

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

Mechanismen der Antigenpräsentation
bei der Induktion der CD8 T-Zellantwort
gegen das murine Cytomegalovirus

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der physiologischen Wissenschaften

der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
vorgelegt von

Julia Katharina Büttner
aus Heppenheim

Mainz, 2013

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

3. Gutachter:

Tag der Promotion: 01.04.2014

Zusammenfassung

Die Kontrolle der Cytomegalovirus(CMV)-Infektion durch CD8 T-Zellen ist abhängig von der effizienten MHC-Klasse-I-Präsentation viraler Peptide auf der Zelloberfläche. Um die Erkennung infizierter Zellen zu unterdrücken, interferieren während der *Early* (E)-Phase der murinen CMV (mCMV)-Infektion virale Immunevasine mit dem intrazellulären Transport von Peptid-MHC-I (pMHC-I) Komplexen. Den Immunevasinen gelingt es allerdings nicht, ein *Priming* mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen zu verhindern. Daher wurde angenommen, dass die Initiation der antiviralen CD8 T-Zellantwort primär auf der *Cross*-Präsentation viraler Peptide auf nicht-infizierten, professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (profAPC) beruht und damit unabhängig von viralen Immunevasionsmechanismen ist.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mittels BAC-Mutagenese eine mCMV-Rekombinante generiert, um die direkte Präsentation viraler Peptide durch die zusätzliche Expression des zentralen Immunevasins m152 bereits in der *Immediate Early* (IE)-Phase verstärkt zu unterdrücken. Wie erwartet reduzierte die verstärkte m152-Expression sowohl in der IE- als auch in der E-Phase die pMHC-I-Präsentation *in vitro*. Dies führte überraschenderweise nach Infektion immunkompetenter BALB/c-Mäuse (Haplotyp H-2^d) zu einer verminderten CD8 T-Zellantwort und damit zur Verschlechterung der Kontrolle der Infektion im drainierenden Lymphknoten. Diese Beobachtungen weisen erstmals auf einen wichtigen Beitrag der direkten Antigenpräsentation bei der Initiation der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort im immunkompetenten Wirt hin. Zusätzlich konnte auch nach mCMV-Infektion von *Cross*-Präsentations-defizienten Mäusen (Haplotyp H-2^b) eine antivirale CD8 T-Zellantwort initiiert werden. Diese Beobachtung bestätigt, dass durch direkte Antigenpräsentation auf infizierten profAPC trotz viraler Immunevasionsmechanismen eine CD8 T-Zellantwort induziert werden kann. Allerdings wurde weder die antivirale CD8 T-Zellantwort noch die Kontrolle der Infektion im Haplotyp H-2^b durch die verstärkte m152-Expression moduliert.

In einem weiteren Teil der Arbeit konnte im klinisch relevanten Modellsystem der mCMV-Infektion von Knochenmarktransplantations (KMT)-Rezipienten (Haplotyp H-2^d) gezeigt werden, dass die verstärkte m152-Expression die Rekrutierung IE1-spezifischer CD8 T-Zellen in die infizierte Lunge unterdrückt. Dies konnte sowohl früh nach Infektion, als auch während der viralen Latenz nachgewiesen werden. Zusätzlich war die Rekrutierung IE1-spezifischer CD8 T-Zellen in die Lunge deutlich vermindert in L^d-Rezipienten von L^{d+}-hämatopoetischen Zellen, die das IE1-präsentierende MHC-I-Molekül L^d nicht auf den nicht-hämatopoetischen Gewebszellen exprimieren. Diese Beobachtungen zeigen, dass die Rekrutierung antiviraler CD8 T-Zellen in ein peripheres Organ von der direkten Antigenpräsentation auf nicht-hämatopoetischen, infizierten Gewebszellen bestimmt wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit erstmals gezeigt werden, dass trotz viraler Immunevasionsmechanismen nach mCMV-Infektion des immunkompetenten Wirtes und des KMT-Rezipienten die antivirale CD8 T-Zellantwort von der direkten Antigenpräsentation bestimmt wird.

Summary

The control of cytomegalovirus (CMV) infection by CD8 T cells depends on efficient presentation of viral peptides at the cell surface. Virus-encoded immunoevasins subvert recognition of infected cells by inhibiting the cell surface transport of peptide-loaded MHC-I (pMHC-I) complexes. Yet, it is current opinion that antiviral CD8 T-cell priming occurs predominantly through cross-presentation of antigenic material endocytosed by uninfected professional antigen-presenting cells (profAPC) and is therefore independent of viral immunoevasins.

We studied the CD8 T-cell response against a new recombinant murine CMV (mCMV) that expresses the most efficient mCMV-encoded immunoevasin m152 in the *Early* (E) phase and, in addition, ectopically in the *Immediate Early* (IE) phase, resulting in a strong inhibition of pMHC-I presentation *in vitro*. Surprisingly, after infection of immunocompetent BALB/c-mice (haplotype H-2^d) enhanced immune evasion resulted in reduced CD8 T-cell priming in spite of increased viral gene expression in the draining regional lymph node (RLN), compared to mCMV-wildtype infection. This finding clearly identified a major contribution of direct antigen presentation to CD8 T-cell priming. In addition, mCMV-infection of mice (haplotype H-2^b) deficient in the canonical cross-presentation pathway induces a broad antiviral CD8 T-cell response. These data confirm that direct antigen presentation can occur in infected profAPC despite the expression of immunoevasins. However, in mice of haplotype H-2^b the antiviral CD8 T-cell priming and viral gene expression in the RLN were independent of m152 expression.

After infection of immunocompromised, hematopoietic cell transplantation (HCT)-recipients (haplotype H-2^d) enhanced expression of m152 reduced the recruitment of IE1-specific CD8 T cells to the lungs. Notably, recruitment of IE1-specific CD8 T cells was strongly reduced in L^d recipients of L^{d+} hematopoietic cells, which by themselves do not express IE1 peptide-presenting MHC-I molecule L^d on their tissue cells. These findings indicate that pulmonary recruitment of antiviral CD8 T cells depends on direct antigen presentation by non-hematopoietic tissue cells.

In conclusion, we show here that the antiviral CD8 T-cell response in the immunocompetent host as well as in the HCT recipient is driven predominantly by direct antigen presentation despite the presence of viral immune evasion molecules.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Cytomegaloviren.....	1
1.1.1 Taxonomie.....	1
1.1.2 Morphologie und Genom	1
1.1.3 Replikationszyklus und Morphogenese.....	2
1.1.4 Klinische Relevanz der HCMV-Infektion und Intervention	4
1.2 Immunbiologie der CMV-Infektion.....	6
1.2.1 Rolle des angeborenen Immunsystems für die Kontrolle der CMV-Infektion	6
1.2.2 Rolle des adaptiven Immunsystems für die Kontrolle der CMV-Infektion	7
1.2.3 Antigenpräsentation über MHC-I-Komplexe.....	8
1.2.3.1 Direkte Antigenpräsentation	8
1.2.3.2 Cross-Präsentation.....	10
1.2.4 Phasen der CD8 T-Zellantwort.....	11
1.2.4.1 Initiale Aktivierung antiviraler CD8 T-Zellen	11
1.2.4.2 <i>Memory</i> -Phase der antiviralen CD8 T-Zellantwort	12
1.3 Immunmodulation durch CMV.....	14
1.3.1 Rolle von m152 als zentrales Immunevasin des murinen CMV	15
1.4 Ziel der Arbeit	17
2 Material.....	18
2.1 Allgemeine Laborgeräte und Reagenzien	18
2.1.1 Allgemeine Laborgeräte.....	18
2.1.2 Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien	19
2.1.3 Chemikalien.....	20
2.1.4 Kits	22
2.1.5 Enzyme	22
2.1.6 Oligonukleotide.....	23

2.1.7	Antikörper	24
2.1.7.1	Antikörper für den Western Blot.....	24
2.1.7.2	Antikörper für die Durchflusszytometrie	24
2.1.7.3	MHC-Multimere für die Durchflusszytometrie.....	25
2.1.7.4	<i>Microbeads</i> -gekoppelte Antikörper	25
2.1.7.5	Antikörper für den ELISpot-Assay.....	25
2.1.7.6	Antikörper für die <i>in vivo</i> Depletion von Lymphozyten.....	25
2.2	Bakterien	25
2.3	Viren	26
2.4	mCMV Peptide	26
2.5	mCMV-ORF-Bibliothek	27
2.6	Versuchstiere.....	28
2.7	Materialien für die Zellkultur.....	29
2.7.1	Zellkulturmedien und Medienzusätze.....	29
2.7.2	Primäre Zellen und Zelllinien	31
3	Methoden	32
3.1	Zellbiologische Methoden	32
3.1.1	Anlage von murinen, embryonalen Fibroblasten (MEF)	32
3.1.2	Kryokonservierung und Rekultivierung von MEF.....	33
3.1.3	Bestimmung der Zellzahl	33
3.1.4	Transfektion von BAC-Plasmid-DNA.....	34
3.1.5	Entfernung der BAC-Sequenz aus rekonstituierten Viren.....	34
3.2	Virologische Methoden	35
3.2.1	mCMV-Produktion	35
3.2.2	mCMV-Virustiter Bestimmung.....	36
3.2.2.1	Virustiter-Bestimmung eines Virusstocks.....	36
3.2.2.2	Virustiter-Bestimmung aus Organhomogenaten	36
3.2.2.3	Virustiter-Bestimmung aus Zellkulturüberständen.....	37
3.2.3	Zentrifugale Infektion von MEF	37
3.3.	Molekularbiologische Methoden: DNA	38
3.3.1.	Bakterienanzucht.....	38
3.3.1.1	Flüssigkulturen	38
3.3.1.2	Plattenkulturen	38

3.3.1.3	Dauerkulturen.....	39
3.3.2	Transformation kompetenter Bakterien.....	39
3.3.2.1	Herstellung elektrokompenter Bakterien	39
3.3.2.2	Elektrotransformation von Plasmiden oder BAC-Plasmiden.....	39
3.3.3	Isolierung von Plasmid-DNA	40
3.3.3.1	Schnellpräparation von Plasmid-DNA.....	40
3.3.3.2	Schnellpräparation von BAC-Plasmid-DNA.....	41
3.3.3.3	QIAprep Spin Miniprep	41
3.3.3.4	QIAGEN Plasmid-Maxipräparation	42
3.3.3.5	BAC-Plasmid Maxipräparation.....	42
3.3.3.6	DNA-Isolierung aus Organen.....	42
3.3.3.7	Isolierung von viraler DNA aus Zellen oder Zellkulturüberständen.....	43
3.3.5	Quantifizierung von Nukleinsäurelösungen.....	43
3.3.6	Enzymatische Restriktion.....	43
3.3.7	Native Gelelektrophorese	44
3.3.8	Elution von DNA aus Agarosegelen.....	45
3.3.9	Aufreinigung von PCR Produkten	45
3.3.10	Dephosphorylierung linearer DNA	45
3.3.11	Ligation von PCR Fragment und Vektor.....	46
3.3.12	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	46
3.3.13	Quantitative PCR (qPCR)	47
3.3.13.1	Absolute Quantifizierung mit <i>SYBR Green</i>	47
3.3.14	BAC-Mutagenese mittels Zwei-Schritt-Rekombination zur Generierung rekombinanter mCMV	49
3.4	Molekularbiologische Methoden: RNA	50
3.4.1	Isolierung von Gesamt-RNA	50
3.4.1.1	Isolierung von RNA aus infizierten Zellen	50
3.4.1.2	Isolierung von RNA aus Lymphknoten	51
3.4.2	Quantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR).....	51
3.5	Biochemische Methoden.....	53
3.5.1	Gesamtproteinextraktion aus infizierten Zellen	53
3.5.2	Proteinquantifizierung	53

3.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	54
3.5.4	Western Blot.....	55
3.6	Tierexperimentelle Methoden	56
3.6.1	Immunsuppression	56
3.6.2	Intraplantare Infektion	57
3.6.3	Organentnahme und Probenkonservierung	57
3.6.4	Experimentelle Knochenmarktransplantation und mCMV-Infektion.....	57
3.6.4.1	Isolierung von Knochenmarkzellen	57
3.6.4.2	Immunsuppression, Transfer von Knochenmarkzellen und Infektion.....	58
3.6.5	<i>In vivo</i> -Depletion von CD8 T-Zellen und NK Zellen	58
3.6.6	Adoptiver Transfer	58
3.7	Immunologische Methoden.....	59
3.7.1	Gewinnung von Lymphozyten aus Organen	59
3.7.1.1	Aufarbeitung von Milzen oder Lymphknoten.....	59
3.7.1.2	Aufarbeitung von Lungen	59
3.7.2	Immunomagnetische Anreicherung von CD8 T-Zellen.....	60
3.7.3	Anlage und Restimulation von zytotoxischen T-Zellen.....	61
3.8	Methoden zur <i>ex vivo</i> Analyse Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen	62
3.8.1	ELISpot (<i>Enzyme-Linked Immunospot</i>)-Assay.....	62
3.8.2	Zytofluorometrische Analysen.....	64
3.8.2.1	Färbung von Oberflächenmolekülen	64
3.8.2.2	Färbung von intrazellulärem IFN γ	65
3.8.3	mCMV-Genom-weite Analyse der virus-spezifischen Immunantwort	65
4	Ergebnisse.....	67
4.1	Generierung rekombinanter mCMV zur IE-Expression des Immunevasins m152.....	67
4.1.1	Generierung und Charakterisierung des <i>Shuttle</i> -Plasmids.....	67
4.1.2	Herstellung und Charakterisierung rekombinanter mCMV-BAC-Plasmide	70
4.1.3	Herstellung der mCMV-Rekombinanten m152.IE+E und m152.IE	72
4.2	Charakterisierung der generierten Rekombinanten in Zellkultur.....	73
4.2.1	m152-Expression unter selektiven IE-Bedingungen.....	73
4.2.2	Kinetik der m152-Expression nach Infektion von Fibroblasten	75

4.2.3	<i>In vitro</i> -Replikationskinetik der mCMV-Rekombinanten.....	77
4.3	Funktionalität des IE-exprimierten Immunevasins m152	78
4.4	<i>In vivo</i> -Replikationskinetik der m152.IE+E-Rekombinanten	81
4.5	Einfluss der viralen Immunevasion auf die frühe CD8 T-Zellantwort	83
4.5.1	Die m152.IE+E-Infektion unterdrückt die CD8 T-Zellantwort im Haplotyp H-2 ^d	84
4.5.2	Die m152-Expression unterdrückt die <i>Memory</i> CD8 T-Zellantwort im Haplotyp H-2 ^d	87
4.5.3	m152 verhindert die effiziente Kontrolle der akuten mCMV-Infektion im Haplotyp H-2 ^d	88
4.5.4	m152 beeinflusst nicht die CD8 T-Zellantwort im Haplotyp H-2 ^b	90
4.5.5	Die mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort ist unabhängig von der <i>Cross</i> -Präsentation viraler Peptide	93
4.5.6	IFN γ - <i>Signalling</i> beeinflusst nicht die mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort im Haplotyp H-2 ^b	94
4.6	Rolle der Immunevasion im syngenem KMT-Modell	97
4.6.1	Die Terminierung der produktiven WT.BAC- oder m152.IE+E-Infektion verläuft im KMT-Rezipienten vergleichbar	98
4.6.2	Die m152-Expression reduziert die Rekrutierung antiviraler CD8 T-Zellen in Lunge und Milz nach Infektion von KMT-Rezipienten.....	100
4.6.2.1	Zytofluorometrische Phänotypisierung IE1-spezifischer CD8 T-Zellen.....	100
4.6.2.2	m152 unterdrückt die Rekrutierung antiviraler CD8 T-Zellen in Milz und Lunge	102
4.7	Die Antigenpräsentation infizierter, nicht-hämatopoetischer Gewebszellen führt zur Rekrutierung antiviraler CD8 T-Zellen.....	106
4.8	Die Immunkontrolle durch eine IE1-spezifische CTL-Linie ist nach WT.BAC- oder m152.IE+E-Infektion vergleichbar	109
5	Diskussion	111
5.1	Ergebnisdiskussion.....	111
5.2	Fazit und Ausblick.....	126
6	Literatur	128
7	Danksagung	147
8	Lebenslauf	148

Abkürzungsverzeichnis

A

A	Absorption
A. bidest	Reinstwasser (Aqua ad iniectabilia)
Abb.	Abbildung
AIDS	Erworbenes Immunschwäche-Syndrom (<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zellen (<i>Antigen Presenting Cells</i>)
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
AT	Adoptiver Transfer
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
α (Präfix)	anti/alpha

B

BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
BCA	Bicinchonin-Säure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
β ₂ m	β ₂ -Mikroglobulin
β-ME	β-Mercaptoethanol

C

Cam	Chloramphenicol
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CID	<i>Cytomegalic Inclusion Disease</i>
CIP	<i>Calf Intestinal Phosphatase</i>
CMV	Cytomegalovirus
Cs	Cäsium
C _T	<i>Threshold Cycle</i>
CTL	zytolytische T-Lymphozyten (<i>Cytolytic T lymphocytes</i>)
CTLL	zytolytische T-Lymphozyten-Linie (<i>Cytolytic T lymphocyte Line</i>)
Cy	Cyanin

D

DAMP	<i>Death Associated Molecular Pattern</i>
DC	Dendritische Zelle (<i>Dendritic Cell</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DRiPs	<i>Defective Ribosomal Products</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	1,4-Dithiothreitol

E

E	<i>Early</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELIspot	Enzyme-Linked Immunospot
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAAP	ER-assoziierte Aminopeptidase

ERAD	<i>ER-Associated Degradation</i>
ERGIC	<i>ER-Golgi-Intermediate Compartment</i>
F	
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
For	<i>Forward</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
G	
gB	Glykoprotein B
gp	Glykoprotein
Gy	Gray
H	
h	Stunde (<i>Hour</i>)
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HHV	Humanes Herpesvirus
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HRP	Horseradish Peroxidase
HSV	Herpes-Simplex-Virus
Hz	Hertz
I	
IE	<i>Immediate Early</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRFE	<i>Interferon Regulatory Factor Element</i>
i.v.	intravenös
K	
Kan	Kanamycin
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KMT	Knochenmarktransplantation
KMZ	Knochenmarkzellen
kV	Kilovolt
L	
L	<i>Late</i>
L	Ligand
LB-Medium	Luria-Betrani-Medium
LK	Lymphknoten
M	
MACS	<i>Magnetic Cell Separation</i>
mAk	monoklonaler Antikörper
mCMV	murines Cytomegalovirus
MEF	Murine Embryonale Fibroblasten
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIE	<i>Major Immediate Early</i>
MIEPE	<i>Major Immediate Early Promotor Enhancer</i>
MIE-PEEP	<i>Major Immediate Early Promotor Enhancer Enhancer Promotor</i>
M	Molar
mM	Millimol

Min	Minute
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i>
MPN	<i>Most Probable Number</i>
N	
n.i.	nicht infiziert
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
O	
OD	Optische Dichte
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
P	
P	Promotor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
pAK	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PD-L1	<i>Programmed Death Ligand-1</i>
PFU	<i>Plaque-Forming Unit</i>
p.i.	post infection
PI	Proteinase Inhibitor
pMHC-Komplex	Peptid-beladener MHC-Komplex
profAPC	<i>Professional Antigen Presenting Cell</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
pthrp	<i>parathyroid hormone-related protein-ecoding gene</i>
Q	
qPCR	quantitative PCR
R	
Rev	<i>Reverse</i>
rhIL-2	rekombinantes humanes Interleukin-2
ROX	5-Carboxy-x-Rhodamin
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
RT-qPCR	quantitative RT-PCR
S	
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
sec	Sekunde
SLEC	<i>Short Lived Effector Cells</i>
SPF	<i>Specified Pathogen Free</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
SV40	<i>Simian Virus-40</i>
T	
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAP	<i>Transporter Associated with Antigen Processing</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T Cell Receptor</i>)

TCM	<i>Central Memory</i> T-Zellen
TEM	Effektor <i>Memory</i> T-Zellen
T _h C	T-Helfer-Zelle (<i>T helper cell</i>)
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TLR	Toll- <i>Like</i> Rezeptor
U	
U	<i>Unit</i>
ün	über Nacht
UTR	<i>Untranslated Region</i>
V	
VSP	Virusstandardpuffer
v/v	Volumen/Volumen
VZ	Verdopplungszeit
VZV	Varizella-Zoster-Virus
W	
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen (<i>weight/volume</i>)

1 Einleitung

1.1 Cytomegaloviren

1.1.1 Taxonomie

Die Cytomegaloviren (CMV) werden aufgrund ihrer biologischen und morphologischen Eigenschaften der Familie der *Herpesviridae* zugeordnet (Roizman et al., 1981). Die Namensgebung basiert auf der Beobachtung einer drastischen Zellvergrößerung CMV-infizierter Zellen (Zytomegalie) (Weller et al., 1960).

Die ubiquitär verbreiteten *Herpesviridae* sind gekennzeichnet durch eine einheitliche Morphologie der Viruspartikel und die Etablierung viraler Latenz nach immunologischer Kontrolle der Primärinfektion (Roizman und Baines 1991).

Bislang sind acht humanpathogene Herpesviren bekannt (Pellett und Roizman, 2013) und innerhalb der *Herpesviridae* erfolgt eine weitere Unterteilung in die Subfamilien *Alpha-*, *Beta-* und *Gammaherpesvirinae*.

Humanpathogene Vertreter der ***Alphaherpesvirinae*** sind die Herpes simplex-Viren Typ1 (HSV-1) und Typ2 (HSV-2) sowie das Varizella-Zoster-Virus (VZV). *Alphaherpesvirinae* sind gekennzeichnet durch ein breites Wirtsspektrum, einen kurzen Replikationszyklus und die Etablierung von Latenz in den Nervenzellen der sensorischen Ganglien.

Das humane CMV (HCMV) sowie das HHV-6 und HHV-7 werden der Familie der ***Betaherpesvirinae*** zugeordnet. Sie sind Spezies-spezifisch und gekennzeichnet durch einen langsamen Replikationszyklus sowie einen breiten Zelltropismus. Die Etablierung von Latenz erfolgt in unterschiedlichen Organen, darunter Lunge, Leber, Pankreas, Niere und Herz (Koffron et al., 1997). Aufgrund der strikten Speziespezifität ist eine Untersuchung der HCMV-Infektion in einem Tiermodell nicht möglich. Da HCMV und das murine CMV (mCMV) genetische, immunologische und strukturelle Eigenschaften teilen, kann die Untersuchung der mCMV-Infektion der Maus als Modell für die klinisch relevante HCMV-Infektion dienen (Rawlinson et al., 1996; Reddehase, 2002).

Gammaherpesvirinae besitzen ein enges Wirtsspektrum. Die produktive Infektion sowie die Etablierung von Latenz erfolgen überwiegend in B- und T-Lymphozyten. Humanpathogene Mitglieder der *Gammaherpesvirinae* sind das Epstein-Barr-Virus (EBV) und das Kaposi Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV).

1.1.2 Morphologie und Genom

Reife Virionen haben einen Durchmesser von 150-200nm und zeigen die für Herpesviren charakteristische Morphologie. Im Inneren des Viruspartikels befindet sich das lineare, doppelsträngige DNA-Genom (Dolan et al, 2004; Mocarski et al., 2013), eingebettet in einem ikosaedrischen Nukleokapsid. Eine amorphe Proteinmatrix, das Tegument, umgibt das

Kapsid. Das Tegument besteht primär aus Phosphoproteinen, wobei auch zelluläre sowie virale RNA-Spezies nachgewiesen wurden (Kalejta, 2013). Das Virion ist umgeben von einer Lipidhülle zellulären Ursprungs, in die virale Glykoproteine eingelagert sind. Die viralen Hüllproteine sind für die Virusadsorption an die Wirtszelle notwendig. Sie haben wichtige Funktionen bei der Virionreifung und der Induktion der CMV-spezifischen, humoralen Immunantwort (Feire und Compton, 2013).

Das ca. 230 kbp große CMV-Genom besitzt eine hohe Kodierungskapazität; so wurden vorläufig für mCMV etwa 170 offene Leserahmen (ORFs) (Rawlinson et al., 1996; Tang et al., 2006) und für HCMV 200 ORFs annotiert (Chee et al., 1990; zur Übersicht: Davison et al., 2013). Eine neuere Studie wies darauf hin, dass unter Berücksichtigung von alternativen Transkript-Startpunkten die Kodierungskapazität von HCMV bei 751 ORFs liegt (Stern-Ginossar et al., 2012). Der Mehrzahl der identifizierten ORFs, beziehungsweise ihrer Genprodukte, konnte jedoch bisher keine Funktion zugeordnet werden. Überraschenderweise sind für die *in vitro* Replikation in Fibroblasten von HCMV lediglich 45 ORFs essenziell (Dunn et al., 2003).

HCMV und mCMV weisen eine Sequenzhomologie von 42,5% auf, wobei lediglich für 78 mCMV-ORFs ein homologer HCMV-ORF identifiziert werden konnte. Diese ORFs können sowohl Sequenz-homolog als auch Positions-homolog sein (Landolfo et al., 2003). Erstaunlicherweise konnte die mCMV-Replikation in humanen Zellen bereits durch eine singuläre Mutation in der M112/M113-Genregion (*Early1*) erreicht werden (Schumacher et al., 2010; zur Übersicht: Brune, 2013).

1.1.3 Replikationszyklus und Morphogenese

Da die Infektion mit CMV durch einen breiten Zelltropismus gekennzeichnet ist (Myerson et al., 1984; Ibanez et al., 1991; Sinzger et al., 2000), muss die Penetration der Wirtszelle und Initiation des lytischen Replikationszyklus in verschiedenen Zelltypen möglich sein.

Die **Adsorption** des Virions an die Zellmembran der Wirtszelle wird durch die unspezifische Bindung der viralen Glykoproteine gM/gN und gB an zelluläre Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) initiiert (Compton et al., 1993). Um die Adsorption des Virions zu stabilisieren, erfolgt eine Interaktion weiterer zellulärer Rezeptoren mit viralen Glykoproteinen. Als mögliche zelluläre Rezeptoren werden Annexin II (Wright et al., 1994; 1995), CD13 (Soderberg et al., 1993) und Integrine (Feire et al., 2004) diskutiert.

Nach Adsorption folgt die **Fusion** der Virus- und Zellmembran in einem pH-unabhängigen Prozess (Compton et al., 1992) und die Freisetzung des Teguments und Nukleokapsids in das Zytoplasma der Wirtszelle (Feire und Compton, 2013). Für die Infektion von Epithel- und Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass ein pentamerer Komplex aus den viralen Proteinen gH, gL, UL128, UL130 und UL130a essenziell ist (Hahn et al., 2004; Gerna et al., 2005; Wang und Shenk, 2005; Adler et al., 2006) und eher über Endozytose verläuft (Ryckman et al., 2006). Für mCMV konnte neben dem gH/gL/gO-Komplex ein alternativer

gH/gL/MCK-2-Komplex identifiziert werden, der die Virusdissemination ermöglicht und essenziell ist für die Infektion von Makrophagen (Wagner et al. 2013).

Nach **Entfernung des Teguments** (*Uncoating*) erfolgt, analog zu HSV-1, der Mikrotubuli-vermittelte Nukleokapsidtransport zum Zellkern (Sodeik et al., 1997), wo die Nukleokapside an den Kernporenkomplex binden. Diese Bindung induziert die **Freisetzung der viralen DNA** in das Nukleoplasma (Ojala et al., 2000). Nach Fusion der Genomenden liegt die virale DNA zeitweise zirkularisiert vor und wird mit zellulären Histonen komplexiert (Marks und Spector, 1988).

Die **Genexpression** der viralen DNA ist bei allen Vertretern der Cytomegaloviren kaskadenartig reguliert und wird in die *Immediate Early* (IE)-, *Early* (E)- und *Late* (L)-Phase unterteilt. Der Übergang von der IE- in die E-Phase erfolgt 1-2 Stunden nach mCMV-Infektion. Die nachfolgende L-Phase setzt 16h nach der Infektion ein und beginnt definitionsgemäß mit der Replikation der viralen DNA. In einer neueren Studie konnte jedoch *in vitro* gezeigt werden, dass das Maximum der viralen Genexpression bereits in den ersten zwei Stunden des lytischen Replikationszyklus stattfindet. Zu diesem Zeitpunkt konnten bereits IE-, E- und auch L-Transkripte detektiert werden. Bereits 5-6h nach Infektion folgt eine schnelle Repression der viralen Genexpression (Marcinowski et al., 2012).

Nach dem klassischen Modell der viralen Genexpression wird nach dem Eintritt der viralen DNA in den Zellkern der Wirtszelle die IE-Phase initiiert. Für den Transkriptionsstart der IE-Gene werden keine viralen, transaktivatorischen Proteine benötigt. Zelluläre Transkriptionsfaktoren interagieren zunächst mit dem *Major Immediate Early* (MIE) *Promotor Enhancer* (MIEPE) (zur Übersicht: Meier und Stinski, 2013). Die mCMV-kodierte MIE-Region wird auch als MIE-PEEP (*Major Immediate Early Promotor Enhancer Promotor*) bezeichnet, da sie zwei *Enhancer*-Elemente enthält, welche von bi-direktionalen Promotorsequenzen flankiert werden (Chatellard et al., 2007; Kropp et al., 2009).

Die MIE-Genregion reguliert bei HCMV die Expression von zwei (*ie1* und *ie2*) (zur Übersicht: Landolfo et al., 2003), bei mCMV die Expression von drei viralen Genen (*ie1*, *ie3* und *ie2*) (Keil et al., 1987). Das murine *IE1*-Transkript kodiert für das 89/76 kDa **IE1-Protein**, ein Transaktivator viraler und zellulärer Gene (Messerle et al., 1992; Gribaudo et al., 2000; Wilhelmi et al., 2008) und beinhaltet ein L^d-präsentiertes, immundominantes CD8 T-Zell-Epitop (Reddehase et al., 1989). Das *IE3*-Transkript kodiert für das 88kDa bis 90kDa **IE3-Protein**, das einen essenziellen Transaktivator der E-Genexpression darstellt (Messerle et al., 1992; Angulo et al., 2000; Martínez et al., 2010). Dem nicht essenziellen 42kDa **IE2-Protein** konnte bisher keine Funktion zugeordnet werden (Cardin et al., 1995; Manning und Mocarski, 1998).

Generell modulieren die IE-Proteine den Wirtszellmetabolismus, steuern die virale E-Genexpression und leiten das lytische Replikationsprogramm ein (Keil et al., 1984; Bühler et al., 1990; Messerle et al., 1992; Busche et al., 2008).

Die E-Genprodukte, wie beispielsweise die virale DNA-Polymerase, sind für die Replikation der viralen DNA essenziell (Pellet und Roizman, 2007). Der Beginn der DNA-Replikation

definiert den Anfang der L-Phase, in der hauptsächlich die viralen Strukturproteine synthetisiert werden.

Ausgehend vom zirkularisierten Genom erfolgt die virale **DNA-Replikation** nach dem *rolling circle*-Prinzip. Die neusynthetisierte DNA ist mit der Ausgangsmatrize kovalent verbunden, wodurch Konkatemere entstehen, die mehrere Kopien der viralen DNA als linearen Doppelstrang enthalten. Die Spaltung dieser Konkatemere in Einzel-Genome erfolgt während der Verpackung der DNA in Nukleokapside, die zur Stabilisierung mit einem vorläufigen Tegument umgeben werden (Marks und Spector, 1998; Gibson und Bogner, 2013). In einem ersten Knospungsprozess (*Budding, primary envelopment*) werden diese Kapside durch die innere Kernmembran in den perinukleären Raum geschleust. Die temporäre Virushülle fusioniert mit der äußeren Kernmembran (*de-envelopment*), wodurch die Nukleokapside in das Zytosol freigesetzt werden. Die Nukleokapside erhalten ihr endgültiges Tegument im *virus assembly compartment* und im Anschluss erfolgt eine zweite Reifungsknospung (*secondary envelopment*) an den Membranen des tubulären Endosoms oder des Trans-Golgi-Netzwerks (TGN) (Tooze et al., 1993; Fraile-Ramos et al., 2001). Die resultierenden Virionen werden mit einer doppelten Hüllmembran umgeben. Die äußere Hüllmembran fusioniert mit der Wirtszellmembran und reife, einfach umhüllte Virionen werden in den extrazellulären Raum freigesetzt (Mettenleiter et al., 2006).

1.1.4 Klinische Relevanz der HCMV-Infektion und Intervention

HCMV ist ubiquitär verbreitet, wobei die Durchseuchungsrate von sozio-ökonomischen Faktoren abhängig ist. In Mitteleuropa und Nordamerika liegt die Durchseuchungsrate im Erwachsenenalter bei 40-50%, während in Entwicklungsländern aufgrund des niedrigen Hygienestandards eine Durchseuchungsrate von 100% existiert (Cannon et al., 2013). Die Virusübertragung erfolgt in den meisten Fällen horizontal durch Speichel, Urin, Genitalsekret, Tränenflüssigkeit, Blut oder Muttermilch. Zudem kann eine Übertragung auch durch Blutkonserven oder Transplantation von Geweben, Organen sowie Knochenmark seropositiver Spender erfolgen. Eine vertikale Übertragung erfolgt transplazentar von der infizierten Mutter auf den Embryo oder Fötus. Die Inzidenz der kongenitalen HCMV-Infektion beträgt etwa 0,2-2,3% bei allen Schwangerschaften, wobei 10% aller Infektionen symptomatisch verlaufen.

Der Infektionsverlauf wird primär durch den Immunstatus des Wirts bestimmt. Eine Infektion des **immunkompetenten Individuums** verläuft meistens inapparent. Sie kann sich in einem allgemeinen Unwohlsein, sowie einem leichten Fieber äußern, in seltenen Fällen tritt eine Mononucleose-ähnliche Symptomatik auf (Klemola et al., 1970). Nach Terminierung der produktiven Infektion kommt es zur Etablierung lebenslanger Latenz, die durch Reaktivierungsereignisse unterbrochen wird, welche in der Regel ebenfalls inapparent verlaufen.

Die Primärinfektion eines **immusupprimierten oder immunologisch unreifen Individuums** kann zu schweren klinischen Manifestationen führen (Reddehase, 2002). Die kongenitale CMV-Infektion immunologisch unreifer Embryonen und Föten kann während einer primären oder rekurrenten Infektion der Mutter sowie einer Superinfektion der seropositiven Mutter mit einem weiteren HCMV-Stamm erfolgen (Ross et al., 2006) und verläuft bei 10-15% der Neugeborenen symptomatisch (Boppana und Britt, 2013). Die durch kongenitale Infektion hervorgerufene Symptomatik der CMV-Erkrankung wird auch als *cytomegalic inclusion disease* (CID) bezeichnet. Typische CID-Symptome sind Petechien der Haut, Hepatosplenomegalie, Pneumonie, Hepatitis und Retinitis (Boppana et al., 1992; 1997). Als Spätschäden können neurologische Schädigungen, wie mentale Retardation oder Verlust des Seh- und/oder Hörvermögens auftreten (Fowler et al., 1992, zur Übersicht: Reddehase, 2002).

Eine für die HCMV-Infektion empfängliche Risikogruppe bilden Patienten mit **angeborener** (*severe combined immunodeficiency*, SCID), **erworbener** (*acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS) oder **therapeutisch-induzierter Immundefizienz**. Beispielsweise sind 90% der HIV (Humanes Immundefizienz-Virus)-Patienten HCMV-seropositiv, daher wird oft die AIDS-Symptomatik dieses Patientenkollektivs durch die HCMV-Erkrankung verschlimmert. Empfänger von Organ- oder Knochenmark-Transplantationen (KMT) müssen sich einer immunsuppressiven Behandlung unterziehen. Als Folgen einer HCMV Primärinfektion, Re-Infektion oder Rekurrenz werden in immunsupprimierten Patienten schwere Organmanifestationen, wie interstitielle Pneumonie, Kolitis, Gastroenteritis, Hepatitis und Retinitis beobachtet.

Die medizinische **Prophylaxe oder Therapie** der akuten HCMV-Infektion erfolgt derzeit durch Gabe von Inhibitoren der viralen DNA-Replikation, wie beispielsweise Ganciclovir oder Foscarnet (Boeckh 2011; Michel et al., 2013). Während die antivirale Therapie bei Erwachsenen mit großem Erfolg in der klinischen Routine angewendet wird, stehen für die Behandlung der kongenitalen Infektion keine antiviralen Therapien zur Verfügung.

Ein Impfstoff zur Induzierung einer humoralen und zellulären Immunantwort gegen HCMV ist gegenwärtig nicht verfügbar. In der klinischen Grundlagenforschung werden jedoch verschiedene Vakzinierungsansätze verfolgt (Plotkin und Plachter, 2013), wie beispielsweise die Verwendung von attenuierten Viren, viralen Vektoren, rekombinanten Glykoproteinen, DNA-Plasmiden, antigenen Peptiden oder nicht-replikativen Viruspartikeln.

1.2 Immunbiologie der CMV-Infektion

Die CMV-Primärinfektion wird effizient vom angeborenen und adaptiven Immunsystem des immunkompetenten Wirtes kontrolliert. In der frühen Phase der Infektion sind vorwiegend die Komponenten des angeborenen Immunsystems wirksam, zu denen beispielsweise Makrophagen, Dendritische Zellen (DC) und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gehören. Teil der nachfolgenden, adaptiven Immunität sind Antikörper-sezernierende B-Zellen sowie Antigen-spezifische T-Zellpopulationen.

1.2.1 Rolle des angeborenen Immunsystems für die Kontrolle der CMV-Infektion

In den ersten Tagen der akuten CMV-Infektion erfolgt die immunologische Kontrolle vorrangig durch NK-Zellen, die eine Komponente der angeborenen Immunität darstellen (Bukowski et al., 1984; Arase et al., 2002; Vidal et al., 2013).

NK-Zellen erkennen infizierte oder transformierte Zellen Antigen-unabhängig und bilden so eine primäre Verteidigungslinie des Immunsystems. Zur antiviralen Aktivität der NK-Zellen gehört die Sekretion von Zytokinen (z.B. Interferon- γ (IFN γ)), Interleukinen und Chemokinen, welche die virale Dissemination unterdrücken können. Darüber hinaus sind NK-Zellen zur direkten Zytolyse von Zielzellen befähigt, die durch Freisetzung von Perforin und Granzym (Tay et al., 1997; van Dommelen et al., 2003; Loh et al., 2005) oder Aktivierung apoptotischer Signalwege (Nagata, 1997; Smyth et al., 2003) vermittelt wird.

Die Aktivierung der NK-Zellen wird durch das Wechselspiel inhibierender und aktivierender NK-Zellrezeptoren und deren Interaktion mit NK-Zell-Liganden auf Zielzellen reguliert (zur Übersicht: Kirwan und Burshtyn, 2007). Beispielsweise sind MHC-I-Moleküle inhibitorische Liganden für NK-Zellrezeptoren. Folglich können NK-Zellen durch eine reduzierte MHC-I-Oberflächenexpression der Zielzellen aktiviert werden. Dieser Erkennungsmechanismus wird auch als *missing-self-recognition* bezeichnet (Kärre, 2008).

Auch der Genotyp des Wirtsorganismus kann die Effizienz der NK-Zell-vermittelten Kontrolle der mCMV-Infektion determinieren. Mausstämme, wie der C57BL/6-Laborstamm, exprimieren den aktivierenden NK-Zellrezeptor Ly49H (Brown et al., 2001; Daniels et al., 2001; Lee et al., 2002), der spezifisch durch das mCMV-kodierte m157-Transmembranprotein aktiviert wird (Arase et al., 2002; Smith et al., 2002). Dies führt zur spezifischen Erkennung und Auslöschung mCMV-infizierter Zellen. Bei den meisten Maus-Inzuchtstämmen, darunter auch BALB/c, sowie in der natürlichen Mauspopulation, wird der Ly49H-Rezeptor nicht exprimiert; somit kann eine effiziente NK-Zellaktivierung über eine m157-Ly49H-Interaktion nicht stattfinden (zur Übersicht: Lisnić et al., 2010; Redwood et al. 2013).

Die CMV-Infektion kann aber nicht langfristig durch NK-Zellen kontrolliert werden. Daher ist

die Induktion einer mCMV-spezifischen, adaptiven Immunantwort essenziell (Welsh et al., 1991).

1.2.2 Rolle des adaptiven Immunsystems für die Kontrolle der CMV-Infektion

Die adaptive Immunantwort wird durch T-Zellen und Antikörper-sezernierende B-Zellen vermittelt. Antigen-spezifische T-Zellpopulationen entstehen durch somatisches *Rearrangement* variabler Gensegmente, die für den membranständigen T-Zell-Rezeptor (TCR) kodieren. T-Zellen werden in einem nachfolgenden Reifungsprozess selektioniert, um die Reaktivität gegen Selbstantigene zu verhindern. Zusätzlich exprimieren T-Zellen Ko-Rezeptoren, die eine Differenzierung in zytotoxische CD8 T-Zellen (*cytotoxic T lymphocyte* (CTL)) und CD4 T-Helfer-Zellen (*T helper cell* (T_HC)) ermöglichen. Die CMV-Infektion induziert eine umfassende CD4 und CD8 T-Zellantwort gegen eine Vielzahl viraler Epitope.

Die spezifische Erkennung Antigen-präsentierender Zellen (APC) durch **CD8 T-Zellen** erfolgt durch die Interaktion ihres TCR mit dem Peptid-MHC-I (pMHC-I) Komplex (Rudolph et al., 2006). Diese Interaktion und die weiterer ko-stimulatorischer Moleküle mit Liganden der Zielzelle führen zur spezifischen Aktivierung (siehe 1.2.4.1) und Induktion der Effektorfunktionen der CD8 T-Zelle. Teil der Effektorfunktion ist die direkte zytotoxische Aktivität und die Freisetzung von Zytokinen (z.B. IFN γ , TNF α) und Chemokinen. Zusätzlich wird durch die Aktivierung die Proliferation der CD8 T-Zellen induziert. Nach Terminierung der akuten Infektionsphase verbleiben Antigen-spezifische *Memory* CD8 T-Zellen im Organismus und können bei erneutem Antigenkontakt ihre Effektor-Funktionen schneller abrufen (siehe 1.2.4.2).

Der protektive Effekt virus-spezifischer CD8 T-Zellen gegenüber einer CMV-Infektion konnte im Modell der mCMV-Infektion klar nachgewiesen werden. So schützt der adoptive Transfer virus-spezifischer CD8 T-Zellen immunsupprimierte, mCMV-infizierte BALB/c-Mäuse vor der mCMV-Infektion (Reddehase et al., 1985; Reddehase et al., 1987; Holtappels et al., 2008a; Ebert et al., 2012). Auch im klinisch relevanten Modell der experimentellen KMT wurde gezeigt, dass die Rekonstitution der antiviralen CD8 T-Zellantwort nach Immunsuppression für die Kontrolle der mCMV-Infektion essenziell ist (Holtappels et al., 1998; Podlech et al., 1998). Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass während der viralen Latenz virus-spezifische CD8 T-Zellen sporadische Reaktivierungsereignisse terminieren (Simon et al., 2006) und das Rezidivrisiko vermindern (Steffens et al., 1998).

CD4 T-Zellen erkennen MHC-II-präsentierte Peptide auf der Zelloberfläche von professionellen APC (profAPC) und werden hinsichtlich ihrer sezernierten Zytokine in T_H1 - (IFN γ) und T_H2 -Zellen (IL-4, IL-5) unterteilt. Wesentliche Funktionen der CD4 T-Zellen sind die Regulation von Entzündungsreaktionen durch die Aktivierung von Makrophagen sowie die Stimulation von B-Zellen.

Eine CD4 T-Zellantwort ist essenziell für den langfristigen Schutz vor viraler Rezidiv in seropositiven Individuen (Gamadia et al., 2003). Die immunologische Charakterisierung

HCMV-spezifischer CD4 T-Zellen zeigte, dass eine klassische T_H1 -Antwort induziert wird, die gekennzeichnet ist durch die Sezernierung der Zytokine IFN γ und TNF α (Rentenaar et al., 2000; Bitmansour et al., 2001). Im Modell der mCMV-Infektion wurde gezeigt, dass CD4 T-Zellen essenziell für die Kontrolle der Virusreplikation in der Speicheldrüse sind (Jonjić et al., 1989; zur Übersicht: Walton et al., 2013).

Die Antikörper-vermittelte, **humorale Immunität** spielt im Rahmen der primären CMV-Infektion eine untergeordnete Rolle, allerdings vermindern mCMV-spezifische Antikörper die Virus-Dissemination nach Reaktivierung und vermitteln Schutz vor sekundären CMV-Infektionen (Mach et al., 2013).

1.2.3 Antigenpräsentation über MHC-I-Komplexe

Antivirale CD8 T-Zellen erkennen über ihren TCR virale MHC-I-präsentierte Peptide auf der Zelloberfläche einer APC. Die MHC-I-Präsentation viraler Peptide wird von zwei unterschiedlichen Mechanismen gewährleistet. Hierzu zählen sowohl die **direkte Antigenpräsentation** durch infizierte Zellen (Neefjes et al., 2011) als auch die **Cross-Präsentation** exogener Peptide, vermittelt durch nicht-infizierte APC (Joffre et al., 2012). Der Mechanismus der Cross-Präsentation ermöglicht die Initiation einer Immunantwort gegen Pathogene, welche nicht in profAPC replizieren oder Immunevasions-Mechanismen entwickelt haben, um die Antigenpräsentation auf der Oberfläche von infizierten profAPC zu verhindern.

1.2.3.1 Direkte Antigenpräsentation

Die kontinuierliche pMHC-I-Präsentation auf der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen ermöglicht dem Organismus die Präsentation wirtsfremder Peptide zur spezifischen Aktivierung zytotoxischer CD8 T-Zellen (siehe Abb. 1.1).

Antigene Peptide werden durch einen kontinuierlichen Degradationsprozess wirtseigener sowie wirtsfremder Proteine über den Ubiquitin-Proteasom-*Pathway* generiert (Sijts et al., 2011). Beispielsweise werden falsch translatierte oder falsch gefaltete Proteine, sogenannte DRiPs (*defective ribosomal products*), zunächst mit einem Ubiquitin-*Tag* versehen und dadurch für die Proteolyse durch einen multikatalytischen Proteasekomplex, das konstitutive 26S-Proteasom, markiert (Schubert et al., 2000). Die regulatorische 19S-Untereinheit des Proteasoms transferiert ubiquitinylierte Proteine in die Zylinder-förmige 20S-Untereinheit zur Proteolyse. In lymphatischen Geweben oder nach IFN γ -Stimulation werden drei aktive Zentren des Proteasoms durch alternative, enzymatische Untereinheiten ersetzt (Hisamatsu et al., 1996). Dieses modifizierte Proteasom wird auch als Immunoproteasom bezeichnet. Die unterschiedliche Substratspezifität von konstitutivem und Immunoproteasom ermöglicht eine Erweiterung der Variabilität generierter Peptide (Toes et al., 2001).

Die proteasomale Prozessierung resultiert in Peptiden mit einer Länge zwischen 3-20 Aminosäuren. Langkettige Peptide werden erneut durch zytosolische Proteasen weiter

verkürzt (*trimming*) (Rock et al., 2004) und anschließend unter ATP-Hydrolyse TAP (*transporter associated with antigen processing*)-vermittelt in das ER transportiert. Im ER-Lumen werden Peptide erneut von den ER-Aminopeptidasen ERAAP/2 (human) oder der ER *aminopeptidase associated with antigen processing* ERAAP (murin) *getrimmt* (Serwold et al., 2002; Saveanu et al., 2005; zur Übersicht: van Endert, 2011), wobei schließlich Peptide mit einer Länge von 8-9 AS auf MHC-I-Moleküle geladen werden. Die Kopplung eines Peptids an ein freies MHC-I-Molekül wird durch den Peptid-Beladungs-Komplex initiiert. Dieser Komplex enthält die MHC-I α -Kette, β_2m , TAP sowie verschiedene Chaperone (u.a. Tapasin, ERp57, Calnexin und Calreticulin) (Wearsch und Cresswell, 2008). Tapasin interagiert direkt mit TAP und dem freien MHC-I-Molekül und vermittelt die Kopplung des transportierten Peptids an MHC-I.

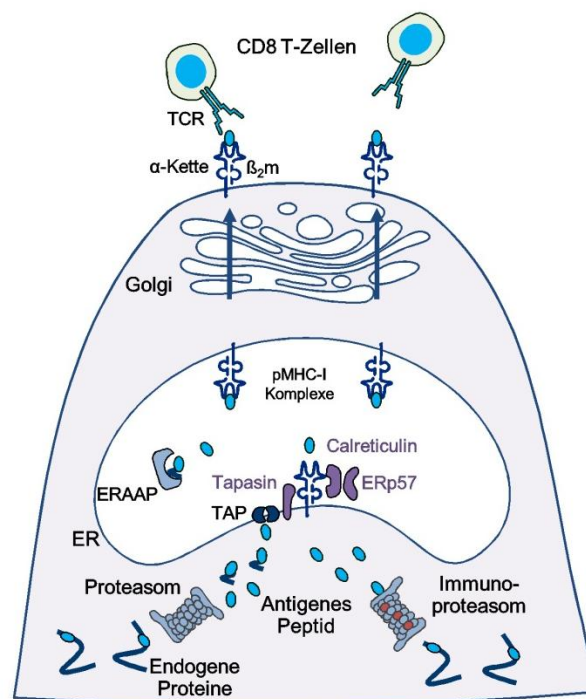


Abb. 1.1 Schema des klassischen MHC-I-Präsentationsweges. Endogene Proteine werden nach proteasomaler Prozessierung TAP-vermittelt in das Lumen des ER transloziert. Ein Komplex bestehend aus TAP, der MHC-I- α -Kette, β_2m sowie Tapasin, Calreticulin und ERp57 lädt die Peptide auf freie MHC-I-Moleküle. Der pMHC-I-Komplex wird anschließend über den sekretorischen Transportweg zur Zelloberfläche transportiert und CD8 T-Zellen präsentiert.

Im Anschluss wird der pMHC-I-Komplex bestehend aus MHC- α -Kette, β_2m und gebundenem Peptid über den konstitutiven sekretorischen Transportweg zur Zelloberfläche transportiert und kann vom Antigen-spezifischen TCR der CD8 T-Zellen erkannt werden. Nicht-assoziierte Peptide sowie unbeladene oder falsch-gefaltete MHC-I-Moleküle werden zur proteasomalen Degradation in das Zytosol transloziert (Hughes et al., 1997).

1.2.3.2 Cross-Präsentation

Die MHC-I-Präsentation exogener Antigene (Bevan et al., 1976a; b) wird auch als *Cross-Präsentation* und die resultierende Initiation einer CD8 T-Zellantwort als *Cross-Priming* bezeichnet (Bevan, 2006). In der Maus sind zur *Cross-Präsentation* lymphoide ($CD8^{high}$) und migratorische ($CD103^{high}CD11b^{low}$) DC-Subpopulationen befähigt (Jung et al., 2002; Shortman und Heath, 2010; Joffre et al., 2012). Der Beitrag anderer Zellpopulationen wird diskutiert (Nierkens et al., 2013; Segura et al., 2013). Die Fähigkeit zur *Cross-Präsentation* durch CD8-positive DC kann durch eine Infektion des Organismus verstärkt werden (zur Übersicht: Dresch et al., 2012). Sowohl PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) auf der Oberfläche von Pathogenen, als auch durch den Zelltod infizierter Zellen freigesetzte DAMPs (*death associated molecular patterns*) oder inflammatorische Zytokine können die Rekrutierung und Entwicklung von *Cross-präsentierenden* DC begünstigen.

Nach der Internalisierung eines Antigens durch die *Cross-präsentierende* Zelle folgt die Prozessierung und MHC-I-Präsentation unter Beteiligung verschiedener zellulärer Kompartimente und Transportwege (siehe 1.2.3.1). In der Literatur wurde ein zytosolischer und ein vesikulärer Transportweg beschrieben (Joffre et al., 2012). Welcher Antigen-Transportweg *in vivo* eine Rolle spielt, konnte bislang nicht geklärt werden und dieser ist abhängig von der APC-Subpopulation, der Antigenart und dem Mechanismus der Antigen-Aufnahme.

Der **zytosolische** *Cross-Präsentationsweg* postuliert die Translokation internalisierter Proteine aus dem Endosomenlumen in das Zytosol (Kovacsovic-Bankowski und Rock, 1995) mit anschließender proteasomaler Prozessierung (Palmowski et al., 2006). Dies konnte allerdings ausschließlich in CD8-positiven DC gezeigt werden (Lin et al., 2008). Es wird vermutet, dass die Proteintranslokation in das Zytosol durch einen bisher nicht identifizierten, endosomalen Transporter gewährleistet wird. Diskutiert wird eine Beteiligung des ER-assoziierten Degradations(ERAD)-Systems (Ackerman et al., 2006; Vyas et al., 2008). Der hoch konservierte ERAD-Komplex vermittelt die Retrotranslokation falsch gefalteter Proteine vom ER-Lumen in das Zytoplasma und konnte auch in endosomalen Kompartimenten nachgewiesen werden. Nach dem Proteintransport in das Zytosol erfolgen die Antigen-Prozessierung, die MHC-I-Beladung und der pMHC-I-Transport analog zum klassischen MHC-I-Präsentationsweg endogener Proteine.

Ein Peptidtransfer kann auch durch *gap-junctions* von einer infizierten Zelle in das Zytosol einer APC erfolgen. Dies ermöglicht beispielsweise den Transfer antigener Peptide von apoptotischen Zellen in nicht-apoptotische Nachbarzellen für eine effektive Antigenpräsentation (Neijssen et al., 2005; Pang et al., 2009).

In dem **vesikulären** *Cross-Präsentationsweg* erfolgt die MHC-I-Beladung der antigenen Peptide nach Internalisierung der Antigene im endozytotischen Kompartiment in einem Proteasom- und TAP-unabhängigen Prozess. Die Proteinprozessierung erfolgt ohne Proteintransfer in das Zytosol durch die Protease CathepsinS (Shen et al., 2004). Es

ermöglicht jedoch ausschließlich eine proteasomale Degradation die Generierung von Peptiden mit einer optimalen Länge von 8-9 AS für die MHC-I-Beladung (siehe 1.2.3.1).

Um eine Peptidprozessierung durch das Proteasom zu gewährleisten, wird ein alternativer **Phagosom-Zytosol-Phagosom**-Transportweg postuliert, der sowohl Komponenten des zytosolischen als auch des vesikulären Transportweges nutzt. Über Phagozytose internalisierte Antigene werden in Phagosomen degradiert. In diesen wurden ER-Komponenten wie TAP und die MHC-I-Beladungsmaschinerie nachgewiesen (Gagnon et al., 2002; Guermonprez et al., 2003; Houde et al., 2003). Obwohl Anhaltspunkte für eine Interaktion zwischen Phagosom und ER existieren, konnte bisher eine direkte ER-Phagosom-Fusion nicht belegt werden (Touret et al., 2005). Alternativ kann ein ER-Phagosom-Proteintransport über ER-abstammende Lipidspeicherorganelle (*Lipid Droplets*) erfolgen (Bougnères et al., 2009). Aus dem Phagosom wird das Antigen in das Zytosol transloziert. Nach Ubiquitylierung und proteasomaler Degradation werden antigene Peptide anschließend erneut TAP-vermittelt in das Phagosomenlumen re-importiert und auf phagosomale MHC-I-Moleküle geladen (Ackerman et al., 2003; Guermonprez et al., 2003).

Es wurde auch ein direkter Transfer intakter pMHC-I-Komplexe einer infizierten Zelle zu einer nicht infizierten APC über direkten Zell-Zell-Kontakt beschrieben. Dieser Mechanismus der Antigenpräsentation wird auch als **Cross-Dressing** bezeichnet (Dolan et al., 2006) und spielt bei der Aktivierung von *Memory* CD8 T-Zellen durch DC eine Rolle (Wakim und Bevan et al., 2011).

1.2.4 Phasen der CD8 T-Zellantwort

1.2.4.1 Initiale Aktivierung antiviraler CD8 T-Zellen

Die initiale Aktivierung von CD8 T-Zellen ist abhängig von der MHC-I-Präsentation antigener Peptide durch profAPC und der Interaktion mit kostimulatorischen Molekülen. Zu den profAPC gehören DC, Makrophagen und B-Zellen. Diese Zellen sind grundsätzlich in der Lage, antigene Peptide über MHC-I oder MHC-II zu präsentieren. Zur initialen Aktivierung naiver CD8 T-Zellen sind *in vivo* hauptsächlich DC befähigt (zur Übersicht: Yewdell, 2010), da diese eine hohe Anzahl an MHC-I und kostimulatorischen Molekülen exprimieren.

DC sind permissiv für die produktive CMV-Infektion (Riegler et al., 2000). Die CMV-Infektion von DC bewirkt eine Reduktion der MHC-I- und MHC-II-Oberflächenexpression sowie der kostimulatorischen Moleküle (Andrews et al., 2001), während die Expression inhibitorischer Liganden wie PD-L1 (*programmed death ligand-1*) verstärkt wird (Benedict et al., 2008). Die Fähigkeit zur Induktion einer antiviralen CD8 T-Zellantwort durch CMV-infizierte DC wird daher kontrovers diskutiert (Raftery et al., 2001; Gerna et al., 2005; Busche et al., 2013).

Nach der primären Aufnahme von Fremdanthigenen durch DC und einer zusätzlichen Stimulation durch inflammatorische Zytokine durchlaufen DC einen Reifungsprozess (zur Übersicht: Hammer und Ma, 2013). Die daraus hervorgehenden reifen DC migrieren über die

afferenten Lymphgefäße in sekundäre lymphatische Organe (Matin-Fontecha et al., 2003) und prozessieren effizient Antigene, die nachfolgend über MHC-I-Moleküle präsentiert werden. Vollständig ausgereifte DC sind zwar in der Lage effizient Antigene zu prozessieren und präsentieren, allerdings können sie keine exogenen Antigene aufnehmen (Wilson et al., 2006).

Naive CD8 T-Zellen wandern, auch in Abwesenheit inflammatorischer Prozesse, kontinuierlich aus den Blutgefäßen in den Lymphknoten (LK) ein. In einem Bereich unterhalb des subkapsulären Sinus findet das initiale *Priming*-Ereignis zwischen reifer DC und naiver T-Zelle statt (Hickman et al., 2008). Die Aktivierung der CD8 T-Zelle ist abhängig von der Interaktion des TCR mit dem pMHC-I-Komplex (Signal 1), der Interaktion kostimulatorischer Moleküle der T-Zelle mit ihren Liganden (Signal 2) sowie der Wirkung proinflammatorischer Zytokine (Signal 3). Die TCR-pMHC-Interaktion wird zusätzlich durch Adhäsionsmoleküle, wie Integrine, stabilisiert, die zur Ausbildung der „immunologischen Synapse“ führen (zur Übersicht: Cox und Zajac, 2010). Eine vollständige Aktivierung der CD8 T-Zell-Effektorfunktionen kann bereits wenige Stunden nach Antigen-Kontakt nachgewiesen werden (Norbury et al., 2002; Prlic et al., 2006).

Neuere Arbeiten zeigen, dass im LK weniger als 100 Antigen-präsentierende DC ausreichend sind, um eine T-Zellantwort zu initiieren (Celli et al., 2012). Die Frequenzen naiver CD8 T-Zellen spezifisch für einen pMHC-I-Komplex liegen bei ungefähr 1 unter 5×10^5 Zellen (Arstila et al., 1999).

Antigen-stimulierte CD8 T-Zellen proliferieren und differenzieren in Effektor und *Memory* CD8 T-Zellen (siehe auch 1.2.4.2). Effektor T-Zellen migrieren entlang chemotaktischer Gradienten in das periphere Gewebe. *Gepriimte* CD8 T-Zellen sind nicht mehr strikt auf kostimulatorische Moleküle angewiesen, können durch Antigenpräsentation auf einer Vielzahl von Zelltypen aktiviert werden (nicht-professionelle APC) und eliminieren nach erneutem Antigenkontakt infizierte Zellen sehr effizient.

1.2.4.2 **Memory-Phase der antiviralen CD8 T-Zellantwort**

Nach Kontrolle einer produktiven Infektion bilden *Memory* CD8 T-Zellen eine langfristige, protektive Barriere im Organismus. Sie sind in der Lage nach erneutem Antigenkontakt zu proliferieren und weitere Effektorfunktionen auszuüben. Durch die Expression des Oberflächenmoleküls CD62L (L-Selektin) können zwei *Memory* T-Zell-Subpopulationen unterschieden werden (zur Übersicht: Obar und Lefrançois, 2010b).

Das *Homing*-Molekül CD62L ermöglicht naiven T-Zellen wie auch den *Central Memory Cells* (TCM) die Migration in sekundäre lymphatische Organe (Springer et al., 1994). TCM sind befähigt, nach erneutem Antigenkontakt schnell zu proliferieren. Als Folge dieser Restimulation oder der Aktivierung naiver T-Zellen wird das CD62L-Molekül proteolytisch abgespalten (Kahn et al., 1994) und die resultierenden CD62L^{low} CD8 T-Zellen werden als *Effector Memory Cells* (TEM) bezeichnet. TEM patrouillieren in peripheren Geweben

(Masopust et al., 2001) und können nach erneutem Antigenkontakt ihre Effektorfunktionen schnell und effizient ausüben. Sie haben allerdings eine verminderte Proliferationskapazität.

Ein besonderes immunologisches Charakteristikum von CMV ist die Expansion einzelner CD8 T-Zellspezifitäten während der CMV-Latenz. Dieses Phänomen wird auch als **Memory Inflation** bezeichnet (Holtappels et al., 2000a; Karrer et al., 2003; Munks et al., 2006a). Man geht davon aus, dass die Latenz durch Phasen stochastischer Genexpression und sporadische Reaktivierungsereignisse unterbrochen wird (Kurz et al., 1999; Simon et al., 2006; Seckert et al., 2012). Diese Ereignisse können zur MHC-I-Präsentation viraler Peptide führen, die ihrerseits von Antigen-spezifischen TEM erkannt werden. Die CD8 T-Zellen expandieren nach dem erneuten Antigenkontakt, kontrollieren frühe Stadien der transkriptionellen Reaktivierung und vergrößern damit den CMV-spezifischen T-Zellpool (zur Übersicht: Seckert et al., 2013).

Die mCMV-spezifischen *Memory* CD8 T-Zellen sind in der Lage, die produktive CMV-Infektion nach adoptivem Transfer in mCMV-infizierte Rezipienten zu kontrollieren (Podlech et al., 2000). Im Gegensatz zur CMV-Infektion sind antivirale CD8 T-Zellen während der chronischen Infektionsphase, beispielsweise nach Lymphozytärer Choriomeningitisvirus-Infektion, nicht protektiv (Moskophidis et al., 1993). Die sogenannte *Exhaustion* antiviraler CD8 T-Zellen korreliert mit einer hohen Viruslast und der Expression des inhibitorischen Rezeptors PD-1 auf der Oberfläche der T-Zelle (Barber et al., 2006) und wird von dem Zytokin-Milieu bestimmt (Yi et al., 2010). Die mCMV-spezifischen *Memory* CD8 T-Zellen zeigen keine *Exhaustion* (Podlech et al., 2000; Snyder et al., 2008; Cicin-Sain et al., 2011).

