.2. Intraperitoneale Infektion

Für die intraperitoneale Infektion (i.p.) wurde eine Virus-Konzentration des mCMV-WT.Smith Virus (s. 2.10) von  $2 \times 10^5$  PFU / 250 $\mu$ l / Maus verwendet. Für die Injektion wurde die Maus stark fixiert (Trendelenburg Position) damit die inneren Organe nach dorsal rutschen und somit eine Punktion innerer Organe z.B. Blase oder Zäkum vermieden ist. Die Injektion sollte sich im kaudalen Drittel nahe der Medianen (rechte Seite) befinden.

### 3.6.3. Intraplantare Infektion

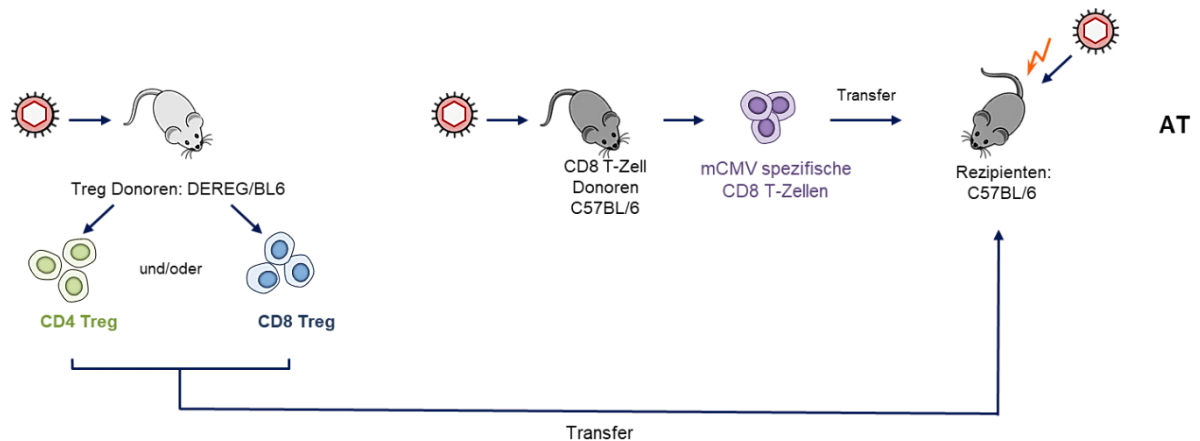
Für die intraplantare Infektion (i.f.) wurde eine Virus-Konzentration des mCMV- $\Delta$ 157 (s. 2.10) von  $2 \times 10^5$  PFU / 50 $\mu$ l / Maus verwendet. Für die Injektion wurde die Maus mit Hilfe eines *restrainer* fixiert, und die Viruslösung in die rechte Hinterpfote injiziert. Circa 6-7 Tage nach einer Infektion ist bei immunsupprimierten Mäusen – jedoch nicht bei immunkompetenten Mäusen – eine Hämorrhagie am Injektionsort zu beobachten. Mit der i.f. Infektion, gelangt die Viruslösung durch den Lymphabfluss direkt zu den Lymphknoten, daher kommt es auch zu lokalen Lymphknotenschwellungen (van den Broeck et al. 2006).

### 3.6.4. Intravenöser Zelltransfer

Für den intravenösen Transfer (i.v.) wurden die Treg und CD8 T-Zellen (s. **Tab. 6**) den Mäusen in einem Gesamtvolumen von 300-600 $\mu$ l injiziert. Dafür wurden die Mäuse mit Hilfe eines *restrainer* fixiert und die jeweiligen Zellen in eine der beiden lateralen Schwanzvenen injiziert. Um die Schwanzvenen besser zugänglich zu machen, wurden die Mäuse vor der Injektion unter einer Infrarotlampe für mindestens 5min gesetzt. Durch den i.v. Transfer gelangen die Zellen direkt in die Blutgefäße und von dort in alle Organe.

### 3.6.5. Adoptiver Transfer

Der adoptive Transfer (AT) ist ein Verfahren, mit dem die Wirkung der CD4 und CD8 Treg auf die Immunkontrolle nach einer mCMV-Infektion *in vivo* getestet werden kann. Um die potenzielle suppressive Wirkung der CD4 und CD8 Treg auf die CD8 T-Zell vermittelte mCMV-spezifische Immunantwort zu testen, wurden CD8 T-Zellen aus mCMV-infizierten AT-Donoren (C57BL/6), in immunsupprimierte AT-Rezipienten (C57BL/6) transferiert und gleichzeitig aus Treg Donoren (DEREG-C57BL/6 oder C57BL/6) die CD4 oder CD8 Treg in dieselben AT-Rezipienten transferiert (s. **Abb. 11**). C57BL/6 Mäuse exprimieren den aktivierenden NK-Rezeptor Ly49H, welcher mit dem m157-Liganden auf der Oberfläche infizierter Zellen interagiert. Um zu verhindern, dass die NK Zellen das mCMV kontrollieren, wurden die Mäuse mit der Mutante mCMV- $\Delta$ m157 infiziert um die Stimulation des Ly49H Rezeptors zu verhindern. Dadurch wird die mCMV Immunkontrolle primär von den CD8 T-Zellen und nicht von den NK Zellen beeinflusst (Reddehase et al. 1985, Krmpotic et al. 2003).



**Abb. 11: Prinzip des ATs.** Eine Woche nach mCMV Infektion der C57BL/6 AT-Donoren, wurden die CD8 T-Zellen isoliert und in AT-Rezipienten (mit 7,5Gy bestrahlt und mit  $2 \times 10^5$  PFU mCMV infiziert) transferiert. Gleichzeitig wurden die Treg aus mCMV-infizierten DERE-C57BL/6 oder C57BL/6 Donoren isoliert und den AT-Rezipienten zusammen mit den CD8 T-Zellen ko-transferiert.

Material:

- MACS Puffer: (s. 2.5.2)
- MagniSort Puffer (s. 2.5.2)
- FACS Puffer (s. 2.5.2)
- DPBS
- Steriles Sezierbesteck
- Zentrifugenröhrchen (4ml, 15ml, 50ml)
- Zell-Nylonsiebe (100 $\mu$ m, 40 $\mu$ m)
- Einmalspritze (2ml)
- Petrischale (6cm)
- Kleintierbestrahlungsanlage
- Virus (mCMV.WT-Smith; mCMV- $\Delta$ m157) (s. 2.10)
- MagniSort Magneten
- MagniSort *CD4 bzw. CD8 T cell enrichment kit*
- MACS Separationssäulen (*LS Columns*)
- CD8a (Ly-2) *Microbeads*

Durchführung:

**1. Tag -7:**

Die Treg- und CD8 T-Zell Donoren wurden mit  $2 \times 10^5$  PFU mCMV.WT-Smith i.p. infiziert (s. 3.6.2).

**2. Tag -1:**

Die AT Rezipienten wurden 6 Tage nach der Infektion mit 7,5Gy bestrahlt (s. 3.6.1), sodass eine Immunsuppression gewährleistet ist.

**3. Tag 0:**

7 Tage nach Infektion der Donoren fand der AT statt. Dazu wurden die Treg- und CD8 T-Zell Donoren mittels zervikaler Dislokation getötet, die Milzen entnommen und jeweils

im Pool präpariert (3.3.1.1). Anschließend wurde aus dem Gesamtmilzpool der Treg Donoren, die CD4 und/oder CD8 T-Zellen mittels negativ-Selektion MagniSort isoliert (s. 3.3.3) und die Zellzahl für eine darauffolgende zytofluorometrische Zellsortierung der CD4 Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>) oder CD8 Treg (CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>) eingestellt (s. 3.3.4). Nach Erhalt der Treg wurden diese bei 311xg für 20min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Pellets jeweils mit DPBS resuspendiert. Die Zellzahlen wurden anschließend ermittelt und eingestellt (s. **Tab. 6**). Aus dem Gesamtmilzpool der CD8 T-Zell Donoren, wurden die CD8 T-Zellen mittels positiv-Selektion MACS isoliert (s. 3.3.2.1) und die Zellzahl stets auf  $1 \times 10^5$  / 300µl / Maus eingestellt (s. **Tab. 6**), da bei dieser Zellzahl die CD8 T-Zellen vor einer mCMV Infektion schützen.

Anschließend wurde den Rezipienten Mäusen die CD8 T-Zellen und/oder CD4 oder CD8 Treg i.v. transferiert (s. 3.6.4) und mit dem Virus mCMV-Δm157 i.f. infiziert (s. 3.6.3). Dabei erhielten mindesten 5 der Rezipienten Mäuse keinen Zelltransfer und dienten als Kontrollmäuse. 10-12 Tage nach dem Transfer, wenn die immunsupprimierten AT Rezipienten welche keine schützenden CD8 T-Zellen erhalten haben, der mCMV-Infektion erlagen, wurden Milz, Lunge und Leber isoliert und in Kryogefäße mit 1ml DMEM + 10% FCS (v/v) bei -80°C eingefroren. Anschließend wurde die Virustiterbestimmung in den Organhomogenaten (s. 3.2.2.2) mittels Plaque-Assay bestimmt. Zusätzlich dazu wurde der Nachweis einer mCMV-Infektion in der Leber immunhistologisch nachgewiesen (s. 3.5.3), dabei wurden die Leberstückchen nach der Entnahme mittels 37%iges Formalin (v/v) fixiert.

**Tab. 6: Gruppen des Zelltransfers eines ATs.** Alle Rezipienten Mäuse wurden mit mCMV- $\Delta$ m157 mit  $2 \times 10^5$  PFU  $50 \mu\text{l}$  / Maus i.f. infiziert. Die CD8 T-Zellen, sowie die CD4 oder CD8 Treg wurden in einem Volumen von je  $300 \mu\text{l}$  / Maus i.v. transferiert. Bei einem Ko-Transfer von CD8 T-Zellen und Treg, wurden die Zellen vor Transfer im Volumen-Verhältnis 1:1 gemischt und  $600 \mu\text{l}$  / Maus i.v. transferiert. Die Zellzahl der CD8 T-Zellen mCMV-infizierter Donoren betrug stets  $1 \times 10^5$  / Maus. Die Zellzahl der Treg variierte zwischen  $1 \times 10^4$  –  $1 \times 10^6$ .

mCMV- $\Delta$ m157 $2 \times 10^5$ pfu pro Maus i.pl.	CD8 T-Zellen mCMV-infizierter Donoren pro Maus	CD4 oder CD8 Treg pro Maus	Zelltransfer pro Maus [ $\mu\text{l}$ ] i.v.
+	-	-	-
+	$1 \times 10^5$	-	300
+	-	$1 \times 10^4$	300
+	-	$5 \times 10^4$	300
+	-	$1 \times 10^5$	300
+	-	$1,5 \times 10^5$	300
+	-	$5 \times 10^5$	300
+	-	$9 \times 10^5$	300
+	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	600
+	$1 \times 10^5$	$5 \times 10^4$	600
+	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^5$	600
+	$1 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	600
+	$1 \times 10^5$	$5 \times 10^5$	600
+	$1 \times 10^5$	$9 \times 10^5$	600

## 4. ERGEBNISSE

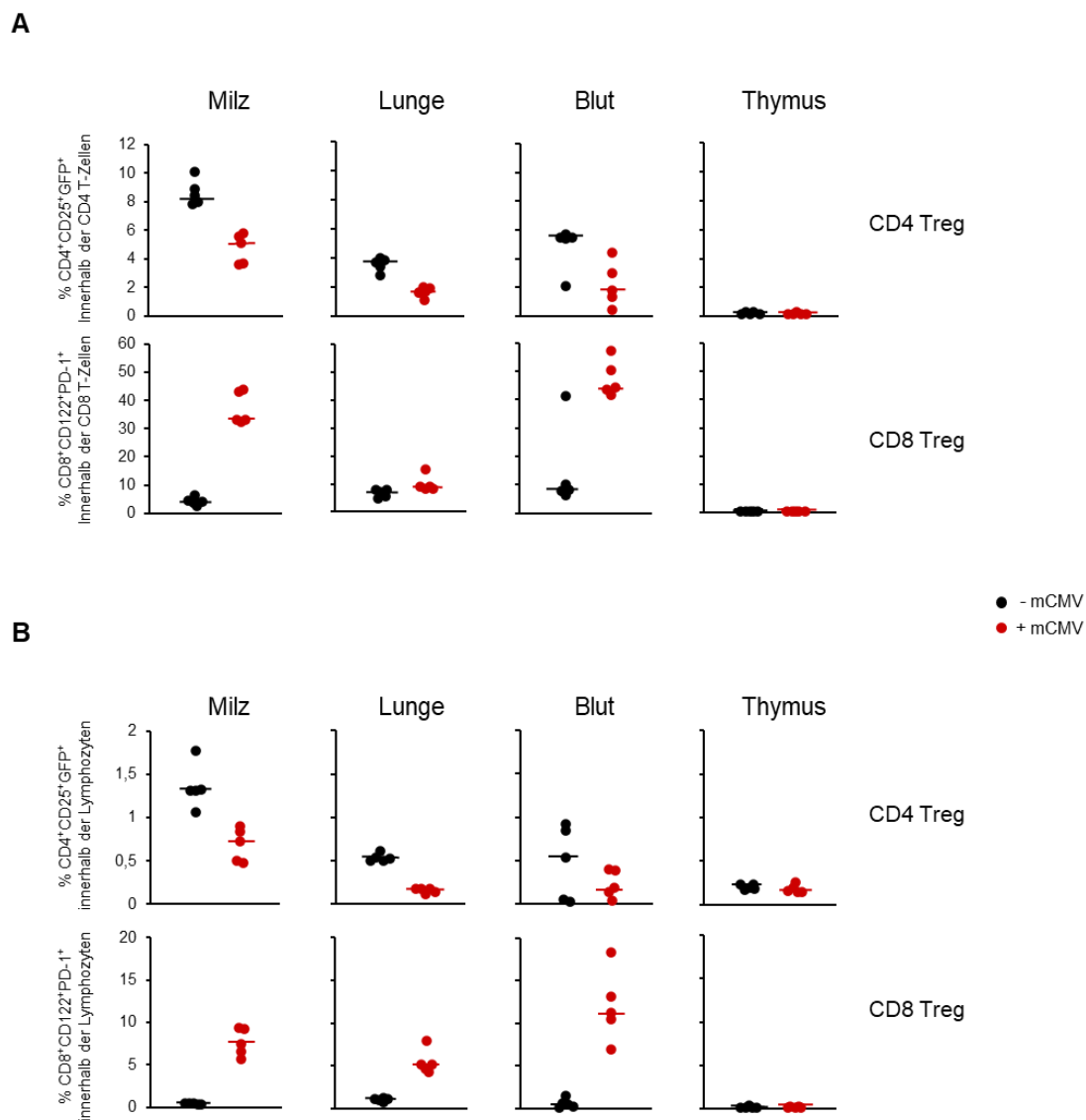
CMV ist von hoher medizinischer Relevanz durch seine hohe Pathogenese in immungeschwächten und neugeborenen Personen. Besonders hoch ist das Risiko einer CMV-Infektion bei Patienten mit AIDS, Organtransplantationen oder Empfängern von allogenen HSCT (Ahmed 2011). Obwohl mittlerweile Therapien zur Behandlung von CMV-Erkrankungen eingesetzt werden, ist die Behandlung mit einer schlechten oralen Bioverfügbarkeit, der Entwicklung einer antiviralen Arzneimittelresistenz, sowie einer antiviralen Arzneimittel verbundenen Zytotoxizitäten assoziiert (Ahmed 2011). Daher besteht nach wie vor ein dringender Bedarf an der Entwicklung von Präparaten zur Behandlung von CMV, um die Morbidität zu reduzieren und die Infektion einzudämmen (Ahmed 2011, Lindenberg et al. 2014). In den letzten Jahren rückte eine weitere Komponente des Immunsystems, die an der Immunkontrolle von CMV-Infektionen beteiligt ist, in den Fokus der experimentellen und klinischen Forschung. Treg beeinträchtigen nachweislich die Immunität gegen CMV-Infektionen, wobei CD4 Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) im Mittelpunkt des Interesses steht (Mayer et al. 2012, Lindenberg et al. 2014, Mayer & Sparwasser 2014, Almanan et al. 2017, Lim et al. 2020). Noch weniger ist über die Bedeutung einer weiteren Population von suppressiven T-Zellen bekannt, den CD8 Treg (Pomié et al. 2008, Avivi et al. 2013, Li et al. 2014b). Studien besagen, dass die angeborene und adaptive Immunität durch CD4 Treg moduliert werden kann, während die Bedeutung und der Phänotyp von CD8 Treg immer noch umstritten ist (Aandahl et al. 2004, Sakaguchi et al. 2007, Schwele et al. 2012). Es ist anerkannt, dass CD8 Treg eine Subpopulation von CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> T-Zellen sind (Rifa'i et al. 2004, Endharti et al. 2005, Lee et al. 2008, Dai et al. 2010). Weitere Marker, die CD8 Treg charakterisieren, scheinen vom Modellsystem sowie von experimentellen Bedingungen abhängig zu sein, wobei PD-1 im Mittelpunkt der Diskussionen steht (Dai et al. 2010, Elizondo et al. 2019, Mishra et al. 2021, Tan et al. 2021). Generell liegen nur wenige Daten vor, ob und inwieweit Treg, insbesondere CD8 Treg, die CD8 T-Zellen nach einer mCMV-Infektion *in vitro* und *in vivo* supprimieren.

Schwerpunkt dieser Arbeit war es das suppressive Potential der Treg, allen voran CD8 Treg, auf die Effektor T-Zellen *in vitro* und *in vivo* zu ermitteln, um immuntherapeutische Strategien zur Behandlung von CMV-infizierten Patienten entwickeln zu können. Des Weiteren sollten im Rahmen dieser Arbeit die suppressiven Mechanismen der Treg untersucht, sowie die Marker der CD8 Treg weiter charakterisiert und deren Einfluss auf Effektor T-Zellen untersucht werden.

#### 4.1. Prozentuale Verteilung der Treg

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die prozentuale Verteilung von CD4 und CD8 Treg in mCMV-infizierten und naiven Mäusen analysiert werden. Dazu wurden die Treg aus jeweils akut infizierten (1 Woche p.i.) und naiven DREG-C57BL/6 Mäusen aus verschiedenen Organen isoliert (s. 3.3.1), mit Antikörpern (CD4 Treg: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>; CD8 Treg: CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>) markiert (s. 2.8.1 und 3.4) und durchflusszytometrisch als Einzeltiermessungen analysiert. Eine repräsentative *Gating*-Strategie der CD4 und CD8 Treg aus mCMV-infizierten Mäusen ist im Anhang (s. **Abb. A1**) dargestellt. Zur Ermittlung der prozentualen Verteilung der Treg wurde je ein Prism-Plot, mit Hilfe des Software-Programms CXP des verwendeten Durchflusszytometers erstellt (s. Anhang **Abb. A2**) und die Ergebnisse als Punktdiagramme dargestellt (s. **Abb. 12**). Es wurde dabei zwischen dem prozentualen Anteil der CD4 Treg innerhalb der CD4 T-Zellen, bzw. der CD8 Treg innerhalb der CD8 T-Zellen (s. **Abb. 12A**) und dem prozentualen Anteil der beiden Treg Populationen unter den Lymphozyten unterschieden. (s. **Abb. 12B**)

Es konnte festgestellt werden, dass der prozentuale Anteil der CD4 Treg sowohl innerhalb der CD4 T-Zellen (s. **Abb. 12A**) als auch innerhalb der Lymphozyten (s. **Abb. 12B**) aus der Milz, Lunge und Blut von mCMV beeinflusst wurde. Der prozentuale Anteil an CD4 Treg sank nach einer mCMV-Infektion. Im Thymus waren weder CD4 Treg noch CD8 Treg aus infizierten und nicht-infizierten Mäusen nachweisbar. Hingegen expandierte der prozentuale Anteil an CD8 Treg aus mCMV-infizierten Mäusen innerhalb der CD8 T-Zellen (s. **Abb. 12A**) im Vergleich zu naiven Mäusen, um das 9-fache in der Milz, [Mittelwert: +mCMV: 37%; -mCMV: 4%] um das 3-fache im Blut [Mittelwert: +mCMV: 48%; -mCMV: 15%] und um das 1,5-fache in der Lunge [Mittelwert: +mCMV: 10%; -mCMV: 7%]. Innerhalb der Lymphozyten (s. **Abb. 12B**) stieg der prozentuale Anteil an CD8 Treg infizierter Mäuse fast um das 16-fache in der Milz, [Mittelwert: +mCMV: 8%; -mCMV: 0,5%] um das 5,5-fache in der Lunge [Mittelwert: +mCMV: 5,5%; -mCMV: 1%] und um 30-fache im Blut [Mittelwert: +mCMV: 12%; -mCMV: 0,4%] im Vergleich zu dem prozentualen Anteil an CD8 Treg aus naiven Mäusen.



**Abb. 12: Prozentuale Verteilung der Treg.** Es wurden aus je 5 DEREK-C57BL/6 Mäusen nach einer mCMV-Infektion (1 Woche p.i.) und aus 5 naiven Mäusen die CD4 und CD8 Treg aus der Milz, Lunge, Thymus und dem Blut isoliert. Die CD4 und CD8 T-Zellen wurden mittels negativ-Selektion MagniSort angereichert, mit Antikörper markiert [CD4+CD25+Foxp3<sup>+</sup>; CD8+CD122+PD-1<sup>+</sup>] und durchflusszytometrisch analysiert. Die Prozentuale Verteilung der Treg wurde als Punktdiagramm dargestellt, dabei stellt jeder Punkt eine Maus dar: schwarz [-mCMV] rot [+mCMV]. Der Median ist als horizontaler Balken dargestellt. Es wurde unterschieden zwischen den prozentualen Anteil an Treg innerhalb der CD4 bzw. CD8 T-Zellen (**A**) und der Lymphozyten (**B**).

Schlussfolgerung:

Eine mCMV-Infektion immunkompetenter Mäuse induziert die Expansion von CD8 Treg und nicht von CD4 Treg.

## 4.2. Suppressives Potential von Treg nach einer mCMV-Infektion

Die bisherigen Daten haben gezeigt, dass sich die prozentuale Verteilung zwischen CD4 und CD8 Treg nach einer mCMV-Infektion unterscheidet. Zahlreiche Studien besagen, dass CD4 Treg nach einer mCMV-Infektion ein suppressives Potential aufweisen (Aandahl et al. 2004, Li et al. 2010, Schwele et al. 2012, Sungur et al. 2013). Im Gegensatz dazu, gibt es über den suppressiven Effekt der CD8 Treg bislang wenige Studien. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit das suppressive Potential von CD4 und CD8 Treg nach einer mCMV-Infektion analysiert.

Dazu wurde ein Suppression-Assay etabliert (s. 3.3.4). Retrospektive Analysen haben gezeigt, dass in folgenden Experimenten anstelle von CD8 Treg ( $CD8^+CD3^+CD122^+PD1^+CD127^-$ ) eine Population mit folgendem Phänotyp getestet wurden:  $CD8^+CD3^+CD122^+PD1^{+/-}CD127^-$  (s. **Tab. 7**). Aufgrund dessen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Phänotyp  $CD8^+CD3^+CD122^+PD1^+CD127^-$  als CD8 Treg Sub I und  $CD8^+CD3^+CD122^+PD1^{+/-}CD127^-$  als CD8 Treg Sub I+IV bezeichnet.

**Tab. 7: CD8 Treg Phänotypen in den Suppression-Assays.**

Experiment (Versuchscode)	Phänotyp CD8 Treg Sub I+IV	Phänotyp CD8 Treg Sub I
Experiment 1 (SH-5)	X	
Experiment 2 (SH-2)	X	
Experiment 3 (SH-4)	X	
Experiment 4 (SH-6)	X	
Experiment 5 (SH-7)	X	
Experiment 6 (SH-8)	X	
Experiment 7 (SH-9)		X

Um das suppressive Potential der Treg nach einer mCMV-Infektion zu testen, wurden die CD4 Tresp ( $CD4^+CD25^-$ ) und CD8 Tresp ( $CD8^+CD122^-$ ) aus einen Gesamtpool von 6 Milzen aus akut infizierten C57BL/6-Thy1.1 Mäusen immunomagnetisch isoliert und mit CFSE markiert. Die Tresp wurden mit  $\alpha CD3\epsilon$  markierten DC polyklonal stimuliert. Die Treg (CD4 Treg:  $GFP^+CD4^+CD25^+$ ; CD8 Treg Sub I+IV:  $CD8^+CD3^+CD122^+PD1^{+/-}CD127^-$ ) wurden aus einem Gesamtpool von 5 Milzen aus akut infizierten DEREK-C57BL/6 Mäusen durch eine Kombination aus immunomagnetische und zytofluorometrischer Zellsortierung isoliert und mit den Tresp und DC für 4-5 Tage kokultiviert. Die Treg wurden dabei in verschiedenen Konzentrationen als Triplikate zu den stetig konstanten Tresp dazugegeben [getestete Tresp:Treg-Verhältnisse; 1:1;

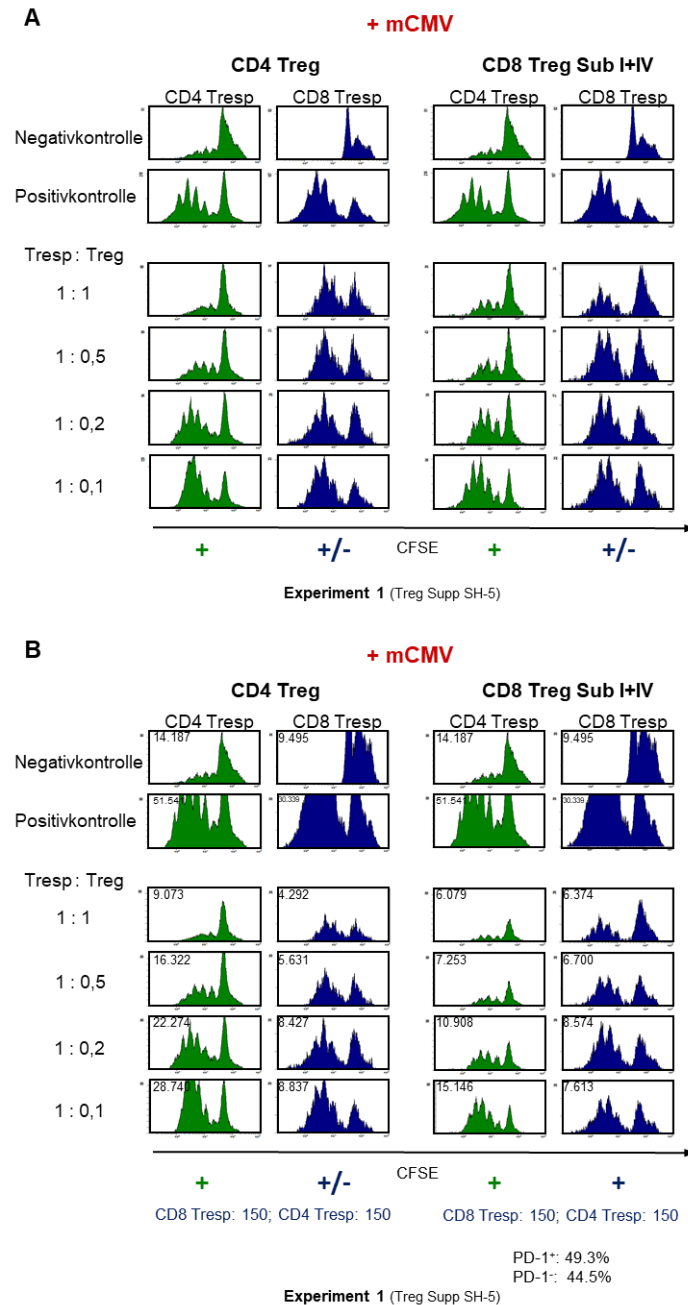
1:0,5; 1:0,2; 1:0,1] (s. **Tab. 2**). Danach wurde die Proliferation der Tresp durchflusszytometrisch analysiert. Eine repräsentative durchflusszytometrische Auswertung der CD8 Treg Sub I+IV (s. **Abb. A3**) und CD4 Treg (s. **Abb. A4**) ist im Anhang. Durch diese Messung konnte die Unterdrückung der Tresp Proliferation durch die Zugabe von Treg analysiert werden (s. **Abb. 13**). Die Ergebnisse wurden sowohl mit Autoskalierung (s. **Abb. 13A**), als auch mit normierter Skalierung (s. **Abb. 13B**) dargestellt.

Wie erwartet, war bei Fehlen des  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$  Antikörpers in der Negativkontrolle, sowohl unter den CD4 als auch unter den CD8 Tresp, keine Proliferation zu erkennen (s. **Abb. 13A**; **Abb. 13B**). Hingegen kam es durch die Zugabe des  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$  Antikörpers in der Positivkontrolle jeweils zur Proliferation der Tresp Zellen (Abnahme der CFSE Intensität führt zu einem nach links verschobenem *Peak* in einem FACS Histogramm). Im Vergleich zur Negativ- und Positivkontrolle, ging aus den CD4 Tresp zu CD4 Treg Titrationen (s. **Abb. 13A**) hervor, dass die CD4 Treg suppressiv auf die CD4 Tresp wirkten; am stärksten bei einer 1:1 Konzentration [CD4 Tresp:CD4 Treg] (ähnliche Peak-Verteilung wie bei der Negativkontrolle). Dieser suppressive Effekt nahm durch geringere CD4 Treg Konzentrationen ab. Unter den CD8 Tresp zu CD4 Treg Titrationen konnte ein weniger starkes suppressives Potential der CD4 Treg, im Vergleich zu den CD4 Tresp, festgestellt werden.

Aus den Titrationen der CD4 Tresp zu CD8 Treg Sub I+IV (s. **Abb. 13A**), konnte beobachtet werden, dass auch die CD8 Treg Sub I+IV suppressiv auf die CD4 Tresp wirkten. Das suppressive Potential der CD8 Treg Sub I+IV nahm, wie auch unter den CD4 Treg, mit geringerer Konzentration an Treg ab. Ähnlich wie bei den CD4 Treg, ist der suppressive Effekt auf die CD8 Tresp nach Zugabe der CD8 Treg Sub I+IV geringer als auf die CD4 Tresp.

Um den suppressiven Effekt der Treg auf die jeweiligen Tresp besser vergleichen zu können, wurde eine normierte Skalierung erstellt (s. **Abb. 13B**). Das suppressive Potential der Treg auf die Tresp wurde verdeutlicht durch die Zunahme an Gesamtzellen bei verringerter Treg Konzentrationen. Als Beispiel: Bei einer 1:1 Titration [CD4 Tresp:CD4 Treg] wurden etwa 9000 Zellen gemessen, während bei einer 1:0,1 Titration [CD4 Tresp:CD4 Treg] ca. 30.000 Zellen erfasst wurden. Die Zellzahl stieg also um das 3-fache durch die Zugabe von nur ein Zehntel an CD4 Treg an. Dieselbe Beobachtung war auch unter den CD8 Treg Sub I+IV zu erkennen. Als Beispiel: Bei einer 1:1 Titration [CD4 Tresp:CD8 Treg Sub I+IV] mit etwa 6000 Zellen und bei einer 1:0,1 Titration [CD4 Tresp:CD8 Treg Sub I+IV] mit ca. 15.000 Zellen. Auch hier konnte ein Anstieg um das 2-fache beobachtet werden, wenn die Zugabe von CD8 Treg Sub I+IV um den Faktor 10 geringer war. Unter den CD8 Tresp ist nach Zugabe der CD4 Treg ebenfalls ein Anstieg, um den Faktor 2 zu erkennen: 1:1 Titration [CD8 Tresp:CD4 Treg] ca. 4000 Zellen und

bei einer 1:0,1 Titration ca. 8000 Zellen. Die Zellzahl der CD8 Tresp nach Zugabe der CD8 Treg Sub I+IV stieg um das 1,5 fache an: 1:1 Titration [CD8 Tresp:CD8 Treg Sub I+IV] ca. 6000 Zellen und nach einer 1:0,1 Titration ca. 7600 Zellen.



**Abb. 13: Suppression-Assay nach mCMV-Infektion.** Die Proliferation der CD4 Tresp [CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>] sind in grün und die der CD8 Tresp [CD8<sup>+</sup>CD122<sup>-</sup>] in blau dargestellt. CD8 Tresp wurden nach 4-tägiger und CD4 Tresp nach 5-tägiger Kokultur durchflusszytometrisch analysiert. Es wurde jeweils eine Negativ- [Tresp + DC] und eine Positivkontrolle [Tresp + DC + α-CD3ε] mitgeführt. Die Treg wurden zu den Tresp in verschiedenen Konzentrationen hinzu titriert [1:1; 1:0,5; 1:0,2; 1:0,1]. In (A) sind die Ergebnisse mittels Autoskalierung, in (B) mittels normierter Skalierung dargestellt (Skalierungseinstellung wurde in hellblau unterhalb der Abbildung geschrieben). Die Zahlen in den Graphiken zeigen die jeweils gemessenen Gesamtzellzahlen aus den Kulturen. Wirken die Treg suppressiv auf die Tresp so wurde dies mit einem „+“ und einem „+/-“ für weniger suppressiv vermerkt. Die Graphiken beinhalten die zusätzliche Information des prozentualen Anteiles von PD-1<sup>+</sup> bzw. PD-1<sup>-</sup> unter den CD8 Treg Sub I+IV.

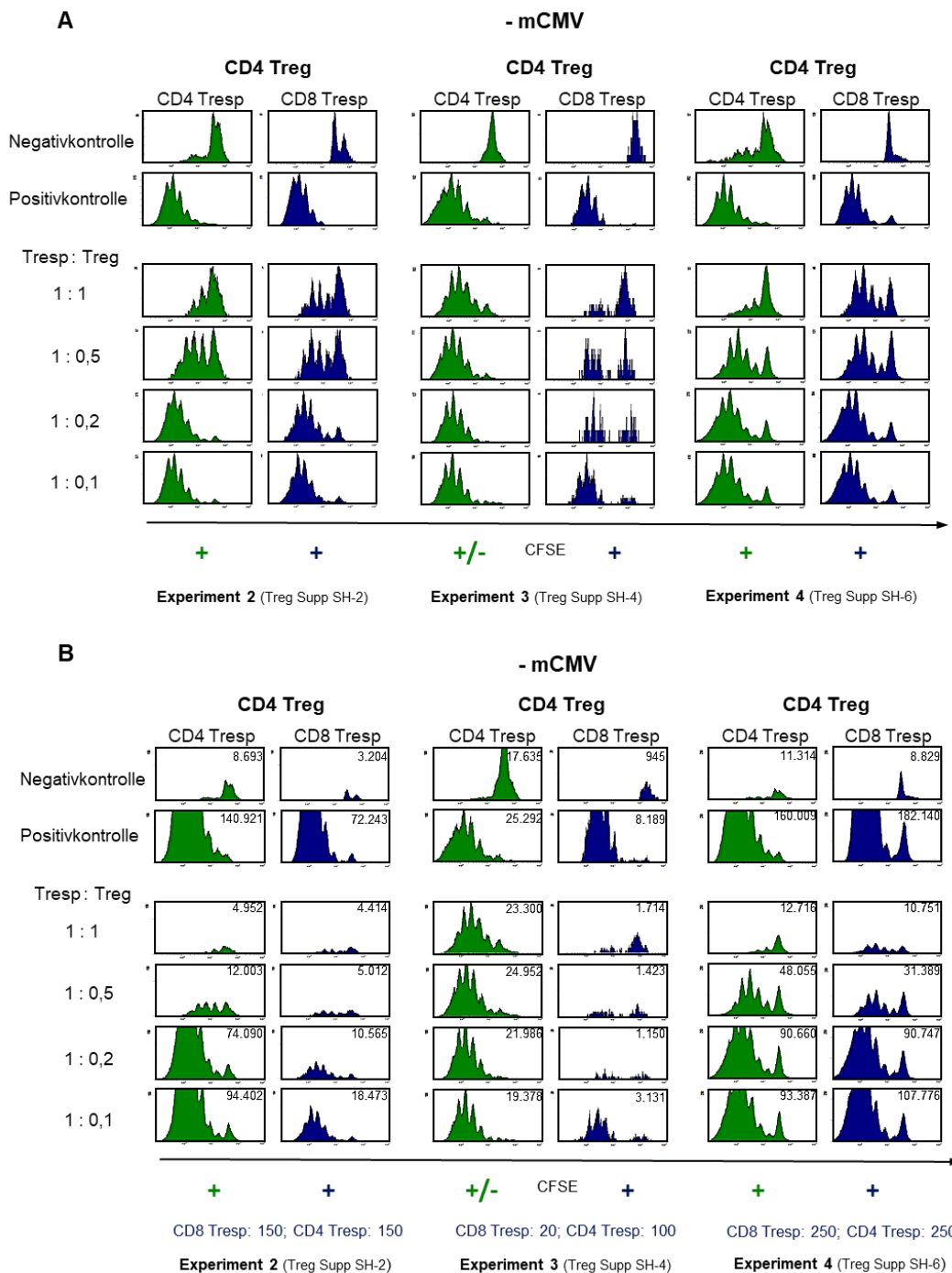
### Schlussfolgerung:

CD8 Treg Sub I+IV aus mCMV-infizierten Mäusen wirken mindestens so suppressiv auf CD4 und CD8 Tresp wie CD4 Treg.

### **4.3. Suppressives Potential von Treg ohne mCMV-Infektion**

Die bisherigen Daten haben gezeigt, dass in einem Suppression-Assay nach einer mCMV-Infektion CD4 und CD8 Treg Sub I+IV suppressiv auf Tresp wirken, wobei der suppressive Effekt stärker auf den CD4 Tresp zu erkennen war. Es stellt sich die Frage, ob die Funktion der Treg durch eine mCMV-Infektion beeinflusst wird und somit auch ohne mCMV-Infektion ein suppressives Potential der Treg nachzuweisen wäre. Um diese Frage beantworten zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit derselbe Suppression-Assay wie in Kapitel 4.2. durchgeführt, mit der Ausnahme, dass Tresp sowie Treg aus den Milzen **naiver** C57BL/6-Thy1.1 bzw. DREG-C57BL/6 Mäuse isoliert wurden. Die Ergebnisse wurden für die CD4 und CD8 Treg separat dargestellt (s. **Abb. 14**, CD4 Treg; s. **Abb. 15**, CD8 Treg). Eine repräsentative *Gating*-Strategie dieser Experimente befindet sich im Anhang (s. **Abb. A5-A12**). Die Unterdrückung der Tresp Proliferation durch CD4 Treg wurde in drei unabhängigen Experimenten dargestellt (Experiment 2-4; s. **Abb. 14**), die Suppression durch CD8 Treg Sub I+IV in insgesamt fünf Experimenten (Experiment 2-6, s. **Abb. 15**) Die Ergebnisse wurden sowohl mit Autoskalierung (**Abb. 14A**; **Abb. 15A**) als auch mit normierter Skalierung (**Abb. 14B**; **Abb. 15B**) dargestellt.

Durch die Autoskalierung der CD4 Treg (**Abb. 14A**) war zu erkennen, dass in allen drei Experimenten CD4 Treg die CD4 Tresp unterdrückten, da bei einer 1:1 Titration [CD4 Tresp:CD4 Treg], die Zellen kaum proliferierten, wohingegen bei einer abnehmenden Konzentration von CD4 Treg eine Proliferation der Zellen zu erkennen war. Es konnte zudem festgestellt werden, dass CD4 Treg ebenfalls auf die CD8 Tresp suppressiv wirkten. Durch die normierte Skalierung (s. **Abb. 14B**) wurde der suppressive Effekt von CD4 Treg noch deutlicher sichtbar. Es konnte bei den drei Experimenten festgestellt werden, dass unter den CD4 Tresp einer 1:1 Konzentration [CD4 Tresp:CD4 Treg] eine Zellzahl zwischen ca. 5.000 – 12.000 erfasst wurde, während diese bei einer 1:0,1 Konzentration auf einer Zellzahl von ca. 94.000 expandierte. Daraus lässt sich folgern, dass die CD4 Treg die CD4 Tresp unterdrückten. Unter den CD8 Tresp sind die Zellzahlen der drei Experimente bei einer 1:1 Konzentration [CD8 Tresp:CD4 Treg] zwar unterschiedlich, jedoch expandierten die Zellzahlen nach Abnahme der CD4 Treg um teilweise das 10-fache (Experiment 4).



**Abb. 14: Testen des suppressiven Potentials der CD4 Treg aus naiven Mäusen.** Aus naiven DEREK-C57BL/6 Mäusen, wurden CD4 Treg aus einem Pool von Milzzellen isoliert. Dabei wurden CD4 T-Zellen durch immunomagenetische negativ-Selektion MagniSort angereichert, gefolgt von einer zytofluorometrischen Zellsortierung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> (CD4 Treg). Die Unterdrückung der Tresp Proliferation wurde in einem Suppression-Assay analysiert. Dabei wurden die CD4 Tresp (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>; grün) und CD8 Tresp (CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>; blau) aus naiven C57BL/6-Thy1.1. Mäusen angereichert, mit CFSE markiert und mit  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$  beladenen DC polyklonal stimuliert. Nach 4-5 Tagen Kokultivierung wurde die Proliferation von Tresp zytofluorometrisch durch das Gating auf CD90.1 und CFSE analysiert. Je eine Messung stellt einen Pool aus Quadruplikate dar. Dargestellt sind eine Negativ- [DC + Tresp] und eine Positivkontrolle [DC+  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$  + Tresp]. Die Treg wurden zu den Tresp in verschiedenen Konzentrationen hinzu titriert [1:1; 1:0,5; 1:0,2; 1:0,1]. In (A) sind die Ergebnisse mittels Autoskalierung, in (B) mittels normierter Skalierung dargestellt (Skalierungseinstellung wurde in hellblau unterhalb der Abbildung geschrieben). Die Zahlen in den Graphiken zeigen die jeweils erfassten Gesamtzellzahlen aus den Kulturen an. Wirken die Treg suppressiv auf die Tresp so wurde dies mit einem „+“ und einem „+/-“ für weniger suppressiv vermerkt.

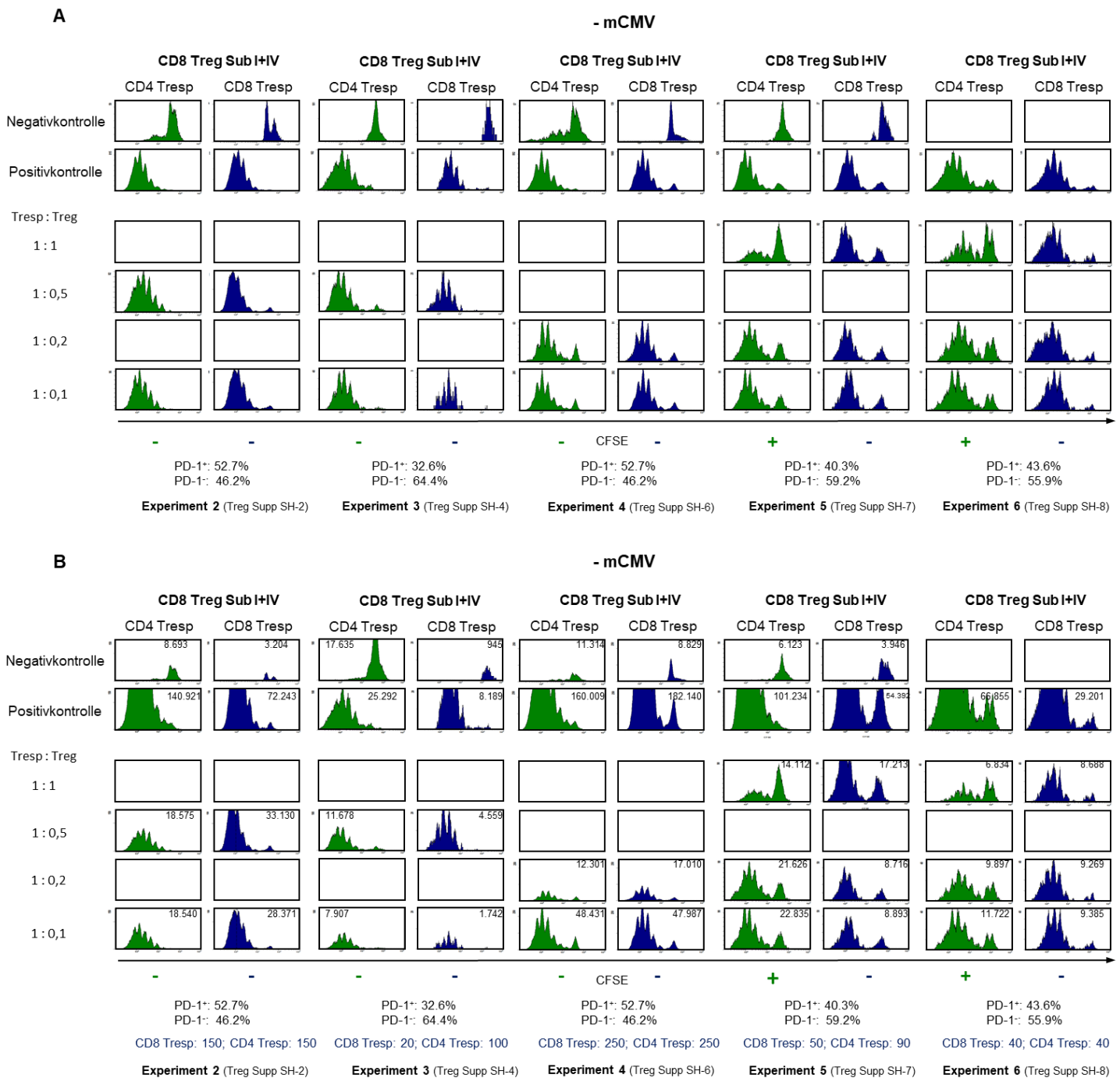
### Schlussfolgerung:

CD4 Treg aus naiven Mäusen wirken suppressiv auf die Proliferation von CD4 und CD8 Tresp. Im Vergleich dazu, konnten CD4 Treg aus mCMV-infizierten Mäusen die CD8 Tresp weniger stark supprimieren als CD4 Treg aus naiven Mäusen. Eine mCMV-Infektion beeinflusst die Funktion der CD4 Treg *in vitro*.

In **Abb. 15** sind fünf verschiedene Experimente gezeigt, in denen das suppressive Potential der CD8 Treg Sub I+IV auf CD4 und CD8 Tresp untersucht wurde. Aufgrund der geringen Ausbeute von CD8 Treg Sub I+IV konnten teilweise nicht alle Titrationsstufen getestet werden und diese auch nur in Duplikaten oder Triplikaten durchgeführt werden. In den ersten drei Experimenten (2, 4, 6) (s. **Abb. 15A**) war zu beobachten, dass aufgrund der zu geringen Konzentration an CD8 Treg Sub I+IV zu sowohl CD4 als auch CD8 Tresp kein suppressiver Effekt festgestellt werden konnte, da die Proliferation der Tresp nicht unterdrückt werden konnte. Erst in den letzten beiden Versuchen (Experiment 5, 6), reichte die Zellzahl an CD8 Treg Sub I+IV aus um eine 1:1 Titration [CD4 Tresp:CD8 Treg Sub I+IV] testen zu können. Es konnte beobachtet werden, dass nur bei einer 1:1 Titration die CD8 Treg Sub I+IV auf die CD4 Tresp suppressiv wirkten, indem die Proliferation von CD4 Tresp – jedoch nicht von CD8 Tresp – unterdrückt werden konnte. Durch eine abnehmende Konzentration von CD8 Treg Sub I+IV konnte wieder eine Proliferation der CD4 Tresp erkannt werden. Durch die normierte Skalierung (s. **Abb. 15B**) war in Experiment 5 zu erkennen, dass auch die Gesamtzellzahl der CD4 Tresp nach Verminderung der CD8 Treg Sub I+IV Konzentrationen um das 1,5-fache anstieg: 1:1 Titration [CD4 Tresp: CD8 Treg Sub I+IV] ca. 14.000 Zellen und bei einer 1:0,1 Titration [CD4 Tresp:CD8 Treg Sub I+IV] ca. 23.000 Zellen. Dieselbe Beobachtung konnte auch in Experiment 6 festgestellt werden: 1:1 Titration [CD4 Tresp: CD8 Treg Sub I+IV] mit ca. 7000 Zellen und bei einer 1:0,1 Konzentration [CD4 Tresp:CD8 Treg Sub I+IV] mit ca. 11.000 Zellen.

Es konnte demnach gezeigt werden, dass die CD8 Treg Sub I+IV auch ohne mCMV-Infektion die CD4 Tresp unterdrückten, allerdings nur bei einer 1:1 Konzentration [CD4Tresp:CD8 Treg Sub I+IV]. Dieser Effekt konnte nicht für die CD8 Tresp gezeigt werden. Im Gegensatz dazu, konnte aus den Daten des Suppression-Assays aus mCMV-infizierten Mäusen beobachtet werden, dass CD8 Treg Sub I+IV sowohl auf CD4 Tresp als auch CD8 Tresp suppressiv wirkten (s. **Abb. 13**).

# Ergebnisse



**Abb. 15: Testen des suppressiven Potentials der CD8 Treg Sub I+IV aus naiven Mäusen.** Aus naiven DREG-C57BL/6 Mäusen, wurden CD8 Treg Sub I+IV aus einem Pool von Milzzellen isoliert. Dabei wurden CD8 T-Zellen durch immunomagenetische negativ-Selektion MagniSort angereichert, gefolgt von einer zytofluorometrischen Zellsortierung von CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>hi</sup>CD127<sup>lo</sup> (CD8 Treg Sub I+IV). Die Unterdrückung der Tresp Proliferation wurde in einem Suppression-Assay analysiert. Dabei wurden die CD4 Tresp (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>; grün) und CD8 Tresp (CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>; blau) aus naiven C57BL/6-Thy1.1. Mäusen angereichert, mit CFSE markiert und mit  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$  beladenen DC polyklonal stimuliert. Nach 4-5 Tagen Kokultivierung wurde die Proliferation von Tresp zytofluorometrisch durch das Gating auf CD90.1 und CFSE analysiert. Je eine Messung stellt einen Pool aus: Experiment 2: Duplikate; Experiment 3: Duplikate; Experiment 4: Duplikate; Experiment 5: Triplikate und Experiment 6: Duplikate; dar. Dargestellt sind eine Negativ- [DC + Tresp] und eine Positivkontrolle [DC+  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$  + Tresp]. Die Treg wurden zu den Tresp in verschiedenen Konzentrationen hinzu titriert [1:1; 1:0,5; 1:0,2; 1:0,1]. In (A) sind die Ergebnisse mittels Autoskalierung, in (B) mittels normierter Skalierung dargestellt (Skalierungseinstellung wurde in hellblau unterhalb der Abbildung geschrieben). Die Zahlen in den Graphiken zeigen die jeweils erfassten Gesamtzellzahlen aus den Kulturen. Wirken die Treg suppressiv auf die Tresp so wurde dies mit einem „+“ für suppressiv, einem „+/-“ für weniger suppressiv und einem „-“ für keine Suppression vermerkt.

Schlussfolgerung:

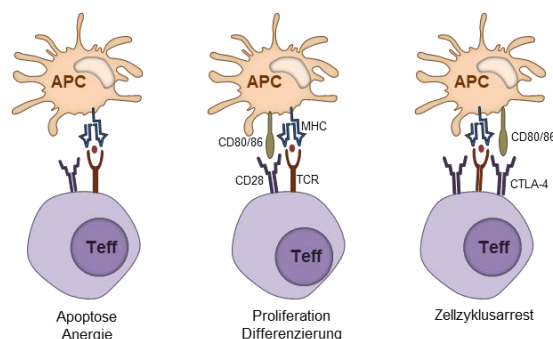
CD8 Treg Sub I+IV aus naiven Mäusen supprimieren die CD4 Tresp nur bei einer 1:1 Konzentration [CD4 Tresp:CD8 Treg Sub I+IV], jedoch nicht die CD8 Tresp. CD8 Treg Sub I+IV, aus mCMV-infizierten Mäusen können sowohl CD4 Tresp als auch CD8 Tresp supprimieren. Eine mCMV-Infektion beeinflusst die Funktion der CD8 Treg Sub I+IV *in vitro*.

**4.4. Verantwortliche Mechanismen für den suppressiven Effekt der Treg**

Die vorherigen Versuche haben gezeigt, dass das suppressive Potential der Treg durch eine mCMV-Infektion beeinflusst wird. Zur Untersuchung der zugrunde liegenden suppressiven Mechanismen wurde die Zelloberflächenexpression von *Fas/FasL*, *CD28* und *CTLA-4* der Treg untersucht (s. 4.4.1). Darüber hinaus wurde die Sekretion folgender anti-inflammatorischen Zytokine aus den Überständen der Suppression-Assays getestet: IFN $\gamma$ , IL-10, IL-2, IL-34 und TGF $\beta$ -1 (s. 4.4.2).

**4.4.1. Fas/FasL, CD28 und CTLA-4 Expression**

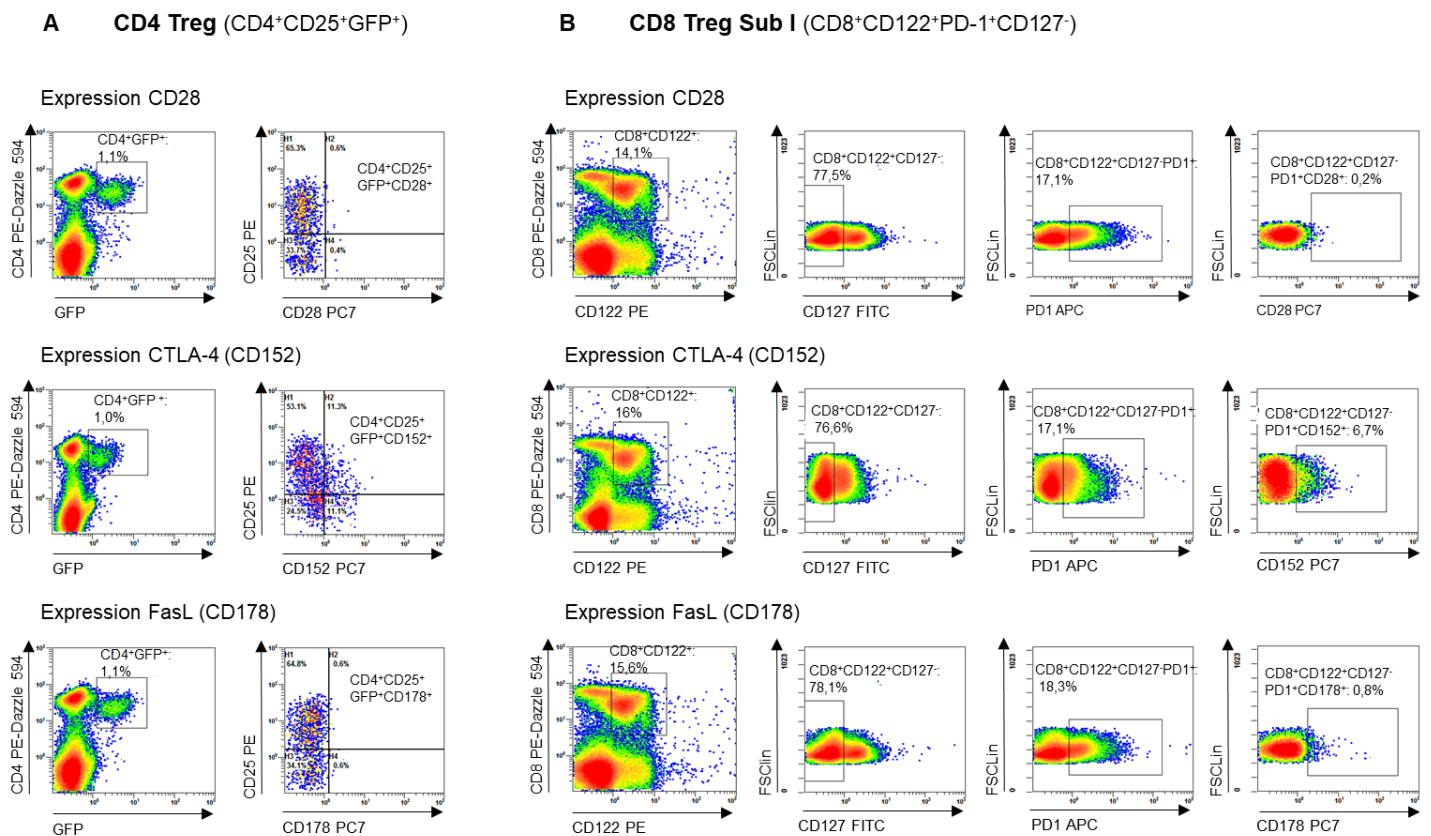
Die wichtigsten Moleküle für die Steuerung der Effektorfunktionen und Differenzierung der T-Zellen sind *CD28* und *CTLA-4* (CD152). Diese Proteine binden an dieselben Liganden CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) auf APCs, *CTLA-4* jedoch mit einer viel höheren Affinität (Noel et al. 1996). Zudem überträgt *CD28* ein positives stimulatorisches Signal zur T-Zell Aktivierung, während *CTLA-4* inhibitorische kostimulatorische Signale überträgt (Noel et al. 1996). Eine TCR Bindung ohne *CD28*-Ligation führt entweder zur Apoptose oder zur Anergie, während eine Bindung mit *CD28* zur Proliferation und Differenzierung von T-Zellen führt (Noel et al. 1996, Aronin et al. 2014) (s. **Abb. 16**).



**Abb. 16: CD28 und CTLA-4 Interaktionen.** Bindet *CD28* nicht an die Liganden CD80/86 kommt es zu einer Apoptose oder Anergie. Im Falle einer Bindung von *CD28* und CD80/86 kommt es zur Proliferation und Differenzierung von T-Zellen. Die Bindung von *CTLA-4* an CD80/86 resultiert in einem Zellzyklusarrest und somit zu einer Termination der T-Zellaktivierung. Antigenpräsentierende-Zelle (APC); MHC (*major histocompatibility complex*); TCR (T-Zellrezeptor); Teff (T Effektorzelle). Diese Abbildung wurde von Aronin et al. 2014 übernommen und modifiziert.

Fas und sein *Fas Ligand (FasL; CD178)* sind Mitglieder der Tumornekrosefaktor (TNF) Familie. Die Ligation von *Fas* mit *FasL* führt zur Aktivierung einer Caspase-Kaskade, welche Apoptose unmittelbar initiiert und für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase essenziell ist (Volpe et al. 2016).

Bereits in mehreren Publikationen wurde die Expression dieser Moleküle als potenzielle suppressive Mechanismen der Treg beschrieben (Alegre et al. 2001, Sakaguchi et al. 2009, Du & Cao 2018). Unter den CD4 Treg gilt *CTLA-4* sogar als Hauptregulator der Treg Suppression (Hong & Kim 2018). Aus diesem Grund wurde in diesem Versuch die Expression von *CD28*, *CTLA-4* und *Fas/FasL* der Treg getestet. Dabei wurden aus infizierten DEREK-C57BL/6 Mäusen (1 Woche p.i.) die Treg immunomagnetisch isoliert, mit FACS Antikörpern markiert und die CD4 (s. **Abb. 17A**) bzw. CD8 Treg Sub I (s. **Abb. 17B**) durchflusszytometrisch analysiert.



**Abb. 17: Oberflächenexpression der Treg.** Aus akut infizierten DEREK-C57BL/6 Mäusen wurden CD4 Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>) und CD8 Treg Sub I (CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>) aus einem Pool von Milzzellen isoliert. Dabei wurden CD4 und CD8 T-Zellen immunomagnetisch via negativ-Selektion MagniSort angereichert. Für die Expression von *CD28*, *CTLA-4* und *FasL* wurden die Treg jeweils mit Antikörpern markiert und durchflusszytometrisch analysiert. In (A) ist die Oberflächenexpression von *CD28*, *CTLA-4* und *FasL* der CD4 Treg und in (B) der CD8 Treg dargestellt.

Es konnte beobachtet werden, dass *CD28* und *FasL* weder von CD4 noch CD8 Treg Sub I exprimiert wurden. Im Gegenzug dazu, exprimierten sowohl CD4 als auch CD8 Treg Sub I

*CTLA-4*. Die Expression von *CTLA-4* unter den CD4 Treg war dabei stärker im Vergleich zu den CD8 Treg Sub I [CD4 Treg: 11,3%; CD8 Treg Sub I: 6,7%]. Die Beobachtung, dass der T-Zellmarker *CTLA-4* von den CD4 Treg exprimiert wird, wurde durch diesen Versuch belegt. Dies konnte nun auch für die CD8 Treg Sub I bestätigt werden.

### Schlussfolgerung:

Eine potenzielle Erklärung für das suppressive Potential von CD4 und CD8 Treg Sub I, könnte an der Oberflächenexpression von *CTLA-4* liegen.

