

# **Untersuchung von humoralen und zellulären Immunabwehrmechanismen gegen das murine Cytomegalovirus**

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg  
zur  
Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.

vorgelegt von  
**Monika Dietz**  
aus Bamberg

Als Dissertation genehmigt von der Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Friedrich-Alexander-Universität  
Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung:	25.07.2012
Vorsitzender der Promotionskommission:	Prof. Dr. Rainer Fink
Erstberichterstatter/in:	Prof. Dr. Thomas Winkler
Zweitberichterstatter/in:	Prof. Dr. Thomas Stamminger

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung und Summary .....</b>	<b>3</b>
1.1	Zusammenfassung .....	3
1.2	Summary .....	4
<b>2</b>	<b>Einleitung und Fragestellungen .....</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse der 1. Aufgabenstellung .....</b>	<b>14</b>
3.1	Generierung der rekombinanten Viren .....	14
3.1.1	Konstruktion der BACs (galk Rekombination) .....	14
3.1.2	Konstruktion der Rekombinationsfragmente.....	16
3.1.3	Bestätigung und Rekonstitution der rekombinanten Viren .....	18
3.2	<i>In vitro</i> Charakterisierung der rekombinanten Viren.....	19
3.3	<i>In vivo</i> Charakterisierung der Rekombinanten Viren.....	23
3.4	Schutzversuche .....	26
<b>4</b>	<b>Ergebnisse der 2. Aufgabenstellung .....</b>	<b>32</b>
4.1	Vergleich des MCMV-Infektionsverlaufes in Mäusen mit und ohne CD8 <sup>+</sup> T-Zellen ..	32
4.2	Vergleich der MCMV-Infektion in CD8 <sup>-/-</sup> und CD8 <sup>-/-</sup> JHT <sup>-/-</sup> Mäusen: .....	37
4.3	Protektionspotential von CD4 <sup>+</sup> Zellen.....	39
4.4	Depletion verschiedener Zelltypen vor Infektion mit MCMV.....	41
4.5	Zytotoxisches Potential von TCRαβ <sup>+</sup> und TCRγδ <sup>+</sup> T-Zellen <i>in vitro</i> .....	48
4.6	Adoptiver Transfer von TCRαβ <sup>+</sup> und TCRγδ <sup>+</sup> T-Zellen nach Infektion mit MCMV .....	50
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>53</b>
5.1	Viruskontrolle durch ADCC.....	53
5.2	MCMV Immunkontrolle in CD8 <sup>-/-</sup> Mäusen .....	57
5.3	DN T-Zellen.....	58
5.4	TCRγδ <sup>+</sup> T-Zellen .....	59
<b>6</b>	<b>Material.....</b>	<b>66</b>
6.1	Plastik und Verbrauchsmaterialien .....	66
6.2	Chemikalien und Reagenzien .....	66
6.3	Medien, Puffer und Lösungen.....	66
6.4	Biologische Materialien.....	69
6.4.1	Bakterien und Virusstämme .....	69
6.4.2	Nukleinsäuren und Enzyme .....	69
6.4.3	Zelllinien.....	71

6.4.4	<i>In vitro</i> verwendete Antikörper und Konjugate .....	72
6.4.5	Proteine und <i>in vivo</i> applizierte Reagenzien .....	73
6.4.6	Versuchstiere .....	73
6.5	Geräte.....	74
<b>7</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>75</b>
7.1	Generierung der rekombinanten hgB-Viren .....	75
7.1.1	Klonierungen.....	75
7.1.2	Sequenzierung .....	77
7.1.3	Transformation von Plasmiden und BACs .....	77
7.1.4	Transfektion der BACs und Rekonstitution der Viren .....	77
7.1.5	<i>In vitro</i> Amplifikation und Reinigung von Virionen .....	77
7.2	Weitere Molekularbiologische und zellbiologische Methoden.....	78
7.2.1	Quantitative Proteinbestimmung.....	78
7.2.2	Zellkulturverfahren .....	78
7.3	Immunologische Methoden.....	81
7.3.1	Immunfluoreszenzfärbung .....	81
7.3.2	Enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest (ELISA).....	81
7.3.3	SDS-PAGE und Western Blot Analyse (WB) .....	82
7.3.4	Durchflusszytometrie .....	83
7.4	Tierexperimentelle Techniken .....	84
7.4.1	Infektionen und Überleben .....	84
7.4.2	Blutentnahme und Serumgewinnung .....	84
7.4.3	Analyse der <i>in vivo</i> Biolumineszenz.....	85
7.4.4	Bestimmung der Viruslast in den Organen.....	85
7.4.5	<i>In vivo</i> Depletionen.....	86
7.4.6	Isolation und Aufreinigung muriner Zellen.....	86
7.4.7	Adoptiver Zell- und Serumtransfer.....	88
7.5	Statistische Auswertung.....	88
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>89</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>105</b>

# 1 Zusammenfassung und Summary

## 1.1 Zusammenfassung

Das Cytomegalovirus (CMV) ist ein klinisch relevantes Pathogen, da es in immundefizienten Patienten schwere Komplikationen auslöst. Für die Entwicklung neuer Therapieansätze ist das Verständnis der Immunkontrolle in gesunden infizierten Personen wichtig. Um dies zu untersuchen wird das Modellsystem des murinen Cytomegalovirus (MCMV) genutzt. In immundefizienten RAG<sup>-/-</sup> Mäusen wird die MCMV-Infektion nach Verabreichung von Antikörpern kontrolliert. Antikörper vermitteln Schutz über verschiedene Effektormechanismen. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Hypothese überprüft, dass im Falle der MCMV-Infektion *Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity* (ADCC) *in vivo* ein wichtiges Protektionsprinzip darstellt. Um die Rolle von Immunglobulin-Fc vermittelten Effektorfunktionen zu untersuchen, wurde ein rekombinantes MCMV generiert, welches ein heterologes antigenes Protein nur auf der Oberfläche infizierter Zellen, nicht aber als Teil des Viruspartikels exprimiert. Hierfür wurde das Glykoprotein B des humanen CMV (hgB) partiell und komplett in das Genom von MCMV157luc inseriert. Die resultierenden Viren replizierten *in vitro* und in RAG<sup>-/-</sup> Mäusen vergleichbar zu MCMV157luc. hgB wurde *in vitro* auf der Oberfläche von infizierten Zellen detektiert und induzierte *in vivo* eine Antikörperantwort. Beide Viren wurden von neutralisierenden Antikörpern gegen hgB *in vitro* nicht neutralisiert. In Schutzversuchen wurden hohe Dosen muriner und humaner hgB-spezifischer Antikörper verabreicht. Es konnte keine Protektion nachgewiesen werden. Der fehlende Schutz wurde sowohl bei prophylaktischer, als auch bei therapeutischer Antikörpergabe beobachtet. Die möglichen Ursachen dafür werden im Diskussteil dieser Arbeit erörtert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde durch sukzessive Entfernung einzelner Zelltypen deren Bedeutung für den Verlauf der MCMV-Infektion bestimmt. In CD8<sup>-/-</sup> Mäusen verlief die Infektion entsprechend immunkompetenten C57BL/6 Mäusen bis zur Ausbildung von Latenz. CD8<sup>-/-</sup>JHT<sup>-/-</sup> Mäuse, ohne CD8<sup>+</sup> T-Zellen und B-Zellen, kontrollierten die MCMV-Infektion selbst nach Depletion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Dies demonstrierte die Austauschbarkeit der konventionellen B- und T-Zellen. Erst die Depletion aller CD3<sup>+</sup> Zellen in CD8<sup>-/-</sup>JHT<sup>-/-</sup> Mäusen führte zum Verlust der Immunkontrolle. Folglich waren CD3<sup>+</sup> doppelt negative (DN) T-Zellen am Schutz beteiligt. Zytotoxizität konnte *in vitro* nur für CD3<sup>+</sup>DN T-Zell Rezeptor (TCR)  $\gamma\delta^+$  Zellen bestätigt werden. Adoptiver Transfer von präadaptierten TCR $\gamma\delta^+$  Effektorzellen in produktiv infizierte, immundefiziente RAG<sup>-/-</sup> Mäuse reduzierte den Virustiter signifikant und verlängerte das Überleben der Versuchstiere. Der Transfer der gleichen Anzahl TCR $\alpha\beta^+$  Zellen bewirkte dagegen kein längeres Überleben. Ebenso zeigte der Transfer naiver DN Zellen keinen protektiven Effekt. Diese Ergebnisse fügen eine weitere Ebene zur komplexen Immunkontrolle von CMV hinzu, welche für die klinische Anwendung interessant sein könnte.

## 1.2 Summary

Cytomegalovirus (CMV) is a clinically relevant pathogen because it causes severe complications in immunodeficient patients. Understanding immune control in healthy infected individuals is important for the development of new therapeutic strategies. For research the murine model of MCMV is used. Immunodeficient RAG<sup>-/-</sup> mice are able to control murine cytomegalovirus (MCMV) infection after application of antibodies. Those antibodies can mediate different protective effector mechanisms. In the first part of this thesis we challenged the hypothesis that antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) provides *in vivo* an important principle of protection after MCMV infection. To establish the role of immunoglobulin-Fc mediated effector functions we constructed a recombinant MCMV expressing a heterologous antigenic protein only on the surface of infected cells but not as part of the infectious virion. Therefore partial or complete glycoprotein B of human CMV (hgB) was inserted in the genome of MCMV157luc. The resulting viruses replicated comparably to MCMV157luc *in vitro* and in RAG<sup>-/-</sup> animals. *In vitro* the hgB protein was detected on the surface of infected cells and *in vivo* it was able to induce an antibody response. Neutralizing hgB specific antibodies were incapable of neutralizing any one of the hgB expressing viruses *in vitro*. High doses of murine and human hgb-specific antibodies were tested *in vivo* for their antiviral capacity, but no protection could be detected. Lacking protection was observed after prophylactic as well as after therapeutic application of antibodies. Possible explanations are considered in the discussion chapter of this thesis.

In the second part of this work the influence of certain effector cell types on the course of MCMV infection was determined by their gradual ablation. CD8<sup>-/-</sup> mice controlled virus infection to the same extent as fully immunocompetent C57BL/6 mice and established latency. CD8<sup>-/-</sup>JHT<sup>-/-</sup> mice, which lack both CD8<sup>+</sup> cells and B cells, also controlled infection even after *in vivo* depletion of CD4<sup>+</sup> T cells thus demonstrating the dispensability of conventional B and T cells. Depletion of all CD3<sup>+</sup> cells in CD8<sup>-/-</sup>JHT<sup>-/-</sup> mice finally lead to a loss of protection. Therefore CD3<sup>+</sup> double negative (DN) T cells were able to mediate protection against MCMV infection. Only CD3<sup>+</sup> DN T cell receptor (TCR)  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> cells were able to lyse infected cells *in vitro*. Adoptive transfer of TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> effector cells into immunodeficient CMV infected RAG<sup>-/-</sup> mice lead to significantly reduced viral titers and prolonged survival of the recipients. Transfer of the same number of TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> T cells could not elongate survival. Likewise transfer of naïve cells showed no protective effect. These results add another layer to the complex immune control of CMV which might be of clinical relevance.

## 2 Einleitung und Fragestellungen

### Herpesviren

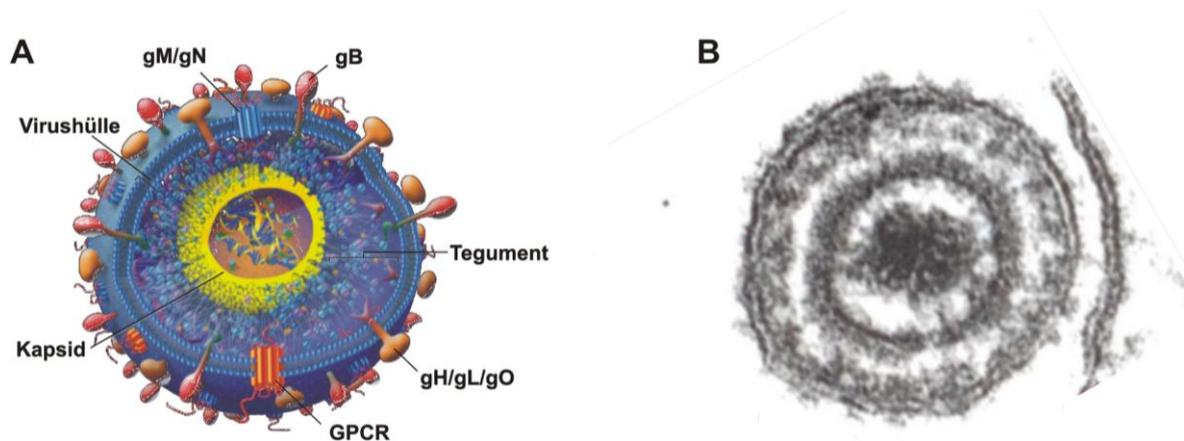
Herpesviren zählen im Hinblick auf ihr Genom und ihre Morphologie zu den größten und genetisch komplexesten, humanpathogenen Viren (Davison et al., 2003). Sie sind doppelsträngige DNA-Viren und von einer Hülle umgeben. Da sie ubiquitär vorkommen (Sweet, 1999) und eine Vielzahl von Wirbeltieren infizieren können, kommt ihnen besondere Bedeutung zu. Eine weitere charakteristische Eigenschaft der Herpesviren ist ihre Fähigkeit zur lebenslangen Persistenz. Die Virusfamilie umfasst ca. 170 Virusspezies und ist in die Unterfamilien der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Herpesvirinae untergliedert. Zur ersten Gruppe gehören unter anderem das Pseudorabies Virus (PRV) und die humanpathogenen Herpes simplex (HSV) und Varizella Zoster Viren (VZV). Der wichtigste Vertreter der  $\beta$ -Herpesviren ist das humanpathogene Cytomegalovirus (CMV), weil es in Menschen aller Altersgruppen das am weitesten verbreitete Pathogen darstellt (Plotkin, 2004). Typisch für diese Gruppe ist eine strenge Wirtsspezifität. Als bekannter, humanpathogener Vertreter der  $\gamma$ -Herpesviren ist das Epstein-Barr-Virus zu nennen.

### Aufbau des humanen Cytomegalovirus und das Mausmodell

Die CMV-DNA umfasst ca. 230 000 Basenpaare (bp) und kodiert für mehr als 160 offene Leserahmen (ORF) (Chee and Barrell, 1990). Wie in Abb. 1 gezeigt, liegt sie in einem ikosaederförmigen, aus verschiedenen Kapsomeren aufgebauten, Kapsid. Darüber befindet sich eine aus globulären, oft phosphorylierten Proteinen bestehende Matrix, welche als Tegument bezeichnet wird (Gibson, 2008). Dieses ist von einer Lipid-Doppelschicht umhüllt, welche aus der Membran der Wirtszelle hervorgeht und unter anderem die viralen Glykoproteine B (gB), H (gH), L (gL), M (gM), N (gN) und O (gO) sowie den G-Proteingekoppelten Rezeptor (GPCR) enthält (Mettenleiter, 2002). Die Viruspartikel sind pleomorph mit einem Durchmesser von 150 - 200 nm (Roizmann et al., 1992).

Da die HCMV-Infektion auf Grund der strengen Wirtsspezifität des Virus nicht im Tiermodell untersucht werden kann, wurde zur Erforschung des humanpathogenen Virus ein Mausmodell mit MCMV etabliert (Kattenhorn et al., 2004; Rawlinson et al., 1996). Beide Viren verfügen über sehr ähnliche genetische, biologische und pathologische Eigenschaften (Staczek, 1990). Die Abfolge der Genexpression ist zeitlich reguliert und untergliedert die Gene in drei Klassen: sehr früh (IE), früh (E) und spät im Replikationszyklus exprimierte Gene. HCMV und MCMV besitzen nicht nur eine DNA-Sequenzidentität von 45 % und eine außerdem sehr ähnliche Verteilung der Basen Guanin und Cystidin im restlichen Genom, sondern einen vollständig colinear verlaufenden Bereich der zentralen 180 bp, welcher 79 ORFs umfasst. Des Weiteren sind auch außerhalb dieses Bereiches viele wesentliche Proteine an ähnlicher Stelle im Genom kodiert, wie zum Beispiel die Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) I Homologen m144 und UL18, der GPCR, sowie

alle viral kodierte Enzyme. *In vivo* charakterisiert beide Viren ein Tropismus für hämatopoetische Zellen, vor allem Makrophagen, Epithelzellen und Speicheldrüsen. Die Folgen der MCMV- bzw. HCMV-Infektion in Bezug auf Pathogenese während der akuten Infektion, persistenter Infektion und Reaktivierung aus der Latenz bei Immunsuppression sind in den jeweiligen Wirten vergleichbar (Sweet, 1999), wobei die transplazentale Übertragung für MCMV nicht belegt ist. Auch die in den respektiven Wirten induzierte Immunantwort verläuft entsprechend.



**Abb. 1: Struktur eines Virions des humanen Cytomegalovirus (HCMV)**

(A) Schematische Darstellung der HCMV Morphologie: HCMV besteht aus einem ikosaedrischen Kapsid, welches das lineare, doppelsträngige DNA-Genom enthält. Dieses ist von der Proteinmatrix des Teguments und einer Virushülle mit den eingelagerten Glykoproteinen B, H, L, M, N und O umgeben. GPCR G-Protein-bindender Rezeptor; Abbildung modifiziert aus Reddehase (2006).

(B) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Virions (Flint et al., 2004).

### Das Proteom von CMV

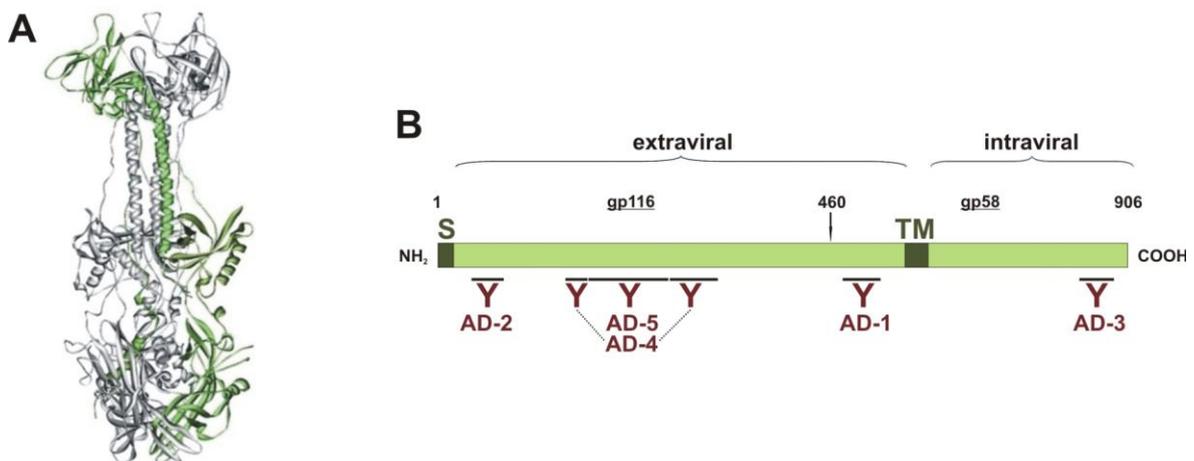
Insgesamt sind im CMV Viruspartikel mindestens 70 verschiedene viral kodierte und ebenso viele zelluläre, strukturelle Proteine enthalten (Varnum et al., 2004). Bis heute wurden acht in die Hüllmembran von HCMV integrierte Proteine experimentell nachgewiesen (Britt and Boppana, 2004).

Zwischen allen Mitgliedern der Familie Herpesviridae konserviert sind gB, gH, gL, gM, und gN (Mettenleiter, 2002).

gH komplexiert dabei immer über eine Disulfidbrücke mit gL, welches für den Transport von gH durch die Zelle, dessen posttranslationale Modifikation und Inkorporation in die Virushülle essentiell ist (Kaye et al., 1992). Da gL keine Transmembrandomäne besitzt wird es über gH in der Membran verankert. Die beiden Proteine sind an Fusionsprozessen zwischen Virus und Zelle sowie zwischen infizierten Zellen und durch unterschiedliche Komplexbildung mit weiteren Partnern an der Determinierung des Zelltropismus beteiligt (Kinzler and Compton, 2005; Wang and Shenk, 2005).

Mit einer Abundanz von 10 % des Gesamtproteingehalts ist das Membranprotein gM das am meisten in die Virushülle eingelagerte Glykoprotein (Varnum et al., 2004). Es enthält sieben vorausgesagte Transmembranregionen und gehört zum Typ III der Membranproteine. Über eine Disulfidbrücke mit gN verbunden, sichert es dessen Transport durch die Zelle (Kari and Gehrz, 1988, 1993; Mach et al., 2000). gM und gN, sowie deren Komplexbildung, sind unter den Herpesviren konserviert (Gretch et al., 1988; Jons et al., 1998; Koyano et al., 2003; Lake and Hutt-Fletcher, 2000; Wu et al., 1998). Allerdings ist gM für die Virusreplikation bei  $\alpha$ -Herpesviren entbehrlich, ebenso wie gN für viele andere Herpesviren. Der gM/gN Komplex spielt eine wesentliche Rolle innerhalb der Virusmorphogenese von HCMV (Krzyzaniak et al., 2007; Mach et al., 2007).

Bei HCMV und manch anderen Herpesviren außer MCMV, findet sich zusätzlich das Glykoprotein O (gO), welches im Komplex mit gH/gL vorliegt (Paterson et al., 2002). Für dieses hochglykosylierte Membranprotein existiert mit m74 ein strukturelles Homolog in MCMV, nicht jedoch in anderen Herpesviren (Scrivano et al., 2010). gO ist nicht essentiell im HCMV Replikationszyklus. Allerdings scheint es bei der Umhüllung und Freisetzung von Viren eine wichtige Rolle zu spielen, da Viren ohne gO im Wachstum eingeschränkt waren (Hobom et al., 2000; Jiang et al., 2008).



**Abb. 2: gB Struktur**

(A) Von Heinrich Sticht (Universität Erlangen) vorhergesagte 3D-Struktur des hgB-Trimers. Die 3D-Struktur des hgB-Trimers wurde mittels komparativem Alignment mit gB von Herpes simplex Viren (HSV) im Programm MODELLER modelliert (Eswar et al., 2006). Ein einzelnes gB-Monomer ist grün hinterlegt.

(B) Lineare Darstellung des hgB-Proteins mit den Untereinheiten gp116 und gp58, der Furinschnittstelle bei AS 460, sowie den antigenen Domänen AD-1 - 5. AD-4 ist eine diskontinuierliche Domäne, welche AD-5 umgibt. S Signalsequenz; TM Transmembranregion. Modifiziert nach Mach (2006) und Pötzsch (2011).

Da das Glykoprotein B im weiteren Verlauf der Arbeit relevant sein wird, soll an dieser Stelle genauer auf die Charakteristik dieses Proteins eingegangen werden. gB ist am stärksten konserviert unter allen herpesviralen Glykoproteinen (Cranage et al., 1986). Zwischen hgB und MCMV gB (mgB) besteht eine Sequenzidentität von 45 % (Rapp et al., 1992). Für die Verbreitung von CMV ist gB essentiell, da es den ersten Kontakt des Virus

mit der Zelle vermittelt, indem es an Heparansulfatproteoglykane und Integrine adsorbiert (Boyle and Compton, 1998; Feire et al., 2004). Außerdem ist es an der Einleitung der Fusion zwischen Virus und Zellmembran über fusogene Glycinreste beteiligt (Reschke et al., 1995). Ähnliche Funktionen übernimmt es auch in anderen Herpesviren (Heldwein and Krummenacher, 2008). HgB ist ein Membranprotein vom Typ I. Es entsteht beim Laborstamm AD169 aus einem 906 Aminosäuren (AS) langen Vorläuferpeptid (Abb. 2B), welches posttranslational glykosyliert und im Trans-Golgi Netzwerk (TGN) von der zellulären Furin-Protease bei AS 460 in die beiden Untereinheiten gp116 (116 kDa) und gp58 (58 kDa) gespalten wird (Britt and Auger, 1986; Spaete et al., 1990). gp116 umfasst dabei den N-Terminus welcher in infizierten Zellen luminal und später auf der Virusoberfläche zu finden ist. Gp58 bildet vor allem den intrazellulären bzw. -viralen C-Terminus und den Transmembranbereich. Über Disulfidbrücken sind die beiden Untereinheiten kovalent verbunden (Britt, 1984). Die AS 1 bis 29 von gp58 stellen eine Signalsequenz dar, welche den Transport ins Endoplasmatische Retikulum (ER) vermittelt, wo sie abgespalten wird (Perlman and Halvorson, 1983). Dort setzt sich das Protein zu Oligomeren zusammen (Britt and Vugler, 1992; Scheffczik et al., 2001). Des Weiteren befinden sich im C-Terminus von gB tyrosinbasierte Motive und Di-Leucine welche das Protein in den distalen sekretorischen Signalweg sortieren (Bonifacino and Traub, 2003; Jarvis et al., 2002). Das prozessierte gB wird auf die Membranoberfläche infizierter Zellen transportiert, wo es durch die hydrophobe Transmembrandomäne verankert ist (Reschke et al., 1995) und in Analogie zu HSV und EBV wie in Abb. 2A gezeigt, wahrscheinlich in Trimeren vorliegt (Backovic et al., 2009; Heldwein et al., 2006). Die eben genannten Motive sind für die anschließende Endozytose des Proteins von der Zelloberfläche verantwortlich (Tugizov et al., 1999). Über das Abschnüren von Vesikeln wird gB wieder von der Oberfläche endozytiert und dem TGN zugeführt (Radsak et al., 1996). Es befindet sich also bis zur Bildung der Virushülle im sogenannten *Assembly Compartment* ständig im Kreislauf von und zur Zelloberfläche. Da 100 % aller HCMV seropositiven Menschen Antikörper gegen dieses Protein bilden (Marshall et al., 1992), ist hgB *in vivo* sehr immunogen (Potzsch et al., 2011) *In vitro* sind diese Antikörper für 40 - 70 % der gesamten Neutralisationskapazität der getesteten Seren verantwortlich (Britt et al., 1990). Bisher wurden innerhalb des hgB-Proteins fünf antigene Domänen (AD-1 - 5) definiert (Britt and Mach, 1996; Potzsch et al., 2011), wobei AD-4 diskontinuierlich verläuft (Abb. 2B).

### **Pathogenese, Übertragung und Nachweis von CMV**

CMV kann vertikal von der Mutter auf das Kind pränatal, perinatal oder postnatal übertragen werden. Außerdem geschieht dies horizontal durch Kontakt mit Körperflüssigkeiten von produktiv infizierten Individuen oder durch Transplantation eines infizierten Organs. Die Primärinfektion mit HCMV verläuft in gesunden und immunkompetenten Organismen analog zu MCMV überwiegend inapparent und asymptomatisch, teilweise mit Mononukleose-ähnlichen Symptomen (Ho, 2008). In den meisten Organen wird die Infek-

tion schnell vom Immunsystem kontrolliert. Nur in den Speicheldrüsen kommt es zu einer verlängerten Phase der Virusreplikation und Virusausscheidung über den Speichel (Britt, 2008; Britt, 1996; Reddehase et al., 2002).

Schwere Komplikationen werden auf Grund des noch nicht voll entwickelten Immunsystems bei Neugeborenen oder bei immunkompromitierten Patienten nach immunsuppressiver Medikamentenbehandlung oder HIV-Infektion beobachtet. Sie beinhalten fatale klinische Symptome wie Leukopenie, interstitielle Pneumonie, Retinitis, Enzephalitis und gastrointestinale Beschwerden sowie ein erhöhtes Risiko der Transplantatabstossung und bei Säuglingen Hörschäden und Retardierung (Jones, 2003; Kapp et al., 2007; Morton and Nance, 2006; Reddehase et al., 1985).

Die Übertragung über Schleimhäute führt zunächst zu einer Infektion von Epithelzellen. Bei anderen Transmissionswegen werden zuerst die Endothelzellen des vaskulären Systems infiziert (Fish et al., 1998). In immunsupprimierten Wirten erfolgt die Dissemination in die Hauptzielorgane Lunge, Leber, Nieren, Speicheldrüsen und Pankreas (Bissinger et al., 2002) hauptsächlich über infizierte Zellen im Blutkreislauf und kaum über freie Viruspartikel (Hsu et al., 2009; Ibanez et al., 1991). Dabei werden eine Vielzahl weiterer Körperteile infiziert (Bissinger et al., 2002; Feire et al., 2004). Nach zwei bis vier Tagen hat der Infekt die Endziele wie beispielsweise die Leber erreicht und verbreitet sich von dort nicht weiter in andere Organe (Erlach et al., 2006; Sacher et al., 2008). Innerhalb der Organe bilden Endothel- und Epithelzellen den Hauptort der Virusreplikation (Revello and Gerna, 2010), obwohl CMV einen breiten Zelltropismus für Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Hepatozyten, myeloide Zellen sowie Stroma- und neuronale Zellen zeigt (Mendelson et al., 1996; Myerson et al., 1984; Sinzger and Jahn, 1996). Nach Abklingen der Primärinfektion persistiert das Virus lebenslang in verschiedenen Geweben des Wirtsorganismus. Putative Latenzorte sind die Zellen des hämatopoetischen Systems wie Makrophagen und Vorläufer von myeloiden und dendritischen Zellen (Hahn et al., 1998; Seckert et al., 2009; Taylor-Wiedeman et al., 1991). Die molekularen Vorgänge der Aufrechterhaltung und Reaktivierung aus der Latenz sind zu großen Teilen noch unbekannt (Reddehase et al., 2008; Sinclair and Sissons, 2006). Bei Stress oder Entzündung kommt es zu intermittierender Reaktivierung in den lytischen Replikationszyklus. Diese kann abhängig vom Immunstatus asymptomatisch oder Mononukleose-ähnlich verlaufen, ist aber in jedem Fall mit der Ausscheidung von infektiösem Virus vor allem im Speichel verbunden (Ho, 2008). Bedingt durch sozio-ökonomische Faktoren liegen die Seropositivitätsraten für HCMV in Industrienationen bei 40 – 60 %. In Entwicklungsländern erreichen sie bis zu 100 % (Ho, 2008).

Im Menschen wurde genau wie im Tiermodell die multiple Infektion mit mehreren CMV Stämmen beobachtet (Bale et al., 1996; Gorman et al., 2006; Novak et al., 2008), welche zum einen durch die synchrone Infektion mit verschiedenen Stämmen oder durch Reinfektion mit einem weiteren Stamm erfolgen kann.

Routinemäßig findet der Nachweis einer Infektion über Bestimmung spezifischer Antikörpertiter im Serum der Testorganismen oder über direkten Virusnachweis mittels quantita-

tiver Real-time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) statt. Darüber hinaus kann eine Virusanzüchtung auf Fibroblasten erfolgen, wobei nach mehreren Wochen typische Zellveränderungen zu beobachten sind. Diese beinhalten Riesenzellbildung mit zytoplasmatischen Einschlusskörperchen, sogenannte „Eulenaugenzellen“, und das Ablösung infizierter Zellen aus dem Zellverband, welches als „zytopathischer Effekt“ bezeichnet wird.

### **Immunantwort gegen CMV und Fragestellungen**

Die zelluläre Immunantwort gegen CMV ist in ihrer Vielschichtigkeit wahrscheinlich einzigartig. Aufgrund der langen Koevolution von Virus und Wirt (McGeoch et al., 1995) entwickelten sich im Laufe der Zeit auf beiden Seiten multiple Abwehr- und Immunevasionsstrategien. Als Folge davon sind nahezu alle Bereiche des angeborenen und adaptiven Immunsystems in teilweise redundante Abwehrmechanismen gegen CMV eingebunden (Polic et al., 1998).