Eine selektive Expansion einzelner Spezifitäten in der *Memory*-Phase der CD8 T-Zellantwort wurde im Haplotyp H-2^d gegen die Epitope IE1 und m164 (Holtappels et al., 2000a; Holtappels et al., 2002c; Karrer et al., 2003; Snyder et al., 2011) und im Haplotyp H-2^b gegen IE3, M38 und m139 (Munks et al., 2006a) nachgewiesen. Welche biologischen Kriterien bestimmen, ob ein Epitop eine expandierende *Memory* CD8 T-Zellantwort induzieren kann, ist derzeit weitgehend unbekannt. Aktuelle Arbeiten konnten allerdings zeigen, dass die genannten Epitope eine geringere Abhängigkeit von der Prozessierung durch das Immunoproteasom zeigen (Hutchinson et al., 2011) und die an der *Memory Inflation* beteiligten APC nicht-hämatopoetischen Ursprungs sind (Seckert et al., 2011; Torti et al., 2011a).

Im Modell der mCMV-Infektion konnte gezeigt werden, dass der *Memory* CD8 T-Zellpool durch den kontinuierlichen Ersatz von terminal-differenzierten *short lived effector cells* (SLEC) aufrechterhalten wird (Snyder et al., 2009). Der SLEC-Phänotyp ist gekennzeichnet durch eine vermehrte Antigen-induzierte T-Zell-Proliferation (Ibegbu et al., 2005; Thimme et al., 2005).

Eine immunologische Phänotypisierung der HCMV-spezifischen CD8 T-Zellsubpopulationen zeigte, dass es sich hauptsächlich um terminal differenzierte T-Zellen handelt (Champagne et al., 2001). Sie haben nur geringe Proliferationskapazität (Henson et al., 2009), da sie

inhibitorische Rezeptoren wie KLRG1 (*killer cell lectin-like receptor subfamily G1*) exprimieren. Eine minore Subpopulation nicht-terminal differenzierter *Memory* T-Zellen ist weiterhin proliferationsfähig und übt nach Restimulation sowie Kostimulation eine verstärkte Effektorfunktion aus (Waller et al., 2007).

In immunkompetenten Individuen sezerniert die Mehrheit HCMV-spezifischer *Memory* CD8 T-Zellen die Zytokine TNF α , MIP1- β und IFN γ (Gillespie et al., 2000; Scheinberg et al., 2009). Klinische Studien konnten belegen, dass die HCMV-spezifischen *Memory* CD8 T-Zellen einen Schutz nach HCMV-Reaktivierungen in Transplantationspatienten ermöglichen (Zhou, 2009).

1.3 Immunmodulation durch CMV

Im Laufe des evolutionären Adaptationsprozesses an ihren jeweiligen Wirt haben die Cytomegaloviren der verschiedenen Spezies Gene erworben, die nicht für die Replikation essenziell sind, sondern die Virus-Wirt-Interaktion modulieren. Zu diesen Genen gehören die CMV-kodierten Immunevasions-Gene, deren Expression Komponenten der angeborenen und adaptiven Immunität moduliert. Zwischen Immunevasions-Genen unterschiedlicher CMV-Spezies existieren keine Sequenzhomologien. Allerdings haben Cytomegaloviren analoge Mechanismen zur Immunevasion entwickelt. Zentral ist hierbei die Unterdrückung der antiviralen CD8 T-Zellantwort durch Interferenz mit dem MHC-I-Präsentationsweg der infizierten Zelle, vermittelt durch virale Immunevasionsproteine (Reddehase, 2002; Reddehase et al., 2004; Holtappels et al., 2006; Hansen und Bouvier, 2009; Lemmermann et al., 2012).

Die Expression der HCMV-kodierten Immunevasionsproteine erfolgt in allen Phasen der viralen Genexpression, um die Erkennung infizierter Zellen effizient zu verhindern (zur Übersicht: Noriega et al., 2012). Eine kritische Phase stellt die IE-Phase dar, da sowohl Virion-assoziierte als auch neusynthetisierte IE-Proteine für die proteasomale Prozessierung und MHC-I-Präsentation zur Verfügung stehen. Während die IE-Expression der HCMV-kodierten Immunevasine gpUS3, gpUS2 und gpUS11 nachgewiesen wurde (Ahn et al., 1996; Hesse et al., 2013), werden die bekannten mCMV-kodierten Immunevasionsproteine m152/gp40, m06/gp48 und m04/gp34 (zur Übersicht: Reddehase, 2002; Lemmermann et al., 2012) in der E-Phase des viralen Replikationszyklus exprimiert.

Die Quantifizierung der Antigenpräsentation in An- und Abwesenheit viraler Immunevasine wurde durch die Expression des Modellpeptids SIINFEKL möglich (Lemmermann et al., 2010a). Eine Infektion von Fibroblasten mit den rekombinanten Viren mCMV-SIINFEKL oder mCMV- Δ m06 Δ m152-SIINFEKL zeigte, dass die Expression der Immunevasine die K^b-SIINFEKL-Präsentation um einen Faktor >100 reduziert. Die Gesamtexpression aller K^b-Moleküle wird lediglich um den Faktor ~2 reduziert (Lemmermann et al., 2010a). Diese Beobachtung bestätigt den starken Einfluss der Immunevasine m152 und m06 auf den Transport neu generierter pMHC-I-Moleküle vom ER zur Zelloberfläche, während die Abnahme von bereits auf der Zelloberfläche vorhandenen MHC-I-Molekülen erst verzögert

durch normalen *Turnover* erfolgt. Zusätzlich postulierte Tomaš et al. (2010) unabhängig von der Expression der Immunevasine eine beschleunigte Inhibition des MHC-I-*Recyclings* in der E-Phase der viralen Genexpression durch einen noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus.

1.3.1 Rolle von m152 als zentrales Immunevasin des murinen CMV

Das MHC-I-ähnliche Membranglykoprotein **m152/gp40** (nachfolgend m152) retendiert pMHC-I-Komplexe in einem ERGIC (ER-Golgi-*intermediate compartment*)/cis-Golgi-Kompartiment (Ziegler et al., 1997; Ziegler et al., 2000) und wird daher auch als *Retainer* bezeichnet. Es verhindert folglich die Präsentation antigener Peptide und inhibiert so die Aktivierung antiviraler CD8 T-Zellen (Del Val et al., 1989; 1992). Die lumenale Domäne des m152-Proteins interagiert transient mit dem pMHC-I-Komplex und induziert möglicherweise eine post-translationale Modifikation, die den pMHC-I-Transport verhindert (Ziegler et al., 2000). Während das m152-Protein den Golgi-Apparat passiert und lysosomal abgebaut wird, akkumulieren die pMHC-I-Komplexe im ERGIC mit der Konsequenz, dass die pMHC-I-Dichte auf der Oberfläche infizierter Zellen reduziert wird (Del Val et al., 1989; 1992) (siehe Abb. 1.2).

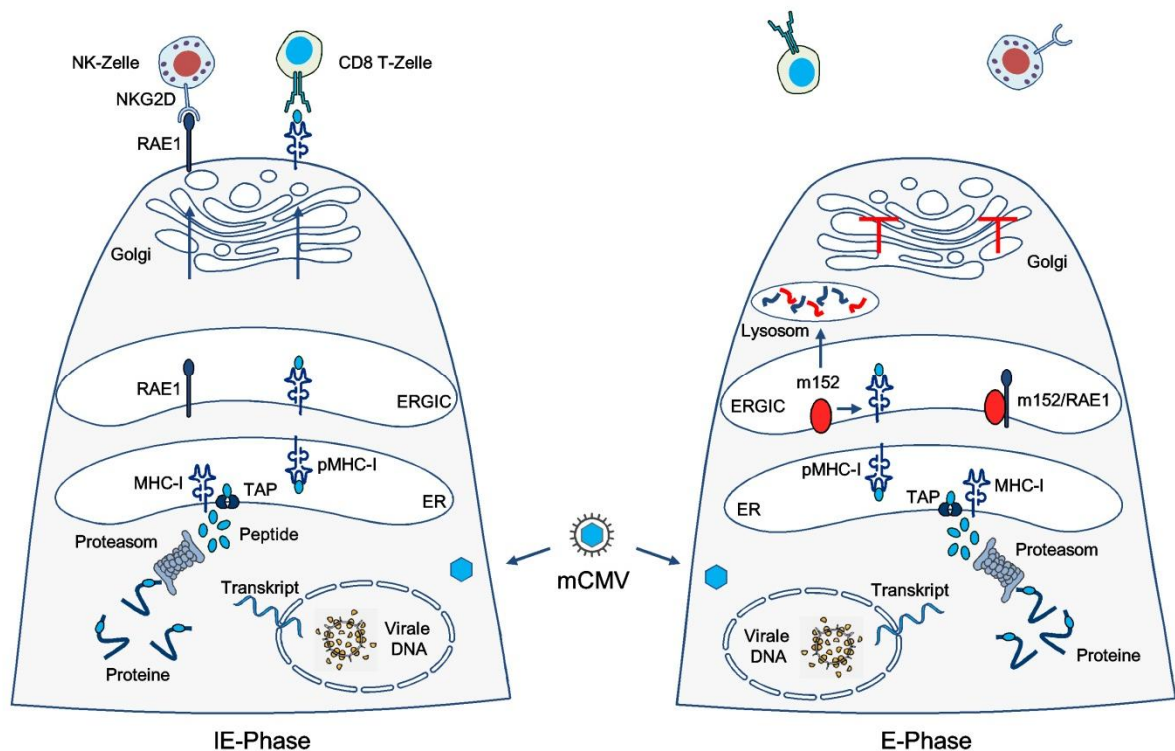


Abb. 1.2 Funktionen des Immunevasins m152. Während der IE-Phase erfolgt eine Aktivierung von CD8 T-Zellen durch die MHC-I-Präsentation viraler Antigene, sowie eine RAE1/NKG2D-vermittelte NK-Zellaktivierung. Erst in der E-Phase retendiert das Immunevasin m152 pMHC-I- und RAE1-Moleküle im ERGIC und verhindert somit die Aktivierung von CD8 T-Zellen und NK-Zellen.

Da die alleinige Deletion des ORF *m152* die pMHC-I-Präsentation infizierter Zellen wieder herstellt, gilt m152 formal als zentrales Immunevasin von mCMV (Krpmotić et al., 1999;

Holtappels et al., 2004; Holtappels et al., 2006; Lemmermann et al., 2012). Als m152-Funktionsanalogon gilt das HCMV-kodierte gpUS3-Glykoprotein, da es in Assoziation mit Tapasin die Beladung der MHC-I-Moleküle verhindert und diese im ER arretiert (Park et al., 2004; Ahn et al., 1996; Jones et al., 1996).

Da die Expression der Immunevasine in einer Reduktion der pMHC-I-Oberflächenexpression infizierter Zellen resultiert, ermöglicht dies potenziell eine NK-Zellaktivierung. Dieser Mechanismus wird auch als *missing-self-recognition* bezeichnet (siehe 1.2.1). Um die Aktivierung von NK-Zellen zu verhindern, reduziert das m152-Protein auch die Oberflächenexpression von Liganden des aktivierenden NK-Zellrezeptors NKG2D (Krmpotić et al., 2002; Lodoen et al., 2003). Zu diesem Zweck interferiert das m152-Protein mit den MHC-I-ähnlichen NKG2D-Liganden der RAE1-Molekülfamilie. Die Assoziation zwischen m152 und den verschiedenen RAE1-Isoformen variiert; die höchste Affinität konnte für RAE1 γ beobachtet werden (Zhi et al., 2010). In einer aktuellen Publikation konnte die Kristallstruktur des m152/RAE1 γ -Komplexes analysiert werden (Wang et al., 2012). Diese Analyse ergab, dass m152 in einer Zangen-ähnlichen Struktur mit RAE1 γ interagiert. Obwohl drei potenzielle Glykosylierungsstellen im m152-Protein vorliegen (Ziegler et al., 1997), ergab die Strukturanalyse lediglich zwei glykosylierte AS an den Positionen Asn61 und Asn208. Diese Glykosylierungen haben allerdings keinen Einfluss auf die Ausbildung des m152/RAE1 γ -Komplexes (Wang et al., 2012; Fink et al., 2013) und die pMHC-I-Retention (Fink et al., 2013).

Das mCMV-kodierte Immunevasionsprotein **m06/gp48** (nachfolgend m06) bindet im ER stabil an pMHC-I-Komplexe und vermittelt deren gerichteten Transport vom ER in den endolysosomalen Abbauweg der Zelle (Reusch et al., 1999; Reusch et al., 2002). Im Lysosom erfolgt der Abbau des m06-pMHC-I-Komplexes. Auch **m04/gp32** (nachfolgend m04) bindet im ER stabil an pMHC-I-Komplexe, verhindert allerdings nicht deren Präsentation, sondern wird über den sekretorischen Transportweg als m04-pMHC-I-Komplex auf der Zelloberfläche präsentiert (Kleijnen et al., 1997; Lu et al., 2006). Generell gilt m04 nicht als Immunevasin der CD8 T-Zellerkennung, da in alleiniger Anwesenheit von m04 mCMV- Δ m06 Δ m152-infizierte Zellen weiterhin von CTLs erkannt werden (Holtappels et al., 2006; Pinto et al., 2006). Allerdings verhindert m04 die NK-Zellaktivierung durch Interaktion mit inhibitorischen Rezeptoren der Ly49-Familie (Babić et al., 2010).

1.4 Ziel der Arbeit

Die Initiation einer protektiven CD8 T-Zellantwort ist essenziell für die Kontrolle der akuten und chronischen CMV-Infektion. Im Zuge evolutionärer Adaptationsprozesse zwischen Wirt und Virus entwickelten sich virale Gene, deren Expression der effektiven Immunkontrolle durch das wirtseigene Immunsystem entgegen wirkt. Im Modell der murinen CMV (mCMV)-Infektion interagiert das zentrale Immunevasin m152 transient mit Peptid-beladenen MHC-I-Molekülen, retendiert diese im ERGIC und inhibiert dadurch die Erkennung infizierter Zellen durch antivirale CD8 T-Zellen in der *Early* (E)-Phase der Infektion. Allerdings können bereits in der *Immediate Early* (IE)-Phase sowohl Virion-assoziierte als auch neusynthetisierte, virale IE-Proteine prozessiert werden, vor der nachgeschalteten Immunevasion auf der Oberfläche der Zellen gekoppelt an MHC-I-Moleküle präsentiert werden, und eine protektive CD8 T-Zellantwort induzieren. Daher sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Präsentation viraler antigenen Peptide durch eine zusätzliche m152-Expression in der IE-Phase unterdrückt werden.

Um dieses Ziel zu erreichen, sollte nach Integration des *m152*-ORF in die *ie2*-Genregion unter Kontrolle des regulatorischen MIE-PEEP-Genelements und nachfolgender Generierung rekombinanter Viren mittels BAC-Technologie eine molekularbiologische, biochemische und funktionelle Charakterisierung der verwendeten mCMV-Rekombinanten erfolgen.

Im Vordergrund der Arbeit stand die Untersuchung eines möglichen Einflusses der verstärkten Immunevasion nach m152-Expression in der IE- und E-Phase auf die akute Phase und die *Memory*-Phase der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort im immunkompetenten Wirt. Bisherige Studien zum Einfluss der viralen Immunevasion auf die mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort sind unvollständig, da ausschließlich mCMV-Rekombinanten verwendet wurden, in denen Immunevasine deletiert wurden (Gold et al., 2002; Munks et al., 2007; Böhm et al., 2008, Busche et al., 2013). Der in der vorliegenden Arbeit entwickelte Ansatz der verstärkten Immunevasion ist daher neu.

Es wurde erwartet, dass eine verstärkte m152-Expression auf das mCMV-spezifische CD8 T-Zell-*Priming* nur einen marginalen Einfluss hat, da bereits gezeigt wurde, dass das *Priming* im immunkompetenten Wirt unabhängig von der Expression viraler Immunevasine ist. Dieses Phänomen wurde durch *Cross*-Präsentation auf nicht-infizierten profAPC erklärt, in denen folgerichtig keine Immunevasine exprimiert werden (Gold et al., 2002; Munks et al., 2007; Böhm et al., 2008; Busche et al., 2013). Von der Expression der Immunevasine sollte vielmehr die *Memory* CD8 T-Zellantwort beeinflusst werden, da diese von der direkten Antigenpräsentation abhängt (Seckert et al., 2011; Torti et al., 2011a).

Zusätzlich wurde die antivirale CD8 T-Zellantwort nach Infektion von KMT-Rezipienten bestimmt, da es sich hierbei um ein klinisch relevantes Infektionsmodell handelt (Holtappels et al., 1998; Simon et al., 2006; Böhm et al., 2009).

2 Material

2.1 Allgemeine Laborgeräte und Reagenzien

2.1.1 Allgemeine Laborgeräte

Gerät	Typ, Hersteller, Herkunft
Brutschrank für Bakterien	B6, Heraeus, Hanau
Brutschrank für Zellen	HERA cell 240, Heraeus, Hanau
Bunsenbrenner	FIREBOYeco, INTEGRA Bioscience AG, Zizers, Schweiz
Elektroporator	Gene Pulser™, BioRad, München
Gel-Dokumentationsanlage	Digit Store, INTAS, Göttingen UVstar320nm, Biometra, Göttingen
Heizplatte/Magnetrührer	IKA Combimag RET, Janke und Kunkel, Staufen
Invertmikroskop	Leica, Wetzlar
Mikroskop	Se-Ph-3, Nikon, Düsseldorf Olympus SZX12, Olympus, Hamburg
Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Multistepper	Eppendorf, Hamburg
Photometer	Nanodrop ND-1000, PeqLab, Erlangen
Pipetten	Gilson, Villies Le Bel, Frankreich, Eppendorf, Hamburg Rainin, Mettler Toledo, Oakland
Pipetierhilfe	Pipetboy, INTEGRA Bioscience, Fernwald
<i>Power Supply</i>	EPS 301, EPS 600, Pharmacia, Erlangen
Schüttler	KS 260 basic, IKA-Werke GmbH&CO.KG, Staufen
Schwingmühle	Mixer Mill MM300, Retsch GmbH, Haan
Sezierbesteck	Hammacher, Karl Hammacher GmbH, Solingen
Sicherheitswerkbank	Template Tamer Captair Bio, Erlab, Köln
Sterile Werkbank	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge	5424, Eppendorf, Hamburg 5417R, Eppendorf, Hamburg Multifuge 3L, Heraeus, Hanau
<i>Thermocycler</i>	7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems, Foster, USA
Thermoschüttler	Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge	CombiPlus, ThermoScientific, Bonn

Vollschutz Kleintierbestrahlungsanlage	Typ OB 58-BA, Buchler, Braunschweig
Waage	BP61, Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zellbestrahlungsanlage	Gammacell 2000, Molsgaard Medical, Dänemark
Zentrifuge	Sorvall RC6+ centrifuge, ThermoScientific, Bonn
Zählkammern	Neubauer-improved, LO-Laboroptik, Bad Homburg
Zytofluorometer	Cytomics FC500, Beckman Coulter, Krefeld

2.1.2 Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien

Gerät	Typ, Hersteller, Herkunft; Herstellerteilenummer
Autoradiographiefilm	Lumi-Film Chemilumineszent Detection Film, Roche, Mannheim; Nr. 11666657001
Einfrierröhrchen	1,8ml CryoTube, Nunc International, Roskilde, Dänemark; Nr. 375418
Einmal-Plastikpipetten	5ml, Greiner bio-one, Nürtingen; Nr. 606180 10ml, Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 357551 25ml, Greiner bio-one, Nürtingen; Nr. 760180
Einweg-Plastikschalen	100/20mm, Greiner bio-one, Nürtingen; Nr. 664102
Einmal-Spritzen	1ml, Braun, Melsungen; Nr. 9161406V 25ml, Braun, Melsungen; Nr. 4606027 50ml, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 308500
Elektroporationsküvetten	1mm Spaltbreite, PeqLab, Erlangen; Nr. 71-2010-LE 2mm Spaltbreite, PeqLab, Erlangen; Nr. 71-2020-LE
ELISpot 96 <i>Well</i> -Platte	MultiScreen _{HTS} , Millipore, Schwalbach; Nr. MSIPN4550
FACS Röhrchen	12x75mm Rundboden RIA tube, Falcon, Becton Dickinson Heidelberg; Nr. 2008
Filterspitzen	20µl Rainin, Mettler Toledo, Oakland, USA; Nr. GPL10F 200µl Rainin, Mettler Toledo, Oakland, USA; Nr. GPL200F 1000µl Rainin, Mettler Toledo, Oakland, USA; Nr. GPL1000F
Kanülen	0,4x12mm, Braun, Melsungen; Nr. 4665406 0,45x12mm, Braun, Melsungen; Nr. 4657683
MACS Säulen	LS MACS Separation Columns, Miltenyi, Bergisch Gladbach; Nr. 130-042-401
Mahlkugeln für Schwingmühle	3mm Stahlkugeln, Wälzlager Vertrieb Wiesbaden GmbH, Mainz Kastel; Nr. 1022184
PVDF-Membran	Millipore, Schwalbach; Nr. IPVH00010
Reaktionsgefäße	1,5ml, Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 72.690 2ml, Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 72.695 5ml, Greiner bio-one, Nürtingen; Nr. 115261

	15ml, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 352096
	50ml, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353070
Reaktionsgefäße für PCR	0,2ml MicroAmp, Applied Biosystems, Foster, USA; Nr. N801-0840
	PCR Streifen 1x8 Gefäße 0,2ml, Greiner bio-one, Nürtingen; Nr. 673210
	Strip Caps für 8 Gefäße, Flachdeckel, Greiner bio-one, Nürtingen; Nr. 373250
Skalpell	Braun, Melsungen; Nr. BA211 und BA221
Sterilfilter	Spritzenvorsatzfilter 0,45µm, VWR, Darmstadt; Nr. 28145-481
	500ml Stericup Express Plus 0,22µm, Millipore, Schwalbach; Nr. SCGPUO5RE
Whatman-Papier	Whatman Chromatography Paper, Whatman, Dassel; Nr. 3030690
Zellkulturplatten	6-Well-Flachbodenplatten, beschichtet, Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353046
	24-Well-Flachbodenplatten, unbeschichtet, Greiner, Nürtingen; Nr. 662102
	48-Well-Flachbodenplatten, beschichtet, Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353078
	96-Well-Gewebekulturplatten, beschichtet, steril, Greiner, Frickenhausen; Nr. 655180
	96-Well-Rundbodenplatten, unbeschichtet, Greiner, Frickenhausen; Nr. 650101
Zellkulturflaschen	75cm ² , Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353135
Zellkulturschalen	60x15mm, unbeschichtet, Greiner bio-one, Nürtingen; Nr. 628161
	150x25mm, beschichtet, Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353025
Zellnylonsieb	40µm, Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 352340
	100µm, Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 352360
Zentrifugenröhrchen	14ml Spitzboden; Falcon, Heidelberg, Nr. 352096
	50ml Spitzboden, Falcon, Heidelberg, Nr. 352070
Zellschaber	25cm, Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 83.1830

2.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller, Herkunft; Herstellerteilenummer
Acrylamid (Rotiphorese Gel30)	Roth, Karlsruhe; Nr. 3029.1
Actinomycin D	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim; Nr. 856258
Agarose	BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, USA; Nr. 840.004

Ampicillin	Roth, Karlsruhe; Nr. K029.1
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim; Nr. A3678
Bacto Agar	BD Bioscience, Heidelberg; Nr. 214010
BCIP/NBTplus	MABTECH, Hamburg; Nr. 3650
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe; Nr. 4221.1
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe; Nr. 512.1
Bovines Serum Albumin (BSA)	Ortho-Clinical Diagnostics Inc., Neckargemünd; Nr. 718110
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe; Nr. 3886.2
Cycloheximid	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim; Nr. C-7698
Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs)	Fermentas, St. Leon-Roth; Nr. R0182
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe; Nr. 4720.21,
4-Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe; Nr. 6908.1
DNA-Längenstandard	1kB DNA Ladder, Invitrogen, Karlsruhe; Nr. 15615-016
DPBS	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe; Nr. 14190
Erythrozyten-Lysepuffer	Sigma Aldrich, Deisenhofen; Nr. 127757
Ethanol 100%	Roth, Karlsruhe; Nr. P076.1
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe; Nr. 2218.1
EDTA	Roth, Karlsruhe; Nr. 7533.3
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich; Nr. A15-151
Glycerin (86%)	Roth, Karlsruhe; Nr. 7533.3
Heparin	Ratiopharm, Ulm, 25000 I.E./5ml; Nr. 5394.02.00
HEPES	Gibco, Eggenstein; Nr. 15630-056
Isopropanol	Hedinger, Stuttgart;
Kanamycin	Roth, Karlsruhe; Nr. T832.2
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein (Nr. 25030-024)
Methanol	VWR, Darmstadt; Nr. 20874307
Methylcellulose	VWR, Darmstadt; Nr. 25499.183
Milchpulver	Roth, Karlsruhe; Nr. T145.3
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe; Nr. 5741.1
Penicillin/Streptomycin	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe; Nr. 15140
Protein-Längenstandard	Fermentas, St. Leon-Roth; Nr. SM0671
RNase A	QIAGEN, Hilden; Nr. 1007885
ROX	Genova Diagnostics, England; Nr. 80-3315-10

Saccharose	Roth, Karlsruhe; Nr. 4621.1
TEMED	Roth, Karlsruhe; Nr. 2367.3
Trypanblau	Biochrom, Berlin; Nr. L6323
Trypsin	Difco, Michigan, USA; Nr. 15400-054
Türks-Lösung	Merck, Darmstadt; Nr. 1.09277
Tween20	Sigma Aldrich, Deisenhofen; Nr. P1379
Yeast Extract Servabacter	Serva, Heidelberg; Nr. 245402

2.1.4 Kits

Kit	Hersteller, Herkunft; Herstellerteilenummer
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Pierce, Bonn; Nr. 23225
Cytofix/Cytoperm Plus Kit	BD Bioscience, Heidelberg; Nr. 555028
DNeasy Blood & Tissue Kit	QIAGEN, Hilden; Nr. 69506
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, München; Nr. RPN 2132
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Roche, Mannheim; Nr. 11858874001
OneStep RT-PCR Kit	QIAGEN, Hilden; Nr. 210212
PolyFect Transfection Reagent	QIAGEN, Hilden; Nr. 301105
QIAGEN Plasmid Mini Kit	QIAGEN, Hilden; Nr. 12125
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden; Nr. 12163
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden; Nr. 28704
QIAshredder	QIAGEN, Hilden; Nr. 79656
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	QIAGEN, Hilden; Nr. 204143
RNase-free DNase Set	QIAGEN, Hilden; Nr. 79254
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden; Nr. 74106

2.1.5 Enzyme

Enzym	Hersteller, Herkunft; Herstellerteilenummer
<i>Calf Interstitial Phosphatase (CIP)</i>	New England Biolabs (NEB), Frankfurt a.M.; Nr. M1290L
DNase I	Sigma Aldrich, Deisenhofen; Nr. DN-25
<i>HotStar Taq-DNA-Polymerase</i>	QIAGEN, Hilden; Nr. 203205
<i>HotStar HiFidelity DNA Polymerase</i>	QIAGEN, Hilden; Nr. 202602
Kollagenase A	Roche, Mannheim; Nr. 10103586001

Restriktionsendonukleasen	NEB, Frankfurt a. Main, Fermentas, St. Leon-Roth
RNase (DNase frei)	QIAGEN, Hilden, Nr. 19101
Streptavidin-Alkalin Phosphatase	MEBTECH, Nacka Strand, Schweden; Nr. 3310-10
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Roth; Nr. EL0335

2.1.6 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers (Ulm) oder Metabion (Martinsried) synthetisiert, wobei die erhaltenen Lyophilisate in *Aqua bidest.* (*Aqua* B. Braun, Melsungen) oder Tris pH 8,0 (Sonden) resuspendiert wurden. Die Positionsangaben der mCMV-Sequenzen erfolgen nach Rawlinson et al. (1996) (GenBank Accession No.: NC_004065). Bei anderen Sequenzen ist die *GenBank Accession* Nummer angegeben. Restriktionsstellen, welche durch PCR eingefügt wurden, sind fett markiert.

Tab. 2.1 Oligonukleotide zur Generierung von rekombinanten BAC Plasmiden

Primer	Sequenz
m152 <i>HpaI</i> -For	5'-GAAGTTAAAC-n'184.240 CATATAAAAGCTGTCCCCCATGCCATTCTGA-n'184.269-n'211.468- TCAGACGCGGGCTACTCCCGAAAGAGTAAC-n'211.439-3'
m152 <i>HpaI</i> -Rev	5'-GGAGTTAAAC- n'210.056- TGACTAATAAGTTATCTTTATTGTACAAGTGTGTGTGTTATCCCTGA GCCATTCCAG- n'210.115-3' Amplifikatgröße: 1428 bp

Tab. 2.2 Oligonukleotide zur Sequenzierung rekombinanter BAC Plasmide

Primer	Sequenz
Na1x-Rev ie2.3-For	n'184.168-184.189; 5'-GCAAATTAGGGGATTTTCAGTGC-3' n'184.623-184.604; 5'-TGGGGTCTAAGGCACAGATC-3' Amplifikatgröße: 455 bp
m152 Δ ie2-For	n'184.365-184.346, 5'-AGCCCAATGCAACCTTACCC-3' Amplifikatgröße mit Primer ie2.3-Rev: 197 bp

Tab. 2.3 Oligonukleotide für Quantifizierungen mit SYBR Green

Primer	Sequenz
LC-gB-For3 LC-gB-Rev3	n'84.017-84.037; 5'-GAAGATCCGCATGTCCTTCAG-3' n'84.151-84.131; 5'-AATCCGTCCAACATCTTGTCG-3' Amplifikatgröße: 115 bp
LC-PTHrP-For2 LC-PTHrP-Rev2	5'-GGTATCTGCCCTCATCGTCTG-3' 5'-CGTTTCTTCCTCCACCATCTG-3' GeneBank Accession No.: M60056; n'186-206 Amplifikatgröße: 142 bp

Tab. 2.4 Oligonukleotide für die quantitative RT-PCR

Primer/Sonden-Paar	Sequenz
m152-For2	n´210.668-210.688; 5´-ACTCCGTTTCGCGAGACTGATG-3´
m152-Rev4	n´210.783-210.760; 5´-GACAACCCAGACACAACGAATAC-3´
m152-Taq (Sonde)	n´210.696-210.716; 5´[6~FAM]-CCAACGGAACCTGAGTGCGCA[TAMRA~6~FAM]-3´ Amplifikatgröße: 115 bp
IE1-For1	n´181.184-181.210; 5´-TGGCTGATTGATAGTTCTGTTTTATCA-3´
IE1-Rev1	n´181.438-181.421; 5´-CTCATGGACCGCATCGCT-3´
IE1-Taq1(Sonde)	n´181.239-181.249 (Exon4), n´181.372-181.385 (Exon3) 5´[6~CY5]-AACGCTCCTCACTGCAGCATGCTTG[BHQ~6~CY5]-3´ Amplifikatgröße: 133 bp

2.1.7 Antikörper

2.1.7.1 Antikörper für den Western Blot

Antikörper	Typ/Klon	Verdünnung	Bezugsquelle
anti-m152	3D10	1:250	Dr. E. Kremmer, Helmolz Zentrum, München
anti-IE1	Croma101	1:2000	Dr. Stipan Jonjić Univerity of Rijeka, Kroatien
anti-IE2(N)	pAk	1:250	Peptide Specialty Laboratories, Heidelberg
anti-Maus-HRP	pAk	1:10000	DAKO, Nr. P0260
anti-Kaninchen-HRP	pAk	1:10000	DAKO, Nr. P0217
anti-Ratte-HRP	pAK	1:10000	DAKO, Nr. P0217

pAK=polyklonaler Antikörper

2.1.7.2 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Klon	Menge	Bezugsquelle
Ratte anti- Maus CD8a-FITC	53-6.7	0,5 µg/10 ⁶ Zellen	BD Bioscience Nr. 553031
Ratte anti- Maus CD8a-PE-Cy5	53-6.7	0,5 µg/10 ⁶ Zellen	BD Bioscience Nr. 553034
Ratte anti- Maus CD62L-PE/Cy7	Mel-14	0,3 µg/10 ⁶ Zellen	Beckman Coulter Nr. 731715
anti- Maus KLRG1-PE	2F1	0,5 µg/10 ⁶ Zellen	eBioscience Nr. 12-5893-82
anti- Maus IFN-γ-FITC	XMG1.2	0,25 µg/10 ⁶ Zellen	BD Bioscience Nr. 554411
anti- Maus CD16/CD32 (Fc-Block)	93	1 µg/10 ⁶ Zellen	eBioscience Nr. 14-0161

2.1.7.3 MHC-Multimere für die Durchflusszytometrie

Die Synthese der APC-konjugierten MHC-DextramereTM (Multimere) wurde von der Firma Immudex (Kopenhagen) durchgeführt. Hierbei wurde eine optimierte Anzahl an peptidbeladenen MHC-Klasse-I-Molekülen, sowie das Fluorochrom über ein Dextranpolymer verknüpft. Für die Oberflächenfärbung wurden jeweils 10µl Dextramer pro 10⁶ Zellen eingesetzt.

Bezeichnung	Peptid	MHC-I-Präsentation
IE1-Multimer	YPHFMPNTL	H2-L ^d
m164-Multimer	AGPPRYSRI	H2-D ^d
M105-Multimer	TYWPVVSDI	H2-K ^d

2.1.7.4 Microbeads-gekoppelte Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Isotyp	Endkonzentration	Bezugsquelle
anti-Maus CD8 (Ly2) <i>Microbeads</i>	Ratte	IgG2a	10µl/10 ⁷ Zellen	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Nr. 130-049-40

2.1.7.5 Antikörper für den ELISpot-Assay

Bezeichnung	Klon	Isotyp	Endkonzentration	Bezugsquelle
Primär Ak: anti-Maus IFN-γ	RMMG-1	Ratte IgG1	5µg/ml	Biosource Europe Solingen Nr. AMC4834
Sekundär Ak: anti-Maus IFN-γ Biotin-gekoppelt	XMG1.2	Ratte IgG1	1µg/ml	Pharmigen Heidelberg Nr. 18112D

2.1.7.6 Antikörper für die *in vivo* Depletion von Lymphozyten

Bezeichnung	Klon	Menge	Bezugsquelle
anti-asialo GM1 Serum Kaninchen	polyklonal	25µl	WAKO Chemicals (Osaka, Japan Nr. 986-10001)
anti-CD8 Ascites-Antikörper Ratte	YTS 169.4	1mg	Dr. Stipan Jonjić University of Rijeka, Kroatien

2.2 Bakterien

Die Generierung des *Shuttle*-Plasmids sowie die mCMV-BAC-Mutagenese wurden mit Hilfe von Bakterien des *E.coli*-Stammes DH10B durchgeführt. Dieser Stamm eignet sich gut für die Propagierung großer Konstrukte und besitzt eine hohe Transformationseffizienz (Durfee et. al, 2008).

Genotyp: F- *mcrA*Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74recA1 endA1 araD139*Δ(*ara, leu*)7697 *galU galKλ-rpsL nupG*

2.3 Viren

Die Experimente in der vorliegenden Arbeit wurden mit den folgenden Viren durchgeführt:

MW97.01 (mCMV-WT.BAC): Die chimäre mCMV-Rekombinante wurde aus dem Genom des Laborstammes ATCC VR-194 sowie dem *Hind*III-E-Fragment des Laborstammes K181 über *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC)-Mutagenese generiert. Nach Transfektion des mCMV-BAC-Genoms in embryonale Fibroblasten (MEF) und Exzision der von Sequenzhomologien flankierten BAC-Sequenz mittels homologer Rekombination durch den eukaryotischen Rekombinationsapparat, konnte aus dem Überstand das rekonstituierte Virus MW97.01 isoliert werden (Wagner et al., 1999).

Eine *frameshift*-Mutation im mCMV-WT.BAC Plasmid (pSM3fr) vermittelt allerdings eine reduzierte Virusproduktion in der Speicheldrüse (Jordan et al., 2011). Da die generierten Viren auf dem pSM3fr-Plasmid basieren, wurde als Referenz in allen Experimenten mCMV-WT.BAC (WT.BAC) verwendet. Unserer Arbeitsgruppe wurde WT.BAC freundlicherweise von Prof. Dr. U. H. Koszinowski (ehemals Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Mikrobiologie in München) zur Verfügung gestellt.

mCMV- Δ m152 Δ Kan: Die Virusrekombinante basiert auf dem mCMV-BAC Plasmid pSM3fr (Wagner et al., 1999), wurde durch Deletion zwischen den Nukleotiden 210244 und 211379 (GenBank Accession No.: NC_004065) hergestellt und wird im Folgenden als Δ m152 bezeichnet.

mCMV-m152.IE+E: Dieses rekombinante Virus wurde zur ektopischen Expression des Immunevasins m152 unter Kontrolle des *ie2*-Promotors im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellt. Die *Immediate Early* (IE)-Phase Expression erfolgt in dieser Rekombinanten zusätzlich zur regulären *Early* (E)-Phasen Expression. Die Klonierung des Immunevasins m152 erfolgte an Position n`184.236 (GenBank Accession No.: NC_004065) über Zwei-Schritt-BAC-Mutagenese (Messerle et al., 1997; siehe 3.3.14) unter Integration von 3'-UTR, ORF und 5'-UTR der authentischen Sequenz (n`211.466-210.056) (siehe Abb. 4.1). Das kürzlich beschriebene *Interferon Regulatory Factor Element* (IRFE) in der *m152*-Promotorregion (Wilhelmi, Vortrag 4th Mini Herpesvirus Workshop Berlin, 2009) ist nicht enthalten.

mCMV-m152.IE: Ausgehend vom BAC-Plasmid mCMV- Δ m152 Δ Kan erfolgte die Virusgenerierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels BAC-Mutagenese analog zur Virusrekombinante mCMV-m152.IE+E. Da das authentische E-Phasen Gen *m152* deletiert ist, wird m152 ausschließlich unter Kontrolle des *ie2*-Promotors in der IE-Phase exprimiert.

2.4 mCMV Peptide

Die verwendeten Peptide wurden von der Firma JPT Peptide Technologies GmbH synthetisiert. Die Lagerung der Peptide erfolgte als Lyophilisate bei -70°C, während Stammlösungen (10^{-3} oder 10^{-4} M) bei -20°C aufbewahrt wurden. Die Peptide wurden zur

spezifischen Beladung von antigenpräsentierenden Zellen (APC) verwendet, um für die Stimulation IFN γ -sezernierender Effektorzellen eingesetzt zu werden, welche zytofluorometrisch oder im ELISpot-Assay nachgewiesen wurden. Die angegebenen Indizes definieren die Aminosäurereposition im translatierten Protein.

Tab. 2.5 Verwendete Peptide im Haplotyp H-2^d

ORF	Peptidsequenz	MHC-I-Präsentation	Referenz
m04	²⁴³ YGPSLYRRF ²⁵¹	D ^d	Holtappels et al., 2000c
m18	³⁴⁶ SGPSRGRII ³⁵⁴	D ^d	Holtappels et al., 2002b
M45	⁵⁰⁷ VGPALGRGL ⁵¹⁵	D ^d	Holtappels et al., 2004
M83	⁷⁶¹ YPSKEPFNF ⁷⁶⁹	L ^d	Holtappels et al., 2001
M84	²⁹⁷ AYAGLFTPL ³⁰⁵	K ^d	Holtappels et al., 2000b
M105	²⁰⁷ TYWPVVSDI ²¹⁵	K ^d	Holtappels et al., 2008b
m123	¹⁶⁸ YPHFMTNL ¹⁷⁹	L ^d	Reddehase et al., 1989
m145	⁴⁵¹ CYYASRTKL ⁴⁵⁹	K ^d	Holtappels et al., 2008b
m164	¹⁶⁷ AGPPRYSRI ¹⁷⁵	D ^d	Holtappels et al., 2002a;c

ORF=Open Reading Frame

Tab. 2.6 Verwendete Peptide im Haplotyp H-2^b

ORF	Peptidsequenz	MHC-I-Präsentation	Referenz
M38	³¹⁶ SSPPMFRV ³²³	K ^b	Munks et al., 2006a;b
M45	⁹⁸⁵ HGIRNASFI ⁹⁹³	D ^b	Munks et al., 2006a;b
M57	⁸¹⁶ SCLEFWQRV ⁸²⁴	K ^b	Munks et al., 2006b
M122	⁴¹⁶ RALEYKNL ⁴²³	K ^b	Munks et al., 2006a
M139	⁴¹⁹ TVYGFCLL ⁴²⁶	K ^b	Munks et al., 2006a;b
M141	¹⁶ VIDAFSRL ²³	K ^b	Munks et al., 2006a;b

2.5 mCMV-ORF-Bibliothek

Die von Munks et al. (2006b) klonierte mCMV-ORF-Bibliothek umfasst die 170 annotierten *Open Reading Frames* (ORFs) des mCMV-WT.BAC-Genoms MW97.01 (Rawlinson et al., 1996). Jeder vorhergesagte ORF wurde in den Expressionsvektor pcDNA3.1 V5-His-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert und wird unter Kontrolle des hCMV-MIE-*Promotor-Enhancer* exprimiert. Nach Transfektion der Expressionsvektoren in SV40-Fibroblasten, erfolgt die Translation und proteasomale Prozessierung des jeweiligen mCMV-Proteins, wobei die im Protein enthaltenen antigenen Peptide im ER auf MHC-Klasse-I-Moleküle geladen und anschließend auf der Oberfläche der transfizierten Zelle präsentiert werden. Durch Co-Kultivierung mit Milzzellen mCMV-*geprimter* BALB/c-Mäuse und anschließender Analyse der

IFN γ -Produktion, wird die Antigenitätsanalyse der 170 mCMV-ORFs ermöglicht. Die ORF-Bibliothek wurde uns freundlicherweise von Michael Munks (OHSU, Oregon, USA) zur Verfügung gestellt.

2.6 Versuchstiere

Die verwendeten Versuchstiere wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg Universität Mainz unter *specified-pathogen-free* (SPF)-Bedingungen gezüchtet. Für die Versuche wurden 8-10 Wochen alte, weibliche Tiere der murinen Inzuchtstämme **BALB/c** (Haplotyp H-2^d) und **C57BL/6** (Haplotyp H-2^b) eingesetzt. Für einzelne Versuche wurden auch Tiere folgender Mausstämmen verwendet:

BALB/c-H-2^{dm2}: Bei der H-2^{dm2}-Maus handelt es sich um eine natürliche Deletionsmutante, bei der der MHC-Klasse-I-Bereich, der auch das Molekül L^d umfasst, deletiert ist (Rubocki et al., 1986). Die H-2^{dm2}-Maus basiert auf dem genetischen Hintergrund der BALB/c-Maus (Haplotyp H-2^d).

C57BL/6-Unc93b1^{3d/3d} (3d): Die 3d-Maus trägt den genetischen C57BL/6-Hintergrund (Haplotyp H-2^b) und beinhaltet eine *Missense* Mutation im *Unc93b1*-Allel. Diese Mutation verhindert u.a. die *Cross*-Präsentation von exogenen Antigenen (Janssen et al., 2006; Tabeta et al., 2006). Die 3d-Mäuse wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. Melanie Brinkmann (Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig) zur Verfügung gestellt.

C57BL/6-IFNGR^{-/-}: In der transgenen IFNGR^{-/-}-Maus wurde auf dem genetischen C57BL/6-Hintergrund (Haplotyp H-2^b) das für den IFN γ -Rezeptor kodierende Allel deletiert (Huang et al., 1993). Diese Mäuse wurden freundlicherweise von Dr. Marieke Essers (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Die tierexperimentellen Arbeiten erfolgten unter der Genehmigung der Bezirksregierung Rheinland Pfalz (Genehmigungsnummer 23 177-07/G09-1-004).

2.7 Materialien für die Zellkultur

2.7.1 Zellkulturmedien und Medienzusätze

Die verwendeten Medien wurden von GIBCO Invitrogen (Karlsruhe) bezogen, mit den aufgelisteten Zusätzen supplementiert und bei 4°C gelagert.

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

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

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

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

MEMalpha +GlutaMAX™ (*Minimum Essential Medium Alpha*); Nr. 32561-029

Penicillin	100U/ml
Streptomycin	0,1mg/ml
β-Mercaptoethanol	5x10 ⁻⁵ M
HEPES	10mM
FCS	7,5% (v/v)

RPMI 1640 +GlutaMAX™ (*Roswell Park Memorial Institute*); Nr. 81870-010

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

OptiMEMI +GlutaMAX™ (*Optimum Minimum Essential Medium*); Nr. 61965-026

Actinomycin D inhibiert irreversibel die zelluläre Transkription durch DNA-Interkalierung und wurde in Kombination mit Cycloheximid verwendet um IE-arretierte Zellen zu generieren. Es eine Stammlösung von 1mg/ml angesetzt (Endkonzentration: 5 µg/ml).

Brefeldin A inhibiert intrazelluläre Transportvorgänge des sekretorischen *Pathways*, wodurch es zu einer Proteinakkumulation im ER kommt. Für eine intrazelluläre Zytokinfärbung wurden Effektorzellen während der Peptidstimulation mit Brefeldin A behandelt, um die IFN γ -Sekretion zu verhindern. Dafür wurde Brefeldin A aus dem Cytotfix/Cytoperm Plus Kit (Bezeichnung: *GolgiPlug*) in einer Endverdünnung von 1:1.000 eingesetzt.

Cycloheximid inhibiert reversibel die Translation und wurde zur Anreicherung von IE-Transkripten eingesetzt. Es wurde eine Stammlösung von 2mg/ml verwendet (Endkonzentration: 0,05 mg/ml).

Fötales Kälberserum (FCS): Durch eine 45-minütige Inkubation bei 56°C mussten vor der Verwendung im Serum enthaltene Komplementbestandteile inaktiviert werden. Anschließend wurde das Serum bei 4°C aufbewahrt.

L-Glutamin: Die Stammlösung (200mM in 0,9% (w/v) NaCl) wurde bei -20°C gelagert, wobei zu 500ml Zellkulturmedium 5ml L-Glutamin hinzugefügt wurden (Endkonzentration: 20mM).

HEPES wurde Kulturmedien stark proliferierender Zelllinien beigefügt, da es über eine sehr hohe Pufferkapazität im physiologischen Bereich verfügt (pH 6,8-8,2). HEPES wurde als 1M Lösung bezogen, wobei 5ml der Stammlösung 500ml Zellkulturmedium zugesetzt wurde (Endkonzentration: 10mM).

Interleukin-2 (IL-2) ist ein Wachstumsfaktor, der die Proliferation und Differenzierung von Antigen bzw. Lektin-stimulierten T-Lymphozyten fördert (Smith, 1984; Smith, 1988). Rekombinantes humanes IL-2 (rhIL-2) (Lot. 89050/84802) mit einer Aktivität von $7,3 \times 10^6$ U/mg wurde für die Langzeitkultivierung von T-Zelllinien verwendet (Endaktivität: 100U/ml) und freundlicherweise vom Sandoz Forschungsinstitut (Wien) zur Verfügung gestellt.

Methylzellulosemedium wurde zur Überschichtung von infizierten MEF verwendet. 8,8g Methylcellulose wurden mit 360ml *Aqua bidest.* und einem Magnetührstab autoklaviert. Anschließend wurde die Methylzellulose durch Rühren bei 4°C resuspendiert. Folgende Zusätze wurden vor der Verwendung hinzugefügt:

MEM 10x (Gibco, Nr. 21430-20)	40ml
Penicillin	100U/ml
Streptomycin	0,1mg/ml
L-Glutamin	2mM
FCS	4% (v/v)

→ Einstellung des pH Wertes von pH 7,5 mit NaHCO₃ (55g/l)

Penicillin/Streptomycin: Um Kontaminationen mit gram-positiven und -negativen Bakterien vorzubeugen, wurde den Zellkulturmedien Penicillin/Streptomycin hinzugefügt. 5ml der Stammlösung (10.000U Penicillin + 10mg/ml Streptomycin in 0,9%(w/v) NaCl) wurden 500ml Zellkulturmedium zugesetzt (Endkonzentration: 100U Penicillin und 0,1mg/ml Streptomycin).

PolyFect wurde zur Transfektion von Plasmiden verwendet (siehe 3.1.4.) und besteht aus sphärischen, positiv-geladenen Dendrimeren. Diese Dendrimere interagieren mit der negativ-geladenen DNA und bilden mit dieser kompakte Strukturen. Die DNA-Dendrimer-Komplexe werden anschließend endozytiert und die DNA in der Zelle freigesetzt.

Trypanblau ermöglicht eine Differenzierung zwischen toten und vitalen Zellen innerhalb einer Zellpopulation. Die 0,5%-ige Stammlösung wurde vor Gebrauch 1:5 mit PBS verdünnt (Endkonzentration: 0,1%). Tote Zellen werden blau angefärbt, während vitale Zellen für den Farbstoff einige Zeit nicht permissiv sind.

Trypsin/EDTA: Zur enzymatischen Ablösung von adhären Zellen wurde die Stammlösung 1:10 mit PBS verdünnt (Endkonzentration: 0,5g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA, pH 7,4-7,6).

TÜRKS Lösung wurde zur Leukozytenzählung aus Organ- und Knochenmarkpräparationen verwendet. Die in der Lösung enthaltene Essigsäure lysiert Erythrozyten, gleichzeitig werden kernhaltige Zellen vom enthaltenen Methylviolett angefärbt.

2.7.2 Primäre Zellen und Zelllinien

Murine Embryonale Fibroblasten (MEF): Diese primären, adhären Zellen (siehe 3.1.1.) sind für mCMV permissiv und wurden für die Bestimmung von Virustitern aus Orangen und Zellkulturüberständen sowie für die Virusrekonstitution verwendet. Die Kultivierung erfolgte in MEM (10% FCS (v/v)). Die primären Zellen konnten nach 3-4 Tagen Kultivierung im Verhältnis 1:3 oder 1:4 auf beschichtete Zellkulturplatten geteilt werden.

P815: Diese immortalisierte Mastrozytom-Suspensionszelllinie (ATCC-Nummer: TIB-64) wurde ursprünglich aus der DBA/2-Maus (Haplotyp H-2^d) isoliert und wurde im ELISpot-Assay für H-2^d präsentierte Peptide als APC verwendet. Die Kultivierung erfolgte in RPMI (5% FCS (v/v)).

EL-4: Diese Suspensionszelllinie stammt ursprünglich aus einem T-Zell-Lymphom der C57BL/6N-Maus und wurde im ELISpot-Assay als APC für H-2^b präsentierte Peptide verwendet (ATCC-Nummer: TIB-39). Die Kultivierung erfolgte in DMEM (10% FCS (v/v)).

SV40-transformierte BALB/c-Fibroblasten (BALB/SV40): Diese immortalisierte, murine Fibroblastenzelllinie wurde für die Transfektion der Expressionsplasmide der mCMV-ORF-Bibliothek verwendet (siehe 3.8.3). Die Kultivierung erfolgte in DMEM (10% FCS (v/v)). Diese Zelllinie wurde uns freundlicherweise von D. Johnson, Oregon Health and Science University, USA zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Kryokonservierung und Rekultivierung von MEF

Für die Langzeitkonservierung wurden MEF in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert. Um während des Einfrierprozesses eine Zellschädigung durch Eiskristallbildung zu verhindern, enthielt das Einfriermedium DMSO.

Material Trypsin/EDTA (pH 7,4)

Medium: Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO)
MEM (10% FCS)

Durchführung: Die adhärennten Zellen wurden mit 3ml Trypsin/EDTA pro 150mm Schale abgelöst und anschließend in Medium aufgenommen. Nach einer Zellzählung wurden die Zellen sedimentiert (10min, 300xg) und auf eine Zelldichte von $1-5 \times 10^6$ Zellen/ml mit gekühltem Einfriermedium eingestellt. In jedes Einfrierröhrchen wurde 1ml der Zellsuspension gegeben. Zum langsamen Abkühlen wurden die Einfrierröhrchen in Papiertücher gewickelt und über Nacht (üN) bei -70°C gelagert. Die Überführung in -196°C zur dauerhaften Lagerung erfolgte am nächsten Tag.

Für die Rekultivierung wurden die eingefrorenen Zellen im Wasserbad (37°C) aufgetaut und schnellstmöglich mit 50ml Medium gespült, um das toxische DMSO auszuwaschen. Nach der Zentrifugation (10min, 300xg) wurden die pelletierten Zellen in frischem Medium aufgenommen und auf beschichtete Zellkulturschalen verteilt. Nach 3-4 Tagen konnten die konfluenten Zellen im Verhältnis 1:3 oder 1:4 gesplittet werden.

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Färbung mit Trypanblau oder TÜRKs Lösung durchgeführt. Für die Differenzierung von lebenden und toten Zellen wurde der Vitalfarbstoff Trypanblau verwendet. Lebende Zellen sind für den Farbstoff kurze Zeit nicht permissiv, während tote Zellen dunkelblau angefärbt werden.

TÜRKs Lösung wurde zur Leukozytenzählung aus Organ- und Knochenmarkpräparationen verwendet, da die in der Lösung enthaltene Essigsäure hämolysiert, während kernhaltige Zellen durch Methylviolett gefärbt werden.

Durchführung: Es wurde ein Aliquot der Zellsuspension abgenommen und in einem adäquaten Volumen mit der Färbelösung verdünnt. Die Zählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer, wobei nach dem Auszählen von vier Großquadraten die Zellzahl nach folgender Formel berechnet wurde:

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

N= Anzahl der gezählten Zellen; n= Anzahl der ausgezählten Großquadrate;

V= Verdünnungsfaktor

3.1.4 Transfektion von BAC-Plasmid-DNA

Material: PolyFect (QIAGEN)
BAC-Maxipräparation (siehe 3.3.3.5)

Medium: MEM – (ohne Zusätze)
MEM (10% FCS)

Durchführung: Um eine optimale Transfektionseffizienz zu erreichen, wurden MEF mit einer Konfluenz von 70-80% in 6-Well-Platten transfiziert. Für die Transfektion wurden definierte Volumina (2,5, 5, 10 oder 15µl) der frisch isolierten BAC-DNA eingesetzt und jeweils auf 100µl Medium (MEM –) aufgefüllt. Nach Zugabe von 10µl PolyFect erfolgt eine 10-minütige Inkubation bei 20-22°C, wobei es zur Bildung der DNA-Dendrimer-Komplexen kommt. Die MEF wurden währenddessen mit 1ml PBS gewaschen und anschließend mit 1,5ml MEM (10% FCS) überschichtet. Die Transfektionsansätze wurden nach der Zugabe von jeweils 600µl MEM (10% FCS) sofort auf die MEF gegeben. Nach einer Inkubation von 7-12h bei 37°C, wurde das Transfektionsmedium abgenommen und durch frisches MEM (10% FCS) ersetzt.

Nach erfolgreicher Transfektion waren nach 3-4 Tagen erste Virusplaques sichtbar. Sobald 60-80% der Zellen lysiert waren, wurde der Überstand abgenommen und für 10min bei 300xg zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand konnte anschließend bei -70°C gelagert werden. Für ein detailliertes Protokoll siehe Lemmermann et al. (2010b).

3.1.5 Entfernung der BAC-Sequenz aus rekonstituierten Viren

Die in den rekonstituierten Viren zurückbleibende BAC-Vektor-Sequenz modifiziert möglicherweise die biologischen Eigenschaften der rekonstituierten Viren und sollte deshalb entfernt werden (Adler et al., 2001). Da die BAC-Sequenz von homologen Sequenzbereichen flankiert ist, ermöglicht dies die Eliminierung durch den eukaryotischen Rekombinationsapparat mittels homologer Rekombination während der Virusreplikation (Wagner et al., 1999).

Medium: Methylcellulosemedium
MEM (10% FCS)

Durchführung: Die Viruspassage erfolgte durch wiederholte Infektion von konfluenten MEF in beschichteten 6-Well-Platten. Nach erfolgreicher Virusrekonstitution (siehe 3.1.4) wurde das Kulturmedium durchlysiertes MEF abgenommen und zur Entfernung von Zelltrümmern zentrifugiert (10min, 300xg). Für die erste Viruspassagierung wurde 1ml des Zellkulturüberstandes auf konfluente MEF übertragen, während für weiteren Passagen 1µl Zellkulturüberstand resuspendiert in 999µl Medium ausreichend war. Der restliche Überstand wurde bei -70°C gelagert. Für die Viruspassage wurde das Kulturmedium der konfluenten MEF abgenommen und die Zellen wurden mit dem Infektionsmedium überschichtet. Dies wurde unter gelegentlichem Schwenken für 30min bei 20-22°C inkubiert und anschließend

wurden 2ml Medium zugegeben. Nach 4-5 Tagen war der Zellrasen durchlysiert. Dieser Vorgang wurde bis Passage 4 wiederholt.

Um klonale Rekombinanten, ausgehend von einem Einzelplaque, zu isolieren, wurden die Zellen nach der Infektion (Viruspassage 5) mit Methylcellulose überschichtet. Deutlich sichtbare Plaques konnten nach 3 Tagen unter dem Mikroskop markiert und mit einer sterilen, abgeschnittenen Pipettenspitzen die den Plaque umgebenden Zellen entnommen werden. Diese wurden in 1ml Kulturmedium resuspendiert und für eine weitere Infektion von MEF verwendet.

Um die Exzision der BAC-Sequenz zu überprüfen, wurde virale DNA aus dem Zellkulturüberstand von Viruspassage 1 und 6 isoliert (siehe 3.3.3.7). Durch quantitative PCR (siehe 3.3.13.1) mit BAC-spezifischen Primern, wurde die verbleibende BAC-Sequenz quantifiziert. Waren weniger als 10^3 BAC-Sequenzen pro 10^6 Virusgenomen nachweisbar, konnte das rekonstituierte Virus als BAC-frei bezeichnet werden. Nach weiteren Sequenzüberprüfungen bezüglich der eingefügten Mutationen erfolgte die Virusaufreinigung (siehe 3.2.1).

3.2 Virologische Methoden

3.2.1 mCMV-Produktion

Material: Virusstandardpuffer (VSP)

Tris	50mM	6,1g
EDTA	5mM	1,86g
KCl	12mM	0,895g
		<i>Aqua bidest. ad 1000ml</i>

pH 7,8 einstellen, autoklavieren

VSP+ 15% Saccharose (w/v)

Lösung frisch ansetzen und sterilfiltrieren

Medium: MEM (10% FCS)

Durchführung: Hochreine mCMV-Stocks wurden aus 50-55 Zellkulturschalen (150mm) infizierter MEF generiert. Die Infektion erfolgte in 5ml Medium pro Zellkulturschale mit 1×10^5 PFU mCMV-Stock oder 50µl Zellkulturüberstand einer durchlysierten 100mm Zellkulturschale, unter mehrmaligem Schwenken. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei 20-22°C wurden 20ml Medium hinzugegeben und die infizierten Zellen für 4 Tage bei 37°C inkubiert. Nach 4-5 Tagen wurde der durchlysierte Zellrasen mit einem Zellschaber abgelöst, wobei alle weiteren Schritte auf Eis durchgeführt wurden. Nach Zentrifugation für 20min bei 6.370xg (Sorvall RC 6+, Rotor F14(S)_6x250y) wurde der Überstand in 250ml Zentrifugenbechern gesammelt und nach Aufschluss des Zellpellets im *dounce*-Homogenisator erfolgte die Pelletierung der Virionen durch Zentrifugation (30.000xg, 3h, 4°C, Sorvall RC 6+, Rotor F12(S)_6x500LEX). Das Pellet wurde ün angelöst, resuspendiert

und über ein VSP-Saccharose-Kissen (15% Saccharose (w/v)) weiter gereinigt (72.000xg, 1h, 4°C, Sorvall Combi Plus, Rotor AH629). Das Viruspellet wurde im Anschluss in 2-3ml VSP resuspendiert, in verschiedenen Volumina (20, 50 oder 100µl) aliquotiert und bei -70°C gelagert. Virusstocks konnten bis zu dreimal aufgetaut und eingefroren werden ohne signifikante Reduktion des Virustiters. Ein detailliertes Protokoll wurde von Podlech et al. (2002) veröffentlicht.

3.2.2 mCMV-Virustiter Bestimmung

Die Angabe der Virustiter erfolgt in *plaque forming unit* (PFU). Eine PFU ist per Definition die Virusmenge, die benötigt wird, um in einem Monolayer permissiver Zellen einen einzelnen Plaque zu erzeugen. Die Berechnung erfolgt nach der folgenden Formel:

$$\text{Virustiter (PFU/ml)} = \text{Anzahl der Plaques} \times V \quad (V = \text{Verdünnungsfaktor})$$

3.2.2.1 Virustiter-Bestimmung eines Virusstocks

Die Virustiterbestimmung erfolgte durch \log_{10} -Titration des hochkonzentrierten Virusstocks und anschließender Infektion permissiver MEF.

Medium: Methylcellulosemedium
MEM (10% FCS)

Durchführung: Von einem Virusstock unbekanntem Titer wurde eine \log_{10} -Titrationsserie (6-8 Verdünnungsstufen) mit Medium hergestellt. Es war unbedingt notwendig die Pipettenspitze bei einem Wechsel von der höheren zu der niedrigeren Virionenkonzentration zu erneuern, um die Verschleppung von infektiösen Viren zu verhindern. Anschließend wurden jeweils 100µl jeder Verdünnungsstufe auf konfluente MEF gegeben. Nach 30-minütiger Inkubationszeit bei 20-22°C wurden die infizierten MEF mit 500µl Methylcellulose überschichtet und bei 37°C inkubiert. Nach 4 Tagen konnten die Virusplaques am Invertmikroskop ausgezählt werden. Für ein ausführlicheres Protokoll siehe Podlech et al. (2002).

3.2.2.2 Virustiter-Bestimmung aus Organhomogenaten

Medium: Methylcellulosemedium
MEM (10% FCS)

Durchführung: Die Virustiterbestimmung aus Organhomogenaten erfolgte durch Infektion konfluenter MEF, welche auf 48-Well-Platten ausgesät waren. Die Organe wurden im Wasserbad (37°C) aufgetaut, über ein Metallsieb homogenisiert und in 2ml Medium aufgenommen. Von der Suspension wurde eine \log_{10} -Titrationsserie (8 Verdünnungsstufen) mit Medium hergestellt, wobei jeweils 100µl jeder Verdünnungsstufe in Duplikaten auf konfluente MEF gegeben wurde. Nach zentrifugaler Infektion (siehe 3.2.3) wurden die infizierten MEF mit jeweils 500µl Methylcellulosemedium überschichtet und bei 37°C

inkubiert. Nach 4 Tagen konnten die Virusplaques am Invertmikroskop ausgezählt werden und der Virustiter (PFU/Organ) wurde berechnet.

3.2.2.3 Virustiter-Bestimmung aus Zellkulturüberständen

Medium: Methylcellulosemedium
MEM (10% FCS)

Durchführung: Die Virustiterbestimmung aus Zellkulturüberständen erfolgte durch Infektion konfluenten MEF, welche auf 48-Well-Platten ausgesät waren. Zellkulturüberstände infizierter MEF wurden durch \log_{10} -Titration bis zu einer Verdünnung von 10^{-9} mit Medium verdünnt, wobei jeweils 100 μ l jeder Verdünnungsstufe in Duplikaten auf konfluente MEF gegeben wurde. Nach zentrifugaler Infektion (siehe 3.2.3) wurden die infizierten MEF mit jeweils 500 μ l Methylcellulosemedium überschichtet und bei 37°C inkubiert. Nach 4 Tagen konnten die Virusplaques am Invertmikroskop ausgezählt werden und der Virustiter (PFU/ml) wurde berechnet.

3.2.3 Zentrifugale Infektion von MEF

Die Infektion permissiver Zellen mit mCMV kann durch Zentrifugation bis um den Faktor 20 verstärkt werden (Osborn und Walker, 1968; Kurz et al., 1997; Podlech et al., 2002).