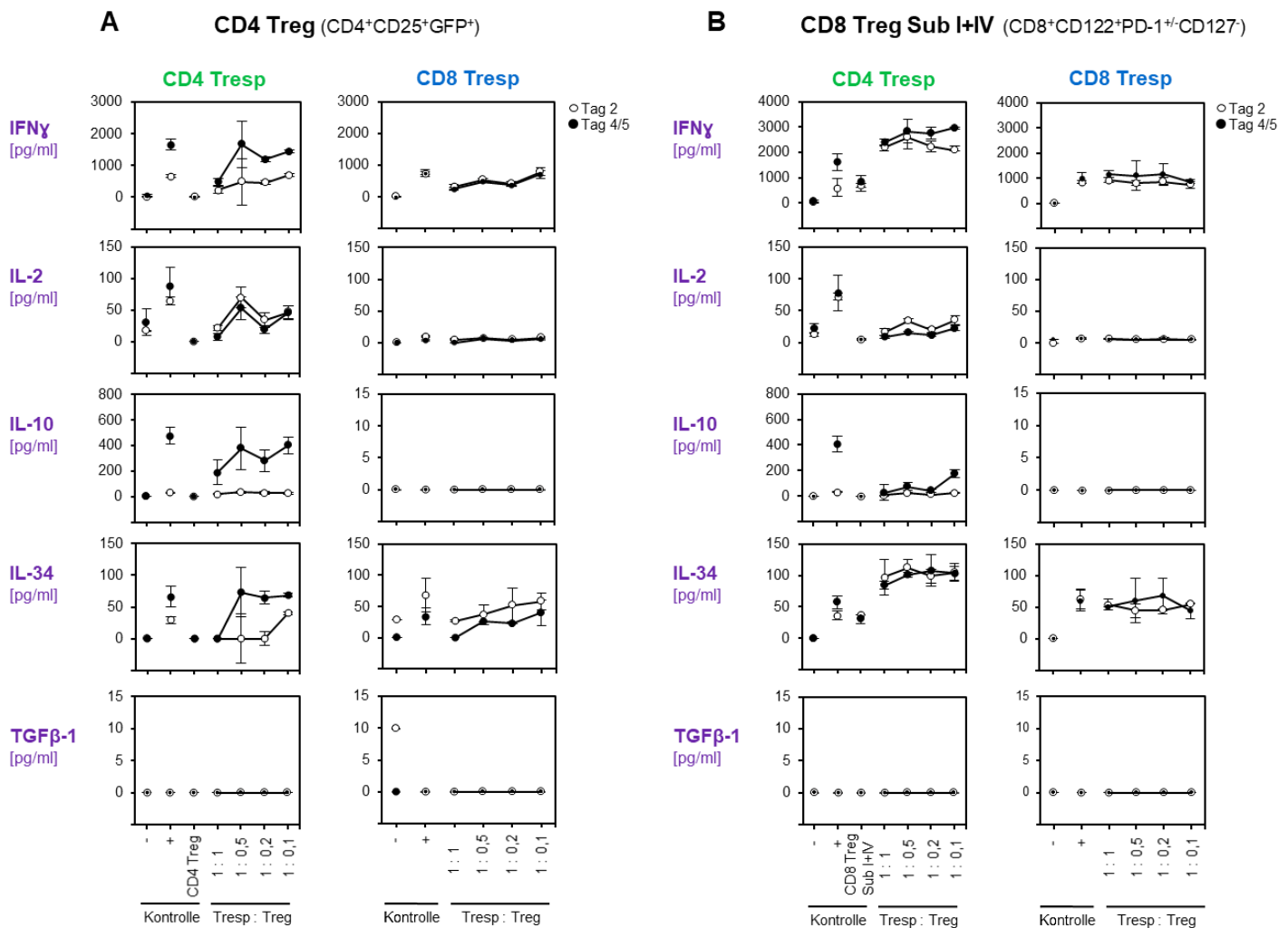
### **4.4.2. Zytokinsekretion**

Bereits beschriebene inhibitorische Mechanismen der CD4 Treg Suppression sind die Freisetzung anti-inflammatorischer Zytokine wie beispielsweise IL-10, IL-34 und TGF $\beta$ -1, wobei auch pro-inflammatorische Zytokine wie IL-2 und IFN $\gamma$  eine Rolle spielen sollen (Zhao et al. 2017, Hong & Kim 2018). Die Hauptmerkmale suppressiver CD4 Treg sind, dass sie eine hohe Expression der IL-2 Alpha-Kette (CD25) exprimieren können und somit eine hohe Affinität haben, IL-2 zu binden (Sakaguchi et al. 2007). Die Notwendigkeit von IL-2 der CD4 Treg wurde auch durch *in vivo* Studien bereits nachgewiesen, in welchem deutlich wurde, dass ein IL-2 Mangel zu einer tödlichen lymphoproliferativen Erkrankung, ähnlich wie bei einem Mangel an Foxp3, in Mäusen führt (Schorle et al. 1991). TGF $\beta$ -1 ist an der Immunregulation der CD4 Treg beteiligt und vermittelt eine Suppression durch Zell-Zell-Kontakt (Nakamura et al. 2001). IL-10 kann die Synthese von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IFN $\gamma$  und IL-2 hemmen, welche von den Treg produziert werden (Wang et al. 2016). IL-34 ist an dem suppressiven Potential von CD4 und CD8 Treg beteiligt und hemmt alloreaktive Immunantworten (Bézie et al. 2015).

Um zu verstehen welche Zytokine von Treg und Tresp während eines Suppression-Assays sekretiert wurden, und somit für das suppressive Potential der Treg verantwortlich sein können, wurden in der vorliegenden Arbeit die Überstände der Suppression-Assay Kulturen am zweiten, vierten und fünften Tag entnommen und als Einzelmessungen mit Hilfe des LegendPlex-Assays auf die oben beschriebenen Zytokine getestet. Diese drei Zeitpunkte wurden ausgewählt da bekannt war, dass die Sekretion von Zytokinen infolge einer Stimulation *in vitro* stark variieren kann (Weber & Iacono 1997, Sullivan et al. 2000). Es wurde dabei zwischen den Überständen der Suppression-Assays aus mCMV-infizierten und naiven Mäusen unterschieden, um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die Sekretion der Zytokine von Treg und Tresp durch eine mCMV-Infektion beeinflusst wird. Die Einzelmessungen der Tresp und Treg Sekretion ist im Anhang zu finden (s. **Abb. A13** und **Abb. A14**).

#### 4.4.2.1. Zytokinsekretion von Tresp und Treg aus mCMV-infizierten Mäusen

Die Zytokinsekretion aus den Überständen der Suppression-Assays mCMV-infizierter Mäuse (Experiment 1; s. 4.2.) ist in **Abb. 18** dargestellt. Dabei wurde zwischen der Sekretion der Zytokine von Tresp unter dem Einfluss von CD4 Treg (s. **Abb. 18A**) und CD8 Treg Sub I+IV (**Abb. 18B**) unterschieden.



**Abb. 18: Zytokinsekretion der Kokulturen von Tresp und Treg aus mCMV-infizierten Mäusen nach einem Suppression-Assay.** Die Überstände der Suppression-Assay Kulturen wurden am zweiten (hellgraue Punkte), vierten bzw. fünften Tag (schwarze Punkte) kollektiert. Die Produktion der Zytokine IFN $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-34 und TGF $\beta$ -1 wurde zytofluorometrisch unter Verwendung des LegendPlex-Assays in Gegenwart von CD4 Treg (**A**) und CD8 Treg Sub I+IV (**B**) analysiert. Unstimulierte Tresp [Tresp + DC] und stimulierte Tresp [Tresp + DC +  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$ ] dienten als Negativ [-] bzw. Positivkontrolle [+]. Kokulturen der CD4 bzw. CD8 Treg Sub I+IV mit DC +  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$  dienten als CD4 Treg bzw. CD8 Treg Sub I+IV Kontrolle. Die Konzentration der Tresp wurde konstant gehalten, während die Treg in abnehmender Konzentration zugegeben wurden [1:1; 1:0,5; 1:0,2; 1:0,1]. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte (Triplikate) der Einzelmessungen mit den jeweiligen Standardfehlern dar. Die Ergebnisse wurden mit MS Excel ermittelt [Standardfehler: STABW.S].

### Sekretion von IFN $\gamma$ :

#### **CD4 Treg – Tag 2:**

- Keine IFN $\gamma$  Sekretion in den Negativkontrollen der CD4 und CD8 Tresp sowie in der CD4 Treg Kontrolle.
- Zunahme der IFN $\gamma$  Sekretion in den CD4 und CD8 Tresp Positivkontrollen um je ein 700-faches.
- Anstieg der IFN $\gamma$  Sekretion nach Zugabe der CD4 Treg zu den CD4 Tresp [1:1 Titration; 230pg/ml] im Vergleich zur Negativkontrolle [9pg/ml].
- 3-facher Anstieg der IFN $\gamma$  Sekretion bei einer 1:0,1 Titration [CD4 Tresp:CD4 Treg] [690pg/ml] im Vergleich zu einer 1:1 Konzentration [CD4 Tresp:CD4 Treg]. Dieser Wert ähnelte dem der Positivkontrolle [Mittelwert: 661pg/ml].
- Anstieg der IFN $\gamma$  Sekretion nach Zugabe der CD4 Treg zu den CD8 Tresp [1:1 Titration; 320pg/ml] im Vergleich zur Negativkontrolle [0pg/ml].
- 2,5-fache Zunahme der IFN $\gamma$  Sekretion bei einer 1:0,1 Konzentration [CD8 Tresp:CD4 Treg; 796pg/ml] im Vergleich zur 1:1 Konzentration [CD8 Tresp:CD4 Treg].

#### **CD4 Treg – Tag 4 / Tag 5:**

- Keine Sekretion in den Negativkontrollen der Tresp sowie in der CD4 Treg Kontrolle
- ein 2,5-facher Anstieg an IFN $\gamma$  in der CD4 Tresp Positivkontrolle [1661pg/ml] im Vergleich zum zweiten Tag, jedoch nicht in der CD8 Tresp Positivkontrolle [750pg/ml].
- Anstieg die IFN $\gamma$  Sekretion um das 3-fache durch verringerte CD4 Treg Konzentrationen zu den CD4 Tresp [1:1 Titration: 481pg/ml; 1:0,1 Titration: 1441pg/ml].
- Anstieg der IFN $\gamma$  Sekretion um das 2,8-fache durch verringerte CD4 Treg Konzentrationen zu den CD8 Tresp [1:1 Titration: 249pg/ml; 1:0,1 Titration: 709pg/ml].

#### **CD8 Treg Sub I+IV – Tag 2:**

- Keine Sekretion von IFN $\gamma$  in den Negativkontrollen der CD4 und CD8 Tresp.
- Höhere Sekretion von IFN $\gamma$  in der CD8 Treg Sub I+IV Kontrolle [700pg/ml] als in der CD4 Tresp Positivkontrolle [587pg/ml].
- Keine erhöhte Sekretion von IFN $\gamma$  durch die Zugabe von CD8 Treg Sub I+IV zu CD4 Tresp nach einer 1:0,1 Titration [2085pg/ml] im Vergleich zur 1:1 Titration [2204pg/ml].

- Keine erhöhte Sekretion von IFN $\gamma$  durch die Zugabe von CD8 Treg Sub I+IV zu CD8 Tresp nach einer 1:0,1 Titration [734pg/ml] im Vergleich zur 1:1 Titration [923pg/ml].

### **CD8 Treg Sub I+IV – Tag 4 / Tag 5:**

- Keine Sekretion von IFN $\gamma$  in den Negativkontrollen der CD4 und CD8 Tresp.
- 2,7-fache Zunahme der IFN $\gamma$  Sekretion der CD4 Tresp Positivkontrolle im Vergleich zum zweiten Tag [Tag 2: 587pg/ml; Tag 5: 1614pg/ml].
- 1,2-fache Zunahme der IFN $\gamma$  Sekretion der CD8 Tresp Positivkontrolle im Vergleich zum zweiten Tag [Tag 2: 843pg/ml; Tag 4: 1004pg/ml].
- Erhöhte IFN $\gamma$  Sekretion nach Zugabe von CD8 Treg Sub I+IV zu CD4 Tresp einer 1:0,1 Titration [2961pg/ml] im Vergleich zur 1:1 Titration [2393pg/ml].
- Keine erhöhte IFN $\gamma$  Sekretion nach Zugabe von CD8 Treg Sub I+IV zu CD8 Tresp einer 1:0,1 Titration [867pg/ml] im Vergleich zur 1:1 Titration [1161pg/ml].

### **Sekretion von IL-2:**

#### **CD4 Treg – Tag 2:**

- Minimale Sekretion von IL-2 in der Negativkontrollen der CD4 Tresp [18pg/ml].
- 3,6-facher Anstieg der IL-2 Sekretion in der CD4 Tresp Positivkontrolle [65pg/ml] im Vergleich zur Negativkontrolle der CD4 Tresp [18pg/ml].
- Anstieg der IL-2 Sekretion in der CD8 Tresp Positivkontrolle [10pg/ml] im Vergleich zur Negativkontrolle [0pg/ml].
- 2,1-facher Anstieg der IL-2 Sekretion bei einer 1:0,1 Konzentration [47pg/ml] nach Zugabe von CD4 Treg zu CD4 Tresp im Vergleich zur 1:1 Konzentration [22pg/ml].
- 1,7-facher Anstieg der IL-2 Sekretion bei einer 1:0,1 Konzentration [7,8pg/ml] nach Zugabe von CD4 Treg zu CD8 Tresp im Vergleich zur 1:1 Konzentration [4,7pg/ml].

#### **CD4 Treg – Tag 4 / Tag 5:**

- Keine Sekretion in den Negativkontrollen der Tresp sowie in der CD4 Treg Kontrolle.
- IL-2-Sekretion in der CD4 Tresp Positivkontrolle [88pg/ml] und in der CD8 Tresp Positivkontrolle [18pg/ml].
- 5,7-fache IL-2 Sekretion nach Zugabe von CD8 Treg Sub I+IV zu CD4 Tresp einer 1:0,1 Titration [46pg/ml] im Vergleich zur 1:1 Titration [8,1pg/ml].
- Anstieg der IL-2 Sekretion nach Zugabe von CD8 Treg Sub I+IV zu CD8 Tresp einer 1:0,1 Titration [5,7pg/ml] im Vergleich zur 1:1 Titration [0pg/ml].

**CD8 Treg – Tag 2:**

- Minimale Sekretion von IL-2 in der Negativkontrollen der CD4 Tresp [CD4 Tresp: 13pg/ml; CD8 Tresp: 0pg/ml].
- IL-2 Sekretion der CD4 [72pg/ml] und CD8 Tresp [7pg/ml] Positivkontrolle. Minimale IL-2 Sekretion in der CD8 Treg Sub I+IV Kontrolle [4,6pg/ml].
- 2,1-fache IL-2 Sekretion nach Zugabe von CD8 Treg Sub I+IV zu CD4 Tresp einer 1:0,1 Titration [35,1pg/ml] im Vergleich zur 1:1 Titration [16,8pg/ml].
- Keine erhöhte IL-2 Sekretion nach Zugabe von CD8 Treg Sub I+IV zu CD4 Tresp einer 1:0,1 Titration [5,1pg/ml] im Vergleich zur 1:1 Titration [6,7pg/ml].

**CD8 Treg Sub I+IV – Tag 4 / Tag 5:**

- IL-2-Sekretion in den Negativkontrollen [CD4 Tresp: 21,4pg/ml; CD8 Tresp: 5,9pg/ml] und Positivkontrollen [CD4 Tresp: 77,7pg/ml; CD8 Tresp: 6,5pg/ml] der Tresp sowie der CD8 Treg Sub I+IV Kontrolle [CD4 Tresp: 4,6pg/ml].
- 2,6-fache IL-2 Sekretion nach Zugabe von CD8 Treg Sub I+IV zu CD4 Tresp einer 1:0,1 Titration [22,4pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [8,7pg/ml].
- Keine erhöhte IL-2 Sekretion nach Zugabe von CD8 Treg Sub I+IV zu CD8 Tresp einer 1:0,1 Titration [5,2pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [5,8pg/ml].

**Sekretion von IL-10:**

**CD4 Treg – Tag 2:**

- Keine Sekretion von IL-10 in den Negativkontrollen von CD4 und CD8 Tresp sowie in der CD4 Treg Kontrolle.
- Sekretion von IL-10 nur in der CD4 Tresp Positivkontrolle [33,6pg/ml], nicht in der CD8 Tresp Positivkontrolle.
- 1,3-facher Anstieg der IL-10 Sekretion nach Zugabe von CD4 Tresp zu CD4 Treg einer 1:0,1 Titration [21,1pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [27,6pg/ml].
- Keine IL-10 Sekretion nach Zugabe von CD8 Tresp zu CD4 Treg.

**CD4 Treg – Tag 4 / Tag 5:**

- Keine IL-10 Sekretion in den Negativkontrollen der Tresp und CD4 Treg Kontrolle.
- IL-10 Sekretion in der CD4 Tresp Positivkontrolle [474pg/ml] aber nicht in der CD8 Tresp Positivkontrolle.
- 2,1-facher Anstieg der IL-10 Sekretion einer 1:0,1 Titration [CD4 Tresp: CD4 Treg; 400pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [CD4 Tresp:CD4 Treg; 191pg/ml].

- Keine IL-10 Sekretion nach Zugabe von CD4 Treg zu CD8 Tresp.

### **CD8 Treg Sub I+IV – Tag 2:**

- Keine Sekretion von IL-10 in den Negativkontrollen der Tresp sowie der CD8 Treg Sub I+IV Kontrolle.
- Sekretion von IL-10 in der CD4 Tresp Positivkontrolle [33,2pg/ml] aber nicht in der CD8 Tresp Kontrolle.
- 2,7-facher Anstieg der IL-10 Sekretion einer 1:0,1 Titration [CD4 Tresp:CD8 Treg Sub I+IV; 24,1pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [CD4 Tresp:CD8 Treg Sub I+IV; 8,8pg/ml].
- Keine IL-10 Sekretion nach Zugabe von CD8 Tresp zu CD8 Treg Sub I+IV.

### **CD8 Treg Sub I+IV – Tag 4 / Tag 5:**

- Keine Sekretion von IL-10 in den Negativkontrollen der Tresp sowie der CD8 Treg Sub I+IV Kontrolle.
- Sekretion von IL-10 in der CD4 Tresp Positivkontrolle [409pg/ml] expandierte im Vergleich zum zweiten Tag um das 12-fache.
- Keine Sekretion von IL-10 in der CD8 Tresp Positivkontrolle
- 6,2-facher Anstieg der IL-10 Sekretion einer 1:0,1 Titration [CD4 Tresp:CD8 Treg Sub I+IV; 174,8pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [CD4 Tresp:CD8 Treg Sub I+IV; 28pg/ml].
- Keine IL-10 Sekretion nach Zugabe von CD8 Treg Sub I+IV zu CD8 Tresp.

## **Sekretion von IL-34:**

### **CD4 Treg – Tag 2:**

- Keine IL-34 Sekretion in der Negativkontrollen von CD4 Tresp sowie der CD4 Treg Kontrolle.
- Sekretion von IL-34 in der CD8 Tresp Negativkontrolle [22,2pg/ml]
- Sekretion von IL-34 in der Positivkontrollen der Tresp [CD4 Tresp: 29pg/ml; CD8 Tresp: 69pg/ml]
- IL-34 Sekretion nach Zugabe von CD4 Treg zu CD4 Tresp nach einer 1:0,1 Titration [40pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [0pg/ml].
- 2,2-facher Anstieg der IL-34 Sekretion nach Zugabe von CD4 Treg zu CD8 Tresp nach einer 1:0,1 Titration [58pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [27pg/ml].

**CD4 Treg – Tag 4 / Tag 5:**

- Keine Sekretion von IL-34 in den Negativkontrollen der Tresp sowie in der CD4 Treg Kontrolle.
- 2,3-facher Anstieg der IL-34 Sekretion der CD4 Tresp Positivkontrolle [66,4pg/ml] im Vergleich zu der Sekretion am zweiten Tag.
- 2-fache Abnahme der IL-34 Sekretion der CD8 Tresp Positivkontrolle [34,3pg/ml] im Vergleich zu der Sekretion am zweiten Tag.
- Anstieg der IL-34 Sekretion nach Zugabe von CD4 Treg zu CD4 Tresp nach einer 1:0,1 Titration [68,2pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [0pg/ml].
- Anstieg der IL-34 Sekretion nach Zugabe von CD4 Treg zu CD8 Tresp nach einer 1:0,1 Titration [40,4pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [0pg/ml].

**CD8 Treg Sub I+IV – Tag 2:**

- Keine IL-34 Sekretion in den Negativkontrollen von CD4 und CD8 Tresp.
- Sekretion von IL-34 in den Positivkontrolle der Tresp [CD4 Tresp: 36pg/ml; CD8 Tresp: 63pg/ml] und der CD8 Treg Sub I+IV Kontrolle [38pg/ml].
- Anstieg der IL-34 Sekretion nach Zugabe von CD4 Treg zu CD4 Tresp einer 1:0,1 Titration [107,4pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [97,2pg/ml].
- Kaum ein Anstieg der IL-34 Sekretion nach Zugabe von CD8 Treg Sub I+IV zu CD8 Tresp nach einer 1:0,1 Titration [55pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [54,2pg/ml].

**CD8 Treg Sub I+IV – Tag 4 / Tag 5:**

- Keine Sekretion von IL-34 in den Negativkontrollen der Tresp.
- Sekretion von IL-34 in den Positivkontrollen der Tresp [CD4 Tresp: 57pg/ml; CD8 Tresp: 60pg/ml] und CD8 Treg Sub I+IV Positivkontrolle [30,6pg/ml].
- Anstieg der IL-34 Sekretion nach Zugabe von CD8 Treg Sub I+IV zu CD4 Tresp nach einer 1:0,1 Titration [103,7pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [84,3pg/ml].
- Abnahme der IL-34 Sekretion nach Zugabe von CD8 Treg Sub I+IV zu CD8 Tresp nach einer 1:0,1 Titration [44,8pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [50,8pg/ml].

**Sekretion von TGF $\beta$ -1:**

- Es konnte keine Sekretion von TGF $\beta$ -1 detektiert werden.

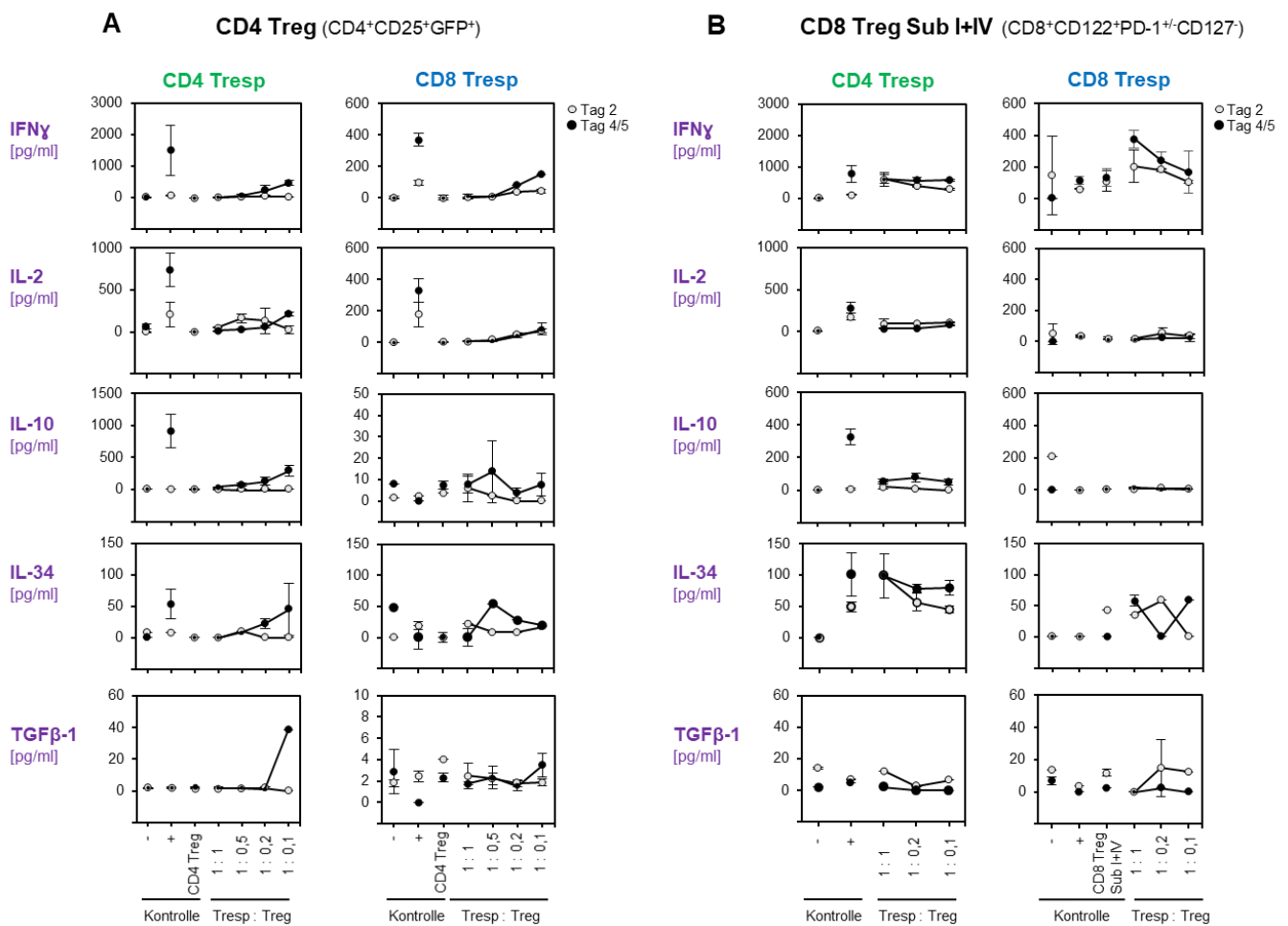
**Schlussfolgerung:**

CD4 Treg supprimieren die Sekretion von IFN $\gamma$ , IL-2, IL-10 und IL-34 durch stimulierte Tresp aus mCMV-infizierten Mäusen. Allerdings konnte ein erheblicher Unterschied zwischen CD4 und

CD8 Tresp in Bezug auf die Sekretion unterschiedlicher Zytokine festgestellt werden. Im Gegensatz dazu, konnten die CD8 Treg Sub I+IV die Sekretion von ausschließlich IFN $\gamma$ , IL-2 und IL-10 durch stimulierte CD4 Tresp, nicht jedoch CD8 Tresp, supprimieren.

#### 4.4.2.2. Zytokinsekretion von Tresp und Treg aus naiven Mäusen

Die Zytokinsekretion aus den Überständen der Suppression-Assays (Experiment 4 und 6) naiver Mäuse ist in **Abb. 19** dargestellt. Dabei wurde zwischen der Sekretion der Zytokine von Tresp unter dem Einfluss von CD4 Treg (s. **Abb. 19A**; Experiment 4) und CD8 Treg Sub I+IV (s. **Abb. 19B**; Experiment 6) unterschieden.



**Abb. 19: Zytokinsekretion der Kokulturen von Tresp und Treg aus naiven Mäusen nach einem Suppression-Assay.** Die Überstände der Suppression-Assay Kulturen wurden am zweiten (hellgraue Punkte), vierten und fünften Tag (schwarze Punkte) kollektiert. Die Produktion der Zytokine IFN $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-34 und TGF $\beta$ -1 wurden zytofluorometrisch unter Verwendung des LegendPlex-Assays in Gegenwart von CD4 Treg (A) und CD8 Treg Sub I+IV (B) analysiert. Unstimulierte Tresp [Tresp + DC] und stimulierte Tresp [Tresp + DC +  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$ ] dienen als Negativ [-] bzw. Positivkontrolle [+]. Kokulturen der CD4 bzw. CD8 Treg mit DC +  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$  dienen als CD4- bzw. CD8 Treg Kontrolle. Die Konzentration der Tresp wurde konstant gehalten, während die Treg in abnehmender Konzentration zugegeben wurden [1:1; 1:0,5; 1:0,2; 1:0,1]. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte (A: Quadruplikate und B: Duplikate) der Einzelmessungen mit den jeweiligen Standardfehlern dar. Die Ergebnisse wurden mit MS Excel ermittelt [Standardfehler: STABW.S].

### Sekretion von IFN $\gamma$ :

#### **CD4 Treg – Tag 2:**

- keine IFN $\gamma$  Sekretion in den Negativkontrollen der Tresp sowie in der CD4 Treg Kontrolle.
- IFN $\gamma$  Sekretion in den Positivkontrollen der Tresp [CD4 Tresp: 73pg/ml; CD8 Tresp: 95pg/ml].
- 4,2-facher Anstieg der IFN $\gamma$  Sekretion nach Zugabe von CD4 Treg zu CD4 Tresp einer 1:0,1 Titration [27,2pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [6,5pg/ml].
- 13,9-facher Anstieg der IFN $\gamma$  Sekretion nach Zugabe von CD4 Treg zu CD8 Tresp nach einer 1:0,1 Titration [43pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [3,1pg/ml].

#### **CD4 Treg – Tag 4 / Tag 5:**

- Keine Sekretion von IFN $\gamma$  in den Negativkontrollen der Tresp sowie in der CD4 Treg Kontrolle.
- IFN $\gamma$  Sekretion in den Positivkontrollen der Tresp [CD4 Tresp: 1510pg/ml; CD8 Tresp: 368pg/ml].
- 150-facher Anstieg der IFN $\gamma$  Sekretion nach Zugabe von CD4 Treg zu CD4 Treg nach einer 1:0,1 Titration [465pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [9,3pg/ml].
- 19,5-facher Anstieg der IFN $\gamma$  Sekretion nach Zugabe von CD4 Treg zu CD8 Tresp nach einer 1:0,1 Titration [150,1pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [7,7pg/ml].

#### **CD8 Treg Sub I+IV – Tag 2:**

- Sekretion von IFN $\gamma$  in den Negativkontrollen der Tresp [CD4 Tresp: 1,8pg/ml; CD8 Tresp: 144,7pg/ml].
- Sekretion von IFN $\gamma$  in den Positivkontrollen der Tresp [CD4 Tresp: 116pg/ml; CD8 Tresp: 61pg/ml] und CD8 Treg Sub I+IV Kontrolle [112pg/ml].
- Abnahme der IFN $\gamma$  Sekretion nach einer 1:0,1 Titration [CD4 Tresp: CD8 Treg Sub I+IV; 290pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [CD4 Tresp: CD8 Treg Sub I+IV; 611,3pg/ml].
- Abnahme der IFN $\gamma$  Sekretion nach einer 1:0,1 Titration [CD8 Tresp: CD8 Treg Sub I+IV; 106pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [CD8 Tresp: CD8 Treg Sub I+IV; 204,1pg/ml].

#### **CD8 Treg Sub I+IV – Tag 4 / Tag 5:**

- Minimale Sekretion von IFN $\gamma$  in den Negativkontrollen der Tresp [CD4 Tresp: 1,1pg/ml; CD8 Tresp: 1,9pg/ml]

- IFN $\gamma$  Sekretion expandierte in der CD4 Tresp Positivkontrolle um das 6,8-fache [785pg/ml] und der CD8 Tresp Positivkontrolle [115,5pg/ml] um das 1,9-fache im Vergleich zum zweiten Tag [Tag 2: CD4 Tresp: 116pg/ml; CD8 Tresp: 61pg/ml].
- Anstieg der IFN $\gamma$  Sekretion in der CD8 Treg Sub I+IV Kontrolle [132pg/ml] im Vergleich zum zweiten Tag [111,5pg/ml]
- Abnahme der IFN $\gamma$  Sekretion nach einer 1:0,1 Titration [CD4 Tresp: CD8 Treg Sub I+IV; 577,6pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [CD4 Tresp: CD8 Treg Sub I+IV; 617,4pg/ml].
- Abnahme der IFN $\gamma$  Sekretion nach einer 1:0,1 Titration [CD8 Tresp: CD8 Treg Sub I+IV; 167,3pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [CD8 Tresp: CD8 Treg Sub I+IV; 375,7pg/ml].

### Sekretion von IL-2:

#### **CD4 Treg – Tag 2:**

- Keine IL-2 Sekretion in den Negativkontrollen der Tresp sowie in der CD4 Treg Kontrolle.
- IL-2 Sekretion in den Tresp Positivkontrollen [CD4 Tresp: 209pg/ml; CD8 Tresp: 177pg/ml].
- Abnahme der IL-2 Sekretion nach einer 1:0,1 Titration [CD4 Tresp:CD4 Treg; 28,9pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [CD4 Tresp:CD4 Treg; 54,1pg/ml].
- 10,7-facher Anstieg der IL-2 Sekretion nach einer 1:0,1 Titration [CD8 Tresp:CD4 Treg; 71,9pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [CD4 Tresp:CD4 Treg; 6,7pg/ml].

#### **CD4 Treg – Tag 4 / Tag 5:**

- Keine Sekretion von IL-2 in der CD8 Tresp Negativkontrollen der Tresp sowie in der CD4 Treg Kontrolle.
- Sekretion von IL-2 in der CD4 Tresp Negativkontrolle [63,4pg/ml] und in den Tresp Positivkontrollen [CD4 Tresp: 736,7pg/ml; CD8 Tresp: 330,6pg/ml]
- 16-facher Anstieg der IL-2 Sekretion nach Zugabe von CD4 Treg zu CD4 Tresp nach einer 1:0,1 Titration [212,7pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [13,3pg/ml].
- 13,4-facher Anstieg der IL-2 Sekretion nach Zugabe von CD4 Treg zu CD8 Tresp nach einer 1:0,1 Titration [84,6pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [6,3pg/ml].

**CD8 Treg Sub I+IV – Tag 2:**

- Sekretion von IL-2 in den Negativkontrollen der Tresp [CD4 Tresp: 1,9pg/ml; CD8 Tresp: 48,8pg/ml], in den Positivkontrollen der Tresp [CD4 Tresp: 176,8pg/ml; CD8 Tresp: 36,2pg/ml] und in der CD8 Treg Sub I+IV Kontrolle [20,8pg/ml].
- 1,1-facher Anstieg der IL-2 Sekretion nach Zugabe von CD8 Treg Sub I+IV zu CD4 Tresp nach einer 1:0,1 Titration [102,4pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [91,5pg/ml].
- 1,8-facher Anstieg der IL-2 Sekretion nach Zugabe von CD8 Treg Sub I+IV zu CD8 Tresp nach einer 1:0,1 Titration [34,9pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [19,2pg/ml].

**CD8 Treg Sub I+IV – Tag 4 / Tag 5:**

- Minimale Sekretion von IL-2 in den Negativkontrollen der Tresp [CD4 Tresp: 1,3pg/ml; CD8 Tresp: 1,6g/ml].
- Sekretion von IL-2 in den Positivkontrollen der Tresp [CD4 Tresp: 279,5pg/ml; CD8 Tresp: 30,6pg/ml] und in der CD8 Treg Sub I+IV Kontrolle [132pg/ml].
- 2-facher Anstieg der IL-2 Sekretion nach Zugabe von CD8 Treg Sub I+IV zu CD4 Tresp nach einer 1:0,1 Titration [71,7pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [35,6pg/ml].
- 1,8-facher Anstieg der IL-2 Sekretion nach Zugabe von CD8 Treg Sub I+IV zu CD8 Tresp nach einer 1:0,1 Titration [23,7pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [13,4pg/ml].

**Sekretion von IL-10:**

**CD4 Treg – Tag 2:**

- Keine Sekretion von IL-10 in der CD4 Tresp Negativkontrolle und CD4 Treg Kontrolle; Minimale Sekretion von IL-10 in der CD8 Tresp Negativkontrolle [1,3pg/ml] und Positivkontrolle der Tresp [CD4 Tresp: 1,3pg/ml; CD8 Tresp: 2,3pg/ml].
- Keine Zunahme der IL-10 Sekretion nach verringerter CD4 Treg zu CD4 Tresp Konzentration [1:1 Titration [3pg/ml], 1:0,1 Titration [0pg/ml].
- Keine Zunahme der IL-10 Sekretion nach verringerter CD4 Treg zu CD8 Tresp Konzentration [1:1 Titration [6pg/ml], 1:0,1 Titration [0pg/ml].

**CD4 Treg – Tag 4 / Tag 5:**

- Minimale IL-10 Sekretion in den Negativkontrollen Tresp [CD4 Tresp 7,7pg/ml; CD8 Tresp: 7,7mg/ml] und CD4 Treg Kontrolle [7pg/ml].

- Anstieg der IL-10 Sekretion in der CD4 Tresp Positivkontrolle [910pg/ml] um das 700-fache im Vergleich zu der Sekretion am Tag 2.
- Keine Sekretion von IL-10 in der CD8 Tresp Positivkontrolle.
- 7,6-facher Anstieg der IL-10 Sekretion nach Zugabe von CD4 Treg zu CD4 Tresp nach einer 1:0,1 Titration [291,4pg/ml], im Vergleich zur 1:1 Titration [38,4pg/ml].
- Keine Zunahme der IL-10 Sekretion nach verringerter CD4 Treg zu CD8 Tresp Konzentration [1:1 Titration [7,9pg/ml], 1:0,1 Titration [7,6pg/ml].

### **CD8 Treg Sub I+IV – Tag 2:**

- Keine Sekretion von IL- in der CD4 Tresp Negativkontrolle.
- Sekretion von IL-10 in der CD8 Tresp Negativkontrolle [208pg/ml].
- Minimale Sekretion von IL-10 in der CD8 Treg Sub I+IV Kontrolle [5,4pg/ml] sowie in der CD4 Tresp Positivkontrolle [6,2pg/ml].
- Keine Sekretion von IL-10 in der CD8 Tresp Positivkontrolle
- Keine Zunahme der IL-10 Sekretion nach verringerter CD4 Treg zu CD4 Tresp Konzentration [1:1 Titration [18,7pg/ml], 1:0,1 Titration [0pg/ml].
- Keine Zunahme der IL-10 Sekretion nach verringerter CD4 Treg zu CD8 Tresp Konzentration [1:1 Titration [3,6pg/ml], 1:0,1 Titration [2,3pg/ml].

### **CD8 Treg Sub I+IV – Tag 4 / Tag 5:**

- Keine Sekretion von IL-10 in den Negativkontrollen der CD4 und CD8 Tresp.
- Keine Sekretion von IL-10 in der CD8 Tresp Positivkontrolle.
- 52,5-facher Anstieg der IL-10 Sekretion in der CD4 Tresp Positivkontrolle [325,8pg/ml] im Vergleich zur Sekretion am zweiten Tag.
- Keine Zunahme der IL-10 Sekretion nach verringerter CD4 Treg zu CD4 Tresp Konzentration [1:1 Titration [56,6pg/ml], 1:0,1 Titration [50,8pg/ml].
- Keine Zunahme der IL-10 Sekretion nach verringerter CD4 Treg zu CD8 Tresp Konzentration [1:1 Titration [10,3pg/ml], 1:0,1 Titration [6,3pg/ml].

### **Sekretion von IL-34:**

#### **CD4 Treg – Tag 2:**

- keine IL-34 Sekretion in der CD8 Tresp Negativkontrolle sowie in der CD4 Treg Kontrolle.
- Minimale Sekretion von IL-34 in der CD4 Tresp Positivkontrolle [8,8pg/ml] und in der CD4 Tresp Negativkontrolle [8,8pg/ml].

- Keine IL-34 Sekretion Zugabe der CD4 Treg zu CD4 Tresp Konzentration, außer bei einer 1:0,5 Konzentration [10,5pg/ml].
- Keine Zunahme der IL-34 Sekretion nach verringerter CD4 Treg zu CD8 Tresp Konzentration [1:1 Titration [22,6pg/ml], 1:0,1 Titration [17,4pg/ml]].

### **CD4 Treg – Tag 4 / Tag 5:**

- Keine Sekretion von IL-34 in der CD4 Tresp Negativkontrolle und CD4 Treg Kontrolle.
- Sekretion von IL-34 in der CD8 Tresp Negativkontrolle [49,2pg/ml].
- 6,1-facher Anstieg der IL-34- Sekretion in der CD4 Tresp Positivkontrolle [53,8pg/ml] im Vergleich zu der Sekretion am zweiten Tag.
- Anstieg der IL-34 Sekretion nach verringerter CD4 Treg zu CD4 Tresp Konzentration [1:1 Titration [0pg/ml]; 1:0,1 Titration [45,5pg/ml]].
- Schwankungen in der IL-34 Sekretion nach verringerter CD4 Treg zu CD8 Tresp Konzentration [1:1 Titration [0pg/ml], 1:0,5 Titration [54,4pg/ml]; 1:0,2 Titration [27,9pg/ml]; 1:0,1 Titration [19,3pg/ml]].

### **CD8 Treg Sub I+IV – Tag 2:**

- Keine IL-34 Sekretion in den Negativkontrollen von CD4 und CD8 Tresp.
- Keine IL-34 Sekretion in der CD8 Tresp Positivkontrolle.
- Sekretion IL-34 in der CD4 Tresp Positivkontrolle [48,8pg/ml].
- Sekretion von IL-34 in der CD8 Treg Sub I+IV Kontrolle [43,8pg/ml].
- 2,2-fache Abnahme der IL-34 Sekretion nach Zugabe der CD8 Treg Sub I+IV zu CD4 Tresp [1:1 Titration [98,5pg/ml]; 1:0,1 Titration [45pg/ml]].
- Schwankungen in der IL-34 Sekretion nach Zugabe der CD8 Treg Sub I+IV zu den CD8 Tresp [1:1 Titration; 36pg/ml und 1:0,2 Titration; 58,9pg/ml; 1:0,1 Titration: 0pg/ml].

### **CD8 Treg Sub I+IV – Tag 4 / Tag 5:**

- Keine Sekretion von IL-34 in den Negativkontrollen der CD4 und CD8 Tresp und in der CD8 Treg Sub I+IV Kontrolle.
- Keine IL-34 Sekretion in der CD8 Tresp Positivkontrolle.
- IL-34 Sekretion in der CD4 Tresp Positivkontrolle [100,6pg/ml].
- Keine Zunahme der IL-34 Sekretion nach verringerter CD8 Treg Sub I+IV zu CD4 Tresp Konzentration [1:1 Titration [98,5pg/ml], 1:0,1 Titration [79,7pg/ml]].

- Schwankungen in der IL-34 Sekretion nach Zugabe der CD8 Treg Sub I+IV zu den CD8 Tresp [1:1 Titration; 57,6pg/ml und 1:0,2 Titration; 0pg/ml; 1:0,1 Titration: 58,9pg/ml].

### Sekretion von TGF $\beta$ -1:

#### **CD4 Treg – Tag 2:**

- Minimale Sekretion von TGF $\beta$ -1 in den Negativkontrollen von CD4 und CD8 Tresp [CD4 Tresp: 1,9pg/ml; CD8 Tresp: 1,8pg/ml], in den Positivkontrollen der Tresp [CD4 Tresp: 2,2pg/ml; CD8 Tresp: 2,4pg/ml] und in der CD4 Treg Kontrolle [2,8pg/ml].
- Abnahme der TGF $\beta$ -1 Sekretion nach verringerter CD4 Treg zu CD4 Tresp Konzentration [1:1 Titration [1,7pg/ml], 1:0,1 Titration [0pg/ml]].
- Abnahme der IL-34 Sekretion nach verringerter CD4 Treg zu CD8 Tresp Konzentration [1:1 Titration [2,5pg/ml], 1:0,1 Titration [1,9pg/ml]].

#### **CD4 Treg – Tag 4 / Tag 5:**

- Minimale Sekretion von TGF $\beta$ -1 in der Negativkontrolle der CD4 und CD8 Tresp [CD4 Tresp: 1,8pg/ml; CD8 Tresp: 2,9pg/ml], der CD4 Tresp Positivkontrolle [2,1pg/ml] und der CD4 Treg Kontrolle [2,3pg/ml].
- Keine Sekretion von TGF $\beta$ -1 in der CD8 Tresp Positivkontrolle.
- 19,3-fache Zunahme der TGF $\beta$ -1 Sekretion nach verringerter CD4 Treg zu CD4 Tresp Konzentration [1:1 Titration [2pg/ml], 1:0,1 Titration [38,6pg/ml]].
- Schwankungen in der TGF $\beta$ -1 Sekretion nach verringerter CD4 Treg zu CD8 Tresp Konzentration [1:1 Titration [1,8pg/ml], 1:0,5 Titration [2,3pg/ml]; 1:0,2 [1,5pg/ml]; 1:0,1 [3,5pg/ml]].

#### **CD8 Treg Sub I+IV – Tag 2:**

- Sekretion von TGF $\beta$ -1 in den Negativkontrollen von CD4 [13,9pg/ml] und CD8 Tresp [13,7pg/ml].
- Minimale Sekretion von TGF $\beta$ -1 in den Positivkontrollen von CD4 Tresp [6,9pg/ml] und CD8 Tresp [3,7pg/ml].
- Sekretion von TGF $\beta$ -1 in der CD8 Treg Sub I+IV Kontrolle [11,8pg/ml].
- 1,9-fache Abnahme der TGF $\beta$ -1 Sekretion nach verringerter CD8 Treg Sub I+IV zu CD4 Tresp Konzentration [1:1 Titration [12,3pg/ml], 1:0,1 Titration [6,4pg/ml]].

- Schwankung der TGF $\beta$ -1 Sekretion nach Zugabe der CD8 Treg Sub I+IV zu CD8 Tresp Konzentration [1:1 Titration [0pg/ml]; 1:0,2 Titration [14,8]; 1:0,1 Titration [12,3pg/ml]].

### **CD8 Treg Sub I+IV – Tag 4 / Tag 5:**

- Minimale Sekretion von TGF $\beta$ -1 in den Negativkontrolle von CD4 Tresp [2,2pg/ml] und CD8 Tresp [6,6pg/ml], in der CD4 Tresp Positivkontrolle [5pg/ml] und der CD8 Treg Sub I+IV Kontrolle [5pg/ml].
- Keine Sekretion von TGF $\beta$ -1 in der CD8 Tresp Positivkontrolle.
- Keine Sekretion von TGF $\beta$ -1 nach Zugabe der CD4 Tresp zu CD8 Treg Sub I+IV Konzentration
- Keine Sekretion von TGF $\beta$ -1 nach Zugabe der CD8 Tresp zu CD8 Treg Sub I+IV Konzentration

### Schlussfolgerung:

CD4 Treg supprimieren die Sekretion von IFN $\gamma$ , IL-2, IL-10 und IL-34 durch stimulierte Tresp aus naiven Mäusen. Dabei war ein erheblicher Unterschied zwischen CD4 und CD8 Tresp in Bezug auf die Sekretion verschiedener Zytokine festzustellen. Die CD8 Treg Sub I+IV konnten die Sekretion der getesteten Zytokine durch stimulierte CD4 Tresp, nicht jedoch CD8 Tresp, aus naiven Mäusen von IL-2, IL-10 und TGF $\beta$ -1 minimal supprimieren. Eine mCMV-Infektion beeinflusst demnach auch die Expression von Zytokinen *in vitro*.

## **4.5. Genom-Datenbank der CD8 Treg**

Die bisherigen Daten haben gezeigt, dass CD4 und CD8 Treg Sub I+IV ein suppressives Potential *in vitro* aufweisen, welches von einer mCMV-Infektion beeinflusst wird. Es konnte zudem gezeigt werden, dass ein potenzieller suppressiver Mechanismus von Treg, die Freisetzung anti- und pro-inflammatorische Zytokine darstellt. Die Sekretion dieser variiert jedoch zwischen den Treg und wird zudem ebenfalls von einer mCMV-Infektion beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Augenmerk auf CD8 Treg des Phänotyps CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> (Sub I) gelegt. Retrospektive Analysen haben jedoch gezeigt, dass in früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe CD8 Treg des Phänotyps CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+/-</sup>CD127<sup>-</sup> (Sub I+IV) getestet wurden. Da es auch in der Literatur bislang keinen Konsens bezüglich der Oberflächenmarker von CD8 Treg gibt, wurde der Fokus für die Genom-Datenbank Analyse auf folgende Subpopulationen gelegt:

## Ergebnisse

CD8 Treg Sub I (CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>)

CD8 Treg Sub II (CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>)

CD8 Treg Sub III (CD8<sup>+</sup>CD122<sup>-</sup>PD-1<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>)

Es sollte dadurch geklärt werden, welche Gene sich zwischen den CD8 Treg Subpopulationen aus mCMV-infizierten und naiven Mäusen unterscheiden und exprimiert werden. Dafür wurden aus infizierten und naiven C57BL/6 Mäusen die Zellzahl aus einem Pool von Gesamtmilzen bestimmt (s. 3.3.1.1). Anschließend wurden mittels immunomagnetischer negativ-Selektion MagniSort (s. 3.3.3) die CD8 T-Zellen isoliert, gefolgt von einer zytofluorometrischen Zellsortierung der oben genannten Subpopulationen (s. **Tab. 8**). Die Treg wurden auf einer Zellzahl von mindestens  $1 \times 10^5$  eingestellt und als *dry pellet* der Translationalen Onkologie an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (TRON) übergeben, welche die Sequenzierung und RNA Datenbankgenerierung durchgeführt hat. Es wurden dabei je drei Proben der jeweiligen Gruppen aus mCMV-infizierten und naiven Mäusen abgegeben (s. **Tab. 8**).

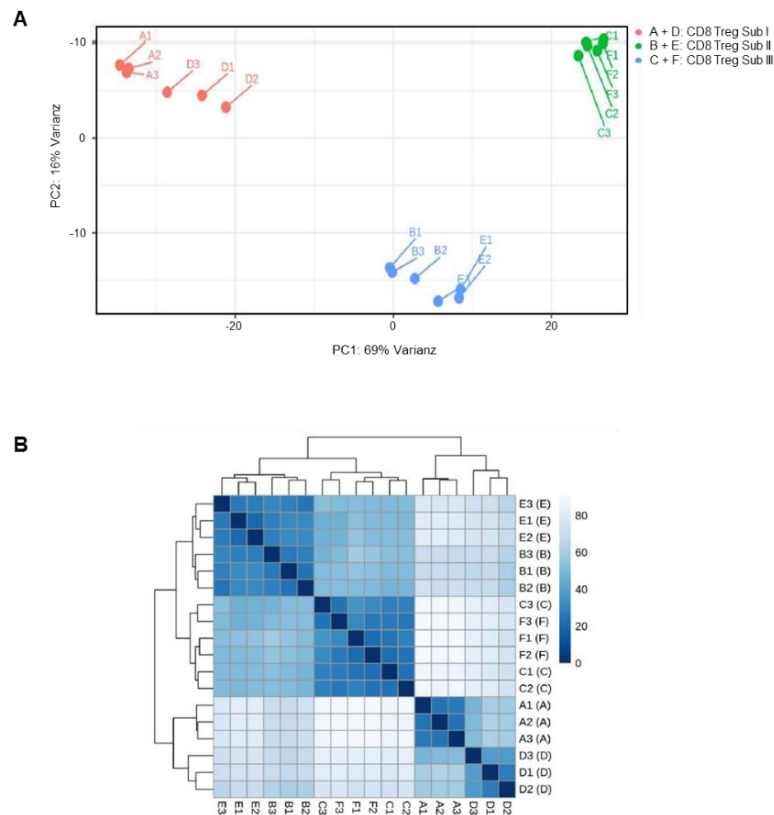
**Tab. 8: Gruppierung der RNA-Sequenzierungsdaten.**

	Gruppen	Proben		
<b>+ mCMV</b>	A (Sub I)	A1	A2	A3
	B (Sub II)	B1	B2	B3
	C (Sub III)	C1	C2	C3
<b>- mCMV</b>	D (Sub I)	D1	D2	D3
	E (Sub II)	E1	E2	E3
	F (Sub III)	F1	F2	F3

Es ist als erster Schritt essenziell, bei RNA-Sequenzierungsanalysen eine Übersicht darüber zu erhalten, ob sich die Proben in deren Varianzen ähneln oder unterscheiden. Um dies untersuchen zu können wurde eine Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*; PCA) durchgeführt (s. **Abb. 20A**). PCA ist ein Algorithmus in der Biometrie, in welchen eine Reihe von Beobachtungen korrelierter Variablen und deren Redundanz möglichst effektiv als Hauptkomponenten zusammengefasst wird (Wesche, Leyer & Wesche 2007). Dafür werden die Variablen in linear unkorrelierte Variablen mit Hilfe von orthogonalen Transformationen umgewandelt (Karamizadeh et al. 2013). Zudem werden alle Variablen vergleichbar, indem sie auf einem Mittelwert von null und einer Varianz von eins standardisiert werden (Karamizadeh et al. 2013). Es ist außerdem wichtig zu erkennen, ob es Hauptvariationsquellen im Datensatz gibt,

## Ergebnisse

um mögliche Probenausreißer zu identifizieren. Dafür wurde ein hierarchisches Clustering durchgeführt (s. **Abb. 20B**).



**Abb. 20: Übersicht der RNA-Sequenzierungsdaten.** CD8 Treg Subpopulationen I-III wurden aus 9 akut infizierte und 30 unbehandelte C57BL/6 Mäusen durch immunomagnetischer negativ-Selektion MagniSort, gefolgt von einer zytofluorometrischen Zellsortierung von CD8 Treg Sub I (CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>; Gruppe A und D), CD8 Treg Sub II (CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>; Gruppe B und E) und CD8 Treg Sub III (CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>-</sup>PD-1<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>; Gruppe C und F) gewonnen. **(A)** Die Hauptkomponentenanalyse zeigt in einem 2D-Graphen die Variablen (PC1 und PC2) der Gruppen an. Dabei sind Gruppen A+D in Rot, B+E in Blau und C+F in Grün dargestellt. **(B)** Das hierarchische Clustering zeigt durch ein Farbschema (dunkelblau = kein Unterschied; hellblau = starker Unterschied) die Hauptvariationsquellen in dem Datensatz an.

Durch die Hauptkomponentenanalyse (s. **Abb. 20A**) konnten die unterschiedlichen Variablen in zwei Hauptkomponenten (PC1: x-Achse und PC2: y-Achse) in einem 2D Diagramm zusammengefasst werden. Zunächst ist PC1 eine lineare Kombination aller abgegebenen Proben (s. **Tab. 8**), und widerspiegelt die gemeinsame Varianz aller 18 Proben. In diesem Fall bedeutet dies, dass die Varianz aller Proben 69% betrug. PC2 schneidet PC1 im rechten Winkel. Die Varianz dieser lag bei 9%. Aus diesen Ergebnissen ließ sich schließen, dass sich die jeweiligen identischen Subpopulationen, unabhängig von einer mCMV-Infektion, in ihren Varianzen sehr ähneln. Im Gegensatz dazu, unterschieden sich die Gruppen unterschiedlicher Subpopulationen voneinander. Jedoch gab dieses Ergebnis keine Information darüber, inwieweit sich diese in ihrem Phänotyp ähneln oder unterscheiden. Ein Überblick darüber konnte

durch das hierarchische Clustering (**Abb. 20B**) gewonnen werden. Dabei gab die Skala 0 (dunkelblau = kein Unterschied) bis 80 (hellblau = starker Unterschied) das Farbschema vor, inwieweit sich die verschiedenen Gruppen voneinander unterscheiden. Es konnte festgestellt werden, dass sich die Gruppen A und D (CD8 Treg Sub I) von Gruppe C und F (CD8 Treg Sub III) erheblich voneinander unterscheiden, da diese ein sehr hellblaues Farbschema aufwiesen. Wohingegen sich die Gruppen B und E (CD8 Treg Sub II) von Gruppe C und F (CD8 Treg Sub III) weniger stark voneinander unterscheiden (mittelblaues Farbschema).

Aufgrund dieser Beobachtungen und den vorherigen Erkenntnissen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Fokus zunächst auf die unterschiedliche Expression der Gene innerhalb der Gruppen A und D (CD8 Treg Sub I) gelegt, um zu klären, inwieweit eine mCMV-Infektion dies beeinflusst. Im Anschluss wurde der Fokus auf den Vergleich der Gruppen A (CD8 Treg Sub I) und C (CD8 Treg Sub III) gelegt, um mehr über die Subpopulationen in Bezug auf deren Genexpressionen erfahren zu können. Für eine übersichtliche Darstellung der Ergebnisse, wurden die RNA-Sequenzierungsdaten in je vier verschiedene Gruppen aufgeteilt: Zelltod (s. 4.5.1), Immun-Checkpoints (s. 4.5.2), inflammatorische Zytokine und Chemokine (s. 4.5.3) sowie Treg Marker und wichtige Regulatoren (s. 4.5.4).

### 4.5.1. Zelltod

Der Replikationszyklus von mCMV dauert ca. 24 Stunden. Aufgrund des langen Replikationszyklus und der anschließenden Latenz, ist es essentiell für Cytomegaloviren den frühzeitigen Zelltod effizient zu inhibieren (Handke et al. 2012, Oh et al. 2021). Das CMV muss dementsprechend der Induktion des Zelltods, eine Folge der Immunantwort, entgegenwirken (Handke et al. 2012, Oh et al. 2021). Der Zelltod kann in vier Hauptkategorien unterteilt werden: Apoptose, Nekroptose, Pyroptose und Parthanatos (Robinson et al. 2019, Tang et al. 2019, Oh et al. 2021). In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression verschiedener, am Zelltod beteiligter Gene (*kursiv*) von CD8 Treg Subpopulationen untersucht.

Apoptose: Der durch Apoptose vermittelte Zelltod ist Caspase-abhängig und beinhaltet einen zusätzlichen extrinsischen apoptotischen Signalweg, welcher durch den Tumor Nekrose Faktor (*Tnf*) stimuliert wird (Oh et al. 2021). Fas und sein Ligand (*FasL*) sind Mitglieder der TNF-Familie und initiieren unmittelbar Apoptose (Volpe et al. 2016). Zusätzlich dazu, gibt es noch einen weiteren Signalweg, welcher die T-Zell vermittelte Zytotoxizität sowie den Perforin-Granzym abhängigen Zelltod beinhaltet (Voskoboinik et al. 2010). Dieser Signalweg wird primär von zytotoxischen Lymphozyten verwendet, um virusinfizierte Zellen zu eliminieren. Der Perforin

(*prf1*) -Granzym Signalweg kann Apoptose entweder über Granzym A (*Gzma*) oder B (*Gzmb*) induzieren (Elmore 2007). Im Gegenzug dazu ist Granzym K (*Gzmk*) eine pro-apoptotische Serinprotease, welche intrazelluläre (z.B. Hemmung der Virusreplikation) sowie extrazelluläre (z.B. Regulierung einer pro-inflammatorischen Zytokinantwort) Mechanismen beinhaltet (Bouwman et al. 2021). *Suppressors of cytokine signalling* (SOCS) sind negative Regulatoren, welche an der Zytokin-induzierten Signaltransduktion beteiligt sind (Blalock et al. 2013). Diese spielen eine essentielle Rolle beim Zellwachstum und der Apoptose (Oh et al. 2009). Es wird vermutet, dass diese Proteine eine wichtige Rolle bei der Immunevasion von CMV spielen (Blalock et al. 2013).

Pyroptose: Der Signalweg der Pyroptose ist ebenfalls Caspase-abhängig und ist mit der Stimulation einer anhaltenden inflammatorischen Immunantwort assoziiert (Bergsbaken et al. 2009). Mit Hilfe der Bildung von Gasdermin-D (*Gsdmd*) vermittelten Membranporen, werden die pro-inflammatorischen Zytokine (IL-1b, IL-18) freigesetzt (Oh et al. 2021).

Nekroptose und Parthanatos: Diese Signalwege sind Caspase-unabhängig. Die Nekroptose ist eine Form der TNF $\alpha$ -induzierten programmierten Nekrose, welche durch die Wirkung von zwei Rezeptor-interagierenden Proteinkinasen (*RIP1*, *RIP3*) und deren Substrat *Mixed Lineage Kinase Domain-Like* (*Mkl*) reguliert wird (Upton et al. 2010, Chien & Dix 2012, Gong et al. 2017). Transkripte welche mit dem Parthanatos Signalwegs assoziiert sind, heißen Poly [ADP-Ribose] Polymerase 1 (*Parp1*) sowie Poly [ADP-Ribose] Glykohydrolase (*Parg*) (Oh et al. 2020). *Parp1* ist essenziell für die zelluläre Homöostase und ist dadurch an Krankheiten wie Schlaganfall, Myokardinfarkt und Parkinson beteiligt (David et al. 2009). Eine *Parp1* Überaktivierung führt zu Zelltod (David et al. 2009). Letzteres ist auf die Freisetzung des Apoptose induzierenden Faktor (AIF) aus den Mitochondrien zurückzuführen (David et al. 2009). Der Begriff Parthanatos geht auf den Namen „*Thanatos*“ zurück, eine Personifikation des Todes aus der griechischen Mythologie zur Beschreibung des Zelltods, welches durch das PAR-Polymer initiiert wird (Yu et al. 2006, David et al. 2009).

#### 4.5.1.1. Vergleich der Genexpression von CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten mit CD8 Treg Sub I aus naiven Mäusen

Die Expression der am Zelltod beteiligten Gene wurde zunächst in CD8 Treg Sub I mCMV-infizierter und naiver Tiere analysiert (s. **Abb. 21**). Die Ergebnisse wurden dabei als Säulendiagramm (s. **Abb. 21A**) dargestellt, um einen Überblick der exprimierten Gene zu erhalten. Für weitere detailliertere Analysen der Lage- und Streuung wurden die

RNA-Sequenzierungsdaten als Kastengraphiken (s. **Abb. 21B**) dargestellt, um signifikante Unterschiede feststellen zu können.