Die erste zelluläre Defensive gegen die Infektion bilden die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) welche zur angeborenen Immunität gehören und daher nicht erst adaptieren müssen. Sie werden über die Ausschüttung von proinflammatorischem Typ I Interferon und Interleukin (IL) 12 infizierter Zellen aktiviert und wandern direkt zum Infektionsort (Biron et al., 1999). Durch die Produktion von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  locken sie andere Zelltypen an und aktivieren diese. Bereits 36 Stunden nach Infektion erreicht die IFN $\gamma$  Produktion ihr Maximum und nach zwei Tagen ist starke Proliferation von NK-Zellen in Leber und Milz messbar (Dokun et al., 2001). Ihre Hauptaufgabe ist allerdings die Lyse infizierter Zellen. Normalerweise präsentieren abnorme Zellen Bestandteile fremder Proteine über den MHC I. Um dies und damit die Erkennung durch das Immunsystem, speziell durch CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) zu verhindern, reduziert das Virus die Exposition von MHC I auf der Oberfläche infizierter Zellen (Kavanagh et al., 2001; Reddehase, 2002; Reusch et al., 1999). Diese Zellen mit verringertem MHC I-Gehalt werden von NK-Zellen nach dem „Missing-Self-Prinzip“ (Karre, 1991) als fremd erkannt und über die Sekretion von Granzym und Perforin eliminiert (Russell and Ley, 2002). Bei Mäusen wurde ein zusätzlicher Schutzmechanismus gegen CMV nachgewiesen. Das vom Virus in der frühen Phase der Infektion exprimierte Protein m157 bindet in C57BL/6 Mäusen an den aktivierenden Ly49H Rezeptor auf NK-Zellen (Arase et al., 2002; Smith et al., 2002). Daraufhin zerstören NK-Zellen die infizierten Zellen. In diesen Tieren stellt diese spezifische NK-Aktivierung die zweite und dominante Phase der NK-Abwehr dar.

Fünf bis sechs Tage nach Infektion erscheinen CTL am Infektionsort (Quinnan et al., 1980). Wie bereits erwähnt präsentieren infizierte Zellen über den MHC I-Peptide viraler Proteine. Diese werden von CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkannt und die befallenen Zellen lysiert. Antigene für die T-Zell Antwort sind zum einen in der frühen Infektionsphase exprimierte Proteine, aber auch Peptide der Tegumentproteine, und Glykoproteine wie gB und gH (Borysiewicz et al., 1983). CTL begrenzen vor allem die akute Phase der Infektion. In der Klinik wird der adoptive Transfer von CMV-spezifischen CTL als Therapieform eingesetzt (Cobbold et al.,

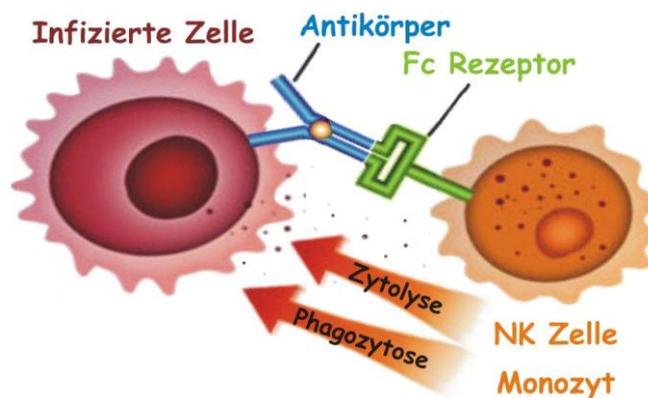
2005; Kapp et al., 2007; Riddell et al., 1992). Allerdings ist die Reaktion von CTL vor allem auf frühe Antigene in einer persistenten Infektion auch für die sogenannte „Memory Inflation“ verantwortlich (Karrer et al., 2003). Dieses Phänomen wurde von Snyder et al. (2011) definiert als die Erhaltung und Ansammlung von CD8<sup>+</sup> Effektor und Effektorgedächtniszellen, welche für bestimmte virale Antigene spezifisch sind. Schon bevor es bei der intermittierenden, lokalen Reaktivierung aus der Latenz zur Produktion von infektiösem Virus kommt, werden CTL durch die zwei *immediate early* (IE) Genprodukte von m139 und M38 bei der Maus, sowie IE1 und dem in der späten Phase exprimiertem Tegumentprotein pp65 im Menschen aktiviert (McLaughlin-Taylor et al., 1994; Moss and Khan, 2004). Dies führt dazu, dass in älteren Personen bis zu 50 % aller CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen gegen CMV und vor allem gegen diese beiden Proteine gerichtet sind (Sylwester et al., 2005; Vescovini et al., 2007). CTL sind also ferner für die Überwachung der Latenz notwendig und werden in Mensch und Maus zum Schutz vor Reaktivierung eingesetzt (Reddehase et al., 1987; Reusser et al., 1991; Walter et al., 1995).

Dabei spielen auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine wichtige Rolle. Sie greifen zeitgleich mit CTL in den Verlauf der Infektion ein und akkumulieren vor allem in Lunge und Milz (Arens et al., 2008). Nach Depletion von CTL können sie deren Schutzfunktion kompensieren (Jonjic et al., 1990). Außerdem sind sie an der Kontrolle der lytischen Infektion in verschiedenen Organen, vor allem Lunge und Speicheldrüsen, beteiligt. In Abwesenheit von CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist die Beseitigung der Infektion aus diesen Organen bei Mäusen beeinträchtigt (Jonjic et al., 1990; Krmpotic et al., 2003). Der Schutzeffekt geht mit der Produktion und lokalen Sekretion von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  einher (Hegel and Ahles, 1994; Lucin et al., 1992; Walton et al., 2011). *In vitro* verringern diese beiden Zytokine die Virusreplikation in der Phase der Nucleokapsidformation (Davignon et al., 1996; Lucin et al., 1994). Auch IL2, 10 und 17 werden von CD4<sup>+</sup> Zellen produziert (Arens et al., 2008). Dies zeigt, dass auch verschiedene Zytokine eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung der Infektion spielen.

B-Zellen sind bei der Produktion von Antikörpern gegen CMV auf die Hilfe von CD4<sup>+</sup> T-Zellen angewiesen (Jonjic et al., 1989). Nach dem ersten Kontakt mit spezifischen Antigenen werden in den Keimzentren zuerst IgM sezernierende Plasmazellen gebildet. Antikörper dieses Subtyps sind bereits acht bis zehn Tage nach Beginn der Infektion im Blut nachweisbar (Quinnan and Manischewitz, 1979). Aktivierte B-Zellen durchlaufen Affinitätsreifung und Klassenwechsel und entwickeln sich in langlebige IgG-sekretierende Plasmazellen, welche kontinuierlich hochaffine, CMV-spezifische Antikörper abgeben. Ab Tag 21 nach Infektion werden im steigenden Antikörpertiter im Blut auch neutralisierende Antikörper detektiert (Quinnan and Manischewitz, 1979). Außerdem werden schnell aktivierbare Gedächtnis B-Zellen produziert. Diese können bei Antigenkontakt innerhalb weniger Tage ohne weitere CD4<sup>+</sup>-Hilfe Antikörper produzieren und limitieren vor allem die Verbreitung von reaktiviertem Virus (Hebeis et al., 2004).

Antikörper können über unterschiedlichste Mechanismen schützen (Burton, 2002). Zum einen kann freies Virus von neutralisierenden Antikörpern gebunden und so die Ausbreitung der Infektion verhindert werden. Zum anderen können neutralisierende Antikörper

schützen indem sie die Adsorption des Virus an die Zielzelle verhindern (Ohizumi et al., 1992), die Fusion mit der Zielzellmembran (Gicklhorn et al., 2003) oder die Penetration des Virus in die Zellen (Navarro et al., 1993). Verschiedene Studien haben gezeigt, wie wichtig die Rolle der neutralisierenden Antikörper bei der Begrenzung der Infektion und der Erhaltung der Latenz ist. So konnte der passive Transfer von MCMV neutralisierenden, monoklonalen Antikörpern Mäuse vor einer CMV-Infektion schützen und die Ausbreitung von reaktivierten Viren verhindern (Farrell and Shellam, 1991; Jonjic et al., 1994; Shanley et al., 1981). Durch adoptiven Transfer von Serum oder antigenspezifischen Gedächtnis-B-Zellen wurde sowohl ein protektiver als auch therapeutischer Effekt in immundefizienten Mäusen nachgewiesen (Klenovsek et al., 2007). Zum Teil wurde diese Form der passiven Immunisierung auch im Menschen evaluiert (Kapp et al., 2007; Sokos et al., 2002). Die typische Diversität der Epitope potenter neutralisierender Antikörper zeigt ihr Schutzpotential und macht sie auf der Suche nach Therapiemöglichkeiten zum Ziel der Forschung.



**Abb. 3: Mechanismus der ADCC**

Spezifische Antikörper binden an infizierte Zellen. Effektorzellen werden über Bindung an deren Fc-Region aktiviert. Es kommt zu Phagozytose oder Lyse durch Perforin und Granzymausschüttung. Angepasst von Eureka Therapeutics, Inc.

Eine weitere, durch Antikörper vermittelte, Form des Schutzes ist die antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC). Diese ist für die weitere Arbeit von Bedeutung und in Abb. 3 dargestellt. Dabei binden Antikörper mit der variablen Region an Epitope viraler Proteine auf infizierten Zellen. Verschiedene Effektorzellen können mit ihren Fc-Rezeptoren an die freie, konstante Region der Antikörper binden. Zum einen sind dies NK-Zellen. Deren Aktivierung über den Fc $\gamma$ -Rezeptor führt zur Ausschüttung von Perforin und Granzym und so zur Lyse der infizierten Zelle. Zum anderen können Makrophagen über den Fc-Rezeptor IIIa und Neutrophile an die Antikörper adsorbieren. Sie werden dadurch zur Phagozytose der infizierten Zellen angeregt.

Dieser Mechanismus wurde bereits früh adressiert (Manischewitz and Quinnan, 1980), konnte allerdings für CMV noch nicht direkt nachgewiesen werden. Es ist nicht bekannt ob es sich bei der Protektion durch Antikörper in den genannten Studien um reine Neut-

ralisation oder außerdem um ADCC handelt. Beim Schutz durch Serum könnten beide Mechanismen und nicht neutralisierende AK eine zusätzliche Rolle spielen. Hierfür spricht unter anderem die Tatsache, dass die *in vitro* Neutralisationskapazität und die *in vivo* Protektion der Antikörper oft nicht korrelieren. Auch *in vitro* nicht neutralisierende Antikörper können *in vivo* Schutz vermitteln. Außerdem zeigten Antikörper organspezifische Unterschiede in ihrer Protektionskapazität (Farrell and Shellam, 1991). Diese Ausgangssituation führte zur ersten Fragestellung der Doktorarbeit:

**Tragen die Bindung von Antikörpern an Oberflächenproteine infizierter Zellen und Fc-Rezeptor vermittelte Effektorfunktionen zum Schutz gegen MCMV bei?**

Es sollten rekombinante MCMV generiert werden, welche ein heterologes Protein auf der Oberfläche von infizierten Zellen exprimieren, nicht aber in der Virushülle tragen. In immundefizienten Mäusen wurde getestet, ob verschiedene murine und humane Antikörper gegen dieses Protein Schutz gegen die Viren vermitteln können. Da Neutralisation durch das Fehlen des Proteins in der Virushülle ausgeschlossen ist, kann es sich dabei nur um ADCC handeln.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde dem Umstand Tribut gezollt, dass die aufgezählten Immunabwehrmechanismen gegen CMV redundant und teilweise verzichtbar sind. Zum Beispiel gelten  $CD8^+$  T-Zellen als eine der wichtigsten Zelltypen im Schutz gegen CMV. Werden sie aber im Mausmodell durch Depletion entfernt, wird die Primärinfektion mit der gleichen Kinetik eingedämmt und Latenz etabliert (Jonjic et al., 1990). Ähnliches gilt für  $CD4^+$  T- und B-Zellen (Jonjic et al., 1989; Jonjic et al., 1994). Erst die kombinierte Eliminierung verschiedener Zelltypen führte zu verstärkter Reaktivierung aus der Latenz (Polic et al., 1998). Dabei ist nicht bekannt ob sich alle Bestandteile der Immunkontrolle beliebig gegeneinander austauschen lassen, oder ob es essentielle Kontrollfunktionen gibt. Daher stellte sich die Frage:

**In wieweit lassen sich die dominanten Abwehrmechanismen gegen MCMV reduzieren und welche Zelltypen sind für den Schutz gegen die CMV-Infektion essentiell?**

Zur Beantwortung dieser Frage sollte eine vergleichende Hierarchie der am Schutz beteiligten Zellpopulationen etabliert werden. Diese Untersuchungen führten zur Bestimmung eines weiteren protektiven Zelltyps.

### 3 Ergebnisse der 1. Aufgabenstellung

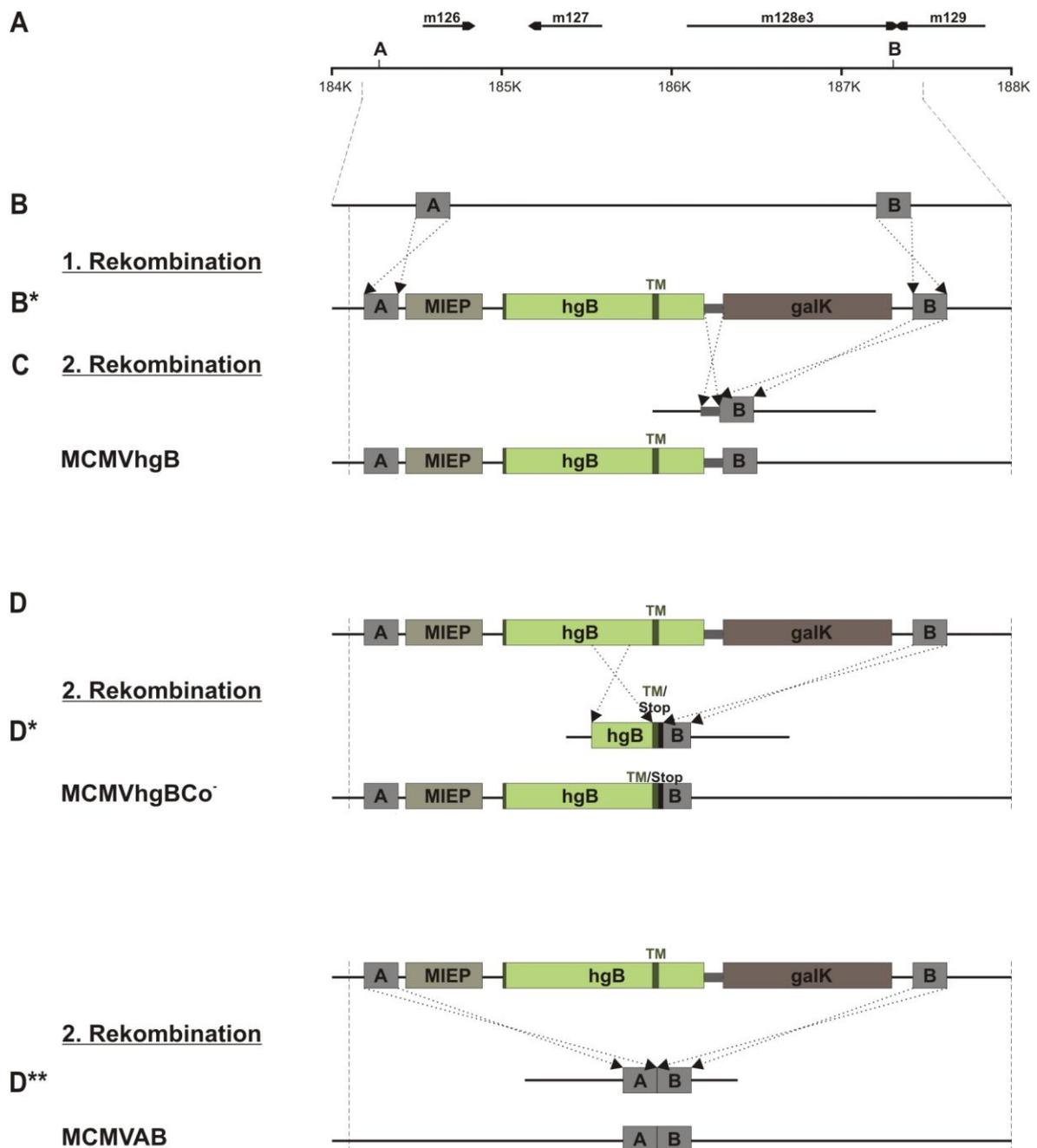
#### 3.1 Generierung der rekombinanten Viren

Erstes experimentelles Ziel dieser Arbeit war die Konstruktion eines rekombinanten murinen Cytomegalovirus, welches hgB auf der Oberfläche von infizierten Zellen exprimieren sollte, nicht aber in die Virushülle integriert (MCMVhgB). Als Ausgangsmaterial diente das Genom von MCMV157luc. Dieses ging aus dem MCMV wt Stamm Smith hervor und trägt anstelle von m157 das Luziferasegen des Glühwürmchens unter Kontrolle des humanen *major immediate early promotor* (MIEP). Das MCMV Genom lag als artifizielles, bakterielles Chromosom (BAC) in E.coli vor, worin es propagiert und verändert werden konnte.

Beim Einfügen von zusätzlicher DNA in das Virusgenom werden einige bp toleriert, ohne dass es durch Übergröße des Genoms zu Verpackungsproblemen der viralen DNA in Kapside und damit verbundenen Replikationsdefiziten kommt. Mit einem offenen Leserahmen von rund 2 700 bp stellt hgB ein relativ großes Gen dar. Da mgB für die Fusion von Virushülle und Zellmembran essentiell ist, konnte es nicht substituiert werden. Folglich würde das resultierende Virus sowohl mgB als auch hgB-DNA tragen. Allerdings sollte hgB im Gegensatz zu mgB nicht in die Virushülle von MCMV integriert werden, weil die Virusmorphogenese für HCMV und MCMV spezifisch verläuft. Um die Expression von hgB unabhängig vom Ort der Insertion zu gewährleisten, sollte der humane MIEP direkt vor dem hgB-Leserahmen inseriert werden. Dies sollte zusätzlich bewirken, dass das eigentlich erst spät im Replikationszyklus exprimierte Protein (Rapp et al., 1992) schon wenige Stunden nach Infektion synthetisiert wird. Damit sollten insgesamt 3 625 bp in das Virusgenom eingefügt werden. Folglich mussten nicht essentielle Teile aus dem Genom entfernt werden. Nach Literaturrecherche wurde der Bereich von m126 bis m128 (2 968 bp) für die Deletion bestimmt (Abb. 4A), da er im gesamten MCMV Genom der einzige zusammenhängende Bereich passender Größe war, für welchen keine essentielle Funktion beschrieben war (Rawlinson et al., 1996; Tang et al., 2006) und welcher nicht sensitiv gegenüber Mutagenese war. Er kodiert an bekannten Funktionen nur in m128 für Exon 3 von ie2, welches für Virusreplikation und Infektiösität unerheblich ist (Cardin et al., 1995; Manning and Mocarski, 1988).

##### 3.1.1 Konstruktion der BACs (galK Rekombination)

Für die Mutagenese wurde die galK Rekombinase Methode nach Warming et al. (2005) gewählt, der das Prinzip der homologen Rekombination zugrunde liegt. Diese setzt voraus, dass entsprechende Rekombinationsfragmente generiert werden können, welche in Abschnitt 3.1.2 beschrieben sind. Ein Schema der Strategie ist in Abb. 4 gezeigt.



**Abb. 4: Schematische Darstellung der Herstellung der drei mutierten Viren.**

(A) Darstellung der Region m126 – m129 des MCMV Genoms

(B) In einen ersten Rekombinationsschritt wurde der Bereich von m126 bis m128 des MCMV Genoms deletiert und stattdessen der MIEP, der Leserahmen für hgB und eine Galaktokinasegen komplettierende Sequenz (galK) als Selektionsmarker in das BAC eingebracht. (B\*) Rekombinationsfragment I

(C) Im zweiten Rekombinationsschritt wurde der Selektionsmarker entfernt.

(D) Durch den Einsatz unterschiedlicher Rekombinationsfragmente II (B\*, D\* und D\*\*) wurden die unterschiedlichen Mutationen für MCMVhgB, MCMVhgB<sup>Co-</sup> und MCMVAB generiert. TM Transmembranregion

### **Rekombination I (Insertion von hgB-Gen und Selektionsmarker)**

Im Rahmen dieser Methode wurde in einem ersten Rekombinationsschritt der entsprechende Bereich (MCMV157luc Smith: 184 308 – 187 275 bp) deletiert und stattdessen die gewünschte DNA und galk als Selektionsmarker in das BAC eingebracht.

Zunächst wurde das MCMV157luc-BAC in SW102 Bakterien transformiert, welche eine hitzeaktivierbare Rekombinase enthielten. Durch Erhöhung der Temperatur von 32°C auf 42°C wurde diese aktiviert. Anschließend wurde das lineare Rekombinationsfragment I (Abb. 4B\*) transformiert. Dieses enthielt den MIEP, den Leserahmen für hgB und galk. Begrenzt wurde es durch die zwei homologen Regionen A und B, welche den zu mutierenden Bereich im BAC flankierten. Wie in Abb. 4B schematisch gezeigt, sollte es zur homologen Rekombination zwischen den Homologien A und B kommen. Die Bakterien mit den rekombinierten BACs wurden auf Agar-Platten mit Deoxygalaktose als einziger Kohlenstoffquelle über die Expression von galk selektioniert und durch PCR bestätigt.

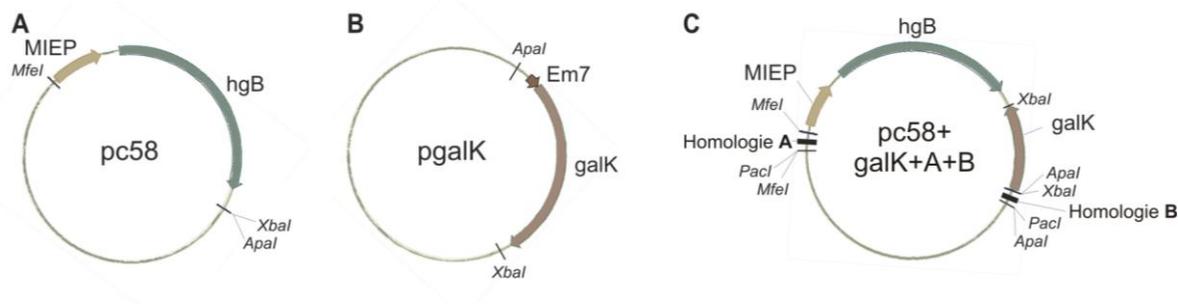
### **Rekombination II (Entfernen des Selektionsmarkers)**

Für die zweite Rekombination wurde nach Aktivierung der Rekombinase das Rekombinationsfragment II transformiert. Durch Rekombination mit dieser DNA wurde der galk Marker wieder aus dem erhaltenen BAC entfernt. Dies geschah über eine neue homologe Region zwischen dem hgB-Leserahmen und galk und über Homologie B (Abb. 4C). Die rekombinierten Klone wurden mittels Kolonie-PCR identifiziert. Das ursprüngliche BAC enthielt an der Insertionsstelle bereits eine Polyadenylierungssequenz welche für das hgB-Virus genutzt werden konnte.

## **3.1.2 Konstruktion der Rekombinationsfragmente**

### **Rekombinationsfragment I**

Das lineare DNA-Fragment für die erste Rekombination sollte zwischen den homologen Regionen A und B den MIEP, den Leserahmen für hgB und galk tragen. Es wurde aus dem Plasmid pc58 generiert, welches bereits den MIEP und hgB enthielt (Abb. 5A). Zuerst wurde der Vektor pgalk, welcher die galk Kasette in einem Blueskript Rückgrat trägt, mit den Restriktionsenzymen ApaI und XbaI geschnitten (Abb. 5B). Die galk-Kasette wurde gereinigt und über die entsprechenden Schnittstellen in pc58 eingefügt (pc58+galk). Mit passenden Primern wurden die Homologien A und B von einer BAC-Matrize amplifiziert. Die Primer wurden so gestaltet, dass Homologie A über MfeI in den Vektor eingesetzt werden konnte und zu Beginn der Homologie zusätzlich eine PacI Schnittstelle entstand. Homologie B enthielt am Ende eine PacI Schnittstelle und wurde über ApaI in den Vektor inseriert. Durch Kolonie-PCR wurden die richtigen Klone identifiziert und sequenziert sowie der Vektor pc58+galk+A+B (Abb. 5C) durch Restriktionsspaltung kontrolliert. Das gesamte Rekombinationsfragment wurde über die eingefügten PacI Schnittstellen aus dem Vektor gespalten und gereinigt (Abb. 4B\*). Es enthielt, bedingt durch die Nutzung der Schnittstellen, Sequenzen aus dem Expressionsvektor und umfasste insgesamt 4 535 bp.



**Abb. 5: Konstruktion von Rekombinationsfragment I**

(A) pc58 basiert auf pcDNA3 und enthielt MIEP und hgB

(B) pgalk enthielt die galK-Kassette.

(C) Der finale Vektor pc58+galK+A+B enthielt Homologie A, den MIEP, den hgB-Leserahmen, galK und Homologie B.

### Rekombinationsfragment II

Für die Generierung von MCMVhgB (Abb. 4C) wurde der pc58+galK+A+B Vektor zur Erstellung des Rekombinationsfragments verwendet. Die galK-Kassette wurde über die ursprüngliche und eine, mit Homologie B eingefügte, XbaI Schnittstelle aus dem Vektor entfernt. Der rückligierte Vektor pc58+A+B diente als Matrize für die Amplifikation eines 265 bp Rekombinationsfragmentes, welches einen Bereich der Vektor DNA hinter hgB als neue, homologe Region und Homologie B abdeckte.

Neben MCMVhgB wurden zwei weitere rekombinante Viren konstruiert (Abb. 4C und D). Der C-Terminus von hgB enthält Di-Lysine und tyrosinbasierte Motive (YxxO; Y Tyrosin, x beliebige AS, O große hydrophobe AS), welche für die Endozytose des Proteins von der Zelloberfläche verantwortlich sind (Tugizov et al., 1999). Durch Entfernung des Carboxyterminus könnte hgB aufgrund fehlender Endozytosemotive auf der Oberfläche infizierter Zellen akkumulieren. Daher wurde eine Mutante erstellt, welche nur den Transmembran- und den Extrazellulären Bereich von hgB ohne C-Terminus exprimiert (MCMVhgBCo<sup>-</sup>). Hierfür wurde ein Rekombinationsfragment erstellt, bei welchem die letzten 354 bp von hgB durch ein Stop-Codon ersetzt waren (Abb. 4D\*). Es enthielt Sequenzen von hgB bis bp 2 346 als erste Homologie, ein Stop-Codon und den Beginn von Homologie B. Außerdem wurde eine Kontrolle generiert, welche nur die Deletion von m126 bis m128 aufwies (MCMVAB). MCMVAB wurde durch Rekombination mit einem Fragment gebildet, welches nur die beiden Homologien A und B enthielt (Abb. 4D\*\*). Für die Generierung von MCMVhgBCo<sup>-</sup> und MCMVAB wurden jeweils zwei 119 bzw. 123 bp umfassende Oligonukleotide (Abb. 4D\* und D\*\*) käuflich erworben, aneinander gelagert und als Rekombinationsfragment II eingesetzt (6.4.2).

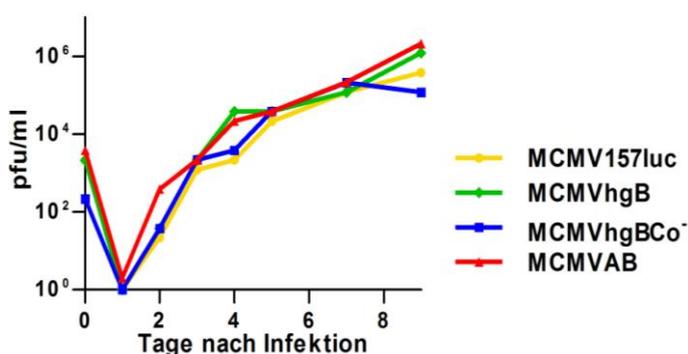
### **3.1.3 Bestätigung und Rekonstitution der rekombinanten Viren**

Durch Verdau mit dem Restriktionsenzym NotI und anschließende Gelelektrophorese wurde die BAC-DNA der hgB-BACs auf ihre Vollständigkeit überprüft und das erhaltene Bandenmuster mit gespaltener MCMV157luc DNA verglichen (nicht gezeigt). Zusätzlich wurde die korrekte Nukleotidabfolge durch DNA-Sequenzierung der Übergangsregionen der hgB-Viren und des mutierten Bereichs von MCMVAB verifiziert. Die BAC-DNA wurde in MEF transfiziert. Nach Ausbreitung des cytopathischen Effekts wurden die im Überstand enthaltenen Virionen erneut in einer PCR eingesetzt und DNA-Fragmente passender Größe von den mutierten Bereichen amplifiziert. Insgesamt wurden durch die Mutageneseprozedur keine unbeabsichtigten Veränderungen in den rekombinanten BACs verursacht, die mit den angewandten Methoden nachweisbar waren.

## 3.2 *In vitro* Charakterisierung der rekombinanten Viren

### Replikation der rekombinanten Viren *in vitro*

Alle rekombinanten Viren waren durch die Deletion der Leserahmen m126 bis m128 gekennzeichnet. Zwei der Viren enthielten zusätzlich spezie fremde DNA in Form von hgB. Ob diese Deletion, oder die Insertion von HCMV-DNA, Veränderungen im Replikationszyklus verursacht hatten, wurde durch Untersuchung des Replikationsverhaltens überprüft. MEF wurden mit einer niedrigen Multiplizität der Infektion (moi) von weniger als eins mit den vier Viren infiziert. Nach den in Abb. 6 angegebenen Zeitabständen wurden die Zellkulturüberstände abgenommen, die Virustiter bestimmt und gegen die Entnahmezeitpunkte aufgetragen. Am Tag nach Infektion war der Replikationszyklus noch nicht vollständig durchlaufen und somit keine infektiösen Viren im Überstand detektierbar. Alle Replikationskurven wiesen einen ähnlichen Verlauf auf und erreichten neun Tage nach Infektion einen Höchstwert von  $10^5$  bis  $10^6$  plaque forming units (pfu) pro ml. Die rekombinanten Viren waren demnach im Hinblick auf Geschwindigkeit und Effizienz der Replikation mit MCMV157luc vergleichbar und somit eine Bedingung für nachfolgende Versuche erfüllt.