Medium: Methylcellulosemedium
MEM (10% FCS)

Durchführung: Für die zentrifugale Infektion wurden MEF in den benötigten Zellkulturschalen (6-, 48-Well-Platten, 100mm Schalen) ausgesät. Das Kulturmedium der Zellen wurde abgenommen. Nach der Zellzählung wurden die MEF mit der angesetzten Virussuspension infiziert und bei 760xg 5min zentrifugiert. Die Zellkulturschalen wurden anschließend um 180° gedreht und erneut bei 760xg für 25min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen entweder mit Methylcellulosemedium überschichtet oder mit Medium supplementiert. Die benötigte Virusmenge für eine MOI (*multiplicity of infection*) von 4 berechnet sich folgendermaßen:

$$\text{Zellzahl} \times 0,2 \text{ PFU} = \text{benötigte PFU Menge des Virusstocks}$$

3.3. Molekularbiologische Methoden: DNA

3.3.1. Bakterienanzucht

3.3.1.1 Flüssigkulturen

Medium: LB-Medium
 NaCl 10g
 Bacto-Trypton 10g
 Hefeextrakt 5g
 ad 1l H₂O; pH 7,5 einstellen (mit NaOH), autoklavieren

Antibiotika Stammlösungen:

Antibiotikum	Konzentration	Lösungsmittel	Verdünnungsfaktor	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml	<i>Aqua bidest.</i>	1:1000	100 µg/ml
Chloramphenicol (Cam)	34mg/ml	100% Ethanol	1:2000	17 µg/ml
Kanamycin (Kan)	10 mg/ml	<i>Aqua bidest.</i>	1:400	25 µg/ml

Die Lösungen wurden sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

Die Zugabe des Antibiotikums erfolgte vor der Verwendung des LB-Mediums.

Durchführung: Eine Einzelkolonie einer üN-Plattenkultur wurde verwendet um eine Flüssigkultur anzupflanzen. Die Entnahme der Kolonie erfolgte mit einer sterilen Pipettenspitze, die in das mit Medium gefüllte Kulturgefäß gegeben wurde (5ml LB-Medium bei *high-copy* Plasmiden; 10ml LB-Medium bei *low-copy* Plasmiden). Die Flüssigkulturen wurden üN bei der benötigten Temperatur unter Schütteln (250 U/min) kultiviert. Für größere Volumina wurde eine Vorkultur (5ml) angeimpft. Nach 5-8 h Kultivierungszeit konnte das benötigte Kulturvolumen mit der Vorkultur angeimpft werden.

3.3.1.2 Plattenkulturen

Plattenkulturen wurden verwendet, um Transformanten zu selektieren oder Bakterien über einen begrenzten Zeitraum zu lagern.

Material: LB-Agar
 LB-Medium
 Bacto Agar 15g

Durchführung: LB-Agar wurde durch Aufkochen verflüssigt, im Wasserbad auf 40-45°C abgekühlt und durch das benötigte Antibiotikum supplementiert. Sterile Petrischalen wurden mit dem noch flüssigen LB-Agar beschichtet und konnten 2-3 Wochen bei 4°C gelagert werden. Die Plattenkulturen wurden entweder als Verdünnungsausstrich oder flächig mit einem Drigalskispatel angelegt.

3.3.1.3 Dauerkulturen

Für eine dauerhafte Lagerung wurden 500µl üN-Flüssigkultur mit 600µl Glycerin gemischt und bei -70°C gelagert.

3.3.2 Transformation kompetenter Bakterien

3.3.2.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Medium: LB-Medium

Material: Glycerinlösung 10% (v/v); bei 4°C vorkühlen

Durchführung: Ausgehend von einer frischen Plattenkultur wurde eine Kolonie gepickt, in 10ml LB-Medium (+Antibiotikum) überführt und üN bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag wurden 500ml LB-Medium (+Antibiotikum) mit 5ml der Übernachtskultur angeimpft und weiterhin bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis eine optische Dichte von 0,5 bis 0,7 bei 600nm erreicht war. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Die Bakterien wurden sedimentiert (6079xg, 4°C, 10min) und die Überstände dekantiert, die Pellets in je 150ml 10% Glycerin resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 1x Pelletvolumen eiskaltem, 10%-igem Glycerin aufgenommen. Die elektrokompetenten Zellen wurden in 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße (50µl/Gefäß) überführt und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte im Anschluss bei -70°C.

3.3.2.2 Elektrottransformation von Plasmiden oder BAC-Plasmiden

Material: Elektroporationsküvetten
elektrokompetente Zellen (siehe 3.3.2.1)
LB-Agar

Durchführung: Die elektrokompetenten Zellen (50µl) wurden auf Eis aufgetaut und mit der zu transformierenden DNA versetzt (50-200ng). Der Ansatz wurde in die vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 2mm) überführt und die Bakterien wurden bei 2,5kV, 400Ω und 25µF perforiert (GenePulser, BIORAD, München). Anschließend wurde zu den transformierten Bakterien 500µl LB-Medium ohne Antibiotika hinzugegeben und der Ansatz für 30-90min bei der entsprechenden Temperatur unter Schütteln inkubiert. Abhängig vom Transformationsansatz wurden 20-200µl auf einer LB-Agarplatte (+Antibiotikum) ausgestrichen.

Für die Transformation von BAC-DNA wurde das Protokoll von Swaminathan und Sharan (2004) modifiziert verwendet. Hierbei sollte beachtet werden, dass sowohl BAC-DNA als auch elektrokompetente Bakterien am Tag der Transformation frisch präpariert wurden. Für die Transformation wurden zwischen 1-3µl BAC-DNA verwendet und die Elektroporation erfolgte mit Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 1mm) bei 1,75kV, 200Ω und 25µF.

3.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid- oder BAC-DNA wurde die Methode der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) modifiziert angewendet. Hierbei werden die Bakterien zunächst in einem SDS- und NaOH-haltigen Puffer lysiert. In der Probe enthaltene Proteine und die DNA denaturieren und werden durch die nachfolgende Zugabe von KAc präzipitiert, während die Plasmid-DNA in Lösung bleibt. So können chromosomale DNA, Proteinbestandteile und SDS durch Zentrifugation sedimentiert werden. Die Plasmid-DNA befindet sich im Überstand und kann entweder mit Alkohol gefällt (siehe 3.3.3.1) oder über eine Silicagel-Matrix (siehe 3.3.3.3) gereinigt werden.

3.3.3.1 Schnellpräparation von Plasmid-DNA

Nach alkalischer Lyse der Bakterien erfolgte die Schnellpräparation von Plasmid-DNA durch alkoholische Fällung.

<u>Material:</u>	70% Ethanol		
	Isopropanol		
<u>Puffer:</u>	Puffer 1 (P1)		
	Tris	50mM	6,06g
	Na ₂ EDTAx2H ₂ O	10mM	3,72g
			mit H ₂ O _{demin} ad 1000ml
	pH 8,0 einstellen (mit HCl)		
	autoklavieren und 100 mg DNase hinzugeben		
	Puffer 2 (P2)		
	NaOH	200 mM	8g
	20% SDS	1%	50ml
			mit H ₂ O _{demin} ad 1000ml
	pH 8,0 einstellen (mit HCl)		
	autoklavieren, bei 20-22°C lagern		
	Puffer 3 (P3)		
	KAc	3 M	294,5g
			mit H ₂ O _{demin} ad 1000ml
	auf pH 5,5 einstellen(mit Eisessig)		
	autoklavieren, bei 4°C lagern		
	1x TE oder 10mM Tris/HCl (pH 8)		

Durchführung: Es wurden 5ml Selektionsmedium mit einer Bakterienkolonie beimpft und bei geeigneter Temperatur üN unter Schütteln kultiviert. Für die Präparation wurden 2ml der Flüssigkultur verwendet, die in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt und sedimentiert (20.000xg, 1min, Eppendorf cetrifuge 5417R) wurden. Das Pellet wurde in 250µl P1 resuspendiert und nach Zugabe von 250µl P2 für 5min bei 20-22°C inkubiert. Danach wurden 350µl P3 hinzugegeben, die Probe für 10min auf Eis inkubiert und der Debris anschließend sedimentiert (20.000xg, 30min, 4°C, Eppendorf cetrifuge 5417R). Der Überstand wurde

abgenommen, die DNA mit 750µl Isopropanol gefällt und präzipitiert (20.000xg, 10min, Eppendorf zentrifuge 5417R). Nach einem Waschschriff mit 250µl 70% Ethanol wurde die DNA kurz getrocknet und das Pellet in 50µl TE oder 10mM Tris/HCl pH 8 aufgenommen.

3.3.3.2 Schnellpräparation von BAC-Plasmid-DNA

Die Schnellpräparation von BAC-Plasmiden erfolgte durch alkalischen Lyse mit anschließender alkoholischer DNA-Fällung. Da es sich bei BAC-Plasmiden um besonders große *low-copy* Plasmide handelt (~240kbp) muss zur Aufrechterhaltung der DNA-Integrität Scherkräfte vermieden werden. Nach der alkalischen Lyse sollten bei allen Arbeitsschritten nur abschnittene Pipettenspitzen verwendet werden, auch ein Vortexen der Proben wurde vermieden.

Material: 70% Ethanol
Isopropanol
RNaseA

Puffer: P1, P2 und P3 (siehe 3.3.3.1)
1x TE oder 10mM Tris/HCl (pH 8)

Durchführung: 10ml Flüssigkultur (+Cam) wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und ün unter Schütteln bei 37°C kultiviert. Nach dem Anlegen einer Dauerkultur wurde die restliche Flüssigkultur sedimentiert (2.380xg, 4°C, 10min, Heraeus Laborfuge 400R, Rotor 8179). Das Pellet wurde in 200µl P1 (siehe 3.3.3.1) resuspendiert und in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt. Zur alkalischen Lyse wurde die Suspension mit 300µl P2 versetzt, sofort durch Invertieren gemischt und 5min bei 20-22°C inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 300µl P3. Nach einer Inkubation auf Eis für 5-10min fielen SDS, chromosomale DNA und Proteinbestandteile aus, die anschließend abzentrifugiert wurden (18.000xg, 10min, 4°C, Eppendorf zentrifuge 5417R). Zwischenzeitlich wurden 600µl Isopropanol in frische 2ml Reaktionsgefäße vorgelegt, in die die Überstände der Zentrifugation dekantiert wurden. Der Ansatz wurde erneut zentrifugiert (18.000xg, 15min, 4°C, Eppendorf zentrifuge 5417R), das DNA Präzipitat mit 1ml Ethanol (70%, -20°C) gewaschen und pelletiert (18.000xg, 5min, 4°C, Eppendorf zentrifuge 5417R). Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet an der Luft getrocknet, in 100µl TE Puffer oder 10mM Tris/HCl (pH 8) mit 1% RNaseA aufgenommen und für 10min bei 37°C gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

3.3.3.3 QIAprep Spin Miniprep

Für Sequenzierungen oder Transformationsansätze wurden hochreine Plasmid-DNA über eine QIAprep *spin*-Säule aufgereinigt. Nach alkalischer Lyse (siehe 3.3.3.1) erfolgte die Aufreinigung durch reversible Adsorption der DNA an eine Silicagel-Matrix. Durch variierende Salzkonzentrationen während den einzelnen Arbeitsschritten wurde die DNA erst an die Silicamembran gebunden, gewaschen und anschließend eluiert.

Kit: QIAGEN Plasmid Mini Kit

Durchführung: Die Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers aus 1,5ml einer 5ml Übernachtkultur. Nach alkalischer Lyse, Adsorption der DNA an der Silicamembran und mehrmaligem Waschen, wurde die DNA in 50µl Elutionspuffer (Tris/HCl pH 8,5) oder *Aqua bidest.* durch Zentrifugation (20.000xg, 1min, Eppendorf *centrifuge* 5417R) von der Säule eluiert. Eine vollständiges Protokoll kann dem Herstellerhandbuch entnommen werden:

<http://www.qiagen.com/products/plasmid/qiaprepminiprepsystem/qiaprepminiprepkit.aspx#Tabs=t2>

3.3.3.4 QIAGEN Plasmid-Maxipräparation

Das Protokoll basiert auf einer alkalischen Lyse, gefolgt von Bindung der DNA an einen Anionentauschersäule unter Niedrigsalzbedingungen. RNA, Proteine und andere niedermolekulare Moleküle wurden unter mittleren Salzkonzentrationen herausgewaschen, während die Elution bei hohen Salzkonzentrationen erfolgte. Die eluierte DNA (bis 500µg) wurde anschließend mit Isopropanol präzipitiert.

Kit: QIAGEN Plasmid Maxi Kit

Durchführung: LB-Selektivmedium (500ml *low-copy* bzw. 150ml *high-copy* Plasmid) wurde ausgehen von einer 5ml Vorkultur im Verhältnis 1:1.000 angeimpft und unter Schütteln bei der benötigten Temperatur üN kultiviert. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten nach dem Herstellerprotokoll:

<http://www.qiagen.com/products/plasmid/qiagenplasmidpurificationsystem/qiagenplasmidmaxikit.aspx#Tabs=t2>

3.3.3.5 BAC-Plasmid Maxipräparation

Kit: Nucloebond Kit PC

Durchführung: Die benötigte 500ml Kultur wurde mit 1ml einer Bakterienvorkultur angeimpft und üN bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach Pelletierung der Bakterien (5.000xg, 10min, 4°C, Sorvall RC 6+, Rotor F12(S)_6x500LEX) wurden alle weiteren Schritte nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Zusätzlich erfolgte die Klärung des Lysates über einen Faltenfilter, bevor das Lysat auf die Säule gegen wurde. Die BAC-DNA wurde in 200-250µl 10mM Tris/HCl pH 8,5 aufgenommen und bei 4°C gelagert. Ein ausführliches Protokoll kann dem Handbuch entnommen werden:

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

3.3.3.6 DNA-Isolierung aus Organen

Für die DNA-Isolierung aus Organen wurden die Organzellen zu Beginn mechanisch und enzymatisch aufgeschlossen. Anschließend wurde die DNA an eine Silicagel-Matrix gebunden, mehrfach gewaschen und eluiert.

Kit: DNeasy Blood and Tissue Kit

Durchführung: 25mg des aufzuschließenden Organs (Sonderfall: Milz 10mg) wurden in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und mit 180µl ATL-Puffer und 20µl Proteinase K versetzt. Nach Zugabe von zwei Mahlkugeln konnten die Organe in der Schwingmühle MM300 (Frequenz 30Hz, 3min) homogenisiert werden. Der weitere mechanische und enzymatische Aufschluss erfolgte unter Schütteln bei 56°C für 3-12h. Anschließend wurden 200µl der Organsuspension zur DNA-Isolierung eingesetzt. Die Elution der DNA erfolgte in 100µl AE-Puffer. Eine vollständiges Protokoll kann dem Firmenhandbuch entnommen werden:

<http://www.qiagen.com/products/genomicdnastabilizationpurification/dneasytissuesystem/dneasybloodtissuekit.aspx#Tabs=t2>

3.3.3.7 Isolierung von viraler DNA aus Zellen oder Zellkulturüberständen

Kit: High Pure Viral Nucleic Acid Kit

Zur Überprüfung der Deletion der BAC-Sequenz oder zur Bestimmung des Genom-zu-PFU-Verhältnisses wurde virale DNA aus Zellkulturüberständen oder Viruspräparationen isoliert. Die Probe wurde enzymatisch mit Proteinase K aufgeschlossen. Die zugefügte poly(A)-RNA verbessert die Bindung von niedrig-konzentrierten viralen Nukleinsäuren. Die virale DNA wurde an einer Glasfieberröhre adsorbiert und konnte anschließend von Proteinen und anderen Kontaminationen gereinigt und eluiert werden. Die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll:

https://www.roche-applied-science.com/publications/print_mat/nucleic_acid_purification_isolation.pdf

3.3.5 Quantifizierung von Nukleinsäurelösungen

Die Bestimmung von Konzentration und Qualität einer Nukleinsäurelösung wurde spektrometrisch durch die Messung der Absorption (A) bei 260nm am Nanodrop (PeqLab, Erlangen) durchgeführt. Der Konzentrationsberechnung wurde die folgende Formel zugrunde gelegt:

$$C_{\text{DNA}}[\mu\text{g/ml}] = A_{260\text{nm}} \times 50$$

$$C_{\text{RNA}}[\mu\text{g/ml}] = A_{260\text{nm}} \times 40$$

Die residuale Proteinkontamination wurde durch den Quotient A_{260}/A_{280} bestimmt, der das Verhältnis zwischen enthaltenen Nukleinsäuren und Proteinen angibt und zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte.

3.3.6 Enzymatische Restriktion

Restriktionsenzyme schneiden DNA an definierten, palindromen Erkennungssequenzen und wurden für die Charakterisierung oder Linearisierung von Plasmiden verwendet.

Durchführung: Restringiert wurden meist 200-1500ng Plasmid-DNA, wobei die Enzyme mit einer Aktivität von 5-20U im geeigneten Puffer eingesetzt wurden. Wurden mehrere Restriktionsenzyme in einem Ansatz verwendet, mussten die Reaktionsbedingungen so gewählt werden, dass sie für alle Enzyme geeignet waren. Der Restriktionsansatz wurde

anschließen 2-16h bei der benötigten Temperatur inkubiert.

Für die Restriktion von BAC-Plasmiden wurden 12µl einer Maxi-Präparation oder 50µl einer Mini-Präparation eingesetzt und mit 20U des gewählten Enzymes in einem Gesamtvolumen von 60-80µl verdaut.

Tab.2.7 Standard-Restriktionsansatz

Komponente	Menge [µl]
10x Restriktionspuffer	2µl
Plasmid DNA (200-1500 ng)	xµl
Restriktionsenzym (5-20 U)	yµl
<i>Aqua bidest.</i>	ad 20µl

Wurden die restringierten Plasmide anschließend für eine Ligation eingesetzt, erfolgte eine Aufreinigung über ein präparatives Agarosegel mit nachfolgender Gelelution (siehe 3.3.8) oder über eine Silicasäule (siehe 3.3.3.3.).

3.3.7 Native Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient zur präparative Auftrennung von Plasmiden und PCR-Produkten anhand ihrer Größe.

Material: Agarose
DNA-Längenstandard
Ethidiumbromid

Puffer:

50x TAE-Puffer		
Tris	400mM	48,44g
EDTAx2H ₂ O	50mM	18,6g
		mit H ₂ O _{demin} ad 1000ml
		pH 8,0 einstellen (mit Eisessig), autoklavieren
		Gebrauchslösung: 1xTAE in H ₂ O
50x TBE-Puffer		
Tris	400mM	54,5g
EDTAx2H ₂ O	10mM	3,7g
Borsäure	450mM	27,8g
		mit H ₂ O _{demin} ad 1000ml
		pH 8,3 einstellen (mit Eisessig), autoklavieren
		Gebrauchslösung: 1xTBE in H ₂ O
10x Probenpuffer		
Saccharose	67% (w/v)	
Bromphenolblau	0,05% (w/v)	

Durchführung: Die DNA-Auftrennung erfolgte in einem 1%igen Agarosegel mit TAE-Puffer. Je nach Anwendung und Anzahl der Proben erfolgte die Verwendung von Maxi-Gelen (20x20cm bzw. 20x10cm) oder Mini-Gelen (10x6,5cm). Vor dem Auftragen der Proben mussten diese mit 1/10-Volumen Probenpuffer versetzt werden, um das Einsinken der Nucleinsäuren in die Geltasche zu ermöglichen. Zusätzlich zu den zu analysierenden Proben wurde ein DNA-Längenstandard mitgeführt, der eine Größenordnung der elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Banden ermöglicht. Die Auftrennung erfolgte in einer horizontalen Elektrophoresekammer in 1xTAE Puffer. Hierbei richtete sich die angelegte Spannung (0,5V/cm bis 5V/cm Elektrodenabstand) nach der Größe des Gels und der zu trennenden DNA-Fragmente. Zur Visualisierung der DNA wurde dem Agarosegel das DNA-interkalierende Fluorophor Ethidiumbromid (Endkonzentration: 1µg/ml) zugesetzt. Die DNA-Banden können sichtbar gemacht werden, wenn das interkalierte Ethidiumbromid mit UV-Licht angeregt wird. Die Dokumentation erfolgte mit einer Sofortbildkamera (Polaroid Land Camera MP-4 mit Polaroidfilm Typ 667) oder einer CCD-Kamera.

Für BAC-Plasmide (~240 kbp) wurden 0,7%ige Agarose-TBE-Gele (20x25cm) verwendet. Die Auftrennung der BAC-DNA erfolgte mit 70V in TBE-Laufpuffer bei 4°C üN.

3.3.8 Elution von DNA aus Agarosegelen

Kit: QIAquick Gel Extraction Kit

Durchführung: Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA erfolgte die Exzision der Bande aus dem Agarosegel. Anschließend wurde die residuale Agarose bei 72°C in QG-Puffer gelöst und nach Zugabe von Isopropanol die Probe auf die *spin*-Säule gegeben. Es folgte die Reinigung der DNA durch verschiedene Waschschrte mit anschließender Elution in 10mM TrisHCl (pH 8,5). Für ein detailliertes Herstellerprotokoll siehe:

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

3.3.9 Aufreinigung von PCR Produkten

Kit: QIAquick PCR Purification Kit

Die Aufreinigung von PCR-Produkten ist notwendig, um enthaltene Kontaminanten wie Primer oder Salze zu entfernen, wenn PCR-Produkte für Ligationen oder zur Sequenzierung eingesetzt werden. Nach Adsorption der DNA an einer Silicamembran erfolgt die Reinigung durch verschiedenen Waschschrte mit anschließender Elution in 10mM TrisHCl (pH 8,5). Die Arbeitsschritte erfolgten nach dem Herstellerprotokoll:

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

3.3.10 Dephosphorylierung linearer DNA

Um eine Religation eines linearisierten Vektors zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatgruppen enzymatisch durch eine alkalischer Phosphatase entfernt.

Enzym: Calf Interstitial Alkaline Phosphatase (CIB)

Durchführung: Pro 1µg DNA wurden 0,5U CIB eingesetzt. Sie wurde direkt zu dem Restriktionsansatz hinzugegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung der alkalischer Phosphatase wurde die DNA über ein präparatives Agarosegel gereinigt (siehe 3.3.7.) und anschließend aus dem Gel eluiert (siehe 3.3.8).

3.3.11 Ligation von PCR Fragment und Vektor

Enzym: T4-Ligase

Die T4-Ligase katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung der Phosphodiesterbindung zwischen 5´Phosphat- und 3´Hydroxylgruppe doppelsträngiger DNA. Für einen Ligationsansatz wurden zwischen 50-200ng des linearisierten, dephosphorylierten Vektors im Verhältnis 1:2 bis 1:5 zum geschnittenen Insert eingesetzt. Die benötigten DNA-Mengen können wie folgt berechnet werden:

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

n = Verhältnisfaktor

Bei der Ligation von kohäsiven Enden wurden 1-2U der T4-Ligase eingesetzt, während glatte Enden mit 5U des Enzyms unter Zugabe von 1/10 Volumen Polyethylenglycol-Lösung (PEG) ligiert wurden. Die Ansätze wurden 1h bei 16°C oder für 2h bei 22°C inkubiert und danach in elektrokompetente Bakterien transformiert (siehe 3.3.2).

3.3.12 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht die gezielte Amplifikation definierter DNA-Sequenzen. Ausgehend von sequenzspezifischen Primern synthetisiert eine DNA-abhängige DNA-Polymerase mit Hilfe von dNTPs einen komplementären DNA-Strang zu der im Ansatz enthaltenen einzelsträngigen DNA-Matrize.

Zunächst werden durch Erhitzung des Reaktionsansatzes auf 95°C Doppelstränge der DNA getrennt. Anschließend binden bei einer Reaktionstemperatur von 50-65°C die sequenzspezifischen Primer an die nun einzelsträngige DNA. Im letzten Schritt erfolgt die Neusynthese des komplementären DNA-Strangs durch die thermostabile DNA-Polymerase. Diese Schritte werden mehrfach wiederholt und theoretisch verdoppelt sich jede DNA-Matrize bei jedem Zyklus. Nach n Wiederholungen sind demzufolge 2^n Nukleinsäuremoleküle im Ansatz vorhanden. Praktisch ist dies allerdings durch die Aktivität der Polymerase limitiert, wenn Primer und Nukleotide im Überschuss eingesetzt werden. Daher erfolgt die Amplifikation der DNA-Matrize nur in einer bestimmten Phase exponentiell. Um Amplifikationsfehler durch Basenfehlpaarungen zu minimieren kann die *HotStar HiFidelity* DNA Polymerase mit einer zusätzlichen 3´→5´Exonukleaseaktivität, die auch als *Proof-*

Reading-Funktion bezeichnet wird, eingesetzt werden.

Neben der Amplifikation von DNA-Sequenzen können mit Hilfe der PCR Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme an die 5´- und 3´-Enden des PCR-Produktes eingebracht werden. Hierbei liegen die Restriktionsschnittstellen nicht direkt am 5´-Ende der Primer, da zusätzlich ein Überhang von drei *nonsense*-Basen eingebaut wird, um eine optimale Restriktion zu ermöglichen (Zimmermann et al., 1998). Für die Klonierung kann das PCR-Produkt anschließend mit dem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten und für die Ligation mit einem linearisierten Vektor verwendet werden.

3.3.13 Quantitative PCR (qPCR)

Mit Hilfe der quantitativen PCR kann die Kinetik einer Standard-PCR in *real time* verfolgt werden. Gleichzeitig wird eine Bestimmung der Template-Konzentration im Ansatz mit Hilfe einer Standard-Titration ermöglicht. Die Messung der PCR-Kinetik kann wahlweise sequenzunspezifisch mit einem DNA interkalierenden Fluorophor (z.B. *SYBR Green*) oder sequenzspezifisch mit fluoreszenzmarkierten Sonden (z.B. *TaqMan* Sonden). Die Intensität der emittierten Fluoreszenz ist in der exponentiellen Phase direkt proportional zu der Menge neu gebildeter PCR-Produkte. Eine Quantifizierung erfolgt über die Formel:

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

N=Anzahl der amplifizierten Moleküle

N₀=initiale Menge der Moleküle

E=PCR-Effizienz

n=Anzahl der Zyklen

Unter optimalen Bedingungen verdoppelt sich das Ausgangsmaterial bei jedem Zyklus (PCR-Effizienz= 2). Ist die PCR-Effizienz bei zwei Reaktionen vergleichbar, ist der Anstieg des Signals nur abhängig von der Anfangskonzentration des *Templates*.

Alle sequenzspezifischen Primer wurden mit der Software *Primer Express 2.0* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ausgewählt.

3.3.13.1 Absolute Quantifizierung mit *SYBR Green*

Um die Anzahl der mCMV-Genome aus infizierten Organen zu bestimmen oder die BAC-Freiheit von mCMV-Rekombinanten zu überprüfen wurde eine *SYBR Green* qPCR mit dem *SYBR Green* Kit durchgeführt. Die Detektion erfolgt über die Interkalierung des Fluorophors *SYBR Green* in dsDNA, wobei theoretisch auch unspezifische PCR-Produkte oder Primerdimere detektiert werden können. Da unspezifische Produkte im Vergleich zum Amplifikat eine abweichende Schmelztemperatur besitzen, wurde nach Abschluss der PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Reaktionstemperatur wurde hierbei von 60°C auf 95°C erhöht, wodurch die dsDNA denaturiert, der interkalierte Farbstoff freigesetzt und

die Fluoreszenzabnahme detektiert wurde. Das Maximum der Fluoreszenzabnahme gibt die Schmelztemperatur des amplifizierten PCR-Produktes an, welche bei einem einheitlichen PCR-Produkt identisch ist.

Um eine absolute Quantifizierung zu ermöglichen, wurde ein Plasmidstandard (pDrive-gB-PTHrP-BAC) mit definierter Teilchenzahl mitgeführt. Das Plasmid enthält das mCMV-Gen M55/gB, das zelluläre Gen *pthrp* (*parathyroid hormone-related peptide encoding gene*) sowie die BAC-Sequenz (Lemmermann et al., 2010b). Die Quantifizierung des zellulären Gens *pthrp* ermöglicht eine Normierung der viralen Genome auf eine definierte Zellzahl. Nach Linearisierung wurde das Standardplasmid aufgereinigt und auf eine definierte Molekülanzahl eingestellt. Anschließend erfolgte eine \log_{10} -Titration von $0,5 \times 10^6$ bis $0,5 \times 10^0$ Molekülen/ μl in Tris-Puffer und der Einsatz in der qPCR.

Tab. 2.8 Ansatz der SYBR Green PCR

Komponente	Volumen	Endkonzentration
2x <i>QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix</i>	10 μl	1x
Primer-for/-rev (10 μM)	1,5 μl	0,75 μM
DNA	2-5 μl	100ng
<i>Aqua bidest.</i>	ad 20 μl	

Um Kontaminationen zu verhindern, wurde der *Mastermix* (beinhaltet Polymerase, Puffer, Primer) in einem separaten Raum unter einem Tamer (Oncor Appligen, Heidelberg) angesetzt und jeweils 18 μl des *Mastermixes* vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe der zu analysierenden DNA. Die qPCR wurde am *real-time Cycler* mit dem folgenden Temperaturprofil durchgeführt:

Tab. 2.9 Temperaturprofil für die SYBR Green PCR

	Zeit	Temperatur	
Aktivierungsschritt	15min	95°C	Aktivierung der <i>HotStarTaq</i> Polymerase
Denaturierung	15sec	94°C	
<i>Annealing</i>	30sec	62°C	
Extension	45sec	72°C	Datenakquisition
Zyklenzahl	50		
Schmelzkurve			
Denaturierung	15sec	95°C	
Annealing	1min	60°C	
Denaturierung	15sec	95°C	

3.3.14 BAC-Mutagenese mittels Zwei-Schritt-Rekombination zur Generierung rekombinanter mCMV

Die Zwei-Schritt-Rekombinationsmutagenese in *E. coli* (DH10B) wurde in Anlehnung an die Verfahren von O'Connor et al. (1989), Messerle et al. (1997), Borst et al. (1999), sowie Wagner et al. (1999) durchgeführt. Hierfür wurde zunächst ein *Shuttle*-Plasmid konstruiert, das die in das mCMV-Genom zu integrierende Sequenz enthält, die ihrerseits von Sequenzen flankiert wird, welche homolog zum gewünschten Integrationsort sind (Smith G.R., 1988).

Material: LB-Agarplatten
LB-Agarplatten mit 5% (w/v) Saccharose

Durchführung:

I. Cotransformation des *Shuttle*-Plasmids und Bildung der Co-Integrate

Elektrokompetente DH10B-Bakterien, die das zu mutierende mCMV-BAC-Plasmid enthielten, wurden mit 1ng *Shuttle*-Plasmid-DNA transformiert (siehe 3.3.2) und für 1h in LB-Medium bei 30°C geschüttelt. Der Ansatz wurde anschließend auf LB-Platten (Cam/Kan) ausplattiert und für 24-36h bei 30°C inkubiert. Durch homologe Rekombination wird in diesem Schritt das *Shuttle*-Plasmid vollständig in das mCMV-BAC-Plasmid integriert und es erfolgt die Ausbildung sogenannter Co-Integraten.

II. Anreicherung von Co-Integraten und Entfernung der *Shuttle*-Plasmide

Aus Schritt I wurden 10 Bakterienkolonien auf LB-Platten (Cam/Kan) ausgestrichen und üN bei 43°C inkubiert. Bei dieser Temperatur können nur Co-Integrate replizieren. In nicht integrierten *Shuttle*-Plasmiden wird ein falsch gefaltetes Replikationsprotein (*RepA*) synthetisiert, welches den temperatursensitiven Replikationsursprung *pSC101* des *Shuttle*-Plasmides nicht mehr induzieren kann (Hashimoto-Gotho et al., 1981, Steinmetz et al., 1985; Blomfield et al., 1991). Nach diesem Schritt sollten große Einzelkolonien entstanden sein. War dies nicht der Fall, wurde Schritt II wiederholt.

III. Auflösung der Co-Integrate

10 große Bakterienkolonien aus Schritt II wurden auf LB-Platten (Cam) ausgestrichen und für 30h bei 30°C inkubiert, um die gebildeten Co-Integrate durch erneute homologe Rekombination aufzulösen. Dieser Schritt konnte optional wiederholt werden, um Einzelkolonien zu erhalten. Die selektionierten Klone enthalten entweder aufgelöste oder nicht-aufgelöste Co-Integrate.

IV. Selektion gegen nicht aufgelöste Co-Integrate

10 Bakterienkolonien von Schritt III wurden auf LB-Platten (Cam) mit 5% Saccharose (w/v) ausgestrichen und für 30h bei 30°C inkubiert. Bakterien, die nicht-aufgelöste Co-Integrate tragen, replizieren nicht in Gegenwart von Saccharose. Sie tragen das *SacB*-Gen unter Kontrolle des *Lac*-Promotors, der in Gegenwart von Saccharose aktiviert wird und die

Expression des Exoenzyms Levan-Saccharase induziert. Levan-Saccharase katalysiert die Synthese des Polysaccharids Levan aus Saccharose. Dies führt zu einer Levan-Akkumulation im periplasmatischen Raum mit lethalen Wirkungen auf *E.coli*. Die Selektion auf Saccharoseplatten wurde mindestens zweimal wiederholt.

V. Testen auf aufgelöste Co-Integrate

Da aufgelöste Co-Integrate Kan-sensitiv sind, erfolgt die Selektion auf Kan- und Cam-Platten. Hierzu wurden Kan- und Cam-Platten mit 100 Einzelklonen aus Schritt IV beimpft und üN bei 37°C kultiviert. Es ist zu beachten, dass erst die Kan-Platte beimpft wurde.

VI. Charakterisierung der Kan-sensitiven Klone

Ausgehend von 10 Kan-sensitiven Klonen wurden jeweils 10ml LB-Flüssigkultur (+Cam) angeimpft und unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Dauerkultur angelegt (siehe 3.3.1.3) und die BAC-DNA präpariert (siehe 3.3.3.5), um die Integrität des BAC-Plasmids über Restriktionsanalyse zu verifizieren (siehe 3.3.6). Um die Sequenzintegration zu bestätigen wurde die entsprechende Region des mCMV-Genoms mittels PCR amplifiziert und das Produkt sequenziert. Hierbei enthalten statistisch gesehen 50% der Klone das mutierte mCMV-BAC-Plasmid.

VII. Virusrekonstitution

Durch Sequenzierung verifizierte mCMV-BAC-Plasmide wurden für eine BAC-Maxipräparation verwendet (siehe 3.3.3.5). Die Virusrekonstitution erfolgte wie unter 3.1.4 durch Transfektion von MEF mit der isolierten BAC-DNA.

3.4 Molekularbiologische Methoden: RNA

3.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Lymphknoten oder infizierten MEF wurde das *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN, Hilden) verwendet. Nach Zellyse im stark denaturierenden Guanidin-Isothiocyanat-Puffer wurde die RNA unter Hochsalzbedingungen spezifisch an eine Silicagelmatrix gebunden. Residuale DNA-Kontaminationen wurden enzymatisch abgebaut, ausgewaschen und die RNA in RNase-freiem H₂O eluiert.

3.4.1.1 Isolierung von RNA aus infizierten Zellen

<u>Kits:</u>	RNeasy Mini Kit QIAshredder RNase-free DNase Set
<u>Material:</u>	β-Mercaptoethanol
<u>Puffer:</u>	PBS

Durchführung: Infizierte Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 350µl/*Well* RLT-Puffer (+1% β-Mercaptoethanol) lysiert. Mit einem Zellschaber wurden die lysierten Zellen abgelöst und über eine QIAshredder-Säule homogenisiert. Das Homogenat konnte bis zur RNA Isolierung bei -70°C aufbewahrt werden. Nach dem Auftauen wurden die Proben mit 350µl 70% Ethanol versetzt und auf die *spin*-Säule geladen. Die Aufreinigung der RNA erfolgte nach Protokoll, wobei die Säule zusätzlich mit DNase (10µl DNase in 70µl RDD-Puffer) behandelt wurde, um DNA-Kontaminationen zu vermeiden. Die RNA wurde in 30µl RNase-freiem H₂O eluiert und bei -70°C gelagert. Für ein detailliertes Protokoll siehe:

<http://www.qiagen.com/products/rnastabilizationpurification/rneasyminisystem/rneasymini.aspx#Tabs=t2>

3.4.1.2 Isolierung von RNA aus Lymphknoten

Kits: RNeasy Mini Kit
RNase-free DNase Set

Material: β-Mercaptoethanol

Durchführung: Die Lymphknoten wurden in 350µl RLT-Puffer (+1% β-Mercaptoethanol) aufgenommen und mit Hilfe der Schwingmühle homogenisiert (siehe 3.3.3.6). Anschließend wurden die Zelltrümmer aus dem Homogenat bei 21.000xg für 5min pelletiert (Eppendorf zentrifuge 5417R). Der Überstand wurde mit 350µl 70% Ethanol versetzt und auf die *spin*-Säule geladen. Es folgte der enzymatische Abbau residueller DNA durch Zugabe von 80µl DNase und Inkubation für 15min bei 20-22°C. Nach zweimaligem Waschen konnte die RNA in 30µl RNase-freiem H₂O eluiert werden. Die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll:

<http://www.qiagen.com/products/rnastabilizationpurification/rneasyminisystem/rneasymini.aspx#Tabs=t2>

3.4.2 Quantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)

Für die Transkriptquantifizierung synthetisiert zunächst eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase; RT), aus der im Ansatz enthaltenen RNA einen komplementären DNA-Strang (cDNA). Dieser dient als Matrize für die anschließende quantitative PCR (siehe 3.3.13) mit sequenzspezifischen *TaqMan*-Sonden (siehe Tab. 2.4). Die verwendeten *TaqMan*-Sonden sind am 5'-Ende mit einem Fluoreszenz-Reporter und am 3'-Ende mit einem *Quencher* markiert. Bindet die Sonde sequenzspezifisch an die ssDNA-Matrize wird die Sonde durch die 5'→3'-Exonukleasefunktion der Polymerase abgebaut. Durch die räumliche Trennung von Reporter und *Quencher* emittiert der Reporter nun Fluoreszenz, da diese nicht mehr von *Quencher* unterdrückt wird. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zum gebildeten PCR-Produkt.

Alle Quantifizierungen wurden mit dem *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems) unter Verwendung des *OneStep RT-PCR Kits* (QIAGEN, Hilden) durchgeführt. Dieses Kit beinhaltet sowohl die RT als auch die DNA-Polymerase und ermöglicht cDNA-Synthese und

real time PCR in einem Reaktionsansatz. Hierbei erfolgt zunächst die Reverse Transkription bei 50°C. Bei dieser Temperatur ist die DNA-Polymerase zunächst inaktiv. Erst durch einen Initialisierungsschritt (95°C) wird die Polymerase aktiviert, während gleichzeitig die Reverse Transkriptase denaturiert.

Um eine absolute Quantifizierung zu ermöglichen wurden als externe Standards *in vitro* Transkripte mit einer Teilchenanzahl von 10^6 bis 10 pro Ansatz eingesetzt (Kurz et al., 1999; Simon et al., 2006). In Tab 2.10 und 2.11 sind der Pipettieransatz der RT-qPCR sowie das verwendete Temperaturprofil aufgeführt.

Tab. 2.10 Pipettierschema der RT-qPCR

Komponente	Volumen	Endkonzentration
5x <i>OneStep</i> RT-PCR-Puffer	5µl	1x; 2,5mM MgCl ₂
dNTP Mix (10mM je dNTP)	1,67µl	0,67mM
Primer-for/-rev (10µM)	1,5µl	0,6µM
Sonde (10µM)	0,66µl	0,264µM
<i>OneStep</i> RT-PCR Enzym Mix	1µl	
ROX (10µM)	0,33µl	0,132µM
MgCl ₂ (25mM)	1,5µl	1,5mM
RNA	≤ 1µg	
Rnase-freies Wasser	ad 25µl	
Endvolumen	25µl	

Tab. 2.11 Temperaturprofil für die RT-qPCR:

	Zeit	Temperatur	
Reverse Transkription	30min	50°C	
Initialer PCR Aktivierungsschritt	15min	95°C	Denaturierung der Reversen Transkriptase; Aktivierung der <i>HotStar Taq</i> Polymerase
2-Schritt <i>Cycling</i>			
Denaturierung	15sec	94°C	
<i>Annealing/Extension</i>	60sec	58°C	Daten Akquisition
Zyklenzahl	45		

3.5 Biochemische Methoden

3.5.1 Gesamtproteinextraktion aus infizierten Zellen

Puffer: Lysepuffer zur Gesamtproteinextraktion

HEPES pH 7,7	20mM	1ml (1M)
NaCl	200mM	2ml (5M)
MgCl ₂	1,5mM	75µl (1M)
EDTA	0,4mM	40µl (0,5M)
Triton X-100	1%	5ml (10%)
Lagerung bei 4°C		

Puffer: Proteinaseinhibitor (PI *Complete*, Roche, Mannheim)
DTT (1M; Endkonzentration: 0,5mM)

Durchführung: Zum Analysezeitpunkt wurden die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen, anschließend mit einem Zellschaber von der Kulturschale gelöst und in dem residualen PBS in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden pelletiert (1.000xg, 5min, 4°C, Eppendorf zentrifuge 5417R), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 200µl Lysepuffer (+PI (1:250), +1M DTT (1:2.000)) aufgenommen. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis, wurde die Probe zur Abtrennung von Zelltrümmern zentrifugiert (21.000xg, 10min, 4°C, Eppendorf zentrifuge 5417R). Die Gesamtproteine befanden sich im Überstand, welcher abgenommen und bis zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge mittels BCA-Test (siehe 3.5.2) bei -20°C gelagert wurde.

3.5.2 Proteinquantifizierung

Die Proteinmenge in Zelllysaten wurde mittels BCA-Test photometrisch bestimmt. Das Prinzip des BCA-Testes beruht auf der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ (Biuret Reaktion), welche von Cystein, Tryptophan, Tyrosin oder der Peptidbindung katalysiert wird. Bicinchonin-Säure (BCA) bildet unter alkalischen Bedingungen mit Cu⁺ einen lila-blauen Komplex, der bei 562nm photometrisch nachgewiesen wird. Die gemessene Absorption ist linear zu der in der Probe enthaltenen Proteinmenge in einem Messbereich zwischen 20µg/ml bis 2mg/ml Gesamtprotein. Zur Erstellung einer Eichgrade wird bei jeder Messung ein BSA-Standard mitgeführt.

Kit: BCA Protein Assay Kit

Durchführung: Wie von der Firma angegeben, wurden die Testreagenzien verdünnt und die BSA-Standardreihe titriert. Für die Messung der Proben wurden jeweils 200µl des BCA-Reagenzes in Duplikaten auf eine 96-Well-Platten pipettiert und anschließend 50µl Zelllysatz hinzugefügt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C erfolgte die photometrische

Messung (Multiskan MS, Thermo Scientific, Bonn). Die in der Probe enthaltene Proteinmenge konnte anhand der Eichgrade berechnet werden. Für ein detailliertes Protokoll siehe: <http://www.piercenet.com/instructions/2161296.pdf>

3.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Molekularmasse. Das zur Probe gegebene Detergenz SDS komplexiert mit den Proteinen und überlagert die Eigenladung der Proteine, so dass eine negative Nettoladung verbleibt, die eine Größenauftrennung im elektrischen Feld ermöglicht.

Puffer: 5x SDS PAGE Proben Puffer (*Laemmli*-Puffer)

Tris/HCl pH 6,8	0,225M	2,25ml 1M Tris
Glycerol	50%	5ml (100%)
SDS	5%	2,5ml 20% SDS
Bromphenolblau	0,05%	5mg
Dithiothreitol	0,25M	2,5ml 1M
		mit H ₂ O _{demin} ad 10ml

4x Trenngelpuffer

SDS	0,4%	20ml 10% SDS
Tris/HCl pH 8,8	1,5M	90,9g
		mit H ₂ O _{demin} ad 500ml

4x Sammelgelpuffer

SDS	0,4%	20ml 10% SDS
Tris/HCl pH 6,8	1,25M	30,28g
		mit H ₂ O _{demin} ad 500ml

5x Elektrodenpuffer

SDS	0,5%	100ml 10% SDS
Glycin	960mM	144,13g
Tris/HCl pH 8,3	125mM	30,29g
		mit H ₂ O _{demin} ad 2000ml

Material: PageRuler™ Prestained Protein Ladder

Durchführung: Für die elektrophoretische Auftrennung wurden 50µg Gesamtprotein eingesetzt. Das benötigte Volumen des Zelllysates (siehe 3.5.1./2.) wurde entnommen, mit 1/5 Probenvolumen *Laemmli*-Puffer versetzt und für 5min bei 95°C aufgeköcht. Um später die Größen der Proteinbanden bestimmen zu können, wurde zusätzlich ein Proteinstandard mitgeführt. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem polymerisierten Acrylamidgel der folgenden Zusammensetzung:

Tab. 2.12 Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel

	Sammelgel (4%)	Trenngel (12,5%)
Acrylamidlösung (30%)	1,5ml	7,2ml
4x Sammelgelpuffer	2,82ml	-
4x Trenngelpuffer	-	4,5ml
<i>Aqua bidest.</i>	6,93ml	6,3ml
APS (10%)	130 μ l	130 μ l
TEMED	20 μ l	20 μ l

Die gegossenen Gele wurden in der Elektrophoresekammer fixiert und die Kammer mit 1xElektrodenpuffer gefüllt. Nach dem Auftragen der Proben wurde eine Spannung von 100V angelegt. Nachdem die Proben in das Trenngel eingelaufen waren, wurde die Spannung auf 150V erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, nachdem das Bromphenolblau des Probenpuffers aus dem Gel heraus gelaufen war. Das Sammelgel wurde abgetrennt und das Trenngel konnte für den Western Blot verwendet werden (siehe 3.5.4.).

3.5.4 Western Blot

Nach dem Transfer der elektrophoretisch-aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran und der spezifischen Antikörperbindung kann das Protein über Chemilumineszenz nachgewiesen werden. Die an den Sekundär-Ak gekoppelte Meerrettichperoxidase (HRP) oxidiert Luminol in Gegenwart von H_2O_2 . Ein Oxidationszwischenprodukt des Luminols emittiert Licht bei 430nm, das auf einem Autoradiographiefilm detektiert werden kann.

Kit: ECL Plus Western Blotting Detection System

Puffer: Transferpuffer (nach Bjerrum-Schäfer-Nielsen)

Glycin	39mM	1,46g
Ethanol	20%	100ml
SDS	1,3mM	1,9ml aus 10%
Tris/HCl (pH 8,4)	48mM	2,91g
		mit H_2O_{demin} ad 500ml

10x PBS

NaCl	1,37mM	80g
KCl	26,8mM	2g
$Na_2HPO_4(2H_2O)$	78,1mM	14g
KH_2PO_4	14,7mM	2g
		mit H_2O_{demin} ad 500ml

Blockierpuffer

Magermilchpulver	5%	50g
------------------	----	-----

Triton X-100	0,1%	1ml mit PBS ad 1000ml
Waschpuffer I		
Magermilchpulver	1%	10g
Triton X-100	0,1%	1ml mit PBS ad 1000ml
Waschpuffer II		
Triton X-100	0,1%	1ml mit PBS ad 1000ml

Material: Autoradiographiefilm (Lumi-Film Chemiluminiscent Detection Film)
 PVDF-Membran
 Whatman-Papier

Durchführung: Die elektrophoretisch-aufgetrennten Proteine wurden aus dem SDS-Gel mittels *semi-dry* Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert. Zunächst wurden vier Whatman-Papiere auf die Größe des Gels zugeschnitten (5,5x16,5cm) und mit Transferpuffer getränkt. Nach der Aktivierung der PVDF-Membran für 1min in Methanol (100%), wurde diese mit *Aqua bidest.* gespült und anschließend in Transferpuffer gelagert. In der Blotkammer wurden zunächst zwei Whatman-Papiere und die aktivierte PVDF-Membran platziert. Das SDS-Gel wurde luftblasenfrei auf die Membran gelegt und mit zwei Whatman-Papieren bedeckt. Der Transfer erfolgte bei 0,8mA/cm² für 90min. Der Proteintransfer auf die PVDF-Membran konnte anhand der Übertragung des gefärbten Längenstandards überprüft werden. Anschließend wurde die Membran für 1h unter Schütteln in Blockierlösung inkubiert. Der Primär-Antikörper wurde in 5-7ml Waschpuffer verdünnt und mit der Membran ün unter Schütteln bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran 5x10min mit Waschlösung I gewaschen und anschließend mit dem HRP-markierten Sekundär- Antikörper (1:10.000) für 1h inkubiert. Nachdem die Membran 5x10min mit Waschlösung II gewaschen wurde, konnte der Nachweis der Proteine erfolgen.

Hierfür wurde die PVDF-Membran mit 2ml der frisch angesetzten Detektionslösung gespült und anschließend zwischen zwei Klarsichtfolien in eine Filmkassette überführt. Im Fotolabor wurde ein Autoradiographiefilm auf die Membran gelegt und nach unterschiedlicher Expositionszeit entwickelt. Zur Größenzuordnung der Proteinbanden wurde der Proteinstandard auf dem entwickeltem Film markiert.

3.6 Tierexperimentelle Methoden

3.6.1 Immunsuppression

Mäuse wurden in einer Kleintierbestrahlungsanlage (Buchler, Braunschweig) mit zwei ¹³⁷Cs-Quellen mit einer Dosis von 6,5Gy sublethal bestrahlt. Die Bestrahlung der Versuchstiere

induziert die Aplasie des Knochenmarks durch Auslöschung der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (Mutter et al., 1988).

3.6.2 Intraplantare Infektion

Die intraplantare mCMV-Infektion erfolgte mit 1×10^5 PFU eines gereinigten Virusstocks in 25 μ l PBS. Die verwendete Virussuspension wurde immer auf Eis gelagert und mit Hilfe einer 1ml Spritze und Kanülen (0,4x19mm) in die linke Hinterpfote injiziert.

Bei immunsupprimierten Tieren ist nach 7 Tagen eine deutliche Hämorrhagie und lokale Schwellung der Hinterpfote sichtbar. Bei immunkompetenten Tieren ist die Schwellung deutlich geringer.

3.6.3 Organentnahme und Probenkonservierung

Medium: MEM (10%FCS)

Die Versuchstiere wurden mit CO₂ betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Nach Desinfektion mit 70% Ethanol wurde der Bauchraum eröffnet und Lunge, Milz, Leber und Speicheldrüsen entnommen. Die Organe wurden in Einfrierröhrchen überführt, auf Eis gekühlt und anschließend bei -70°C gelagert. Wurden die Organe zur Virustiterbestimmung verwendet (siehe 3.2.2.2) erfolgte die Lagerung in MEM.

3.6.4 Experimentelle Knochenmarktransplantation und mCMV-Infektion

3.6.4.1 Isolierung von Knochenmarkzellen

Puffer: PBS
PBS+2% FCS (v/v)

Durchführung: Als Knochenmarkzellen (KMZ)-Spender wurden weibliche BALB/c-Mäuse verwendet, die nach Betäubung mit CO₂ durch zervikale Dislokation getötet wurden. Nach Desinfektion mit 70% (v/v) Ethanol wurde das Fell der Hinterbeine entfernt und der Femur aus der Hüftgelenkpfanne getrennt. Femur und Tibia wurden freipräpariert und in PBS+2% FCS gelagert, um ein Austrocknen zu verhindern. Zum Spülen der Knochenmarkhöhle wurden die Epiphysen abgetrennt, das Knochenmark mit Hilfe einer Kanüle (0,4x12mm) mit PBS+2% FCS herausgespült und in einem 50ml Reaktionsgefäß gesammelt. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation: 300xg, 10min, Megafuge 2.0; Rotor: 8160) und anschließend über ein Zellnylonsieb (100 μ m) filtriert. Nach der Zellzählung wurde die Zellzahl auf 10^7 KMZ/ml mit PBS eingestellt. Ein detailliertes Protokoll wurde von Podlech et al. (2002) veröffentlicht.

3.6.4.2 Immunsuppression, Transfer von Knochenmarkzellen und Infektion

Die Immunsuppression der Rezipienten erfolgte durch Bestrahlung mit einer Dosis von 6,5Gy. Die KMZ wurden 3-4 h nach der Bestrahlung in einer Konzentration von 5×10^6 KMZ/500 μ l PBS intravenös (i.v.) in die Schwanzvene appliziert. Die intraplantare mCMV-Infektion erfolgte direkt nach Gabe der KMZ (siehe 3.6.2.).

3.6.5 *In vivo*-Depletion von CD8 T-Zellen und NK Zellen

Um den Einfluss der Natürliche Killer (NK)- und CD8 T-Zellen auf die immunologische Kontrolle der mCMV-Infektion zu analysieren, wurden diese *in vivo* mit einem spezifischen Antikörper depletiert. Hierbei bindet der Antikörper sein Zielantigen und induziert eine Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität oder Komplement-vermittelt Zytolyse der Zielzellen. Um eine residuale Aktivität der depletierten Zellpopulation auf die Kontrolle der Infektion auszuschließen, erfolgte die Depletion 24h vor einer Infektion.

Der Vorteil einer spezifischen *in vivo*-Depletion von Zellpopulationen im Vergleich zu *knockout*-Mäusen, mit einer genetischen Defizienz in der entsprechenden Zellpopulation, beruht darauf, dass die immunologische Reifung in Anwesenheit aller Zellpopulationen erfolgt. Die Depletion kann dann zu einem definierten Zeitpunkt durchgeführt werden.

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

Durchführung: Den Versuchstieren wurden 24h vor der Infektion 25 μ l anti-*asialo* GM1 Antiserum/500 μ l PBS bzw. 1mg/500 μ l PBS monoklonaler anti-CD8-AK (Stipan Jonjic, Kroatien) i.v. injiziert. Die Depletionseffizienz sollte durch zytofluorometrische Analyse kontrolliert werden.

3.6.6 Adoptiver Transfer

Der adoptive Transfer (AT) *in vitro* generierter, peptidspezifischer T-Zelllinie (CTLL) ermöglicht die Analyse des protektive Potenzial dieser Zellen in immunsupprimierten, mCMV-infizierten Rezipienten in Abwesenheit anderer potenziell protektiver Immunzellen.

Durchführung: Die peptid-spezifische CTLL wurde wie unter 3.7.3 beschrieben generiert und kultiviert. Am Tag des AT wurde die CTLL geerntet und dreimalig mit PBS gewaschen (5min bei 423xg). Nach Bestimmung der Zellzahl mit Trypanblau (siehe 3.1.3) wurde die benötigte Zellkonzentration eingestellt. In mit 6,5Gy immunsupprimierte BALB/c-Mäuse wurden 0,5ml der Zelllösung i.v. injiziert, gefolgt von der intraplantaren mCMV-Infektion mit 1×10^5 PFU. Neun Tage nach dem AT erfolgte die sterile Entnahme der Organe zur Quantifizierung der Virustiter in den mCMV-Zielorganen mittels Plaque-Assay.

3.7 Immunologische Methoden

3.7.1 Gewinnung von Lymphozyten aus Organen

Die Einzelzellsuspension der Organe wurde für die zytofluorometrische Zellcharakterisierung (siehe 3.8.2) oder die immunomagnetische Isolierung von CD8 T-Zellen (siehe 3.7.2.) verwendet.

3.7.1.1 Aufarbeitung von Milzen oder Lymphknoten

Medium: PBS
RPMI (5%FCS)

Material: TÜRKs-Lösung

Durchführung: Nach der Organentnahme wurden die Milzen oder Lymphknoten in RPMI gelagert und zur Herstellung einer Einzelzellsuspension mit dem Stempel einer 2ml Spritze über ein Metallsieb homogenisiert. Die Zellsuspension wurde in 20ml RPMI aufgenommen und abzentrifugiert (550xg, 5min). Das Zellpellet wurde in 5ml PBS resuspendiert und über ein 40µm Zellsieb filtriert. Anschließend wurde die Zellzahl mit TÜRKs-Lösung bestimmt.

3.7.1.2 Aufarbeitung von Lungen

Material: PBS/Heparin
Heparin (25000 IE/ml) 50U/ml 1ml
in 500ml PBS

TÜRKs-Lösung

Medium: DMEM (10% FCS)
LSM1077 Lymphocyte Separation Medium (Ficoll)
RPMI (5% FCS)

Enzyme: DNase (Stock 3mg/ml, Endkonzentration: 0,05mg/ml)
Kollagenase A (Stock 25mg/ml, Endkonzentration: 1,7mg/ml)

Durchführung: Der Bauchraum der mit CO₂ betäubten Mäuse wurde eröffnet und die *Vena cava inferior* inzidiert. Durch Herzpunktion wurde die Lunge mit 5-10ml PBS/Heparin gespült, anschließend entnommen und in DMEM gelagert. Nach der Entfernung von hilären Lymphknoten, Trachea und Hauptbronchien wurde das Lungengewebe von bis zu 4 Lungen pro Ansatz mit einer Schere zerkleinert und in einen Erlenmeyerkolben überführt. Es folgte ein enzymatischer Aufschluss in 15ml DMEM unter Zusatz von 300µl DNase I und 1ml Kollagenase A unter Rühren für 60min bei 37°C. Die Zellsuspension wurde danach über ein Metallsieb gegeben, mit dem Stempel einer 2ml Spritze homogenisiert und anschließend in einem 50ml Röhrchen abzentrifugiert (550xg, 7min). Der Überstand wurde in ein 50ml Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert (550xg, 7min). Das Zellpellet wurde in 50ml DMEM resuspendiert und wieder abzentrifugiert (550xg, 7min). Anschließend wurden beide

Pellets in 16ml RPMI vereint und über ein 100µm Zellsieb filtriert. Es wurden 4ml Ficoll in ein 15ml Röhrchen vorgelegt, mit 8ml der Zellsuspension überschichtet und ohne Bremse für 30min bei 779xg zentrifugiert. Hierbei reichert sich mononukleäre Zellen in der Phase zwischen Medium und Ficoll an, während Erythrozyten, Granulozyten und Zelltrümmer pelletiert werden. Die lymphozytenreiche Bande wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen, sofort mit 15ml RPMI gewaschen und die Zellzahl wurde mit TÜRKs Lösung bestimmt.

3.7.2 Immunomagnetische Anreicherung von CD8 T-Zellen

Die immunomagnetische Zellseparation erfolgte mit Hilfe monoklonaler Antikörper an deren Fc-Teil paramagnetische *Beads* gekoppelt sind. Die Einzelzellsuspension lymphatischer Organe wurde mit den markierten Antikörpern inkubiert, die ihr Zielantigen binden. Anschließend erfolgte die Auftragung der Zellsuspension auf eine ferromagnetische Säule, die einem starken Magnetfeld ausgesetzt wurde. Die magnetisch-markierten Zielzellen wurden in der Säule zurückgehalten, während nicht-markierte Zellen von der Säule gewaschen wurden. Abschließend konnten die Zielzellen außerhalb des Magnetfeldes eluiert werden (Miltenyi et al., 1990).

Mittels immunomagnetischer Zellseparation wurden CD8 T-Zellen aus Milz- oder Lungenzellsuspensionen isoliert und konnten anschließend als Effektoren im ELISpot-Assay eingesetzt werden (siehe 3.8.1).

Material: LS MACS Separation Columns

Medium: MEMalpha (5% FCS)

Microbeads: anti-Maus CD8 (Ly2) *Microbeads*

Puffer: PBS

5xMACS-Puffer

EDTA Na ₂ x2H ₂ O	10mM	1,86g
BSA	2,5% (w/v)	12,5g
		ad 500ml PBS

Lösung steril filtrieren, 1xMACS Puffer mit PBS ansetzen

Durchführung: Für die Anreicherung wurden 10⁷ Zellen (siehe 3.7.1) mit 90µl MACS-Puffer und 10µl *Microbeads* versetzt. Handelte es sich um Lungenzellsuspensionen wurden 10⁷ Zellen 20µl *Microbeads* zugesetzt. Die Zellen wurden für 15min bei 4°C inkubiert und anschließend zur Entfernung von ungebundenen *Microbeads* mit 50ml MACS-Puffer gewaschen (300xg, 10min). Das Pellet wurde in 500µl MACS-Puffer pro 1x10⁸ Zellen aufgenommen und auf die mit 3ml MACS-Puffer äquilibrierte LS-Säule, mit einer Kapazität von maximal 2x10⁹ Zellen, gegeben. Nach dreimaligem Waschen der Säule mit je 3ml MACS-Puffer, erfolgte die Elution der Zielzellen in 5ml MACS-Puffer. Die Zellen wurden erneut über eine zweite LS-Säule gegeben, um den Reinheitsgrad zu erhöhen. Anschließend

wurden die eluierten Zellen mit MEMalpha gewaschen (550xg, 5min) und in 1ml MEMalpha resuspendiert. Nach der Zellzählung in Trypanblau konnten die isolierten CD8 T-Zellen als Effektoren im ELISpot-Assay (siehe 3.8.1) eingesetzt werden.

3.7.3 Anlage und Restimulation von zytotoxischen T-Zellen

Polyklonale, zytolytische CD8 T-Lymphozyten-Linien (CTLLs) wurden aus Milzzellen infizierter Mäuse (>12 Wochen p.i.) durch wiederholte Restimulation mit Peptid-beladenen APC in IL-2-haltigem Medium gewonnen. Unter diesen Kultivierungsbedingungen reifen Peptid-spezifische *Memory* CD8 T-Zellen zu T-Zellen mit typischen Effektorfunktionen wie IFN γ -Sekretion und zytolytische Aktivität. Eine zytofluorometrische Phänotypisierung zeigte, dass die kultivierten CTLLs einen Effektor-*Memory* Phänotyp exprimieren (Ebert et al., 2012).

Medium: MEMalpha (10%FCS)
MEMalpha (10%FCS+100U rhIL-2/ml)
Erythrozytenlysepuffer

Material: antigene Peptide (siehe 2.4)

Durchführung: Aus 3 Milzen latent infizierter BALB/c-Mäuse wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt (siehe 3.7.1.1). Nach einer Erythrozytenlyse (2ml Erythrozytenlysepuffer/Milz) wurden die Milzzellen mit 30ml MEMalpha gewaschen. Die Zellen wurden auf eine Zellzahl von $1,5 \times 10^7$ Zellen/1,5ml MEMalpha ohne IL-2 eingestellt, in eine 24-Well-Platte ausgesät und das antigene Peptid wurde in einer Endkonzentration von 10^{-9} M zugesetzt. Nach 4 Tagen wurden 0,5 ml/Well IL-2 haltiges MEMalpha supplementiert (entspricht: 50 U IL-2 pro Well). Abhängig von der erreichten Zelldichte wurden die Kulturen 1-2 Mal pro Woche gesplittet, wobei das Kulturmedium mit IL-2 (100U pro Kultur) versetzt war.

Eine Woche nach Anlage der Kultur erfolgte eine erste Restimulation. Die ersten beiden Restimulationen erfolgten wöchentlich, alle späteren vierzehntägig. Für die Restimulation der CTLL wurden peptidbeladene Milzzellen als Stimulatorzellen verwendet. Dazu wurden die Milzzellen nach Erythrozytenlyse in MEMalpha aufgenommen und anschließend mit 30Gy bestrahlt. Die bestrahlten Milzzellen wurden mit MEMalpha +IL-2 auf eine Zellzahl von 5×10^5 /Well/ml eingestellt und anschließend mit synthetischem Peptid (10^{-9} M Endkonzentration) beladen. Die CTLL wurde in ihrem „alten“ Kulturmedium auf 5×10^5 Zellen/Well eingestellt und mit jeweils 1ml der peptidbeladenen APC supplementiert. Die CTLL konnte nach der 3. Stimulation als Effektorzellen im ELISpot-Assay (siehe 3.8.1) eingesetzt werden.