Durch die Darstellung des Säulendiagramms (s. **Abb. 21A**) konnte festgestellt werden, dass sich die am Zelltod beteiligten Gene von CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten mit CD8 Treg Sub I aus naiven Mäusen kaum in ihrer Expression unterscheiden. Wobei die Genexpression von *Gzma* der CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen um das 6-fache, *Gzmb* um das 4,5-fache und *Gzmk* um das 2,4-fache höher war als bei den CD8 Treg Sub I aus naiven Mäusen. Diese Darstellung gab jedoch keine Information darüber ob sich diese Gene auch signifikant voneinander unterscheiden. Zudem konnte durch die einheitliche Skalierung des Säulendiagramms keine weiteren Unterschiede in der Genexpression beobachtet werden. Hingegen konnte durch die Darstellung der RNA-Sequenzierungsdaten in separaten Kastengraphiken (s. **Abb. 21B**) folgendes beobachtet werden:

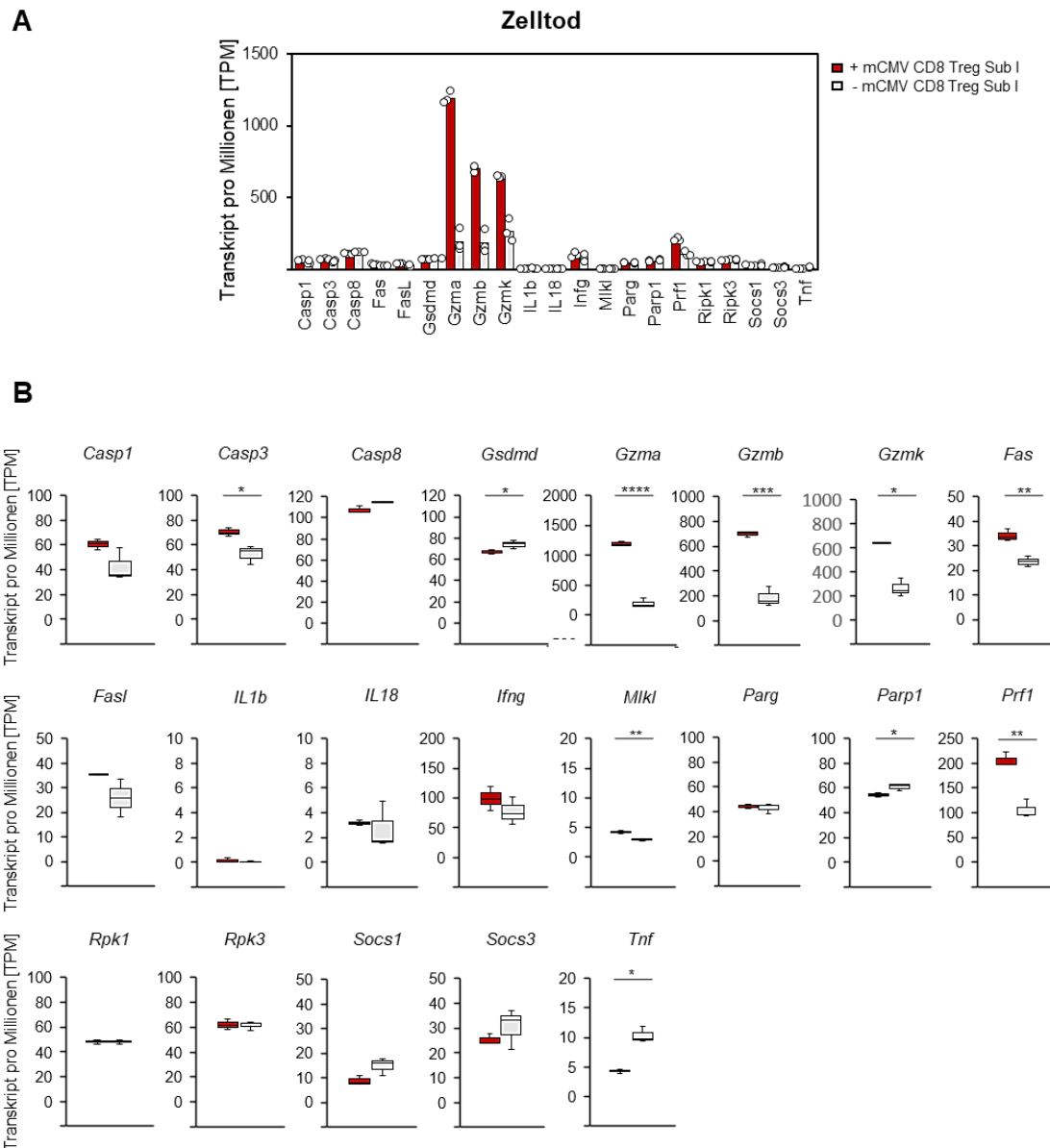
Signifikant höhere Expression folgender Gene von CD8 Treg Sub I aus **naiven** Mäusen im Vergleich mit CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen:

- *Gsdmd* [t(4) = -2,86; p < 0,05]
- *Parp1* [t(4) = -3,28; p < 0,05]
- *Tnf* [t(2) = -7,35; p < 0,05]

Signifikant höhere Expression folgender Gene von CD8 Treg Sub I aus **mCMV-infizierten** Mäusen im Vergleich mit CD8 Treg Sub I aus naiven Mäusen:

- *Casp3* [t(4) = 3,63; p < 0,05]
- *Gzma* [t(4) = 19,38; p < 10<sup>-4</sup>]
- *Gzmb* [t(4) = 10,42; p < 10<sup>-3</sup>]
- *Gzmk* [t(2) = 0,007; p < 0,05]
- *Fas* [t(4) = 5,61; p < 10<sup>-2</sup>]
- *Mkl1* [t(4) = 7,49; p < 10<sup>-2</sup>]
- *Prf1* [t(4) = 7,58; p < 10<sup>-2</sup>]

Die restlichen Gene zeigten keinen signifikanten Unterschied.



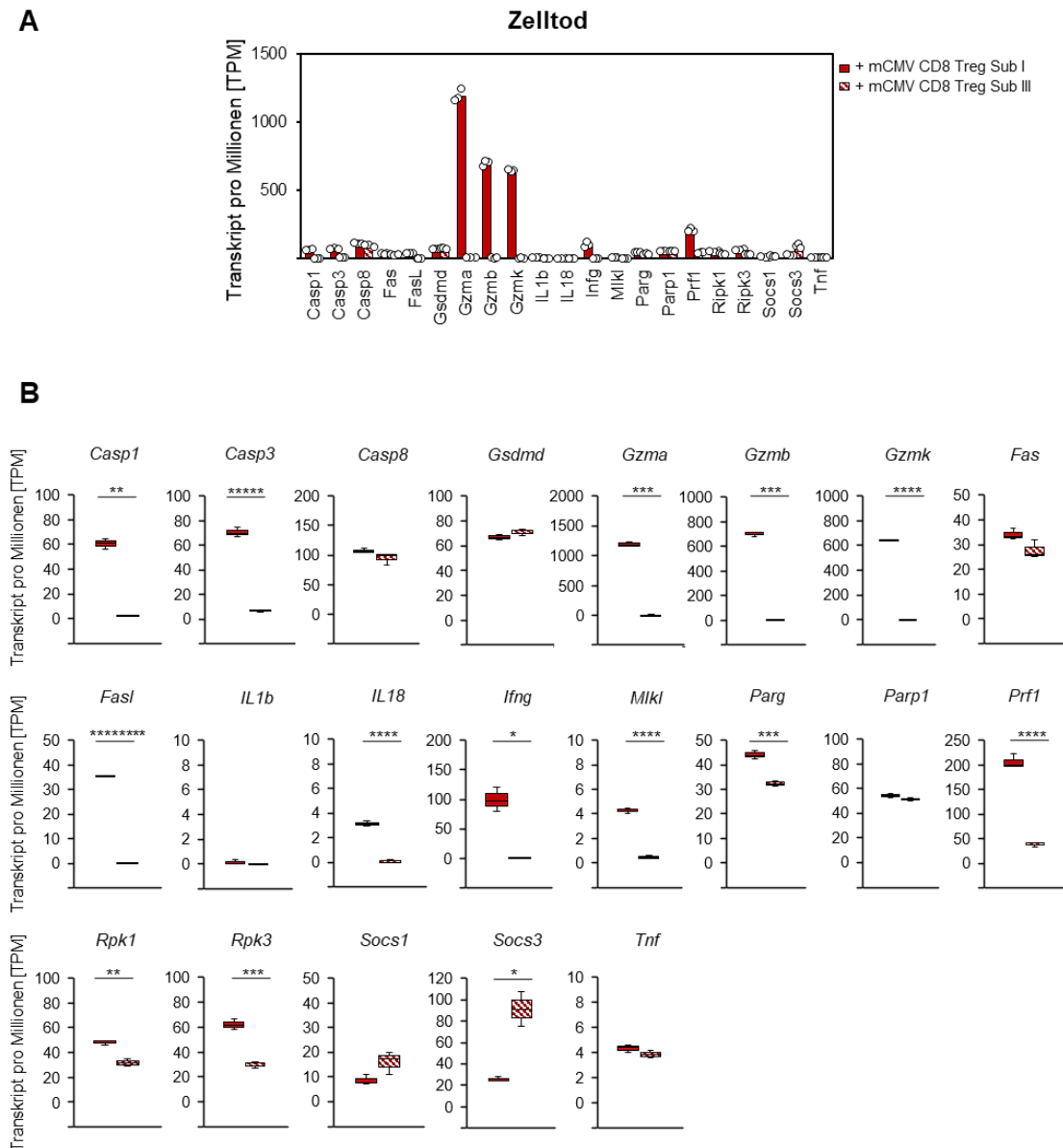
**Abb. 21: Expression der am Zelltod beteiligten Gene in CD8 Treg Sub I mCMV-infizierter und naiver Mäuse.** CD8 Treg Sub I wurden durch immunomagnetische negativ-Selektion von CD8 T-Zellen gewonnen, gefolgt von einer zytofluorometrischen Zellsortierung von CD8 Treg Sub I (CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>; Gruppe A und D) aus 9 akut infizierten bzw. 30 unbehandelten C57BL/6 Mäusen. **(A)** Säulendiagramm der am Zelltod beteiligten Gene wurden als Transkript pro Millionen reads [TPM] angegeben. Die Säulen stellen die Mittelwerte der drei Proben von CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten (rot) und naiven Mäusen (hellgrau) dar, die weißen Kreise symbolisieren die Einzelwerte der jeweiligen Proben. **(B)** Kastengraphiken der am Zelltod beteiligten Gene zeigt das 1. und 3. Quartil, sowie den Median als Transkript pro Millionen reads [TPM] an. Für den Vergleich zweier Versuchsgruppen wurde der p-Wert mit dem Zweistichproben t-Test bestimmt. Ein p-Wert <0,05 zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an, dabei bedeutet \* p < 0,05; \*\* p < 10<sup>-2</sup>; \*\*\* p < 10<sup>-3</sup>; \*\*\*\* p < 10<sup>-4</sup>.

Schlussfolgerung:

Es gab signifikante Unterschiede in der Expression der am Zelltod beteiligten Gene von CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten und naiven Mäusen. Allen voran, exprimierten CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen ausschließlich Gene, welche für eine Initiierung der Apoptose verantwortlich sind.

### 4.5.1.2. Vergleich der Genexpression von CD8 Treg Sub I mit CD8 Treg Sub III aus mCMV-infizierten Mäusen

Die Expression der am Zelltod beteiligten Genen wurde von CD8 Treg Sub I mit CD8 Treg Sub III aus mCMV-infizierten Mäusen analysiert (s. **Abb. 22**). Die Ergebnisse wurden dabei als Säulendiagramm (s. **Abb. 22A**) und Kastengraphiken (s. **Abb. 22B**) dargestellt.



**Abb. 22: Expression der am Zelltod beteiligten Gene in CD8 Treg Sub I mit CD8 Treg Sub III mCMV-infizierter Mäuse.** CD8 Treg Sub I und III wurden durch immunomagnetische negativ-Selektion von CD8 T-Zellen gewonnen, gefolgt von einer zytofluorometrischen Zellsortierung von CD8 Treg Sub I (CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>; Gruppe A) und CD8 Treg Sub III (CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>; Gruppe C) aus je 9 akut infizierten C57BL/6 Mäusen. **(A)** Säulendiagramm der am Zelltod beteiligten Gene wurden als Transkript pro Millionen *reads* [TPM] dargestellt. Die Säulen stellen die Mittelwerte der Proben von CD8 Treg Sub I (rot) und III (rot-weiß gestreift) aus mCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen dar, die weißen Kreise symbolisieren die Einzelwerte der jeweiligen Proben. **(B)** Kastengraphiken zeigen das 1. und 3. Quartil, sowie den Median als Transkript pro Millionen *reads* [TPM] an. Für den Vergleich zweier Versuchsgruppen wurde der p-Wert mit dem Zweistichproben t-Test bestimmt. Ein p-Wert <0,05 zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an. \* p < 0,05; \*\* p < 10<sup>-2</sup>; \*\*\* p < 10<sup>-3</sup>; \*\*\*\* p < 10<sup>-4</sup>; \*\*\*\*\* p < 10<sup>-5</sup>; \*\*\*\*\*) p < 10<sup>-6</sup>; \*\*\*\*\*) p < 10<sup>-7</sup>; \*\*\*\*\*) p < 10<sup>-8</sup>.

Durch die Darstellung des Säulendiagramms (s. **Abb. 22A**) konnte festgestellt werden, dass sich die am Zelltod beteiligten Gene von CD8 Treg Sub I mit CD8 Treg Sub III aus mCMV-infizierten Mäusen kaum in ihrer Expression unterscheiden. Wobei die Genexpression von *Gzma* der CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen um das 170-fache, *Gzmb* um das 200-fache und *Gzmk* um das 244-fache höher war als bei den CD8 Treg Sub III. Dieser Unterschied konnte auch bei *Prf1* beobachtet werden (CD8 Treg Sub I: 5,3-fach höher als CD8 Treg Sub III). Diese Darstellung gab jedoch keine Information darüber ob sich diese Gene auch signifikant voneinander unterscheiden. Um dies zu klären, wurden die RNA-Sequenzierungsdaten in separate Kastengraphiken (s. **Abb. 22A**) dargestellt. Es konnte folgendes beobachtet werden:

Signifikant höhere Expression folgender Gene der **CD8 Treg Sub I** im Vergleich mit CD8 Treg Sub III aus mCMV-infizierten Mäusen:

- *Casp1* [t(2) = 25,46; p < 10<sup>-2</sup>]
- *Casp3* [t(4) = 30,78; p < 10<sup>-5</sup>]
- *Gzma* [t(2) = 47,68; p < 10<sup>-3</sup>]
- *Gzmb* [t(2) = 54,29; p < 10<sup>-3</sup>]
- *Gzmk* [t(2) = 214,27; p < 10<sup>-4</sup>]
- *Fasl* [t(4) = 161,52; p < 10<sup>-8</sup>]
- *Irfg* [t(2) = 8,38; p < 0,05]
- *IL18* [t(4) = 21,47; p < 10<sup>-4</sup>]
- *Mkl1* [t(2) = 25,45; p < 10<sup>-4</sup>]
- *Parg* [t(2) = 10,42; p < 10<sup>-3</sup>]
- *Prf1* [t(4) = 19,57; p < 10<sup>-4</sup>]
- *Rpk1* [t(4) = 7,71; p < 10<sup>-2</sup>]
- *Rpk3* [t(4) = 11,57; p < 10<sup>-3</sup>]

Signifikant höhere Expression folgender Gene der **CD8 Treg Sub III** im Vergleich mit CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen:

- *Socs3* [t(2) = -7,03; p < 0,05].

### Schlussfolgerung:

In allen vier Hauptkategorien des Zelltods lag die Expression der analysierten Gene von CD8 Treg Sub III im Vergleich mit den CD8 Treg Sub I signifikant niedriger, außer bei *Socs3*.

#### 4.5.2. Immun-Checkpoint

Treg können entweder schützend (Regulation der Immunhomöostase) oder suppressiv (Inhibierung der Immunantworten bei verschiedenen Krankheiten) wirken. Daher sind Immun-Checkpoints (ICs) essenziell für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase, sowie bei der Verhinderung von Autoimmunität (Marin-Acevedo et al. 2018). ICs werden von T-Lymphozyten exprimiert und sind membranständige Rezeptoren, welche die Immunreaktion entweder pro- oder anti-inflammatorisch regulieren (Wykes & Lewin 2018). Diese beiden Wege sind notwendig für die Regulierung der Dauer, der Art sowie dem Ausmaß einer Immunantwort (Marin-Acevedo et al. 2018). In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression verschiedener, an ICs beteiligten Gene (*kursiv*), von CD8 Treg Subpopulationen untersucht.

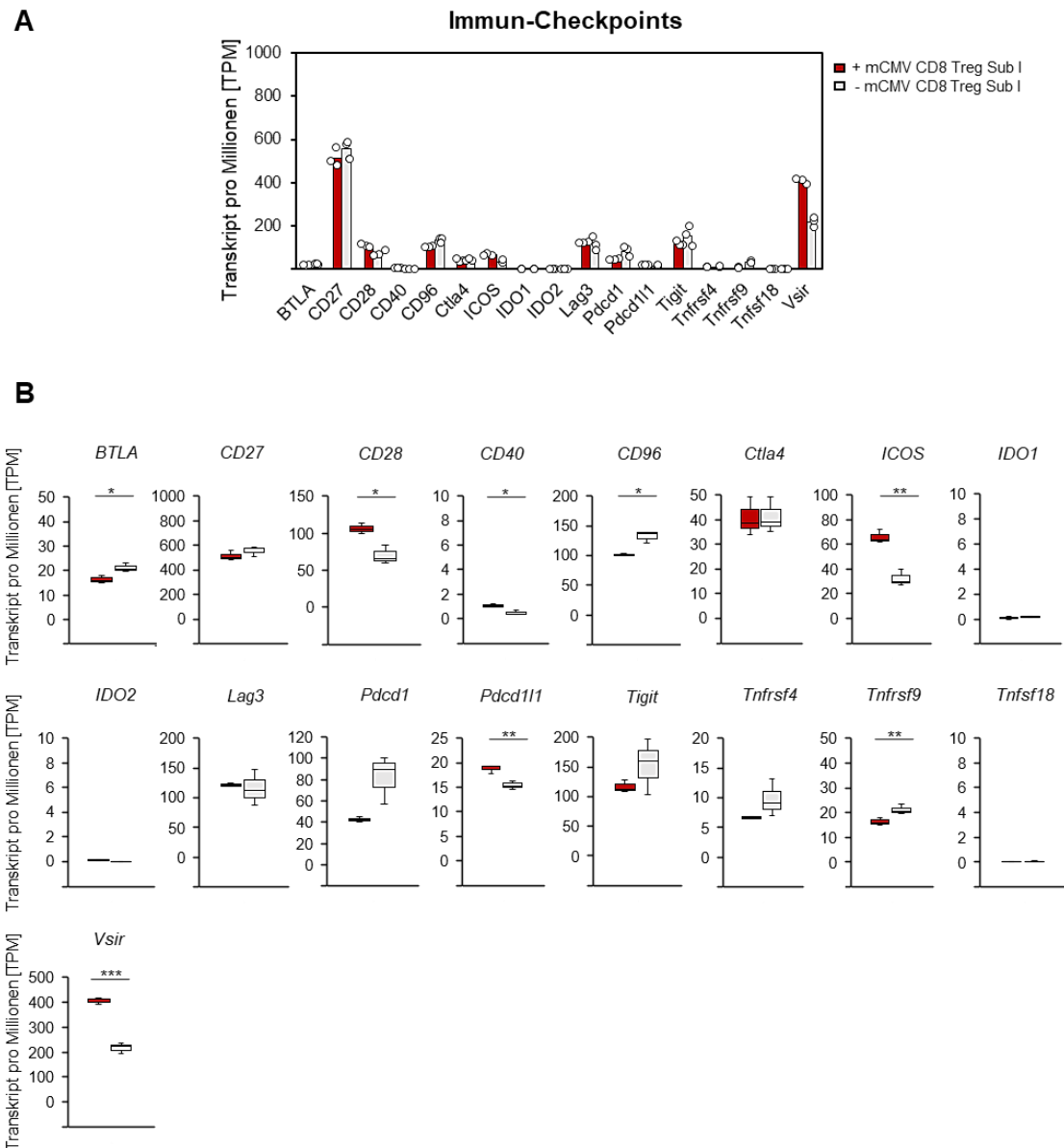
Anti-inflammatorische Regulation: Zu den T-Zell assoziierten inhibitorischen Molekülen gehört unter anderem das *Lymphocyte activation gene 3 (Lag3)* Gen. Es spielt bei der negativen Regulierung der Zellproliferation und Aktivierung von T-Zellen eine fundamentale Rolle, um Gewebeschäden und Autoimmunität zu verhindern (Marin-Acevedo et al. 2018). Der T-Zell Immunrezeptor mit Ig- und ITIM Domänen (*Tigit*) ist Teil der CD28 Familie und auf NK-Zellen sowie T-Zellen exprimiert. *Tigit* übt eine direkte immunsuppressive Wirkung auf diese Zellen aus und erhöht dadurch die Ausschüttung immunregulatorischer Zytokine (Marin-Acevedo et al. 2018). Der V-domain Ig Suppressor der T-Zell Aktivierung (*Visir*) verhält sich einerseits wie ein stimulatorischer Ligand für APCs indem er eine Immunaktivierung auslöst und andererseits als ein negativer Ligand für T-Zellen, indem er die Aktivierung und Proliferation sowie die Zytokinproduktion supprimiert (Lines et al. 2014). Der B- und T-Zell Attenuator (*BTLA*) wurde als das dritte Mitglied der CD28 Familie entdeckt (Yu et al. 2019). Der Herpesvirus-Eintrittsmediator (HVEM) wurde als spezifischer Ligand für *BTLA* identifiziert (Wegiel et al. 2008, Marin-Acevedo et al. 2018, Yu et al. 2019). Studien zeigten, dass virusspezifische T-Zellen eine sehr hohe Expression von *BTLA* aufweisen (Yu et al. 2019). Durch die Ligation von *BTLA* durch sein Ligand HVEM, kommt es zu einer Inhibition der B- und T-Zell Aktivierung, Proliferation und Zytokinproduktion (Marin-Acevedo et al. 2018, Yu et al. 2019). Um eine Autoimmunität vorzubeugen, regulieren zahlreiche Signalwege die Aktivierung von T-Zellen während einer Immunantwort, welches als periphere Toleranz bezeichnet wird (Fife & Bluestone 2008, Guo et al. 2019). In diesem Teil der Immuntoleranz, regulieren hauptsächlich das T-Lymphozyt-assoziierte Antigen 4 (*Ctla4*) sowie „programmed cell death protein 1“ (*pdc1*) die Signalwege der ICs. *Ctla4* und *pdc1* sind beide Mitglieder der CD28 Familie (Guo et al. 2019). *Pdc1* reguliert die T-Zell Aktivierung durch die Bindung an seinen Liganden (*pdc111*) (Ribas &

Wolchok 2018, Guo et al. 2019). Beide Gene inhibieren die T-Zell Proliferation sowie die IFN $\gamma$ , Tnf und IL-2 Produktion (Buchbinder & Desai 2016, Guo et al. 2019). Das „*Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor protein*; GITR“ (tnfsf18) ist ein IC, welcher permanent von Treg Zellen exprimiert wird (Amoozgar et al. 2021). Durch die Aktivierung seines Liganden wird die Zell- und Effektorfunktion erhöht (Amoozgar et al. 2021). Eine GITR-Stimulation in Treg Zellen führt zur Instabilität sowie Erschöpfung der Treg Zellen und hemmt die suppressive Funktion der Treg (Coe et al. 2010, Amoozgar et al. 2021).

Pro-inflammatorische Regulation: Im Gegensatz zu der anti-inflammatorischen Regulation, welche die Immunreaktion abschwächen, verstärken die pro-inflammatorischen Moleküle die Immunreaktion gegen beispielsweise maligne Zellen (Marin-Acevedo et al. 2018). CD134 oder OX40 (*Tnfrsf4*) ist Mitglied der TNF-Familie und wird von CD4 und CD8 T-Zellen, sowie von Treg exprimiert (Marin-Acevedo et al. 2018). Es spielt zusammen mit seinem Liganden eine essenzielle Rolle bei der Aktivierung, Proliferation und dem Überleben der T-Zellen (Marin-Acevedo et al. 2018). CD278 oder *inducible T cell costimulator (ICOS)* wird spezifisch von CD4 T-Zellen exprimiert und ist verantwortlich für die Proliferation und Zytokinproduktion dieser Zellen. Studien fanden heraus, dass CD287 die Entstehung der CD4 Treg fördert, indem die Apoptose in CD4 T-Zellen reduziert wurde (Zheng et al. 2013a). CD137 (*Tnfrsf9*) wird von T-Zellen, NK-Zellen und APCs exprimiert (Marin-Acevedo et al. 2018). Sobald CD137 an seinen Liganden bindet, löst es unmittelbar eine Immunproliferation und Aktivierung von ausschließlich NK-Zellen und T-Zellen aus (Marin-Acevedo et al. 2018). CD27 ist Mitglied der TNF-Familie und führt durch die Bindung an seinen Liganden zur Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen in Effektor und Gedächtniszellen, sowie zur Stärkung von B-Zellen (Marin-Acevedo et al. 2018). Indoleamine 2,3-dioxygenase (*IDO*) ist ein Tryptophan abbauendes Enzym, welches Tryptophan in Kynurenin umwandelt (Marin-Acevedo et al. 2018). Letzteres fördert die Differenzierung von Treg und verringert die Aktivität von CD8 T-Zellen, was zu einem immunsupprimierenden Milieu führt (Moon et al. 2015, Marin-Acevedo et al. 2018). CD40 gehört zur TNF-Familie und spielt zusammen mit seinem Liganden eine entscheidende Rolle bei verschiedenen immunologischen Prozessen, welche sowohl zum humoralen als auch zum zellvermittelten Immunsystem beitragen (Tang et al. 2021). CD96 ist Mitglied der Ig-Superfamilie und wird primär von T-Zellen exprimiert (Dougall et al. 2017). CD96 und *Tigit* wirken zusammen mit dem kostimulatorischen Rezeptor CD226 als ko-inhibitorische Rezeptoren (Liu et al. 2020).

### 4.5.2.1. Vergleich der Genexpression von CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten mit CD8 Treg Sub I aus naiven Mäusen

Die Expression der an den ICs beteiligten Genen, wurde zunächst in CD8 Treg Sub I mCMV-infizierter und naiver Tiere analysiert (s. **Abb. 23**). Die Ergebnisse wurden dabei als Säulendiagramm (s. **Abb. 23A**) und Kastengraphiken (s. **Abb. 23B**) dargestellt.



**Abb. 23: Expression der am Immun-Checkpoint beteiligten Genen in CD8 Treg Sub I mCMV-infizierter und naiver Mäuse.** CD8 Treg Sub I wurden durch immunomagnetische negativ-Selektion von CD8 T-Zellen gewonnen, gefolgt von einer zytofluorometrischen Zellsortierung von CD8 Treg Sub I (CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>; Gruppe A und D) aus 9 akut infizierten bzw. 30 unbehandelten C57BL/6 Mäusen. **(A)** Säulendiagramm der an ICs beteiligten Gene wurden als Transkript pro Millionen reads [TPM] angegeben. Die Säulen stellen die Mittelwerte der drei Proben von CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten (rot) und naiven Mäusen (hellgrau) dar, die weißen Kreise symbolisieren die Einzelwerte der jeweiligen Proben. **(B)** Kastengraphiken der an ICs beteiligten Gene zeigt das 1. und 3. Quartil, sowie den Median als Transkript pro Millionen reads [TPM] an. Für den Vergleich zweier Versuchsgruppen wurde der p-Wert mit dem Zweistichproben t-Test bestimmt. Ein p-Wert <0,05 zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an, dabei bedeutet \* p < 0,05; \*\* p < 10<sup>-2</sup>.

Durch die Darstellung der Ergebnisse in einem Säulendiagramm (s. **Abb. 23A**), konnte festgestellt werden, dass sich die Genexpressionen von CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten mit CD8 Treg Sub I aus naiven Mäusen nicht voneinander unterscheidet, mit der Ausnahme des Gens *visir*. Die Expression von *visir* wurde von den CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen um das 2-fache stärker exprimiert als aus naiven Mäusen. Im Gegenzug dazu, konnten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen durch die Darstellung der Kastengraphiken (s. **Abb. 23A**) beobachtet werden:

Signifikant höhere Expression folgender Gene von CD8 Treg Sub I aus **naiven** Mäusen im Vergleich mit CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen:

- *BTLA* [t(4) = -3,38; p < 0,05]
- *CD96* [t(2) = -5,29; p < 0,05]
- *Tnfrsf9* [t(4) = -6,72; p < 10<sup>-2</sup>]

Signifikant höhere Expression folgender Gene von CD8 Treg Sub I aus **mCMV-infizierten** Mäusen im Vergleich mit CD8 Treg Sub I aus naiven Mäusen:

- *Pdcd111* [t(4) = 4,92; p < 10<sup>-2</sup>]
- *Visir* [t(4) = 13,49; p < 10<sup>-3</sup>]
- *CD28* [t(4) = 4,36; p < 0,05]
- *CD40* [t(4) = 4,44; p < 0,05]
- *ICOS* [t(4) = 6,84; p < 10<sup>-2</sup>]

Die restlichen Gene zeigten keinen signifikanten Unterschied.

### Schlussfolgerung:

Es konnten signifikante Unterschiede von CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten mit CD8 Treg Sub I aus naiven Mäusen beobachtet werden. Dabei exprimierten CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen ICs, welche hauptsächlich an einer anti-inflammatorischen Regulation beteiligt sind.

#### 4.5.2.2. Vergleich der Genexpression von CD8 Treg Sub I mit CD8 Treg Sub III aus mCMV-infizierten Mäusen

Die Expression der an den ICs beteiligten Genen wurde von CD8 Treg Sub I mit CD8 Treg Sub III aus mCMV-infizierten Mäusen analysiert (s. **Abb. 24**). Die Ergebnisse wurden dabei als Säulendiagramm (s. **Abb. 24A**) und Kastengraphiken (s. **Abb. 24B**) dargestellt.

Durch die Darstellung des Säulendiagramms (s. **Abb. 24A**) konnte festgestellt werden, dass sich die Gene von CD8 Treg Sub I mit CD8 Treg Sub III aus mCMV-infizierten Mäusen kaum in ihrer Expression unterscheiden. Wobei die Genexpression der CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen von *CD28* um das 3,6-fache, *Lag3* um das 115-fache, *Tigit* um das 29-fache und *Visir* um das 1,4-fache höher als bei den CD8 Treg Sub III lag. Diese Darstellung gab jedoch keine Information darüber, ob sich diese Gene auch signifikant voneinander unterscheiden. Um dies zu klären, wurden die RNA-Sequenzierungsdaten in separate Kastengraphiken (s. **Abb. 24B**) dargestellt. Es konnte folgendes beobachtet werden:

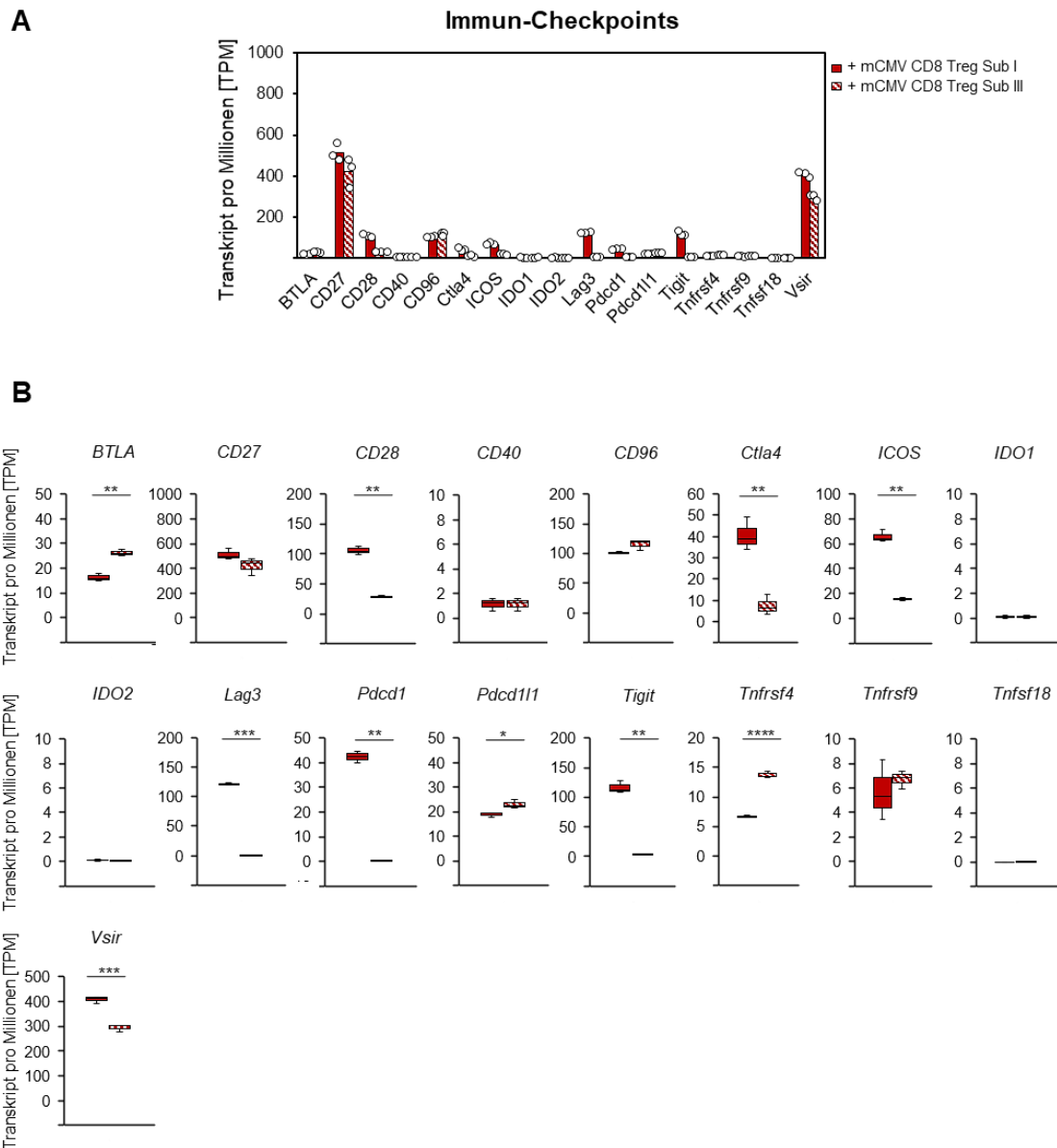
Signifikant höhere Expression folgender Gene der **CD8 Treg Sub I** im Vergleich mit CD8 Treg Sub III aus mCMV-infizierten Mäusen:

- *CD28* [t(2) = 18,82; p < 10<sup>-2</sup>]
- *Ctla4* [t(4) = 6,28; p < 10<sup>-2</sup>]
- *ICOS* [t(2) = 16,43; p < 10<sup>-2</sup>]
- *Lag3* [t(2) = 83,27; p < 10<sup>-3</sup>]
- *Pdcd1* [t(2) = 31,12; p < 10<sup>-2</sup>]
- *Tigit* [t(2) = 19,21; p < 10<sup>-2</sup>]
- *Vsir* [t(4) = 10,12; p < 10<sup>-3</sup>]

Signifikant höhere Expression folgender Gene der **CD8 Treg Sub III** im Vergleich mit CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen:

- *BTLA* [t(4) = -7,83; p < 10<sup>-2</sup>]
- *Pdcd111* [t(4) = -4,04; p < 0,05]
- *Tnfrsf4* [t(4) = -19,76; p < 10<sup>-4</sup>]

Die restlichen Gene zeigten keinen signifikanten Unterschied.



**Abb. 24: Expression der am Immun-Checkpoint beteiligten Gene der CD8 Treg Sub I und CD8 Treg Sub III aus mCMV-infizierten Mäusen.** CD8 Treg Sub I und III wurden durch immunomagnetische negativ-Selektion von CD8 T-Zellen gewonnen, gefolgt von einer zytofluorometrischen Zellsortierung von CD8 Treg Sub I (CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>; Gruppe A) und CD8 Treg Sub III (CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>; Gruppe C) aus je 9 akut infizierten C57BL/6 Mäusen. **(A)** Säulendiagramm der an IC beteiligten Genen wurden als Transkript pro Millionen *reads* [TPM] dargestellt. Die Säulen stellen die Mittelwerte der abgegebenen Proben von CD8 Treg Sub I (rot) und CD8 Treg Sub III (rot-weiß gestreift) aus mCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen dar, die weißen Kreise symbolisieren die Einzelproben der jeweiligen Proben. **(B)** Kastengraphiken zeigen das 1. und 3. Quartil, sowie den Median der jeweiligen Proben als Transkript pro Millionen *reads* [TPM] an. Für den Vergleich zweier Versuchsgruppen wurde der p-Wert mit dem Zweistichproben t-Test bestimmt. Ein p-Wert <0,05 zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an. \* p < 0,05; \*\* p < 10<sup>-2</sup>; \*\*\* p < 10<sup>-3</sup>; \*\*\*\* p < 10<sup>-4</sup>.

Schlussfolgerung:

Es konnten signifikante Unterschiede von CD8 Treg Sub I mit CD8 Treg Sub III aus mCMV-infizierten Mäusen beobachtet werden. Dabei exprimierten CD8 Treg Sub I die ICs welche hauptsächlich an einer anti-inflammatorischen Regulation beteiligt sind, signifikant stärker als CD8 Treg Sub III.

### 4.5.3. Inflammatorische Zytokine und Chemokine

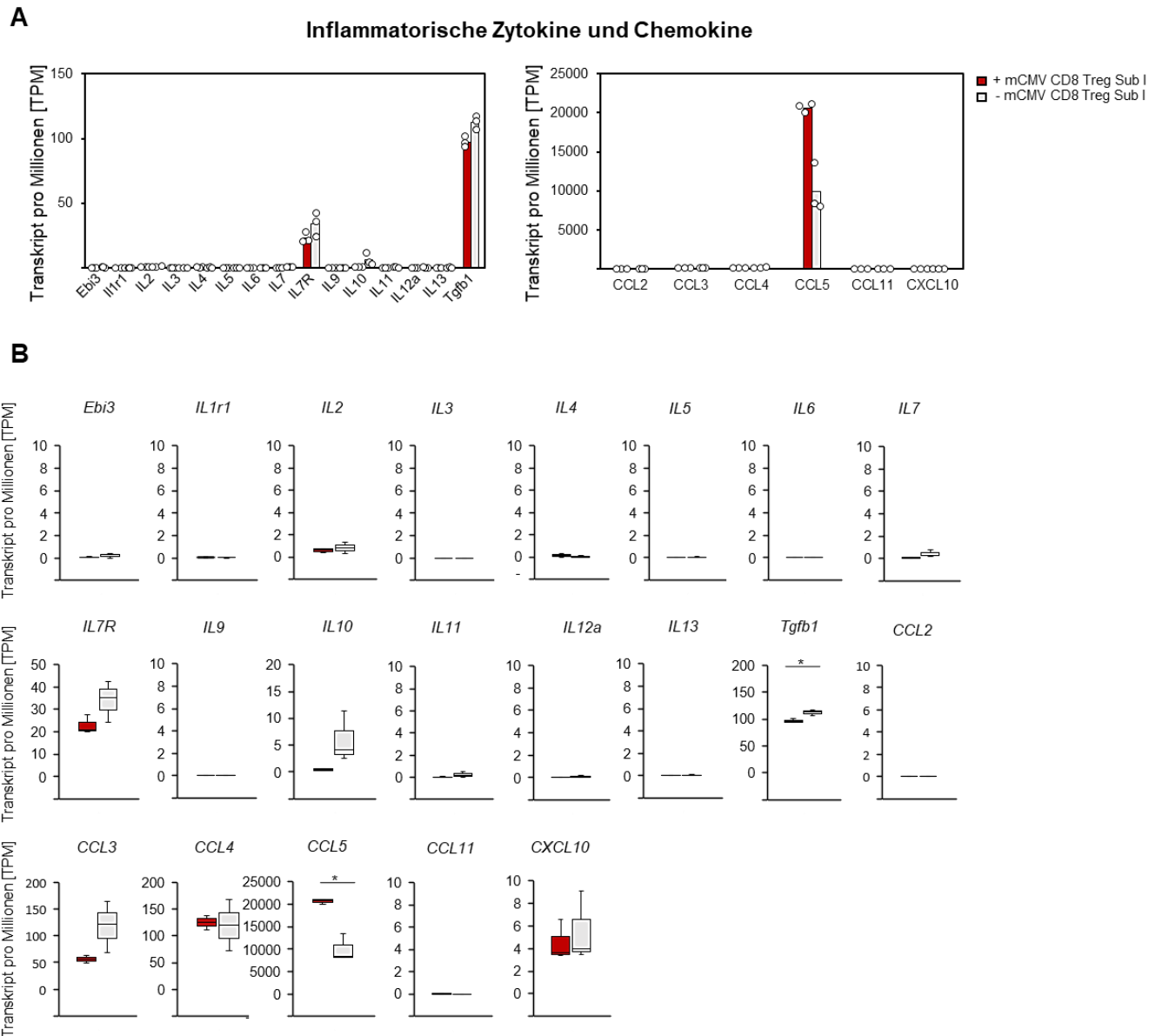
Zytokine, aber auch Chemokine sind sekretierte Proteine, welche das Zellwachstum, Differenzierung, Proliferation aber auch den programmierten Zelltod regulieren können (Borish & Steinke 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression verschiedener Zytokine und Chemokine von CD8 Treg Subpopulationen untersucht (s. **Tab. 9**).

**Tab. 9: Pro und anti-inflammatorische Zytokin und Chemokin-Regulation.**

	Zytokin/Chemokin	Funktion
<b>Anti-inflammatorisch</b>	IL-1R1	Inhibitor der IL-1 $\alpha$ und IL-1 $\beta$ vermittelten Zellaktivierung
	IL-4	Förderung der Entwicklung von Th2 Lymphozyten; Wachstum und Differenzierungsfaktor für B-Zellen
	IL-6	Inhibition der TNF und IL-1 Produktion durch Makrophagen
	IL-10	Inhibition der Zytokinproduktion von Monozyten/Makrophagen, Neutrophilen und T-Zellen
	IL-11	Hemmung der pro-inflammatorische Zytokinantwort durch Monozyten/Makrophagen; Förderung der Th2 Lymphozytenantwort
	IL-13	Inhibition der Zytokinproduktion von Monozyten/Makrophagen
	TGF $\beta$ -1	Suppression der Zytokinproduktion durch Inhibition der Makrophagen und Th1 Zellaktivität
<b>Pro-inflammatorisch</b>	IL-2	Wachstumsfaktor für T-, NK- und B-Zellen; Steigerung der zytotoxischen Aktivität von CD8 T-Zellen
	IL-3	Förderung der Stimulation von Proliferation und Differenzierung in Knochenmarkzellen
	IL-5	Ko-Stimulator der T-Zellen
	IL-7/IL-7R	Stimulation des Wachstums von B- und T-Lymphozyten
	IL-9	Regulation der Hämatopoese
	IL-12/Ebi3 (IL-35)	Induktion der IFN $\gamma$ Produktion von T- und NK-Zellen; Aktivierung zytotoxischer T-Zellen
<b>Chemokine</b>	CCL3	Beteiligung an Inflammatorischen Prozessen
	CCL4	Enthalten in zytotoxischen T-Zellen mit geringer Perforin Expression
	CCL5	Bildung von zytotoxischen T-Zellen und Bindung an T-Zellen
	CCL11	Beteiligung an inflammatorischen Prozessen
	CXCL10	Beteiligung an der Immunantwort

### 4.5.3.1. Vergleich der Genexpression von CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten mit CD8 Treg Sub I aus naiven Mäusen

Die Zytokin- und Chemokin Expression wurde zunächst in CD8 Treg Sub I mCMV-infizierter und naiver Tiere analysiert (s. **Abb. 25**). Die Ergebnisse wurden dabei als Säulendiagramm (s. **Abb. 25A**) und Kastengraphiken (s. **Abb. 25B**) dargestellt.



**Abb. 25: Zytokin und Chemokin-Expression von CD8 Treg Sub I mCMV-infizierter und naiver Mäuse.** CD8 Treg Sub I wurden durch immunomagnetische negativ-Selektion von CD8 T-Zellen gewonnen, gefolgt von einer zytofluorometrischen Zellsortierung von CD8 Treg Sub I (CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>; Gruppe A und D) aus 9 akut infizierten bzw. 30 unbehandelten C57BL/6 Mäusen. **(A)** Säulendiagramm der Zytokin und Chemokin beteiligten Gene wurden als Transkript pro Millionen reads [TPM] angegeben. Die Säulen stellen die Mittelwerte der drei Proben von CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten (rot) und naiven Mäusen (hellgrau) dar, die weißen Kreise symbolisieren die Einzelwerte der jeweiligen Proben. **(B)** Kastengraphiken der Zytokin und Chemokin beteiligten Gene zeigt das 1. und 3. Quartil, sowie den Median als Transkript pro Millionen reads [TPM] an. Für den Vergleich zweier Versuchsgruppen wurde der p-Wert mit dem Zweistichproben t-Test bestimmt. Ein p-Wert <0,05 zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an. Dabei bedeutet \* p < 0,05.

Durch die Darstellung der Ergebnisse in einem Säulendiagramm (s. **Abb. 25A**), konnte festgestellt werden, dass sich die Genexpressionen der Zytokine und Chemokine von CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten mit CD8 Treg Sub I aus naiven Mäusen nicht voneinander unterscheiden, mit der Ausnahme des Chemokins *CCL5*. Die Expression von *CCL5* wurde von den CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen um das 2-fache stärker exprimiert als aus naiven Mäusen. Durch die Darstellung der Kastengraphik (s. **Abb. 25B**) konnte folgendes festgestellt werden:

Signifikant höhere Expression folgender Gene von CD8 Treg Sub I aus **naiven** Mäusen im Vergleich mit CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen:

- *tgfb1* [t(4) = -4,22; p < 0,05]

Signifikant höhere Expression folgender Gene von CD8 Treg Sub I aus **mCMV-infizierten** Mäusen im Vergleich mit CD8 Treg Sub I aus naiven Mäusen:

- *CCL5* [t(2) = 5,90; p < 0,05]

Die restlichen Gene zeigten keinen signifikanten Unterschied in ihrer Expression.

### Schlussfolgerung:

Die Expression der Zytokine und Chemokine von CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten und naiven Mäusen unterscheidet sich kaum. *CCL5* wurde von CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen und *tgfb1* aus naiven Mäusen signifikant stärker exprimiert.

#### 4.5.3.2. Vergleich der Genexpression von CD8 Treg Sub I mit CD8 Treg Sub III aus mCMV-infizierten Mäusen

Die Zytokin- und Chemokin-Expression wurden von CD8 Treg Sub I im Vergleich mit CD8 Treg Sub III aus mCMV-infizierten Mäusen analysiert (s. **Abb. 26**). Die Ergebnisse wurden dabei als Säulendiagramm (s. **Abb. 26A**) und Kastengraphiken (s. **Abb. 26B**) dargestellt.

Es konnte durch die Darstellung des Säulendiagramms (s. **Abb. 26A**) beobachtet werden, dass sich die Gene von CD8 Treg Sub I mit CD8 Treg Sub III aus mCMV-infizierten Mäusen kaum in ihrer Expression unterscheiden. Wobei die Genexpression von *IL7R* der CD8 Treg Sub III um das 12-fache stärker exprimiert wurden als von den CD8 Treg Sub I. Im Gegenzug dazu lag die Expression von *CCL5* der CD8 Treg Sub I um das 132-fache höher als bei den CD8 Treg Sub III. Durch die Darstellung der Kastengraphiken (s. **Abb. 26B**) konnte folgendes festgestellt werden:

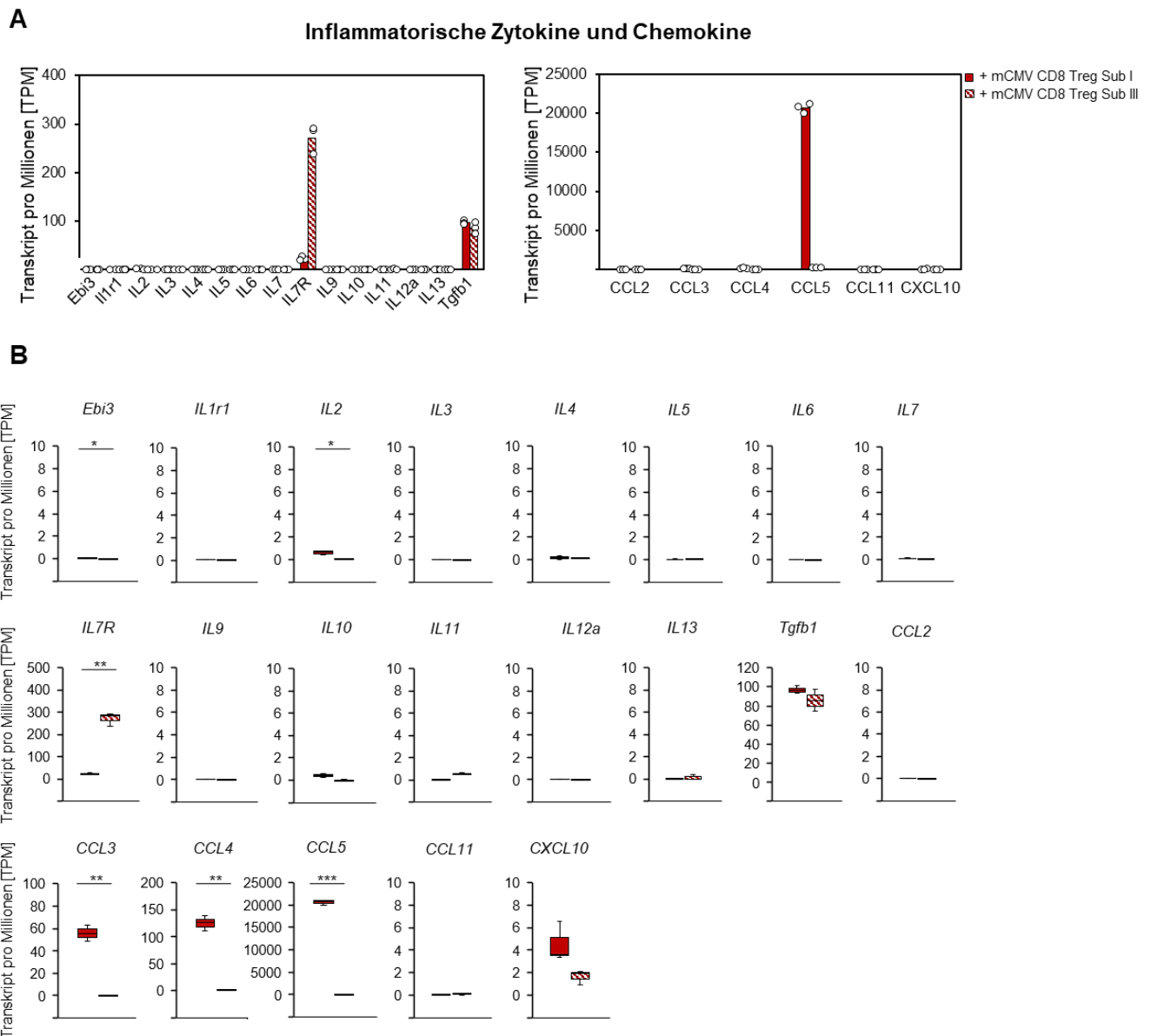
Signifikant höhere Expression folgender Gene der **CD8 Treg Sub I** im Vergleich mit CD8 Treg Sub III aus mCMV-infizierten Mäusen:

- *Ebi3* [t(4) = 4,55; p < 0,05]
- *IL-2* [t(2) = 4,64; p < 0,05]
- *CCL3* [t(2) = 12,78; p < 10<sup>-2</sup>]
- *CCL4* [t(2) = 15,52; p < 10<sup>-2</sup>]
- *CCL5* [t(2) = 60,73; p < 10<sup>-3</sup>]

Signifikant höhere Expression folgender Gene der **CD8 Treg Sub III** im Vergleich mit CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen:

- *IL7R* [t(2) = -14,23; p < 10<sup>-2</sup>]

Die restlichen Gene zeigten keinen signifikanten Unterschied in derer Expression.



**Abb. 26: Zytokin und Chemokin-Expression von CD8 Treg Sub I und CD8 Treg Sub III.** CD8 Treg Sub I und III wurden durch immunomagnetische negativ-Selektion von CD8 T-Zellen gewonnen, gefolgt von einer zytofluorometrischen Zellsortierung von CD8 Treg Sub I (CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>; Gruppe A) und CD8 Treg Sub III (CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>-</sup>PD-1<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>; Gruppe C) aus je 9 akut infizierten C57BL/6 Mäusen. **(A)** Säulendiagramm der Zytokin und Chemokin beteiligten Gene wurden als Transkript pro Millionen reads [TPM] dargestellt. Die Säulen stellen die Mittelwerte der abgegebenen Proben von CD8 Treg Sub I (rot) und CD8 Treg Sub III (rot-weiß gestreift) aus mCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen dar, die weißen Kreise symbolisieren die Einzelproben der jeweiligen Proben. **(B)** Kastengraphiken zeigen das 1. und 3. Quartil, sowie den Median der jeweiligen Proben als Transkript pro Millionen reads [TPM] an. Für den Vergleich zweier Versuchsgruppen wurde der p-Wert mit dem Zweistichproben t-Test bestimmt. Ein p-Wert <0,05 zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an. Dabei bedeutet \* p < 0,05; \*\* p < 10<sup>-2</sup>; \*\*\* p < 10<sup>-3</sup>.

Schlussfolgerung:

Die Expression der Zytokine und Chemokine von CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten und naiven Mäusen unterscheidet sich kaum. Es konnte eine signifikante stärkere Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie *Ebi3* und *IL-2* aber auch von Chemokinen wie *CCL3*, *CCL4*

und *CCL5* welche an der Produktion zytotoxischer T-Zellen beteiligt sind, von CD8 Treg Sub I im Vergleich zu den CD8 Treg Sub III aus mCMV-infizierten Mäusen beobachtet werden.

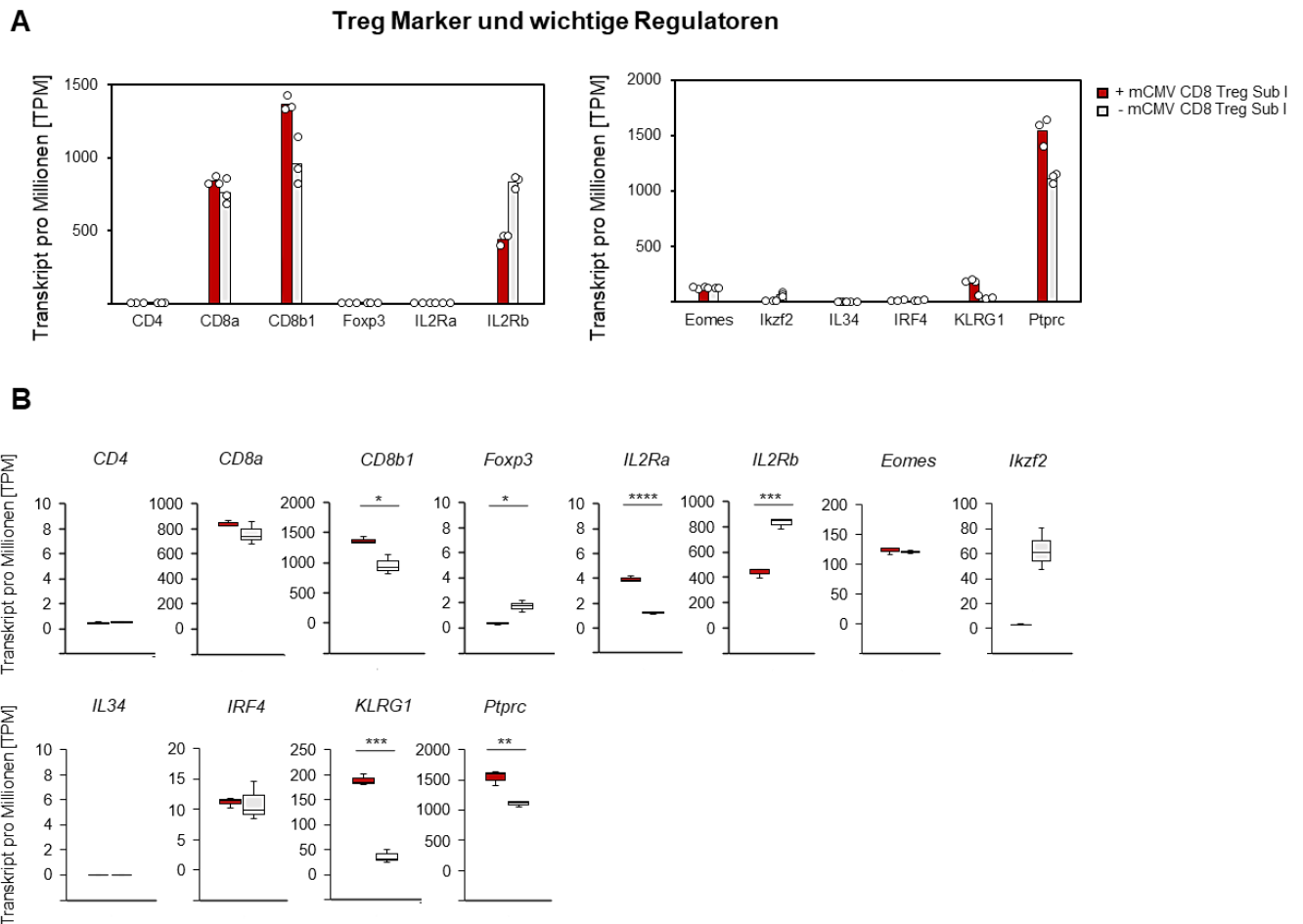
#### 4.5.4. Treg Marker und wichtige Regulatoren

Es wurde zudem in der vorliegenden Arbeit die Expression verschiedener Treg Marker und deren wichtigen Regulatoren (*kursiv*) von CD8 Treg Subpopulationen untersucht.

Zu den wichtigen Regulatoren gehört unter anderem der Transkriptionsfaktor Eomesodermin (*Eomes*), welcher von Effektor CD8 T-Zellen induziert wird und für die IFN $\gamma$  Induktion der CD8 T-Zellen verantwortlich ist. Die Expression von *Eomes* ist ausreichend um eine Expression von beispielsweise *Granzym B* oder *Perforin* hervorzurufen (Li et al. 2018b). Ein weiterer wichtiger Regulator, ist Helios (*Irf2*), ein Mitglied der Transkriptionsfamilie, welcher in Treg exprimiert wird (Serre et al. 2011). Studien haben gezeigt, dass Helios ein spezifischer Marker für Treg ist (Serre et al. 2011). Das „killer cell lectin-like receptor G1“ (*KLRG1*) ist ein inhibitorischer Zelloberflächenrezeptor, welches von NK- und T-Zellen exprimiert wird (Meinicke et al. 2017). Es wird zudem als Marker für CD8 T-Zell Erschöpfungen benutzt (Meinicke et al. 2017). *CD45* (*Ptprc*) wird von allen Leukozyten exprimiert und spielt eine essenzielle Rolle in der Zellentwicklung, Aktivierung, Seneszenz sowie der Apoptose (Altin & Sloan 1997). Der „interferon regulatory factor 4“ (*Irf4*) hat seine Hauptfunktion in Lymphozyten in welchem es die Entwicklung, Affinitätsreifung und terminale Differenzierung von B-Zellen steuert, sowie eine essenzielle Rolle in diversen Effektor T-Zellen spielt (Hagman 2017). *IL-34* ist ein Zytokin, das die Differenzierung und Viabilität von Monozyten und Makrophagen durch den „colony-stimulation factor-1 receptor“ fördert (Lin et al. 2008). *IL-34* ist zudem ein Treg spezifisches Zytokin, vermittelt Transplantat-Toleranz und ist an dem suppressiven Potential der Treg beteiligt (Bézie et al. 2015).

##### 4.5.4.1. Vergleich der Genexpression von CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten mit CD8 Treg Sub I aus naiven Mäusen

Die Expression der Treg Marker und seinen wichtigen Regulatoren wurde zunächst in CD8 Treg Sub I mCMV-infizierter und naiver Tiere analysiert (s. **Abb. 27**). Die Ergebnisse wurden dabei als Säulendiagramm (s. **Abb. 27A**) und Kastengraphiken (s. **Abb. 27B**) dargestellt.



**Abb. 27: Expression von Treg Marker und wichtigen Regulatoren von CD8 Treg Sub I mCMV-infizierter und naiver Mäuse.** CD8 Treg Sub I wurden durch immunomagnetische negativ-Selektion von CD8 T-Zellen gewonnen, gefolgt von einer zytofluorometrischen Zellsortierung von CD8 Treg Sub I (CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>; Gruppe A und D) aus 9 akut infizierten bzw. 30 unbehandelten C57BL/6 Mäusen. **(A)** Säulendiagramm der Treg Marker und wichtigen Regulatoren beteiligten Gene wurden als Transkript pro Millionen reads [TPM] angegeben. Die Säulen stellen die Mittelwerte der drei Proben von CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten (rot) und naiven Mäusen (hellgrau) dar, die weißen Kreise symbolisieren die Einzelwerte der jeweiligen Proben. **(B)** Kastengraphiken der Treg Marker und wichtigen Regulatoren beteiligten Gene zeigt das 1. und 3. Quartil, sowie den Median als Transkript pro Millionen reads [TPM] an. Für den Vergleich zweier Versuchsgruppen wurde der p-Wert mit dem Zweistichproben t-Test bestimmt. Ein p-Wert <0,05 zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an. Dabei bedeutet \* p < 0,05; \*\* p < 10<sup>-2</sup>; \*\*\* p < 10<sup>-3</sup>; \*\*\*\* p < 10<sup>-4</sup>.

