Immunevasion des murinen Cytomegalovirus: Regulatoren der MHC-Klasse-I vermittelten Antigenpräsentation

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Dorothea Ruth Gillert-Marien

geboren am 20.07.1967 in Berlin

Mainz, 2007

Datum der mündlichen Prüfung: 22.11.2007

Die Wissenschaft ist der Verstand der Welt, die Kunst ihre Seele.

Maxim Gorkij

Inhaltsverzeichnis

1

Zusammenfassung 4

Abkürzungsverzeichnis 6

1 Einleitung 9

1.1 Virusinfektionen – Interaktion zwischen Virus und Wirt 9

1.2 Cytomegalovirus 10

1.2.1 Die Cytomegalovirus-Infektion beim Menschen 11

1.2.2 Das murine CMV-Modellsystem 13

1.3 Die Immunantwort des infizierten Wirts 14

1.4 Immunevasion im infizierten Wirt 21

1.5 Ziele der Arbeit 25

2 Material und Methoden 26

2.1 Material 26

2.1.1 Grundausstattung 26

2.1.1.1 Allgemeine Laborgeräte 26

2.1.1.2 Plastikwaren 28

2.1.2 Chemikalien und Zellkulturzusätze 30

2.1.3 Medien und Puffer für die Zellkultur 33

2.1.4 Puffer und Lösungen für den ELISPOT-*Assay* 35

2.1.5 Puffer und Lösungen für die FACS-Analyse 36

2.1.6 Puffer und Lösungen für die Isolierung von CD8 T-Zellen mittels *Magnetic Cell Separation* (MACS) 37

2.1.7 Puffer und Lösungen für die Immunhistochemie 37

2.1.8 Antikörper (Ak) 38

2.1.9 Versuchstiere ... 40
2.1.10 Murines CMV und Virusmutanten ... 40
2.1.11 Peptide ... 41
2.1.12 Zelllinien ... 42
2.2 Methoden ... 44
2.2.1 Zellkultur ... 44
2.2.2 Bestimmung der Zellzahl ... 44
2.2.3 Herstellung von Zellsuspensionen aus Milzzellen ... 45
2.2.4 Anlage, Kultivierung und Restimulation von zytolytischen CD8 T-Lymphozyten ... 46
2.2.5 Isolierung von CD8 T-Zellen aus *memory*-Milzzellen ... 47
2.2.6 Murine Embryonale Fibroblasten (MEF) ... 48
2.2.6.1 Präparation von MEF ... 48
2.2.6.2 Kryokonservierung und Rekultivierung von MEF ... 50
2.2.7 Präparation von dendritischen Zellen aus Knochenmark ... 51
2.2.8 Virusproduktion ... 52
2.2.8.1 Infektion von MEF ... 52
2.2.8.2 Virusreinigung ... 53
2.2.8.3 Virustiterbestimmung von Virusstocks ... 54
2.2.9 Infektion von Mäusen ... 55
2.2.10 Tests zum Nachweis von CD8 T-Zell Effektorfunktionen ... 56
2.2.10.1 ELI *(Enzyme-Linked Immuno-)*SPOT - *Assay* ... 56
2.2.10.2 Zytolysetest (51Cr-*Release-Assay*) ... 61
2.2.11 Adoptiver Transfer mit Virusinfektion ... 63
2.2.11.1 Transfer und Infektion ... 63
2.2.11.2 Virustiterbestimmung in Organhomogenaten ... 64
2.2.12 Immunhistochemie ... 65
2.2.12.1 Einbetten und Schneiden der Organe ... 65
2.2.12.2 Entparaffinierung der Schnitte ... 66
2.2.12.3 mCMV-IE1-Immunhistochemie ... 66
2.2.13 *In-Situ*-Hybridisierung ... 68
2.2.14 Zytofluorometrische Analyse ... 68

3 Ergebnisse 70

3.1 vRAP-modulierte MHC-Klasse-I Oberflächenpräsentation.....70

3.2 Erkennung der vRAP-modulierten Peptidpräsentation durch CD8 T-Zellen 73

3.3 Abhängigkeit der vRAP-modulierten CD8 T-Zell-Aktivierung von der Epitoppräsentation.....77

3.4 Epitoperkennungsmuster im Haplotyp H-2^d.....80

3.5 Effekt der vRAPs in verschiedenen Zelltypen..... 82

3.6 Epitoperkennungsmuster im Haplotyp H-2^b.....85

3.7 *In vivo* Relevanz der vRAPs..... 87

3.8 Vergleich des protektiven Potentials von M45-D^b- und M45-D^d-CTLL.....91

3.9 Einfluss von IFNγ auf die vRAP-modulierte Oberfächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen..... 93

3.10 Einfluss von IFNγ auf die vRAP-modulierte Peptidpräsentation.....96

3.10.1 Untersuchung der Epitoperkennung durch IE1- und m164-CTLL..... 96

3.10.2 Untersuchung der Epitoperkennung durch M45-D^b- und M45-D^d-CTLL 102

3.11 Effekt von vRAPs auf die Epitoperkennung durch *memory* CD8 T-Zellen 106

4 Diskussion 110

5 Literaturverzeichnis 122

6 Veröffentlichungen 131

Zusammenfassung

Aufgrund einer effizienten Immunkontrolle – insbesondere durch CD8 T-Zellen - verläuft die Infektion immunkompetenter Menschen mit hCMV in der Regel asymptomatisch. Bei immundefizienten Personen hingegen ist eine hCMV-Infektion von erheblicher klinischer Relevanz. So kann es zu Organmanifestationen wie beispielsweise einer interstitiellen Pneumonie kommen, die immer wieder letal verläuft. Infolge der strikten Speziesspezifität ist eine Untersuchung der hCMV-Infektion in einem anderen Wirtsorganismus nicht möglich. Experimentelle Studien können jedoch aufgrund der vergleichbaren Pathogenese und Immunkontrolle von hCMV und mCMV im Mausmodell durchgeführt werden.

Im Laufe der Koevolution von Virus und Wirt haben sich komplexe Mechanismen entwickelt, die es dem Virus erlauben, die Immunantwort des Wirtsorganismus zu unterlaufen. Einer dieser Mechanismen ist die Interferenz des Virus mit der Präsentation antigener Peptide über MHC-Klasse-I-Moleküle, wodurch die Aktivierung von zytotoxischen CD8 T-Zellen beeinflusst wird. mCMV kodiert für drei Regulatoren der Antigenpräsentation: Während m152/gp40 peptidbeladene MHC-Klasse-I-Komplexe im cis-Golgi-Kompartiment akkumuliert, führt m06/gp48 diese Komplexe der lysosomalen Degradation zu. Im Gegensatz dazu vermittelt m04/gp34 deren Transport an die Zelloberfläche. Trotzdem wurde m04/gp34 in der Literatur bisher als Inhibitor der CD8 T-Zellaktivierung beschrieben. Postuliert wurden eine sterische Inhibition der TCR-Bindung an den MHC/Peptidkomplex durch das gebundene m04-Protein sowie – alternativ - eine m04-induzierte Konformationsänderung des MHC/Peptidkomplexes.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss dieser viralen Proteine auf die Peptidpräsentation bzw. die T-Zellaktivierung zu untersuchen. Dazu wurde ein Set von Viren verwendet, das neben mCMV-WT aus mCMV-Deletionsmutanten besteht, die jedes der regulatorischen Proteine einzeln bzw. in allen möglichen Kombinationen exprimieren, einschließlich einer Mutante, die keines der Proteine besitzt. Entgegen der bisher gültigen Annahme konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass m04/gp34 die Antigenpräsentation nicht inhibiert. Wird es allein exprimiert, bleibt die T-Zellaktivierung unbeeinflusst. Wird es zusammen mit m152/gp40 exprimiert, stellt

es die T-Zellaktivierung wieder her, indem es den herunter regulierenden Effekt von m152/gp40 antagonisiert. Dieser positiv regulierende Effekt von m04/gp34 wird wiederum durch m06/gp48 aufgehoben. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, wie die verschiedenen Effekte dieser Virusproteine *in vivo* das Überleben im infizierten Wirt steuern. So wird im adoptiven Transfermodell die Infektion mit der Deletionsmutante, die m152/gp40 alleine exprimiert, schlechter kontrolliert als die Infektion mit der m152/gp40 und m04/gp34 exprimierenden Mutante. Dieser die CD8 T-Zellkontrolle verbessernde Effekt von m04/gp34 wird durch m06/gp48 wieder aufgehoben.

Dass ein viraler Erreger nicht nur negative Regulatoren der Antigenpräsentation exprimiert, sondern auch einen positiven Regulator, der den Effekt eines negativen Regulators wieder aufhebt, ist in der Literatur beispiellos. Durch differentielle Expression dieser Regulatoren eröffnet sich damit dem Virus die Möglichkeit, die Antigenpräsentation gezielt zu modulieren.

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
APC	antigenpräsentierende Zelle (*antigen-presenting cell*)
AT	Adoptiver Transfer
ATCC	*American Type Culture Collection*
BAC	*Bacterial Artificial Chromosome*
BMDC	*Bone Marrow derived Dendritic Cell*
BSA	Bovines Serum-Albumin
CMV	Cytomegalovirus
cpm	*counts per minute*
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
CTLL	Zytotoxische T-Lymphozyten-Linie
DAB	Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's *modified Eagle* Medium
DMF	n,n-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERGIC	ER-Golgi-*intermediate compartment*
FACS	*Fluorescence activated cell sorter*
FCS	*Fetal Calf Serum*
Gy	Gray
GM-CSF	*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
hc	*high control*
hCMV	humanes Cytomegalovirus
IE	*immediate early*

IFN	Interferon
IL	Interleukin
i. p.	intraplantar
i. v.	intravenös
HRPO	*horse-raddish* Peroxidase
KM	Knochenmark
lc	*low control*
mCMV	murines Cytomegalovirus
MACS	*Magnetic Cell Separation*
ME	Mercaptoethanol
MEF	murine embryonale Fibroblasten
MEM	*Minimum Essential* Medium
MHC	*Major Histocompatibility Complex*
moi	*multiplicity of infection*
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NS	Normalserum
ORF	*Open Reading Frame*
PBS	*Phosphate Buffered Saline*
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pfu	*plaque forming unit*
p. i.	*post infection*
POD	Peroxidase
RBCLB	*Red Blood Cell Lysing Buffer*
rpm	*rounds per minute*
RPMI	*Rosewell Park Memorial Institute*
RT	Raumtemperatur
TAP	*Transporter associated with Antigen Presentation*
TBS	*Tris Buffered Saline*

TCR	*T Cell Receptor*
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
ü.N.	über Nacht
U	*Unit*
Verd.	Verdünnung
VSP	Virusstandardpuffer
WT	Wildtyp
vRAP	*viral Regulator of Antigen Presentation*

1 Einleitung

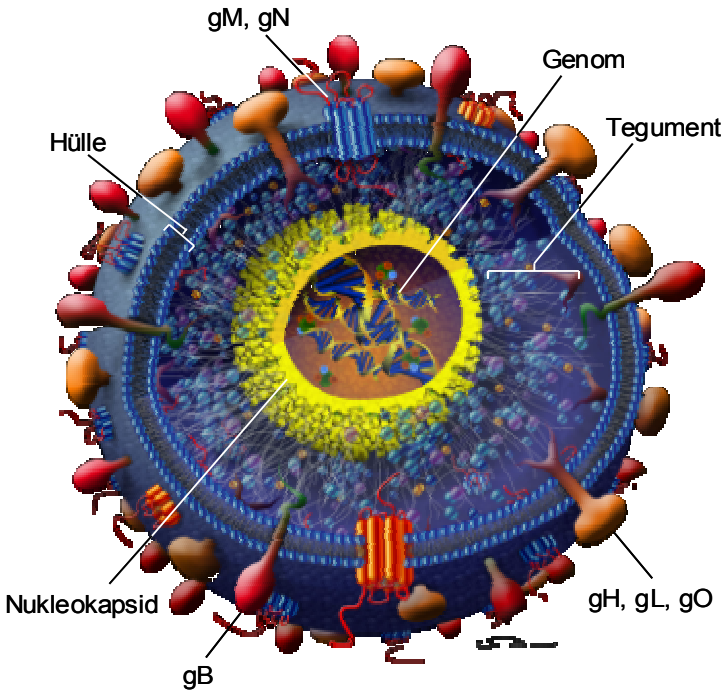
1.1 Virusinfektionen – Interaktion zwischen Virus und Wirt

Da sich Viren aufgrund des Fehlens eines eigenen Stoffwechsels nur innerhalb und mit Hilfe einer Wirtszelle vermehren können, ist das Überleben des Wirtsorganismus für den Erreger von essentieller Bedeutung. Dabei hängt der Verlauf der Virusinfektion von einer komplexen Kombination umweltbedingter Gegebenheiten sowie genetischer Faktoren des Pathogens und des Wirts ab. Dass Virusinfektionen trotz Impfkampagnen und der Einführung antiviraler Medikamente nach wie vor eine Herausforderung für die Gesundheit der Menschen darstellen, zeigt die Inzidenz der HIV (humanes Immundefizienz-Virus) -Infektionen, die fortschreitende Verbreitung des West-Nil-Virus und die sich abzeichnende Gefahr einer Influenzapandemie [Kielczewska & Vidal, 2006].

Aufgrund effizienter antiviraler Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus gegenüber einer Virusinfektion überrascht es nicht, dass die Koevolution von Virus und Wirt wiederum zur Entwicklung von viralen Mechanismen geführt hat, die die Immunantwort abschwächen oder unterlaufen. Dabei ist es das Ziel des Virus zu überleben, ohne den Wirt letal zu schädigen, bevor die Vermehrung des Virus gesichert ist. Tatsächlich werden die meisten Viren vom Immunsystem kontrolliert, sodass der Wirtsorganismus die Virusinfektion überlebt. Allerdings bedeutet die Kontrolle einer Virusinfektion nicht zwangsläufig, dass das Virus aus dem Wirt eliminiert wird. So ist die Ausbildung einer Latenz, bei der das virale Genom dauerhaft im Wirt verbleibt ohne eine klinische Symptomatik hervorzurufen, typisch für die Mitglieder der Familie der Herpesviren (Herpesviridae).

1.2 Cytomegalovirus

Cytomegaloviren (CMV) gehören innerhalb der Familie der Herpesviridae zur Unterfamilie der Betaherpesvirinae. Sie sind ubiquitär in zahlreichen Spezies verbreitet und zeigen zusammen mit anderen Mitgliedern der Herpesviridae eine einheitliche Morphologie (Abb. 1).



A. Townsend; entnommen aus Streblow *et al.*, 2006

***Abbildung 1:* Morphologie eines humanen Cytomegaloviruspartikels:** Das lineare, doppelsträngige DNA-Genom liegt innerhalb eines ikosaedrischen Nukleokapsids. Dieses wird von einer amorphen Proteinmasse, dem Tegument, umschlossen. Die äußere Abgrenzung bildet eine Hüllmembran, deren Oberflächenglykoproteine die Anheftung des Viruspartikel an die Wirtszelle vermitteln [zur Übersicht siehe Streblow *et al.*, 2006].

Cytomegaloviren sind streng speziesspezifisch und zeichnen sich durch einen sehr langen Replikationszyklus aus, der in drei Phasen eingeteilt wird: *immediate early* (IE), *early* (E) und *late* (L). Das Genom der Cytomegaloviren hat eine hohe Proteinkodierungskapazität. Mit 145 offenen Leserahmen gehört das Genom des humanen CMV (hCMV) zu den größten viralen Genomen [Davison *et al.*, 2003]. Eine CMV-Infektion verursacht eine langsam einsetzende späte Zytopathologie. Dabei

kommt es zu einer Zellvergrößerung (Zytomegalie), die namengebend für das Virus war.

1.2.1 Die Cytomegalovirus-Infektion beim Menschen

Eine Infektion mit hCMV kann während des gesamten Lebens erfolgen. Die hCMV-Durchseuchungsrate ist vom Lebensalter und von den sozioökonomischen Bedingungen abhängig. In Mitteleuropa und Nordamerika beträgt sie 50-80%, in den Entwicklungsländern erreicht sie bereits im Kindesalter meist 100%. Übertragen werden kann das Virus bereits im Mutterleib diaplazentar oder kongenital während der Geburt. Häufig ist auch die Infektion des Säuglings durch die Muttermilch. Im Kleinkindalter wird CMV meist durch Speichel und Körperflüssigkeiten übertragen [zur Übersicht siehe Reddehase, 2002]. Im Erwachsenenalter spielt auch die Weitergabe des Virus über Vaginalsekret bzw. Sperma eine Rolle. Eine CMV-Infektion kann außerdem durch Organtransplantate und Blutpräparate erfolgen.

Eine hCMV-Primärinfektion immunkompetenter Personen verläuft in der Regel asymptomatisch oder seltener mit unspezifischer Symptomatik, ähnlich einer Mononukleose. Der harmlose Verlauf der Primärinfektion ist auf eine effiziente Kontrolle durch das Immunsystem, insbesondere durch CD8 T-Zellen des Wirtsorganismus zurückzuführen. Dennoch wird, wie bei allen Herpesviren, nach der Primärinfektion eine lebenslange Latenz etabliert [Roizman & Baines, 1991]. Nach dem Abklingen der akuten Phase persistiert CMV in einigen Organen, besonders in der Speicheldrüse, mit niedriger Replikationsrate noch monatelang. Die Expression der meisten viralen Proteine ist während der persistierenden Infektion stark reduziert [zur Übersicht siehe Mocarski & Kemble, 1996]. Die im Gegensatz zur Latenz zeitlich begrenzte Persistenz von CMV endet einige Monate nach Abklingen der akuten Infektion. Während der Latenz sind replikationskompetente virale Genome vorhanden, nicht aber infektiöse Viruspartikel [zur Übersicht siehe Reddehase, 2002]. Auch wenn der Replikationszyklus nicht vollständig abläuft, ist das virale Genom während der Latenz transkriptional aktiv [Simon *et al.*, 2006a]. In Abhängigkeit vom infizierten Zell- und Gewebetyp sowie der dortigen Immunkontrolle können akute, persistierende und latente Infektion in demselben Organismus vorliegen [Kurz *et al.*, 1997]. Eine Rekurrenz, d. h. eine Reaktivierung des viralen Genoms hin zur

produktiven Infektion, ist spontan im immunkompetenten Organismus möglich. Sie verläuft meist asymptomatisch mit der Nachweismöglichkeit des Virus in Speichel und Urin [Meyers *et al.*, 1990]. Meist führen jedoch exogene Faktoren wie Fieber, Traumata oder immunsupressive Behandlungen zur Reaktivierung des Virus [Balthesen *et al.*, 1994; Reddehase, 2002; Reddehase *et al.*, 1994; Reinke *et al.*, 1999]. Das Fehlen der immunologischen Kontrolle bei einer CMV-Infektion führt zu klinischer Symptomatik. So kann eine intrauterine Infektion durch diaplazentare Übertragung durch die Mutter mit einer CMV-Primärinfektion zu schweren Embryopathien oder zum Abort führen. Bezüglich pränataler Schädigungen ist die hCMV-Infektion in den Industrienationen die häufigste virale Ursache [De Jong *et al.*, 1998; Trincado & Rawlinson, 2001]. Ein hohes Risiko tragen außerdem Kinder mit angeborener Immundefizienz (SCID) und Patienten mit erworbener Immundefizienz (AIDS). Bei AIDS-Patienten gehört die hCMV-Infektion zu den häufigsten opportunistischen Infektionen. Zu den gefährdeten Personen gehören auch Patienten mit medikamentös und/oder strahlungsbedingter Immunsuppression, wie sie zur Unterdrückung von Abstoßungsreaktionen nach Organ- und Knochenmarktransplantationen durchgeführt wird. Eine Erkrankung kann dabei aus einer Reaktivierung von latentem CMV im Empfänger sowie aus dem transplantierten Organ bzw. aus Blutprodukten resultieren. Eine hCMV-Primärinfektion des Transplantatempfängers hat meist einen schwereren Verlauf zur Folge als eine Virusreaktivierung und kann durch die Manifestation von Erkrankungen wie Leberinsuffizienz oder interstitielle Pneumonie sogar lebensbedrohlich sein [Reinke *et al.*, 1999]. Die CMV-bedingte Erkrankungswahrscheinlichkeit nach therapeutischer Immunsuppression korreliert mit dem Grad und der Dauer der Immuninkompetenz.

Therapieansätze

Bisher sind die Therapiemöglichkeiten einer hCMV-Infektion beschränkt auf den Einsatz von systemisch wirkenden Medikamenten wie Ganciclovir, Foscarnet und Cidofovir, die die Replikation des Virus hemmen. Die Eliminierung des Virus durch diese Substanzen wird jedoch nicht erreicht. Darüber hinaus weisen die Medikamente erhebliche Nebenwirkungen auf. Auch können sich bei länger andauernder Therapie Resistenzen gegenüber den virostatischen Wirkstoffen entwickeln [Pass, 2001]. Trotzdem kann die Behandlung von Transplantations- und AIDS-Patienten mit einem

der antiviralen Wirkstoffe in vielen Fällen das Ausmaß hCMV-bedingter Erkrankungen deutlich reduzieren [zur Übersicht siehe Biron, 2006]. Die vorhandenen Nachteile machen jedoch die andauernde Suche nach einer Therapiestrategie mit günstigerem Verhältnis zwischen Wirkung und Nebenwirkung notwendig.

Eine zugelassene hCMV-Vakzine steht bisher nicht zur Verfügung, obwohl bereits 1999 vom „*Institute of Medicine*" der „*National Academy of Sciences*" der Entwicklung einer hCMV-Vakzine zur Verhinderung kongenitaler hCMV-Infektionen höchste Priorität eingeräumt wurde. Die Entwicklung eines solchen Impfstoffes erweist sich jedoch als äußerst schwierig und komplex, da er die Situation sowohl einer hCMV-Infektion nach Transplantation als auch einer kongenitalen Infektion berücksichtigen können sollte [zur Übersicht siehe Khanna & Diamond, 2006].

Ein weiterer möglicher Ansatz zur Prävention einer hCMV-Erkrankung ist eine präemptive Zytoimmuntherapie mit hCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellen, um die endogene Rekonstitution protektiver CD8 T-Zellen zu verbessern. Das Prinzip der Zytoimmuntherapie von CMV-Infektionen durch adoptiven Transfer antigenspezifischer CD8 T-Zellen wurde zum ersten Mal im murinen System beschrieben [Reddehase *et al.*, 1985]. Dazu wurden immunsupprimierte BALB/c-Mäuse (Rezipient) mit mCMV infiziert. Anschließend wurden mittels adoptiven Transfers *ex vivo* isolierte Effektor-*memory*-T-Zellen mCMV-infizierter, immunkompetenter Mäuse (Donor) auf die Rezipienten übertragen und die antivirale protektive Funktion der transferierten Zellen getestet [Reddehase *et al.*, 1985]. Sowohl der prophylaktische Transfer von Effektor-*memory*-T-Zellen am Tag der Infektion als auch der therapeutische Transfer am Tag sechs nach Infektion hatten eine signifikante Reduktion der Virustiter zur Folge [Reddehase *et al.*, 1985]. In klinischen Studien konnte das Prinzip der Zytoimmuntherapie für Knochenmarktransplantationspatienten bestätigt werden [Riddell *et al.*, 1992]. Da sie jedoch extrem aufwendig ist, wird sie routinemäßig nicht eingesetzt.

1.2.2 Das murine CMV-Modellsystem

Hinsichtlich struktureller und biologischer Parameter sowie der genetischen Organisation gibt es große Ähnlichkeiten zwischen hCMV und mCMV [zur Übersicht siehe Holtappels *et al.*, 2006b; Rawlinson *et al.*, 1996; Reddehase, 2002]. Der Verlauf

der Infektion im immuninkompetenten Wirt hinsichtlich Gewebetropismus und klinischer Symptomatik ist vergleichbar. So kommt es zu Organmanifestationen wie einer interstitiellen Pneumonie [Brody & Craighead, 1974; Reddehase *et al.*, 1985], Hepatitis [Bolger *et al.*, 1999] und Adrenalitis [Pulakhandam & Dincsoy, 1990; Smith & Wehner, 1980]. Ein weiteres Zielorgan ist die Speicheldrüse, in der das Virus in beiden Spezies nach Abklingen der akuten Infektion noch über Monate hinweg nachweisbar ist [Jonjic *et al.*, 1989; Reddehase *et al.*, 1994]. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten kann die Pathogenese von CMV im murinen Modellsystem untersucht werden. Das mCMV-Modellsystem ermöglicht außerdem übertragbare Rückschlüsse bezüglich der hCMV-Reaktivierung aus der Latenz [Gonczol *et al.*, 1985; zur Übersicht siehe Reddehase *et al.*, 2002; Simon *et al.*, 2006b]. Sowohl hCMV als auch mCMV haben Mechanismen zur Kontrolle der Immunantwort, wie die Einflussnahme auf die CD8 T-Zellantwort, entwickelt, bei der virale Proteine in die Präsentation der antigenen Peptide eingreifen [zur Übersicht siehe Reddehase, 2002; Reddehase *et al.*, 2004]. Damit können Erkenntnisse aus mCMV-*in vivo*-Studien bezüglich funktioneller Zusammenhänge zwischen Immunkontrolle und Immunevasion auch auf das hCMV-System übertragen werden.

Obwohl sich die beiden Viren - trotz der vorhandenen Ähnlichkeiten und Parallelen - auf genetischer Ebene voneinander unterscheiden, zeigen doch die bisherigen Untersuchungen, dass das Modellsystem Maus geeignet ist, die akute, chronische und latente CMV-Infektion zu studieren [zur Übersicht siehe Holtappels *et al.*, 2006b].

1.3 Die Immunantwort des infizierten Wirts

Der immunkompetente Wirtsorganismus ist normalerweise in der Lage, eine CMV-Infektion effizient zu kontrollieren. Für den Schutz vor dieser Infektion stehen dem infizierten Wirt verschiedene immunologische Mechanismen sowohl der angeborenen als auch der adaptiven Immunabwehr zur Verfügung.

Zu den zellulären Komponenten des Immunsystems gehören innerhalb der angeborenen Immunität unspezifische Effektorzellen, wie Makrophagen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sowie Effektorzellen limitierter Diversität für Antigenerkennung wie TCRγ/δ T-Zellen. Die adaptive Immunantwort umfaßt

hochspezifische Effektorzellen hoher Diversität für Antigenerkennung wie Antikörper-produzierende B-Zellen sowie TCRα/β T-Zellen. NK-Zellen bilden eine effiziente, direkt nach der Virus-Infektion einsetzende Abwehr [Arase *et al.*, 2002; zur Übersicht siehe Lanier & Phillips, 1992]. Sie geht der einige Tage später einsetzenden adaptiven Immunantwort mit hochspezifischen Effektorzellen voraus. Die Bedeutung dieser primären Verteidigungslinie ist deshalb während der ersten drei Tage nach Infektion am größten [zur Übersicht siehe Andoniou *et al*. 2006; Welsh, 1986]. Durch die Aktivität der NK-Zellen kann der infizierte Wirtsorganismus jedoch nicht dauerhaft geschützt werden.

Die Relevanz von CD4 T-Zellen und CD8 T-Zellen innerhalb der adaptiven Immunität wurde von Koszinowski und Kollegen [1993] im mCMV-Infektionsmodell gezeigt. Eine schützende Funktion von NK-Zellen (angeborene Immunabwehr) konnte zwar nachgewiesen werden [Bukowski *et al.*, 1985], eine langfristige immunologische Kontrolle der mCMV-Infektion erfolgt jedoch erst mit dem Einsetzen der adaptiven T-Zellantwort. Sie ist hochspezifisch und wird etwa drei Tage nach mCMV-Infektion hochreguliert. Ihr Maximum erreicht sie etwa 10 Tage nach Infektion [Quinnan *et al.*, 1978; Reddehase *et al.*, 1988].

Eine Auslöschung der zellulären Komponenten des Immunsystems durch γ-Bestrahlung hat eine massive Infektion mit Nachweis des Virus in lebenswichtigen Organen wie Lunge, Leber, Nebenniere sowie Gastrointestinaltrakt zur Folge [zur Übersicht siehe Holtappels *et al.*, 2006b] und macht die Relevanz der zellvermittelten Immunität deutlich. Verantwortlich für den Schutz vor einer mCMV-Infektion innerhalb der adaptiven Immunabwehr sind in genetisch suszeptiblen Mausstämmen CD8 T-Zellen [Reddehase *et al.*, 1985; Lathbury *et al.*, 1996]. Zudem konnte gezeigt werden, dass in Folge der Expression des IE1-Transkripts von mCMV während der Latenz IE1-spezifische CD8 T-Zellen eine Reaktivierung von latentem Virus erkennen und auch beenden können [Simon *et al.*, 2006a; Simon *et al.*, 2006b].

CD8 T-Zellen

Die Kontrolle und Eliminierung intrazellulärer Pathogene, wie beispielsweise Viren, ist eine wichtige Aufgabe von CD8 T-Zellen [zur Übersicht siehe Wong & Pamer, 2003]. Sie limitieren die Virusreplikation, indem sie entweder die virusinfizierten Zellen zerstören oder indem sie Zytokine sezernieren, die einen antiviralen Status in den

Zellen hervorrufen [zur Übersicht siehe Yewdell & Haeryfar, 2005].

Die Aktivierung der CD8 T-Zellen erfolgt, wenn ihr T-Zellrezeptor (*T cell receptor*, TCR) seinen Liganden erkennt, der aus der Verbindung von antigenem Peptid und Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex,* MHC) -Klasse-I-Molekül besteht und auf der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zelle (*antigen-presenting cell*, APC) präsentiert wird [zur Übersicht siehe Germain *et al.*, 1994]. Die auf die Erkennung der APC folgende Verbindung von APC und CD8 T-Zelle wird als immunologische Synapse bezeichnet [Grakoui *et al.*, 1999]. Die aktivierte CD8 T-Zelle proliferiert und Zellen, die das zum TCR komplementäre Zielantigen tragen, werden lysiert.

Die durch eine Virusinfektion induzierte CD8 T-Zellantwort fokussiert sich in der Regel auf wenige Epitope, obwohl die Zahl der präsentierten viralen Peptide um ein Vielfaches höher ist. Dieses Phänomen wird als Immunodominanz bezeichnet [zur Übersicht siehe Yewdell & Bennink, 1999; Yewdell & Del Val, 2004]. Für mCMV konnte gezeigt werden, dass die Dominanz einer Spezifität nicht zwangsläufig bedeutet, dass sie für die Kontrolle der Infektion entscheidend bzw. überhaupt protektiv ist [Holtappels *et al.*, 2004]. Grundsätzlich jedoch ist die Relevanz von CD8 T-Zellen für die Kontrolle sowohl von hCMV wie auch von mCMV allgemein anerkannt [Borysiewicz *et al.*, 1988; Einsele *et al.*, 2002; Podlech et al., 1998; Quinnan *et al.*, 1980; Reddehase *et al.*, 1985; Reddehase *et al.*, 1988; Reusser *et al.*, 1991; zur Übersicht siehe Riddell *et al.*, 1991]. So konnte nachgewiesen werden, dass CD8 T-Zelllinien aller für den Haplotyp H-2^d bekannten Spezifitäten den infizierten Wirtsorganismus vor einer letalen mCMV-Infektion schützen [zur Übersicht siehe Holtappels *et al.*, 2006b]. Dabei spielt es keine Rolle, ob das antigene Peptid eine immundominante oder subdominante T-Zellantwort induziert [zur Übersicht siehe Holtappels *et al.*, 2006b].

Bei hCMV-infizierten Patienten war nach prophylaktischer Zytoimmuntherapie durch Adoptiven Transfer von CD8 T-Zelllinien bzw. -klonen, die spezifisch für das hCMV-Tegumentprotein UL83/pp65 sind, die Inzidenz der CMV-Erkrankungen gesunken [Riddell *et al.*, 1992; Walter *et al.*, 1995].

Antigenprozessierung und -präsentation

Ein wesentliches Merkmal der adaptiven Immunantwort ist die Fähigkeit, die Synthese von körperfremden oder mutierten körpereigenen Proteinen in Körperzellen zu erkennen und diese Zellen gezielt zu lysieren. Die Erkennung solcher Zellen durch zytolytische CD8 T-Zellen erfolgt, wenn diese Proteine zuvor in der Zelle prozessiert und die daraus resultierenden Peptide in Assoziation mit MHC-Klasse-I-Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert werden.

Die Prozessierung von Peptiden findet im Zytosol statt. Nachdem virale Proteine innerhalb der Zelle durch Polyubiquitinylierung als Substratproteine gekennzeichnet worden sind, können sie durch eine multikatalytische Protease, das Proteasom, abgebaut werden. Das Proteasom besteht aus einem 20S Hauptkomplex zylindrischer Struktur, auf dessen Innenseite sich mehrere katalytische Zentren befinden, sowie aus zwei regulatorischen 19S Untereinheiten. Gelangt ein polyubiquitinyliertes Protein an ein Proteasom, so sorgt die 19S Untereinheit - als Voraussetzung für die weitere Degradation - für die Abspaltung der Ubiquitinkette und die Entfaltung des Substrats [Groothuis *et al.*, 2005]. Die innerhalb des 20S Hauptkomplexes stattfindende Hydrolyse kann nach hydrophoben, nach basischen oder nach sauren Aminosäureresten erfolgen [zur Übersicht siehe Rock & Goldberg, 1999]. In den Proteasomen entsteht auch das carboxyterminale Ende der Peptide, mit denen sie in der MHC-Klasse-I-Bindungsgrube verankert werden können.

Neben diesem konstitutiven Proteasom besitzen Zellen ein durch Interferon γ (IFNγ) induzierbares sogenanntes Immunoproteasom. Es unterscheidet sich vom konstitutiven Proteasom durch den Austausch von Untereinheiten des katalytischen Zentrums. Durch den Proteinverdau im Immunoproteasom können andere Spaltprodukte der Substratproteine gebildet werden und somit andere Peptide entstehen [zur Übersicht siehe Groothuis *et al.*, 2005]. Zudem können Immunoproteasomen die Antigenpräsentation beschleunigen und/oder verstärken [zur Übersicht siehe Strehl *et al.*, 2005]. In den meisten Zellen nicht hämatopoetischen Ursprungs werden ausschließlich konstitutive Proteasomen exprimiert [zur Übersicht siehe Groothuis *et al.*, 2005]. Im Gegensatz dazu kommen in Zellen immunologisch relevanter Gewebe, wie beispielsweise der Milz, beide Proteasom-Formen vor. Aufgrund ihres unterschiedlichen Substratverdaus führt dies

zu einer erweiterten Vielfalt von Peptiden [zur Übersicht siehe Groothuis *et al.*, 2005; Strehl *et al.*, 2005].

Die Mehrheit der proteasomal prozessierten Peptide hat eine Länge von mehr als 15 Aminosäuren [Reits *et al.*, 2004]. Damit sie in Assoziation mit den MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Zelloberfläche einer APC präsentiert werden können, werden die Peptide durch zytosolische und im Endoplasmatischen Retikulum (ER) befindliche Aminopeptidasen auf die für die Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle notwendige Länge von 8-12 Aminosäuren getrimmt [Rammensee *et al.*, 1993; Rammensee *et al.*, 1997]. Der Zusammenbau von Peptid und MHC-Klasse-I-Molekül findet im ER statt. Dazu überführt der Transporter-assoziiert-mit-Antigenprozessierung (TAP) das Peptid unter ATP-Verbrauch aus dem Zytosol in das ER-Lumen. Mit Hilfe eines MHC-Klasse-I-spezifischen Beladungskomplexes wird das MHC-Molekül mit dem Peptid beladen. Der Beladungskomplex setzt sich neben dem MHC-Klasse-I-Heterodimer, bestehend aus α-Kette und β-2-Mikroglobulin, aus einer Gruppe von Chaperonen (Calretikulin, ERp57, BiP, Tapasin) und dem TAP zusammmen. Der Prozess der MHC-Beladung findet in unmittelbarer Nachbarschaft zum TAP statt. Vom ER aus werden die beladenen MHC-Klasse-I-Komplexe über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert (siehe Abb. 2)[zur Übersicht siehe Kloetzel, 2001; Koch & Tampé, 2006; Yewdell *et al.*, 2003].

Es werden sowohl Peptide aus zellulären Proteinen als auch Peptide aus viralen oder mutierten Proteinen prozessiert. Von dem Pool prozessierter Peptide stehen dem Immunsystem auf der Zelloberfläche allerdings nur ca. 0,1% zur Verfügung. Die anderen Peptide werden im Zytosol wieder zu freien Aminosäuren abgebaut und für die Synthese neuer Proteine verwendet [zur Übersicht siehe Yewdell *et al.*, 2003]. Die auf der Zelloberfläche in Assoziation mit MHC-Klasse-I präsentierten antigenen Peptide werden durch spezifische TCR erkannt, die auf CD8 T-Zellen exprimiert werden [zur Übersicht siehe Marrack & Kappler, 1987]. Eine Aktivierung der CD8 T-Zellen findet allerdings nur statt, wenn die präsentierten Peptide von Fremdproteinen (Virusproteine, mutierte Proteine) abstammen, da CD8 T-Zellen im Zuge der thymischen T-Zellreifung gelernt haben, körpereigene Proteine als „Selbst“ zu tolerieren und nur gegen körperfremde Antigene zu reagieren [Hengartner *et al.*, 1988].

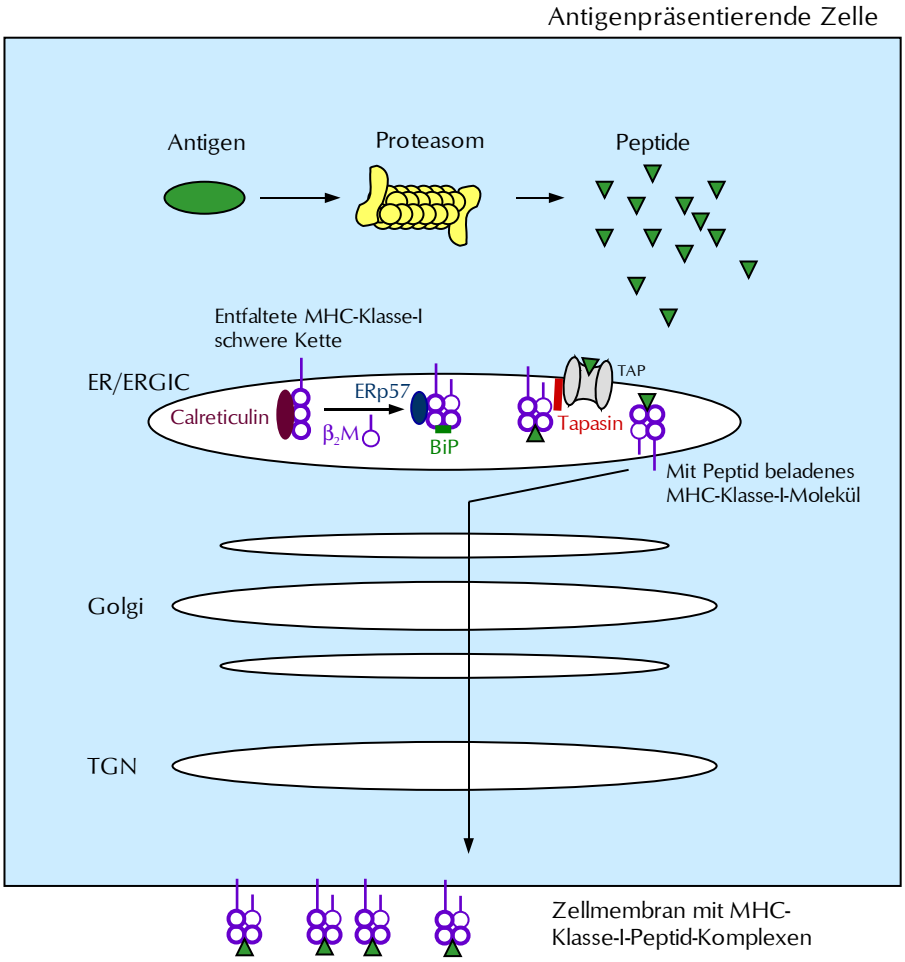


Abbildung 2: **Schematische Darstellung der MHC-Klasse-I Antigenpräsentation.** Das in der Abbildung als Antigen gekennzeichnete Substratprotein wird im Proteasom proteolytisch gespalten. Über den Transporter-assoziiert-mit-Antigenprozessierung (TAP) werden die entstandenen Peptide in das Lumen des endoplasmatischen Reticulums (ER) überführt und dort auf neu synthetisierte MHC-Klasse-I-Moleküle geladen. Der Zusammenbau der MHC-Moleküle sowie ihre Beladung mit Peptid wird durch einen Beladungskomplex gesteuert, zu dem Calreticulin, ERp57, BiP und Tapasin gehören. Über den Golgi-Apparat und das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) werden die MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe an die Zelloberfläche transportiert.