3.8 Methoden zur *ex vivo* Analyse Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen

3.8.1 ELISpot (*Enzyme-Linked Immunospot*)-Assay

Der ELISpot-Assay ermöglicht die Quantifizierung von Zytokin-sezernierenden Zellen auf Einzelzellebene. Hierbei bindet das Zytokin an einen immobilisierten Antikörper und wird anschließend über einen weiteren Antigen-spezifischen, Enzym-gekoppelten Detektionsantikörper nachgewiesen (Czerkinsky et al., 1983).

Für den ELISpot-Assay wird eine Mikrotiterplatte mit dem Primär-Antikörper (anti-IFN γ) beschichtet. Durch Co-Kultivierung von Effektoren und APC erfolgt die Aktivierung der Effektorzellen, die daraufhin IFN γ -sezernieren. IFN γ bindet an den Primär-Antikörper und kann anschließend detektiert werden. Die Visualisierung erfolgt über einen IFN γ -spezifischen, biotinylierten Sekundär-Antikörper, Streptavidin-Alkalische Phosphatase und ein Chromogen. Das Chromogen wird enzymatisch abgebaut und bildet ein blaues, unlösliches Präzipitat. Da ein Spot von einer Zytokin-produzierenden Zelle ausgeht, ermöglicht dies die Bestimmung der Effektorzellzahl in einer Lymphozytenpopulation.

Der ELISpot-Assay wurde eingesetzt um Frequenzen virus-spezifischer CD8 T-Zellen nach Infektion mit mCMV-WT.BAC, mCMV-m152.IE+E oder mCMV- Δ m152 zu vergleichen oder um die CD8 T-Zellaktivierung nach Co-Kultivierung mit APC infiziert mit mCMV-WT.BAC, mCMV-m152.IE+E oder mCMV- Δ m152 zu analysieren.

Antikörper: Primär Antikörper: anti-Maus IFN γ , Endkonzentration: 5 μ g/ml in PBS
Sekundär-Antikörper: anti-Maus IFN- γ Biotin-gekoppelt, Endkonzentration: 1 μ g/ μ l in PBS+0,5% BSA

Enzym: Streptavidin-ALP, 1:1000 in PBS

Material: 35% Ethanol (v/v)
MultiScreen_{HTS} Platte
BCIP/NBTplus

Medium: MEMalpha (7,5% oder 10% FCS)

Puffer: PBS
PBS+0,01% Tween20 (v/v)

Durchführung: Die MultiScreen_{HTS} Platte wurde für 1min mit 20 μ l frisch angesetzttem, 35%igem Ethanol (v/v) aktiviert und anschließend dreimal mit 200 μ l PBS gewaschen. Für die Antikörperbeschichtung wurde in jedes *Well* 55 μ l Primär-Antikörper (5 μ g/ml in PBS) pipettiert und üN bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde überschüssiger, ungebundener Antikörper zweimal mit 200 μ l *Aqua bidest./Well* ausgewaschen. Um unspezifische Bindungen zu blockieren wurden 200 μ l MEMalpha (10% FCS)/*Well* auspipettiert und diese für 2h im Brutschrank inkubiert.

ELISpot-Assay mit exogen beladenen APC: P815 (Haplotyp H-2^d) oder EL-4 (Haplotyp H-2^b) Suspensionszellen (2×10^6 Zellen/ml) wurden mit synthetischem Peptid (10^{-6} M) exogen beladen. Nach einstündiger Inkubation bei 20-22°C, wurden 50µl der beladenen APC (entspricht 1×10^5 Zellen) in jedes *Well* der ELISpot-Platte überführt. Als Effektoren kamen CD8 T-Zellen aus Milz, Lunge oder Lymphknoten infizierter Mäuse zum Einsatz, die zuvor immunomagnetisch isoliert worden sind (siehe 3.7.2). Die Effektoren wurden nach der Isolation in Medium aufgenommen und in titrierten Konzentrationen im Bereich von 5×10^3 bis 1×10^5 /100µl Medium/*Well* als Triplikate in die ELISpot-Platte ausgesät.

ELISpot-Assay mit mCMV-infizierten APC: Konfluente MEF wurden auf 100mm Zellkulturschalen zentrifugal mit 0,2 PFU infiziert (siehe 3.2.3) und anschließend für 1h im Brutschrank inkubiert. Die infizierten Zellen wurden trypsiniert, zweimal mit MEMalpha (7,5% FCS) gewaschen, und anschließend 10^5 Zellen/50µl Medium/*Well* ausgesät. Als Effektoren wurden CD8 T-Zellen immunomagnetisch aus Milzen akut oder latent WT.BAC-infizierter Mäuse isoliert (siehe 3.7.2) und im Bereich von 1×10^3 bis 5×10^4 /100µl Medium/*Well* eingesetzt. Alternativ konnten CTLLs als Effektoren verwendet werden, die in einem Bereich von 50-400 Zellen/100µl Medium/*Well* titriert wurden.

Nach Vorbereitung der Effektoren und APC wurde das Blockiermedium von der Platte abgenommen und die Zellen wie beschrieben ausgesät und für 18h im Brutschrank co-kultiviert. Nach zehnmalem Waschen mit 200µl PBS (0,01% Tween20)/*Well* wurde in jedes *Well* 55µl des Biotin-gelabelten Sekundär-Antikörpers (1µg/ml in PBS mit 0,5% BSA) pipettiert und die Platte für 2h im Brutschrank inkubiert. Ungebundener Antikörper konnte durch sechsmaliges Waschen mit 200µl PBS (0,01% Tween20)/*Well* entfernt werden. Anschließend wurden 100µl Streptavidin-Alkalische Phosphatase (1:1000 in PBS)/*Well* auf die Platte pipettiert und für 45min bei 20-22°C inkubiert. Die Platte wurde dreimal mit 200µl PBS (0,01% Tween20)/*Well* und anschließend dreimal mit 200µl PBS/*Well* gewaschen. Die Visualisierung der Spots erfolgte durch Zugabe von 100µl filtriertem BCIP/NBTplus/*Well* für 20-30min bei 20-22°C. Nach der Entwicklung wurde die Platte gründlich mit Leitungswasser gespült und getrocknet. Die Spots wurden am Mikroskop (Olympus SZX 12) mit 10-facher Vergrößerung gezählt.

Die Bestimmung der Frequenzen IFN γ -sezernierender Zellen wurde mittels Regressionsanalyse durchgeführt. Dabei bildet die Effektorzellzahl die unabhängige Variable x (Abszisse) und die Spotfrequenzen der Triplikate die abhängige Variable y (Ordinate). Da nur eine unabhängige Variable vorhanden ist ergibt sich eine lineare Einfachregression. Die berechnete Gerade ermöglicht die Ermittlung der *most probable number* (MPN) der Spotfrequenzen. Die 95% Konfidenzintervalle bezeichnen den Bereich, der die ermittelte Spotfrequenz mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% beinhaltet. Die Berechnungen wurden mit der Software *Mathematica V8.0 Statistics* „Linear Regression“ (Wolfram Research Inc., Champaign, IL) durchgeführt.

3.8.2 Zytofluorometrische Analysen

Die Durchflusszytometrie dient der Analyse von Oberflächenantigenen oder intrazellulärer Proteinen auf Einzelzellebene und ermöglicht eine biochemische und funktionelle Zellcharakterisierung. Hierfür wird zunächst eine Einzelzellpopulation mit Antigen-spezifischen, Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt. Im Durchflusszytometer passiert die Einzelzellsuspension im laminaren Flüssigkeitsstrom einen fokussierten Laserstrahl. Beim Durchtritt der Zellen durch den Fokus des Lasers wird zunächst die Lichtstreuung der Zellen als Vorwärtsstreuung (*Forward Scatter*, FSC) und die Lichtstreuung in einem 90° Winkel als Seitwärtsstreuung (*Side Scatter*, SSC) detektiert. Der FSC ermöglicht hierbei eine Abschätzung der Zellgröße, während der SSC die Granularität und Struktur der Zelle misst. Zusätzlich werden die Fluorochrome der gebundenen Antikörper angeregt und ihre entsprechende Emission über hochsensitive *Photomultiplier* detektiert. Um bei Mehrfachfärbungen die verschiedenen Emissionsspektren der verwendeten Fluorochrome zu unterscheiden, werden in der optischen Messeinheit zusätzlich dichroitische Spiegel und Bandpassfilter eingesetzt. Da sich die Emissionsspektren der Fluorochrome teilweise überlappen, müssen die erhobenen Daten durch Kompensation korrigiert werden. Zusätzlich können bei der Analyse Zellpopulationen, die sich über mehrere Parameter definieren, über *Gates* verknüpft werden.

Für diese Arbeit wurde das Durchflusszytometer FC500 von Beckman Coulter mit der Gerätesoftware CXP verwendet.

3.8.2.1 Färbung von Oberflächenmolekülen

Die Färbung von Oberflächenantigenen wurde verwendet um mCMV-spezifische CD8 T-Zellen aus Milz oder Lunge mittels Peptid-gekoppelten MHC-Klasse-I-Dextrameren (siehe 2.1.7.3) zu identifizieren und anhand ihrer Oberflächenantigenexpression zu charakterisieren.

Puffer: MACS-Puffer
PBS

Material: Antikörper (siehe 2.1.7.2)
Dextramere (siehe 2.1.7.3)

Durchführung: Lymphozyten wurden, wie unter 3.7.1 beschrieben, aus Milz oder Lunge isoliert, wobei für die Oberflächenfärbung 2×10^6 Zellen pro Ansatz eingesetzt wurden. Um Antigen-unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren, wurden die Zellen zunächst mit 2µl Fc-Block in 48µl MACS-Puffer für 5min bei 20-22°C vorinkubiert. Nach einem Waschschrift mit 1ml MACS-Puffer (300xg, 5min) wurden 10µl Dextramer (Immudex, Kopenhagen) zu den Zellen gegeben und für 10min bei 20-22°C inkubiert. Anschließend wurden Antikörper zur Oberflächenfärbung für die Phänotypisierung der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellen hinzugegeben und für 20min bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen

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

3.8.2.2 Färbung von intrazellulärem IFN γ

Durch Kultivierung von Milz- oder Lungenzellen mCMV-infizierter Mäuse mit synthetischem Peptid werden die enthaltenen peptid-spezifische CD8 T-Zellen selektiv stimuliert und zur IFN γ -Produktion angeregt. Die Zugabe von Brefeldin A (*GolgiPlug*) verhindert die Proteinsekretion, IFN γ akkumuliert in der Zelle und kann nach intrazellulärer Färbung mit einem IFN γ -spezifischen Antikörper zytofluorometrisch nachgewiesen werden. Für die Färbung ist eine Fixierung und Permeabilisierung der Zellen notwendig. Eine Oberflächenfärbung muss daher vor der Fixierung erfolgen.

Material: Antikörper (siehe 2.1.7.2)
Brefeldin A (*GolgiPlug*, BD Bioscience)
Cytofix/Cytoperm Plus Kit (BD Bioscience, Heidelberg)
MACS-Puffer
Peptide (siehe 2.5)

Medium: MEMalpha (10% FCS)

Durchführung: Aus mCMV-infizierten BALB/c-Mäusen wurden Milzen oder Lungen entnommen und wie unter 3.7.1 beschrieben aufgearbeitet. Anschließend wurden jeweils 2×10^6 Zellen/130µl MEMalpha mit antigenem Peptid (10^{-5} M/ 20µl PBS, Endkonzentration: 10^{-6} M) co-kultiviert. Zusätzlich wurden 50µl *GolgiPlug* hinzu gegeben (Endverdünnung: 1:1.000) und die Ansätze für 5h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden mit 1ml MACS-Puffer gewaschen (300xg, 5min) und anschließend mit 2µl Fc-Block in 48µl MACS-Puffer für 5min bei 20-22°C inkubiert. Für die anschließende Oberflächenfärbung (siehe 3.8.2.1) wurde ein PE-Cy5-konjugierter, CD8a-spezifischer Antikörper hinzu gegeben. Nach dem Waschen der Zellen mit 1ml MACS-Puffer (300xg, 5min), wurde das Zellpellet in 200µl *Cytofix/Cytoperm* aufgenommen und für 20min bei 4°C inkubiert. Es erfolgte ein Waschschriff mit 1ml *PermWash*-Puffer (300xg, 5min), anschließend wurde ein FITC-konjugierter, IFN γ -spezifischer Antikörper für die intrazelluläre Färbung hinzugegeben und für 20min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit 1ml *PermWash*-Puffer gewaschen und für die zytofluorometrische Messung in 700µl MACS-Puffer aufgenommen.

3.8.3 mCMV-Genom-weite Analyse der virus-spezifischen Immunantwort

Für die mCMV-ORF-Bibliothek wurde jeder von Rawlinson et al. (1996) vorhergesagter mCMV-*Open Reading Frame* (ORF) in ein Expressionsplasmid kloniert (Munks et al., 2006b). Die Bibliothek ermöglichte erstmals ein mCMV-Genom-weite *Screening* nach viralen antigenen Peptiden.

Für diese Analyse werden SV40-Fibroblasten mit jeweils einem der 170 Expressionsplasmiden transfiziert. In der Folge kommt es zur Proteinexpression und zur Prozessierung und Präsentation von antigenen Peptiden. Während einer Co-Kultivierung der APC mit Gesamt-Milzzellen aus mCMV-infizierten BALB/c-Mäusen, erkennen Peptid-spezifische CD8 T-Zellen ihr entsprechendes antigenes Peptid und werden aktiviert. Die Aktivierung wird im Folgenden durch einen intrazellulären IFN γ -Nachweis zytofluorometrisch bestimmt.

Material: DNA-Platten (170 Expressionsplasmide; je 0,5 μ g Plasmid in 20 μ l PBS/*Well*)
Brefeldin A (*GolgiPlug*)
PolyFect
Erythrozyten-Lysepuffer

Medium: DMEM (10% FCS)
MEMalpha (10% FCS)
OptiMEM[®] I+GlutaMAX[™] (ohne Zusätze)

Durchführung: Die Durchführung des mCMV-Genom-weiten ORF-Bibliotheken-*Screenings* erfolgte nach dem bei Lemmermann et al. (2010b) veröffentlichten Protokoll.

Dazu wurden BALB/SV40-Fibroblasten in einer Zelldichte von 1,2 $\times 10^4$ Zellen/*Well* DMEM in einer 96-*Well*-Flachbodenplatte ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Fibroblasten mit den 173 Expressionsplasmiden, wobei pro *Well* immer ein Plasmid transfiziert wurde. Hierfür wurden 50 μ l OptiMEM/*PolyFect*-Gemisch (1 μ l *PolyFect*/0,5 μ g DNA) auf die vorgefertigten DNA-Platten (0,5 μ g Plasmid-DNA/*Well* in 20 μ l PBS) gegeben und für 15min bei 20-22°C inkubiert. Das Kulturmedium der BALB/SV40-Zellen wurde abgenommen und durch 40 μ l OptiMEM ersetzt. Für die Transfektion wurden anschließend jeweils 30 μ l des DNA-*PolyFect*-Gemisches auf eine Fibroblasten-Kultur übertragen (entspricht 0,25 μ g Plasmid-DNA/*Well*). Nach 3h Inkubation bei 37°C wurde das Transfektionsmedium mit 100 μ l DMEM supplementiert und die Zellen bei 37°C für 48h kultiviert.

Zur Analyse wurden 6 Milzen mCMV-infizierter BALB/c-Mäuse, wie unter 3.7.1.1 beschrieben, aufgearbeitet. Nach der Erythrozytenlyse wurden die Zellen zweimal mit MEMalpha gewaschen und auf eine Zellzahl von 10⁶ Zellen/100 μ l eingestellt. Das Kulturmedium der transfizierten Fibroblasten wurde abgenommen und durch 50 μ l MEMalpha ersetzt. Anschließend wurden 100 μ l Effektoren und 50 μ l Brefeldin A (Endkonzentration 1:1.000) auf jedes *Well* gegeben. Die Effektoren und APC wurden für 1min bei 216xg zentrifugiert, um einen optimalen Kontakt zwischen APC und Effektoren zu ermöglichen. Nach 6-stündiger Inkubation bei 37°C erfolgte die spezifische Färbung der CD8a-Oberflächenexpression sowie intrazellulärem IFN γ mit nachfolgender zytofluorometrische Analyse (siehe 3.8.2.2).

4 Ergebnisse

4.1 Generierung rekombinanter mCMV zur IE-Expression des Immunevasins m152

Die MHC-I-assoziierte Präsentation viraler Antigene auf der Zelloberfläche ermöglicht die Initiierung einer antiviralen CD8 T-Zellantwort. Alle Cytomegaloviren (CMV) kodieren daher für Regulatoren der Antigenpräsentation, sogenannte Immunevasine, um der effektiven Immunkontrolle des Wirtes entgegen zu wirken. Im Modellsystem der murinen CMV (mCMV)-Infektion retendiert das zentrale Immunevasin m152 Peptid-beladene MHC-I-Moleküle im ERGIC (Ziegler et al., 1997; Ziegler et al., 2000) und verhindert so die spezifische Aktivierung antiviraler CD8 T-Zellen (Del Val et al., 1989; Del Val et al., 1992). Da m152 allerdings erst in der *Early* (E)-Phase der Infektion exprimiert wird, kann dieses in der *Immediate Early* (IE)-Phase nicht wirken. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein rekombinantes mCMV generiert werden, das durch eine zusätzliche m152-Expression in der IE-Phase die Präsentation viraler antigenener Peptide verstärkt unterdrücken sollte.

Hierfür erfolgte zunächst die ektopische Insertion des *m152*-ORF unter Kontrolle des *ie2*-Promotors der MIE-PEEP-Region mittels Zwei-Schritt-BAC-Mutagenese (siehe 3.3.15). Grundlage dieser Mutagenese-Strategie ist die homologe Rekombination zwischen dem mCMV Ausgangs-BAC-Plasmid und einem *Shuttle*-Plasmid, welches sowohl das zu inserierende Gen, als auch Sequenzhomologien zum gewünschten Insertionsort bereitstellt. Zunächst musste das *Shuttle*-Plasmid kloniert und in Bakterien transformiert werden, welche bereits das mCMV-BAC-Zielpasmid enthielten. Über homologe Rekombination und anschließende Selektionsschritte erfolgte die Generierung des rekombinanten BAC-Plasmids. Nach anschließender Rekonstitution und Passagierung der Virusrekombinanten in Zellkultur verbleiben keine störenden Vektorsequenzen oder Selektionsmarker.

4.1.1 Generierung und Charakterisierung des *Shuttle*-Plasmids

Für die Generierung des *Shuttle*-Plasmids pST76K_SR_ΔIE2m152 (Abb. 4.1B) wurde das Zwischenkonstrukt pST76K_SR_ie1/3-ie2 verwendet. Dieses Plasmid kodiert für ein Kanamycin-Resistenzgen (KanR) und besitzt einen Temperatur-sensitiven Replikationsursprung, der eine Replikation nur bei 30°C erlaubt. Zudem trägt das Plasmid das Gen für die *RecA*-Rekombinase, welches die Mutagenese in *RecA*-negativen *E.coli*-Stämmen wie DH10B erlaubt sowie das *SacB*-Gen, welches für das Exoenzym Levan-Saccharase kodiert (Blomfield et al. 1991; Borst et al. 2004). Das Zwischenkonstrukt pST76K_SR_ie1/3-ie2 enthält zusätzlich die *ie1/ie3-ie2*-Genregion, die aus dem Plasmid pUCAMB (Grzimek et al., 2001) in den Ausgangsvektor pST76K_SR subkloniert wurde.

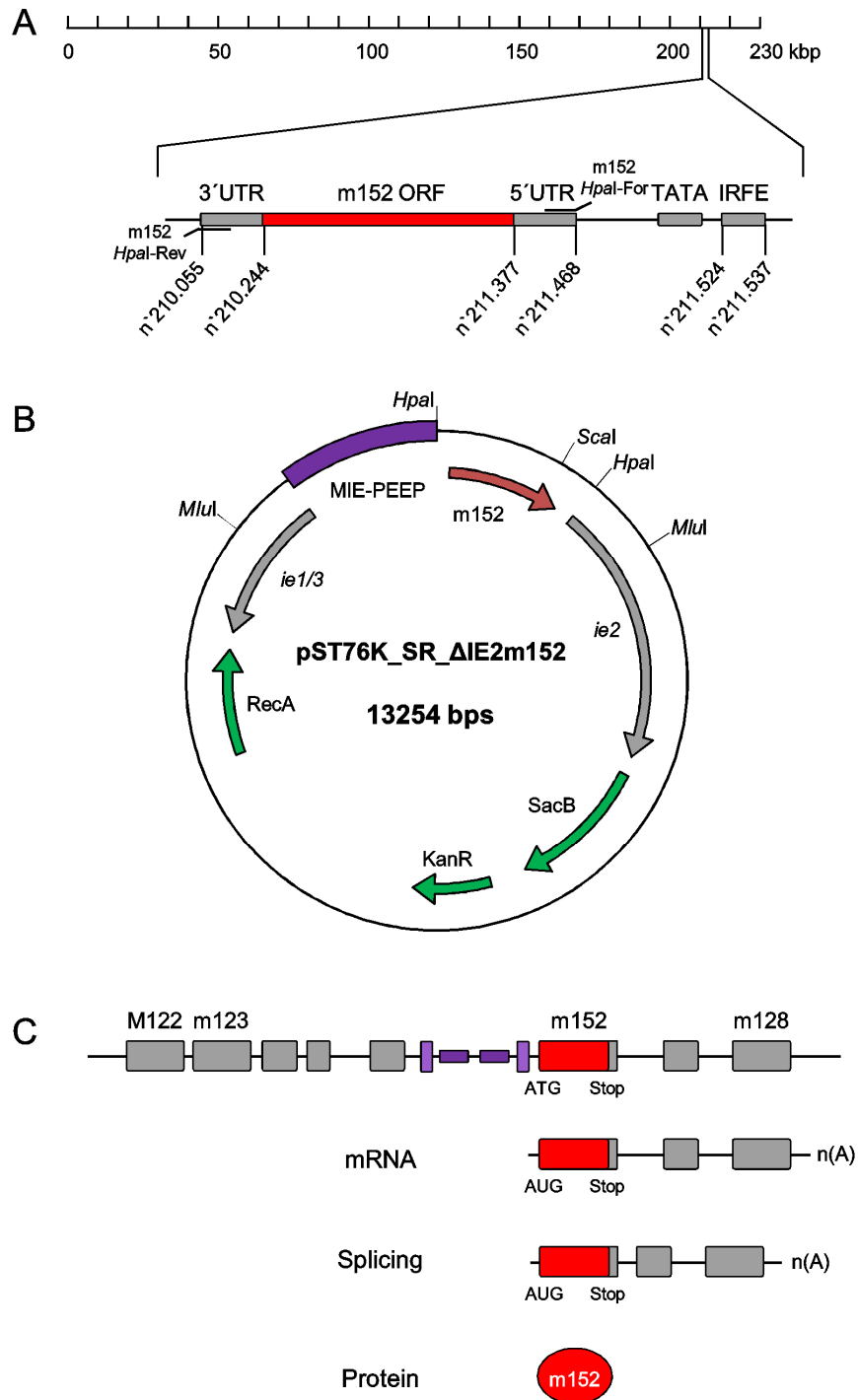


Abb. 4.1: Darstellung der Klonierungsstrategie mit Plasmidkarte des Shuttle-Plasmids pST76K_SR_ΔIE2m152. A) Karte des mCMV-Genoms mit detailliertem Ausschnitt der *m152*-Genregion. Der *m152*-Promotor enthält ein *Interferon Regulatory Factor Element* (IRFE). Neben dem *m152*-ORF ist die 5' und 3' *Untranslated Region* (UTR) eingezeichnet. Die Primer geben an, welcher Sequenzbereich für die Klonierung des Shuttle-Plasmids pST76K_SR_ΔIE2m152 amplifiziert wurde. B) Dargestellt ist das für die Zwei-Schritt-BAC-Mutagenese benötigte Shuttle-Plasmid pST76K_SR_ΔIE2m152, welches die MIE-PEEP-Genregion mit *m152*-Gensequenz unter Kontrolle des *ie2*-Promotors enthält. Zusätzlich werden aus dem parentalen pST76K_SR-Plasmid Gene für die homologe Rekombination und nachfolgende Selektionsschritte bereitgestellt (siehe 3.3.15). Eine Restriktion mit *MluI* und *Scal* an den eingezeichneten Schnittstellen ergibt Fragmentgrößen von 1kbp, 9,2kbp und 3kbp. C) Dargestellt ist der *m152*-ORF in der *ie2*-Genregion. Die Transkription ergibt eine *m152-ie2*-mRNA, die anschließend gespleißt wird. Die Translation der gespleißten mRNA wird durch das *m152* Stop-Codon terminiert, daher wird kein IE2-Protein gebildet.

Zur Generierung des *Shuttle*-Plasmids wurde der Ausgangsvektor pST76K_SR_ie1/3-ie2 mit *HpaI* restringiert. Hierdurch wurde ein 79bp-Fragment deletiert, welches sowohl die komplette *ie2*-Promotorsequenz als auch einen Teil des nicht-kodierenden *ie2-Exon1* enthält. Die Klonierungsstrategie sah daher vor, dass der *ie2*-Promotor bei der Generierung des m152-Amplifikates wieder bereit gestellt wird.

Das zu inserierende *m152*-Gen wurde mittels *touch-down*-PCR aus dem mCMV-BAC-Plasmid pSM3fr (Wagner et al., 1999) amplifiziert (siehe Abb. 4.1A). Die *touch-down* PCR zeichnet sich im Gegensatz zur klassischen PCR (siehe 3.3.12) durch schrittweise reduzierte *Annealing*-Temperaturen aus, was eine spezifischere Bindung der Oligonukleotide ermöglicht. Die *Annealing*-Temperatur wird während den ersten 18 Zyklen beginnend bei 62°C um 1°C pro Zyklus erniedrigt. Für weitere 12 Zyklen wird eine *Annealing*-Temperatur von 45°C gewählt. Die Amplifikation erfolgte mit den Oligonukleotiden m152-*HpaI*-For und m152-*HpaI*-Rev (siehe 2.1.7), welche zusätzlich den *ie2*-Promotor und *HpaI*-Schnittstellen bereitstellen. Das resultierende 1.428bp Amplifikat wurde mit *HpaI* restringiert und in den geschnittenen Vektor pST76K_SR_ie1/3-ie2 ligiert (siehe 3.3.11). Es ist generell zu beachten, dass durch die Integration des *m152*-ORF in die *ie2*-Genregion das IE2-kodierende *Exon3* nicht translatiert werden kann, da die Translation der *m152-ie2*-mRNA nach dem *m152*-Stop-Codon terminiert wird (siehe Abb. 4.1C).

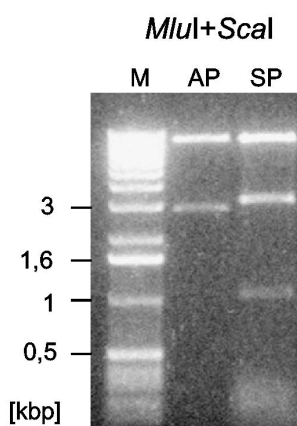


Abb. 4.2: Restriktion des *Shuttle*-Plasmids pST76K_SR_ΔIE2m152
Gelelektrophoretische Auftrennung des Ausgangsplasmids (AP) pST76K_SR_ie1/3-ie2, sowie des generierten *Shuttle*-Plasmids (SP) pST76K_SR_ΔIE2m152 nach enzymatischer Restriktion mit *MluI/Scal*. 1 µg Plasmid-DNA wurde mit *MluI/Scal* restringiert und auf einem 1%-igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Restriktion mit *MluI* und *Scal* ergab für das SP Fragmentgrößen von 1kbp, 9,2kbp und 3kbp (siehe Abb. 4.1), und für das AP 2,6kbp und 9,2kbp. Diese Restriktion bestätigt die korrekte Orientierung des *m152*-Gens in der *ie2*-Genregion.
M: 1kbp Längenstandard; AP: pST76K_SR_ie1/3-ie2;
SP: pST76K_SR_ΔIE2m152.

Nach Transformation in *E. coli* DH10B erfolgte die Selektion auf LB-Platten mit Kan bei 30°C. Die Plasmid-DNA der selektionierten Klone wurde isoliert (siehe 3.3.3.1) und anschließend die korrekte Insertion der *m152*-Gensequenz mittels Restriktionsanalyse bestätigt (siehe Abb. 4.2).

Nachdem Integration und Orientierung des *m152*-Gens in der *ie2*-Genregion verifiziert waren, wurden einzelne Klone mit den Oligonukleotiden m152Δie2-For und Na1x-Rev (siehe 2.1.7) sequenziert (GATC, Konstanz). Das ausgewählte *Shuttle*-Plasmid trägt keine Mutationen in der IE-integrierten *m152*-Gensequenz und konnte anschließend für die Generierung rekombinanter mCMV-BAC-Plasmide über homologe Rekombination verwendet werden.

Fazit: Das für die Zwei-Schritt-BAC-Mutagenese benötigte *Shuttle*-Plasmid wurde erfolgreich kloniert.

4.1.2 Herstellung und Charakterisierung rekombinanter mCMV-BAC-Plasmide

Nach erfolgreicher Klonierung des *Shuttle*-Plasmids pST76K_SR_ΔIE2m152 konnte dieses für die Generierung rekombinanter BAC-Plasmide mittels Zwei-Schritt-BAC-Mutagenese (siehe 3.3.15) eingesetzt werden. Als parentale mCMV-Konstrukte dienten das mCMV-BAC-Plasmid pSM3fr (Wagner et al, 1999) und die m152-Deletionsmutante pSM3fr_Δm152. Eine schematische Darstellung der resultierenden Rekombinanten findet sich in Abb. 4.3. Nach Transformation des *Shuttle*-Plasmids pST76K_SR_ΔIE2m152 in elektrokompetente DH10B Bakterien, die bereits das mCMV-BAC-Plasmid pSM3fr tragen, erhält man nach homologer Rekombination und anschließender Selektion (siehe 3.3.14) das Plasmid mCMV-BAC-m152.IE+E (Abb. 4.3). Dieses BAC-Plasmid beinhaltet die ektopische *m152*-Gensequenz unter Kontrolle des *ie2*-Promotors, zusätzlich zur intrinsischen *m152*-Gensequenz, deren Expression durch einen transaktivierbaren E-Promotor gesteuert wird. Das BAC-Plasmid mCMV-BAC-m152.IE wurde nach Transformation des *Shuttle*-Plasmids pST76K_SR_ΔIE2m152 in elektrokompetente DH10B, welche das Ausgangs-BAC-Plasmid pSM3fr_Δm152 enthalten, über nachfolgende Zwei-Schritt-BAC-Mutagenese generiert (siehe 3.3.14) und beinhaltet die *m152*-Gensequenz ausschließlich ektopisch unter Kontrolle des *ie2*-Promotors.

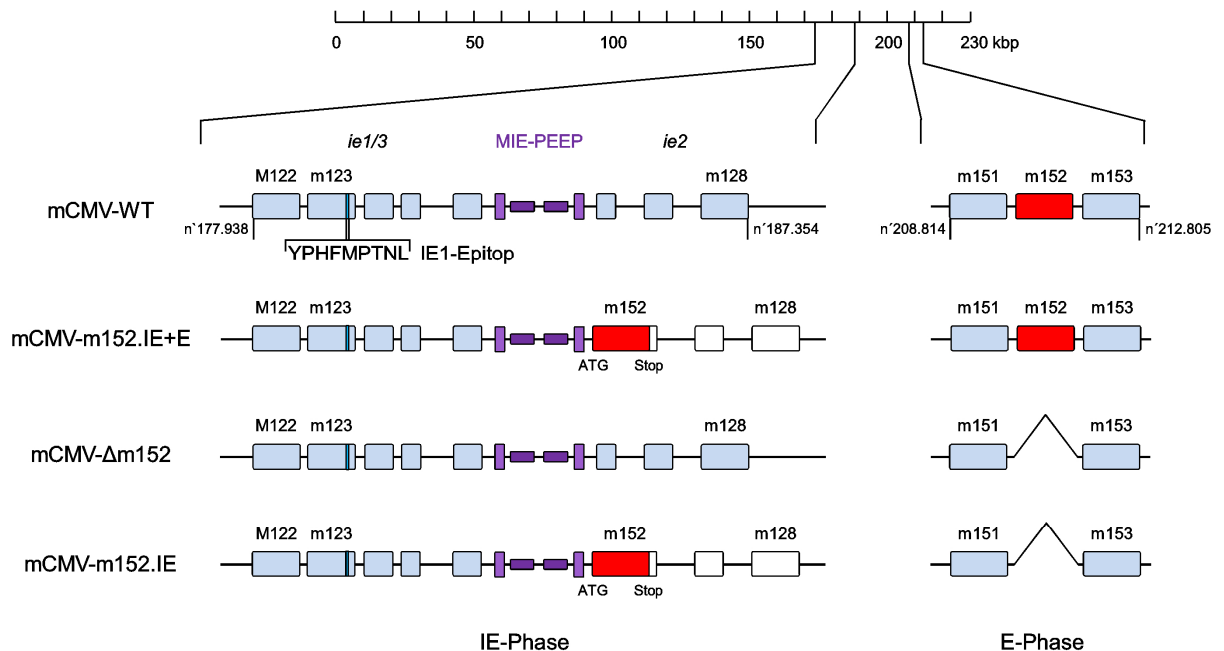


Abb. 4.3: Integration des Immunevasins *m152* in die MIE-PEEP-Region. Karte des mCMV-Genoms mit detailliertem Ausschnitt der MIE-PEEP-Region (links), sowie der *m152*-Genregion (rechts). Die *m152*.IE-Rekombinanten entstanden mittels Zwei-Schritt-BAC-Mutagenese durch Insertion der *m152*-Sequenz (rot) in die *ie2*-Genregion. Hierdurch wurden die Virusrekombinanten mCMV-m152.IE+E sowie mCMV-m152.IE generiert. PEEP (lila), *Promotor1 Enhancer1 Enhancer2 Promotor2*.

Um während der Virusrekonstitution in MEF die Exzision der BAC-Sequenz durch den eukaryontischen Rekombinationsapparat zu gewährleisten, ist diese von 553bp-großen, homologen Sequenzen flankiert. Die Exzision der BAC-Sequenz ist allerdings auch spontan in *RecA*-negativen prokaryontischen Zellen möglich, so dass es zum Verlust des mCMV-Genoms aus dem BAC-Plasmid kommen kann. Es ist deshalb notwendig, die Integrität des mCMV-BAC-Plasmids nach der Mutagenese durch Restriktionsanalyse zu bestätigen. In Abb. 4.4 ist die gelelektrophoretische Auftrennung der restringierten BAC-DNA dargestellt. Sowohl die parentalen als auch die neu-generierten BAC-Plasmide zeigen das typische Bandenmuster der mCMV-BAC-DNA. Dies bestätigt die Integrität der BAC-Plasmide. Zusätzlich wurde die IE-inserierte *m152*-Gensequenz mit den Oligonukleotiden *m152* Δ ie2-For und Na1x-Rev (siehe 2.1.7) amplifiziert und sequenziert. Da keine Mutationen in der IE-inserierten *m152*-Gensequenz nachweisbar waren, konnten ausgewählte Klone zur Virusrekonstitution in MEF verwendet werden.

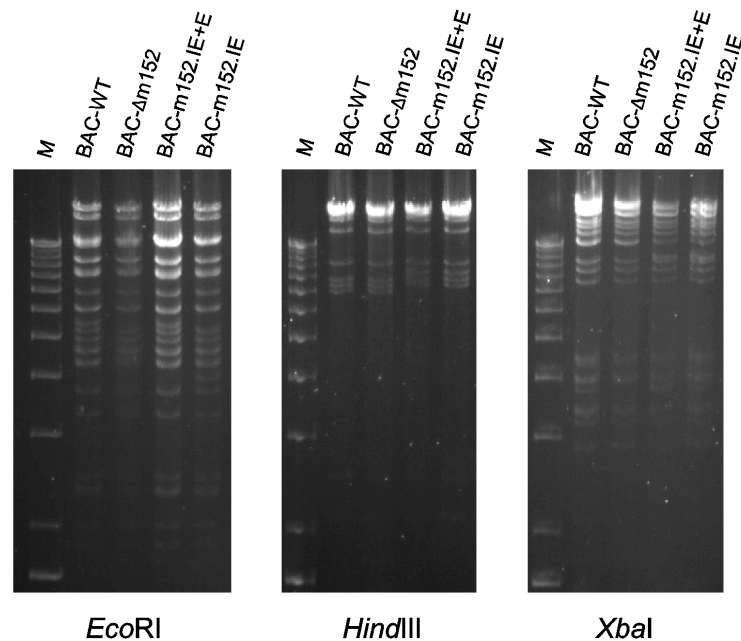


Abb. 4.4: Integrität des mCMV-BAC-Genoms nach homologer Rekombination in *E.coli*. Durch Restriktionsanalyse wurde nach Zwei-Schritt-BAC-Mutagenese die Integrität des mCMV-BAC-Genoms bestätigt. Hierfür wurden jeweils 50 μ l BAC-DNA einer Mini-Präparation mit *EcoRI*, *HindIII* oder *XbaI* restringiert und gelelektrophoretisch auf einem 0,7% TBE-Agarosegel aufgetrennt. Dargestellt sind jeweils die parentalen BAC-Plasmide, gefolgt von den generierten *m152.IE*-Rekombinanten. Spur M, 1kbp Marker.

Fazit: Eine erfolgreiche, homologe Rekombinationen zwischen *Shuttle*-Plasmid pST76K_SR_ Δ IE2*m152* und dem jeweils parentalen mCMV-BAC resultiert in den BACs mCMV-BAC-*m152.IE+E* und mCMV-BAC-*m152.IE*.

4.1.3 Herstellung der mCMV-Rekombinanten m152.IE+E und m152.IE

Für die Rekonstitution der Virusrekombinanten wurden MEF mit den Plasmiden mCMV-BAC-m152.IE+E oder mCMV-BAC-m152.IE transfiziert (siehe 3.1.4). Nach erfolgreicher Virusrekonstitution waren nach 2-4 Tagen Virusplaques im konfluenten Zellrasen zu erkennen. Die rekonstituierten Viren enthielten allerdings noch die für die Replikation in *E.coli* benötigte BAC-Sequenz, welche die biologischen Eigenschaften der Rekombinanten beeinflussen könnte (Wagner et al., 1999; Adler et al., 2001). Da die BAC-Sequenz von homologen Sequenzen flankiert ist, ermöglicht dies die Exzision der BAC-Sequenz durch den zellulären Rekombinationsapparat. Hierfür wurden die Virusrekombinanten bis Passage 5 kultiviert (siehe 3.1.5). Die Exzision der BAC-Sequenz wurde anschließend durch Quantifizierung der BAC-Sequenz und des viralen Gens *M55/gB* verifiziert (siehe 3.3.13.1). Hierfür wurde aus Zellkulturüberständen die virale DNA isoliert (siehe 3.3.3.7) und in einer qPCR eingesetzt. Als externer Standard diente das von Lemmermann et al. (2010b) beschriebene Plasmid pDrive-gB-PTHrP-BAC. Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in Tab. 4.5 zusammengefasst.

Eine Rekombinante gilt formal als BAC-frei, wenn weniger als 100 BAC-Sequenzen pro 10^6 Virusgenomen nachweisbar sind. Da bei beiden getesteten Rekombinanten keine bzw. weniger als 100 BAC-Sequenzen/ 10^6 Virusgenomen nachweisbar waren, konnten die Virusrekombinanten für eine Virusaufreinigung verwendet werden.

Tab. 4.5: Quantifizierung der BAC-Sequenz nach Viruspassage auf MEF. Virale DNA wurde aus Zellkulturüberständen lysierter MEF nach Passage 0 und 6 bzw. 7 isoliert. 2µl der viralen DNA wurden für die absolute Quantifizierung des viralen Gens *M55/gB* und der BAC-Sequenz eingesetzt.

mCMV-Rekombinante	Passage	Virale Genome (M55/gB)	BAC-Sequenz	BAC-Sequenz pro 10^6 Genome
mCMV-m152.IE+E	P0	$3,22 \times 10^5$	$6,49 \times 10^4$	2×10^5
	P6	$3,38 \times 10^5$	5	15
mCMV-m152.IE	P0	$4,33 \times 10^5$	$7,6 \times 10^4$	$1,8 \times 10^5$
	P7	$2,66 \times 10^6$	0	0

Anschließend wurden die Genom-zu-PFU-Verhältnisse der Virusstocks bestimmt. Das Genom-zu-PFU-Verhältnis gibt die Zahl der CMV-Genome an, die für die Bildung eines Plaques in permissiven MEF benötigt wird. Da die Plaquebildung über mehrere Infektionsrunden erfolgt, ermöglicht das Genom-zu-PFU-Verhältnis eine zusätzliche Aussage über die Infektiosität der generierten Rekombinanten. Wie von Kurz et al. (1997) beschrieben, liegt das Genom-zu-PFU-Verhältnis von mCMV-WT.*Smith* bei etwa 500 zu 1. Die Bestimmung des Genom-zu-PFU-Verhältnisses erfolgte mit Hilfe der von Simon et al. (2005) beschriebenen absoluten Quantifizierung des viralen Gens *M55/gB* (Primerpaar: LC-gB-For3; LC-gB-Rev3; siehe 2.1.7). Aus 10µl Virusstock mit bekannten PFU wurde die virale

DNA aufgereinigt (siehe 3.3.3.7) und die Anzahl der viralen Genome in Triplikaten quantifiziert (siehe 3.3.13.1).

Tab. 4.6: Bestimmung des Genom-zu-PFU-Verhältnisses der generierten mCMV-Rekombinanten. Aus den Virusstocks wurde virale DNA isoliert und die Anzahl der viralen Genome mit *M55/gB*-spezifischer PCR aus \log_{10} -Titrationen der viralen DNA quantifiziert. Als Plasmidstandard wurde pDrive-gB-PTHrP-BAC verwendet. Dargestellt ist sowohl der Virustiter als auch die errechnete Anzahl der viralen Genome/PFU.

mCMV-Rekombinante	Virustiter [PFU/ml]	Genome pro PFU [Mittelwert]
mCMV-WT.BAC	$2,8 \times 10^8$	361
mCMV-m152.IE+E	$2,4 \times 10^8$	193
mCMV-m152.IE	$1,4 \times 10^8$	402
mCMV- Δ m152	$2,4 \times 10^9$	151

In Tab 4.6 sind die ermittelten Genom-zu-PFU-Verhältnisse der verwendeten Viren dargestellt. Das ermittelte Genom-zu-PFU-Verhältnis der Rekombinanten unterscheidet sich nur gering vom Literaturwert von 500 zu 1. Die generierten Viren mCMV-m152.IE+E und mCMV-m152.IE werden im Nachfolgenden als m152.IE+E sowie m152.IE bezeichnet.

Fazit: Die mCMV-Rekombinanten mCMV-m152.IE+E (nachfolgend: m152.IE+E) und mCMV-m152.IE (nachfolgend: m152.IE) wurden erfolgreich rekonstituiert. Durch mehrmaliges Passagieren wurde die residuale BAC-Sequenz entfernt. Die Genom-zu-PFU-Verhältnisse der neu-generierten Viren zeigten, dass die ektopische m152-Insertion die *in vitro*-Infektiösität nicht nennenswert verändert, vor allem aber nicht verschlechtert hat.

4.2 Charakterisierung der generierten Rekombinanten in Zellkultur

Nach erfolgreicher Generierung der mCMV-Rekombinanten m152.IE+E und m152.IE musste die ektopische Expression des Immunevasins m152 in der IE-Phase bestätigt werden. Hierfür wurde die m152-Proteinexpression nach Infektion von MEF sowohl unter selektiven IE-Bedingungen als auch während des Infektionsverlaufs analysiert. Zusätzlich erfolgte die Aufnahme einer *in vitro*-Replikationskinetik, um eine mögliche Attenuierung der generierten Viren auszuschließen.

4.2.1 m152-Expression unter selektiven IE-Bedingungen

Die Integration des *m152*-ORF in die *ie2*-Genregion konnte durch Sequenzierungen gezeigt werden. Um anschließend die IE-Expression des m152-Proteins zu bestätigen, wurden Fibroblasten unter selektiven IE-Bedingungen infiziert. Zusätzlich musste bestätigt werden, dass durch die Integration des *m152*-ORF kein IE2-Protein translatiert wird.

Für eine Infektion unter selektiven IE-Bedingungen wurden konfluente MEF in Anwesenheit von Cycloheximid (CH) zentrifugal mit den Viren WT.BAC, m152.IE+E, m152.IE oder Δ m152 infiziert (siehe 3.2.3). Da CH reversibel die zelluläre Translation inhibiert, werden IE-

Transkripte, welche per Definition keine viralen Transaktivatorproteine zur Genexpression benötigen, angereichert. Nach einer Infektionszeit von 2h wurde CH ausgewaschen und die Zellen wurden für weitere 3h mit ActinomycinD (Act.D) inkubiert. Act.D hemmt irreversibel die Transkription und ermöglicht nun die selektive Translation der zuvor synthetisierten IE-Transkripte.

Die Western Blot-Analysen zur Detektion des IE2- oder m152-Proteins aus Zelllysaten (siehe 3.5) sind in Abb. 4.7 dargestellt. Unter selektiven IE-Bedingungen war das IE2-Protein (43kDa) nach Infektion mit WT.BAC oder $\Delta m152$ deutlich nachweisbar. Wie erwartet konnte nach m152.IE+E- oder m152.IE-Infektion das IE2-Protein nicht detektiert werden. Das IE2-kodierende *Exon3* kann nicht translatiert werden, da durch Integration des *m152*-ORF in die *ie2*-Genregion die Translation der *m152-ie2*-mRNA nach dem *m152*-Stop-Codon terminiert wird (siehe Abb. 4.1C). Ein alternativer Translationsstart am Start ATG des IE2-kodierenden *Exon3* kann ausgeschlossen werden, da hierfür eine *internal ribosomal entry site* (IRES) notwendig wäre.

Wie zu erwarten, war in WT.BAC-infizierten MEF das E-exprimierte m152-Protein unter selektiven IE-Bedingungen nicht nachweisbar, während ohne IE-Arrest 5h nach Infektion eine markante m152-Proteinbande detektiert wurde. Nach $\Delta m152$ -Infektion konnte das m152-Protein erwartungsgemäß nicht nachgewiesen werden. Dies belegt zusätzlich die hohe Spezifität des verwendeten m152-Antikörpers 3D10. Wurden MEF unter selektiven IE-Bedingungen mit m152.IE+E oder m152.IE infiziert, konnten alle Isoformen des Glykoproteins m152 detektiert werden (48kDa, 40kDa und 36kDa).

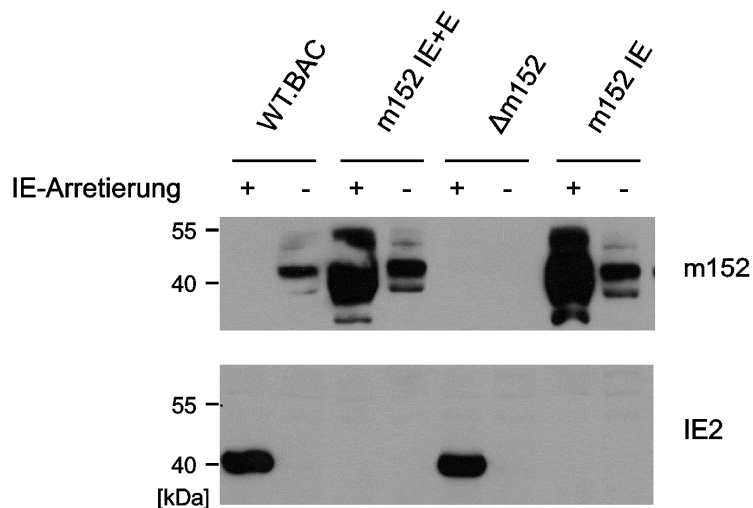


Abb. 4.7: m152-Proteinexpression unter selektiven IE-Bedingungen. Western Blot-Analysen aus Gesamtzelllysaten infizierter, IE-arretierter MEF. MEF wurden 15Min mit 50 μ g CH/ml Medium behandelt und anschließend mit den angegebenen Viren zentrifugal infiziert (MOI=4). 2h nach der Infektion wurde das CH mit Act.D-haltigem-Medium (5 μ g/ml) ausgewaschen und die Zellen mit Act.D co-kultiviert. Nach 3h (Gesamtinfektionszeit: 5h), wurden Zelllysate hergestellt (siehe 3.5.1). Jeweils 50 μ g Gesamtprotein wurden über ein 12,5%-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert (siehe 3.5.3). Die Detektion der Proteine erfolgte mit den Primär-Antikörpern $\alpha m152$ (3D10, 1:250) und $\alpha IE2(N)$ (1:250) (siehe 2.1.9.1). Die Verwendung von HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern ermöglichte die Detektion über Chemilumineszenz mittels *ECLplus Western Blotting Detection Reagenz* (siehe 3.5.4).

Fazit: *In vitro* konnten nach Infektion mit m152.IE+E oder m152.IE alle m152-Proteinisoformen unter selektiven IE-Bedingungen nachgewiesen werden.

4.2.2 Kinetik der m152-Expression nach Infektion von Fibroblasten

Nachdem die Expression des m152-Proteins unter selektiven IE-Bedingungen nach Infektion mit m152.IE+E oder m152.IE nachgewiesen worden ist, sollte weiterführend die Expression des *m152*-Transkripts und des korrespondierenden m152-Proteins im Infektionsverlauf nachvollzogen werden.

Für die Aufnahme der *m152*-Transkriptionskinetik (Abb. 4.8) wurden Triplikate konfluenter MEF zentrifugal mit den Viren WT.BAC, m152.IE+E oder m152.IE infiziert (MOI=4; siehe 3.2.3) und zu definierten Zeitpunkten wurde Gesamt-RNA isoliert (siehe 3.4.1.1). Die *m152*-Transkriptquantifizierung erfolgte mittels RT-qPCR, wobei ein *m152 in vitro*-Transkript als externer Standard diente (siehe 3.4.2).

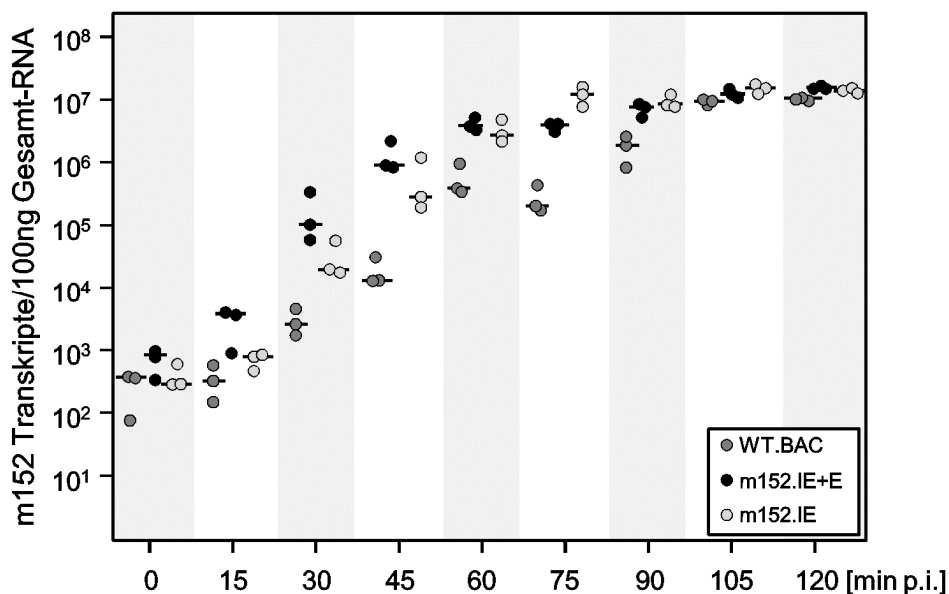


Abb. 4.8: Transkriptquantifizierung nach Infektion mit WT.BAC, m152.IE+E oder m152.IE. MEF wurden zentrifugal mit den angegebenen Viren infiziert (MOI=4). Zu den dargestellten Zeitpunkten wurde Gesamt-RNA isoliert (siehe 3.4.1). Hierbei entspricht t_0 dem Zeitpunkt nach 30-minütiger zentrifugaler Infektion (siehe 3.2.3). Die absolute Quantifizierung der *m152*-Transkripte erfolgte aus 100ng Gesamt-RNA mittels RT-qPCR (siehe 3.4.2) mit dem unter 2.1.6 in Tab 2.4 aufgeführten Primer/Sonden-Paar. Als externer Standard wurde das *m152 in vitro*-Transkript verwendet. Die Symbole repräsentieren unabhängige Kulturen. Die Mediane sind als horizontale Balken eingezeichnet.

In MEF infiziert mit m152.IE+E und m152.IE war 30 bis 90Min (entspricht 60-120Min) nach Infektion die Zahl der *m152*-Transkripte im Vergleich zur WT.BAC-Infektion deutlich erhöht. Obwohl es sich beim regulären *m152* um ein E-Phasen Transkript handelt, war ein Anstieg der *m152*-Transkriptmenge auch nach WT.BAC Infektion bereits nach 45Min (entspricht 75Min nach Infektion) nachweisbar. 105Min nach Infektion wurde von allen Viren ein Plateau

vergleichbarer *m152*-Transkriptmengen erreicht.

Nachfolgend sollte geklärt werden, ob die zu frühen Zeitpunkten erhöhten *m152*-Transkriptmengen nach Infektion mit *m152.IE+E* oder *m152.IE* (Abb. 4.8) einen Einfluss auf die *m152*-Proteinexpression haben. Hierfür wurden konfluente MEF zentrifugal infiziert mit WT.BAC, *m152.IE+E* oder *m152.IE* (MOI=4). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Gesamtprotein extrahiert (siehe 3.5.1) und das IE1- bzw. *m152*-Protein mittels Western Blot nachgewiesen (Abb. 4.9).

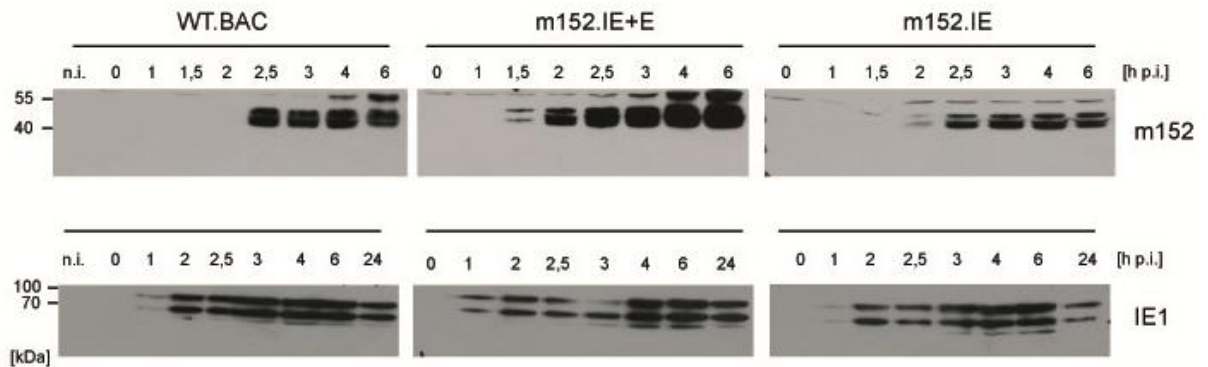


Abb. 4.9: Kinetik der IE1- und *m152*-Proteinexpression nach Infektion mit WT.BAC, *m152.IE+E* oder *m152.IE*. Western Blot von Gesamtzelllysaten infizierter MEF. MEF wurden mit den angegebenen Viren infiziert und zu den dargestellten Zeitpunkten wurden Zelllysate hergestellt. Hierbei entspricht t_0 dem Zeitpunkt nach 30-minütiger, zentrifugaler Infektion. Jeweils 50 μ g Gesamtprotein wurden über ein 12,5%-iges SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion der Proteine erfolgte mit den Antikörpern α m152 (3D10, 1:250) und α IE1 (Croma101, 1:2000). Die Verwendung von HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern ermöglichte die Detektion über Chemilumineszenz mittels *ECLplus Western Blotting Detection Reagenz*. n.i., nicht infiziert; IE1~76/89kDa; *m152*-Proteinisofomren~48/40/36kDa

Die detektierten IE1-Proteinmengen waren zu den dargestellten Analysezeitpunkten nach Infektion mit WT.BAC, *m152.IE+E* oder *m152.IE* vergleichbar. Dies zeigte, dass die ektopische *m152*-Expression in der IE-Phase sowie die damit einhergehende IE2-Deletion keinen Einfluss auf die IE1-Proteinexpression haben.

2,5h nach WT.BAC-Infektion konnten die bekannten *m152*-Proteinisofomren (48kDa, 40kDa und 36kDa) detektiert werden. Nach *m152.IE+E*-Infektion konnte das *m152*-Protein bereits 1,5h nach der Infektion nachgewiesen werden, wobei zusätzlich die detektierte *m152*-Proteinmenge im Vergleich zur WT.BAC-Infektion zu allen Zeitpunkten sichtbar erhöht war. Unerwarteterweise konnte in *m152.IE*-infizierten MEF das *m152*-Protein erst 2h nach Infektion nachgewiesen werden, wobei die *m152*-Proteinmengen im Vergleich zur WT.BAC-Infektion leicht reduziert waren. Die in der IE Phase induzierte *m152*-Proteinexpression war damit geringer als die Expression in der E-Phase nach WT.BAC-Infektion.

Fazit: Nach *m152*-Expression in der IE-Phase bzw. IE- und E-Phase waren die *m152*-Transkriptmengen im Vergleich zur WT.BAC-Infektion zu frühen Infektionszeitpunkten signifikant erhöht. Darüber hinaus war das *m152*-Protein nach Expression in der IE- und E-

Phase deutlich verstärkt und bereits zu einem früheren Zeitpunkt als nach WT.BAC-Infektion nachweisbar.

4.2.3 *In vitro*-Replikationskinetik der mCMV-Rekombinanten

Bevor die generierten Rekombinanten für nachfolgende Tierversuche verwendet werden konnten, war es notwendig, eine mögliche Attenuierung der Viren durch die ektopische IE-Insertion der *m152*-Gensequenz auszuschließen. Hierfür wurde zunächst die replikative Fitness der Rekombinanten in Zellkultur überprüft, wobei das Wachstum der Virusrekombinanten weder zeitlich noch quantitativ von den parental Viren abweichen sollte. Aus MEF infiziert mit WT.BAC, *m152.IE+E*, *m152.IE* oder $\Delta m152$ wurden zu definierten Zeitpunkten die viralen Genome mittels *M55/gB*-spezifischer qPCR bestimmt (Primer/Sonden Paar siehe 2.1.6 Tab. 2.3). Die Quantifizierung des zellulären Gens *pthrp* ermöglicht eine Normierung auf eine definierte Zellzahl. Parallel wurde die Virusreplikation über die Anzahl der im Überstand enthaltenen infektiösen Viren mittels Plaque-Assay bestimmt (siehe 3.2.2.3).

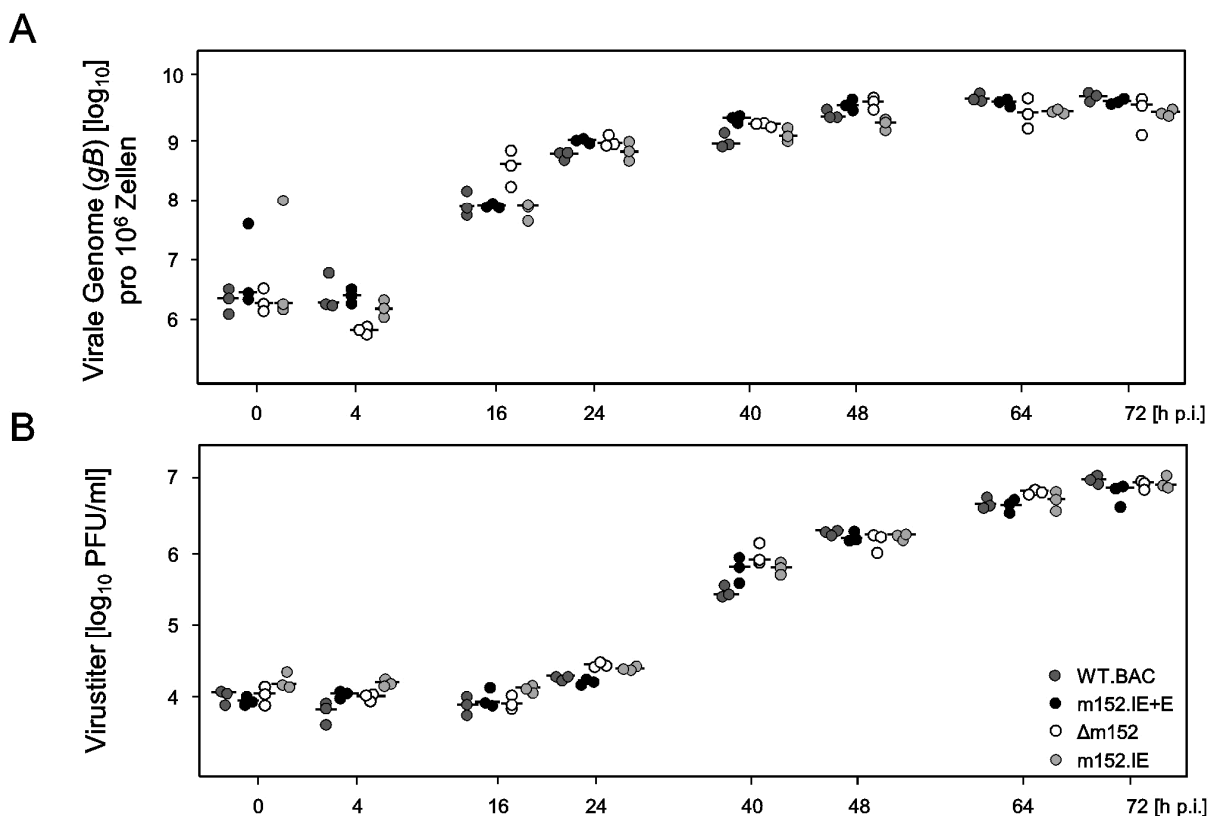


Abb. 4.10: *In vitro*-Replikationskinetik der rekombinanten Viren. MEF wurden zentrifugal mit WT.BAC, *m152.IE+E*, *m152.IE* oder $\Delta m152$ infiziert (MOI=0,4). A) Absolute Quantifizierung viraler Genome in infizierten Zellen durch *M55/gB*-spezifische qPCR und Normierung auf das zelluläre *pthrp*-Gen. B) Quantifizierung der im Zellkulturüberstand enthaltenen, infektiösen Viren durch Plaque-Assay. Der Zeitpunkt t_0 definiert den Beginn der Infektion. Die Symbole repräsentieren die Ergebnisse von einzelnen, voneinander unabhängigen Kulturen. Die Mediane sind als Balken dargestellt.

Die neu-generierten Viren m152.IE+E und m152.IE waren bezogen auf ihre *in vitro*-Infektiosität nicht attenuiert. Die ektopische IE-Insertion des *m152*-ORF zeigt *in vitro* keinen Einfluss auf die Virusreplikation und die Menge freigesetzter Viren. Die Initiation der viralen DNA-Replikation war etwa 16h nach Infektion durch den Anstieg der Anzahl viraler Genome in den infizierten Zellen sichtbar (Abb. 4.10A). Dies bedeutet, dass die virale DNA-Replikation zwischen 4 und 16h nach der Infektion initiiert wurde. Die Virustiter im Zellkulturüberstand zeigten 40h nach Infektion einen signifikanten Anstieg (Abb. 4.10B), welcher auf die Freisetzung infektiöser Viren in einem Zeitraum zwischen 24 bis 40h nach der Infektion zurückzuführen ist.