Durch die Darstellung der Ergebnisse in einem Säulendiagramm (s. **Abb. 27A**), konnte festgestellt werden, dass sich die Genexpressionen der Treg Marker von CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten mit CD8 Treg Sub I aus naiven Mäusen kaum voneinander unterscheiden, mit der Ausnahme von *CD8b1* und *IL2Rb*. Die Expression von *CD8b1* wurde von den CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen um das 1,4-fache stärker exprimiert als aus naiven Mäusen. Im Gegenzug dazu, wurde *IL2Rb* um das 1,9-fache von CD8 Treg Sub I aus naiven Mäusen stärker als aus mCMV-infizierten Mäusen exprimiert. Unter den wichtigen Regulatoren konnte beobachtet werden, dass die Expression von *Ptprc* um das 1,4-fache stärker

von CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten als aus naiven Mäusen exprimiert wurde. Durch die Darstellung der Kastengraphiken (s. **Abb. 27B**) konnte folgendes beobachtet werden:

Signifikant höhere Expression folgender Gene von CD8 Treg Sub I aus **naiven** Mäusen im Vergleich mit CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen:

- *Foxp3* [t(2) = -5,01; p < 0,05]
- *IL2Rb* [t(4) = -12,33; p < 10<sup>-3</sup>]

Signifikant höhere Expression folgender Gene von CD8 Treg Sub I aus **mCMV-infizierten** Mäusen im Vergleich mit CD8 Treg Sub I aus naiven Mäusen

- *CD8b1* [t(4) = 4,07; p < 0,05]
- *IL2Ra* [t(4) = 17,97; p < 10<sup>-4</sup>]
- *KLRG1* [t(4) = 15,32; p < 10<sup>-3</sup>]
- *Ptprc* [t(4) = 5,52; p < 10<sup>-2</sup>]

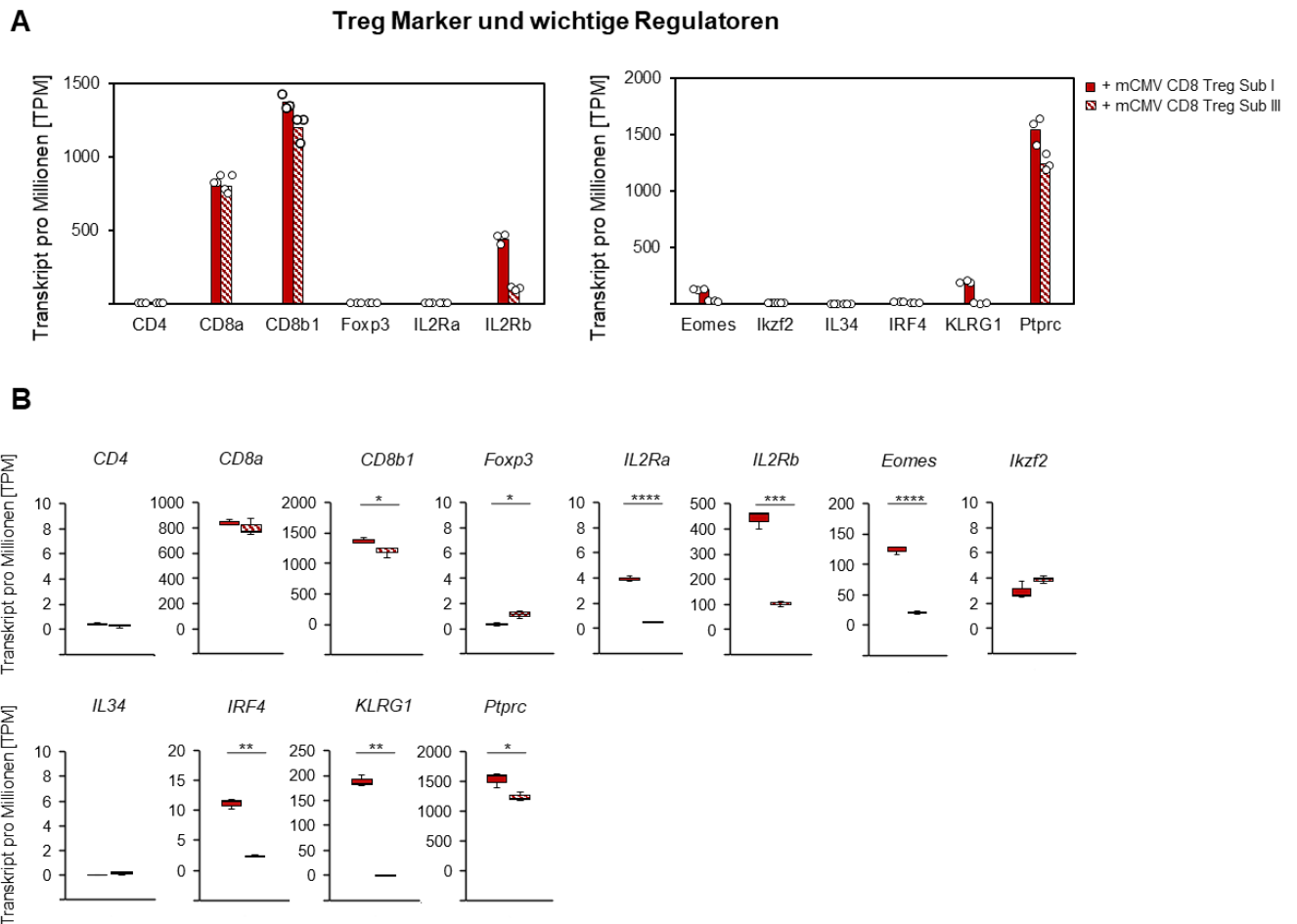
Die restlichen Gene zeigten keinen signifikanten Unterschied in ihrer Expression.

### Schlussfolgerung:

Die Expression der Treg Marker von CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten und naiven Mäusen unterscheiden sich signifikant voneinander. Es konnte eine signifikant höhere Expression von *KLRG1* und *Ptprc* unter den CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen im Vergleich mit CD8 Treg Sub I aus naiven Mäusen beobachtet werden.

#### **4.2.1.1. Vergleich der Genexpression von CD8 Treg Sub I mit CD8 Treg Sub III aus mCMV-infizierten Mäusen**

Die Expression der Treg Marker und seinen wichtigen Regulatoren wurden von CD8 Treg Sub I im Vergleich mit CD8 Treg Sub III aus mCMV-infizierten Mäusen analysiert (s. **Abb. 28**). Die Ergebnisse wurden dabei als Säulendiagramm (s. **Abb. 28A**) und Kastengraphiken (s. **Abb. 28B**) dargestellt.



**Abb. 28: Expression von Treg Marker und wichtigen Regulatoren von CD8 Treg Sub I und CD8 Treg Sub III.** CD8 Treg Sub I und III wurden durch immunomagnetische negativ-Selektion von CD8 T-Zellen gewonnen, gefolgt von einer zytofluorometrischen Zellsortierung von CD8 Treg Sub I (CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>; Gruppe A) und CD8 Treg Sub III (CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>-</sup>PD-1<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>; Gruppe C) aus je 9 akut infizierten C57BL/6 Mäusen. **(A)** Säulendiagramm der Treg Marker und wichtigen Regulatoren beteiligten Genen wurden als Transkript pro Millionen reads [TPM] dargestellt. Die Säulen stellen die Mittelwerte der abgegebenen Proben von CD8 Treg Sub I (rot) und CD8 Treg Sub III (rot-weiß gestreift) aus mCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen dar, die weißen Kreise symbolisieren die Einzelproben der jeweiligen Proben. **(B)** Kastengraphiken zeigen das 1. und 3. Quartil, sowie den Median der jeweiligen Proben als Transkript pro Millionen reads [TPM] an. Für den Vergleich zweier Versuchsgruppen wurde der p-Wert mit dem Zweistichproben t-Test bestimmt. Ein p-Wert <0,05 zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an. Dabei bedeutet: \* p < 0,05; \*\* p < 10<sup>-2</sup>; \*\*\* p < 10<sup>-3</sup>; \*\*\*\* p < 10<sup>-4</sup>.

Es konnte durch die Darstellung des Säulendiagramms (s. **Abb. 28A**) beobachtet werden, dass *IL2Rb* von CD8 Treg Sub I im Vergleich mit CD8 Treg Sub III aus mCMV-infizierten Mäusen um das 4,3-fache stärker exprimiert wurde. Auch *KLRG1* wurde von den CD8 Treg Sub I um das 209-fache und *Ptprc* um das 1,2-fache stärker als von den CD8 Treg Sub III exprimiert. Durch die Darstellung der Kastengraphiken (s. **Abb. 28B**) konnte folgendes festgestellt werden:

Signifikant höhere Expression folgender Gene der **CD8 Treg Sub I** im Vergleich mit CD8 Treg Sub III aus mCMV-infizierten Mäusen:

- *CD8b1* [t(4) = 2,79; p < 0,05]

- *IL2Ra* [t(4) = 23,75; p < 10<sup>-4</sup>]
- *IL2Rb* [t(4) = 15,51; p < 10<sup>-3</sup>]
- *Eomes* [t(4) = 24,13; p < 10<sup>-4</sup>]
- *Irf4* [t(2) = 18,10; p < 10<sup>-2</sup>]
- *KLRG1* [t(2) = 29,26; p < 10<sup>-2</sup>]
- *Ptprc* [t(4) = 3,54; p < 0,05]

Signifikant höhere Expression folgender Gene der **CD8 Treg Sub III** im Vergleich mit CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen:

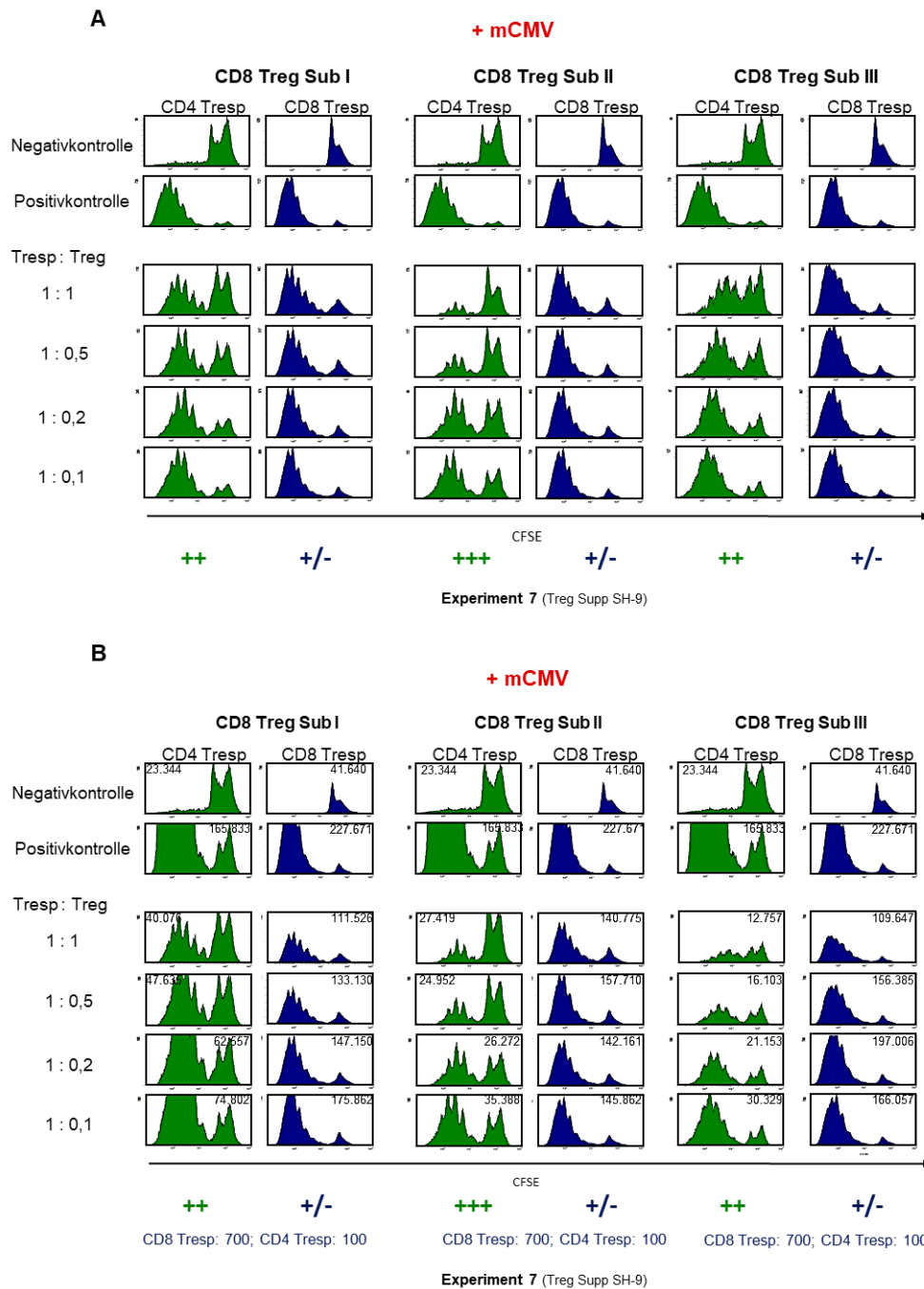
- *Foxp3* [t(4) = -4,06; p < 0,05]

### Schlussfolgerung:

Die Expression der Treg Marker und wichtigen Regulatoren unterschieden sich im Vergleich von CD8 Treg Sub I mit CD8 Treg Sub III aus mCMV-infizierten Mäusen signifikant voneinander. Wobei die Genexpression von CD8 Treg Sub I aller Gene, bis auf *Foxp3*, signifikant höher lag als bei den CD8 Treg Sub III.

## 4.6. Testen des suppressiven Potentials von CD8 Treg Subpopulationen

Die RNA-Sequenzierungsdaten haben gezeigt, dass es signifikante Unterschiede in der Genexpression zwischen den CD8 Treg Subpopulationen I und III gab. Jedoch war damit nicht geklärt, ob die verschiedenen CD8 Treg Subpopulationen auch ein suppressives Potential aufweisen. Daher wurde deren suppressives Potential, ähnlich wie in Kapitel 4.2, in einem Suppression-Assay getestet. Im Gegensatz zu den vorherigen Suppression-Assays wurden die Treg (CD8 Treg Sub I: CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>; CD8 Treg Sub II: CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD1<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>; CD8 Treg Sub III: CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>-</sup>PD1<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>) aus akut infizierten **C57BL/6** Mäusen anstelle von **DEREG-C57BL/6** Mäusen durch eine Kombination aus immunomagnetische und zytofluorometrischer Zellsortierung isoliert, um zu gewährleisten, dass der suppressive Effekt der Treg nicht von einem Mausstamm abhängt. Die Unterdrückung der Tresp Proliferation nach Zugabe der Treg wurde durchflusszytometrisch analysiert (s. **Abb. 29**). Die Ergebnisse wurden sowohl mit Autoskalierung (s. **Abb. 29A**), als auch mit normierter Skalierung (s. **Abb. 29B**) dargestellt.



**Abb. 29: Testen des suppressiven Potentials von CD8 Treg Subpopulationen:** Aus akut infizierten C57BL/6 Mäusen, wurden CD8 Treg Subpopulationen aus einem Pool von Milzzellen isoliert. Dabei wurden CD8 T-Zellen durch immunomagenetische negativ-Selektion MagniSort angereichert, gefolgt von einer zytofluorometrischen Zellsortierung von CD8 Treg Sub I (CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>), CD8 Treg Sub II (CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>) und CD8 Treg Sub III (CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>-</sup>PD-1<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>). Die Unterdrückung der Tresp Proliferation wurde in einem Suppression-Assay analysiert. Dabei wurden die CD4 Tresp (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>; grün) und CD8 Tresp (CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>; blau) aus mCMV-infizierten C57BL/6-Thy1.1. Mäusen isoliert, mit CFSE markiert und mit  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$  beladenen DC polykonal stimuliert. Nach 4-5 Tagen Kokultivierung wurde die Proliferation von Tresp zytofluorometrisch durch das Gating auf CD90.1 und CFSE analysiert. Je eine Messung stellt einen Pool aus Quadruplikate dar. Dargestellt sind Negativ- [DC + Tresp] und Positivkontrollen [DC+  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$  + Tresp]. Die Treg wurden zu einer konstanten Tresp Zellzahl in abnehmenden Konzentrationen titriert [1:1; 1:0,5; 1:0,2; 1:0,1]. In (A) sind die Ergebnisse mittels Autoskalierung, in (B) mittels normierter Skalierung dargestellt (Skalierungseinstellung wurde in hellblau unterhalb der Abbildung geschrieben). Die Zahlen in den Graphiken zeigen die jeweils erfassten Gesamtzellzahlen aus den Kulturen an. Wirken die Treg stark suppressiv auf die Tresp so wurde dies mit einem „+++“, einem „++“ für suppressiv und einem „+/-“ für weniger suppressiv vermerkt.

Durch die Autoskalierung (s. **Abb. 29A**) war zu erkennen, dass CD8 Treg Sub I die CD4 Tresp unterdrückten, da bei einer 1:1 Titration [CD4 Tresp:CD4 Treg], die Zellen kaum proliferierten, im Vergleich zu einer abnehmenden Konzentration von CD8 Treg Sub I. Hingegen, konnte festgestellt werden, dass CD8 Treg Sub I kaum einen suppressiven Effekt auf die CD8 Tresp ausüben konnten. Dies wurde auch für CD8 Treg Sub II und III beobachtet, wobei CD8 Treg Sub II die CD4 Tresp sogar stärker supprimierten als die CD8 Treg Sub I. Durch die normierte Skalierung (s. **Abb. 29B**) wurde der suppressive Effekt der CD8 Treg Sub I-III noch deutlicher. Es konnte bei den CD8 Treg Sub I festgestellt werden, dass unter den CD4 Tresp einer 1:1 Konzentration [CD4 Tresp:CD8 Treg Sub I] eine Zellzahl von ca. 40.000 erfasst wurde, während diese bei einer 1:0,1 Konzentration zu einer Zellzahl von ca. 75.000, und somit um das 1,9-fache, expandierte. Dies konnte auch für die CD8 Treg Sub III beobachtet werden, in welchem die Zellzahl im Vergleich zu einer 1:1 Titration [CD4 Tresp:CD8 Treg Sub III; ca. 13.000] mit einer 1:0,1 Titration [CD4 Tresp:CD8 Treg Sub III; ca. 30.000] um das 2,3-fache anstieg. Die Expansion konnte jedoch nicht unter den CD8 Treg Sub II beobachtet werden [1:1 Titration: ca. 27.000; 1:0,1 Titration: ca. 35.000]. Obwohl der suppressive Effekt der CD8 Treg Subpopulationen gering erschien, expandierte die Zahl der Tresp nach Zugabe der CD8 Treg Sub I zu den CD8 Tresp um das 1,6-fache [1:1 Titration ca. 111.500; 1:0,1 Titration ca. 176.000] und um das 1,5-fache nach Zugabe der CD8 Treg Sub III zu den CD8 Tresp [1:1 Titration ca. 110.000; 1:0,1 Titration ca. 166.000].

### Schlussfolgerung:

Alle drei CD8 Treg Subpopulationen (I-III) zeigten ein starkes suppressives Potential gegenüber den CD4 Tresp. Der suppressive Effekt unter den CD8 Tresp konnte nur anhand der Zellzahlen festgestellt werden.

## **4.7. Adoptiver Transfer der Treg**

Nachdem durch die *in vitro* Versuche das suppressive Potential von CD4 und CD8 Treg bewiesen worden war, war zu klären, ob der suppressive Effekt der Treg auch *in vivo* zu beobachten ist. Der AT (s. 3.6.5) ist ein Verfahren, mit dem die Wirkung der CD4 und CD8 Treg auf die Immunkontrolle einer mCMV-Infektion *in vivo* getestet werden kann. Frühere Studien unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass immunsupprimierte Donoren vor dem tödlichen Verlauf einer mCMV-Infektion gerettet werden können, indem schützende CD8 Effektorzellen entweder durch *ex-vivo* isolierte mCMV-angereicherte CD8 T-Zellen oder durch *in vitro* generierte mCMV-Peptid-spezifische CTLL transferiert wurden (Holtappels et al. 2013). Die

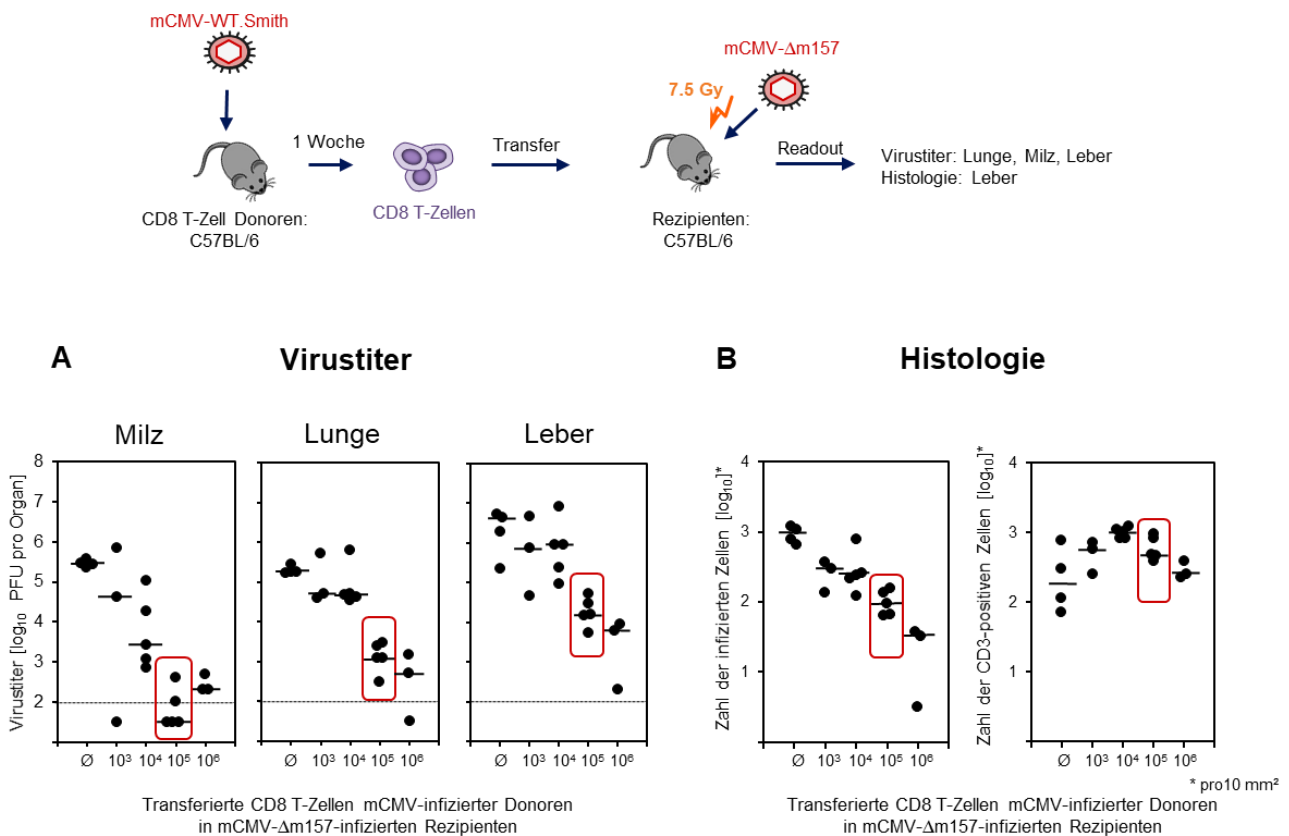
Kontrolle einer mCMV-Infektion, hängt dabei von einer Reihe verschiedener Parameter ab, wie z.B. von dem schützenden Potential der CD8 Effektorzellen sowie die Anzahl an transferierten Zellen.

Um zu klären, wie hoch die Anzahl an *ex-vivo* isolierten CD8 T-Zellen sein muss, um einen Schutz vor einer mCMV-Infektion zu vermitteln, wurden in der vorliegenden Arbeit aus einem Gesamtpool von Milzen mCMV-infizierter C57BL/6 Mäusen (1 Woche p.i.) die CD8 T-Zellen mCMV-infizierter Donoren via positiv-Selektion MACS (s. 3.3.2.1) isoliert und auf verschiedene Konzentrationen eingestellt (s. **Tab. 10**). Die Rezipienten (C57BL/6 Mäuse) wurden 24 Stunden vor dem AT mit 7,5Gy bestrahlt (s. 3.6.1), sodass eine Immunsuppression gewährleistet ist. Am Tag des ATs wurde den Rezipienten Mäusen verschiedene Konzentrationen der CD8-T-Zellen transferiert (i.v.) und die Mäuse mit der Virusmutante mCMV- $\Delta$ m157 infiziert (i.f.). (s. **Tab. 10**).

**Tab. 10: Gruppen des Transfers von CD8 T-Zellen mCMV-infizierter Donoren.**

Gruppen	mCMV- $\Delta$ m157 2x10 <sup>5</sup> pfu i.f.	CD8 T-Zellen mCMV-infizierter Donoren	Tierzahlen	gestorben Tag 10	gestorben Tag 11
A	+	-	7	2	1
B	+	10 <sup>3</sup>	5	1	1
C	+	10 <sup>4</sup>	5		
D	+	10 <sup>5</sup>	5		
E	+	10 <sup>6</sup>	5	2	

11 Tage nach dem Transfer, wenn die immunsupprimierten AT-Rezipienten welche keine CD8 T-Zellen erhalten haben (Gruppe A; s. **Tab. 10**), der mCMV-Infektion erlagen, wurden Milz, Lunge und Leber der Tiere isoliert und in Kryogefäße bei -80°C eingefroren. Anschließend wurde eine Virustiterbestimmung in den Organhomogenaten (s. 3.2.2.2) mittels Plaque-Assay ermittelt. Zusätzlich wurden die mCMV-spezifischen Zellen in der Leber immunhistologisch quantifiziert (s. 3.5.3.). Die Ergebnisse sind in **Abb. 30** dargestellt.



**Abb. 30: Adoptiv transferierte CD8 T-Zellen mCMV-infizierter Donoren.** Eine Woche nach mCMV-Infektion (i.p.) von vier C57BL/6 CD8 T-Zell-Donor Mäusen, wurden CD8 T-Zellen via positiv-Selektion MACS isoliert und i.v. in steigenden Konzentrationen (10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> und 10<sup>6</sup>) in 27 C57BL/6 AT Rezipienten Mäusen transferiert, welche ein Tag vor Transfer mit 7,5Gy bestrahlt und intraplantar mit mCMV-Δm157 2x10<sup>5</sup> PFU infiziert worden waren. Als Kontrolle dienten bestrahlte und mit mCMV-Δm157 infizierte Rezipienten ohne CD8 T-Zell Transfer (Ø). **(A)** Die Virustiter in Milz, Lunge und Leber wurden mittels *Plaque*-Assay bestimmt. **(B)** Die Zahl infizierter Zellen wurden in der Leber (pro 10mm<sup>2</sup>) mittels IE1-spezifischen Antikörper durch immunhistologische Färbung ermittelt. Die Ergebnisse repräsentieren die Einzeltiterbestimmungen am Tag 11 nach Infektion (schwarze Punkte). Der Median ist als horizontaler Balken dargestellt und die gestrichelte horizontale Linie stellt das Detektionslimit des ATs dar.

Die Virustiter (s. **Abb. 30A**) in den Kontrollgruppen (Ø) von Milz, Lunge und Leber wiesen wie erwartet einen sehr hohen Virustiter von 2-3x10<sup>5</sup> (5-6 log<sub>10</sub>) PFU pro Organ auf. Es war zu beobachten, dass der Virustiter nach Zugabe von 1x10<sup>3</sup> CD8 T-Zellen bereits um das 1,1-fache in der Milz, Lunge und Leber, im Vergleich zur Kontrollgruppe gesunken ist. Nach einem Transfer von 1x10<sup>4</sup> CD8 T-Zellen sank der Virustiter in der Milz sogar um das 1,5-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies konnte jedoch nicht in der Lunge und Leber beobachtet werden. Der Virustiter sank bei einer 1x10<sup>5</sup> CD8 T-Zellkonzentration in der Milz um das 2,4-fache, in der Lunge um das 1,7-fache und in der Leber um das 1,5-fache, im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach einem Transfer mit der höchsten Konzentration von 1x10<sup>6</sup> CD8 T-Zellen lagen die Virustiter minimal über dem Detektionslimit bei 3x10<sup>2</sup> (2,4 log<sub>10</sub>) PFU pro Organ in der Milz, in der Lunge bei 6,7x10<sup>2</sup> (2,9 log<sub>10</sub>) PFU pro Organ und bei 5,1x10<sup>3</sup> (3,3 log<sub>10</sub>) PFU pro Organ in der Leber. Diese Beobachtungen konnten auch durch den immunhistologischen Nachweis

mCMV-spezifischen Zellen pro Leber (s. **Abb. 30B**) nachgewiesen werden. Die Zahl der infizierten Zellen lag bei einem Transfer von  $1 \times 10^6$  Zellen am niedrigsten (Mittelwert:  $2,3 \times 10^1$  ( $1,19 \log_{10}$ )). Die Zahl der CD3 positiven Zellen pro  $10 \text{mm}^2$  in der Leber expandierte im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mittelwert:  $3,2 \times 10^2$  ( $2,3 \log_{10}$ )) durch einen Transfer von  $1 \times 10^3$  (Mittelwert:  $5,1 \times 10^2$  ( $2,7 \log_{10}$ )) und  $1 \times 10^4$  (Mittelwert:  $1 \times 10^3$  ( $3 \log_{10}$ )) CD8 T-Zellen. Im Gegenzug dazu, sank die Zahl der CD3 positiven Zellen nach einem Transfer von  $1 \times 10^5$  CD8 T-Zellen (Mittelwert:  $6,2 \times 10^2$  ( $2,8 \log_{10}$ )) und erreichte nach einem Transfer von  $1 \times 10^6$  CD8 T-Zellen (Mittelwert:  $2,9 \times 10^2$  ( $2,5 \log_{10}$ )) einen naheliegenden Wert an CD3 positiven Zellen wie in der Kontrollgruppe.

### Schlussfolgerung:

Es besteht ein Schutz vor einer mCMV-Infektion nach einem AT, ab einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  CD8 T-Zellen in allen drei Organen. Obwohl der Schutz bei einem Transfer von  $1 \times 10^6$  CD8 T-Zellen höher ist, wurden für alle Folgeexperimente ausschließlich  $1 \times 10^5$  CD8 T-Zellen mCMV-infizierter Donoren transferiert, um zu gewährleisten, dass die Treg die schützenden CD8 T-Zellen noch supprimieren können.

### **4.7.1. Transfer von CD4 und CD8 Treg**

Die vorherigen Daten haben gezeigt, dass durch den Zelltransfer von  $1 \times 10^5$  CD8 T-Zellen eine mCMV-Infektion kontrolliert werden kann. Diese Beobachtung belegt bereits existierende Studien (Steffens et al. 1998, Simon et al. 2006, Holtappels et al. 2013). Studien postulieren, dass eine 10-fach höhere Zahl an Treg verabreicht werden muss um die schützenden CD8 T-Zellen supprimieren zu können (Moskophidis et al. 1992, Wolf et al. 2005). Da es in der vorliegenden Arbeit nicht sicher war, ob die Treg auch *in vivo* ein suppressives Potential aufweisen, wurde eine höhere und/oder niedrigere Treg Konzentration als die schützenden CD8 T-Zellen den Mäusen transferiert.

#### **4.7.1.1. Transfer von CD4 Treg**

##### **4.7.1.1.1. Transfer von $5 \times 10^5$ CD4 Treg**

Um das suppressive Potential der CD4 Treg *in vivo* testen zu können, wurden aus einem Gesamtpool von Milzen aus mCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen (1 Woche p.i.) die CD8 T-Zellen via positiv-Selektion MACS (s. 3.3.2.1) isoliert und auf einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  eingestellt. Die CD4 T-Zellen der mCMV-infizierten Treg Donoren (DEREG-C57BL/6 Mäuse) wurden aus einem Gesamtpool von Milzen mittels negativ-Selektion MagniSort (s. 3.3.3) isoliert und

## Ergebnisse

zytofluorometrisch sortiert (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>). Die CD4 Treg wurden auf einer Zellzahl von  $5 \times 10^5$  eingestellt. Die C57BL/6 Rezipienten Mäuse wurden 24 Stunden vor dem AT mit 7,5Gy bestrahlt (s. 3.6.5), sodass eine Immunsuppression gewährleistet ist. Am Tag des ATs wurden die Rezipienten Mäuse mit  $1 \times 10^5$  CD8-T-Zellen sowie mit  $5 \times 10^5$  CD4 Treg transferiert (i.v.) (s. **Tab. 11**). Zusätzlich dazu, wurden die Rezipienten mit der Virusmutante mCMV- $\Delta$ m157 infiziert (i.f.).

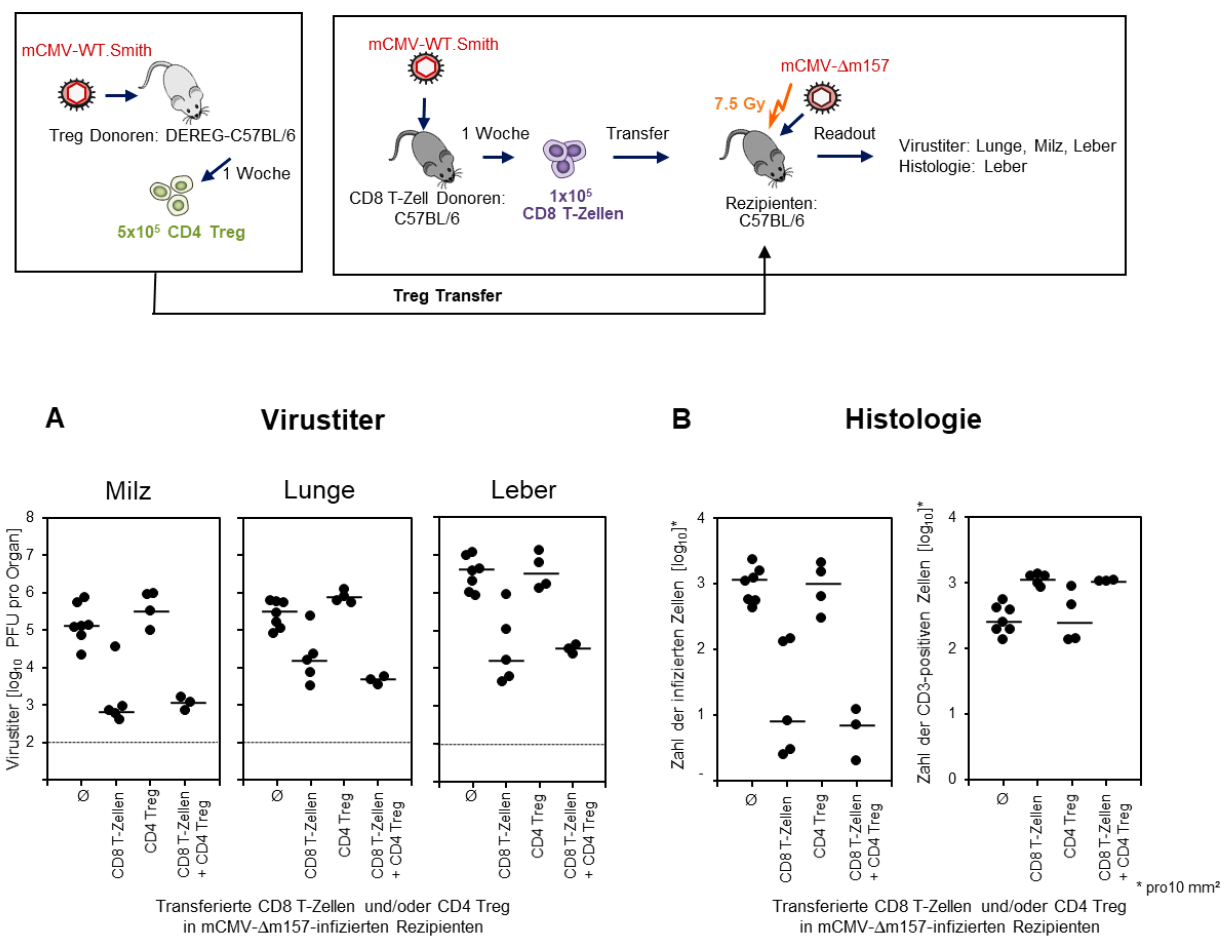
**Tab. 11: Gruppen des Transfers von CD4 Treg und CD8 T-Zellen.**

Gruppen	mCMV- $\Delta$ m157 2x10 <sup>5</sup> pfu i.f.	CD8 T-Zellen mCMV-infizierter Donoren	CD4 Treg	Tierzahlen	gestorben Tag 9
A	+	-	-	7	
B	+	1x10 <sup>5</sup>	-	5	
C	+	-	5x10 <sup>5</sup>	4	
D	+	1x10 <sup>5</sup>	5x10 <sup>5</sup>	4	1

11 Tage nach dem Transfer, als die immunsupprimierten AT-Rezipienten welche keine schützenden CD8 T-Zellen erhalten haben (Gruppe A; s. **Tab. 11**), der mCMV-Infektion erlagen, wurden Milz, Lunge und Leber pro Maus isoliert. Dabei wurden die Virustiter der Organhomogenate mittels Plaque-Assay (s. 3.2.2.2) bestimmt, sowie die mCMV-spezifischen Zellen pro Leber immunhistologisch nachgewiesen (s. 3.5.3). Die Ergebnisse des ATs sind in **Abb. 31** dargestellt.

Es war zu beobachten, dass die Virustiter in den Kontrollgruppen ( $\emptyset$ ) von Milz, Lunge und Leber wie erwartet einen relativ hohen Virustiter von Mittelwerten zwischen  $2,5 - 3 \times 10^5$  ( $5-6,5 \log_{10}$ ) PFU pro Organ aufwiesen (s. **Abb. 31A**). Die Daten haben zudem gezeigt, dass nach einem Transfer von  $1 \times 10^5$  CD8 T-Zellen in der Milz, Lunge und Leber ein Schutz vor der mCMV-Infektion vorliegt, welches die Daten der vorherigen Ergebnisse (s. **Abb. 30A**) bestätigten. Bei einem Transfer von  $5 \times 10^5$  CD4 Treg war kein schützender Effekt zu erwarten, sondern ein ähnlicher Virustiter wie in den jeweiligen Kontrollgruppen. Diese Erwartung hat sich in allen drei Organen bestätigt. Bei einem Ko-Transfer von  $5 \times 10^5$  CD4 Treg und  $1 \times 10^5$  CD8 T-Zellen war zu erwarten, dass die CD4 Treg die CD8 T-Zellen supprimieren und somit der schützende Effekt durch die CD8 T-Zellen reduziert wird. Dies hätte in einem höheren Virustiter, im Vergleich zur Gruppe nach Transfer von  $1 \times 10^5$  CD8 T-Zellen alleine, resultieren sollen. Dies konnte jedoch in Milz, Lunge und Leber nicht beobachtet werden, denn die Virustiter blieben im Vergleich zu den  $1 \times 10^5$  transferierten CD8 T-Zellen nahezu unverändert. Diese Beobachtungen

konnten auch durch den immunhistologischen Nachweis mCMV-spezifischer Zellen in der Leber (s. **Abb. 31B**) nachgewiesen werden. Die Zahl der infizierten Zellen pro 10mm<sup>2</sup> in der Leber lag am höchsten in der Kontrollgruppe, sowie nach einem Transfer von 5x10<sup>5</sup> CD4 Treg. Im Gegenzug dazu, konnte für die transferierten Gruppen 1x10<sup>5</sup> CD8 T-Zellen und der Kombination aus 5x10<sup>5</sup> CD4 Treg mit 1x10<sup>5</sup> CD8 T-Zellen kaum infizierte Zellen detektiert werden. Dagegen lag die Zahl der CD3 positiven Zellen pro 10mm<sup>2</sup> der Leber in der Kontrollgruppe und nach der transferierten Zellzahl von 5x10<sup>5</sup> CD4 Treg bei Mittelwerten zwischen 3-4x10<sup>2</sup> (2,45 log<sub>10</sub>), während diese in den Gruppen von 1x10<sup>5</sup> CD8 T-Zellen und der Kombination aus 5x10<sup>5</sup> CD4 Treg mit 1x10<sup>5</sup> CD8 T-Zellen bei einem Mittelwert von 1,1x10<sup>3</sup> (3,05 log<sub>10</sub>) lag.



**Abb. 31: Testen des suppressiven Potentials von 5x10<sup>5</sup> CD4 Treg in einem AT.** Eine Woche nach einer mCMV-Infektion (i.p.) von drei C57BL/6 CD8 T-Zell-Donor Mäusen, wurden mCMV-spezifische CD8 T-Zellen via positiv-Selektion MACS isoliert und i.v. mit einer Konzentration von 1x10<sup>5</sup> CD8 T-Zellen den 20 DEREG-C57BL/6 AT Rezipienten Mäusen transferiert, welche einen Tag vor Transfer mit 7,5Gy bestrahlt und intraplantar mit mCMV-Δm157 2x10<sup>5</sup> PFU infiziert wurden. Gleichzeitig wurden aus 8 akut mCMV-infizierten DEREG-C57BL/6 Mäusen die CD4 Treg aus einem Pool von Gesamtmilzen immunomagnetisch via negativ-Selektion MagniSort isoliert und zytofluorometrisch sortiert (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>). Die CD4 Treg wurden den Rezipienten Mäusen mit einer Konzentration von 5x10<sup>5</sup> i.v. transferiert. Als Kontrolle dienten bestrahlte und mit mCMV-Δm157 infizierte Rezipienten ohne CD8 T-Zell Transfer (∅). **(A)** Die Virustiter in Milz, Lunge und Leber wurden mittels *Plaque-Assay* bestimmt. **(B)** Die Zahl infizierter Zellen wurden in der Leber (pro 10mm<sup>2</sup>) mittels IE1-spezifischer Immunhistologie ermittelt. Die Ergebnisse repräsentieren die Einzeltiterbestimmungen am Tag 11 nach Infektion (schwarze Punkte). Der Median ist als horizontaler Balken dargestellt und die gestrichelte horizontale Linie stellt das Detektionslimit des ATs dar.

Schlussfolgerung:

CD4 Treg konnten mit  $5 \times 10^5$  transferierten Zellen die CD8 T-Zellen mCMV-infizierter Donoren mit einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  nicht supprimieren.

**4.7.1.1.2. Transfer von  $9 \times 10^5$  CD4 Treg**

Aufgrund der vorherigen Beobachtung sollte im Folgeversuch das 10-fache an CD4 Treg im Vergleich zu den CD8 T-Zellen mCMV-infizierter Donoren in einem AT eingesetzt werden, um den postulierenden suppressiven Effekt der CD4 Treg zeigen zu können. Aufgrund einer zu geringen CD4 Treg Zellzahl nach der durchflusszytometrischen Zellsortierungen konnte nur ein Ko-Transfer von  $9 \times 10^5$  CD4 Treg, anstelle von  $1 \times 10^6$  CD4 Treg, und  $9 \times 10^4$  CD8 T-Zellen (Verhältnis: 10:1) den Rezipienten Mäusen transferiert werden (s. **Tab. 12**). Der Versuchsablauf war ansonsten identisch wie das in Kapitel 4.7.1.1.1 beschriebene Experiment.

**Tab. 12: Gruppen des Transfers von CD4 Treg und CD8 T-Zellen.**

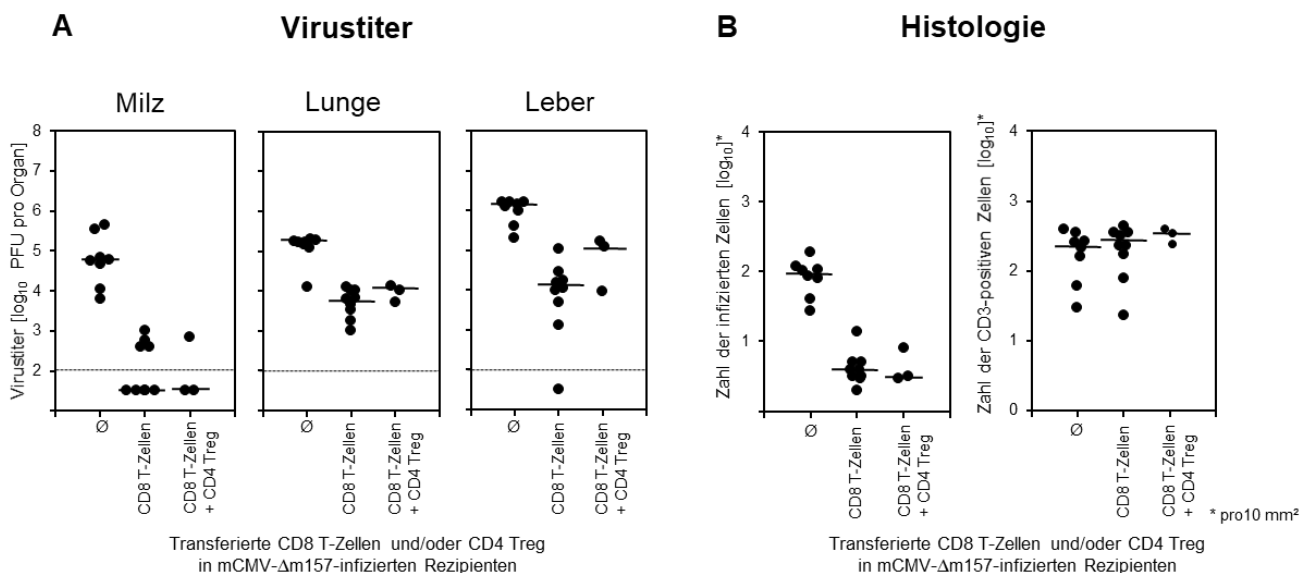
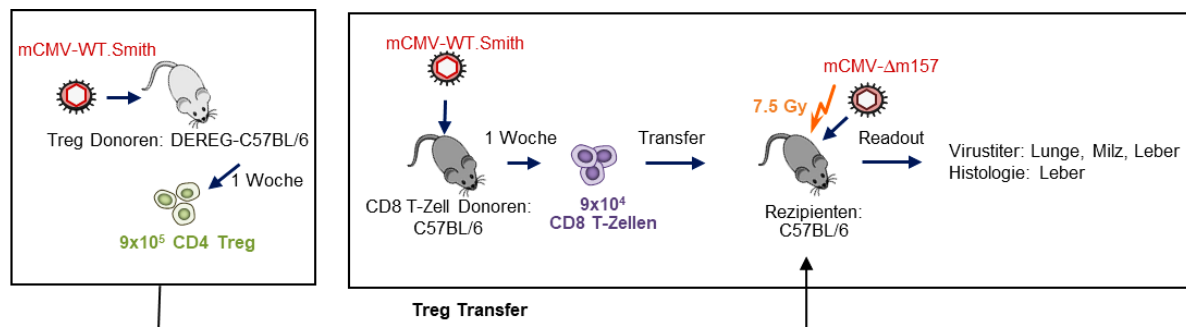
Gruppen	mCMV- $\Delta$ m157 $2 \times 10^5$ pfu i.f.	CD8 T-Zellen mCMV-infizierter Donoren	CD4 Treg	Tierzahlen
A	+	-	-	8
B	+	$9 \times 10^4$	-	9
C	+	$9 \times 10^4$	$9 \times 10^5$	3

Die Ergebnisse diesen ATs sind in **Abb. 32** dargestellt. Es war zu beobachten, dass die Virustiter in den Kontrollgruppen ( $\emptyset$ ) von Milz, Lunge und Leber, wie auch schon in den vorherigen Versuchen, bei Mittelwerten von ca.  $1,3 \times 10^5$  –  $1,2 \times 10^6$  ( $4,8$ - $6 \log_{10}$ ) PFU pro Organ lagen. (s. **Abb. 32A**). Der Transfer von  $9 \times 10^4$  CD8 T-Zellen zeigt wie in den voran gegangen Experimenten einen deutlich positiven Effekt vor einer mCMV-Infektion. Eine Kombination von  $9 \times 10^5$  CD4 Treg und  $9 \times 10^4$  CD8 T-Zellen konnte den Schutz durch die CD8 T-Zellen in Milz und Lunge nicht aufheben. In der Leber war hingegen eine Reduktion des Schutzes durch die CD4 Treg zu beobachten; die Virustiter stiegen im Median um den Faktor 1,3 an.

Diese Beobachtungen konnten jedoch nicht durch den immunhistologischen Nachweis mCMV-spezifischer Zellen in der Leber (s. **Abb. 32B**) nachgewiesen werden. Die Zahl der infizierten Zellen pro  $10 \text{mm}^2$  in der Leber lag am höchsten in der Kontrollgruppe; in den beiden Transfergruppen waren kaum infizierte Zellen nachweisbar. Dagegen lag der Mittelwert der CD3 positiven Zellen pro  $10 \text{mm}^2$  in der Leber in der Kontrollgruppe und transferierten CD8 T-Zellen

## Ergebnisse

alleine bei  $2,3 \times 10^2$  ( $2,4 \log_{10}$ ). In der Gruppe des Ko-Transfers von  $9 \times 10^5$  CD4 Treg und  $9 \times 10^4$  stieg der Mittelwert der CD3 positiven Zellen pro  $10 \text{mm}^2$  in der Leber um das 1,3-fache im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen an ( $3,2 \times 10^2$  ( $2,5 \log_{10}$ )).



**Abb. 32: Testen des suppressiven Potentials von  $9 \times 10^5$  CD4 Treg in einem AT.** Eine Woche nach einer mCMV-Infektion (i.p.) von drei C57BL/6 CD8 T-Zell-Donor Mäusen, wurden mCMV-spezifische CD8 T-Zellen via positiv-Selektion MACS isoliert und i.v. mit einer Konzentration von  $9 \times 10^4$  CD8 T-Zellen den 20 DEREK-C57BL/6 AT Rezipienten Mäusen transferiert, welche einen Tag vor dem Transfer mit 7,5Gy bestrahlt und intraplantar mit mCMV-Δm157  $2 \times 10^5$  PFU infiziert worden waren. Gleichzeitig wurden aus 8 akut mCMV-infizierten DEREK-C57BL/6 Mäusen die CD4 Treg aus einem Pool von Gesamtmilzen immunomagnetisch via negativ-Selektion MagniSort isoliert und zytofluorometrisch sortiert ( $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{GFP}^+$ ). Die CD4 Treg wurden den Rezipienten Mäusen mit einer Konzentration von  $9 \times 10^5$  i.v. transferiert. Als Kontrolle dient bestrahlte und mit mCMV-Δm157 infizierte Rezipienten ohne CD8 T-Zell Transfer (Ø). (A) Die Virustiter in Milz, Lunge und Leber wurden mittels *Plaque-Assay* bestimmt. (B) Die Zahl infizierter Zellen wurden in der Leber (pro  $10 \text{mm}^2$ ) mittels IE1-spezifischer Immunhistologie ermittelt. Die Ergebnisse repräsentieren die Einzeltiterbestimmungen am Tag 11 nach Infektion (schwarze Punkte). Der Median ist als horizontaler Balken dargestellt und die gestrichelte horizontale Linie stellt das Detektionslimit des ATs dar.

### Schlussfolgerung:

CD4 Treg konnten mit  $9 \times 10^5$  transferierten Zellen die CD8 T-Zellen mCMV-infizierter Donoren mit einer Konzentration von  $9 \times 10^4$  organspezifisch (nur Leber) supprimieren. Die Suppression durch CD4 Treg konnte jedoch nicht histologisch nachgewiesen werden.

#### 4.7.1.2. Transfer von CD8 Treg

Die vorherigen Daten haben gezeigt, dass es notwendig war, das 10-fache an CD4 Treg im Vergleich zu den schützenden CD8 T-Zellen zu transferieren, um einen organspezifischen suppressiven Effekt der CD4 Treg erkennen zu können. Es sollte deshalb in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob CD8 Treg *in vivo* in der Lage sind die CD8 T-Zellen zu supprimieren. Retrospektive Analysen haben gezeigt, dass die transferierten CD8 Treg folgenden Phänotyps: CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+/-</sup>CD127<sup>-</sup> (Sub I+IV) in **Abb. 33** und **Abb. 34** getestet wurden. In **Abb. 35** wurden den Mäusen CD8 Treg Sub I (CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>) transferiert.

##### 4.7.1.2.1. Transfer von 5x10<sup>5</sup> CD8 Treg Sub I+IV

Um das suppressive Potential der CD8 Treg Sub I+IV *in vivo* testen zu können, wurde zunächst die 5-fache Menge an CD8 Treg Sub I+IV im Vergleich zu den CD8 T-Zellen transferiert. Dabei wurden aus einem Gesamtpool von Milzen aus mCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen (1 Woche p.i.) die CD8 T-Zellen via positiv-Selektion MACS (s. 3.3.2.1) isoliert und auf einer Konzentration von 1x10<sup>5</sup> eingestellt. Die CD8 T-Zellen aus mCMV-infizierten Donoren wurden aus einem Gesamtpool von Milzen aus DEREK-C57BL/6 Mäusen (1 Woche p.i.) mittels negativ-Selektion MagniSort (s. 3.3.3) isoliert, zytofluorometrisch sortiert (CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+/-</sup>CD127<sup>-</sup>) und auf einer Zellzahl von 5x10<sup>5</sup> eingestellt. Die Rezipienten (C57BL/6 Mäuse) wurden 24 Stunden vor dem AT mit 7,5Gy bestrahlt (s. 3.6.1.), sodass eine Immunsuppression gewährleistet ist. Am Tag des ATs wurden die Rezipienten mit den CD8 T-Zellen sowie mit den CD8 Treg Sub I+IV transferiert (i.v.) (s. **Tab. 13**). Zusätzlich dazu, wurden die Rezipienten mit der Virusmutante mCMV-Δm157 infiziert (i.f.).

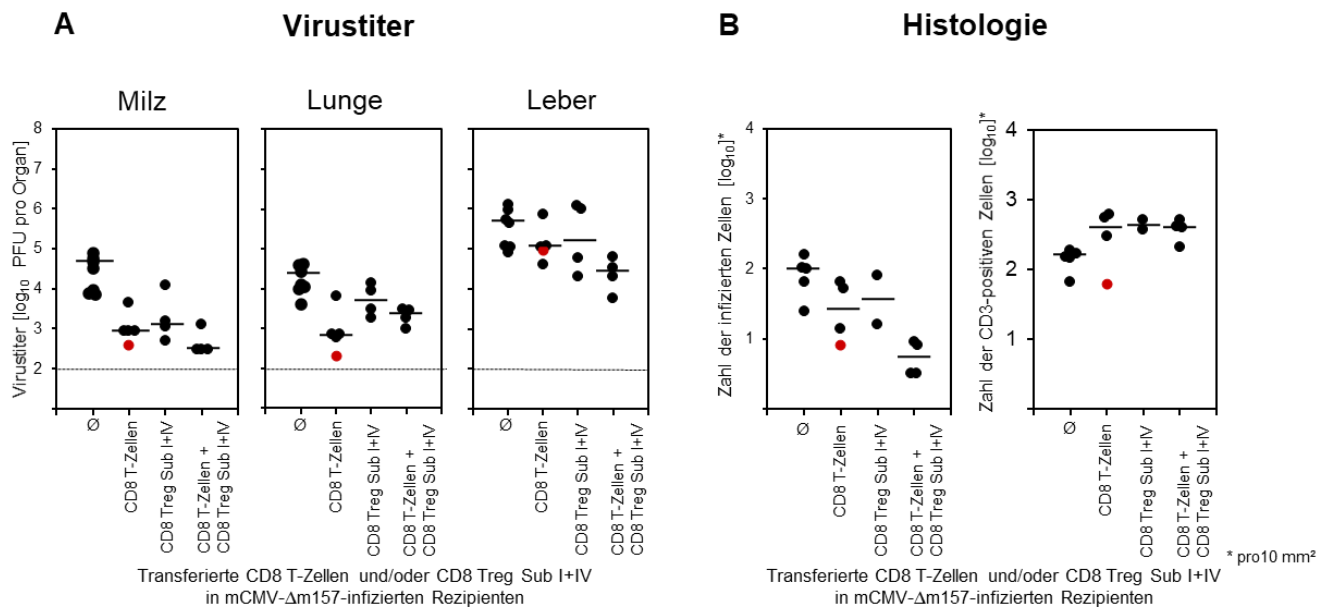
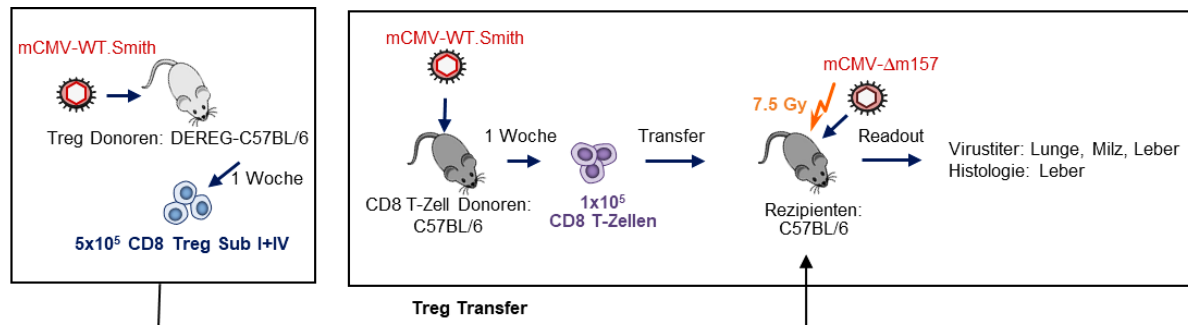
**Tab. 13: Gruppen der transferierten CD8 Treg Sub I+IV und CD8 T-Zellkonzentration.**

Gruppen	mCMV-Δm157 2x10 <sup>5</sup> pfu i.f.	CD8 T-Zellen mCMV-infizierter Donoren	CD8 Treg Sub I+IV	Tierzahlen	gestorben Tag 8
A	+	-	-	7	2
B	+	1x10 <sup>5</sup>	-	5	1
C	+	-	5x10 <sup>5</sup>	4	2
D	+	1x10 <sup>5</sup>	5x10 <sup>5</sup>	4	1

9 Tage nach dem Transfer, als die immunsupprimierten AT-Rezipienten die keine CD8 T-Zellen erhalten haben (Gruppe A; s. **Tab. 13**), der mCMV-Infektion erlagen, wurden Milz, Lunge und Leber der Mäuse isoliert und die Virustiterbestimmung in den Organhomogenaten (s. 3.2.2.2)

## Ergebnisse

mittels Plaque-Assays ermittelt. Zusätzlich dazu wurden die mCMV-spezifischen Zellen in der Leber immunhistologisch nachgewiesen (s. 3.5.3). Die Ergebnisse des ATs sind in **Abb. 33** dargestellt.



**Abb. 33: Testen des suppressiven Potentials von  $5 \times 10^5$  CD8 Treg Sub I+IV in einem AT.** Eine Woche nach einer mCMV-Infektion (i.p.) von drei C57BL/6 CD8 T-Zell-Donor Mäusen, wurden CD8 T-Zellen via positiv-Selektion MACS isoliert und i.v. mit einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  CD8 T-Zellen den 20 DEREG-C57BL/6 AT Rezipienten Mäusen transferiert, welche ein Tag vor Transfer mit 7,5Gy bestrahlt und intraplantar mit mCMV- $\Delta$ m157  $2 \times 10^5$  PFU infiziert worden waren. Gleichzeitig wurden aus 8 akut mCMV-infizierten DEREG-C57BL/6 Mäusen die CD8 Treg Sub I+IV aus einem Pool von Gesamtmilzen immunomagnetisch via negativ-Selektion MagniSort isoliert, mit Antikörpern markiert und zytofluorometrisch sortiert ( $\text{CD}8^+ \text{CD}3^+ \text{CD}122^+ \text{PD-1}^{\pm} \text{CD}127^-$ ). Die CD8 Treg Sub I+IV wurden den Rezipienten Mäusen mit einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  i.v. transferiert. Als Kontrolle dienten bestrahlte und mit mCMV- $\Delta$ m157 infizierte Rezipienten ohne CD8 T-Zell Transfer ( $\emptyset$ ). **(A)** Die Virustiter in Milz, Lunge und Leber wurden mittels *Plaque*-Assay bestimmt. **(B)** Die Zahl infizierter Zellen wurden in der Leber (pro  $10 \text{ mm}^2$ ) mittels IE1-spezifischen Antikörper, immunhistologisch ermittelt. Die Ergebnisse repräsentieren die Einzeltiterbestimmungen am Tag 9 nach Infektion (schwarze Punkte). Die Mäuse, die schon am 8. Tag verstorben sind, sind als rote Punkte dargestellt. Der Median ist als horizontaler Balken dargestellt und die gestrichelte horizontale Linie stellte das Detektionslimit des ATs dar.

Es konnte beobachtet werden, dass die Virustiter in den Kontrollgruppen aufgrund der fehlenden CD8 T-Zellen in allen drei Organen, wie auch in den vorherigen ATs mit CD4 Treg, zwischen Mittelwerten von  $2,6 \times 10^4$  –  $6,5 \times 10^5$  ( $4,4$ - $5,7 \log_{10}$ ) PFU pro Organ lagen (s. **Abb. 33A**). Vergleichsweise konnte gezeigt werden, dass durch den Transfer von  $1 \times 10^5$  CD8 T-Zellen, die Rezipienten Mäuse vor einer mCMV-Infektion, aufgrund des niedrigen Virustiters in Milz und Lunge, geschützt waren. Dies konnte jedoch nicht in der Leber beobachtet werden. Es wurde erwartet, dass die  $5 \times 10^5$  CD8 Treg Sub I+IV transferierten Zellen alleine nicht vor einer mCMV-Infektion schützen und somit einen ähnlichen Virustiter wie die Kontrollgruppe aufweisen. Dies konnte in der Lunge und Leber, jedoch nicht in der Milz beobachtet werden. Bei einem Ko-Transfer von  $5 \times 10^5$  CD8 Treg Sub I+IV und  $1 \times 10^5$  CD8 T-Zellen wurde erwartet, dass die CD8 Treg Sub I+IV den Schutz der CD8 T-Zellen unterdrücken und somit einen ähnlichen Virustiter wie in der Kontrollgruppe aufweisen. Dies konnte jedoch in keinem der drei Organe festgestellt werden. Diese Beobachtung bestätigte sich auch histologisch (s. **Abb. 33B**). Die Zahl der CD3-positiven Zellen pro  $10 \text{mm}^2$  in der Leber war in der Kontrollgruppe gering (Mittelwert:  $1,4 \times 10^2$  ( $2,1 \log_{10}$ )); in der Gruppe der transferierten CD8 Treg Sub I+IV alleine, lag die Zahl der CD3-positiven Zellen pro  $10 \text{mm}^2$  in der Leber bei einem Mittelwert von  $4,5 \times 10^2$  ( $2,6 \log_{10}$ ). In der Gruppe des Ko-Transfers von  $5 \times 10^5$  CD8 Treg Sub I+IV und  $1 \times 10^5$  CD8 T-Zellen konnten kaum infizierte Zellen in der Leber, im Vergleich zu den anderen Gruppen, gezählt werden.