In unserer Arbeitsgruppe konnten für mCMV im Haplotyp H-2^{d} die beiden MHC-Klasse-I präsentierten immundominanten Peptide IE1 und m164 identifiziert werden [Holtappels *et al.*, 2002a; Reddehase *et al.*, 1989]. CD8 T-Zelllinien beider Spezifitäten sind in der Lage, die mCMV-Infektion in immunsupprimierten Tieren zu kontrollieren [Holtappels *et al.*, 2002a]. Das in der IE-Phase exprimierte IE1(pp89)-Peptid wird vom ORF *m123* kodiert [Reddehase *et al.*, 1989] und nicht nur während der akuten mCMV-Infektion, sondern auch während der Latenz präsentiert [Simon *et al.*, 2006a].

In der Folge kommt es zu einer Anreicherung IE1-spezifischer CD8 T-Zellen in der Latenz [Holtappels *et al.*, 2000c; Simon *et al.*, 2006a]. Durch die Präsentation des IE1-Peptids während der Latenz kann eine Virusreaktivierung erkannt und beendet werden [Simon *et al.*, 2006a]. Das aus dem ORF *m164* stammende zweite immundominante Peptid wird in der E-Phase exprimiert [Holtappels *et al.*, 2002a]. Darüber hinaus wurden weitere antigene Peptide identifiziert, die eine subdominante CD8 T-Zellantwort induzieren und aus E-Phase Proteinen stammen (Tab. 1).

Tabelle 1: **Antigene Peptide von mCMV im Haplotyp H-2^d.**

ORF	Peptidsequenz	MHC-I-Restriktion	Erstbeschreibung
m04	^{243}YGPSLYRRF^{251}	D^d	Holtappels *et al.*, 2000a
m18	^{346}SGPSRGRII^{354}	D^d	Holtappels *et al.*, 2002b
M45	^{507}VGPALGRGL^{515}	D^d	Holtappels *et al.*, 2006b
M83	^{761}YPSKEPFNF^{769}	L^d	Holtappels *et al.*, 2001
M84	^{297}AYAGLFTPL^{305}	K^d	Holtappels *et al.*, 2000b
m123	^{168}YPHFMPTNL^{176}	L^d	Reddehase *et al.*, 1989
m164	^{257}AGPPRYSRI^{265}	D^d	Holtappels *et al.*, 2002a

Für den Haplotyp H-2^b sind mittlerweile über 20 antigene Peptide beschrieben [Holtappels *et al.*, 2006b; Munks *et al.*, 2006b; Munks, persönliche Mitteilung].

IFNγ

Interferone sind eine Gruppe von Zytokinen, die die Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort herstellen und somit eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr von Viren spielen. Interferone werden in zwei verschiedene Klassen eingeteilt: Typ I (α/β), auf die hier nicht näher eingegangen werden soll und Typ II (γ) Interferone.

Erste Erkenntnisse über die Rolle von IFNγ, das durch aktivierte CD4 und CD8 T-Zellen sowie durch NK-Zellen in großen Mengen synthetisiert wird [Hengel *et al.*, 2005], konnten durch die Untersuchung der Virusreplikation mCMV infizierter, IFNγ-

depletierter Mäuse gewonnen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die antivirale Effektorfunktion sowohl von CD4 als auch von CD8 T-Zellen *in vivo* von IFNγ abhängig ist [Hengel *et al.*, 1994; zur Übersicht siehe Zimmermann & Hengel, 2006]. So ist IFNγ entscheidend für die Eliminierung des replizierenden Virus aus der Speicheldrüse [Lucin *et al.*, 1992] und für die MHC-Klasse-I abhängige Präsentation viraler Peptide [Hengel *et al.*, 1994]. Die Freisetzung von IFNγ durch CD8 T-Zellen hat eine Hochregulation der Expression der MHC-Klasse-I α-Kette und β-2-Mikroglobulin sowie von TAP und Tapasin zur Folge und damit eine starke Zunahme von MHC-Klasse-I-Molekülen und deren Beladung mit Peptid [Hengel *et al.*, 1994; zur Übersicht siehe Schroder *et al.*, 2004; Strehl *et al.*, 2005]. Außerdem spielt IFNγ eine Rolle bei der effizienteren Prozessierung viraler antigener Peptide *in vivo* [Geginat *et al.*, 1997]. Neben der bereits erwähnten Induktion von Immunoproteasomen dient IFNγ als Aktivator des PA28-Komplexes, der Ein- und Austritt des Proteinsubstrats in und aus dem Proteasom erleichtert. Des weiteren induziert IFNγ verschiedene sowohl zytosolische als auch ER-residente Aminopeptidasen [zur Übersicht siehe Strehl *et al.*, 2005].

1.4 Immunevasion im infizierten Wirt

Cytomegaloviren haben im Laufe der Evolution Strategien entwickelt, der Immunantwort des Wirts zu entkommen und damit das permanente Existieren des viralen Genoms in der infizierten Zelle zu ermöglichen. Eine eher passive Strategie ist die Replikation von CMV in Geweben wie den Epithelzellen der Speicheldrüse, in denen weniger MHC-Klasse-I-Moleküle exprimiert werden und demzufolge auch weniger CD8 T-Zellen aktiviert werden [Jonjic *et al.*, 1989]. Aufgrund dieser abgeschwächten Immunkontrolle ist in den betreffenden Zellen eine relativ ungestörte Virusreplikation möglich. Zusätzlich wird die Exposition von Antigenen gegenüber dem Immunsystem des Wirts durch die Etablierung von Latenz (die für alle Herpesviren typisch ist) verringert, da in dieser Phase die virale Genexpression sehr limitiert ist [zur Übersicht siehe Reddehase, 2002].

Von besonderer Bedeutung ist das aktive Eingreifen von CMV in die Immunantwort des Wirts. Sowohl hCMV als auch mCMV greifen durch Modulation der MHC-Klasse-

I-Antigenpräsentation in die Immunkontrolle durch CD8 T-Zellen ein [zur Übersicht siehe Alcami & Koszinowski, 2000; Hengel *et al.*, 1998; Ploegh, 1998; Reddehase *et al.*, 2004; Tortorella *et al.*, 2000]. Das Protein US6 von hCMV beispielsweise bindet an TAP und bewirkt dessen Konformationsänderung, auf Grund derer der Transport antigener Peptide ins ER verhindert wird und damit auch ihre Präsentation an der Zelloberfläche [Ahn *et al.*, 1997; Hengel *et al.*, 1997]. Bereits 1989 war bekannt, dass die Expression von E-Phase Genen von mCMV die MHC-Klasse-I-Präsentation eines CD8 T-Zellepitops aus dem IE1-Protein verhindert [Del Val *et al.*, 1989]. Diese Blockierung der Antigenpräsentation konnte später im ER/*cis*-Golgi-Kompartiment lokalisiert werden [Del Val *et al.*, 1992]. 1995 konnten Thäle und Kollegen zeigen, dass mehr als ein Gen an dem viralen Eingreifen in den Transport der MHC-Klasse-I-Moleküle beteiligt ist und dass verschiedene Schritte im MHC-Klasse-I-Transport an die Zelloberfläche betroffen sind [Thäle *et al.*, 1995].

Im mCMV-Genom sind bisher drei Gene beschrieben, die für Proteine kodieren, die in die Antigenpräsentation über MHC-Klasse-I-Moleküle eingreifen. In der Literatur sind diese Proteine bekannt als Immunevasine [zur Übersicht siehe Lilley & Ploegh, 2005; Reddehase, 2002] bzw. als VIPRs (*viral genes that inhibit antigen presentation to CD8 T cells*) [zur Übersicht siehe Pinto & Hill, 2005; Yewdell & Hill, 2002]. Die Gene *m04*, *m06* und *m152*, die für diese Immunevasine/VIPRs kodieren, sind nicht homolog zu den hCMV Klasse-I-Modulatoren [zur Übersicht siehe Mocarski, 2002]. Alle drei Genprodukte sind Typ I Transmembranglykoproteine und werden in der E-Phase der mCMV-Infektion exprimiert.

Das Gen *m152* kodiert für das Typ I Transmembranglykoprotein **m152/gp40** (im Folgenden kurz: m152). Seine Transkription startet zwei Stunden nach Infektion, die Synthese des Proteins setzt 3-4 Stunden nach Infektion ein [Ziegler *et al.*, 1997]. m152 retendiert peptidbeladene MHC-Klasse-I-Moleküle im ER-Golgi-*intermediate compartment* (ERGIC)/cis-Golgi-Kompartiment (siehe Abb. 3)[Ziegler *et al.*, 1997; Ziegler *et al.*, 2000], wodurch die Präsentation prozessierter antigener Peptide an der Zelloberfläche zur Induktion einer Immunantwort inhibiert wird [Del Val *et al.*, 1989; Del Val *et al.*, 1992].
Die durch m152 zurückgehaltenen Moleküle bestehen aus dem vollständigen

trimolekularen Komplex aus α-Kette, β-2-Mikroglobulin und Peptid. Die Bindung zwischen diesem Komplex und m152 ist transient. Während m152 eine geringe Halbwertszeit hat – es gelangt ins Lysosom und wird dort allmählich abgebaut – werden die zurückgehaltenen MHC-Klasse-I-Moleküle im ERGIC akkumuliert [Ziegler *et al.*, 2000].
Über seinen Einfluss auf den Transport peptidbeladener MHC-Klasse-I-Moleküle an die Zelloberfläche hinaus kann m152 auch die Expression von RAE-1-Liganden des aktivierenden NK-Zell-Rezeptors NKG2D herunterregulieren [Krmpotic *et al.*, 2002; Lodoen *et al.*, 2003].

Das von Reusch und Kollegen [1999] identifizierte Typ I Transmembranglykoprotein **m06/gp48** (im Folgenden kurz: m06) erreicht 3-6 Stunden nach Infektion sein Expressionsmaximum und wird dann während des gesamten Replikationszyklus in großen Mengen produziert [Reusch *et al.*, 1999]. m06 ist in der Lage, stabile Komplexe mit peptidbeladenen MHC-Klasse-I-Molekülen zu bilden. Es führt die MHC-Peptid-Komplexe vom ER *via* Golgi-Apparat der lysosomalen Degradation zu (siehe Abb. 3). Im zytoplasmatischen Teil von m06 befinden sich zwei Dileucin-basierte Signalmotive, die die lysosomale Degradation des m06-MHC-Peptid-Komplexes vermitteln. Daran beteiligt sind die Adaptorproteine AP1-A und AP3-A, die an Dileucin-basierte Signalmotive im zytoplasmatischen Teil potentieller *Cargo*-Proteine wie m06 binden [Reusch *et al.*, 1999; Reusch *et al.*, 2002]. Im Lysosom werden sowohl MHC-Peptid-Komplex als auch m06 abgebaut. Auch wenn m06 nicht an MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden ist, wird es degradiert, allerdings nicht im Lysosom, sondern im zytosolischen Proteasom [Bubeck *et al.*, 2002].

Identifiziert und erstmalig beschrieben wurde das mCMV-codierte Membranglykoprotein **m04/gp34** (im Folgenden kurz: m04) von Kleijnen und Kollegen [1997]. Die Expression von m04 beginnt zwei Stunden nach Infektion. Es wird in großen Mengen gebildet und bindet fest an β-2-Mikroglobuline der MHC-Klasse-I-Moleküle im ER [Kavanagh *et al.*, 2001b]. Nicht gebundene m04 Moleküle verbleiben im ER, bis sie degradiert werden. Im Gegensatz zu m152 und m06 verhindert m04 den Transport peptidbeladener MHC-Klasse-I-Komplexe an die Zelloberfläche nicht. Stattdessen verlässt es das ER nur in Assoziation mit MHC-

Klasse-I-Komplexen. Über den Golgi-Apparat wird dieser Komplex an die Zelloberfläche transportiert (siehe Abb. 3)[Kavanagh *et al.*, 2001b; Kleijnen *et al.*, 1997]. Trotzdem wird m04 in der Literatur als Protein beschrieben, welches an der Zelloberfläche störend in die Erkennung von peptidbeladenen MHC-Klasse-I-Komplexen durch den TCR von CD8 T-Zellen eingreift [zur Übersicht siehe Lilley & Ploegh, 2005]. Dabei geht man davon aus, dass m04 durch seine Bindung an MHC-Klasse-I eine Konformationsänderung des MHC-Peptid-Komplexes induziert oder dass es zu einer sterischen Behinderung der MHC-Peptid-Erkennung durch den TCR kommt.

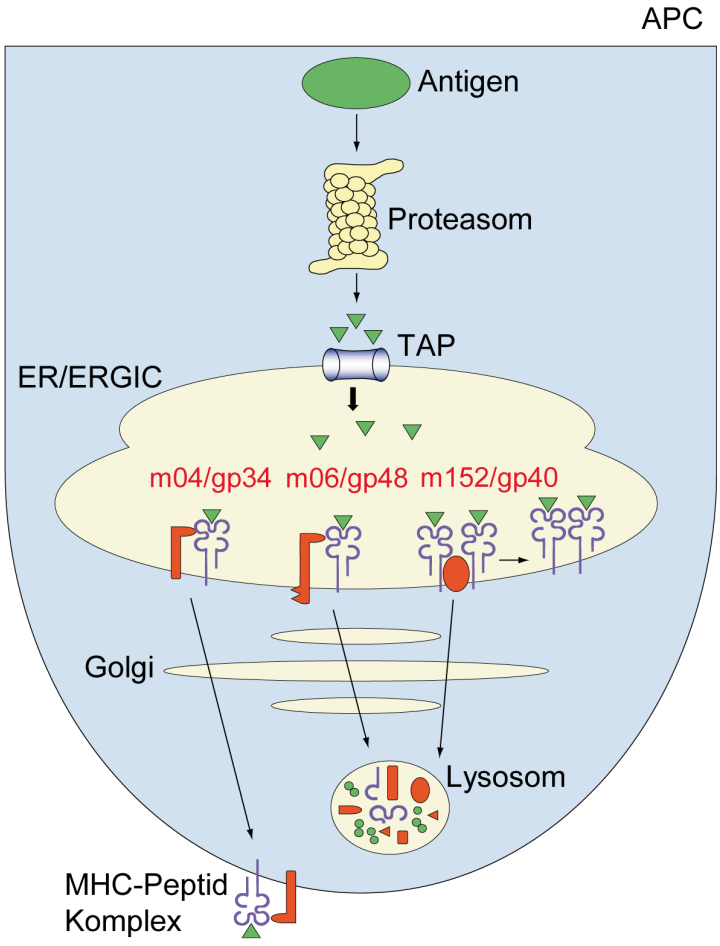


***Abbildung 3:* Einfluss der mCMV-kodierten Immunevasine/VIPRs auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenpräsentation.** m152 induziert die Akkumulation der MHC-Peptid-Komplexe im ER/ERGIC und wird dann im Lysosom abgebaut. m06 vermittelt den lysosomalen Abbau der MHC-Peptid-Komplexe. Durch m04 wird die Oberflächenpräsentation der MHC-Moleküle gefördert. (Angepasst von Niels Lemmermann, aus Reddehase, 2002.)

Darüber hinaus wurde von einer Kooperation zwischen m04 und m152 bzw. von allen drei viralen Proteinen berichtet [Kavanagh *et al.*, 2001a; LoPiccolo *et al.*, 2003]. Außerdem wird diskutiert, dass m04 möglicherweise die Aktivierung von NK-Zellen durch die Hochregulation der MHC-Klasse-I Expression inhibiert [Kleijnen *et al.*, 1997], da NK-Zellen durch das Fehlen von MHC-Klasse-I-Molekülen aktiviert werden [zur Übersicht siehe Pinto & Hill, 2005].

1.5 Ziele der Arbeit

Sowohl hCMV als auch mCMV haben Strategien entwickelt, um sich der Immunkontrolle durch CD8 T-Zellen zu entziehen. Vielversprechende klinische Therapieansätze basieren auf dem Transfer von antiviralen CD8 T-Zellen mit dem Ziel, bei immunsupprimierten Patienten die CMV-Infektion zu kontrollieren. Ein besseres Verständnis der viralen Immunevasionsmechanismen ist daher von fundamentaler Bedeutung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Kenntnisse sowohl über die Funktion als auch die Interaktionen der Immunevasine im mCMV-Infektionsmodell zu verbessern. Dazu sollte ein Set an Viren verwendet werden, dass in der Arbeitsgruppe von U. H. Koszinowski generiert worden war. Es beinhaltet Virusmutanten, die die drei Immunevasionsproteine (Immunevasine) von mCMV einzeln und in allen möglichen Kombinationen exprimieren, inklusive einer Mutante, die keines der drei Proteine exprimiert [Wagner *et al.*, 2002]. Bislang war mit diesem Set an Virusmutanten der Einfluss der Immunevasine auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression untersucht worden [Wagner *et al.*, 2002]. In der vorliegenden Arbeit sollte nun erstmalig auch die mCMV-modulierte Erkennung der MHC-Klasse-I präsentierten mCMV-Peptide durch CD8 T-Zellen untersucht werden. Darüber hinaus sollte der Frage nachgegangen werden, ob das Zytokin IFNγ einen Einfluss auf die die CD8 T-Zellantwort modulierenden Effekte der Immunevasine hat.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Grundausstattung

2.1.1.1 Allgemeine Laborgeräte

Brutschrank BB 6060 CU	Heraeus (Hanau)
Dounce-Homogenisator	Braun (Melsungen; Nr. 530830815)
Durchflusszytometer	FACSort; Becton Dickinson (Heidelberg)
ELISPOT-Reader V2.1	A.EL.VIS GmbH (Hannover)
Feuchte Kammern	Haushaltswarenbedarf Gerda (Schuch, Langgöns)
Flüssigstickstofftank	Messer (Griesheim)
Gamma-Counter Cobra II	Packard Canberra (Frankfurt a.M.)
Heizplatte/Magnetrührer	IKA Combimag RET (Janke & Kunkel, Staufen)
Mikroskope	Invertmikroskop: Leitz DM IL, Leitz (Wetzlar)
	Phasenmikroskop: Nikon SE, Nikon (Düsseldorf)
	SZX12, Olympus (Hamburg)
Mikrotom	Mikrotom HM355; Microtom (Walldorf)
Multikanalpipetten	Finnpipette; Labsystems (Helsinki, Finnland)

	Gilson (Villies Le Bel; Frankreich)
Multistepper	Eppendorf (Hamburg)
Paraffinerhitzer	Hiso TAPplus; Leica (Bensheim)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
	Gilson (Villies Le Bel; Frankreich)
Schüttler	Hypo-Shaker; Neo-Lab (Heidelberg)
Sterile Werkbank	Typ HS 18, Heraeus (Hanau)
Tischzentrifugen	Mikrozentrifuge Force 7; Roth (Karlsruhe)
	Megafuge 2.0; Heraeus (Hanau)
	Labofuge 200; Heraeus (Hanau)
	Multifuge 3S-R; Heraeus (Hanau)
Ultrazentrifuge	Sorvall Combi Plus; Sorvall (Hanau)
	Sorvall RC 5C; Sorvall (Hanau)
Vollschutz-Kleintier-Bestrahlungsanlage (Cäsium-Quelle: ^{137}Cs)	Typ OB 58-BA; Buchler (Braunschweig)
Waage	Typ 510-63, Kern (Albstadt)
Wasserbad	Memmert GmbH (Schwabach)
Zellbestrahlungsanlage	Gammacell 2000; Molsgaard Medical (Denmark)
Zellsorter	MACS; Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

2.1.1.2 Plastikwaren

Alle verwendeten Plastikwaren wurden von den Firmen steril bezogen. Ausnahmen sind mit (*) gekennzeichnet.

Counterröhrchen*	6,0x38mm GLKL, 0,6ml, Greiner (Nürtingen; Nr. 101101)
Einfrierröhrchen	1,8ml *Cryo Tube Vials*, Nunc International (Dänemark; Nr. 375418)
Einmal-Plastikpipetten	5ml costar stripette, Corning (New York, USA; Nr. 4487)
	10ml costar stripette, Corning (New York, USA; Nr. 4488)
	25ml costar stripette, Corning (New York, USA; Nr. 4489)
Einmal-Pipettenspitzen	für 1ml-Pipette
	für 200µl-Pipette
	für 10µl-Pipette
Einmal-Spritzen	1ml Braun (Melsungen; Nr. 916 140/6)
	2ml Braun (Melsungen; Nr. 0460 6027)
	5ml Henke Sass Wolf GmbH (Tuttlingen; Nr. 4050.000D0)
	10ml Braun (Melsungen; Nr. 0460 6108)
Einblock-Kassetten*	Tissue Tek III, Sakura Finetek BV (Zoeterwoude, Niederlande)
FACS-Röhrchen*	12x75mm round bottom RIA tube, Falcon, Becton Dickinson, (Heidelberg; Nr. 2008)
Filtereinheit	Whatman GmbH (Dassel; Nr. 10462241)
Kanülen	0,40x20mm, Braun (Melsungen)

	0,45x12mm, Braun (Melsungen)
Mikrotiterplatten*	96 Well-Rundbodenplatten, Greiner (Nürtingen; Nr. 662102)
Petrischalen	siehe Zellkulturschalen
Polyallomerröhrchen	36ml QTY25, Sorvall (Newtown, USA; Nr. 03141)
Reaktionsgefäße*	0,5ml Eppendorf (Hamburg; Nr. 35325)
	1,5ml Eppendorf (Hamburg; Nr. 0030 102.002)
	2ml Eppendorf (Hamburg; Nr. 0030 120.086)
Skalpell	Braun, Aesculap AG & Co KG (Tuttlingen; BA221)
6-Wellplatten	für Suspensionszellen, Greiner (Nürtingen; Nr. 657185)
24-Wellplatten	für Suspensionszellen, Greiner (Nürtingen; Nr. 662102)
48-Wellplatten	für adhärente Zellen Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg; Nr. 35 3078)
96-Wellplatten, Biodyne B Membran	45 µm Pore, Nunc International (Dänemark; Nr. 255984)
Zentrifugenröhrchen	5ml Greiner (Nürtingen; Nr. 115261)
	14ml Spitzboden, Falcon (Heidelberg; Nr. 352096)
	50ml Spitzboden, Falcon (Heidelberg; Nr. 352070)
Zellkulturflaschen	25cm^2, Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg; Nr. 35 3024)
	75cm^2, Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg; Nr. 35 3135)

Zellkulturschalen	6cm Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg; Nr. 35 3004)
	10cm Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg; Nr. 35 3003)
Zellkulturschalen	14,5cm Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg; Nr. 35 3025)
Zell-Nylonsieb	40µm Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg; Nr. 352340)
	100µm Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg; Nr. 352360)
Zellschaber	Sarstedt (Newton, USA; Nr. 83.1830)

2.1.2 Chemikalien und Zellkulturzusätze

Alle Chemikalien wurden, falls nicht anders vermerkt, in p. a. Qualität bezogen. Zum Ansetzen von Lösungen wurde ausschließlich Wasser aus der Apotheke der Universität Mainz (Aqua ad iniectabilia, Braun; Melsungen) verwendet. In der Folge wird dieses Wasser als aqua bidest. bezeichnet werden.

Aqua ad iniectabilia	Braun (Melsungen)
3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC-Tabletten)	Sigma (Deisenhofen; Nr. A-6926)
Ammonium-Nickelsulfat-Hexahydrat	Fluka (Buchs, Schweiz; Nr. 09885)
Amphotericin B	Sigma (Deisenhofen)
Brefeldin A	Sigma (Deisenhofen)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Ortho-Clinical Diagnostics Inc. (Neckargemünd)
^{51}Cr ($Na_2{}^{51}CrO_4$)	Perkin Elmer (Zaventem, Belgien)
3,3' Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure (EDTA)	Roth (Karlsruhe)

Essigsäure 100%	Roth (Karlsruhe; Nr. 3738.5)
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories (Pasching, Östereich; Nr. B15-001)
Formalin (37%ig)	Merck (Darmstadt)
Geneticin 418 (G418)	Gibco (Karlsruhe)
Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor (GM-CSF)	PeproTech (Rocky Hill, USA)
L-Glutamin	Gibco (Karlsruhe; Nr. 25030-024)
Haemalaun nach Mayer	Waldeck GmbH & Co KG (Nr. 2E010)
HEPES, 1M	Gibco (Eggenstein; Nr. 15630-056)
HEPES	Roth (Karlsruhe; Nr. 91054)
Isopropanol	Apotheke der Universität Mainz
Rekombinantes humanes Interleukin 2 (rh IL-2)	Das Zytokin wurde freundlicherweise vom Sandoz Forschungsinstitut (Wien) zur Verfügung gestellt.
Kaliumchlorid (KCl)	Roth (Karlsruhe; Nr. 6781.1)
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck (Darmstadt)
2-Mercaptoethanol	Sigma (Deisenhofen; Nr. M7522)
Methylcellulose	Fluka (Buchs, Schweiz)
n,n-Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich (Steinheim; Nr. D15.855-0)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt, Nr. 1.02951.1000)
Natriumacetat ($C_2H_3NaO_2$ x $3H_2O$)	Roth (Karlsruhe, Nr. 6779.1)
Na-EDTA	Merck (Darmstadt)
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Roth (Karlsruhe; Nr. 8563.1)
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Roth (Karlsruhe; Nr. 6885.1)

Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4 x $2H_2O$)	Merck (Darmstadt)
Paraffin, 56°C	Vogel-Histo-Comp (Giessen)
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco (Karlsruhe; Nr. 14190-094)
Penicillin/Streptomycin	Gibco (Karlsruhe; Nr. 15140-122)
Peroxidase-konjugiertes (HRPO)-Streptavidin	Jackson Immuno Research/Dianova (Hamburg; Nr. 016-030-084
Peroxidase *VECTASTAIN* ABC Kit Standart	Vector *Laboratories Inc.* (Burlingame, USA; Nr. VC-PK-4000)
Red Blood Cell Lysing Buffer (RBCLB)	Sigma (Deisenhofen; Nr. R7757)
Sucrose	Roth (Karlsruhe)
Tris	Roth (Karlsruhe; Nr. 5429.2)
Trypanblau	Biochrom (Berlin)
Trypsin	Difco (Michigan, USA)
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories (Pasching, Östereich; Nr. L 11-004)
Tween 20	Sigma (Deisenhofen)
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	Merck (Darmstadt)
Xylol	Merck (Darmstadt; Nr. 1.08685.2500)

2.1.3 Medien und Puffer für die Zellkultur

Die Medien wurden steril von der Firma Gibco bezogen, bei 4°C gelagert und mit den jeweils aufgelisteten Zusätzen supplementiert. Sofern nicht anders beschrieben, ist L-Glutamin in Form von L-Glutamax bereits in den Medien enthalten.

RPMI 1640 (Rosewell Park Memorial Institute) (Nr. 61870-010)

Penicillin	100U/ml
Streptomycin	0,1mg/ml
2-Mercaptoethanol	$5x10^{-5}$M
HEPES	10mM
FCS	5% (v/v)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Nr. 61965-026)

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

IMEM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) (Nr. 31980-022)

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

MEM (Minimum Essential Medium) (Nr. 41090-028)

	Penicillin	100U/ml
	Streptomycin	0,1mg/ml
	FCS	5-10% (v/v)
Nur bei Lagerung von Organen:	Amphothericin B	1,4µg/ml

MEM alpha (Nr. 32561-029)

	Penicillin	100U/ml
	Streptomycin	0,1mg/ml
	2-Mercaptoethanol	$5x10^{-5}$M
	HEPES	10mM
	FCS	7,5% (v/v)
+/-	Interleucin 2 (IL-2)	200U/ml

Methylzellulose-Medium

Zur Herstellung von 500ml Methylzellulose-Medium wurden zuerst 8,8g Methylzellulose in 360ml aqua bidest. suspendiert und zusammen mit einem Magnetstab autoklaviert. Nachdem die Lösung etwas abgekühlt war, wurde sie mehrere Stunden zum vollständigen Lösen der Methylzellulose gerührt und dann im Kühlschrank aufbewahrt.

Vor Gebrauch wurden folgende Zusätze zugegeben:

MEM 10x (Nr. 21430-20)	40ml
Penicillin	100U/ml
Streptomycin	0,1mg/ml
L-Glutamin	2mM
FCS	4% (v/v)
einstellen auf	pH 7,5

Trypsin-EDTA

Trypsin-EDTA wurde steril von PAA (Nr. L11-004) bezogen und 1:10 mit PBS verdünnt. Die Lösung wurde zum Ablösen von MEF verwendet.

VSP (Virus-Standard-Puffer)

1M Tris	50ml/l
1M KCL	12ml/l
0,1M Na-EDTA	50ml/l
aqua bidest.	ad 1l
einstellen auf	pH 7,4

2.1.4 Puffer und Lösungen für den ELISPOT-*Assay*

Puffer zur Verdünnung des Primärantikörpers (*Coating*-Puffer)

Stammlösung **A**	1,59g Na_2CO_3	ad 100ml aqua bidest.
Stammlösung **B**	2,93g $NaHCO_3$	ad 100ml aqua bidest.

Jeweils 1ml **A** und 1ml **B** wurden in einem 50ml Zentrifugenröhrchen zusammenpipettiert und die Lösung mit aqua bidest. auf 10ml aufgefüllt. Anschließend wurde der pH auf 9,6 (mit Lösung **A** oder **B**) eingestellt.

Puffer zur Verdünnung des Sekundärantikörpers (*Ab-Dilution*-Puffer)

Der *Ab-Dilution*-Puffer setzt sich aus PBS und 1% (v/v) einer 22,1%igen BSA-Lösung (w/v) zusammen.
Ansatz für eine ELISPOT-Platte:

PBS	5,5ml
BSA (22,1%ig)	60µl

Die beiden Puffer zur Verdünnung von Primär- und Sekundär-Anitkörper wurden jeweils direkt vor Gebrauch angesetzt.

50mM Na-Acetatpuffer

Essigsäure 100%	0,979ml
Natriumacetat x $3H_2O$	4,59g
aqua bidest.	ad 1000ml

Waschpuffer

Tween 20	1,25ml
PBS	ad 500ml

Konjugate-Dilution Puffer

Ansatz am Versuchstag für eine ELISPOT-Platte:

Waschpuffer	5ml
FCS	250µl

2.1.5 Puffer und Lösungen für die FACS-Analyse

FACS-Puffer

BSA	2g
EDTA	1,99g
HEPES	2,383g
NaN_3	1,5mg
PBS	ad 500ml

Flow-Puffer

Der Flow-Puffer (BD FACS Flow™ Nr. 342003) wurde von Becton Dickinson (BD) bezogen.

Fc-Block-Lösung

Die Fc-Blocklösung wurde direkt vor Gebrauch angesetzt.

anti-Maus CD16/CD32 (Fcγ III/II Rezeptor)	2µl
FACS-Puffer	100µl

Cytofix/Cytoperm Plus

Zur Fixierung und Permeabilisierung von Zellen wurde folgender Kit verwendet: BD Cytofix/Cytoperm™ Plus Kit with BD Golgi Plug™ Nr. 555028.

2.1.6 Puffer und Lösungen für die Isolierung von CD8 T-Zellen mittels *Magnetic Cell Separation* (MACS)

MACS-Puffer

Stammlösung, 5x	25g BSA
	3,72g EDTA
	ad 1l PBS
Gebrauchslösung, 1x	1:5 Verd. der MACS-Stammlsg. in PBS

2.1.7 Puffer und Lösungen für die Immunhistochemie

TBS-Puffer (Tris Buffered Saline)

Stammlösung, 10x	121g Tris-HCl [1M]
	8,8g NaCl [0,15M]
	ad 1l aqua bidest.
einstellen auf	pH 7,4
Gebrauchslösung, 1x	1:10 Verd. der TBS-Stammlsg. in aqua bidest.

BSA-TBS

Stammlösung, 10%ig (w/v)	10g BSA [10%]
	ad 100ml TBS (1x)
Lagerung	-20°C
Gebrauchslösung, 1%ig	1:10 Verd. der BSA-TBS-Stammlösung
Lagerung	-20°C

Gepuffertes Formalin (4%ig)

KH_2PO_4 [66mM]	9,07g
Na_2HPO_4 [84mM]	11,86g
	ad 860ml aqua bidest.
Formalin (Stammlösung 37%)	140ml
einstellen auf	pH 7,4

Trypsin-Lösung

NaCL	8g
KCL	0,2g
KH_2PO_4	0,2g
Na_2HPO_4	1,15g
EDTA	1,25g
	ad 1l aqua bidest.
einstellen auf	pH 7,4
autoklavieren	
Trypsin einrühren	1,25g
Lagerung	4°C

2.1.8 Antikörper (Ak)

Für den ELISPOT-*Assay* verwendete Ak

Bezeichnung	Klon	Endkonzentration	Quelle
Primär-Ak Ratte anti-Maus IFNγ	RMMG-1	5µg/ml	Biosource Europe (Solingen; Nr. AMC 4834)
Sekundär-Ak Biotin-gekoppelter Ratte anti-Maus IFNγ	XMG1.2	1µg/ml	Pharmingen (Heidelberg; Nr. 18112D)

Für die Immunhistochemie und die *In-Situ*-Hybridisierung verwendete Ak und Seren

Bezeichnung	Klon	Quelle
Normalserum Kaninchen	polykonal	Life Technologies (Paisley, Schottland; Nr. 16120099)
Maus anti-mCMV-IE1 (pp89/76)	Croma 101	Prof. Jonjic, Rijeka, Kroatien
Ziege anti-Maus IgG (Fab)-Biotin	polyklonal	Sigma (Deisenhofen; Nr. B 0529)
Peroxidase VECTASTAIN ABC Kit Standart	-	Vector Laboratories Inc. (Nr. VC-PK-4000)

Für die Durchflusszytometrie verwendete Ak

Bezeichnung	Klon	Endkonzentration	Quelle
PE-Maus anti-Maus H-2L^{d}	30-5-7S	2µg/100µl für 1x10^{6}Zellen	Cedarlane Laboratories Ltd. (Hornby, Ontario, Canada; Nr. CL9011PE)
PE-Isotyp Kontrolle Maus (Balb/c) IgG_{2a}, κ	G155-178	0,4µg/100µl für 1x10^{6} Zellen	BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg; Nr. 553457)
Kaninchen anti-m164 mCMV	polyklonal	2µg/100µl für 1x10^{6}Zellen	Dr. D. Strand, Inst. für Med. Mikrobiologie, Uni Mainz
Alexa Fluor 488 anti-Kaninchen IgG (H+L)	polykonal	1µg/100µl für 1x10^{6}Zellen	Molekular Probes (Eugene, Oregon, USA; Nr. A11008
anti-Maus CD16/CD32 (Fcγ III/II Rezeptor)	2.4G2	1µg/100µl für 1x10^{6}Zellen	BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg; Nr. 553142)

2.1.9 Versuchstiere

Die verwendeten Versuchstiere stammen aus der Zucht der zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Sie wurden unter SPF (*Specified-Pathogen-Free*) Bedingungen gehaltenen. Für die Anlage von zytotoxischen T-Lymphozyten-Linien (CTLL) aus Milzen sowie die Durchführung von adoptiven Transfers wurden weibliche Mäuse der Inzuchtstämme C57BL/6N (Haplotyp H-2^b) und BALB/cJ (Haplotyp H-2^d) verwendet. Zur Herstellung von murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) wurden Embryonen aus schwangeren Mäusen des Stammes BALB/cJ und des Stammes BALB/c-H-2^{dm2} verwendet.
Die Tierversuche wurden von der Bezirksregierung Rheinhessen-Pfalz unter der Nummer 177-07/021-28 genehmigt.

2.1.10 Murines CMV und Virusmutanten

Die zur Infektion von Zellen und Versuchtieren verwendeten Viren, die virale Regulatoren der Antigenpräsentation (vRAP) in verschiedenen Kombinationen exprimieren, sind in Tab. 2 gelistet. Das von Markus Wagner mittels BAC (*bacterial artificial chromosome*) Technologie hergestellte Virus mCMV MW97.01 [Messerle *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 1999] entspricht in den wesentlichen biologischen Infektionsparametern dem Wildtyp (WT) Stamm Smith (mCMV-WT-Smith, ATCC VR-194) und wurde daher als mCMV-WT eingesetzt. (Ausnahme: Zur Herstellung von *memory*-Mäusen wurde mCMV-WT-Smith verwendet (siehe 2.2.9.)

***Tabelle 2*: Exprimierte vRAPs in vRAP-Gendeletionsmutanten von mCMV.** Ausgehend vom Stamm mCMV MW97.01 wurden die Deletionsmutanten von Markus Wagner [Wagner *et al.,* 2002] hergestellt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Sie wurden als Sucrose-Gradienten-aufgereinigte Virusstocks (siehe 2.2.8) eingesetzt.

Virus	**vRAP-Expression**		
	m04	m06	m152
Δ*m04+06+152*	–	–	–
Δ*m04+152*	–	+	–
Δ*m06+152*	+	–	–
Δ*m04+06*	–	–	+
Δ*m152*	+	+	–
Δ*m06*	+	–	+
Δ*m04*	–	+	+
WT	+	+	+

2.1.11 Peptide

Die in dieser Arbeit verwendeten antigenen Peptide von mCMV wurden von der Firma JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin synthetisiert. Die Peptide wurden HPLC-gereinigt (Counter-Ion: Trifluoracetat) und in einer Reinheit von >80% geliefert. Sie sind in der nachfolgenden Tabelle 3 gelistet [zur Übersicht siehe Holtappels *et al.,* 2006b; Reddehase, 2002]:

Tabelle 3: **In dieser Arbeit verwendete antigene Peptide von mCMV.**

ORF	Phase	Peptidsequenz	MHC I Restriktion	Zur Generierung von CTLL verwendete Molaritäten
m04	E	^{243}YGPSLYRRF^{251}	D^d	10^{-8}M
m18	E	^{346}SGPSRGRII^{354}	D^d	10^{-10}M
M45	E	^{507}VGPALGRGL^{515}	D^d	10^{-9}M
		^{985}HGIRNASFI^{993}	D^b	10^{-10}M
M57		^{816}SCLEFWQRV^{824}	K^b	10^{-9}M
M83	E/L	^{761}YPSKEPFNF^{769}	L^d	10^{-10}M
M84	E	^{297}AYAGLFTPL^{305}	K^d	10^{-10}M
M97		^{210}IISPFPGL^{217}	K^b	10^{-8}M
m123	IE	^{168}YPHFMPTNL^{176}	L^d	10^{-9}M
m139		^{419}TVYGFCLL^{426}	K^b	10^{-8}M
m164	E	^{257}AGPPRYSRI^{265}	D^d	10^{-9}M

2.1.12 Zelllinien

P815

Die Zelllinie wurde als antigenpräsentierende Zelle (APC) für H-2^d restringierte Peptide im Zytolysetest und im ELISPOT-*Assay* eingesetzt. Es handelt sich um eine Maus-Mastozytom-Zelllinie (Mausstamm: DBA/2) und ist eine Suspensionszelle. Die durch P815 im Zytolysetest erfasste Lyse ist Perforin-vermittelt.

Haplotyp: H-2^d; MHC-Klasse-II negativ

Kulturmedium: RPMI + 5% FCS

Passagierung: Titration mit 0,5-1ml / 2ml in 24-Well-Platte, 1x pro Woche

P815/B7

Hierbei handelt es sich um die oben beschriebene Mastozytom-Zelllinie, die mit der humanen B7-1 (CD80) cDNA transfiziert wurde [Azuma *et al.*, 1992]. Diese Zelllinie (Suspensionszellen) wurde zur Restimulation von CTLL mit dem Haplotyp H-2^d verwendet.

Haplotyp:	H-2^d; MHC-Klasse-II negativ
Kulturmedium:	RPMI + 5% FCS + 0,167mg/ml G418
Passagierung:	Titration mit 0,5 - 1ml, 2ml in 24-Well-Platte, 1x pro Woche

Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Lanier, Department of Human Immunology, DNAX Research Institute, Palo Alto, USA, zur Verfügung gestellt.