Fazit: Die generierten Viren m152.IE+E und m152.IE sind bezogen auf ihre *in vitro*-Replikation nicht attenuiert.

4.3 Funktionalität des IE-exprimierten Immunevasins m152

Es konnte bereits gezeigt werden, dass MEF, infiziert mit m152.IE+E oder m152.IE, das Immunevasin m152 unter selektiven IE-Bedingungen exprimieren (siehe Abb. 4.7). Weiterführend konnte in infizierten MEF eine Erhöhung der *m152*-Transkript- und Proteinmenge nach Infektion mit m152.IE+E im Vergleich zur WT.BAC-Infektion nachgewiesen werden. In den folgenden Experimenten sollte nun geklärt werden, ob das in der IE-Phase exprimierte m152-Protein funktionell ist. Da die zentrale Funktion von m152 die Reduktion der pMHC-Klasse-I-Oberflächenexpression durch Retention der pMHC-I-Komplexe im ERGIC (Ziegler et al., 1997; 2000) darstellt, wurde die m152-Funktionalität über die Antigenpräsentation infizierter Zellen im ELISpot-Assay abgefragt. Hierbei dienten infizierte MEF als APC. Die Stimulation der Effektoren durch Δ m152-infizierte Zellen diente als Referenz, da sie die maximal mögliche Peptidpräsentation der APC in Abwesenheit des zentralen Immunevasins widerspiegelt. Zunächst wurden IE-arretierte, infizierte MEF (analog zu 4.2.1) als APC im ELISpot-Assay eingesetzt (siehe 3.8.1). Als Effektorzellen wurden sowohl CD8 T-Zellen aus Milzen latent infizierter BALB/c-Mäuse (siehe 3.7.2) als auch eine IE1-spezifische T-Zelllinie (CTLL) verwendet (siehe 3.7.4). In einem weiteren Experiment wurde die intrazelluläre IFN γ -Produktion einer IE1-spezifischen CTLL nach Stimulation mit infizierten, IE-arretierten MEF zytofluorometrisch bestimmt.

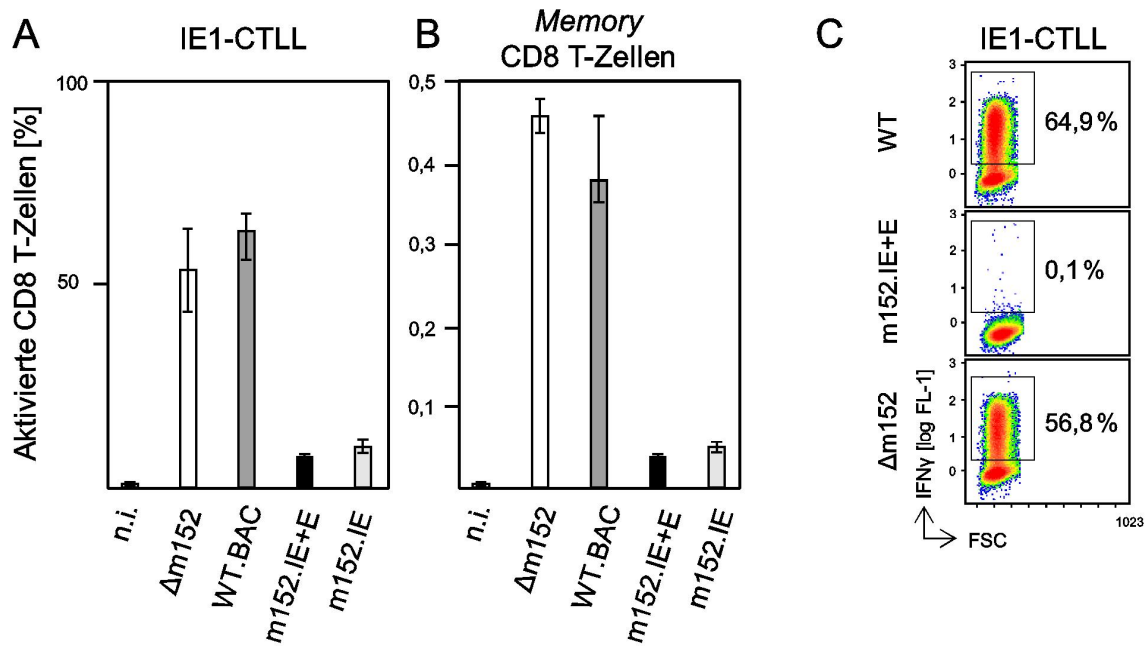


Abb. 4.11: Erkennung IE-arretierter, infizierter MEF durch eine IE1-CTLL oder *Memory* CD8 T-Zellen. Analyse der Antigenpräsentation von IE-arretierten MEF (siehe Abb. 4.7) infiziert mit WT.BAC, m152.IE+E, m152.IE oder $\Delta m152$ (MOI=4). Als Effektoren im ELISpot-Assay dienten immunmagnetisch isolierte CD8 T-Zellen aus Milzen latent infizierter BALB/c-Mäuse (B) sowie eine IE1-spezifische CTLL (A). Die dargestellten Balken repräsentieren die durch lineare Regression bestimmten Frequenzen der IFN- γ -sezernierenden CD8 T-Zellen mit den dazugehörigen 95%-Konfidenzintervallen. n.i.=nicht infizierte MEF. Die Stimulation einer IE1-CTLL wurde zusätzlich durch eine intrazelluläre IFN γ -Färbung bestimmt (C). Hierfür wurden 5×10^5 IE1-CTLs mit infizierten, IE-arretierten MEF (1×10^5 ; Behandlung wie beschrieben) für 5h co-kultiviert und anschließend intrazellulär mit einem IFN γ -spezifischen Antikörper gefärbt (siehe 3.8.2.2). Dargestellt ist der FSC gegen die intrazelluläre IFN γ -Expression (log FL-1, FITC).

IE-arretierte MEF infiziert mit WT.BAC oder $\Delta m152$ wurden sowohl von den *ex vivo* isolierten mCMV-spezifischen CD8 T-Zellen (Abb 4.11B) als auch von einer IE1-spezifischen CTLL (Abb. 4.11A/C) erkannt. Da durch den IE-Arrest die E-Phasen Immunevasine m152, m06 und m04 nicht wirken, war eine nicht durch Immunevasine beeinflusste Präsentation des IE1-Peptids auch nach WT.BAC-Infektion ermöglicht.

Die Erkennung der IE-arretierten MEF infiziert mit m152.IE+E oder m152.IE durch die jeweiligen Effektoren war im Vergleich zur WT.BAC-Infektion deutlich reduziert. Dies lässt auf eine stark reduzierte Präsentation viraler Peptide durch die eingesetzten APC schließen. Da kein weiteres Immunevasin mit pMHC-I-*down*-modulierender Funktion in der IE-Phase exprimiert wird, ist die reduzierte Antigenpräsentation auf die Funktionalität des IE-exprimierten Immunevasins m152 zurückzuführen.

Weiterführend sollte nun geklärt werden, welchen Einfluss die m152-Expression in der IE-Phase auf die Antigenpräsentation infizierter Zellen während des Infektionsverlaufes hat. Hierfür wurden konfluente MEF mit WT.BAC, m152.IE+E, m152.IE oder $\Delta m152$ (MOI=4) infiziert und die Transkription zu definierten Zeitpunkten irreversibel mit Act.D inhibiert. Die bis zum Act.D-Zugabezeitpunkt gebildeten Transkripte konnten über den gesamten Assay-Zeitraum weiter translatiert werden. Die Act.D-arretierten, infizierten MEF wurden als APC im

ELISpot-Assay eingesetzt (siehe 3.8.1), wobei eine IE1- oder m164-peptidspezifische CTLL als Effektorzelle verwendet wurde (siehe 3.7.4).

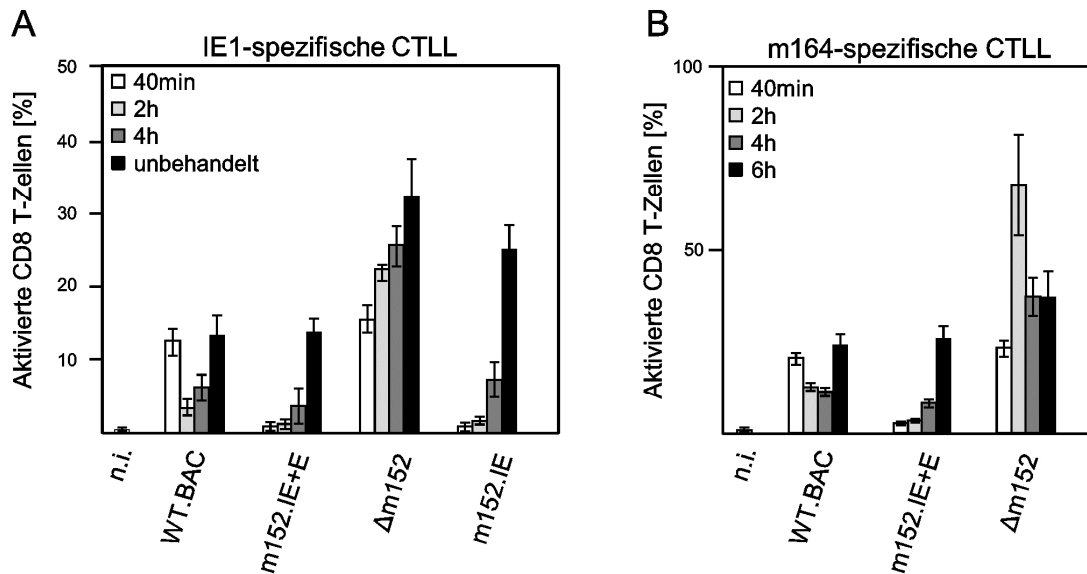


Abb. 4.12: Erkennung Act.D-arretierter, infizierter MEF durch IE1- oder m164-CTLL. Analyse der Antigenpräsentation von Act.D-arretierten MEF infiziert mit WT.BAC, m152.IE+E, Δ m152 oder m152.IE (MOI=4). Infizierte MEF wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion mit Act.D (5 μ g/ml Medium) für 1 Stunde inkubiert und anschließend als APC im ELISpot-Assay eingesetzt. Eine IE1- (A) oder m164- (B) spezifische CTLL wurde als Effektorzelle eingesetzt. Dargestellt sind die durch lineare Regression ermittelten Frequenzen IFN- γ -sezernierender Zellen mit den dazugehörigen 95% Konfidenzintervallen. n.i., nicht infizierte MEF; unbehandelt, infizierte MEF nicht Act.D behandelt.

Wie in Abbildung 4.12A dargestellt, wurden IE1-spezifische T-Zellen schon 40min nach Infektion mit WT.BAC oder Δ m152 durch die infizierten MEF aktiviert. Wurde die virale Transkription 2 Stunden nach der Infektion arretiert, war die Stimulation der IE1-spezifischen CTLL durch WT.BAC-infizierte APC deutlich reduziert. Dies ist auf die Expression des m152-Proteins in der nach 2 Stunden bereits erreichten E Phase zurückzuführen, die zu einer Reduktion der präsentierten antigenen Peptide auf der Oberfläche der infizierten Zellen führt. Mit m152.IE- oder m152.IE+E-infizierte MEF stimulierten eine IE1-spezifische CTLL zu frühen Zeitpunkten nicht, da das IE-exprimierte m152 die IE1-Antigenpräsentation vollständig unterdrückte. Erst 4h nach Infektion mit m152.IE+E oder m152.IE waren genügend pMHC-I-Komplexe an die Zelloberfläche gelangt, um die IE1-spezifische CTLL zu aktivieren. Ab diesem Zeitpunkt wurden die IE1-CTLL von Zellen infiziert mit WT.BAC, m152.IE+E oder m152.IE mit vergleichbarer Effizienz stimuliert.

Die m152.IE-Infektion inhibierte die IE1-Präsentation zu frühen Infektionszeitpunkten, allerdings konnten nicht arretierte m152.IE-infizierte und Δ m152-infizierte MEF die IE1-spezifische CTLL mit einer vergleichbaren Effizienz aktivieren (Abb. 4.12A, schwarze Balken). Da bereits gezeigt wurde, dass die alleinige Expression von m152 in der IE-Phase in einer geringeren m152-Proteinmenge als nach WT.BAC-Infektion resultiert (vergleiche Abb. 4.9) und dies nun auch funktionell durch eine verringerte Hemmung der IE1-Präsentation zu späten Infektionszeitpunkten bestätigt wurde, wurde die m152.IE-

Rekombinante in den nachfolgenden Experimenten nicht mehr verwendet.

Um die Reduktion der Antigenpräsentation durch das IE-exprimierte m152 für ein weiteres CD8 T-Zell-Epitop zu belegen, wurde der ELISpot-Assay mit einer m164-spezifischen CTLL wiederholt (Abb. 4.12B). Bis 4 Stunden nach m152.IE+E-Infektion wurde die m164-spezifische CTLL von den infizierten MEF nicht stimuliert. Da WT.BAC-infizierte MEF die m164-spezifische CTLL zu diesen frühen Zeitpunkten bereits aktivierten, muss die reduzierte Erkennung der m152.IE+E-infizierten Zellen auf eine verstärkte Inhibition der m164-Peptidpräsentation zurückzuführen sein. Erstaunlicherweise war die Stimulation der m164-spezifischen CTLL 6 Stunden nach Infektion in allen Infektionsgruppen vergleichbar (Abb. 3.12B, schwarze Balken), was auf vergleichbare Mengen des präsentierten m164-Peptids schließen lässt.

Fazit: Nach Infektion mit m152.IE+E oder m152.IE reduziert das m152-Protein bereits in der IE-Phase die Präsentation viraler Antigene.

4.4 *In vivo*-Replikationskinetik der m152.IE+E-Rekombinanten

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die ektopische m152-Expression unter Kontrolle des *ie2*-Promotors keinen Einfluss auf die Replikation in Zellkultur hat (siehe Abb. 4.10) und diese sich auch nicht auf die IE1-Proteinexpression auswirkt (siehe Abb. 4.9). Für nachfolgende *in vivo*-Experimente musste zusätzlich überprüft werden, ob die m152-Expression in der IE-Phase *in vivo* die „replikative Fitness“ (d.h. die virale Replikation) beeinträchtigt. Da die mCMV-Infektion im immunkompetenten Wirt effizient vom Immunsystem kontrolliert wird, wurde die *in vivo*-Replikationskinetik im immundepletierten Wirt untersucht.

Dazu wurden BALB/c-Mäuse nach γ -Bestrahlung (6,5Gy) mit 1×10^5 PFU der Viren WT.BAC, m152.IE+E oder Δ m152 intraplantar infiziert und zu definierten Zeitpunkten nach Infektion wurden repräsentative mCMV-Zielorgane von je 3 Tieren pro Gruppe entnommen. Aus den Organen wurde DNA isoliert (siehe 3.3.3.7) und die virale Replikation mittels *M55/gB* spezifischer qPCR (siehe 3.3.13.1) bestimmt. Eine *pthrp*-spezifische qPCR ermöglichte die Normierung auf eine definierte Zellzahl. Die Ergebnisse der *in vivo*-Replikationskinetik sind in Abb. 4.13 zusammengefasst.

Die Verdopplungszeiten der mCMV-Rekombinanten wurden, wie von Lemmermann et al. (2010) beschrieben, über lineare Regressionanalyse bestimmt. Die ermittelten Verdopplungszeiten der mCMV-Rekombinanten sind in allen dargestellten Organen vergleichbar, was zusätzlich durch die sich überlappenden 95%-Konfidenzintervalle verdeutlicht wird. Die *in vivo*-Replikation der verwendeten Viren verläuft also in immunsupprimierten Mäusen vergleichbar. Weder die ektopische m152-Insertion in die *ie2*-Genregion noch die m152-Deletion hatten einen Einfluss auf die virale Replikation *in vivo*.

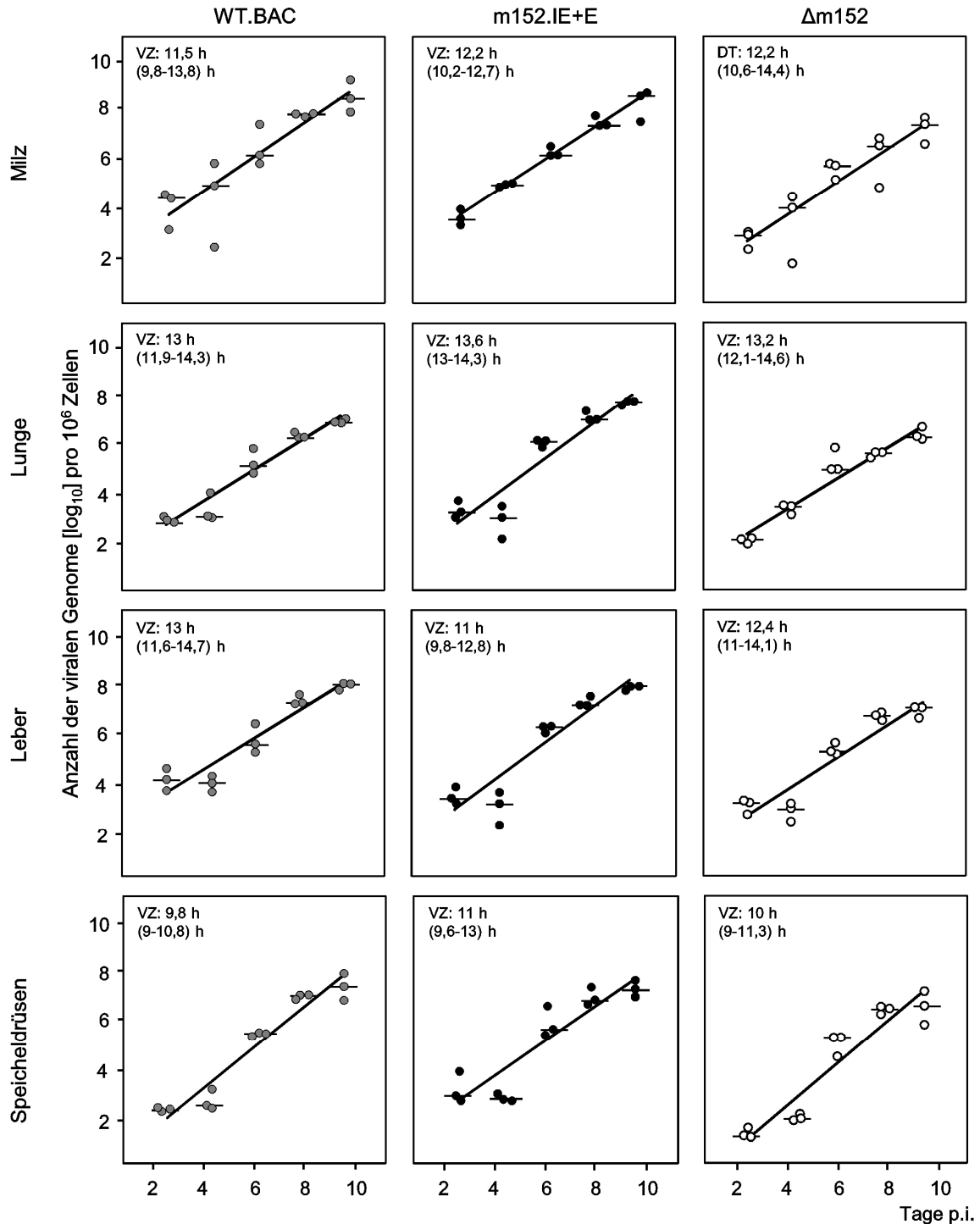


Abb. 4.13: *In vivo*-Replikationskinetik der Virusrecombinante. Immunsupprimierte BALB/c-Mäuse wurden mit 10^5 PFU WT.BAC, m152.IE+E, oder Δ m152 intraplantar infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 3 Mäuse Milz, Lunge, Leber und Speicheldrüse entnommen und die viralen Genome mittels qPCR quantifiziert. Durch lineare Regressionanalyse wurden die Verdopplungszeiten der Viren ermittelt. Die Werte in den Klammern geben die 95% Konfidenzintervalle an. Die Symbole repräsentieren unabhängig gemessene Tiere. Die Mediane sind durch horizontale Balken gekennzeichnet.

Fazit: Die *in vivo*-Replikation der verwendeten Viren ist in Abwesenheit immunologischer Kontrollmechanismen vergleichbar.

4.5 Einfluss der viralen Immunevasion auf die frühe CD8 T-Zellantwort

Das *Priming* antiviraler CD8 T-Zellen erfolgt im Lymphknoten (LK) hauptsächlich durch Interaktion naiver T-Zellen mit antigenpräsentierenden DC (Norbury et al., 2002). Da bereits gezeigt werden konnte, dass DC für mCMV permissiv sind (Andrews et al., 2001), ist die direkte Präsentation viraler antigener Peptide auf infizierten DC *in vivo* denkbar. Dies lässt vermuten, dass die Expression der Immunevasine in infizierten DC die Präsentation der viralen Antigene verhindert (Holtappels et al., 2006) und damit die Initiation der Immunantwort supprimiert. Alternativ zur direkten Antigenpräsentation ist das CD8 T-Zell-*Priming* auch über *Cross*-Präsentation exogener viraler Antigene und deren Präsentation auf nicht-infizierten CD8-positiven DC möglich (zur Übersicht: Joffre et al., 2012).

Der Einfluss viraler Immunevasionsproteine auf das CD8 T-Zell-*Priming* wurde bereits ausführlich unter Verwendung einer mCMV-Rekombinanten, in der die Immunevasine m152, m06 und m04 deletiert wurden (mCMV- Δ m152 Δ m06 Δ m04; nachfolgend: Δ Evasin, Wagner et al., 2002), beschrieben (zur Übersicht: Lemmermann et al., 2012). Die Infektion immunkompetenter C57BL/6-Mäuse (Haplotyp H-2^b) mit Δ Evasin zeigte überraschenderweise keine Veränderung in den mCMV-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen. Auch die Immundominanz-Hierarchie der CD8 T-Zellspezifitäten ist nach *Priming* mit Δ Evasin oder WT.BAC vergleichbar (Gold et al., 2002; 2004; Reddehase et al., 2004; Holtappels et al., 2006; Munks et al., 2007;). Experimente unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die Expression der Immunevasine die antiviralen CD8 T-Zellfrequenzen nach Infektion immunkompetenter BALB/c-Mäuse (Haplotyp H-2^d) im drainierenden LK sogar erhöht (Böhm et al., 2008). Dieses Phänomen wurde durch eine nach WT.BAC-Infektion verbesserte virale Replikation im LK und eine dadurch vermehrte Bereitstellung viraler Antigene und deren Präsentation auf nicht-infizierten DC erklärt. In Abwesenheit der Immunevasine wurde, bedingt durch die effiziente Präsentation viraler Antigene, die Infektion schnell von antiviralen CD8 T-Zellen kontrolliert. Dies führt zu einer verminderten viralen Replikation im Lymphknoten. Der Mechanismus der frühen CD8 T-Zellkontrolle wird auch als negative *Feedback*-Regulation bezeichnet. Von unserer Arbeitsgruppe wurde auf Grundlage dieser Arbeit postuliert, dass ein effizientes *Priming* primär durch *Cross*-Präsentation geprägt wird.

Um bisherige Untersuchungen des CD8 T-Zell-*Primings* in Abhängigkeit von viraler Immunevasion zu vervollständigen, sollte in dieser Arbeit geklärt werden, welche Rolle die verstärkte m152-Expression nach m152.IE+E-Infektion bei der Initiation der CD8 T-Zellantwort im immunkompetenten Wirt spielt. Da *in vitro* bereits gezeigt werden konnte, dass die MHC-I-Präsentation antigener Peptide in m152.IE+E-infizierten MEF in der IE-Phase stark reduziert ist (siehe Abb. 4.11), kann spekuliert werden, dass eine m152.IE+E-Infektion *in vivo* möglicherweise nicht effektiv von CD8 T-Zellen kontrolliert werden kann. Dies sollte durch eine erhöhte virale Last im drainierenden LK und damit eine verbesserte Bereitstellung von antigenem Material für *Cross-Priming* eine verstärkte CD8 T-Zellantwort induzieren.

Da bisherige Arbeiten darauf hinweisen, dass die CD8 T-Zellantwort durch *Cross-Präsentation* initiiert wird, sollte zusätzlich das CD8 T-Zell-*Priming* nach Infektion *Cross-Priming*-defizienter Mäuse analysiert werden. Hierbei wurde erwartet, dass die Initiation der CD8 T-Zellantwort stark unterdrückt ist.

4.5.1 Die m152.IE+E-Infektion unterdrückt die CD8 T-Zellantwort im Haplotyp H-2^d

In unserer Arbeitsgruppe wurde der Einfluss viraler Immunevasion auf die antivirale CD8 T-Zellantwort bisher überwiegend nach Infektion mit einer Δ Evasin-Rekombinanten, in der die Immunevasine deletiert wurden (zur Übersicht: Lemmermann et al., 2012), beschrieben. Die im Rahmen dieser Arbeit generierte mCMV-Rekombinante m152.IE+E ermöglicht erstmals den Einfluss einer verstärkten Immunevasion auf die Initiation der CD8 T-Zellantwort zu bestimmen. Zu diesem Zweck erfolgte eine Quantifizierung der antiviralen CD8 T-Zellfrequenzen 7 Tage nach intraplantarer Infektion mit WT.BAC, m152.IE+E oder Δ m152. Hierfür wurden CD8 T-Zellen aus Milz und LK von jeweils 5 Tieren pro Infektionsgruppe als Effektoren und mit synthetischen Peptiden beladene P815-Zellen (Haplotyp H-2^d) als APC im ELISpot-Assay eingesetzt.

Das Muster der CD8 T-Zellfrequenzen war in allen Infektionsgruppen vergleichbar, mit klarer Dominanz der Spezifitäten IE1 und m164 in der Milz (siehe Abb. 4.14). Wie bereits Böhm et al. (2008) für die Δ Evasin-Infektion zeigen konnten, waren auch nach Δ m152-Infektion, trotz verbesserter Antigenpräsentation Δ m152-infizierter Zellen, die CD8 T-Zellfrequenzen im LK im Vergleich zur WT.BAC-Infektion deutlich reduziert. Demgegenüber waren in der Milz die CD8 T-Zellfrequenzen nach Infektion mit WT.BAC oder Δ m152 für alle Epitope vergleichbar (siehe Abb. 4.14A), mit Ausnahme der IE1-Spezifität.

Überraschenderweise waren die CD8 T-Zellfrequenzen aller getesteten Spezifitäten auch durch eine verstärkte m152-Expression nach m152.IE+E-Infektion im Vergleich zur WT.BAC-Infektion deutlich reduziert. Dies konnte sowohl für die Milz als auch für den LK gezeigt werden. Dieses Experiment zeigte erstmals, dass eine verstärkte m152-Expression und die damit verbundene verstärkte Inhibition der Antigenpräsentation die frühe CD8 T-Zellantwort beeinflusst.

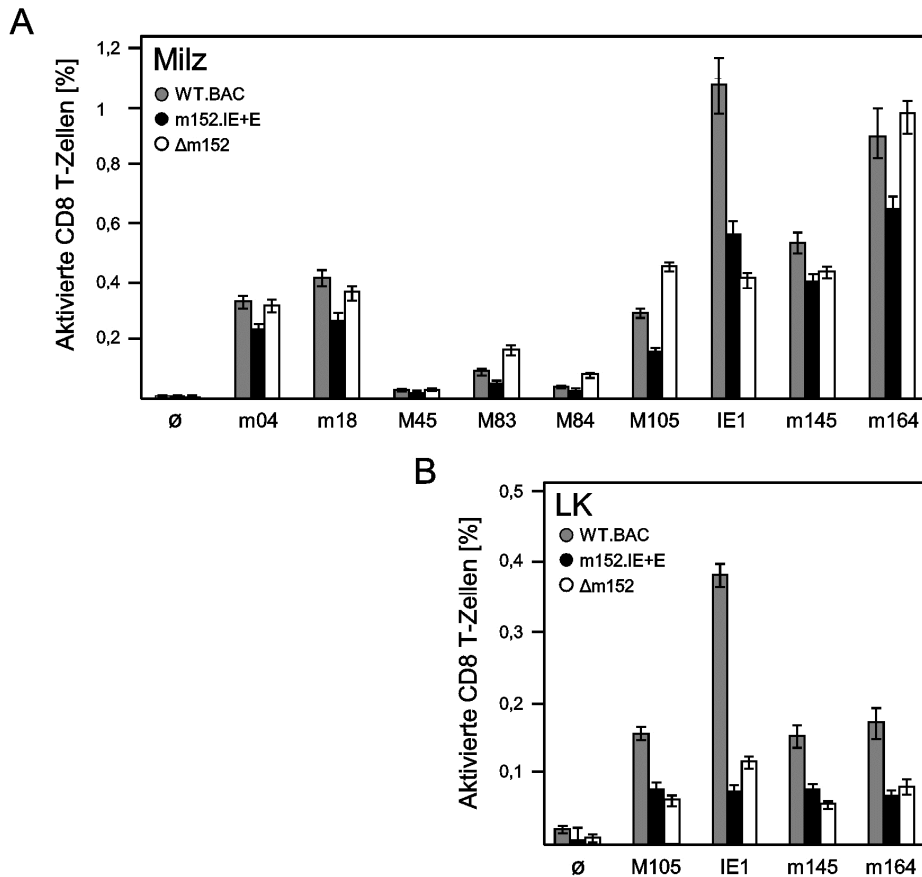


Abb. 4.14: Einfluss der m152-Expression auf die mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort im Haplotyp H-2^d. BALB/c-Mäuse wurden intraplantar mit 10^5 PFU WT.BAC (graue Balken), m152.IE+E (schwarze Balken) oder Δ m152 (leere Balken) infiziert. Nach 7 Tagen wurden CD8 T-Zellen aus einem Pool von 5 Milzen (A) LK (B) oder immunomagnetisch isoliert und als Effektoren im ELISpot-Assay eingesetzt. Als APC dienen P815-Zellen (Haplotyp H-2^d), welche exogen mit 10^{-7} M des jeweiligen Peptids beladen wurden. Als Kontrolle wurden unbeladene P815-Zellen mitgeführt (\emptyset). Die Balken repräsentieren die durch lineare Regression bestimmten Frequenzen der IFN- γ -sezernierenden CD8 T-Zellen. Die eingezeichneten Fehlerbalken stellen die 95% Konfidenzintervalle dar.

Der bisher verwendete ELISpot-Assay limitiert die Analyse auf T-Zellspezifitäten bereits identifizierter CD8 T-Zell-Epitope. Es sollte deshalb sichergestellt werden, dass die Unterdrückung der Spezifitäten in der Akutphase der m152.IE+E-Infektion die CD8 T-Zellantwort bisher nicht analysierter Epitope nicht begünstigt, sondern die CD8 T-Zellantwort generell vermindert ist.

Für die Analyse des vollständigen mCMV-Immuns wurden SV40-Fibroblasten (Haplotyp H-2^d) mit der von Munks et al. (2006b) generierten ORF-Bibliothek, die das gesamte mCMV-Genom umfasst, transfiziert und als APC eingesetzt. Enthält ein mCMV-ORF ein oder mehrere antigene Peptide, können diese endogen prozessiert von der transfizierten Zelle präsentiert werden und co-kultivierte Effektorzellen stimulieren.

Die Effektorzellen wurden 7 Tage nach Infektion mit WT.BAC oder m152.IE+E aus BALB/c-Milzen isoliert. Die Antigen-stimulierten, IFN γ -produzierenden Effektorzellen wurden zytofluorometrisch quantifiziert (siehe 3.8.2). Zu diesem Zweck erfolgte eine Oberflächenfärbung mit einem CD8a-spezifischem AK, gefolgt von einer intrazellulären

Färbung mit einem IFN γ -spezifischen Antikörper. Als Kontrolle wurden die Effektoren mit den bekannten, synthetischen mCMV-Peptiden stimuliert.

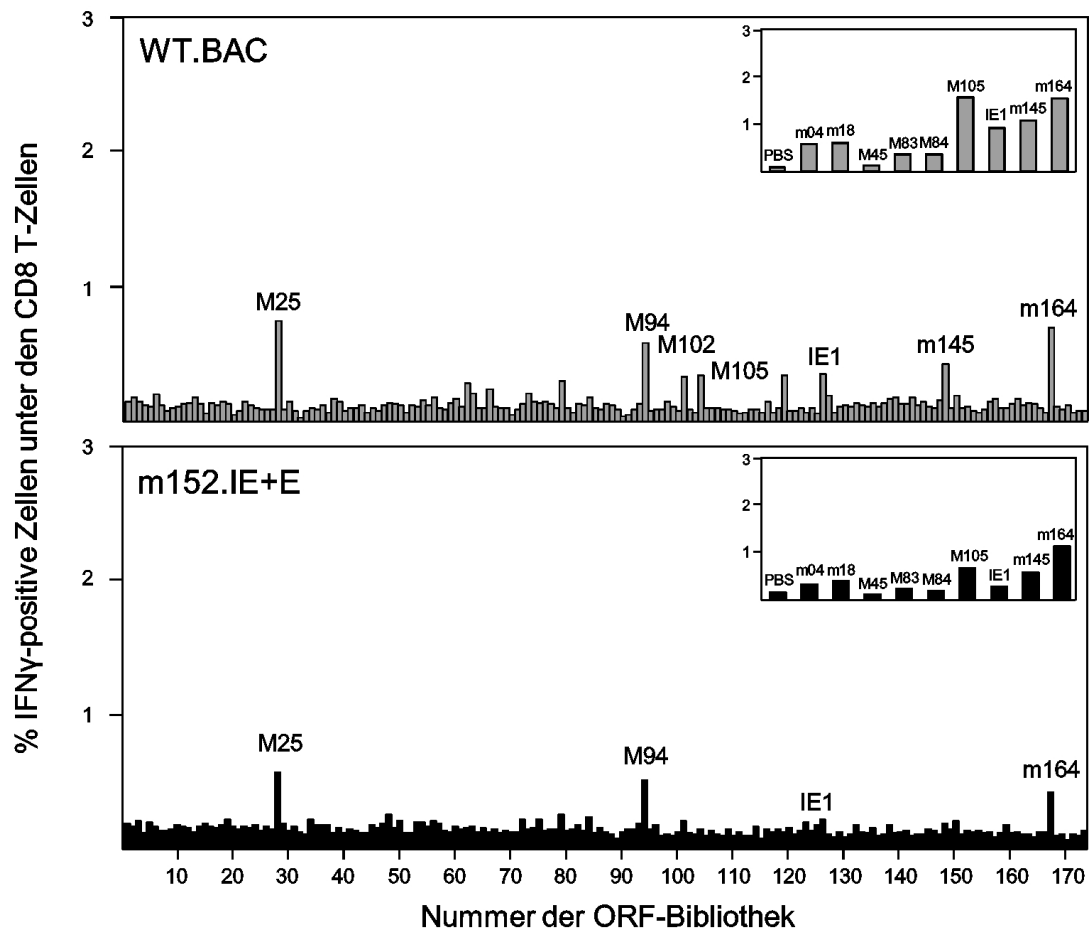


Abb. 4.15: mCMV-Genom-weites Antigenitäts-Screening in der akuten Phase der mCMV-Infektion. Mit Hilfe der ORF-Bibliothek wurde die Genom-weite CD8 T-Zellantwort 7 Tage nach intraplantarer Infektion mit WT.BAC (graue Balken) und m152.IE+E (schwarze Balken) abgefragt. Hierfür wurden Expressionsplasmide der ORF-Bibliothek in BALB-SV40-Fibroblasten transfiziert und diese als APC verwendet (siehe 3.8.4). Die Effektoren wurden aus Gesamtmilzzellen von 6 akut infizierten BALB/c-Mäusen gewonnen. Eine Zuordnung der ORF-Bibliotheknummern zu den mCMV-ORFs ist von Holtappels et al. (2008b) veröffentlicht worden. Als Kontrolle wurden die Effektoren mit synthetischem Peptid stimuliert (eingefügte Kästen). Die Quantifizierung der IFN γ -produzierenden CD8 T-Zellen erfolgte zytofluorometrisch. Elektronische Gates wurden auf die Lymphozytenpopulation und anschließend auf die Population mit positiver CD8a-Oberflächenexpression (log FL-4, PE-Cy5) eingestellt.

Das ORF-Bibliotheken-Screening zeigte, dass nach m152.IE+E-Infektion die CD8 T-Zellfrequenzen aller Spezifitäten im Vergleich zur WT.BAC-Infektion deutlich reduziert waren (Abb. 4.15). Die Spezifitäten M25, M94 und m164 dominierten nach m152.IE+E-Infektion die CD8 T-Zellantwort, während andere Spezifitäten nur marginal nachweisbar waren. Eine IE1-spezifische CD8 T-Zellantwort war weder im ORF-Bibliotheken-Screening noch nach Stimulation mit synthetischem IE1-Peptid detektierbar.

Fazit: In der akuten Phase der mCMV-Infektion sind in Abwesenheit des Immunevasins m152 die mCMV-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen im LK vermindert. Für die Milz gilt dies jedoch nicht, da die CD8 T-Zellfrequenzen in An- und Abwesenheit von m152 vergleichbar waren. Erstaunlicherweise unterdrückt die m152-Expression in der IE- und E-Infektionsphase die mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort im Vergleich zur alleinigen m152-Expression in der E-Phase nach WT.BAC-Infektion.

4.5.2 Die m152-Expression unterdrückt die *Memory* CD8 T-Zellantwort im Haplotyp H-2^d

Die Expansion virus-spezifischer CD8 T-Zellen während der viralen Latenz ist ein Charakteristikum der CMV-spezifischen Immunantwort. Es wird postuliert, dass sporadische virale Genexpressionsereignisse und die damit einhergehende Präsentation viraler Antigene auf nicht-hämatopoetischen Gewebszellen die Akkumulation funktioneller Effektor CD8 T-Zellen induzieren (Holtappels et al., 1998; Holtappels et al., 2000a; Snyder et al., 2008; Seckert et al., 2011; 2013).

Im nachfolgenden Experiment sollte geklärt werden, welchen Einfluss die m152-Expression in der IE- und E-Phase auf die CD8 T-Zellantwort in der *Memory*-Phase hat. Es wurde vermutet, dass die zusätzliche m152-Expression in der IE-Phase die Expansion antiviraler CD8 T-Zellen in der *Memory*-Phase unterdrückt. Um dies zu prüfen, erfolgte die Quantifizierung der CD8 T-Zellfrequenzen 28 Wochen nach intraplantarer Infektion mit WT.BAC, m152.IE+E oder Δ m152 mittels ELISpot-Assay.

Die *Memory* CD8 T-Zellantwort in der Milz wurde in allen Infektionsgruppen deutlich von den Spezifitäten IE1 und m164 dominiert. In diesem Experiment waren die ermittelten CD8 T-Zellfrequenzen in der *Memory* Phase geringer als in der Akutphase (vergleiche Abb. 4.14). Eine Akkumulation mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen in der Milz konnte somit nicht festgestellt werden.

Im Vergleich zur WT.BAC-Infektion waren die CD8 T-Zellfrequenzen nach Δ m152-Infektion erhöht. Eine Ausnahme stellte die IE1-Spezifität dar, hier waren die CD8 T-Zellfrequenzen nach Δ m152-Infektion geringer. Dieses Muster konnte auch bereits für die latente Δ Evasin-Infektion gezeigt werden (unveröffentlichte Daten, V. Böhm).

Wie bereits in der Akutphase der m152.IE+E-Infektion gezeigt werden konnte (siehe Abb. 4.14), war auch in der *Memory* Phase die CD8 T-Zellantwort für alle getesteten Epitope im Vergleich zu WT.BAC-Infektion signifikant reduziert.

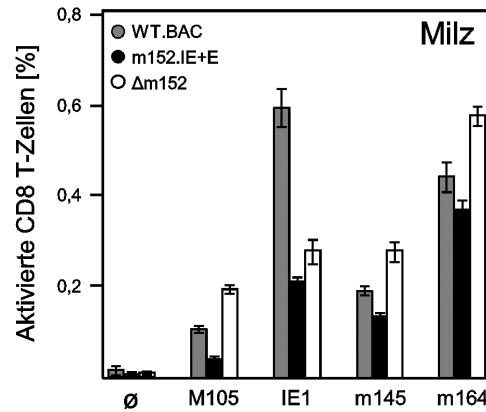


Abb. 4.16: Einfluss der m152-Expression auf die Memory CD8 T-Zellantwort in der Milz. BALB/c-Mäuse wurden intraplantar mit 10^5 PFU WT.BAC (graue Balken), m152.IE+E (schwarze Balken) oder Δ m152 (leere Balken) infiziert. Aus einem Pool von 5 Milzen wurden 28 Wochen nach der Infektion CD8 T-Zellen isoliert und als Effektoren im ELISpot-Assay verwendet. Als APC wurden P815-Zellen (Haplotyp H-2^d) exogen mit dem jeweiligen Peptid (10^{-7} M) beladen. Als Kontrolle wurden unbeladene P815-Zellen mitgeführt (\emptyset). Die Balken repräsentieren die Frequenzen der IFN- γ -sezernierenden CD8 T-Zellen die durch lineare Regression bestimmt wurden. Die Fehlerbalken kennzeichnen die 95% Konfidenzintervalle.

Fazit: In der *Memory* Phase der mCMV-Infektion führt das Fehlen des Immunevasins m152 zu einer Erhöhung mCMV-spezifischer CD8 T-Zellfrequenzen. Für die IE1-spezifische CD8 T-Zellen gilt dies jedoch nicht. Wie in der Akutphase, ist deren Frequenz sogar niedriger als nach WT.BAC-Infektion. Im Vergleich zur WT.BAC-Infektion hat eine m152-Expression in der IE- und E-Phase der Infektion niedrigere mCMV-spezifische CD8 T-Zellfrequenzen zur Folge; eine Beobachtung, die bereits in der Akutphase gemacht wurde.

4.5.3 m152 verhindert die effiziente Kontrolle der akuten mCMV-Infektion im Haplotyp H-2^d

Die akute CMV-Infektion wird im immunkompetenten Wirt effektiv durch das angeborene und adaptive Immunsystem kontrolliert. Da die CD8 T-Zellfrequenzen nach m152.IE+E-Infektion immunkompetenter BALB/c-Mäuse im Vergleich zur WT.BAC-Infektion stark unterdrückt waren (siehe Abb. 4.14 und 4.16), sollte nachfolgend geklärt werden, welchen Einfluss die m152-Expression in der IE- und E-Phase auf die virale Genexpression im drainierenden LK hat.

Es wurde bereits *in vitro* gezeigt, dass m152.IE+E-infizierte Fibroblasten von mCMV-spezifischen CD8 T-Zellen schlechter erkannt wurden als WT.BAC-infizierte Zellen (siehe Abb. 4.12). Es war daher zu erwarten, dass auch *in vivo* die m152-Expression in der IE- und E-Phase zu einer verschlechterten Erkennung der infizierten Zellen durch mCMV-spezifische CD8 T-Zellen führt. Da antivirale CD8 T-Zellen die Kontrolle der akuten mCMV-Infektion vermitteln, sollte eine verminderte CD8 T-Zellkontrolle in einer erhöhten viralen Replikation im drainierenden LK resultieren.

Um eine Korrelation zwischen viraler Replikation und Peptid-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen zu ermöglichen, wurde die intranodale Genexpression des *ie1*-Gens

bestimmt, das für ein immundominantes CD8 T-Zell-Epitop kodiert (Reddehase et al., 1989). Bei dem IE1-Protein handelt es sich um ein Nicht-Struktur-Protein, das heißt, es gelangt nicht Virion-assoziiert in die Wirtszelle und die Präsentation des antigenen IE1-Peptids ist somit von der Expression sowie Translation des *IE1*-Transkriptes abhängig.

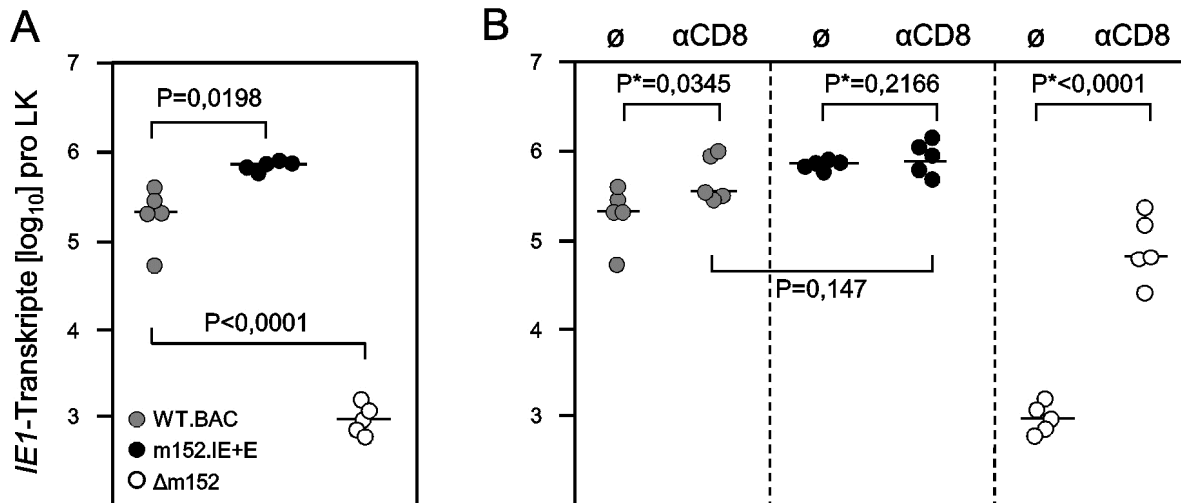


Abb. 4.17: Einfluss der m152-Expression auf die virale Genexpression im drainierenden LK. A) BALB/c-Mäuse wurden intraplantar mit 10^5 PFU WT.BAC (graue Symbole), m152.IE+E (schwarze Symbole) oder Δ m152 (leere Symbole) infiziert. 3 Tage p.i. wurde Gesamt-RNA aus den poplitealen LK aufgereinigt, wobei anschließend 500ng RNA für die *IE1*-spezifische RT-qPCR eingesetzt wurde. B) Um den Einfluss der CD8 T-Zellkontrolle auf die virale Genexpression im LK zu bestimmen, erfolgte 24h vor der Infektion eine CD8-Zelldepletion durch i.v. Injektion von 1mg anti-CD8 Antikörper (siehe 3.6.5). Die Infektion und Transkriptquantifizierung erfolgte wie unter 3.17A beschrieben. Mediane sind als horizontale Linien angegeben. Die angegebenen P-Werte wurden mit dem 2-tailed *t*-Test (Welch-Test) und die P*-Werte wurden mit dem 1-tailed *t*-Test (Welch-Test) ermittelt [<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/?Format=C>].

Die Quantifizierung der viralen Genexpression im poplitealen LK erfolgte 3 Tage nach intraplantarer Infektion immunkompetenter BALB/c-Mäuse mit WT.BAC, m152.IE+E oder Δ m152. Für die absolute Quantifizierung der *IE1*-Transkriptmenge mittels RT-qPCR (siehe 3.4.2) wurden jeweils 500 μ g Gesamt-RNA eingesetzt und ein *IE1-in vitro*-Transkript diente als externer Standard.

Wie erwartet, war in Abwesenheit von m152 die virale Genexpression im drainierenden LK signifikant geringer ($P < 0,0001$) als nach WT.BAC-Infektion (siehe Abb. 4.17A), da die verbesserte Antigenpräsentation infizierter Zellen eine frühe CD8 T-Zellkontrolle begünstigt. Die frühe Eliminierung der infizierten Zellen vermindert somit die virale CD8 T-Zellantwort im poplitealen LK (vergleiche Abb. 4.14).

Nach m152.IE+E-Infektion war die virale Genexpression im LK signifikant höher als nach WT.BAC-Infektion ($P = 0,0198$), während die mCMV-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen deutlich reduziert waren (vergleiche Abb. 4.14). Diese Experimente zeigen erstmals, dass eine verstärkte Immunevasion und die damit einhergehende Reduktion der pMHC-I-Präsentation auf infizierten Zellen zu einer erhöhten viralen Genexpression im LK führt und gleichzeitig die antivirale CD8 T-Zellantwort unterdrückt.

Nachfolgend sollte nach m152.IE+E-Infektion geklärt werden, welchen Einfluss die Anwesenheit von CD8 T-Zellen auf die virale Genexpression im LK hat. Es wurde erwartet, dass m152.IE+E-infizierte Zellen der CD8 T-Zellkontrolle entgehen und die An- oder Abwesenheit antiviraler CD8 T-Zellen die virale Replikation nicht beeinflusst.

Eine *in vivo*-Depletion der CD8-exprimierenden Zellen erfolgte mittels α CD8-Antikörper 24h vor der Infektion (siehe 3.6.5). Die Quantifizierung der *IE1*-Transkripte erfolgte, wie bereits beschrieben, aus dem poplitealen LK 3 Tage nach Infektion. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.17B zusammengefasst.

In Abwesenheit der CD8 T-Zell-vermittelten Kontrollmechanismen ist die virale Genexpression nach WT.BAC-Infektion signifikant höher als in Anwesenheit der CD8 T-Zellen ($P^*=0,0345$). Wie bereits erwartet, ist nach m152.IE+E-Infektion in An- und Abwesenheit der CD8 T-Zellkontrolle die virale Genexpression im LK vergleichbar ($P^*=0,2166$). Dies zeigt, dass die m152.IE+E-Infektion nicht effizient von CD8 T-Zellen kontrolliert wurde. Zusätzlich konnte der Replikationsunterschied zwischen WT.BAC und m152.IE+E durch die Depletion von CD8 T-Zellen aufgehoben werden.

Die Δ m152-Infektion wurde sehr effizient kontrolliert, was zu einer im Vergleich zur WT.BAC-Infektion deutlich geringeren viralen Genexpression im LK führte. In Abwesenheit der CD8 T-Zellkontrolle war die virale Genexpression nach Δ m152-Infektion dagegen signifikant höher als in Anwesenheit der CD8 T-Zellen ($P^*<0,0001$). Allerdings konnte der Replikationsunterschied zwischen Δ m152 und WT.BAC durch alleinige Depletion der CD8 T-Zellen nicht vollständig aufgehoben werden.

Fazit: In immunkompetenten BALB/c-Mäusen resultiert die Abwesenheit des Immunevasins m152 in einer effizienten Kontrolle der Infektion durch CD8 T-Zellen. Die verstärkte m152-Expression führt zu einer verschlechterten Kontrolle der Infektion.

4.5.4 m152 beeinflusst nicht die CD8 T-Zellantwort im Haplotyp H-2^b

In bisherigen Publikationen konnte gezeigt werden, dass nach Infektion von immunkompetenten C57BL/6-Mäusen mit WT.BAC bzw. Δ Evasin die mCMV-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen und damit die Immundominanz-Hierarchie der Spezifitäten vergleichbar sind (Gold et al., 2002). Da aber ausschließlich die Immunantwort in der Milz abgefragt wurde und nicht das initiale *Priming*-Ereignis im LK, sollte im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden, welchen Einfluss die m152-Deletion sowie die m152-Expression in der IE- und E-Phase auf die antivirale CD8 T-Zellantwort H-2^b-restringierter Epitope im drainierenden LK hat. Parallel sollte, analog zu den Analysen im Haplotyp H-2^d (siehe Abb. 4.14 und 4.17), die virale Replikation im drainierenden LK mit den CD8 T-Zellfrequenzen korreliert werden.

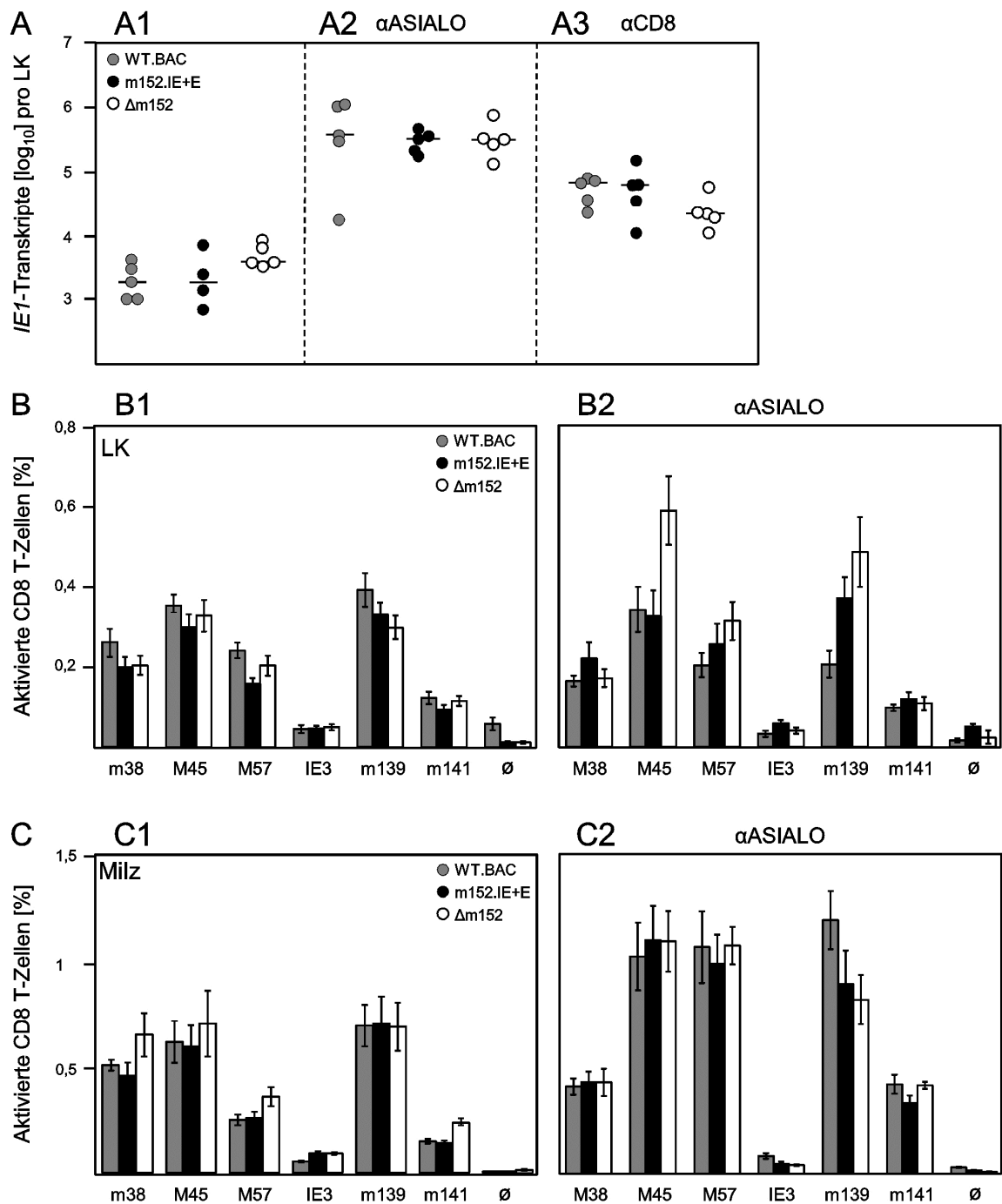


Abb. 4.18: Einfluss der m152-Expression auf die CD8 T-Zellantwort im Haplotyp H-2^b in An- und Abwesenheit der NK-Zellkontrolle. A1/B1/C1) Kontrollgruppen ohne Depletion von Lymphozyten-Subpopulationen. A2/B2/C2) *In vivo*-Depletion von NK-Zellen durch i.v. Injektion von 25 μ l anti-asialo GM1 Antiserum. A3) *In vivo*-Depletion von CD8 T-Zellen durch i.v. Injektion von 1mg anti-CD8 Antikörper. A) 3 Tage nach intraplantarer Infektion mit 10⁵PFU WT.BAC (graue Symbole), m152.IE+E (schwarze Symbole) oder Δ m152 (leere Symbole) erfolgte die Quantifizierung der intranodalen IE1-Transkripte mittels RT-qPCR. Die Mediane sind als horizontale Linien eingezeichnet. Zusätzlich wurden 7 Tage nach Infektion CD8 T-Zellen aus einem Pool von 5 LK (B) oder Milzen (C) immunomagnetisch isoliert und als Effektoren im ELISpot-Assay eingesetzt. Als APC dienten EL-4 Zellen (Haplotyp H-2^b), welche exogen mit dem angegebenen Peptid der Konzentration 10⁻⁷M beladen wurden. Unbeladene EL4-Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt (\emptyset). Die Balken repräsentieren die durch lineare Regression bestimmten Frequenzen der IFN- γ -sezernierenden CD8 T-Zellen. Die eingezeichneten Fehlerbalken stellen die 95% Konfidenzintervalle dar.

Hierfür erfolgte 3 Tage nach intraplantarer Infektion mit WT.BAC, m152.IE+E oder Δ m152 immunkompetenter C57BL/6-Mäuse (Haplotyp H-2^b) die Quantifizierung der viralen Genexpression im LK (siehe Abb. 4.17). Die mCMV-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen wurden 7 Tage nach Infektion mittels ELISpot-Assay bestimmt. Die Ergebnisse der *IE1*-Quantifizierung sind in Abb. 4.18A1 dargestellt. Abb. 4.18B1 und C1 fassen die antivirale CD8 T-Zellantwort in Milz und LK zusammen.

Insgesamt ist die virale Genexpression im LK 3 Tage nach intraplantarer WT.BAC-Infektion von C57BL/6-Mäusen deutlich geringer (~5.000 *IE1*-Transkripte/LK) als nach Infektion von BALB/c-Mäusen (~300.000 *IE1*-Transkripte/LK). Überraschenderweise konnte die verstärkte virale Replikation in Abhängigkeit von der m152-Expression in C57BL/6 nicht nachgewiesen werden (vergleiche Abb. 4.17); die *IE1*-Genexpression im LK war in allen Infektionsgruppen vergleichbar (Abb. 4.18A1). Dies korreliert mit den CD8 T-Zellfrequenzen im Haplotyp H-2^b, die in Milz und LK in allen Infektionsgruppen vergleichbar waren (Abb. 4.18B1,C1).

Während die mCMV-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen im Haplotyp H-2^d deutlich von der m152-Expression moduliert wurden, hatten die Immunevasine offenbar keinen Einfluss auf die CD8 T-Zellantwort im Haplotyp H-2^b. Obwohl nach *in vitro*-Infektion von MEF oder BMDC (*bone marrow derived dendritic cells*) die Immunevasine die Präsentation der pMHC-I-Komplexe auch im Haplotyp H-2^b modulieren (Holtappels et al., 2006), scheint dies nicht zu bedeuten, dass die Immunevasine *in vivo* im Kontext der Infektion wirksam sind und die mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort beeinflussen.

Es ist bekannt, dass die mCMV-Infektion in C57BL/6-Mäusen effizient von NK-Zellen kontrolliert wird. Hierbei wird der aktivierende NK-Zellrezeptor Ly49H spezifisch durch das mCMV-kodierte m157-Transmembranprotein stimuliert (Arase et al., 2002; Smith et al., 2002). Da BALB/c-Mäuse Ly49H nicht exprimieren, findet hier eine m157-vermittelte Aktivierung der NK-Zellen nicht statt (zur Übersicht: Lisnić et al., 2010).

In einer aktuellen Publikation konnte gezeigt werden, dass eine effektive Aktivierung der NK-Zellen über m157 die mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort unterdrückt (Mitrović et al., 2012). Basierend auf diesen Beobachtungen wurde vermutet, dass in Abwesenheit der NK-Zellkontrolle die CD8 T-Zellantwort verstärkt ist und möglicherweise unter diesen Bedingungen ein Einfluss der viralen Immunevasion auf die mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort nachgewiesen werden könnte.

Alle verwendeten Viren kodieren für den NK-Zell-Liganden m157; deshalb wurden die Quantifizierung der *IE1*-Transkripte im LK und die Analyse der CD8 T-Zellantwort in Milz und LK nach *in vivo*-Depletion der NK-Zellen in der C57BL/6-Maus wiederholt. Es ist zu beachten, dass der verwendete Depletionsantikörper anti-asialo GM1 auch aktivierte CD8 T-Zellen depletiert (Slifka et al., 2000); daher muss die Applikation des Antikörpers einmalig 24h vor der Infektion erfolgen.

Die Ergebnisse der Analysen sind in Abb. 4.18A2, B2 und C2 zusammengefasst. Wie erwartet, erhöht die Depletion der NK-Zellen die virale Genexpression im LK 3 Tage nach Infektion der C57BL/6-Mäuse (vergleiche Abb. 4.18A1 und A2). Allerdings war weiterhin die

virale Replikation in allen Infektionsgruppen vergleichbar. Dies korreliert zusätzlich mit den quantifizierten CD8 T-Zellfrequenzen, die in Milz und LK vergleichbar waren. Eine Ausnahme bildeten im LK die Spezifitäten M45, M57 und m139 nach Δ m152-Infektion; hier waren die Frequenzen deutlich höher als nach WT.BAC-Infektion. Die CD8 T-Zellfrequenzen waren nach *Priming* mit WT.BAC oder m152.IE+E allerdings vergleichbar.

Die Depletion CD8-exprimierender Zellen erhöht die virale Genexpression im LK 3 Tage nach Infektion im Vergleich zu den nicht-depletierten C57BL/6-Mäusen (vergleiche Abb. 4.18A1 und A3). Allerdings war weiterhin die virale Replikation in allen Infektionsgruppen vergleichbar. Das Niveau der viralen Replikation war insgesamt niedriger als nach Depletion der NK-Zellen. Dies bestätigt die Dominanz der NK-Zellantwort in der frühen Kontrolle der viralen Replikation im Haplotyp H-2^b.

Fazit: Nach Infektion immunkompetenter C57BL/6-Mäuse hatte die m152-Expression keinen Einfluss auf die antivirale CD8 T-Zellantwort und die virale Replikation im LK. Dies konnte auch in Abwesenheit der NK-Zellkontrolle bestätigt werden. Eine Ausnahme bilden die Spezifitäten M45, M57 und m139 im LK, die in Abwesenheit des Immunevasins m152 und der NK-Zellkontrolle im Vergleich zur WT.BAC-Infektion deutlich profitierten.

4.5.5 Die mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort ist unabhängig von der Cross-Präsentation viraler Peptide

In einigen Publikationen wird auf eine maßgebliche Rolle der *Cross-Präsentation* viraler Peptide auf nicht infizierten profAPC bei der Induktion der mCMV-spezifischen Immunantwort verwiesen (Böhm et al., 2008; Snyder et al., 2010; Torti et al., 2011b; Busche et al., 2013). Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigte Modulation der CD8 T-Zellantwort durch die m152-Expression im Haplotyp H-2^d widerspricht den publizierten Ergebnissen, da m152 nur in infizierten APC wirken kann und somit keinen Einfluss auf die *Cross-Präsentation* viraler Antigene haben kann.

Es war daher von Interesse die Rolle der *Cross-Präsentation* bei der Initiation der CD8 T-Zellantwort durch Infektion *Cross-Präsentations-defizienter* C57BL/6-Unc93b1^{3d/3d}-Mäuse (nachfolgend: 3d; Haplotyp H-2^b) zu bestimmen. Die verwendete 3d-Maus trägt eine *Missense-Mutation* im *Unc93b1*-Allel, welche u.a. die *Cross-Präsentation* von exogenen Antigenen verhindert (Janssen et al., 2006; Tabeta et al., 2006).