### Schlussfolgerung:

CD8 Treg Sub I+IV konnten mit  $5 \times 10^5$  transferierten Zellen die schützenden CD8 T-Zellen nicht supprimieren.

#### **4.7.1.2.2. Transfer von $9 \times 10^5$ CD8 Treg Sub I+IV**

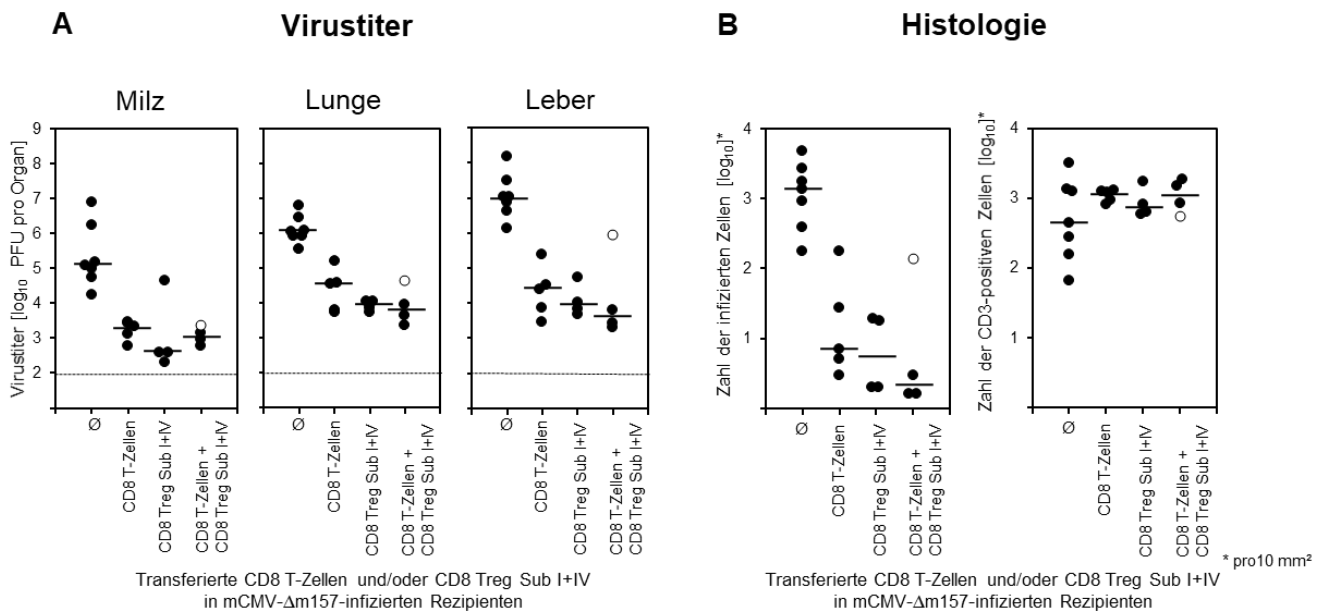
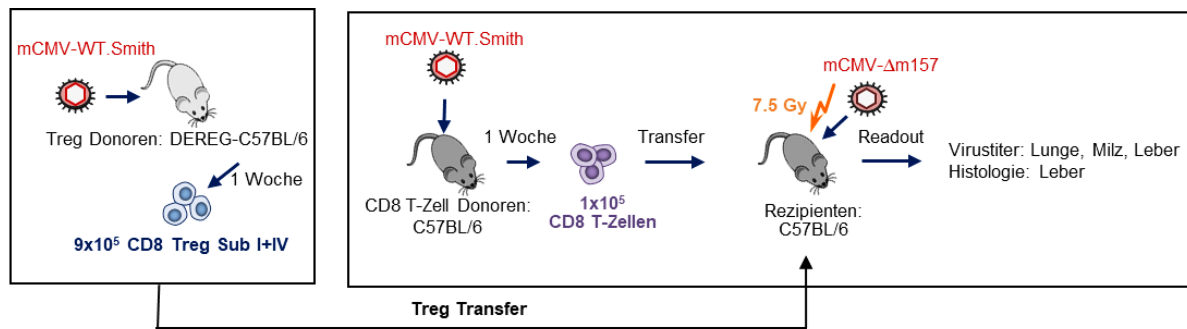
Aufgrund der vorherigen Ergebnisse des CD4 Treg Transfers und den Beobachtungen nach einem Zelltransfer von  $5 \times 10^5$  CD8 Treg Sub I+IV, sollte in dem Folgeversuch das 10-fache an CD8 Treg Sub I+IV relativ zu den schützenden CD8 T-Zellen in einem AT eingesetzt werden. In Folge der zu geringen Zellzahl an CD8 Treg Sub I+IV nach der durchflusszytometrischen Zellsortierung konnte nur das 9-fache an CD8 Treg Sub I+IV transferiert werden. Der Ablauf dieses Versuches war ansonsten identisch wie zum vorherigen Versuch (s. **Tab. 14**).

Tab. 14: Gruppen des Transfers von CD8 Treg Sub I+IV und CD8 T-Zellkonzentrationen.

Gruppen	mCMV- $\Delta$ m157 2x10 <sup>5</sup> pfu i.f.	CD8 T-Zellen mCMV-infizierter Donoren	CD8 Treg Sub I+IV	Tierzahlen
A	+	-	-	7
B	+	1x10 <sup>5</sup>	-	5
C	+	-	9x10 <sup>5</sup>	4
D	+	1x10 <sup>5</sup>	9x10 <sup>5</sup>	4

Die Ergebnisse sind in **Abb. 34** dargestellt. Es war zu beobachten, dass die Virustiter (s. **Abb. 34A**) in den Kontrollgruppen ( $\emptyset$ ) von Milz, Lunge und Leber, wie auch schon in den vorherigen Versuchen relativ hoch lagen (Mittelwerte:  $1,5 \times 10^6$  –  $3,2 \times 10^7$  ( $5,3-7,1 \log_{10}$ )) PFU pro Organ. Wie auch in den früheren Versuchen konnte beobachtet werden, dass  $1 \times 10^5$  CD8 T-Zellen einen deutlich positiven Effekt nach einer mCMV-Infektion aufweisen. Im Vergleich zum Transfer von CD8 Treg Sub I+IV des vorherigen ATs (s. **Abb. 33A**) konnte durch den alleinigen Transfer von  $9 \times 10^5$  CD8 Treg Sub I+IV kein ähnlicher Virustiter wie in der Kontrolle beobachtet werden, sondern einen noch niedrigeren Titer als die schützenden CD8 T-Zellen in Milz, Lunge und Leber. Auch nach einem Ko-Transfer aus  $9 \times 10^5$  CD8 Treg Sub I+IV und  $1 \times 10^5$  CD8 T-Zellen konnte kein suppressiver Effekt der CD8 Treg Sub I+IV festgestellt werden.

Diese Beobachtung wurde auch histologisch nachgewiesen (s. **Abb. 34B**). Die Zahl der infizierten Zellen in der Leber war in der Kontrollgruppe hoch (Mittelwert:  $1,7 \times 10^3$  ( $3 \log_{10}$ )); jedoch waren kaum infizierte Zellen in den Transfergruppen von CD8 Treg Sub I+IV alleine und des Ko-Transfers von CD8 T-Zellen und CD8 Treg Sub I+IV zählbar. Hingegen lag die Zahl der CD3-positiven Zellen pro 10mm<sup>2</sup> in der Leber in der Kontrollgruppe bei einem Mittelwert von  $9,7 \times 10^2$  ( $2,7 \log_{10}$ ) und bei den anderen Transfergruppen bei einem Mittelwert von ca.  $1 \times 10^3$  ( $3 \log_{10}$ ).



**Abb. 34: Testen des suppressiven Potentials von  $9 \times 10^5$  CD8 Treg Sub I+IV in einem AT.** Eine Woche nach einer mCMV-Infektion (i.p.) von drei C57BL/6 CD8 T-Zell -Donor Mäusen, wurden mCMV-spezifische CD8 T-Zellen via positiv-Selektion MACS isoliert und i.v. mit einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  CD8 T-Zellen den 20 DEREG-C57BL/6 AT Rezipienten Mäusen transferiert, welche mit 7,5Gy bestrahlt wurden und intraplantar mit mCMV- $\Delta$ m157  $2 \times 10^5$  PFU infiziert wurden. Gleichzeitig wurden aus 8 akut mCMV-infizierten DEREG-C57BL/6 Mäusen die CD8 Treg Sub I+IV aus einem Pool von Gesamtmilzen immunomagnetisch via negativ-Selektion MagniSort isoliert, mit Antikörpern markiert und zytofluorometrisch sortiert (CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+/</sup>CD127<sup>-</sup>). Die CD8 Treg Sub I+IV wurden den Rezipienten Mäusen mit einer Konzentration von  $9 \times 10^5$  i.v. transferiert. Als Kontrolle dienten bestrahlte und mit mCMV- $\Delta$ m157 infizierte Rezipienten ohne CD8 T-Zell Transfer (Ø). (A) Die Virustiter in Milz, Lunge und Leber wurden mittels *Plaque*-Assay bestimmt. (B) Die Zahl infizierter Zellen wurden in der Leber (pro 10mm<sup>2</sup>) mittels IE1-spezifischer Immunhistologie ermittelt. Die Ergebnisse repräsentieren die Einzeltiterbestimmungen am Tag 12 nach Infektion (schwarze Punkte). Aufgrund geringer Zellzahl erhielt eine Maus die Hälfte der ursprünglich transferierten Zellzahlen ( $5 \times 10^4$  CD8 T-Zellen;  $5 \times 10^5$  CD8 Treg Sub I+IV) (weiße Punkte). Der Median ist als horizontaler Balken dargestellt und die gestrichelte horizontale Linie stellt den Schwellenwert dar.

Schlussfolgerung:

CD8 Treg Sub I+IV konnten mit  $9 \times 10^5$  transferierten Zellen die CD8 T-Zellen mCMV-infizierter Donoren mit einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  nicht supprimieren. Hingegen schützten die CD8 Treg Sub I+IV nach einem alleinigen Transfer mindestens so gut wie CD8 T-Zellen.

#### 4.7.1.2.3. Transfer von $5 \times 10^4$ CD8 Treg Sub I

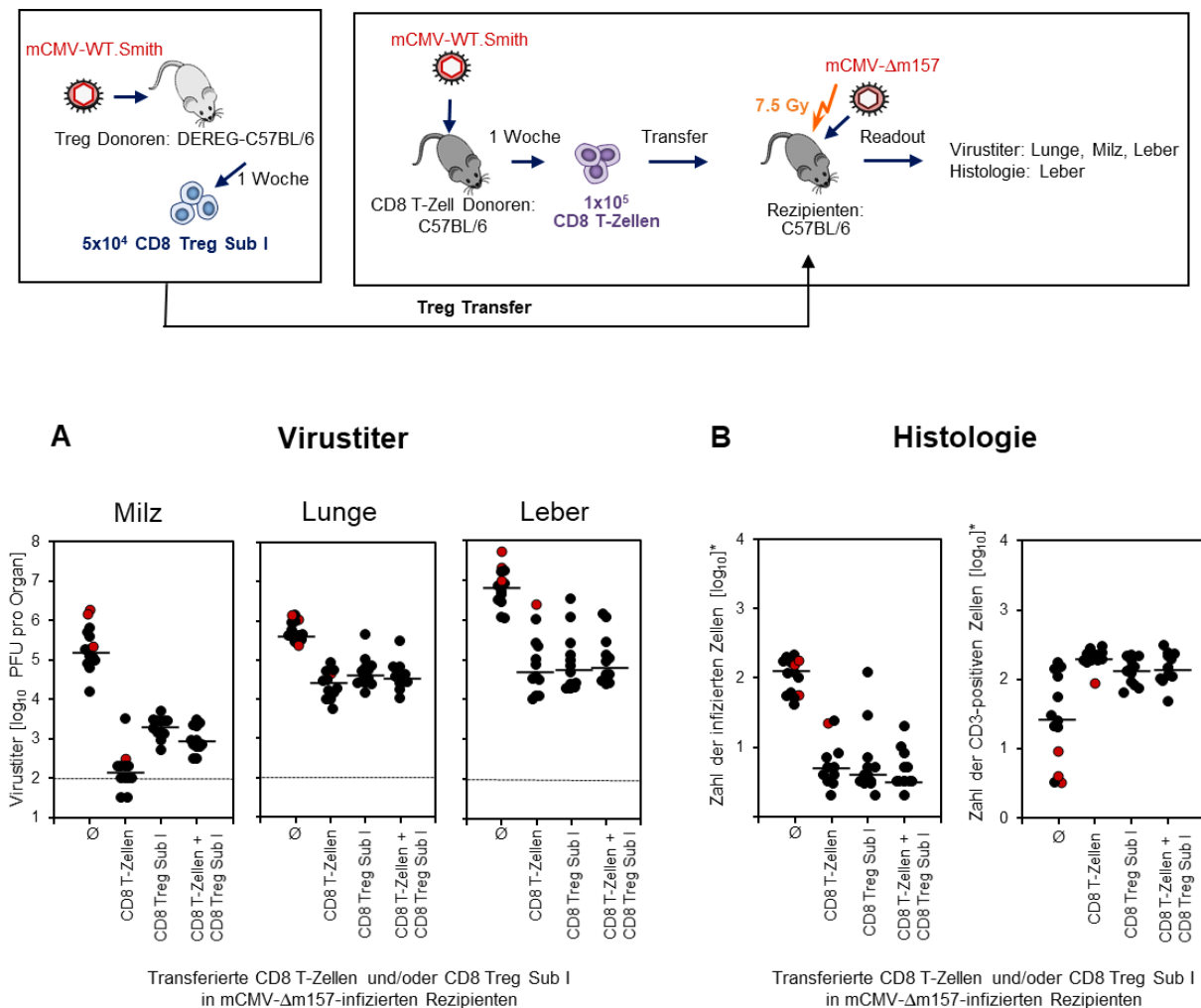
Im vorherigen Experiment konnte beobachtet werden, dass CD8 Treg Sub I+IV bei einer Konzentration von  $9 \times 10^5$  vor einer mCMV-Infektion ebenso schützen wie bei einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  CD8 T-Zellen. Dadurch stellte sich die Frage, ob im Gegensatz zu den CD4 Treg, weniger CD8 Treg als CD8 T-Zellen transferiert werden müssen, um einen suppressiven Effekt erkennen zu können. In einer AT Kinetik (s. Anhang **Abb. A15**) konnte gezeigt werden, dass bei einem Transfer mit 2-fach weniger CD8 Treg Sub I als CD8 T-Zellen (2:1), die CD8 Treg Sub I in der Lage sind, die schützenden CD8 T-Zellen zu supprimieren. Aus diesem Grund wurde ein Folgeversuch mit  $5 \times 10^4$  CD8 Treg Sub I wiederholt. In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurde der AT mit **CD8 Treg Sub I** durchgeführt. Zusätzlich dazu, wurden **C56BL/6** Mäuse anstelle von **DEREG-C56BL/6** als Treg Donoren benutzt, um zu gewährleisten, dass die Suppression unabhängig von dem verwendeten Mausstamm ist. Dazu wurden aus mCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen aus einem Gesamtpool von Milzen (1 Woche p.i.) die CD8 T-Zellen via positiv-Selektion MACS (s. 3.3.2.1) isoliert und auf einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  pro Maus eingestellt. Die CD8 Treg Sub I wurden aus akut infizierten C57BL/6 Mäusen aus einem Gesamtpool von Milzen mittels negativ-Selektion MagniSort (s. 3.3.3) isoliert, zytofluorometrisch sortiert ( $CD8^+CD3^+CD122^+PD-1^+CD127^-$ ) und auf einer Zellzahl von  $5 \times 10^4$  eingestellt. Die Rezipienten Mäuse wurden 24 Stunden vor dem AT mit 7,5Gy bestrahlt (s. 3.6.1), sodass eine Immunsuppression gewährleistet ist. Am Tag des ATs wurden den Rezipienten Mäusen CD8 T-Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  und  $5 \times 10^4$  CD8 Treg Sub I transferiert (i.v.) (s. **Tab. 15**). Zusätzlich dazu, wurden die Rezipienten mit der Virusmutante mCMV- $\Delta$ m157 infiziert (i.f.).

Tab. 15: Gruppen des Transfers von CD8 Treg Sub I und CD8 T-Zellkonzentrationen.

Gruppen	mCMV- $\Delta$ m157 $2 \times 10^5$ pfu i.f.	CD8 T-Zellen mCMV-infizierter Donoren	CD8 Treg Sub I	Tierzahlen	gestorben Tag 11
A	+	-	-	14	3
B	+	$1 \times 10^5$	-	12	1
C	+	-	$5 \times 10^4$	12	
D	+	$1 \times 10^5$	$5 \times 10^4$	12	

11 Tage nach dem Transfer, als die immunsupprimierten AT-Rezipienten welche keine CD8 T-Zellen erhalten haben (Gruppe A; s. **Tab. 15**), der mCMV-Infektion erlagen, wurden Milz, Lunge und Leber pro Maus isoliert. Die Virustiterbestimmung in den Organhomogenaten wurde

mittels Plaque-Assays (s. 3.2.2.2) ermittelt. Zusätzlich dazu wurden die mCMV-spezifischen Zellen pro Leber immunhistologisch nachgewiesen (s. 3.5.3). Die Ergebnisse des ATs sind in **Abb. 35** dargestellt.



**Abb. 35: Testen des suppressiven Potentials von 5x10<sup>4</sup> CD8 Treg Sub I in einem AT.** Eine Woche nach einer mCMV-Infektion (i.p.) von vier C57BL/6 CD8 T-Zell-Donor Mäusen, wurden CD8 T-Zellen via positiv-Selektion MACS isoliert und i.v. mit einer Konzentration von 5x10<sup>4</sup> CD8 T-Zellen den 50 C57BL/6 AT Rezipienten Mäusen transferiert, welche einen Tag vor Transfer mit 7,5Gy bestrahlt und intraplantar mit mCMV-Δm157 2x10<sup>5</sup> PFU infiziert worden waren. Gleichzeitig wurden aus 10 akut mCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen die CD8 Treg Sub I aus einem Pool von Gesamtmilzen immunomagnetisch via negativ-Selektion MagniSort isoliert, mit Antikörpern markiert und zytofluorometrisch sortiert (CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>). Die CD8 Treg Sub I wurden den Rezipienten Mäusen mit einer Konzentration von 5x10<sup>4</sup> i.v. transferiert. Als Kontrolle dienen bestrahlte und mit mCMV-Δm157 infizierte Rezipienten ohne CD8 T-Zell Transfer (∅). **(A)** Die Virustiter in Milz, Lunge und Leber wurden mittels *Plaque-Assay* bestimmt. **(B)** Die Zahl infizierter Zellen wurden in der Leber (pro 10mm<sup>2</sup>) mittels IE1-spezifischer Immunhistologie ermittelt. Die Ergebnisse repräsentieren die Einzeltiterbestimmungen am Tag 11 nach Infektion (schwarze Punkte). Die Mäuse, die am Tag des AT Abbruchs schon tot waren, wurden als roten Punkte dargestellt. Der Median ist als horizontaler Balken dargestellt und die gestrichelte horizontale Linie stellt das Detektionslimit des ATs dar.

Es war zu beobachten, dass die Virustiter (s. **Abb. 35A**) in den Kontrollgruppen (∅) von Milz, Lunge und Leber, wie erwartet bei Mittelwerten von 4x10<sup>5</sup> – 1x10<sup>7</sup> (5,3-6,8 log<sub>10</sub>) PFU pro Organ lag. Der Transfer von 1x10<sup>5</sup> CD8 T-Zellen schützt vor einer mCMV-Infektion. Im Vergleich zu

den Transfer von CD8 Treg Sub I+IV der früheren ATs, (s. **Abb. 33A** und **Abb. 34A**) konnte durch den alleinigen Transfer von  $5 \times 10^4$  CD8 Treg Sub I ein 1,6-facher Anstieg des Medians im Vergleich zu den CD8 T-Zellen in der Milz beobachtet werden. Dies konnte nicht in der Lunge und Leber festgestellt werden. Nach einem Ko-Transfer aus  $5 \times 10^4$  CD8 Treg Sub I und  $1 \times 10^5$  CD8 T-Zellen konnte ein suppressiver Effekt der CD8 Treg Sub I in der Milz festgestellt werden, da der Median um ein 1,4-faches, im Vergleich zu den schützenden CD8 T-Zellen, expandierte. Dies konnte jedoch nicht in der Lunge und Leber erkannt werden.

Die Daten bestätigten sich immunhistologisch (s. **Abb. 35B**). Während kaum infizierte Zellen in den transferierten Gruppen, bis auf der Kontrollgruppe, gezählt werden konnten, lag die Zahl der CD3-positiven Zellen pro  $10 \text{mm}^2$  in allen drei transferierten Gruppen bei einem Mittelwert von  $1,7 \times 10^2$  ( $2,2 \log_{10}$ ).

### Schlussfolgerung:

CD8 Treg Sub I konnten mit  $5 \times 10^4$  transferierten Zellen die CD8 T-Zellen mit einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  organspezifisch (nur Milz) supprimieren. Hingegen schützen CD8 Treg Sub I nach einem alleinigen Transfer und als Ko-Transfer mit CD8 T-Zellen mindestens so gut wie bei einem alleinigen Transfer von CD8 T-Zellen in Lunge und Leber.

## 5. DISKUSSION

### 5.1. CD8 Treg und CD8 Treg Subpopulationen sind suppressiv *in vitro*

Treg sind essenziell für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase und können eine Vielzahl von physiologischen und pathologischen Immunantworten supprimieren (Sakaguchi et al. 2009). Da Defekte der Treg Funktionen zahlreichen immunvermittelten Krankheiten zu Grunde liegen, besteht großes Interesse, die Funktion von Treg zu verstehen, um ihre therapeutischen Funktionen verbessern zu können (McMurphy & Levings 2012). Während die angeborene und adaptive Immunität durch CD4 Treg moduliert werden kann, gibt es bislang nur wenige Studien darüber, ob und inwieweit CD8 Treg ein suppressives Potential aufweisen. Die Bestimmung der Aktivität der Treg *in vitro* ist somit der erste Schritt, um die Funktionen der Treg analysieren zu können (Collison & Vignali 2011).

Bereits bekannt war, dass CD4 Treg unter anderem die Aktivierung, Proliferation und Zytokinproduktion von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterdrücken. Mit Hilfe des *in vitro* Suppression-Assays konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass CD8 Treg Sub I+IV aus mCMV-infizierten und aus naiven Mäusen mindestens so suppressiv sind wie CD4 Treg (s. **Abb. 13**; **Abb. 14**; **Abb. 15**). Dabei hängt die Stärke der Suppression vom Tresp zu Treg Verhältnis ab. Dies war vor allem unter den CD8 Treg Sub I+IV aus naiven Mäusen zu erkennen (s. **Abb. 15**). Obwohl retrospektive Analysen gezeigt haben, dass in den Suppression-Assays CD8 Treg Sub I+IV (CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+/-</sup>CD127<sup>-</sup>) anstelle der erwünschten CD8 Treg Population (CD8 Treg Sub I): CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> getestet wurden, konnten frühere Daten aus unserer Arbeitsgruppe auch das suppressive Potential der CD8 Treg Sub I nachweisen. Obgleich Studien besagen, dass nur durch den PD-1 Marker die CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> Zellen ihre regulatorischen Fähigkeiten erhalten (Dai et al. 2010), konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass obwohl der Anteil an PD-1 unter den CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> Zellen aus infizierten und naiven Mäusen ca. 50% PD-1<sup>+</sup> bzw. PD-1<sup>-</sup> beträgt, die CD8 Treg Sub I+IV ein suppressives Potential aufwiesen (s. **Abb. 15**). Dies konnte interessanterweise auch durch einen Suppression-Assay der CD8 Treg Subpopulationen aus mCMV-infizierten Mäusen gezeigt werden, denn die PD-1 negativen CD8 Treg Sub II (CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>), hatten ein mindestens genauso suppressives Potential gegenüber der CD4 Tresp Proliferation wie CD8 Treg Sub I (s. **Abb. 29**). Selbst die CD8 Treg Sub III (CD8<sup>+</sup>CD122<sup>-</sup>PD-1<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>) zeigten ein suppressives Potential gegenüber den CD4 Tresp, wodurch sich die Frage stellt, welcher der

Marker nun für den suppressiven Effekt verantwortlich ist. Dieser Fragestellung muss in der Zukunft noch nachgegangen werden.

Es konnte stets gezeigt werden, dass CD4 und CD8 Treg Sub I, II, III und I+IV die CD4 Tresp stärker als die CD8 Tresp supprimieren. Auffällig war jedoch, dass die Zellzahlen unter den CD8 Tresp deutlich niedriger lagen als unter den CD4 Tresp. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die CD8 Tresp die Nachweisgrenze von CFSE, welche bereits nach acht Zellzyklen erreicht ist, sehr viel schneller erreichen als CD4 Tresp. Somit besitzen CD8 Tresp eine erheblich höhere Proliferationsrate, die im Rahmen der durchflusszytometrischen Analysen nicht mehr gemessen werden konnte (Lyons 2000). Obwohl die Proliferation der CD8 Tresp einen Tag (Tag 4 der Kokultur) vor den CD4 Tresp gemessen wurde, sollte für die Zukunft ein noch früherer Zeitpunkt gewählt werden, um getrennte Proliferationsstufen zu erkennen. Des Weiteren konnten CD8 Treg Sub I+IV aus naiven Mäusen nur während einer 1:1 Titration [Tresp:Treg] die CD4 Tresp unterdrücken, jedoch aber nicht die CD8 Tresp im Gegenzug zu CD8 Treg Sub I+IV aus mCMV-infizierten Mäusen (s. **Abb. 13** und **Abb. 15**). Hingegen konnten CD4 Treg aus naiven Mäusen die CD8 Tresp stärker supprimieren als CD4 Treg aus infizierten Mäusen (s. **Abb. 13** und **Abb. 14**). Eine mCMV-Infektion beeinflusst demnach das suppressive Potential der CD4 und CD8 Treg Sub I+IV *in vitro*.

Studien berichten, dass durch die Bedingungen des Suppression-Assays die Suppression von APCs ein Hauptmechanismus der Treg Funktionen darstellt (Shevach 2009, McMurphy & Levings 2012). Um sicherzustellen, dass in der vorliegenden Arbeit die Treg ausschließlich die Tresp supprimieren, sollte dieser Assay nochmals in Abwesenheit von APCs mit *bead*-gekoppelten oder Platten-gebundenen  $\alpha$ -CD28 Antikörper durchgeführt werden, sodass die Tresp die einzigen Zielzellen der Treg sind (Shevach 2009).

Es muss bei den Daten berücksichtigt werden, dass neben den Tresp zu Treg Titrationen keine parallele Titration von Zellen, die keine Treg sind, (mit derselben Behandlung wie Treg) zu den Tresp titriert wurden. Laut Studien ist dies jedoch essenziell, um aufzuklären ob der suppressive Effekt der Treg ausschließlich durch Zelltod aufgrund von Überfunktion durch deren zytotoxischen Funktion verursacht wurde (Sakaguchi et al. 2009, Shevach 2009, McMurphy & Levings 2012). In Zukunft sollte der Suppression-Assay außerdem in Gegenwart und Abwesenheit von IL-2 gemessen werden, um die Viabilität der Zellen zu bestätigen, da Treg anfällig für Zelltod sind (Taams et al. 2001). Daten aus unserem Labor zeigten zudem, dass CD8 Treg – aber nicht CD4 Treg – zytolytisch aktiv sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden CFSE markierte Tresp eingesetzt, um die Unterdrückung der Proliferation durch Zugabe der Treg durchflusszytometrisch zu messen. Die CFSE Markierung der Tresp ermöglicht eine separate Analyse von Tresp und Treg. Es ermöglicht aber auch Analysen zur Proliferation z.B. der Expression von Zelloberflächenmarkern oder Zytokinproduktion von proliferierenden oder nicht-proliferierenden Zellen (Crome et al. 2010, McMurchy & Levings 2012). Die prozentuale Suppressionrate der Zellen, die sich mindestens einmal geteilt haben, wird automatisch mittels der durchflusszytometrischen Software als Graph dargestellt. Dabei wird der Anteil an Zellen bestimmt, die sich mindestens einmal geteilt haben (mit der Ausnahme des rechten *Peaks* = ungeteilte Zellen). Dieses Verfahren berücksichtigt jedoch nicht, dass Tresp mehrfache Zellteilungen durchlaufen können, wodurch kleine *Peaks* schwer zu erkennen sind (McMurchy & Levings 2012). Daher ist eine geringe Anzahl von Tresp überpräsentiert, welches automatisch den Anschein vermittelt, dass die suppressive Fähigkeit der Treg verringert ist (McMurchy & Levings 2012). Dies ist u.a. in Experiment 1 zu erkennen, in welchem das suppressive Potential der CD8 Treg Sub I+IV auf die CD8 Tresp getestet wurde (s. **Abb. 13**). Wären alle *Peaks* ersichtlich, könnte eine präzisere Aussage über den suppressiven Effekt der Treg getroffen werden. Aus diesem Grund, sollte in Zukunft durchflusszytometrische Softwareprogramme für die CFSE basierte Suppression verwendet werden, um beispielsweise den Proliferations- oder Teilungsindex zu berechnen (McMurchy & Levings 2012). Dadurch kann eine genaue Aussage darüber getroffen werden, wie hoch der prozentuale Anteil an Tresp und Treg in der Kokulturen ist.

Die verwendete Methode des *in vitro* Suppression-Assays, basiert auf der Beschreibung nach Mayer und Kollegen (Mayer & Sparwasser 2014). In der Publikation wurde Ethidiumbromid (EMA) und Propidiumiodid (PI) benutzt, um lebende von toten Zellen zu unterscheiden (Mayer & Sparwasser 2014). Aufgrund der Inkompatibilität der Substanzen mit dem, in der vorliegenden Arbeit zur Verfügung stehenden Durchflusszytometer, konnten diese Farbstoffe nicht verwendet werden. Daher wurden die Zellen lediglich über ihre Größe und Granularität gemessen, um lebende und tote Zellen voneinander zu unterscheiden. Tote Zellen haben eine geringere FSC-Streuung, sowie eine höhere SSC-Streuung als lebende Zellen. Dadurch konnte in der vorliegenden Arbeit ein *Gate* nur um die lebenden Zellen mit Hilfe der Software des Durchflusszytometers erstellt werden, wodurch die toten Zellen in den Analysen vermieden werden konnten. Dadurch stellt es eine gleichwertige Methode im Vergleich zur Färbung mit EMA und PI dar. Problematisch ist jedoch, dass durch das Entstehen von Zellcluster die Wahrscheinlichkeit von Fehlern und falsch-positiven Ergebnissen erhöht wird. Um eine präzisere Darstellung der lebenden und toten Zellen zu erhalten, könnte in der Zukunft das

„Zombie NIR Kit“ von BioLegend benutzt werden. Es ist ein aminreaktiver und wasserlöslicher Fluoreszenzfarbstoff, welcher eine rote Fluoreszenz bereitstellt und sich somit für eine Mehrfarbenerkennung eignet. Diverse Publikationen berichteten von den positiven Eigenschaften dieses Kits im Vergleich zu EMA und PI, da die Handhabung toxischer Chemikalien nicht notwendig ist (Pinder et al. 2017, García Nores et al. 2018, Kilens et al. 2018, Wang et al. 2018). Zusätzlich dazu kann eine Aussage darüber getroffen werden, wie hoch der prozentuale Anteil an lebenden im Vergleich zu toten Zellen ist.

### 5.2. Suppressive Mechanismen der CD8 Treg

Durch den Suppression-Assay konnte zwar gezeigt werden, dass die Treg ein suppressives Potential *in vitro* aufweisen, doch konnte diese Methode nicht darüber Aufschluss geben, welche molekularen Mechanismen für den suppressiven Effekt verantwortlich sind. Dies ist jedoch essenziell ist um zu verstehen, welche Mechanismen zur Erhaltung der Selbsttoleranz und Immunhomöostase durch Treg beitragen (Sakaguchi et al. 2009). Zudem kann damit geklärt werden, welcher Mechanismus ein geeignetes Ziel für die effektive Kontrolle von Immunantworten via Treg ist (Sakaguchi et al. 2009). Verschiedene Studien beschrieben eine Reihe von Regulationsmechanismen die durch Treg vermittelt werden (Sun et al. 1988, Zhang et al. 1993, Poussier et al. 2002, Endharti et al. 2005, Probst et al. 2005, Pandiyan et al. 2007, Bézie et al. 2018, Vieyra-Lobato et al. 2018), worauf die Analyse der suppressiven Mechanismen von CD4 und CD8 Treg in der vorliegenden Arbeit basierte.

- a) Direkter Tod der Zielzelle
- b) Negative Signalisierung durch *CTLA-4* durch die Interaktion mit APCs oder *FasL*
- c) Freisetzung von immunsuppressiven Zytokinen wie IL-10, IL-2, TGF $\beta$ -1, IL-34 und INF $\gamma$

#### 5.2.1. CTLA-4 Expression von CD4 und CD8 Treg

Aufgrund der beschriebenen Regulationsmechanismen der Treg, war es in der vorliegenden Arbeit essenziell, zunächst die Oberflächenexpression von CD8 Treg im Vergleich mit CD4 Treg zu analysieren. Dabei wurde das Augenmerk im Rahmen dieser Arbeit auf die CD8 Treg Sub I (CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>) gelegt, da diese Zellpopulation im Mittelpunkt der Analysen stand.

Die Daten haben wie erwartet gezeigt, dass CD4 Treg *CTLA-4*, jedoch nicht *CD28* oder *FasL* exprimierten (s. **Abb. 17**). Bereits bekannt ist, dass *CTLA-4* durch eine Aktivierung von T-Zellen, sowie von CD4 Treg konstitutiv exprimiert wird. Dadurch kommt diesem Oberflächenmarker eine

Schlüsselrolle bei der Treg vermittelten Suppression zu (Shevach 2009, Qureshi et al. 2011, Ha et al. 2019). In früheren Studien wurde bezüglich der Modifikationen in der APC Funktion berichtet, dass aktivierte CD4 Treg die Hochregulation erschweren oder die Expression von CD80/CD86 herunterregulieren (Linsley et al. 1994, Sakaguchi et al. 2009). Beides scheint von der Expression von *CTLA-4* abhängig zu sein (Zhao et al. 2006, Sakaguchi et al. 2009). Das *CTLA-4* Homolog *CD28* vermittelt sowohl eine IL-2 Produktion als auch eine T-Zellproliferation, welche durch *CTLA-4* wiederum inhibiert werden (Chambers et al. 1999, Brunner-Weinzierl et al. 2004, Pentcheva-Hoang et al. 2004, Hebel et al. 2013). Interessanterweise konnte im fortgeschrittenen Differenzierungszustand von CMV-spezifischen T-Zellen eine mangelnde Expression der kostimulatorischen Rezeptoren *CD27* und *CD28* festgestellt werden, obwohl diese ansonsten konstituierend auf naiven T-Zellen exprimiert sind (Appay et al. 2002, van den Berg et al. 2019). Dies ist wohl der Grund dafür, warum CD4 und CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen *CD28* nicht exprimieren (s. **Abb. 17**). Es wurde postuliert, dass eine CD4 Treg vermittelte Proliferationsunterdrückung durch anti-*CTLA-4* *in vitro* rückgängig gemacht werden könnte, doch diese Wirkung konnte nicht in allen Studien beobachtet werden (Thornton et al. 2004). Es konnte gezeigt werden, dass eine CD4 Treg Defizienz *in vivo* ausreicht um unter anderem diverse Tumore auszulösen (Wing et al. 2008). Da CD4 Treg die Aktivierung und Expansion inflammatorischer T-Zellen unterdrücken, ist die Funktion von *CTLA-4* entscheidend (Hebel et al. 2013). Die Bindung von *CTLA-4* der Treg mit CD80/86 induziert die Reaktion der CD80 und CD86 Expression dendritischer Zellen, wodurch kaum *CD28* Signale möglich sind (Qureshi et al. 2011, Ha et al. 2019). Die Expression von *CTLA-4* der CD4 Treg ist zudem von großer Bedeutung *in vivo*, da sie nur so regulatorisch wirken können (Wing et al. 2008, Kolar et al. 2009, Hebel et al. 2013).

Die Daten der vorliegenden Arbeit konnten zudem zeigen, dass CD8 Treg Sub I ebenfalls *CTLA-4*, wenn auch weniger stark als die CD4 Treg, exprimierten (s. **Abb. 17**). Ähnlich wie auch bei den CD4 Treg konnte kaum eine Expression von *CD28* oder *FasL* unter den CD8 Treg beobachtet werden (s. **Abb. 17**). Interessanterweise zeigte jedoch eine Studie, dass CD8 T-Zellen generell stärker *CTLA-4* exprimieren als CD4 T-Zellen (Pandiyani et al. 2007). Yu und seine Kollegen konnten zeigen, dass *CTLA-4* nach einer T-Zellaktivierung vor einer Regulation einer verstärkten Antitumorimmunität schützen soll (Yu et al. 2012). Dementsprechend schützen vor allem CD8 Treg vor Antitumorimmunität. Generell bedeutet eine Expression von *CTLA-4* durch CD8 Treg Sub I, dass die Produktion von IL-2, IL-2R Expression und die Zell-Zyklus-Progression aktivierter T-Lymphozyten inhibiert werden (Walunas et al. 1996). Ein weiterer suppressiver Mechanismus von *CTLA-4* durch CD8 Treg Sub I ist, dass Tyrosin-unabhängige

Signale durch eine Membranproximale-Region der zytoplasmatischen Domäne von *CTLA-4* vermittelt werden können, welche die T-Zellaktivierung unmittelbar hemmen (Cinek et al. 2000).

Des Weiteren wurde beschrieben, dass die Ligation von Fas mit *FasL* unmittelbar Apoptose initiiert und für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase essenziell ist (Volpe et al. 2016). Dieser Mechanismus wird unter anderem von CD8 Treg verwendet, um Effektor T-Zellen durch gezielte Zytotoxizität zu töten (Vieyra-Lobato et al. 2018). Studien berichten, dass die Oberflächenexpression von *FasL* nur durch eine Stimulation des T-Zellrezeptors mit einem Antigen wie beispielsweise  $\alpha$ -TCR/CD3 induziert wird, wobei CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach der Stimulation, im Vergleich zu den CD8<sup>+</sup> T-Zellen, eine sehr schwache Expression von *FasL* aufweisen (Suda et al. 1995, Oberg et al. 1997, Janssen et al. 2000b, Janssen et al. 2000a). Es ist demnach essenziell die Expression von *FasL* der Treg mit einem geeigneten Stimulus zu wiederholen, um definitiv ausschließen zu können, dass weder CD4 noch CD8 Treg Sub I *FasL* exprimieren.

Zusammenfassend zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass *CTLA-4* von CD4 und CD8 Treg Sub I in der Akutphase der mCMV-Infektion exprimiert wurde. In weiteren Experimenten könnten zusätzlich dazu die Interaktion von *CD28*, *CTLA-4* und *FasL* mit den Treg evaluiert werden. Dazu sollte zudem eine getrennte Analyse der CD8 Treg Subpopulationen durchgeführt werden, um Unterschiede in der Expression zwischen den CD8 Treg Subpopulationen erkennen zu können.

### 5.2.2. Zytokinsekretion von CD4 und CD8 Treg

Es gibt generell mehrere Methoden, um die Produktion von Zytokinen zu ermitteln – wie beispielsweise die Zytokin Expression auf mRNA Ebene, die Proteinsynthese von Zytokinen sowie die Sekretion von Zytokinen (Mosmann & Fong 1989, Openshaw et al. 1995, Carter & Swain 1997, Finkelman & Morris 1999). Limitationen dieser Techniken sind jedoch, dass die Expression von Zytokinen auf mRNA-Ebene mit den Mengen der Zytokinprotein-Produktion eventuell nicht im gleichen Ausmaß korreliert, oder aber die zelluläre Zytokinprotein-Produktion nicht im gleichen Ausmaß mit der Zytokinsekretion korreliert (Finkelman & Morris 1999). Des Weiteren liegt die Zytokinproduktion immunisierter Tiere unter den nachweisbaren Detektionslimit, wodurch es essenziell ist die Immunzellen *in vitro* mit einem Antigen zu restimulieren, um ihre Zytokinproduktion nachweislich bestätigen zu können (Fujihashi et al. 1993, Openshaw et al. 1995, Finkelman & Morris 1999). Auch in der vorliegenden Arbeit wurden die Tresp mit einem  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$  Antikörper polyklonal stimuliert, es kann somit nicht sicher gesagt

werden, ob die getestete Zytokinsekretion mit der Zytokinproduktion *in vivo* korreliert (Finkelman & Morris 1999).

Für die Freisetzung von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen der Treg wie IL-10, IL-2, TGF $\beta$ -1, IL-34 und INF $\gamma$  wurden die Überstände der Suppression-Assay Kulturen aus mCMV-infizierten und naiven Mäusen am zweiten, vierten und fünften Tag gesammelt und durchflusszytometrisch analysiert. Wie bereits erwähnt, stellte sich durch retrospektive Analysen heraus, dass nicht CD8 Treg Sub I sondern CD8 Treg Sub I+IV (CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+/-</sup>CD127<sup>-</sup>) in den Suppression-Assays eingegangen sind. Es konnte dabei festgestellt werden, dass CD4 Treg sowohl aus mCMV-infizierten als auch aus naiven Mäusen die Sekretion von INF $\gamma$ , IL-2, IL-10 und IL-34 durch stimulierte Tresp supprimieren konnten (s. **Abb. 18** und **Abb. 19**). Dass die Sekretion dieser Zytokine von CD4 Treg supprimiert werden, wurde bereits von mehreren Studien bestätigt (Thornton & Shevach 1998, Aandahl et al. 2004, Zhao et al. 2006, Shevach 2009, Li et al. 2010, Schmidt et al. 2012). Im Gegensatz zu den CD4 Treg, konnten CD8 Treg Sub I+IV aus mCMV-infizierten Mäusen die Sekretion von ausschließlich INF $\gamma$ , IL-2 und IL-10 durch stimulierte CD4 Tresp, nicht jedoch durch CD8 Tresp, supprimieren (s. **Abb. 18**). CD8 Treg Sub I+IV aus naiven Mäusen konnten die getesteten Zytokine durch stimulierte CD4 Tresp, nicht jedoch von CD8 Tresp, von IL-2, IL-10 und TGF $\beta$ -1 minimal supprimieren. (s. **Abb. 19**). Eine mCMV-Infektion beeinflusst demnach auch die Freisetzung von Zytokinen *in vitro*.

Bereits frühere Studien berichteten darüber, dass die Sekretion von IL-10 durch CD8 Treg als Hauptmechanismus für deren suppressiven Effekt verantwortlich sein soll (Endharti et al. 2005, Rifa'i et al. 2008, Dai et al. 2010, Li et al. 2014b). Eine Studie von Endharti und Kollegen konnte sogar das erste Mal zeigen, dass CD8 Treg die INF $\gamma$  Produktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch die Produktion von IL-10 *in vitro* unterdrücken können, wobei CD8 Treg in seiner Studie als CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> definiert waren (Endharti et al. 2005). CD8 Treg die IL-10 produzieren, sollen zudem die Proliferation von CD4 positiven Th1 und Th2-Zellen supprimieren (Hisatsune et al. 1992, Inoue et al. 1993, Vieyra-Lobato et al. 2018). Zusätzlich dazu, kann IL-10 die Aktivität von zytotoxischen T-Lymphozyten durch die Reduktion der MHC-I Expression in den Zielzellen supprimieren (Filaci et al. 2004, Vieyra-Lobato et al. 2018). IL-2 könnte an der Bildung und Funktion von CD8 Treg beteiligt sein, denn es konnte gezeigt werden, dass IL-2 die Funktion von gedächtnisähnlichen autoregulatorischen CD8 Treg (definiert als CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>) in autoimmunen diabetischen NOD-Mäusen verbessern, sowie ihre Entwicklung durch die Induktion von CD4 Treg unterdrücken kann (Shameli et al. 2013, Li et al. 2014b). Dai und

Kollegen konnten unter anderem zeigen, dass die Verabreichung von IL-2 die Suppression von CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> Treg in Allotransplantatabstoßungen nicht signifikant fördern konnte (Dai et al. 2014). Es bleibt zu klären, ob CTL-Aktivitäten von CD8 Treg an der Regulierung von Effektor-Zellen beteiligt sind (Li et al. 2014b).

### **5.2.3. Ausblick über suppressiven Mechanismen der Treg**

Immer mehr Beweise deuten darauf hin, dass CD4 und CD8 Treg nicht einen einzigen suppressiven Mechanismus verwenden, sondern ein Arsenal verschiedener Mechanismen (Shevach 2009, Schmidt et al. 2012, Vieyra-Lobato et al. 2018). Bisher ist jedoch unklar, wann die Treg welchen Mechanismus anwenden und ob die Treg von einem zum anderen wechseln oder mehrere Mechanismen gleichzeitig anwenden (Schmidt et al. 2012). Zudem existieren verschiedene CD8 Treg Subpopulationen und weitere Untersuchungen sollten zeigen, ob diese auf einen bestimmten Unterdrückungsmechanismus spezialisiert sind. Mit dem *in vitro* Suppression-Assay können nicht alle Aspekte der Zytokinsekretion durch die Treg nachgewiesen werden, da die Suppression der Tresp Sekretion nicht nur die Suppression der Treg widerspiegelt, sondern auch die der APCs berücksichtigt werden müssen (Shevach 2009, Schmidt et al. 2012). In Zukunft könnte, wie bereits in Kapitel 5.1 erwähnt, der Suppression-Assay mit kovalent plattengebundenen  $\alpha$ -CD3 Antikörpern wiederholt werden, sodass die Zytokinsekretion der Treg klar von Tresp und DC getrennt werden kann (Schmidt et al. 2012).

Die Kenntnis der suppressiven Mechanismen der Treg könnten für die therapeutische Manipulation der Treg entscheidend sein, denn bei ausgeprägten Formen von Krebs ist die Suppression von Tresp sehr schädlich, während eine Unterdrückung von autoreaktiven T-Zellen einer Autoimmunerkrankung wünschenswert ist (Schmidt et al. 2012). Es bedarf weiterer Forschung, um zu klären welche Mechanismen für die Treg vermittelten Suppression verantwortlich sind bzw. welche dieser Mechanismen am wichtigsten sind.

### **5.3. CD8 Treg Subpopulationen unterscheiden sich signifikant in ihrer Genexpression**

Niederlova und Kollegen beschrieben CD8 Treg als eine heterogene Population, welche unterschiedliche Zellen sowie Phänotypen involvieren (s. **Abb. 5**) (Niederlova et al. 2021). In der vorliegenden Arbeit konnte durch den Suppression-Assay (s. **Abb. 13; Abb. 14; Abb. 15; Abb. 29**) und den potenziell suppressiven Mechanismen der CD8 Treg (s. **Abb. 17; Abb. 18;**

**Abb. 19)** erkannt werden, dass diese sehr vielfältig in ihrer Funktion sind. Da es bis *dato* keinen klar definierten Phänotyp der CD8 Treg gibt, wurde in der vorliegenden Arbeit CD8 Treg Subpopulationen (CD8 Treg Sub I: CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>; CD8 Treg Sub III: CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD122<sup>-</sup>PD-1<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>) mittels RNA-Sequenzierung charakterisiert, um zu erkennen, inwieweit die CD8 Treg Subpopulationen aus mCMV-infizierten und naiven Mäusen sich in ihrer Genexpression unterscheiden. Die Ergebnisse der Genom-Datenbank wurden dabei in je vier verschiedene Gruppen aufgeteilt: Zelltod (s. 4.5.1), Immun-Checkpoints (s. 4.5.2), Inflammatorische Zytokine und Chemokine (s. 4.5.3) sowie Treg Marker und wichtige Regulatoren (s. 4.5.4). Diese Einteilung beruhte unter anderem auf die von Bézie et al. verwendete Darstellung der möglichen CD8 Treg Mechanismen (Bézie et al. 2018). Insgesamt konnte gezeigt werden, dass es signifikante Unterschiede zwischen CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten und naiven Mäusen gab. Auch zwischen CD8 Treg Sub I und III konnten signifikante Unterschiede beobachtet werden. In den folgenden Kapiteln (s. 5.3.1; 5.3.2; 5.3.3; 5.3.4) konnte durch eine Literaturrecherche festgestellt werden, dass die Genexpression von CD8 Treg Sub I nach einer mCMV-Infektion stark den CD4 Treg ähneln.

### 5.3.1. CD8 Treg Sub I exprimieren Gene, die Apoptose initiieren

In der Gruppe Zelltod (s. 4.5.1), konnte der Vergleich der Genexpression von CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen mit CD8 Treg Sub I aus naiven Mäusen zeigen, dass sich die beiden Gruppen signifikant voneinander – vorwiegend in der Genexpression, die für eine Initiierung der Apoptose beteiligt sind – unterscheiden (s. **Abb. 21**). So wurden *Gzma*, *Gzmb* und *Gzmk*, *Fas* und Perforin (*Prf1*) signifikant stärker von den CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen exprimiert als von naiven Mäusen (s. **Abb. 21**). Im Gegenzug dazu, konnte beobachtet werden, dass fast alle am Zelltod beteiligten Gene, bei dem Vergleich von CD8 Treg Sub I mit CD8 Treg Sub III, signifikant stärker von CD8 Treg Sub I exprimiert wurden (s. **Abb. 22**). Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die CD8 Treg Sub III aufgrund des Phänotyps ähnlich zu den CD8 Tresp (CD8<sup>+</sup>CD122<sup>-</sup>) sind und dadurch eine ähnliche IL-2 Produktion, Proliferation und apoptotische Signalwege aufweisen (Wang et al. 2009, Zou et al. 2014). Um die Ergebnisse zu interpretieren, dass CD8 Treg Sub I Apoptose initiieren, muss verstanden werden, wie es zu einer Infektion einer Zelle mit mCMV kommt. Dies kann prinzipiell in drei verschiedenen Schritten geschehen: 1) lytische Replikationszyklus resultiert in der Produktion und Freisetzung von nachkommenden Viren sowie dem Absterben infizierter Zellen; 2) Etablierung von Latenz, wodurch das virale Genom in Abwesenheit von einer Virusproduktion aufrechterhalten wird; 3) frühe Induktion des Zelltods, wodurch die Zelle stirbt, bevor das Virus

seinen Replikationszyklus abschließen kann (Handke et al. 2012). Um den frühen Zelltod zu verhindern, muss das Virus den Abwehrmechanismen des Wirts entgehen. Dafür produziert mCMV sogenannte Zelltodhemmende Proteine, wodurch das Virus seinen Replikationszyklus abschließen kann (Handke et al. 2012). In mCMV werden die am besten charakterisierten anti-apoptotischen und anti-nekrotischen Proteine von den ORFs M36, M38.5 und M40 kodiert (Handke et al. 2012). Zukünftige Experimente sollten überprüfen, ob die CD8 Treg Subpopulationen und CD4 Treg diese Proteine exprimieren. Eine erhöhte Apoptose der Zielzellen von CD8 Treg Sub I aus mCMV infizierten Mäusen könnte ein Schlüsselement bei der Wiederherstellung der normalen Immunhomöostase sein (Sula Karreci et al. 2017). Es ist bereits bekannt, dass durch die Expression von *Granzyme* und *Perforin* die Apoptose durch Caspase-abhängige oder unabhängige Signalwege induziert werden kann und die Treg die CD4 und CD8 Tresp durch eine granuläre Freisetzung töten können (Grossman et al. 2004, Li et al. 2014a, Arce-Sillas et al. 2016, Sula Karreci et al. 2017). Viele Studien berichteten über die zentrale Rolle von *GzmB* bei der Induktion der Effektor T-Zell Suppression und Allotransplantattoleranz (Gondek et al. 2005, Cao et al. 2007, Azzi et al. 2013, Sula Karreci et al. 2017). Eine kürzlich durchgeführte Studie zeigte, dass in *GzmB* defizienten Mäusen eine Treg vermittelte Immunsuppression durch einen *GzmB*-abhängigen, aber *Perforin* unabhängigen Mechanismus *in vitro* auftrat und dass der Zelltod von Effektor T-Zellen durch Treg verursacht wurde (Gondek et al. 2005). Der *Perforin/Granzym* Signalweg kann Apoptose entweder über *Gzma* oder *Gzmb* induzieren (Elmore 2007). Die extrinsischen, intrinsischen und *Gzmb* Signalwege werden durch die Spaltung von *Caspase-3* eingeleitet, welches zur DNA-Fragmentierung, Abbau von Zytoskelett- und Kernproteinen, Vernetzung von Proteinen, Bildung apoptotischer Zellen, Expression von Liganden für phagozytäre Zellrezeptoren und schließlich zur Aufnahme durch phagozytischen Zellen führt (Elmore 2007). Caspasen haben proteolytische Aktivitäten, sobald sie (v.a. *Caspase-3*) aktiviert sind, ist die Initiierung des Zelltods unwiderruflich (Elmore 2007).

Es scheint als würden die exprimierten Gene sowohl den direkten Zelltod sowie das limitierte Überleben von CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen fördern. Es ist demnach essenziell sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu überprüfen, ob die Suppression der Treg durch Zelltod initiiert wurde.

### 5.3.2. CD8 Treg Sub I exprimieren anti-inflammatorische Immune-Checkpoints

In der Gruppe Immun-Checkpoint (IC) (s. 4.5.2), konnte gezeigt werden, dass CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen *CD28*, *CD40*, *ICOS*, *Pdcd111* und *Vsir* signifikant stärker als CD8 Treg Sub I aus naiven Mäusen exprimierten (s. **Abb. 23**). Hingegen wurden von CD8 Treg Sub I im Vergleich zu CD8 Treg Sub III folgende Gene signifikant stärker exprimiert: *CD28*, *CTLA-4*, *ICOS*, *Lag3*, *Pdcd1*, *Tigit*, *Vsir* (s. **Abb. 24**).

Mehrere Studien berichten, dass die Mehrheit an intratumoralen oder infizierten Treg die ICs hochregulieren, wodurch die Treg zu wichtigen IC-Inhibitoren werden (Okamura et al. 2012, Syed Khaja et al. 2017, Sasidharan Nair & Elkord 2018). Interessanterweise sind genau die Gene stärker exprimiert die vorwiegend an anti-inflammatorischen ICs beteiligt sind und ebenfalls in CD4 Treg nach einer Infektion stark exprimiert sind (Sasidharan Nair & Elkord 2018, Saleh & Elkord 2019). Die Expression von ko-inhibitorischen Molekülen der Treg einschließlich *CTLA-4*, *Pdcd1*, *Lag3* und *Tigit* sind für deren suppressive Funktion von entscheidender Bedeutung (Takahashi et al. 2000, Huang et al. 2004, Joller et al. 2014, Zhang et al. 2016, Sasidharan Nair & Elkord 2018). Treg spielen eine zentrale Rolle bei der Entwicklung einer Resistenz gegen ICs, wodurch es zu Reinfektionen oder einem Tumorrückfall mit schlechten Prognosen führen kann (Saleh & Elkord 2019). Es ist daher von hoher Priorität diese Mechanismen aufzuklären, um die Lebensqualität der Patienten zu erhöhen.

PD-1 (*pdcd1*) interagiert mit seinen Liganden (*Pdcd111*) um die Proliferation, das Überleben und die Effektorfunktionen von T-Zellen zu inhibieren, sowie Apoptose zu induzieren. *Pdcd111* kann mit CD80 (B7-1) interagieren und dadurch spezifisch die Proliferation von T-Zellen hemmen (Butte et al. 2007, Shi et al. 2011). Studien berichten, dass Treg in der Lage sind, hohe Konzentrationen von PD-1 und *CTLA-4* während einer Infektion zu exprimieren, um den Viren zu gewährleisten, dass sie sich ohne Probleme im Wirt replizieren können (Sasidharan Nair & Elkord 2018). Murine Studien zeigten, dass CD4 Treg in Gegenwart von Effektor T-Zellen *Lag3* exprimieren und signifikant zu ihrer Suppressionsaktivität beitragen (Huang et al. 2004). Es ist demnach davon auszugehen, dass CD8 Treg Sub I die gleiche Fähigkeit besitzen. Treg die *Tigit* exprimieren, unterdrücken spezifisch die pro-inflammatorischen Reaktionen von Th1 und Th17 sowie die Effektor T-Zellproliferation (Joller et al. 2014). Im Gegensatz zu *CTLA-4* und PD-1 wird die konstitutive VISTA (*Vsir*) Expression in den meisten Immunzellen, einschließlich CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen, DC und Neutrophile aber nicht in B-Zellen, beobachtet (Kondo et al. 2016). VISTA fungiert als ko-inhibitorischer Rezeptor auf T-Zellen und als Ligand zur Ausübung synergistischer Immunsuppression auf APCs (Kondo et al. 2016). VISTA bindet

an seinen Liganden, um die T-Zell Proliferation zu hemmen sowie die Zytokinfreisetzung zu reduzieren (Saleh & Elkord 2019).

Die Literaturrecherche daraufhin, dass die Hochregulierung von *Tigit*, *Lag3*, *Vsir* und *Ctla4* der CD8 Treg Sub I, genau wie bei den CD4 Treg, zu einer Umgehung der Immunantwort führt (Saleh & Elkord 2019).

### 5.3.3. CD8 Treg Sub I exprimieren inflammatorische Chemokine

Die Funktion von VISTA könnte ein Grund dafür sein, weshalb in der Gruppe inflammatorische Zytokine und Chemokine gezeigt werden konnte (s. 4.5.3), dass CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten und naiven Mäusen sich kaum in ihrer Genexpression unterscheiden. Interessanterweise war die Expression von TGF $\beta$ -1 (*Tgfb1*) höher in den CD8 Treg Sub I aus naiven Mäusen im Vergleich zu den CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen (s. **Abb. 25**). TGF $\beta$ -1 ist essenziell für die Suppression von *Gzmba*, *Gzmb* und *KLRG1* (Mishra et al. 2021). *In vitro* Studien zeigten, dass stimulierte CD4 Treg TGF $\beta$ -1 produzieren, welches von Glykoprotein-A-Wiederholungen (GARP), einem Transmembranprotein abhängig ist (Dedobbeleer et al. 2017). Durch diese aktive Form können Treg ihre immunsuppressive Wirkung auf Tresp durch Zellkontakt ausüben (Stockis et al. 2009). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, weshalb die Treg aus naiven Mäusen in einem Suppression-Assay suppressiv auf die Tresp wirkten. Das Chemokin *CCL5* wurde signifikant stärker von CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen im Vergleich mit CD8 Treg Sub I aus naiven Mäusen exprimiert (s. **Abb. 25**). Wang und Kollegen berichten, dass unter den CD4 Treg *CCL5* direkt durch Foxp3 aktiviert wird, wodurch es die Rekrutierung der CD4 Treg zu der Stelle der Infektion oder der Tumorstelle fördert (Wang et al. 2017). Es ist aus den Daten der vorliegenden Arbeit unklar durch welchen Marker *CCL5* von den CD8 Treg Sub I aktiviert wird, doch könnte es die Rekrutierung der CD8 Treg Sub I zur Infektionsstelle ebenfalls fördern.

Es konnte außerdem von CD8 Treg Sub I eine erhöhte Expression der inflammatorischen Chemokine *CCL3*, *CCL4* und *CCL5* im Vergleich zu CD8 Treg Sub III aus mCMV-infizierten Mäusen beobachtet werden (s. **Abb. 26**). Im Vergleich dazu berichtete eine Studie, dass *CCL4* und *CCL8* ebenfalls von CD4 Treg exprimiert werden (Iellem et al. 2001). Interessanterweise wurde *IL7R* unter den CD8 Treg Sub III im Vergleich zu CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen signifikant stärker exprimiert. Studien besagen, dass die Sequestrierung von *IL-7* oder die Beeinträchtigung des *IL7R* Signalwegs nach einer Allotransplantation die CD4 Treg vermittelte Toleranz aufgehoben wird, indem ihre Unterdrückungsfähigkeit limitiert wurde. *IL7R*

Expression der Treg unterstützt deren funktionale Aktivität, indem sie ihre IL-2 Empfindlichkeit erhöhen (Schmaler et al. 2015). Dies muss wohl durch eine mCMV-Infektion inhibiert werden, da *IL7R* nicht während einer Infektion exprimiert wird.