EL-4

Bei den EL-4 Zellen handelt es sich um eine Suspensionszelllinie, die aus einem T-Zell-Lymphom der Maus (C57BL/6N) stammt. Sie wurden im Zytolysetest als APC für H-2^b präsentierte Peptide eingesetzt.

Haplotyp:	H-2^b
Kulturmedium:	DMEM + 10% FCS
Passagierung:	1:20 Verdünnung (0,5ml/10ml) in 50ml Flasche, 2x pro Woche

J774

Die Makrophagenzelllinie J774 stammt aus einem Retikulosarkom der Hausmaus (Mus musculus). Sie wurde im ELISPOT-*Assay* als infizierte APC verwendet.

Haplotyp:	H-2^d
Kulturmedium:	DMEM + 10% FCS
Passagierung:	1:30 bzw. 1:40 Verdünnung in unbeschichteten 6-Well-Platten, 4ml pro Well, 2x pro Woche

145-2C11

Bei der Zelllinie 145-2C11 handelt es sich um ein Hybridom, das aus der Fusion einer Ak produzierenden B-Zelle (hier: anti-Maus CD3ε aus Cricetulus migratorius, Hamster) und einer immortalisierten Myelomzelle (hier: Mus musculus, Hausmaus) hervorgegangen ist. Die Zelllinie wurde im ELISPOT-*Assay* als Kontrolle für die Gesamtaktivität der im *Assay* getesteten Effektorzellen eingesetzt.

Kulturmedium: IMDM + 10% FCS
Passagierung: Titration mit 1ml, 2ml in 24-Well-Platte, 1x pro Woche

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt, um Kontaminationen der in Kultur gehaltenen Zelllinien mit Luftkeimen, wie Pilzsporen und Bakterien vorzubeugen. Es wurden ausschließlich sterile Glas- und Plastikwaren verwendet.
Die Zelllinien wurden in einem CO_2-Inkubator bei 37°C und 5% CO_2-Gehalt in gesättigter Wasserdampfatmosphäre (95% relative Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Auf diese Weise wurden die auf physiologische Werte eingestellten pH-Werte der Kulturmedien (CO_2/Bicarbonat-gepuffert) konstant gehalten.

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Mit Hilfe des Vitalfarbstoffes Trypanblau wurde die Lebendzellzahl von Zellsuspensionen bestimmt. Trypanblau durchdringt defekte Zellmembranen toter Zellen sofort. Der ins Zytosol gelangte Farbstoff färbt die Zelle blau. Bei lebenden Zellen mit intakter Zellmembran wird diese erst nach ca. 10min für den Farbstoff permeabel. Auf diese Weise ist eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen möglich.
Zur Ermittlung der Zellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension in einem definierten Verhältnis mit Trypanblau gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer (Kammertiefe: 0,1mm) überführt. Anschließend wurden mindestens 25 Kleinquadrate (das entspricht einem Großquadrat) ausgezählt.

Die Zellzahl wurde mit Hilfe folgender Formel errechnet:

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

dabei ist

N = Anzahl der gezählten Zellen

n = Anzahl der ausgezählten Großquadrate

V = Verdünnungsfaktor

10^4 = Kammerfaktor.

2.2.3 Herstellung von Zellsuspensionen aus Milzzellen

Milzzellsuspensionen wurden zur Anlage von polyklonalen CTLL und zur Restimulation von CTLL mit Haplotyp H-2^b verwendet.

Material

- Metallsieb (steril)
- Petrischale (6cm)
- *Red Blood Cell Lysing Buffer* (RBCLB)
- Zell-Nylonsieb (40µm)
- RPMI oder MEMα / ohne IL-2

Durchführung

Die Milzen wurden steril entnommen und in ein Röhrchen mit RPMI überführt. Anschließend wurden die Organe auf einem Metallsieb, das auf eine geöffnete Petrischale gelegt wurde, zerrieben. Die entstandene Zellsuspension wurde mit RPMI vom Zellsieb in die Petrischale gespült, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 4min bei 681xg pelletiert. Zur anschließenden Erythrozytenlyse wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 2ml RBCLB/Milz aufgenommen und 1,5min bei RT leicht geschüttelt. Im Anschluss wurden die Zellen drei Mal in RPMI gewaschen. Um eine Einzelzellsuspension herzustellen, wurde das Pellet nach dem letzten Abzentrifugieren in einem definierten Volumen Medium aufgenommen und über ein Zell-Nylonsieb filtriert. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurde nun die Zellzahl bestimmt (siehe 2.2.2). Erwartete Zellzahl: ca. $1x10^8$ Zellen/Milz.

2.2.4 Anlage, Kultivierung und Restimulation von zytolytischen CD8 T-Lymphozyten

Die für diese Arbeit verwendeten polyklonalen, zytolytischen $CD8^+$ T-Lymphozyten wurden aus Milzzellen von mCMV-infizierten Mäusen (>8 Wochen p.i.) angelegt. Diese Milzzellen differenzieren durch *in vitro* Propagierung in IL-2 haltigem Medium und Restimulation mit dem entsprechenden Peptid zu reifen Effektorzellen. Es wurden weibliche Tiere der Mausstämme C57BL/6N und BALB/cJ verwendet.

Material

- Metallsieb (steril)
- 6cm-Petrischale
- RBCLB
- Zell-Nylonsieb (40µm)
- RPMI
- MEMα / +/- IL-2 (200 U/ml)
- antigene Peptide (siehe 2.1.11)

Durchführung

T-Zell-Anlage

Für die Anlage einer peptidspezifischen T-Zelllinie wurde aus den Milzen von drei latent infizierten Mäusen (siehe 2.2.9) eine Zellsuspension (siehe 2.2.3) hergestellt. Zur Aussaat in 24-Well-Platten wurden die Milzzellen auf $1{,}5x10^7$ Zellen pro 1,5ml MEMα ohne IL-2 eingestellt und die entsprechende Menge an Peptid zugesetzt. Die Peptid-Spezifitäten der angelegten CTLL sowie die eingesetzen Molaritäten sind unter 2.1.11 gelistet.

Vier Tage nach T-Zellanlage wurde 0,5ml/Well IL-2 haltiges MEMα zugegeben. Das entspricht ca. 200 Units IL-2 pro Well.

Kultur und Restimulation

Die CTL-Kulturen wurden in Abhängigkeit von der Zelldichte 1-2 Mal pro Woche geteilt (Verhältnis 1:2 oder 1:3).

Abweichend von der sonst üblichen Restimulation alle zwei Wochen, wurden frisch

angelegte CTLL zunächst zwei Mal in wöchentlichem Abstand restimuliert. Der häufigere Kontakt mit dem Peptid soll Wachstum und Differenzierung der für dieses Peptid spezifischen CTL fördern.

Zur Restimulation von CTLL des Haplotyps H-2^d wurden Zellen des Typs P815/B7 als Stimulatorzellen verwendet. Sie wurden drei Mal gewaschen und anschließend gezählt. Um ihre Proliferationsfähigkeit auszuschalten, wurden die Zellen mit 9000 rad bestrahlt. Die Zelldichte wurde in frischem MEMα auf 6-8x10^5 Zellen/Well/ml eingestellt und das jeweilige Peptid in definierter Molarität (siehe 2.1.11) zugegeben. Je 1ml pro Well dieses Stimulationsgemisches wurde den CTL-Kulturen zugesetzt. Die zu restimulierenden CTLL wurden zuvor in ihrem „alten" Medium auf 5x10^5 Zellen/Well/ml eingestellt.

Die Restimulation von CTLL des Haplotyps H-2^b wurde mit Milzzellen einer nicht infizierten Maus des Stammes C57BL/6N durchgeführt. Milzentnahme und Zellaufarbeitung erfolgte wie unter 2.2.3 beschrieben. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurde die Milzzellsuspension mit 3000 rad bestrahlt und anschließend auf 5x10^5 Zellen/Well/ml mit frischem MEMα eingestellt. Nach Zugabe des Peptids in definierter Molarität (siehe 2.1.11) wurde 1ml pro Well in die zuvor nach Bedarf geteilte CTL-Kultur gegeben.

2.2.5 Isolierung von CD8 T-Zellen aus *memory*-Milzzellen

Um neben CTLL verschiedener Spezifitäten auch *ex vivo* isolierte CD8 *memory*-Milzzellen untersuchen zu können, wurden diese mittels *magnetic cell separation* (MACS) aus den Milzen von Mäusen isoliert.

Material

- Metallsieb (steril)
- 6cm-Petrischale
- RBCLB
- Zell-Nylonsieb (40µm)
- RPMI
- MACS-Puffer (siehe 2.1.6)
- MACS CD8a (Ly-2) *Micro-Beads*
- Auto-MACS-Säulen: Typ MS^+/RS^+

Durchführung

Aus den Milzen von latent infizierten Mäusen (siehe 2.2.9) wurde eine Zellsuspension (siehe 2.2.3) hergestellt. Nach dem letzten Waschen der Zellen wurden diese in 5ml MACS-Puffer aufgenommen und die Zellzahl bestimmt (siehe 2.2.2). Die benötigte Zellmenge wurde entnommen, abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Pro 10^7 Milzzellen wurde das Pellet in 90µl MACS-Puffer und 10µl MACS CD8a (Ly-2) *Micro-Beads* resuspendiert, gründlich gemischt und 15min bei 4°C unter mehrmaligem Schwenken inkubiert. Anschließend wurden die Zellen ein Mal im 10-20-fachen *Label*volumen mit MACS-Puffer gewaschen und bei 300xg für 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1ml MACS-Puffer pro 10^8 Zellen aufgenommen. Mit Hilfe eines Auto-MACS-Gerätes (Miltenyi Biotec) wurden die $CD8^+$ Milzzellen nach folgendem Protokoll positiv selektioniert.

Vorbereitung des Auto-MACS:

- Gerät einschalten
- Säulen mit 500µl MACS-Puffer ein Mal waschen

Positivselektion (Programm: 'possel D') über zwei Säulen:

- vorbereitete Zellsuspension auf die im Magnetfeld befindliche Säule geben (die magnetisch markierten, $CD8^+$ Zellen binden an die Matrix der Säule)
- unmarkierte Zellen ($CD8^-$) passieren die Säule und werden verworfen
- Säulen drei Mal mit 500µl MACS-Puffer waschen
- Säulen aus dem Auto-MACS entfernen
- zum Eluieren der $CD8^+$ Zellen 1ml MACS-Puffer auf die Säulen geben
- Auffangen der $CD8^+$ Zellen in ein 15ml Röhrchen

2.2.6 Murine Embryonale Fibroblasten (MEF)

2.2.6.1 Präparation von MEF

MEF sind primäre Fibroblasten, die produktiv mit mCMV infizierbar sind. Sie wurden daher für die Virusproduktion, als infizierte APC im ELISPOT-*Assay* und im Zytolysetest, sowie zur Bestimmung des Virustiters in infizierten Organen verwendet.

Material

- schwangere Maus (C57BL/6N oder BALB/cJ), Tag 17 der Schwangerschaft
- zwei sterile Petrischalen (10 cm)
- PBS
- Trypsin/EDTA-Lösungen pH 6,4 und pH 7,4
- steriler 300ml Erlenmeyrkolben mit Glasperlen und Magnetstab
- steriles Metallsieb
- MEM + 10% FCS
- steriles 50ml Röhrchen und Zell-Nylonsieb (100µm)

Durchführung

Einer trächtigen Maus wurden am Tag 17 der Schwangerschaft die Embryonen steril entnommen und sofort in einer Petrischale auf Eis gestellt. Fruchtsack, Fruchtblase und Placenta wurden entfernt und die Föten vorsichtig von den Innereien, den Augenanlagen und dem Gehirn befreit. Das verbliebene Gewebe wurde in eine neue Petrischale überführt. Zunächst wurde das Gewebe mit einer Schere, anschließend mit zwei parallel gehaltenen Skalpellen zerkleinert, bis ein einheitlicher Zellbrei entstanden war. Das Gewebe wurde dann mit Hilfe eines Löffels in einen Erlenmeyrkolben mit Glasperlen und Magnetstab überführt, und es wurden 15ml PBS und 15ml Trypsin/EDTA pH 6,4 zugegeben. Der Ansatz wurde unter langsamem Rühren bei 37°C 30min inkubiert. Danach wurden noch zwei Mal je 15ml PBS und 15ml Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben und für jeweils weitere 30min bei 37°C unter Rühren inkubiert.

Nach insgesamt 1½h Inkubation wurde die Zellsuspension über ein steriles Metallsieb gegeben, mit MEM nachgespült und das Filtrat 10min bei 302xg abzentrifugiert. Die Zellen wurden noch einmal gewaschen und das Pellet in 10ml Medium aufgenommen und zur Entfernung von Gewebeteilen über ein Nylon-Sieb (100µm) gegeben. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in einer Dichte von $2x10^7$ Zellen pro Petrischale (d=14,5cm) in 25ml MEM ausgesät (1. Passage).

Um nicht adhärente Zellen und Erythrozyten zu entfernen, wurden die Kulturen am folgenden Tag drei Mal mit PBS gespült. Anschließend wurde 30ml frisches MEM zugegeben. Nach insgesamt drei bis vier Tagen hat sich ein konfluenter Zellrasen gebildet. Zu diesem Zeitpunkt wurden die MEF eingefroren. Dazu wurde zunächst ein

Mal mit PBS gespült. Danach wurden die Zellen durch Zugabe von 3ml Trypsin/EDTA pH 7,4 (Inkubation ca. 3min bei RT) zur Kryokonservierung (siehe 2.2.6.2) abgelöst.

Anmerkung: Die Zahl der Embryonen pro Maus, sowie die Zellausbeute pro Embryo kann von Präparation zu Präparation erheblich variieren.

2.2.6.2 Kryokonservierung und Rekultivierung von MEF

Unter Kryokonservierung versteht man das Aufbewahren von Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C. Um Schädigungen durch Kristallbildung in den Zellen beim Einfrieren zu vermeiden, wird dem Einfriermedium Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt, welches durch seine stark hygroskopischen Eigenschaften die Bildung von Eiskristallen verhindert. Da DMSO bei RT zytotoxisch wirkt, darf es in Verbindung mit Zellen nur gekühlt (4°C) verwendet werden. Grundsätzlich werden Zellen in der im Folgenden beschriebenen Weise kryokonserviert. Der Einfriervorgang und die Rekultivierung der Zellen sind hier am Beispiel von MEF dargestellt.

Material

- Einfriermedium: 90% FCS + 10% DMSO
- beschriftete Kryoröhrchen

Durchführung

Die, wie unter 2.2.6.1 beschrieben, abgelösten MEF wurden in ein 50ml-Zentrifugenröhrchen überführt und 5min bei 411xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in vorgekühltem Einfriermedium aufgenommen und je 1ml in ebenfalls vorgekühlte Kryoröhrchen gegeben. Die MEF wurden je nach Bedarf in zwei verschiedenen Zelldichten pro Kryoröhrchen eingefroren:

1. Aus einer 14,5cm Petrischale wurden 4-5 Aliquots zu je 1ml eingefroren. Ein solches Aliquot wurde nach dem Auftauen auf eine 10cm Petrischale ausgesät.
2. Aus einer 14,5cm Petrischale wurde ein Aliquot zu 1ml eingefroren. Dieses Aliquot wurde nach dem Auftauen auf 3-4 14,5cm Petrischalen ausgesät.

Um den Einfriervorgang für die Zellen möglichst schonend zu gestalten, wurden die Aliquots zunächst für 24h auf -70°C herunter gekühlt. Erst dann wurden sie zur Lagerung in die Dampfphase von flüssigem Stickstoff überführt.

Zur Rekultivierung wurden die eingefrorenen Zellen im Wasserbad (37°C) aufgetaut und sofort in ein möglichst großes Volumen MEM aufgenommen, um das DMSO zu verdünnen. Je nach Dichte der eingefrorenen Zellen wurden diese dann auf 10cm Petrischalen (10ml Medium) oder 14,5cm Petrischalen (25-30ml Medium) ausgesät (2. Passage).

2.2.7 Präparation von dendritischen Zellen aus Knochenmark

Dendritische Zellen (DCs) aus Knochenmark (auch *Bone Marrow derived Dendritic Cells* (BMDC)) wurden - neben Fibroblasten - als APC im ELISPOT-*Assay* eingesetzt. Die Reifung der DCs dauert sechs Tage, daher wurden die DCs entsprechend 6 Tage vor dem geplanten Versuchstag präpariert.

Material

- BALB/cJ Mäuse
- Ethanol
- PBS
- RPMI + muriner Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor (GM-CSF) (200U/ml)
- RBCLB
- Spritze
- Kanüle
- Becherglas
- Zell-Nylonsieb (40µm)
- unbeschichtete 6-Wellplatte

Durchführung

Die Präparation des Knochenmarks zur Gewinnung von BMDC erfolgte unter sterilen Bedingungen. Zunächst wurden Femura und Tibiae aus den zuvor getöteten Mäusen herauspräpariert und in wenig PBS gelegt, um sie vor dem Austrocknen zu schützen. Anschließend wurden die Knochen mit Ethanol abgerieben und, sofern noch vorhanden, die Gelenke gekappt. Nun wurde das Knochenmark mit PBS herausgespült, bis die Knochen klar waren. Das in einem Becherglas gesammelte PBS

mit den Knochenmarkzellen wurde so lange resuspendiert, bis keine Klümpchen mehr vorhanden waren. Um die Erythrozyten aus dem Ansatz zu entfernen, wurde die Zellsuspension abzentrifugiert (475xg, 5min) und pro Maus 0,5ml RBCLB zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5min wurde ein Mal mit PBS gewaschen und die Lösung durch ein 40µm Zell-Nylonsieb gegeben, um evtl. noch vorhandene kleine Zell-Klümpchen zu entfernen. Zuletzt wurden die Zellen gezählt (siehe 2.2.2) und $3x10^6$ Zellen/4ml RPMI pro Well in eine unbeschichtete 6-Wellplatte ausgesät.
An Tag 1 und 3 nach der Präparation fand jeweils ein Medium-Wechsel (3ml) statt, um auf DCs zu selektionieren. Die zu DCs heranreifenden Zellen haften am Plattenboden. Gereifte Zellen gehen in Suspension. Je weiter fortgeschritten die Kultur ist, desto weniger Zellen sind adhärent, d. h. um so mehr Zellen sind gereift.
An Tag 6 nach der Präparation konnten die gereiften DCs aus dem Überstand geerntet und im Versuch eingesetzt werden.

2.2.8 Virusproduktion

Die in der vorliegenden Arbeit für die Infektion von Zellen und Mäusen verwendeten Viren wurden als hochgereinigte Präparationen eingesetzt. Dazu wurden MEF mit dem jeweiligen Virus infiziert. Nachdem es sich nach 4-5 Tagen ausreichend vermehrt hatte, wurde das Virus Sukrose-gereinigt und zur Aufbewahrung bei -70°C eingefroren. Danach wurde der Virustiter bestimmt (siehe 2.2.8.3).

2.2.8.1 Infektion von MEF

Material

- MEF der 3. Passage
- MEM + 10% FCS
- mCMV-WT / mCMV-vRAP-Deletionsmutanten

Durchführung

MEF wurden so aufgetaut und passagiert, dass 40-50 Petrischalen (14,5cm) konfluent mit Fibroblasten der 3. Passage bewachsen waren. Sie wurden mit $1x10^5$ pfu mCMV-WT bzw. mCMV-vRAP-Deletionsmutanten infiziert, indem nach vollständiger Abnahme des alten Mediums das Virus in einem Volumen von 5ml zugegeben

wurde. Virushaltiges Medium und Zellen wurden für 30min bei RT unter mehrmaligem Schwenken inkubiert. Anschließend wurden 20ml MEM pro PS zugegeben. Die infizierten MEF wurden im Brutschrank 4-5 Tage kultiviert, bis die Zellen abgerundet waren und sich ca. 50% der Zellen im Überstand befanden. Zu diesem Zeitpunkt ist die Kultur maximal infiziert, d. h. das Virus hat sich maximal vermehrt.

2.2.8.2 Virusreinigung

Material

- sterile und beschriftete 0,5ml Reaktionsgefäße
- sterile Zellschaber
- Zentrifugenbecher (500ml und 250ml)
- MEM + FCS
- steriler Dounce-Homogenisator
- 50ml Zentrifugenröhrchen
- Virus-Standart-Puffer (VSP)
- 15% (w/v) Sucrose
- sterile 30ml Polyallomerröhrchen

Durchführung

Zur Virusreinigung wurden die infizierten MEF-Kulturen geerntet. Dazu wurden noch adhärente Zellen mit einem Zellschaber vorsichtig vom Boden der Petrischale abgelöst und zusammen mit den im Überstand befindlichen Zellen in vier sterilen 500ml Zentrifugenbechern gesammelt, mit wenig Medium nachgespült (sodass das zur Verfügung stehende Gesamtvolumen der Zentrifugenbecher von 2000ml nicht überschritten wurde) und auf Eis gestellt. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten ebenfalls auf Eis bzw. bei 4°C. Die Zell-Virussuspension wurde nun für 20min bei 6370xg (4°C) zentrifugiert (Sorvall RC 5C Plus, Rotor SLA-3000). Die Überstände wurden in sterilen 250ml Zentrifugenbechern gesammelt und auf Eis gestellt. Die Pellets wurden in 10ml kaltem MEM resuspendiert und auf Eis homogenisiert. Dazu wurde die Zellsuspension in einen sterilen Dounce-Homogenisator überführt und der Stempel 20 Mal auf und ab bewegt. Nach Überführen des Homogenats in sterile

50ml Zentrifugenröhrchen wurde erneut zentrifugiert (20min/3630xg/4°C, Sorvall RC 5C Plus, Rotor SS-34). Die Überstände wurden mit den bereits gesammelten Überständen vereint; in ihnen befindet sich das Virus. Die Pellets, welche lediglich Zelltrümmer enthalten, wurden verworfen. Im Anschluß erfolgte eine dreistündige Zentrifugation bei 25930xg und 4°C (Sorvall RC 5C Plus, Rotor SLA-1500). Die Überstände wurden vorsichtig dekantiert und die virushaltigen Pellets über Nacht zum Lösen auf Eis (im Kühlraum bei 4°C) gestellt. Dabei wurden die Becher schräg ins Eis gestellt, damit die Pellets mit dem restlichen, vom Becherrand herunter gelaufenen Medium bedeckt waren.

Am folgenden Tag wurden die Pellets im verbliebenen Medium resuspendiert, vereint, mit wenig Medium nachgespült und erneut auf Eis im Dounce-Homogenisator, wie oben beschrieben, homogenisiert. Nachfolgend wurde das Homogenat vorsichtig auf ein in sterilen 30ml Polyallomerröhrchen vorgekühltes 15%iges Sucrose/VSP-Kissen (15g Saccharose + 100ml VSP) gegeben. Dabei betrug das Verhältnis von Sucrose/VSP-Kissen zu zugegebener Viruslösung 10:1 (Bsp.: 18ml Sucrose/VSP + 2ml Viruslösung). Der Ansatz wurde für 1h bei 52800xg und 4°C zentrifugiert (Sorvall Combi Plus [Ultrazentrifuge], Rotor AH629). Der Überstand wurde vollständig abgesaugt, die Pellets mit 0,5ml Sucrose/VSP überschichtet und für 4h auf Eis (im Kühlraum bei 4°C) gestellt. Nachdem die Pellets anschließend mit Hilfe einer Pasteurpipette resuspendiert und vereinigt worden waren, wurde die Viruslösung nochmals homogenisiert (s. o.). Die Virussuspension wurde in Aliquots von 20, 50 und 100µl bei -70°C gelagert.

2.2.8.3 Virustiterbestimmung von Virusstocks

Material

- MEF der 3. Passage
- Virusstock
- beschriftete Eppendorf-Reaktionsgefäße
- Methylcellulose-Medium

Durchführung

Zur Bestimmung des Virustiters wurden in 48-Well-Platten ausgesäte MEF der 3. Passage verwendet. Es wurden sechs Verdünnungsstufen des Virusstocks hergestellt (1:10 bis $1:10^6$). Dazu wurde auf Eis gearbeitet. Es wurde in sechs Eppendorf-Reaktionsgefäße je 450µl Medium vorgelegt und in das erste Gefäß 50µl unverdünnte Viruslösung gegeben. Nachdem die Pipettenspitze gewechselt worden war, wurde die erste Verdünnung gut gemischt und 50µl davon in das nächste Reaktionsgefäß gegeben, ohne dabei mit der Pipettenspitze in das vorgelegte Medium zu tauchen. Wiederum wurde die Pipettenspitze gewechselt, bevor gemischt und 50µl Verdünnung in das nächste Reaktionsgefäß (s. o.) gegeben wurde. Nachdem die Verdünnungsreihe in dieser Weise zu Ende geführt worden war, wurden von jeder Verdünnungsstufe je 100µl pro Well auf konfluente MEF-Kulturen, aus denen zuvor das Medium fast vollständig abgesaugt worden war, pipettiert – jeweils als Triplikat. Anschließend wurde 1h bei 37°C inkubiert und dann mit jeweils 0,5ml Methylcellulosemedium überschichtet.

Nach vier Tagen Kultivierung im Brutschrank wurden in den infizierten Kulturen Plaques erkennbar. Diese Plaques sind mikroskopisch sichtbare Löcher im Zellrasen, von denen jedes einzelne auf mindestens ein infektiöses Viruspartikel zurückzuführen ist. Nach der Vermehrung in und Freisetzung aus der ursprünglich infizierten Zelle werden die umliegenden Zellen infiziert. Durch die Lyse der infizierten Zellen entstehen die Plaques, die umso größer sind, je weiter der Prozess der Infektion und Lyse sich räumlich ausgedehnt hat. Mit Hilfe der gezählten Plaques wird dann der Virustiter errechnet, indem die aus den Triplikaten gemittelte Plaquezahl mit der jeweiligen Verdünnungsstufe und dem Faktor 10 (da nur je 100µl der Viruslösung auf die Platte mit MEF übertragen wurden und der Virustiter immer in ml angegeben wird) multipliziert wird [Reddehase *et al.*, 1985]:

Bsp.: 3. Verdünnungsstufe: Plaquezahl x 10^3 x 10 = Virustiter/ml

2.2.9 Infektion von Mäusen

Zur Herstellung latent infizierter Mäuse der Inzuchtstämme C57BL/6 sowie BALB/cJ (sog. *memory*-Mäuse) wurden diese mit mCMV-WT-Smith (ATCC VR-194) infiziert. Sie wurden für die Anlage von CTLL (siehe 2.2.4) benötigt. Im Rahmen von adoptiven

Transfer-Experimenten wurden die Rezipienten mit mittels BAC-Technologie generierten Viren [Wagner *et al.*, 2002] infiziert; entweder mit mCMV-WT (MW 97.01) oder den vRAP-Deletionsmutanten mCMV-Δm04+06 bzw. mCMV-Δm06 (siehe 2.2.11).

Material

- 8-10 Wochen alte, weibliche Mäuse (C57BL/6 oder BALB/cJ)
- Spritzen (1ml)
- Kanülen (0,45x12mm)
- Virus in PBS

Durchführung

Für die Infektion der Tiere wurde zunächst die entsprechende Virusverdünnung mit einer Konzentration von $2x10^5$pfu/50µl PBS pro Maus angesetzt und bis direkt vor der Infektion auf Eis gestellt. Den Mäusen wurde die Infektionslösung intraplantar in die Hinterpfote injiziert.

2.2.10 Tests zum Nachweis von CD8 T-Zell Effektorfunktionen

2.2.10.1 ELI *(Enzyme-Linked Immuno-)*SPOT - *Assay*

Mit Hilfe des ELISPOT-*Assays* können unter Verwendung eines geeigneten Ak-Paares Zytokin-produzierende Zellen auf Einzelzellebene nachgewiesen werden. Die Antikörper binden an verschiedene Epitope desselben Zytokins. Mit dem Primär-Ak wird eine Nylonmembran beschichtet. Das während der Inkubationsphase von APC mit Effektorzellen sezernierte Zytokin bindet unmittelbar an den Primär-Ak. Mit Hilfe des biotinylierten Sekundär-Ak, Streptavidin-Peroxidase und eines Chromogens können die gebundenen Zytokine visualisiert werden. Es erscheinen einzelne Spots, die jeweils einer Zytokin-sezernierenden Zelle zugeordnet werden können. Da die Größe der Spots mit der Menge an sezerniertem Zytokin korreliert, ist eine Beurteilung der induzierten Aktivierung nicht nur auf Einzelzellebene (Quantität) möglich, auch die Intensität (Qualität) der Aktivierung kann erfasst werden [Miyahira *et al.*, 1995; Taguchi *et al.*, 1990].

Mittels des IFN-γ ELISPOT-*Assays* wurde in dieser Arbeit das Ansprechen von $CD8^+$ T-Zellen (CTL) auf präsentierte Epitope untersucht. Durch exogene Beladung von Stimulatorzellen mit titriertem synthetischen Peptid konnte die Sensitivität der CTLL geprüft werden (Dem Ergebnisteil ist zu entnehmen, in welchen Experimenten die Sensitivität der CTLL getestet wurde.). Außerdem wurden die Stimulatorzellen mit jeweils einem der unter 2.1.10 beschriebenen Viren zentrifugal infiziert und die dadurch induzierte IFNγ-Produktion der $CD8^+$ T-Zellen untersucht.

Material

- ELISPOT-Platte: 96-Well-Platte mit Biodyne B Membran (Nalge Nunc)
- MEMα + 10% FCS / ohne IL-2
- *Coating*-Puffer
- Primär- und Sekundär-Ak
- *Ab-Dilution*-Puffer
- Waschpuffer
- Peroxidase-konjugiertes (HRPO)-Streptavidin
- Na-Acetat-Puffer
- AEC-Tabletten
- DMF-Lösung
- H_2O_2 (30%ig)

Durchführung

Zur Beschichtung der ELISPOT-Platte wurde zunächst der Primär-Ak in frisch angesetztem *Coating*-Puffer auf eine Endkonzentration von 5µg/ml eingestellt. Von der Ak-Lösung wurden je 55µl/Well in die ELISPOT-Platte gegeben. Dieser Ansatz wurde bei 4°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde der primäre Ak mit 200µl aqua bidest. pro Well ausgewaschen. Der Waschvorgang wurde vier Mal im Abstand von 15min wiederholt. Im Anschluß wurden 200µl MEMα/10%FCS pro Well auspipettiert und die Platte bei 37°C mindestens 1h inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren.

Als APC (Stimulatorzellen) dienten MEF (Haplotyp $H\text{-}2^d$ bzw. $H\text{-}2^b$), BMDC oder die Makrophagenzelllinie J774. Pro Well wurden $1x10^5$ Zellen/50µl eingesetzt.

1. Exogene Beladung von Stimulatorzellen mit synthetischem Peptid

   Es wurde eine Verdünnungsreihe des zu testenden Peptids im Bereich von

10^{-7}M bis 10^{-14}M (in $\log_{[10]}$ Titrations-Stufen) hergestellt. Dabei wurde auf Eis gearbeitet. In sieben Eppendorf-Hütchen wurden dazu pro Peptid-Konzentration je 900µl Medium vorgelegt. In einem 8. Hütchen wurde in 1ml die höchste Peptid-Konzentration (10^{-7}M) angesetzt. Die Titration erfolgte mit 100µl, dabei wurde nach jedem Überführen des Titrationsvolumens die Pipettenspitze gewechselt, um ein Verfälschen der Peptid-Konzentration zu vermeiden (genauere Beschreibung siehe auch 2.2.8.3). Die Stimulatorzellen wurden geerntet, gewaschen, gezählt und auf $2x10^6$ Zellen in je 9 Eppendorf-Hütchen (ein Kontrollansatz ohne Peptid) eingestellt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun wurde das gesamte Volumen jeder Peptid-Verdünnungsstufe in das jeweilige Eppendorf-Hütchen mit den Stimulatorzellen überführt, die Ansätze resuspendiert und für 1h bei 37°C inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit RPMI wurde dann das überschüssige Peptid wieder ausgewaschen und die Pellets in jeweils 800µl resuspendiert.

2. Infektion von Stimulatorzellen

   MEF als Stimulatorzellen wurden in der 3. Passage verwendet. Sie wurden so auf 10er PS gesplittet, dass diese am Versuchstag konfluent mit MEF bewachsen waren. BMDC wurden 6 Tage vor Versuchsbeginn hergestellt und auf 10er PS bereitgestellt. J774 wurden in Zellkulturflaschen (75 cm^2) in ausreichender Menge vermehrt. Die Infektion der Stimulatorzellen in 10er PS erfolgte zentrifugal bei MEF und J774 mit 0,2pfu, bei BMDC mit 0,4pfu. MEF und J774 wurden dann 30min bei 760xg zentrifugiert, BMDC 20min bei 475xg*. Zunächst wurde 5min (BMDC 3min) zentrifugiert, dann wurden die PS um 180° gedreht und für weitere 25min (BMDC 17min) zentifugiert. Die anschließende Inkubationszeit bei 37°C betrug 1h. Dann wurden die Zellen geerntet, gewaschen, gezählt und auf $1x10^5$Zellen/50µl/Well eingestellt.

Die Effektorzellen wurden geerntet, drei Mal gewaschen und gezählt. Sie wurden in unterschiedlicher Zellzahl/Well (CTLL: 300, 200, 100, 50 Zellen/Well; CD8 *memory*-Milzzellen: zwischen $6x10^4$ und $1x10^3$ Zellen/Well) ausgesät.

Nachdem das Medium zum Blockieren von unspezifischen Bindungen (s. o.) aus der

* Die höhere Infektionsdosis der empfindlichen BMDC ergibt sich aus der niedrigeren Umdrehungszahl und der kürzeren Zentrifugationszeit.

ELISPOT-Platte entfernt worden war, wurden nun je 50µl Stimulatorzellen und je 100µl Effektorzellen pro Well zusammenpipettiert. Die Effektoren wurden in Triplikaten ausgesät. Die Inkubation des Effektor/Stimulator-Zellgemisches erfolgte verdunstungsgeschützt im Brutschrank für ca. 18h.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen durch Waschen mit Waschpuffer (9x) und aqua bidest. (1x) aus der ELISPOT-Platte entfernt. Nachdem der Sekundär-Ak in frisch angesetztem *Ab-Dilution*-Puffer auf eine Konzentration von 0,5mg/ml eingestellt worden war, konnte von dieser Lösung 50µl/Well auspipettiert und die Platte für 2h bei RT inkubiert werden. Anschließend wurde die Platte 5x mit Waschpuffer gewaschen. 50µl des zuvor 1:250 verdünnten HRPO-Streptavidin-Konjugates wurden in jedes Well pipettiert und die Platte für weitere 2h bei RT inkubiert. Das Konjugat wurde durch 5maliges Waschen mit Waschpuffer wieder aus der Platte entfernt. Zur Sichtbarmachung der Spots wurden je 70µl des ebenfalls frisch angesetzten 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC) in die Wells der ELISPOT-Platte gegeben. Dazu wurden 20mg AEC (1 Tablette) in 2,5ml n,n-Dimethylformamid (DMF) gelöst. Anschließend wurden 47,5ml Na-Acetat-Puffer, pH 5,0 zugegeben. Direkt vor Gebrauch wurden 25µl H_2O_2 (30%ig) zu der Lösung zugegeben und diese zur Entfernung ungelöster Partikel filtriert (Filtereinheit 0,8µm, Whatman GmbH). Die Färbereaktion auf dem Nylon-Boden der Platte erfolgte dann für ca. 10min bei RT. Sie wurde durch Waschen mit aqua bidest. (3x) gestoppt. Nach dem Trocknen der Biodyne B Membran konnten die Spots mit Hilfe eines modularen Stereo-Zoom-Mikroskops mit Kaltlichtquelle als Auflicht bei 10-facher Vergrößerung ausgezählt werden. Eine Auswertung der Spotgrößen erfolgte mit Hilfe des ELISPOT-Readers V2.1 (A.EL.VIS GmbH, Hannover).

Frequenzauswertung der Spots

Um die Frequenzen der IFNγ-sezernierenden, spotbildenden Zellen zu berechnen, wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt. Dabei ist die Effektorzellzahl die unabhängige Variable x (Abszisse) und die Spotfrequenz der Triplikate die abhängige Variable y (Ordinate). Da nur eine unabhängige Variable x vorhanden ist, liegt eine lineare Einfachregression vor. Ziel der Regressionsrechnung ist es, eine Gerade zu finden, die den Zusammenhang zwischen den beiden Variablen optimal beschreibt. Diese Gerade ermöglicht die Ermittlung der *most propable number* (MPN) der

Spotfrequenz, d. h. die Ermittlung der abhängigen Variablen y. Die Gerade kann durch die Gleichung $y = ax$ beschrieben werden.

Für die Rechnung wurde die Software Mathemathica V4.2.1 Statistics „LinearRegression" (Wolfram Research Inc., Champaign, IL) verwendet. Es wurde die Steigung a der Regressionsgeraden ermittelt, sowie das 95%ige Konfidenzintervall und der p-Wert. Das 95%ige Konfindenzintervall liefert Informationen in derselben Dimension, wie die untersuchte Variable. Es gibt den Bereich an, der den gesuchten Wert, d. h. die Spotfrequenz, mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% beinhaltet. Der p-Wert bezeichnet die Irrtumswahrscheinlichkeit, mit der das Konfidenzintervall den gesuchten Wert nicht enthält. Er muss < 0,01 sein, damit die Nullhypothese - die aussagt, dass ein bestimmter Zusammenhang nicht besteht - abgelehnt und eine lineare Verteilungsfunktion angenommen werden kann.

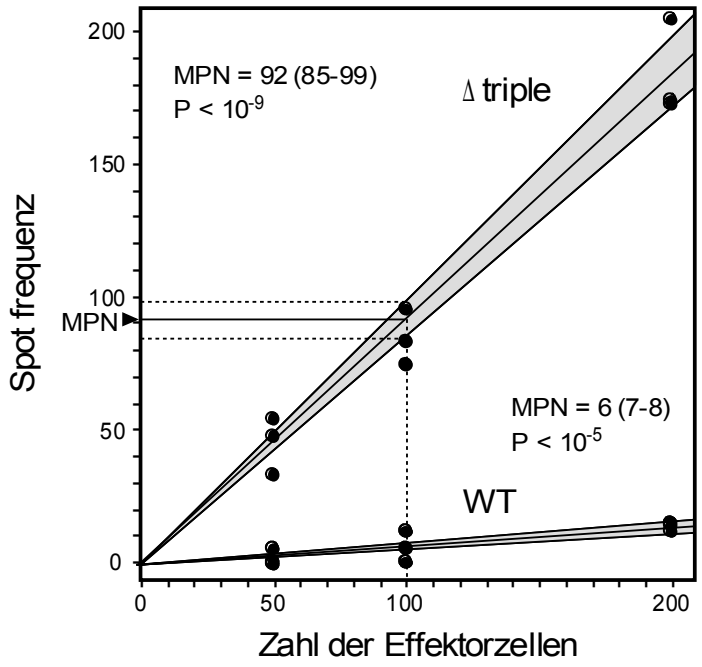


Abbildung 4: **Grafische Darstellung der Ermittlung der Spotfrequenz.** Als Beispiel dient ein ELISPOT-*Assay*, bei dem die Stimulatorzellen mit mCMV-WT (WT) bzw. mCMV-Δ*m04+06+152* (Δ*triple*) infiziert wurden und bei dem als Effektorzellen IE1-CTL eingesetzt wurden. Eingetragen sind die Einzelwerte der Spotfrequenz sowie Regressionsgeraden, Konfidenzintervalle und die *most propable number* (MPN).

Am Beispiel von mCMV-WT (WT) und mCMV-Δ*m04+06+152* (Δ*triple*) ist in Abb. 4 graphisch dargestellt, was durch die Regressionsanalyse rechnerisch ermittelt wurde. Die Regressionsgerade wird nach oben und nach unten von den 95%

Konfidenzintervallen flankiert (grau unterlegte Flächen). Für eine beliebige Zellzahl, z. B. 100 Effektorzellen, lässt sich nun die MPN der Spotfrequenz sowie die statistische Schwankung nach oben und nach unten auf der Ordinate ablesen.