Die mCMV-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen wurden 7 Tage nach intraplantarer Infektion mit WT.BAC, m152.IE+E oder Δ m152 von *Cross-Präsentations-defizienten* 3d-Mäusen mittels ELISpot-Assay bestimmt (Abb. 4.19). Überraschenderweise wurden nach mCMV-Infektion in Milz und LK von 3d-Mäusen höhere virus-spezifische CD8 T-Zellfrequenzen detektiert, als nach Infektion von C57BL/6-Mäusen (vergleiche Abb 4.19 mit Abb. 4.18B1 und C1).

Die Frequenz-Hierarchien der Spezifitäten in *Cross-Präsentations-defizienten* 3d- und in parentalen C57BL/6-Mäusen waren jedoch vergleichbar. Dies bedeutet, dass die Initiation

der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort unabhängig von der *Cross*-Präsentation viraler Antigene stattfinden kann. Da die 3d-Maus den genetischen Hintergrund der C57BL/6-Maus trägt, waren die mCMV-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen in allen Infektionsgruppen vergleichbar und unabhängig von der m152-Expression (vergleiche Abb. 4.18).

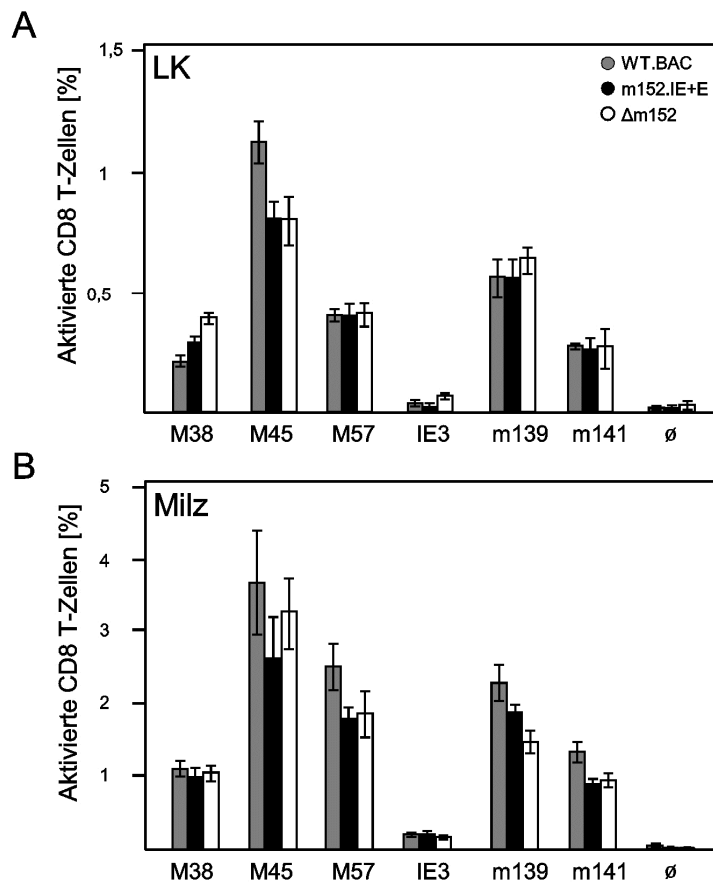


Abb. 4.19: Antivirale CD8 T-Zellantwort in Cross-Präsentations-defizienten Mäusen. 3d-Mäuse wurden intraplantar mit 1×10^5 PFU mCMV-WT.BAC (graue Balken), mCMV-m152.IE+E (schwarze Balken) oder mCMV- Δ m152 (leere Balken) infiziert. Nach 7 Tagen wurden CD8 T-Zellen aus einem Pool von je 3 LK (A) bzw. Milzen (B) immunomagnetisch isoliert und als Effektoren im ELISpot-Assay eingesetzt. Als APC wurden EL-4 Zellen (Haplotyp H-2^b), welche exogen mit dem jeweiligen Peptid (10^{-7} M) beladen wurden, verwendet. Als Kontrolle wurden unbeladene EL4-Zellen mitgeführt (\emptyset). Die Balken repräsentieren die durch lineare Regression bestimmten Frequenzen der IFN- γ -sezernierenden CD8 T-Zellen. Die Fehlerbalken stellen die 95% Konfidenzintervalle dar.

Fazit: Das mCMV-spezifische CD8 T-Zell-*Priming* ist sowohl bezüglich Frequenzhöhe als auch Frequenzmuster unabhängig von der *Cross*-Präsentation viraler Peptide. Die Modulation der m152-Expression hatte keinen Einfluss auf CD8 T-Zellantwort der 3d-Mäuse (Haplotyp H-2^b).

4.5.6 IFN γ -*Signalling* beeinflusst nicht die mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort im Haplotyp H-2^b

In den vorhergehenden Abschnitten konnte gezeigt werden, dass die m152-Expression in der IE- und E-Infektionsphase die CD8 T-Zellantwort im Haplotyp H-2^d unterdrückt, während kein Einfluss der m152-Expression auf die CD8 T-Zellantwort im Haplotyp H-2^b nachgewiesen werden konnte. In weiterführenden Experimenten sollte geklärt werden, welcher Mechanismus die Wirkung der Immunevasine im Haplotyp H-2^b aufhebt.

Es ist bekannt, dass neben der viralen Immunevasion auch Zytokine die Antigenpräsentation der Wirtszellen modulieren können (Geginat et al., 1997; Biron, 2001). Beispielsweise bewirkt IFN γ eine verstärkte Expression der MHC-I-Moleküle und induziert die Expression

von Genen, die für eine effiziente Antigenprozessierung benötigt werden, wie TAP, ERAAP und die Untereinheiten des Immunproteasoms.

In vitro wurde beobachtet, dass eine IFN γ -Vorbehandlung von Fibroblasten die Antigenpräsentation verbessert und bei nachfolgender Infektion die inhibitorischen Funktionen der Immunevasine außer Kraft setzt (Hengel et al. 1994; Fink et al., 2012). Es wird vermutet, dass unter Einfluss von IFN γ mehr pMHC-Komplexe gebildet werden als durch die viralen Immunevasionsproteine in der Zelle retendiert werden können. *In vivo* wird IFN γ hauptsächlich von T-Lymphozyten sowie NK-Zellen sezerniert und eine Antikörpervermittelte IFN γ -Depletion führt in immunsupprimierten, infizierten Mäusen zu einer reduzierten Kontrolle durch transferierte CD8 T-Zellen (Hengel et al., 1994). Zusätzlich konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass nach Infektion von B6-SAP-IFN- γ -Mäusen (H-2^b), welche hohen IFN γ -Serumleveln durch eine konstitutive IFN γ -Expression in der Leber aufweisen, die antivirale Effizienz einer transferierten CTL verbessert ist (Fink et al., 2012).

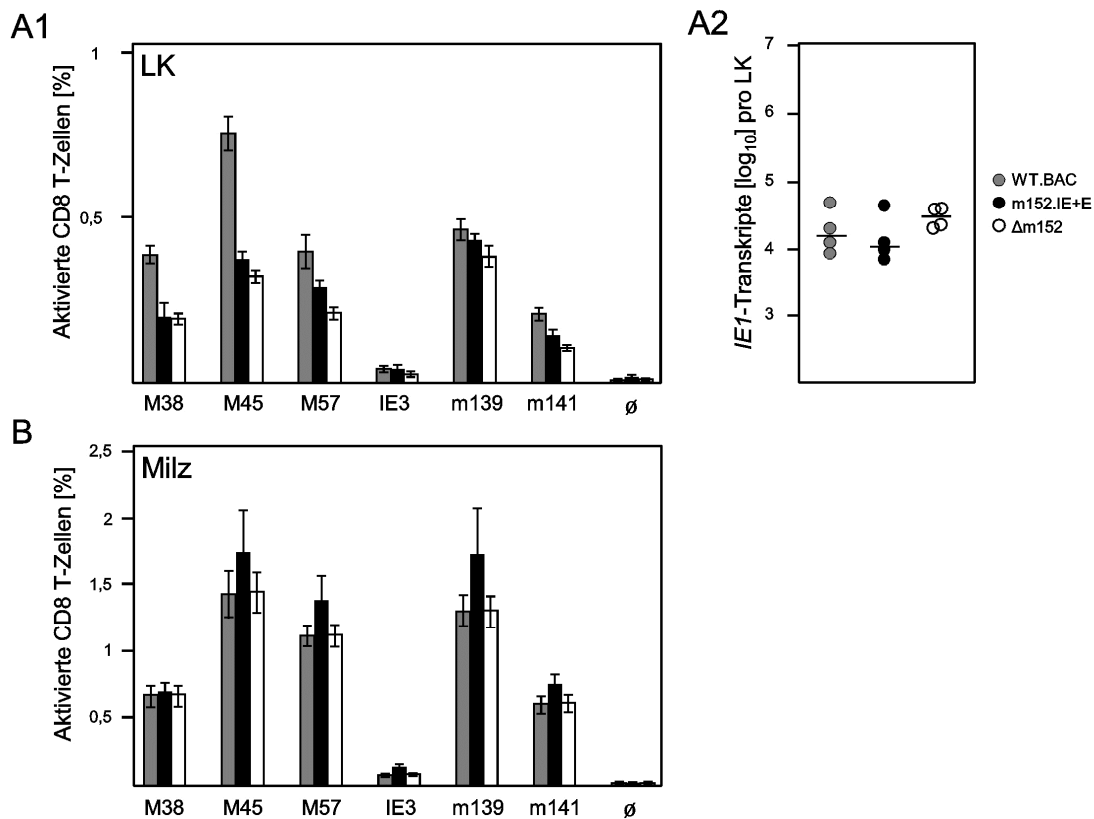


Abb. 4.20: Einfluss der IFN γ -Induktion auf die mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort. IFN γ R^{-/-}-Mäuse (Haplotyp H-2^b) wurden intraplantar mit 1×10^5 PFU mCMV-WT.BAC (graue Symbole), mCMV-m152.IE+E (schwarze Symbole) oder mCMV- Δ m152 (leere Symbole) infiziert. 3 Tage p.i. wurde von 4 Tieren pro Infektionsgruppe die RNA aus den poplitealen LK isoliert. Für die IE1-spezifische RT-qPCR wurden 500ng Gesamt-RNA eingesetzt (A2). Die horizontalen Linien geben die Mediane an. Zusätzlich wurden 7 Tage nach Infektion CD8 T-Zellen aus einem Pool von 3 LK (A1) oder Milzen (B1) immunomagnetisch isoliert und als Effektoren im ELISpot-Assay eingesetzt. Als APC wurden EL-4 Zellen (Haplotyp H-2^b) exogen mit dem angegebenen Peptid (10^{-7} M) beladen. Als Kontrolle wurden unbeladene EL4-Zellen mitgeführt (\emptyset). Die Balken repräsentieren die durch lineare Regression bestimmten Frequenzen der IFN- γ -sezernierenden CD8 T-Zellen. Die Fehlerbalken kennzeichnen die 95% Konfidenzintervalle.

Es stellte sich die Frage, ob eine IFN γ -Induktion nach mCMV-Infektion in immun-kompetenten C57BL/6-Mäusen die Wirkung der Immunevasine außer Kraft setzt. Dies könnte die fehlende Abhängigkeit der CD8 T-Zellantwort von der viralen Immunevasion im Haplotyp H-2^b erklären. Es war daher von Interesse, die mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort nach Infektion von C57BL/6-IFNGR^{-/-}-Mäusen (nachfolgend: IFNGR^{-/-}; Haplotyp H-2^b) zu bestimmen. In der transgenen IFNGR^{-/-}-Maus ist das für den IFN γ -Rezeptor kodierende Allel deletiert (Huang et al., 1993).

Nach intraplantarer Infektion von IFNGR^{-/-}-Mäusen mit WT.BAC, m152.IE+E oder Δ m152 wurde die mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort in Milz und LK mittels ELISpot-Assay quantifiziert.

Nach Infektion von IFNGR^{-/-}-Mäusen (Haplotyp H-2^b) mit m152.IE+E oder Δ m152 waren die CD8 T-Zellfrequenzen im drainierenden LK geringer als nach WT.BAC-Infektion (Abb. 4.20A1). Ausnahmen stellten die Spezifitäten IE3 und m139 dar. In der Milz waren die mCMV-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen in allen Infektionsgruppen vergleichbar (Abb. 4.20B). Tendenziell wurden nach m152.IE+E-Infektion für die Spezifitäten M45, M57 und m139 sogar höhere CD8 T-Zellfrequenzen als nach WT.BAC-Infektion nachgewiesen.

Die Quantifizierung der *IE1*-Transkripte im LK zeigte, dass die m152-Expression nach Infektion von IFNGR^{-/-}-Mäusen keinen Einfluss auf die virale Replikation hatte (Abb. 4.20A2).

Die virale Genexpression im LK kann daher nicht schlüssig mit den gemessenen CD8 T-Zellfrequenzen korreliert werden. Beispielsweise können geringere CD8 T-Zellfrequenzen im LK nach Δ m152-Infektion im Vergleich zur WT.BAC-Infektion nicht schlüssig erklärt werden.

Fazit: In Abwesenheit des IFN γ -*Signallings* beeinflusst die Expression des Immunevasins m152 weder die antivirale CD8 T-Zellantwort noch die virale Genexpression im LK.

4.6 Rolle der Immunevasion im syngenem KMT-Modell

Der Einfluss der m152-Expression auf die frühe CD8 T-Zellantwort im immunkompetenten Wirt wurde bereits ausführlich beschrieben (siehe 4.5). Es sollte weiterführend der Einfluss einer verstärkten Immunevasion im klinisch relevanten KMT-Modell mit anschließender Virusinfektion auf verschiedene Infektionsparameter analysiert werden. Im Gegensatz zum immunkompetenten Wirt, der die mCMV-Infektion effektiv kontrolliert (siehe Abb. 4.17), muss im KMT-Rezipienten zunächst die hämatopoetische Rekonstitution erfolgen, bevor die akute CMV-Infektion kontrolliert werden kann. In der KMT-Situation erfolgt die Kontrolle hauptsächlich durch mCMV-spezifische CD8 T-Zellen (Reusser et al., 1991; Podlech et al., 1998; 2000). Zusätzlich ist durch die nicht kontrollierte Virusdissemination in der Phase der hämatopoetischen Rekonstitution die virale Organ-Last im KMT-Rezipienten, im Vergleich zum immunkompetent infizierten Wirt, deutlich erhöht (Simon et al., 2006; Reddehase 2002).

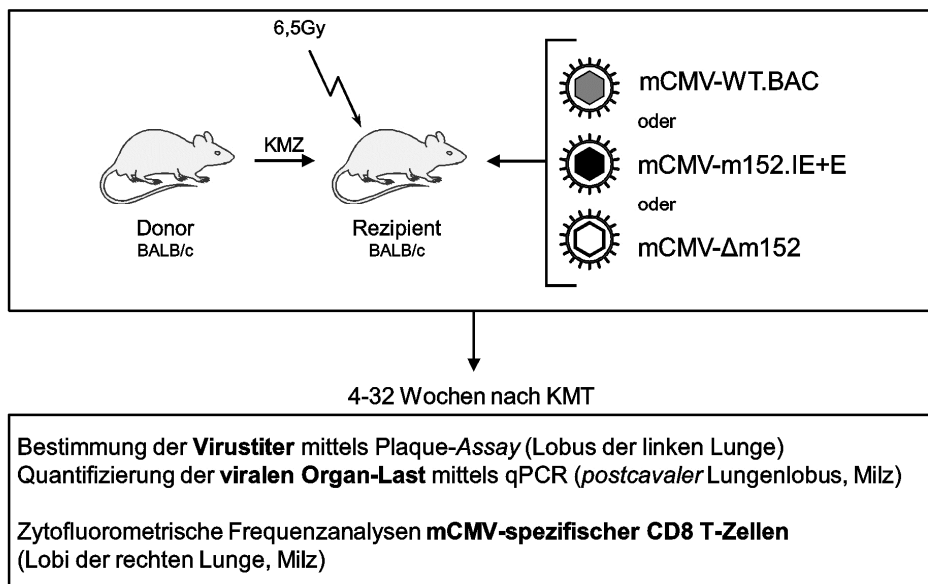


Abb. 4.21: Darstellung des syngenem KMT-Modells. BALB/c-Rezipienten wurden mit 6,5Gy bestrahlt und mit 5×10^6 syngenem Knochenmarkszellen (KMZ) rekonstituiert. Anschließend erfolgt die intraplantare Infektion mit 1×10^5 PFU der entsprechenden Viren. In einem Zeitraum zwischen 4-32 Wochen nach KMT und Infektion wurden die mCMV-spezifischen CD8 T-Zellen aus Milz und Lunge (3 Lobi der rechten Lunge) zytofluorometrisch analysiert. Der Infektionsverlauf wurde durch Bestimmung der Virustiter aus dem Lobus der linken Lunge und durch Quantifizierung viraler Genome mittels qPCR aus dem *postcavalen* Lungenlobus und der Milz bestimmt.

Von Böhm et al. (2009) konnte bereits gezeigt werden, dass in der Phase der Immunrekonstitution eine Infektion mit Δ Evasin deutlich effizienter kontrolliert wird als die WT.BAC-Infektion. Hierbei ist in Abwesenheit der Immunevasine sowohl die virale Organ-Last reduziert als auch die Geschwindigkeit der Terminierung der produktiven Infektion erhöht. Ein Einfluss der Immunevasine auf die antivirale CD8 T-Zellantwort konnte allerdings nicht festgestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, welchen Einfluss eine im Vergleich zum

WT.BAC verstärkte Immunevasion nach m152.IE+E-Infektion auf die virale Organ-Last, die Terminierung der produktiven Infektion und auf die Rekrutierung mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen in Milz und Lunge hat. Hierfür wurden BALB/c-Rezipienten zunächst mit 6,5Gy bestrahlt. Anschließend erfolgten der Transfer von Knochenmarkszellen zur immunologischen Rekonstitution sowie die intraplantare Infektion mit WT.BAC, m152.IE+E oder Δ m152 (siehe Abb. 4.21). Zu definierten Zeitpunkten nach KMT und Infektion wurden die Frequenzen der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellen aus Milz und Lunge zytofluorometrisch bestimmt und die CD8 T-Zellen phänotypisiert (siehe Abb. 4.23). Zusätzlich wurde die Kontrolle der Virusinfektion in der Lunge mittels Plaque-Assay verfolgt. Da die produktive Infektion bereits nach 8-12 Wochen kontrolliert ist (Holtappels et al., 1998), wurde zusätzlich die virale DNA-Load in Milz und Lunge mittels qPCR zu allen Zeitpunkten bestimmt (siehe 4.22).

4.6.1 Die Terminierung der produktiven WT.BAC- oder m152.IE+E-Infektion verläuft im KMT-Rezipienten vergleichbar

In vorangegangenen Experimenten konnte nach m152.IE+E-Infektion von immunkompetenten BALB/c-Mäusen gezeigt werden, dass die m152-Expression in der IE- und E-Phase eine effiziente CD8 T-Zellkontrolle der Infektion unterdrückt. Dies führt im drainierenden LK zu einer erhöhten viralen Genexpression (Abb. 4.17A und B).

Im KMT-Modell erfolgt die Kontrolle der Infektion nicht wie im immunkompetenten Tier unmittelbar nach der Infektion, sondern ist durch die immunologische Rekonstitution verzögert. Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob die m152.IE+E-Infektion effizient von rekonstituierten CD8 T-Zellen kontrolliert werden kann oder ob möglicherweise durch die verstärkte m152-Expression eine persistierende Infektion im KMT-Rezipienten induziert wird. Hierfür wurden 4, 6, 8, 14, 20 und 26 Wochen nach KMT und Infektion mit WT.BAC, m152.IE+E oder Δ m152 von jeweils 5 Tieren pro Gruppe die Virustiter in der Lunge (linker Lobus) mittels Plaque-Assay quantifiziert (siehe 3.2.2.2). Um nach Kontrolle der produktiven Infektion den Einfluss der verstärkten Immunevasion nach m152.IE+E-Infektion auf die latente virale Genomlast zu ermitteln, wurde diese zusätzlich in Milz und Lunge mittels qPCR (siehe 3.3.13.1) bestimmt.

Überraschenderweise waren die Virustiter in der Lunge nach Infektion mit WT.BAC oder m152.IE+E über den gesamten Analysezeitraum vergleichbar (Abb 4.22 A). Nach einem Maximum der viralen Replikation kommt es 8 Wochen nach KMT zu einer deutlichen Reduktion der Virustiter in der Lunge. Dies korreliert mit dem Nachweis infiltrierender, mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen und markiert das Einsetzen der immunologischen Kontrolle (vergl. Abb. 4.24). Wie zu erwarten, waren nach Δ m152-Infektion die Virustiter in der Lunge zu allen Zeitpunkten geringer als nach WT.BAC-Infektion, da die immunologische Kontrolle, wie schon für die Infektion mit Δ Evasin publiziert wurde (Böhm et al., 2009), effizienter verläuft. 14 Wochen nach KMT war in keiner der Infektionsgruppen noch produktive Infektion nachweisbar. Die hier erhobenen Daten zur immunologischen Kontrolle

der mCMV-Infektion im KMT-Modell stimmen mit den bereits publizierten Daten überein (vergleiche Holtappels et al., 1998; Böhm et al., 2009).

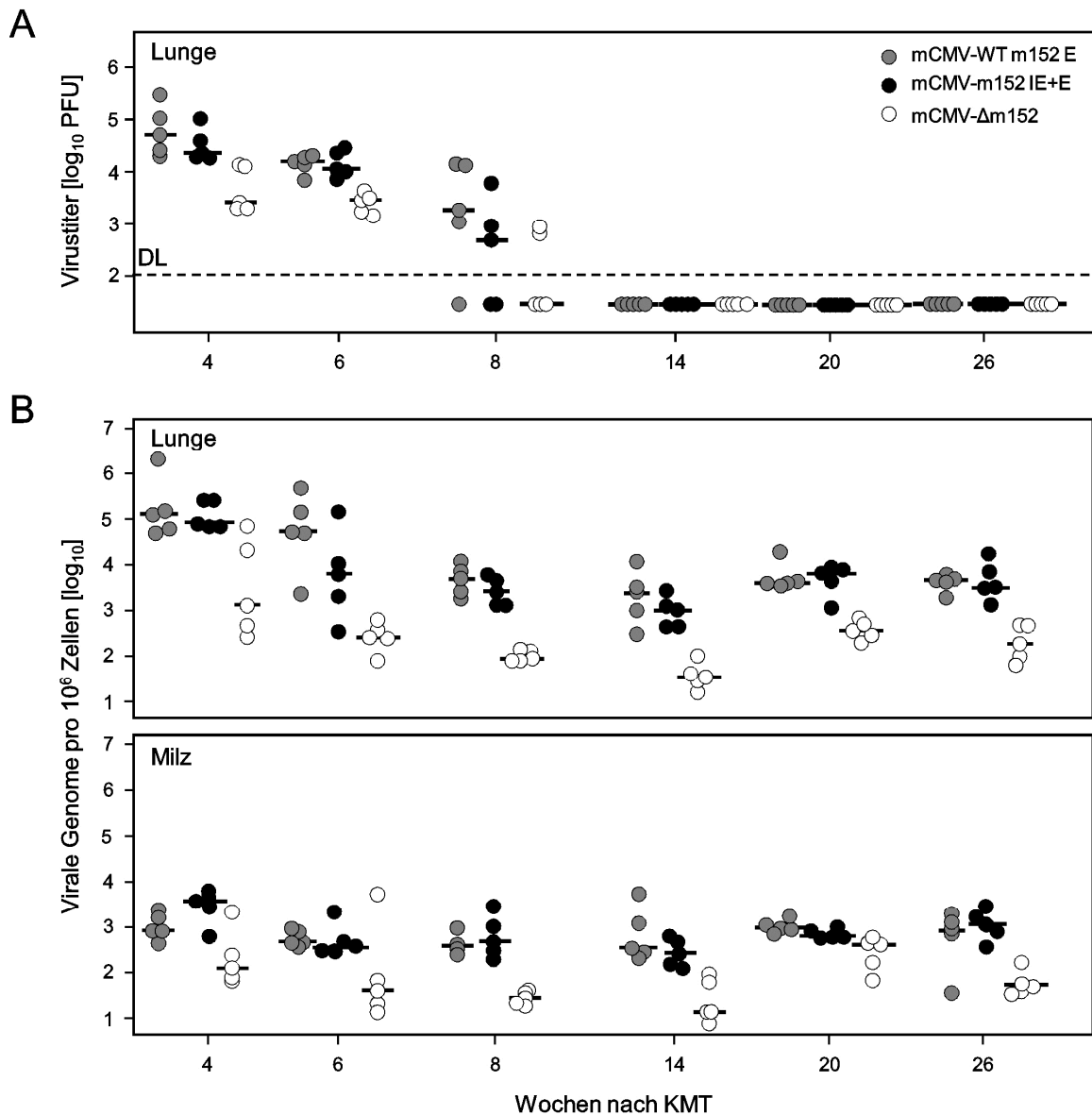


Abb. 4.22: Immunologische Kontrolle der Primärinfektion und Latenzetablierung nach experimenteller KMT. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach KMT und Infektion mit den Viren WT.BAC (graue Symbole), m152.IE+E (schwarze Symbole) oder Δ m152 (leere Symbole) wurden von 5 Tieren pro Gruppe Milz und Lunge entnommen. A) Virustiter in der Lunge (linker Lobus). Der Virustiter wurde mittels Plaque-Assay aus Organhomogenaten bestimmt. B) Virale Genom-Last in Zielorganen von mCMV. Die Quantifizierung der viralen Genome erfolgte mittels *M55/gB*-spezifischer qPCR aus Lunge (*postcavalis* Lobus) und Milz. Eine Normierung auf 1×10^6 Zellen erfolgte mittels Quantifizierung des zellulären *pthrp*-Gens. Symbole repräsentieren unabhängige Einzeltierbestimmungen. Der dazugehörige Median ist als horizontale Linie eingezeichnet. Die unterbrochene Linie markiert das Detektionslimit (DL) des Plaque-Assays.

Die virale Genom-Last in der Lunge war während der produktiven WT.BAC- oder m152.IE+E-Infektion von KMT-Rezipienten vergleichbar (ca. 100.000 Genome pro 10^6 Zellen). Nach dem Einsetzen der immunologischen Kontrolle reduzierte sich die virale Last in der Lunge auf 2.000-10.000 Genome/ 10^6 Zellen und blieb im Zeitraum von 8 bis 26 Wochen nach KMT konstant (Abb 4.22 B). Im Vergleich dazu lag die virale Last in der Milz nach

Infektion mit WT.BAC und m152.IE+E zu allen Analysezeitpunkten bei 1.000 Genome/10⁶ Zellen, war somit deutlich geringer als in der Lunge und blieb über den gesamten Analysezeitraum konstant. Wurden KMT-Rezipienten mit Δ m152 infiziert, wurde, wie bereits gezeigt, die Infektion in Milz und Lunge effizienter kontrolliert, was zu einer deutlichen Reduktion der viralen Last in den Organen führte (Abb 4.22 B).

Fazit: Nach m152-Expression in der IE- und E-Phase oder alleiniger Expression in der E-Phase erfolgte die Kontrolle der Infektion nach experimenteller KMT und endogener Rekonstitution mit einer vergleichbaren Kinetik. Auch die virale Genomlast in Milz und Lunge wurde durch die verstärkte m152-Expression nicht beeinflusst.

4.6.2 Die m152-Expression reduziert die Rekrutierung antiviraler CD8 T-Zellen in Lunge und Milz nach Infektion von KMT-Rezipienten

Wie gezeigt, reduziert die im Vergleich zum WT.BAC verstärkte Immunevasion m152.IE+E-infizierter Zellen die antivirale CD8 T-Zellantwort im Haplotyp H-2^d (siehe Abb. 4.14 und 4.16). Daher sollte der Einfluss der m152-Expression in der IE- und E-Phase der Infektion auf die Rekrutierung antiviraler CD8 T-Zellen in Milz und Lunge nach KMT geklärt werden. Zu diesem Zweck wurde die antivirale CD8 T-Zellantwort nach Infektion mit WT.BAC, m152.IE+E oder Δ m152 während der hämatopoetischen Rekonstitution der KMT-Rezipienten zytofluorometrisch verfolgt.

4.6.2.1 Zytofluorometrische Phänotypisierung IE1-spezifischer CD8 T-Zellen

Mit Hilfe von pMHC-I-Multimeren (Dextramere, Immudex, siehe 2.1.9.3) wurden mCMV-spezifische CD8 T-Zellen von Lymphozyten aus Milz oder Lunge zytofluorometrisch quantifiziert (siehe 3.8.3.1). Diese Methode liefert die Frequenzen Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen in einer Zellpopulation ohne zusätzlichen Stimulus und ermöglicht eine Phänotypisierung der Zellen. Für eine Phänotypisierung wurde das *L-selectin* (CD62L) und *killer-cell lectin receptor G1* (KLRG1) Expressionsmuster der Multimer-positiven CD8 T-Zellen bestimmt. Die Analyse der CD62L-Expression ermöglicht eine Unterscheidung zwischen *Central Memory* und *Effector Memory* CD8 T-Zellen. KLRG1 wird auf terminal differenzierten, nicht-proliferierenden CD8 T-Zellen exprimiert (Ibegbu et al., 2005; Thimme et al., 2005). Die Differenzierung der CD8 T-Zellsubpopulationen folgt dem von Obar und Lefrançois (2010b) beschriebenen Schema.

Um zusätzlich eine Effektorfunktion von aktivierten CD8 T-Zellen zu bestimmen, erfolgte die Quantifizierung von IFN γ -produzierenden CD8 T-Zellen nach Stimulation mit synthetischem Peptid.

Exemplarisch ist die zytofluorometrische Vierfarbenanalyse der pulmonalen, IE1-spezifischen CD8 T-Zellen 8 Wochen nach KMT und WT.BAC-Infektion in Abb. 4.23 dargestellt. Die Färbung erfolgte mit dem IE1-L^d-Dextramer (siehe 2.1.9.3) sowie

spezifischen Antikörpern gegen CD8a, CD62L sowie KLRG1 (siehe 2.1.9.2). Für die Quantifizierung IFN γ -produzierender CD8 T-Zellen nach IE1-Peptidstimulation erfolgte die Oberflächenfärbung mit CD8a-, CD62L- und KLRG1-spezifischen Antikörpern, gefolgt von einer intrazellulären IFN γ -Färbung (siehe 3.8.3.2).

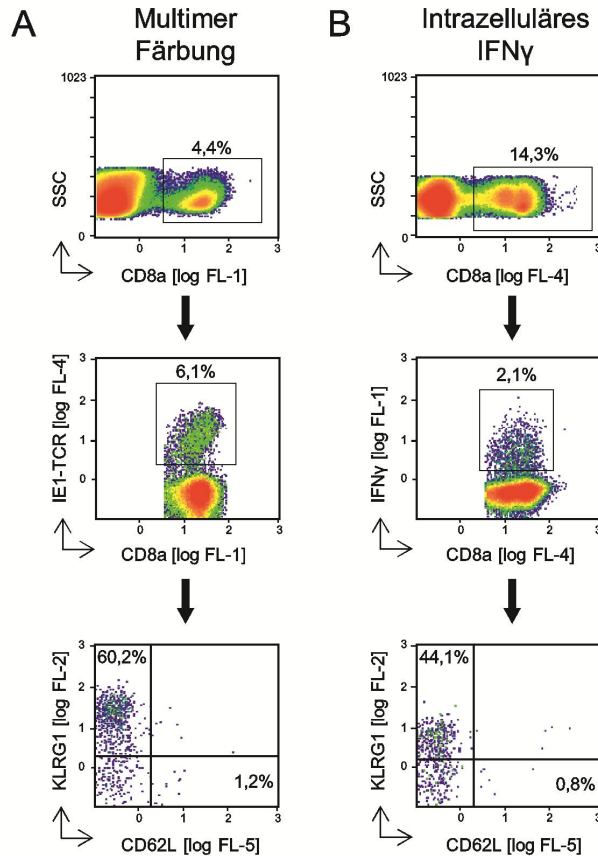


Abb. 4.23: Zytofluorometrische Analyse IE1-spezifischer CD8 T-Zellen.

A) Darstellung IE1-spezifischer CD8 T-Zellen mittels pMHC-Multimer Färbung. 8 Wochen nach KMT und Infektion mit WT.BAC (siehe 3.6.4) wurden die pulmonalen Lymphozyten aus einem Pool von 3 Lungen (siehe 3.7.1) aufgereinigt und in einer Vierfarbenanalyse (Marker: CD8a, Multimer (IE1-Dextramer), CD62L und KLRG1) eingesetzt. Obere Reihe, *Side Scatter* (SSC, lineare Darstellung) gegen CD8a-Expression (log FL-1, FITC). Ein elektronisches *Gate* wurde auf die CD8a-positiven Zellen eingestellt. Mittlere Reihe, der prozentuale Anteil IE1-Peptid spezifischer Zellen unter den CD8a-positiven T-Zellen wurde durch Färbung mit dem IE1-TCR-spezifischen Multimer bestimmt (log FL-4, APC). Untere Reihe, Expression der Aktivierungsmarker CD62L (log FL-5, PE-Cy7) und KLRG1 (log FL-2, PE) unter den Zellen im CD8a-positiven IE1-TCR-positiven *Gate*. B) Darstellung IE1-spezifischer CD8 T-Zellen mittels intrazellulärer IFN γ -Färbung. 8 Wochen nach KMT und Infektion mit WT.BAC wurden 10^6 Lymphozyten aus einem Pool von 3 Lungen für 5h mit synthetischem IE1-Peptid (10^{-6} M) kultiviert und für die Vier-Farben-Analyse verwendet (Marker:

Oberflächenfärbung: CD8a, KLRG1, CD62L; intrazellulär: IFN γ). Obere Reihe, *Side Scatter* (SSC, lineare Darstellung) gegen CD8a-Oberflächenexpression (log FL-4, PE-Cy5). Ein elektronisches *Gate* wurde auf die CD8a-positiven Zellen gesetzt. Mittlere Reihe, der prozentuale Anteil IFN γ -positiver Zellen unter den CD8a-positiven Zellen wurde durch intrazelluläre IFN γ -Färbung bestimmt (log FL-1, FITC). Untere Reihe, Analyse der CD62L (log FL-5, PE-Cy7) und KLRG1 (log FL-2, PE) Oberflächenexpression unter den CD8a-positiven, IFN γ -positiven Zellen.

In der pulmonalen Lymphozytenpopulation wurden 8 Wochen nach KMT und Infektion mit WT.BAC 4,4% CD8a-positive Zellen detektiert, davon waren 6,1% IE1-TCR-positiv. Bei den IE1-spezifischen CD8 T-Zellen handelte es sich mit einer Majorität von 60,2% um terminal-differenzierte *Short Lived Effector Cells* (SLEC, KLRG1^{high}CD62L^{low}).

Nach IE1-Peptidstimulation wurden in der pulmonalen Lymphozytenpopulation 14,3% CD8a-positive Zellen detektiert. In der Gesamtheit aller CD8a-positiven Zellen produzierten 2,1% nach IE1-Peptidstimulation IFN γ . Die Majorität der IFN γ -produzierenden CD8 T-Zellen zeigten einen SLEC-Phänotyp.

4.6.2.2 m152 unterdrückt die Rekrutierung antiviraler CD8 T-Zellen in Milz und Lunge

Um den Einfluss einer verstärkten m152-Expression auf die Rekonstitution antiviraler CD8 T-Zellen nach KMT aufzuklären, erfolgte die zytofluorometrische Quantifizierung der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellen (siehe Abb. 4.23) 4, 8, 12, 16, 24 und 32 Wochen nach KMT und Infektion mit WT.BAC, m152.IE+E oder Δ m152. Für die zytofluorometrische Analyse erfolgte die Färbung von Lymphozyten aus Milz und Lunge mittels IE1-L^d- oder m164-D^d-Multimeren sowie spezifischen Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD8a, CD62L sowie KLRG1. In Abb. 4.24A wurde der prozentuale Anteil der CD8a-positiven Zellen aus Milz und Lunge aus dem *Lymphozytengate* im Verlauf der Infektion dargestellt. Hierbei lag der Anteil CD8a-positiver Zellen in der Milz zu allen Analysezeitpunkten um 3% und war nach Infektion mit WT.BAC, m152.IE+E oder Δ m152 vergleichbar. Dem gegenüber lag der Anteil CD8a-positiver Zellen in der infizierten Lunge 4 Wochen nach KMT und mCMV-Infektion bei 20-35%, sank daraufhin ab und schwankte im weiteren Verlauf um 5-10 %. Ein Einfluss der m152-Expression auf die Rekrutierung CD8a-positiver Zellen konnte weder in der Lunge noch in der Milz nachgewiesen werden.

Die Quantifizierung der IE1-L^d- bzw. m164-D^d-Multimer-positiven unter den CD8a-positiven Zellen (siehe Abb. 4.24B) zeigte, dass nach Δ m152-Infektion von KMT-Rezipienten der Anteil IE1- bzw. m164-spezifischer CD8 T-Zellen sowohl in der Lunge als auch in der Milz deutlich höher war als nach WT.BAC-Infektion. Eine Ausnahme stellte Woche 24 und 32 nach KMT dar.

In der m152.IE+E-infizierten Lunge wurden deutlich weniger IE1-spezifische CD8 T-Zellen nachgewiesen als nach WT.BAC-Infektion. Allerdings war in der Milz der Anteil m164- bzw. IE1-Multimer-positiver CD8 T-Zellen nach Infektion mit WT.BAC oder m152-IE+E vergleichbar. Daher wurde die zytofluorometrische Vierfarbenanalyse 8 Wochen nach KMT und Infektion exemplarisch in der Milz wiederholt. Zusätzlich ermöglicht die unabhängige Messung von 5 Tieren pro Infektionsgruppe (siehe Abb. 4.25) eine statistische Auswertung. Die Analyse zeigte, dass im Vergleich zur WT.BAC-Infektion der prozentuale Anteil IE1-spezifischer CD8 T-Zellen nach m152.IE+E-Infektion signifikant reduziert ($P=0,0049$) bzw. nach Δ m152-Infektion signifikant erhöht war ($P=0,0013$).

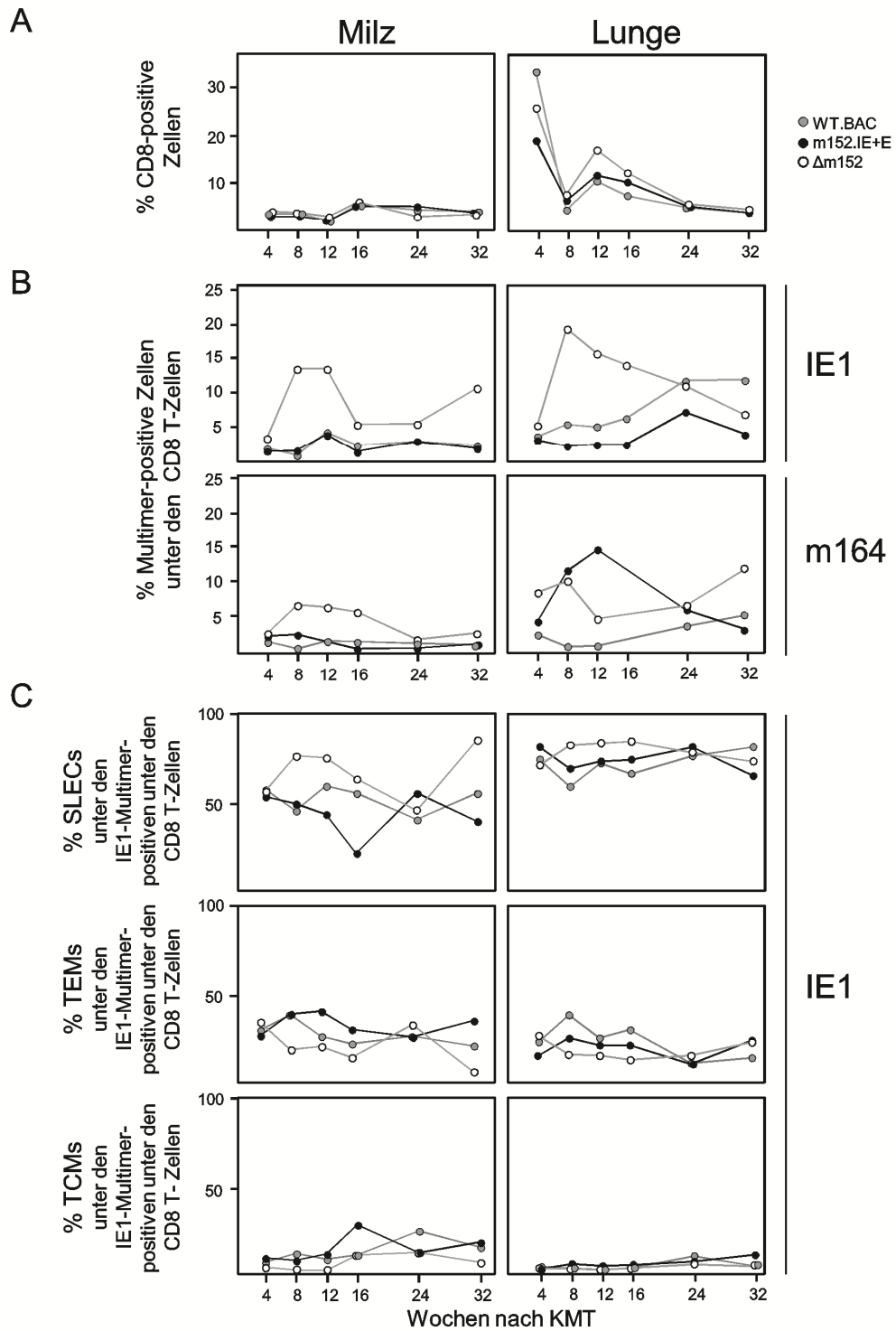


Abb. 4.24 Kinetik der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort nach experimenteller KMT und Infektion. KMT-Rezipienten wurden intraplantar mit 1×10^5 PFU WT.BAC (graue Symbole), m152.IE+E (schwarze Symbole) oder $\Delta m152$ (leere Symbole) infiziert (siehe Abb. 4.21). Zu den dargestellten Zeitpunkten wurde jeweils aus einem Pool von 3 Milzen bzw. Lungen eine Einzelzellsuspension hergestellt und diese für die zytofluorometrische Analyse verwendet. Die Zellpopulationen wurden mittels Vierfarbenanalyse wie unter 4.23 A beschrieben identifiziert. A) Darstellung der CD8a-positiven Zellen aus dem *Lymphozytengate*. B) Prozentualer Anteil der IE1- bzw. m164-TCR-positiven Zellen unter den CD8a-positiven Zellen. C) Prozentualer Anteil der IE1-TCR-positiven SLEC ($KLRG1^{high}CD62L^{low}$), TEM ($KLRG1^{low}CD62L^{low}$) und TCM ($KLRG1^{low}CD62L^{high}$) unter den IE1-TCR-positiven Zellen.

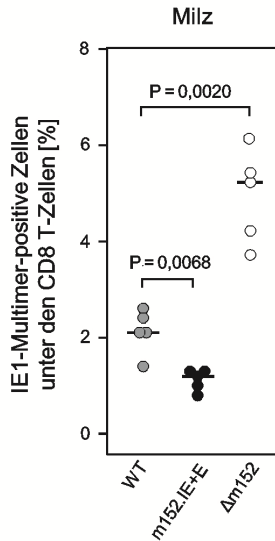


Abb. 4.25: Frequenzen IE1-spezifischer CD8 T-Zellen in der Milz nach experimenteller KMT und Infektion. Immunsupprimierte KMT-Rezipienten wurden intraplantar mit 1×10^5 PFU WT.BAC (graue Symbole), m152.IE+E (schwarze Symbole) oder Δ m152 (leere Symbole) infiziert (siehe Abb. 4.21). 8 Wochen nach KMT wurden aus jeweils 5 Milzen pro Infektionsgruppe unabhängige Einzelzellsuspensionen hergestellt und zytofluorometrisch analysiert. Die Zellpopulationen wurden mittels Vierfarbenanalyse wie unter 4.23 A beschrieben identifiziert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der IE1-TCR-positiven Zellen unter den CD8a-positiven Zellen. Die Symbole repräsentieren unabhängige Einzeltiermessungen. Die Mediane sind als Balken eingetragen. Die angegebenen P-Werte wurden mit dem ungleichen Varianz t-Test (Welch-Test) ermittelt [<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/?Format=C>].

Um einen möglichen Einfluss der m152-Expression und der damit einhergehenden Reduktion der Antigenpräsentation infizierter Zellen auf den Aktivierungsphänotyp der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellen zu untersuchen, erfolgte eine Differenzierung der CD8 T-Zellsubpopulationen in SLEC ($\text{KLRG1}^{\text{high}}\text{CD62L}^{\text{low}}$), TEM ($\text{KLRG1}^{\text{low}}\text{CD62L}^{\text{low}}$) und TCM ($\text{KLRG1}^{\text{low}}\text{CD62L}^{\text{high}}$) (Obar und Lefrançois, 2010a;b). Exemplarisch ist diese Phänotypisierung für die IE1-spezifischen CD8 T-Zellen in Lunge und Milz im longitudinalen Verlauf nach KMT und Infektion dargestellt (Abb. 4.24C).

Bei der Majorität IE1-spezifischer CD8 T-Zellen aus Milz und Lunge handelte es sich um SLEC ($\text{KLRG1}^{\text{high}}\text{CD62L}^{\text{low}}$). Dies stimmt mit den Beobachtungen von Thimme et al. (2005) überein, da virus-spezifische SLEC hauptsächlich nach persistierender Stimulation mit viralen Antigenen, wie es nach CMV-Infektion der Fall ist, nachgewiesen wurden. Auch Synder und Kollegen konnten zeigen, dass der mCMV-spezifische *Memory* CD8 T-Zellpool primär aus SLEC gebildet wird (Snyder et al., 2009).

Weiter lässt sich feststellen, dass der Anteil IE1-spezifischer TCM in der Milz deutlich höher war als in der Lunge. Auch dies ist nicht überraschend, da TCM hauptsächlich in sekundären lymphatischen Organen wie LK und Milz lokalisiert sind.

Nach Δ m152-Infektion war der Anteil IE1-spezifischer SLEC in der Milz über den gesamten Analysezeitraum höher als nach WT.BAC-Infektion. Auch in der Δ m152-infizierten Lunge waren 8 bis 16 Wochen nach KMT mehr IE1-spezifische SLEC nachweisbar als nach WT.BAC-Infektion. In der m152.IE+E- oder WT.BAC-infizierten Lunge war der Anteil IE1-spezifischer SLEC zu allen Zeitpunkten vergleichbar.

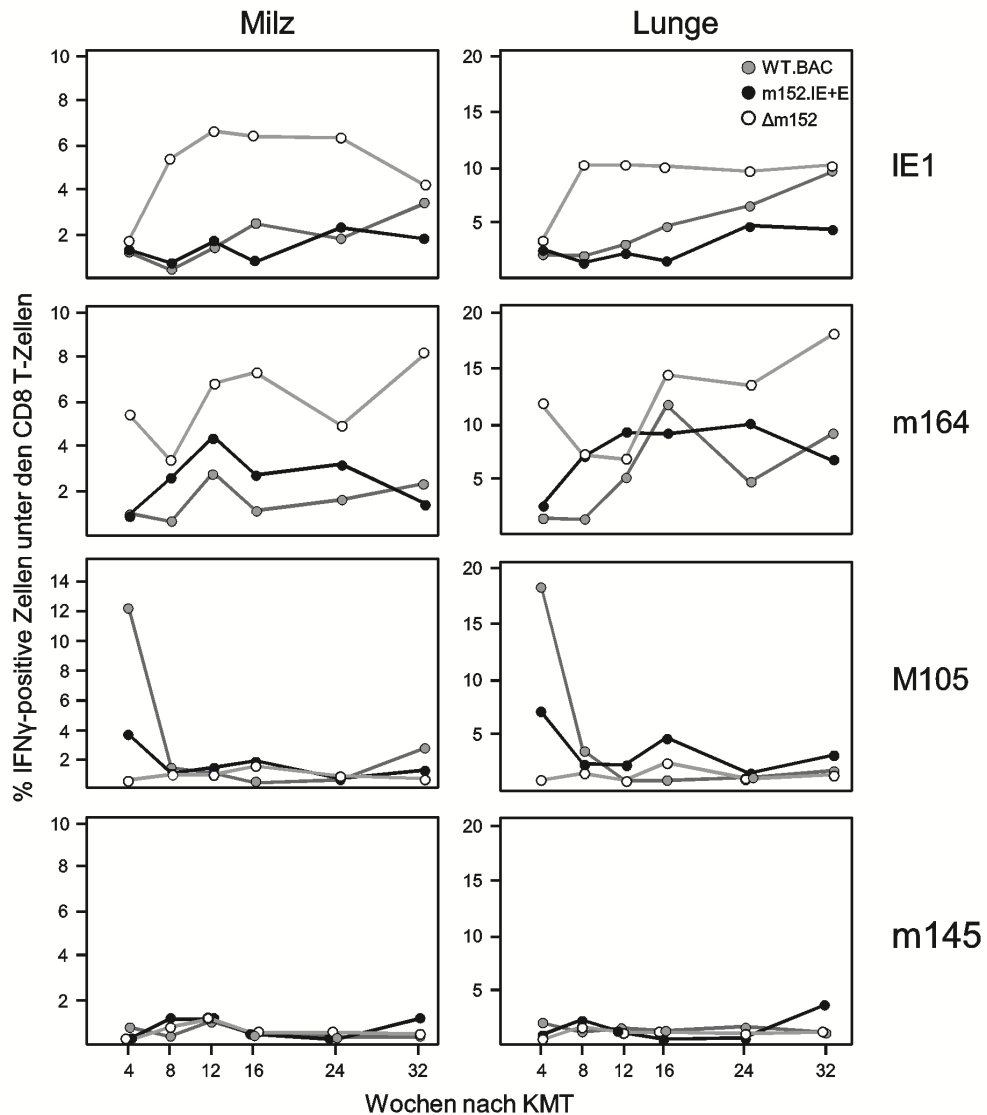


Abb. 4.26: Kinetik mCMV-spezifischer CD8 T-Zellfrequenzen nach experimenteller KMT und Infektion. Die Frequenzen der IFN γ -positiven, Epitop-spezifischen CD8 T-Zellen wurden nach KMT und Infektion mit WT.BAC (graue Symbole), m152.IE+E (schwarze Symbole) oder Δ m152 (leere Symbole) zytofluorometrisch quantifiziert. Zu den dargestellten Zeitpunkten wurden 10^6 Milzzellen oder pulmonale Lymphozyten aus einem Pool von je 3 Organen isoliert, mit den angegebenen, synthetischen Peptiden (10^{-6} M) für 5h co-kultiviert und anschließend für die unter Abb. 4.23B beschriebene Vierfarbenanalyse eingesetzt. Dargestellt sind die IFN γ -positive Zellen unter der gesamten CD8a-positiven Zellpopulation.

Um zusätzlich eine Effektorfunktion der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellen zu erfassen, erfolgte parallel zur MHC-I-Multimerfärbung die zytofluorometrische Quantifizierung der IFN γ -produzierenden CD8 T-Zellen nach Stimulation mit synthetischen mCMV-spezifischen Peptiden. Die Ergebnisse bestätigen eine verbesserte Rekrutierung IE1- bzw. m164-spezifischer CD8 T-Zellen in die Δ m152-infizierte Lunge und Milz (Abb. 4.26). Während die m152.IE+E-Infektion die Rekrutierung IE1-spezifischer CD8 T-Zellen unterdrückte, wurde die Rekrutierung von m164-spezifischen CD8 T-Zellen in Milz und Lunge eher begünstigt. Die Frequenzen der Spezifitäten M105 und m145 wurden im longitudinalen Verlauf nach

KMT und Infektion weder von der m152-Deletion noch von der verstärkten m152-Expression beeinflusst.

Fazit: In Abwesenheit von m152 wurde nach Infektion von KMT-Rezipienten eine erhöhte Anzahl an IE1- bzw. m164-spezifischen SLEC in Milz und Lunge rekrutiert. Nach verstärkter m152-Expression war die Rekrutierung IE1-spezifischer CD8 T-Zellen vermindert.

4.7 Die Antigenpräsentation infizierter, nicht-hämatopoetischer Gewebszellen führt zur Rekrutierung antiviraler CD8 T-Zellen

In der vorliegenden Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass nach Infektion von KMT-Rezipienten die m152-Expression die Rekrutierung IE1-spezifischer CD8 T-Zellen in die Lunge unterdrückte. In Abwesenheit von m152 wurden höhere Frequenzen pulmonaler IE1-spezifischer CD8 T-Zellen nachgewiesen, während nach verstärkter m152-Expression die Rekrutierung IE1-spezifischer CD8 T-Zellen vermindert war. Da die Frequenzen der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellen durch das virale Immunevasin m152 moduliert wurden, ließ dies vermuten, dass die Rekrutierung virus-spezifischer CD8 T-Zellen durch die MHC-I-Präsentation viraler antigener Peptide auf infizierten Zellen und nicht durch *Cross-Präsentation* auf nicht-infizierten DCs bestimmt wird.

Es ist bekannt, dass für das initiale CD8 T-Zell-*Priming* die Interaktion naiver CD8 T-Zellen mit hämatopoetischen profAPCs in lymphatischen Organen notwendig ist (zur Übersicht: Yewdell, 2010). Im Gegensatz dazu sind *geprimte* Effektor T-Zellen nicht mehr strikt auf Kostimulation durch hämatopoetische profAPCs angewiesen. Daher ist eine Restimulation *geprimter* CD8 T-Zellen durch die Antigenpräsentation auf diversen Zelltypen möglich (Sigal et al., 1999), wie beispielsweise APCs nicht-hämatopoetischen Ursprungs. In einer aktuellen Publikation unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die Rekrutierung von CD8 T-Zellen in die latent infizierte Lunge von der Antigenpräsentation auf nicht-hämatopoetischen, parenchymalen Zellen abhängt (Seckert et al., 2011). Hierfür wurden folgende KM-Chimären verwendet: bestrahlte H-2^{dm2}-Mäuse wurden mit BALB/c-KMZ rekonstituiert (H-2d χ dm2) und anschließend mit WT.BAC infiziert. Da die nicht-hämatopoetischen Rezipienten-Zellen der H-2d χ dm2-Chimäre das MHC-I L^d-Molekül nicht exprimieren, kann das virale, L^d-präsentierte IE1-Peptid ausschließlich von hämatopoetischen Donorzellen präsentiert werden (siehe Abb. 4.27). Als Kontrolle erfolgte der syngene Transfer von BALB/c-KMZ in bestrahlte BALB/c-Rezipienten (H-2d χ d) mit anschließender Infektion. Dieses etablierte Modell wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet, um aufzuklären, ob die Rekrutierung IE1-spezifischer CD8 T-Zellen in die Lunge von der Antigenpräsentation auf hämatopoetischen oder nicht-hämatopoetischen Zellen bestimmt wird. Im Gegensatz zu der Arbeit von Seckert und Kollegen (2011), erfolgte die Analyse der IE1-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen der KM-Chimäre und Homochimäre nach Infektion mit WT.BAC, m152.IE+E oder Δ m152.

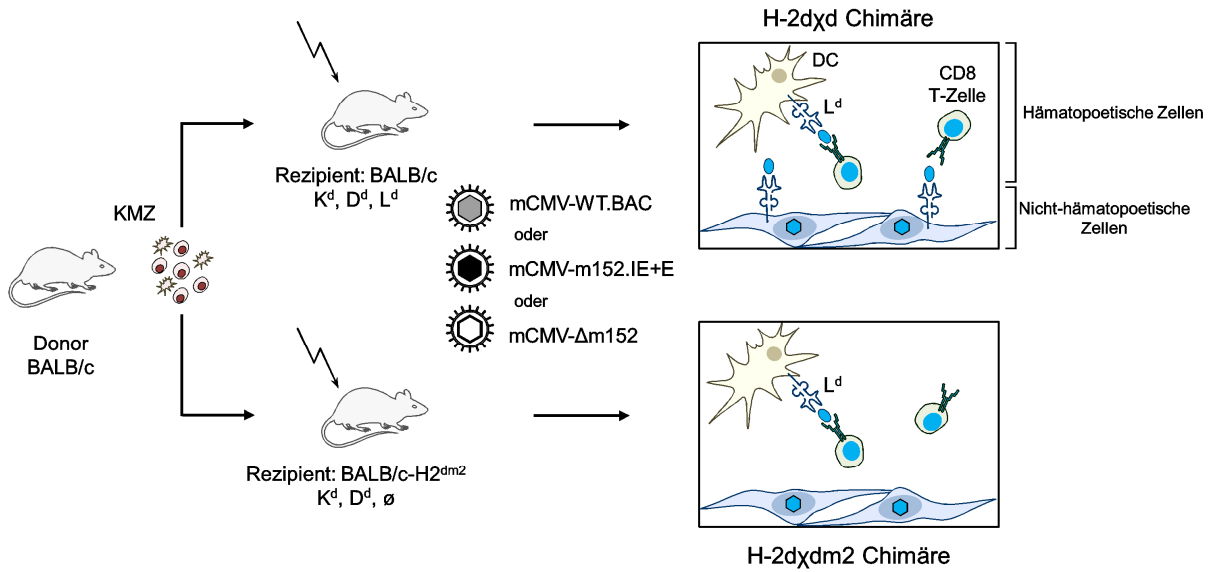


Abb. 4.27: Modell der Generierung und Infektion von KM-Chimären. Durch γ -Bestrahlung immunsupprimierte BALB/c- oder H-2^{dm2}-Mäuse wurden mit 5×10^6 BALB/c-KMZ rekonstituiert. Anschließend erfolgt eine intraplantare Infektion mit 1×10^5 PFU der angegebenen Viren. Da die nicht-hämatopoetischen Rezipientenzellen der H-2xdm2-Chimäre (untere Abb.) das MHC-I L^d-Molekül nicht exprimieren, wird das L^d-restringierte IE1-Epitop (hellblau) ausschließlich von den hämatopoetischen Spenderzellen präsentiert. Dem gegenüber kann in der H-2xd-Homochimären (obere Abb.) das IE1-Epitop von Rezipienten- und Spenderzellen präsentiert werden.

Die Quantifizierung der pulmonalen, IE1-spezifischen CD8 T-Zellen erfolgte 8 und 22 Wochen nach KMT zytofluorometrisch mittels MHC-I-Multimerfärbung (siehe Abb. 4.23). Die Ergebnisse der zytofluorometrischen Analysen sind in Abb. 4.28 zusammengefasst.

Wie erwartet wurden 8 Wochen nach KMT und Infektion der H-2xd-Chimären vermehrt IE1-spezifische SLEC in die Δm152-infizierte Lunge rekrutiert, während nach m152.IE+E-Infektion die Rekrutierung IE1-spezifischer SLEC vermindert war. Demgegenüber waren in den infizierten Lungen der H-2xdm2-Chimäre, deutlich weniger IE1-spezifische CD8 T-Zellen in allen Infektionsgruppen nachweisbar. Da in der H-2xdm2-Chimäre die Präsentation des IE1-Peptids nur auf hämatopoetischen Zellen erfolgt, impliziert dies, dass auch für eine effektive Rekrutierung virus-spezifischer CD8 T-Zellen in der frühen Infektionsphase eine Antigenpräsentation auf infizierten nicht-hämatopoetischen Zellen stattfinden muss. Auffällig war außerdem, dass in der H-2xdm2-Chimäre die höchste Anzahl IE1-spezifischer SLEC nach Δm152-Infektion nachgewiesen werden konnte. Nach Infektion mit WT.BAC oder m152.IE+E war der Anteil an SLEC und TEM in der Population der IE1-spezifischen CD8 T-Zellen vergleichbar.

Zum Zeitpunkt 22 Wochen nach KMT und Infektion waren die Frequenzen der pulmonalen, IE1-spezifischen CD8 T-Zellen in den H-2xd-Homo-Chimären deutlich höher als 8 Wochen nach der Infektion. Die vermehrte Rekrutierung antiviraler CD8 T-Zellen in die latent infizierte Lunge konnte bereits von Holtappels et al. (1998) gezeigt werden. Es wird postuliert, dass die stochastische Expression des ie1-Transkriptes in latent infizierten Lungenzellen die

MHC-I-Präsentation des IE1-Peptids und somit eine kontinuierliche Restimulation pulmonaler, IE1-spezifischer CD8 T-Zellen induziert (Kurz et al., 1999; Holtappels et al., 2000a; zur Übersicht: Seckert et al., 2013).

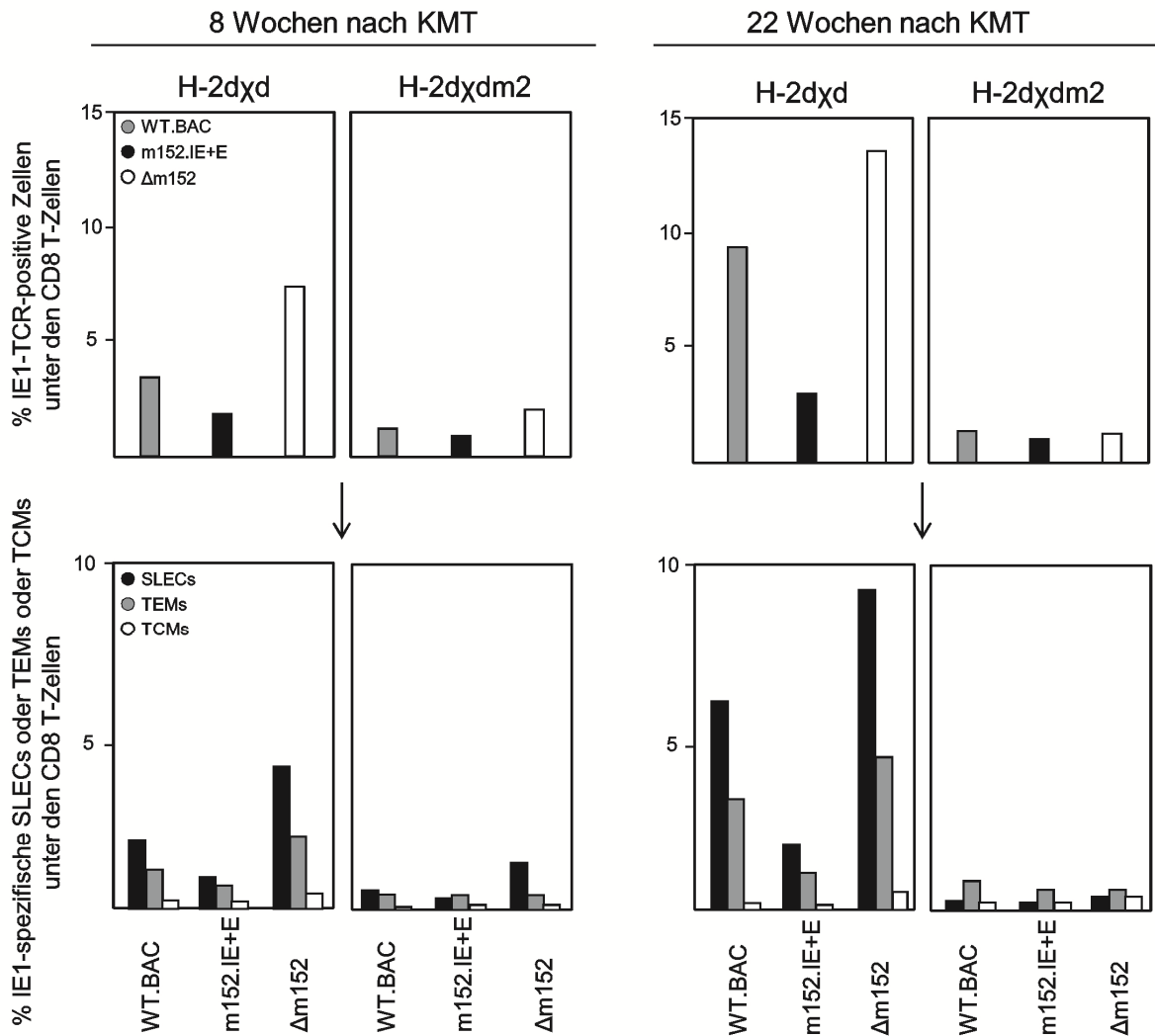


Abb. 4.28: Pulmonale Infiltration IE1-spezifischer CD8 T-Zellen nach experimenteller KMT und Infektion. Immunsupprimierte BALB/c- oder H-2^{dm2}-Mäuse wurden mit 5×10^6 BALB/c-KMZ rekonstituiert und intraplantar mit 1×10^5 PFU WT.BAC (graue Balken), m152.IE+E (schwarze Balken) oder Δ m152 (leere Balken) infiziert. 8 und 22 Wochen nach KMT und Infektion wurden Lymphozyten aus einem Pool von je 5 Lungen pro Gruppe isoliert und zytofluorometrisch analysiert. Die dargestellten Zellpopulationen wurden mittels Vierfarbenanalyse wie unter Abb. 4.23A beschrieben identifiziert. Obere Reihe, prozentualer Anteil IE1-TCR-positiver Zellen unter den CD8a-positiven Zellen. Untere Reihe, Anzahl der IE1-TCR-spezifischen SLEC (schwarze Balken), TEM (graue Balken) und TCM (leere Balken) unter den CD8a/IE1-TCR-positiven Zellen.