### 5.3.4. CD8 Treg Sub I exprimieren Aktivierungsmarker

In der letzten Gruppe der Treg Marker (s. 4.5.4) und wichtigen Regulatoren konnte beobachtet werden, dass *Foxp3* zwar von den CD8 Treg Sub I aus naiven Mäusen stärker als von den CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen exprimiert wird, jedoch war die Expression im Vergleich zu den anderen Genen sehr gering (s. **Abb. 27**). Einige Publikationen berichten, dass CD8 Treg als *CD8<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>* definiert werden (Niederlova et al. 2021), doch die CD8 Treg Subpopulationen in der vorliegenden Arbeit exprimieren kein *Foxp3* (s. **Abb. 27**, **Abb. 28**). Interessanterweise konnte ebenfalls beobachtet werden, dass *KLRG1* und *Ptprc* signifikant stärker von den CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen im Vergleich mit CD8 Treg Sub I aus naiven Mäusen exprimiert wurden (s. **Abb. 27**). *KLRG1* wird auch von CD4 Treg exprimiert, doch im Gegensatz zu *CTLA-4* beschreiben mehrere Studien, dass *KLRG1* nur auf einer Subpopulation von Effektor-ähnlichen Treg Zellen exprimiert wird (Beyersdorf et al. 2007, Feuerer et al. 2010, Meinicke et al. 2017). Es ist noch unklar inwieweit *KLRG1* die CD8 Treg beeinflusst (Meinicke et al. 2017). Die CD8 Treg sollten in dieser Hinsicht weiter charakterisiert werden, um herauszufinden wie *KLRG1* die Zellen beeinflusst. Studien haben zudem *in vivo* zeigen können, dass eine *Ptprc* Ligation die CD4 Treg Motilität reduzieren konnte, welches zu einer verbesserten Wechselwirkung zwischen Treg und DC führte (Camirand et al. 2014). Es ist demnach nicht nur gut, sondern essenziell, dass *Ptprc* von den Treg exprimiert wird (Camirand et al. 2014, Mishra et al. 2021). Auch die Expression von *Eomes* war unter den CD8 Treg Sub I im Vergleich zu den CD8 Treg Sub III aus mCMV-infizierten Mäusen signifikant stärker exprimiert (s. **Abb. 28**). Mishra und seine Kollegen fanden heraus, dass die Expression von *TGF $\beta$ -1* und *Eomes* fundamental für die Funktion und Homöostase der CD8 Treg sind (Mishra et al. 2021).

### 5.3.5. Fazit der Genexpressionsanalysen

Es konnte erstmals gezeigt werden, dass CD8 Treg Sub I aus mCMV-infizierten Mäusen sich mit CD8 Treg Sub I aus naiven Mäusen signifikant in ihrer Genexpression unterscheiden. Dies konnte auch für den Vergleich von CD8 Treg Sub I mit CD8 Treg Sub III aus mCMV-infizierten Mäusen beobachtet werden. Zudem konnte durch eine Literaturrecherche festgestellt werden,

dass sich die CD8 Treg Sub I mit den CD4 Treg in ihrer Genexpression sehr ähneln. Dennoch müssen weitere CD8 Treg Subpopulationen in der Zukunft, bezüglich der Definition der Oberflächenmarker von CD8 Treg, getestet werden. Dafür wurden bereits weitere RNA-Sequenzierung folgender Subpopulationen generiert – jedoch im Rahmen dieser Arbeit noch nicht analysiert:

CD8 Treg Sub I	CD8 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD122 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup>
CD8 Treg Sub III	CD8 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD122 <sup>-</sup> PD-1 <sup>-</sup> CD127 <sup>+</sup>
CD8 Treg Sub VI	CD8 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD122 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> CD127 <sup>+</sup>
CD8 Treg Sub VII	CD8 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD122 <sup>-</sup> PD-1 <sup>-</sup> CD127 <sup>-</sup>

#### 5.4. CD4 und CD8 Treg sind *in vivo* nicht suppressiv

Obwohl in der vorliegenden Arbeit und in mehreren Studien gezeigt werden konnte, dass CD4 und CD8 Treg *in vitro* einen suppressiven Effekt aufweisen ist unklar, ob diese dieselben oder verschiedene Suppressionsmechanismen *in vitro* und *in vivo* benutzt werden. Es gibt nur wenige Studien über die Treg Migration, sowie der Lokalisation der Suppression nach einer adaptiven Immunantwort (Nguyen et al. 2007). Im Gegensatz zum festen Umfeld einer Zellkulturplatte, müssen die Treg *in vivo* in der Lage sein, verschiedene Organe zu beherbergen sowie physisch direkt mit APCs oder Effektor T-Zellen zu interagieren (Shevach 2009). Moskophidis und Kollegen postulieren, dass eine 10-fach höhere Zellzahl an Treg verabreicht werden muss, um die schützenden CD8 T-Zellen nach einer mCMV-Infektion supprimieren zu können (Moskophidis et al. 1992). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass durch eine - im Vergleich zur Zahl der transferierten CD8 T-Zellen – 10-fach höhere CD4 Treg Konzentration, die CD8 T-Zellen in der Leber supprimiert werden konnten (s. **Abb. 32**). Dies konnte jedoch durch eine histologische Färbung nicht bestätigt werden (s. **Abb. 32**). Wie erwartet lagen die Virustiter nach einem Transfer von  $5 \times 10^5$  CD4 Treg genauso hoch wie bei den Kontrollmäusen (s. **Abb. 31**), was bedeutet, dass CD4 Treg keinen schützenden Effekt im Kontext einer CMV-Infektion aufweisen. Im Gegensatz dazu, scheinen die CD8 Treg Sub I+IV und CD8 Treg Sub I nach einem Transfer von  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^5$  und  $9 \times 10^5$  vor einer mCMV-Infektion zu schützen, da die Virustiter im Vergleich zu den Kontrollmäusen relativ gering und ähnlich zu den Virustitern nach CD8 T-Zelltransfer waren (s. **Abb. 33**; **Abb. 34**; **Abb. 35**). Vergleichsweise konnten die CD8 Treg Sub I die CD8 T-Zellen nur in der Milz nach einem 2-fach niedrigeren Zelltransfer supprimieren (s. **Abb. 35**).

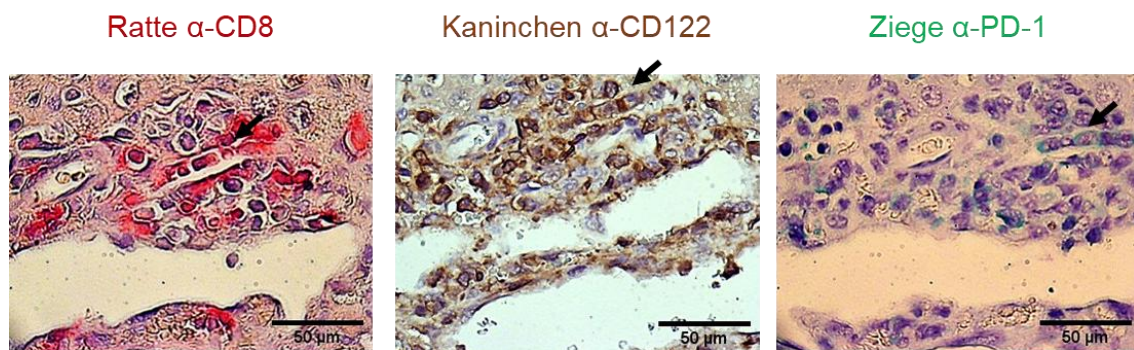
*In vitro* Studien legen nahe, dass *ex-vivo* isolierte Treg erst über ihren T-Zellrezeptor aktiviert werden müssen, um einen suppressiven Effekt zu zeigen (Shevach 2009). Dadurch stellt sich die Frage, ob zum Nachweis des suppressiven Potentials *in vivo* die Treg *in vitro* stimuliert werden müssen. Shevach und Kollegen behaupten, dass polyklonal stimulierte Treg *in vitro* in der Lage seien verschiedene Reaktionen zu kontrollieren, da sie kontinuierlich über ihren T-Zellrezeptor über MHC II Komplexe aktiviert werden (Shevach 2009). Kohm und Kollegen transferierte beispielsweise immunkompetenten Mäusen *in vitro* stimulierte CD4 Treg, immunisierten die Mäuse mit einem *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG) und beobachteten eine Hemmung der Entwicklung eines autoimmunen Enzephalomyelitis (Kohm et al. 2002). Eine weitere Studie beschrieb, dass *in vitro* stimulierte CD4 Treg die Entwicklung von Diabetes inhibierten (Sarween et al. 2004). Um das suppressive Potential der Treg in unserem mCMV-Infektionsmodell auch *in vivo* nachzuweisen, sollten aufgrund der beschriebenen Studien in Zukunft die *ex-vivo* isolierten Treg vor dem Transfer in die AT-Rezipienten bspw. mit  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$  oder  $\alpha$ -CD28 *in vitro* stimuliert werden. Zusätzlich dazu sollten alle CD8 Treg Subpopulationen, die in der vorliegenden Arbeit in einem *in vitro* Suppression-Assay getestet wurden, *in vivo* geprüft werden, um potenzielle Unterschiede in ihren suppressiven Fähigkeiten zu detektieren.

Es könnte zudem sein, dass in der vorliegenden Arbeit keine Treg-Suppression *in vivo* beobachtet werden konnte, da Treg möglicherweise eine Rolle in der Gewebeheilung zukommt (Arpaia et al. 2015). Delacher und seine Kollegen zeigten, dass Treg mehrere epigenetische Reprogrammierungen integrieren, welche die Lokalisation der Treg im Gewebe definieren (Delacher et al. 2017). Eine Möglichkeit, wie eine Gewebeheilung durch Treg vermittelt werden könnte, ist durch die Unterdrückung einer pro-inflammatorischen Chemokinproduktion, Unterdrückung der Endothelzellaktivierung sowie der Unterdrückung pro-inflammatorischer Reaktionen von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems (Burzyn et al. 2013a, Arpaia et al. 2015). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Verabreichung eines rekombinanten Amphiregulin-Proteins (Areg) während beispielsweise einer Muskelverletzung nachweislich die Gewebeheilung durch CD4 Treg fördert (Burzyn et al. 2013b, Arpaia et al. 2015). Es sollte demnach in Zukunft die Areg-Expression von CD4 und CD8 Treg analysiert werden, um zu erkennen, ob die Treg nach einer mCMV-Infektion *in vivo* das Gewebe heilen und ob dies im Zusammenhang mit der Suppression der Treg steht.

### 5.4.1. Fazit und Ausblick der Treg Suppression *in vivo*

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass CD4 Treg, CD8 Treg Sub I, sowie CD8 Treg Sub I+IV *in vivo* die CD8 T-Zellen, mit der Einschränkung der gewählten Bedingungen in der vorliegenden Arbeit, nicht unterdrücken konnten. Für die Zukunft sollten einerseits die Treg *in vitro* vor einem AT stimuliert werden und andererseits alle CD8 Treg Subpopulationen, die in der vorliegenden Arbeit getestet wurden, *in vivo* transferieren, um potenzielle Unterschiede in ihren suppressiven Fähigkeiten zu detektieren.

Einige *in vivo* Studien zeigten unterschiedliche CD4 Treg Dynamiken mit homöostatischer Proliferation bei immundefizienten Mäusen und Antigen-getriebener Expansion sowie lokaler Akkumulation in drainierenden Lymphknoten (Gavin et al. 2002, Fisson et al. 2003, Klein et al. 2003, Walker et al. 2003, Yamazaki et al. 2003, Annacker et al. 2005, Nguyen et al. 2007). Es konnte durch intravitale Mikroskopie gezeigt werden, dass CD4 Treg anscheinend ihre Suppression durch eine Kontaktverhinderung zwischen DC und naiven T-Zellen ausüben. Diese Studien deuten darauf hin, dass die Lokalisation der Treg fundamental ist, um näheres über ihre Suppressorfunktion herausfinden zu können (Nguyen et al. 2007). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit eine histologische Methode etabliert, um die CD8 Treg Sub I *in situ* zu lokalisieren (s. **Abb. 36**).



**Abb. 36: Lokalisierung der CD8 Treg.** Repräsentativer Ausschnitt der Lebergewebeschnitte. Gezeigt sind Serienschritte einer Leber welche aus mCMV-infizierten (i.p.) Mäusen stammen. Die Schnitte wurden je mit einem  $\alpha$ -CD8 (rot),  $\alpha$ -CD122 (braun) oder  $\alpha$ -PD-1 (grün) Antikörper markiert. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Die Pfeile markieren die jeweils gleiche Stelle in allen drei Serienschritten die entweder mit  $\alpha$ -CD8,  $\alpha$ -CD122 oder  $\alpha$ -PD-1 gefärbt wurden. Die Aufnahmen erfolgte mit einer 40x Vergrößerung. Die Marker repräsentieren 50 $\mu$ m.

Diese Färbung veranschaulicht erste Erkenntnisse über die Lokalisierung der CD8 Treg. Dennoch muss die Färbung weiter etabliert werden. Um Serienschritten zu umgehen, sollte eine Immunfluoreszenz-Färbung in Erwägung gezogen werden, um die Lokalisation der CD8 Treg zu verbessern. Eine Studie zeigte, dass die bevorzugte Lokalisierung der Treg an der Stelle der Infektion bei verschiedenen Krankheiten ist, was darauf hindeutet, dass Treg direkt die Effektor T-Zellen hemmen und an der Abtötung von Krankheitserregern beteiligt sind bzw. eine

Entwicklung einer persistierenden Infektion fördern (Joosten & Ottenhoff 2008). Aus diesem Grund sollte diese Färbung nochmal mit je einer Doppelfärbung (s. **Tab. 5**) mit dem mCMV-spezifischen IE-1 Antikörper wiederholt werden, um zu erkennen, wo die CD8 Treg nach einer mCMV-Infektion lokalisiert sind.

## 6. LITERATUR

- AANDAHL, E. M., J. MICHAËLSSON, W. J. MORETTO, F. M. HECHT & D. F. NIXON (2004): Human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *Journal of virology* 78: 2454–2459.
- AHMED, A. (2011): Antiviral treatment of cytomegalovirus infection. *Infectious disorders drug targets* 11: 475–503.
- AHMED, R. & D. GRAY (1996): Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science (New York, N.Y.)* 272: 54–60.
- ALEGRE, M. L., K. A. FRAUWIRTH & C. B. THOMPSON (2001): T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nature reviews. Immunology* 1: 220–228.
- ALI, N., B. ZIRAK, R. S. RODRIGUEZ, M. L. PAULI, H.-A. TRUONG, K. LAI, R. AHN, K. CORBIN, M. M. LOWE, T. C. SCHARSCHMIDT, K. TARAVATI, M. R. TAN, R. R. RICARDO-GONZALEZ, A. NOSBAUM, M. BERTOLINI, W. LIAO, F. O. NESTLE, R. PAUS, G. COTSARELIS, A. K. ABBAS & M. D. ROSENBLUM (2017): Regulatory T Cells in Skin Facilitate Epithelial Stem Cell Differentiation. *Cell* 169: 1119-1129.e11.
- ALMANAN, M., J. RAYNOR, A. SHOLL, M. WANG, C. CHOUGNET, R. D. CARDIN & D. A. HILDEMAN (2017): Tissue-specific control of latent CMV reactivation by regulatory T cells. *PLoS pathogens* 13: e1006507.
- ALMEIDA, A. R. M., N. LEGRAND, M. PAPIERNIK & A. A. FREITAS (2002): Homeostasis of peripheral CD4<sup>+</sup> T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4<sup>+</sup> T cell numbers. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169: 4850–4860.
- ALTERIO DE GOSS, M., R. HOLTAPPELS, H. P. STEFFENS, J. PODLECH, P. ANGELE, L. DREHER, D. THOMAS & M. J. REDDEHASE (1998): Control of cytomegalovirus in bone marrow transplantation chimeras lacking the prevailing antigen-presenting molecule in recipient tissues rests primarily on recipient-derived CD8 T cells. *Journal of virology* 72: 7733–7744.
- ALTIN, J. G. & E. K. SLOAN (1997): The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunol Cell Biol* 75: 430–445.
- ALUVIHARE, V. R., M. KALLIKOURDIS & A. G. BETZ (2004): Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nature immunology* 5: 266–271.
- AMOOZGAR, Z., J. KLOEPPER, J. REN, R. E. TAY, S. W. KAZER, E. KINER, S. KRISHNAN, J. M. POSADA, M. GHOSH, E. MAMESSIER, C. WONG, G. B. FERRARO, A. BATISTA, N. WANG, M. BADEAUX, S. ROBERGE, L. XU, P. HUANG, A. K. SHALEK, D. FUKUMURA, H.-J. KIM & R. K. JAIN (2021): Targeting Treg cells with GITR activation alleviates resistance to immunotherapy in murine glioblastomas. *Nature communications* 12: 2582.
- ANDREWS, D. M., A. A. SCALZO, W. M. YOKOYAMA, M. J. SMYTH & M. A. DEGLI-ESPOSTI (2003): Functional interactions between dendritic cells and NK cells during viral infection. *Nature immunology* 4: 175–181.
- ANNACKER, O., J. L. COOMBES, V. MALMSTROM, H. H. UHLIG, T. BOURNE, B. JOHANSSON-LINDBOM, W. W. AGACE, C. M. PARKER & F. POWRIE (2005): Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *Journal of Experimental Medicine* 202: 1051–1061.

- ANSARI, M. J. I., A. D. SALAMA, T. CHITNIS, R. N. SMITH, H. YAGITA, H. AKIBA, T. YAMAZAKI, M. AZUMA, H. IWAI, S. J. KHOURY, H. AUCHINCLOSS & M. H. SAYEGH (2003): The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *Journal of Experimental Medicine* 198: 63–69.
- APPAY, V., P. R. DUNBAR, M. CALLAN, P. KLENERMAN, G. M. A. GILLESPIE, L. PAPAGNO, G. S. OGG, A. KING, F. LECHNER, C. A. SPINA, S. LITTLE, D. V. HAVLIR, D. D. RICHMAN, N. GRUENER, G. PAPE, A. WATERS, P. EASTERBROOK, M. SALIO, V. CERUNDOLO, A. J. MCMICHAEL & S. L. ROWLAND-JONES (2002): Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nature medicine* 8: 379–385.
- ARASE, H., E. S. MOCARSKI, A. E. CAMPBELL, A. B. HILL & L. L. LANIER (2002): Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science (New York, N.Y.)* 296: 1323–1326.
- ARCE-SILLAS, A., D. D. ÁLVAREZ-LUQUÍN, B. TAMAYA-DOMÍNGUEZ, S. GOMEZ-FUENTES, A. TREJO-GARCÍA, M. MELO-SALAS, G. CÁRDENAS, J. RODRÍGUEZ-RAMÍREZ & L. ADALID-PERALTA (2016): Regulatory T Cells: Molecular Actions on Effector Cells in Immune Regulation. *Journal of immunology research* 2016: 1720827.
- ARISTIMUÑO, C., C. de ANDRÉS, M. BARTOLOMÉ, V. de LAS HERAS, M. L. MARTÍNEZ-GINÉS, R. ARROYO, E. FERNÁNDEZ-CRUZ & S. SÁNCHEZ-RAMÓN (2010): IFNbeta-1a therapy for multiple sclerosis expands regulatory CD8+ T cells and decreases memory CD8+ subset: a longitudinal 1-year study. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 134: 148–157.
- ARONIN, A., S. AMSILI, T. B. PRIGOZHINA, K. TZDAKA, R. SHEN, L. GRINMANN, F. SZAFER, P. EDEBRINK, M.-A. RAUVOLA, N. SHANI & M. D. ELHALEL (2014): Highly efficient, in-vivo Fas-mediated apoptosis of B-cell lymphoma by hexameric CTLA4-FasL. *J Hematol Oncol* 7: 64.
- ARPAIA, N., J. A. GREEN, B. MOLTEDO, A. ARVEY, S. HEMMERS, S. YUAN, P. M. TREUTING & A. Y. RUDENSKY (2015): A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection. *Cell* 162: 1078–1089.
- ASANO, M., M. TODA, N. SAKAGUCHI & S. SAKAGUCHI (1996): Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *Journal of Experimental Medicine* 184: 387–396.
- AVIVI, I., D. STROOPINSKY, J. M. ROWE & T. KATZ (2013): A subset of CD8+ T cells acquiring selective suppressive properties may play a role in GvHD management. *Transplant immunology* 28: 57–61.
- AZZI, J., N. SKARTSIS, M. MOUNAYAR, C. N. MAGEE, I. BATAL, C. TING, R. MOORE, L. V. RIELLA, S. OHORI, R. ABDOLI, B. SMITH, P. FIORINA, D. HEATHCOTE, T. BAKHOS, P. G. ASHTON-RICKARDT & R. ABDI (2013): Serine protease inhibitor 6 plays a critical role in protecting murine granzyme B-producing regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 191: 2319–2327.
- BAPAT, S. P., J. MYOUNG SUH, S. FANG, S. LIU, Y. ZHANG, A. CHENG, C. ZHOU, Y. LIANG, M. LEBLANC, C. LIDDLE, A. R. ATKINS, R. T. YU, M. DOWNES, R. M. EVANS & Y. ZHENG (2015): Depletion of fat-resident Treg cells prevents age-associated insulin resistance. *Nature* 528: 137–141.
- BARBER, D. L., E. J. WHERRY, D. MASOPIUST, B. ZHU, J. P. ALLISON, A. H. SHARPE, G. J. FREEMAN & R. AHMED (2006): Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439: 682–687.
- BEHJATI, S. & P. S. TARPEY (2013): What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 98: 236–238.

- BENNETT, C. L., J. CHRISTIE, F. RAMSDALL, M. E. BRUNKOW, P. J. FERGUSON, L. WHITESSELL, T. E. KELLY, F. T. SAULSBURY, P. F. CHANCE & H. D. OCHS (2001): The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature genetics* 27: 20–21.
- BERES, A. J., D. HARIBHAI, A. C. CHADWICK, P. J. GONYO, C. B. WILLIAMS & W. R. DROBYSKI (2012): CD8+ Foxp3+ regulatory T cells are induced during graft-versus-host disease and mitigate disease severity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 189: 464–474.
- BERGER, A., A. REITTER, P. N. HARTER, H. BUXMANN, R. ALLWINN, F. LOUWEN & H. W. DOERR (2011): Problems and challenges in the diagnosis of vertical infection with human cytomegalovirus (CMV): lessons from two accidental cases. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 51: 285–288.
- BERGSBAKEN, T., S. L. FINK & B. T. COOKSON (2009): Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature reviews. Microbiology* 7: 99–109.
- BERNUZZI, F., D. FENOGLIO, F. BATTAGLIA, M. FRAVEGA, M. E. GERSHWIN, F. INDIVERI, A. A. ANSARI, M. PODDA, P. INVERNIZZI & G. FILACI (2010): Phenotypical and functional alterations of CD8 regulatory T cells in primary biliary cirrhosis. *Journal of autoimmunity* 35: 176–180.
- BEROD, L., F. PUTTUR, J. HUEHN & T. SPARWASSER (2012): Tregs in infection and vaccinology: heroes or traitors? *Microbial biotechnology* 5: 260–269.
- BERRY, R., G. M. WATSON, S. JONJIC, M. A. DEGLI-ESPOSTI & J. ROSSJOHN (2020): Modulation of innate and adaptive immunity by cytomegaloviruses. *Nature reviews. Immunology* 20: 113–127.
- BEYERSDORF, N., X. DING, J. K. TIETZE & T. HANKE (2007): Characterization of mouse CD4 T cell subsets defined by expression of KLRG1. *Eur. J. Immunol.* 37: 3445–3454.
- BÉZIE, S., I. ANEGON & C. GUILLONNEAU (2018): Advances on CD8+ Treg Cells and Their Potential in Transplantation. *Transplantation* 102: 1467–1478.
- BÉZIE, S., D. MEISTERMANN, L. BOUCAULT, S. KILENS, J. ZOPPI, E. AUTRUSSEAU, A. DONNART, V. NERRIÈRE-DAGUIN, F. BELLIER-WAAST, E. CHARPENTIER, F. DUTEILLE, L. DAVID, I. ANEGON & C. GUILLONNEAU (2017): Ex Vivo Expanded Human Non-Cytotoxic CD8+CD45RClow/- Tregs Efficiently Delay Skin Graft Rejection and GVHD in Humanized Mice. *Frontiers in immunology* 8: 2014.
- BÉZIE, S., E. PICARDA, J. OSSART, L. TESSON, C. USAL, K. RENAUDIN, I. ANEGON & C. GUILLONNEAU (2015): IL-34 is a Treg-specific cytokine and mediates transplant tolerance. *The Journal of clinical investigation* 125: 3952–3964.
- BIRON, C. A. (1998): Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections. *Seminars in immunology* 10: 383–390.
- BIRON, C. A., K. S. BYRON & J. L. SULLIVAN (1989): Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *The New England journal of medicine* 320: 1731–1735.
- BLACKBURN, S. D., H. SHIN, W. N. HAINING, T. ZOU, C. J. WORKMAN, A. POLLEY, M. R. BETTS, G. J. FREEMAN, D. A. A. VIGNALI & E. J. WHERRY (2009): Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nature immunology* 10: 29–37.

- BLALOCK, E. L., H. CHIEN & R. D. DIX (2013): Murine cytomegalovirus downregulates interleukin-17 in mice with retrovirus-induced immunosuppression that are susceptible to experimental cytomegalovirus retinitis. *Cytokine* 61: 862–875.
- BOECKH, M., W. NICHOLS, G. PAPANICOLAOU, R. RUBIN, J. R. WINGARD & J. ZAIA (2003): Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: current status, known challenges, and future strategies. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 9: 543–558.
- BOER, M. C., C. PRINS, K. E. VAN MEIJGAARDEN, J. T. VAN DISSEL, T. H. M. OTTENHOFF & S. A. JOOSTEN (2015): Mycobacterium bovis BCG Vaccination Induces Divergent Proinflammatory or Regulatory T Cell Responses in Adults. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 22: 778–788.
- BOER, M. C., K. E. VAN MEIJGAARDEN, S. A. JOOSTEN & T. H. M. OTTENHOFF (2014): CD8+ regulatory T cells, and not CD4+ T cells, dominate suppressive phenotype and function after in vitro live Mycobacterium bovis-BCG activation of human cells. *PloS one* 9: e94192.
- BOOR, P. P. C., H. J. METSELAAR, S. de JONGE, S. MANCHAM, L. J. W. VAN DER LAAN & J. KWEKKEBOOM (2011): Human plasmacytoid dendritic cells induce CD8<sup>+</sup> LAG-3<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> CTLA-4<sup>+</sup> regulatory T cells that suppress allo-reactive memory T cells. *Eur. J. Immunol.* 41: 1663–1674.
- BOPANA, S. B., R. F. PASS, W. J. BRITT, S. STAGNO & C. A. ALFORD (1992): Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *The Pediatric infectious disease journal* 11: 93–99.
- BORISH, L. C. & J. W. STEINKE (2003): 2. Cytokines and chemokines. *The Journal of allergy and clinical immunology* 111: S460-75.
- BOUWMAN, A. C., K. R. VAN DAALLEN, S. CRNKO, T. ten BROEKE & N. BOVENSCHEN (2021): Intracellular and Extracellular Roles of Granzyme K. *Frontiers in immunology* 12: 677707.
- BRODY, A. R. & J. E. CRAIGHEAD (1974): Pathogenesis of pulmonary cytomegalovirus infection in immunosuppressed mice. *The Journal of infectious diseases* 129: 677–689.
- BROWN, M. G., A. O. DOKUN, J. W. HEUSEL, H. R. SMITH, D. L. BECKMAN, E. A. BLATTENBERGER, C. E. DUBBELDE, L. R. STONE, A. A. SCALZO & W. M. YOKOYAMA (2001): Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science (New York, N.Y.)* 292: 934–937.
- BRUNKOW, M. E., E. W. JEFFERY, K. A. HJERRILD, B. PAEPER, L. B. CLARK, S. A. YASAYKO, J. E. WILKINSON, D. GALAS, S. F. ZIEGLER & F. RAMSDELL (2001): Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature genetics* 27: 68–73.
- BRUNNER-WEINZIERL, M. C., H. HOFF & G.-R. BURMESTER (2004): Multiple functions for CD28 and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 during different phases of T cell responses: implications for arthritis and autoimmune diseases. *Arthritis research & therapy* 6: 45–54.
- BUBIĆ, I., M. WAGNER, A. KRMPOTIĆ, T. SAULIG, S. KIM, W. M. YOKOYAMA, S. JONJIĆ & U. H. KOSZINOWSKI (2004): Gain of virulence caused by loss of a gene in murine cytomegalovirus. *Journal of virology* 78: 7536–7544.
- BUCHBINDER, E. I. & A. DESAI (2016): CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *American journal of clinical oncology* 39: 98–106.
- BUKOWSKI, J. F., B. A. WODA & R. M. WELSH (1984): Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *Journal of virology* 52: 119–128.

- BURGESS, A. W. & D. METCALF (1980): The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood* 56: 947–958.
- BURZYN, D., C. BENOIST & D. MATHIS (2013a): Regulatory T cells in nonlymphoid tissues. *Nature immunology* 14: 1007–1013.
- BURZYN, D., W. KUSWANTO, D. KOLODIN, J. L. SHADRACH, M. CERLETTI, Y. JANG, E. SEFIK, T. G. TAN, A. J. WAGERS, C. BENOIST & D. MATHIS (2013b): A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. *Cell* 155: 1282–1295.
- BUTTE, M. J., M. E. KEIR, T. B. PHAMDUY, A. H. SHARPE & G. J. FREEMAN (2007): Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 27: 111–122.
- CAMIRAND, G., Y. WANG, Y. LU, Y. Y. WAN, Y. LIN, S. DENG, G. GUZ, D. L. PERKINS, P. W. FINN, D. L. FARBER, R. A. FLAVELL, W. D. SHLOMCHIK, F. G. LAKKIS, C. E. RUDD & D. M. ROTHSTEIN (2014): CD45 ligation expands Tregs by promoting interactions with DCs. *The Journal of clinical investigation* 124: 4603–4613.
- CAO, X., S. F. CAI, T. A. FEHNIGER, J. SONG, L. I. COLLINS, D. R. PIWNICA-WORMS & T. J. LEY (2007): Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 27: 635–646.
- CARAMALHO, Í., H. NUNES-CABAÇO, R. B. FOXALL & A. E. SOUSA (2015): Regulatory T-Cell Development in the Human Thymus. *Frontiers in immunology* 6: 395.
- CARTER, L. L. & S. L. SWAIN (1997): Single cell analyses of cytokine production. *Current Opinion in Immunology* 9: 177–182.
- CHA, T. A., E. TOM, G. W. KEMBLE, G. M. DUKE, E. S. MOCARSKI & R. R. SPAETE (1996): Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *Journal of virology* 70: 78–83.
- CHAMBERS, C. A., M. S. KUHNS & J. P. ALLISON (1999): Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) regulates primary and secondary peptide-specific CD4(+) T cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 8603–8608.
- CHANG, Y., E. CESARMAN, M. S. PESSIN, F. LEE, J. CULPEPPER, D. M. KNOWLES & P. S. MOORE (1994): Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science (New York, N.Y.)* 266: 1865–1869.
- CHÁVEZ-GALÁN, L., M. C. ARENAS-DEL ANGEL, E. ZENTENO, R. CHÁVEZ & R. LASCURAIN (2009): Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cellular & molecular immunology* 6: 15–25.
- CHEE, M. S., A. T. BANKIER, S. BECK, R. BOHNI, C. M. BROWN, R. CERNY, T. HORSNELL, C. A. HUTCHISON, T. KOUZARIDES & J. A. MARTIGNETTI (1990): Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Current topics in microbiology and immunology* 154: 125–169.
- CHEN, D. H., H. JIANG, M. LEE, F. LIU & Z. H. ZHOU (1999): Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. *Virology* 260: 10–16.
- CHEN, X., J. J. PRIATEL, M. T. CHOW & H.-S. TEH (2008): Preferential development of CD4 and CD8 T regulatory cells in RasGRP1-deficient mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180: 5973–5982.

- CHEN, Y., C. J. HAINES, I. GUTCHER, K. HOCHWELLER, W. M. BLUMENSCHNEIN, T. MCCLANAHAN, G. HÄMMERLING, M. O. LI, D. J. CUA & M. J. MCGEACHY (2011): Foxp3(+) regulatory T cells promote T helper 17 cell development in vivo through regulation of interleukin-2. *Immunity* 34: 409–421.
- CHENG, T. P., A. R. FRENCH, B. F. M. PLOUGASTEL, J. T. PINGEL, M. M. ORIHUELA, M. L. BULLER & W. M. YOKOYAMA (2008): Ly49h is necessary for genetic resistance to murine cytomegalovirus. *Immunogenetics* 60: 565–573.
- CHEUNG, T. W. & S. A. TEICH (1999): Cytomegalovirus infection in patients with HIV infection. *The Mount Sinai journal of medicine, New York* 66: 113–124.
- CHIEN, H. & R. D. DIX (2012): Evidence for multiple cell death pathways during development of experimental cytomegalovirus retinitis in mice with retrovirus-induced immunosuppression: apoptosis, necroptosis, and pyroptosis. *Journal of virology* 86: 10961–10978.
- CHUNG, Y., S. TANAKA, F. CHU, R. I. NURIEVA, G. J. MARTINEZ, S. RAWAL, Y.-H. WANG, H. LIM, J. M. REYNOLDS, X. ZHOU, H. FAN, Z. LIU, S. S. NEELAPU & C. DONG (2011): Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nature medicine* 17: 983–988.
- CINEK, T., A. SADRA & J. B. IMBODEN (2000): Cutting edge: tyrosine-independent transmission of inhibitory signals by CTLA-4. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164: 5–8.
- CIPOLLETTA, D., M. FEUERER, A. LI, N. KAMEI, J. LEE, S. E. SHOELSON, C. BENOIST & D. MATHIS (2012): PPAR- $\gamma$  is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature* 486: 549–553.
- COE, D., S. BEGOM, C. ADDEY, M. WHITE, J. DYSON & J.-G. CHAI (2010): Depletion of regulatory T cells by anti-GITR mAb as a novel mechanism for cancer immunotherapy. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 59: 1367–1377.
- COLLISON, L. W. & D. A. A. VIGNALI (2011): In vitro Treg suppression assays. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 707: 21–37.
- COMPTON, T., R. R. NEPOMUCENO & D. M. NOWLIN (1992): Human cytomegalovirus penetrates host cells by PH-independent fusion at the cell surface. *Virology* 191: 387–395.
- COMPTON, T., D. M. NOWLIN & N. R. COOPER (1993): Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* 193: 834–841.
- CRADDOCK, C., R. M. SZYDLO, F. DAZZI, E. OLAVARRIA, K. CWCYNARSKI, A. YONG, P. BROOKES, J. de LA FUENTE, E. KANFER, J. F. APPERLEY & J. M. GOLDMAN (2001): Cytomegalovirus seropositivity adversely influences outcome after T-depleted unrelated donor transplant in patients with chronic myeloid leukaemia: the case for tailored graft-versus-host disease prophylaxis. *British journal of haematology* 112: 228–236.
- CROME, S. Q., B. CLIVE, A. Y. WANG, C. Y. KANG, V. CHOW, J. YU, A. LAI, A. GHAHARY, R. BROADY & M. K. LEVINGS (2010): Inflammatory effects of ex vivo human Th17 cells are suppressed by regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185: 3199–3208.
- DAI, H., N. WAN, S. ZHANG, Y. MOORE, F. WAN & Z. DAI (2010): Cutting edge: programmed death-1 defines CD8+CD122+ T cells as regulatory versus memory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185: 803–807.
- DAI, Z., S. ZHANG, Q. XIE, S. WU, J. SU, S. LI, Y. XU & X. C. LI (2014): Natural CD8+CD122+ T cells are more potent in suppression of allograft rejection than CD4+CD25+ regulatory T

- cells. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 14: 39–48.
- DANIELS, K. A., G. DEVORA, W. C. LAI, C. L. O'DONNELL, M. BENNETT & R. M. WELSH (2001): Murine cytomegalovirus is regulated by a discrete subset of natural killer cells reactive with monoclonal antibody to Ly49H. *Journal of Experimental Medicine* 194: 29–44.
- DAVID, K. K., S. A. ANDRABI, T. M. DAWSON & V. L. DAWSON (2009): Parthanatos, a messenger of death. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 14: 1116–1128.
- DEBES, G. F., M. E. DAHL, A. J. MAHINY, K. BONHAGEN, D. J. CAMPBELL, K. SIEGMUND, K. J. ERB, D. B. LEWIS, T. KAMRADT & A. HAMANN (2006): Chemotactic responses of IL-4-, IL-10-, and IFN-gamma-producing CD4+ T cells depend on tissue origin and microbial stimulus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 176: 557–566.
- DEDOBBELEER, O., J. STOCKIS, B. VAN DER WONING, P. G. COULIE & S. LUCAS (2017): Cutting Edge: Active TGF- $\beta$ 1 Released from GARP/TGF- $\beta$ 1 Complexes on the Surface of Stimulated Human B Lymphocytes Increases Class-Switch Recombination and Production of IgA. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 199: 391–396.
- DELACHER, M., C. D. IMBUSCH, D. WEICHENHAN, A. BREILING, A. HOTZ-WAGENBLATT, U. TRÄGER, A.-C. HOFER, D. KÄGEBEIN, Q. WANG, F. FRAUHAMMER, J.-P. MALLM, K. BAUER, C. HERRMANN, P. A. LANG, B. BRORS, C. PLASS & M. FEUERER (2017): Genome-wide DNA-methylation landscape defines specialization of regulatory T cells in tissues. *Nature immunology* 18: 1160–1172.
- DELIYANTI, D., D. M. TALIA, T. ZHU, M. J. MAXWELL, A. AGROTIS, J. R. JEROME, E. M. HARGREAVES, S. GERONDAKIS, M. L. HIBBS, F. MACKAY & J. L. WILKINSON-BERKA (2017): Foxp3+ Tregs are recruited to the retina to repair pathological angiogenesis. *Nature communications* 8: 748.
- DOLAN, A., C. CUNNINGHAM, R. D. HECTOR, A. F. HASSAN-WALKER, L. LEE, C. ADDISON, D. J. DARGAN, D. J. MCGEOCH, D. GATHERER, V. C. EMERY, P. D. GRIFFITHS, C. SINZGER, B. P. MCSHARRY, G. W. G. WILKINSON & A. J. DAVISON (2004): Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *The Journal of general virology* 85: 1301–1312.
- DOUGALL, W. C., S. KURTULUS, M. J. SMYTH & A. C. ANDERSON (2017): TIGIT and CD96: new checkpoint receptor targets for cancer immunotherapy. *Immunological reviews* 276: 112–120.
- DOWLING, J. N., A. R. SASLOW, J. A. ARMSTRONG & M. HO (1976): Cytomegalovirus infection in patients receiving immunosuppressive therapy for rheumatologic disorders. *The Journal of infectious diseases* 133: 399–408.
- DREW, W. L. (1988): Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. *The Journal of infectious diseases* 158: 449–456.
- DU, W. & X. CAO (2018): Cytotoxic Pathways in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Frontiers in immunology* 9: 2979.
- DUMAS, A. M., J. L. M. C. GEELEN, W. MARIS & J. VAN DER NOORDAA (1980): Infectivity and Molecular Weight of Varicella-Zoster Virus DNA. *The Journal of general virology* 47: 233–235.
- DUNCAN, S. R., W. F. GRGURICH, A. T. IACONO, G. J. BURCKART, S. A. YOUSEM, I. L. PARADIS, P. A. WILLIAMS, B. A. JOHNSON & B. P. GRIFFITH (1994): A comparison of ganciclovir and acyclovir to prevent cytomegalovirus after lung transplantation. *American journal of respiratory and critical care medicine* 150: 146–152.

- EINSELE, H., G. EHNINGER, M. STEIDLE, I. FISCHER, S. BIHLER, F. GERNETH, A. VALLBRACHT, H. SCHMIDT, H. D. WALLER & C. A. MÜLLER (1993): Lymphocytopenia as an unfavorable prognostic factor in patients with cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *Blood* 82: 1672–1678.
- EINSELE, H., E. ROOSNEK, N. RUFER, C. SINZGER, S. RIEGLER, J. LÖFFLER, U. GRIGOLEIT, A. MORIS, H.-G. RAMMENSEE, L. KANZ, A. KLEIHAEUER, F. FRANK, G. JAHN & H. HEBART (2002): Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* 99: 3916–3922.
- ELIZONDO, D. M., T. E. ANDARGIE, N. L. HADDOCK, R. L. L. DA SILVA, T. R. de MOURA & M. W. LIPSCOMB (2019): IL-10 producing CD8+ CD122+ PD-1+ regulatory T cells are expanded by dendritic cells silenced for Allograft Inflammatory Factor-1. *Journal of leukocyte biology* 105: 123–130.
- ELMORE, S. (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 35: 495–516.
- EMERY, V. C. & P. D. GRIFFITHS (1990): Molecular biology of cytomegalovirus. *International journal of experimental pathology* 71: 905–918.
- ENDHARTI, A. T., M. RIFA'I, Z. SHI, Y. FUKUOKA, Y. NAKAHARA, Y. KAWAMOTO, K. TAKEDA, K.-I. ISOBE & H. SUZUKI (2005): Cutting edge: CD8+CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 175: 7093–7097.
- EPSTEIN, M. A., G. HENLE, B. G. ACHONG & Y. M. BARR (1965): MORPHOLOGICAL AND BIOLOGICAL STUDIES ON A VIRUS IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *Journal of Experimental Medicine* 121: 761–770.
- FEIRE, A. L., H. KOSS & T. COMPTON (2004): Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 15470–15475.
- FENOGLIO, D., C. DENTONE, A. SIGNORI, A. DI BIAGIO, A. PARODI, F. KALLI, G. NASI, M. CURTO, G. CENDERELLO, P. de LEO, V. BARTOLACCI, G. OROFINO, L. A. NICOLINI, L. TARMASSO, E. FIORILLO, V. ORRÙ, P. TRAVERSO, B. BRUZZONE, F. IVALDI, E. MANTIA, M. GUERRA, S. NEGRINI, M. GIACOMINI, S. BHAGANI & G. FILACI (2018): CD8+CD28-CD127loCD39+ regulatory T-cell expansion: A new possible pathogenic mechanism for HIV infection? *The Journal of allergy and clinical immunology* 141: 2220-2233.e4.
- FEUCHTINGER, T., K. OPPERK, W. A. BETHGE, M. S. TOPP, F. R. SCHUSTER, E. M. WEISSINGER, M. MOHTY, R. OR, M. MASCHAN, M. SCHUMM, K. HAMPRECHT, R. HANDGRETINGER, P. LANG & H. EINSELE (2010): Adoptive transfer of pp65-specific T cells for the treatment of chemorefractory cytomegalovirus disease or reactivation after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood* 116: 4360–4367.
- FEUERER, M., L. HERRERO, D. CIPOLLETTA, A. NAAZ, J. WONG, A. NAYER, J. LEE, A. B. GOLDFINE, C. BENOIST, S. SHOELSON & D. MATHIS (2009): Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nature medicine* 15: 930–939.
- FEUERER, M., J. A. HILL, K. KRETSCHMER, H. von BOEHMER, D. MATHIS & C. BENOIST (2010): Genomic definition of multiple ex vivo regulatory T cell subphenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 5919–5924.
- FIFE, B. T. & J. A. BLUESTONE (2008): Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunological reviews* 224: 166–182.

- FILACI, G., M. FRAVEGA, S. NEGRINI, F. PROCOPIO, D. FENOGLIO, M. RIZZI, S. BRENCI, P. CONTINI, D. OLIVE, M. GHIO, M. SETTI, R. S. ACCOLLA, F. PUPPO & F. INDIVERI (2004): Nonantigen specific CD8+ T suppressor lymphocytes originate from CD8+CD28- T cells and inhibit both T-cell proliferation and CTL function. *Human immunology* 65: 142–156.
- FINKELMAN, F. D. & S. C. MORRIS (1999): Development of an assay to measure in vivo cytokine production in the mouse. *International Immunology* 11: 1811–1818.
- FISSON, S., G. DARRASSE-JÉZE, E. LITVINOVA, F. SEPTIER, D. KLATZMANN, R. LIBLAU & B. L. SALOMON (2003): Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state. *Journal of Experimental Medicine* 198: 737–746.
- FONTENOT, J. D., M. A. GAVIN & A. Y. RUDENSKY (2003): Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology* 4: 330–336.
- FONTENOT, J. D., J. P. RASMUSSEN, L. M. WILLIAMS, J. L. DOOLEY, A. G. FARR & A. Y. RUDENSKY (2005): Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22: 329–341.
- FORTE, E., Z. ZHANG, E. B. THORP & M. HUMMEL (2020): Cytomegalovirus Latency and Reactivation: An Intricate Interplay With the Host Immune Response. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 10: 130.
- FOWLER, K. B., S. STAGNO, R. F. PASS, W. J. BRITT, T. J. BOLL & C. A. ALFORD (1992): The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *The New England journal of medicine* 326: 663–667.
- FRANCISCO, L. M., V. H. SALINAS, K. E. BROWN, V. K. VANGURI, G. J. FREEMAN, V. K. KUCHROO & A. H. SHARPE (2009): PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine* 206: 3015–3029.
- FRENKEL, N., E. C. SCHIRMER, L. S. WYATT, G. KATSAFANAS, E. ROFFMAN, R. M. DANOVICH & C. H. JUNE (1990): Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 748–752.
- FUJIHASHI, K., M. YAMAMOTO, J. R. MCGHEE & H. KIYONO (1993): alpha beta T cell receptor-positive intraepithelial lymphocytes with CD4+, CD8- and CD4+, CD8+ phenotypes from orally immunized mice provide Th2-like function for B cell responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 151: 6681–6691.
- GAO, W., G. DEMIRCI, T. B. STROM & X. C. LI (2003): Stimulating PD-1-negative signals concurrent with blocking CD154 co-stimulation induces long-term islet allograft survival. *Transplantation* 76: 994–999.
- GARCÍA NORES, G. D., C. L. LY, D. A. CUZZONE, R. P. KATARU, G. E. HESPE, J. S. TORRISI, J. J. HUANG, J. C. GARDENIER, I. L. SAVETSKY, M. D. NITTI, J. Z. YU, S. REHAL & B. J. MEHRARA (2018): CD4+ T cells are activated in regional lymph nodes and migrate to skin to initiate lymphedema. *Nature communications* 9: 1970.
- GARDNER, M. B., J. E. OFFICER, J. PARKER, J. D. ESTES & R. W. RONGEY (1974): Induction of disseminated virulent cytomegalovirus infection by immunosuppression of naturally chronically infected wild mice. *Infection and immunity* 10: 966–969.
- GAVIN, M. A., S. R. CLARKE, E. NEGROU, A. GALLEGOS & A. RUDENSKY (2002): Homeostasis and anergy of CD4(+)/CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nature immunology* 3: 33–41.
- GERGELY, K. M., J. PODLECH, S. BECKER, K. FREITAG, S. KRAUTER, N. BÜSCHER, R. HOLTAPPELS, B. PLACHTER, M. J. REDDEHASE & N. A. W. LEMMERMANN (2021): Therapeutic Vaccination of

- Hematopoietic Cell Transplantation Recipients Improves Protective CD8 T-Cell Immunotherapy of Cytomegalovirus Infection. *Frontiers in immunology* 12: 694588.
- GERSHON, R. K. & K. KONDO (1970): Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18: 723–737.
- GIBSON, L., S. DOOLEY, S. TRZMIELINA, M. SOMASUNDARAN, D. FISHER, M. G. REVELLO & K. LUZURIAGA (2007): Cytomegalovirus (CMV) IE1- and pp65-specific CD8+ T cell responses broaden over time after primary CMV infection in infants. *The Journal of infectious diseases* 195: 1789–1798.
- GONDEK, D. C., L.-F. LU, S. A. QUEZADA, S. SAKAGUCHI & R. J. NOELLE (2005): Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174: 1783–1786.
- GONG, Y.-N., C. GUY, J. C. CRAWFORD & D. R. GREEN (2017): Biological events and molecular signaling following MLKL activation during necroptosis. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 16: 1748–1760.
- GOODRUM, F. (2016): Human Cytomegalovirus Latency: Approaching the Gordian Knot. *Annual review of virology* 3: 333–357.
- GRATAMA, J. W., M. BOECKH, R. NAKAMURA, J. J. CORNELISSEN, R. A. BROOIMANS, J. A. ZAIA, S. J. FORMAN, K. GAAL, K. R. BRAY, G. H. GASIOR, C. S. BOYCE, L. A. SULLIVAN & P. C. SOUTHWICK (2010): Immune monitoring with iTAg MHC Tetramers for prediction of recurrent or persistent cytomegalovirus infection or disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: a prospective multicenter study. *Blood* 116: 1655–1662.
- GRINDE, B. (2013): Herpesviruses: latency and reactivation - viral strategies and host response. *Journal of oral microbiology* 5.
- GROSSMAN, W. J., J. W. VERBSKY, W. BARCHET, M. COLONNA, J. P. ATKINSON & T. J. LEY (2004): Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 21: 589–601.
- GRÜTER, W. (1924): Das Herpesvirus, seine ätiologische und klinische Bedeutung. S. 1058–1060.
- GUO, Q., F. HUANG, C. GONCALVES, S. V. DEL RINCÓN & W. H. MILLER (2019): Translation of cancer immunotherapy from the bench to the bedside. *Advances in cancer research* 143: 1–62.
- HA, D., A. TANAKA, T. KIBAYASHI, A. TANEMURA, D. SUGIYAMA, J. B. WING, E. L. LIM, K. W. W. TENG, D. ADEEGBE, E. W. NEWELL, I. KATAYAMA, H. NISHIKAWA & S. SAKAGUCHI (2019): Differential control of human Treg and effector T cells in tumor immunity by Fc-engineered anti-CTLA-4 antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116: 609–618.
- HAGMAN, J. (2017): Critical Functions of IRF4 in B and T Lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 199: 3715–3716.
- HANDKE, W., E. KRAUSE & W. BRUNE (2012): Live or let die: manipulation of cellular suicide programs by murine cytomegalovirus. *Medical microbiology and immunology* 201: 475–486.
- HARIBHAI, D., W. LIN, L. M. RELLAND, N. TRUONG, C. B. WILLIAMS & T. A. CHATILA (2007): Regulatory T cells dynamically control the primary immune response to foreign antigen. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178: 2961–2972.

- HARTMANN, A., S. SAGEDAL & J. HJELMESAETH (2006): The natural course of cytomegalovirus infection and disease in renal transplant recipients. *Transplantation* 82: S15-7.
- HARTY, J. T., A. R. TVINNEREIM & D. W. WHITE (2000): CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annual review of immunology* 18: 275–308.
- HASPOT, F., T. FEHR, C. GIBBONS, G. ZHAO, T. HOGAN, T. HONJO, G. J. FREEMAN & M. SYKES (2008): Peripheral deletional tolerance of alloreactive CD8 but not CD4 T cells is dependent on the PD-1/PD-L1 pathway. *Blood* 112: 2149–2155.
- HASSAN, J., S. DOOLEY & W. HALL (2007): Immunological response to cytomegalovirus in congenitally infected neonates. *Clinical and experimental immunology* 147: 465–471.
- HAY, J., C. R. ROBERTS, W. T. RUYECHAN & A. C. STEVEN (1987): Chapter 24 Herpesviridae. S. 391–405 in: M. V. NERMUT & A. C. STEVEN (Hrsg.): *Animal Virus Structure. Perspectives in Medical Virology*. Elsevier.
- HEBART, H. & H. EINSELE (2004): Clinical aspects of CMV infection after stem cell transplantation. *Human immunology* 65: 432–436.
- HEBEL, K., M. PIERAU, H. LINGEL, M. STEINER, H. KRAUSE, G. JORCH & M. C. BRUNNER-WEINZIERL (2013): Das neonatale Immunsystem: Modulation durch regulatorische T-Zellen und CTLA-4 (CD152). *Laboratoriumsmedizin* 37.
- HERR, W. & B. PLACHTER (2009): Cytomegalovirus and varicella-zoster virus vaccines in hematopoietic stem cell transplantation. *Expert review of vaccines* 8: 999–1021.
- HISATSUNE, T., Y. MINAI, K. NISHISIMA, A. ENOMOTO, K. W. MOORE, T. YOKOTA, K. ARAI & S. KAMINOGAWA (1992): A suppressive lymphokine derived from Ts clone 13G2 is IL-10. *Lymphokine and cytokine research* 11: 87–93.
- HO, M. (2008): The history of cytomegalovirus and its diseases. *Medical microbiology and immunology* 197: 65–73.
- HOLT, P. G., A. DEGEBRODT, T. VENAILLE, C. O'LEARY, K. KRASKA, J. FLEXMAN, H. FARRELL, G. SHELLAM, P. YOUNG & J. PENHALE (1985): Preparation of interstitial lung cells by enzymatic digestion of tissue slices: preliminary characterization by morphology and performance in functional assays. *Immunology* 54: 139–147.
- HOLTAPPELS, R., S. EBERT, J. PODLECH, A. FINK, V. BÖHM, N. A. LEMMERMANN, K. FREITAG, A. RENZAHO, D. THOMAS & M. J. REDDEHASE (Hrsg.) (2013): Murine model for cytoimmunotherapy of CMV disease after haematopoietic cell transplantation. 2. *Cytomegaloviruses: From Molecular Pathogenesis to Intervention*.
- HOLTAPPELS, R., M. W. MUNKS, J. PODLECH & M. J. REDDEHASE (Hrsg.) (2006): CD8 T-cell-based immunotherapy of cytomegalovirus disease in the mouse model of the immunocompromised bone marrow transplantation recipient: p. 383-418. In: M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom. Caister academic Press.
- HOLTAPPELS, R., J. PODLECH, G. GEGINAT, H. P. STEFFENS, D. THOMAS & M. J. REDDEHASE (1998): Control of murine cytomegalovirus in the lungs: relative but not absolute immunodominance of the immediate-early 1 nonapeptide during the antiviral cytolytic T-lymphocyte response in pulmonary infiltrates. *Journal of virology* 72: 7201–7212.
- HOLTAPPELS, R., J. PODLECH, N. K. GRZIMEK, D. THOMAS, M. F. PAHL-SEIBERT & M. J. REDDEHASE (2001): Experimental preemptive immunotherapy of murine cytomegalovirus disease with CD8 T-cell lines specific for ppM83 and pM84, the two homologs of human cytomegalovirus tegument protein ppUL83 (pp65). *Journal of virology* 75: 6584–6600.

- HOLTAPPELS, R., D. THOMAS, J. PODLECH, G. GEGINAT, H. P. STEFFENS & M. J. REDDEHASE (2000): The putative natural killer decoy early gene m04 (gp34) of murine cytomegalovirus encodes an antigenic peptide recognized by protective antiviral CD8 T cells. *Journal of virology* 74: 1871–1884.
- HOLTAPPELS, R., D. THOMAS, J. PODLECH & M. J. REDDEHASE (2002): Two antigenic peptides from genes m123 and m164 of murine cytomegalovirus quantitatively dominate CD8 T-cell memory in the H-2d haplotype. *Journal of virology* 76: 151–164.
- HONESS, R. W. & B. ROIZMAN (1974): Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *Journal of virology* 14: 8–19.
- HONG, J. & B.-S. KIM (2018): Regulatory T Cell-Mediated Tissue Repair. *Advances in experimental medicine and biology* 1064: 221–233.
- HORI, S., T. NOMURA & S. SAKAGUCHI (2003): Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, N.Y.)* 299: 1057–1061.
- HUANG, C.-T., C. J. WORKMAN, D. FLIES, X. PAN, A. L. MARSON, G. ZHOU, E. L. HIPKISS, S. RAVI, J. KOWALSKI, H. I. LEVITSKY, J. D. POWELL, D. M. PARDOLL, C. G. DRAKE & D. A. A. VIGNALI (2004): Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 21: 503–513.
- HUDSON, J. B., V. MISRA & T. R. MOSMANN (1976): Cytomegalovirus infectivity: Analysis of the phenomenon of centrifugal enhancement of infectivity. *Virology* 72: 235–243.
- HUEHN, J. & M. BEYER (2015): Epigenetic and transcriptional control of Foxp3+ regulatory T cells. *Seminars in immunology* 27: 10–18.
- HUMPHREYS, I. R., C. de TREZ, A. KINKADE, C. A. BENEDICT, M. CROFT & C. F. WARE (2007): Cytomegalovirus exploits IL-10-mediated immune regulation in the salivary glands. *Journal of Experimental Medicine* 204: 1217–1225.
- IELLEM, A., M. MARIANI, R. LANG, H. RECALDE, P. PANINA-BORDIGNON, F. SINIGAGLIA & D. D'AMBROSIO (2001): Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine* 194: 847–853.
- INOUE, T., Y. ASANO, S. MATSUOKA, M. FURUTANI-SEIKI, S. AIZAWA, H. NISHIMURA, T. SHIRAI & T. TADA (1993): Distinction of mouse CD8+ suppressor effector T cell clones from cytotoxic T cell clones by cytokine production and CD45 isoforms. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 150: 2121–2128.
- JAHN, G., W. POHL, B. PLACHTER & J. HINTZENSTERN (1988): Kongenitale Cytomegalovirus-Infektion mit letalem Ausgang. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 113: 424–427.
- JAKHARIA, N., D. HOWARD & D. J. RIEDEL (2021): CMV Infection in Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Prevention and Treatment Strategies. *Current treatment options in infectious diseases* 1–18.
- JANSSEN, O., R. SANZENBACHER & D. KABELITZ (2000a): Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte populations. *Cell and tissue research* 301: 85–99.
- JANSSEN, O., A. STOCKER, R. SANZENBACHER, H. H. OBERG, M. A. SIDDIQI & D. KABELITZ (2000b): Differential regulation of activation-induced cell death in individual human T cell clones. *International archives of allergy and immunology* 121: 183–193.

- JASPER, M. J., K. P. TREMELLEN & S. A. ROBERTSON (2006): Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue. *Molecular human reproduction* 12: 301–308.
- JEAN BELTRAN, P. M. & I. M. CRISTEA (2014): The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics. *Expert review of proteomics* 11: 697–711.
- JOHNSON, K. P. (1969): Mouse cytomegalovirus: placental infection. *The Journal of infectious diseases* 120: 445–450.
- JOLLER, N., E. LOZANO, P. R. BURKETT, B. PATEL, S. XIAO, C. ZHU, J. XIA, T. G. TAN, E. SEFIK, V. YAJNIK, A. H. SHARPE, F. J. QUINTANA, D. MATHIS, C. BENOIST, D. A. HAFLER & V. K. KUCHROO (2014): Treg cells expressing the coinhibitory molecule TIGIT selectively inhibit proinflammatory Th1 and Th17 cell responses. *Immunity* 40: 569–581.
- JONJIC, S., I. BUBIĆ & KRMPOTIĆ (Hrsg.) (2006): Innate immunity to cytomegalovirus, p. 285-320: In: M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- JONJIĆ, S., I. PAVIĆ, B. POLIĆ, I. CRNKOVIĆ, P. LUCIN & U. H. KOSZINOWSKI (1994): Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *Journal of Experimental Medicine* 179: 1713–1717.
- JOOSTEN, S. A. & T. H. M. OTTENHOFF (2008): Human CD4 and CD8 regulatory T cells in infectious diseases and vaccination. *Human immunology* 69: 760–770.
- JORDAN, M. C., J. D. SHANLEY & J. G. STEVENS (1977): Immunosuppression reactivates and disseminates latent murine cytomegalovirus. *The Journal of general virology* 37: 419–423.
- JORDAN, M. C., J. D. SHANLEY & J. G. STEVENS (1978): Immunosuppression reactivates and disseminates latent murine cytomegalovirus. *IARC scientific publications* 769–774.
- JUDGE, A. D., X. ZHANG, H. FUJII, C. D. SURH & J. SPRENT (2002): Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8(+) T cells. *Journal of Experimental Medicine* 196: 935–946.
- KAHN, D. A. & D. BALTIMORE (2010): Pregnancy induces a fetal antigen-specific maternal T regulatory cell response that contributes to tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 9299–9304.
- KARAMIZADEH, S., S. M. ABDULLAH, A. A. MANAF, M. ZAMANI & A. HOOMAN (2013): An Overview of Principal Component Analysis. *JSIP* 04: 173–175.
- KEDIA-MEHTA, N. & D. K. FINLAY (2019): Competition for nutrients and its role in controlling immune responses. *Nature communications* 10: 2123.
- KEIR, M. E., S. C. LIANG, I. GULERIA, Y. E. LATCHMAN, A. QIPO, L. A. ALBACKER, M. KOULMANDA, G. J. FREEMAN, M. H. SAYEGH & A. H. SHARPE (2006): Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *Journal of Experimental Medicine* 203: 883–895.
- KILENS, S., D. MEISTERMANN, D. MORENO, C. CHARIAU, A. GAIGNERIE, A. REIGNIER, Y. LELIÈVRE, M. CASANOVA, C. VALLOT, S. NEDELLEC, L. FLIPPE, J. FIRMIN, J. SONG, E. CHARPENTIER, J. LAMMERS, A. DONNART, N. MAREC, W. DEB, A. BIHOUEE, C. LE CAIGNEC, C. PECQUEUR, R. REDON, P. BARRIÈRE, J. BOURDON, V. PASQUE, M. SOUMILLON, T. S. MIKKELSEN, C. ROUGEULLE, T. FRÉOUR & L. DAVID (2018): Parallel derivation of isogenic human primed and naive induced pluripotent stem cells. *Nature communications* 9: 360.