2.2.10.2 Zytolysetest (^{51}Cr-*Release-Assay*)

Die Effektorfunktion, die im ^{51}Cr-*Release-Assay* abgefragt wird, ist die zytolytische Aktivität von T-Zellen. In diesem *Assay* macht man sich zu Nutze, dass ^{51}Cr-markierte Zellen, die das interessierende Antigen auf der Oberfläche präsentieren, das zuvor aufgenommene ^{51}Cr nur dann freisetzen, wenn sie durch T-Zellen lysiert werden. Das freigesetzte radioaktive ^{51}Cr kann dann im Zellüberstand mit Hilfe eines γ-Counters quantifiziert werden. So kann bestimmt werden, wieviel Prozent der im Versuch eingesetzten APC durch die vorhandene T-Zellpopulation lysiert wurden. Es kann jedoch nicht unterschieden werden, ob die gesamte T-Zellpopulation an der gemessenen Lyse beteiligt ist, oder ob nur einige wenige Zellen für die gesamte lytische Aktivität verantwortlich sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zytolysetest zur Charakterisierung der verschiedenen peptidspezifischen CTLL bezüglich ihrer lytischen Aktivität eingesetzt. Durch Titration des exogen auf die APC geladenen Peptids kann die Sensitivität der Effektoren gemessen werden. Das Verhältnis von Effektoren zu APC bleibt dabei konstant (hier immer 15:1). Außerdem wurde der Zytolysetest eingesetzt, um zu untersuchen, bei welcher Effektorzellkonzentration eine Erkennung und Lyse der APC erfolgt bzw. ob überhaupt eine Lyse stattfindet. Dazu wurde das Verhältnis von Effektoren zu APC titriert.

Testen der Sensitivität einer CTLL

Material

- Effektoren: CTLL unterschiedlicher Spezifität
- Zielzellen: P815 (für CTL mit H-2^{d} Restriktion), EL-4 (für CTL mit H-2^{b} Restriktion)
- synthetische Peptide
- RPMI
- ^{51}Cr ($Na_2{}^{51}CrO_4$) (Perkin Elmer)

Durchführung

Die Zielzellen wurden geerntet, gewaschen, ihre Zellzahl bestimmt und $1x10^6$ Zellen in demselben Volumen suspendiert, welches anschließend zur radioaktiven Markierung mit der ^{51}Cr-Lösung zugegeben wurde. Für die Markierung von $1x10^6$ Zellen wurden 100µCi eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 1¼h wurden die Zellen 3x in RPMI gewaschen. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und auf $1x10^3$ Zellen/50µl/Well eingestellt.

Für die Peptidtitration in Triplikaten wurden in einer 96-Well-Platte je 100µl RPMI vorgelegt. Die drei Wells für die höchste Peptidkonzentration blieben frei. Das Peptid wurde in einer Konzentration von 10^{-7}M angesetzt und je 110µl in die drei freigelassenen Wells gegeben. Auf Eis wurde in $\log_{[10]}$ Titrationsstufen bis zu einer Konzentration von 10^{-14}M titriert. Pro Well wurden nun $1x10^3$ der zuvor angesetzten Zielzellen zugegeben und der Ansatz ½h bei 37°C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die zu testenden CTLL drei Mal in RPMI gewaschen und gezählt. Sie wurden auf eine Zellzahl von $1,5x10^4$ Zellen/50µl und Well eingestellt und auspipettiert.

Zur Berechnung der spezifischen Lyse der Testgruppen sowie zur Bestimmung der unspezifischen Lyse wurden stets *high control* und *low control* mitgeführt. Dazu wurden je $1x10^3$ ^{51}Cr-markierten Zielzellen in je 200µl/Well ohne Zugabe von Effektoren in 9-facher Wiederholung angelegt. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität der markierten Zellen wurde bei den Proben der *high control* die Radioaktivität von 100µl suspendierter Zellen gemessen. Bei den Proben der *low control* wurde die durch Spontanlyse freigesetzte Radioaktivität in 100µl zellfreiem Überstand gemessen. Für die Bestimmung der antigenunabhängigen, unspezifischen Lyse wurden Zielzellen und Effektoren ohne Zugabe des Antigens in 9-facher Wiederholung zusammengegeben (*no antigen*). Der Prozentsatz der unspezifischen Lyse der Zielzellen wird für die Berechnung der spezifischen Lyse benötigt.

Der komplette Ansatz, d. h. Peptidtitration, *low control* und *no antigen*, wurde zur besseren Kontaktaufnahme von Effektoren und Zielzellen bei 110xg anzentrifugiert und anschließend für 3½h im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen bei 500xg pelletiert und je 100µl Überstand in vorbereitete Counter-Röhrchen zur Messung der Radioaktivität im γ-Counter überführt.

Berechnung der spezifischen Lyse

Die spezifische Lyse wurde mit Hilfe folgender Formel ermittelt:

$$\frac{(cpm-lc)}{(hc-lc)} x100 = Prozent\ spezifische\ Lyse$$

Dabei ist cpm = radioaktive *counts* pro min der gemessenen Probe
hc = high control
lc = low control.

Für die statistische Auswertung mit Mathematica (siehe 2.2.10.1) wurden die jeweiligen Nαt-Werte des linearen Bereichs der lytischen Aktivität eingesetzt.

2.2.11 Adoptiver Transfer mit Virusinfektion

Das protektive Potential von CTLL *in vivo* wurde im adoptiven Transfer (AT)-Modell untersucht. In diesem Tiermodell wird zunächst das hämatopoetische System der Mäuse durch Bestrahlung zerstört. Durch die anschließende Infektion der Tiere und die gezielte Übertragung von peptidspezifischen CTLL, lässt sich das protektive Potential der transferierten Zellen in Abwesenheit anderer lymphatischer Zellen untersuchen. Das Schutzpotential ist dabei auch abhängig von der Menge an natürlich prozessiertem Peptid auf den infizierten Zellen. Die Menge des präsentierten Peptids wiederum wird von den vRAPs gesteuert.

2.2.11.1 Transfer und Infektion

Material

- Rezipienten-Mäuse: BALB/cJ oder C57BL/6
- Einmal-Spritzen (1ml, 5ml)
- Kanülen (0,40x20mm; 0,45x12mm)
- Virus in PBS (ohne FCS)
- CTLL in PBS (ohne FCS)

Durchführung

Die Versuchstiere wurden zur Immunsuppression in einer Kleintierbestrahlungsanlage (Cäsiumquelle: ^{137}Cs) mit Dosen von 6,5 Gy bei Mäusen des Stammes BALB/cJ am Tag des Transfers und der Infektion bzw. von 7,5 Gy bei Tieren des Stammes

C57BL/6 einen Tag vor Transfer und Infektion bestrahlt. Der Zelltransfer erfolgte in einem Volumen von 500µl pro Maus. Die Zellen wurden i. v. in die Schwanzvene injiziert. Die Menge der transferierten Zellen betrug 10^4, 10^5 bzw.10^6 Zellen/Maus. Anschließend wurden die Mäuse, wie unter 2.2.9 beschrieben, mit je $2x10^5$ pfu/50µl infiziert. In jeder Gruppe von Mäusen befanden sich 5 bis 8 Tiere.
An Tag 11-12 nach Transfer und Infektion wurden Milz und Lunge zur Bestimmung der Virustiter und die Leber zur Ermittlung der Zahl infizierter Zellen mittels immunhistochemischer Analyse entnommen. Milz und Lunge wurden bei -70°C eingefroren. Die Lebern wurden in Formalin fixiert (siehe 2.2.12.1).

2.2.11.2 Virustiterbestimmung in Organhomogenaten

Um den Virustiter in Organen zu bestimmen, wurden diese zu Homogenaten aufgearbeitet, auf MEF der 3. Passage übertragen und zentrifugal infiziert. Nach vier Tagen Inkubation konnten die gebildeten Plaques ausgezählt und der Virustiter errechnet werden.

Material

- Organe
- Metallsiebe
- Einmal-Spritzen (2ml)
- Petrischalen (6cm)
- MEM
- Kryoröhrchen
- 48-Well-Platten mit 900µl Medium
- 48-Well-Platten mit MEF der 3. Passage
- Methylzellulose-Medium

Durchführung

Zunächst wurden die Organe aufgetaut und auf Eis gestellt. Jedes Organ wurde mit Hilfe eines 2ml-Spritzenstempels durch ein steriles Metallsieb gerieben und in einer 6cm Petrischale aufgefangen. Das im Sieb hängende Gewebe wurde mit 2x 1ml Medium nachgespült. Die gewonnene Zellsuspension wurde in ein vorbereitetes Kryoröhrchen überführt und auf Eis gestellt. Nach abgeschlossener Aufarbeitung aller

Organe konnten je 100µl Organhomogenat zur Titration (6 Verdünnungsstufen) auf vorbereitete Platten (48-Wells) mit 900µl vorgelegtem Medium übertragen werden. Titriert wurde mit 100µl, wobei nach jedem Übertrag ins nächste Well die Spitze gewechselt wurde, um die Verdünnungsreihe durch Verschleppen von Viruspartikeln nicht zu verfälschen. Je 2x 100µl titriertes Organhomogenat wurde auf die vorbereiteten Platten mit MEF, deren Medium zuvor bis auf ca. 100µl abgesaugt worden war, übertragen. Die MEF mit den Organhomogenatverdünnungen wurden für 30min bei 760xg zentrifugal infiziert. Anschließend wurden die Ansätze mit 0,5ml Methylzellulose überschichtet und für 4 Tage bei 37°C inkubiert.

Aus den gezählten Plaques wurde der **Virustiter pro Organ** wie folgt errechnet:

1. Verdünnungsstufe: Plaquezahl x 2 x 10^2
2. Verdünnungsstufe: Plaquezahl x 2 x 10^3

2.2.12 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ermöglicht den Nachweis von Proteinen im Gewebe. Dies geschieht mit Hilfe von Antikörpern, welche wiederum mit einem entsprechenden Detektionssytem gekoppelt sind. In dieser Arbeit dient die Immunhistochemie dem Nachweis von mCMV-WT oder mCMV-vRAP-Mutanten infizierten Leberzellen.

2.2.12.1 Einbetten und Schneiden der Organe

Für die histologische Färbung wurden die zu untersuchenden Lebern Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet.

Material

- 4%ige Formalinlösung
- Isopropanol (20%, 40%, 60%, 80%, 90%, 100%)
- Xylol
- Paraffin
- silanisierte Objektträger

Durchführung

Nach der Organentnahme wurden die Lebern 18h in einer 4%igen wässrigen

Formalinlösung bei RT fixiert und anschließend für 2h in Leitungswasser gespült. In einer aufsteigenden Alkoholreihe (Isopropanol in ansteigenden Konzentrationen, 20%, 40%, 60%, 80%, 90% und 100% für je 45min) wurden die Organe dehydriert, anschließend für 3h in Xylol inkubiert, über Nacht in 60°C heissem Paraffin belassen und am nächsten Morgen in Paraffin eingeblockt.
Um die Blöckchen am Mikrotom schneiden zu können, wurden sie auf -20°C gekühlt. Die Schnittdicke wurde auf 2µm eingestellt. Die Serienschnitte wurden zunächst im Kaltwasserbad (20°C) aufgefangen und dann in ein Warmwasserbad (40°C) zum Strecken überführt, damit sie glatt auf einen silanisierten Objektträger aufgezogen werden konnten. Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C getrocknet.

2.2.12.2 Entparaffinierung der Schnitte

Um die Schnitte immunhistologisch färben zu können, mussten sie zunächst entparaffiniert werden.

Material

- Xylol
- Isopropanol (50%, 70%, 90%, 100%)
- aqua bidest.

Durchführung

Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte 15min in Xylol inkubiert. Anschließend durchliefen sie eine absteigende Isopropanolreihe (100%, 90%, 70% und 50% für je 3min) und wurden zuletzt für einige Minuten in aqua bidest. gespült.

2.2.12.3 mCMV-IE1-Immunhistochemie

In den entparaffinierten Organschnitten wurde mit Hilfe der Avidin-Biotin-Peroxidase-Färbung (sog. ABC-Methode) das Vorhandensein des viralen IE1-Proteins (pp89/76) überprüft. Als Substrat diente Diaminobenzidin (DAB), das in Verbindung mit Nickel zu einer Schwarzfärbung an den Stellen des Gewebes führt, an denen es zu einer Expression des IE1-Proteins gekommen ist.

Material

- Trypsin-Lösung (Difco, Michigan, USA)
- Methanol, H_2O_2
- PBS, TBS, BSA-TBS
- Normalserum (NS) Kaninchen
- Ak: Primär-Ak anti-pp89/76; Sekundär-Ak Ziege anti-Maus IgG (Fab)-Biotin-konjugiert (siehe 2.1.8)
- Peroxidase VECTASTAIN ABC-Kit Standard
- Diaminobenzidin (DAB) und Nickelsulfat ($NiSO_4 \times 6H_2O$)
- Trispuffer
- Haemalaun nach Mayer
- Xylol, Isopropanol, Entellan

Durchführung

- Inkubation in Trypsin (15min, 37°C)
- 3x 1min spülen in aqua bidest.
- Methanol-H_2O_2-Block (30min, RT) (30ml Methanol, 30ml PBS, 1ml H_2O_2)
- 3x 1min spülen in TBS
- Inkubation in NS Kaninchen, 1:10 in BSA-TBS (1%) (20min, feuchte Kammer), danach Serum abschütten
- Inkubation mit dem Primär-Ak anti-pp89/76, 1:250 in BSA-TBS (1%) sowie NS Kaninchen, 1:10 in BSA-TBS (1%) (60min, feuchte Kammer)
- 3x 1min spülen in TBS
- Inkubation mit dem Sekundär-Ak Ziege anti-Maus IgG (Fab)-Biotin, 1:200 in BSA-TBS (1%) (30min, RT)
- 3x 1min spülen in TBS
- Inkubation mit dem ABC-Reagenz (Avidin 1:100; Biotin-Peroxidase 1:100 in BSA-TBS) für 30min bei RT
- 3x 10min in TBS spülen
- spezifische Färbung: 10mg DAB + 75mg Nickelsulfat in 50ml Trispuffer (50mM) lösen und filtrieren; 17µl H_2O_2 (30%) zugeben (Inkubationszeit: 10min)
- Gegenfärbung mit Haemalaun (3s)
- Dehydrierung (aufsteigende Isopropanolreihe: 1x 50%, 1x 70%, 1x 90%, 2x 100%, jeweils 30s), anschließend Trocknen lassen und über Xylol in Entellan eindecken.

2.2.13 *In-Situ*-Hybridisierung

Das Verfahren der *In-Situ*-Hybridisierung (ISH) erlaubt den Nachweis spezifischer Nukleinsäuren (RNA, DNA) im Gewebeschnitt (*in situ*). Für diese Arbeit wurde eine ISH durchgeführt, um die im adoptiven Transfer verwendeten Viren auf die korrekte Expression der jeweiligen vRAPs hin zu untersuchen.

Als Sonden wurden DNA-Fragmente verwendet, die komplementär zu der DNA der vRAP-Gene *m04*, *m06* und *m152* sind. Damit konnte das Vorhandensein dieser Gene histologisch nachgewiesen werden. Als Markierung wurde Digoxigenin-MdUTP eingesetzt. Durch die Zugabe von Antikörpern gegen Digoxigenin, die wiederum mit alkalischer Phosphatase konjugiert sind (anti-Dig-AP), konnten in Anwesenheit des Substrats Neufuchsin die von den Sonden detektierten Zellen sichtbar (leuchtend rot) gemacht werden. Für genauere Beschreibungen der Durchführung der ISH sei auf folgende Literatur verwiesen: [Leitch *et al.*, 1994; Whiley & Sons].

2.2.14 Zytofluorometrische Analyse

Die durchflusszytometrische (FACS) Analyse ermöglicht die Detektion sowohl von Zelloberflächenmolekülen als auch von intrazellulären Molekülen. Diese Technik wurde eingesetzt, um die Regulation der MHC-Klasse-I Expression auf virusinfizierten Zellen zu analysieren. Dafür wurde eine Zweifarbenanalyse durchgeführt. Mit einem anti-MHC-Klasse-I L^d Ak wurde die Expressionsstärke des H-$2L^d$ Moleküls untersucht. Als Infektionsmarker diente ein polyklonales affinitätsgereinigtes Kaninchen-Serum, das gegen das frühe E-Phase Protein m164 von mCMV gerichtet ist. Das Antiserum bindet intrazellulär an das Protein.

Material

- infizierte MEF der 3. Passage
- FACS-Puffer
- Cytofix/Cytopermkit von BD Biosciences
- Ak (siehe 2.1.8):
  PE-Maus anti-Maus H-$2L^d$
  PE-Isotypkontrolle Maus (Balb/cJ) IgG_{2a}, κ
  Kaninchen anti-m164 mCMV

Alexa Fluor 488 anti-Kaninchen IgG (H+L)
Fc-Block: anti-Maus CD16/CD32 (Fcγ III/II Rezeptor)

Durchführung

Zentrifugal infizierte (siehe 2.2.8.1), 16h im Brutschrank inkubierte MEF wurden geerntet, gewaschen und gezählt. Nachdem die Zellen 1x in FACS-Puffer gewaschen worden waren, folgte die Inkubation in Blocklösung (anti-Maus CD16/CD32, 1µg/10^6 Zellen in 100µl) für 10min bei 4°C. Die spezifische Zelloberflächenfärbung erfolgte mit einem PE-konjugierten anti H-2L^d Ak (2µg/10^6 Zellen in 100µl) für 30min bei 4°C. Nach diesem Markierungsschritt wurden die Zellen gewaschen und mit Cytofix/Cytoperm zur Fixierung und Permeabilisierung behandelt (Inkubation 20min bei 4°C). Anschließend wurde ein Mal mit *Perm-Wash* (Cytofix/Cytopermkit) gewaschen. Auf die in dieser Weise für die intrazelluläre Färbung vorbereiteten Zellen wurde zunächst der m164-spezifische Ak (0,2µg/10^6Zellen in 100µl) gegeben und 20min bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschgang mit *Perm/Wash* Puffer wurde als Sekundär-Ak ein Alexa Fluor 488-konjugierter Ziege anti-Kaninchen IgG Ak zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von wiederum 20min bei 4°C wurden die Zellen gewaschen. Isotypkontrollen wurden jeweils mitgeführt.
Die anschließenden Messungen wurden mit einem FACSort durchgeführt und die aquirierten Daten mit Hilfe der Software CellQuest Pro (Becton Dickinson) ausgewertet. Dafür wurde das *life gate* auf die Lymphozytenpopulation gesetzt. Alle in diesem *gate* erfassten Zellen wurden in die Auswertung miteinbezogen.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Immunevasine/VIPRs von mCMV auf die Reaktivität mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen untersucht. Um die bisher bekannten drei Immunevasine systematisch untersuchen zu können, war von Wagner und Kollegen [2002] ein Set von Virusmutanten generiert worden. Es beinhaltet Gendeletionsmutanten, welche für die Genprodukte aller drei Immunevasine in allen möglichen Kombinationen kodieren: drei Viren, die jeweils nur eines der drei Immunevasine exprimieren, drei Viren, die die Kombinationen aus zwei Immunevasinen exprimieren, sowie eine *Triple*-Mutante, die keines der Immunevasine exprimiert.

Da die im Folgenden beschriebenden Daten unter anderem zeigen werden, dass m04 die TCR-Erkennung peptidbeladener MHC-Klasse-I-Moleküle nicht inhibiert und dass es als positiver Regulator der Antigenpräsentation fungieren kann, ist demzufolge seine Bezeichnung als Immunevasin oder VIPR nicht zutreffend. Es wurde das Akronym 'vRAP' (*viral Regulator of Antigen Presentation*) eingeführt [Holtappels *et al.*, 2006a], um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass virale Proteine in die Antigenpräsentation der Wirtszelle sowohl negativ wie auch positiv regulierend eingreifen können. Im Folgenden wird der Einheitlichkeit halber ausschließlich dieses Akronym verwendet werden.

3.1 vRAP-modulierte MHC-Klasse-I Oberflächenpräsentation

Um den Effekt der vRAPs auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression in einem der *in vivo* Situation möglichst nahe kommenden System zu untersuchen, wurde die Infektion von primären Mausembryofibroblasten (MEF, BALB/cJ) als Zellkulturmodell gewählt. Diese wurden mit mCMV-WT bzw. mit jeweils einer der sieben vRAP-Gendeletionsmutanten infiziert (siehe Material und Methoden, Tab. 2), die im Folgenden als Virus-Set bezeichnet werden. Als Kontrolle dienten nicht infizierte MEF. Nach 16-stündiger Inkubation wurden die Zellen in der späten E-Phase der viralen Genexpression zytofluorometrisch analysiert.

Die zytofluorometrische Zweifarbenanalyse (siehe Abb. 5) zeigt die Oberflächenexpression des MHC-Klasse-I-Moleküls L^d (PE Fluoreszenzintensität, Abszisse) und das als Infektionsmarker dienende E-Phase Glykoprotein m164 (gp38) (Alexa Fluor 488 Fluoreszenzintensität, Ordinate). Die analoge Analyse der vRAP-modulierten MHC-Klasse-I Expression wurde auch für H-2D^d und H-2K^d durchgeführt. Die Ergebnisse (hier nicht gezeigt) entsprachen denen der H-2L^d-Analyse.

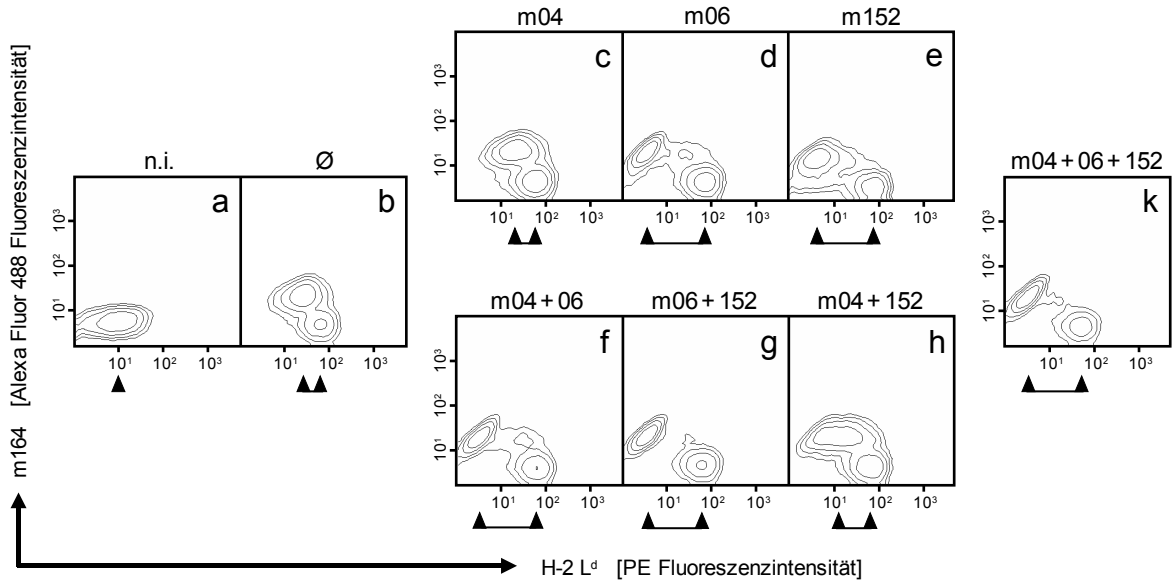


Abbildung 5: **vRAP-modulierte MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression**. MEF (BALB/cJ) wurden nicht infiziert (a, n.i., Kontrollansatz) bzw. infiziert mit der Mutante mCMV-Δ*m04+06+152* (b, Ø), mit mCMV-WT (k) bzw. mit einer der vRAP-Gendeletionsmutanten (c-h). Gezeigt sind jeweils die exprimierten vRAPs. Nach 16h wurde eine zytofluorometrische Zweifarbenanalyse durchgeführt. Die Konturplots repräsentieren die Fluoreszenzintensität für ca. 35.000 Zellen im *life gate*.

In den MEF-Kulturen waren nicht alle Zellen mit mCMV infizierbar. In der FACS-Analyse konnten aus diesem Grund deutlich zwei Zellpopulationen unterschieden werden. Die infizierte Zellpopulation wurde definiert durch die Expression des viralen m164-Proteins, die nicht infizierte durch das Fehlen von m164 (siehe Abb. 5, b-k). Die nicht infizierten Zellen der verschiedenen infizierten Ansätze zeigten – wie die infizierten Zellen dieser Ansätze auch - eine Hochregulation des L^d-Moleküls, die von einer weiteren Regulation durch die vRAPs aber unberührt blieben. Sie konnten daher als interner Standard für die Effizienz der vRAP-modulierten Oberflächenenexpression

dienen.

n.i. und Infektion mit mCMV-Δ*m04+06+152* (a und b): Im Vergleich zu nicht infizierten MEF-Kulturen, bei denen die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression niedrig war (a), zeigte eine Infektion mit der *Triple*-Mutante (mCMV-Δ*m04+06+152*) eine Hochregulation des H2-L^d Moleküls (b). Die Oberflächenexpression innerhalb der nicht infizierten Zellpopulation war höher als in der infizierten. In den infizierten Zellen hatte entweder eine geringere Hochregulation oder eine aktive Herunterregulation des MHC-Klasse-I-Moleküls stattgefunden. Aufgrund des Fehlens von vRAPs kann grundsätzlich ausgeschlossen werden, dass die Hochregulation der Oberflächenexpression von H2-L^d der infizierten und der nicht infizierten Zellpopulation durch die vRAPs induziert wurde.

Infektion mit den Doppelmutanten (c-e): Mit Hilfe der Doppelmutanten mCMV-Δ*m06+152*, mCMV-Δ*m04+152* und mCMV-Δ*m04+06* konnte der Effekt jedes einzelnen vRAP untersucht werden. Die Hochregulation der MHC-Klasse-I-Moleküle der nicht infizierten Zellpopulation innerhalb der infizierten Kulturen war nach Infektion mit allen drei Virusmutanten identisch. Im Gegensatz dazu war in den m164-positiven, d. h. infizierten Zellpopulationen die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression durch die einzelnen vRAPs unterschiedlich reguliert. Die Oberflächenexpression von H2-L^d nach Infektion mit mCMV-Δ*m06+152* war identisch mit der nach Infektion mit der *Triple*-Mutante, d. h. hier zeigte m04 keinen nachweisbaren Einfluss auf die Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle (vgl. c mit b). Hingegen war eine deutliche Herunterregulierung von H2-L^d zu beobachten, wenn entweder m06 oder m152 allein exprimiert wurden (d und e). Die Regulierung erfolgte bis auf Werte unterhalb des Expressionsniveaus der nicht infizierten MEF der Kontrollgruppe (vgl. d und e mit a).

Infektion mit den Einfachmutanten (f-h): Die Expression von jeweils zwei vRAPs in den Deletionsmutanten mCMV-Δ*m152*, mCMV-Δ*m04* und mCMV-Δ*m06* erlaubte die Untersuchung ihres selektiven Zusammenspiels. Die Koexpression von m04 mit m06 zeigte keine Wirkung auf die Herunterregulation durch m06; das MHC-Klasse-I Expressionsniveau innerhalb der infizierten Zellen entsprach dem nach Infektion mit der m06 alleine exprimierenden Doppelmutante (mCMV-Δ*m04+152*) (vgl. d mit f). Die kombinierte Expression von m06 und m152 hatte einen stark herunterregulierenden Effekt der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression auf die m164-

positive Zellpopulation (g). Das korreliert mit der bekannten Funktion von m06, beladene MHC-Klasse-I-Moleküle zur Degradation ins Lysosom zu transportieren und mit der Funktion von m152, beladene MHC-Klasse-I-Moleküle im ERGIC zurückzuhalten [Reusch *et al.*, 1999; Ziegler *et al.*, 2000]. Im Gegensatz dazu war, wenn m04 und m152 koexprimiert wurden, die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression der infizierten Zellen fast vollständig wiederhergestellt, d. h. m04 zeigte hier einen positiven, die Wirkung von m152 antagonisierenden Effekt (h).

Infektion mit mCMV-WT (k): Die mCMV-WT-Infektion ermöglichte die Darstellung der konzertierten Wirkungsweise aller drei vRAPs (k). Wiederum blieb die Hochregulation von H2-L^d in der nicht infizierten Zellopulation von den vRAPs unbeeinflusst. Der Nettoeffekt der vRAPs zeigte sich in einer starken Herunterregulation der MHC-Klasse-I Expression innerhalb der infizierten Zellen. Der beobachtete positiv regulierende Effekt von m04 kam hier nicht mehr zum Tragen. Er scheint von m06 antagonisiert worden zu sein.

Zusammenfassung: Die einzeln exprimierten Regulatoren m06 und m152 zeigten nach Infektion von MEF einen negativen Effekt auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression. Dagegen scheint m04 als positiver Regulator zu wirken. m04 konnte bei gemeinsamer Expression mit m152 dessen negativen Effekt aufheben. Waren im mCMV-WT alle drei Regulatoren gemeinsam exprimiert, überdeckte m06 den positiv regulierenden Effekt von m04. mCMV codiert somit für Regulatoren, die sowohl eine negative wie auch eine positive Modulation der MHC-Klasse-I Oberflächenmoleküle ermöglichen.

3.2 Erkennung der vRAP-modulierten Peptidpräsentation durch CD8 T-Zellen

Die Feststellung, dass die drei vRAPs die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression differentiell modulieren, ließ die Frage offen, ob die auf der Zelloberfläche exprimierten MHC-Klasse-I-Moleküle peptidbeladen sind und ob diese im Falle einer Peptidbeladung durch polyklonale CD8 T-Zellen erkannt werden können. Mit Hilfe des IFNγ-ELISPOT-*Assays* sollte untersucht werden, ob und in welcher Weise die

vRAPs einen Einfluss auf die Peptidpräsentation und die Epitoperkennung durch CD8 T-Zellen haben. Folgende Teilaspekte standen dabei im Vordergrund: Spiegelt die vRAP-modulierte Erkennung der präsentierten Peptide durch CD8 T-Zellen die in Abb. 5 dargestellte MHC-Klasse-I Oberflächenpräsentation wieder? Hat m04, das an MHC-Klasse-I-Moleküle bindet und diese an die Zelloberfläche eskortiert, einen positiven Einfluss auf die Epitoperkennung durch CD8 T-Zellen oder stört es die Interaktion zwischen peptidbeladenem MHC-Molekül und TCR? Letzteres wäre mit einem immunevasiven Effekt von m04 gleich zu setzen und wurde bereits in der Literatur diskutiert [Lilley & Ploegh, 2005].

In einem ersten Experiment wurde zunächst die Präsentation und Erkennung des mCMV IE1-Peptids ^{168}YPHFMPTNL^{176} [Reddehase *et al*., 1989; Reddehase, 2002] (siehe auch Tab. 3) mittels einer IE1-spezifischen T-Zelllinie untersucht (siehe Abb. 6). Da das IE1-Peptid durch das H2-L^{d}-Molekül präsentiert wird, ist ein direkter Vergleich zwischen Epitoperkennung (siehe Abb. 6) und Expression des präsentierenden MHC-Klasse-I-Moleküls (siehe Abb. 5) möglich. Dazu wurden MEF-Kulturen mit dem Virus-Set infiziert. Zum Testen der Sensitivität der IE1-CTLL wurden MEF in einem Parallelansatz mit synthetischem IE1-Peptid beladen. Die infizierten bzw. mit Peptid beladenen MEF wurden ü.N. mit den Effektorzellen inkubiert. Mittels ELISPOT-Analyse wurde die Zahl der aktivierten, IFNγ-produzierenden IE1-CTL ermittelt (siehe Abb. 6A). Das bezüglich der Epitoperkennung im ELISPOT-*Assay* beobachtete Muster entspricht im Wesentlichen den Beobachtungen für die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression (siehe Abb. 5). Die Infektion der MEF mit der *Triple*-Mutante hatte das vollständige Ansprechen der Effektorzellen zur Folge, d. h. ohne exprimierte vRAPs fand keine Immunevasion statt. Nach Infektion der MEF mit mCMV-WT war das Phänomen der Immunevasion für den überwiegenden Teil der CTL erkennbar. Gleichzeitig wurde deutlich, dass das konzertierte Zusammenspiel aller drei vRAPs eine vollständige Inhibition der IE1-Peptidpräsentation nicht ermöglicht. Etwa 10% der IE1-spezifischen CTL exprimierten TCRs, die dazu in der Lage waren, das trotz vorhanderer vRAPs präsentierte IE1-Peptid zu erkennen.

Bei alleiniger Expression von m04, war die Epitoppräsentation nicht reduziert; 100% der ausgesäten IE1-CTL wurden durch die Stimulatorzellen aktiviert. Demnach zeigt m04 alleine keinen immunevasiven Effekt. Die separate Expression von m06 bzw. von m152 hatte eine Reduktion der Epitoperkennung zur Folge. Dabei war im Gegensatz

zu der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression (siehe Abb. 5 und Wagner *et al.*, 2002) der Effekt von m152 deutlich stärker als der von m06. Wenn die vRAPs einzeln exprimiert werden, ist also bezüglich der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression m06 der stärkste negative Regulator, während für die Antigenpräsentation m152 den stärksten negativ regulierenden Effekt hat.

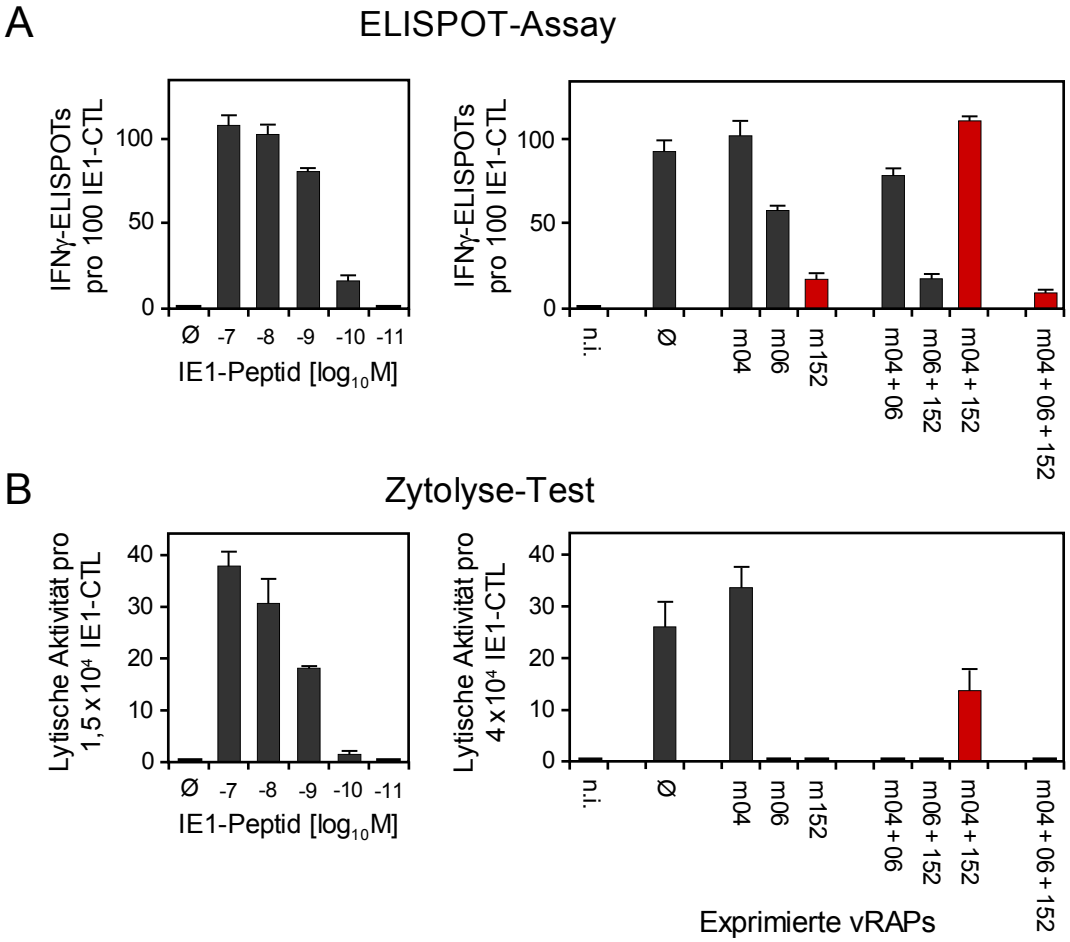


Abbildung 6: **vRAP-modulierte IE1-Epitoperkennung durch IE1-CTLL.** A: Effektorzellaktivierung durch mit dem Virus-Set infizierte MEF (BALB/cJ) bzw. durch exogen mit synthetischem IE1-Peptid beladene MEF, gemessen im 18-h IFNγ-ELISPOT-*Assay*. B: Effektorzellaktivierung durch ^{51}Cr-markierte und, wie unter A beschrieben, infizierte bzw. exogen beladene Zielzellen, gemessen im 4-h Zytolysetest. Als Effektorzellen wurden für das mCMV-IE1-L^{d}-Peptid ^{168}YPHFMPTNL^{176} spezifische CTL eingesetzt. Die vRAPs, die in den mit den jeweiligen Mutanten infizierten Stimulatorzellen exprimiert wurden, sind an der x-Achse der jeweiligen Abbildung verzeichnet. Die Ergebnisse für die Schlüsselviren sind in rot dargestellt.

Die Koexpression von m04 und m06 hatte im Vergleich zur alleinigen Expression von m06 eine verbesserte Erkennung der epitoppräsentierenden Stimulatorzellen zur Folge. m04 zeigte somit eine den immunevasiven Effekt von m06 zum Teil antagonisierende Wirkung auf die Epitoppräsentation. Erwartungsgemäß zeigten m06 und m152, gemeinsam exprimiert, eine starke herunterregulierende Wirkung auf die Epitoperkennung. Das Erkennungsniveau entsprach dem nach Infektion mit der m152 exprimierenden Mutante mCMV-Δ*m04+06*. Die zusätzliche Expression von m06 zeigte also keine weitere Steigerung des bereits vorhandenen immunevasiven Effekts von m152. Dies konnte in einem weiteren unabhängigen Experiment mit einer anderen IE1-spezifischen T-Zelllinie bestätigt werden (siehe Abb. 7). Die bemerkenswerteste Beobachtung wurde nach der gemeinsamen Expression der vRAPs m04 und m152 gemacht. Hier zeigte m04 eine stark antagonistische Wirkungsweise zu der von m152. 100 % der Effektorzellen wurden aktiviert. Der immunevasive Effekt von m152 war durch m04 also vollständig aufgehoben worden; m04 kann somit als positiver Regulator der MHC-Klasse-I restringierten Peptidpräsentation fungieren. Interessanterweise zeigte sich der stärkste immunevasive Effekt dennoch, wenn mit mCMV-WT, das alle drei vRAPs exprimiert, infiziert wurde. Der zuvor beobachtete, die Wirkung von m152 aufhebende Effekt von m04 wurde hier durch den negativen Regulator m06 wieder außer Kraft gesetzt. Um die wesentlichen Aussagen dieses Experiments zu verdeutlichen, sind die wichtigsten Daten in Abb. 6 (und allen folgenden Darstellungen zur T-Zellaktivierung) rot markiert. Die korrespondierenden Viren sollen von nun an als Schlüsselviren bezeichnet werden. Durch die Beschreibung ihrer Wirkungsweise können die Erkenntnisse dieses Versuchs wie folgt zusammengefasst werden: Die Infektion mit der *Triple*-Mutante zeigt das Ausgangsniveau der Epitoppräsentation ohne den Einfluss der vRAPs. m152 hat einen starken immunevasiven Effekt auf die Epitoperkennung, der allerdings durch die Koexpression mit m04 wieder aufgehoben wird. Sind alle drei vRAPs exprimiert, führt m06 wiederum zu einer Aufhebung des anti-immunevasiven Effekts von m04, sodass der Nettoeffekt aller drei vRAPs in einer fast vollständigen Reduktion der Epitoperkennung besteht.

Stellt man die Effektorfunktion der IFNγ-Sekretion, wie sie im ELISPOT-*Assay* (Dauer ca. 18h) untersucht wurde, der lytischen Aktivität, gemessen mit Hilfe des Zytolysetests (Dauer ca. 4h), gegenüber, so war zunächst bei vergleichbarer

Sensitivität (Abb. 6 A+B, linke Bildhälfte, Detektionsgrenze 10^{-10}M) ein geringeres Auflösungsvermögen in der Erkennung der infizierten Zellen zu beobachten. Dies ist möglicherweise auf die geringere Kontaktzeit zwischen infizierten Ziellzellen und Effektorzellen im Zytolysetest zurückzuführen. Trotzdem können auch hier die im ELISPOT-*Assay* gewonnenen Erkenntnisse über das Zusammenspiel der vRAPs bestätigt werden. Wurde m152 allein exprimiert, war keine Lyse nachweisbar, die Koexpression mit m04 hatte eine Reduktion des immunevasiven Effekts von m152 zur Folge. Nach Infektion mit mCMV-WT war durch die m04 antagonisierende Wirkung von m06 keine lytische Aktivität mehr nachweisbar.