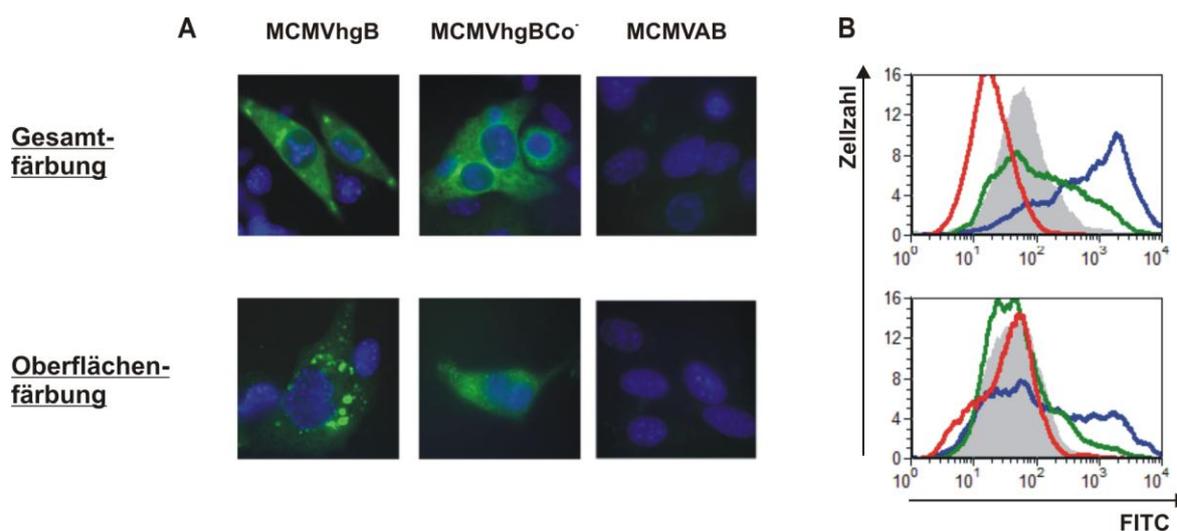


**Abb. 6: Replikationskurve der mutierten Viren im Vergleich zu MCMV157luc**

In einer 96-Loch Platte wurden MEF mit einer moi von 0,05 bis 0,1 mit den vier Viren infiziert. Nach vier Stunden wurden die Zellen gewaschen und mit frischem Medium bedeckt. An den Tagen 1, 2, 3, 4, 5, 7 und 9 wurde der Überstand abgenommen und der Virustiter durch Endpunkt titration und Immunfluoreszenzfärbung bestimmt.

### Expression von hgB

Eine weitere Voraussetzung war die Expression und einwandfreie Faltung von xenogenem hgB, sowie dessen Exposition auf der Oberfläche von MCMVhgB- und MCMVhgBCo<sup>-</sup>-infizierten Zellen. Um dies zu belegen, wurden MEF mit den rekombinanten Viren infiziert und zwei Tage nach Infektion für Immunfluoreszenz- und durchflusszytometrische Analysen prozessiert. Zunächst wurden unspezifische Bindungen durch Inkubation mit naivem Serum und monoklonalen Antikörpern (mab) gegen die Fc-Rezeptoren CD16/32 gesättigt. Ein Teil der Zellen wurde mit 3 %-igem Paraformaldehyd (PFA) permeabilisiert, um die generelle Expression des Proteins in infizierten Zellen nachzuweisen. Außerdem wurde die Exposition auf der Oberfläche von nicht durchlässigen Zellen aufgezeichnet.



**Abb. 7: hB wird von infizierten Zellen exprimiert und auf der Zelloberfläche exponiert**

**(A)** Immunfluoreszenzanalyse: MEF wurden in Zellkulturschalen auf Deckgläsern ausgesät und mit den rekombinanten Viren infiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit PFA fixiert, teilweise mit Triton X-100 behandelt (Gesamtfärbung) und mit dem mab gegen hB SM5-1 und FITC-konjugierten Sekundärantikörpern angefärbt.

**(B)** Durchflusszytometrische Analyse: MCMVhgB (grün), MCMVhgBCo<sup>-</sup> (blau) oder MCMVAB (rot) infizierte MEF wurden mit Kollagenase D abgelöst und wie in (A) beschrieben fixiert und gefärbt. Als Erstantikörper wurde 27-39 oder eine Isotypkontrolle (grau) eingesetzt. Zellfragmente wurden anhand ihrer Größe aus der Auswertung ausgeschlossen.

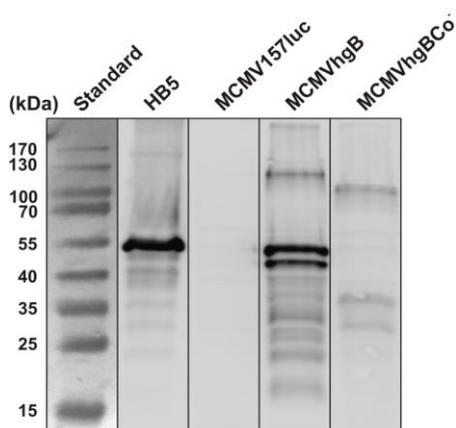
In der Immunfluoreszenz wurde der humane mab SM5-1 eingesetzt, welcher ein konformationelles Epitop auf hB bindet (Potsch et al., 2011). Dieser wurde mit FITC-konjugierten Sekundärantikörpern nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit Dapi blau angefärbt. Für beide hB-Viren zeigten die Bilder eine starke Gesamtexpression von hB in permeabilisierten Zellen, dessen Lokalisation wahrscheinlich die verzweigten Strukturen des Endoplasmatischen Retikulums waren. Die Bindung von SM5-1 gab auch einen Hinweis auf die richtige Tertiärstruktur des exprimierten Proteins, da SM5-1 bei unzureichender oder falscher Faltung nicht an das Epitop binden kann (Potsch et al., 2011). Auf der Oberfläche von infizierten Zellen fand sich vergleichsweise wenig hB. Es wurde dort vor allem in Konglomeraten detektiert. Diese waren auf MCMVhgBCo<sup>-</sup>-infizierten Zellen kleiner und gleichmäßiger verteilt als auf MCMVhgB-infizierten Zellen. Insgesamt schien die Menge an hB auf der Oberfläche von MCMVhgBCo<sup>-</sup>-infizierten Zellen größer. MCMVAB-infizierte Zellen gaben keine Fluoreszenzsignale. Dies bestätigte die spezifische Bindung von Primär- und Sekundärantikörpern. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit anderen humanen oder murinen mabs gegen hB erzielt (nicht gezeigt).

Um hB mittels Durchflusszytometrie nachzuweisen, wurden die Zellen wie für die Immunfluoreszenz blockiert und teilweise permeabilisiert. Gezeigt ist in die Färbung mit dem murinen mab 27-39, welcher ebenfalls ein konformationelles Epitop von hB erkennt (Britt and Vugler, 1992). Bei Gesamtfärbung war eine schwache, unspezifische Verschie-

bung von isotypgefärbten Zellen im Vergleich zu MCMVAB-infizierten, 27-39 gefärbten Zellen zu erkennen. MCMVhgB $\text{Co}^-$ -infizierte Zellen schienen auch in dieser Analysenmethode sowohl insgesamt, als auch auf der Oberfläche mehr hgB zu exprimieren als MCMVhgB-infizierte Zellen, da sich das Signal weiter nach rechts verschob. Allerdings wiesen diese Zellen, bedingt durch die eingesetzte Viruspräparation, auch eine höhere Infektionsrate auf. Die korrekte Expression und Oberflächenexposition von hgB nach Infektion mit den hgB-Viren wurde mit dieser Methode bestätigt.

### Inkorporation von hgB in Virionen

Schließlich sollte geklärt werden, ob hgB als Strukturprotein in die MCMV Hülle integriert wird. Über ein Sucrosekissen gereinigte MCMV Virionen und über einen Tartratgradient gereinigte HCMV Partikel wurden im Immunoblot vergleichsweise mit dem hgB-spezifischen Antikörper 27-287 analysiert. hgB (130 kDa) besteht aus der C-terminalen Untereinheit gp58 (58 kDa), die mit der N-terminalen Untereinheit gp 116 (116 kDa) über Disulfidbrücken kovalent verbunden ist (Britt, 1984; Britt and Mach, 1996). Der mausmonoklonale Antikörper 27-287 bindet ein lineares Epitop der Antigenen Domäne 1 (AD-1), welche innerhalb von gp58 liegt. gp116 kann damit nicht allein, sondern nur als ungespaltenes Protein zusammen mit gp58 detektiert werden.



**Abb. 8: hgB in Präparationen von gereinigten Virionen**

Über ein Sucrosekissen gereinigte Virionen wurden in einem Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen in ihre Proteinbestandteile aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde hgB mit dem spezifischen Mausantikörper 27-287 detektiert. Als Kontrolle für hgB dienten über einen Tartratgradient gereinigte HCMV Partikel. Gebundene Antikörper wurden mit Anti-Maus-IgG-HRP Sekundärantikörpern detektiert.

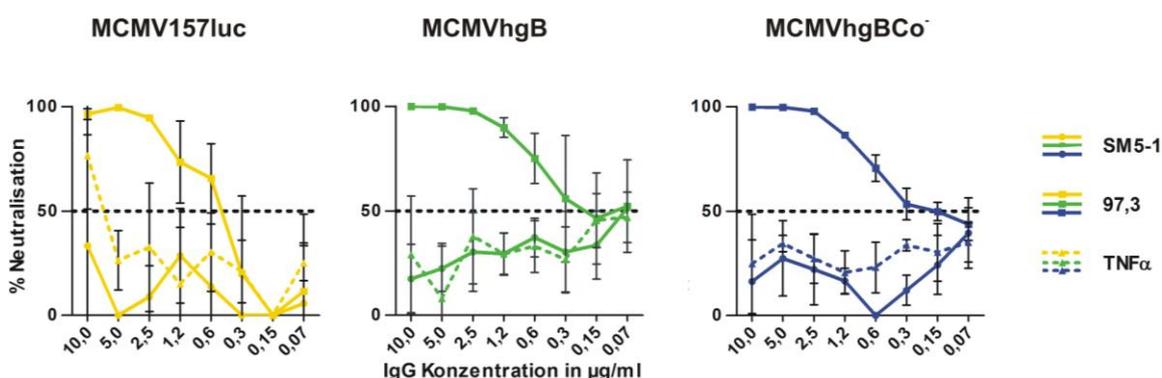
In der Spur der HCMV Partikel, wurde eine breite Bande auf Höhe von 55 kDa detektiert. Diese dürfte gp58 zuzuordnen sein. Auf der gleichen Höhe fand sich bei MCMVhgB-Virionen eine Bande. Zwei zusätzliche Banden wurden hier knapp unterhalb der 55 kDa Bande und oberhalb bei ca. 130 kDa detektiert. Die Zweitere könnte dem Gesamtprotein hgB mit 130 kDa entsprechen, welches trotz der reduzierenden Bedingungen in geringen Mengen zu finden war. Bei MCMVhgB $\text{Co}^-$  erkannte der Antikörper ein Protein bei 35 kDa. Dieses könnte mit dem verkürzten gp58 ohne Carboxyterminus übereinstimmen. Auch die höher gelegene Bande bei ungespaltenem hgB, lag bei MCMVhgB $\text{Co}^-$ -Virionen 20 kDa niedriger als bei MCMVhgB. MCMV wt Virionen enthielten keine Proteine, die 27-287

banden. Somit wurde hgB in Präparationen beider hgB-Viren nachgewiesen. Dieses könnte entweder in der Virushülle integriert oder als Verunreinigung in der Präparation vorliegen. Anhand der WB Analysen konnte zwischen diesen Möglichkeiten nicht diskriminiert werden.

### **Neutralisation der mutierten Viren durch hgB-spezifische neutralisierende Antikörper**

Für die *in vivo* Schutzversuche war es essentiell, dass die rekombinanten hgB-Viren von hgB-spezifischen mabs nicht neutralisiert wurden, und somit der einzig mögliche Protektionsmechanismus bei der Elimination von infizierten Zellen lag.

Daher wurden die hgB-Viren *in vitro* auf ihre Neutralisierbarkeit durch hgB- und mgB-spezifische, neutralisierende mabs getestet. Hierfür wurde humane Antikörper SM5-1 benutzt, welcher HCMV bei einer Konzentration von 1µg/ml zu 100 % neutralisiert (Potsch et al., 2011). 97,3 ist ein neutralisierender mab aus der Maus und bindet an murines gB (Diplomarbeit Sonja Pötzsch). Zur Kontrolle wurde ein TNFα-spezifischer Antikörper mitgeführt, welcher erwartungsgemäß keine spezifische Neutralisationsaktivität zeigte.



**Abb. 9: Neutralisation der hgB-Viren durch mabs gegen hgB und mgB**

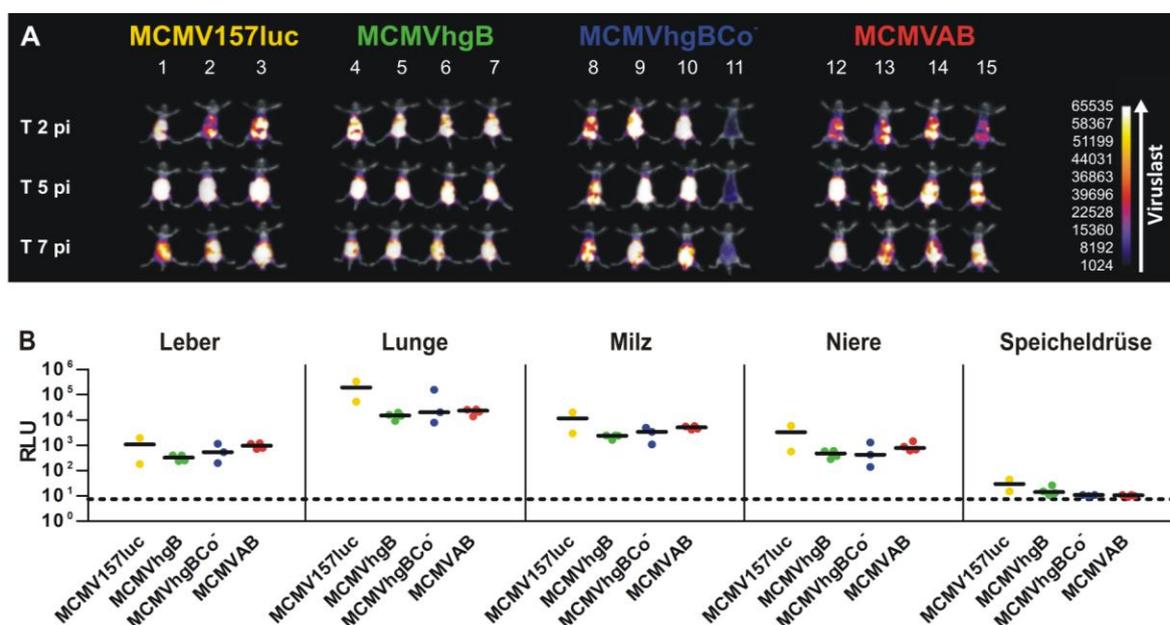
Die verschiedenen Viren wurden jeweils eine Stunde mit abnehmenden Konzentrationen der angegebenen mabs inkubiert. Anschließend wurden sie auf infizierbare MEF gegeben. Nach zwei Tagen wurde die Luziferaseaktivität gemessen und die prozentuale Neutralisation berechnet.

Alle drei getesteten Viren wurden von 97,3 über Bindung an mgB zu 100 % neutralisiert. Die 50 %-ige Neutralisation wurde bei Antikörperkonzentrationen zwischen 0,5 und 0,2 µg/ml erreicht. Der hgB-spezifische SM5-1 konnte die rekombinanten hgB-Viren selbst bei hohen Konzentrationen ebenso wenig neutralisieren wie das ursprüngliche Virus MCMV157luc. Auch der Antikörper gegen TNFα zeigte keine Neutralisationsaktivität. Sollte also hgB tatsächlich in die Virushülle integrieren, reichte die Konzentration des Proteins nicht für die Neutralisation der Viruspartikel aus. Wahrscheinlicher war allerdings, dass es sich bei dem im WB nachgewiesenen hgB um Verunreinigungen in der Präparation handelte.

### 3.3 *In vivo* Charakterisierung der Rekombinanten Viren

#### Replikation der rekombinanten Viren *in vivo*

Um Schutzversuche durchführen zu können, musste zuerst die Replikationsfähigkeit der rekombinanten Viren *in vivo* sichergestellt werden. In immunkompetenten Organismen setzt die Kontrolle der primären CMV-Infektion sehr schnell ein. Deshalb sollten spätere Schutzversuche in immundefizienten RAG<sup>-/-</sup> Mäusen durchgeführt werden. Der Versuchsaufbau wurde in diesen Tieren ohne Antikörper getestet. Die RAG<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mit  $1 \times 10^5$  pfu der rekombinanten Viren infiziert.



**Abb. 10: Verlauf der Infektion mit den rekombinanten Viren in RAG<sup>-/-</sup> Mäusen**

**(A) *In vivo* Biolumineszenzanalysen:** Infizierten Tieren wurde der Bauch enthaart und 0,5 mg D-Luziferin intraperitoneal appliziert. Die Biolumineszenz der narkotisierten Tiere wurde in einer Dunkelkammer über einen Zeitraum von 120 Sekunden mit einem CCD Kamerasystem aufgenommen. Relative Intensitäten des transmittierten Lichts sind in Falschfarben dargestellt und über die entsprechenden Hellfeldaufnahmen gelegt. Die Falschfarbenskala zeigt die Korrelation zwischen relativem Photonenfluss jeder Mauseaufnahme und Viruslast.

**(B)** Am Tag 14 nach Infektion wurden die Tiere getötet und die angegebenen Organe entnommen. Mittels Luziferaseassay wurde die relative Viruslast pro 30 µg Organ bestimmt. Jeder Kreis repräsentiert die Viruslast eines Tieres im entsprechenden Organ, die horizontalen Balken zeigen den Median. Die gestrichelte Linie markiert den Hintergrundwert eines naiven Organs. Da bei Maus #11 zu keinem Zeitpunkt eine produktive Infektion detektiert wurde, wurde sie aus der Auswertung ausgeschlossen.

Eine ausgezeichnete Methode, den Verlauf der Infektion im lebenden Tier zu verfolgen, ist die *in vivo* Biolumineszenzanalyse. Hierfür wurde den Tieren 0,5 mg D-Luziferin intraperitoneal appliziert. Durch die in infizierten Zellen exprimierte Glühwürmchen-Luziferase, kam es zu einer Substratumsetzungsreaktion bei der Licht emittiert wurde. Dabei korreliert die Viruslast mit der Menge des abgegebenen Lichtes, welches gemessen

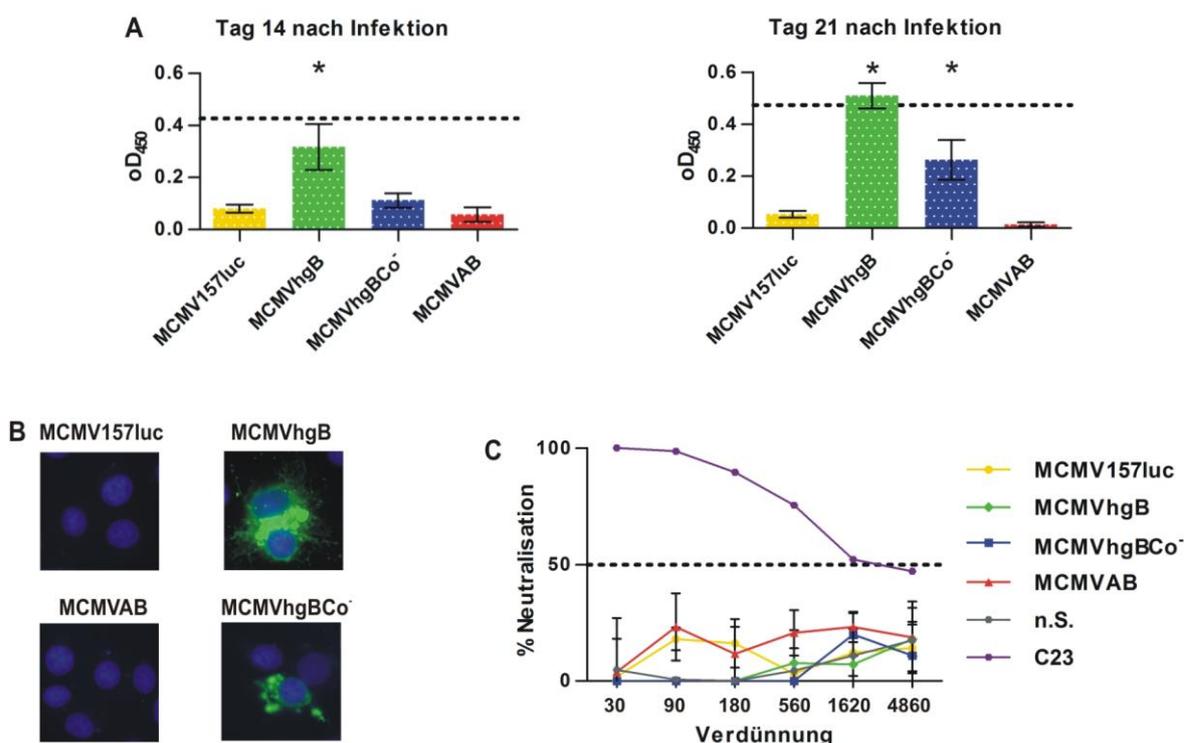
und über eine Falschfarbenskala quantitativ dargestellt wurde. An Tag 3, 7 und 10 nach Infektion wurden Biolumineszenzbilder aufgenommen und die Infektion zwischen den rekombinanten Viren verglichen. Alle Tiere zeigten an Tag 3 nach Infektion starke Biolumineszenzsignale, welche bis Tag 7 nach Infektion maximale Intensität erreichten. Zwischen den einzelnen Virusinfekten war die Signalstärke an den verschiedenen Tagen vergleichbar.

14 Tage nach der Infektion wurden die Tiere getötet, Leber, Lunge, Milz, Niere und Speicheldrüse isoliert und der Virustiter in den einzelnen Organen mittels Luziferaseassay bestimmt. Dafür wurde die von 30 µg Organhomogenat nach Substratzugabe abgegebene Lichtmenge in relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen. Als Hintergrundkontrolle diente Homogenat von naiven Organen. Die höchste Viruslast im Bereich von  $10^5$  RLU wurde in der Lunge erreicht, gefolgt von Milz, Niere und Leber. In der Speicheldrüse konnten nur Werte auf Hintergrundniveau detektiert werden. Die drei mutierten Viren zeigten untereinander kaum Unterschiede. Im Vergleich zu MCMV157luc wurden maximal eine log Stufe niedrigere Werte gemessen. Somit waren die Viren *in vivo* replikationskompetent und die Ausbreitung der Infektion unter den Viren vergleichbar.

### **Immunogenität der rekombinanten Viren**

Als nächstes wurde die Expression von hgB *in vivo* untersucht. Dies musste indirekt über den Nachweis der Immunogenität von viral exprimiertem hgB in Mäusen erfolgen. HgB und mgB sind in ihren jeweiligen Wirten sehr immunogen (Marshall et al., 1992; Potzsch et al., 2011; Rapp et al., 1992). Wenn hgB in infizierten Zellen produziert wird, sollte dies eine humorale Immunantwort erzeugen. Um diese Hypothese zu testen, wurde das Serum von immunkompetenten CD8<sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion im ELISA gegen HCMV Partikel eingesetzt. Bereits 14 Tage nach Infektion mit MCMVhgB wurden im Serum signifikant erhöhte Titer an hgB-spezifischen Antikörpern detektiert. Für Seren aus MCMVhgB<sup>Co-</sup>-infizierten Tieren konnten zu diesem Zeitpunkt nur leicht angestiegene Antikörpertiter gemessen werden. Dies änderte sich bis Tag 21 nach Infektion. Auch MCMVhgB<sup>Co-</sup>-infizierte Tiere hatten signifikant höhere Titer an hgB-spezifischen Antikörpern. Indes waren die Antikörpertiter bei Infektion mit MCMVhgB weiter angestiegen und an Tag 21 weiterhin signifikant gegen alle anderen Viren erhöht. Demnach hätte dieses Virus eine höhere immunogene Kapazität als MCMVhgB<sup>Co-</sup>. Bei einmaliger Applikation von hgB beispielsweise als Verunreinigung in der Viruspräparation wäre indes kein IgG Titer nachweisbar. Damit wurde die Expression von hgB *in vivo* bestätigt. Zusätzlich wurde das Serum in der Immunfluoreszenz auf hgB-transfizierten Cos7-Zellen getestet. Gepoolte Seren von je vier MCMVhgB- oder MCMVhgB<sup>Co-</sup>-infizierten Tieren enthielten auch hier ausreichend hgB-bindende Antikörper um die transfizierten, permeabilisierten Zellen anzufärben. Außerdem wurde überprüft, ob die induzierten, hgB-spezifischen Antikörper zur Neutralisation befähigt waren. Da die rekombinanten hgB-Viren von neutralisierenden Antikörpern gegen hgB nicht neutralisiert werden konnten (Abb. 9), musste HCMV als Ziel

für eventuell neutralisierende, hgB-spezifische Antikörper eingesetzt werden. Als Kontrolle diente der humane C23 Antikörper welcher die antigene Domäne 2 von hgB erkennt (Masuho et al., 1987) und die HCMV Virionen effektiv neutralisierte. Im Gegensatz dazu enthielt keiner der getesteten Serenpools ausreichend neutralisierende Antikörper, um die 50 %-ige Neutralisation zu erreichen.



**Abb. 11: Immunogenität von rekombinant exprimiertem hgB in  $CD8^{-/-}$  Mäusen**

**(A)** Seren von infizierten  $CD8^{-/-}$  Mäusen wurden zwei und drei Wochen nach Infektion im ELISA gegen HCMV Partikel getestet. Gezeigt sind die Mittelwerte der gemessenen  $OD_{450}$ -Werte abzüglich Hintergrund für jeweils vier Seren. Der Hintergrund-Wert ergab sich aus dem Mittelwert für den Sekundärantikörper. Die Standardabweichung ist angegeben. Die gestrichelte Linie markiert den Wert des hgB-spezifischen mab 27-39, welcher als Positivkontrolle diente.

**(B)** Je vier Seren von 28 Tage infizierten  $CD8^{-/-}$  Mäusen wurden gruppenweise gepoolt und zur Immunfluoreszenzfärbung von hgB-transfizierten, permeabilisierten Cos7-Zellen eingesetzt. Detektiert wurden die gebundenen Antikörper mit einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper. Die Zellkerne wurden mit Dapi blau anfärbt.

**(C)** Die Neutralisierbarkeit von HCMV durch Seren aus infizierten  $CD8^{-/-}$  Mäusen wurde 28 Tage nach Infektion bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte der Neutralisationskapazität der einzelnen Seren mit Standardabweichung. Als Kontrolle wurde Serum von naiven Mäusen (n.S.) und der mab C23 mit einer Anfangskonzentration von 10 $\mu$ g/ml mitgeführt.

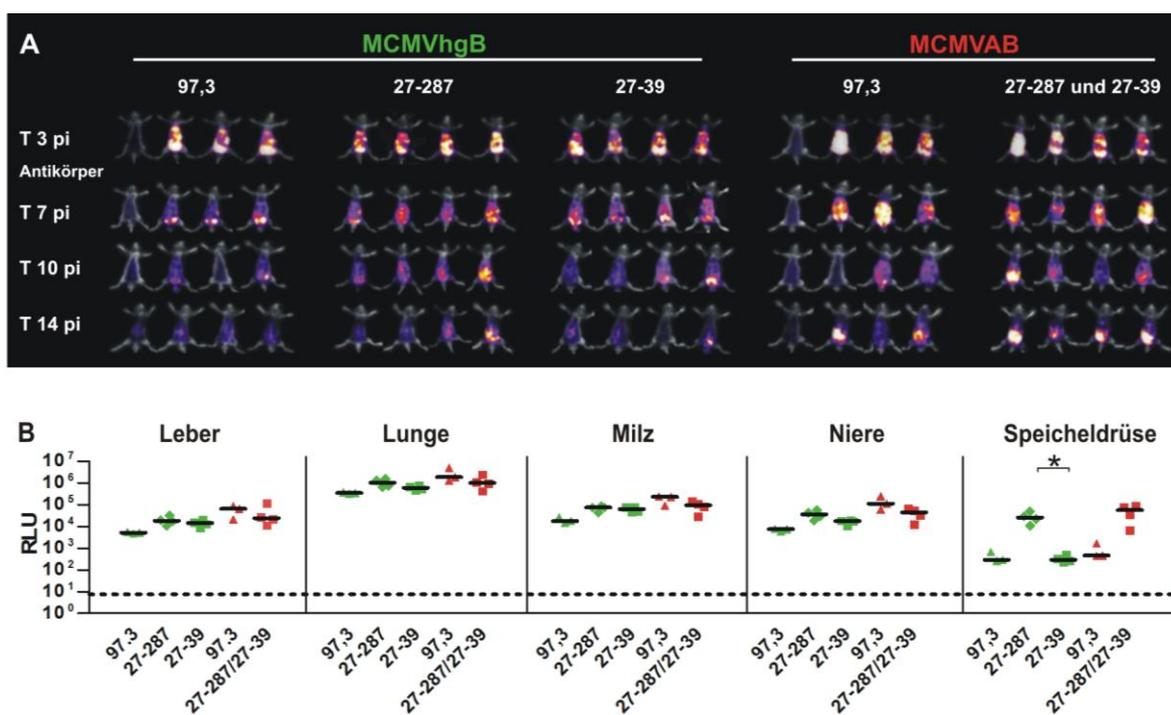
### 3.4 Schutzversuche

Da die Vorversuche gezeigt hatten, dass die mutierten Viren *in vivo* vergleichbar replizierten und hgB auf infizierten Zellen produzierten, waren die wesentlichen Bedingungen erfüllt, um in diesem Model die Einsatzmöglichkeiten hgB-reaktiver Antikörper zu eruieren. Das Protektionspotential von Antikörpern kann bei therapeutischer oder prophylaktischer Anwendung variieren. Zunächst sollte ADCC als Schutzmechanismus durch therapeutischen Einsatz von spezifischen mabs nachgewiesen werden.

#### Therapie

Im ersten Schutzversuch wurden die mausmonoklonalen Antikörper 27-39 und 27-287 (vgl 3.2) eingesetzt. Ersterer bindet ein konformationelles Epitop von hgB und neutralisiert darüber HCMV Virionen. In durchflusszytometrischen Analysen erkannte er hgB auf infizierten Zellen (Abb. 7B). Nachdem MCMVhgB nicht über hgB neutralisiert werden konnte, könnte dieser Antikörper nur über den Mechanismus der ADCC schützen. 27-287 bindet ein lineares Epitop innerhalb von AD-1 und wirkt auf HCMV nicht neutralisierend (Utz et al., 1989). Zur Kontrolle wurde der mgB-spezifische, neutralisierende Antikörper 97,3 (vgl Abb. 9) mitgeführt. Erfahrungsgemäß reduziert die Gabe von 97,3 den Virustiter in den Organen um eine log Stufe. Drei Gruppen von RAG<sup>-/-</sup> Mäusen wurden mit MCMVhgB infiziert. Je 750 µg entweder 27-39, 27-287 oder 97,3 Antikörper wurden drei Tage nach Infektion intraperitoneal appliziert. Zusätzlich wurden zwei Gruppen mit MCMVAB infiziert und erhielten die gleiche Menge 97,3 oder 27-39 und 27-287 Antikörper und somit die doppelte Antikörpermenge. Die Auswertung der Organtiter erfolgte an Tag 15. Damit sollte den Antikörpern genug Zeit gegeben werden, um ihr potentielles Protektionspotential zu entfalten. An Tag 4, 7, 10 und 14 wurden *in vivo* Biolumineszenzbilder aufgenommen, um den Verlauf der Infektion zu verfolgen.