- KLEIN, L., K. KHAZAIE & H. von BOEHMER (2003): In vivo dynamics of antigen-specific regulatory T cells not predicted from behavior in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 8886–8891.
- KLEMOLA, E., R. von ESSEN, G. HENLE & W. HENLE (1970): Infectious-mononucleosis-like disease with negative heterophil agglutination test. Clinical features in relation to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus antibodies. *The Journal of infectious diseases* 121: 608–614.
- KOEHN, B. H., M. L. FORD, I. R. FERRER, K. BOROM, S. GANGAPPA, A. D. KIRK & C. P. LARSEN (2008): PD-1-dependent mechanisms maintain peripheral tolerance of donor-reactive CD8+ T cells to transplanted tissue. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 181: 5313–5322.
- KOHN, A. P., P. A. CARPENTIER, H. A. ANGER & S. D. MILLER (2002): Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169: 4712–4716.
- KOLAR, P., K. KNIEKE, J. K. E. HEGEL, D. QUANDT, G.-R. BURMESTER, H. HOFF & M. C. BRUNNER-WEINZIERL (2009): CTLA-4 (CD152) controls homeostasis and suppressive capacity of regulatory T cells in mice. *Arthritis and rheumatism* 60: 123–132.
- KOLODIN, D., N. VAN PANHUYS, C. LI, A. M. MAGNUSON, D. CIPOLLETTA, C. M. MILLER, A. WAGERS, R. N. GERMAIN, C. BENOIST & D. MATHIS (2015): Antigen- and cytokine-driven accumulation of regulatory T cells in visceral adipose tissue of lean mice. *Cell metabolism* 21: 543–557.
- KONDO, Y., T. OHNO, N. NISHII, K. HARADA, H. YAGITA & M. AZUMA (2016): Differential contribution of three immune checkpoint (VISTA, CTLA-4, PD-1) pathways to antitumor responses against squamous cell carcinoma. *Oral oncology* 57: 54–60.
- KRMPOTIC, A., I. BUBIC, B. POLIC, P. LUCIN & S. JONJIC (2003): Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. *Microbes and infection* 5: 1263–1277.
- KROPP, K. A., C. O. SIMON, A. FINK, A. RENZHO, B. KÜHNAPFEL, J. PODLECH, M. J. REDDEHASE & N. K. A. GRZIMEK (2009): Synergism between the components of the bipartite major immediate-early transcriptional enhancer of murine cytomegalovirus does not accelerate virus replication in cell culture and host tissues. *The Journal of general virology* 90: 2395–2401.
- KU, C. C., M. MURAKAMI, A. SAKAMOTO, J. KAPPLER & P. MARRACK (2000): Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines. *Science (New York, N.Y.)* 288: 675–678.
- LA ROSA, C. & D. J. DIAMOND (2012): The immune response to human CMV. *Future virology* 7: 279–293.
- LIDLAW, B. J., W. CUI, R. A. AMEZQUITA, S. M. GRAY, T. GUAN, Y. LU, Y. KOBAYASHI, R. A. FLAVELL, S. H. KLEINSTEIN, J. CRAFT & S. M. KAECH (2015): Production of IL-10 by CD4(+) regulatory T cells during the resolution of infection promotes the maturation of memory CD8(+) T cells. *Nature immunology* 16: 871–879.
- LANDOLFO, S., M. GARIGLIO, G. GRIBAUDO & D. LEMBO (2003): The human cytomegalovirus. *Pharmacology & therapeutics* 98: 269–297.
- LANTERI, M. C., K. M. O'BRIEN, W. E. PURTHA, M. J. CAMERON, J. M. LUND, R. E. OWEN, J. W. HEITMAN, B. CUSTER, D. F. HIRSCHKORN, L. H. TOBLER, N. KIELY, H. E. PRINCE, L. C.

- NDHLOVU, D. F. NIXON, H. T. KAMEL, D. J. KELVIN, M. P. BUSCH, A. Y. RUDENSKY, M. S. DIAMOND & P. J. NORRIS (2009): Tregs control the development of symptomatic West Nile virus infection in humans and mice. *The Journal of clinical investigation* 119: 3266–3277.
- LEE, S. H., S. GIRARD, D. MACINA, M. BUSÀ, A. ZAFER, A. BELOUCHI, P. GROS & S. M. VIDAL (2001): Susceptibility to mouse cytomegalovirus is associated with deletion of an activating natural killer cell receptor of the C-type lectin superfamily. *Nature genetics* 28: 42–45.
- LEE, Y.-H., Y. ISHIDA, M. RIFA'I, Z. SHI, K.-I. ISOBE & H. SUZUKI (2008): Essential role of CD8+CD122+ regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 180: 825–832.
- LEHMANN, J. S., A. ZHAO, B. SUN, W. JIANG & S. JI (2017): Multiplex Cytokine Profiling of Stimulated Mouse Splenocytes Using a Cytometric Bead-based Immunoassay Platform. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- LEMMERMANN, N. A., J. PODLECH, C. K. SECKERT, K. A. KROPP, N. K. GRZIMEK, M. J. REDDEHASE & R. HOLTAPPELS (2010): CD8 T-Cell Immunotherapy of Cytomegalovirus Disease in the Murine Model. S. 369–420 in: S. KAUFMANN & D. KABELITZ (Hrsg.): *Immunology of Infection. Methods in Microbiology*. Elsevier.
- LEYER, I. & K. WESCHE (Hrsg.) (2007): *Multivariate Statistik in der Ökologie*. Springer-Lehrbuch. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- LI, C., J. R. DISPIRITO, D. ZEMMOUR, R. G. SPALLANZANI, W. KUSWANTO, C. BENOIST & D. MATHIS (2018a): TCR Transgenic Mice Reveal Stepwise, Multi-site Acquisition of the Distinctive Fat-Treg Phenotype. *Cell* 174: 285-299.e12.
- LI, J., S. K. FIGUEIRA, A. C. A. VRAZO, B. F. BINKOWSKI, B. L. BUTLER, Y. TABATA, A. FILIPOVICH, M. B. JORDAN & K. A. RISMA (2014a): Real-time detection of CTL function reveals distinct patterns of caspase activation mediated by Fas versus granzyme B. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 193: 519–528.
- LI, J., Y. HE, J. HAO, L. NI & C. DONG (2018b): High Levels of Eomes Promote Exhaustion of Anti-tumor CD8+ T Cells. *Frontiers in immunology* 9: 2981.
- LI, S., Q. XIE, Y. ZENG, C. ZOU, X. LIU, S. WU, H. DENG, Y. XU, X. C. LI & Z. DAI (2014b): A naturally occurring CD8(+)CD122(+) T-cell subset as a memory-like Treg family. *Cellular & molecular immunology* 11: 326–331.
- LI, Y., X. LIU, F. HUANG, H. ZHOU, Y. HUANG & F. FANG (2010): CD4+CD25+ regulatory T cells suppress the immune responses of mouse embryo fibroblasts to murine cytomegalovirus infection. *Immunology letters* 131: 131–138.
- LIM, E. Y., S. E. JACKSON & M. R. WILLS (2020): The CD4+ T Cell Response to Human Cytomegalovirus in Healthy and Immunocompromised People. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 10: 202.
- LIMAYE, A. P., R. BAKTHAVATSALAM, H. W. KIM, S. E. RANDOLPH, J. B. HALLDORSON, P. J. HEALEY, C. S. KUHR, A. E. LEVY, J. D. PERKINS, J. D. REYES & M. BOECKH (2006): Impact of cytomegalovirus in organ transplant recipients in the era of antiviral prophylaxis. *Transplantation* 81: 1645–1652.
- LIN, H., E. LEE, K. HESTIR, C. LEO, M. HUANG, E. BOSCH, R. HALENBECK, G. WU, A. ZHOU, D. BEHRENS, D. HOLLENBAUGH, T. LINNEMANN, M. QIN, J. WONG, K. CHU, S. K. DOBERSTEIN & L. T. WILLIAMS (2008): Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science* (New York, N.Y.) 320: 807–811.

- LINDENBERG, M., G. SOLMAZ, F. PUTTUR & T. SPARWASSER (2014): Mouse cytomegalovirus infection overrules T regulatory cell suppression on natural killer cells. *Virology* 11: 145.
- LINDQUESTER, G. J. & P. E. PELLETT (1991): Properties of the human herpesvirus 6 strain Z29 genome: G + C content, length, and presence of variable-length directly repeated terminal sequence elements. *Virology* 182: 102–110.
- LINES, J. L., L. F. SEMPERE, T. BROUGHTON, L. WANG & R. NOELLE (2014): VISTA is a novel broad-spectrum negative checkpoint regulator for cancer immunotherapy. *Cancer immunology research* 2: 510–517.
- LINSLEY, P. S., J. L. GREENE, W. BRADY, J. BAJORATH, J. A. LEDBETTER & R. PEACH (1994): Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1: 793–801.
- LINTERMAN, M. A., W. PIERSON, S. K. LEE, A. KALLIES, S. KAWAMOTO, T. F. RAYNER, M. SRIVASTAVA, D. P. DIVEKAR, L. BEATON, J. J. HOGAN, S. FAGARASAN, A. LISTON, K. G. C. SMITH & C. G. VINUESA (2011): Foxp3<sup>+</sup> follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nature medicine* 17: 975–982.
- LIU, F., J. HUANG, F. HE, X. MA, F. FAN, M. MENG, Y. ZHUO & L. ZHANG (2020): CD96, a new immune checkpoint, correlates with immune profile and clinical outcome of glioma. *Scientific reports* 10: 10768.
- LIU, G.-Z., L.-B. FANG, P. HJELMSTRÖM & X.-G. GAO (2007): Increased CD8<sup>+</sup> central memory T cells in patients with multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 13: 149–155.
- LJUNGMAN, P., M. HAKKI & M. BOECKH (2011): Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Hematology/oncology clinics of North America* 25: 151–169.
- LJUNGMAN, P., L. PEREZ-BERCOFF, J. JONSSON, G. AVETISYAN, E. SPARRELID, J. ASCHAN, L. BARKHOLT, K. LARSSON, J. WINIARSKI, Z. YUN & O. RINGDÉN (2006): Risk factors for the development of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 91: 78–83.
- LOH, J., D. T. CHU, A. K. O'GUIN, W. M. YOKOYAMA & H. W. VIRGIN (2005): Natural killer cells utilize both perforin and gamma interferon to regulate murine cytomegalovirus infection in the spleen and liver. *Journal of virology* 79: 661–667.
- LYONS, A. (2000): Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *Journal of immunological methods* 243: 147–154.
- MACAGNO, A., N. L. BERNASCONI, F. VANZETTA, E. DANDER, A. SARASINI, M. G. REVELLO, G. GERNA, F. SALLUSTO & A. LANZAVECCHIA (2010): Isolation of human monoclonal antibodies that potently neutralize human cytomegalovirus infection by targeting different epitopes on the gH/gL/UL128-131A complex. *Journal of virology* 84: 1005–1013.
- MALEK, T. R., A. YU, V. VINCEK, P. SCIBELLI & L. KONG (2002): CD4 Regulatory T Cells Prevent Lethal Autoimmunity in IL-2R $\beta$ -Deficient Mice. *Immunity* 17: 167–178.
- MARIN-ACEVEDO, J. A., B. DHOLARIA, A. E. SOYANO, K. L. KNUTSON, S. CHUMSRI & Y. LOU (2018): Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges. *J Hematol Oncol* 11: 39.
- MARTÍNEZ, F. P., R. CRUZ, F. LU, R. PLASSCHAERT, Z. DENG, Y. A. RIVERA-MOLINA, M. S. BARTOLOMEI, P. M. LIEBERMAN & Q. TANG (2014): CTCF binding to the first intron of the major immediate early (MIE) gene of human cytomegalovirus (HCMV) negatively regulates MIE gene expression and HCMV replication. *Journal of virology* 88: 7389–7401.

- MAYER, C. T., L. BEROD & T. SPARWASSER (2012): Layers of dendritic cell-mediated T cell tolerance, their regulation and the prevention of autoimmunity. *Frontiers in immunology* 3: 183.
- MAYER, C. T. & T. SPARWASSER (2014): Assessing the suppressive activity of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 1193: 85–96.
- McMURCHY, A. N. & M. K. LEVINGS (2012): Suppression assays with human T regulatory cells: a technical guide. *Eur. J. Immunol.* 42: 27–34.
- MEHDIZADEH, M., S. KARAMI, H. GHAFARI NAZARI, G. SANKANIAN, M. HAMIDPOUR & A. HAJIFATHALI (2021): Immunotherapy with adoptive cytomegalovirus-specific T cells transfer: Summarizing latest gene engineering techniques. *Health science reports* 4: e322.
- MEINICKE, H., A. BREMSER, M. BRACK, K. SCHRENK, H. PIRCHER & A. IZCUE (2017): KLRG1 impairs regulatory T-cell competitive fitness in the gut. *Immunology* 152: 65–73.
- MEYERS, J. D., P. LJUNGMAN & L. D. FISHER (1990): Cytomegalovirus excretion as a predictor of cytomegalovirus disease after marrow transplantation: importance of cytomegalovirus viremia. *The Journal of infectious diseases* 162: 373–380.
- MILLER, W. J., J. MCCULLOUGH, H. H. BALFOUR, R. J. HAAKE, N. K. RAMSAY, A. GOLDMAN, R. BOWMAN & J. KERSEY (1991): Prevention of cytomegalovirus infection following bone marrow transplantation: a randomized trial of blood product screening. *Bone marrow transplantation* 7: 227–234.
- MILTENYI, S., W. MÜLLER, W. WEICHEL & A. RADBRUCH (1990): High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11: 231–238.
- MISHRA, S., W. LIAO, Y. LIU, M. YANG, C. MA, H. WU, M. ZHAO, X. ZHANG, Y. QIU, Q. LU & N. ZHANG (2021): TGF- $\beta$  and Eomes control the homeostasis of CD8<sup>+</sup> regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine* 218.
- MOCARSKI, E. S., T. SHENK & R. F. PASS (Hrsg.) (2007): Knipe, D.M. and Howley, P.M., Eds., *Fields Virology*, 5th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2701-2772.
- MOON, Y. W., J. HAJJAR, P. HWU & A. NAING (2015): Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer. *Journal for immunotherapy of cancer* 3: 51.
- MOSKOPHIDIS, D., H. PIRCHER, I. CIERNIK, B. ODERMATT, H. HENGARTNER & R. M. ZINKERNAGEL (1992): Suppression of virus-specific antibody production by CD8<sup>+</sup> class I-restricted antiviral cytotoxic T cells in vivo. *Journal of virology* 66: 3661–3668.
- MOSKOWITZ, L., G. T. HENSLEY, J. C. CHAN & K. ADAMS (1985): Immediate causes of death in acquired immunodeficiency syndrome. *Archives of pathology & laboratory medicine* 109: 735–738.
- MOSMANN, T. R. & T. FONG (1989): Specific assays for cytokine production by T cells. *Journal of immunological methods* 116: 151–158.
- MURPHY, E., I. RIGOUTSOS, T. SHIBUYA & T. E. SHENK (2003): Reevaluation of human cytomegalovirus coding potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 13585–13590.
- MUTTER, W., M. J. REDDEHASE, F. W. BUSCH, H. J. BÜHRING & U. H. KOSZINOWSKI (1988): Failure in generating hemopoietic stem cells is the primary cause of death from cytomegalovirus disease in the immunocompromised host. *Journal of Experimental Medicine* 167: 1645–1658.
- NAGATA, S. (1997): Apoptosis by Death Factor. *Cell* 88: 355–365.

- NAJAFIAN, N., T. CHITNIS, A. D. SALAMA, B. ZHU, C. BENOUE, X. YUAN, M. R. CLARKSON, M. H. SAYEGH & S. J. KHOURY (2003): Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model. *The Journal of clinical investigation* 112: 1037–1048.
- NAKAMURA, K., A. KITANI & W. STROBER (2001): Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *Journal of Experimental Medicine* 194: 629–644.
- NEGRINI, S., D. FENOGLIO, A. PARODI, F. KALLI, F. BATTAGLIA, G. NASI, M. CURTO, S. TARDITO, F. FERRERA & G. FILACI (2017): Phenotypic Alterations Involved in CD8+ Treg Impairment in Systemic Sclerosis. *Frontiers in immunology* 8: 18.
- NEIMAN, P. E., W. REEVES, G. RAY, N. FLOURNOY, K. G. LERNER, G. E. SALE & E. D. THOMAS (1977): A prospective analysis interstitial pneumonia and opportunistic viral infection among recipients of allogeneic bone marrow grafts. *The Journal of infectious diseases* 136: 754–767.
- NGUYEN, V. H., R. ZEISER, D. L. DASILVA, D. S. CHANG, A. BEILHACK, C. H. CONTAG & R. S. NEGRIN (2007): In vivo dynamics of regulatory T-cell trafficking and survival predict effective strategies to control graft-versus-host disease following allogeneic transplantation. *Blood* 109: 2649–2656.
- NIEDERLOVA, V., O. TSYKLAURI, T. CHADIMOVA & O. STEPANEK (2021): CD8+ Tregs revisited: A heterogeneous population with different phenotypes and properties. *Eur. J. Immunol.* 51: 512–530.
- NISHIMURA, H., T. OKAZAKI, Y. TANAKA, K. NAKATANI, M. HARA, A. MATSUMORI, S. SASAYAMA, A. MIZOGUCHI, H. HIAI, N. MINATO & T. HONJO (2001): Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science (New York, N.Y.)* 291: 319–322.
- NOEL, P. J., L. H. BOISE & C. B. THOMPSON (1996): Regulation of T cell activation by CD28 and CTLA4. *Advances in experimental medicine and biology* 406: 209–217.
- OBERG, H. H., B. LENGL-JANSSEN, D. KABELITZ & O. JANSSEN (1997): Activation-induced T cell death: resistance or susceptibility correlate with cell surface fas ligand expression and T helper phenotype. *Cellular immunology* 181: 93–100.
- OH, J., M.-W. HUR & C.-E. LEE (2009): SOCS1 protects protein tyrosine phosphatases by thioredoxin upregulation and attenuates Jaks to suppress ROS-mediated apoptosis. *Oncogene* 28: 3145–3156.
- OH, J. J., J. J. CARTER & R. D. DIX (2021): A Mouse Model That Mimics AIDS-Related Cytomegalovirus Retinitis: Insights into Pathogenesis. *Pathogens (Basel, Switzerland)* 10.
- OH, J. J., J. J. CARTER, J. G. E. NEMENO & R. D. DIX (2020): Parthanatos-associated proteins are stimulated intraocularly during development of experimental murine cytomegalovirus retinitis in mice with retrovirus-induced immunosuppression. *Journal of medical virology* 92: 394–398.
- OJALA, P. M., B. SODEIK, M. W. EBERSOLD, U. KUTAY & A. HELENIUS (2000): Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Molecular and cellular biology* 20: 4922–4931.
- OKAMURA, T., K. FUJIO, S. SUMITOMO & K. YAMAMOTO (2012): Roles of LAG3 and EGR2 in regulatory T cells. *Annals of the rheumatic diseases* 71 Suppl 2: i96-100.
- OLDENHOVE, G., N. BOULADOUX, E. A. WOHLFERT, J. A. HALL, D. CHOU, L. DOS SANTOS, S. O'BRIEN, R. BLANK, E. LAMB, S. NATARAJAN, R. KASTENMAYER, C. HUNTER, M. E. GRIGG & Y.

- BELKAID (2009): Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity* 31: 772–786.
- OPENSHAW, P., E. E. MURPHY, N. A. HOSKEN, V. MAINO, K. DAVIS, K. MURPHY & A. O'GARRA (1995): Heterogeneity of intracellular cytokine synthesis at the single-cell level in polarized T helper 1 and T helper 2 populations. *Journal of Experimental Medicine* 182: 1357–1367.
- OWEN, D. L., L. E. SJAASTAD & M. A. FARRAR (2019): Regulatory T Cell Development in the Thymus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 203: 2031–2041.
- PALUDAN, S. R., A. G. BOWIE, K. A. HORAN & K. A. FITZGERALD (2011): Recognition of herpesviruses by the innate immune system. *Nature reviews. Immunology* 11: 143–154.
- PANDIYAN, P., H. R. CONTI, L. ZHENG, A. C. PETERSON, D. R. MATHERN, N. HERNÁNDEZ-SANTOS, M. EDGERTON, S. L. GAFFEN & M. J. LENARDO (2011): CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells promote Th17 cells in vitro and enhance host resistance in mouse *Candida albicans* Th17 cell infection model. *Immunity* 34: 422–434.
- PANDIYAN, P., J. K. E. HEGEL, M. KRUEGER, D. QUANDT & M. C. BRUNNER-WEINZIERL (2007): High IFN-gamma production of individual CD8 T lymphocytes is controlled by CD152 (CTLA-4). *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178: 2132–2140.
- PARISH, C. R. (1999): Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol Cell Biol* 77: 499–508.
- PEGGS, K. S. (2009): Adoptive T cell immunotherapy for cytomegalovirus. *Expert opinion on biological therapy* 9: 725–736.
- PEGGS, K. S., K. THOMSON, E. SAMUEL, G. DYER, J. ARMOOGUM, R. CHAKRAVERTY, K. PANG, S. MACKINNON & M. W. LOWDELL (2011): Directly selected cytomegalovirus-reactive donor T cells confer rapid and safe systemic reconstitution of virus-specific immunity following stem cell transplantation. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 52: 49–57.
- PELLET, P. & B. ROIZMAN (Hrsg.) (2007): A Brief Introduction: In: Howley, P., Ed., *Fields of Virology*. 5. Aufl. 2480-2499. Lippincott, Philadelphia.
- PENTCHEVA-HOANG, T., J. G. EGEN, K. WOJNOONSKI & J. P. ALLISON (2004): B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity* 21: 401–413.
- PETROVAS, C., J. P. CASAZZA, J. M. BRENCHLEY, D. A. PRICE, E. GOSTICK, W. C. ADAMS, M. L. PRECOPIO, T. SCHACKER, M. ROEDERER, D. C. DOUEK & R. A. KOUP (2006): PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *Journal of Experimental Medicine* 203: 2281–2292.
- PICARDA, G. & C. A. BENEDICT (2018): Cytomegalovirus: Shape-Shifting the Immune System. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 200: 3881–3889.
- PINDER, C. L., S. KRATOCHVIL, D. CIZMECI, L. MUIR, Y. GUO, R. J. SHATTOCK & P. F. MCKAY (2017): Isolation and Characterization of Antigen-Specific Plasmablasts Using a Novel Flow Cytometry-Based Ig Capture Assay. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 199: 4180–4188.
- PODLECH, J., R. HOLTAPPELS, N. K. GRZIMEK & M. J. REDDEHASE (2002): Animal models: Murine cytomegalovirus. 493-IN11 in: S. KAUFMANN & D. KABELITZ (Hrsg.): *Immunology of Infection*. 32. Aufl. *Methods in Microbiology*. Elsevier.
- PODLECH, J., R. HOLTAPPELS, M. F. PAHL-SEIBERT, H. P. STEFFENS & M. J. REDDEHASE (2000): Murine model of interstitial cytomegalovirus pneumonia in syngeneic bone marrow

- transplantation: persistence of protective pulmonary CD8-T-cell infiltrates after clearance of acute infection. *Journal of virology* 74: 7496–7507.
- PODLECH, J., R. HOLTAPPELS, N. WIRTZ, H. P. STEFFENS & M. J. REDDEHASE (1998): Reconstitution of CD8 T cells is essential for the prevention of multiple-organ cytomegalovirus histopathology after bone marrow transplantation. *The Journal of general virology* 79 (Pt 9): 2099–2104.
- POLANSKY, J. K. & J. HUEHN (2007): To be or not to be a Treg: Epigenetische Regulation der Foxp3-Expression in regulatorischen T-Zellen. *Zeitschrift für Rheumatologie* 66: 417–420.
- POLIĆ, B., H. HENGEL, A. KRMPOTIĆ, J. TRGOVČIĆ, I. PAVIĆ, P. LUCCARONIN, S. JONJIĆ & U. H. KOSZINOWSKI (1998): Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *Journal of Experimental Medicine* 188: 1047–1054.
- POMIÉ, C., I. MÉNAGER-MARCQ & J. P. M. VAN MEERWIJK (2008): Murine CD8+ regulatory T lymphocytes: the new era. *Human immunology* 69: 708–714.
- POOLE, E. L. & M. M. NEVELS (2021): Editorial: Cytomegalovirus Pathogenesis and Host Interactions. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 11: 711551.
- POPESCU, I., C. MACEDO, K. ABU-ELMAGD, R. SHAPIRO, Y. HUA, A. W. THOMSON, A. E. MORELLI, W. J. STORKUS & D. METES (2007): EBV-specific CD8+ T cell reactivation in transplant patients results in expansion of CD8+ type-1 regulatory T cells. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 7: 1215–1223.
- POUSSIER, P., T. NING, D. BANERJEE & M. JULIUS (2002): A unique subset of self-specific intrainestinal T cells maintains gut integrity. *Journal of Experimental Medicine* 195: 1491–1497.
- PROBST, H. C., K. MCCOY, T. OKAZAKI, T. HONJO & M. VAN DEN BROEK (2005): Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nature immunology* 6: 280–286.
- QUAH, B. J. C., H. S. WARREN & C. R. PARISH (2007): Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nature protocols* 2: 2049–2056.
- QURESHI, O. S., Y. ZHENG, K. NAKAMURA, K. ATTRIDGE, C. MANZOTTI, E. M. SCHMIDT, J. BAKER, L. E. JEFFERY, S. KAUR, Z. BRIGGS, T. Z. HOU, C. E. FUTTER, G. ANDERSON, L. S. K. WALKER & D. M. SANSOM (2011): Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science (New York, N.Y.)* 332: 600–603.
- RAWLINSON, W. D., H. E. FARRELL & B. G. BARRELL (1996): Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *Journal of virology* 70: 8833–8849.
- REDDEHASE, M. (2013a): *Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention*. Caister academic Press, Norfolk.
- REDDEHASE, M. J. (2002): Antigen and immunoevasin: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nature reviews. Immunology* 2: 831–844.
- REDDEHASE, M. J. (2013b): *Cytomegaloviruses: From Molecular Pathogenesis to Intervention*. Caister academic Press, Norfolk.

- REDDEHASE, M. J., M. BALTHESSEN, M. RAPP, S. JONJIĆ, I. PAVIĆ & U. H. KOSZINOWSKI (1994): The conditions of primary infection define the load of latent viral genome in organs and the risk of recurrent cytomegalovirus disease. *Journal of Experimental Medicine* 179: 185–193.
- REDDEHASE, M. J., S. JONJIĆ, F. WEILAND, W. MUTTER & U. H. KOSZINOWSKI (1988): Adoptive immunotherapy of murine cytomegalovirus adenitis in the immunocompromised host: CD4-helper-independent antiviral function of CD8-positive memory T lymphocytes derived from latently infected donors. *Journal of virology* 62: 1061–1065.
- REDDEHASE, M. J., G. M. KEIL & U. H. KOSZINOWSKI (1984): The cytolytic T lymphocyte response to the murine cytomegalovirus. II. Detection of virus replication stage-specific antigens by separate populations of in vivo active cytolytic T lymphocyte precursors. *European journal of immunology* 14: 56–61.
- REDDEHASE, M. J., J. B. ROTHBARD & U. H. KOSZINOWSKI (1989): A pentapeptide as minimal antigenic determinant for MHC class I-restricted T lymphocytes. *Nature* 337: 651–653.
- REDDEHASE, M. J., F. WEILAND, K. MÜNCH, S. JONJIC, A. LÜSKE & U. H. KOSZINOWSKI (1985): Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *Journal of virology* 55: 264–273.
- REEVES, M. & J. SINCLAIR (2008): Aspects of human cytomegalovirus latency and reactivation. *Current topics in microbiology and immunology* 325: 297–313.
- REUSSER, P., S. R. RIDDELL, J. D. MEYERS & P. D. GREENBERG (1991): Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* 78: 1373–1380.
- REVELLO, M. G., M. ZAVATTONI, M. FURIONE, E. FABBRI & G. GERNA (2006): Preconceptional primary human cytomegalovirus infection and risk of congenital infection. *The Journal of infectious diseases* 193: 783–787.
- RIBAS, A. & J. D. WOLCHOK (2018): Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science (New York, N.Y.)* 359: 1350–1355.
- RIDDELL, S. R., K. S. WATANABE, J. M. GOODRICH, C. R. LI, M. E. AGHA & P. D. GREENBERG (1992): Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science (New York, N.Y.)* 257: 238–241.
- RIFA'I, M., Y. KAWAMOTO, I. NAKASHIMA & H. SUZUKI (2004): Essential roles of CD8+CD122+ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *Journal of Experimental Medicine* 200: 1123–1134.
- RIFA'I, M., Z. SHI, S.-Y. ZHANG, Y. H. LEE, H. SHIKU, K.-I. ISOBE & H. SUZUKI (2008): CD8+CD122+ regulatory T cells recognize activated T cells via conventional MHC class I-alpha/beta-TCR interaction and become IL-10-producing active regulatory cells. *International Immunology* 20: 937–947.
- ROBB, R. J., K. E. LINEBURG, R. D. KUNS, Y. A. WILSON, N. C. RAFFELT, S. D. OLVER, A. VARELIAS, K. A. ALEXANDER, B. E. TEAL, T. SPARWASSER, G. J. HAMMERLING, K. A. MARKEY, M. KOYAMA, A. D. CLOUSTON, C. R. ENGWERDA, G. R. HILL & K. P. A. MACDONALD (2012): Identification and expansion of highly suppressive CD8(+)FoxP3(+) regulatory T cells after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 119: 5898–5908.
- ROBERTS, T. C., D. C. BRENNAN, R. S. BULLER, M. GAUDREAU-KEENER, M. A. SCHNITZLER, K. E. STERNHELL, K. A. GARLOCK, G. G. SINGER & G. A. STORCH (1998): Quantitative

- polymerase chain reaction to predict occurrence of symptomatic cytomegalovirus infection and assess response to ganciclovir therapy in renal transplant recipients. *The Journal of infectious diseases* 178: 626–635.
- ROBINSON, N., R. GANESAN, C. HEGEDŰS, K. KOVÁCS, T. A. KUFER & L. VIRÁG (2019): Programmed necrotic cell death of macrophages: Focus on pyroptosis, necroptosis, and parthanatos. *Redox biology* 26: 101239.
- ROIZMAN, B. & J. BAINES (1991): The diversity and unity of herpesviridae. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 14: 63–79.
- ROIZMAN, B., L. E. CARMICHAEL, F. DEINHARDT, G. DE-THE, A. J. NAHMIA, W. PLOWRIGHT, F. RAPP, P. SHELDRIK, M. TAKAHASHI & K. WOLF (1981): Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* 16: 201–217.
- ROIZMANN, B., R. C. DESROSIERS, B. FLECKENSTEIN, C. LOPEZ, A. C. MINSON & M. J. STUDDERT (1992): The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of virology* 123: 425–449.
- RONCADOR, G., P. J. BROWN, L. MAESTRE, S. HUE, J. L. MARTÍNEZ-TORRECUADRADA, K.-L. LING, S. PRATAP, C. TOMS, B. C. FOX, V. CERUNDOLO, F. POWRIE & A. H. BANHAM (2005): Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur. J. Immunol.* 35: 1681–1691.
- ROWE, J. H., J. M. ERTELT, M. N. AGUILERA, M. A. FARRAR & S. S. WAY (2011): Foxp3(+) regulatory T cell expansion required for sustaining pregnancy compromises host defense against prenatal bacterial pathogens. *Cell host & microbe* 10: 54–64.
- ROWE, J. H., J. M. ERTELT, L. XIN & S. S. WAY (2012): Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen. *Nature* 490: 102–106.
- SAKAGUCHI, S., N. SAKAGUCHI, M. ASANO, M. ITOH & M. TODA (1995): Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 155: 1151–1164.
- SAKAGUCHI, S., K. WING & M. MIYARA (2007): Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur. J. Immunol.* 37 Suppl 1: S116-23.
- SAKAGUCHI, S., K. WING, Y. ONISHI, P. PRIETO-MARTIN & T. YAMAGUCHI (2009): Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *International Immunology* 21: 1105–1111.
- SALEH, R. & E. ELKORD (2019): Treg-mediated acquired resistance to immune checkpoint inhibitors. *Cancer letters* 457: 168–179.
- SALIGRAMA, N., F. ZHAO, M. J. SIKORA, W. S. SERRATELLI, R. A. FERNANDES, D. M. LOUIS, W. YAO, X. JI, J. IDOYAGA, V. B. MAHAJAN, L. M. STEINMETZ, Y.-H. CHIEN, S. L. HAUSER, J. R. OKSENBERG, K. C. GARCIA & M. M. DAVIS (2019): Opposing T cell responses in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature* 572: 481–487.
- SAMSTEIN, R. M., S. Z. JOSEFOWICZ, A. ARVEY, P. M. TREUTING & A. Y. RUDENSKY (2012): Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. *Cell* 150: 29–38.
- SARWEEN, N., A. CHODOS, C. RAYKUNDALIA, M. KHAN, A. K. ABBAS & L. S. K. WALKER (2004): CD4+CD25+ cells controlling a pathogenic CD4 response inhibit cytokine differentiation, CXCR-3 expression, and tissue invasion. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 173: 2942–2951.

- SASIDHARAN NAIR, V. & E. ELKORD (2018): Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy: a focus on T-regulatory cells. *Immunol Cell Biol* 96: 21–33.
- SCALZO, A. A., N. A. FITZGERALD, C. R. WALLACE, A. E. GIBBONS, Y. C. SMART, R. C. BURTON & G. R. SHELLAM (1992): The effect of the *Cmv-1* resistance gene, which is linked to the natural killer cell gene complex, is mediated by natural killer cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 149: 581–589.
- SCHILLING, E.-M., M. SCHERER & T. STAMMINGER (2021): Intrinsic Immune Mechanisms Restricting Human Cytomegalovirus Replication. *Viruses* 13.
- SCHLEISS, M. R. & T. C. HEINEMAN (2005): Progress toward an elusive goal: current status of cytomegalovirus vaccines. *Expert review of vaccines* 4: 381–406.
- SCHMALER, M., M. A. S. BROGGI, N. LAGARDE, B. F. STÖCKLIN, C. G. KING, D. FINKE & S. W. ROSSI (2015): IL-7R signaling in regulatory T cells maintains peripheral and allograft tolerance in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: 13330–13335.
- SCHMIDT, A., N. OBERLE & P. H. KRAMMER (2012): Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Frontiers in immunology* 3: 51.
- SCHMITZ, I., C. SCHNEIDER, A. FRÖHLICH, H. FREBEL, D. CHRIST, W. J. LEONARD, T. SPARWASSER, A. OXENIUS, S. FREIGANG & M. KOPF (2013): IL-21 restricts virus-driven Treg cell expansion in chronic LCMV infection. *PLoS pathogens* 9: e1003362.
- SCHNEIDER, K., A. LOEWENDORF, C. de TREZ, J. FULTON, A. RHODE, H. SHUMWAY, S. HA, G. PATTERSON, K. PFEFFER, S. A. NEDOSPASOV, C. F. WARE & C. A. BENEDICT (2008): Lymphotoxin-mediated crosstalk between B cells and splenic stroma promotes the initial type I interferon response to cytomegalovirus. *Cell host & microbe* 3: 67–76.
- SCHNEWEIS, K. E. (1962): Serologische Untersuchung zur Typendifferenzierung des Herpesvirus hominis. *Z. S.* 24–48.
- SCHORLE, H., T. HOLTSCHEKE, T. HÜNIG, A. SCHIMPL & I. HORAK (1991): Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* 352: 621–624.
- SCHWELE, S., A. M. FISCHER, G. BRESTRICH, M. W. WŁODARSKI, L. WAGNER, M. SCHMUECK, A. ROEMHILD, S. THOMAS, M. H. HAMMER, N. BABEL, A. KURTZ, J. P. MACIEJEWSKI, P. REINKE & H.-D. VOLK (2012): Cytomegalovirus-specific regulatory and effector T cells share TCR clonality--possible relation to repetitive CMV infections. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 12: 669–681.
- SEDDIKI, N., B. SANTNER-NANAN, J. MARTINSON, J. ZAUNDERS, S. SASSON, A. LANDAY, M. SOLOMON, W. SELBY, S. I. ALEXANDER, R. NANAN, A. KELLEHER & B. FAZEKAS DE ST GROTH (2006): Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *Journal of Experimental Medicine* 203: 1693–1700.
- SERRE, K., C. BÉNÉZECH, G. DESANTI, S. BOBAT, K.-M. TOELLNER, R. BIRD, S. CHAN, P. KASTNER, A. F. CUNNINGHAM, I. C. M. MACLENNAN & E. MOHR (2011): Helios is associated with CD4 T cells differentiating to T helper 2 and follicular helper T cells in vivo independently of Foxp3 expression. *PloS one* 6: e20731.
- SHAMELI, A., J. YAMANOUCHI, S. TSAI, Y. YANG, X. CLEMENTE-CASARES, A. MOORE, P. SERRA & P. SANTAMARIA (2013): IL-2 promotes the function of memory-like autoregulatory CD8+ T

- cells but suppresses their development via FoxP3<sup>+</sup> Treg cells. *Eur. J. Immunol.* 43: 394–403.
- SHAPIRO, H. M. (2003): *Practical flow cytometry*. 4. Aufl. Wiley-LISS, New York.
- SHEVACH, E. M. (2009): Mechanisms of foxp3<sup>+</sup> T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30: 636–645.
- SHEVACH, E. M. & A. M. THORNTON (2014): tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunological reviews* 259: 88–102.
- SHEVYREV, D. & V. TERESHCHENKO (2019): Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis. *Frontiers in immunology* 10: 3100.
- SHI, F., M. SHI, Z. ZENG, R.-Z. QI, Z.-W. LIU, J.-Y. ZHANG, Y.-P. YANG, P. TIEN & F.-S. WANG (2011): PD-1 and PD-L1 upregulation promotes CD8(+) T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients. *International journal of cancer* 128: 887–896.
- SHI, Z., M. RIFA'I, Y. H. LEE, H. SHIKU, K.-I. ISOBE & H. SUZUKI (2008): Importance of CD80/CD86-CD28 interactions in the recognition of target cells by CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> regulatory T cells. *Immunology* 124: 121–128.
- SHIMA, T., Y. SASAKI, M. ITOH, A. NAKASHIMA, N. ISHII, K. SUGAMURA & S. SAITO (2010): Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance of early pregnancy but not late pregnancy in allogeneic mice. *Journal of reproductive immunology* 85: 121–129.
- SHIMIZU, J., S. YAMAZAKI & S. SAKAGUCHI (1999): Induction of tumor immunity by removing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 163: 5211–5218.
- SHRIKANT, P., A. KHORUTS & M. F. MESCHER (1999): CTLA-4 Blockade Reverses CD8<sup>+</sup> T Cell Tolerance to Tumor by a CD4<sup>+</sup> T Cell- and IL-2-Dependent Mechanism. *Immunity* 11: 483–493.
- SIMON, C. O., R. HOLTAPPELS, H.-M. TERVO, V. BÖHM, T. DÄUBNER, S. A. OEHRLEIN-KARPI, B. KÜHNAPFEL, A. RENZAHO, D. STRAND, J. PODLECH, M. J. REDDEHASE & N. K. A. GRZIMEK (2006): CD8 T cells control cytomegalovirus latency by epitope-specific sensing of transcriptional reactivation. *Journal of virology* 80: 10436–10456.
- SINGH, N., J. S. DUMMER, S. KUSNE, M. K. BREINIG, J. A. ARMSTRONG, L. MAKOWKA, T. E. STARZL & M. HO (1988): Infections with cytomegalovirus and other herpesviruses in 121 liver transplant recipients: transmission by donated organ and the effect of OKT3 antibodies. *The Journal of infectious diseases* 158: 124–131.
- SISON, R. F., G. N. HOLLAND, L. J. MACARTHUR, N. C. WHEELER & M. S. GOTTLIEB (1991): Cytomegalovirus Retinopathy as the Initial Manifestation of the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *American Journal of Ophthalmology* 112: 243–249.
- SLATKO, B. E., A. F. GARDNER & F. M. AUSUBEL (2018): Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current protocols in molecular biology* 122: e59.
- SMITH, M. G. (1956): Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 92: 424–430.
- SMYTH, M. J., K. TAKEDA, Y. HAYAKAWA, J. J. PESCHON, M. R. VAN DEN BRINK & H. YAGITA (2003): Nature's TRAIL—On a Path to Cancer Immunotherapy. *Immunity* 18: 1–6.

- SÖDERBERG, C., T. D. GIUGNI, J. A. ZAIA, S. LARSSON, J. M. WAHLBERG & E. MÖLLER (1993): CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection. *Journal of virology* 67: 6576–6585.
- STEFFENS, H. P., S. KURZ, R. HOLTAPPELS & M. J. REDDEHASE (1998): Preemptive CD8 T-cell immunotherapy of acute cytomegalovirus infection prevents lethal disease, limits the burden of latent viral genomes, and reduces the risk of virus recurrence. *Journal of virology* 72: 1797–1804.
- STOCKIS, J., W. FINK, V. FRANÇOIS, T. CONNEROTTE, C. de SMET, L. KNOOPS, P. VAN DER BRUGGEN, T. BOON, P. G. COULIE & S. LUCAS (2009): Comparison of stable human Treg and Th clones by transcriptional profiling. *Eur. J. Immunol.* 39: 869–882.
- SUBUDHI, S. K., P. ZHOU, L. M. YERIAN, R. K. CHIN, J. C. LO, R. A. ANDERS, Y. SUN, L. CHEN, Y. WANG, M.-L. ALEGRE & Y.-X. FU (2004): Local expression of B7-H1 promotes organ-specific autoimmunity and transplant rejection. *The Journal of clinical investigation* 113: 694–700.
- SUDA, T., T. OKAZAKI, Y. NAITO, T. YOKOTA, N. ARAI, S. OZAKI, K. NAKAO & S. NAGATA (1995): Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 154: 3806–3813.
- SULA KARRECI, E., S. K. ESKANDARI, F. DOTIWALA, S. K. ROURAY, A. T. KURDI, J. P. ASSAKER, P. LUCKYANCHYKOV, A. B. MIHALI, O. MAAROUF, T. J. BORGES, A. ALKHUDHAYRI, K. R. PATEL, A. RADWAN, I. GHOBRIAL, M. MCGRATH, A. CHANDRAKER, L. V. RIELLA, W. ELYAMAN, R. ABDI, J. LIEBERMAN & J. AZZI (2017): Human regulatory T cells undergo self-inflicted damage via granzyme pathways upon activation. *JCI insight* 2.
- SULLIVAN, K. E., J. CUTILLI, L. M. PILIERO, D. GHAVIMI-ALAGHA, S. E. STARR, D. E. CAMPBELL & S. D. DOUGLAS (2000): Measurement of cytokine secretion, intracellular protein expression, and mRNA in resting and stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Clin Diagn Lab Immunol* 7: 920–924.
- SUN, D., Y. QIN, J. CHLUBA, J. T. EPPLIN & H. WEKERLE (1988): Suppression of experimentally induced autoimmune encephalomyelitis by cytolytic T-T cell interactions. *Nature* 332: 843–845.
- SUNGUR, C. M., Y. J. TANG-FELDMAN, E. AMES, M. ALVAREZ, M. CHEN, D. L. LONGO, C. POMEROY & W. J. MURPHY (2013): Murine natural killer cell licensing and regulation by T regulatory cells in viral responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 7401–7406.
- SUVAS, S., A. K. AZKUR, B. S. KIM, U. KUMARAGURU & B. T. ROUSE (2004): CD4+CD25+ regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 172: 4123–4132.
- SUVAS, S., U. KUMARAGURU, C. D. PACK, S. LEE & B. T. ROUSE (2003): CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *Journal of Experimental Medicine* 198: 889–901.
- SYED KHAJA, A. S., S. M. TOOR, H. EL SALHAT, I. FAOUR, N. UL HAQ, B. R. ALI & E. ELKORD (2017): Preferential accumulation of regulatory T cells with highly immunosuppressive characteristics in breast tumor microenvironment. *Oncotarget* 8: 33159–33171.
- SYLWESTER, A. W., B. L. MITCHELL, J. B. EDGAR, C. TAORMINA, C. PELTE, F. RUCHTI, P. R. SLEATH, K. H. GRABSTEIN, N. A. HOSKEN, F. KERN, J. A. NELSON & L. J. PICKER (2005): Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *Journal of Experimental Medicine* 202: 673–685.

- TAAMS, L. S., J. SMITH, M. H. RUSTIN, M. SALMON, L. W. POULTER & A. N. AKBAR (2001): Human anergic/suppressive CD4+CD25+ T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur. J. Immunol.* 31: 1122–1131.
- TAKAHASHI, T., Y. KUNIYASU, M. TODA, N. SAKAGUCHI, M. ITOH, M. IWATA, J. SHIMIZU & S. SAKAGUCHI (1998): Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *International Immunology* 10: 1969–1980.
- TAKAHASHI, T., T. TAGAMI, S. YAMAZAKI, T. UEDE, J. SHIMIZU, N. SAKAGUCHI, T. W. MAK & S. SAKAGUCHI (2000): Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *Journal of Experimental Medicine* 192: 303–310.
- TAN, C. L., J. R. KUCHROO, P. T. SAGE, D. LIANG, L. M. FRANCISCO, J. BUCK, Y. R. THAKER, Q. ZHANG, S. L. MCARDEL, V. R. JUNEJA, S. J. LEE, S. B. LOVITCH, C. LIAN, G. F. MURPHY, B. R. BLAZAR, D. A. A. VIGNALI, G. J. FREEMAN & A. H. SHARPE (2021): PD-1 restraint of regulatory T cell suppressive activity is critical for immune tolerance. *Journal of Experimental Medicine* 218.
- TANG, D., R. KANG, T. V. BERGHE, P. VANDENABEELE & G. KROEMER (2019): The molecular machinery of regulated cell death. *Cell research* 29: 347–364.
- TANG, Q., E. A. MURPHY & G. G. MAUL (2006): Experimental confirmation of global murine cytomegalovirus open reading frames by transcriptional detection and partial characterization of newly described gene products. *Journal of virology* 80: 6873–6882.
- TANG, T., X. CHENG, B. TRUONG, L. SUN, X. YANG & H. WANG (2021): Molecular basis and therapeutic implications of CD40/CD40L immune checkpoint. *Pharmacology & therapeutics* 219: 107709.
- TAY, C. H. & R. M. WELSH (1997): Distinct organ-dependent mechanisms for the control of murine cytomegalovirus infection by natural killer cells. *Journal of virology* 71: 267–275.
- TELES, A., C. THUERE, P. O. WAFULA, T. EL-MOUSLEH, M. L. ZENCLUSSEN & A. C. ZENCLUSSEN (2013): Origin of Foxp3(+) cells during pregnancy. *American journal of clinical and experimental immunology* 2: 222–233.
- THORNTON, A. M., C. A. PICCIRILLO & E. M. SHEVACH (2004): Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *Eur. J. Immunol.* 34: 366–376.
- THORNTON, A. M. & E. M. SHEVACH (1998): CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *Journal of Experimental Medicine* 188: 287–296.
- TOMTISHEN, J. P. (2012): Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virology* 9: 22.
- TOOZE, J., M. HOLLINSHEAD, B. REIS, K. RADSACK & H. KERN (1993): Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *European journal of cell biology* 60: 163–178.
- TOVAR-SALAZAR, A. & A. WEINBERG (2020): Understanding the mechanism of action of cytomegalovirus-induced regulatory T cells. *Virology* 547: 1–6.
- TSUTSUI, Y., I. KOSUGI & H. KAWASAKI (2005): Neuropathogenesis in cytomegalovirus infection: indication of the mechanisms using mouse models. *Reviews in medical virology* 15: 327–345.

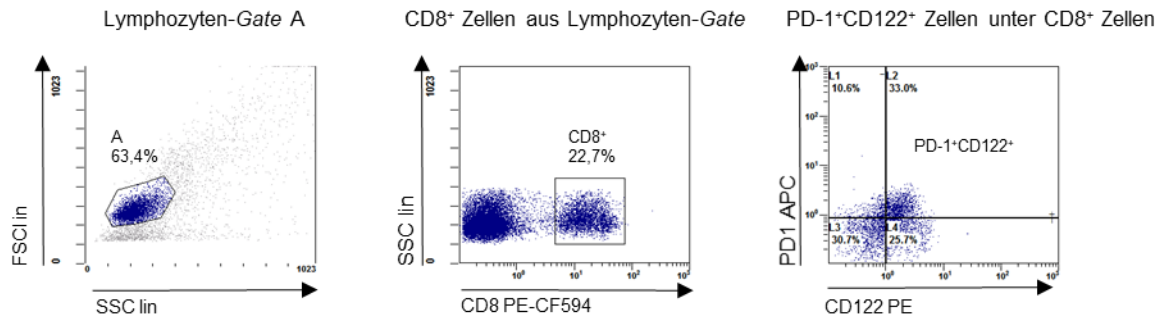
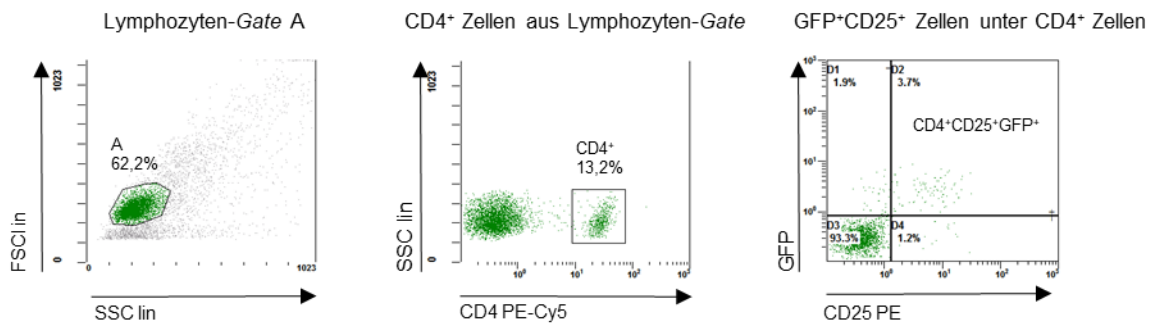
- TUNG, K. S. K., J. HAKAL, H. QIAO, C. RIVAL, J. C. H. LI, A. G. A. PAUL, K. WHEELER, P. PRAMOONJAGO, C. M. GRAFER, W. SUN, R. D. SAMPSON, E. W. P. WONG, P. P. REDDI, U. S. DESHMUKH, D. M. HARDY, H. TANG, C. Y. CHENG & E. GOLDBERG (2017): Egress of sperm autoantigen from seminiferous tubules maintains systemic tolerance. *The Journal of clinical investigation* 127: 1046–1060.
- UPTON, J. W., W. J. KAISER & E. S. MOCARSKI (2010): Virus inhibition of RIP3-dependent necrosis. *Cell host & microbe* 7: 302–313.
- VAN DE BERG, P. J., K. M. HEUTINCK, R. RAABE, R. C. MINNEE, S. LA YOUNG, K. A. VAN DONSELAAR-VAN DER PANT, F. J. BEMELMAN, R. A. VAN LIER & I. J. ten BERGE (2010): Human cytomegalovirus induces systemic immune activation characterized by a type 1 cytokine signature. *The Journal of infectious diseases* 202: 690–699.
- VAN DE BERG, P. J. E. J., A. VAN STIJN, I. J. M. ten BERGE & R. A. W. VAN LIER (2008): A fingerprint left by cytomegalovirus infection in the human T cell compartment. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 41: 213–217.
- VAN DEN BERG, S. P. H., I. N. PARDIECK, J. LANFERMEIJER, D. SAUCE, P. KLENERMAN, D. VAN BAARLE & R. ARENS (2019): The hallmarks of CMV-specific CD8 T-cell differentiation. *Medical microbiology and immunology* 208: 365–373.
- VAN DEN BROECK, W., A. DERORE & P. SIMOENS (2006): Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: Descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrl mice. *Journal of immunological methods* 312: 12–19.
- VAN DOMMELEN, S. L. H., H. A. TABARIAS, M. J. SMYTH & M. A. DEGLI-ESPOSTI (2003): Activation of natural killer (NK) T cells during murine cytomegalovirus infection enhances the antiviral response mediated by NK cells. *Journal of virology* 77: 1877–1884.
- VARNUM, S. M., D. N. STREBLOW, M. E. MONROE, P. SMITH, K. J. AUBERRY, L. PASA-TOLIC, D. WANG, D. G. CAMP, K. RODLAND, S. WILEY, W. BRITT, T. SHENK, R. D. SMITH & J. A. NELSON (2004): Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *Journal of virology* 78: 10960–10966.
- VELU, V., K. TITANJI, B. ZHU, S. HUSAIN, A. PLADEVEGA, L. LAI, T. H. VANDERFORD, L. CHENNAREDDI, G. SILVESTRI, G. J. FREEMAN, R. AHMED & R. R. AMARA (2009): Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature* 458: 206–210.
- VIEYRA-LOBATO, M. R., J. VELA-OJEDA, L. MONTIEL-CERVANTES, R. LÓPEZ-SANTIAGO & M. C. MORENO-LAFONT (2018): Description of CD8+ Regulatory T Lymphocytes and Their Specific Intervention in Graft-versus-Host and Infectious Diseases, Autoimmunity, and Cancer. *Journal of immunology research* 2018: 3758713.
- VIGNALI, D. A. A., L. W. COLLISON & C. J. WORKMAN (2008): How regulatory T cells work. *Nature reviews. Immunology* 8: 523–532.
- VOLPE, E., M. SAMBUCCI, L. BATTISTINI & G. BORSELLINO (2016): Fas-Fas Ligand: Checkpoint of T Cell Functions in Multiple Sclerosis. *Frontiers in immunology* 7: 382.
- VOSKOBOINIK, I., M. A. DUNSTONE, K. BARAN, J. C. WHISSTOCK & J. A. TRAPANI (2010): Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunological reviews* 235: 35–54.
- WAGNER, E. K. & D. C. BLOOM (1997): Experimental investigation of herpes simplex virus latency. *Clinical microbiology reviews* 10: 419–443.

- WAISER, J., K. BUDDE, M. SCHREIBER, K. KORN, S. STENGLEIN, J.-T. DRENCKHAHN, T. BÖHLER, I. HAUSER & H.-H. NEUMAYER (1998): Effectiveness of deferred therapy with ganciclovir in renal allograft recipients with cytomegalovirus disease. *Transplantation Proceedings* 30: 2083–2085.
- WALKER, M. R., D. J. KASPROWICZ, V. H. GERSUK, A. BENARD, M. VAN LANDEGHEN, J. H. BUCKNER & S. F. ZIEGLER (2003): Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *The Journal of clinical investigation* 112: 1437–1443.
- WALTER, E. A., P. D. GREENBERG, M. J. GILBERT, R. J. FINCH, K. S. WATANABE, E. D. THOMAS & S. R. RIDDELL (1995): Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *The New England journal of medicine* 333: 1038–1044.
- WALUNAS, T. L., C. Y. BAKKER & J. A. BLUESTONE (1996): CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *Journal of Experimental Medicine* 183: 2541–2550.
- WAN, Y. Y. & R. A. FLAVELL (2005): Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 5126–5131.
- WANG, K., J. LIU & J. LI (2018): IL-35-producing B cells in gastric cancer patients. *Medicine* 97: e0710.
- WANG, S., X. GAO, G. SHEN, W. WANG, J. LI, J. ZHAO, Y.-Q. WEI & C. K. EDWARDS (2016): Interleukin-10 deficiency impairs regulatory T cell-derived neuropilin-1 functions and promotes Th1 and Th17 immunity. *Scientific reports* 6: 24249.
- WANG, X., M. LANG, T. ZHAO, X. FENG, C. ZHENG, C. HUANG, J. HAO, J. DONG, L. LUO, X. LI, C. LAN, W. YU, M. YU, S. YANG & H. REN (2017): Cancer-FOXP3 directly activated CCL5 to recruit FOXP3+Treg cells in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 36: 3048–3058.
- WANG, X.-N., M. A. HANIFFA, U. HOLTICK, M. P. COLLIN, G. JACKSON, C. M. U. HILKENS, E. HOLLER, M. EDINGER, P. HOFFMANN & A. M. DICKINSON (2009): Regulatory T-cell suppression of CD8+ T-cell-mediated graft-versus-host reaction requires their presence during priming. *Transplantation* 88: 188–197.
- WEBER, R. L. & V. J. IACONO (1997): The cytokines: a review of interleukins. *Periodontal clinical investigations : official publication of the Northeastern Society of Periodontists* 19: 17–22.
- WEGIEL, B., A. BJARTELL, Z. CULIG & J. L. PERSSON (2008): Interleukin-6 activates PI3K/Akt pathway and regulates cyclin A1 to promote prostate cancer cell survival. *International journal of cancer* 122: 1521–1529.
- WELLER, T. H., J. B. HANSHAW & D. E. SCOTT (1960): Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology* 12: 130–132.
- WELSH, R. M., J. O. BRUBAKER, M. VARGAS-CORTES & C. L. O'DONNELL (1991): Natural killer (NK) cell response to virus infections in mice with severe combined immunodeficiency. The stimulation of NK cells and the NK cell-dependent control of virus infections occur independently of T and B cell function. *Journal of Experimental Medicine* 173: 1053–1063.
- WESCHE, L.: *Multivariate Statistik in der Ökologie: Hauptkomponentenanalyse (PCA)*. Springer Berlin Heidelberg.
- WEST, J. A., S. M. GREGORY & B. DAMANIA (2012): Toll-like receptor sensing of human herpesvirus infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2: 122.

- WHITLEY, R. J. (1996): *Medical Microbiology: Herpesviruses*. 4. Aufl., Galveston (TX).
- WILDIN, R. S., F. RAMSDELL, J. PEAKE, F. FARAVELLI, J. L. CASANOVA, N. BUIST, E. LEVY-LAHAD, M. MAZZELLA, O. GOULET, L. PERRONI, F. D. BRICARELLI, G. BYRNE, M. MCEUEN, S. PROLL, M. APPLEBY & M. E. BRUNKOW (2001): X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nature genetics* 27: 18–20.
- WING, K., Y. ONISHI, P. PRIETO-MARTIN, T. YAMAGUCHI, M. MIYARA, Z. FEHERVARI, T. NOMURA & S. SAKAGUCHI (2008): CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science (New York, N.Y.)* 322: 271–275.
- WOLF, D., K. HOCHEGGER, A. M. WOLF, H. F. RUMPOLD, G. GASTL, H. TILG, G. MAYER, E. GUNSILIUS & A. R. ROSENKRANZ (2005): CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in mice. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 16: 1360–1370.
- WRIGHT, J. F., A. KUROSKY & S. WASI (1994): An endothelial cell-surface form of annexin II binds human cytomegalovirus. *Biochemical and biophysical research communications* 198: 983–989.
- WYKES, M. N. & S. R. LEWIN (2018): Immune checkpoint blockade in infectious diseases. *Nature reviews. Immunology* 18: 91–104.
- WYNN, K. K. & R. KHANNA (2006): Models of CMV infection. *Drug Discovery Today: Disease Models* 3: 91–96.
- YAMAZAKI, S., T. IYODA, K. TARBELL, K. OLSON, K. VELINZON, K. INABA & R. M. STEINMAN (2003): Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 198: 235–247.
- YU, P., R. N. BAMFORD & T. A. WALDMANN (2014): IL-15-dependent CD8+ CD122+ T cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by modulating IL-17 production by CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 44: 3330–3341.
- YU, P., J. C. STEEL, M. ZHANG, J. C. MORRIS, R. WAITZ, M. FASSO, J. P. ALLISON & T. A. WALDMANN (2012): Simultaneous inhibition of two regulatory T-cell subsets enhanced Interleukin-15 efficacy in a prostate tumor model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 6187–6192.
- YU, T., J. L. ROBOTHAM & Y. YOON (2006): Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 2653–2658.
- YU, X., Y. ZHENG, R. MAO, Z. SU & J. ZHANG (2019): BTLA/HVEM Signaling: Milestones in Research and Role in Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Frontiers in immunology* 10: 617.
- YU, Y., X. MA, R. GONG, J. ZHU, L. WEI & J. YAO (2018): Recent advances in CD8+ regulatory T cell research. *Oncology letters* 15: 8187–8194.
- ZHANG, B., S. CHIKUMA, S. HORI, S. FAGARASAN & T. HONJO (2016): Nonoverlapping roles of PD-1 and FoxP3 in maintaining immune tolerance in a novel autoimmune pancreatitis mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113: 8490–8495.
- ZHANG, J., R. MEDAER, P. STINISSEN, D. HAFLER & J. RAUS (1993): MHC-restricted depletion of human myelin basic protein-reactive T cells by T cell vaccination. *Science (New York, N.Y.)* 261: 1451–1454.

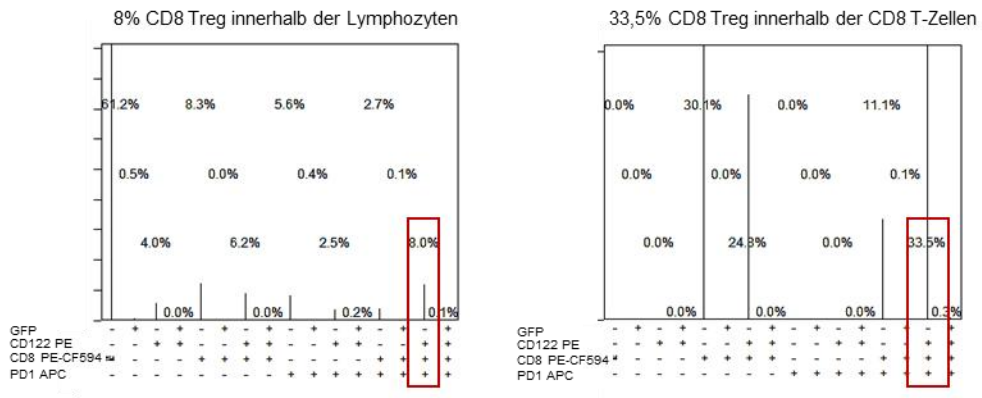
- ZHANG, L., A. M. BERTUCCI, R. RAMSEY-GOLDMAN, R. K. BURT & S. K. DATTA (2009): Regulatory T cell (Treg) subsets return in patients with refractory lupus following stem cell transplantation, and TGF-beta-producing CD8+ Treg cells are associated with immunological remission of lupus. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 183: 6346–6358.
- ZHANG, L., A. M. BERTUCCI, R. RAMSEY-GOLDMAN, E. R. HARSHA-STRONG, R. K. BURT & S. K. DATTA (2013): Major pathogenic steps in human lupus can be effectively suppressed by nucleosomal histone peptide epitope-induced regulatory immunity. *Clinical immunology* (Orlando, Fla.) 149: 365–378.
- ZHANG, X., S. SUN, I. HWANG, D. F. TOUGH & J. SPRENT (1998): Potent and Selective Stimulation of Memory-Phenotype CD8+ T Cells In Vivo by IL-15. *Immunity* 8: 591–599.
- ZHAO, D.-M., A. M. THORNTON, R. J. DIPAOLO & E. M. SHEVACH (2006): Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 107: 3925–3932.
- ZHAO, H., X. LIAO & Y. KANG (2017): Tregs: Where We Are and What Comes Next? *Frontiers in immunology* 8: 1578.
- ZHENG, J., P.-L. CHAN, Y. LIU, G. QIN, Z. XIANG, K.-T. LAM, D. B. LEWIS, Y.-L. LAU & W. TU (2013a): ICOS regulates the generation and function of human CD4+ Treg in a CTLA-4 dependent manner. *PLoS one* 8: e82203.
- ZHENG, J., Y. LIU, Y. LIU, M. LIU, Z. XIANG, K.-T. LAM, D. B. LEWIS, Y.-L. LAU & W. TU (2013b): Human CD8+ regulatory T cells inhibit GVHD and preserve general immunity in humanized mice. *Science translational medicine* 5: 168ra9.
- ZHENG, W., Q. XU, Y. ZHANG, X. E. W. GAO, M. ZHANG, W. ZHAI, R. S. RAJKUMAR & Z. LIU (2020): Toll-like receptor-mediated innate immunity against herpesviridae infection: a current perspective on viral infection signaling pathways. *Virology* 17: 192.
- ZHENG, Y. & A. Y. RUDENSKY (2007): Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nature immunology* 8: 457–462.
- ZOU, Q., B. WU, J. XUE, X. FAN, C. FENG, S. GENG, M. WANG & B. WANG (2014): CD8+ Treg cells suppress CD8+ T cell-responses by IL-10-dependent mechanism during H5N1 influenza virus infection. *Eur. J. Immunol.* 44: 103–114.