Schlussfolgerung: Im ELISPOT-*Assay* zeigte sich ein Epitoperkennungsmuster mit m152 als negativem Hauptregulator, mit m04 als seinem Antagonisten und m06 wiederum als negativem Regulator des Antagonisten m04. Trotz geringerem Auflösungsvermögen war das im ELISPOT-*Assay* beobachtete Grundmuster der Epitoperkennung durch IE1-CTL auch im Zytolysetest nachweisbar.

3.3 Abhängigkeit der vRAP-modulierten CD8 T-Zell-Aktivierung von der Epitoppräsentation

Es war bekannt, dass der negative Regulator m152 nicht nur den Transport der MHC-Klasse-I-Moleküle an die Zelloberfläche inhibiert; m152 reguliert auch die Zelloberflächenexpression von Mitgliedern der RAE-1 Familie herunter, die an den NK-Zell-aktivierenden Rezeptor NKG2D binden [Krmpotic *et al.*, 2002; Lodoen *et al.*, 2003]. NKG2D wird allerdings nicht nur auf NK-Zellen exprimiert, sondern auch auf aktivierten CD8 T-Zellen. Es kann jedoch ausgeschlossen werden, dass das beobachtete T-Zellaktivierungsmuster im ELISPOT-*Assay* möglicherweise peptidunabhängig auf die Modulation der Expression von RAE-1 auf den Stimulatorzellen zurückzuführen ist, da eine Bindung von RAE-1 an NKG2D für CD8 T-Zellen kein erkennbares Signal darstellt [zur Übersicht siehe Vivier *et al.*, 2002]. Allerdings führt die mCMV-Infektion zu Veränderungen im Transkriptom [zur Übersicht siehe Shenk, 2006]. Damit stellte sich die Frage, ob mCMV-infizierte Fibroblasten bis jetzt nicht identifizierte vRAP-regulierte Liganden exprimieren, die an

Rezeptoren binden, die von aktivierten T-Zellen exprimiert werden und IFNγ-Sekretion induzieren. Solche vRAP-regulierten, aber peptidunabhängigen Liganden könnten viruskodiert oder zellulär, aber virusinduziert sein.

Die im Folgenden beschriebenen, sich ergänzenden Experimente sollten nun klären, ob das in Abb. 6 dargestellte Erkennungsmuster tatsächlich von der Oberflächenpräsentation des MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexes abhängt oder ob diesem Muster ein anderer, virusinduzierter peptidunabhängiger Effekt zugrunde liegt.

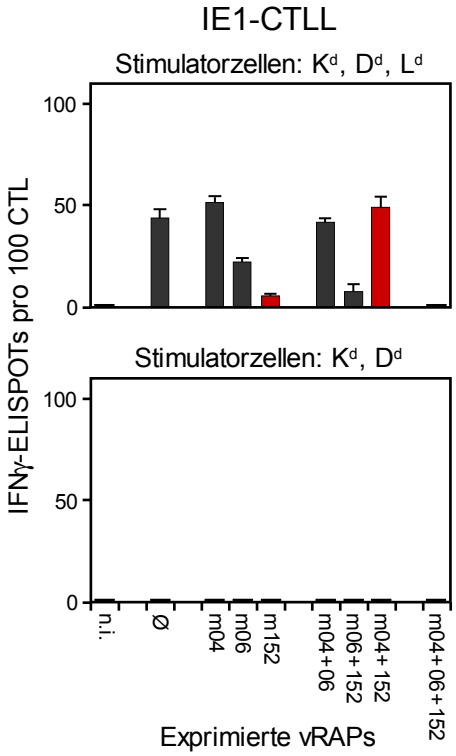


Abbildung 7: **vRAP-modulierte T-Zell-Aktivierung in Abhängigkeit von der IE1-Peptidpräsentation.** Getestet wurde die Aktivierung von IE1-CTL durch infizierte MEF im ELISPOT-*Assay*. Als Stimulatorzellen wurden mit dem Virus-Set infizierte BALB/cJ-MEF verwendet, die alle drei H-2^{d} MHC-Klasse-I-Moleküle K^{d}, D^{d} und L^{d} exprimieren, (oberer Teil der Abbildung), bzw. infizierte BALB/c-H-2^{dm2}-MEF, die lediglich die Moleküle K^{d} und D^{d} exprimieren (unterer Teil der Abbildung).

Im ersten ELISPOT-*Assay* (Abb. 7) wurden als Stimulatorzellen zwei verschiedene Typen von MEF verwendet, die jeweils mit dem Virus-Set infiziert wurden. Die L^{d}-restringierte IE1-Peptidpräsentation und Erkennung durch IE1-spezifische CTL auf

BALB/cJ-MEF wurde mit der Präsentation auf BALB/c-H-2^{dm2}-MEF, denen das IE1-präsentierende Molekül H-$2L^d$ fehlt [Rubocki *et al.*, 1986], verglichen. Durch Infektion der BALB/cJ-MEF konnte das bereits beobachtete Erkennungsmuster der IE1-spezifischen CTL reproduziert werden (siehe Abb. 6). Nach Infektion der BALB/c-H-2^{dm2}-MEF, die nur die Moleküle H-$2K^d$ und H-$2D^d$ exprimieren, war keine Reaktivität der IE1-spezifischen CTL nachzuweisen. Dieses Ergebnis belegte, dass das T-Zellaktivierungsmuster peptidabhängig ist und nicht durch Interaktionen mit anderen, virusregulierten Zelloberflächenmolekülen hervorgerufen worden ist.

In einem zweiten ELISPOT-*Assay* (Abb. 8) wurden infizierte BALB/cJ-MEF zur Stimulation einer T-Zelllinie verwendet, die ein antigenes Peptid (^{243}YGPSLYRRF^{251}) aus dem m04-Protein D^d-restringiert erkennt. Die Besonderheit dieses Proteins liegt darin, dass es gleichzeitig vRAP und Antigen ist (Holtappels *et al.*, 2000a).

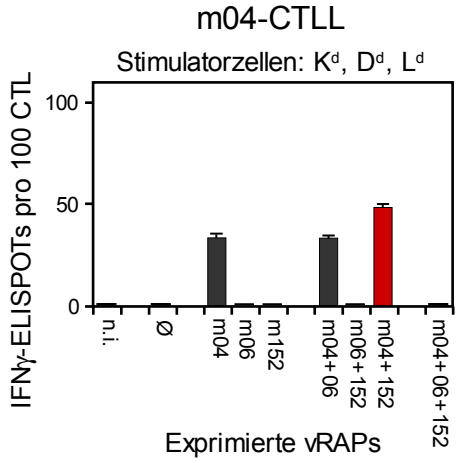


Abbildung 8: **vRAP-moduliertes Epitoperkennungsmuster in Abhängigkeit von der m04-Epitoppräsentation.** Getestet wurde die Aktivierung von m04-CTL im ELISPOT-*Assay*. Als Stimulatorzellen wurden mit dem Virus-Set infizierte BALB/cJ-MEF verwendet.

Unter der Annahme, dass die Aktivierung von Effektorzellen peptidabhängig ist, sollten m04-CTL nur durch infizierte Zellen aktiviert werden, in denen das m04-Protein – und damit das antigene m04-Peptid – exprimiert ist. Tatsächlich tauchten in dem bekannten Epitoperkennungsmuster Lücken auf. Eine IFNγ-Sekretion war nur dann nachweisbar, wenn mit den m04-exprimierenden Mutanten mCMV-Δm06+152,

mCMV-Δ*m152* und mCMV-Δ*m06* infiziert worden war. Lediglich nach Infektion mit mCMV-WT, das alle drei vRAPs und damit auch m04 exprimiert, war keine Epitoperkennung nachweisbar, was sich mit der konzertierten immunevasiven Wirkung der vRAPs erklären lässt.

Schlussfolgerung: Fehlt das für die Peptidpräsentation notwendige MHC-Klasse-I-Molekül, bzw. wird das antigene Peptid nicht präsentiert, findet keine Aktivierung der Effektorzellen und damit keine Regulation von deren IFNγ-Sekretion durch die vRAPs statt. Diese Ergebnisse belegen, dass die beobachtete T-Zellaktivierung durch vRAP-Gendeletionsmutanten-infizierte MEF peptidabhängig ist.

3.4 Epitoperkennungsmuster im Haplotyp H-2^d

Bisher wurde der Einfluss der vRAPs lediglich auf die Präsentation des immundominanten IE1-Peptids hin untersucht. Es stellte sich die Frage, ob die negativ und positiv regulierenden Effekte der vRAPs qualitativ von dem entsprechenden MHC-Allel und/oder vom präsentierten antigenen Peptid abhängen. Es war bekannt, dass die Interaktionen zwischen den einzelnen vRAPs und den verschiedenen MHC-Klasse-I-Molekülen unterschiedlich sind. Während m152 lediglich transient mit dem MHC-Klasse-I-Molekül interagiert [Ziegler *et al.*, 2000], ist die Verbindung zwischen m04 bzw. m06 und MHC-Klasse-I-Molekülen stabil [Kavanagh *et al.*, 2001b; Reusch *et al.*, 1999]. Die Unterschiede dieser Bindungsaffinitäten der vRAPs könnten dazu führen, dass die relativen Beiträge der vRAPs zum Grad der Antigenpräsentation je nach MHC-Klasse-I-Molekül differieren.

Um Klarheit darüber zu erlangen, ob das für das IE1-Peptid beobachtete Erkennungsmuster grundsätzlich auch für andere antigene Peptide bzw. MHC-Allele gültig ist, wurden alle bislang bekannten H-2^d-restringierten CD8 T-Zellspezifitäten von mCMV (Peptidsequenzen siehe Tab. 3) auf dieses Erkennungsmuster hin untersucht (Abb. 9).

Tatsächlich fiel zunächst auf, dass der Effekt der vRAPs teilweise quantitativ differiert. Im Vergleich zu den fünf übrigen Peptiden wurde die Präsentation des H-2D^d-restringierten Peptids m18 deutlich weniger herunterreguliert, wenn m06 und m152

koexprimiert wurden oder gar nicht, wenn m06 alleine exprimiert wurde. Außerdem war für alle D^d-restringierten Peptide kein oder nur ein sehr schwacher Effekt des negativen Regulators m06 zu verzeichnen, wenn er alleine exprimiert wurde.

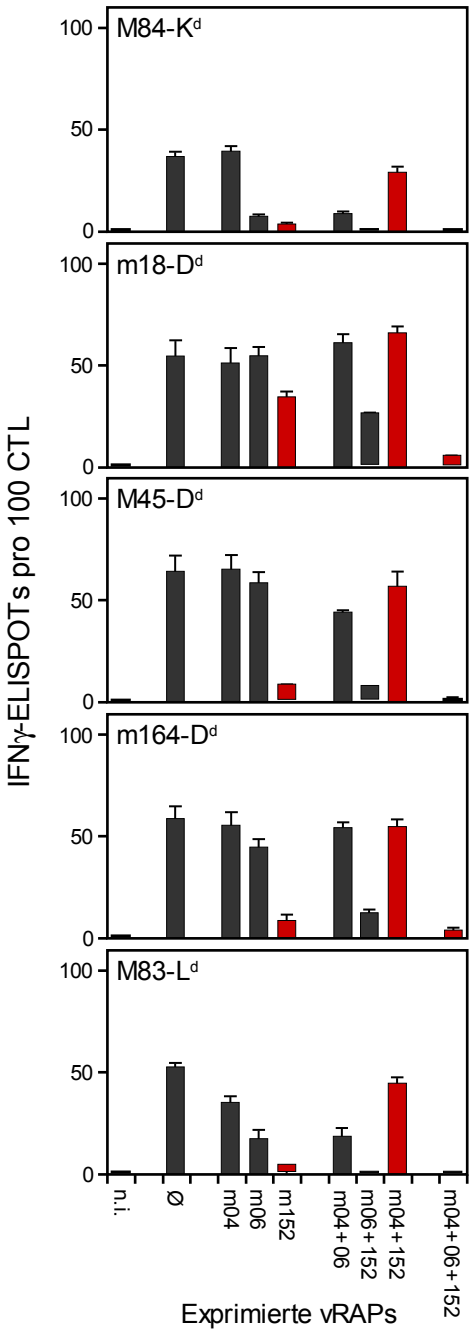


Abbildung 9: **vRAP-modulierte Epitoperkennungsmuster für alle derzeit bekannten antigenen Peptide des Haplotyps H-2^d.** Als Stimulatorzellen im ELISPOT-*Assay* wurden mit dem Virus-Set infizierte BALB/cJ-MEF verwendet. (Die hier fehlenden Erkennungsmuster für IE1-L^d und m04-D^d wurden bereits in Abb. 6+7 (IE1) bzw. Abb. 8 (m04) gezeigt.)

Betrachtet man jedoch die generelle Wirkungsweise der drei vRAPs, so war das bereits für die vRAP-regulierte IE1-Peptidpräsentation beobachtete Grundmuster erkennbar: m152 regelt die Peptidpräsentation herunter, m04 hebt den

immunevasiven Effekt von m152 wieder auf und m06 antagonisiert den Effekt von m04.

Schlussfolgerung: Das vRAP-modulierte Epitoperkennungsmuster gilt für alle drei MHC-Klasse-I-Moleküle des Haplotyps H-2^d und für alle derzeit bekannten Epitope dieses Haplotyps.

3.5 Effekt der vRAPs in verschiedenen Zelltypen

Es konnte gezeigt werden, dass die Wirkung der vRAPs für alle getesteten H-2^d restringierten mCMV-Peptide vergleichbar ist. Als Stimulatorzellen wurden für diese Experimente Fibroblasten verwendet. Ob das beobachtete Erkennungsmuster auch unter Verwendung anderer Stimulatorzellen nachweisbar ist, sollten die folgenden ELISPOT-*Assays* zeigen.

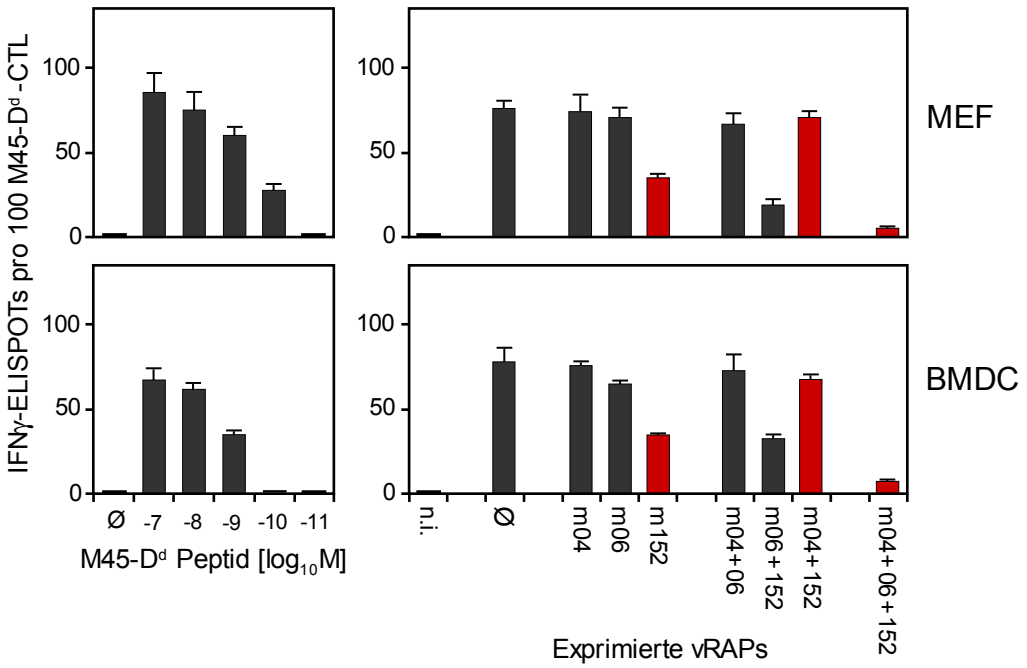


Abbildung 10: **Einfluss der vRAPs auf die Antigenpräsentation von verschiedenen Zelltypen.** Als Stimulatorzellen im ELISPOT-*Assay* wurden infizierte BALB/cJ-MEF als Beispiel für einen Zelltyp stromaler Herkunft (oberer Teil der Abbildung) und infizierte Knochenmarkmakrophagen (BMDC) als Beispiel für einen professionell antigenpräsentierenden Zelltyp (unterer Teil der Abbildung) verwendet. Als Effektorzellen wurden M45-D^d-CTL eingesetzt, die das Peptid ^{507}VGPALGRGL^{515} erkennen. Die Sensitivität der Epitoperkennung der M45-D^d-CTL auf den beiden Zelltypen wurde durch exogene Beladung der Stimulatorzellen mit dem synthetischem M45-D^d-Peptid verglichen.

Zunächst sind hier die Epitoperkennungsmuster nach Infektion mit dem Virus-Set für MEF als Beispiel eines stromalen Zelltyps und für BMDC als Beispiel für einen professionell antigenpräsentierenden Zelltyp hämatopoetischen Ursprungs gezeigt. Der Einfluss der vRAPs auf das Epitoperkennungsmuster wurde mit einer M45-peptidspezifischen CTL-Linie getestet, die das korrespondierende Peptid mit der Sequenz ^{507}VGPALGRGL^{515} D^{d}-restringiert erkennt (Abb. 10).

Obwohl die Sensitivität der Erkennung des exogen beladenen Peptids bei MEF um den Faktor 10 höher war, war das vRAP-modulierte Erkennungsmuster bei MEF und BMDC identisch.

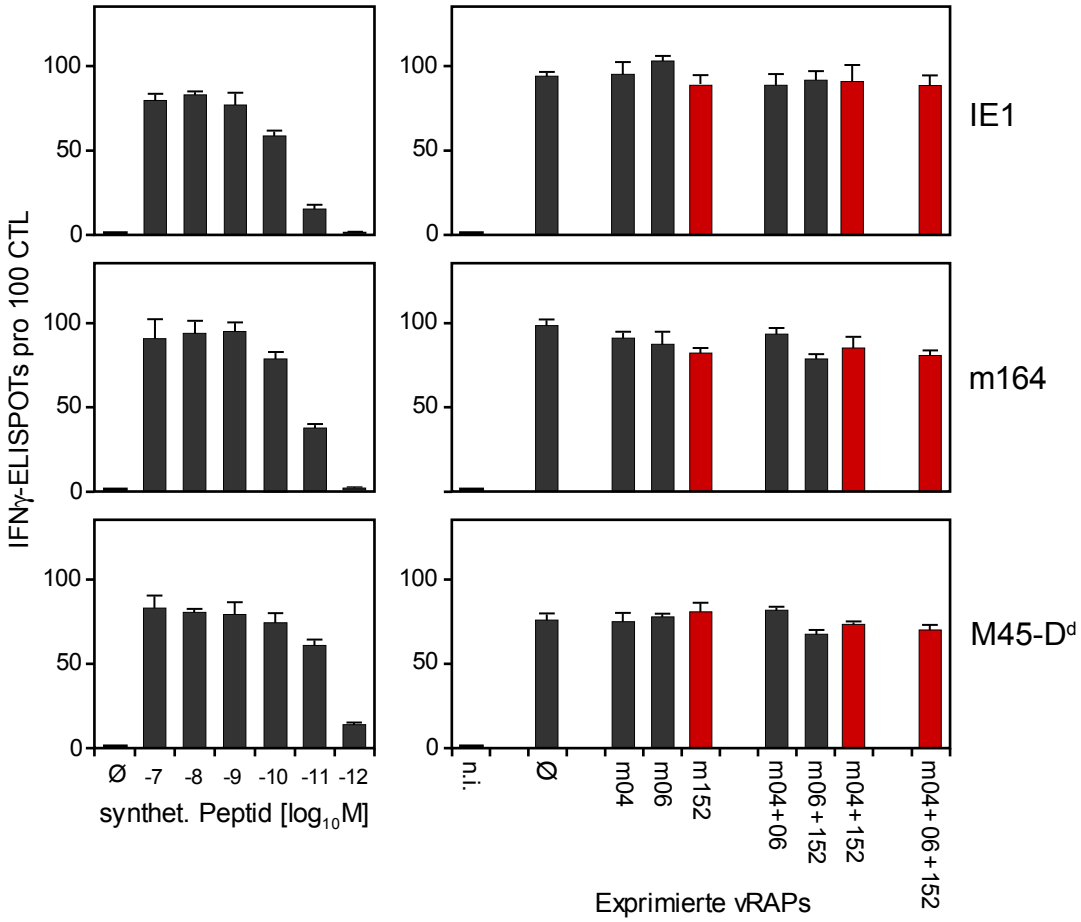


Abbildung 11: **Einfluss der vRAPs auf die Antigenpräsentation auf der Makrophagenzelllinie J774.** Als Stimulatorzellen im ELISPOT-*Assay* wurden infizierte J774 eingesetzt. Die Spezifitäten der getesteten CTL sind jeweils am rechten Abbildungsrand angezeigt. Durch exogene Beladung mit dem entsprechenden synthetischen Peptid wurden die Sensitivitäten der CTLL für die Epitoperkennung miteinander verglichen.

Von Interesse war außerdem, ob die Peptidpräsentation auf Makrophagen als weiterem, wichtigen professionell-antigenpräsentierenden Zelltyp hämatopoetischen Ursprungs ebenfalls durch die vRAPs reguliert wird. Aus der Literatur war bekannt, dass die Antigenpräsentation des IE1-Peptids in mCMV-WT infizierten Fibroblasten vollständig verhindert wurde, während die Präsentation des IE1-Peptids auf mCMV-infizierten primären Knochenmarkmakrophagen sowie auf der Makrophagenzelllinie J774 *in vitro* unbeeinflusst blieb [Hengel *et al.*, 2000].

Um die Frage nach der Regulierbarkeit der Peptidpräsentation durch die drei vRAPs in Makrophagen zu klären, wurde das Epitoperkennungsmuster auf J774 durch CTL mit drei verschiedenen Spezifitäten getestet: IE1-CTLL, m164-CTLL und M45-D^d-CTLL.

Die Untersuchung der vRAP-modulierten Peptiderkennung auf infizierten Makrophagen (Abb. 11) zeigte, dass kein regulierender Effekt der vRAPs vorhanden war. Mit allen drei getesteten CTLL blieb deren Aktivierung nach Infektion mit den Einfach- und Doppel-Mutanten, sowie mit mCMV-WT auf dem Aktivierungsniveau der *Triple*-Mutante. Die negativen Regulatoren m06 und m152 bewirkten keine Herunterregulation der Epitoperkennung. Eine positive Regulation der Antigenpräsentation durch m04 konnte deshalb ebenfalls nicht beobachtet werden.

Gleichzeitig war eine höhere Sensitivität der Peptiderkennung von exogen mit M45-D^d-Peptid beladenen Makrophagen durch M45-D^d-CTL zu beobachten als bei MEF oder BMDC (vgl. Abb. 10 und Abb. 11). M45-D^d-CTL erkannten auf Makrophagen ihr korrespondierendes Peptid bis zu einer Konzentration von 10^{-12}M, während das Peptid auf MEF bis zu einer Konzentration von 10^{-10}M und auf BMDC bis 10^{-9}M erkannt wurde.

<u>Schlussfolgerung:</u> Die Regulation der Peptidpräsentation durch die drei vRAPs im H-2^d Haplotyp resultiert in einem Erkennungsmuster, das für MEF und BMDC vergleichbar ist. In der Makrophagenzelllinie J774 findet keine Regulation der Antigenpräsentation statt.

3.6 Epitoperkennungsmuster im Haplotyp H-2^b

Die entscheidende Beobachtung, die nach der Analyse der Epitoperkennungsmuster im Haplotyp H-2^d gemacht wurde, war, dass m04 einheitlich als positiver Regulator fungieren kann, indem er den immunevasiven Effekt von m152 antagonisiert. Für den Haplotyp H-2^b war in einer früheren Arbeit von Kavanagh *et al.*, [2001a] beschrieben worden, dass m152 die K^b-restringierte Peptidpräsentation nur in Kooperation mit m04 effektiv und vollständig inhibieren kann, während die D^b-restringierte Präsentation allein durch m152 komplett verhindert wird.

Um zu überprüfen, ob die Wirkungsweise der vRAPs zwischen den beiden Haplotypen tatsächlich differiert, wurden die Epitoperkennungsmuster nach Infektion mit dem Virus-Set für ausgewählte K^b- und D^b-restringierte antigene Peptide [Munks *et al.*, 2006b] (Peptidsequenzen siehe Tab. 3) getestet. Zwei dieser Peptide waren auch in der Arbeit von Kavanagh und Kollegen, [2001a] verwendet worden. Beide Peptide sind K^b-restringiert und stammen aus den Proteinen M57 und M97 [Munks *et al.*, 2006b].

Die in Abb. 12A gezeigten Erkennungsmuster durch die korrespondierenden peptidspezifischen CTL entsprachen grundsätzlich dem Grundmuster, das auch für den Haplotyp H-2^d gefunden wurde. Es fiel auf, dass das Erkennungsniveau der verschiedenen CTL unterschiedlich war. Für die *Triple*-Mutante als Referenzwert lag es zwischen 60% und 90% der ausgesäten CTL. Schwankungen im Erkennungsniveau der CTL könnten durch unterschiedliche Affinitäten vom TCR zum MHC-Klasse-I-Peptid-Komplex verursacht worden sein. Obwohl ein schwach negativer Effekt von m04 alleine für die Spezifität m139-K^b zu beobachten war sowie eine geringe Verstärkung des immunevasiven Effektes von m06 durch m04 für die Spezifitäten m139-K^b und M97-K^b, war gleichzeitig sehr deutlich der im Haplotyp H-2^d beobachtete auf m152 antagonistisch wirkende Effekt von m04 zu sehen, wenn diese beiden vRAPs zusammen exprimiert wurden. Betrachtet man also die Wirkungsweise der in den Schlüsselviren exprimierten vRAPs, ist auch im Haplotyp H-2^b der immunevasive Effekt des stärksten negativen vRAP m152 zu erkennen, der positiv regulierende Effekt von m04, der die Wirkung von m152 wieder aufhebt und, wenn alle drei vRAPs zusammen agieren, der m04 antagonisierende Effekt von m06.

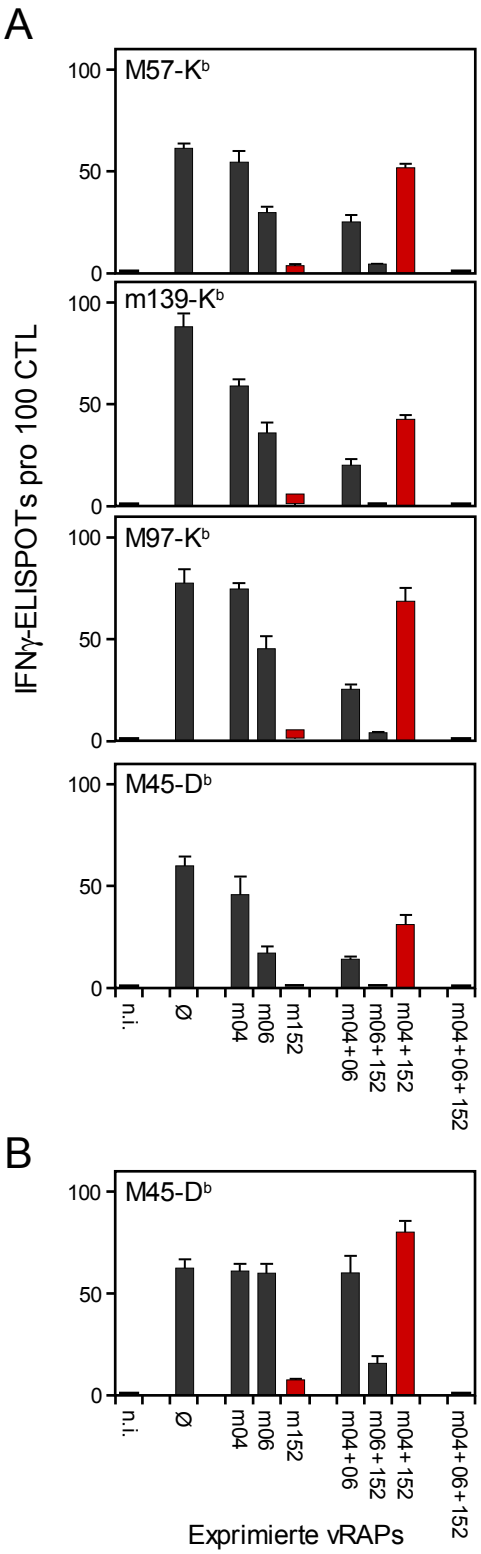


Abbildung 12: **vRAP-modulierte Erkennungsmuster für MHC-Klasse-I präsentierte Epitope im Haplotyp H-2^b.** Es wurde ein ELISPOT-*Assay* durchgeführt. A: Als Stimulatorzellen dienten mit dem Virus-Set infizierte C57BL/6-MEF (Haplotyp H-2^b). Die Epitop-Spezifitäten der CTL und der präsentierenden MHC-Klasse-I Allele sind jeweils angezeigt. B: Als Stimulatorzellen dienten mit dem Virus-Set infizierte C57BL/6-BMDC. Es wurde die Epitoperkennung durch M45-D^b-CTL getestet.

Ein Vergleich der Epitoperkennungsmuster für das aus dem Protein M45 stammende D^b-restringierte Peptid ^{985}HGIRNASFI^{993} (siehe Tab. 3) nach Infektion von MEF und BMDC mit dem Virus-Set (vgl. Abb. 12 A, 4. Graphik und B) zeigte Unterschiede in

der Effektivität der vRAPs. Während ein deutlicher, negativ regulatorischer Effekt von m06 und eine vollständige Herunterregulation durch m152 in MEF zu beobachten war, zeigte m06 in BMDC keinen immunevasiven Effekt und m152 bewirkte kein vollständiges Zurückhalten der peptidbeladenen MHC-Klasse-I-Moleküle. Um so mehr fiel der m152 antagonisierende, besonders starke Effekt von m04 in BMDC auf. Die Expression aller drei vRAPs in mCMV-WT hatte, wie auch in MEF, die komplette Aufhebung der Peptidpräsentation durch den die Wirkung von m04 aufhebenden Regulator m06 zur Folge.

Schlussfolgerung: Das für den Haplotyp H-2^d beobachtete Epitoperkennungsmuster war auch im Haplotyp H-2^b sowohl für MEF als auch für BMDC nachweisbar.

3.7 *In vivo* Relevanz der vRAPs

In MEF und BMDC wurden die modulierenden Effekte der vRAPs und damit auch der positiv regulierende Effekt von m04 gezeigt, während in J774 keine Modulation der Antigenpräsentation durch die vRAPs beobachtet wurde. Es konnte also gezeigt werden, dass der vRAP m04 ein positiver Regulator der Antigenpräsentation zu sein scheint, wenn - wie in MEF und BMDC - eine Modulation der Antigenpräsentation durch die vRAPs überhaupt stattfindet. Die in dieser Arbeit getesteten Stimulatorzelltypen können jedoch nicht als repräsentativ für alle infizierten Zelltypen der verschiedenen Organe angesehen werden, zu denen Hepatozyten, Endothelzellen, Pneumozyten, verschiedene andere Epithelzelltypen, Myozyten, Adipozyten, Fibrozyten, Makrophagen und dendritische Zellen gehören. Um die *in vivo* Relevanz der vRAPs für die CD8 T-Zell-vermittelte Kontrolle der mCMV-Infektion zu überprüfen, ist daher die Analyse ihres Effekts auf die Viruskontrolle in den infizierten Organen das aussagekräftigste Kriterium [zur Übersicht siehe Holtappels *et al.*, 2006b].

Das Tierversuchsmodell des Adoptiven Transfers diente als Testverfahren, um die Kontrolle der mCMV-Infektion durch CTL definierter Spezifität zu analysieren. In einer früheren Arbeit unserer Arbeitsgruppe [Holtappels *et al.*, 2004] war gezeigt worden, dass die M45-D^b-CTL eine mCMV-Infektion von C57BL/6-Mäusen unterschiedlich

kontrollieren. Nach Infektion mit mCMV-Δ*m152*, das m04 und m06 exprimiert, wurde die Virusreplikation in Lunge, Milz und Leber kontrolliert, während nach Infektion mit mCMV-Δ*m152*rev bzw. mCMV-WT der Virustiter durch die M45-D^b-CTL nicht reduziert wurde. Das Ergebnis dieser *in vivo*-Studie stimmt mit den in dieser Arbeit für m152 erhobenen *in vitro* Befunde überein: m152 ist für die Epitoppräsentation von M45-D^b in MEF und BMDC der stärkste inhibitorische Regulator (siehe Abb. 12). Fehlt m152 (mCMV-Δ*m152*), so wird die Epitoperkennung wiederhergestellt, vollständig in BMDC, jedoch nur teilweise in MEF. Auf der Basis dieser früheren Befunde wurde die *in vivo* Relevanz mit Hilfe von M45-D^b-spezifischen CTL nach Infektion mit den Schlüsselviren mCMV-Δ*m04+06* (nur m152 exprimiert), mCMV-Δ*m06* (m152 und m04 exprimiert) und mCMV-WT untersucht. Von besonderer Bedeutung war die Frage, ob m04 auch *in vivo* die von m152 verursachte Retention der peptidbeladenen MHC-Klasse-I-Moleküle aufhebt und damit die Kontrolle der mCMV-Infektion wieder herstellt.

Um die Kontrolle der Infektion *in vivo* zu untersuchen, wurden die Lebern der Rezipienten des Adoptiven Transfers immunhistochemisch untersucht. In Abb. 13 ist das experimentelle Vorgehen skizziert.

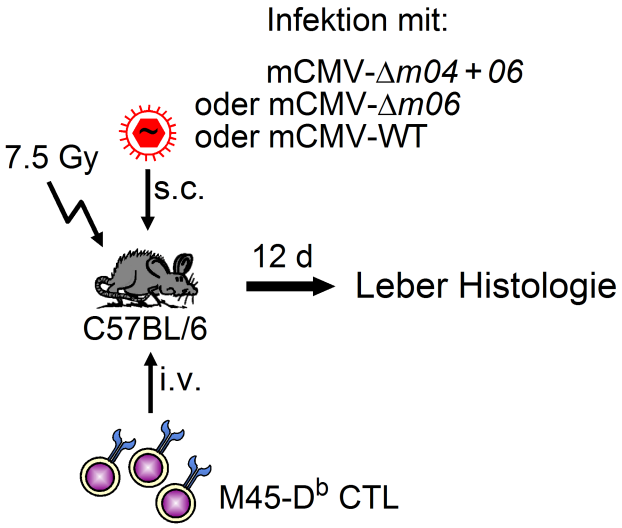


***Abbildung 13:* Adoptiver Transfer.** Rezipienten des Stammes C57BL/6 wurden durch γ-Bestrahlung mit 7,5 Gy immunsupprimiert. Die Tiere erhielten 10^4, 10^5 bzw. 10^6 M45-D^b-CTL intravenös (i.v.) und wurden subcutan (s.c.) mit einem der drei Schlüsselviren infiziert. 12 Tage nach Transfer und Infektion wurden die Lebern entnommen und infizierte Zellen im Lebergewebe mittels ISH nachgewiesen.

Immunsupprimierte C57BL/6-Mäuse wurden mit definierten Zellzahlen von M45-D^b-CTL substituiert und anschließend mit den Schlüsselviren infiziert. Zum Nachweis der infizierten Zellen im Lebergewebe wurden DNA-Sonden, die spezifisch für das nachzuweisende vRAP-Gen sind, verwendet. (Das Sondendesign ist in Abb. 14A skizziert.) Um zunächst zu überprüfen, ob die entsprechende DNA der verschiedenen vRAPs in den Schlüsselviren vorhanden ist, wurden Lebern von Tieren ohne T-Zelltransfer jeder Infektionsgruppe mittels ISH untersucht.

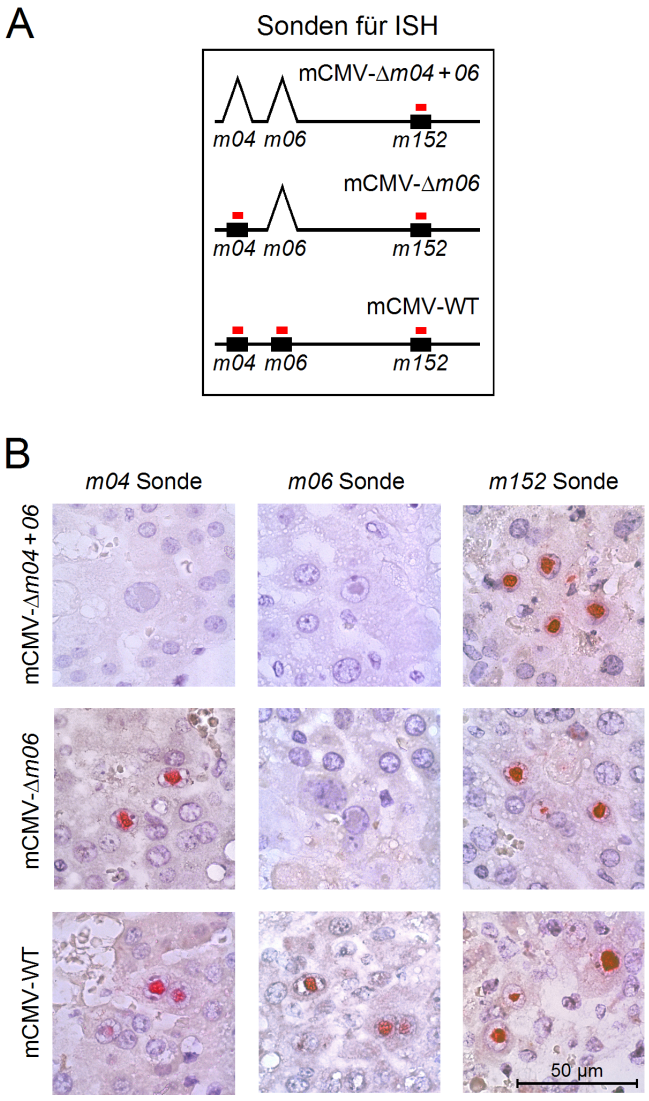


Abbildung 14: **Identifizierung der Schlüsselviren mittels ISH und Darstellung infizierter Leberzellen in Lebergewebeschnitten.** A: Design der zur Identifizierung der Schlüsselviren verwendeten ISH-Sonden. Die schwarzen Rechtecke symbolisieren die Positionen der vRAPs, die kleinen roten Rechtecke die Bindung der DNA-Sonden. B: Lebergewebeschnitte der mit den Schlüsselviren infizierten C57BL/6 Mäuse. Die intranukleären Einschlusskörper der infizierten Leberzellen sind rot gefärbt, wenn das Virusgen vorhanden ist, für das die jeweilige vRAP-Sonde spezifisch ist.

Mit Hilfe dieses experimentellen Ansatzes konnte die Identität der Schlüsselviren verifiziert werden (Abb. 14B). vRAP-spezifische DNA war nur nachweisbar, wenn die

Tiere mit dem entsprechenden Virus infiziert waren.

Da in allen drei Schlüsselviren das Gen *m152* vorhanden ist, wurde zur Ermittlung der Gesamtzahl infizierter Leberzellen nach Infektion und CTL-Substitution die *m152*-Sonde verwendet (Abb. 15).