Zwei Mäuse zeigten an Tag 3 keine Luziferaseaktivität und wurden aus der Auswertung ausgeschlossen. Bei allen anderen Tieren war diese an Tag 7, 10 und 14 im Vergleich zu Tag 3 teilweise deutlich reduziert. Dies ließe auf einen protektiven Effekt aller Antikörper schließen. In der Auswertung der Organtiter an Tag 15 dagegen befanden sich alle Werte auf einem ähnlich hohen Level wie ohne Therapie (vgl Abb. 10). In allen Organen außer der Speicheldrüse unterschieden sich die Organtiter der verschiedenen Gruppen um maximal eine log Stufe. Selbst der Antikörper 97,3, welcher über mgB neutralisieren sollte, zeigte in diesem Versuch nur einen minimalen Effekt nach Infektion mit MCMVhgB. Eine Ausnahme bildete die Speicheldrüse. Hier reduzierte die Therapie mit 97,3 den Organtiter um zwei log Stufen. Auch 27-39 zeigte nach Infektion mit MCMVhgB in diesem Organ einen protektiven Effekt. Der Antikörper verringerte die Viruslast auf das gleiche Niveau wie 97,3 und unterschied sich damit signifikant von 27-287. Demnach wies 27-39 ein organspezifisches Schutzpotential in der Speicheldrüse auf.

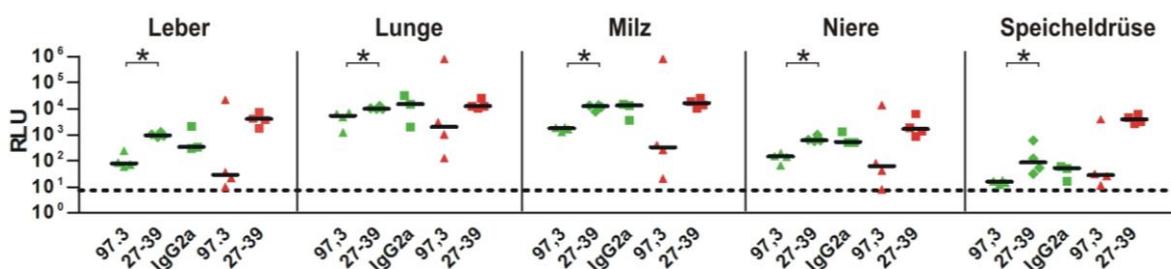


**Abb. 12: Schutzversuch durch therapeutische Gabe von hgB- und mgB-spezifischen Antikörpern**

RAG<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mit MCMVhgB (grün) oder MCMVAB (rot) infiziert. Nach drei Tagen wurden 750 µg der angegebenen Antikörper verabreicht. Die letzte Gruppe erhielt mit 750 µg 27-39 und 750 µg 27-287 die doppelte Antikörperdosis.

**(A/B)** Die Biolumineszenzanalysen und die Viruslast in den Organen an Tag 15 wurden, wie in Abb. 10 beschrieben, ermittelt.

Eine Ursache für die Diskrepanz zwischen den letzten *in vivo* Biolumineszenzaufnahmen an Tag 14 und dem Virustiter in den Organen an Tag 15 könnte in der Halbwertszeit der Antikörper liegen. Diese beträgt für IgG2a nur sechs bis acht Tage (Vieira and Rajewsky, 1988). Wird die kritische Menge an Antikörpern im Organismus unterschritten, könnte der Virustiter trotz anfänglicher Protektion wieder ansteigen. Daher wurde der Versuchsaufbau im nächsten Versuch leicht abgeändert. Die Antikörpergabe erfolgte direkt am Tag nach der Infektion und die Auswertung der Organtiter an Tag 10. Durch die frühere Applikation und verkürzte Wirkspanne der Antikörper sollte der protektive Effekt verstärkt und der Virustiter in den Organen wenn möglich reduziert werden. Außerdem wurde die Protektionskapazität der gleichen 27-39 Antikörperpräparation hier im Vergleich zu einer unspezifischen IgG2a Isotypkontrolle und 97,3 Antikörpern getestet. Da die Infektion mittels Biolumineszenzanalysen am Tag nach Infektion noch nicht messbar ist, wurde darauf verzichtet und einen Tag nach Infektion mit MCMVhgB je 750 µg entweder 27-39, 97,3 oder Isotypantikörper intraperitoneal appliziert. Zusätzlich wurden zwei Gruppen mit MCMVAB infiziert und erhielten die gleiche Menge 27-39 oder 97,3 Antikörper.



**Abb. 13: Schutzversuch durch therapeutische Gabe von hgB- und mgB-spezifischen Antikörpern**

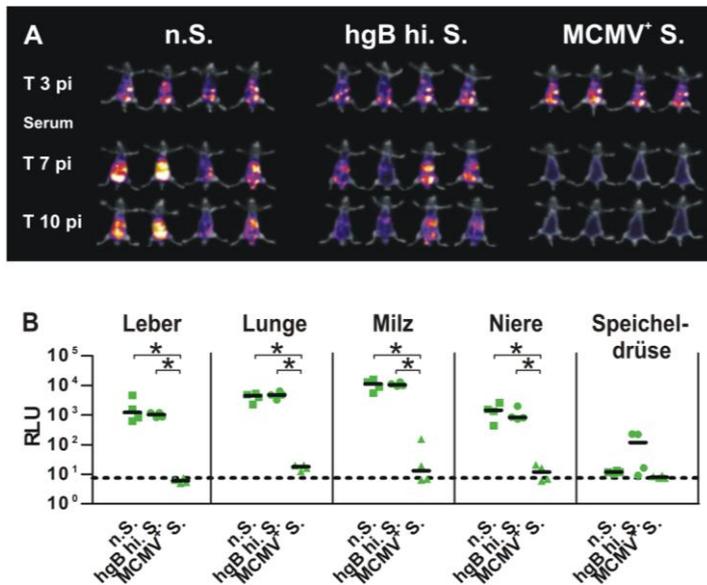
Drei Mäuse pro Gruppe wurden mit MCMVhgB (grün) oder MCMVAB (rot) infiziert. Am Tag nach Infektion wurden 750 µg der angegebenen Antikörper appliziert. Die Viruslast in den Organen wurde an Tag 10, wie in Abb. 10 beschrieben, ermittelt.

Bei der Bestimmung der Virustiter wurden die niedrigsten Werte nach Verabreichung von 97,3 Antikörpern gemessen. Dieses Muster zeigte sich in allen Organen unabhängig vom Virustyp. Die Gabe von 27-39 nach Infektion mit MCMVhgB bewirkte keine Reduktion des Organtiters im Vergleich zur Isotypkontrolle. Im Vergleich zur Gruppe welche mit 97,3 therapiert wurde, zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied im Titer. Demzufolge war der hgB-spezifische Mausantikörper 27-39 bei therapeutischer Gabe in diesem Ablauf nicht in der Lage gegen MCMVhgB zu schützen.

Die zwei getesteten mabs stellten lediglich einen kleinen, stichprobenartigen Ausschnitt aus dem Antikörperrepertoire einer infizierten, immunkompetenten Maus dar. Es bestand die Möglichkeit, dass bestimmte hgB-spezifische Antikörper durch ADCC besser schützen können, aber genau die beiden getesteten Antikörper nicht die dafür erforderlichen Eigenschaften besaßen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden MCMVhgB-infizierte RAG<sup>-/-</sup> Mäuse mit Serum therapiert. Serum hat den Vorteil, dass es eine Mischung aus sämtlichen induzierten Antikörpern enthält. Da speziell das Schutzpotential von hgB-reaktiven Antikörpern abgefragt werden sollte, wurden immunkompetente Mäuse dreifach mit löslichem hgB (Sanofi Pasteur) und Adjuvans immunisiert und das Serum abgenommen. Das hyperimmune hgB-Serum (hgB hi. S.) hatte einen hohen spezifischen Antikörpertiter, enthielt allerdings keine neutralisierenden Antikörper (Daten nicht gezeigt). Somit sollten die unterschiedlichsten hgB-reaktiven Antikörper auch in Verbindung mit Komplement zur Verfügung stehen. Drei Tage nach Infektion wurden 350 µl Serum verabreicht. Das Serum naiver Mäuse (n. S.) wurde als Negativkontrolle und Serum MCMV-infizierter Mäuse (MCMV<sup>+</sup> S.) als Positivkontrolle eingesetzt.

An den Tagen 3, 7 und 10 wurden Biolumineszenzbilder aufgenommen. Die Gruppe, welche MCMV<sup>+</sup> Serum bekommen hatte, unterschied sich von den beiden anderen Gruppen, indem bereits an Tag 7 keine Luziferaseaktivität mehr detektierbar war. Dreizehn Tage nach Infektion wurde die Viruslast in den Organen bestimmt. Mit Ausnahme der Speicheldrüse zeigte sich in allen Organen ein ähnliches Ergebnis. Die Therapie mit dem Serum infizierter Mäuse reduzierte den Virustiter auf Hintergrundniveau. Die Viruslast von

Mäusen, welche hyperimmunes hgB-Serum erhalten hatten, befand sich auf dem gleichen Level wie nach Gabe von naivem Serum. Somit enthielt hyperimmunes hgB-Serum keine ausreichenden Mengen an ADCC-fähigen Antikörpern, um bei therapeutischer Anwendung gegen MCMVhgB zu schützen.



**Abb. 14: Schutzversuch durch therapeutische Gabe von Serum**

RAG<sup>-/-</sup> Mäusen wurde drei Tage nach Infektion mit MCMVhgB 350  $\mu$ l naives Serum (n.S.), hyperimmunes hgB-Serum (hgB hi. S.) oder Serum von mit MCMV infizierten Mäusen (MCMV<sup>+</sup> S.) verabreicht.

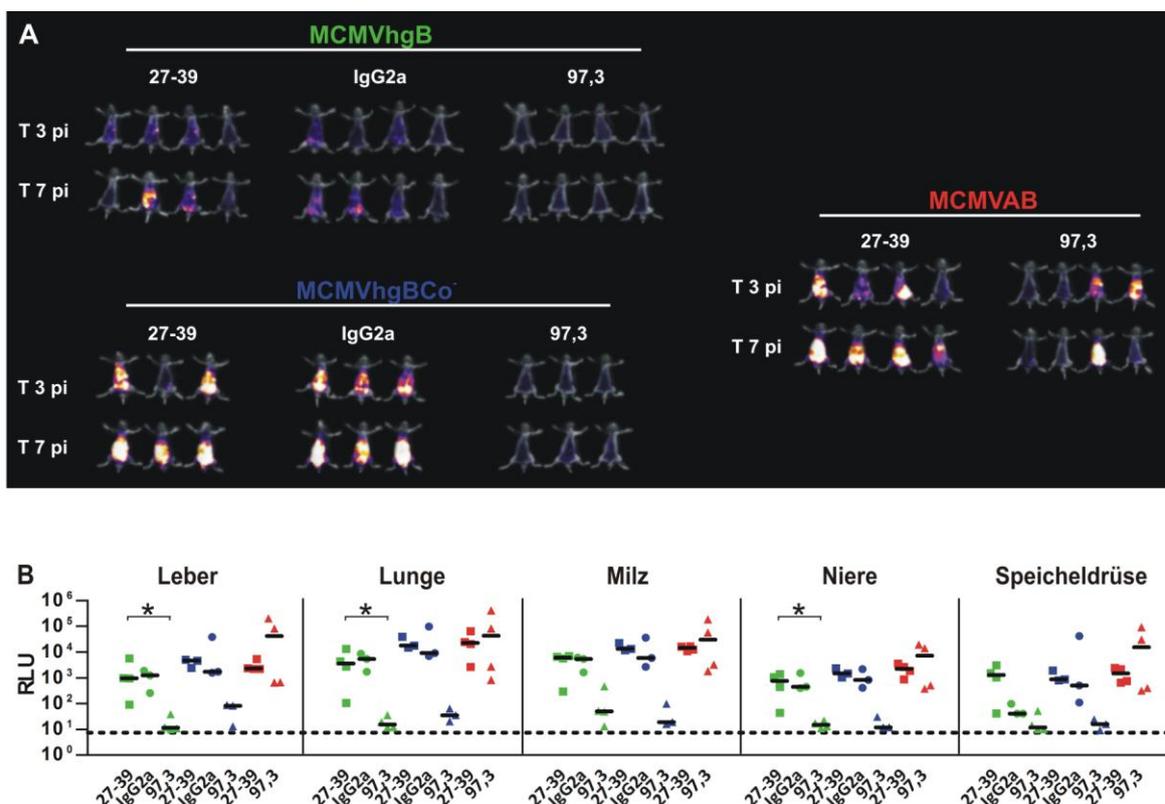
(A/B) Die Biolumineszenzanalysen und die Viruslast in den Organen an Tag 13 nach Infektion wurden, wie in Abb. 10 beschrieben, ermittelt.

### Prophylaxe

In unserem Versuchsaufbau wurden die Mäuse standardmäßig mit  $10^5$  pfu der Viren infiziert. Diese Dosis ist unphysiologisch hoch und entspricht nicht der natürlichen Infektion. Das könnte eine mögliche Ursache sein, warum die therapeutisch verabreichten Antikörper eine sich sehr rasch ausbreitende Infektion nicht bewältigen konnten. Prophylaktischer Schutz kann schon mit geringeren Antikörpermengen erreicht werden, da dieser bereits bei der Primärinfektion präsent ist und unverzüglich seine Funktion erfüllt, indem er das Inoculum, oder erste infizierte Zellen beseitigt. Somit wird die Entwicklung einer produktiven Infektion von Beginn an verhindert. Um diese Situation zu simulieren wurde der mausmonoklonale Antikörper 27-39, welcher organspezifischen Schutz in Speicheldrüse zeigte, am Tag vor Infektion verabreicht. Als Kontrollen dienten wie zuvor der 97,3 Antikörper und ein unspezifischer Isotypantikörper. Alle Antikörper wurden mit 700  $\mu$ g dosiert. Des Weiteren wurde zusätzlich das MCMVhgB<sup>Co</sup>-Virus eingesetzt, um die potentielle protektive Funktion des Antikörpers gegen dieses Virus mit den anderen beiden Viren zu vergleichen.

Die *in vivo* Biolumineszenzbilder zeigten, dass 97,3 bei Infektion mit allen drei Viren schützte. Nach Infektion mit den hgB-Viren wurde die Luziferaseexpression komplett verhindert, während nach Infektion mit MCMVAB ein weniger homogenes Bild entstand. Bei Infektion mit den hgB-Viren waren die Ergebnisse für 27-39 Rezipienten und die Isotypkontrolle vergleichbar, wenngleich der Infekt mit MCMVhgB schwächer ausfiel. In

den Organitern an Tag 10 nach Infektion fanden sich analoge Werte für die hgB-Viren. Sowohl bei Infektion mit MCMVhgB als auch mit MCMVhgB $\text{Co}^-$  befand sich die Viruslast in fast allen Organen nach 27-39 Gabe auf dem gleichen, hohen Level wie nach Isotypgabe. Indes zeigten sich teilweise signifikante Unterschiede zu der Gruppe, welche 97,3 Antikörper erhalten hatte. Dieser Antikörper reduzierte den Organtiter nach Infektion mit den hgB-Viren um durchschnittlich zwei log Stufen, konnte allerdings nach Infektion mit MCMVAB keine homogene Reduktion des Organtiters bewirken. Folglich trug 27-39 bei prophylaktischer Verabreichung nicht zum Schutz durch ADCC gegen eines der hgB-Viren bei.



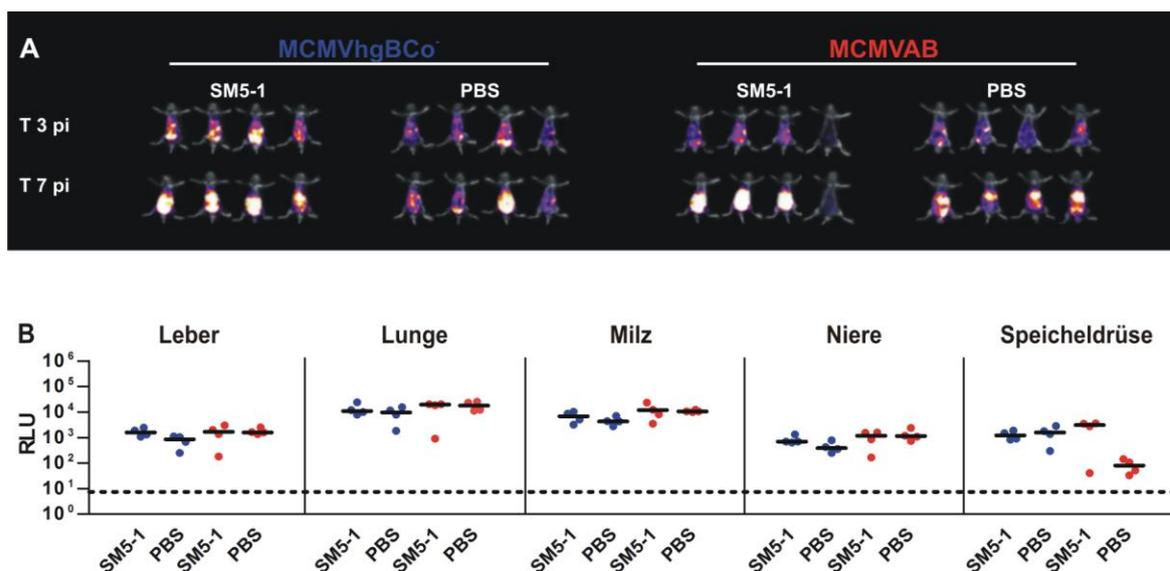
**Abb. 15: Schutzversuch durch prophylaktische Gabe von hgB- und mgB-spezifischen Mausantikörpern**

RAG<sup>-/-</sup> Mäuse wurden 700  $\mu\text{g}$  der angegebenen Antikörper verabreicht. Am nächsten Tag wurden sie mit MCMVhgB (grün), MCMVhgB $\text{Co}^-$  (blau) oder MCMVAB (rot) infiziert.

**(A/B)** Die Biolumineszenzanalysen und die Viruslast in den Organen an Tag 10 nach Infektion wurden, wie in Abb. 10 beschrieben, ermittelt. Eine MCMVhgB-infizierte Maus, welche IgG2a erhalten hatte, verstarb an Tag 7 nach Infektion aus versuchsunabhängigen Gründen.

Zuletzt sollte die prophylaktische Protektionskapazität von SM5-1 getestet werden. Dies ist ein hochpotenter, humaner Antikörper, welcher ein konformationelles Epitop innerhalb von AD-4 des hgB bindet und neutralisierend wirkt. Hier sollte überprüft werden ob er zusätzlich durch ADCC schützen könnte. Der Ablauf des Versuches erfolgte wie zuvor. 200  $\mu\text{g}$  SM5-1 Antikörper oder PBS wurden intraperitoneal verabreicht. Am nächsten Tag

wurden die Tiere mit MCMVhgBCo<sup>-</sup> oder MCMVAB infiziert. In den Biolumineszenzbildern konnte nach Antikörpergabe keine wesentliche Reduktion der Luziferaseaktivität verzeichnet werden. Bei einem Tier schlug die Infektion nicht an. Auch in den Organitern an Tag 10 nach Infektion zeigten sich mit Ausnahme der Speicheldrüse keine Unterschiede zwischen den Gruppen. In diesem Organ schien sich der MCMVAB Infekt durch Antikörpergabe zu verstärken. Zusammenfassend ließ sich demzufolge feststellen, dass in allen getesteten Settings keine ADCC nachgewiesen werden konnte.



**Abb. 16: Schutzversuch durch prophylaktische Gabe von humanen, hgB-spezifischen Antikörpern**

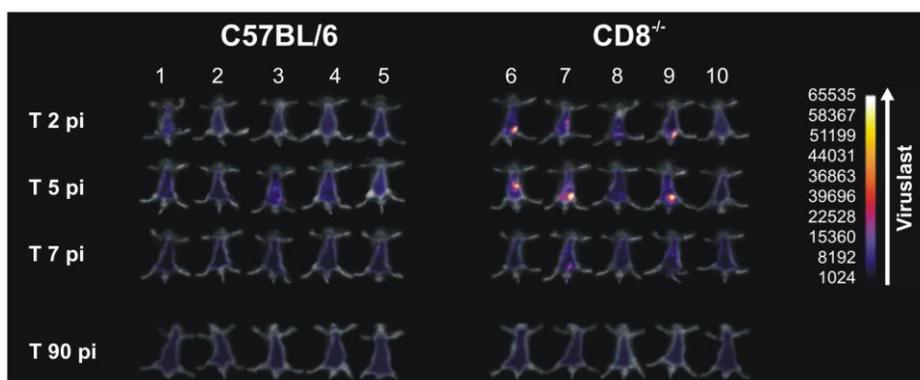
RAG<sup>-/-</sup> Mäusen wurden 200 µg SM5-1 Antikörper oder PBS verabreicht. Am nächsten Tag wurden sie mit MCMVhgBCo<sup>-</sup> (blau) oder MCMVAB (rot) infiziert.

**(A/B)** Die Biolumineszenzanalysen und die Viruslast in den Organen an Tag 10 nach Infektion wurden, wie in Abb. 10 beschrieben, ermittelt.

## 4 Ergebnisse der 2. Aufgabenstellung

### 4.1 Vergleich des MCMV-Infektionsverlaufes in Mäusen mit und ohne CD8<sup>+</sup> T-Zellen

In immunkompetenten, gesunden Mäusen wird die MCMV-Infektion durch teilweise redundant agierende Effektoren wie NK-, T- und B-Zellen kontrolliert (Polic et al., 1998). Diese sorgen dafür, dass 14 Tage nach Infektion kein Virus mehr nachweisbar ist (Krmptotic et al., 2003). In diesem Projekt sollte untersucht werden, in wie weit Mäuse nach sukzessiver Entfernung der dominanten Protektionsmechanismen in der Lage sind, die MCMV-Infektion zu kontrollieren und welche Rolle die einzelnen Mechanismen spielen. Von Jonjic et al (1990) wurde gezeigt, dass der Verlauf der Infektion in BALB/c Mäusen vergleichbar ist, unabhängig davon ob CD8<sup>+</sup> T-Zellen mittels depletierender Antikörper entfernt wurden oder nicht. Dabei wurde der Verlauf der Infektion als der Ablauf der akuten, persistenten und latenten Phase selbiger definiert. Als Grundlage für weitere Versuche sollte dieser Befund für genetische CD8<sup>-/-</sup> Tiere mit C57BL/6 Hintergrund bestätigt werden. Bei diesen Tieren ist die CD8 $\alpha$  Kette deletiert, so dass keine CD8<sup>+</sup> Zellen gebildet werden können. Fünf Tiere pro Gruppe wurden mit je  $1 \times 10^5$  pfu MCMV157luc infiziert. Da in immunkompetenten Tieren eine sehr schnelle Kontrolle der akuten Infektion erwartet wurde, wurde der frühe Infektionsverlauf durch *in vivo* Biolumineszenzanalysen an Tag 2, 5 und 7 nach Infektion festgehalten. Um eine eventuelle spätere Reaktivierung oder eine persistierende Infektion zu detektieren, wurden zusätzliche Bilder an Tag 90 nach Infektion aufgenommen.



**Abb. 17:** *In vivo* Biolumineszenzanalysen von C57BL/6 und CD8<sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit MCMV157luc

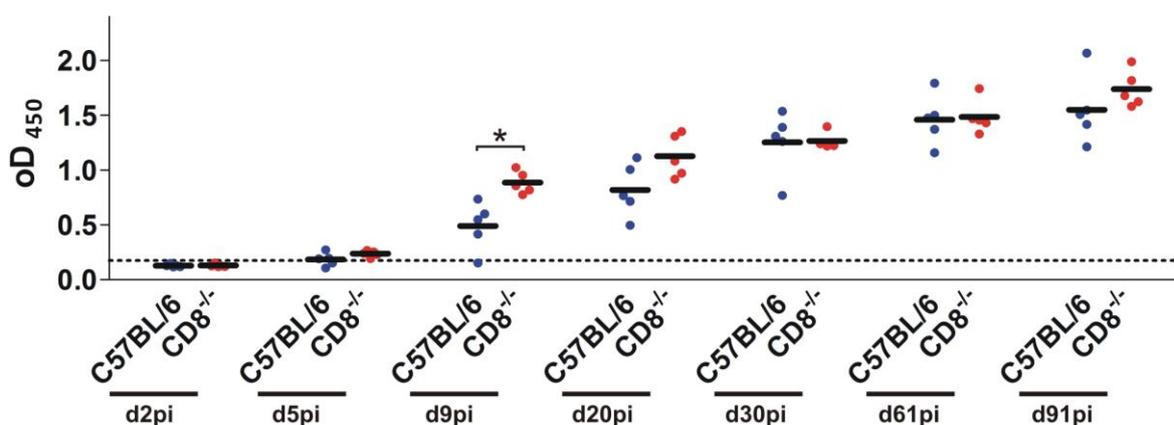
Die Biolumineszenzanalysen wurden wie in Abb. 10 beschrieben durchgeführt

In der Gruppe der immunkompetenten C57BL/6 Mäuse setzte die Kontrolle der Virusdissemination unmittelbar nach Infektion ein. Es wurde nur minimale Lichtemission bei einigen Mäusen an Tag 2 und 5 nach Infektion detektiert. Sieben Tage nach Infektion war bei

keinem der Tiere Luziferaseaktivität messbar. Die Primärinfektion wurde kontrolliert. Dies traf genauso für  $CD8^{-/}$  Tiere zu. Auch wenn man bei einigen Tieren an Tag 2 und 5 nach Infektion noch schwaches Leuchten vor allem im Bereich der Einstichstelle der Luziferin-Applikation sah, wurde die Infektion letztlich mit vergleichbarer Kinetik kontrolliert. Offen blieb die Frage, ob das Virus in nicht leuchtenden Tieren tatsächlich latent ist, oder ob es auf sehr niedrigem Level, unter der Detektionsgrenze der Biolumineszenzanalyse persistiert. Um dies zu testen wurde versucht, zu einem späten Zeitpunkt nach Infektion, infektiöses Virus durch Anzucht nachzuweisen. Beim Plaque-Assay liegt die Nachweisgrenze für das Virus bei 10 pfu pro mg Organ. Da bei der Lyse einer einzelnen produktiv infizierten Zelle sehr große Mengen an neuen Viruspartikeln entstehen, sollte es mit dieser Methode möglich sein, sie in einem persistent infizierten Organ aufzuspüren. Sind keine infektiösen Virionen vorhanden, kann man von echter Latenz ausgehen. 93 Tage nach Infektion wurden die Tiere getötet, Leber, Lunge, Milz, Niere und Speicheldrüse entnommen und ein Plaque-Assay durchgeführt. Infizierte Zellen wurden drei Tage später durch indirekte Immunfluoreszenz und IE 1 Färbung detektiert. Als Kontrolle diente Homogenat aus naiven Organen, dem pro Vertiefung 10 pfu gereinigte Viren zugegeben wurden. Diese ließen sich nach Verstärkung des Infekts durch Zentrifugation in der Immunfluoreszenz mit mehr als 50 Foci pro Vertiefung detektieren, während in Homogenaten aus infizierten Tieren kaum infektiöses Virus gefunden werden konnte. Lediglich in der Leber einer  $CD8^{-/}$  Maus (#6) konnten infizierte Zellen in vereinzelt Foci reproduzierbar nachgewiesen werden. In allen anderen getesteten Organen wurde kein Virus detektiert. Es waren somit keine signifikanten Mengen an infektiösem Virus nachweisbar. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass es zwischen den Datenerhebungen zu unterschiedlich häufigen Reaktivierungen kam, da die Ergebnisse nur eine Momentaufnahme zum jeweiligen Zeitpunkt zeigten.

### Quantitativer und qualitativer Vergleich der Antikörperantwort in Mäusen mit und ohne CD8<sup>+</sup> Zellen im Verlauf der MCMV-Infektion

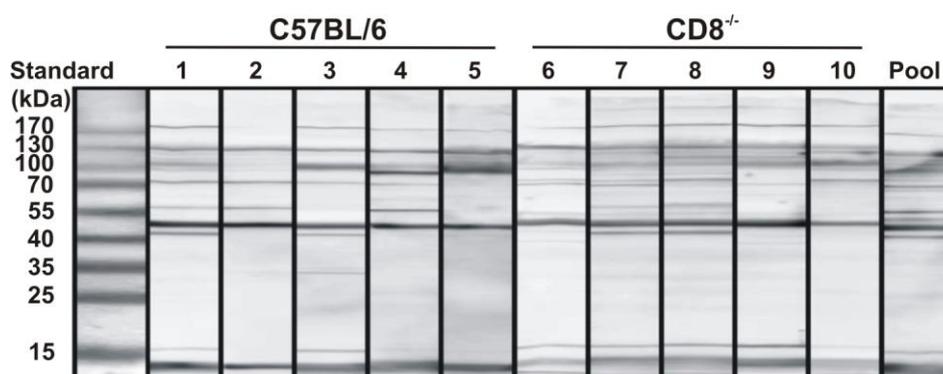
In vorangegangenen Arbeiten wurden Hinweise dafür gefunden, dass CD8<sup>-/-</sup> Tiere im Vergleich zu C57BL/6 wt Mäusen höhere MCMV-spezifische Antikörpertiter ausbildeten. Daher sollte die Menge virusspezifischer Antikörper und deren Zielantigene im Blut von Mäusen mit und ohne CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Infektion mit MCMVm157luc verglichen werden. An den Tagen 2, 5, 9, 20, 30, 61, 91 nach Infektion wurden den Mäusen Blut entnommen und der virusspezifische Antikörpertiter in den Seren mittels antigenspezifischem ELISA bestimmt. Für alle Tiere ergab die Bestimmung der virusspezifischen IgG-Konzentration im zeitlichen Verlauf zunehmende Werte. Bemerkenswert ist, dass die Tiere beider Gruppen trotz des schnellen Abklingens der Primärinfektion bis zum letzten Entnahmezeitpunkt der Proben an Tag 91 steigende Antikörpertiter aufwiesen. Da die Schwankungen zwischen den Werten innerhalb einer Gruppe teilweise größer waren, als zwischen den Gruppen konnten nur an Tag 9 signifikant höhere Werte für die Gruppe der CD8<sup>-/-</sup> Tiere ermittelt werden. Tiere ohne CD8<sup>+</sup> T-Zellen entwickelten also nach Infektion bis Tag 20 schneller höhere Antikörpertiter, die aber im weiteren Verlauf auch von C57BL/6 Mäusen erreicht wurden. Die Seren der beiden Gruppen unterschieden sich quantitativ nicht wesentlich.



**Abb. 18: Virusspezifische Serum-IgG-Titer in C57BL/6 und CD8<sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit MCMV**

Der spezifische Serum-IgG-Titer wurde mittels ELISA auf virusbeschichteten Platten (100 ng/Vertiefung) in Duplikaten bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte für die einzelnen Tiere (Punkte), sowie die Mittelwerte pro Gruppe (Balken). Die gestrichelte Horizontallinie gibt den virusspezifischen Serum-IgG-Titer eines naiven Kontrollserums an.

Als nächstes wurde die Antigenspezifität der Antikörper untersucht. Denkbar wäre, dass ein Mausstamm ein breiteres Spektrum an Antikörpern entwickelt oder verstärkt Antikörper gegen bestimmte Proteine gebildet wurden. Das Serum der infizierten Tiere wurde in einem WB mit Lysat aus gereinigten MCMV157luc Virionen analysiert. Hierfür wurde jeweils das Serum von Tag 61 gewählt, da sich bis dahin ein stabiles Antikörperrepertoire eingestellt haben sollte und die Seren zu diesem Zeitpunkt insgesamt vergleichbare Mengen an Antikörpern enthielten.