## 7. ANHANG

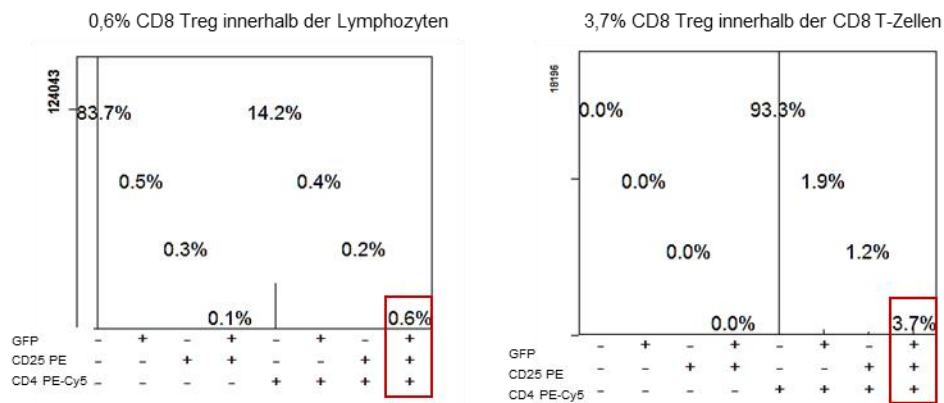
A CD8 Treg (CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>)B CD4 Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>)

**Abb. A1: Gating-Strategie von CD8 und CD4 Treg am Beispiel einer mCMV-infizierten Maus.** Treg wurden aus den Milzen von 5 mCMV-infizierten oder 5 naiven Mäusen durch immunomagnetische negativ-Selektion MagniSort isoliert und anschließend mit Antikörpern markiert (CD8 Treg: CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>; CD4 Treg: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>). Die durchflusszytometrischen Analysen wurden dabei als Einzeltiermessungen analysiert. Die CD8 Treg wurden dabei in blau und die CD4 Treg in grün dargestellt.

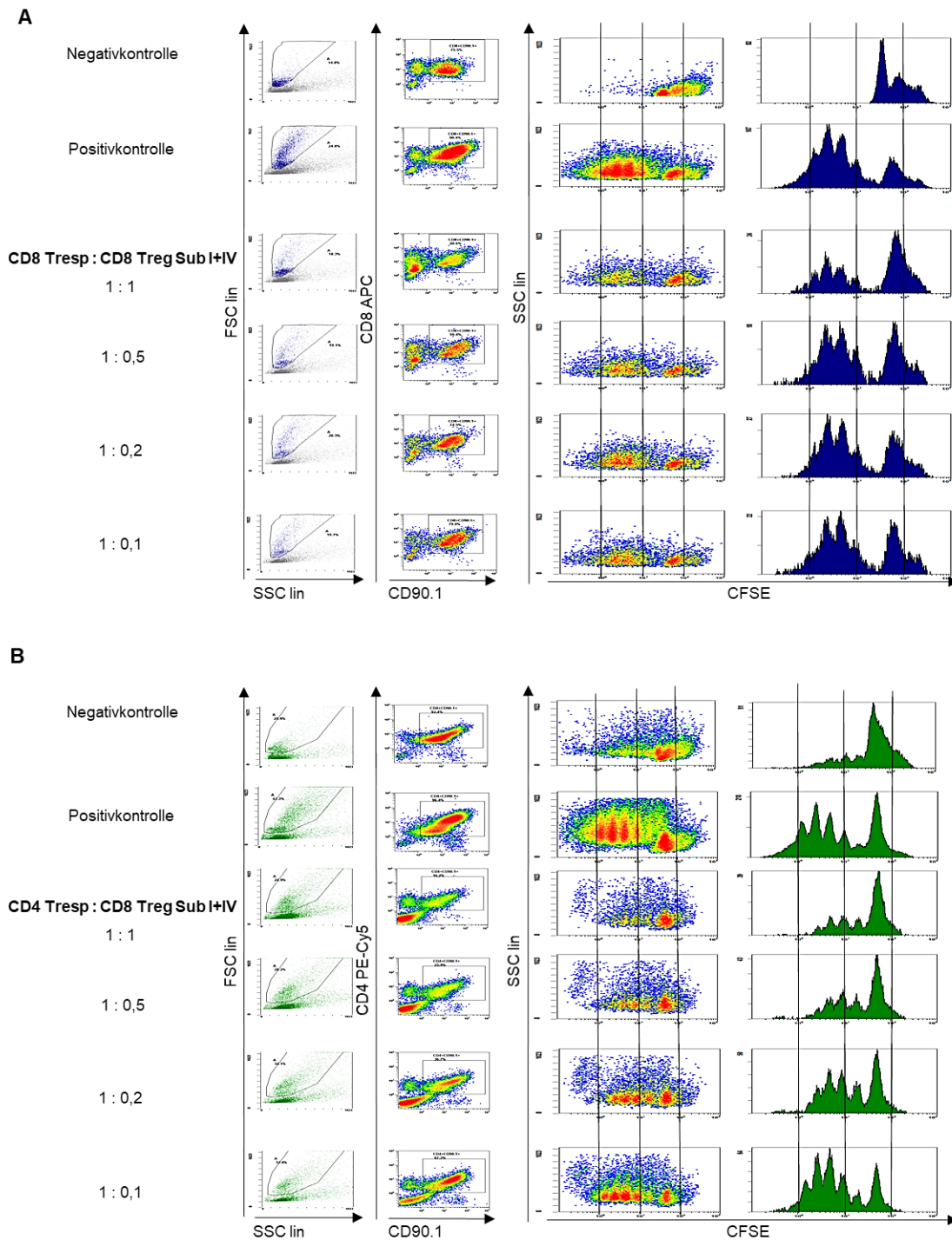
**A** CD8 Treg (CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>)



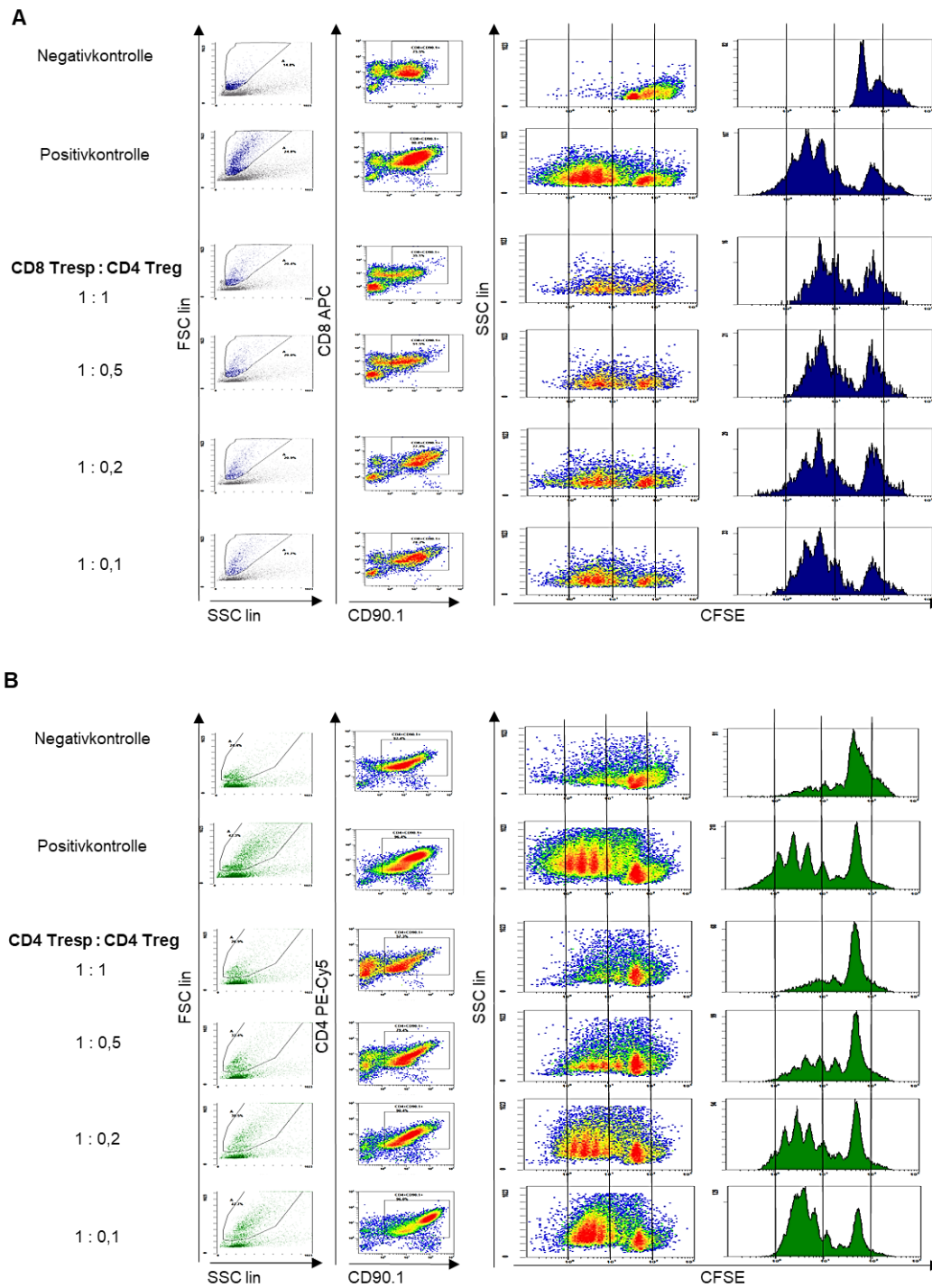
**B** CD4 Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>)



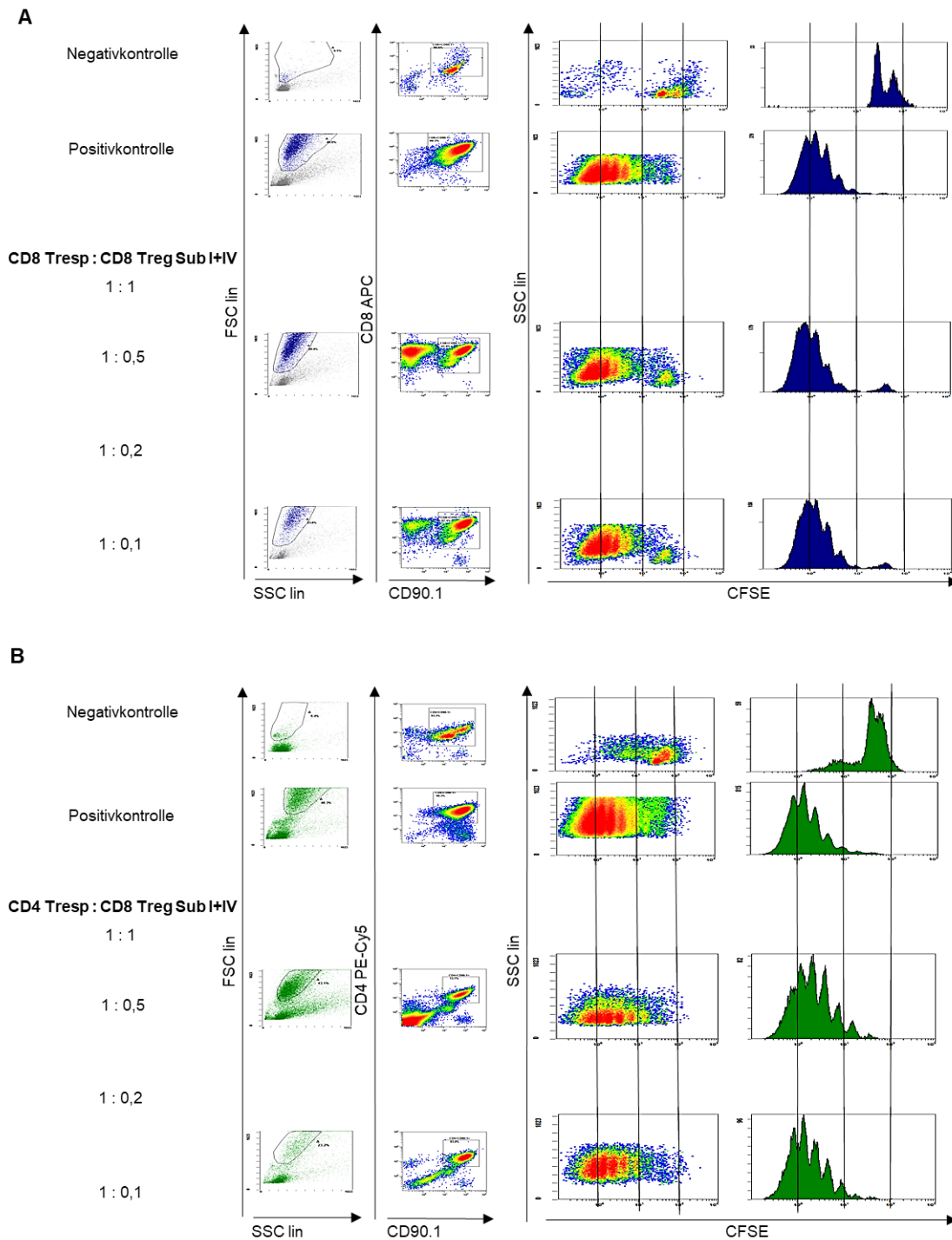
**Abb. A2: Prism-Plot Darstellung von CD8 und CD4 Treg am Beispiel einer mCMV-infizierten Maus.** Der Prism-Plot gibt an, wie hoch der prozentuale Anteil an CD4 oder CD8 Treg innerhalb der CD4 oder CD8 T-Zellen bzw. innerhalb der Lymphozyten ist. Der prozentuale Anteil der Treg ist jeweils in dem roten Kasten dargestellt. Dabei geben die „+“ und „-“ Werte der jeweiligen Marker deren prozentuale Verteilung innerhalb der T-Zellen oder der Lymphozyten an.



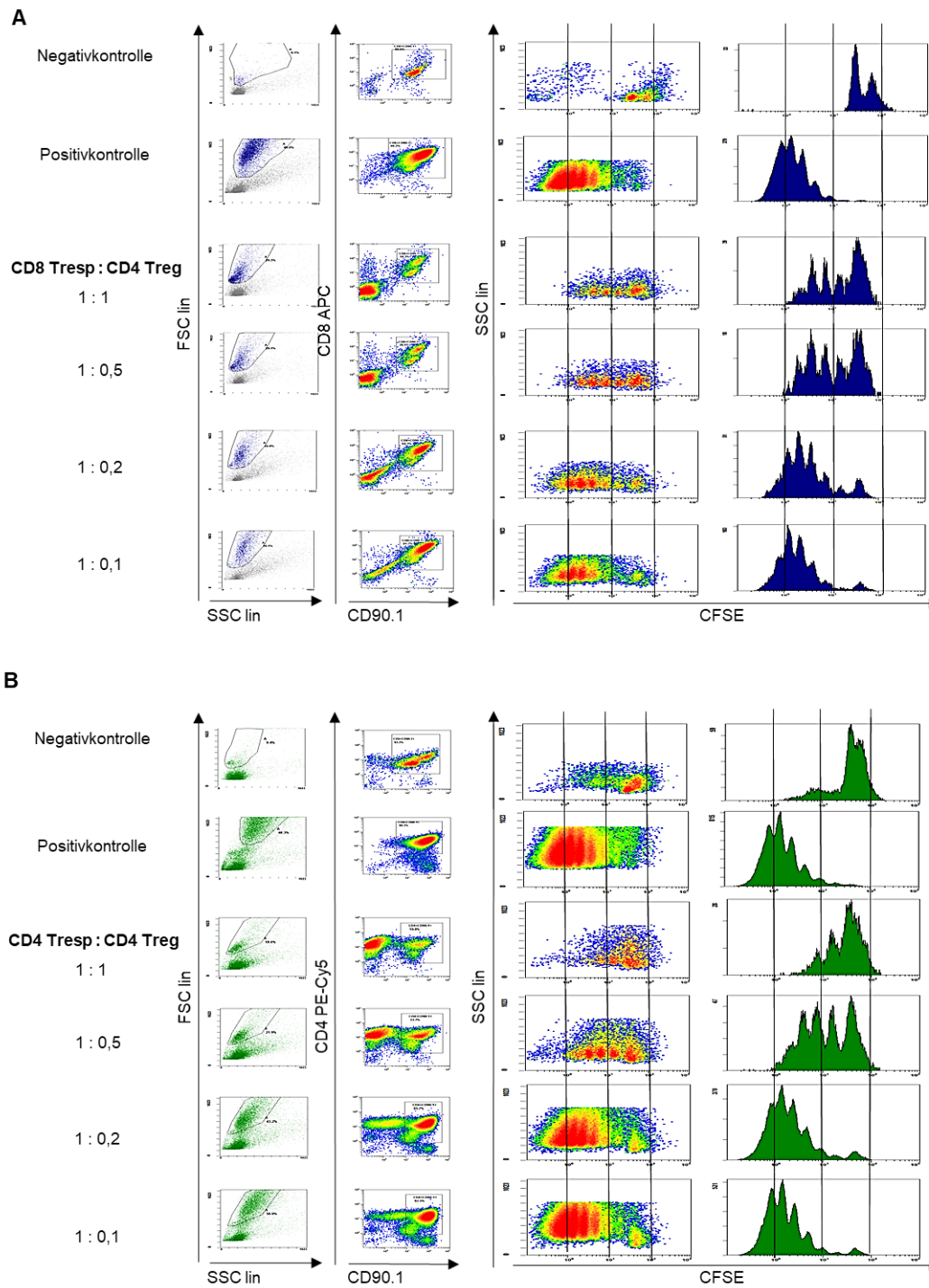
**Abb. A3: Gating-Strategie der CD8 Treg Sub I+IV: Suppression-Assay nach mCMV-Infektion (Experiment 1 Treg Supp SH-5).** Die Proliferation der CD4 Tresp [CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>] sind in grün und die der CD8 Tresp [CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>] in blau dargestellt. CD8 Tresp wurden nach 4-tägiger und CD4 Tresp nach 5-tägiger Kokultur durchflusszytometrisch analysiert. Es wurde jeweils eine Negativ- [Tresp + DC] und Positivkontrolle [Tresp +  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$  + DC] mitgeführt. Die CD8 Treg Sub I+IV wurden zu den Tresp in verschiedenen Konzentrationen hinzu titriert [1:1; 1:0,5; 1:0,2; 1:0,1]. Je eine Messung stellt einen Pool aus Triplikaten dar. In (A) sind die Ergebnisse der CD8 Tresp zu CD8 Treg Sub I+IV und in (B) der CD4 Tresp zu CD8 Treg Sub I+IV dargestellt.



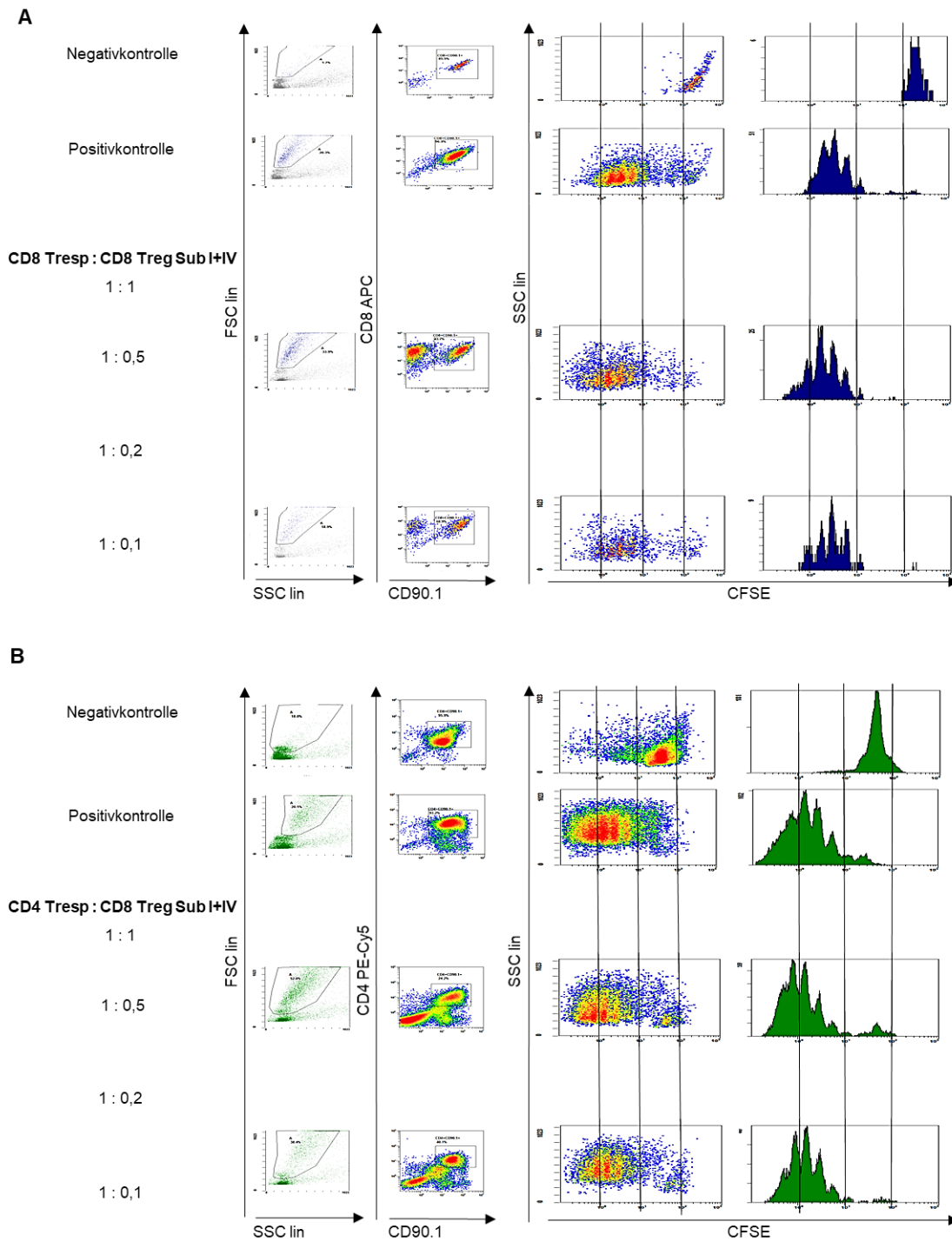
**Abb. A4: Gating-Strategie der CD4 Treg: Suppression-Assay nach mCMV-Infektion (Experiment 1 Treg Supp SH-5).** Die Proliferation der CD4 Tresp [CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>] sind in grün und die der CD8 Tresp [CD8<sup>+</sup>CD122<sup>-</sup>] in blau dargestellt. CD8 Tresp wurden nach 4-tägiger und CD4 Tresp nach 5-tägiger Kokultur durchflusszytometrisch analysiert. Es wurde jeweils eine Negativ- [Tresp + DC] und Positivkontrolle [Tresp + α-CD3ε + DC] mitgeführt. Die CD4 Treg wurden zu den Tresp in verschiedenen Konzentrationen hinzu titriert [1:1; 1:0,5; 1:0,2; 1:0,1]. Je eine Messung stellt einen Pool aus Quadruplikaten dar. In (A) sind die Ergebnisse der CD8 Tresp zu CD4 Treg und in (B) der CD4 Tresp zu CD4 Treg dargestellt



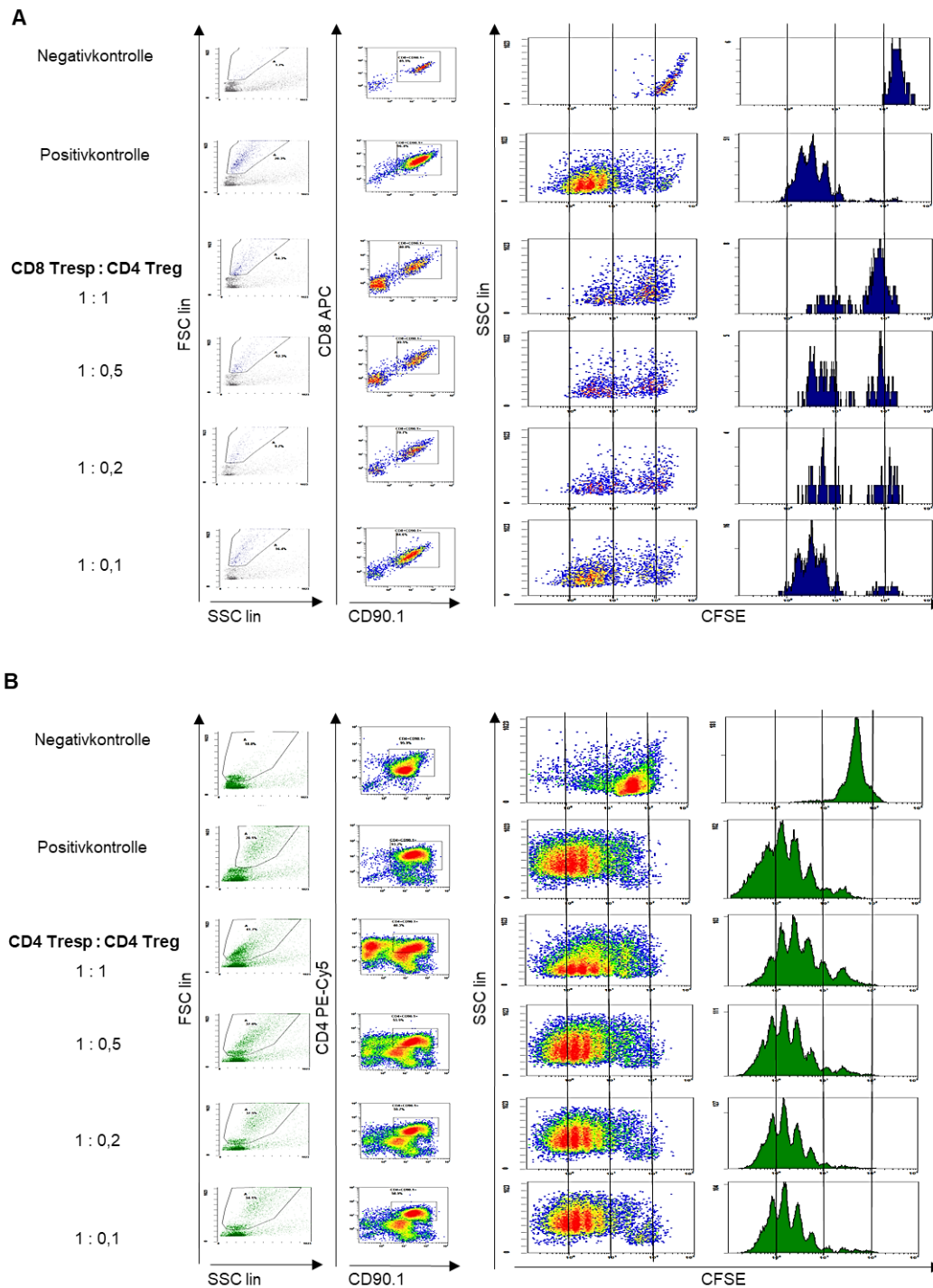
**Abb. A5: Gating-Strategie der CD8 Treg Sub I+IV: Suppression-Assay ohne mCMV-Infektion (Experiment 2 Treg Supp SH-2).** Die Proliferation der CD4 Tresp [CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>] sind in grün und die der CD8 Tresp [CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>] in blau dargestellt. CD8 Tresp wurden nach 4-tägiger und CD4 Tresp nach 5-tägiger Kokultur durchflusszytometrisch analysiert. Es wurde jeweils eine Negativ- [Tresp + DC] und Positivkontrolle [Tresp +  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$  + DC] mitgeführt. Die CD8 Treg Sub I+IV wurden zu den Tresp in verschiedenen Konzentrationen hinzu titriert [1:1; 1:0,5; 1:0,2; 1:0,1]. Je eine Messung stellt einen Pool aus Duplikaten dar. In (A) sind die Ergebnisse der CD8 Tresp zu CD8 Treg Sub I+IV und in (B) der CD4 Tresp zu CD8 Treg Sub I+IV dargestellt.



**Abb. A6: Gating-Strategie der CD4 Treg: Suppression-Assay ohne mCMV-Infektion (Experiment 2; Treg Supp SH-2).** Die Proliferation der CD4 Tresp [CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>] sind in grün und die der CD8 Tresp [CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>] in blau dargestellt. CD8 Tresp wurden nach 4-tägiger und CD4 Tresp nach 5-tägiger Kokultur durchflusszytometrisch analysiert. Es wurde jeweils eine Negativ- [Tresp + DC] und Positivkontrolle [Tresp + α-CD3ε + DC] mitgeführt. Die CD4 Tresp wurden zu den Tresp in verschiedenen Konzentrationen hinzu titriert [1:1; 1:0,5; 1:0,2; 1:0,1]. Je eine Messung stellt einen Pool aus Quadruplikaten dar. In (A) sind die Ergebnisse der CD8 Tresp zu CD4 Treg und in (B) der CD4 Tresp zu CD4 Treg dargestellt.

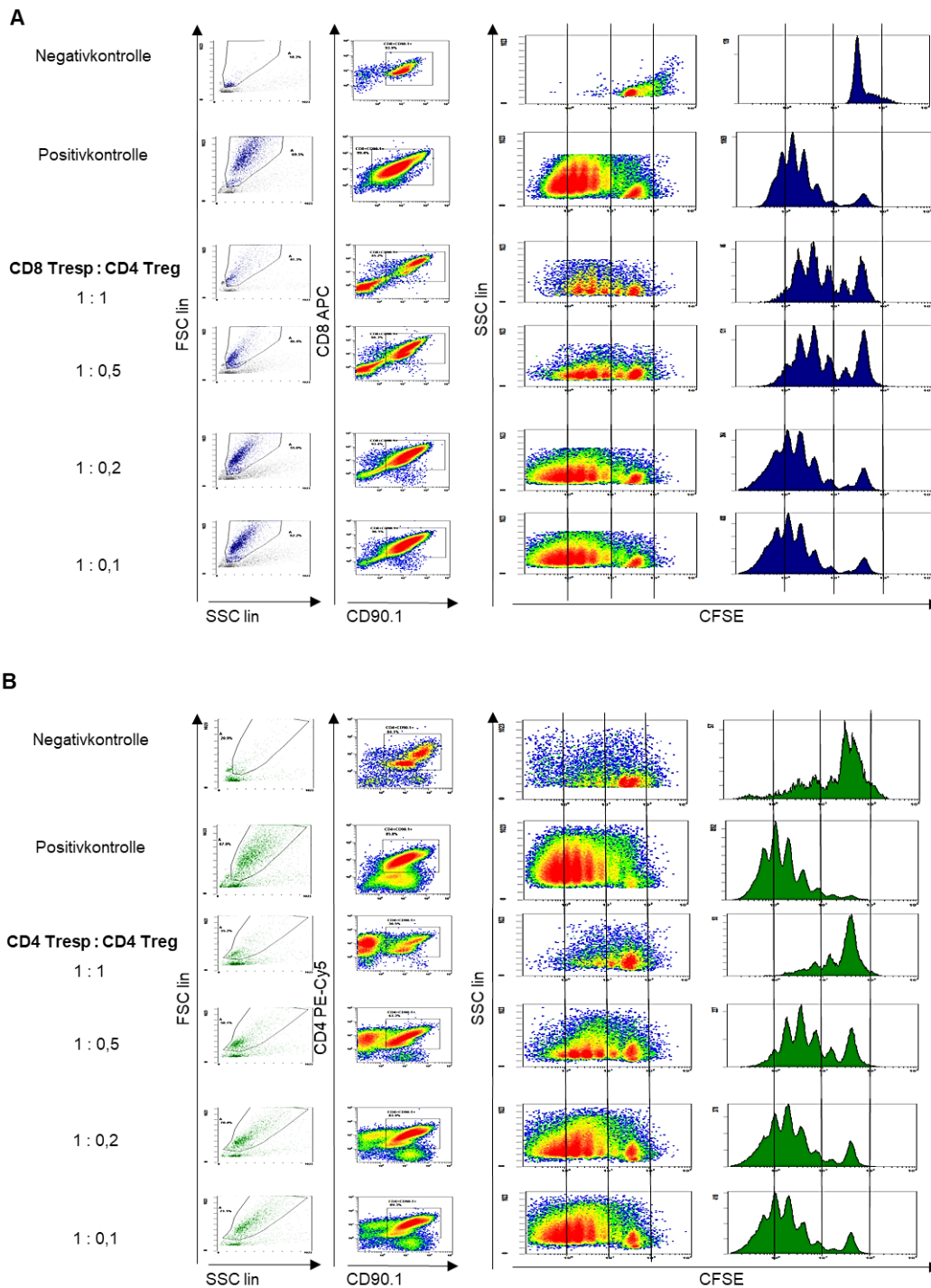


**Abb. A7: Gating-Strategie der CD8 Treg Sub I+IV: Suppression-Assay ohne mCMV-Infektion (Experiment 3 Treg Supp SH-4).** Die Proliferation der CD4 Tresp [CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>] sind in grün und die der CD8 Tresp [CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>] in blau dargestellt. CD8 Tresp wurden nach 4-tägiger und CD4 Tresp nach 5-tägiger Kokultur durchflusszytometrisch analysiert. Es wurde jeweils eine Negativ- [Tresp + DC] und Positivkontrolle [Tresp + α-CD3ε + DC] mitgeführt. Die CD8 Treg Sub I+IV wurden zu den Tresp in verschiedenen Konzentrationen hinzu titriert [1:1; 1:0,5; 1:0,2; 1:0,1]. Je eine Messung stellt einen Pool aus Duplikaten dar. In (A) sind die Ergebnisse der CD8 Tresp zu CD8 Treg Sub I+IV und in (B) der CD4 Tresp zu CD8 Treg Sub I+IV dargestellt

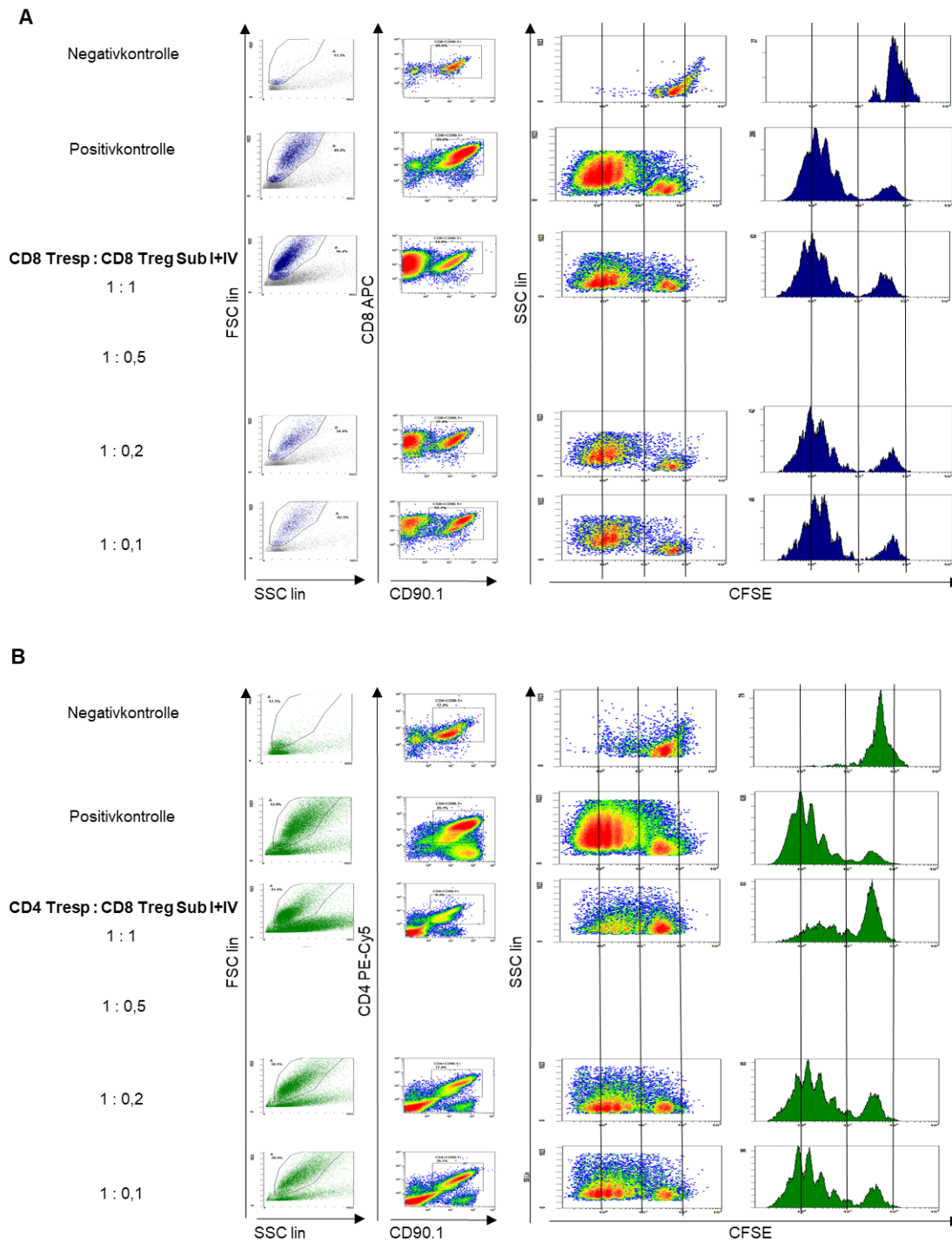


**Abb. A8: Gating-Strategie der CD4 Treg: Suppression-Assay ohne mCMV-Infektion (Experiment 3 Treg Supp SH-4).** Die Proliferation der CD4 Tresp [CD4+CD25] sind in grün und die der CD8 Tresp [CD8+CD122] in blau dargestellt. CD8 Tresp wurden nach 4-tägiger und CD4 Tresp nach 5-tägiger Kokultur durchflusszytometrisch analysiert. Es wurde jeweils eine Negativ- [Tresp + DC] und Positivkontrolle [Tresp +  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$  + DC] mitgeführt. Die CD4 Tresp wurden zu den Tresp in verschiedenen Konzentrationen hinzu titriert [1:1; 1:0,5; 1:0,2; 1:0,1]. Je eine Messung stellt einen Pool aus Quadruplikate dar. In (A) sind die Ergebnisse der CD8 Tresp zu CD4 Treg und in (B) der CD4 Tresp zu CD4 Treg dargestellt.

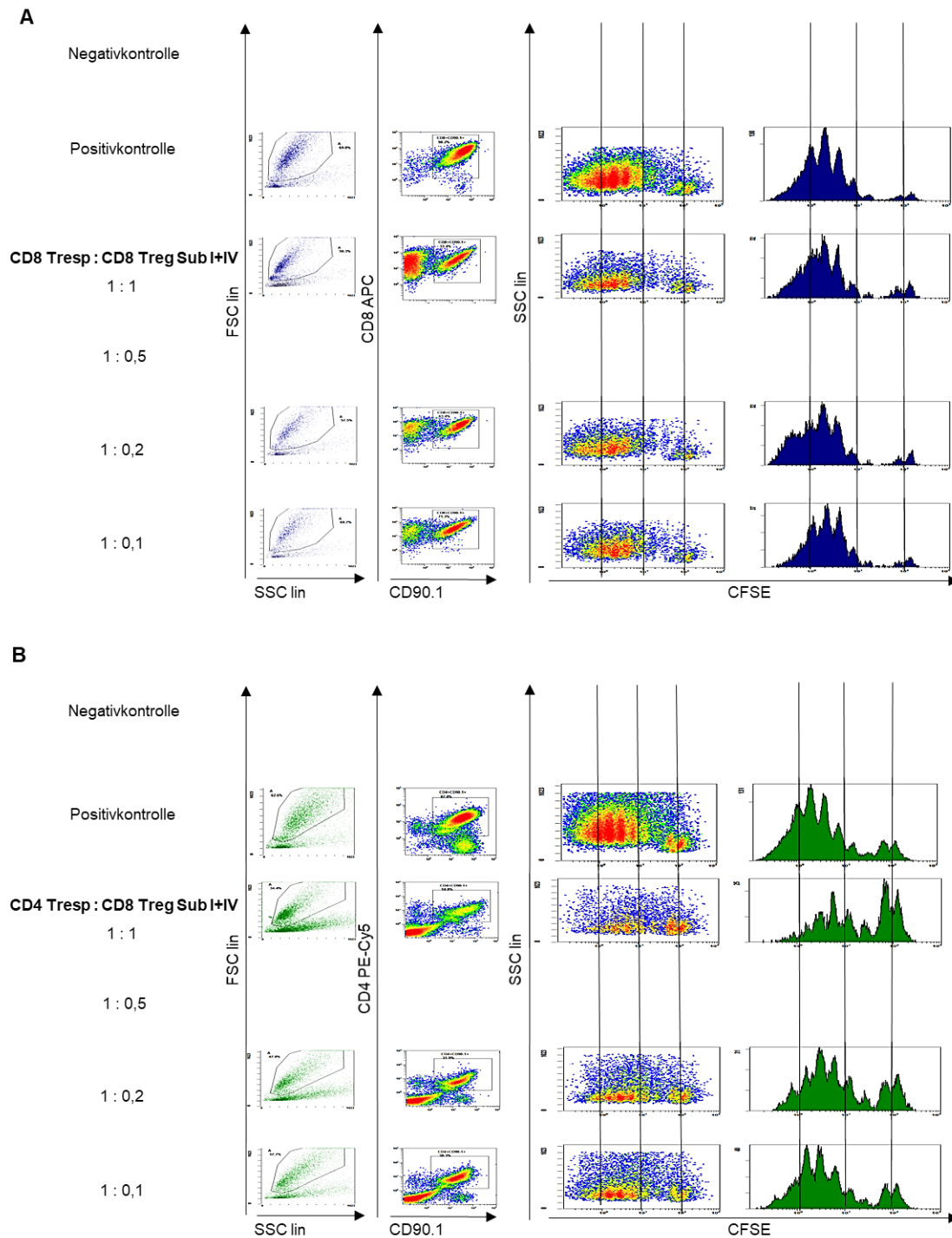




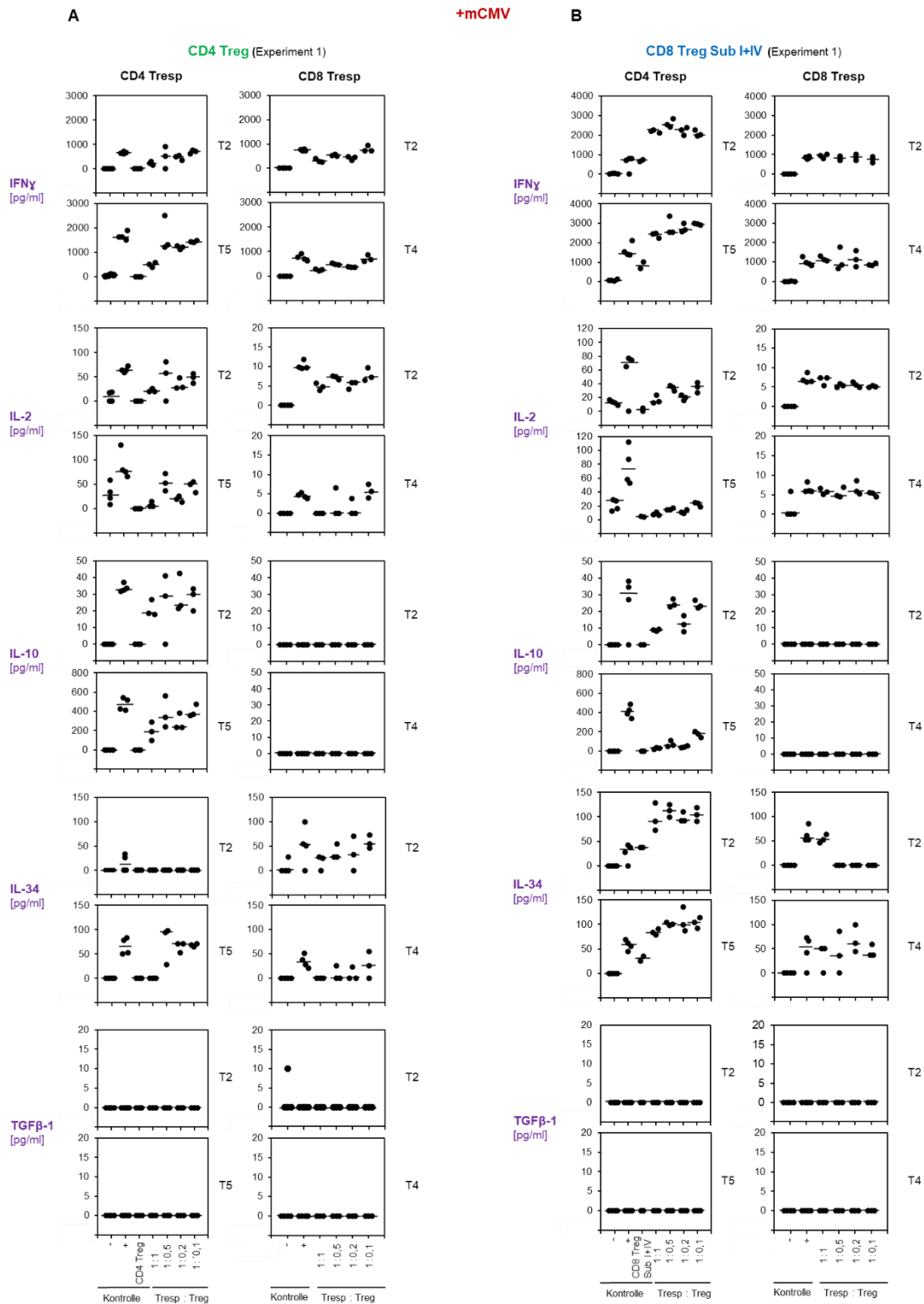
**Abb. A10: Gating-Strategie der CD4 Treg: Suppression-Assay ohne mCMV-Infektion (Experiment 4 Treg Supp SH-6).** Die Proliferation der CD4 Tresp [CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>] sind in grün und die der CD8 Tresp [CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>] in blau dargestellt. CD8 Tresp wurden nach 4-tägiger und CD4 Tresp nach 5-tägiger Kokultur durchflusszytometrisch analysiert. Es wurde jeweils eine Negativ- [Tresp + DC] und Positivkontrolle [Tresp + α-CD3ε + DC] mitgeführt. Die CD4 Treg wurden zu den Tresp in verschiedenen Konzentrationen hinzu titriert [1:1; 1:0,5; 1:0,2; 1:0,1]. Je eine Messung stellt einen Pool aus Quadruplikate dar. In (A) sind die Ergebnisse der CD8 Tresp zu CD4 Treg und in (B) der CD4 Tresp zu CD4 Treg dargestellt.



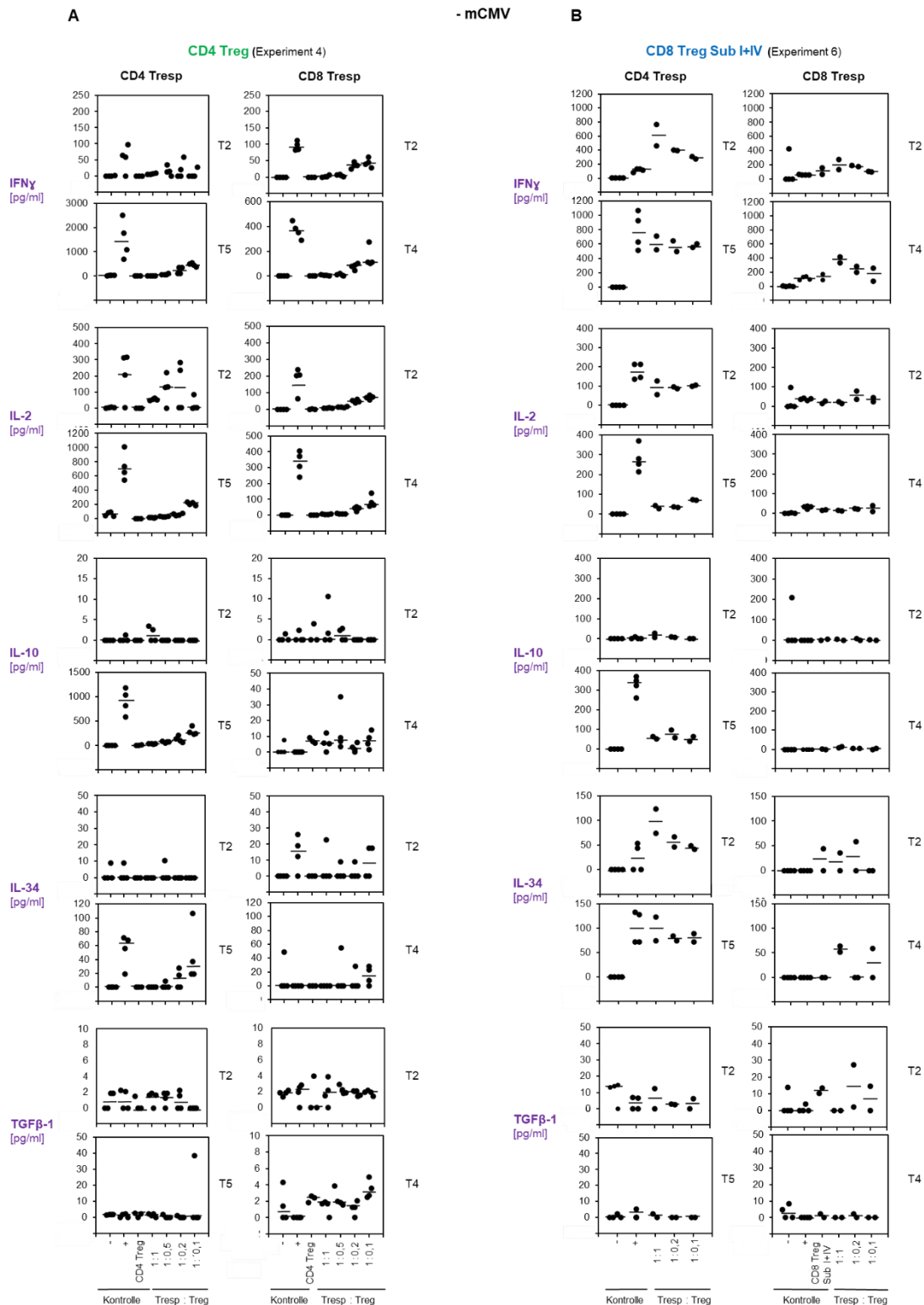
**Abb. A11: Gating-Strategie der CD8 Treg Sub I+IV: Suppression-Assay ohne mCMV-Infektion (Experiment 5 Treg Supp SH-7).** Die Proliferation der CD4 Tresp [CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>] sind in grün und die der CD8 Tresp [CD8<sup>+</sup>CD122<sup>-</sup>] in blau dargestellt. CD8 Tresp wurden nach 4-tägiger und CD4 Tresp nach 5-tägiger Kokultur durchflusszytometrisch analysiert. Es wurde jeweils eine Negativ- [Tresp + DC] und Positivkontrolle [Tresp + α-CD3ε + DC] mitgeführt. Die CD8 Treg Sub I+IV wurden zu den Tresp in verschiedenen Konzentrationen hinzu titriert [1:1; 1:0,5; 1:0,2; 1:0,1]. Je eine Messung stellt einen Pool aus Triplikaten dar. In (A) sind die Ergebnisse der CD8 Tresp zu CD8 Treg Sub I+IV und in (B) der CD4 Tresp zu CD8 Treg Sub I+IV dargestellt



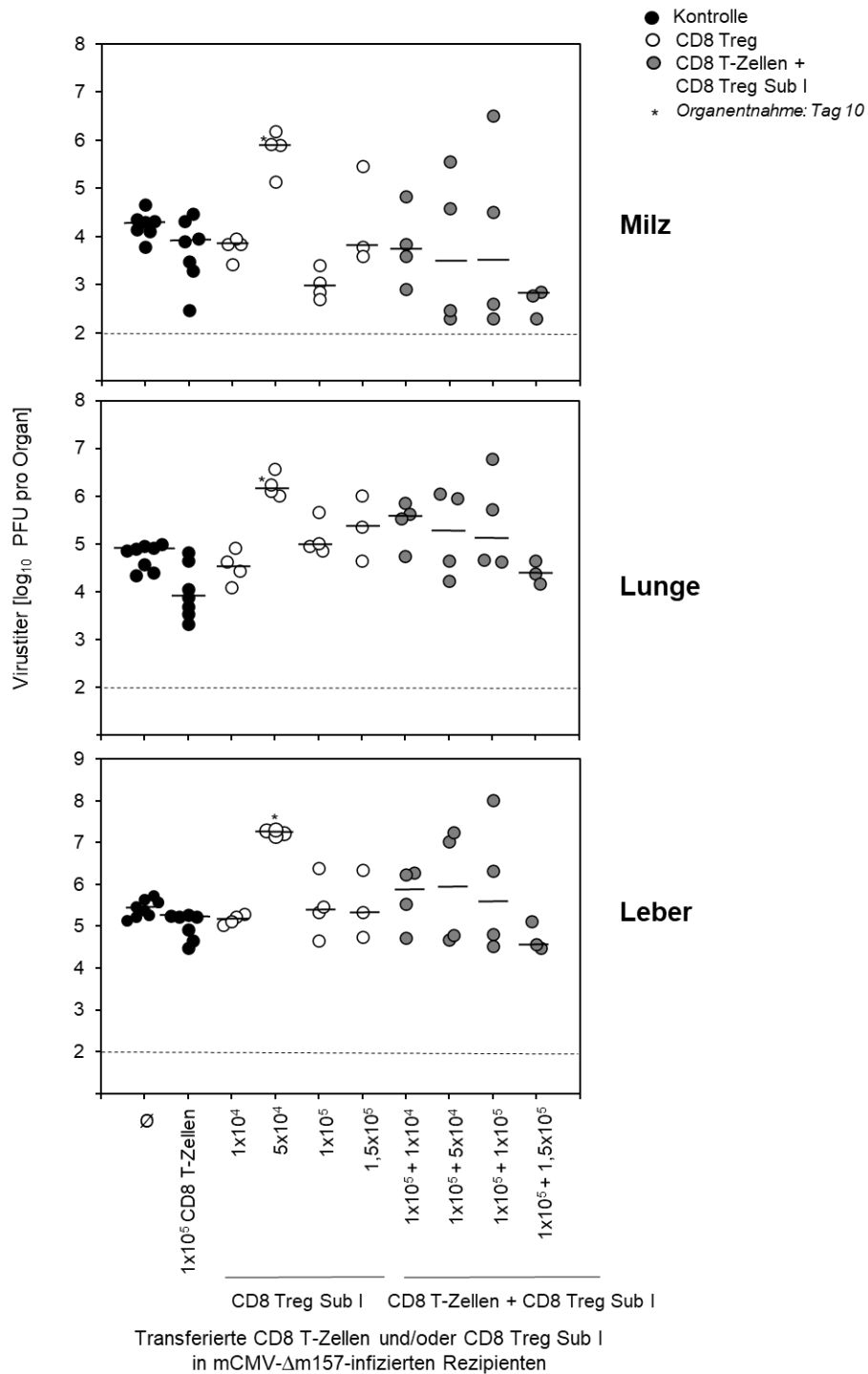
**Abb. A12: Gating-Strategie der CD8 Treg Sub I+IV: Suppression-Assay ohne mCMV-Infektion (Experiment 6 Treg Supp SH-8).** Die Proliferation der CD4 Tresp [CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>] sind in grün und die der CD8 Tresp [CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>] in blau dargestellt. CD8 Tresp wurden nach 4-tägiger und CD4 Tresp nach 5-tägiger Kokultur durchflusszytometrisch analysiert. Es wurde eine Positivkontrolle [Tresp + α-CD3ε + DC] mitgeführt. Aufgrund einer zu geringen Zellzahl konnte keine Negativkontrolle [Tresp + DC] mitgeführt werden. Die CD8 Treg Sub I+IV wurden zu den Tresp in verschiedenen Konzentrationen hinzu titriert [1:1; 1:0,5; 1:0,2; 1:0,1]. Je eine Messung stellt einen Pool aus Duplikaten dar. In (A) sind die Ergebnisse der CD8 Tresp zu CD8 Treg Sub I+IV und in (B) der CD4 Tresp zu CD8 Treg Sub I+IV dargestellt.



**Abb. A13: Zytokinsekretion der Kokulturen von Tresp und Treg aus mCMV-infizierten Mäusen nach einem Suppression-Assay.** Die Überstände der Suppression-Assay Kulturen wurden am zweiten, vierten und fünften Tag (schwarze Punkte) gesammelt. Die Produktion der Zytokine IFN $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-34 und TGF $\beta$ -1 wurden durchflusszytometrisch unter Verwendung des LegendPlex-Assays in Gegenwart von CD4 Treg (A) und CD8 Treg Sub I+IV (B) als Einzelmessungen analysiert. Unstimulierte Tresp [Tresp + DC] und stimulierte Tresp [Tresp + DC +  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$ ] dienten als Negativ [-] bzw. Positivkontrolle [+]. Kokulturen der CD4- bzw. CD8 Treg Sub I+IV Kontrollen beinhalteten [Treg + DC +  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$ ]. Die Konzentration der Tresp wurde konstant gehalten, während die Treg in abnehmender Konzentration zugegeben wurden [1:1; 1:0,5; 1:0,2; 1:0,1]. Der Median ist als horizontaler Balken dargestellt.



**Abb. A14: Zytokinsekretion der Kokulturen von Tresp und Treg aus naiven Mäusen nach einem Suppression-Assay.** Die Überstände der Suppression-Assay Kulturen wurden am zweiten, vierten und fünften Tag (schwarze Punkte) gesammelt. Die Produktion der Zytokine IFN $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-34 und TGF $\beta$ -1 wurden durchflusszytometrisch unter Verwendung des LegendPlex-Assays in Gegenwart von CD4 Treg (A) und CD8 Treg Sub I+IV (B) als Einzelmessungen analysiert. Unstimulierte Tresp [Tresp + DC] und stimulierte Tresp [Tresp + DC +  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$ ] dienten als Negativ [-] bzw. Positivkontrolle [+]. Kokulturen der CD4- bzw. CD8 Treg Sub I+IV Kontrollen beinhalteten [Treg + DC +  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$ ]. Die Konzentration der Tresp wurde konstant gehalten, während die Treg in abnehmender Konzentration zugegeben wurden [1:1; 1:0,5; 1:0,2; 1:0,1]. Der Median ist als horizontaler Balken dargestellt.



**Abb. A15: Testen des suppressiven Potentials von CD8 Treg Sub I in einem AT.** Eine Woche nach einer mCMV-Infektion (i.p.) von fünf C57BL/6 AT-Donor Mäusen, wurden CD8 T-Zellen via positiv-Selektion MACS isoliert und i.v. mit einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  den 45 C57BL/6 AT Rezipienten Mäusen transferiert (schwarze Punkte), welche mit 7,5Gy bestrahlt wurden und intraplantar mit mCMV- $\Delta$ m157  $2 \times 10^5$  PFU infiziert wurden. Gleichzeitig wurden aus 10 akut mCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen die CD8 Treg Sub I aus einem Pool von Gesamtmilzen immunomagnetisch via negativ-Selektion MagniSort isoliert, mit Antikörpern markiert und zytofluorometrisch sortiert ( $CD8^+CD3^+CD122^+PD-1^+CD127^-$ ). Die CD8 Treg Sub I wurden den Rezipienten Mäusen mit Konzentrationen von  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1,5 \times 10^5$  i.v. transferiert (weißen Punkte). Als Kontrolle dienten bestrahlte und mit mCMV- $\Delta$ m157 infizierte Rezipienten, ohne CD8 T-Zell Transfer ( $\emptyset$ ; schwarze Punkte). (A) Die Virustiter in Milz, Lunge und Leber wurden mittels Plaque-Assay bestimmt. Die grauen Punkte zeigen den Ko-Transfer von CD8 T-Zellen und CD8 Treg Sub I. Der Median ist als horizontaler Balken dargestellt und die gestrichelte horizontale Linie stellt das Detektionslimit dar.

## **8. DANKSAGUNG**

## **9. LEBENSLAUF**