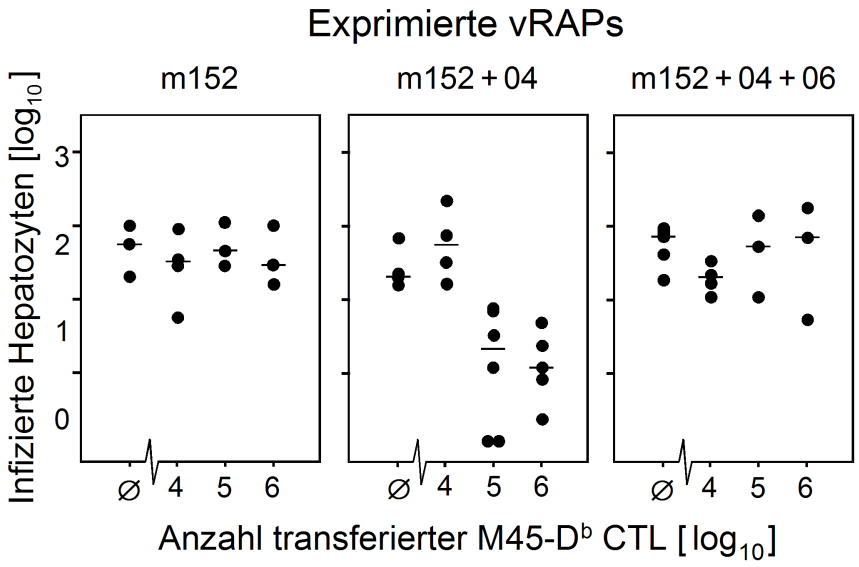


Abbildung 15: **Einfluss der vRAPs auf die Immunkontrolle durch M45-D^b-CTLL.** Entsprechend der Infektion der Rezipienten mit jeweils einem der drei Schlüsselviren sind die exprimierten vRAPs angezeigt. Zur Quantifizierung der infizierten Leberzellen wurde eine ISH mit der *m152*-Sonde durchgeführt. Auf der y-Achse ist die Zahl der infizierten Leberzellen innerhalb eines Areals von 50 mm² Lebergewebe aufgetragen. Jeder Punkt zeigt die Daten eines individuellen Rezipienten (Ø, kein Zelltransfer). Der Median für jede Versuchsgruppe ist markiert (–).

Das Ergebnis dieses Adoptiven Transfer Experiments zeigte eine Übereinstimmung mit den *in vitro* erhobenen Daten für infizierte MEF und BMDC: War m152, das die Epitoppräsentation herunterreguliert, allein vorhanden, wurde eine Kontrolle der Infektion verhindert. Die Zahl der infizierten Zellen blieb, unabhängig von der Menge transferierter CD8 T-Zellen, konstant hoch. Die Koexpression des positiven Regulators m04 stellte die Kontrolle der Leberinfektion wieder her; die Zahl der infizierten Zellen sank mit zunehmender Menge transferierter CTL. Die zusätzliche Expression von m06 im mCMV-WT hob den m04-Effekt wieder auf und verhinderte die Kontrolle der Infektion; die Zahl der infizierten Leberzellen blieb CTL-Dosis unabhängig hoch.

Schlussfolgerung: Die *in vivo* Kontrolle der Schlüsselviren durch M45-D^b-spezifische CTL zeigte, dass die Expression von m152 die schützende Wirkung der CTL verhindert. Die Koexpression von m04 mit m152 stellt die Kontrolle der Infektion durch die CTL wieder her. Die Expression aller drei vRAPs im mCMV-WT wiederum hebt die Immunkontrolle auf. Diese *in vivo* erhobenen Befunde bestätigen die *in vitro* Funktionen der vRAPs bezüglich der Antigenpräsentation.

3.8 Vergleich des protektiven Potentials von M45-D^b- und M45-D^d-CTLL

Bezüglich ihres *in vivo* protektiven Potentials gegenüber einer mCMV-Infektion stellt die M45-D^b-CTLL eine Ausnahme dar: Während alle bislang identifizierten sieben H-2^d restringierten CD8 T-Zellspezifitäten den mCMV-WT kontrollieren, gelingt dies der M45-D^b-CTLL nicht [zur Übersicht siehe Holtappels *et al.*, 2006b]. Dieser Befund konnte in der vorliegenden Arbeit reproduziert werden (Abb. 16). Die Wahl dieser CTL-Spezifität hatte für die Frage nach dem regulatorischen Einfluss der vRAPs *in vivo* den Vorteil, dass klare Aussagen getroffen werden können: keine Kontrolle der Infektion, wenn m152 alleine exprimiert wird, Kontrolle der Infektion, wenn m04 und m152 koexprimiert werden und Wiederaufheben des m04-Effektes durch m06, wenn alle drei vRAPs exprimiert werden. Für alle anderen bislang getesteten mCMV-Spezifitäten gilt, dass sie immunsupprimierte Rezipienten nach Infektion mit dem alle drei Regulatoren exprimierenden mCMV-WT vor der CMV-Infektion schützen [zur Übersicht siehe Holtappels *et al.*, 2006b].

Um die *in vivo* Bedeutung der vRAPs für die Kontrolle der mCMV-Infektion durch weitere CD8 T-Zellspezifitäten zu bestätigen, wurde ein zweites antigenes Peptid aus dem M45-Protein ausgewählt. Dieses M45-D^d-Peptid induziert eine CD8 T-Zellspezifität *in vivo*, die nach Expansion *in vitro* eine mCMV-WT-Infektion kontrolliert. Diese M45-D^d-Spezifität wurde in einem analogen Transferexperiment eingesetzt. Für den Nachweis der Infektionskontrolle wurde die Lunge als ein weiteres Organ, in dem sich eine CMV-Infektion manifestieren kann, gewählt. Die Virustiter sind in Abb. 16 dargestellt.

Die für die Lungen der C57BL/6-Mäuse (identische Mäuse, wie für das in Abb. 15

dargestellte Experiment) ermittelten Virustiter bestätigen den im Experiment von Abb. 15 dargestellten Einfluss der vRAPs auf die Kontrolle der Infektion durch M45-D^b-CTL. Wird m152 alleine exprimiert, wurde die Infektion nicht kontrolliert (Abb. 16A, 1. Graphik).

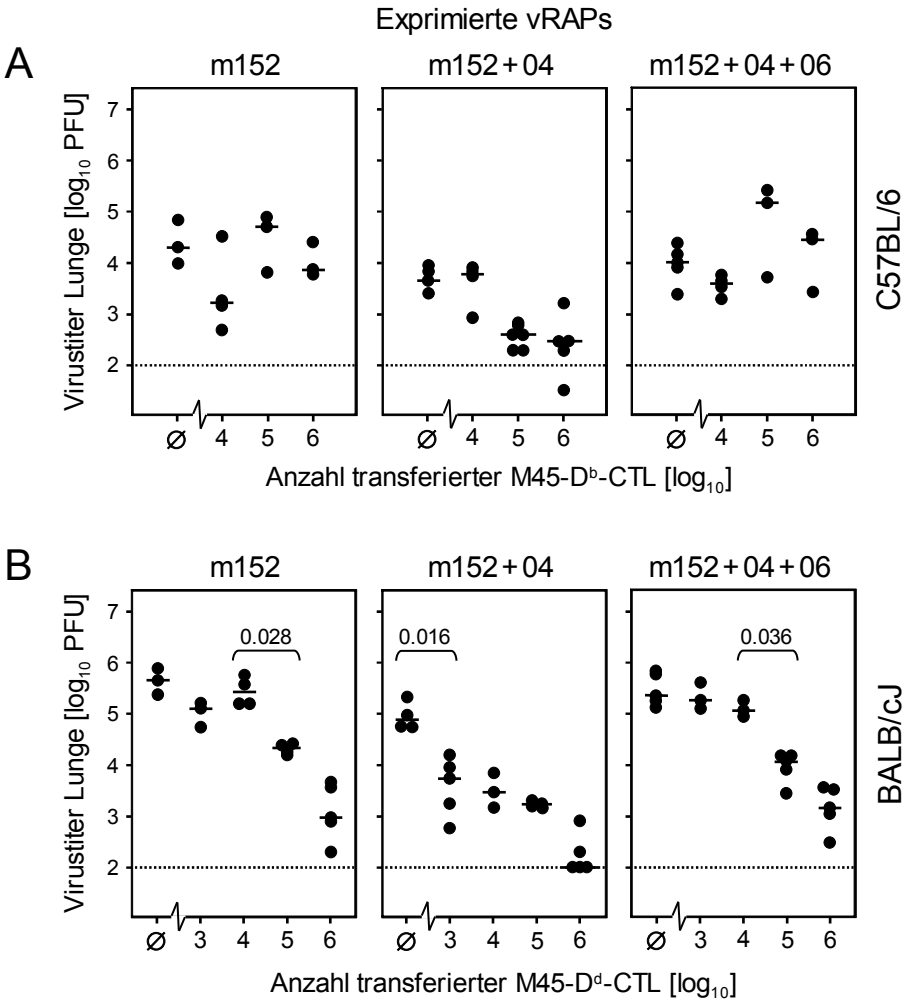


Abbildung 16: **Einfluss der vRAPs auf die Immunkontrolle durch M45-D^d-CTLL und M45-D^b-CTLL.** A: Adoptiver Transfer (Prinzip siehe Abb. 13) von M45-D^b-CTL in 7,5-Gy-bestrahlte C57BL/6 Rezipienten (es handelt sich um die selben Tiere wie in Abb. 15). B: Adoptiver Transfer von M45-D^d-CTL in 6,5-Gy-bestrahlten BALB/cJ Rezipienten. Die Tiere wurden jeweils mit den Schlüsselviren mCMV-Δ*m04+06*, mCMV-Δ*m06* und mCMV-WT infiziert; dargestellt sind die jeweils exprimierten vRAPs oberhalb der einzelnen Graphiken. Die Virustiter in der Lunge wurden 12 Tage nach Transfer und Infektion mittels Plaquetest ermittelt. Die Ordinate repräsentiert die Menge an infektiösem Virus in der Lunge. Die gepunktete Linie kennzeichnet die Nachweisgrenze des Plaquetests. Die aufgetragenen Punkte zeigen die Virustiter der individuellen Rezipienten des Adoptiven Transfers. Der Median für jede Gruppe ist markiert (--). In Abbildungsteil B sind die p-Werte dafür eingetragen, dass der Virustiter signifikant abnimmt und damit Schutz ab einer bestimmten Effektorzelldosis vermittelt wird.

Wurde m152 zusammen mit m04 exprimiert, wurden die Virustiter reduziert und damit die Infektion kontrolliert. Die Infektion mit mCMV-WT hatte wiederum kein Abfallen der Virustiter zur Folge, d. h. die M45-D^b-CTL haben keinen Schutz vor der Infektion vermitteln können.
Im BALB/cJ-System war in allen drei Infektionsgruppen eine Reduktion der Virustiter erkennbar, der modulierende Effekt der vRAPs war jedoch ebenfalls sichtbar. War m152 allein exprimiert, setzte eine signifikante Kontrolle der Virustiter erst bei einem Transfer von 10^5 M45-D^d-CTL ein, während bei der Koexpression von m04 mit m152 eine signifikante Reduktion der Virusreplikation bereits bei 10^3 transferierten CTL begann. Die Expression aller drei vRAPs im mCMV-WT (also auch die Expression von m06 als Gegenspieler von m04) setzte den Beginn der signifikanten Kontrolle der mCMV-Infektion auf eine Zelldosis von 10^5 transferierten CTL zurück.

Schlussfolgerung: Der Einfluss der vRAPs auf die Kontrolle der mCMV-Infektion ist auch im Haplotyp H-2^d für M45-D^d-CTLL nachweisbar. Für die Kontrolle der mCMV-Infektion *in vivo* war daher die Regulation der Epitoppräsentation durch die vRAPs in infizierten MEF und BMDC *in vitro* prädiktiv. Gleichzeitig konnte durch die *in vivo*-Untersuchungen die Rolle von m04 als positivem Regulator bestätigt werden.

3.9 Einfluss von IFNγ auf die vRAP-modulierte Oberfächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen

IFNγ ist ein in der Immunabwehr wichtiges Zytokin. Es wird u. a. von CD8 T-Zellen freigesetzt. Indem es eine Erhöhung der Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen induziert, stimuliert es den Prozess der MHC-Klasse-I Antigenpräsentation. Damit beeinflusst IFNγ *in vivo* ebenso wie die vRAPs die Aktivierung von CD8 T-Zellen. Um zu untersuchen, ob IFNγ einen Einfluss auf die beobachteten negativ und positiv regulierenden Effekte der vRAPs *in vitro* hat, wurden MEF mit und ohne IFNγ-Vorbehandlung mit dem Virus-Set infiziert. Mit Hilfe einer zytofluorometrischen Zweifarbenanalyse (analog zu der in Abschnitt 3.1 dargestellten Zweifarbenanalyse) wurde die MHC-Klasse-I-Expression auf den infizierten Zellen analysiert. Als

Infektionsmarker diente wiederum die Expression des E-Phase Glykoproteins m164. Zunächst wurde die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression der IFNγ-vorbehandelten und infizierten MEF mit der von nicht vorbehandelten, aber mit demselben Virus-Set infizierten MEF verglichen. Gezeigt ist hier die Oberflächenexpression von H-2L^d, die in ihren Kernaussagen der von H-2D^d und H-2K^d entspricht (Daten nicht gezeigt).
Das in Abb. 5 dargestellte Muster der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression ohne IFNγ-Vorbehandlung konnte in diesem Versuch (Abb. 17, blaue Konturplots) reproduziert werden.

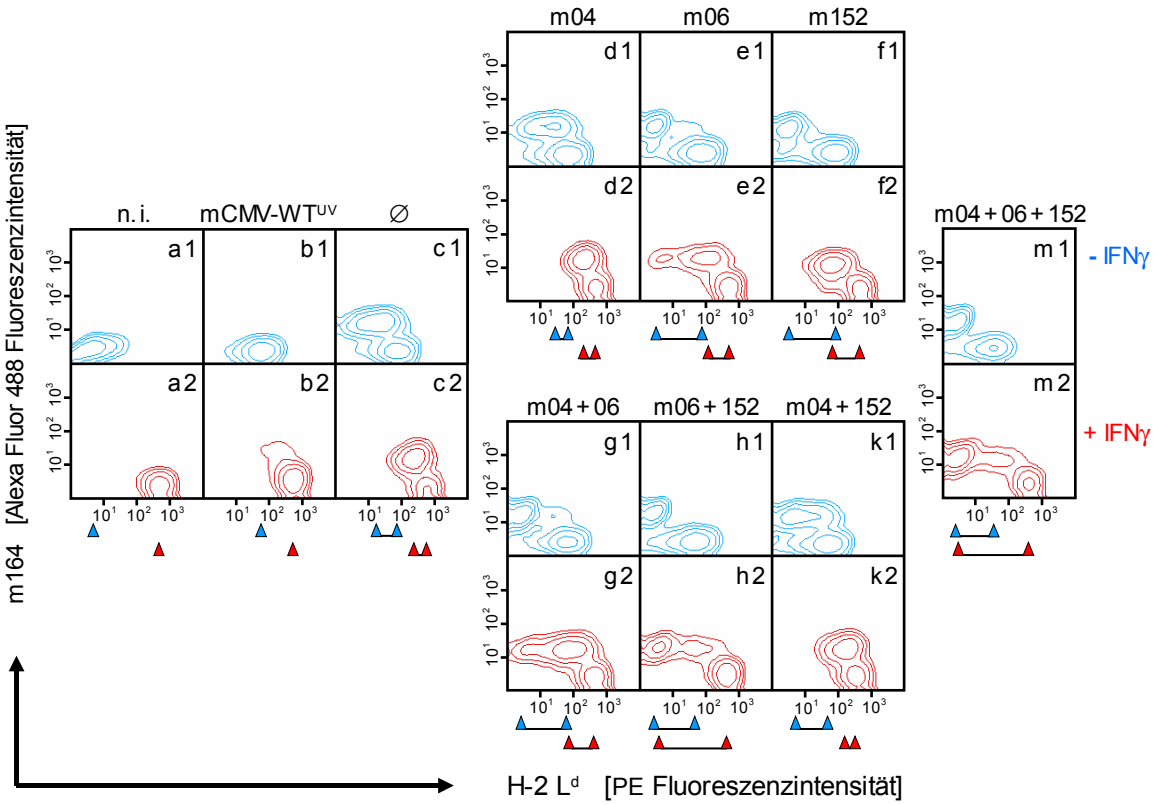


Abbildung 17: **vRAP-modulierte MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression in Abhängigkeit von IFNγ.** IFNγ vorbehandelte (rote Konturplots) bzw. nicht vorbehandelte MEF (BALB/cJ) (blaue Konturplots) wurden nicht infiziert (a, n.i.), mit UV-inaktiviertem mCMV-WT inkubiert (b), bzw. mit dem Virus-Set infiziert (c-m, exprimierte vRAPs sind angezeigt). 16h nach Infektion wurde eine zytofluorometrische Zweifarbenanalyse zum Nachweis des viralen m164-Proteins in Kombination mit der MHC-Klasse-I-L^d-Expression durchgeführt. Die Konturplots repräsentieren die Fluoreszenzintensitäten für ca. 35.000 lebende Zellen im *life gate*.

n.i. (a1 und a2): IFNγ alleine bewirkte im Vergleich zu nicht infizierten und nicht IFNγ-vorbehandelten MEF (a1) eine drastische Hochregulation der MHC-Klasse-I-Moleküle (a2).

Inkubation mit UV-inaktiviertem mCMV-WT (b1 und b2): Ohne IFNγ-Vorbehandlung hatte die Inkubation mit UV-inaktiviertem mCMV-WT eine Zunahme der Oberflächenexpression der MHC-Klasse-I-Moleküle zur Folge (b1). Das als Infektionsmarker dienende E-Phase Glykoprotein m164 war aber nicht nachweisbar, d. h. eine Infektion der Zellen lag trotz Viruskontakt nicht vor. Durch die Vorbehandlung mit IFNγ stieg die Oberflächenexpression noch weiter an (b2).

Infektion mit replikationsfähigem Virus (c-m): Wie bereits unter 3.1 beschrieben, waren sowohl mit als auch ohne IFNγ-Vorbehandlung zwei Zellpopulationen zu erkennen: Eine nicht infizierte mit hochregulierter MHC-Klasse-I Expression und eine infizierte Zellpopulation mit weniger stark ausgeprägter Hochregulation, aber exprimiertem Infektionsmarker m164.

Infektion mit mCMV-Δ*m04+06+152* (c1 und c2): Die MHC-Klasse-I Oberflächenpräsentation der infizierten und der nicht infizierten Zellpopulation wurde durch die IFNγ-Vorbehandlung in ihrem Niveau (c2) im Vergleich zu dem Ansatz ohne IFNγ-Vorbehandlung (c1) insgesamt erhöht.

Infektion mit den Doppelmutanten (d1, d2, e1, e2, f1, f2): Die Effekte jedes einzeln exprimierten vRAP sind im Wesentlichen dieselben, mit und ohne IFNγ-Vorbehandlung. Im Vergleich zu der nicht infizierten Zellpopulation innerhalb des jeweiligen Ansatzes regelten m06 und m152 die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression deutlich herunter, während m04 nur einen schwach herunterregulierenden Effekt zeigte. Insgesamt war das MHC-Klasse-I Expressionsniveau nach IFNγ-Vorbehandlung jedoch höher als auf nicht IFNγ-vorbehandelten MEF. Außerdem war das Ausmaß der negativen Regulation durch m06 bzw. m152 nach IFNγ-Vorbehandlung geringer.

Infektion mit den Einfachmutanten (g1, g2, h1, h2, k1, k2): Auch für die Gruppe von Mutanten, in der jeweils zwei der vRAPs zusammen exprimiert werden, lag das Expressionsniveau der MHC-Klasse-I-Moleküle nach INFγ-Vorbehandlung höher als ohne entsprechende Vorbehandlung. Die kombinierte Expression von m06 und m152 hatte nach IFNγ-Vorbehandlung einen stärker negativ regulierenden Effekt (h2) als die Koexpression von m04 und m06 (g2). Der positive, die Oberflächenexpression wiederherstellende, also antagonisierende Effekt von m04, der zu beobachten war,

wenn m04 und m152 koexprimiert sind, war nach IFNγ-Vorbehandlung noch deutlicher zu erkennen als ohne die entsprechende Vorbehandlung (k2 und k1).
Infektion mit mCMV-WT (m1 und m2): Sowohl mit als auch ohne IFNγ-Vorbehandlung zeigte die konzertierte Wirkung aller drei vRAPs, dass m06 den Effekt von m04 wieder aufhebt. Dieser Effekt war nach IFNγ-Vorbehandlung noch stärker ausgeprägt. In der Summe führte dies zu einer stark herunterregulierten MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression auf den infizierten Zellen (m2).

Schlussfolgerung: Die negativ bzw. positiv regulierenden Effekte der drei vRAPs auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression waren sowohl ohne als auch mit IFNγ-Vorbehandlung zu beobachten.

3.10 Einfluss von IFNγ auf die vRAP-modulierte Peptidpräsentation

3.10.1 Untersuchung der Epitoperkennung durch IE1- und m164-CTLL

Um den Einfluss von IFNγ auf die vRAP-modulierte Peptidpräsentation zu untersuchen, wurde mittels ELISPOT-*Assay* die Epitoperkennung auf MEF durch L^d-restringierte IE1-spezifische CTL und durch D^d-restringierte m164-spezifische CTL getestet. Dazu wurden MEF mit und ohne IFNγ-Vorbehandlung mit dem Virus-Set infiziert.

Einfluss von IFNγ auf die Spotfrequenz

Der Einfluss einer IFNγ-Vorbehandlung auf die vRAP-modulierte Epitoperkennung durch IE1-spezifische CTL nach Infektion mit dem Virus-Set ist im oberen Teil von Abb. 18 zu sehen. Die Darstellung der Spotfrequenz ohne IFNγ-Vorbehandlung der Stimulatorzellen im obersten Diagramm lässt das bereits bekannte Muster erkennen: Die IFNγ-Sekretion durch IE1-spezifische CTL nach Infektion mit dem Schlüssel-Virus mCMV-Δ*m04+06*, das den negativen Hauptregulator m152 exprimiert, war im Vergleich zur Erkennung nach Infektion mit der *Triple*-Mutante stark reduziert. Durch

die zusätzliche Expression von m04 wurde dieser Effekt antagonisiert. Die wiederum hinzukommende Expression von m06 im mCMV-WT hob den Effekt von m04 dagegen auf, sodass eine Aktivierung der CTL fast vollständig unterbunden wurde.

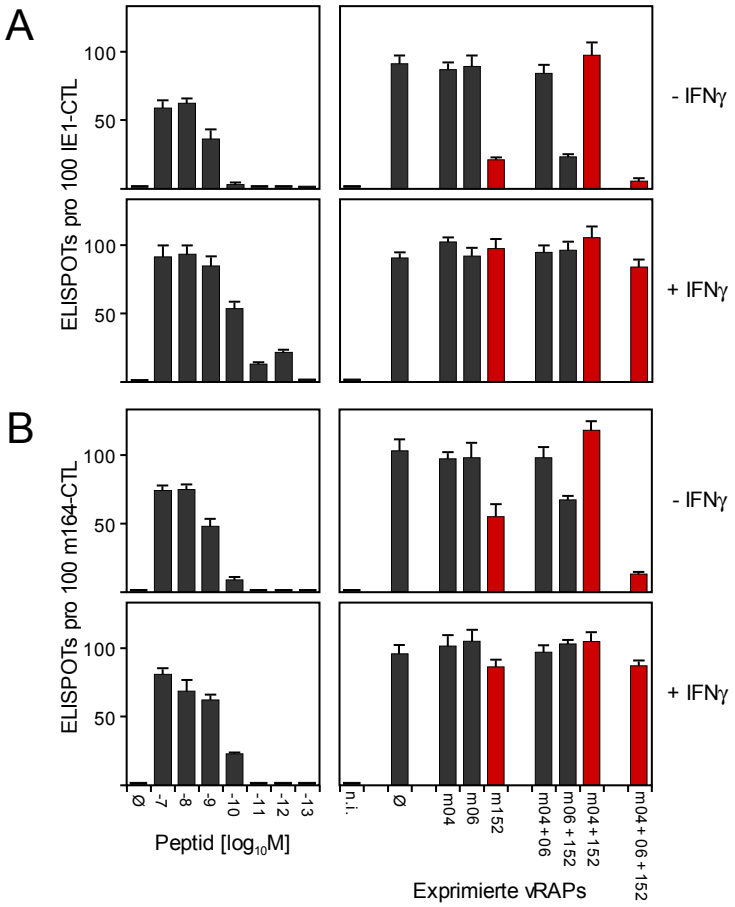


Abbildung 18: **Einfluss von IFNγ auf die Regulation der Epitoperkennung durch die vRAPs im Haplotyp H-2^d.** ELISPOT-*Assay* zur Ermittlung der Stimulierbarkeit von CTL in Abhängigkeit von einer IFNγ-Vorbehandlung der Stimulatorzellen (BALB/cJ). Die Stimulatorzellen wurden mit dem Virus-Set infiziert. Im oberen Teil der Abbildung sind die Erkennungsmuster durch IE1-CTL dargestellt (A), im unteren Teil der Abbildung die Erkennungsmuster durch m164-CTL (B). Die Sensitivitäten der CTL wurden verglichen, indem die Epitoperkennung nach exogener Beladung der MEF mit bzw. ohne IFNγ-Vorbehandlung mit synthetischem Peptid untersucht wurde.

Ein anderes Bild stellte sich dar, wenn die infizierten MEF zuvor mit IFNγ vorbehandelt worden waren. Das bisher beobachtete Erkennungsmuster war nicht mehr nachweisbar. Die Epitoperkennung lag für alle Virusmutanten identisch bei 100%. Lediglich nach Infektion mit mCMV-WT wurden nur 80% der CTL aktiviert. Hier war

also noch ein leichter immunevasiver Effekt der vRAPs in ihrem Zusammenspiel erkennbar. Die durch Beladung der IFNγ-vorbehandelten Stimulatorzellen mit synthetischem Peptid getestete Sensitivität der IE1-CTL war höher als ohne IFNγ-Vorbehandlung. Dieses Phänomen war allerdings bei keiner anderen getesteten T-Zelllinie zu beobachten (siehe Abb. 18B und Abb. 21).

Werden m164-CTL als Effektorzellen eingesetzt (Abb. 18B), zeigte sich bezüglich der Stimulierbarkeit durch infizierte Zellen ein ähnliches Ergebnis. Mit IFNγ-Vorbehandlung war das bekannte Erkennungsmuster, das ohne IFNγ-Vorbehandlung zu sehen war, nahezu vollständig aufgehoben. Für die Schlüsselviren ließen sich nur noch Tendenzen einer vRAP-modulierten Antigenpräsentation beobachten. Die Sensitivität der Peptiderkennung war trotz IFNγ-Vorbehandlung gleich geblieben.

Einfluss von IFNγ auf die Spotgröße

Während bezüglich der Spotfrequenz keine oder eine nur sehr schwach regulierende Wirkung der vRAPs nach IFNγ-Vorbehandlung zu beobachten war, fiel auf, dass die Spotgrößen zwischen den einzelnen Ansätzen teilweise deutlich variierten. Die Unterschiede in der Spotgröße sind von Bedeutung, da diese direkt mit der Menge an sezerniertem IFNγ korrelieren. Um die Spots ihrer Größe nach beurteilen zu können, wurden sie in Größenklassen eingeteilt. Abb. 19 zeigt beispielhaft jeweils einen ELISPOT-Filter der Ansätze, für die die MEF (mit bzw. ohne IFNγ-Vorbehandlung) mit mCMV-WT bzw. mCMV-Δ*m04+06+152* infiziert wurden, als Fotodokumentation und nebenstehend die graphische Darstellung der Spotgrößenauswertung für diese Ansätze. Dabei enthält die Größenklasse 1 die kleinsten Spots (1-10x500µm²), die Größenklasse 2 die nächstgrößeren Spots (11-20x500µm²) usw.. In der Größenklasse 9 sind die größten Spots zusammengefasst (81-150x500µm²).

Entsprechend der Frequenzanalyse induzierte die Infektion mit mCMV-WT ohne IFNγ-Vorbehandlung nahezu keine IFNγ-Sekretion der Effektoren, während zahlreiche kleine Spots erkennbar waren, wenn die mCMV-WT-infizierten MEF IFNγ-vorbehandelt worden waren. Die meisten Spots waren dabei der Größenklasse 2 zuzuordnen.

Nach Infektion mit der *Triple*-Mutante, die keines der vRAPs exprimiert, waren insgesamt größere Spots erkennbar. Ohne IFNγ-Vorbehandlung lag das Maximum der Spotgrößenverteilung bei der Größenklasse 3, gleichzeitig kamen sehr große

Spotgrößen vor, die nach Infektion mit mCMV-WT gar nicht vorhanden waren. Wurden die mit der *Triple*-Mutante infizierten MEF mit IFNγ vorbehandelt, verschob sich das Maximum der Spotgrößenverteilung um eine Größenklasse hin zu größeren Spotgrößen. Obwohl bezüglich der Spotfrequenzen der IFNγ-sezernierenden IE1-CTL und damit deren Aktivierung durch mCMV-WT bzw. durch *Triple*-Mutante infizierte MEF nach IFNγ-Vorbehandlung kein wesentlicher Unterschied mehr zu erkennen war (siehe Abb. 18, rechte Bildhälfte, zweites Diagramm von oben), wurde der Unterschied in den Spotgrößen hier sehr deutlich (Abb. 19, rechte Bildhälfte). Nach IFNγ-Vorbehandlung konnte ein Einfluss der vRAPs demnach nur auf der Ebene der Menge an sezerniertem IFNγ beobachtet werden, nicht aber auf der Ebene der Frequenz der IFNγ-sezernierenden IE1-CTL.

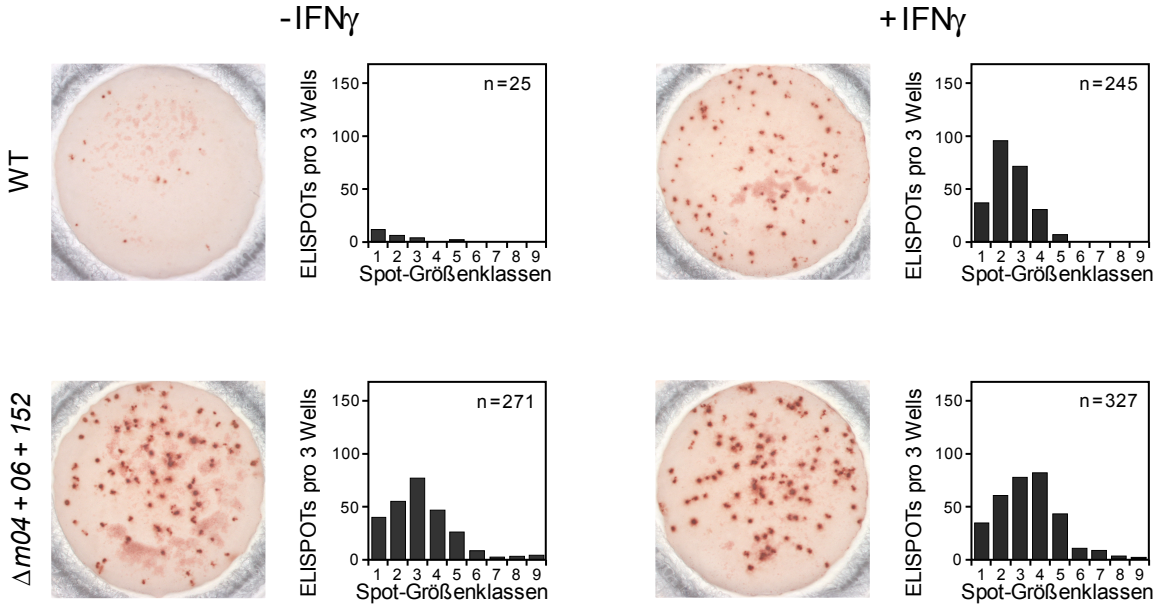


Abbildung 19: **Vergleich der Spotgrößen mit und ohne IFNγ-Vorbehandlung der Stimulatorzellen.** Dargestellt sind jeweils in der linken Bildhälfte die Fotodokumentationen ausgewählter ELISPOT-Membranen des in Abb. 18 gezeigten, mit IE1-CTL durchgeführten ELISPOT-*Assays*, rechts daneben die graphischen Auswertungen der Spotgrößen, die die Spots von jeweils drei Wells beinhalten. n = Anzahl der pro drei Wells gezählten Spots.

In Abb. 20 ist die gesamte Spotgrößenauswertung des oben beschriebenen ELISPOT-*Assays* gezeigt. Betrachtet werden zunächst die Ansätze ohne IFNγ-Vorbehandlung mit IE1-CTLL als Effektorzellen (siehe Abb. 20 A, a1-h1). Die Spotgrößen, wie sie nach

Infektion mit mCMV-Δ*m04+06+152* zu sehen waren, stellten die Vergleichsgrößenverteilung dar (a1). Hier fand man in der dritten Größenklasse die meisten Spots. Wurde m04 alleine exprimiert (b1), lag das Maximum innerhalb der Spotgrößenverteilung an der selben Stelle, wie nach Infektion mit der *Triple*-Mutante; allerdings waren in den großen Größenklassen mehr Spots zu erkennen als nach Infektion mit der *Triple*-Mutante.

Wurden m06 bzw. m152 alleine exprimiert (c1 und d1), waren die Spotgrößen kleiner als nach Infektion mit der *Triple*-Mutante. Auf der Ebene der Spotgröße spiegelte sich somit der negativ regulierende Effekt dieser beiden vRAPs wider, wobei der Effekt von m152 auch hier deutlich stärker ausgeprägt war.

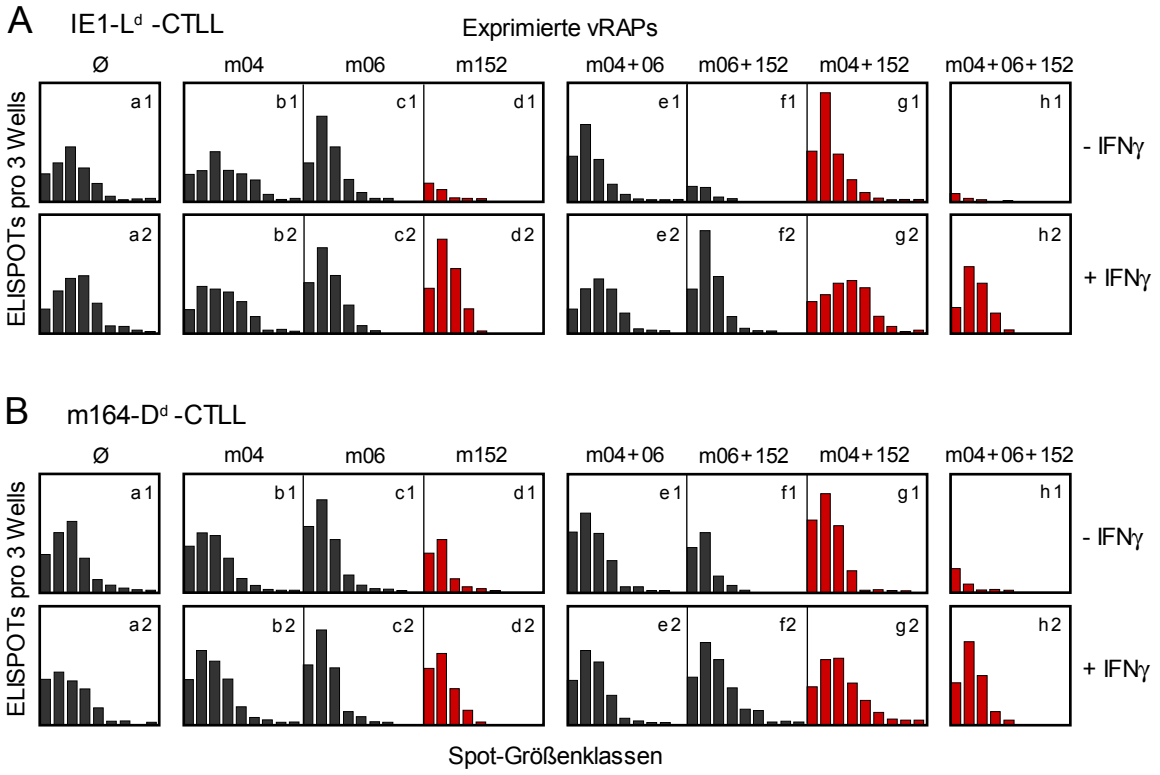


Abbildung 20: **Einfluss einer IFNγ-Vorbehandlung von mit dem Virus-Set infizierten MEF (Haplotyp H-2^d) auf die Spotgröße.** Dargestellt ist die vollständige Spotgrößenauswertung für den in Abb. 18 gezeigten ELISPOT-*Assay*. Berücksichtigt wurde jeweils die Summe der Spots von drei Wells. Innerhalb einer Graphik ist ganz links die Zahl der kleinsten Spots zu sehen (Größenklasse 1), ganz rechts die der größten (Größenklasse 9). In der jeweils oberen Reihe der Graphiken sind die Spotgrößen ohne IFNγ-Vorbehandlung der MEF dargestellt, in der unteren Reihe mit IFNγ-Vorbehandlung. Oberhalb der Graphiken sind die exprimierten vRAPs vermerkt.

In der Gruppe der Mutanten, die jeweils zwei vRAPs exprimieren, zeigte sich innerhalb der Spotgröße der bereits für die Spotfrequenz beobachtete stärkste die IFNγ-Sekretion reduzierende Effekt, wenn m06 und m152 zusammen exprimiert wurden (f1). Bei der gemeinsamen Expression von m04 und m152, wurde der positive Effekt von m04 vor allem durch das Vorhandensein großer Spots sichtbar (g1). Die wenigen Spots, die bei Expression aller drei vRAPs beobachtet werden konnten, waren entsprechend der konzertierten Zusammenarbeit der vRAPs sehr klein (h1).
Besonders deutlich waren die Unterschiede in der Spotgröße zu sehen, wenn die mit dem Virus-Set infizierten MEF mit IFNγ vorbehandelt worden waren (Abb. 20A, a2-h2). Während die Unterschiede in den Frequenzen, die nach Infektion von MEF ohne IFNγ-Vorbehandlung gefunden wurden, nach IFNγ-Vorbehandlung nivelliert worden waren, waren bezüglich der Spotgröße deutliche Unterschiede erkennbar. Die Spots, die nach Infektion mit der *Triple*-Mutante von IFNγ-vorbehandelten MEF entstanden, waren größer als die Spots, die nach Infektion mit demselben Virus auf nicht vorbehandelten MEF zu beobachten waren (vgl. Abb. 20A, a2 und a1). Sehr deutlich zu sehen war auch, dass die Expression von m04 auf IFNγ-vorbehandelten MEF sehr viel größere Spots verursachte als die *Triple*-Mutante (vgl. Abb. 20A, b2 und a2), d. h. auch nach IFNγ-Vorbehandlung war ein positiv regulierender Effekt von m04 zu verzeichnen. Die jeweils alleinige Expression von m06 und m152 induzierte kleinere Spots als das Fehlen aller drei vRAPs (vgl. Abb. 20A, c2, d2 und a2). Auch für die Kombination von zwei vRAPs nach IFNγ-Vorbehandlung gilt, dass m04 einen antagonisierenden Effekt auf die die Spotgröße reduzierende Wirkung von m152 (vgl. Abb. 20A, d2 und g2) und auch von m06 (vgl. Abb. 20A, c2 und e2) hatte. Bei der gemeinsamen Expression von m04 und m152 war der Effekt von IFNγ auf die Spotgrößen am stärksten (Abb. 20A, g2). In Übereinstimmung mit den bereits gemachten Beobachtungen auf Frequenzebene wurde der positive Effekt von m04 wieder aufgehoben, wenn alle drei Regulatoren zusammen exprimiert wurden (Abb. 20A, h2).
Wurden m164-CTLL als Effektorzellen eingesetzt (Abb. 20B), konnten ohne IFNγ-Vorbehandlung der MEF kaum Unterschiede in den Spotgrößen festgestellt werden. Das Spotgrößenmaximum nach Infektion mit der *Triple*-Mutante (Abb. 20B, a1) lag in der dritten Größenklasse. Nach Infektion mit der ausschließlich m04 exprimierenden Mutante (Abb. 20B, b1) wurden in der zweiten und dritten Größenklasse etwa gleich

viele Spots ermittelt. Nach Infektion mit mCMV-WT (Abb. 20B, h1) waren vor allem Spots in der kleinsten Größenklasse zu sehen, während das Spotgrößenmaximum bei allen anderen Viren in der zweiten Größenklasse lag (Abb. 20B, c1-g1). Mit IFNγ-Vorbehandlung war nur für die m04 und m152 exprimierende Mutante ein die Spotgrößen regulierender Effekt zu beobachten (Abb. 20B, vgl. Schlüsselviren d2, g2 und h2). Während m152 alleine kleine Spots hervorrief, antagonisierte m04 in Koexpression mit m152 dessen Effekt. Die zusätzliche Expression von m06 hatte wiederum kleine Spots zur Folge. Der Effekt von m04 wurde also wieder aufgehoben.