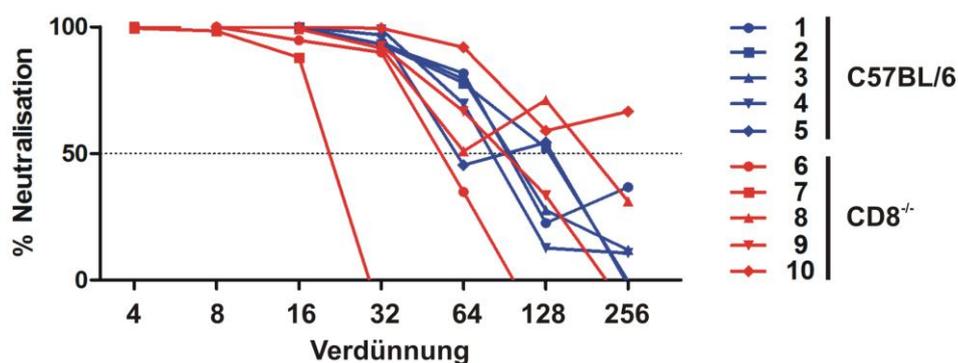


**Abb. 19.: Antikörperspezifitäten in den Seren von MCMV157luc infizierten C57BL/6 und CD8<sup>-/-</sup> Mäusen**

Lysat von MCMV-Virionen wurde in einem SDS-Polyacrylamid-Gel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und auf Nitrozellulose übertragen. Diese wurde in Streifen geschnitten mit 1:100 verdünnten Seren von infizierten C57BL/6 und CD8<sup>-/-</sup> Mäusen inkubiert. Zur Kontrolle wurde ein Streifen mit dem gepoolten Serum infizierter Mäuse inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mit anti-Maus-IgG-HRP (Verdünnung 1:1000) Sekundärantikörpern detektiert und mittels Wasserstoffperoxid nachgewiesen.

Im vorliegenden Blot (Abb. 19) waren bei allen Seren die gleichen charakteristischen Banden zu sehen. Die dominanten Antigene wie beispielsweise Glykoprotein B mit 52 kDa und 130 kDa (Rapp et al., 1992) wurden von allen Seren erkannt. Alle detektierten Banden tauchten auch im Serenpool auf. Vereinzelt wurden zusätzliche Banden detektiert oder einzelne Banden fehlten. Diese Unterschiede waren jedoch innerhalb einer Gruppe genauso zu finden, wie zwischen den Gruppen. Es gab demnach keine Proteine die spezifisch nur von allen Seren aus einer der beiden Gruppen erkannt wurden und von der anderen nicht. Bei den verschiedenen Seren waren die einzelnen Banden teilweise unterschiedlich stark ausgeprägt. Ein Muster, nach welchem bestimmte Banden bei der einen oder anderen Gruppe stärker zum Vorschein kamen, ließ sich dabei allerdings nicht erkennen. Folglich wurden keine Antikörper spezifisch oder verstärkt nur von C57BL/6 oder CD8<sup>-/-</sup> Mäusen gebildet.

Weder quantitative noch Spezifitätsanalysen erlauben eine Aussage über das Protektionspotential der in den Seren enthaltenen Antikörper. Da Neutralisation von freien Viruspartikeln durch Antikörper eine wichtige Komponente der Immunantwort bei Virusinfektionen bildet, wurde die *in vitro* Neutralisationskapazität der einzelnen Seren ermittelt und zwischen den Gruppen verglichen. Auch dafür wurden Seren von Tag 61 nach Infektion benutzt. Für alle Seren wurde die prozentuale Neutralisation nach Inkubation mit den einzelnen Verdünnungen berechnet und beide Werte gegeneinander aufgetragen.



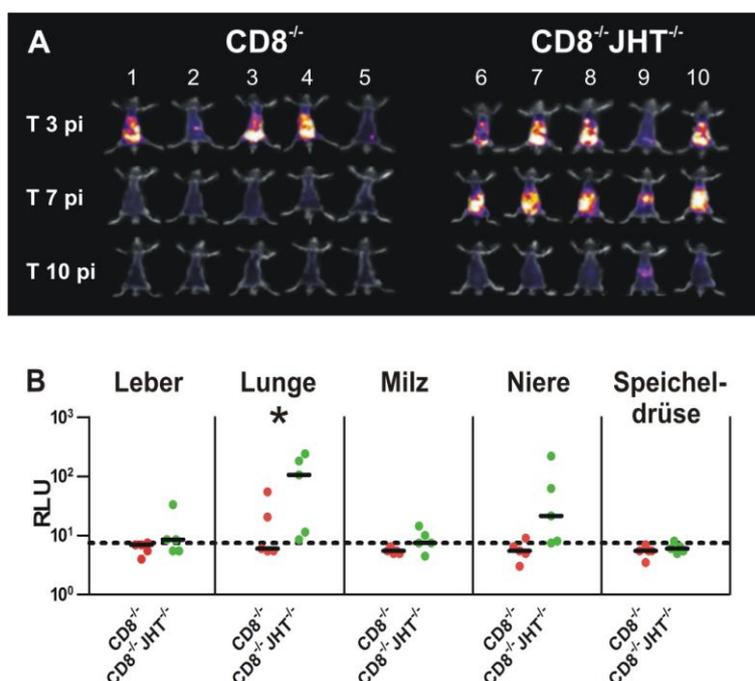
**Abb. 20: Neutralisationskapazität der Seren in vitro**

1 200 pfu MCMV157luc Virus wurden mit den angegebenen Serenverdünnungen für eine Stunde inkubiert und zur Infektion von MEF eingesetzt. Je mehr neutralisierende Antikörper in den Seren enthalten waren, desto weniger Zellen wurden infiziert. Nach vier Stunden wurden die Zellen mit frischem Medium bedeckt. Zwei Tage nach Infektion wurde verbleibende Luziferaseaktivität in jeden Ansatz im Luminometer gemessen. Mit Hilfe eines Ansatzes ohne Antikörper wurde die prozentuale Neutralisation der eingesetzten Virusmenge für jede Verdünnungsstufe berechnet.

Alle Seren errichten 100 %-ige Neutralisation. Die Neutralisationskurven der C57BL/6 Mäuse schnitten die 50 % Neutralisationslinie homogen bei Verdünnungen zwischen 1:64 und 1:128. Sie variierten dabei um den Faktor zwei und lagen damit innerhalb der Testvarianz. Bei CD8<sup>-/-</sup> Mäusen war dieser Wert mit einer Verdünnung von 1:30 teilweise schon viel früher erreicht. Manche dieser Tiere erreichten ihn jedoch selbst bei der maximalen getesteten Verdünnung von 1:256 nicht. Die Neutralisationskapazität dieser Seren variierte innerhalb der Gruppe stark. Gemessen an den berechneten Mittelwerten der getesteten Seren (nicht gezeigt) unterscheiden sich die beiden Gruppen allerdings nicht. Der Befund von Jonjic (1990) konnte damit auch für CD8<sup>-/-</sup> Tiere mit C57BL/6 Hintergrund bestätigt werden. Die Immunantwort im Verlauf der MCMV-Infektion ist in den getesteten Parametern zwischen Mäusen mit und ohne CD8<sup>+</sup> T-Zellen vergleichbar.

## 4.2 Vergleich der MCMV-Infektion in $CD8^{-/-}$ und $CD8^{-/-}JHT^{-/-}$ Mäusen:

Neben den  $CD8^{+}$  T-Zellen spielen Antikörper eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der MCMV-Infektion (Klenovsek et al., 2007).  $CD8^{-/-}JHT^{-/-}$  Mäuse haben zusätzlich zur  $CD8\alpha$  Deletion eine Deletion der schweren J Kette. Dadurch kann die VDJ Umlagerung nicht stattfinden, und es können keine produktiven B-Zellen gebildet werden (Chen et al., 1993). Im Folgenden wurde untersucht, welchen Einfluss dieser zusätzliche Defekt auf den Verlauf der MCMV-Infektion im Vergleich zu  $CD8^{-/-}$  Mäusen hat. Jeweils fünf  $CD8^{-/-}JHT^{-/-}$  und  $CD8^{-/-}$  Tiere wurden mit MCMVAB infiziert. Der Verlauf der Infektion wurde durch *in vivo* Biolumineszenzanalysen festgehalten.

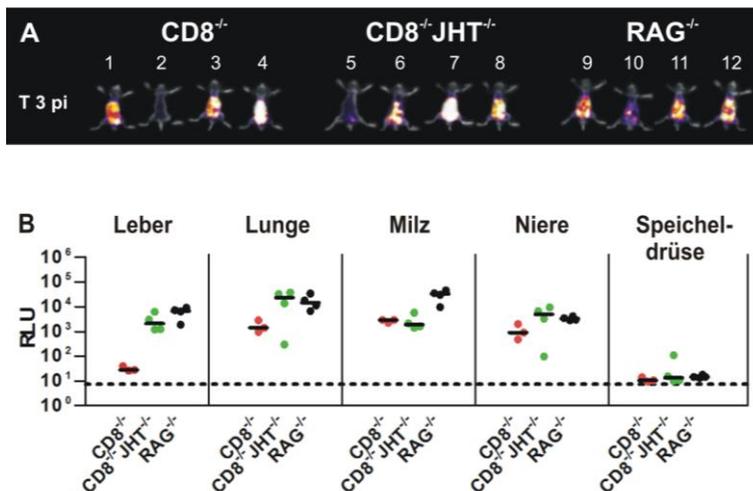


**Abb. 21: Verlauf der Infektion in Mäusen ohne  $CD8^{+}$  T-Zellen und B-Zellen**

**(A/B)** Die Biolumineszenzanalysen und die Viruslast in den Organen an Tag 13 nach Infektion wurden, wie in Abb. 10 beschrieben, bestimmt.

Drei von fünf  $CD8^{-/-}$  Tieren zeigten an Tag 3 nach Infektion schwache Luziferaseaktivität. An Tag 7 nach Infektion war keine Luziferaseaktivität mehr erkennbar. Bei  $CD8^{-/-}JHT^{-/-}$  Tieren konnte zu diesem Zeitpunkt immernoch Luziferaseaktivität detektiert werden. Die Viruskontrolle setzte folglich in Tieren ohne Antikörper erst später ein. In den Wiederholungsversuchen (nicht gezeigt) wurde dieser Effekt mit schwächerer Ausprägung reproduziert. Trotz dieser Unterschiede wurde die Infektion an Tag 10 nach Infektion letztendlich von Tieren ohne  $CD8^{+}$  T-Zellen und ohne B-Zellen genauso kontrolliert wie mit B-Zellen. Um den Virustiter in den einzelnen Organen genauer zu bestimmen wurde an Tag 13 nach Infektion die Viruslast bestimmt. In Leber, Milz und Speicheldrüsen waren die relativen Organ-titer zu diesem Zeitpunkt in beiden Gruppen auf das Niveau von nicht infizierten Tieren reduziert. Dies traf bei  $CD8^{-/-}$  Tieren für alle Organe zu.  $CD8^{-/-}JHT^{-/-}$  Tiere wiesen in Lunge und Niere eine leicht erhöhte Viruslast auf. Allerdings waren diese Unterschiede nur für die Niere signifikant.

Die gezeigten Biolumineszenzanalysen deuteten darauf hin, dass es an Tag 7 nach Infektion einen Unterschied zwischen  $CD8^{-/-}$  und  $CD8^{-/-}JHT^{-/-}$  Tieren gab, der sich im weiteren Verlauf der Infektion relativierte. Daher sollte im nächsten Versuch getestet werden ob der Virustiter an Tag sieben mit immundefizienten  $RAG^{-/-}$  Tieren vergleichbar war und ob es Unterschiede zwischen den einzelnen Organen gab. Hierfür wurden jeweils drei  $CD8^{-/-}$ ,  $CD8^{-/-}JHT^{-/-}$  und drei  $RAG^{-/-}$  Mäuse infiziert, an Tag sieben nach Infektion getötet und der Virustiter in den Organen mittels Luziferase Assay bestimmt.



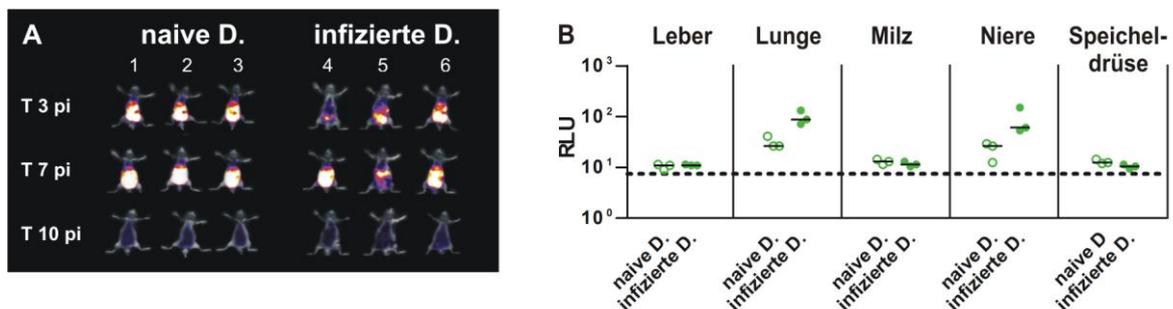
**Abb. 22: Verlauf der Infektion in Mäusen ohne  $CD8^+$  T-Zellen und ohne B-Zellen im Vergleich zu immundefizienten  $RAG^{-/-}$  Mäusen**

**(A/B)** Die Biolumineszenzanalysen und die Viruslast in den Organen an Tag 7 nach Infektion wurden, wie in Abb. 10 beschrieben, ermittelt.

Die Biolumineszenzanalysen an Tag drei nach Infektion zeigten, dass alle Tiere bis auf eine  $CD8^{-/-}$  Maus (#2) produktiv infiziert waren. Diese Maus wurde deshalb aus der Auswertung ausgeschlossen. Im Luziferaseassay wurden organspezifische Unterschiede in der Luziferaseaktivität festgestellt. An Tag sieben nach Infektion war die Luziferaseaktivität von  $CD8^{-/-}JHT^{-/-}$  Tieren im Vergleich zu  $CD8^{-/-}$  Tieren in Leber, Lunge und Niere erhöht und mit  $RAG^{-/-}$  Tieren vergleichbar. In der Milz dagegen befanden sich die Virustiter von  $CD8^{-/-}$  und  $CD8^{-/-}JHT^{-/-}$  Tieren auf einem ähnlichen, eine log Stufe niedrigerem Level. Allerdings waren die Unterschiede nicht signifikant. Für die Speicheldrüse konnten in diesem frühen Stadium der Infektion bei allen Stämmen nur Werte auf Hintergrundniveau ermittelt werden. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass Antikörper in  $CD8^{-/-}JHT^{-/-}$  Mäusen für der Schutz entbehrlich waren.

### 4.3 Protektionspotential von CD4<sup>+</sup> Zellen

Von Jonjic et al (1990) wurde gezeigt, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die in MCMV-infizierten Tieren ohne CD8<sup>+</sup> T-Zellen heranreifen eine kompensatorische Schutzfunktion übernehmen können, über die sie in immunkompetenten Tieren nicht verfügen. Sollte dies auch für die CD4<sup>+</sup> T-Zellen in CD8<sup>-/-</sup>JHT<sup>-/-</sup> Mäusen gelten, müssten präadaptierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Lage sein den Virustiter nach prophylaktischem Transfer in naive Tiere und anschließender Infektion schneller zu reduzieren, als transferierte Zellen aus naiven Donoren. Drei naive und vier infizierte CD8<sup>-/-</sup>JHT<sup>-/-</sup> Mäuse wurden zwölf Wochen nach Infektion getötet und die Milzen entnommen. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit 99 %-iger Reinheit isoliert (Abb. 32). Jeweils eine Mio oder 2,5 Mio Zellen aus naiven bzw. infizierten Donoren wurden in je drei CD8<sup>-/-</sup>JHT<sup>-/-</sup> Rezipienten pro Gruppe transferiert. Drei Tage später wurden diese mit  $1,5 \times 10^5$  pfu MCMVAB infiziert.

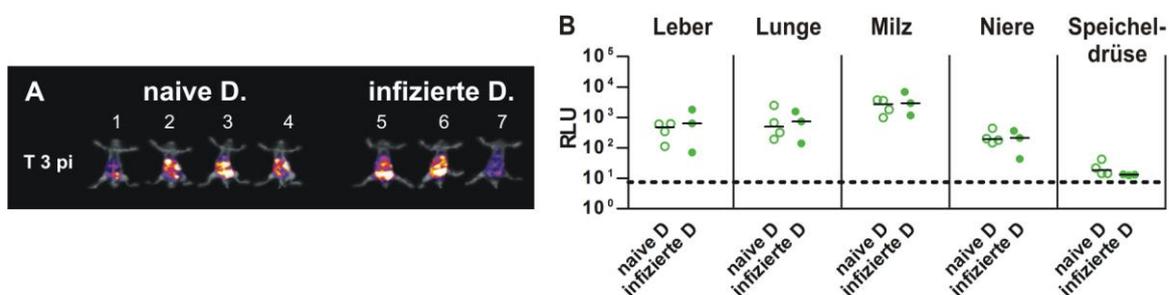


**Abb. 23: Adoptiver Transfer von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in CD8<sup>-/-</sup>JHT<sup>-/-</sup> drei Tage vor Infektion**

(A/B) Die Biolumineszenzanalysen und die Viruslast in den Organen an Tag 13 nach Infektion wurden, wie in Abb. 10 beschrieben, ermittelt.

In den Biolumineszenzanalysen sah man zunächst kaum Unterschiede im Verlauf der Infektion zwischen den beiden Gruppen oder im Vergleich zu nicht transferierten Tieren (vgl. Abb. 21A und Abb. 22A). Beide Gruppen zeigten an Tag 3 und 7 nach Infektion Luziferaseaktivität und kontrollierten die Infektion an Tag 10. Tendenziell wurde an Tag 3 und 7 in Rezipienten präadaptierter Zellen eine schwächere Luziferaseaktivität als in Rezipienten naiver Zellen detektiert. Bei der Bestimmung der Viruslast in den Organen an Tag 13 nach Infektion wurde die umgekehrte Tendenz ermittelt. In Lunge und Niere waren die relativen Organtiter nach adoptivem Transfer um eine halbe log Stufe erhöht. Da die Unterschiede nicht signifikant waren, stellte sich die Frage ob es sich dabei um zufällige Schwankungen im Test handelte oder ob sie tatsächlich von den transferierten Zellen verursacht wurden, und ob sich die Unterschiede durch Variation des Versuchsablaufes deutlicher detektieren ließen. Daher wurde der Versuch mit zwei wesentlichen Änderungen wiederholt. Zum einen wurde die Anzahl der transferierten Zellen erhöht um deren Wirkung zu verstärken. Es wurden jeweils 2,5 Mio Zellen aus vier naiven Donoren und 3 Mio Zellen aus drei infizierten Donoren sieben Wochen nach Infektion mit ähnlicher Reinheit wie im ersten Versuch isoliert und transferiert. Zum anderen wurde die relative Vi-

ruslast in den Organen bereits an Tag 7 bestimmt, da im frühen Stadium der Unterschied zwischen präadaptierten Effektoren, die sofort agieren können und naiven Zellen, die zuerst aktiviert werden müssen, prominenter sein könnte. Drei, bzw. vier Tiere pro Gruppe wurden mit  $1 \times 10^5$  pfu MCMVAB infiziert.



**Abb. 24: Prophylaktischer Transfer von  $CD4^+$  T-Zellen in  $CD8^{-/-} JHT^{-/-}$  drei Tage vor Infektion**

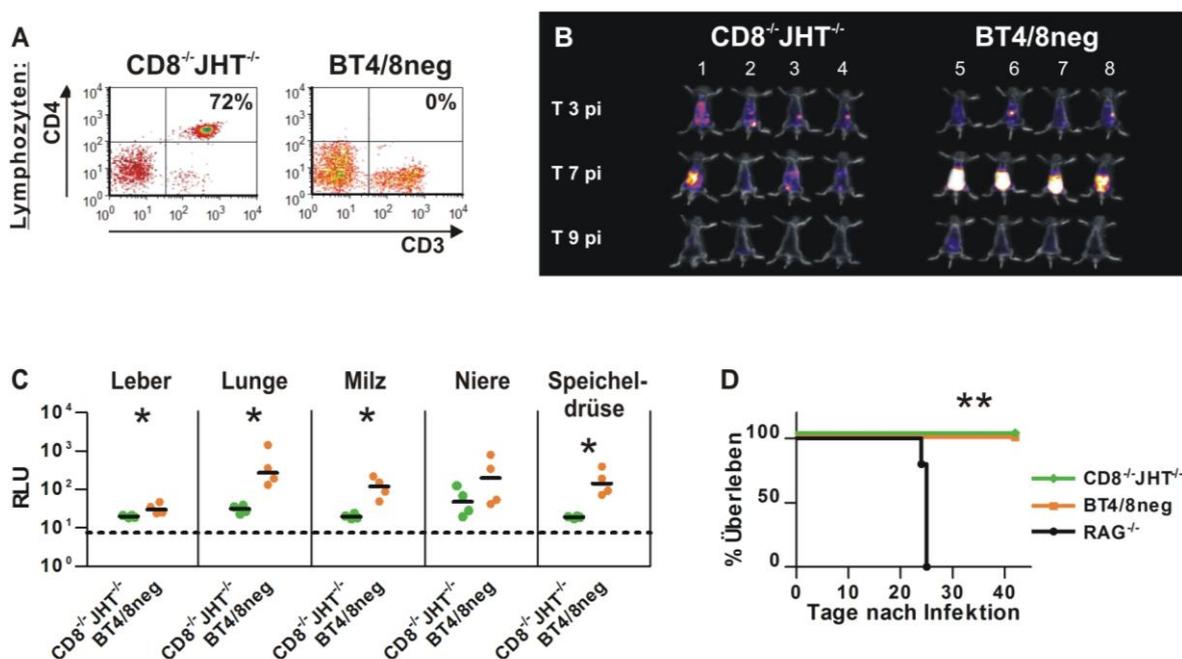
(A) Die Biolumineszenzanalysen und die Viruslast in den Organen an Tag 7 nach Infektion wurden, wie in Abb. 10 beschrieben, ermittelt.

Die Biolumineszenzanalysen an Tag 3 nach Infektion zeigten vergleichbare Luziferaseaktivität für alle Tiere. Auch in den Organen konnten an Tag 7 nach Infektion keine Unterschiede in der Viruslast detektiert werden. Folglich bewirkte die Anwesenheit von spezifisch aktivierten  $CD4^+$  Effektorzellen zum Zeitpunkt der Infektion keine schnellere Viruskontrolle. Rezipienten von präadaptierten  $CD4^+$  Effektorzellen kontrollierten die Infektion im gleichen Zeitraum wie Tiere in welchen diese Aktivierung erst nach Infektion erfolgen musste, weil naive oder keine  $CD4^+$  T-Zellen (vgl Abb. 21A) transferiert wurden.

## 4.4 Depletion verschiedener Zelltypen vor Infektion mit MCMV

### Depletion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Auch wenn präadaptierte, transferierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht in der Lage sind in Rezipienten eine schnellere Kontrolle der MCMV-Infektion herbeizuführen, ist nicht auszuschließen, dass sie in CD8<sup>-/-</sup>JHT<sup>-/-</sup> Mäusen eine Schutzfunktion erfüllen. Um dies zu untersuchen wurden zusätzlich zu der genetischen Deletion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen und B-Zellen die CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch depletierende Antikörper entfernt. Hierfür wurden an Tag -1, 3 und 8 nach Infektion 250 µg YTS 191 Antikörper (Jonjic) intraperitoneal appliziert. Vor Infektion, und bei Beendigung des Versuches wurde die erfolgreiche Depletion mittels durchflusszytometrischer Analyse des Blutes aller Versuchstiere bestätigt. Für die Überlebenskurve wurden an Tag -1, 3 und 35 je 300 µg des Antikörpers sowie an Tag 7, 17 und 24 je 700 µg verabreicht. Die Depletion wurde an Tag 0, 7, 10, 13, 17, 20, 28 und 35, im Falle gleichzeitiger Depletion vorher, überprüft. Damit sollte ermittelt werden, ob CD8<sup>-/-</sup>JHT<sup>-/-</sup> Mäuse ohne CD4<sup>+</sup> T-Zellen (BT4/8neg) immer noch in der Lage sind die MCMV-Infektion längerfristig zu kontrollieren und der Verlauf der Infektion mit CD8<sup>-/-</sup>JHT<sup>-/-</sup> Mäusen mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen verglichen werden.



**Abb. 25: Verlauf der Infektion in CD8<sup>-/-</sup>JHT<sup>-/-</sup> Mäusen mit und ohne CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

(A) Die erfolgreiche Depletion wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse des Blutes an Tag 0,7 und 13 (B und C) bzw. 0, 7, 10, 13, 17, 20, 28 und 35 (D) überprüft. Gefärbt wurde mit Antikörpern gegen CD3 (APC) und CD4 (PE). Es wurden nur Zellen im Lymphozytenfenster analysiert. Gezeigt sind die charakteristischen Daten jeweils einer Maus pro Gruppe am Tag der Infektion.

(B/C) Die Biolumineszenzanalysen und die Viruslast in den Organen an Tag 13 nach Infektion wurden, wie in Abb. 10 beschrieben, ermittelt.

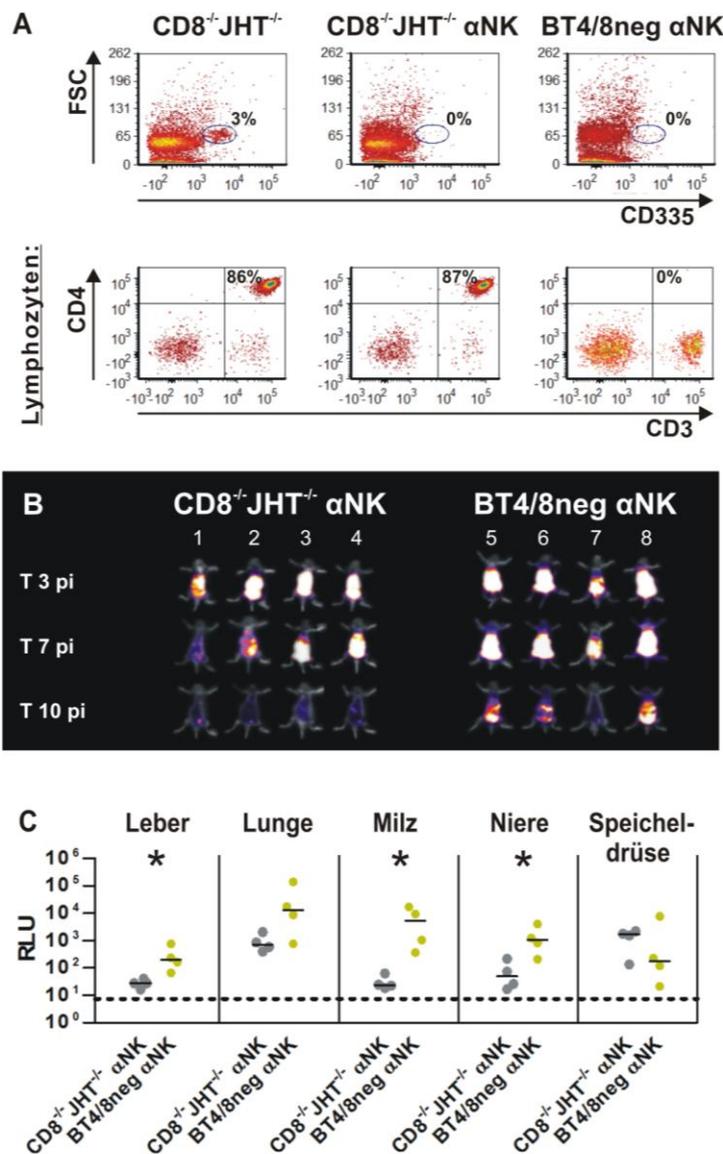
(D) Je fünf CD8<sup>-/-</sup>JHT<sup>-/-</sup> und BT4/8neg Mäuse wurden mit MCMV157luc infiziert. Die Daten für RAG<sup>-/-</sup> Mäuse wurden aus einem anderen Versuch unter gleichen Bedingungen gewonnen. (p < 0,005)

Vier  $CD8^{-/-}JHT^{-/-}$  und vier BT4/8neg Mäuse wurden mit MCMV157luc infiziert. In den Biolumineszenzbildern wurde an Tag 3 und 9 nach Infektion vergleichbare Luziferaseaktivität für alle Tiere detektiert. Lediglich an Tag 7 nach Infektion zeigten BT4/8neg Mäuse stärkere Luziferaseaktivität als die Vergleichsgruppe. Diese war an Tag 13 nach Infektion in den verschiedenen Organen (Verweis Abb. 25C) von BT4/8neg Mäusen um maximal eine log Stufe signifikant erhöht. Nur in der Niere konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Daraus ließ sich folgern, dass  $CD8^{-/-}JHT^{-/-}$  Mäuse die Infektion besser bzw. schneller kontrollieren als BT4/8neg Mäuse. Die Überlebenskurve zeigte allerdings, dass auch Mäuse ohne B- und  $CD4/8^{+}$  T-Zellen in der Lage sind eine MCMV-Infektion längerfristig zu kontrollieren und keiner der genannten Zelltypen dafür essentiell war.

### **Depletion von $CD4^{+}$ T-Zellen und/oder NK-Zellen**

Eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Virusinfektionen spielen neben den schon getesteten Zelltypen auch die NK-Zellen. Sie reduzieren den Virustiter in den Organen z.B. in der Leber innerhalb der von drei bis fünf Tagen nach Infektion (Scalzo et al., 1990). Für die Etablierung echter Latenz ist allerdings die Unterstützung der adaptiven Immunität notwendig (Krpmotic et al., 2003). Bei einer normalen Infektion von C57BL/6 Mäusen mit wt MCMV werden NK-Zellen durch Bindung ihres Ly49H Rezeptors an das viral kodierte Protein m157 auf der Oberfläche von infizierten Zellen aktiviert (Brown et al., 2001; Daniels et al., 2001; Kielczewska et al., 2007; Lee et al., 2001). Im Genom der hier verwendeten Viren ist m157 durch das Luziferasegen ersetzt, so dass der beschriebene Ablauf außer Kraft gesetzt wird. Daher sollte der Schutzeffekt dieser Zellen im Falle der MCMV157luc-Infektion vernachlässigbar sein.

Allerdings besteht die Möglichkeit, dass NK-Zellen zusätzlich oder kompensatorisch durch einen weiteren, m157 unabhängigen Mechanismus wie z.B. durch klassische Aktivierung über verringerte MHC I-Expression auf der Oberfläche infizierter Zellen, schützen. Dokun et al. (2001) zeigten, dass NK-Zellen in der frühen Phase der MCMV-Infektion unabhängig von Ly49H proliferierten und IFN $\gamma$  produzierten. Außerdem sind verschiedene NK-Zellpopulationen in der Lage T-Zellen über Zytokine zu beeinflussen (Andoniou et al., 2008; Su et al., 2001). Um die Schutzfunktion von NK-Zellen und ein mögliches Zusammenspiel mit  $CD4^{+}$  Zellen zu überprüfen, wurden in jeweils vier  $CD8^{-/-}JHT^{-/-}$  Tieren entweder nur die NK-Zellen ( $CD8^{-/-}JHT^{-/-}$   $\alpha$ NK) oder NK- und  $CD4^{+}$  T-Zellen (BT4/8neg  $\alpha$ NK) durch Antikörpergabe depletiert. An den Tagen -1 und 6 wurden entweder nur 500  $\mu$ g PK-136 Antikörper gegen NK1.1, oder zusätzlich 300  $\mu$ g YTS 191 an den Tagen -1, 3 und 6, intraperitoneal appliziert. Wie zuvor wurde die erfolgreiche Depletion überprüft.