In den pulmonalen Infiltraten der H-2dxdm2-Chimäre war 22 Wochen nach KMT keine Anreicherung IE1-spezifischer CD8 T-Zellen nachweisbar. Dies belegt den Einfluss der Antigenpräsentation durch nicht-hämatopoetische Zellen auf die pulmonale Rekrutierung IE1-spezifischer CD8 T-Zellen in der *Memory*-Phase. Darüber hinaus zeigte die Majorität der pulmonalen IE1-spezifischen CD8 T-Zellen der H-2dxdm2-Chimäre einen TEM-Phänotyp,

während die infiltrierenden CD8 T-Zellen in der H-2 α d-Homochimäre einen SLEC-Phänotyp aufwiesen.

Fazit: Eine effektive Rekrutierung IE1-spezifischer CD8 T-Zellen in die akut oder latent infizierte Lunge wird von direkter Antigenpräsentation auf nicht-hämatopoetischen Zellen vermittelt und von viralen Immunevasionsmechanismen unterdrückt.

4.8 Die Immunkontrolle durch eine IE1-spezifische CTL-Linie ist nach WT.BAC- oder m152.IE+E-Infektion vergleichbar

In der vorliegenden Arbeit wurde bereits gezeigt, dass die IE1-Antigenpräsentation von m152.IE+E-infizierten MEF in der IE-Phase der viralen Replikation im Vergleich zur WT.BAC-Infektion deutlich reduziert war (siehe Abb. 4.11 und 4.12). Zudem konnte nach intraplantarer m152.IE+E-Infektion immunkompetenter BALB/c-Mäuse eine erhöhte virale Genexpression im ableitenden LK nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.17). Demgegenüber wurden die Infektion mit WT.BAC und m152.IE+E nach Infektion von KMT-Rezipienten (Haplotyp H-2 d) mit vergleichbarer Kinetik kontrolliert (siehe Abb. 4.22).

Abschließend sollte die Immunkontrolle einer IE1-spezifischen CTLL nach Infektion mit WT.BAC oder m152.IE+E *in vivo* analysiert werden. Hierbei wird erwartet, dass die IE1-spezifische CTLL die m152.IE+E-Infektion nur vermindert kontrolliert. Das protektive Potenzial mCMV-spezifischer T-Zell-Linien mit definierter Epitop-Spezifität konnte bereits in verschiedenen experimentellen Ansätzen nachgewiesen werden (Reddehase et al., 1987; Holtappels et al., 2000b; Holtappels et al., 2001; Holtappels et al., 2002c).

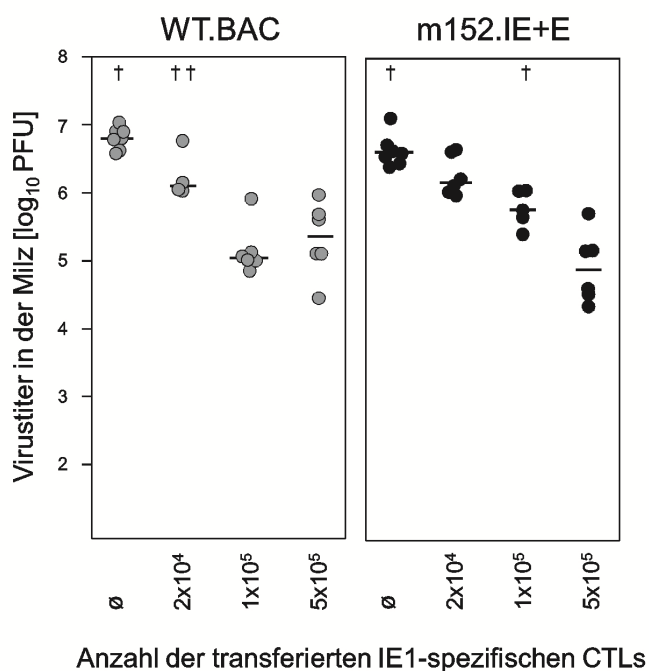


Abb. 4.29: Schutzwirkung transferierter IE1-spezifischer CTLL. Immunsupprimierten BALB/c-Mäusen wurden definierte Zellzahlen der IE1-spezifischen CTLL i.v. injiziert und anschließend erfolgte die intraplantare Infektion mit 1×10^5 PFU WT.BAC oder m152.IE+E. Als Kontrolle wurde eine Infektionsgruppe ohne Transfer mitgeführt (\emptyset). 9 Tage nach Transfer erfolgte die Organentnahme und exemplarisch wurde in der Milz die Viruslast im Plaque-Assay quantifiziert. Die Mediane sind als horizontale Balken dargestellt. †= verstorbene Tiere.

Der adoptive Transfer (AT) einer *in vitro*-generierten IE1-spezifischen CTLL (siehe 3.7.3) erfolgte in immunsupprimierten BALB/c-Mäusen (siehe 3.6.1) nach Infektion mit 1×10^5 PFU m152.IE+E oder WT.BAC (siehe 3.6.2). Als Referenz wurde eine Gruppe ohne Transfer mitgeführt. An Tag 9 nach AT wurde die Viruslast exemplarisch in der Milz mittels Plaque-Assay ermittelt.

Nach Infektion mit WT.BAC und m152.IE+E war die Viruslast in der Milz in den Kontrollgruppen, welche keinen Transfer protektiver CD8 T-Zellen erhielten, vergleichbar (siehe Abb. 4.29). Bereits ein Transfer von 2×10^4 IE1-spezifischen CTLLs reduzierte die Virustiter in der Milz sowohl nach Infektion mit WT.BAC als auch mit m152.IE+E. Generell war die Immunkontrolle durch eine *in vitro*-generierte, IE1-spezifische CTLL nach m152.IE+E- oder WT.BAC-Infektion aber vergleichbar.

Fazit: Eine nach mCMV-Infektion verstärkte m152-Expression beeinflusst nicht die Immunkontrolle durch eine *in vitro*-generierte IE1-CTLL.

5 Diskussion

5.1 Ergebnisdiskussion

Das Humane Cytomegalovirus (HCMV) ist ein ubiquitär verbreiteter Krankheitserreger, der bei immunsupprimierten Individuen schwere klinische Manifestationen hervorruft. Die Entwicklung einer Vakzine hat daher hohe Priorität (Griffiths et al., 2013). Hierfür ist ein detailliertes Verständnis der Interaktion zwischen Cytomegaloviren und dem wirtseigenen Immunsystem unabdingbar. Da die Immunkontrolle primär von antiviralen CD8 T-Zellen vermittelt wird, bildet die Interferenz von CMV mit dem MHC-I-Antigenpräsentationsweg, vermittelt durch Immunevasionsproteine, einen Forschungsschwerpunkt vieler Arbeitsgruppen.

Die Expression der HCMV-kodierten Immunevasionsproteine erfolgt in allen Phasen der viralen Genexpression, um die Erkennung infizierter Zellen zu verhindern (zur Übersicht: Noriega et al., 2012). Im Zuge der murinen CMV (mCMV)-Infektion findet die Expression der Immunevasionsproteine m152, m06 und m04 erst in der *Early*-(E)-Phase statt (zur Übersicht: Reddehase, 2002), so dass bereits in der *Immediate Early*-(IE)-Phase Virion-assoziierte sowie neusynthetisierte IE-Proteine der proteasomalen Prozessierung und MHC-I-Präsentation zugeführt werden. Um die Peptid-MHC (pMHC)-I-Präsentation nach mCMV-Infektion bereits in der IE-Phase zu unterdrücken, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Virusrekombinante generiert, die das zentrale Immunevasin m152 unter Kontrolle der regulatorischen MIE-PEEP-Genregion exprimiert.

Im Fokus dieser Arbeit stand es aufzuklären, welchen Einfluss eine verstärkte m152-Expression auf die Initiation und Aufrechterhaltung der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort hat. Die Analyse der antiviralen CD8 T-Zellantwort erfolgte sowohl nach mCMV-Infektion des immunkompetenten Wirtes als auch des immunsupprimierten Knochenmarktransplantations (KMT)-Rezipienten.

Integration des *m152*-ORF unter Kontrolle des regulatorischen MIE-PEEP-Genelements

Für die ektopische Insertion des *m152*-ORF in die MIE-PEEP-Genregion wurde die Methode der Zwei-Schritt-BAC-Mutagenese gewählt (Messerle et al., 1997; Borst et al., 1999; Wagner et al., 1999). Grundlage hierfür bildet eine homologe Rekombination zwischen parentalem mCMV-BAC-Plasmid und einem *Shuttle*-Plasmid, welches das zu inserierende Gen sowie Sequenzhomologien zum gewünschten Integrationsort bereitstellt.

Als Integrationsort des *m152*-ORF wurde das nicht-essenzielle *ie2*-Gen gewählt (Messerle et al., 1992; Cardin et al., 1995). Die Expression des *ie2*-Gens wird durch die MIE-PEEP-Genregion kontrolliert und erfolgt sowohl in der akuten Phase der Infektion als auch während der viralen Latenz (Grzimek et al., 2001; Simon et al., 2007; Seckert et al., 2012). Zusätzlich

steuert die MIE-PEEP-Region die Expression des IE1-Proteins, das ein immundominantes CD8 T-Zell-Epitop bereitstellt (Reddehase et al., 1989). Eine Integration des *m152*-ORF in die *ie2*-Genregion ermöglicht die Expression des IE1-Peptids und des Immunevasins m152 unter Kontrolle des gleichen Genelements.

Alternativ wäre eine Integration des *m152*-ORF in die *ie1/3*-Transkriptionseinheit denkbar; ein Ansatz der jedoch verschiedene Probleme mit sich bringt. Die Integration sollte nicht im Bereich der Genregion erfolgen, die für das immundominante IE1-Peptid kodiert. Würde m152 hingegen an Stelle von IE3 exprimiert, hätte die Virusrekombinante einen starken Replikationsdefekt, da das IE3-Protein ein essenzieller Transaktivator der nachfolgenden E-Genexpression ist (Angulo et al., 2000; Perez et al., 2013). Vor diesem Hintergrund sollte generell von der Insertion eines Gens in die *ie1/3*-Transkriptionseinheit abgesehen werden.

Mit Hilfe der BAC-Mutagenese wurden zwei rekombinante Viren generiert: **mCMV-m152.IE+E** und **mCMV-m152.IE**. Die Virusrekombinante mCMV-m152.IE+E (nachfolgend: m152.IE+E) beinhaltet den *m152*-ORF unter Kontrolle des *ie2*-Promotors, zusätzlich zur *m152*-Gensequenz unter Kontrolle des authentischen Promotors. Die Rekombinante mCMV-m152.IE (nachfolgend: m152.IE) kodiert den *m152*-ORF alleinig in der MIE-PEEP-Genregion.

In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits die Insertion des Diphtherie Toxin Rezeptor-Gens in die *ie2*-Genregion erfolgreich durchgeführt, ohne die biologischen Eigenschaften des rekombinanten Virus zu beeinflussen (Scheller, 35th Annual International Herpesvirus Workshop, Salt Lake City, 2010). Es war daher davon auszugehen, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte ektopische Insertion des *m152*-ORFs keinen Einfluss auf das Wachstum der neu-generierten Viren hat.

Die Bestimmung des **Genom-zu-PFU-Verhältnisses** der BAC-freien Viren m152.IE+E und m152.IE zeigte, dass verglichen mit den parental Viren (mCMV-WT.BAC oder mCMV- Δ m152) eine ähnliche Anzahl an viralen Genomen benötigt wird, um ein Plaque-bildendes Ereignis (PFU) in permissiven Zellen zu induzieren (Tab. 4.6). Das Genom-zu-PFU-Verhältnis der jeweiligen Rekombinante war vergleichbar mit dem in der Literatur beschriebenen Wert des mCMV-WT-*Smith*-Stammes von ~500:1 (Kurz et al., 1997; Grzimek et al., 1999).

Zusätzlich belegten die Ergebnisse der ***in vitro*-Replikationskinetik**, dass alle generierten Virusrekombinanten vergleichbar mit den parental Viren in permissiven Fibroblasten replizieren (Abb. 4.10). Darüber hinaus konnten für die Rekombinanten ***in vivo*** nach Infektion von immunsupprimierten BALB/c-Mäusen vergleichbare Verdopplungszeiten in ausgewählten mCMV-Zielorganen (Lunge, Leber, Milz, Speicheldrüse) nachgewiesen werden (Abb. 4.13).

Durch die Integration des *m152*-ORF in die *ie2*-Genregion sollte das IE2-Protein nicht translatiert werden, da die Translation des *m152-IE2*-Transkriptes durch das m152-Stop-Codon terminiert wird. Die Bestätigung der IE2-Deletion erfolgte unter selektiven IE-

Bedingungen nach m152.IE+E- oder m152.IE-Infektion von Fibroblasten. Im Western Blot war das IE2-Protein nicht nachweisbar (Abb. 4.7).

Da die MIE-PEEP-Region zusätzlich die *ie1*-Genexpression reguliert, wurde auch die **IE1-Proteinexpression** untersucht. Diese zeigte sich wie erwartet unbeeinflusst von der ektopischen m152-Expression (Abb. 4.9).

Funktionelle Expression des Immunevasins m152 in der IE-Phase

In der vorliegenden Arbeit wurde die ektopische **Expression des m152-Proteins** zunächst unter selektiven IE-Bedingungen nach m152.IE+E- oder m152.IE-Infektion überprüft. In Fibroblasten konnte unter diesen Bedingungen das m152-Protein ausschließlich nach m152.IE+E- oder m152.IE-Infektion und nicht nach Infektion mit WT.BAC nachgewiesen werden (Abb. 4.7). Dies bestätigte die Beobachtungen von Del Val et al. (1989), dass die Expression der mCMV-kodierten Immunevasine nach WT-Infektion erst in der E-Phase der viralen Genexpression einsetzt.

Nachfolgend sollte geklärt werden, wie sich die m152-Proteinexpression im zeitlichen Verlauf der Infektion mit m152.IE+E oder m152.IE verhält. Die erste Studie über die m152-Proteinexpression wurde von Ziegler et al. (1997) durchgeführt. In dieser Arbeit wurde das m152-Protein als Typ I-Transmembran glykoprotein mit drei potenziellen N-Glykosylierungsstellen beschrieben. In WT-*Smith*-infizierten Fibroblasten konnten 3-4h p.i. drei m152-Isoformen (48kDa, 40kDa und 36kDa) nachgewiesen werden. Das Maximum der m152-Proteinexpression wurde 5-6h p.i. erreicht.

Wie erwartet konnten in der vorliegenden Arbeit nach m152.IE+E-Infektion alle m152-Proteinisoformen zu einem früheren Zeitpunkt (2h p.i.) nachgewiesen werden als nach Infektion mit WT.BAC. Zusätzlich war nach m152.IE+E-Infektion die detektierte m152-Proteinmenge zu allen Zeitpunkten höher.

Nach m152.IE-Infektion war die m152-Proteinexpression im Vergleich zur WT.BAC-Infektion verringert. Dies lässt vermuten, dass die m152-Expression unter Kontrolle des *ie2*-Promotors geringer ist als unter dem E-regulierten Promotor. Möglicherweise kann dies auf eine schnelle Repression der MIE-Genexpression, die *in vitro* bereits 4h nach WT.BAC-Infektion einsetzt (Marcinowski et al., 2012) und durch das regulatorische IE3-Protein induziert wird (Messerle et al., 1992), zurückgeführt werden. Eine selektive Repression der m152-Transkription konnte allerdings erst 6 Stunden nach WT.BAC-Infektion nachgewiesen werden (Marcinowski et al., 2012).

Der Nachweis der **Funktionalität des IE-exprimierten m152-Proteins** erfolgte im ELISpot-Assay mit infizierten Fibroblasten als Zielzellen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach m152.IE+E- oder m152.IE-Infektion die Erkennung der IE-arretierten Fibroblasten sowohl durch mCMV-spezifische *Memory* CD8 T-Zellen als auch eine IE1-spezifische T-Zelllinie (CTL) deutlich reduziert war (Abb. 4.11). Dies lässt auf eine

verminderte Präsentation viraler Antigene durch die eingesetzten APC schließen und belegt die Aktivität des m152-Proteins unter IE-Bedingungen.

In einem weiteren Versuchsansatz sollte der Einfluss einer in der IE-Phase einsetzenden Expression von m152 auf die Antigenpräsentation infizierter Zellen während des Infektionsverlaufes nachvollzogen werden (Abb. 4.12). Zu frühen Zeitpunkten nach Infektion mit m152.IE+E oder m152.IE konnten Fibroblasten eine **IE1-spezifische CTLL** nicht aktivieren, da das IE-exprimierte m152 die IE1-Antigenpräsentation vollständig unterdrückte. Erst 4 Stunden nach m152.IE+E-Infektion stimulierten Fibroblasten eine IE1-spezifische CTLL mit vergleichbarer Effizienz wie WT.BAC-infizierte Fibroblasten.

Von m152.IE-infizierten Fibroblasten wurde eine IE1-spezifische CTLL zu späten Infektionszeitpunkten sehr effizient stimuliert (4.12 A). Dies lässt auf eine verbesserte IE1-Präsentation zu späten Infektionszeitpunkten nach alleiniger m152-Expression schließen, die möglicherweise durch die bereits nachgewiesene verminderte m152-Proteinexpression (Abb. 4.9) erklärt werden kann. Da nach m152.IE-Infektion keine verstärkte Immunevasion erreicht werden konnte, wurde diese Rekombinante für nachfolgende *in vivo*-Versuche ausgeschlossen.

Eine verstärkte Reduktion der Antigenpräsentation nach m152.IE+E-Infektion konnte auch für das **m164-Peptid** belegt werden. In einer früheren Arbeit war gezeigt worden, dass dieses unabhängig von viralen Immunevasionsmechanismen auf infizierten Fibroblasten präsentiert wird und die Erkennung und Lyse infizierter Zellen durch eine m164-spezifische CTLL vermittelt (Holtappels et al., 2002a). Da in der zitierten Arbeit gezeigt werden konnte, dass das m164-Peptid in einer 10-fach höheren Konzentration vorliegt als das IE1-Peptid, wurde angenommen, dass die MHC-I-Präsentation des m164-Peptids der Immunevasion durch eine vermehrte Bereitstellung des Peptids entgeht. In einer aktuellen Arbeit wurde gezeigt, dass in der IE-Phase eine m164-*upstream*-RNA exprimiert wird, die das m164-Peptid kodiert und daher die Präsentation des m164-Peptids bereits in der IE-Phase der Infektion erfolgt (Fink et al., in Vorbereitung).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob die Präsentation des m164-Peptids möglicherweise durch eine verstärkte Expression des Immunevasins m152 nach m152.IE+E-Infektion unterdrückt werden kann. Zu sehr frühen Zeitpunkten erkennt eine m164-spezifische CTLL m152.IE+E-infizierte Fibroblasten tatsächlich nicht (Abb. 4.12B). Allerdings aktivierten Fibroblasten 6 Stunden nach Infektion mit WT.BAC, m152.IE+E oder Δ m152 eine m164-spezifische CTLL mit vergleichbarer Effizienz. Die verstärkte m152-Expression verhindert daher die Präsentation des m164-Peptids nicht vollständig.

Die frühe CD8 T-Zellantwort gegen mCMV ist abhängig von der direkten Antigenpräsentation auf infizierten Zellen

Die Effizienz der CD8 T-Zellantwort hängt von der verfügbaren Menge an pMHC-I-Komplexen auf der Oberfläche der APC ab (Henrickson et al., 2008). Die pMHC-I-Präsentation wird jedoch während der mCMV-Infektion durch die Expression viraler Immunevasine unterdrückt (zur Übersicht: Lemmermann et al., 2012).

Die bisherigen Studien zum Einfluss der viralen Immunevasion auf die mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort wurden überwiegend nach Infektion mit mCMV-Rekombinanten durchgeführt, in denen das zentrale Immunevasin m152 (mCMV- Δ m152; nachfolgend: Δ m152) oder alle drei Immunevasine (mCMV- Δ m152 Δ m06 Δ m04; nachfolgend: Δ Evasin) deletiert worden waren. Überraschenderweise veränderte die Deletion der Immunevasine die CD8 T-Zellfrequenzen in der Akutphase nach Infektion sowie das Spektrum der *geprimten* Spezifitäten nach Infektion von immunkompetenten Mäusen nur wenig (Gold et al., 2002; Munks et al., 2007; Böhm et al., 2008). Daher wurde angenommen, dass die Initiation der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort unabhängig von der direkten Antigenpräsentation auf infizierten Zellen ist und durch Cross-Präsentation viraler Antigene auf nicht-infizierten APC bestimmt wird. Diese Annahme konnte in weiteren mCMV-Infektionssystemen scheinbar bestätigt werden (Snyder et al., 2011, Torti et al., 2011b, Busche et al., 2013).

Im Gegensatz zu den Studien nach mCMV-Infektion konnte im Modellsystem der Rhesus CMV (RhCMV)-Infektion gezeigt werden, dass die Expression von viralen Immunevasinen das antivirale CD8 T-Zell-*Priming* deutlich modulieren kann. Die Generierung von CD8 T-Zellspezifitäten gegen beschriebene Epitope wird durch das Immunevasin Rh189 (HCMV-Homolog: US11) verhindert und eine CD8 T-Zellantwort gegen neue Epitopgruppen induziert (Hansen et al., 2013). Bemerkenswerterweise werden auch MHC-II-präsentierte Peptide erkannt. Bislang konnte für mCMV kein Rh189-Homolog nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die neu-generierte m152.IE+E-Rekombinante verwendet, um den Einfluss einer verstärkten m152-Expression auf die Initiation der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort aufzuklären. Zunächst erfolgte die Analyse des mCMV-Immunoms nach intraplantarer Infektion immunkompetenter BALB/c-Mäuse (Haplotyp H-2^d) mittels ORF-Bibliotheken-*Screening*. Diese Analyse zeigte, dass nach m152.IE+E-Infektion alle Spezifitäten deutlich vermindert nachweisbar waren; es wurden nur CD8 T-Zellantworten gegen Peptide, die von den ORFs M25, M94 oder m164 kodiert werden, nachgewiesen (Abb. 4.15). Auffällig hierbei ist, dass sowohl das M25- als auch das M94-Protein im Virion nachgewiesen werden kann (Kattenhorn et al., 2004). Virion-assoziierte Proteine können unmittelbar nach Penetration der Wirtszelle prozessiert und enthaltene antigene Peptide über MHC-I-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Dies ermöglicht dem infizierten Wirtsorganismus die Initiation einer CD8 T-Zellantwort in der prä-IE-Phase unabhängig von der viralen Genexpression, wodurch die viralen Immunevasionsmechanismen umgangen werden. Das Protein m164/gp36.5 ist nicht im Virion enthalten; es

wird jedoch in der E- und L-Phase trotz der viralen Immunevasionsmechanismen auf infizierten Fibroblasten präsentiert (Holtappels et al., 2002a). Die CD8 T-Zellantwort nach m152.IE+E-Infektion ist folglich gegen Peptide aus Virionproteinen und einem der Immunevasion entkommenden Peptid gerichtet.

Neben dem ORF-Bibliotheken-Screening wurde die CD8 T-Zellantwort in der Akutphase nach Infektion mit WT.BAC, m152.IE+E oder Δ m152 im drainierenden LK, dem Ort des CD8 T-Zell-Primings, bestimmt. Um ein Korrelat zwischen Peptid-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen und viraler Replikation bzw. der Anzahl infizierter Zellen zu ermöglichen, wurde die intranodale Genexpression des *ie1*-Gens bestimmt (Böhm et al., 2008), das für das immundominante CD8 T-Zellepitop IE1 kodiert (Reddehase et al., 1989). Da das IE1-Protein ein Nicht-Struktur-Protein ist, besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der *IE1*-Genexpression, also letztlich der zur Verfügung stehenden Menge an IE1-Protein bzw. IE1-Peptid, und der induzierten IE1-spezifischen CD8 T-Zellantwort.

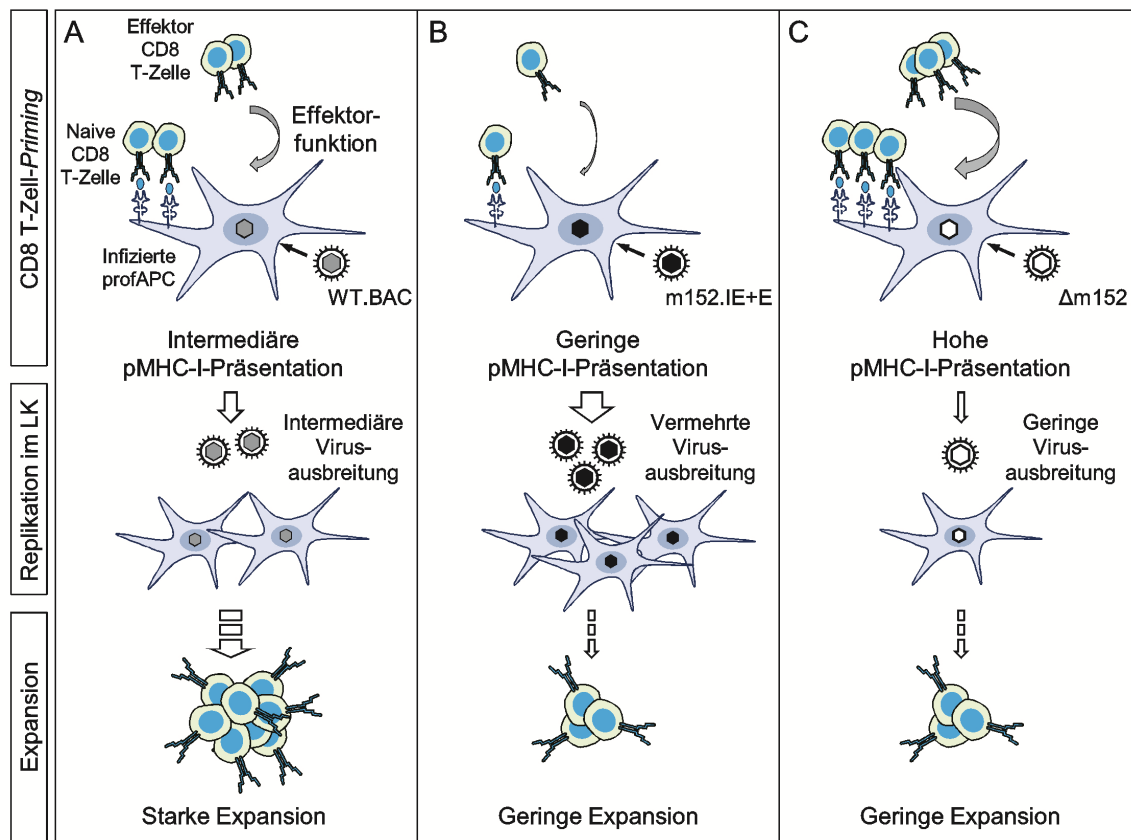


Abb. 5.1: Modell des direkten CD8 T-Zell-Primings in Abhängigkeit von der viralen Immunevasion. In der frühen Phase der mCMV-Infektion werden CD8 T-Zellen durch die pMHC-I-Präsentation auf infizierten profAPC stimuliert und kontrollieren die Infektion. Dieser Prozess ist abhängig von der m152-Expression bzw. der Menge an präsentierten pMHC-I-Komplexen. Die m152-Expression in der IE- und E-Phase reduziert die pMHC-I-Präsentation und führt zu einer verminderten CD8 T-Zellstimulation (B) im Vergleich zur WT.BAC-Infektion, in der m152 nur in der E-Phase exprimiert wird (A). Eine verminderte CD8 T-Zellkontrolle der m152.IE+E-Infektion resultiert in einer höheren Virusausbreitung bei gleichzeitig verminderter Expansion der CD8 T-Zellen. In Abwesenheit von m152 induziert die verbesserte pMHC-I-Präsentation eine effiziente CD8 T-Zellkontrolle der Infektion (C). Dies führt im nachfolgenden Schritt zu einer verringerten Virusausbreitung und zu einer schlechteren Expansion der CD8 T-Zellen im LK.

Die mittels ELISpot-Analyse ermittelten CD8 T-Zellfrequenzen in LK und Milz waren in der Akutphase nach m152.IE+E-Infektion immunkompetenter BALB/c-Mäuse im Vergleich zur Infektion mit WT.BAC deutlich vermindert (Abb. 4.14), während die *IE1*-Expression im LK signifikant erhöht war (Abb. 4.17). Dies weist darauf hin, dass die m152.IE+E-Infektion im immunkompetenten Wirt schlechter kontrolliert wird als die Infektion mit WT.BAC. In einem weiteren Versuchsansatz konnte gezeigt werden, dass der Replikationsunterschied zwischen m152.IE+E und WT.BAC in Abwesenheit von CD8 T-Zellen aufgehoben ist (Abb. 4.17).

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die verstärkte m152-Expression eine verringerte pMHC-I-Präsentation auf infizierten profAPC bewirkt. Folglich werden naive CD8 T-Zellen von m152.IE+E-infizierten profAPC weniger effizient *geprimt* und nachfolgend ist die Kontrolle der Infektion durch antivirale CD8 T-Zellen verschlechtert. Dies führt zu einer erhöhten Anzahl an infizierten Zellen im LK. Allerdings können Zellen infiziert mit m152.IE+E sowohl naive als auch bereits *geprimten* CD8 T Zellen nicht effizient stimulieren, da die Antigenpräsentation durch eine verstärkte m152-Expression unterdrückt wird (Abb. 5.1B). Dies resultiert in einem verminderten CD8 T-Zell-*Priming* nach Infektion mit m152.IE+E. In der vorliegenden Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass in Abwesenheit von m152 sowohl die CD8 T-Zellantwort in der Akutphase der Infektion als auch die *IE1*-Genexpression im LK geringer war als nach WT.BAC-Infektion (Abb. 4.14 und 4.17). Dies bestätigt zunächst die Beobachtung von Böhm et al. (2008) nach Δ Evasin-Infektion. Zunächst können Zellen infiziert mit Δ Evasin bzw. Δ m152, bedingt durch eine verbesserte Antigenpräsentation, naive CD8 T-Zellen effizient stimulieren. Die *geprimten* CD8 T-Zellen kontrollieren schnell die Infektion; ein Phänomen das als negative *Feedback*-Regulation bezeichnet wird. Bedingt durch die frühe CD8 T-Zellkontrolle ist in der Folge die Anzahl der infizierten Zellen im LK vermindert und dies reduziert die Stimulation von naiven und *geprimten* CD8 T-Zellen (Abb. 5.1C). Dies bewirkt ein vermindertes CD8 T-Zell-*Priming* nach Δ m152-Infektion.

In der Arbeit von Böhm et al. (2008) wurde vermutet, dass die Verfügbarkeit von antigenem Material nach Δ Evasin-Infektion die CD8 T-Zellantwort bestimmt und nicht die Abwesenheit der Immunevasine. Daher wurde postuliert, dass die Initiation der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort unabhängig von der direkten Antigenpräsentation ist und von der *Cross*-Präsentation durch nicht-infizierte APC bestimmt wird. Bei diesem Postulat wurde jedoch nicht berücksichtigt, dass nach Δ Evasin-Infektion auch die Anzahl der infizierten, Antigenpräsentierenden Zellen vermindert ist. Eine direkte Antigenpräsentation durch Δ Evasin-infizierte Zellen kann daher nicht ausgeschlossen werden. Das in Abb. 5.1 beschriebene Modell erklärt nun erstmals die Rolle der **direkten Antigenpräsentation** bei der Initiation der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort.

Um die Rolle der direkten Antigenpräsentation bei der Initiation der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort zu bestätigen, wurde in der vorliegenden Arbeit die CD8 T-Zellantwort nach mCMV-Infektion von **Cross-Präsentations-defizienten 3d-Mäusen** bestimmt.

Nach mCMV-Infektion der 3d-Maus (Haplotyp H-2^b) konnten in LK und Milz sogar höhere CD8 T-Zellfrequenzen nachgewiesen werden, als nach Infektion der parentalen C57BL/6-

Mäuse. Dies ist möglicherweise auf eine verstärkte Virusreplikation zurückzuführen, da die 3d-Maus zu den mCMV-suszeptiblen Mausstämmen gehört (Tabeta et al., 2006).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen zudem, dass die Frequenz-Hierarchie der Spezifitäten in *Cross*-Präsentations-defizienten 3d- und den parentalen C57BL/6-Mäusen vergleichbar ist (Abb. 4.19). Diese Beobachtung lässt schließen, dass die mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort nicht von der *Cross*-Präsentation viraler Peptide abhängig ist und konnte in der Arbeit von Crane et al. (2012) durch Analyse der Frequenzen der M45-Spezifität nach mCMV-WT-*Smith*-Infektion von 3d-Mäusen bestätigt werden. Die Autoren konnten zeigen, dass die intrazelluläre IFN γ - und TNF α -Expression sowie die Oberflächenexpression des Degranulationsmarkers CD107a (Betts et al., 2003) von M45-spezifischen CD8 T-Zellen in der Leber der 3d- und C57BL/6-Maus vergleichbar sind.

In der Literatur wurde die Initiation einer mCMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort auch in anderen **Cross-Präsentations-defizienten Mäusen** beschrieben. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde die CD8 T-Zellantwort in **Batf3^{-/-}-Mäusen** (Haplotyp H-2^b) untersucht. *Cross*-präsentierende CD8^{high} und CD103^{high}CD11b^{low} DC dieser Mäuse haben einen Entwicklungsdefekt (Hildner et al., 2008). Torti et al. (2011b) zeigten, dass während der akuten mCMV- Δ m157-Infektion in Batf3^{-/-}-Mäusen die CD8 T-Zellantwort in der Lunge deutlich geringer war, als in den parentalen Mäusen. Daher wurde von Torti und Kollegen geschlussfolgert, dass die Initiation der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort von CD8+ DC und deren Fähigkeit zur *Cross*-Präsentation abhängig ist. Die Reduktion der CD8 T-Zellfrequenzen nach Infektion von Batf3^{-/-}-Mäusen kann allerdings nicht allein auf die Abwesenheit der genannten DC-Subpopulationen zurückgeführt werden. Um diese Schlussfolgerung zu ziehen, müsste eine Rekonstitution der Batf3^{-/-}-Mäuse mit *Cross-Priming*-befähigten DC und nachfolgender Infektion durchgeführt werden. Weiterhin kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass infizierte CD8+ DC essenziell sind für die direkte Präsentation viraler Antigene, unabhängig von ihrer Fähigkeit zur *Cross*-Präsentation. Dieser Einwand wurde von Nopora und Kollegen (2012) näher untersucht. Sie bestätigten, dass nach mCMV-Infektion von Batf3^{-/-}-Mäusen die antivirale CD8 T-Zellantwort in Abwesenheit von *Cross-primenden* DC signifikant vermindert war. Im Gegensatz dazu waren die mCMV-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen nach Infektion von *Cross*-Präsentations-defizienten **CD11c-Rac-Mäusen** (Haplotyp H-2^b) vergleichbar mit den Frequenzen nach Infektion der parentalen C57BL/6-Mäuse. Die CD11c-Rac-Maus exprimiert das dominant negative N17Rac-Transgen selektiv in DC. Dies verhindert die Aufnahme exogener Antigene und reduziert die *Cross*-Präsentation trotz Anwesenheit aller *Cross*-präsentierenden Zelltypen (Kerksiek et al., 2005). Die Experimente von Nopora und Kollegen bestätigen die Abhängigkeit des mCMV-spezifischen CD8 T-Zell-*Primings* von der Anwesenheit der CD8+ DC. Dies ist allerdings, wie bereits vermutet, unabhängig von deren Fähigkeit zur *Cross*-Präsentation (Nopora et al. 2012).

Eine weitere *Cross*-Präsentations-defiziente Maus wurde von Ong und Kollegen verwendet (Ong et al., 2013). Hierfür wurde die Beobachtung einer verminderten *Cross*-Präsentation

nach **Behandlung mit Toll-like Rezeptor (TLR)-Liganden**, wie beispielsweise methylierten Oligonukleotiden (CpG) (Wilson et al., 2006) genutzt. Die IE1-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen waren in CpG-vorbehandelten, mCMV-K181-*Perth*-infizierten Mäusen signifikant höher als nach Infektion der unbehandelten BALB/c-Mäuse. Zusätzlich erfolgte in CpG-vorbehandelten Mäusen eine verbesserte Kontrolle der produktiven Infektion vermittelt durch CD8 T-Zellen. Auch diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine protektive, mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort unabhängig von der Cross-Präsentation induziert werden kann.

Die Beobachtung, dass eine antivirale CD8 T-Zellantwort in Cross-Präsentations-defizienten Mäusen induziert werden kann, lässt nicht den Umkehrschluss zu, dass die direkte Antigenpräsentation auf infizierten profAPC *in vivo* die Initiation der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort dominiert. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass nach mCMV-Infektion bisher nicht beschriebene Cross-Präsentationswege verwendet werden könnten. Diese Problematik wurde lediglich von Ong und Kollegen (2013) adressiert, da belegt wurde, dass CpG-vorbehandelte und mCMV-infizierte Mäuse nicht zur Cross-Präsentation befähigt sind. Generell ist auch die alleinige Verwendung transgener Mausstämmen problematisch, da durch induzierte Mutationen bisher nicht identifizierte Nebeneffekte die Versuchsergebnisse beeinflussen können.

Erst der in der vorliegenden Arbeit verfolgte Ansatz der m152.IE+E-Infektion von BALB/c-Mäusen belegt eine wichtige Rolle der direkten Antigenpräsentation bei der Initiation der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort in einem System in dem sowohl die Cross-Präsentation durch nicht-infizierte profAPC (z.B. DC), als auch die direkte Antigenpräsentation durch infizierte profAPC möglich ist.

Die Initiation der antiviralen CD8 T-Zellantwort im Haplotyp H-2^b ist unabhängig von der viralen Immunevasion

In der vorliegenden Arbeit konnte überraschenderweise eine Modulation der CD8 T-Zellantwort in der akuten Phase der Infektion durch die Expression viraler Immunevasine in der C57BL/6-Maus (Haplotyp H-2^b) nicht bestätigt werden. Es zeigte sich, dass in der akuten Phase nach Infektion mit WT.BAC, m152.IE+E oder Δ m152 sowohl die CD8 T-Zellantwort als auch die virale Genexpression im LK vergleichbar waren (Abb. 4.18). Bereits Gold et al. (2002) und Munks et al. (2007) konnten zeigen, dass in der Akutphase der Infektion die Expression der viralen Immunevasine die CD8 T-Zellantwort im Haplotyp H-2^b nicht beeinflusst. Basierend auf diesen Befunden kann postuliert werden, dass der Einfluss der viralen Immunevasine auf die mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort abhängig vom Genotyp des Mausstammes ist. Obwohl bereits publiziert wurde, dass die Immunevasine die Präsentation der pMHC-I-Moleküle im Haplotyp H-2^b *in vitro* modulieren (Holtappels et al., 2006), scheint dieser Effekt *in vivo* eine untergeordnete Rolle zu spielen. Es könnte

beispielsweise im Haplotyp H-2^b ein Mechanismus existieren, der die inhibitorische Wirkung der Immunevasine aufhebt.

Da bekannt ist, dass die virale Replikation in der C57BL/6-Maus durch **NK-Zellen** über die Interaktion des aktivierenden NK-Zellrezeptor Ly49H mit dem mCMV-kodierten m157-Protein kontrolliert wird (Arase et al., 2002; Smith et al., 2002), wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der NK-Zellkontrolle auf die CD8 T-Zellantwort näher untersucht. Hierfür wurden nach Antikörper-vermittelter Depletion der NK-Zellen mit nachfolgender WT.BAC-, m152.IE+E- oder Δ m152-Infektion sowohl die *IE1*-Expression im LK als auch die mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort bestimmt. Wie erwartet war die virale Genexpression im drainierenden LK in Abwesenheit der NK-Zellen, im Vergleich zu den nicht-depletierten Mäusen, deutlich erhöht. Eine verstärkte virale Genexpression im LK konnte bereits von Mitrović (et al., 2012) nach Infektion mit der m157-Deletionsmutante mCMV- Δ m157 gezeigt werden. In der gleichen Veröffentlichung zeigten die Autoren auch, dass nach Δ m157-Infektion die antivirale CD8 T-Zellantwort deutlich verstärkt ist. Sie führten dies auf eine erhöhte virale Replikation, eine verstärkte Sekretion proinflammatorischer Zytokine (IFN α , IFN γ , IL-12 und IL-6) sowie erhöhte Frequenzen infizierter DC in Abwesenheit der Ly49H-m157-vermittelten NK-Zellaktivierung zurück (Mitrović et al., 2012).

Eine verstärkte antivirale CD8 T-Zellantwort in Abwesenheit der NK-Zellkontrolle konnte auch in der vorliegenden Arbeit belegt werden (Abb. 4.18). Allerdings war in Abwesenheit der NK-Zellen sowohl die virale Replikation im LK als auch die mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort in allen Infektionsgruppen vergleichbar. Eine Ausnahme bildeten nach Δ m152-Infektion die Spezifitäten M45, M57 und m139 im LK, deren Frequenzen deutlich höher waren als nach WT.BAC-Infektion. Eine erhöhte CD8 T-Zellantwort in Abwesenheit von m152 lässt vermuten, dass Δ m152-infizierte Zellen im Vergleich zu WT.BAC-infizierten Zellen eine verstärkte Stimulation der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellen induzieren.

Diese Beobachtungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass eine verminderte Viruslast im LK nach mCMV-Infektion von C57BL/6-Mäusen, bedingt durch die frühe NK-Zellkontrolle, den Einfluss der Immunevasine auf die antivirale CD8 T-Zellantwort vermindert. Erst in Abwesenheit von NK-Zellen können, bedingt durch die höhere Viruslast, die Immunevasine wirksam werden. Dies führt in Abwesenheit der NK-Zellen zu einer verbesserten CD8 T-Zellantwort in Abwesenheit von m152 infolge verstärkter direkter Antigenpräsentation.

Um diese Annahmen zu untermauern, wurde in der vorliegenden Arbeit ein weiterer Ansatz verfolgt. Eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der CMV-Infektion durch NK-Zellen spielt die **Sekretion von IFN γ** . In einer aktuellen Publikation wurde gezeigt, dass von NK-Zellen sezerniertes IFN γ die Differenzierung von Monozyten in DC antreibt und hierdurch die Initiation einer Immunantwort verstärkt wird (Goldszmid et al., 2012). Außerdem moduliert IFN γ die Antigenpräsentation infizierter Zellen durch die Induktion des Immunoproteasoms (Kloetzel, 2001), sowie die verstärkte Expression von Genen, die für die Antigenprozessierung und -präsentation benötigt werden (Ma et al., 1997; Saric et al., 2002; zur Übersicht: Zhou et al., 2009). Eine IFN γ -Vorbehandlung von Fibroblasten verbessert

nicht nur die Antigen-präsentation, sondern setzt bei nachfolgender mCMV-Infektion auch die inhibitorischen Funktionen der viralen Immunevasine außer Kraft (Hengel et al. 1994; Fink et al., 2012). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit postuliert, dass nach mCMV-Infektion von C57BL/6-Mäusen IFN γ die inhibitorische Wirkung der viralen Immunevasine aufhebt.

Um dieses Postulat zu bestätigen, wurde die CD8 T-Zellantwort in der Akutphase nach Infektion mit WT.BAC, m152.IE+E oder Δ m152 von IFN γ -Rezeptor *knockout*-Mäusen (Haplotyp H-2^b) bestimmt. In Abwesenheit des IFN γ -*Signallings* konnte nach mCMV-Infektion kein konsistenter Einfluss der m152-Expression auf die CD8 T-Zellantwort und die virale Replikation im LK festgestellt werden (Abb. 4.20). Daher konnte die Annahme einer Aufhebung der viralen Immunevasion im Haplotyp H-2^b durch von NK-Zellen sezerniertes IFN γ nicht bestätigt werden.

Die Etablierung und Aufrechterhaltung der antiviralen *Memory* CD8 T-Zellantwort ist abhängig von direkter Antigenpräsentation

Nach schneller Expansion antiviraler CD8 T-Zellen während der akuten Infektion folgt nach Kontrolle der Infektion eine Kontraktion des Effektor T-Zellpools. Die verbleibenden antiviralen CD8 T-Zellen bilden mehrheitlich die *Memory* T-Zellpopulation und persistieren langfristig im Wirtsorganismus. Ein herausragendes Charakteristikum der CMV-Infektion bildet die Anreicherung antiviraler CD8 T-Zellen in der latent infizierten Lunge (Holtappels et al., 2000a; Karrer et al. 2003; Munks et al., 2006). Dieses Phänomen wird auch als ***Memory Inflation*** bezeichnet. Auf Grundlage der Detektion stochastischer, viraler Genexpressionsereignisse in der latent infizierten Lunge (Kurz et al., 1999; Grzimek et al., 2001; Simon et al., 2007, Seckert et al., 2012) wurde postuliert, dass die *Memory Inflation* durch die Präsentation antigener, viraler Peptide auf latent-infizierten Zellen angetrieben wird (Seckert et al., 2013). Diese Reaktivierungsereignisse werden von pulmonalen CD8 T-Zellen erkannt und terminiert (Simon et al., 2006).

In neueren Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass die *Memory Inflation* von der pMHC-I-Präsentation auf latent infizierten, nicht-hämatopoetischen Gewebszellen abhängt und unabhängig von der *Cross*-Präsentation ist (Seckert et al., 2011; Torti et al., 2011a). Diese Annahme konnte in der vorliegenden Arbeit erneut bestätigt werden, da gezeigt werden konnte, dass die Expression des Immunevasins m152 in der IE- und E-Phase die *Memory* CD8 T-Zellantwort in immunkompetent-infizierten BALB/c-Mäusen vermindert (Abb. 4.16).

Basierend auf dieser Beobachtung wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss einer verstärkten Immunevasion auf die mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort während der **Etablierung und Aufrechterhaltung der Latenz** bestimmt. Für diese Analysen wurde das Modell der experimentellen KMT mit anschließender mCMV-Infektion gewählt, ein etabliertes System für Studien zur mCMV-Latenz (Reddehase et al., 2008; Seckert et al., 2013).

Bei vergleichbarer viraler Genomlast in der Lunge nach Infektion mit m152.IE+E und WT.BAC von KMT-Rezipienten waren über den gesamten Analysezeitraum die pulmonalen IE1-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen nach m152.IE+E-Infektion deutlich geringer (Abb. 4.24 und 4.26).

Da das zusätzlich integrierte *m152*-Gen in der m152.IE+E-Mutante unter der Kontrolle des *ie2*-Promotors steht und eine stochastische Aktivität dieses Promotors in der latent infizierten Lunge nachgewiesen werden konnte (Grzimek et al., 2001; Seckert et al., 2012), kann auch von einer Expression des *m152*-Gens in der Latenz ausgegangen werden. Die Expression von m152 als IE-Gen führt somit zu einer Reduktion der IE1-Peptidpräsentation und damit zu niedrigen Frequenzen IE1-spezifischer CD8 T-Zellen. Grundlage dieser Hypothese ist die Expression der Proteine IE1 und m152 in einer latent infizierten Zelle und dies setzt die transkriptionelle Aktivität des *ie1/3*- und *ie2*-Promotors voraus. Bisher wurde für die Aktivität der MIE-PEEP-Genregion während der Latenz ein *Switch*-Modell postuliert. Es wurde vermutet, dass die *Enhancer*-Regionen stochastisch aktiviert werden und eins der beiden Gene des bidirektionalen Genpaares aktivieren (Simon et al., 2007). Das *Switch*-Modell sollte auf Grundlage der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse geprüft werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass die produktive Δ m152-Infektion nach KMT schnell kontrolliert wird mit der Konsequenz einer geringeren viralen Genomlast in der Lunge (Abb. 4.22). In Abwesenheit von m152 konnten während der Etablierung und Aufrechterhaltung der Latenz erhöhte IE1-spezifische CD8 T-Zellfrequenzen in Lunge und Milz nachgewiesen werden (Abb. 4.24B und 4.26). Eine Ausnahme bildeten späte Infektionszeitpunkte nach KMT, zu denen die Anzahl IE1-spezifischer CD8 T-Zellen in der Δ m152-infizierten Lunge geringer war als nach WT.BAC-Infektion (Abb. 4.24B). Eine im Vergleich zur WT.BAC-Infektion reduzierte Anzahl IE1-spezifischer CD8 T-Zellen in der latent infizierte Lunge zu späten Infektionszeitpunkten konnte bereits nach Δ Evasin-Infektion von KMT-Rezipienten nachgewiesen werden (Böhm et al., 2009). Dies lässt sich möglicherweise auf eine reduzierte virale Last in der Lunge und eine damit verminderte Anzahl an APC zurückführen.

Die dargestellten Beobachtungen zeigen, dass die Modulation der pMHC-I-Präsentation durch virale Immunevasine sowohl die frühe als auch die *Memory* CD8 T-Zellantwort nach KMT und Infektion prägt und bestätigen, dass die mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort von direkter Antigenpräsentation bestimmt wird. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nur nach Infektion des KMT-Rezipienten sondern auch, wie bereits ausführlich beschreiben, nach Infektion des immunkompetenten Wirtes gezeigt werden.

Es ist auch denkbar, dass die Antigenverfügbarkeit während der CMV-Infektion nicht nur die Frequenz der CD8 T-Zellantwort, sondern auch die **Differenzierung der *Memory* T-Zellen** beeinflusst. Eine Unterscheidung von verschiedenen *Memory* T-Zell-Subpopulationen basiert auf der Expression der Oberflächenantigene CD62L und KLRG1 (zur Übersicht: Obar und Lefrançois, 2010a). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Phänotypisierung zeigte, dass es sich bei der Majorität der IE1-spezifischen CD8 T-Zellen aus Milz und Lunge

um terminal-differenzierte *Short-Lived Effector Cells* (SLEC; CD62L^{low} KLRG1^{high}) handelte (Abb. 4.24). Diese Beobachtung bestätigt die Arbeit von Synder und Kollegen, die bereits zeigen konnten, dass der *Memory* CD8 T-Zell-Pool durch SLEC gebildet wird (Snyder et al., 2008).

Während die m152-Expression in der IE- und E-Phase, verglichen mit der WT.BAC-Infektion bei alleiniger Expression von m152 in der E-Phase, keine Veränderung des immunologischen Phänotyps IE1-spezifischer CD8 T-Zellen induziert, konnte in Abwesenheit von m152 eine höhere Anzahl IE1-spezifischer SLEC nachgewiesen werden (Abb. 4.24C). Eine verbesserte Rekrutierung von IE1-spezifischen SLEC in Abwesenheit von m152 lässt sich möglicherweise auf eine verstärkte pMHC-TCR-Restimulation zurückführen. Diese Annahme wird von den Arbeiten von Thimme und Kollegen (2005) unterstützt, die zeigen konnten, dass für die Entwicklung von SLEC eine repetitive Antigenstimulation essenziell ist. Obar und Lefrançois (2010b) postulierten, dass die Differenzierung von *Memory* CD8 T-Zellen bereits während der Initiation der Immunantwort durch das pMHC-TCR-Signal, durch die Interaktion kostimulatorischer Moleküle der T-Zelle mit ihren Liganden und durch das inflammatorische Zytokin-Milieu bestimmt wird. Daher ist auch denkbar, dass eine verstärkte pMHC-I-Präsentation auf Δ m152-infizierten Zellen bereits während der frühen Phase der Infektion eine vermehrte Rekrutierung von mCMV-spezifischen SLEC bedingt.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Anreicherung IE1-spezifischer SLEC in der *Memory* Phase nach Δ m152-Infektion von KMT-Rezipienten konnte allerdings von Slavuljica (et al., 2010) nach intraplantarer Infektion immunkompetenter BALB/c-Mäuse nicht beobachtet werden. Sowohl in An- als auch in Abwesenheit von m152 war die Verteilung der analysierten TCM- und TEM-Subpopulationen unter den IE1-spezifischen CD8 T-Zellen vergleichbar.

Diese divergenten Beobachtungen sind möglicherweise auf die unterschiedlichen Infektionsmodelle zurückzuführen. Nach Infektion von KMT-Rezipienten erfolgt die Kontrolle der akuten Infektion erst nach Rekonstitution des Immunsystems, daher ist die virale Genomlast in mCMV-Zielorganen höher als nach Infektion immunkompetenter Mäuse. Eine verminderte virale Genomlast nach Infektion immunkompetenter Mäuse würde eine Reduktion der Anzahl infizierter Zellen bedingen und damit zu einer generell reduzierten Präsentation viraler antigener Peptide führen.

Die pulmonale Rekrutierung mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen wird durch die direkte Antigenpräsentation auf nicht-hämatopoetischen Gewebszellen bestimmt

In aktuellen Publikationen war gezeigt worden, dass die Rekrutierung von mCMV-spezifischen SLEC in die latent infizierte Lunge von der Antigenpräsentation auf nicht-hämatopoetischen, parenchymalen Zellen (Seckert et al., 2011; Torti et al., 2011a) sowie von der Expansion von TCM im LK abhängt (Torti et al., 2011a).

In der Arbeit von Seckert und Kollegen wurde sowohl die direkte Antigenpräsentation auf latent infizierten, hämatopoetischen profAPC als auch die Cross-Präsentation viraler Peptide durch pulmonale DC ausgeschlossen. In den bisherigen Arbeiten wurde jedoch nicht beachtet, dass auch nicht-hämatopoetische Endothelzellen zu Cross-Präsentation befähigt sind (Limmer et al., 2000; Bagai et al., 2005). Obwohl von Seckert et al. (2011) und Torti et al. (2011a) gezeigt werden konnte, dass die Antigen-präsentierenden Zellen während der Latenz nicht-hämatopoetischen Ursprungs sind, konnte der Präsentationsweg der viralen Peptide nicht abschließend aufgeklärt werden.

Um die Arbeit von Seckert und Kollegen weiterzuführen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Rekrutierung IE1-spezifischer CD8 T-Zellen in die Lunge sowohl in der frühen Infektionsphase als auch während der Latenz in An- und Abwesenheit des Immunevasins m152 bestimmt. Dies erfolgte unter Verwendung der H-2d χ dm2-KM-Chimären, in der die Präsentation des MHC-I L^d-Moleküls auf nicht-hämatopoetischen Zellen aufgrund des Fehlens des präsentierenden MHC-I L^d-Moleküls nicht möglich ist (Seckert et al., 2011; Abb. 4.27).

In der vorliegenden Arbeit konnte bereits in der **frühen Phase** nach KMT und Infektion gezeigt werden, dass die Anzahl IE1-spezifischer CD8 T-Zellen in der Lunge deutlich vermindert war, wenn das IE1-Peptid ausschließlich auf hämatopoetischen Zellen präsentiert werden konnte (Abb. 4.28). Dies zeigt, dass die frühe Rekrutierung antiviraler CD8 T-Zellen in die infizierte Lunge von der Antigenpräsentation auf nicht-hämatopoetischen Zellen maßgeblich bestimmt wird.

Eine effiziente Rekrutierung IE1-spezifischer SLEC in die infizierte Lunge wurde in Abwesenheit von m152 nachgewiesen, wenn die IE1-Antigenpräsentation sowohl auf hämatopoetischen als auch auf nicht-hämatopoetischen Zellen ermöglicht wurde. Diese Beobachtung belegt einen wesentlichen Beitrag der direkten Antigenpräsentation bei der Rekrutierung antiviraler CD8 T-Zellen in ein peripheres Organ, da die Abwesenheit des Immunevasins m152 und die verbesserte direkte Antigenpräsentation auf infizierten Zellen zu einer verstärkten Rekrutierung von antiviralen CD8 T-Zellen führt.

In Anwesenheit von m152 war die frühe Rekrutierung IE1-spezifischer CD8 T-Zellen in die Lunge vermindert und der Anteil IE1-spezifischer SLEC und TEM vergleichbar. Da in den H-2d χ dm2-KM-Chimären die IE1-Antigenpräsentation ausschließlich auf hämatopoetischen Zellen erfolgt, impliziert eine verminderte Rekrutierung IE1-spezifischer CD8 T-Zellen in

Anwesenheit des viralen Immunevasins m152 erstmals *in vivo* eine Funktionalität von m152 in infizierten Zellen des hämatopoetischen Kompartiments. Bislang wiesen lediglich *in vitro*-Studien auf die Funktionalität der Immunevasine in hämatopoetischen Zellen hin. Hierzu gehören professionelle APC (profAPC) wie DC (Holtappels et al., 2006) und Makrophagen (LoPiccolo et al., 2003).

Während der **Latenz** war in den pulmonalen Infiltraten der H-2d χ dm2-Chimäre keine Anreicherung IE1-spezifischer CD8 T-Zellen nachweisbar. Darüber hinaus zeigte die Majorität der IE1-spezifischen CD8 T-Zellen der H-2d χ dm2-Chimäre einen TEM-Phänotyp, während die infiltrierenden CD8 T-Zellen der H-2d χ d-Homochimäre einen SLEC-Phänotyp aufwiesen. Diese Beobachtungen bestätigen die Arbeit von Seckert et al. (2011).

Die Kontrolle der mCMV-Infektion im Kontext viraler Immunevasion

Die akute CMV-Infektion wird effektiv durch antivirale CD8 T-Zellen kontrolliert, obwohl virale Immunevasine die MHC-I-Präsentation viraler Peptide unterdrücken. Dies deutet darauf hin, dass die Inhibition der pMHC-I-Präsentation durch Immunevasine unvollständig ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der m152-Expression in der IE- und E-Phase auf die Kontrolle der Infektion untersucht. Es zeigte sich, dass eine verstärkte m152-Expression keinen signifikanten Einfluss auf die Immunkontrolle durch eine IE1-spezifische CTLL nach adoptivem Transfer hatte (Abb. 4.29). Auch nach Infektion von KMT-Rezipienten zeigte die Verstärkung der m152-Expression keinen Einfluss auf die Kontrolle der Infektion (Abb. 4.22). Lediglich nach Infektion immunkompetenter BALB/c-Mäuse konnte eine verschlechterte Kontrolle der m152.IE+E-Infektion im drainierenden LK beobachtet werden (Abb. 4.17).

Generell ist das Immunsystem in der Lage, die CMV-Infektion unabhängig von der Expression des Immunevasins m152 zu kontrollieren. Es ist auch zu beachten, dass trotz verstärkter m152-Expression und der damit einhergehenden verminderten MHC-I-Präsentation viraler Peptide auf der Oberfläche infizierter Zellen (Abb. 4.12) weiterhin eine antivirale CD8 T-Zellantwort induziert wurde, auch wenn die Frequenzen aller Spezifitäten deutlich unterdrückt waren (Abb. 4.14). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass nicht allein die Anzahl virus-spezifischer CD8 T-Zellen entscheidend für die Immunkontrolle ist. Vielmehr scheint ein bestimmender Faktor für die protektive Effizienz antiviraler CD8 T-Zellen die Avidität der Interaktion zwischen CD8 T-Zelle und den pMHC-Komplexen (Alexander-Miller et al., 1996) zu sein.

Hoch-avide CD8 T-Zellen können bereits durch eine geringe Anzahl präsentierter pMHC-I-Komplexe aktiviert werden. Nach adoptivem Transfer konnte gezeigt werden, dass eine hoch-avide CTLL eine WT.BAC-Infektion besser kontrolliert als eine nieder-avide CTLL (Ebert et al., 2012; Nauerth et al., 2013). Für den infizierten Wirt ist daher eine geringe Anzahl an hoch-aviden CD8 T-Zellen ausreichend, um einen Schutz zu induzieren. Ein direkter Einfluss der viralen Immunevasine auf die funktionelle Avidität mCMV-spezifischer

CD8 T-Zellen konnte allerdings nicht festgestellt werden (Böhm et al., 2008; Lemmermann et al., 2012).

5.2 Fazit und Ausblick

Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort im immunkompetenten Wirt potenziell sowohl von *Cross*-Präsentation viraler Antigene auf nicht-infizierten DC (Snyder et al., 2010, Torti et al., 2011b, Busche et al., 2013) als auch von direkter Antigenpräsentation auf infizierten Zellen initiiert werden kann (Nopora et al., 2012; Ong et al., 2013). Welcher der beiden Antigenpräsentationswege bei der Initiation der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort dominiert konnte jedoch bisher nicht abschließend geklärt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die direkte Präsentation viraler Antigene durch die vermehrte Bereitstellung des viralen Immunevasionsproteins m152 verstärkt unterdrückt. Hierfür wurde eine mCMV-Rekombinante generiert, die das Immunevasin m152 während der IE- und der E-Phase exprimiert. Nach Infektion immunkompetenter BALB/c-Mäuse verstärkte die vermehrte Bereitstellung von m152 die Immunevasion, unterdrückte das *Priming* antiviraler CD8 T-Zellen und verringerte die Kontrolle der Infektion im drainierenden LK. Diese Beobachtungen zeigten erstmals, dass das mCMV-spezifische CD8 T-Zell-*Priming*, wenn sowohl direkte als auch *Cross*-Präsentation zugelassen wird, maßgeblich von der direkten Antigenpräsentation bestimmt wird.

Weiterführend konnte gezeigt werden, dass auch nach mCMV-Infektion von *Cross*-Präsentations-defizienten Mäusen (Haplotyp H-2^b) eine antivirale CD8 T-Zellantwort initiiert wird. Diese Beobachtung bestätigt, dass die Initiation einer CD8 T-Zellantwort durch infizierte profAPC trotz viraler Immunevasionsmechanismen möglich ist. Allerdings war sowohl die antivirale CD8 T-Zellantwort als auch die Kontrolle der Infektion im Haplotyp H-2^b unabhängig von der viralen Immunevasion. Diese Beobachtungen sind möglicherweise zurückzuführen auf eine frühe Kontrolle der Infektion durch NK-Zellen, die zu einer verminderten Viruslast im LK führt. Bedingt durch die reduzierte Anzahl an APC im LK können die Immunevasine die antivirale CD8 T-Zellantwort nicht beeinflussen.