Schlussfolgerung: Die Vorbehandlung von MEF mit IFNγ zeigte einen Einfluss der vRAPs auf die Epitoperkennung der im Haplotyp H-2^d getesteten CTLL vor allem auf der Ebene der Spotgröße in dem bereits bekannten Muster. Die Spotfrequenzen blieben nach IFNγ-Vorbehandlung der MEF von den vRAPs größtenteils unbeeinflusst.

3.10.2 Untersuchung der Epitoperkennung durch M45-D^b- und M45-D^d-CTLL

Bisher wurde der Einfluss einer IFNγ-Vorbehandlung der Stimulatorzellen auf die vRAP-modulierte Peptidpräsentation des H-$2L^d$-präsentierten Peptids IE1 und des H-$2D^d$-präsentierten Peptids m164 untersucht. Um das Spektrum der getesteten antigenen Peptide zu erweitern und gleichzeitig für den Haplotyp H-2^b eine Aussage bezüglich des Einflusses der IFNγ-Vorbehandlung der Stimulatorzellen auf die modulierenden Effekte der vRAPs machen zu können, wurde die Peptiderkennung mit und ohne IFNγ-Vorbehandlung der MEF und nachfolgender Infektion mit dem Virus-Set durch M45-D^b- und M45-D^d-spezifische CTL im ELISPOT-*Assay* untersucht.

Einfluss von IFNγ auf die Spotfrequenz

Setzte man M45-D^d-CTL als Effektorzellen ein (Abb. 21A), hatte die Vorbehandlung der MEF mit IFNγ im Vergleich zu nicht vorbehandelten MEF keinen Einfluss auf die Sensitivität der getesteten CTL für das synthetische Peptid (linke Bildhälfte). Die regulierenden Effekte der vRAPs auf die Epitoperkennung durch M45-D^d-CTL waren mit IFNγ-vorbehandelten MEF nicht mehr zu erkennen. Es fiel allerdings auf, dass das

Frequenz-Niveau der reagierenden CTL etwas niedriger war als ohne IFNγ-Vorbehandlung.

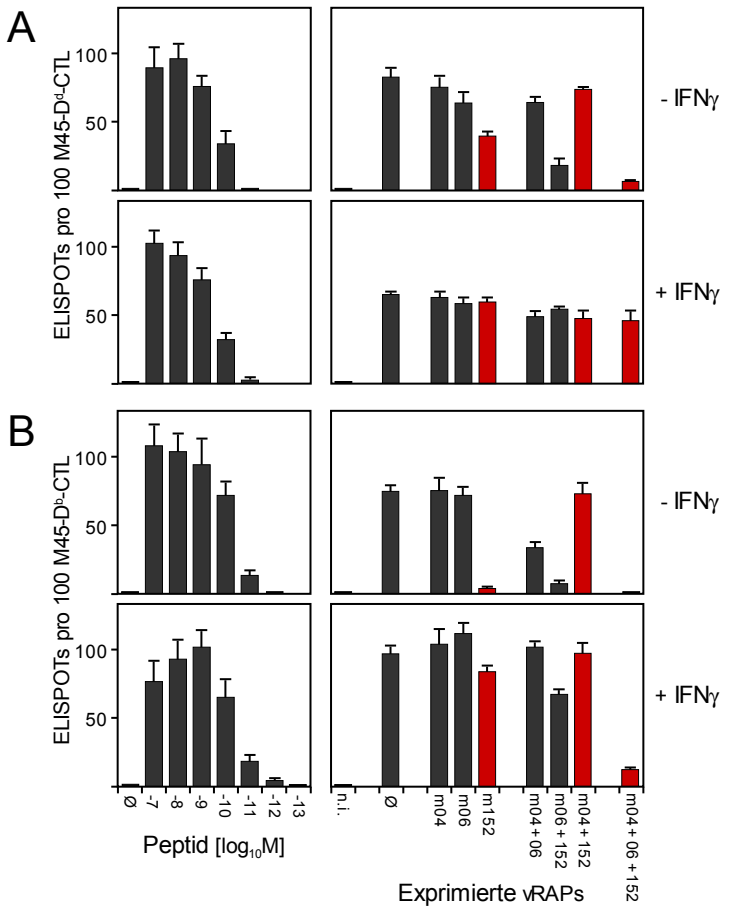


Abbildung 21: **Einfluss von IFNγ auf die vRAP-modulierte Aktivierung von M45-D^d-CTLL und M45-D^b-CTLL.** Als Stimulatorzellen im ELISPOT-*Assay* wurden mit dem Virus-Set infizierte BALB/cJ-MEF (A) und C57BL/6-MEF (B) verwendet, die mit IFNγ vorbehandelt worden waren oder nicht. Dargestellt ist die Frequenz der aktivierten M45-D^d-CTL (A) bzw. der aktivierten M45-D^b-CTL (B). Die Sensitivitäten der CTL wurden durch exogene Beladung der MEF mit synthetischem Peptid mit und ohne IFNγ-Vorbehandlung verglichen.

Die Epitoperkennung durch M45-D^b-CTL (Abb. 21B) war nach IFNγ-Vorbehandlung nur noch schwach durch die vRAPs beeinflusst. Vor allem der immunevasive Effekt von m152 war fast vollständig aufgehoben. Ein antagonisierender Effekt von m04 bei Koexpression mit m152 war daher nur schwach zu erkennen. Nach IFNγ-Vorbehandlung und Infektion der MEF mit mCMV-WT war eine geringe Aktivierung der M45-D^b-CTL zu beobachten. Hier wurde der immunevasive Effekt der konzertierten Zusammenarbeit aller drei vRAPs durch die IFNγ-Vorbehandlung der

MEF nur sehr schwach beeinflusst. Das steht im Gegensatz zur deutlichen Aktivierung der M45-D^d-CTL sowie der IE1- und der m164-CTLL nach IFNγ-Vorbehandlung und Infektion mit mCMV-WT (vgl. Abb. 21B mit Abb. 21A und Abb. 18). Das Frequenzniveau der M45-D^b-CTL war - bei nahezu identischer Sensitivität für das synthetische Peptid - nach IFNγ-Vorbehandlung der infizierten MEF etwas höher als ohne IFNγ-Vorbehandlung (Abb. 21B).

Einfluss von IFNγ auf die Spotgröße

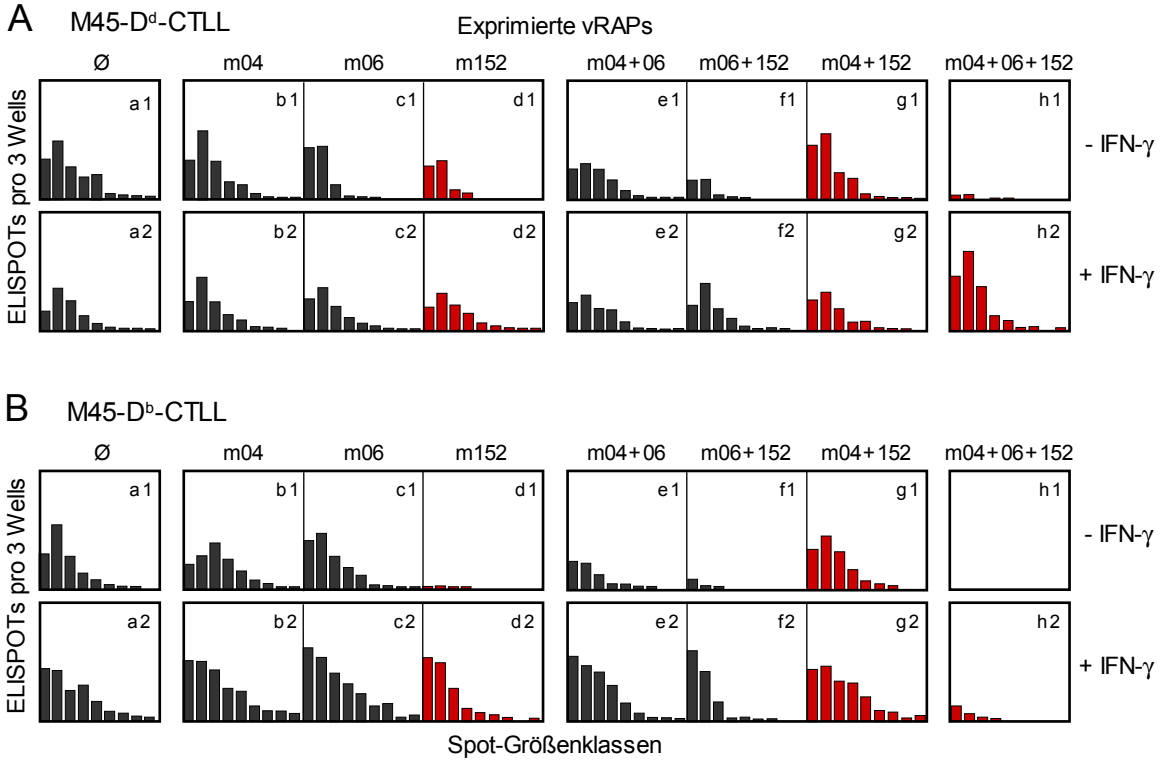


Abbildung 22: **Einfluss einer IFNγ-Vorbehandlung von mit dem Virus-Set infizierten MEF (Haplotyp H-2^d und Haplotyp H-2^b) auf die Spotgröße.** Dargestellt ist die vollständige Spotgrößenauswertung für den in Abb. 21 gezeigten ELISPOT-*Assay*. Berücksichtigt wurde jeweils die Summe der Spots von drei Wells. Innerhalb einer Graphik ist ganz links die Zahl der kleinsten Spots zu sehen (Größenklasse 1), ganz rechts die der größten (Größenklasse 9). In der jeweils oberen Reihe der Graphiken sind die Spotgrößen ohne IFNγ-Vorbehandlung der MEF dargestellt, in der unteren Reihe mit IFNγ-Vorbehandlung. Oberhalb der Graphiken sind die exprimierten vRAPs vermerkt.

Die graphische Darstellung in Abb. 22A zeigt die Spotgrößenverteilung für die in Abb. 21 gezeigten Spotfrequenzen der M45-D^d-CTL. Das Maximum der

Spotgrößenverteilung lag unabhängig von der IFNγ-Vorbehandlung für jeden Ansatz in der zweitkleinsten Größenklasse (Ausnahme: Abb. 22A, h1, da nach Infektion mit mCMV-WT ohne IFNγ-Vorbehandlung der Stimulatorzellen nahezu keine Spots vorhanden waren). Ein Einfluss der vRAPs auf die Spotgrößen konnte demnach weder mit noch ohne IFNγ-Vorbehandlung beobachtet werden.

Für die durch die Epitoperkennung M45-D^b-spezifischer CTL hervorgerufenen Spots (Abb. 22B) war ein Einfluss der vRAPs auf der Ebene der Spotgrößen zwar nachweisbar, aber nur in geringem Maße. Ohne IFNγ-Vorbehandlung war eine Verschiebung des Spotgrößenmaximums um eine Größenklasse zu größeren Spots hin nur zu erkennen, wenn m04 alleine exprimiert wurde (Abb. 22B, b1). Da innerhalb der Gruppe der Schlüsselviren nennenswerte Mengen an Spots nur nach Infektion mit mCMV-Δ*m06*, die m04 und m152 zusammen exprimiert, beobachtet werden konnten und die Infektion mit den anderen beiden Schlüsselviren (mCMV-Δ*m04+06* und mCMV-WT) nur sehr wenig oder gar keine Spotbildung zur Folge hatten, konnte ein eventueller Einfluss der vRAPs auf die Epitoperkennung innerhalb der Schlüsselviren auf der Ebene der Spotgröße nicht festgestellt werden. Lediglich von m04 konnte ein positiv regulierender Effekt auf die Größe der gebildeten Spots (Abb. 22B, b1) beobachtet werden.

Mit IFNγ-Vorbehandlung zeigte sich für die Spotgrößen ein relativ homogenes Bild, das mit den Spotgrößen der durch m164-spezifische CTL hervorgerufenen Spots vergleichbar war, d. h. ein Einfluss der vRAPs auf die Spotgrößen war - mit einer Ausnahme - nicht erkennbar. Eine Verschiebung des Maximums der Spotgrößen hin zu größeren Spotgrößen war zu nur beobachten, wenn m04 und m152 zusammen exprimiert wurden (vgl. Abb. 20B und Abb. 22B, jeweils g2).

Schlussfolgerung: Wie bereits für die IE1- und m164-Peptidpräsentation gezeigt, hob eine IFNγ-Vorbehandlung der MEF den Einfluss der drei vRAPs auf die M45-D^d- sowie die M45-D^b-Peptiderkennung bezüglich der Spotfrequenz nahezu vollständig auf. Bei der M45-D^b-Spezifität blieb auf der Ebene der Spotgröße ihr regulierender Einfluss erkennbar, jedoch in sehr geringer Ausprägung.

3.11 Effekt von vRAPs auf die Epitoperkennung durch *memory* CD8 T-Zellen

Bisher wurde der Einfluss der vRAP-modulierten Antigenpräsentation in Abhängigkeit von IFNγ mit Hilfe von peptidspezifischen CTLL untersucht. Um die Allgemeingültigkeit der mit CTLL verschiedener Spezifitäten und MHC-Restriktionen erhobenen Befunde zu untermauern, wurden *ex vivo* isolierte CD8 *memory*-Milzzellen in analoger Weise untersucht.

Dafür wurden die CD8 T-Zellen aus den Milzen von *memory*-BALB/cJ- bzw. C57BL6-Mäusen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS) isoliert. MEF der Haplotypen H-2^d und H-2^b wurden mit IFNγ vorbehandelt bzw. unbehandelt belassen und mit dem Virus-Set infiziert. Im ELISPOT-*Assay* wurde die Epitoperkennung der auf den MEF präsentierten Peptide durch die CD8 T-Zellen untersucht. Mit Hilfe synthetischer antigener mCMV-Peptide wurde parallel dazu getestet, mit welchen Frequenzen die korrespondierenden Spezifitäten unter den *ex vivo* isolierten CD8 T-Zellen repräsentiert sind. Für den Haplotyp H-2^d wurden alle derzeit bekannten MHC-Klasse-I-restringierten mCMV-Peptide getestet. Für den Haplotyp H-2^b wurden die sieben Spezifitäten ausgewählt, deren Frequenzen in der akuten bzw. in der *memory*-Phase der Infektion am höchsten sind [Munks *et al.*, 2006a].

Die Erkennung der synthetischen Peptide sowie der infizierten Zellen durch *memory*-CD8 T-Zellen mit und ohne IFNγ-Vorbehandlung der Stimulatorzellen im BALB/cJ System ist in Abb. 23A dargestellt. CD8 T-Zellen, die für die immundominanten Peptide IE1 bzw. m164 spezifisch sind, zeigten sowohl mit als auch ohne IFNγ-Vorbehandlung die höchsten Frequenzen, wobei nach IFNγ-Vorbehandlung der Stimulatorzellen die Erkennungsrate der immundominanten Peptide sogar noch etwas reduziert war (Abb. 23A, linke Bildhälfte). Die Erkennung der anderen Peptide durch die CD8 T-Zellen war schwach bzw. für die Peptide M84 und M45-D^d war gar keine Erkennung zu beobachten.

Das Erkennungsmuster der CD8 T-Zellen nach Infektion mit dem Virus-Set ohne IFNγ-Vorbehandlung der MEF (Abb. 23A, rechten Bildhälfte) entsprach wiederum in seinen Grundaussagen dem bekannten Epitoperkennungsmuster. Ausgehend von der Epitoperkennung nach Infektion mit der kein vRAP exprimierenden *Triple*-Mutante wurde die Epitoperkennung bei alleiniger Expression von m04 sogar noch etwas

verstärkt. Sowohl m06 als auch m152 führten im Vergleich zur *Triple*-Mutante zu einer Reduktion der Epitoperkennung. Auch hier war der immunevasive Effekt von m152 wieder am stärksten, bezogen auf die jeweils einzelne Expression der vRAPs.

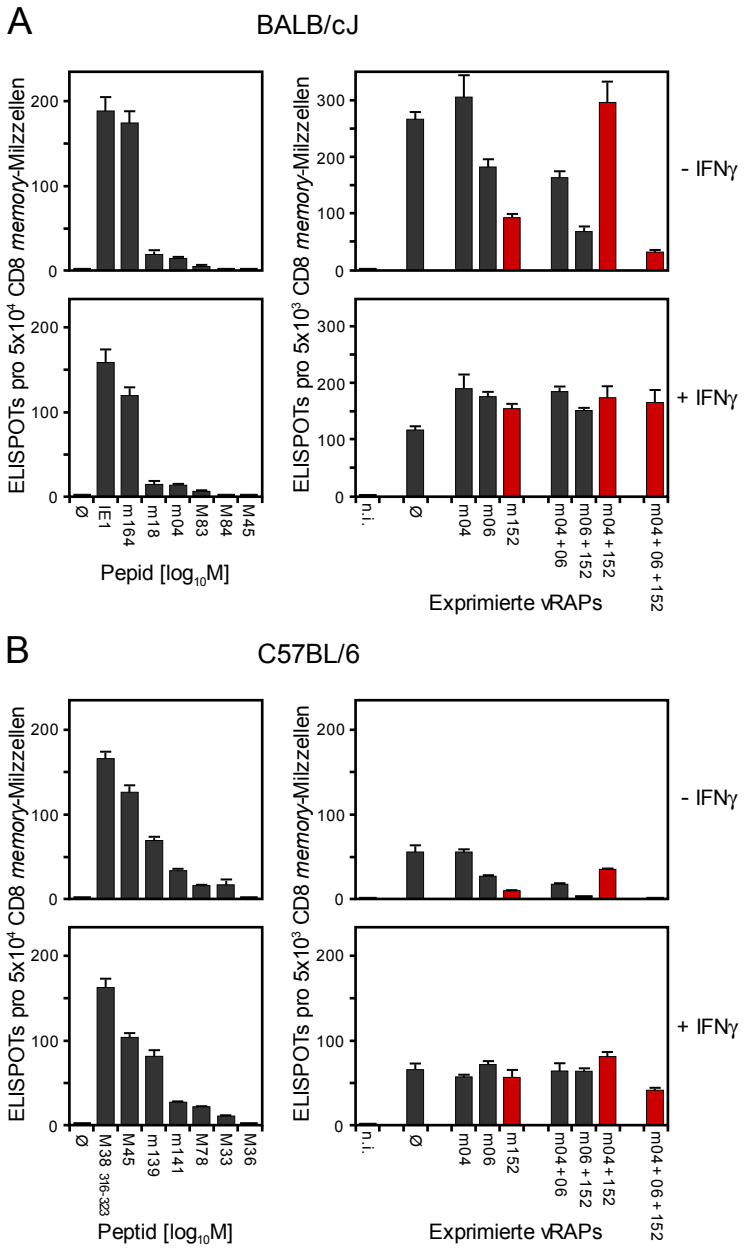


Abbildung 23: **Einfluss von IFNγ auf die vRAP-modulierte Erkennung durch CD8 *memory*-Milzzellen.** Als Stimulatorzellen im ELISPOT-*Assay* wurden MEF (A: Haplotyp H-2^{d}; B: Haplotyp H-2^{b}), die nicht oder mit IFNγ vorbehandelt wurden, eingesetzt. Die linke Bildhälfte zeigt die Frequenzen für die getesteten synthetischen Peptide, die rechte Bildhälfte die Epitoperkennung nach Infektion mit dem Set an Viren. Als Effektoren wurden *ex vivo* isolierte CD8 *memory*-Milzzellen eingesetzt.

In Koexpression mit m06 zeigte m04 weder eine den Effekt von m06 antagonisierende Wirkung (vgl. Abb. 23A, obere Hälfte mit Abb. 6A, Abb. 7, Abb. 9: m164-CTLL) noch eine den Effekt von m06 verstärkende Wirkung (vgl. Abb. 23A mit Abb. 9: M45-D^d-CTLL, Abb. 12: M97-CTLL, m139-CTLL und Abb. 21: M45-D^b-CTLL). Hingegen hatte die Koexpression von m06 mit m152 einen zusätzlichen herunterregulierenden Einfluss auf den immunevasiven Effekt von m152.

Sehr deutlich sichtbar war der antagonisierende Effekt von m04, wenn es mit m152 zusammen exprimiert wurde. Das Erkennungsniveau erreichte das Niveau wie nach alleiniger Expression von m04. Die Epitoperkennung war am geringsten nach Infektion mit mCMV-WT.

Die IFNγ-Vorbehandlung zeigte im Wesentlichen zwei Effekte (Abb. 23A, untere Bildhälfte): Das typische Erkennungsmuster war nahezu vollständig nivelliert; es waren lediglich Tendenzen, in welche Richtung reguliert werden kann, erkennbar. Nicht typisch war, dass die Epitoperkennung nach Infektion der Stimulatorzellen mit der *Triple*-Mutante am niedrigsten war. Darüberhinaus war das Erkennungsniveau durch die IFNγ-Vorbehandlung insgesamt reduziert, was bereits für die M45-D^d-spezifischen CTL beobachtet werden konnte (siehe Abb. 21).

Im Haplotyp H-2^b konnte zunächst dieselbe Hierarchie der T-Zell-Frequenzen reproduziert werden, wie sie bereits von Munks und Kollegen gezeigt worden war [Munks *et al.*, 2006a]. Auf die Erkennung der synthetischen Peptide des Haplotyps H-2^b hatte die IFNγ-Vorbehandlung der Stimulatorzellen – wie bei den Peptiden des Haplotyps H-2^d - keinen Einfluss (Abb. 23B, linke Bildhälfte).

Nach Infektion der nicht mit IFNγ-vorbehandelten MEF (H-2^b) mit dem Virus-Set ist wiederum das bekannte Erkennungsmuster zu sehen (Abb. 23B, rechte Bildhälfte oben). Allerdings ist das Frequenzniveau sehr gering. Mit IFNγ-Vorbehandlung der MEF änderte sich das Erkennungsniveau kaum (Abb. 23B, rechte Bildhälfte, unten). Das Erkennungsmuster war hier ebenfalls nahezu vollständig aufgehoben. Nur für die Erkennung nach Infektion mit mCMV-WT war eine deutliche Reduktion der Spotfrequenz um etwa ein Drittel im Vergleich zu der *Triple*-Mutante zu beobachten.

Schlussfolgerung: Auch für die Gesamtheit der *in vivo* geprimten mCMV-spezifischen CD8 *memory*-Milzzellen der Haplotypen H-2^d und H-2^b gilt, dass ohne IFNγ-Vorbehandlung das bekannte vRAP-regulierte Erkennungsmuster sichtbar war. Eine Vorbehandlung der Stimulatorzellen mit IFNγ hob den Effekt der vRAPs wieder auf.

4 Diskussion

Nach wie vor ist die hCMV-Infektion bei Patienten mit defizientem Immunsystem von erheblicher klinischer Relevanz. Für die Entwicklung einer Vakzine bzw. einer in der Humanmedizin anwendbaren Zytoimmuntherapie ist das Verständnis der viralen Mechanismen, die die Immunabwehr des Wirts kontrollieren sollen, ein wichtiges Ziel in der CMV-Forschung. Im murinen Modellsystem ist durch das zur Verfügung stehende Set an mCMV-vRAP-Gendeletionsmutanten [Wagner *et al.*, 2002] eine funktionelle Analyse der Effekte der einzelnen vRAPs und ihrer Kombinationen auf die Antigenpräsentation möglich. Damit eröffnet sich ein faszinierender Einblick in die viralen Strategien, das Immunsystem des Wirts zu manipulieren.

Erste Erkenntnisse über die biologischen Effekte jedes einzelnen vRAP sowie aller möglichen vRAP-Kombinationen lieferte die Arbeit von Wagner und Kollegen [2002]. M. Wagner generierte das in der vorliegenden Doktorarbeit verwendete vollständige Set an mCMV-vRAP-Gendeletionsmutanten und untersuchte die Oberflächenexpression der MHC-Klasse-I-Moleküle nach Infektion der Zellen mit den verschiedenen Virusmutanten [Wagner *et al.*, 2002]. Wagner und Kollegen konnten zeigen, dass das Ausmaß des inhibitorischen Effekts auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression eine allelspezifische Hierarchie zeigt. Außerdem fanden sie, dass die vRAPs nicht nur synergistisch, sondern in bestimmten Kombinationen auch antagonistisch wirken und sich somit positiv auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenpräsentation auswirken. Es blieb aber die entscheidende Frage offen, ob die an die Zelloberfläche transportierten MHC-Klasse-I-Moleküle mit Peptid beladen sind und wenn ja, ob diese MHC-Peptid-Komplexe von CD8 T-Zellen erkannt werden können. Diese Fragen konnten in der vorliegenden Arbeit geklärt werden.

ELISPOT-*Assay* als Hauptuntersuchungssystem

Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf der Untersuchung der Aktivierung von CD8 T-Zellen unter dem Einflus der vRAPs. Als Hauptuntersuchungssystem wurde der ELISPOT-*Assay* gewählt, mit dessen Hilfe die Anzahl der IFNγ-sezernierenden und damit aktivierten CD8 T-Zellen nach Infektion der Stimulatorzellen mit den verschiedenen Virusmutanten gemessen werden kann. Da die Aktivierung von CD8 T-

Zellen die Präsentation des Peptids, für welches sie einen spezifischen TCR besitzen, zur Voraussetzung hat, kann durch den Nachweis IFNγ-sezernierender Zellen auf die Präsentation des Peptids geschlossen werden. Darüber hinaus sind grundsätzlich auch quantitative Aussagen über die Menge an präsentiertem Peptid möglich. Bei optimaler Peptidpräsentation ist zusätzlich die Bestimmung der Zahl peptidspezifischer Effektorzellen möglich; darin unterscheidet sich der ELISPOT-*Assay* grundlegend vom Zytolysetest, in dem über die Zahl reaktiver Effektoren keine Aussage gemacht werden kann. Ein Vergleich der beiden Testsysteme in der vorliegenden Arbeit hat zudem gezeigt, dass das Auflösungsvermögen des ELISPOT-*Assays* deutlich besser ist als das des Zytolysetests (siehe Abb. 6). Daher wurde zur weiteren Bearbeitung der Fragestellung innerhalb dieser Arbeit der ELISPOT-*Assay* gewählt.

Funktionen der einzelnen vRAPs

Durch die Möglichkeit der Darstellung der Effekte jedes einzelnen vRAP sowie aller möglichen vRAP-Kombinationen auf die T-Zellaktivierung ist ein wichtiger und neuer Einblick in das Eingreifen des Virus in die Immunantwort des Wirtsorganismus gewonnen worden. Mit Hilfe der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Virusmutanten konnte zunächst die Beobachtung von Wagner und Kollegen [2002] bestätigt werden, dass sowohl m152 als auch m06 die MHC-Klasse-I-Oberflächenpräsentation herunter regulieren. Als stärkstes, die Antigenpräsentation und damit die T-Zellaktivierung negativ modulierender vRAP wurde m152 identifiziert. Das auf der Ebene der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression für H-2K^d und H-2K^b als stärkster negativer Regulator identifizierte vRAP m06 [Wagner *et al.*, 2002] hat ebenfalls einen negativ regulierenden Effekt auf die Antigenpräsentation. Seine Auswirkungen auf diese sind jedoch geringer als bei m152 und von unterschiedlichem Ausmaß (siehe Abb. 9 und 12).

Dass jedoch nicht nur eine negative, sondern auch eine positive Regulation der Antigenpräsentation durch ein virales Protein möglich ist, konnte in dieser Arbeit eindeutig demonstriert werden. So zeigt der dritte der drei bisher identifizierten vRAPs, das Glykoprotein m04, einen die Antigenpräsentation positiv regulierenden Effekt, wenn es alleine exprimiert wird; d. h. es fördert nicht nur die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression (siehe Abb. 5), sondern die in Assoziation mit m04 an der Zelloberfläche präsentierten MHC-Klasse-I-Moleküle sind außerdem peptidbeladen,

können von CTL erkannt werden und diese aktivieren (siehe Abb. 6A, 9 und 12). Dieser Effekt von m04 korreliert mit dem von Wagner und Kollegen [2002] erhobenen Befund der durch m04 positiv regulierten Oberflächenexpression der MHC-Klasse-I-Moleküle. Während Wagner als Stimulatorzellen eine SV40-transformierte Fibroblastenzelllinie (Haplotyp H-2^d) verwendet hat, konnten die Befunde in unserer Arbeitsgruppe mit nicht transformierten und damit der natürlichen Situation näher kommenden primären Zellen (MEF) als Stimulatorzellen reproduziert werden.

In der Literatur wurde m04 bisher als negativer Regulator eingestuft. Kleijnen und Kollegen [1997] beschrieben nach ihrer Entdeckung von m04 seine biochemische Funktionsweise zwar als die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression fördernd und damit der Retention der MHC-Moleküle im ER entgegenwirkend [Kleijnen *et al.*, 1997]; diese Förderung der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression interpretierten sie jedoch als Immunevasionsmechanismus, um NK-Zellen ruhig zu stellen, da deren Aktivität durch das Fehlen von MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche gefördert, bzw. durch die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression gehemmt wird. Diskutiert wurde außerdem, dass die Bindung von m04 an MHC-Klasse-I-Moleküle die Erkennung des MHC-Pepid-Komplexes an der Zelloberfläche durch den TCR physikalisch behindern und damit eine T-Zellaktivierung verhindern könnte [zur Übersicht siehe Lilley & Ploegh, 2005]. Dass sich m04 auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression als positiver Regulator auswirkt, stand außer Zweifel [Wagner *et al.*, 2002]. Dass m04 die T-Zellantwort jedoch trotzdem negativ reguliert, konnte in der vorliegenden Arbeit widerlegt werden.

Zusammenspiel der vRAPs

Da das konzertierte Zusammenspiel der drei vRAPs eine fast vollständige Inhibition der Antigenerkennung zur Folge hatte, stellte sich die Frage, ob und wie sich die vRAPs gegenseitig beeinflussen. Für alle fünf MHC-Klasse-I-Moleküle der Haplotypen H-2^d und H-2^b sowie für zehn verschiedene Epitope aus neun verschiedenen Proteinen konnte gezeigt werden, dass der immunevasive Effekt von m152 nicht mehr nachweisbar ist, wenn m04 und m152 zusammen exprimiert werden. Dieses Phänomen wurde *in vitro* sowohl in Fibroblastenzellkulturen wie auch in Kulturen von BMDC beobachtet (siehe Abb. 10). Außerdem konnte *in vivo* gezeigt werden, dass

die Kontrolle der Infektion durch mCMV-spezifische CTLL sehr viel schlechter ist, wenn m152 alleine exprimiert wird. Eine Koexpression von m04 mit m152 verbessert die Immunkontrolle deutlich (siehe Abb. 15 und 16). Hier scheint m04 durch seinen den Transport von MHC-Peptid-Komplexen an die Zelloberfläche fördernden Effekt die negativ modulierende Wirkung von m152 aufzuheben.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass m152 der vRAP mit der stärksten immunevasiven Wirkung ist (s. o.). Diese ist besonders deutlich zu erkennen, wenn m152 alleine exprimiert wird: die Epitoperkennung ist fast vollständig aufgehoben. Eine Koexpression mit dem negativen Regulator m06 vermag die Antigenpräsentation nicht weiter zu reduzieren. Das Fehlen von m152 (mCMV-Δ*m152*) als stärkstem negativen Regulator hat trotz der Expression von m04 und m06 die Wiederherstellung der Antigenpräsentation zur Folge, wenn auch nicht in vollem Umfang. Die Bedeutung von m152 und die aus seinem Fehlen resultierenden Konsequenzen lassen sich durch sein Wirken auf molekularer Ebene erklären [Ziegler *et al.*, 1997; Ziegler *et al.*, 2000]. Danach interferiert m152 mit dem intrazellulären Transportweg der MHC-Klasse-I-Moleküle, indem es peptidbeladene Moleküle im ERGIC/*cis*-Golgi Kompartiment zurückhält. Dies würde bedeuten, dass ein Reservoir von MHC-Peptid-Komplexen geschaffen werden kann, das als optimaler Ausgangspunkt für die Wirkung der beiden anderen vRAPs dienen könnte. Werden nun die beiden negativ regulierenden vRAPs m152 und m06 zusammen exprimiert, so könnte m06 die durch m152 akkumulierten MHC-Peptid-Moleküle in das *trans-Golgi*-Netzwerk (TGN) und weiter zur Degradation ins lysosomale Kompartiment führen. Dagegen hat die gemeinsame Expression von m152 und m04 die Wiederherstellung der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression zur Folge. m04 würde also die Akkumulation der MHC-Moleküle im ERGIC/cis-Golgi Kompartiment sukzessive wieder aufheben.

Um die Rolle von m04 im Verband der vRAPs zu klären, führten Kavanagh und Kollegen [2001a] Experimente mit mCMV-WT bzw. mit der Deletionsmutante mCMV-Δ*m04* aus: Dazu wurden IFNγ-vorbehandelte MEF mit den beiden Viren infiziert, die Virusreplikation in der E-Phase gestoppt und solchermaßen behandelt als Stimulatorzellen für CTL-Klone im Zytolysetest eingesetzt. Die Autoren konnten für m04 unterschiedliche Effekte in Abhängigkeit von den verwendeten CTL-Spezifitäten zeigen. Die Antigenpräsentation und damit die lytische Aktivität der CTL wurde für K^b-

restringierte CTL-Klone, nicht aber für D^b-restringierte CTL-Klone wieder hergestellt, wenn m04 fehlte. Die Autoren schlossen daraus, dass m04 ein negativer Regulator für die untersuchten K^b-restringierten Klone sei. Wagner und Kollegen konnten hingegen zeigen, dass m04 die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression positiv reguliert (s. o.) und den inhibitorischen Effekt von m152 aufhebt [Wagner *et al.*, 2002]. In der vorliegenden Arbeit konnten diese Effekte der vRAPs auch auf der Ebene der Antigenpräsentation bestätigt werden. Lediglich für die Spezifitäten M45-D^d (siehe Abb. 9) sowie für die drei getesteten K^b-restringierten Peptide (siehe Abb. 12) wurde der immunevasive Effekt von m06 auf die Peptidpräsentation durch die zusätzliche Expression von m04 etwas verbessert.

Die gemeinsame Expression der beiden vRAPs m04 und m06 ist von Interesse, da beide Glykoproteine fest an MHC-Moleküle binden und damit um denselben Bindungspartner konkurrieren. Abhängig davon, mit welchem der beiden vRAPs die MHC-Moleküle interagieren, werden sie in unterschiedliche zelluläre Kompartimente dirigiert: m04 vermittelt ihren Transport an die Zelloberfläche, m06 dagegen den Transport ins lysosomale Kompartiment zum Abbau des Komplexes. Ihre gemeinsame Expression zeigte, dass ihr Nettoeffekt nicht immer gleich ist, sondern dass sowohl der positiv regulierende Effekt von m04 überwiegen kann (siehe Abb. 9, m18-D^d) als auch der negativ regulierende Effekt von m06 (siehe Abb. 9, M45-D^d).

Betrachtet man nun die konzertierte Wirkung aller drei vRAPs des mCMV-WT, nämlich die fast vollständige Inhibition der Antigenpräsentation, so wird ein anderer funktioneller Aspekt des Effekts von m06 sichtbar. Es scheint den positiv regulierenden Einfluss von m04 aufzuheben, denn eine Infektion von Zellkulturen oder Rezipienten mit mCMV-WT zeigt im Vergleich zur Infektion mit mCMV-Δ*m06* (Expression von m04 und m152) wieder einen massiven immunevasiven Effekt (siehe Abb. 9, 12, 15 und 16). Durch die umfangreichen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass für das M45-D^b-Peptid auf BMDC sowie für alle getesteten D^d-restringierten Epitope auf MEF der stärkste immunevasive Effekt nach Infektion mit mCMV-WT auftritt, wenn also alle drei vRAPs gemeinsam exprimiert werden. Besonders deutlich ist dieses Phänomen für m18-D^d-CTL zu beobachten (siehe Abb. 9). Entgegen den Schlussfolgerungen von Kavanagh und Kollegen [2001a], die das Phänomen der stärksten Immunevasion im mCMV-WT dem Effekt von m04 zuschreiben (s. o.), führen jedoch die detaillierten Analysen jedes einzelnen

vRAP zu einem differenzierteren Bild ihrer modulierenden Effekte. So scheint der stärkste immunevasive Effekt nach Infektion mit mCMV-WT nicht durch ein Zusammenspiel von m04 und m152 zustande zu kommen, sondern vielmehr durch die Überlagerung der Funktionen von m04 und m06, die ja um die im ERGIC akkumulierten MHC-Klasse-I-Moleküle konkurrieren. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass, wenn m04 und m152 gemeinsam exprimiert werden, m04 den negativ regulierenden Effekt von m152 aufhebt und die Peptidpräsentation fördert (s. o.).

Zusammenspiel von m06 und Adaptorproteinen

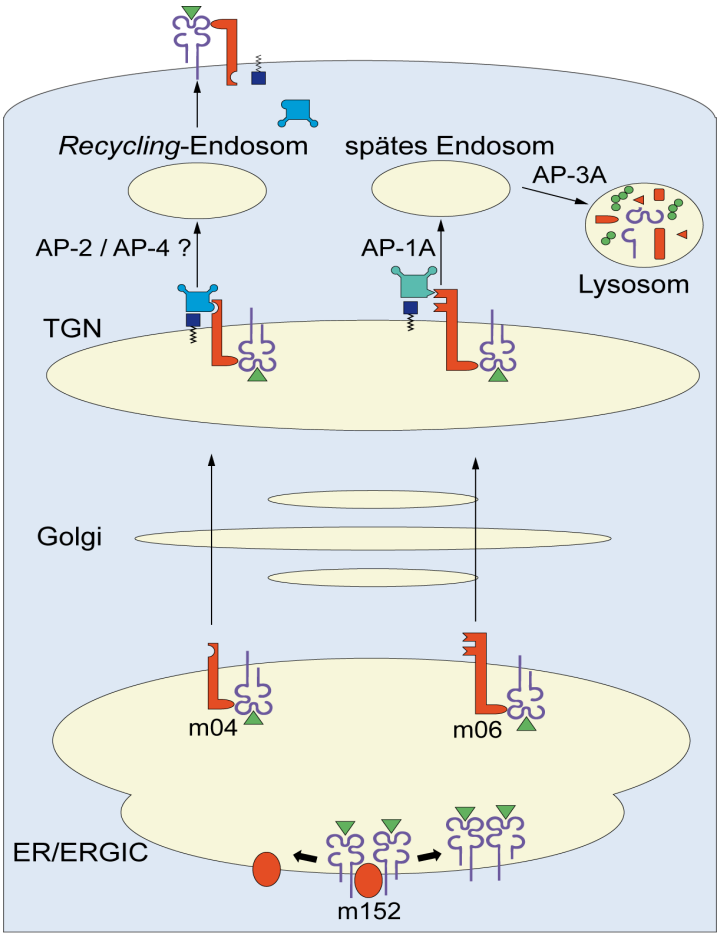


***Abbildung 23:* Zusammenspiel von m06 und m04 mit Adaptorproteinen auf dem Transportweg von MHC-Peptid-Komplexen zur Zelloberfläche.** Vermittelt durch die Interaktion mit den Adaptorproteinen AP-1A und AP-3A werden MHC-Peptid-Komplexe, an die m06 gebunden hat, ins Lysosom transportiert [Reusch *et al.*, 1999; Reusch *et al.*, 2002]. Ob in den Transport von MHC-Peptid-Komplexen, an die m04 gebunden hat, möglicherweise die Adaptorproteine AP-2 bzw. AP-4 involviert sind, ist bisher nicht geklärt. (Die Abb. wurde freundlicherweise von Niels Lemmermann zur Verfügung gestellt.)