**Abb. 26: Verlauf der Infektion in CD8<sup>-/-</sup>JHT<sup>-/-</sup> Mäusen ohne NK-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

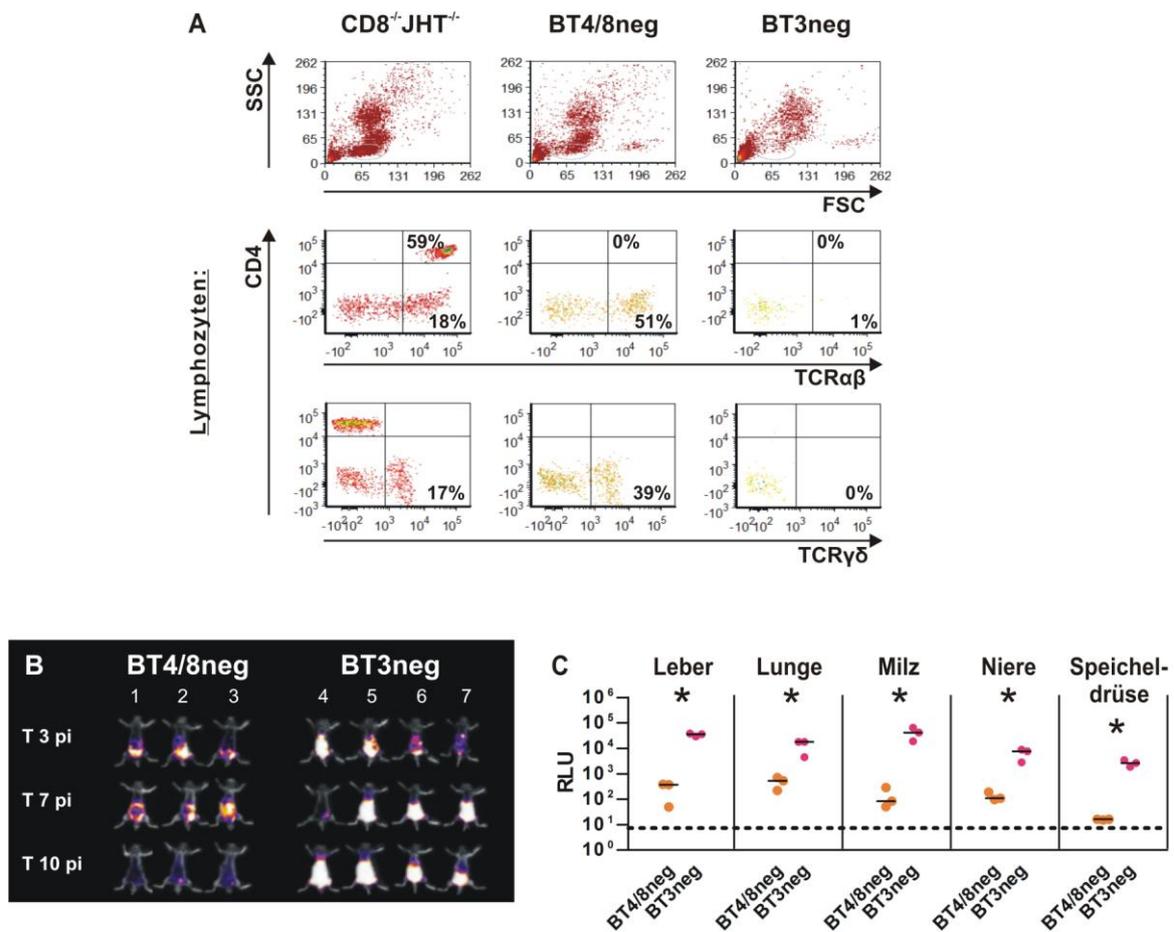
**(A)** Die erfolgreiche Depletion wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse des Blutes an Tag 0 und 13 überprüft. Gefärbt wurde mit Antikörpern gegen CD335 (FITC) bzw. gegen CD3 (APC) und CD4 (PE). Analysiert wurden für die zweite Färbung nur die Zellen im Lymphozytenfenster. Gezeigt sind die charakteristischen Daten jeweils einer Maus pro Gruppe am Tag der Infektion, sowie einer Kontrolle.

**(B/C)** Die Biolumineszenzanalysen und die Viruslast in den Organen an Tag 13 nach Infektion wurden, wie in Abb. 10 beschrieben, ermittelt.

Die Tiere wurden mit MCMV157luc infiziert und zeigten in den Biolumineszenzanalysen schon an Tag 3 und 7 nach Infektion starke Luziferaseaktivität. An Tag 10 nach Infektion war diese bei NK-zelldepletierten Tieren kaum noch sichtbar, während sie in doppelt depletierten Tieren noch messbar, aber im Vergleich zu Tag 7 nach Infektion deutlich reduziert war. Trotz der im Vergleich zu undepletierten Tieren (Abb. 25) stärker ausgeprägten Primärinfektion zeigten CD8<sup>-/-</sup>JHT<sup>-/-</sup> αNK und BT4/8neg αNK eine für erstere deutliche Tendenz zur Viruskontrolle. Die relative Viruslast in den Organen von NK-zelldepletierten Tieren war an Tag 13 nach Infektion annähernd auf Hintergrundniveau reduziert. Für doppelt depletierte Tiere waren die Werte zu diesem Zeitpunkt noch teilweise signifikant erhöht, aber die Biolumineszenzanalysen deuteten auf eine spätere Kontrolle hin.

### **Depletion von CD3<sup>+</sup> und/oder CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Bis hierher zeigten die Daten, dass selbst BT4/8neg  $\alpha$ NK Mäuse, welchen alle konventionellen Effektorzellen durch Deletion (CD8<sup>+</sup> T-Zellen, B-Zellen) oder Depletion (CD4<sup>+</sup> T-Zellen, NK-Zellen) entfernt wurden, die MCMV-Infektion kontrollieren. Es stellte sich die Frage, was unterscheidet die geschützten mehrfach depletierten CD8<sup>-/-</sup>JHT<sup>-/-</sup> Mäuse von RAG<sup>-/-</sup> Mäusen, welche der Infektion erliegen? In RAG<sup>-/-</sup> Mäusen sind nicht nur die konventionellen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen deletiert, sondern durch eine Deletion im Bereich der Rekombinase aktivierenden Gene (RAG-1) gibt es keine funktionellen B- und T-Zellen. In CD8<sup>-/-</sup>JHT<sup>-/-</sup> sind alle B-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen deletiert. Nach Depletion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen bleiben diesen Tieren nur noch CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, also DN T-Zellen, welche sie, die zelluläre Ausstattung betreffend, von RAG<sup>-/-</sup> Mäusen differenzieren. DN T-Zellen sind in der Lage Perforin und Granzym sowie verschiedenste Zytokine zu produzieren und lassen sich aufgrund der Zusammensetzung ihres TCR in zwei Gruppen unterteilen, welche ähnliche Funktionen übernehmen können (Hayday, 2000). Bei der einen besteht er, wie bei der Mehrheit aller T-Zellen, aus einer  $\alpha$  und einer  $\beta$  Kette. CD3<sup>+</sup>DN TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> Zellen, im Folgenden mit TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> abgekürzt, sind vor allem im Knochenmark, Leber und Thymus zu finden. Innerhalb der zweiten Gruppe setzt sich der TCR aus einer  $\gamma$  und einer  $\delta$  Kette zusammen. Diese Zellen sind oft in immunregulatorischen Prozessen gegen unterschiedlichste Pathogene und Tumorbekämpfung involviert und werden künftig mit TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> abgekürzt. Durch Entfernen aller T-Zellen inklusive der DN T-Zellen, sollte ein mit RAG<sup>-/-</sup> Mäusen vergleichbares zelluläres Milieu geschaffen werden, in welchem die Protektion getestet werden konnte. Hierfür wurden Antikörper gegen CD3 verabreicht. Der einzige verfügbare, Antikörper gegen CD3 (145-2C11) bindet an die  $\epsilon$ -Kette dieses Moleküls (Leo et al., 1987). Er unterbindet die T-Zell Funktion *in vivo* durch Modulation des CD3-Komplexes und Depletion (Hirsch et al., 1988). Gleichzeitig führt die Bindung an CD3 $\epsilon$  zur unspezifischen Proliferation aller CD3<sup>+</sup> Zellen (Cron et al., 1989; Leo et al., 1987). Um der damit einhergehenden Zytokinausschüttung entgegenzuwirken, wurden vier Tage vor Infektion zuerst alle CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Verabreichung von 700  $\mu$ g YTS 191 Antiörper entfernt. Am Tag vor Infektion und zwei Tage nachher wurde die Funktion der DN T-Zellen mit 250  $\mu$ g 145-2C11 Antikörper depletiert. Dementsprechend wurden die Tiere BT3neg genannt. Die Vergleichsgruppe der BT4/8neg Mäuse wurde, wie zuvor beschrieben, behandelt und die erfolgreiche Depletion mittels durchflusszytometrischer Analyse des Blutes bestätigt. Da es keinen weiteren CD3-spezifischen Antikörper zum Identifizieren der CD3<sup>+</sup> Zellen gab, mussten diese indirekt über ihren TCR nachgewiesen werden. Jeweils drei BT4/8neg und vier BT3neg Mäuse wurden mit MCMVAB infiziert.



**Abb. 27: Verlauf der Infektion in CD8<sup>-/-</sup> JHT<sup>-/-</sup> Mäusen ohne CD3<sup>+</sup> T-Zellen**

**(A)** Die erfolgreiche Depletion wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse des Blutes an Tag 0 und 13 überprüft. Gefärbt wurde mit Antikörpern gegen CD4 (PE), TCRαβ (PE-Cy7) und gegen TCRγδ (FITC). Gezeigt sind repräsentative Daten jeweils einer Maus pro Gruppe an Tag 13, sowie einer Kontrolle.

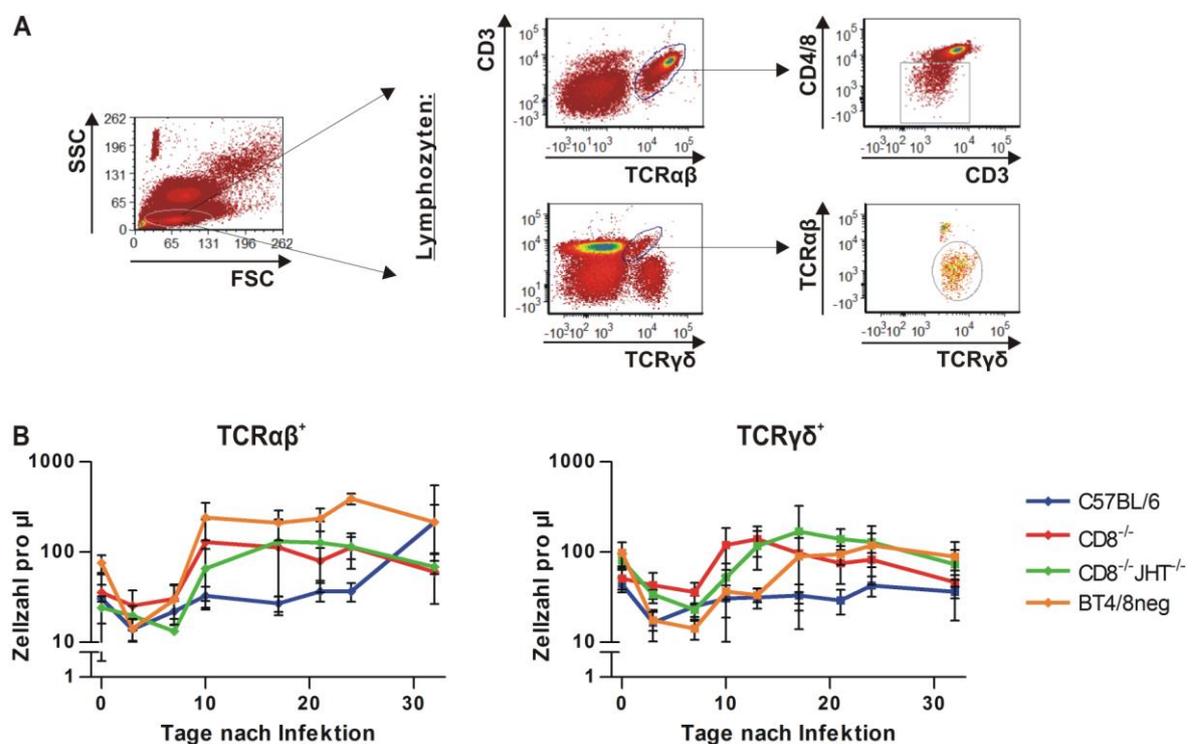
**(B/C)** Die Biolumineszenzanalysen und die Viruslast in den Organen an Tag 13 nach Infektion wurden, wie in Abb. 10 beschrieben, ermittelt.

Wie die Biolumineszenzanalysen zeigen, verlief die Infektion an den Tagen 3 und 7 in beiden Gruppen ähnlich. An Tag 10 jedoch, als BT4/8neg Mäuse die Infektion bereits kontrollierten, war in der zweiten Gruppe immer noch sehr starke Luziferaseaktivität detektierbar. Auch in allen untersuchten Organen dieser Tiere war der Virustiter an Tag 13 nach Infektion signifikant erhöht. Eine Maus (#4) verstarb überraschend bereits an Tag 12 nach Infektion. CD8<sup>-/-</sup> JHT<sup>-/-</sup> Mäuse ohne CD3<sup>+</sup> T-Zellen sind demnach vergleichbar mit RAG<sup>-/-</sup> Mäusen und ebenso nicht in der Lage die MCMV-Infektion zu kontrollieren.

### Proliferation von CD3<sup>+</sup> DN TCRαβ<sup>+</sup> und TCRγδ<sup>+</sup> Zellen in BT4/8neg Mäusen

Da BT4/8neg Mäuse die MCMV-Infektion kontrollieren, BT3neg Mäuse dagegen nicht, muss es sich bei dem zugrundeliegenden Schutzmechanismus in BT4/8neg Mäusen um CD3<sup>+</sup> DN Zellen handeln. Diese unkonventionellen, protektiven Effektorzellen sollten anhand ihrer spezifischen Oberflächenmarker näher charakterisiert werden. Außerdem stellte sich die Frage, ob es sich bei dieser Effektorfunktion um einen kompensatorischen Mechanismus handelt, welcher nur in BT4/8neg Mäusen auftritt, oder ob diese Effektorzellen in anderen Mausstämmen analog sind.

Je vier C57BL/6, CD8<sup>-/-</sup>, CD8<sup>-/-</sup>JHT<sup>-/-</sup> und BT4/8neg Mäuse wurden mit MCMVAB infiziert. An den Tagen 0, 3, 7, 10, 13, 17, 21, 24 und 32 wurden einige Tropfen Vollblut im Durchflusszytometer analysiert. Die Anzahl der pro µl detektierten TCRαβ<sup>+</sup> und TCRγδ<sup>+</sup> Zellen wurden gegen die Entnahmezeitpunkte aufgetragen.



**Abb. 28: Proliferation von TCRαβ<sup>+</sup> und TCRγδ<sup>+</sup> T-Zellen in verschiedenen Mausstämmen nach Infektion mit MCMV**

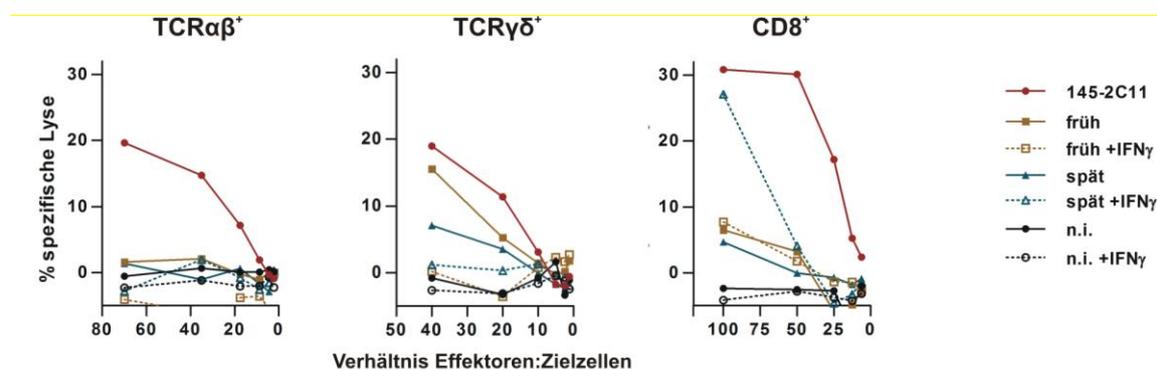
**(A)** Das Blut von je vier infizierten C57BL/6, CD8<sup>-/-</sup>, CD8<sup>-/-</sup>JHT<sup>-/-</sup> und BT4/8neg Mäusen wurde im Verlauf der Infektion mehrfach im Durchflusszytometer analysiert. Je 25 µl Blut wurden mit Antikörpern gegen CD3 (PE), CD4 und 8 (AF700), TCRαβ (PE-Cy7) und TCRγδ (FITC) gefärbt. Die Lymphozyten wurden nach Expression von CD3 und zusätzlich TCRαβ oder TCRγδ eingeteilt. Bei TCRαβ<sup>+</sup> Zellen musste die CD4<sup>+</sup> und die CD8<sup>+</sup> Population abgezogen werden. Für TCRγδ<sup>+</sup> Zellen war eine Feinjustierung notwendig um TCRαβ<sup>+</sup> Zellen auszuschließen.

**(B)** Die Mittelwerte (+/- SD) der pro µl detektierten TCRαβ<sup>+</sup> bzw. TCRγδ<sup>+</sup> wurden gegen die Entnahmezeitpunkte aufgetragen.

DN T-Zellen wurden in naiven Mäusen aller Stämme gefunden. Die durchschnittlich detektierten Zellzahlen lagen für  $\text{TCR}\alpha\beta^+$  T-Zellen bei 24 bis 76 und für  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  T-Zellen bei 44 bis 99. Innerhalb von sieben Tagen nach Infektion sank die Anzahl beider Zelltypen in allen Stämmen stark ab und es kam zu einer Lymphopenie (Kamphuis et al., 2006). Danach proliferierten sowohl  $\text{TCR}\alpha\beta^+$  als auch  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  T-Zellen und erreichten gleiche oder höhere Werte als vor Infektion. Insgesamt wurden nach der Lymphopenie höhere Zellzahlen von  $\text{TCR}\alpha\beta^+$  T-Zellen gemessen als von  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  T-Zellen. Für C57BL/6 Mäuse (blau) war dieser Verlauf weniger stark ausgeprägt. Trotzdem wurde eine Beeinflussung von DN T-Zellen durch MCMV-Infektion in allen vier Mäusstämmen festgestellt.

#### 4.5 Zytotoxisches Potential von TCR $\alpha\beta^+$ und TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellen *in vitro*

Um die protektiven Eigenschaften von TCR $\alpha\beta^+$  bzw. TCR $\gamma\delta^+$  T-Zellen genauer zu untersuchen wurde ein Zytolysetest durchgeführt. Damit wurde *in vitro* überprüft ob DN Effektorzellen infizierte Zellen ähnlich wie CD8 $^+$  T-Zellen lysieren. Die Effektorzellen wurden aus Lymphknoten und Milzen von vier Wochen infizierten CD8 $^{-/-}$ JHT $^{-/-}$  Tieren mit einer Reinheit von 98 % isoliert und über Nacht in RPMI 1640 Medium (100 U/ml Penicillin und 100 mg/l Streptomycin, 350 mg/l L-Glutamin, 10 mM HEPES, 5  $\mu$ M  $\beta$ -ME, 7,5 % FKS, 20 U/ml IL-2) ohne zusätzliche Stimulation kultiviert. Zur Kontrolle des korrekten Versuchsaufbaues wurden 7 Tage nach Infektion mit MCMV wt die CD8 $^+$  T-Zellen von C57BL/6 Mäusen isoliert und mit einer Anfangskonzentration von 200 Effektoren mitgeführt. Für TCR $\alpha\beta^+$  wurde die Titration mit 70 und für TCR $\gamma\delta^+$  mit 40 Effektorzellen begonnen.



**Abb. 29: Zytolysetest doppelt negativer Zellen**

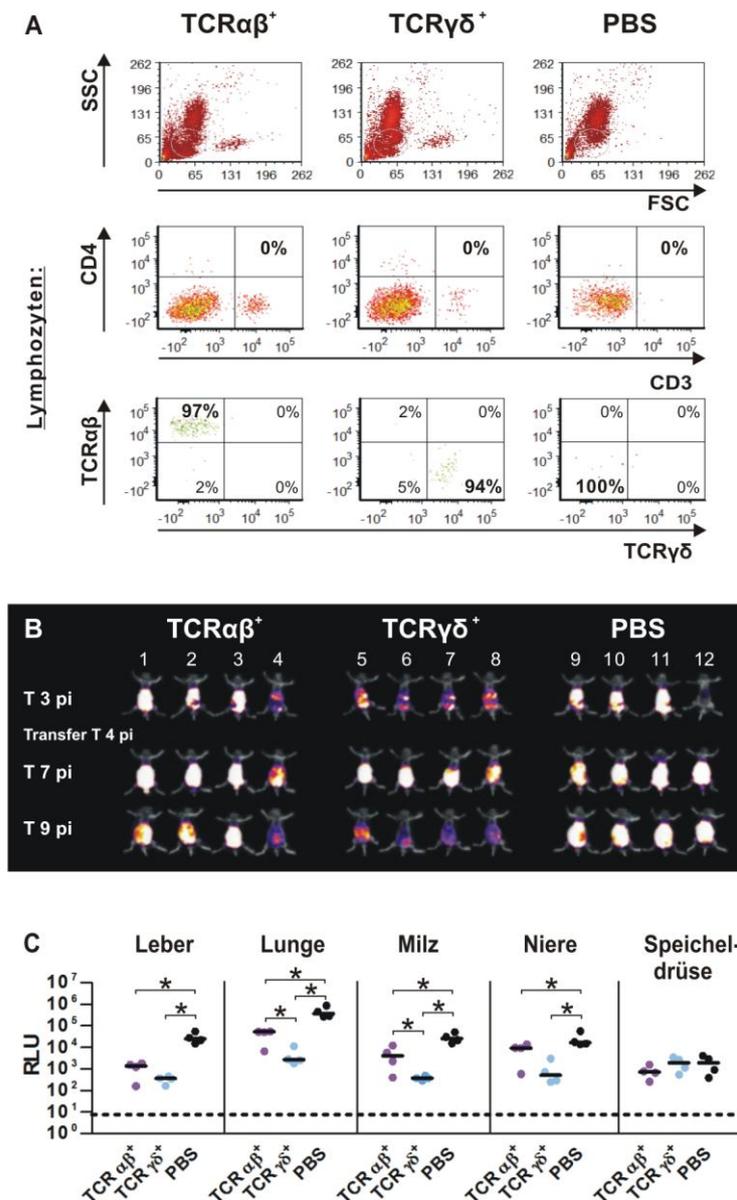
In Triplikaten wurden TCR $\alpha\beta^+$ , TCR $\gamma\delta^+$  und CD8 $^+$  Effektorzellen im angegebenen Verhältnis zu unterschiedlich behandelten,  $^{51}$ Chrom markierten Zielzellen (früh, spät und nicht infiziert; +/- IFN $\gamma$ ) titriert. Nach vier Stunden wurde die frei werdende Radioaktivität gemessen. Die spezifische Lyse wurde berechnet und der Mittelwert gegen die eingesetzte Effektorzellzahl aufgetragen.

Dabei wurden verschiedene Zielzellen verwendet. Um herauszufinden ob TCR $\alpha\beta^+$  und TCR $\gamma\delta^+$  Zellen grundsätzlich eine zytolytische Funktion übernehmen können, wurden CD3 $\epsilon^+$  B-Zell-Hybridome eingesetzt. Diese binden antigenunabhängig an die CD3 $\epsilon$  Kette der Effektoren und aktivieren damit die Zytolyse, falls die gewählten Effektoren dazu in der Lage sind. Die rote Kurve zeigt, dass sowohl TCR $\alpha\beta^+$  als auch TCR $\gamma\delta^+$  Zellen zur Zytolyse befähigt waren und bei einem Effektor:Zielzellen Verhältnis von 70:1 bzw. 40:1 20 % der Zielzellen lysierten. Dies entsprach der Zytolysekapazität von CD8 $^+$  T-Zellen bei einem Verhältnis von 25:1. Darüber hinaus konnten TCR $\alpha\beta^+$  T-Zellen keine der angebotenen Zielzellen spezifisch lysieren. Des Weiteren wurden frühinfizierten Zielzellen (früh) eingesetzt, welche durch Arretierung des viralen Replikationszyklus nur Proteine der frühen Phase präsentieren konnten. Im Gegensatz dazu zeigten spätinfizierte Zellen (spät) Antigene sämtlicher Infektionsphasen. Eine verstärkte Oberflächenexpression der viralen Proteine auf infizierten Zellen sollte durch Zugabe von IFN $\gamma$  erreicht werden. CD8 $^+$  T-Zellen lysierten frühinfizierte, IFN $\gamma$  behandelte MEF in hohen Konzentrationen doppelt so gut

wie spätinfizierte oder unbehandelte Zielzellen. Dieser Effekt ist bei  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  nicht zu beobachten. Sie lysierten unbehandelte, frühinfizierte Zellen am besten, spätinfizierte Zellen schwächer und  $\text{IFN}\gamma$  behandelte Zellen überhaupt nicht. Demnach musste der Stimulus für die Zytolyse ein Protein sein, das in der frühen Phase der Infektion exprimiert wurde und dessen Oberflächenexposition durch  $\text{IFN}\gamma$  nicht gesteigert, sondern verringert wurde. Als Negativkontrolle wurden uninfizierte MEF als Zielzellen eingesetzt. Keine der getesteten Effektorzelltypen lysierte unpezifisch naive Zellen.

### 4.6 Adoptiver Transfer von TCR $\alpha\beta^+$ und TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellen nach Infektion mit MCMV

Als nächstes wurde die Protektionskapazität der Effektorzellen *in vivo* untersucht. Da TCR $\alpha\beta^+$  T-Zellen *in vitro* grundsätzlich cytolytisch aktiv waren und der benötigte, bisher unbekannte Stimulus *in vivo* vorhanden sein könnte, wurden auch sie getestet. Drei Gruppen mit je vier immundefizienten RAG $^{-/-}$  Mäusen wurden mit MCMVAB infiziert. Die produktive Infektion wurde durch Biolumineszenzanalysen an Tag 3 nach Infektion bestätigt. An Tag 4 nach Infektion wurden TCR $\alpha\beta^+$  und TCR $\gamma\delta^+$  T-Zellen mit einer Reinheit von mehr als 99 % aus den Lymphknoten von sechs Wochen mit MCMV157luc infizierten BT4/8neg Donoren isoliert. Je 800 000 Zellen wurden pro Tier transferiert. Die Kontrollgruppe erhielt PBS. Zwölf Tage nach Infektion wurden die transferierten Zellen mittels durchflusszytometrischer Analyse in Blut (Abb. 30A), Milz und Lymphknoten (nicht gezeigt) der Rezipienten detektiert. Die Daten bestätigten, dass keine zusätzlichen Zellen z.B. durch ungenügende Reinheit übertragen wurden und waren im Blut und den untersuchten Organen ähnlich.



**Abb. 30: Adoptiver Transfer von TCR $\alpha\beta^+$  und TCR $\gamma\delta^+$  Effektorzellen in infizierte RAG $^{-/-}$  Mäuse**

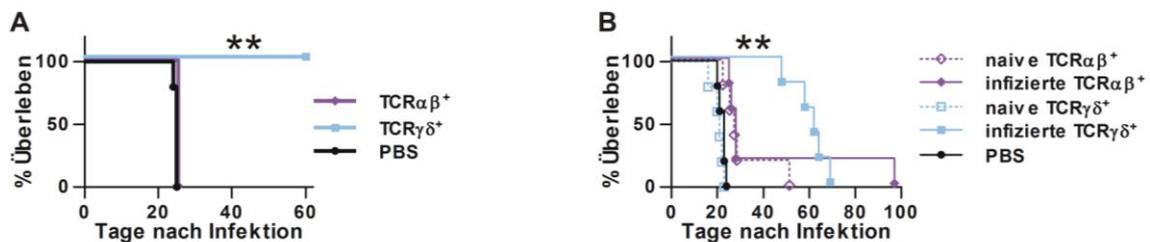
800 000 TCR $\alpha\beta^+$  bzw. TCR $\gamma\delta^+$  T-Zellen aus infizierten CD8 $^{-/-}$ JHT $^{-/-}$  Donoren oder PBS wurden in vier Tage infizierte RAG $^{-/-}$  Mäuse transferiert.

**(A)** Durchflusszytometrische Analyse des Blutes der Rezipienten zwölf Tage nach Infektion. Gefärbt wurde mit Antikörpern gegen CD3 (APC), CD4 (PE), TCR $\alpha\beta$  (PE-Cy7) und TCR $\gamma\delta$  (FITC). Gezeigt sind die charakteristischen Daten jeweils einer Maus pro Gruppe.

**(B)** Die Biolumineszenzanalysen wurden wie in Abb. 10 durchgeführt.

**(C)** Die Viruslast in den Organen der Tiere aus Abb. 30B wurde an Tag 12, wie in Abb. 10 beschrieben, ermittelt.

An Tag 7 nach Infektion zeigten die Biolumineszenzanalysen vergleichbare Luziferaseaktivität in allen Tieren. In TCR $\gamma\delta^+$  Rezipienten war diese an Tag 10 nach Infektion leicht abgeschwächt. Daraus ließ sich auf einen protektiven Effekt von TCR $\gamma\delta^+$  Zellen schließen, der allerdings nicht sofort nach Transfer eintrat, sondern einige Tage Inkubationszeit benötigte. TCR $\gamma\delta^+$  Rezipienten zeigten an Tag 12 nach Infektion in allen Organen außer der Speicheldrüse signifikant niedrigere Virustiter als die PBS Kontrollgruppe. Auch die Virustiter von TCR $\alpha\beta^+$  Rezipienten waren in diesen Organen signifikant niedriger. Sie lagen zwischen den Werten der beiden anderen Gruppen und unterschieden sich von TCR $\gamma\delta^+$  Rezipienten signifikant in Lunge und Milz. In einem weiteren Versuch wurden je 450 000 Zellen transferiert, welche nicht aus Lymphknoten, sondern aus der Milz von infizierten CD8 $^{-/-}$ JHT $^{-/-}$  Mäusen isoliert wurden (nicht gezeigt). Dabei wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. Demnach wären TCR $\gamma\delta^+$  und auch TCR $\alpha\beta^+$  T-Zellen *in vivo* eine Schutzfunktion gegen MCMV zuzuordnen.



**Abb. 31: Überleben nach adoptivem Transfer von TCR $\alpha\beta^+$  und TCR $\gamma\delta^+$  Zellen in infizierte RAG $^{-/-}$  Mäuse (A)** 170 000 TCR $\alpha\beta^+$  bzw. TCR $\gamma\delta^+$  T-Zellen aus infizierten CD8 $^{-/-}$ JHT $^{-/-}$  Donoren oder PBS wurden in 3 Tage infizierte RAG $^{-/-}$  Mäuse transferiert. **(B)** 150 000 TCR $\alpha\beta^+$  bzw. TCR $\gamma\delta^+$  T-Zellen aus infizierten oder naiven CD8 $^{-/-}$ JHT $^{-/-}$  Donoren oder PBS wurden in drei Tage infizierte RAG $^{-/-}$  Mäuse transferiert. Signifikanz sind im Vergleich zu PBS angegeben.