Eine Induktion des immunmodulatorischen Zytokins IFN γ im Haplotyp H-2^b konnte für eine selektive Aufhebung der Immunevasion ausgeschlossen werden. In einem zukünftigen Projekt sollte allerdings eine Gegenüberstellung des Zytokinmusters im drainierenden LK nach mCMV-Infektion in den Haplotypen H-2^b und H-2^d durchgeführt werden. Möglicherweise führt dies zur Identifizierung eines immunmodulatorischen Zytokins, das selektiv nach mCMV-Infektion im Haplotyp H-2^b induziert wird und die viralen Immunevasionsmechanismen aufhebt.

Im Fokus nachfolgender Arbeiten sollte die Identifizierung des Antigen-präsentierenden Zelltyps im LK während der akuten mCMV-Infektion stehen. Die vorliegende Arbeit lieferte erste Hinweise darauf, dass diese APC infiziert sein muss. Die Arbeit von Hsu et al. (2009)

konnte zeigen, dass in der frühen Phase der mCMV-Infektion 80% der infizierten Zellen im LK Makrophagen sind, und nicht wie bisher vermutet DC. Der Beitrag der direkten Antigenpräsentation auf Makrophagen wurde bisher nicht adressiert und kann nach Makrophagen-Depletion durch Applikation von liposomalem Clodronat in WT.BAC-infizierten, *Cross-Priming*-defizienten Mäusen bestimmt werden.

6 Literatur

- Ackerman AL, Giodini A, Cresswell P.** 2006. A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity* **25**:607–17.
- Ackerman AL, Kyritsis C, Tampé R, Cresswell P.** 2003. Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:12889–94.
- Adler B, Scrivano L, Ruzcics Z, Rupp B, Sinzger C, Koszinowski U.** 2006. Role of human cytomegalovirus UL131A in cell type-specific virus entry and release. *J. Gen. Virol.* **87**:2451–60.
- Adler H, Messerle M, Koszinowski UH.** 2001. Virus reconstituted from infectious bacterial artificial chromosome (BAC)-cloned murine gammaherpesvirus 68 acquires wild-type properties in vivo only after excision of BAC vector sequences. *J. Virol.* **75**:5692–96.
- Ahn K, Angulo A, Ghazal P, Peterson PA, Yang Y, Früh K.** 1996. Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:10990–5.
- Alexander-Miller MA, Leggatt GR, Berzofsky JA.** 1996. Selective expansion of high- or low-avidity cytotoxic T lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:4102–7.
- Andrews DM, Andoniou CE, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P, Degli-Esposti MA.** 2001. Infection of dendritic cells by murine cytomegalovirus induces functional paralysis. *Nat. Immunol.* **2**:1077–84.
- Angulo A, Ghazal P, Messerle M.** 2000. The major immediate-early gene *ie3* of mouse cytomegalovirus is essential for viral growth. *J. Virol.* **74**:11129–36.
- Arase H, Mocarski ES, Campbell AE, Hill AB, Lanier LL.** 2002. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* **296**:1323–6.
- Arstila TP, Casrouge A, Baron V, Even J, Kanellopoulos J, Kourilsky P.** 1999. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* **286**:958–61.
- Babić M, Pyzik M, Zafirova B, Mitrović M, Butorac V, Lanier LL, Krmpotić A, Vidal SM, Jonjić S.** 2010. Cytomegalovirus immunoevasin reveals the physiological role of “missing self” recognition in natural killer cell dependent virus control in vivo. *J. Exp. Med.* **207**:2663–73.
- Bagai R, Valujskikh A, Canaday DH, Bailey E, Lalli PN, Harding C V, Heeger PS.** 2005. Mouse endothelial cells cross-present lymphocyte-derived antigen on class I MHC via a TAP1- and proteasome-dependent pathway. *J. Immunol.* **174**:7711–5.
- Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R.** 2006. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**:682–7.
- Benedict CA, Loewendorf A, Garcia Z, Blazar BR, Janssen EM.** 2008. Dendritic cell programming by cytomegalovirus stunts naive T cell responses via the PD-L1/PD-1 pathway. *J. Immunol.* **180**:4836–4847.
- Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, Koup RA.** 2003. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J. Immunol. Methods* **281**:65–78.

- Bevan MJ.** 1976a. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J. Exp. Med.* **143**:1283–8.
- Bevan MJ.** 1976b. Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J. Virol.* **117**:2233–8.
- Bevan MJ.** 2006. Cross-priming. *Nat. Immunol.* **7**:363–5.
- Biron CA.** 2001. Interferons alpha and beta as immune regulators-a new look. *Immunity* **14**:661–4.
- Bitmansour AD, Waldrop SL, Pitcher CJ, Khatamzas E, Kern F, Maino VC, Picker LJ.** 2001. Clonotypic structure of the human CD4+ memory T cell response to cytomegalovirus. *J. Immunol.* **167**:1151–63.
- Blomfield IC, Vaughn V, Rest RF, Eisenstein BI.** 1991. Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis* sacB gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon. *Mol. Microbiol.* **5**:1447–57.
- Boeckh M.** 2011. Complications, diagnosis, management, and prevention of CMV infections: current and future. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **1**:305–9.
- Böhm V, Seckert CK, Simon CO, Thomas D, Renzaho A, Gendig D, Holtappels R, Reddehase MJ.** 2009. Immune evasion proteins enhance cytomegalovirus latency in the lungs. *J. Virol.* **83**:10293–8.
- Böhm V, Simon CO, Podlech J, Seckert CK, Gendig D, Deegen P, Gillert-Marien D, Lemmermann NAW, Holtappels R, Reddehase MJ.** 2008. The immune evasion paradox: immunoevasins of murine cytomegalovirus enhance priming of CD8 T cells by preventing negative feedback regulation. *J. Virol.* **82**:11637–50.
- Boppana SB, Britt WJ.** 2013. Synopsis of Clinical Aspects of Human Cytomegalovirus Disease. Kapitel II.1. p.1-25. In Reddehase MJ (ed.), *Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Boppana SB, Fowler KB, Vaid Y, Hedlund G, Stagno S, Britt WJ, Pass RF.** 1997. Neuroradiographic findings in the newborn period and long-term outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* **99**:409–14.
- Boppana SB, Pass RF, Britt WJ, Stagno S, Alford CA.** 1992. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatric. Infect. Dis. J.* **11**:93–9.
- Borst E, Hahn G, Koszinowski UH, Messerle M.** 1999. Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial art. *J. Virol.* **73**:8320–9.
- Bougnères L, Helft J, Tiwari S, Vargas P, Chang BH, Chan L, Campisi L, Lauvau G, Hugues S, Kumar P, Kamphorst AO, Dumenil AM, Nussenzweig M, MacMicking JD, Amigorena S, Guermonprez P.** 2009. A role for lipid bodies in the cross-presentation of phagocytosed antigens by MHC class I in dendritic cells. *Immunity* **31**:232–44.
- Brown MG, Dokun AO, Heusel JW, Smith HR, Beckman DL, Blattenberger EA, Dubbelde CE, Stone LR, Scalzo AA, Yokoyama WM.** 2001. Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* **292**:934–7.
- Brune W.** 2013. Molecular basis of cytomegalovirus host species specificity. Kapitel I.18. p.322-329. In Reddehase MJ (ed.), *Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.

- Bühler B, Keil GM, Weiland F, Koszinowski UH.** 1990. Characterization of the murine cytomegalovirus early transcription unit e1 that is induced by immediate-early proteins. *J. Virol.* **64**:1907–19.
- Bukowski JF, Woda BA, Welsh RM.** 1984. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *J. Virol.* **52**:119–28.
- Busche A, Angulo A, Kay-Jackson P, Ghazal P, Messerle M.** 2008. Phenotypes of major immediate-early gene mutants of mouse cytomegalovirus. *Med. Microbiol Immunol.* **197**:233–40.
- Busche A, Jirmo AC, Welten SPM, Zischke J, Noack J, Constabel H, Gatzke A-K, Keyser KA, Arens R, Behrens GMN, Messerle M.** 2013. Priming of CD8+ T cells against cytomegalovirus-encoded antigens is dominated by cross-presentation. *J. Immunol.* **190**:2767–77.
- Cannon M, Grosse D, Fowler KB.** 2013. The Epidemiology and Public Health Impact of Congenital Cytomegalovirus Infection. Kapitel II.25. p.26-48. In Reddehase MJ (ed.), *Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Cardin RD, Abenes GB, Stoddart CA, Mocarski ES.** 1995. Murine cytomegalovirus IE2, an activator of gene expression, is dispensable for growth and latency in mice. *Virology* **209**:236–41.
- Celli S, Day M, Müller AJ, Molina-Paris C, Lythe G, Bousso P.** 2012. How many dendritic cells are required to initiate a T-cell response? *Blood* **120**:3945–8.
- Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Tarkowski A.** 1983. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J. Immunol. Methods* **65**:109–121.
- Champagne P, Ogg GS, King AS, Knabenhans C, Ellefsen K, Nobile M, Appay V, Rizzardi GP, Fleury S, Lipp M, Förster R, Rowland-Jones S, Sékaly RP, McMichael AJ, Pantaleo G.** 2001. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* **410**:106–11.
- Chatellard P, Pankiewicz R, Meier E, Durrer L, Sauvage C, Imhof MO.** 2007. The IE2 promoter/enhancer region from mouse CMV provides high levels of therapeutic protein expression in mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.* **96**:106–17.
- Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, Horsnell T, Hutchison CA, Kouzarides T, Martignetti JA.** 1990. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **154**:125–69.
- Cicin-Sain L, Sylwester AW, Hagen SI, Siess DC, Currier N, Legasse AW, Fischer MB, Koudelka CW, Axthelm MK, Nikolich-Zugich J, Picker LJ.** 2011. Cytomegalovirus-specific T cell immunity is maintained in immunosenescent rhesus macaques. *J. Immunol.* **187**:1722–32.
- Compton T, Nepomuceno RR, Nowlin DM.** 1992. Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology* **191**:387–95.
- Compton T, Nowlin DM, Cooper NR.** 1993. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* **193**:834–41.
- Cox MA, Zajac AJ.** 2010. Shaping successful and unsuccessful CD8 T cell responses following infection. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**:159152.
- Crane MJ, Gaddi PJ, Salazar-Mather TP.** 2012. UNC93B1 mediates innate inflammation and antiviral defense in the liver during acute murine cytomegalovirus infection. *PLoS one* **7**:e39161.

- Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A.** 1983. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J. Immunol. Methods* **65**:109–21.
- Daniels KA, Devora G, Lai WC, O'Donnell CL, Bennett M, Welsh RM.** 2001. Murine cytomegalovirus is regulated by a discrete subset of natural killer cells reactive with monoclonal antibody to Ly49H. *J. Exp. Med.* **194**:29–44.
- Davison AJ, Holton M, Dolan A, Dargan DJ, Gatherer D, Hayward GS.** 2013. Comparative Genomics of Primate Cytomegaloviruses. Kapitel I.1. p.1-22. In Reddehase MJ (ed.), *Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Del Val M, Hengel H, Häcker H, Hartlaub U, Ruppert T, Lucin P, Koszinowski UH.** 1992. Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide-loaded major histocompatibility complex class I molecules into the medial-Golgi compartment. *J. Exp. Med.* **176**:729–38.
- Del Val M, Münch K, Reddehase MJ, Koszinowski UH.** 1989. Presentation of CMV immediate-early antigen to cytolytic T lymphocytes is selectively prevented by viral genes expressed in the early phase. *Cell* **58**:305–15.
- Dolan A, Cunningham C, Hector RD, Hassan-Walker AF, Lee L, Addison C, Dargan DJ, McGeoch DJ, Gatherer D, Emery VC, Griffiths PD, Sinzger C, McSharry BP, Wilkinson GWG, Davison AJ.** 2004. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* **85**:1301–12.
- Dolan BP, Gibbs KD, Ostrand-Rosenberg S.** 2006. Dendritic cells cross-dressed with peptide MHC class I complexes prime CD8+ T cells. *J. Immunol.* **177**:6018–24.
- Dresch C, Leverrier Y, Marvel J, Shortman K.** 2012. Development of antigen cross-presentation capacity in dendritic cells. *Trends Immunol.* **33**:381–8.
- Dunn W, Chou C, Li H, Hai R, Patterson D, Stolc V, Zhu H, Liu F.** 2003. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:14223–8.
- Durfee T, Nelson R, Baldwin S, Plunkett G, Burland V, Mau B, Petrosino JF, Qin X, Muzny DM, Ayele M, Gibbs R a, Csörgo B, Pósfai G, Weinstock GM, Blattner FR.** 2008. The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *J. Bacteriol.* **190**:2597–606.
- Ebert S, Podlech J, Gillert-Marien D, Gergely KM, Büttner JK, Fink A, Freitag K, Thomas D, Reddehase MJ, Holtappels R.** 2012. Parameters determining the efficacy of adoptive CD8 T-cell therapy of cytomegalovirus infection. *Med. Microbiol. Immunol.* **201**:527–39.
- Feire AL, Compton T.** 2013. Virus entry and activation of innate defence. Kapitel I.8. p.125-40. In Reddehase MJ (ed.), *Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Feire AL, Koss H, Compton T.** 2004. Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:15470–5.
- Fink A, Lemmermann NAW, Gillert-Marien D, Thomas D, Freitag K, Böhm V, Wilhelmi V, Reifenberg K, Reddehase MJ, Holtappels R.** 2012. Antigen presentation under the influence of “immune evasion” proteins and its modulation by interferon-gamma: implications for immunotherapy of cytomegalovirus infection with antiviral CD8 T cells. *Med. Microbiol. Immunol.* **201**:513–25.

- Fink A, Renzaho A, Reddehase MJ, Lemmermann AW.** 2013. The p36 isoform of murine cytomegalovirus m152 protein suffices for mediating innate and adaptive immune evasion *Viruses* **5**: Akzeptiert für Online-Publikation.
- Fowler KB, Stagno S, Pass RF, Britt WJ, Boll TJ, Alford CA.** 1992. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *NEJM* **326**:663–7.
- Fraile-Ramos A, Kledal TN, Pelchen-Matthews A, Bowers K, Schwartz TW, Marsh M.** 2001. The human cytomegalovirus US28 protein is located in endocytic vesicles and undergoes constitutive endocytosis and recycling. *Molecular Biology of the Cell* **12**:1737–49.
- Gagnon E, Duclos S, Rondeau C, Chevet E, Cameron PH, Steele-Mortimer O, Paiement J, Bergeron JJM, Desjardins M.** 2002. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* **110**:119–31.
- Gamadia LE, Remmerswaal EBM, Weel JF, Bemelman F, Van Lier RAW, Ten Berge IJM.** 2003. Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4+ T cells in protection against CMV disease. *Blood* **101**:2686–92.
- Geginat G, Ruppert T, Hengel H, Holtappels R, Koszinowski UH.** 1997. IFN-gamma is a prerequisite for optimal antigen processing of viral peptides in vivo. *J. Immunol.* **158**:3303–10.
- Gerna G, Percivalle E, Lilleri D, Lozza L, Fornara C, Hahn G, Baldanti F, Revello MG.** 2005. Dendritic-cell infection by human cytomegalovirus is restricted to strains carrying functional UL131-128 genes and mediates efficient viral antigen presentation to CD8+ T cells. *J. Gen. Virol.* **86**:275–84.
- Gibson W, Bogner E.** 2013. Morphogenesis of the cytomegalovirus virion and subviral particles. Kapitel 1.13. p.230-46. In Reddehase MJ (ed.), *Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Gillespie GM, Wills MR, Appay V, O’Callaghan C, Murphy M, Smith N, Sissons P, Rowland-Jones S, Bell JI, Moss PA.** 2000. Functional heterogeneity and high frequencies of cytomegalovirus-specific CD8(+) T lymphocytes in healthy seropositive donors. *J. Virol.* **74**:8140–50.
- Gold MC, Munks MW, Wagner M, Koszinowski UH, Hill AB, Fling SP.** 2002. The murine cytomegalovirus immunomodulatory gene m152 prevents recognition of infected cells by M45-specific CTL but does not alter the immunodominance of the M45-specific CD8 T cell response in vivo. *J. Immunol.* **169**:359–65.
- Goldszmid RS, Caspar P, Rivollier A, White S, Dzutsev A, Hiemy S, Kelsall B, Trinchieri G, Sher A.** 2012. NK cell-derived interferon- γ orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection. *Immunity* **36**:1047–59.
- Gribaudo G, Riera L, Lembo D, De Andrea M, Gariglio M, Rudge TL, Johnson LF, Landolfo S.** 2000. Murine cytomegalovirus stimulates cellular thymidylate synthase gene expression in quiescent cells and requires the enzyme for replication. *J. Virol.* **74**:4979–87.
- Griffiths P, Plotkin S, Mocarski E, Pass R, Schleiss M, Krause P, Bialek S.** 2013. Desirability and feasibility of a vaccine against cytomegalovirus. *Vaccine* **31 Suppl 2**:B197–203.
- Grzimek NK, Dreis D, Schmalz S, Reddehase MJ.** 2001. Random, asynchronous, and asymmetric transcriptional activity of enhancer-flanking major immediate-early genes ie1/3 and ie2 during murine cytomegalovirus latency in the lungs. *J. Virol.* **75**:2692–705.

- Guermonez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, Amigorena S.** 2003. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* **425**:397–402.
- Hahn G, Revello MG, Patrone M, Percivalle E, Campanini G, Sarasini A, Wagner M, Gallina A, Milanesi G, Koszinowski U, Baldanti F, Gerna G.** 2004. Human cytomegalovirus UL131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes. *J. Virol.* **78**:10023–33.
- Hammer GE, Ma A.** 2013. Molecular control of steady-state dendritic cell maturation and immune homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* **31**:743–91.
- Hansen SG, Sacha JB, Hughes CM, Ford JC, Burwitz BJ, Scholz I, Gilbride RM, Lewis MS, Gilliam AN, Ventura AB, Malouli D, Xu G, Richards R, Whizin N, Reed JS, Hammond KB, Fischer M, Turner JM, Legasse AW, Axthelm MK, Edlefsen PT, Nelson JA, Lifson JD, Früh K, Picker LJ.** 2013. Cytomegalovirus vectors violate CD8+ T cell epitope recognition paradigms. *Science* **340**:1237874.
- Hansen TH, Bouvier M.** 2009. MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies. *Nature reviews. Immunology* **9**:503–13.
- Hashimoto-Gotoh T, Franklin FC, Nordheim A, Timmis KN.** 1981. Specific-purpose plasmid cloning vectors. I. Low copy number, temperature-sensitive, mobilization-defective pSC101-derived containment vectors. *Gene* **16**:227–35.
- Hengel H, Lucin P, Jonjić S, Ruppert T, Koszinowski UH.** 1994. Restoration of cytomegalovirus antigen presentation by gamma interferon combats viral escape. *J. Virol.* **68**:289–97.
- Henrickson SE, Mempel TR, Mazo IB, Liu B, Artyomov MN, Zheng H, Peixoto A, Flynn MP, Senman B, Junt T, Wong HC, Chakraborty AK, Von Andrian UH.** 2008. T cell sensing of antigen dose governs interactive behavior with dendritic cells and sets a threshold for T cell activation. *Nature Immunol.* **9**:282–91.
- Henson SM, Franzese O, Macaulay R, Libri V, Azevedo RI, Kiani-Alikhan S, Plunkett FJ, Masters JE, Jackson S, Griffiths SJ, Pircher H-P, Soares MVD, Akbar AN.** 2009. KLRG1 signaling induces defective Akt (ser473) phosphorylation and proliferative dysfunction of highly differentiated CD8+ T cells. *Blood* **113**:6619–28.
- Hesse J, Ameres S, Besold K, Krauter S, Moosmann A, Plachter B.** 2013. Suppression of CD8+ T-cell recognition in the immediate-early phase of human cytomegalovirus infection. *J. Gen. Virol.* **94**:376–86.
- Hickman HD, Takeda K, Skon CN, Murray FR, Hensley SE, Loomis J, Barber GN, Bennink JR, Yewdell JW.** 2008. Direct priming of antiviral CD8+ T cells in the peripheral interfollicular region of lymph nodes. *Nature Immunol.* **9**:155–65.
- Hildner K, Edelson BT, Purtha WE, Diamond M, Matsushita H, Kohyama M, Calderon B, Schraml BU, Unanue ER, Diamond MS, Schreiber RD, Murphy TL, Murphy KM.** 2008. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* **322**:1097–100.
- Hisamatsu H, Shimbara N, Saito Y, Kristensen P, Hendil KB, Fujiwara T, Takahashi E, Tanahashi N, Tamura T, Ichihara A, Tanaka K.** 1996. Newly identified pair of proteasomal subunits regulated reciprocally by interferon gamma. *J. Exp. Med.* **183**:1807–16.
- Holtappels R, Pahl-Seibert MF, Thomas D, Reddehase MJ.** 2000a. Enrichment of immediate-early 1 (m123/pp89) peptide-specific CD8 T cells in a pulmonary CD62L(lo) memory-effector cell pool during latent murine cytomegalovirus infection of the lungs. *J. Virol.* **74**:11495–503.

- Holtappels R, Podlech J, Geginat G, Steffens HP, Thomas D, Reddehase MJ.** 1998. Control of murine cytomegalovirus in the lungs: relative but not absolute immunodominance of the immediate-early 1 nonapeptide during the antiviral cytolytic T-lymphocyte response in pulmonary infiltrates. *J. Virol.* **72**:7201–12.
- Holtappels R, Podlech J, Grzimek NK, Thomas D, Pahl-Seibert MF, Reddehase MJ.** 2001. Experimental preemptive immunotherapy of murine cytomegalovirus disease with CD8 T-cell lines specific for ppM83 and pM84, the two homologs of human cytomegalovirus tegument protein ppUL83 (pp65). *J. Virol.* **75**:6584–600.
- Holtappels R, Thomas D, Reddehase MJ.** 2000b. Identification of a K(d)-restricted antigenic peptide encoded by murine cytomegalovirus early gene M84. *J. Gen. Virol.* **81**:3037–42.
- Holtappels R, Böhm V, Podlech J, Reddehase MJ.** 2008a. CD8 T-cell-based immunotherapy of cytomegalovirus infection: “proof of concept” provided by the murine model. *Med. Microbiol. Immunol.* **197**:125–34.
- Holtappels R, Gillert-Marien D, Thomas D, Podlech J, Deegen P, Herter S, Oehrlein-Karpi SA, Strand D, Wagner M, Reddehase MJ.** 2006. Cytomegalovirus encodes a positive regulator of antigen presentation. *J. Virol.* **80**:7613–24.
- Holtappels R, Grzimek NKA, Simon CO, Thomas D, Dreis D, Reddehase MJ.** 2002a. Processing and presentation of murine cytomegalovirus pORFm164-derived peptide in fibroblasts in the face of all viral immunosubversive early gene functions. *J. Virol.* **76**:6044–53.
- Holtappels R, Grzimek NK a, Thomas D, Reddehase MJ.** 2002b. Early gene m18, a novel player in the immune response to murine cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* **83**:311–6.
- Holtappels R, Podlech J, Pahl-Seibert M-F, Jülch M, Thomas D, Simon CO, Wagner M, Reddehase MJ.** 2004. Cytomegalovirus misleads its host by priming of CD8 T cells specific for an epitope not presented in infected tissues. *J. Exp. Med.* **199**:131–6.
- Holtappels R, Simon CO, Munks MW, Thomas D, Deegen P, Kühnapfel B, Däubner T, Emde SF, Podlech J, Grzimek NKA, Oehrlein-Karpi SA, Hill AB, Reddehase MJ.** 2008b. Subdominant CD8 T-cell epitopes account for protection against cytomegalovirus independent of immunodomination. *J. Virol.* **82**:5781–96.
- Holtappels R, Thomas D, Podlech J, Geginat G, Steffens HP, Reddehase MJ.** 2000b. The putative natural killer decoy early gene m04 (gp34) of murine cytomegalovirus encodes an antigenic peptide recognized by protective antiviral CD8 T cells. *J. Virol.* **74**:1871-1884.
- Holtappels R, Thomas D, Podlech J, Reddehase MJ.** 2002c. Two antigenic peptides from genes m123 and m164 of murine cytomegalovirus quantitatively dominate CD8 T-cell memory in the H-2d haplotype. *J. Virol.* **76**:151–64.
- Holtappels R, Thomas D, Reddehase MJ.** 2009. The efficacy of antigen processing is critical for protection against cytomegalovirus disease in the presence of viral immune evasion proteins. *J. Virol.* **83**:9611–5.
- Houde M, Bertholet S, Gagnon E, Brunet S, Goyette G, Laplante A, Princiotta MF, Thibault P, Sacks D, Desjardins M.** 2003. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* **425**:402–6.
- Hsu KM, Pratt JR, Akers WJ, Achilefu SI, Yokoyama WM.** 2009. Murine cytomegalovirus displays selective infection of cells within hours after systemic administration. *J. Gen. Virol.* **90**:33–43.
- Huang S, Hendriks W, Althage A, Hemmi S, Bluethmann H, Kamijo R, Vilcek J, Zinkernagel RM, Aguet M.** 1993. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* **259**:1742–5.

- Hughes EA, Hammond C, Cresswell P.** 1997. Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Virol.* **94**:1896–901.
- Hutchinson S, Sims S, O'Hara G, Silk J, Gileadi U, Cerundolo V, Klenerman P.** 2011. A dominant role for the immunoproteasome in CD8+ T cell responses to murine cytomegalovirus. *PLoS one* **6**:e14646.
- Ibanez CE, Schrier R, Ghazal P, Wiley C, Nelson JA.** 1991. Human cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages. *J. Virol.* **65**:6581–8.
- Ibegbu CC, Xu Y-X, Harris W, Maggio D, Miller JD, Kourtis AP.** 2005. Expression of killer cell lectin-like receptor G1 on antigen-specific human CD8+ T lymphocytes during active, latent, and resolved infection and its relation with CD57. *J. Immunol.* **174**:6088–94.
- Janssen E, Tabeta K, Barnes MJ, Rutschmann S, McBride S, Bahjat KS, Schoenberger SP, Theofilopoulos AN, Beutler B, Hoebe K.** 2006. Efficient T cell activation via a Toll-Interleukin 1 Receptor-independent pathway. *Immunity* **24**:787–99.
- Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S.** 2012. Cross-presentation by dendritic cells. *Nature reviews. Immunology* **12**:557–69.
- Jones TR, Wiertz EJ, Sun L, Fish KN, Nelson JA, Ploegh HL.** 1996. Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:11327–33.
- Jonjić S, Mutter W, Weiland F, Reddehase MJ, Koszinowski UH.** 1989. Site-restricted persistent cytomegalovirus infection after selective long-term depletion of CD4+ T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **169**:1199–212.
- Jordan S, Krause J, Prager A, Mitrovic M, Jonjic S, Koszinowski UH, Adler B.** 2011. Virus progeny of murine cytomegalovirus bacterial artificial chromosome pSM3fr show reduced growth in salivary Glands due to a fixed mutation of MCK-2. *J. Virol.* **85**:10346–53.
- Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano GI, De los Santos K, Sparwasser T, Wu S, Vuthoori S, Ko K, Zavala F, Pamer EG, Littman DR, Lang RA.** 2002. In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* **17**:211–20.
- Kahn J, Ingraham RH, Shirley F, Migaki GI, Kishimoto TK.** 1994. Membrane proximal cleavage of L-selectin: identification of the cleavage site and a 6-kD transmembrane peptide fragment of L-selectin. *JCB* **125**:461–70.
- Kalejta RF.** 2008. Functions of human cytomegalovirus tegument proteins prior to immediate early gene expression. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **325**:101–15.
- Kärre K.** 2008. Natural killer cell recognition of missing self. *Nature Immunol.* **9**:477–80.
- Karrer U, Sierro S, Wagner M, Oxenius A, Hengel H, Koszinowski UH, Phillips RE, Klenerman P.** 2003. Memory inflation: continuous accumulation of antiviral CD8+ T cells over time. *J. Immunol.* **170**:2022–9.
- Kattenhorn LM, Mills R, Wagner M, Lomsadze A, Makeev V, Borodovsky M, Ploegh HL, Kessler BM.** 2004. Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions. *J. Virol.* **78**:11187–97.

- Keil GM, Ebeling-Keil A, Koszinowski UH.** 1984. Temporal regulation of murine cytomegalovirus transcription and mapping of viral RNA synthesized at immediate early times after infection. *J. Virol.* **50**:784–95.
- Keil GM, Ebeling-Keil A, Koszinowski UH.** 1987. Immediate-early genes of murine cytomegalovirus: location, transcripts, and translation products. *J. Virol.* **61**:526–33.
- Kerksiek KM, Niedergang F, Chavrier P, Busch DH, Brocker T.** 2005. Selective Rac1 inhibition in dendritic cells diminishes apoptotic cell uptake and cross-presentation in vivo. *Blood* **105**:742–9.
- Kleijnen MF, Huppa JB, Lucin P, Mukherjee S, Farrell H, Campbell AE, Koszinowski UH, Hill AB, Ploegh HL.** 1997. A mouse cytomegalovirus glycoprotein, gp34, forms a complex with folded class I MHC molecules in the ER which is not retained but is transported to the cell surface. *EMBO J.* **16**:685–94.
- Klemola E, Von Essen R, Henle G, Henle W.** 1970. Infectious-mononucleosis-like disease with negative heterophil agglutination test. Clinical features in relation to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus antibodies. *J. Infect. Dis.* **121**:608–14.
- Kloetzel PM.** 2001. Antigen processing by the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**:179–87.
- Koffron AJ, Patterson BK, Yan S, Kaufman DB, Fryer JP, Stuart FP, Abecassis MI.** 1997. Latent human cytomegalovirus: a functional study. *Trans. Proc.* **29**:793–5.
- Kovacsovics-Bankowski M, Rock KL.** 1995. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* **267**:243–6.
- Krmpotić A, Messerle M, Crnkovic-Mertens I, Polic B, Jonjic S, Koszinowski UH.** 1999. The immunoevasive function encoded by the mouse cytomegalovirus gene m152 protects the virus against T cell control in vivo. *J. Exp. Med.* **190**:1285–96.
- Krmpotić A, Busch DH, Bubić I, Gebhardt F, Hengel H, Hasan M, Scalzo AA, Koszinowski UH, Jonjic S.** 2002. MCMV glycoprotein gp40 confers virus resistance to CD8⁺ T cells and NK cells in vivo. *Nature Immunol.* **3**:529–35.
- Kropp KA, Simon CO, Fink A, Renzaho A, Kühnapfel B, Podlech J, Reddehase MJ, Grzimek NKA.** 2009. Synergism between the components of the bipartite major immediate-early transcriptional enhancer of murine cytomegalovirus does not accelerate virus replication in cell culture and host tissues. *J. Gen. Virol.* **90**:2395–401.
- Kurz SK, Rapp M, Steffens HP, Grzimek NK, Schmalz S, Reddehase MJ.** 1999. Focal transcriptional activity of murine cytomegalovirus during latency in the lungs. *J. Virol.* **73**:482–94.
- Kurz S, Steffens HP, Mayer A, Harris JR, Reddehase MJ.** 1997. Latency versus persistence or intermittent recurrences: evidence for a latent state of murine cytomegalovirus in the lungs. *J. Virol.* **71**:2980–7.
- Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D.** 2003. The human cytomegalovirus. *Pharmacol. Ther.* **98**:269–97.
- Lee SH, Webb JR, Vidal SM.** 2002. Innate immunity to cytomegalovirus: the Cmv1 locus and its role in natural killer cell function. *Microbes Infect.* **4**:1491–503.
- Lemmermann NAW, Böhm V, Holtappels R, Reddehase MJ.** 2011. In vivo impact of cytomegalovirus evasion of CD8 T-cell immunity: facts and thoughts based on murine models. *Virus Research* **157**:161–74.

- Lemmermann NAW, Fink A, Podlech J, Ebert S, Wilhelmi V, Böhm V, Holtappels R, Reddehase MJ.** 2012. Murine cytomegalovirus immune evasion proteins operative in the MHC class I pathway of antigen processing and presentation: state of knowledge, revisions, and questions. *Med. Microbiol. Immunol.* **201**:497–512.
- Lemmermann NAW, Gergely K, Böhm V, Deegen P, Däubner T, Reddehase MJ.** 2010a. Immune evasion proteins of murine cytomegalovirus preferentially affect cell surface display of recently generated peptide presentation complexes. *J. Virol.* **84**:1221–36.
- Lemmermann NAW, Podlech J, Seckert CK, Kropp KA, Grzimek NKA, Reddehase MJ, and Holtappels R.** 2010b. CD8 T-cell immunotherapy of cytomegalovirus disease in the murine model. In S.H.E. Kaufmann and D. Kabelitz (ed.), *Methods in Microbiology, Immunology of Infection*, 3rd ed., Vol. 37. Academic Press, London and San Diego, Cal.
- Limmer A, Ohl J, Kurts C, Ljunggren HG, Reiss Y, Groettrup M, Momburg F, Arnold B, Knolle PA.** 2000. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat. Med.* **6**:1348–54.
- Lin ML, Zhan Y, Proietto AI, Prato S, Wu L, Heath WR, Villadangos JA, Lew AM.** 2008. Selective suicide of cross-presenting CD8+ dendritic cells by cytochrome c injection shows functional heterogeneity within this subset. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**:3029–34.
- Lisnić VJ, Krmpotić A, Jonjić S.** 2010. Modulation of natural killer cell activity by viruses. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**:530–9.
- Lodoen M, Ogasawara K, Hamerman JA, Arase H, Houchins JP, Mocarski ES, Lanier LL.** 2003. NKG2D-mediated natural killer cell protection against cytomegalovirus is impaired by viral gp40 modulation of retinoic acid early inducible 1 gene molecules. *J. Exp. Med.* **197**:1245–53.
- Loh J, Chu DT, O'Guin AK, Yokoyama WM, Virgin HW.** 2005. Natural killer cells utilize both perforin and gamma interferon to regulate murine cytomegalovirus infection in the spleen and liver. *J. Virol.* **79**:661–7.
- LoPiccolo DM, Gold MC, Kavanagh DG, Wagner M, Koszinowski UH, Hill AB.** 2003. Effective inhibition of K(b)- and D(b)-restricted antigen presentation in primary macrophages by murine cytomegalovirus. *J. Virol.* **77**:301–8.
- Lu X, Kavanagh DG, Hill AB.** 2006. Cellular and molecular requirements for association of the murine cytomegalovirus protein m4/gp34 with major histocompatibility complex class I molecules. *J. Virol.* **80**:6048–55.
- Lucin P, Pavić I, Polić B, Jonjić S, Koszinowski UH.** 1992. Gamma interferon-dependent clearance of cytomegalovirus infection in salivary glands. *J. Virol.* **66**:1977–84.
- Ma W, Lehner PJ, Cresswell P, Pober JS, Johnson DR.** 1997. Interferon-gamma rapidly increases peptide transporter (TAP) subunit expression and peptide transport capacity in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **272**:16585–90.
- Mach M, Wieggers AK, Spindler N, Winkler T.** 2013. Protective humoral immunity. Kapitel II.33. p.214-30. In Reddehase MJ (ed.), *Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Manning WC, Mocarski ES.** 1988. Insertional mutagenesis of the murine cytomegalovirus genome: one prominent alpha gene (ie2) is dispensable for growth. *Virology* **167**:477–84.
- Marcinowski L, Lidschreiber M, Windhager L, Rieder M, Bosse JB, Rädle B, Bonfert T, Györy I, De Graaf M, Prazeres da Costa O, Rosenstiel P, Friedel CC, Zimmer R, Ruzsics Z, Dölken L.** 2012. Real-time transcriptional profiling of cellular and viral gene expression during lytic cytomegalovirus infection. *PLoS Pathog.* **8**:e1002908.

- Marks JR, Spector DH.** 1988. Replication of the murine cytomegalovirus genome: structure and role of the termini in the generation and cleavage of concatamers. *Virology* **162**:98–107.
- Martínez FP, Cosme RSC, Tang Q.** 2010. Murine cytomegalovirus major immediate-early protein 3 interacts with cellular and viral proteins in viral DNA replication compartments and is important for early gene activation. *J. Gen. Virol.* **91**:2664–76.
- Martín-Fontecha A, Sebastiani S, Höpken UE, Ugucioni M, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F.** 2003. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J. Exp. Med.* **198**:615–21.
- Masopust D, Vezys V, Marzo AL, Lefrançois L.** 2001. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* **291**:2413–7.
- Meier JL, Stinski MF.** 2013. Major immediate-early enhancer and its gene products. Kapitel I.10. p.152-73. In Reddehase MJ (ed.), *Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Messerle M, Bühler B, Keil GM, Koszinowski UH.** 1992. Structural organization, expression, and functional characterization of the murine cytomegalovirus immediate-early gene 3. *J. Virol.* **66**:27–36.
- Messerle M, Crnkovic I, Hammerschmidt W, Ziegler H, Koszinowski UH.** 1997. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:14759–63.
- Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H.** 2006. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**:423–9.
- Michel D, Chevillotte M, Mertens T.** 2013. Antiviral therapy, drug resistance and computed resistance profiling. Kapitel II.42. p.400-21. In Reddehase MJ (ed.), *Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A.** 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* **11**:231–8.
- Mitrović M, Arapović J, Jordan S, Fodil-Cornu N, Ebert S, Vidal SM, Krmpotić A, Reddehase MJ, Jonjić S.** 2012. The NK cell response to mouse cytomegalovirus infection affects the level and kinetics of the early CD8(+) T-cell response. *J. Virol.* **86**:2165–75.
- Mocarski ES, Shenk T, Griffiths PD, Pass RF.** 2013. Cytomegaloviruses, p.1960-2014. In Knipe DM, Howley PM (eds.), *Fields Virology* 6th Edition. Lippincott Williams and Wilkins, New York, USA.
- Moskophidis D, Lechner F, Pircher H, Zinkernagel RM.** 1993. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature* **362**:758–61.
- Munks MW, Cho KS, Pinto AK, Sierro S, Klenerman P, Hill AB.** 2006a. Four distinct patterns of memory CD8 T cell responses to chronic murine cytomegalovirus infection. *J. Immunol.* **177**:450–8.
- Munks MW, Gold MC, Zajac AL, Doom CM, Morello CS, Spector DH, Hill AB.** 2006b. Genome-wide analysis reveals a highly diverse CD8 T cell response to murine cytomegalovirus. *J. Immunol.* **176**:3760–6.

- Munks MW, Pinto AK, Doom CM, Hill AB.** 2007. Viral interference with antigen presentation does not alter acute or chronic CD8 T cell immunodominance in murine cytomegalovirus infection. *J. Immunol.* **178**:7235–41.
- Mutter W, Reddehase MJ, Busch FW, Bühring HJ, Koszinowski UH.** 1988. Failure in generating hemopoietic stem cells is the primary cause of death from cytomegalovirus disease in the immunocompromised host. *J. Exp. Med.* **167**:1645–58.
- Myerson D, Hackman RC, Nelson JA, Ward DC, McDougall JK.** 1984. Widespread presence of histologically occult cytomegalovirus. *Hum. Pathol.* **15**:430–9.
- Nagata S.** 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* **88**:355–65.
- Nauerth M, Weißbrich B, Knall R, Franz T, Dössinger G, Bet J, Paszkiewicz PJ, Pfeifer L, Bunse M, Uckert W, Holtappels R, Gillert-Marien D, Neuenhahn M, Krackhardt A, Reddehase MJ, Riddell SR, Busch DH.** 2013. TCR-ligand koff rate correlates with the protective capacity of antigen-specific CD8+ T cells for adoptive transfer. *Sci. Transl. Med.* **192**:192ra87
- Neefjes J, Jongsma MLM, Paul P, Bakke O.** 2011. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **11**:823–36.
- Neijssen J, Herberts C, Drijfhout JW, Reits E, Janssen L, Neefjes J.** 2005. Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature* **434**:83–8.
- Nierkens S, Tel J, Janssen E, Adema GJ.** 2013. Antigen cross-presentation by dendritic cell subsets: one general or all sergeants? *Trends Immunol.* **34**: 361-70.
- Nopora K, Bernhard CA, Ried C, Castello AA, Murphy KM, Marconi P, Koszinowski U, Brocker T.** 2012. MHC class I cross-presentation by dendritic cells counteracts viral immune evasion. *Front. Immunol.* **3**:348.
- Norbury CC, Malide D, Gibbs JS, Bennink JR, Yewdell JW.** 2002. Visualizing priming of virus-specific CD8+ T cells by infected dendritic cells in vivo. *Nat. Immunol.* **3**:265–71.
- Noriega V, Redmann V, Gardner T, Tortorella D.** 2012. Diverse immune evasion strategies by human cytomegalovirus. *Immunol. Res.* **54**:140–51.
- Obar JJ, Lefrançois L.** 2010a. Early signals during CD8 T cell priming regulate the generation of central memory cells. *J. Immunol.* **185**:263–72.
- Obar JJ, Lefrançois L.** 2010b. Memory CD8+ T cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1183**:251–66.
- O'Connor M, Peifer M, Bender W.** 1989. Construction of large DNA segments in *Escherichia coli*. *Science* **244**:1307–12.
- Ojala PM, Sodeik B, Ebersold MW, Kutay U, Helenius A.** 2000. Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **20**:4922–31.
- Ong ML, Wikstrom ME, Fleming P, Estcourt MJ, Hertzog PJ, Hill GR, Andoniou CE, Degli-Esposti MA.** 2013. CpG pre-treatment enhances anti-viral T cell immunity against cytomegalovirus. *Blood* **122**: 50-60.
- Osborn JE, Walker DL.** 1968. Enhancement of infectivity of murine cytomegalovirus in vitro by centrifugal inoculation. *J. Virol.* **2**:853–8.

- Palmowski MJ, Gileadi U, Salio M, Gallimore A, Millrain M, James E, Addey C, Scott D, Dyson J, Simpson E, Cerundolo V.** 2006. Role of immunoproteasomes in cross-presentation. *J. Immunol.* **177**:983–90.
- Pang B, Neijssen J, Qiao X, Janssen L, Janssen H, Lippuner C, Neefjes J.** 2009. Direct antigen presentation and gap junction mediated cross-presentation during apoptosis. *J. Immunol.* **183**:1083–90.
- Park B, Kim Y, Shin J, Lee S, Cho K, Früh K, Lee S, Ahn K.** 2004. Human cytomegalovirus inhibits tapasin-dependent peptide loading and optimization of the MHC class I peptide cargo for immune evasion. *Immunity* **20**:71–85.
- Pellett PE, Roizman B.** 2013. Herpesviridae. p.1802-22. In Knipe DM, Howley PM (eds.), *Fields Virology 6th Edition*. Lippincott Williams and Wilkins, New York, USA.
- Perez KJ, Martínez FP, Cosme-Cruz R, Perez-Crespo NM, Tang Q.** 2013. A short cis-acting motif in the M112-113 promoter region is essential for IE3 to activate M112-113 gene expression and is important for murine cytomegalovirus replication. *J. Virol.* **87**:2639–47.
- Pinto AK, Munks MW, Koszinowski UH, Hill AB.** 2006. Coordinated function of murine cytomegalovirus genes completely inhibits CTL lysis. *J. Immunol.* **177**:3225–34.
- Plotkin SA, Plachter B.** 2013. Cytomegalovirus vaccine: on the way to the future? Kapitel II.43. p.422-47. In Reddehase MJ (ed.), *Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Podlech J, Holtappels R, Grzimek NKA, Reddehase MJR.** 2002. Animal models: murine cytomegalovirus. p.493-525. In S. H. E. Kaufmann and D. Kabelitz (ed.), *Methods in Microbiology, Immunology of Infection*, 2nd ed., vol. 32. Academic Press, London and San Diego, Cal.
- Podlech J, Holtappels R, Pahl-Seibert MF, Steffens HP, Reddehase MJ.** 2000. Murine model of interstitial cytomegalovirus pneumonia in syngeneic bone marrow transplantation: persistence of protective pulmonary CD8-T-cell infiltrates after clearance of acute infection. *J. Virol.* **74**:7496–507.
- Podlech J, Holtappels R, Wirtz N, Steffens HP, Reddehase MJ.** 1998. Reconstitution of CD8 T cells is essential for the prevention of multiple-organ cytomegalovirus histopathology after bone marrow transplantation. *J. Gen. Virol.* **79 (Pt 9)**:2099–104.
- Prlic M, Hernandez-Hoyos G, Bevan MJ.** 2006. Duration of the initial TCR stimulus controls the magnitude but not functionality of the CD8+ T cell response. *J. Exp. Med.* **203**:2135–43.
- Raftery MJ, Schwab M, Eibert SM, Samstag Y, Walczak H, Schönrich G.** 2001. Targeting the function of mature dendritic cells by human cytomegalovirus: a multilayered viral defense strategy. *Immunity* **15**:997–1009.
- Rawlinson WD, Farrell HE, Barrell BG.** 1996. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J. Virol.* **70**:8833–49.
- Reddehase MJ, Bühring HJ, Koszinowski UH.** 1986. Cloned long-term cytolytic T-lymphocyte line with specificity for an immediate-early membrane antigen of murine cytomegalovirus. *J. Virol.* **57**:408–12.
- Reddehase MJ, Mutter W, Münch K, Bühring HJ, Koszinowski UH.** 1987. CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *J. Virol.* **61**:3102–8.

- Reddehase MJ, Rothbard JB, Koszinowski UH.** 1989. A pentapeptide as minimal antigenic determinant for MHC class I-restricted T lymphocytes. *Nature* **337**:651–3.
- Reddehase MJ, Simon CO, Seckert CK, Lemmermann N, Grzimek NKA.** 2008. Murine model of cytomegalovirus latency and reactivation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **325**:315–31.
- Reddehase MJ.** 2002. Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nature reviews. Immunology* **2**:831–44.
- Reddehase MJ, Simon CO, Podlech J, Holtappels R.** 2004. Stalemating a clever opportunist: lessons from murine cytomegalovirus. *Hum. Immunol.* **65**:446–55.
- Redwood AJ, Shellam GR, Smith LM.** 2013. Molecular Evolution of Murine Cytomegalovirus Genomes. Kapitel 1.2. p.23-34. In Reddehase MJ (ed.), *Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Rentenaar RJ, Gamadia LE, Van DerHoek N, Van Diepen FN, Boom R, Weel JF, Wertheim-van Dillen PM, Van Lier RA, Ten Berge IJ.** 2000. Development of virus-specific CD4(+) T cells during primary cytomegalovirus infection. *J Clin. Invest.* **105**:541–8.
- Reusch U, Muranyi W, Lucin P, Burgert HG, Hengel H, Koszinowski UH.** 1999. A cytomegalovirus glycoprotein re-routes MHC class I complexes to lysosomes for degradation. *EMBO J* **18**:1081–91.
- Reusch U, Bernhard O, Koszinowski U, Schu P.** 2002. AP-1A and AP-3A lysosomal sorting functions. *Traffic* **3**:752–61.
- Reusser P, Riddell SR, Meyers JD, Greenberg PD.** 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**:1373–80.
- Riegler S, Hebart H, Einsele H, Brossart P, Jahn G, Sinzger C.** 2000. Monocyte-derived dendritic cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* **81**:393–9.
- Rock KL, York I a, Goldberg AL.** 2004. Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nat. Immunol.* **5**:670–7.
- Roizman B, Baines J.** 1991. The diversity and unity of Herpesviridae. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **14**:63–79.
- Roizman B, Carmichael LE, Deinhardt F, de-The G, Nahmias AJ, Plowright W, Rapp F, Sheldrick P, Takahashi M, Wolf K.** 1981. Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* **16**:201–17.
- Ross SA, Fowler KB, Ashrith G, Stagno S, Britt WJ, Pass RF, Boppana SB.** 2006. Hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection born to mothers with preexisting immunity. *J. Pediatr.* **148**:332-6.
- Rubocki RJ, Hansen TH, Lee DR.** 1986. Molecular studies of murine mutant BALB/c-H-2dm2 define a deletion of several class I genes including the entire H-2Ld gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:9606–10.
- Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA.** 2006. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu. Rev. Immunol.* **24**:419–66.

- Ryckman BJ, Chase MC, Johnson DC.** 2008. HCMV gH/gL/UL128-131 interferes with virus entry into epithelial cells: evidence for cell type-specific receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**:14118–23.
- Saric T, Chang SC, Hattori A, York IA, Markant S, Rock KL, Tsujimoto M, Goldberg AL.** 2002. An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat. Immunol.* **3**:1169–76.
- Saveanu L, Carroll O, Lindo V, Del Val M, Lopez D, Lepelletier Y, Greer F, Schomburg L, Fruci D, Niedermann G, van Endert PM.** 2005. Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat. Immunol.* **6**:689–97.
- Scheinberg P, Melenhorst JJ, Brenchley JM, Hill BJ, Hensel NF, Chattopadhyay PK, Roederer M, Picker LJ, Price DA, Barrett AJ, Douek DC.** 2009. The transfer of adaptive immunity to CMV during hematopoietic stem cell transplantation is dependent on the specificity and phenotype of CMV-specific T cells in the donor. *Blood* **114**:5071–80.
- Schubert U, Antón LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR.** 2000. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* **404**:770–4.
- Schumacher U, Handke W, Jurak I, Brune W.** 2010. Mutations in the M112/M113-coding region facilitate murine cytomegalovirus replication in human cells. *J. Virol.* **84**:7994–8006.
- Seckert CK, Grießl M, Büttner JK, Freitag K, Lemmermann NA & Hummel MA, Liu XF, Abecassis MI & Angulo A, Messerle M & Cook CH & Reddehase MJ.** 2013. Immune surveillance of cytomegalovirus latency and reactivation in murine models: link to ‘Memory Inflation’. Kapitel I.22. p 374-416. In Reddehase MJ (ed.), *Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Seckert CK, Griessl M, Büttner JK, Scheller S, Simon CO, Kropp KA, Renzaho A, Kühnapfel B, Grzimek NKA, Reddehase MJ.** 2012. Viral latency drives “memory inflation”: a unifying hypothesis linking two hallmarks of cytomegalovirus infection. *Med. Microbiol. Immunol.* **201**:551–66.
- Seckert CK, Schader SI, Ebert S, Thomas D, Freitag K, Renzaho A, Podlech J, Reddehase MJ, Holtappels R.** 2011. Antigen-presenting cells of haematopoietic origin prime cytomegalovirus-specific CD8 T-cells but are not sufficient for driving memory inflation during viral latency. *J. Gen. Virol.* **92**:1994–2005.
- Segura E, Durand M, Amigorena S.** 2013. Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ-resident dendritic cells. *J. Exp. Med.* **210**:1035–47.
- Serwold T, Gonzalez F, Kim J, Jacob R, Shastri N.** 2002. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* **419**:480-3.
- Shen L, Sigal LJ, Boes M, Rock KL.** 2004. Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* **21**:155–65.
- Shortman K, Heath WR.** 2010. The CD8+ dendritic cell subset. *Immunol. Rev.* **234**:18–31.
- Sigal LJ, Crotty S, Andino R, Rock KL.** 1999. Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* **398**:77–80.
- Sijts E, Kloetzel PM.** 2011. The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**:1491–502.

- Simon CO, Holtappels R, Tervo HM, Böhm V, Däubner T, Oehrlein-Karpi SA, Kühnapfel B, Renzaho A, Strand D, Podlech J, Reddehase MJ, Grzimek NKA.** 2006. CD8 T cells control cytomegalovirus latency by epitope-specific sensing of transcriptional reactivation. *J. Virol.* **80**:10436–56.
- Simon CO, Kühnapfel B, Reddehase MJ, Grzimek NKA.** 2007. Murine cytomegalovirus major immediate-early enhancer region operating as a genetic switch in bidirectional gene pair transcription. *J. Virol.* **81**:7805–10.
- Simon CO, Seckert CK, Dreis D, Reddehase MJ, Grzimek NKA.** 2005. Role for tumor necrosis factor alpha in murine cytomegalovirus transcriptional reactivation in latently infected lungs. *J. Virol.* **79**:326–40.
- Sinzger C, Kahl M, Laib K, Klingel K, Rieger P, Plachter B, Jahn G.** 2000. Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is determined by a post-entry step dependent on efficient translocation to the nucleus. *J. Gen. Virol.* **81**:3021–35.
- Slavuljica I, Busche A, Babić M, Mitrović M, Gašparović I, Cekinović D, Markova Car E, Pernjak Pugel E, Ciković A, Lisnić VJ, Britt WJ, Koszinowski U, Messerle M, Krmpotić A, Jonjić S.** 2010. Recombinant mouse cytomegalovirus expressing a ligand for the NKG2D receptor is attenuated and has improved vaccine properties. *J. Clin. Invest.* **120**:4532–45.
- Slifka MK, Pagarigan RR, Whitton JL.** 2000. NK markers are expressed on a high percentage of virus-specific CD8+ and CD4+ T cells. *J. Immunol.* **164**:2009–15.
- Smith HRC, Heusel JW, Mehta IK, Kim S, Dorner BG, Naidenko O V, Iizuka K, Furukawa H, Beckman DL, Pingel JT, Scalzo AA, Fremont DH, Yokoyama WM.** 2002. Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:8826–31.
- Smyth MJ, Takeda K, Hayakawa Y, Peschon JJ, Van den Brink MRM, Yagita H.** 2003. Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy. *Immunity* **18**:1–6.
- Snyder CM, Allan JE, Bonnett EL, Doom CM, Hill AB.** 2010. Cross-presentation of a spread-defective MCMV is sufficient to prime the majority of virus-specific CD8+ T cells. *PLoS One* **5**:e9681
- Snyder CM, Cho KS, Bonnett EL, Allan JE, Hill AB.** 2011. Sustained CD8+ T cell memory inflation after infection with a single-cycle cytomegalovirus. *PLoS Pathog.* **7**:e1002295.
- Snyder CM, Cho KS, Bonnett EL, Van Dommelen S, Shellam GR, Hill AB.** 2008. Memory inflation during chronic viral infection is maintained by continuous production of short-lived, functional T cells. *Immunity* **29**:650–9.
- Sodeik B, Ebersold MW, Helenius A.** 1997. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J. Cell Biol.* **136**:1007–21.
- Springer TA.** 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**:301–14.
- Steffens HP, Kurz S, Holtappels R, Reddehase MJ.** 1998. Preemptive CD8 T-cell immunotherapy of acute cytomegalovirus infection prevents lethal disease, limits the burden of latent viral genomes, and reduces the risk of virus recurrence. *J. Virol.* **72**:1797–804.
- Steinmetz M, Le Coq D, Aymerich S, Gonzy-Tréboul G, Gay P.** 1985. The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites. *Mol. Gen. Genet.* **200**:220–8.

- Stern-Ginossar N, Weisburd B, Michalski A, Le VTK, Hein MY, Huang S-X, Ma M, Shen B, Qian S-B, Hengel H, Mann M, Ingolia NT, Weissman JS.** 2012. Decoding human cytomegalovirus. *Science* **338**:1088–93.
- Tabeta K, Hoebe K, Janssen EM, Du X, Georgel P, Crozat K, Mudd S, Mann N, Sovath S, Goode J, Shamel L, Herskovits A a, Portnoy D a, Cooke M, Tarantino LM, Wiltshire T, Steinberg BE, Grinstein S, Beutler B.** 2006. The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat. Immunol.* **7**:156–64.
- Tang Q, Murphy EA, Maul GG.** 2006. Experimental confirmation of global murine cytomegalovirus open reading frames by transcriptional detection and partial characterization of newly described gene products. *J. Virol.* **80**:6873–82.
- Tay CH, Welsh RM.** 1997. Distinct organ-dependent mechanisms for the control of murine cytomegalovirus infection by natural killer cells. *J. Virol.* **71**:267–75.
- Thimme R, Appay V, Koschella M, Panther E, Roth E, Hislop AD, Rickinson AB, Rowland-Jones SL, Blum HE, Pircher H.** 2005. Increased expression of the NK cell receptor KLRG1 by virus-specific CD8 T cells during persistent antigen stimulation. *J. Virol.* **79**:12112–6.
- Toes RE, Nussbaum AK, Degermann S, Schirle M, Emmerich NP, Kraft M, Laplace C, Zwinderman A, Dick TP, Müller J, Schönfisch B, Schmid C, Fehling HJ, Stevanovic S, Rammensee HG, Schild H.** 2001. Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J. Exp. Med.* **194**:1–12.
- Tomaš MI, Kucić N, Mahmutefendić H, Blagojević G, Lucin P.** 2010. Murine cytomegalovirus perturbs endosomal trafficking of major histocompatibility complex class I molecules in the early phase of infection. *J. Virol.* **84**:11101–12.
- Tooze J, Hollinshead M, Reis B, Radsak K, Kern H.** 1993. Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Euro. J. Cell Biol.* **60**:163–78.
- Torti N, Walton SM, Brocker T, Rüllicke T, Oxenius A.** 2011a. Non-hematopoietic cells in lymph nodes drive memory CD8 T cell inflation during murine cytomegalovirus infection. *PLoS Pathog.* **7**:e1002313.
- Torti N, Walton SM, Murphy KM, Oxenius A.** 2011b. Batf3 transcription factor-dependent DC subsets in murine CMV infection: differential impact on T-cell priming and memory inflation. *Eur. J. Immunol.* **41**: 2612-8.
- Touret N, Paroutis P, Terebiznik M, Harrison RE, Trombetta S, Pypaert M, Chow A, Jiang A, Shaw J, Yip C, Moore HP, Van der Wel N, Houben D, Peters PJ, De Chastellier C, Mellman I, Grinstein S.** 2005. Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell* **123**:157–70.
- Van Dommelen SLH, Tabarias HA, Smyth MJ, Degli-Esposti MA.** 2003. Activation of natural killer (NK) T cells during murine cytomegalovirus infection enhances the antiviral response mediated by NK cells. *J. Virol.* **77**:1877–84.
- Van Endert P.** 2011. Post-proteasomal and proteasome-independent generation of MHC class I ligands. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**:1553–67.
- Vidal S, Krmpotić A, Pyzik M, Jonjić S.** 2013. Innate immunity to cytomegalovirus in the murine model. Kapitel II.32. p.191-213. In Reddehase MJ (ed.), *Cytomegaloviruses: from molecular pathogenesis to intervention*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.

- Vyas JM, Van der Veen AG, Ploegh HL.** 2008. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Natu. Rev. Immunol.* **8**:607–18.
- Wagner FM, Brizic I, Prager A, Trsan T, Arapovic M, Lemmermann NA, Podlech J, Reddehase MJ, Lemnitzer F, Bosse JB, Gimpfl M, Marcinowski L, Macdonald M, Adler H, Koszinowski UH, Adler B.** 2013. The viral chemokine MCK-2 of murine cytomegalovirus promotes infection as part of a gH/gL/MCK-2 complex. *PLoS Pathog.* **9**:e1003493.
- Wagner M, Gutermann A, Podlech J, Reddehase MJ, Koszinowski UH.** 2002. Major histocompatibility complex class I allele-specific cooperative and competitive interactions between immune evasion proteins of cytomegalovirus. *J. Exp. Med.* **196**:805–16.
- Wagner M, Jonjic S, Koszinowski UH, Messerle M.** 1999. Systematic excision of vector sequences from the BAC-Cloned herpesvirus genome during virus reconstitution systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *J. Virol.* **73**: 7056-60.
- Wakim LM, Bevan MJ.** 2011. Cross-dressed dendritic cells drive memory CD8+ T-cell activation after viral infection. *Nature* **471**:629–32.
- Waller ECP, McKinney N, Hicks R, Carmichael AJ, Sissons JGP, Wills MR.** 2007. Differential costimulation through CD137 (4-1BB) restores proliferation of human virus-specific “effector memory” (CD28(-) CD45RA(HI)) CD8(+) T cells. *Blood* **110**:4360–6.
- Walton S, Mandaric S, Oxenius A.** 2013. CD4 T cell response in latent and chronic infections. *Front. Immunol.* **4**:105.
- Wang R, Natarajan K, Revilleza MJ, Boyd LF, Zhi L, Zhao H, Robinson H, Margulies DH.** 2012. Structural basis of mouse cytomegalovirus m152/gp40 interaction with RAE1 γ reveals a paradigm for MHC/MHC interaction in immune evasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **109**:3578-87.
- Wang D, Shenk T.** 2005. Human cytomegalovirus UL131 open reading frame is required for epithelial cell tropism. *J. Virol.* **79**:10330–8.
- Wearsch P, Cresswell P.** 2008. The quality control of MHC class I peptide loading. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**:624–31.
- Weller TH, Hansshaw JB, Scott DE.** 1960. Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology* **12**:130–2.
- Welsh RM, Brubaker JO, Vargas-Cortes M, O'Donnell CL.** 1991. Natural killer (NK) cell response to virus infections in mice with severe combined immunodeficiency. The stimulation of NK cells and the NK cell-dependent control of virus infections occur independently of T and B cell function. *J. Exp. Med.* **173**:1053–63.
- Wilhelmi V, Simon CO, Podlech J, Böhm V, Däubner T, Emde S, Strand D, Renzaho A, Lemmermann NA, Seckert CK, Reddehase MJ, Grzimek NK.** 2008. Transactivation of cellular genes involved in nucleotide metabolism by the regulatory IE1 protein of murine cytomegalovirus is not critical for viral replicative fitness in quiescent cells and host tissues. *J. Virol.* **82**:9900-16.
- Wilson NS, Behrens GMN, Lundie RJ, Smith CM, Waithman J, Young L, Forehan SP, Mount A, Steptoe RJ, Shortman KD, De Koning-Ward TF, Belz GT, Carbone FR, Crabb BS, Heath WR, Villadangos JA.** 2006. Systemic activation of dendritic cells by Toll-like receptor ligands or malaria infection impairs cross-presentation and antiviral immunity. *Nat. Immunol.* **7**:165–72.
- Wright JF, Kurosky A, Pryzdial EL, Wasi S.** 1995. Host cellular annexin II is associated with cytomegalovirus particles isolated from cultured human fibroblasts. *J. Virol.* **69**:4784–91.

- Wright JF, Kurosky A, Wasi S.** 1994. An endothelial cell-surface form of annexin II binds human cytomegalovirus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**:983–9.
- Yamamoto N, Shimokata K, Maeno K, Nishiyama Y.** 1987. Effect of recombinant human interferon gamma against human cytomegalovirus. *Arch. Virol.* **94**:323–9.
- Yewdell JW.** 2010. Designing CD8+ T cell vaccines: it's not rocket science (yet). *Curr. Opin. Immunol.* **22**:402–10.
- Yi JS, Cox MA, Zajac AJ.** 2010. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology* **129**:474–81.
- Zhi L, Mans J, Paskow MJ, Brown PH, Schuck P, Jonjić S, Natarajan K, Margulies DH.** 2010. Direct interaction of the mouse cytomegalovirus m152/gp40 immunoevasin with RAE-1 isoforms. *Biochemistry.* **49**:2443-53.
- Zhou F.** 2009. Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. *Int. Rev. Immunol.* **28**:239–60.
- Zhou W, Longmate J, Lacey SF, Palmer JM, Gallez-Hawkins G, Thao L, Spielberger R, Nakamura R, Forman SJ, Zaia JA, Diamond DJ.** 2009. Impact of donor CMV status on viral infection and reconstitution of multifunction CMV-specific T cells in CMV-positive transplant recipients. *Blood* **113**:6465–76.
- Ziegler H, Muranyi W, Burgert HG, Kremmer E, Koszinowski UH.** 2000. The luminal part of the murine cytomegalovirus glycoprotein gp40 catalyzes the retention of MHC class I molecules. *EMBO J.* **19**:870–81.
- Ziegler H, Thale R, Lucin P, Muranyi W, Flohr T, Hengel H, Farrell H, Rawlinson W, Koszinowski UH.** 1997. A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/cis-Golgi compartments. *Immunity* **6**:57–66.
- Zimmermann K, Schögl D, Mannhalter JW.** 1998. Digestion of terminal restriction endonuclease recognition sites on PCR products. *Biotechniques* **24**:582–4.

7 Danksagung

8 Lebenslauf