Die feste Bindung von m06 an den MHC-Peptid-Komplex ermöglicht, dass dieser über das TGN, in dem die Proteine sortiert werden, der Degradation im lysosomalen Kompartiment zugeführt werden kann. In diese Funktion des Sortierens von Lasten (*cargo*) sind die heterotetrameren Adaptorproteine AP-1A und AP-3A involviert (siehe Abb. 23)[Reusch *et al.*, 1999; Reusch *et al.*, 2002]. Reusch konnte in seinen Arbeiten zeigen, dass eines der beiden zytoplasmatisch orientierten, im Bereich des N-Terminus von m06 lokalisierten Dileucin-Motive als Adaptorproteinbindemotiv fungiert und m06 damit ein *Cargo*-Protein für diese beiden Adaptorproteine darstellt. Dabei wird der Transport vom TGN zu den Endosomen über AP-1A vermittelt, während AP-3A den Transport von den Endosomen zu den Lysosomen ermöglicht [Reusch *et al.*, 2002].

Schwankungen innerhalb des Grundmusters der Epitoperkennung im Haplotyp H-2^d

Im Haplotyp H-2^d sind quantitative Unterschiede im vRAP-modulierten Epitoperkennungsmuster zu beobachten (siehe Abb. 9). So hat beispielsweise die Expression von m06 zusammen mit m152 den geringsten negativ regulierenden Effekt auf die Erkennung des D^d-restringierten m18-Peptids innerhalb aller getesteten H-2^d-restringierten Spezifitäten. Ferner war bei allen D^d-restringierten Peptiden fast keine immunevasive Wirkung von m06 alleine zu beobachten. Ob diese Beobachtungen auf allelspezifische Unterschiede der Effekte der vRAPs zurückzuführen sind, ist unklar.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit für diese Schwankungen könnten Unterschiede in der Menge an prozessiertem Peptid sein. Bei zu hohen Peptidmengen gelingt es den vRAPs nicht mehr die Präsentation des Peptids vollständig zu verhindern. Außerdem sind die Affinitäten der TCR weder zwischen den verschiedenen CTL-Spezifitäten noch innerhalb einer CTL-Linie identisch (Daten nicht gezeigt). Daraus resultiert, dass TCR mit hoher Affinität eine definierte Menge präsentierten Peptids besser erkennen können als TCR mit geringerer Affinität. Die sich dadurch ergebenden Schwankungen dürfen dann nicht den Effekten der vRAPs zugeschrieben werden.

Wirkung der vRAPs in verschiedenen Stimulatorzelltypen

In der vorliegenden Arbeit konnte das durch die Wirkung der vRAPs entstandene Epitoperkennungsmuster sowohl mit infizierten MEF als auch BMDC vielfach bestätigt werden. Ein Einfluss der vRAPs auf die Peptidpräsentation von infizierten Makrophagen war für die in dieser Arbeit getesteten Spezifitäten jedoch nicht erkennbar (IE1, m164 und M45-D^d, siehe Abb. 11). Frühere Untersuchungen bezüglich des Einflusses von m06 und m152 auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression hatten bei infizierten Fibroblasten einen herunterregulierenden Effekt gezeigt, nicht aber bei infizierten Makrophagen [Hengel *et al.*, 2000]. Hengel und Kollegen [2000] untersuchten die Menge an synthetisiertem IE-Protein pp89 und quantifizierten die Menge an prozessiertem IE1-Peptid. Sie konnten nachweisen, dass die Prozessierungseffizienz von pp89 zum IE1-Peptid in Makrophagen höher ist als in Fibroblasten. Diese Befunde legen den Schluss nahe, dass die Effektivität der vRAPs von der Menge an prozessiertem Peptid abhängt; d. h. je mehr MHC-Peptid-Komplexe vorhanden sind, desto weniger effizient kann ihr Transport durch die vRAPs moduliert werden. Zu einer anderen Beobachtung bezüglich der Antigenpräsentation kommen LoPiccolo und Kollegen. Sie finden keinen Unterschied in der Qualität der Wirkung der vRAPs bezüglich der Antigenpräsentation in Fibroblasten und Makrophagen im Haplotyp H-2^b [Lo Piccolo *et al.*, 2003]. Allerdings haben sie keine Quantifizierung der getesteten antigenen Peptide durchgeführt, sodass ein Zusammenhang zwischen der Menge an prozessiertem Peptid und der Effektivität der vRAPs nicht hergestellt werden kann. Zudem können sie keinen positiv regulierenden Effekt von m04 im Haplotyp H-2^b nachweisen.

Einfluss von IFNγ auf die Peptidprozessierung und in der Folge auf die quantitativen Effekte der vRAPs

Dass die Menge an prozessiertem und präsentiertem Peptid für die Aktivierung von CD8 T-Zellen von entscheidender Bedeutung ist, zeigten die Experimente, für welche die Stimulatorzellen mit dem die Antigenpräsentation verstärkenden Zytokin IFNγ vorbehandelt wurden. Während auf der Ebene der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression nach IFNγ-Vorbehandlung die regulierenden Effekte der vRAPs nach wie vor nachweisbar waren (siehe Abb. 17), wurde das

Erkennungsmuster bezüglich der Frequenz der aktivierten CD8 T-Zellen aufgehoben (siehe Abb. 18 und 21). Lediglich an der IFNγ-Menge, die von den aktivierten CD8 T-Zellen sezerniert wurde und die mit der Größe der beobachteten Spots auf den Filtern korreliert, konnte sowohl die positive wie auch die negative Regulation der einzelnen vRAPs beobachtet werden, allerdings nur für drei der vier getesteten T-Zelllinien (siehe Abb. 20 und 22).

Wahrscheinlich waren nach IFNγ-Vorbehandlung der Stimulatorzellen peptidbeladene MHC-Moleküle in einem solchen Übermaß vorhanden, dass eine Modulation der Frequenz aktivierter CD8 T-Zellen durch die viralen Regulatoren nicht mehr möglich war. Damit eine Unterbindung des Transports von MHC-Klasse-I-Molekülen an die Zelloberfläche auf Frequenzebene erkennbar ist, darf scheinbar eine bestimmte Menge an peptidbeladenen MHC-Molekülen nicht überschritten werden. Da eine IFNγ-Vorbehandlung die Präsentation von Peptiden verstärken kann [Geginat *et al.*, 1997; Hengel *et al.*, 1994; Khan *et al.*, 2004], hat IFNγ einen indirekten Einfluss auf die Funktionsweise der vRAPs. So stellten Hengel und Kollegen [1994] fest, dass die Wiederherstellung der während der CMV-Infektion aufgehobenen Peptidpräsentation durch einen parakrinen Effekt erfolgt: mCMV-spezifische CD8 T-Zellen können den negativ regulierenden Effekt von mCMV auf die Antigenpräsentation kompensieren, indem sie durch die Sekretion von IFNγ und die damit verbundene Verbesserung der Peptidprozessierung die Antigenpräsentation wiederherstellen. Damit stellt IFNγ einen Gegenpol zu den viralen Immunevasionsmechanismen, die in die Antigenpräsentation eingreifen, dar.

In einer neueren Arbeit [Khan *et al.*, 2004] wird berichtet, dass die IFNγ-induzierte Bildung von Immunoproteasomen *in vitro* durch das mCMV-Gen *M27* gehemmt wird. Das *M27*-Genprodukt inhibiert STAT2, was zu einer Unterbrechung der Signaltransduktion von IFNγ führt. Während die vRAPs eine posttranslationale Immunevasionsstrategie darstellen, scheint das M27-Genprodukt ein weiterer viraler Immunevasionsmechanismus zu sein, der auf prätranskriptionaler Ebene durch die (IFNγ-abhängige) Regulation des Aufbaus des Immunoproteasoms und damit des Peptidrepertoires, indirekt die Quantität der Effekte der vRAPs beeinflusst.

Einfluss der vRAPs auf das *Priming* der Immunantwort und auf das immunologische Gedächtnis

Es ist bekannt, dass vRAPs keinen Einfluss auf das *Priming* der CD8 T-Zellantwort in der immunkompetenten adulten Maus haben. Obwohl m152 die Präsentation von M45-D^b *in vitro* stark herunterreguliert, beobachteten Gold und Kollegen [2002], dass die Frequenz der korrespondierenden CD8 T-Zellspezifität nicht vom Fehlen des m152-Proteins profitiert. Im Haplotyp H-2^b konnte außerdem gezeigt werden, dass nach Infektion mit mCMV-WT bzw. mCMV-Δ*Triple* keine Unterschiede im Umfang und in der Kinetik der virusspezifischen CD8 T-Zellantwort zu verzeichnen waren [Gold *et al.*, 2004]. Dieser Befund konnte in der eigenen Arbeitsgruppe für den Haplotyp H-2^d vielfach bestätigt werden. Auch in einer aktuellen Arbeit wurde gezeigt, dass Umfang oder Spezifität der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellantwort unabhängig von den vRAPs sind [Munks *et al.*, 2007]. Das deutet darauf hin, dass das Priming mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen primär durch Kreuzpräsentation nicht infizierter APC (z. B. DC) erfolgt [zur Übersicht siehe Holtappels *et al.*, 2006b]. Die Kontrolle einer produktiven Infektion in stromalen und parenchymalen Zellen durch CD8 T-Zellen wird jedoch zweifelsfrei von den vRAPs beeinflusst. Die Kontrolle der mCMV-Infektion ist bei einem Fehlen von m152 signifikant besser (siehe Abb. 16) [Holtappels *et al.*, 2004; Krmpotic *et al.*, 1999].

Darüber hinaus wurde von Lu und Kollegen [2006] diskutiert, ob vRAPs möglicherweise eine horizontale Übertragung des Virus erleichtern, indem sie die Erkennung und damit Eliminierung infizierter Zellen durch CD8 T-Zellen reduzieren. Die biologische Relevanz der vRAPs, insbesondere die Bedeutung des die Antigenpräsentation fördernden m04, ist bislang nicht endgültig geklärt. Dass mCMV von der Existenz der vRAPs profitiert, steht jedoch außer Zweifel.

vRAPs im entwicklungsgeschichtlichen Fokus

Neben seiner Funktion, beladene MHC-Klasse-I-Moleküle im ERGIC zurückzuhalten und damit auf die Aktivierung von CD8 T-Zellen negativ einzuwirken, ist m152 ebenfalls in der Lage, auf die Aktivierung von NK-Zellen negativen Einfluss zu nehmen, indem es die NKG2D-Liganden der RAE-1 Familie herunterreguliert [zur Übersicht siehe Jonjic *et al.*, 2006]. m152 hat also die Möglichkeit sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunantwort zu modulieren.

m152 gehört zur m145-Genfamilie, die verschiedene die angeborene Immunität modulierende Gene umfasst. Dies ist ein Hinweis darauf, dass es möglicherweise das entwicklungsgeschichtlich älteste der drei vRAPs ist. Die beiden anderen vRAPs, m04 und m06 gehören der *m02*-Genfamilie an. Beide sind für den Abtransport der MHC-Klasse-I-Moleküle verantwortlich, m04 in Richtung Zelloberfläche, m06 zur Degradation im lysosomalen Kompartiment. Sowohl m04 als auch m06 besitzen in ihrem zytoplasmatischen Teil Sequenzmotive (m04: YXXΦ-Motiv [nicht publizierte Daten]; m06: Dileucin-Motiv [Reusch *et al.*, 2002]), die eine Bindung der m04-MHC-Klasse-I-Komplexe bzw. der m06-MHC-Klasse-I-Komplexe an Adaptorproteine der Proteinsortierungsmaschinerie ermöglichen [zur Übersicht siehe Nakatsu & Ohno, 2003; Reusch *et al.*, 2002]. Eventuell ist der die Immunevasion verstärkende Effekt von m04 im mCMV-WT dadurch zu erklären, dass es den negativ regulierenden Effekt von m06 fördert, indem es seine gebundenen MHC-Klasse-I-Moleküle im *trans*-Golgi Netzwerk der dortigen Proteinsortierungsmaschinerie zuführt. Diese peptidbeladenen MHC-Klasse-I-Moleküle werden dann von m06 übernommen und der lysosomalen Degradation zugeführt.

Grundsätzlich stellt sich die Frage, warum mCMV im Laufe der Evolution drei Proteine erworben hat, die mit der MHC-Klasse-I-Peptidpräsentation interferieren. Dass sich die Proteine entwickelt haben, um dasselbe Ergebnis zu erzielen, ist nach den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit unwahrscheinlich. Vielmehr zeichnet sich ein Zusammenspiel der vRAPs in der Weise ab, dass m152 als negativer Regulator durch m04 antagonisiert werden kann und dieser Effekt von m04 wiederum von m06 aufgehoben werden kann. Da die bisherigen Studien zeigen, dass unter den Bedingungen einer produktiven Infektion der Nettoeffekt dieser Interaktionen eine Inhibition der Antigenpräsentation ist, stellt sich die Frage nach dem Sinn der Existenz von m04. Eine mögliche Funktion von m04 wird deutlich, wenn man sich vor Augen führt, zu welchem Zeitpunkt der immunologischen Reife der Wirtsorganismus infiziert wird: Die Infektion mit CMV erfolgt häufig perinatal [zur Übersicht siehe Reddehase, 2002], in deren Folge sich eine persistierende Infektion im immunologisch unreifen Organismus etabliert, in dem die Entwicklung der immunologischen Selbsttoleranz noch nicht abgeschlossen ist. Möglicherweise könnte m04 dem Virus helfen in seinem Wirt zu überleben und zu persistieren, indem es die Präsentation viraler Antigene zur Induktion von Selbsttoleranz verstärkt. Voraussetzung dafür wäre eine Verschiebung

der relativen Balance der vRAPs zu Gunsten von m04 und zu Ungunsten von m06. Durch differentielle Genregulation hätte das Virus somit die Möglichkeit, die Antigenpräsentation zu verstärken, wenn immunologische Toleranz im sich entwickelnden Immunsystem induziert werden soll, bzw. die Antigenpräsentation zu reduzieren, um sich der Immunkontrolle des immunkompetenten Wirts zu entziehen. Denkbar wäre eine solche Genregulation durch Zytokine oder Toll-like-Rezeptoren oder als Resultat einer anderen Regulation, die vom Zelltyp und seiner Differenzierung abhängig ist. Zukünftige Untersuchungen bezüglich der Genregulation der vRAPs können Aufschluss über diese interessanten, noch offenen Fragen bringen.

5 Literaturverzeichnis

Ahn, K., A. Gruhler, B. Galocha, T. R. Jones, E. J. Wiertz, H. L. Ploegh, P. A. Peterson, Y. Yang & K. Früh. 1997. The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. Immunity **6:**613-621.

Alcami, A. & U. H. Koszinowski. 2000. Viral mechanisms of immune evasion. Immunol. Today **9:**447-455.

Andoniou, C. E., D. M. Andrews & M. A. Degli-Esposti. 2006. Natural killer cells in viral infection: more than just killers. Immunol. Rev. **214:**239-250.

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

Azuma, M., M. Cayabyab, D. Buck, J. H. Phillips & L. L. Lanier. 1992. CD28 interaction with B7 costimulates primary allogeneic proliferative responses and cytotoxicity mediated by small, resting T lymphocytes. J. Exp. Med. **175:**353-360.

Balthesen, M., L. Dreher, P. Lucin & M. J. Reddehase. 1994. The establishment of cytomegalovirus latency in organs is not linked to lokal virus production during primary infection. J. Gen. Virol. **75:**2329-2336.

Biron, K. K. 2006. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. Antiviral Res. **71:**154-163.

Bolger, G., N. Lapeyre, M. Rheaume, P. Kibler, C. Bousquet, M. Garneau & M. Cordingley. 1999. Acute murine cytomegalovirus infection: a model for determining antiviral activity against CMV induced hepatitis. Antiviral Res. **44:**155-165.

Borysiewicz, L. K., S. Graham, J. K. Hickling, P. D. Mason & J. G. Sissons. 1988. Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells: their precursor frequency and stage specificity. Eur. J. Immunol. **18:**269-275.

Brody, A. R. & J. E. Craighead. 1974. Pathogenesis of pulmonary cytomegalovirus infection in immunosuppressed mice. J. Infect. Dis. **129:**677-689.

Bubeck, A., U. Reusch, M. Wagner, T. Ruppert, W. Muranyi, P. M. Kloetzel & U. H. Koszinowski. 2002. The glycoprotein gp48 of murine cytomegalovirus: proteasome-dependent cytosolic dislocation and degradation. J. Biol. Chem. **277:**2216-2224.

Bukowski, J. F., J. F. Warner, G. Dennert & R. M. Welsh. 1985. Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo. J. Exp. Med. **161:**40-52.

Davison, A. J., A. Dolan, P. Akter, C. Addison, D. J. Dargan, D. J. Alcendor, D. J. McGeoch & G. S. Hayward. 2003. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. J. Gen. Virol. **84:**17-28.

De Jong, M. D., G. J. Galasso, B. Gazzard, P. D. Griffith, D. A. Jabs, E. R. Kern & S. A. Spector. 1998. Summary of the II international symposium on cytomegalovirus.

Antiviral Res. **39:**141-162.

Del Val, M., H. Hengel, H. Haecker, U. Hartlaub, T. Ruppert, P. Lucin & U. H. Koszinowski. 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:**729-738.

Del Val, M., K. Münch, M. J. Reddehase & U. H. Koszinowski. 1989. Presentation of CMV immediate-early antigen to cytolytic T lymphocytes is selectively prevented by viral genes expressed in the early phase. Cell **58:**305-315.

Einsele, H. & H. Hebart. 2004. CMV-specific immunotherapy. Hum. Immunol. **65:**558-564.

Einsele, H., E. Roosnek, N. Rufer, C. Sinzger, S. Riegler, J. Löffler, U. Grigoleit, A. Moris, H. G. Rammensee, L. Kanz, A. Kleihauer, F. Frank. G. Jahn & H. Hebart. 2002. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. Blood **99:**3916-3922.

Geginat, G., T. Ruppert, H. Hengel, R. Holtappels & U. H. Koszinowski. 1997. IFN-gamma is a prerequisite for optimal antigen processing of viral peptides in vivo. J. Immunol. **158:**3303-3310.

Germain, R. N. 1994. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. Cell **76:**287-299.

Gold, M. C., M. W. Munks, C. W. McMahon, A. Kelly, D. G. Kavanagh, M. Slifka, U. H. Koszinowski, D. H. Raulet & A. B. Hill. 2004. Murine cytomegalovirus interference with antigen presentation has little effect on the size or the effector memory phenotype of the CD8 T cell response. J. Immunol. **172:**6944-6953.

Gold, M. C., M. W. Munks, M. Wagner, U. H. Koszinowski, A. B. Hill & S. P. Fling. 2002. The murine cytomegalovirus immunomodulatory gene m152 prevents recognition of infected cells by M45-specific CTL but does not alter the immunodominance of the M45-specific CD8 T cell response in vivo. J. Immunol. **169:**359-365.

Gonczol, E., E. Danczig, I. Boldogh, T. Toth & L. Vaczi. 1985. In vivo model for the acute, latent and reactivated phases of cytomegalovirus infection. Acta Microbiol. Hung. **32:**39-47.

Grakoui, A., S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen & M. L. Dustin. 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell aktivation. Science **285:**221-227.

Groothuis, T. A. M., A. C. Griekspoor, J. J. Neijssen, C. A. Herberts & J. J. Neefjes. 2005. MHC class I alleles and their exploration of the antigen-processing machinery. Immunol. Reviews **207:**60-76.

Hengartner, H., B. Odermatt, R. Schneider, M. Schreyer, G. Walle H. R. Mac Donald and R. M. Zinkernagel. 1988. Deletion of self-reactive T cells before entry into the thymus medulla. Nature **336:**388-390.

Hengel, H., W. Brune & U. H. Koszinowski. 1998. Immune evasion by

cytomegalovirus survival strategies of a highly opportunist. Trends Microbiol. **6:**190-197.

Hengel, H., J. O. Koopmann, T. Flohr, W. Muranyi, E. Goulmy, G. J. Hammerling, U. H. Koszinowski & F. Momberg. 1997. A viral ER-resident glycoprotein inactivates the MHC-encoded peptide transporter. Immunity **6:**623-632.

Hengel, H., U. H. Koszinowski & K. K. Conzelmann. 2005. Viruses know it all: new insights into IFN networks. Trends Immunol. **26:**396-401.

Hengel, H., P. Lucin, S. Jonjic, T. Ruppert & U. H. Koszinowski. 1994. Restoration of cytomegalovirus antigen presentation by gamma interferon combats viral escape. J. Virol. **68:**289-297.

Hengel, H., U. Reusch, G. Geginat, R. Holtappels, T. Ruppert, E. Hellebrand, & U. H. Koszinowski. 2000. Macrophages escape inhibition of major histocompatibility complex class I-dependent antigen presentation by cytomegalovirus. J. Virol. **74:**7861-7868.

Holtappels, R., D. Gillert-Marien, D. Thomas, J. Podlech, P. Deegen, S. Herter, S. A. Oehrlein-Karpi, D. Strand, M. Wagner & M. J. Reddehase. 2006a. Cytomegalovirus encodes a positive regulator of antigen presentation. J. Virol. **80:**7613-7624.

Holtappels, R., N. K. A. Grzimek, D. Thomas & M. J. Reddehase. 2002b. Early gene m18, a novel player in the immune response to murine cytomegalovirus. J. Gen. Virol. **83:**311-316.

Holtappels, R., M. W. Munks, J. Podlech & M. J. Reddehase. 2006b. CD8 T-cell-based immunotherapy of cytomegalovirus disease in the mouse model of the immunocompromised bone marrow transplantation recipient, p. 383-418. *In* M. J. Reddehase (ed.), Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.

Holtappels, R., M. F. Pahl-Seibert, D. Thomas & M. J. Reddehase. 2000c. 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:**11495-11503.

Holtappels, R., J. Podlech, N. K. Grzimek, D. Thomas, M. F. Pahl-Seibert & M. J. Reddehase. 2001. Experimental preemptive immunotherapy of murine cytomegalovirus disease with CD8 T-cell lines specific for ppM83 and pM84, the two homologs of human cytomegalovirus tegument protein ppUL83 (pp65). J. Virol. **75:**6584-6600.

Holtappels, R., J. Podlech, M. F. Pahl-Seibert, M. Jülch, D. Thomas, C. O. Simon, M. Wagner & M. J. Reddehase. 2004. Cytomegalovirus misleads its host by priming of CD8 T cells specific for an epitope not presented in infected tissues. J. Exp. Med. **199:**131-136.

Holtappels, R., D. Thomas, J. Podlech, G. Geginat, H. P. Steffens & M. J. Reddehase. 2000a. 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., D. Thomas, J. Podlech & M. J. Reddehase. 2002a. Two antigenic peptides from genes *m123* and *m164* of murine cytomegalovirus quantitatively dominate CD8 T-cell memory in the *H-2*^{d} haplotype. J. Virol. **76:**151-164.

Holtappels, R., D. Thomas & M. J. Reddehase. 2000b. Indentifikation of a K(d)-restricted antigenic peptide encoded by murine cytomegalovirus early gene M84. J. Gen. Virol. **81:**3037-3042.

Jonjic, S., I. Bibic & A. Krmpotic. 2006. Innate Immunity to Cytomegaloviruses, p. 285-319. *In* M. J. Reddehase (ed.), Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.

Jonjic, S., W. Mutter, F. Weiland, M. J. Reddehase & U. H. Koszinowski. 1989. Site-restricted persistent cytomegalovirus infection after selective long-term depletion of CD4+ T lymphocytes. J. Exp. Med. **169:**1199-1212.

Kavanagh, D. G., M. C. Gold, M. Wagner, U. H. Koszinowski & A. B. Hill. 2001a. The multiple immune-evasion genes of murine cytomegalovirus are not redundant: m4 and m152 inhibit antigen presentation in a complementary and cooperative fashion. J. Exp. Med. **194:**967-977.

Kavanagh, D. G., U. H. Koszinowski & A. B. Hill. 2001b. The murine cytomegalovirus immune evasion protein m4/gp34 forms biochemically distinct complexes with class I MHC at the cell surface and in a pre-Golgi compartment. J. Immunol. **167:**3894-3902.

Khan, S., A. Zimmermann, M. Basler, M. Groettrup & H. Hengel. 2004. A cytomegalovirus inhibitor of gamma interferon signaling controls immunoproteasome induction. J. Virol. **78:**1831-1842.

Khanna, R. & D. J. Diamond. 2006. Human cytomegalovirus vaccine: time to look for alternative options. Trends Mol. Med. **12:**26-33.

Kielczewska, A. & S. M. Vidal. 2006. Enemy at the gates: forward genetics of the mouse antiviral response. Curr. Opin. Immunol. **18:**617-626.

Kleijnen, M. F., J. B. Huppa, P. Lucin, S. Mukkerjee, H. Ferrell, A. E. Campbell, U. H. Koszinowski, A. B. Hill & H. Ploegh. 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:**685-694.

Kloetzel, P. M. 2001. Antigen processing by the proteasome. Nat. Rev. **2:**179-187.

Koch, J. & R. Tampé. 2006. The macromolecular peptide-loading complex in MHC class I-dependent antigen presentation. Cell. Mol. Life Sci. **63:**653-662.

Koszinowski, U. H., M. J. Reddehase & S. Jonjic. 1993. The role of T-lymphocyte subsets in the control of cytomegalovirus infection, p. 429-445. *In* Thomas DB (ed.), Viruses and the cellular immune response. Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y.

Krmpotic, A., D. H. Busch, I. Bubic, F. Gebhardt, H. Hengel, M. Hasan, A. A. Scalzo, U. H. Koszinowski & S. Jonjic. 2002. MCMV glycoprotein gp40 confers virus resistance to CD8^{+} T lymphocytes and NK cells in vivo. Nat. Immunol. **3:**529-535.

Krmpotic, A., M. Messerle, I. Crnkovic-Mertens, B. Polic, S. Jonjic & U. H. Koszinowski. 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.

Kurz, S., H. P. Steffens, A. Mayer, J. R. Harris & M. J. Reddehase. 1997. Latency versus persistence or intermittent recurrences: evidence for a latent state of murine cytomegalovirus in the lungs. J. Virol. **71:**2980-2987.

Lanier, L. L. & J. H. Phillips. 1992. Natural killer cells. Curr. Opin. Immunol. **4:**38-42.

Lathbury, L. J., J. E. Allan, G. R. Shellam & A. A. Scalzo. 1996. Effect of host genotype in determining the relative roles of natural killer cells and T cells in mediating protection against murine cytomegalovirus infection. J. Gen. Virol. **77:**2605-2613.

Leitch, A. R., T. Schwarzacher, D. Jackson & I. J. Leitch. 1994: In situ-Hybridisierung. Spectrum Akademischer Verlag, Focus-Reihe, Heidelberg, Berlin, Oxford.

Lilley, B. N. & H. L. Ploegh. 2005. Viral modulation of antigen presentation: manipulation of cellular targets in the ER and beyond. Immunol. Rev. **207:**126-144.

Lodoen, M., K. Ogasawara, J. A. Hamerman, H. Arase, J. P. Houchins, E. S. Mocarski & L. L. Lanier. 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:**1245-1253.

LoPiccolo, D. M., M. C. Gold, D. G. Kavanagh, M. Wagner, U. H. Koszinowski & A. B. Hill. 2003. Effektive inhibition of K^b- and D^b-restricted antigen presentation in primary macrophages by murine cytomegalovirus. J. Virol. **77:**301-308.

Lucin P., I. Pavic, B. Polic, S. Jonjic & U. H. Koszinowski. 1992. Gamma interferon-dependent clearance of cytomegalovirus infection in salivary glands. J. Virol. **66:**1977-1984.

Lu, X., A. K. Pinto, A. M. Kelly, K. S. Cho & A. B. Hill. 2006. Murine cytomegalovirus interference with antigen presentation contributes to the inability of CD8 T cells to control virus in the salivary gland. J. Virol. **80:**4200-4202.

Marrack, P. & J. Kappler. 1987. The T cell receptor. Science **283:**1073-1079.

Messerle, M. & I. Crnkovic. 1997. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **94:**14759-14763.

Meyers, J. D., P. Ljungman & L. D. Fischer. 1990. Cytomegalovirus excretion as a predictor of cytomegalovirus disease after marrow transplantation: importance of cytomegalovirus viremia. J. Infect. Dis. **162:**373-380.

Miyahira, Y., K. Murata, J. R. Rodriguez, M. Esteban, M. M. Rodrigues & F. Zavala. 1995. Quantification of antigen specific $CD8^+$ T cells using an ELISPOT assay. J. Immunol. Methods **181:**45-54.

Mocarski, E. S. 2002. Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative

strategies beyond evasion. Trends Microbiol. **10:**332-339.

Mocarski, E. S. & G. W. Kemble. 1996. Recombinant cytomegaloviruses for study of replication and pathogenesis. Intervirology **39:**320-330.

Munks, M. W., K. S. Cho, A. K. Pinto, S. Sierro, P. Klenermann & A. B. Hill. 2006a. Four distinct patterns of memory CD8 T cell response to murine cytomegalovirus infection. J. Immunol. **177:**450-458.

Munks, M. W., M. C. Gold, A. L. Zajac, C. M. Doom, D. H. Morello, D. H. Spector & A. B. Hill. 2006b. Genome-wide analysis reveals a highly diverse CD8 T cell response to murine cytomegalovirus. J. Immunol. **176:**3760-3766.

Munks, M. W., A. K. Pinto, C. M. Doom & A. B. Hill. 2007. Viral interference with antigen presentation does not alter acute or chronic CD8 T cell immunodominance in murine cytomegalovirus infection. J. Immunol. **178:**7235-7241.

Nakatsu, F. & H. Ohno. 2003. Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network. Cell Struct. Funct. **28:**419-429.

Pass, R. F. 2001. Cytomegalovirus, p. 2675-2705. *In* D. M. Knipe & P. M. Howley (eds.) Virology. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins.

Pinto, A. K. & A. B. Hill. 2005. Viral interference with antigen presentation to CD8+ T cells: lessons from cytomegalovirus. Viral Immunol. **18:**434-444.

Ploegh, H. 1998. Viral strategies of immune evasion. Science **280:**248-253.

Podlech, J., R. Holtappels, N. Wirtz, H. P. Steffens & M. J. Reddehase. 1998. Reconstitution of CD8 T cells is essential for the prevention of multiple-organ cytomegalovirus histopathology after bone marrow transplantation. J. Gen. Virol. **79:**2099-2104.

Pulakhandam, V. & H. P. Dincsoy. 1990. Cytomegaloviral adrenalitis and adrenal insufficiency in AIDS. Am. J. Clin. Pathol. **93:**651-656.

Quinnan, G. V., J. E. Manischewitz & F. A. Ennis. 1978. Cytolytic T lymphocyte response to murine cytomegalovirus infection. Nature **273:**541-543.

Quinnan, G. V., J. E. Manischewitz & F. A. Ennis. 1980. Role of cytotoxic T lymphocytes in murine cytomegalovirus infection. J. Gen. Virol. **47:**503-508.

Rammensee, H. G., J. Bachmann & S. Stevanovic. 1997. MHC ligands and peptide Motifs. Molecular Biology Intelligence Unit, Landes Bioscience, Austin, Tex.

Rammensee, H. G., K. Falk & O. Rötzschke. 1993. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. Annu. Rev. Immunol. **11:**213-244.

Rawlinson, W. D., H. E. Farrell & B. G. Barrell. 1996. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. J. Virol. **70:**8833-8849.

Reddehase, M. J. 2002. Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. Nat. Rev. Immunol. **2:**831-844.

Reddehase, M. J., M. Balthesen, M. Rapp, S. Jonjic, I. Pavic & U. H. Koszinowski.

1994. The conditions of primary infection define the load of latent viral genome in organs and the risk of recurrent cytomegalovirus disease. J. Exp. Med. **179:**185-193.

Reddehase, M. J., S. Jonjic, F. Weiland, W. Mutter & U. H. Koszinowski. 1988. Adoptive immunotherapy of murine cytomegalovirus adrenalitis in the immunocompromised host: CD4-helper-independent antiviral function of CD8-positive memory T lymphocytes derived from latently infected donors. J. Virol. **62:**1061-1065.

Reddehase, M. J., W. Mutter, K. Münch, H. J. Bühring & U. H. Koszinowski. 1987. CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. J. Virol. **61:**3102-3108.

Reddehase, M. J., J. Podlech & N. K. Grzimek. 2002. Mouse models of cytomegalovirus latency: overview. J. Clin. Virol. **2:**S23-S36.

Reddehase, M. J., J. B. Rothbard & U. H. Koszinowski. 1989. A pentapeptide as minimal antigenic determinant for MHC class I-restricted T lymphocytes. Nature **337:**651-653.

Reddehase, M. J., C. O. Simon, J. Podlech & R. Holtappels. 2004. Stalemating a clever opportunist: lessons from murine cytomegalovirus. Hum. Immunol. **65:**446-455.

Reddehase, M. J., H. P. Steffens & R. Holtappels. 1997. Das murine Cytomegalovirus als Modell. Hygiene und Mikrobiologie **4/97:**20-23.

Reddehase, M. J., F. Weiland, K. Münch, S. Jonjic, A. Lüske & U. H. Koszinowski. 1985. Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterisation of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. J. Virol. **55:**264-273.

Reinke, P., S. Prosch, F. Kern & H. D. Volk. 1999. Mechanisms of human cytomegalovirus (HCMV) (re)activation and its impact on organ transplant patients. Transpl. Infect. Dis. **1:**157-164.

Reits, E., J. Neijssen, C. Herberts, W. Benckhuijsen, L. Janssen, J. W. Drijfhout & J. Neefjes. 2004. A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. Immunity **20:**495-506.

Reusch, U., O. Bernhard, U. H. Koszinowski & P. Schu. 2002. AP-1A and AP-3A lysosomal sorting functions. Traffic **3:**752-761.

Reusch, U., W. Muranyi, P. Lucin, H. G. Burgert, H. Hengel & U. H. Koszinowski. 1999. A cytomegalovirus glycoprotein re-routes MHC class I complexes to lysosomes for degradation. EMBO J. **18:**1081-1091.

Reusser, P., S. R. Riddell, J. D. Meyers & P. D. Greenberg. 1991. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. Blood **78:**1373-1380.

Riddell, S. R., P. Reusser & P. D. Greenberg. 1991. Cytotoxic T cells specific for cytomegalovirus: a potential therapy for immunocompromised patients. Rev. Infect.

Dis. **11:**S966-S973.

Riddell, S. R., K. S. Watanabe, J. M. Goodrich, C. R. Li, M. E. Agha & P. D. Greenberg. 1992. Restauration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. Science **257:**238-241.

Rock, K. L. & A. L. Goldberg. 1999. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. Annu. Rev. Immunol. **17:**739-779.

Roizman, B. & J. Baines. 1991. The diversity and unity of Herpesviridae. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. **14:**63-79.

Rubocki, R. J., T. H. Hansen & D. R. Lee. 1986. Molecular studies of murine mutant BALB/c-H-2^{dm2} define a deletion of several class I genes including the entire H-$2L^{d}$ gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83:**9606-9610.

Sakaguchi, S. 2000. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. Cell **101:**455-458.

Schroder, K., P. J. Herzog, T. Ravasi & D. A. Hume. 2004. Interferon-γ: an overview of signals, mechanisms and functions. J. Leukoc. Biol. **75:**163-189.

Shenk, T. 2006. Human cytomegalovirus genomics, p. 49-61. *In* M. J. Reddehase (ed.), Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.

Simon, C. O., R. Holtappels, H. M. Tervo, V. Böhm, T. Däubner, S. A. Oehrlein-Karpi, B. Kühnapfel, A. Renzaho, D. Strand, J. Podlech, M. J. Reddehase & N. K. A. Grzimek. 2006a. CD8 T cells control cytomegalovirus latency by epitope-specific sensing of transcriptional reactivation. J. Virol. **80:**10436-10456.

Simon, C. O., C. Seckert, N. K. A. Grzimek & M. J. Reddehase. 2006b. Murine model of cytomegalovirus latency and reactivation: the silencing/desilencing and immune sensing hypothesis, p. 483-500. *In* M. J. Reddehase (ed.), Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.

Smith, R. D. & R. W. Wehner. 1980. Acute cytomegalovirus glomerulonephritis: an experimental model. Lab. Invest. **43:**278-286.

Steffens, H. P., S. Kurz, R. Holtappels & M. J. Reddehase. 1998. Preemptive CD8 T-cell immunotherapy of acute cytomegalovirus infection prevents lethal disease, limits the burden of latent viral genomes, and reduces the risk of virus recurrence. J. Virol. **72:**1797-1804.

Streblow, D. N., S. M. Varnum, R. D. Smith & J. A. Nelson. 2006. A proteomics analysis of human cytomegalovirus paricles, p. 91-110. *In* M. J. Reddehase (ed.), Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.

Strehl, B., U. Seifert, E. Krüger, S. Heink, U. Kuckelkorn & P. M. Kloetzel. 2005. Interferon-γ, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. Immunol. Rev. **207:**19-30.

Taguchi, T., J. R. Mc Ghee, R. L. Coffman, K. W. Beagley, J. H. Eldridge, K. Takatsu & H. Kiyono. 1990. Detection of individual mouse splenic T cells producing IFNγ and IL-5 using. J. Immunol. Methods **128:**65-73.

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

Trincado, D. E. & W. D. Rawlinson. 2001. Congenital and perinatal infections with cytomegalovirus. J. Paediatr. Child Health **37:**187-192.

Tortorella, D., B. E. Gewurz, M. H. Furman, D. J. Schust & H. L. Ploegh. 2000. Viral subversion of the immune system. Annu. Rev. Immunol. **18:**861-926.

Vivier, E., E. Tomasallo & P. Paul. 2002. Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition? Curr. Opin. Immunol. **14:**306-311.

Wagner, M., A. Gutermann, J. Podlech, M. J. Reddehase & U. H. Koszinowski. 2002. MHC class I allele-specific cooperative and competitive interactions between immune evasion proteins of cytomegalovirus. J. Exp. Med. **196:**805-816.

Wagner, M., S. Jonjic, U. H. Koszinowski & M. Messerle. 1999. Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. J. Virol. **73:**7056-7060.

Walter, E. A, P. D. Greenberg, M. J. Gilbert, R. J. Finch, K. S. Watanabe, E. D. Thomas & S. R. Riddell. 1995. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. N. Engl. J. Med. **333:**1038-1044.

Welsh, R. M. 1986. Regulation of virus infections by natural killer cells. A review. Nat. Immun. Cell Growth Regul. **5:**169-199.

Whiley, J. & Sons, Inc. In situ hybridisation and immunohistochemistry; Current protocols in molecular biology; Volume 2, Chapter14.

Wong, P. & E. G. Pamer. 2003. CD8 T cell responses to infectious pathogens. Annu. Rev. Immunol. **21:**29-70.

Yewdell, J. W. & J. R. Bennink. 1999. Mechanisms of viral interference with MHC class I antigen processing and presentation. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **15:**579-606.

Yewdell, J. W. & M. Del Val. 2004. Immunodominance in TCD8+ responses to viruses: cell biology, cellular immunology, and mathematical models. Immunity **21:**149-153.

Yewdell, J. W. & S. M. Haeryfar. 2005. Understanding presentation of viral antigens to $CD8^+$ T cells in vivo: the key to rational vaccine design. Annu. Rev. Immunol. **23:**651-682.

Yewdell, J. W. & A. B. Hill. 2002. Viral interference with antigen presentation. Nat. Immunol. **3:**1019-1025.

Yewdell, J. W., E. Reits & J. Neefjes. 2003. Making sense of mass destruction:

quantitating MHC class I antigen presentation. Nat. Rev. Immunol. **3:**952-961.

Ziegler, H., W. Muranyi, H. G. Burgert, E. Kremmer & U. H. Koszinowski. 2000. The luminal part of the murine cytomegalovirus glycoprotein gp40 catalyzes MHC class I molecules. EMBO J. **19:**870-881.

Ziegler, H., R. Thäle, P. Lucin, W. Muranyi, T. Flohr, H. Hengel, H. Farrell, W. Rawlinson & U. H. Koszinowski. 1997. A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/cis-Golgi compartments. Immunity **6:**57-66.

Zimmermann, A. & H. Hengel. 2006. Cytomegalovirus interference with interferons, p. 321-339. *In* M. J. Reddehase (ed.), Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.

6 Veröffentlichungen

Gillert-Marien, D., R. Holtappels, D. Thomas, J. Podlech, P. Deegen, S. Herter, S. A. Oehrlein-Karpi, D. Strand, M. Wagner & M. J. Reddehase. 2006. Cytomegalovirus encodes a positive regulator of antigen presentation. J. Virol. **80:**7613-7624.