Für Überlebenstests wurden je 170 000 Zellen mit 99 %-iger Reinheit aus den Lymphknoten von vier Wochen infizierten CD8 $^{-/-}$ JHT $^{-/-}$  Mäusen isoliert und adoptiv transferiert. In durchflusszytometrischen Analysen des Blutes von TCR $\alpha\beta^+$  Rezipienten wurden 14 Tage nach Infektion CD4 $^+$  T-Zellen entdeckt (Daten nicht gezeigt). An Tag 24 wurde diese Population neben TCR $\alpha\beta^+$  Zellen verstärkt nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Die Tiere zeigten Anzeichen einer entzündlichen Darmerkrankungen in Form von Diarrhöe und Gewichtsverlust, welche oft nach Transfer von CD4 $^+$  T-Zell beobachtet wird (Trobonjaca et al., 2001). Daher wurden sie 25 Tage nach Infektion euthanasiert. Sie mussten aus der Auswertung ausgeschlossen werden, da ihr Ableben nicht auf die fehlende Protektion durch TCR $\alpha\beta^+$  reduziert werden konnte. 60 Tage nach Infektion wurde der Versuch beendet und die überlebenden Tiere, welche keine Anzeichen von Krankheit zeigten, getötet. Wie die Überlebenskurve zeigt, sind TCR $\gamma\delta^+$  T-Zellen längerfristig in der Lage immundefiziente RAG $^{-/-}$  Mäuse vor den lethalen Folgen einer MCMV-Infektion zu schützen. In einem weiteren Versuch sollte neben der Protektionskapazität von präadaptierten CD3 $^+$ DN T-Zellen auch naive Zellen getestet werden. Es wurden 150 000 TCR $\alpha\beta^+$  bzw.

TCR $\gamma\delta^+$  T-Zellen mit 99 %-iger Reinheit aus Milz und Lymphknoten von naiven und sechs Monate infizierten CD8 $^{-/-}$ JHT $^{-/-}$  Mäusen isoliert und an Tag 3 nach Infektion in RAG $^{-/-}$  Rezipienten transferiert. Zehn Tage nach Infektion wurden die transferierten Zellen ohne Verunreinigung mittels durchflusscytometrischer Analyse detektiert (Daten nicht gezeigt). In diesem Versuch waren präadaptierte TCR $\gamma\delta^+$  Zellen in der Lage das Überleben der Rezipienten signifikant zu verlängern. Letztendlich konnten sie aber kein dauerhaftes Überleben bis zur Beendigung des Versuches gewährleisten. TCR $\alpha\beta^+$  transferierte Tiere erlagen der Infektion im gleichen Zeitraum wie die Kontrollgruppe welche PBS erhalten hatte oder Rezipienten von naiven Zellen. Damit wurde bestätigt, dass die Präadaption in infizierten Tieren der wesentliche Faktor ist, der transferierten Zellen eine Schutzfunktion ermöglicht. Nur präadaptierte TCR $\gamma\delta^+$  T-Zellen vermittelten Schutz gegen eine MCMV-Infektion.

## 5 Diskussion

### 5.1 Viruskontrolle durch ADCC

An der MCMV Immunkontrolle sind mehrere Ebenen von angeborenen und adaptiven, teilweise redundanten, zellulären Abwehrmechanismen beteiligt (Polic et al., 1998). Dabei sind die Funktionen von NK- und T-Zellen gut erforscht (Arens et al., 2008; Karrer et al., 2003; Moss and Khan, 2004; Reddehase et al., 1987; Smith et al., 2002; Tay et al., 1999; Vidal and Lanier, 2006). Über die Protektion durch Antikörper existieren dagegen weniger Daten (Jonjic et al., 1994; Klenovsek et al., 2007). Besonders die Wirkungsweise nicht neutralisierender Antikörper bedarf genauerer Untersuchung. Bereits 1980 wurde die Bedeutung von ADCC bei der Kontrolle der CMV-Infektion von Quinnan und Manischewitz eruiert (Quinnan et al., 1980). Damals wurde der Ausdruck ADCC allerdings nicht nach der heutigen Definition benutzt, sondern ein ADCC-Test zur Bestimmung der Antikörpertiter im Blut verwendet. Dabei wurde jedoch nicht zwischen CTL- und NK-Zell-vermittelter Lyse unterschieden und somit ADCC nach heutiger Definition nicht eindeutig nachgewiesen. Der direkte Nachweis von ADCC im Verlauf der MCMV-Infektion fehlt bis heute. In der Zwischenzeit gab es jedoch verschiedene Hinweise, dass Neutralisation von freien Viruspartikeln nicht die einzige Schutzfunktion von CMV-spezifischen Antikörpern ist. Beispielsweise postulierten Farrell et al. (1991), dass das *in vivo* Protektionspotential von mabs nicht von ihrer Neutralisationskapazität *in vitro* abgeleitet werden kann. Begründet wurde diese These durch Schutzversuche, in welchen sechs verschiedene mabs gegen Strukturproteine jeweils 66 - 100 % der Versuchstiere vor den tödlichen Folgen der MCMV Infektion schützten. Diese Protektion war unabhängig vom *in vitro* Neutralisations-titer der verabreichten Antikörper. Folglich könnten Antikörper mit schwächerer *in vitro* Neutralisationskapazität durch ADCC *in vivo* zusätzlichen Schutz bieten. Des Weiteren schützte das Serum von immunkompetenten, infizierten Donoren nach adoptivem Transfer in immundefiziente Rezipienten diese besser vor den Folgen der MCMV-Infektion, als Serum von Mäusen die mit inaktiviertem MCMV immunisiert wurden (Dissertation Anna Bootz, Universität Erlangen). Nach Immunisierung werden nur Antikörper gegen im Viruspartikel enthaltene Strukturproteine gebildet. Bei Infektion entstehen natürlicherweise auch Antikörper gegen sehr frühe und frühe nicht strukturelle Antigene. Diese im Serum infizierter Mäuse zusätzlich enthaltenen Antikörper könnten die Ursache für das verbesserte Protektionspotential sein, indem sie die Eliminierung infizierter Zellen über ADCC vermitteln. Selbstverständlich kann diese Aufgabe auch von neutralisierenden Antikörpern übernommen werden. Allerdings sind 90 % der gegen hgB induzierten Antikörper nicht neutralisierend (Potsch et al., 2011). Da diese teilweise mit neutralisierenden Antikörpern um die Bindestellen kompetieren, bringt dies einen Vorteil für das Virus (Speckner et al., 1999). Deshalb wäre es für den Wirt sinnvoll, wenn diese Mehrheit der Antikörper eine Funktion hätte. In anderen viralen Systemen wie beispielsweise der HIV-Infektion wurde dies *in vivo* bereits bewiesen (Tanneau et al., 1990). Nach den geringen

Schutzerfolgen von neutralisierenden Antikörpern in HIV-Vakzinierungsstudien wird aktuell über die Bedeutung der Induktion ADCC-fähiger Antikörper diskutiert (Wren and Kent, 2011). Auch für das zu CMV nah verwandte HSV wurde ADCC *in vivo* bestätigt (Lubinski et al., 2011). Daher ist es plausibel, dass dieser Mechanismus auch für CMV existiert.

Allerdings konnte ADCC im Zusammenhang mit der CMV-Infektion bis heute nicht überzeugend belegt werden. Neue Mutagenesemethoden in CMV-BACs und die Generierung spezifischer Antikörper erlaubten nun die vorliegende Annäherung an die Fragestellung. Einer der Gründe, weshalb hgB als heterologes Protein zum Einsatz kam, war die Verfügbarkeit vieler Antikörper mit unterschiedlicher Spezifität gegen dieses Protein. Des Weiteren wurde hgB als Zielprotein für die Insertion in MCMV und somit ultimativ für die Antikörpertherapie gewählt, da es *in vitro* und *in vivo* gut charakterisiert ist. Die 3D-Struktur von HSV-gB wurde kürzlich entschlüsselt (Heldwein et al., 2006). Da gB das innerhalb der Herpesviren am stärksten konservierte Protein darstellt (Nixdorf et al., 2000), konnte die hgB-Struktur *in silico* korrespondierend modelliert werden (Dr. Pia Rückert und Prof. Dr. Heinrich Sticht, Universität Erlangen). Auch die Immunantwort gegen dieses Protein ist gut erforscht. HgB ist sowohl im Menschen als auch in der Maus sehr immunogen. Auf Grund der strengen Spezifität führt die Verabreichung infektiöser HCMV-Partikel nicht zur Infektion von Mäusen. Allerdings bewirkt die Applikation einer einzelnen Dosis nicht infektiöser Partikel ohne Adjuvans bereits eine gute humorale Immunantwort, welche wie im humanen Serum vor allem Antikörper gegen gB und gH umfasst (Pepperl et al., 2000). Ebenso führten mehrfache Immunisierungen mit löslichem hgB zur Bildung von Antikörpern und langlebigen spezifischen Gedächtnis-B-Zellen (Hebeis et al., 2004).

Ein Problem bei der Infektion oder Immunisierung von Mäusen mit MCMV Viruspartikeln ist die unzureichende Trennung von extrazellulären Partikeln und Bestandteilen lysierter Zellen. Selbst nach mehreren Ultrazentrifugationsschritten über Puffer verschiedener Dichte, konnten Verunreinigungen durch Zellfragmente in der Viruspräparation nicht ausgeschlossen werden. In Western Blot Analysen von Präparationen der rekombinanten hgB-Viren führte dies zum Nachweis spezifischer hgB-Banden, welche auf das in infizierten Zellen exprimierte Protein zurückzuführen sein dürften. Durch neutralisierende hgB-spezifische Antikörper wurden die hgB-Viren nicht neutralisiert. Dies deutet darauf hin, dass hgB, wenn überhaupt, nur in so geringen Mengen in Viruspartikel integriert wird, dass es nicht für die Neutralisation über dieses Protein ausreicht. Ferner impliziert es, dass im Western Blot detektiertes hgB tatsächlich auf Verunreinigungen in der Präparation zurückzuführen ist. Die Expression von hgB *in vivo* wurde indirekt über den induzierten Antikörpertiter nachgewiesen. Theoretisch könnte dieser durch hgB-Verunreinigungen in der Präparation erzeugt werden. Allerdings wurden im Verlauf der MCMVhgB-Infektion steigende hgB-spezifische Antikörpertiter im Serum detektiert. Daraus lässt sich schließen, dass dieser eher durch hgB-Präsentation auf produktiv infizierten Zellen, als durch einmalige Applikation verursacht wurde.

In Schutzversuchen wurden zwei murine und ein humaner Antikörper gegen hgB getestet. Voraussetzung für den Einsatz des humanen Antikörpers war die Bindung von humanem

IgG1 an murine Fc-Rezeptoren. Dies wurde beispielsweise durch die Anwendung des humanisierten ADCC-induzierenden IgG1 Antikörpers Rituximab® in verschiedenen Mausmodellen bestätigt (Clynes et al., 2000; Huang et al., 2010). Für keinen der eingesetzten hgB-spezifischen Antikörper konnte *in vivo* eine Schutzfunktion nachgewiesen werden. Im Umkehrschluss bedeutet dies jedoch nicht, dass ADCC bei der Kontrolle des MCMV-Infektionsverlaufes keine Rolle spielt. Da es mit dem verwendeten Ansatz nicht möglich war eine Aussage über die ADCC-Fähigkeit des natürlicherweise gegen MCMV induzierten Antikörperrepertoires zu treffen, besteht nach wie vor die Option, dass Antikörper gegen virale Glykoproteine oder nicht strukturelle Proteine ADCC vermitteln. Es gibt verschiedene Szenarien, welche auch ADCC gegen hgB erlauben und den im Versuchsaufbau nicht erbrachten Nachweis begründen. Diese sollen im Folgenden erläutert werden:

In den vorliegenden Versuchen wurden drei hgB-spezifische Antikörper eingesetzt. Allerdings muss die fehlende Protektionskapazität der getesteten Antikörper nicht auf andere hgB-spezifische Antikörper oder gar auf Antikörper mit anderer Spezifität übertragbar sein. Legt man die auf Basis von HSV gB modellierte Struktur von hgB zugrunde, binden 27-287 und SM5-1 mit AD-1 und AD-4 an eher exponierte Stellen von hgB (Pötzsch et al., 2011). 27-39 erkennt ein konformationsabhängiges Epitop (Britt and Vugler, 1992). Allerdings können virale Fusionsproteine oft verschiedene, teilweise inaktive Konformationen einnehmen, um unkontrollierte Fusionsaktivität zu vermeiden. Beispielsweise sind bereits drei pH-abhängige Konformationen von Glykoprotein G des Vesicular Stomatitis Virus bekannt (Roche et al., 2008). Da die Postfusionskonformation unerwartete strukturelle Homologien zu HSV gB und damit wahrscheinlich ebenso zu CMV gB hat, ist es plausibel, dass auch für hgB verschiedene Konformationen existieren, bei welchen die Bindestellen für 27-287 und SM5-1 möglicherweise nicht so gut exponiert sind wie im postulierten Model der Post-Fusionskonformation (Heldwein et al., 2006; Roche et al., 2008). Obwohl Antikörperbindung an hgB mittels Immunfluoreszenz und durchflusszytometrischen Analysen nachgewiesen wurde, könnte es der Effektorzelle auf Grund ihrer Größe sterisch nicht möglich sein an den Fc-Teil des Antikörpers zu binden, wenn sich das von den verwendeten Antikörpern gebundene Epitop in einer strukturellen Nische des Proteins befindet. Besonders für SM5-1 ist dies naheliegend, da AD-4 in einer analog zu den bekannten Strukturen modellierten Pre- und Post-Fusionskonformation von hgB an der membranzugewandten Basis des Proteins lokalisiert ist (Dr. Pia Rücker und Prof. Dr. Heinrich Sticht, Dissertation Dr. Sonja Pötzsch, Universität Erlangen). Antikörper, welche sich in ihren Eigenschaften wie Bindung an besser exponierte Epitope oder Subtyp unterscheiden, sind eventuell in der Lage ADCC zu induzieren. Auch transferiertes Serum von hgB-immunisierten Mäusen konnte *in vivo* keinen Schutz vermitteln, obwohl es große Mengen an hgB-spezifischen Antikörpern enthielt. Diese Tatsache könnte damit erklärt werden, dass die ADCC-fähigen Antikörper im eingesetzten Serumpool von immunisierten Mäusen in zu geringen Konzentrationen enthalten waren.

Die Expression und Exposition von hgB auf der Oberfläche infizierter Zellen wurde mittels Immunfluoreszenz und durchflusszytometrischer Analysen nachgewiesen (Abb. 7). Dabei

wurde die Menge von hgB im Verhältnis zu anderen MCMV-kodierten Glykoproteinen nicht quantifiziert. Teilweise erwies sich der Nachweis von Oberflächen-hgB im Durchflusszytometer als schwierig. Daher besteht die Möglichkeit, dass trotz der Detektion von hgB die Menge des präsentierten Proteins nicht ausreichte um ADCC zu induzieren.

Eine weitere Eigenschaft von hgB ist, dass es ständig von der Oberfläche endozytiert wird. Dieser Mechanismus wurde für verschiedene herpesvirale Glykoproteine beschrieben, welche nach der Endozytose in die Virushülle integriert werden und existiert unter anderem auch bei gB von HSV und VZV (Beitia Ortiz de Zarate et al., 2007; Heineman and Hall, 2002). Allerdings gibt es noch kein einheitliches Konzept über dessen Bedeutung. Während beispielsweise die Endozytose von VZV gE wichtig für die Replikation des Virus *in vitro* und dessen Virulenz *in vivo* ist (Moffat et al., 2004), hat in anderen Fällen das experimentelle Inhibieren der Endozytose von Oberflächenproteinen keinen oder nur geringen Einfluss auf die Replikationsfähigkeit und die Komposition der Viruspartikel. Letzteres wurde exemplarisch für gB von PRV und HCMV demonstriert (Jarvis et al., 2002; Nixdorf et al., 2000). Da hgB auch mit bereits gebundenem Antikörper internalisiert wird, könnte dies während der Reaktivierung *in vivo* Vorteile für das Virus mit sich bringen. Internalisierte Antikörper werden im Lysosom abgebaut und stehen damit für die Immunantwort nicht mehr zur Verfügung. Für UL132 von HCMV wurde gezeigt, dass ein Großteil des oberflächenexponierten Proteins innerhalb von 20 Minuten endozytiert und dem TGN zugeführt wird (Kropff et al., 2010). Möglicherweise werden auch *in vivo* gebundene Antikörper mit dem Protein endozytiert, bevor Effektorzellen binden und ihre Zytolysefunktion erfüllen können.

Um dem vorzubeugen und einen auf die Endozytose von hgB zurückzuführenden Effekt auszuschließen, wurde das MCMVhgB<sup>Co</sup> Virus generiert. Verschiedentlich wurde gezeigt, dass das Entfernen von intrazellulären Di-Leucinen und tyrosinbasierten Transportmotiven die Internalisierung der entsprechenden herpesviralen Proteine verringern kann. Zum Beispiel trägt gB von HSV im C-Terminus mehrere dieser konservierten Motive. Die Deletion des C-Terminus oder die Unterbrechung der Di-Leucine führten zu einer verstärkten Oberflächenexpression von HSV-gB (Beitia Ortiz de Zarate et al., 2004; Fan et al., 2002). Des Weiteren wurde die Bedeutung der tyrosinbasierten Sequenzen durch die Bindung von gB-spezifischen Antikörpern an PRV-infizierte Monozyten demonstriert (Favoreel et al., 2002). Diese führte zur Internalisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes. Durch die Mutation von Tyrosin im Transportmotiv wurde dieser Prozess stark verringert. Auch von HCMV werden diese für andere Herpesviren beschriebenen Sortierungsmotive genutzt. HCMV UL132, welches genau wie hgB tyrosinbasierte Motive und Di-Leucine enthält, zeigte nach Mutation dieser Transportmotive extensive Oberflächenexpression im Vergleich zur vornehmlichen TGN-Lokalisation des wt Proteins (Kropff et al., 2010). Dieser Effekt trat stärker hervor je mehr der vier untersuchten Endozytosemotive mutiert wurden. Daher wurde bei MCMVhgB<sup>Co</sup> wie am Beispiel von HSV-gB der komplette intrazelluläre Part entfernt. Damit sollten alle Endozytosemotive

eliminiert werden. Für das MCMVhgB $\text{Co}^-$ -Virus konnte in Immunfluoreszenzfärbungen und durchflusszytometrischen Untersuchungen jedoch keine verstärkte Oberflächenexposition im Vergleich zu MCMVhgB detektiert werden (Abb. 7). Es wurden geringe Unterschiede in der Verteilung des Proteins beobachtet, da viral exprimierte hgB sowohl in den Zellen als auch auf der Oberfläche mehr aggregierte als hgB $\text{Co}^-$ . Auch bei gM von HCMV scheint das YxxO Motiv eine stärkere Rolle im intrazellulären Transport zum assembly compartment zu spielen, als für die Oberflächenendozytose (Krzyzaniak et al., 2007).

ADCC über hgB als Zielstruktur der Antikörper war für beide hgB Viren im gezeigten Versuchsaufbau nicht nachzuweisen. Die dafür angeführten möglichen Ursachen gründen größtenteils auf den charakteristischen Eigenschaften des als Zielstruktur verwendeten Proteins, wie Konformation, Oberflächenexpression und Endozytose. Daher könnte der Nachweis möglicherweise durch eine Änderungen des Antigens gelingen. Beispielsweise könnte die Oberflächenexpression von hgB verbessert werden, indem das Protein über Glycosylphosphatidylinositol an der Zelloberfläche verankert wird (Low, 1989; Paulick and Bertozzi, 2008). Dadurch wird die Endozytose verhindert. Eine andere Möglichkeit wäre ein Virus zu konstruieren, welches als heterologes Zielantigen ein zelluläres Protein exprimiert, das eine hohe Abundanz auf der Oberfläche sowie eine stabile Konformation aufweist und nicht endozytiert wird. Hierfür würden sich Oberflächenmarker von humanen Immunzellen eignen wie beispielsweise CD20, da eine Vielzahl von Antikörpern gegen diese Proteine angeboten wird.

## 5.2 MCMV Immunkontrolle in CD8 $^-/-$ Mäusen

Im gesunden Wirt wird die CMV Infektion durch vielschichtige Immuneffektor-mechanismen perfekt kontrolliert. CD8 $^+$  T-Zellen wird dabei vor NK- und CD4 $^+$  Zellen eine prominente Rolle zugeschrieben (Moss and Khan, 2004; Polic et al., 1998; Reddehase et al., 1987). Zu Beginn des zweiten Projekts wurde der Verlauf der MCMV-Infektion in C57BL/6 wt Mäusen und CD8 $^-/-$  Mäusen verglichen. Ein ähnliches Experiment wurde bereits in Mäusen mit BALB/c Hintergrund durchgeführt, in welchen nach Abklingen der Primärinfektion nur noch IE Genprodukte, aber keine produktiven Viren mehr nachgewiesen werden konnten (Jonjic et al., 1990). In CD8 $^-/-$  depletierten BALB/c Mäusen verlief die Infektion vergleichbar zu undepletierten Tieren. NK-Zellen von C57BL/6 Mäusen besitzen im Gegensatz zu BALB/c Mäusen einen aktivierenden Ly49H Rezeptor, welcher das virale Protein m157 bindet. Dies führt zu einer geringeren Suszeptibilität von C57BL/6 Mäusen gegen die MCMV-Infektion. Da im MCMV157luc-Virus m157 durch das Luziferasagen ersetzt wurde, fehlt bei Infektion mit dem rekombinanten Virus der Ligand für Ly49H. Folglich sollten die Empfänglichkeit für die rekombinanten Viren und der Verlauf der Infektion mit diesen in C57BL/6 und BALB/c Mäusen ähnlich sein (Bubic et al., 2004). Durch die vorliegenden Ergebnisse wurde dies bestätigt (Abb. 18-21). Für C57BL/6 und CD8 $^-/-$  Mäuse wurden keine Unterschiede den Infektionsverlauf oder die etablierte humorale Immun-

antwort betreffend festgestellt. In der Leber einer Maus wurden einzelne Viren durch Anzucht nachgewiesen. Dabei handelte es sich um sehr geringe Mengen, da reproduzierbar in Mehrfachansätzen nur ein Plaque in einem Ansatz detektiert wurde.

Zur Aufrechterhaltung der Latenz im immunkompetenten Wirt gibt es verschiedene Theorien (Kurz and Reddehase, 1999; Reddehase et al., 2002). Eine besagt, dass systemische Latenz weniger durch spezifische Kontrollfaktoren des Replikationszykluses innerhalb latent infizierter Zellen, sondern durch zelluläre Immunabwehrmechanismen bedingt ist (Polic et al., 1998). Demzufolge wird im asymptomatischen Wirt ständig latentes Virus in einzelnen Zellen reaktiviert, die Ausbreitung des Infekts aber durch Immuneffektorzellen unterbunden. Zellen, welche frühe virale Antigene exprimieren, werden beispielsweise von Gedächtnis-CTL eliminiert, bevor Virus produziert werden kann (Karrer et al., 2003; Kurz and Reddehase, 1999). Fehlen die CTL, wird die lokale Reaktivierung von anderen Effektoren wie NK-Zellen oder Antikörpern bekämpft und kann sich nicht ausbreiten (Jonjic et al., 1994; Polic et al., 1998). Die Detektion einzelner infektiöser Viruspartikel in den vorliegenden Versuchen impliziert, dass die Immunantwort, welcher eine Ebene fehlt, nicht 100 %-ig effektiv war. Trotz teilweiser Kompensation der Aufgaben von CTLs durch andere Zellen, ist das Netz der Immunkontrolle ohne CD8<sup>+</sup> Zellen nicht mehr so engmaschig und damit nicht komplett. Dies führte anscheinend dazu, dass gelegentlich wie in der untersuchten Leber einzelne infizierte Zellen in der frühen Phase des Replikationszykluses nicht erkannt wurden und infektiöse Partikel bilden konnten, bevor diese durch andere Effektorzellen eliminiert wurden. Für den gesamten Organismus verläuft der Infekt ohne CTL trotzdem mit vergleichbarer Kinetik und wird weiterhin kontrolliert. Nicht bestimmt wurde, ob es sich bei dem Nachweis von Virus in einem Organ eines Versuchstieres um einen extrem seltenen Einzelfall oder ein häufiger vorkommendes Ereignis handelt, das auch in anderen Organen beobachtet werden kann. Diese feinen Unterschiede bedürfen weiterer Untersuchungen und einer Bestimmung der Frequenz von Viruspartikeln.

### 5.3 DN T-Zellen

Im Verlauf der Arbeit wurden DN T-Zellen als weiterer Bestandteil der vielschichtigen Immunantwort gegen MCMV nachgewiesen. DN T-Zellen stellen weniger als zehn Prozent der im Blut zirkulierenden Lymphozyten, da sie vor allem in Geweben lokalisiert sind. Sie lassen sich nach der Zusammensetzung ihres TCR in TCR $\alpha\beta^+$  und TCR $\gamma\delta^+$  unterteilen, welche jedoch viele Oberflächenmarker wie CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11b, CD16, CD25 und CD28 teilen (Haas et al., 1993). TCR $\alpha\beta^+$  T-Zellen residieren vor allem im Knochenmark, der Leber und dem Thymus (Hossain et al., 2000). TCR $\gamma\delta^+$  T-Zellen findet man in größeren Mengen in den epithelialen Geweben von Darm, Haut und des Reproduktionstraktes (Bluestone et al., 1995). Allerdings ist keine der beiden Untergruppen homogen. Erneut gibt es Subpopulationen, welche sich durch die Verwendung bestimmter Kombinationen von  $\alpha$ ,  $\beta$  oder  $\gamma$ ,  $\delta$  Gensegmenten auszeichnen. Da beide Gruppen trotz

unterschiedlicher Eigenschaften teilweise redundante Funktionen erfüllen, werden die Effekte von  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  oft durch  $\text{TCR}\alpha\beta^+$  T-Zellen verschleiert (Hayday, 2000). Durch die Produktion von Wachstumsfaktoren und lymphotaktischen Chemokinen wie  $\text{IFN}\gamma$  und  $\text{TNF}\alpha$ , welche andere Zellen anlocken und aktivieren, übernehmen sie immunregulatorische Aufgaben. Sie nehmen Stress- und Entzündungssignale auf und übersetzen sie in Stimuli, die zur passenden Polarisierung von Effektorzellen führen. Obwohl sie meist auf Th1 polarisiert sind, können sie ebenfalls Th2 Zytokine produzieren (Cron et al., 1989; Yin et al., 2000). Außerdem können Zytokine wie Interferone und  $\text{TNF}\alpha$  über die Bindung an Rezeptoren auf infizierten Zellen intrazelluläre, antivirale Signalwege aktivieren (Guidotti and Chisari, 2000; Lucin et al., 1992; Pavic et al., 1993). Diese beiden Wirkungsweisen von  $\text{TCR}\alpha\beta^+$ -produzierten Zytokinen erklären, warum nach adoptivem Transfer von  $\text{TCR}\alpha\beta^+$  T-Zellen reduzierte Virustiter in den Organen von immundefizienten Mäusen detektiert wurden (Abb. 30). Schon früher wurde die Beteiligung von  $\text{TCR}\alpha\beta^+$  Zellen an der Immunantwort gegen MCMV in Betracht gezogen. Hossain et al. (2000) detektierten ein Ansteigen von DN  $\text{TCR}\alpha\beta^+$  Zellzahlen in Bauchhöhle, Leber und Milz von C57BL/6 und BALB/c Mäusen nach Infektion mit MCMV. Die Zellen zeigten überwiegend einen aktivierten Phänotyp. Daher wurde über frühe antivirale Effekte durch die Produktion von  $\text{IFN}\gamma$  und Makrophagen-aktivierende Faktoren spekuliert. Zytokine wie  $\text{IFN}\gamma$  konnten *in vitro* die Virusreplikation begrenzen und zeigten auch *in vivo* protektive Effekte (Chong et al., 1983; Oie et al., 1975; Osborn and Medearis, 1966). Für längeren Schutz werden allerdings zusätzliche Effektorfunktionen wie die Zytolyse benötigt (Guidotti and Chisari, 2000). Dies ist die potenteste Eigenschaft von DN T-Zellen. Ähnlich wie NK-Zellen und CTL können sie die Zytolyse von abnormen Zellen durch Freisetzen von Perforin und Granzym, sowie Apoptose durch die Expression des Fas-Liganden vermitteln. Obwohl grundsätzlich sowohl  $\text{TCR}\alpha\beta^+$  als auch  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  T-Zellen zur Zytolyse befähigt sind, reagierten nur  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  Zellen spezifisch mit der Eliminierung von MCMV-infizierten Zellen, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte (Abb. 29). Auch *in vivo* konnten nur  $\text{TCR}\gamma\delta^+$ , nicht aber  $\text{TCR}\alpha\beta^+$  Zellen längerfristig schützen, was Protektion über Zytolyse nahelegt.

#### 5.4 $\text{TCR}\gamma\delta^+$ T-Zellen

Die Diversität des  $\gamma\delta$  T-Zell-Rezeptors entsteht, wie die des  $\alpha\beta$  T- und B-Zell Rezeptors, durch die Kombination von V- (variable), nur bei der  $\delta$  Kette D- (diversity) und J- (joining) Gensegmenten (V(D)J-Rekombination). Dabei ist die Anzahl der jeweiligen Allele niedriger als für  $\alpha$  und  $\beta$  Ketten, was zu einer geringeren Variabilität führt. Für  $V\gamma$  gibt es sieben Allele, für  $V\delta$  zehn (Allison and Havran, 1991). Dazu kommen jeweils mehrere J- bzw. D- und J- Allele (Hayday, 2000).  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  Zellen werden nach der Benutzung der variablen Gensegmente in der  $\gamma$ - und  $\delta$ -Kette benannt, die oft für bestimmte Untergruppen charakteristisch sind. Problematisch ist die Beschreibung der benutzten Gensegmente in murinen  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  Zellen, da es in der Literatur mindestens drei verschiedene Nomenklatu-

ren gibt (Arden et al., 1995; Garman et al., 1986; Heilig and Tonegawa, 1986). Am gängigsten ist die Nomenklatur nach Heilig und Tonegawa.

### **Vergleich der verschiedenen Nomenklaturen für murine Vy Gensegmente**

Modifiziert aus Hayday (2000); G entspricht  $\gamma$ , V variabel

Arden et al. (1995)	Heilig und Tonegawa (1986)	Garman et al. (1986)
GV1S1	V $\gamma$ 5	V $\gamma$ 3
GV2S1	V $\gamma$ 6	V $\gamma$ 4
GV3S1	V $\gamma$ 4	V $\gamma$ 2
GV4S1	V $\gamma$ 7	V $\gamma$ 5
GV5S1	V $\gamma$ 1	V $\gamma$ 1.1
GV5S2	V $\gamma$ 2	V $\gamma$ 1.2
GV5S3	V $\gamma$ 3	V $\gamma$ 1.3

TCR $\gamma\delta^+$  Zellen werden anhand von mehreren Parametern unterschieden. Zu diesen gehören der Zeitpunkt der ontogenetischen Entwicklung und deren Abhängigkeit vom Thymus, die anatomische Lokalisation und das benutzte TCR-Repertoire (Haas et al., 1993). Durch die Benutzung von bestimmten variablen Gensegmenten können sie in Subpopulationen untergliedert werden, welche ein limitiertes Funktionspotential besitzen und mit der Lokalisation in bestimmten Geweben assoziiert sind. Schon sehr früh in der Ontogenese, sogar noch einige Tage vor den TCR $\alpha\beta^+$  Zellen, erscheinen periphere TCR $\gamma\delta^+$  Zellen in Schüben (Havran and Allison, 1988; Hayday, 2000). Sie haben ein begrenztes, teilweise monoklonales TCR-Repertoire, weil nur bestimmte V-Segmente genutzt werden und durch das Fehlen der terminalen Desoxynucleotidyltransferase in fetalen Zellen keine N-Nukleotide vorhanden sind, welche später für zusätzliche Diversität sorgen (Bonneville et al., 2010). Zu diesen gehören die dendritischen, epidermalen T Zellen (DTEC) mit ihrem V $\gamma$ 5V $\delta$ 1 TCR und die V $\gamma$ 6V $\delta$ 1<sup>+</sup> Zellen in den Epithelien des Fortpflanzungstraktes und der Lunge (Jameson and Havran, 2007; Mukasa et al., 1999; Roark et al., 2004). Auch später entstehende periphere TCR $\gamma\delta^+$  Zellen durchlaufen eine funktionelle Programmierung im Thymus (Born et al., 2010). In den sekundären lymphatischen Organen differenzieren manche Populationen induziert durch antigenpräsentierende Zellen und übernehmen dann spezifische Funktionen (Born et al., 2010). V $\gamma$ 1<sup>+</sup> DN T-Zellen sind in foetalen und postnatalen Mäusen nur in sehr geringen Mengen zu finden. Indessen stellen sie in adulten Tieren die größte Population der TCR $\gamma\delta^+$  T-Zellen, welche erneut zweigeteilt ist. Ein Teil der V $\gamma$ 1<sup>+</sup> DN T-Zellen ist der Entwicklung auf den Thymus angewiesen und residiert vor allem in den sekundären lymphatischen Organen. Eine Besonderheit sind die andere Gruppe der V $\gamma$ 1<sup>+</sup> Zellen, die nach ihrer Lokalisation in den intestinalen Epithelien des Darmes benannten Intraepithelialen Lymphozyten (IEL). Sie machen dort 15 – 60 % der TCR $\gamma\delta^+$  Zellen aus und können sich auch in Nacktmäusen ohne Beteiligung des Thymus

entwickeln (Pereira et al., 1995). Diese Zellen gehören zu distinkten Populationen, die sich untereinander nicht austauschen (Chennupati et al., 2010).

Allen TCR $\gamma\delta^+$  Zellen ist gemein, dass sie schnell und ohne vorhergehende Aktivierung reagieren können, ein begrenztes TCR-Repertoire besitzen und ihr Antigen auch unabhängig von MHC-Präsentation erkennen können. Dies inkludiert auch unprozessierte Nicht-Peptide (Boismenu and Havran, 1997; Hayday, 2000). Meist übernehmen sie immunregulatorische Funktionen beispielsweise durch die Produktion von Zytokinen oder sie agieren als zytolytische Effektorzellen. Sie können aber auch abweichende Funktionen erfüllen, wie Antigenpräsentation (Cheng et al., 2008), Phagozytose (Wu et al., 2009) oder die Bereitstellung von B- und T-Zell-Hilfe (Pao et al., 1996; Wen et al., 1996).

Da Funktionen wie Cytokinproduktion, Antigenpräsentation und Zellyse zur Virusabwehr beitragen können, ist es von großem Interesse TCR $\gamma\delta^+$  T-Zellen im Zusammenhang mit der MCMV-Infektion zu untersuchen. Bisher gab es dazu sehr wenige Erkenntnisse. 1989 wurden von Jonjic et al. maximal 100 000 DN Lymphozyten aus sechs Wochen infizierten CD4 $^+$ -depletierten Mäusen in bestrahlte Mäuse transferiert, welche anschließend infiziert wurden. Dabei konnte zwei Wochen nach Infektion keine Reduktion der Virustiter in der Lunge der Rezipienten detektiert werden. Ninomiya et al. (2000) fanden fünf Tage nach Infektion in der Leber von TCR $\gamma\delta^+$ -depletierten Tieren erhöhte Virustiter und postulierten eine protektive Rolle von V $\gamma$ 1 $^+$  Zellen durch die Produktion von IFN $\gamma$  in der frühen Phase der MCMV-Infektion. Auch Cavanaugh et al. (2003) detektierten unter anderem einen Einstrom von CD8 $^+$  und DN TCR $\gamma\delta^+$  Zellen in die Speicheldrüsen von infizierten BALB/c Mäusen, welcher mit erhöhten IFN $\gamma$ -, IL10- und CC-Chemokin-Leveln einherging und bis mindestens 28 Tage nach Infektion anhielt. Da weitere Daten über die Reaktion von TCR $\gamma\delta^+$  T-Zellen auf die MCMV-Infektion nicht verfügbar waren, war es wichtig deren protektive Funktion *in vivo* genauer zu untersuchen und die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen zu überprüfen.

Im humanen System der HCMV-Infektion sorgte vor allem die Gruppe um Merville und Dechanet für ständig neue Erkenntnisse über TCR $\gamma\delta^+$  T-Zellen. Dabei legten sie den Schwerpunkt auf die Unterscheidung der TCR $\gamma\delta^+$  Subpopulationen basierend auf der Verwendung der  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketten. 1999 wurde ein dauerhafter Anstieg von TCR $\gamma\delta^+$  T-Zellen im Blut von Nierentransplantationspatienten nach HCMV-Infektion beobachtet (Dechanet et al., 1999). Diese Zellen trugen vor allem die V $\delta$ 1- und V $\delta$ 3-Kette und proliferierten TCR $\gamma\delta$ -abhängig bei Inkubation mit HCMV Partikeln oder Lysat infizierter Zellen *ex vivo*. Zwei Jahre später wurde eine Korrelation zwischen früher TCR $\gamma\delta^+$  Expansion und einem positiven Krankheitsverlauf publiziert (Lafarge et al., 2001). Anschließend wurden T-Zell-Klone hergestellt und festgestellt, dass vor allem V $\delta$ 2 $^-$  Klone *in vitro* HCMV-infizierte Zellen lysierten und die Ausbreitung des Virus limitierten (Halary et al., 2005). V $\delta$ 2 $^-$  T-Zellen im Blut von immunkompetenten Personen und Transplantationspatienten zeigten ein begrenztes, oligoklonales Rezeptorrepertoire und den Phänotyp von Effektor-/Gedächtniszellen. Damit sind sie der adaptiven Immunantwort zuzuordnen (Pitard et al., 2008). Sogar bei der Infektion mit CMV *in utero* wurde ab der zwölften Woche der

Gestation die Expansion und Differenzierung von  $V\gamma 9^-$  Zellen nachgewiesen, was deren Einbindung in frühe antivirale Protektionsmechanismen suggeriert (Vermijlen et al., 2010). Trotz der vielen Zusammenhänge im humanen System wurde direkte Protektion durch  $TCR\gamma\delta^+$  T-Zellen *in vivo* nicht bewiesen. Auch die Spezifität der Effektorzellen konnte nicht bestimmt werden. Obwohl sich dies oft als schwierig erwies, gibt es dafür bei anderen viralen Infektionen Anhaltspunkte.

Im murinen Model der HSV-Infektion wurde ein  $TCR\gamma\delta^+$  T-Zell-Klon isoliert, welcher konformationsabhängig den unglykosilierten Aminoterminus von Glykoprotein I ohne Präsentation auf MHC erkennt (Johnson et al., 1992; Sciammas and Bluestone, 1998).  $TCR\gamma\delta^+$  Zellen dämmten die HSV-Infektion durch die Produktion von  $IFN\gamma$  ein (Johnson et al., 1992). Genauso wurden nach Infektion mit Influenza A T-Zell-Hybridome hergestellt. Diese reagierten auf Influenza A, nicht aber auf Sendai- oder Vaccinia-Virus-infizierte Zellen, welche Influenza A-Proteine trugen, mit der Produktion von IL2. Außerdem wurden sie von rekombinant exprimiertem, zellulärem Hitzeschockprotein 60 (HSP60) beeinflusst. Auch HSP60-reaktive Klone aus uninfizierten Mäusen bildeten IL2 nach Inkubation mit Influenza A infizierten Zellen (Ponniah et al., 1996). Hier scheint die Bindestruktur also ein zelluläres Protein zu sein, welches in infizierten Zellen hochreguliert ist. Da sowohl virale Proteine, als auch zelluläre Stressproteine, die nach Infektion verstärkt exprimiert werden, als Zielantigen für  $TCR\gamma\delta^+$  Zellen in Betracht kommen, ist es problematisch Parallelen zu anderen Virusinfektionen zu ziehen. Obgleich die Bestimmung der Zielantigene kompliziert ist, und es sich bei den einzelnen Viren um unterschiedliche Strukturen handeln kann, bleibt festzuhalten, dass  $TCR\gamma\delta^+$  Zellen bei der Bekämpfung von vielen viralen Infektionen eine mehr oder weniger prominente Rolle spielen.

Oft ist der erste Anhaltspunkt für eine Beteiligung der  $TCR\gamma\delta^+$  Zellen an der Infektionskontrolle eine erhöhte Zellzahl nach Infektion von immunkompetenten Tieren, wie beim West Nil Virus (Wang et al., 2003).  $TCR\gamma\delta^{-/-}$  Tiere zeigten höhere Virustiter und stärkere Dissemination. Nach adoptivem Transfer von  $TCR\gamma\delta^+$  in diese Tiere wurde eine reduzierte Suszeptibilität beobachtet, welche auf  $IFN\gamma$ -Produktion zurückzuführen war. Auch bei der Vaccinia-Virus-Infektion zeichneten sich  $TCR\gamma\delta^{-/-}$  Mäuse durch signifikant erhöhte Virustiter und eine größere Sterblichkeitsrate aus (Selin et al., 2001). Obwohl in  $TCR\alpha\beta^{-/-}$  Mäusen eine vorübergehende Kontrolle der Infektion zum Zeitpunkt maximaler  $TCR\gamma\delta^+$  Zellzahlen beobachtet wurde, konnten  $TCR\gamma\delta^+$  Zellen keine dauerhafte Kontrolle etablieren. Insgesamt wird deutlich, dass  $TCR\gamma\delta^+$  Zellen sowohl Eigenschaften der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort besitzen und daher oft zwischen beiden eingeordnet werden. Zum einen reagieren sie schnell und benötigen keine vorhergehende Aktivierung. Sie erkennen auch nicht-Peptid-Strukturen unabhängig von MHC und besitzen ein begrenztes, teilweise konserviertes TCR-Repertoire. Ob sie fähig sind ein immunologisches Gedächtnis auszubilden wurde kontrovers gesehen, aber in neueren Publikationen bestätigt (Hayday, 2000; Wallace et al., 1995). Auf der anderen Seite entstehen sie durch V(D)J-Rekombination und gehören durch die Expression eines TCR zu den T-Zellen. Ebenso weißt ihnen der Schutz durch adoptiven Transfer von Zellen infizierter Donoren einen

Platz in der adaptiven Immunität zu. Da in den gezeigten Transferversuchen nur präadaptierte, und nicht naive TCR $\gamma\delta^+$  T-Zellen schützten, unterstützen diese Ergebnisse die Zuordnung zur angepassten Immunität. Dies würde bedeuten, dass in den vorliegenden Experimenten TCR $\gamma\delta^+$  T-Zellen eine Aktivierung in Donoren benötigen. Da diese nicht in Rezipienten erfolgen kann, ist es naheliegend zu spekulieren, dass dafür möglicherweise bestimmte Strukturen, die Wechselwirkung mit anderen Zellen oder von diesen produzierten, aktivierenden Zytokinen benötigt werden (Cook et al., 2008).

Eine andere Hypothese, warum nur präadaptierte TCR $\gamma\delta^+$  Zellen schützten, beruht auf der klonalen Expansion MCMV-spezifischer TCR $\gamma\delta^+$  Zellen in den Donoren. Dies hat zur Folge, dass bei adoptivem Transfer von TCR $\gamma\delta^+$  Zellen eine hohe Prozentzahl spezifischer Zellen enthalten ist. Aus naiven Donoren gewonnene TCR $\gamma\delta^+$  Zellen beinhalten Zellen mit verschiedensten Bindekapazitäten, unter welchen MCMV-spezifische Zellen vielleicht nur einen verschwindend geringen Anteil ausmachen. Diese Hypothese wird von der Tatsache gestützt, dass im ersten Überlebensversuch, in welchem 170 000 Zellen transferiert wurden, alle Rezipienten von TCR $\gamma\delta^+$  Zellen bis Tag 60 ohne Anzeichen von Krankheit überlebten. Im zweiten Überlebenstest wurden weniger Zellen transferiert. Trotz signifikant verlängerter Überlebensdauer im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche PBS erhalten hatte, verstarben die Rezipienten von präadaptierten TCR $\gamma\delta^+$  Zellen schließlich zwischen Tag 51 und 69 nach Infektion. Eine mögliche Erklärung wäre, dass hier die Grenze der minimal für den Schutz benötigten Zellzahl erreicht ist. Weitere Expansion der Zellen im Rezipienten führt schließlich zur Erschöpfung der T-Zellen. Dies ist ein bekanntes Phänomen bei Gedächtniszellen (Akbar and Fletcher, 2005). Beispielsweise enthielten CD4 $^+$  T-Zellen in HCMV-infizierten Individuen kürzere Telomere und weniger CD27/28 auf der Oberfläche. Dieser Phänotyp ging mit geringerer Replikationskapazität einher (Fletcher et al., 2005). Um diese Theorie für TCR $\gamma\delta^+$  Zellen zu überprüfen, könnte man den Phänotyp von Zellen bei Transfer mit dem der Zellen kurz vor Ableben der Tiere in Bezug auf Telomerlänge und CD27/28-Expression vergleichen. Außerdem wäre es aufschlussreich zu sehen, ob besserer bzw. schnellerer Schutz mit der Anzahl der transferierten Zellen korreliert und die minimal für den Schutz und das Überleben benötigte Anzahl transferierter Zellen zu bestimmen.

Einer anderen Erklärung für den Verlust des Schutzes liegt die Immunevasion durch das Virus zugrunde. Es ist nicht bekannt, ob TCR $\gamma\delta^+$  Zellen ein zelluläres, möglicherweise stressinduziertes oder ein viral kodierte Antigen erkennen. Im Falle der Bindung von TCR $\gamma\delta^+$  Zellen an viral exprimierte Proteine auf der infizierten Zelle könnten diese Proteine während der Passagierung im Wirt mutieren, so dass sie durch die restringierte TCR $\gamma\delta^+$  Bindung an konservierte Proteine nicht mehr erkannt werden können. Damit ginge der vermittelte Schutz nach einiger Zeit verloren. Für NK-Zellen wurde nachgewiesen, dass der immunologische Selektionsdruck der durch Bindung an m157 entsteht ausreichend ist, um innerhalb weniger Viruspassagen *in vivo* Variationen von m157 entstehen zu lassen, welche die NK-Zell-Aktivierung über Ly49H umgehen (French et al., 2004; Voigt et al., 2003). Ähnliches wäre auch für TCR $\gamma\delta^+$  Zellen und ihren Liganden denkbar.

Zwei wichtige Punkte konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht behandelt werden. Der erste ist die Bestimmung der genauen Spezifität der MCMV-reaktiven TCR $\gamma\delta^+$  T-Zellen. Natürlich kommen als Zielstruktur alle viralen Glykoproteine in Betracht. Darüber hinaus könnte es ebenso ein zelluläres Protein sein, das durch den Zellstress der Infektion exprimiert oder hochreguliert wird. Allgemein können  $\gamma\delta$  TCR verschiedenste Liganden mit oder ohne MHC Präsentation erkennen. Zu diesen gehören unter anderem virale Proteine, stressinduzierte Tumorantigene oder Hitzeschockproteine und Nichtpeptid-Strukturen, welche von gestressten Zellen oder Mikroorganismen produziert werden wie Phosphoantigene (Bonnevillie et al., 2010; Hayday, 2000; Johnson et al., 1992; Ponniah et al., 1996). Erste Hinweise auf die Natur des Antigens für MCMV-spezifische TCR $\gamma\delta^+$  Zellen gibt der Zytolysetest (Abb. 29). MCMV-infizierte Zellen, die sich in der frühen Phase des Replikationszykluses befanden, wurden besser lysiert als Zellen, welche den Zyklus komplett durchliefen. Außerdem wurde die Eliminierung infizierter Zellen durch die Zugabe von IFN $\gamma$  unterbunden. Im Gegensatz dazu wurden MCMV-infizierte Zellen von CD8 $^+$  Zellen nach IFN $\gamma$ -Behandlung besser lysiert als ohne, da durch Zugabe von IFN $\gamma$  die MHC Präsentation von viralen Proteinen auf der Oberfläche infizierter Zellen verstärkt wird (Guidotti and Chisari, 2000). Dies impliziert zum einen, dass es sich bei den Zytolyse-induzierenden Antigenen für TCR $\gamma\delta^+$  und CD8 $^+$  Zellen um unterschiedliche Strukturen handelt. Zum anderen lässt sich spekulieren, dass sich das Epitop für TCR $\gamma\delta^+$  Zellen auf einem viralen Nicht-MHC-präsentierten Protein oder auf einem zellulären (Stress-) Protein befindet. Wäre es ein MHC-präsentiertes Protein, würde IFN $\gamma$  dessen Oberflächenpräsentation und damit die Erkennung durch Effektorzellen wie am Beispiel der CD8 $^+$  Zellen verstärken. Eine engere Eingrenzung der Zielstruktur ließe sich durch Aktivierungs- oder Zytolysetests bewerkstelligen, in welchen Zielzellen angeboten werden, welche entweder mit viralen Deletionsmutanten infiziert, oder einzelnen viralen Glykoproteinen transfiziert wurden. Um zelluläre Liganden zu untersuchen könnten Zellen eingesetzt werden, welche durch Infektion mit anderen Pathogenen „gestresst“ werden.

In diesem Zusammenhang wäre zusätzlich abzuklären, ob die Aktivierung der MCMV-spezifischen TCR $\gamma\delta^+$  Zellen tatsächlich über den TCR und CD3 $^+$  vermittelte Signale geschieht oder über andere Rezeptoren wie Toll-like- oder NK-Zellrezeptoren. Beispielsweise ist NKG2D auf verschiedenen TCR $\gamma\delta^+$  Zellpopulationen zu finden und ebenso wie der TCR in der Lage Zytotoxizität zu vermitteln (Bonnevillie et al., 2010). Zeigen ließe sich dies durch *in vitro* Aktivierungstests, bei welchen die TCR-Bindung blockiert wird.

Der zweite wichtige Punkt ist die Charakterisierung des Phänotyps der MCMV-reaktiven TCR $\gamma\delta^+$  T-Zellen. Hierbei wäre es interessant zu wissen, ob es sich um eine klonal expandierte Population handelt, die sich durch Verwendung bestimmter variabler Regionen in den Ketten einer bekannten Gruppe von  $\gamma\delta$  T-Zellen zuordnen lässt. Um dies zu bestimmen wäre eine Analyse des Rezeptorrepertoires durch *Spectratyping* hilfreich, wie es bereits für HCMV gezeigt wurde (Dechanet et al., 1999; Knight et al., 2010). Des Weiteren wurde für humane V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen in Analogie zu CD8 $^+$  Zellen eine Einteilung in naive, zentrale oder Effektorgedächtniszellen oder terminal differenzierte Effektorzellen anhand

der Oberflächenmarker CD27, CD28 und CD45RO bzw RA vorgenommen (Dieli et al., 2003). Daher ist es wichtig die Expression von Oberflächenmarkern wie CD45RO, CD62L oder CD69 auf protektiven, murinen TCR $\gamma\delta^+$  Zellen zu messen, da diese neben der Eingrenzung der Population auch den Aktivierungszustand beschreiben und eine Zuordnung der transferierten Zellen zu Effektor- oder Gedächtniszellen erlauben.

Abschließend bleiben die Gründe zu erwähnen, welche TCR $\gamma\delta^+$  Zellen zu einem guten Werkzeug für Immunintervention machen. TCR $\gamma\delta^+$  Zellen erkennen Antigene auch ohne die Präsentation durch MHC-Moleküle. Weil sie nicht auf allogene MHC Moleküle reagieren, induzieren sie keine Transplantatabstoßungsreaktion oder „Graft versus host disease“ und damit verbundene Symptome (Drobyski and Majewski, 1997; Haas et al., 1993). Dies und die im Vergleich zu TCR $\alpha\beta^+$  Zellen geringere Sensitivität gegenüber immunsuppressiver Behandlung prädestiniert sie für die Therapie in Transplantationspatienten. Des Weiteren lassen sich einzelne Subpopulationen direkt ansteuern, da bestimmte Funktionen mit der Verwendung von V-Ketten assoziiert sind. Dadurch werden geringere Zellzahlen benötigt, was zu weniger Nebenwirkungen beispielsweise durch Zytokine führen kann. Außerdem wurde bei TCR $\gamma\delta^+$  Zellen oft ein ausbalancierter Effekt beobachtet, der durch gegenläufige Funktionen wie Pro- und Antiinflammation mehrerer Populationen bedingt ist. Dies bedeutet, dass ein durch Deletion einer Population erzielter Effekt durch die verbleibenden Populationen verstärkt wird (Born et al., 2010). All dies macht TCR $\gamma\delta^+$  zu einem Effektorzelltyp, der therapeutisch oder prophylaktisch in die Immunantwort eingreifen kann.

## 6 Material

### 6.1 Plastik und Verbrauchsmaterialien

Plastik- und Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Becton Dickinson (BD, Heidelberg), Corning (Kaiserslautern), Eppendorf (Hamburg), Greiner Bio-One (Frickenhausen), Hartenstein (Würzburg/Versbach), Millipore (Schwalbach), Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach), nerbe plus (Winsen/Luhe), Nunc (Wiesbaden), Peqlab Biotechnology (Erlangen), Sarstedt (Numbrecht) und VWR International (Darmstadt) verwendet.

### 6.2 Chemikalien und Reagenzien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Lösungen wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen BD (Heidelberg), Fluka (Buchs, Schweiz), Gerbo Biotechnik (Gaiberg), Invitrogen, (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim) und Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA) bezogen.

### 6.3 Medien, Puffer und Lösungen

Puffer, Lösungen und Verdünnungen wurden ausschließlich mit Reinstwasser aus dem Milli-Q Biocell System der Firma Millipore (Schwalbach) hergestellt.

#### Puffer und Lösungen

##### **Allgemeine Puffer:**

**PBS** physiologischer Phosphatpuffer (*phosphate buffered saline*) pH 7,3

- 137 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- 7,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

##### **T4 Puffer** pH 7,3

- 330 mM Tris-Acetat
- 600 mM Kaliumacetat
- 100 mM MgCl<sub>2</sub>
- 5 mM DTT

##### **STE Puffer**

- 100 mM Tris HCl
- 200 mM NaCl
- 2 mM EDTA

**VSP** Virus Suspensionspuffer pH 7,8

- 1 M Tris
- 1 M KCl
- 0,1 M

**TBE Elektrophoresepuffer**

90 mM Tris  
90 mM Borsäure  
2,5 mM EDTA

**LAP Luziferase Assay Puffer**

15 mM  $K_3PO_4$  (pH 7,8)  
25 mM Gly-Gly  
15 mM  $MgSO_4$   
4 mM EDTA

Frisch dazu:

5 mM ATP  
1 mM DTT

**LS Luziferin Solution**

25 mM Gly-Gly  
15 mM  $MgSO_4$   
4 mM EGTA

0,05 mM Luziferin  
2 mM DTT

**FACS Puffer pH 7,3**

1 x PBS  
2 % FKS  
2 mM EDTA

**Erythrozyten-Lysepuffer**

0,15 M  $NH_4Cl$   
0,02 M HEPES  
0,1 mM EDTA

**Puffer für Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970):****SDS-Auftragspuffer (2x)**

2 % SDS  
10 % Glycerin  
1 mM EDTA  
0,005 % Bromphenolblau  
15 mM Tris/HCl pH 6,8  
5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol

**Proteingellaufpuffer**

14,3 g Glycerin  
3,03 g Tris  
1 g SDS  
1 l  $H_2O$

**Proteintransferpuffer**

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
20 % Methanol (v/v)

**Ponceau S-Färbelösung**

0,2 % Ponceau S  
3 % Trichloressigsäure  
in Aqua dest

**Waschpuffer (ELISA/Immunfluoreszenz/PAA Gele)**

1 x PBS  
0,05 % Tween 20

**ELISA-Puffer:****ELISA-Kopplungspuffer pH 9,6**

15 mM  $Na_2CO_3$   
35 mM  $NaHCO_3$

**Inkubationspuffer pH 7,3**

1 x PBS  
0,05 % Tween 20  
2 % FKS

**Medien für Bakterienkultur**

Medien für die Bakterien- und Zellkultur wurden im hauseigenen Medienlabor hergestellt und sterilfiltriert. Vor Gebrauch wurden Antibiotika (100 mg Ampicillin, 30 mg Kanamycin, 17 mg Chloramphenicol) zugesetzt. Die Mengenangaben beziehen sich auf ein Endvolumen von einem Liter.

**LB-Medium pH 7,2**

10 g Bacto Trypton  
5 g Bacto Hefeextrakt  
5 g NaCl

**LB-Agar**

15 g Bacto Agar  
in LB Medium

**SOC-Medium**

20 g Bacto Trypton  
5 g Bacto Hefeextrakt  
2,5 mM NaCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM MgSO<sub>4</sub>  
20 mM Glukose

**M63 Medium 5 x pH 7**

10 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
68 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
2,5 mg FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

**M9 Medium**

6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1 g NH<sub>4</sub>Cl  
0,5 g NaCl

**M63 Minimalmedium Platten**

15 g Agar  
800 ml H<sub>2</sub>O  
200 ml M63 Medium 5 x  
1 ml 1M MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
0,2 % D-Galaktose/ 2-Deoxy-Galaktose/ Glycerol  
1 mg D-Biotin  
45 mg L-Leucin  
12,5 mg Chloramphenicol

**MacConkey Agar Platten**

50 g MacConkey Agar  
1 l H<sub>2</sub>O  
0,2 % D-Galaktose  
12,5 µg/ml Chloramphenicol

**Medien für Zellkultur**

Alle Medien wurden vor Gebrauch mit 350 mg/l L-Glutamin und 10 % FKS versetzt. Hybridomzellen und MEF wurden im hauseigenen RPMI 1640 Medium mit 100 U/ml Penicillin und 100 mg/l Streptomycin kultiviert. Cos7-Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) der Firma Gibco BRL (Glasgow, Schottland) mit 100 mg/l Gentamycin kultiviert. Für Transfektionen wurde das Medium ohne FKS und Gentamycin angesetzt. Das Einfriermedium setzte sich aus drei Volumenanteilen 20 % Glukose und

zwei Volumenanteilen Dimethylsulfoxid (DMSO) in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium zusammen.

### **Standards**

Der GeneRuler™ DNA Ladder Mix wurde von Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Der Protein-Molekulargewichtstandard wurde bei der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) bestellt.

## **6.4 Biologische Materialien**

### **6.4.1 Bakterien und Virusstämme**

Der E.coli Stamm DH10B F- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*dlacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 deoRrecA1 endA1 araD139  $\Delta$ (*ara,leu*)7697*galU galk*  $\lambda$ -*rpsL nupG* (Grant *et al.*, 1990) wurde von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. SW102 Bakterien wurden von Prof. Dr. med. B. Plachter (Universität Mainz) zur Verfügung gestellt. Das BAC MCMV157*luc* wurde von Prof. Dr. M. Messerle (Virologie, Medizinische Hochschule Hannover) erhalten. Die Konstruktion von MCMV157*luc* ist auf der Internetseite des Journals Blood als *online-supported-material* des Artikels von Klenovsek *et al.* (2007) beschrieben. Die Konstruktion der verwendeten mutierten Viren ist in Abschnitt 3.1 dargestellt. Gereinigte Viruspartikel des HCMV Laborstammes AD169 (VR-538, ATCC) wurden von Barbara Kropff (Virologie Erlangen) zur Verfügung gestellt.*

### **6.4.2 Nukleinsäuren und Enzyme**

#### **Plasmide**

<b>ursprünglich</b>	<b>Eigenschaften</b>	<b>Referenz</b>
pc58	auf pcDNA3 basierendes Expressionsplasmid für hgB von AD169	hergestellt von M. Mach 1993
pgalK	Blueskript backbone mit GalK Operon komplementierender Sequenz	(Warming <i>et al.</i> , 2005)
<b>konstruiert</b>		
pc58+galK+A+B	pc58 mit GalK Operon komplementierender Sequenz, Homologie A und B (Abb. 4)	Absatz 3.1.2
pc58+A+B	pc58 mit Homologie A und B (Abb. 4)	Absatz 3.1.2

#### **Oligonukleotide**

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma biomers (Ulm/Donau) synthetisiert. Die Sequenzen sind jeweils in 5'-3' Richtung angegeben. Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen sind unterstrichen.

Primer	Sequenz	Bindestelle, Schnittstelle
pc58fw	TCAGCGTTCGCAGC	pc58
73b1 (pc58rw)	AATTCGCGTAGTCAGGGACGTCATAAGGATAG	pc58
8b4 (Afw)	CAACAATTGCCTTAATTAAGGGCTGTCCCCCATGCC	MCMVie2, MfeI, PacI
9b4 (Ars)	CAACAATTGTAGGGTCGTATCGAG	MCMVie2, MfeI
10b4 (Bfw)	CAATGGGCCCTCTAGAGACCGTCAGGAAGAAG	MCMVie2, ApaI, XbaI
11b4 (Brs)	CAATGGGCCCCCTTAATTAAGGTATTGATTAATAAAC	MCMVie2, ApaI, PacI
91b3 (pc58lead)	CTGCTCCCTGCTTGTG	pc58
93b3 (MIEPrw)	AGTCAATAATCAATGTC	MIEP
15b3 (pcDNA3-rev2)	GAGTGGCACCTTCCAGGG	pcDNA3
29b4 (pc58Bfwsequ)	GGGTTTAGTTCCTCACC	galK
1b2 (pc58EcoRI5)	CATGCGCGAATTCAACTC	hgB
4b2 (gBmut2-3)	GAGTCTTCAAGTGTCTGGCGCCGTTTTTGGGATGTC	hgB
37b4 (pc58fw)	TCAGDGTTTCGCAGCCC	pc58
3b2	CACCAACGAGCAGGCTGCCAGATGCTTCTGGCCCTG	hgB
56b4 (M129rs)	GGACACCATACTACTG	

Fragmente für die 2. Rekombination		Region
51b4 (Abdel)	GCTGTCCCCCATGCCATTTCGAGCCCAGAGCAGGACGGACC GCGGCTCGATACGACCCTAGACCGTCAGGAAGAAGATTCA GTGAGAGGACACGAGGTATGTCATGGTTTTTAATCAATA	MCMV m126(A), m129(B)
52b4 (Abdel 180)	TATTGATTAATAAACCATGACATACCTCGTGTCTCTCACTGA ATCTTCTTCTGACGGTCTAGGGTCGTATCGAGCCGCGGTC CGTCTGCTCTGGGCTCGAATGGCATGGGGGACAGC	MCMV m129(B), m126(A)
54b4 (Gb o endoc)	GTAGTCATTATCACTTATTTGATCTATACTCGACAGCGGCGT CTGTGCACGCAGCCGCTGTAGGACCGTCAGGAAGAAGATT CAGTGAGAGGACACGAGGTATGTCATGGTTTTTAATCAATA	hgB, Stop, MCMV m129(B)
53b4 (Gb o endoc 180)	TATTGATTAATAAACCATGACATACCTCGTGTCTCTCACTGA ATCTTCTTCTGACGGTCTACAGCGGCTGCGTGCACAGAGC GCCGCTGTGAGTATAGATCAAATAAGTGATAATGACTAC	MCMV m129(B), Stop, hgB

**Enzyme**

Restriktionsenzyme New England Biolabs® Inc (NEB), Frankfurt/Main  
 SAP USB Europe GmbH, Staufeu  
 Ligase Invitrogen, Karlsruhe  
 Taq-Polymerase und Collagenase D Roche, Mannheim

**6.4.3 Zelllinien**

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft/Spezies	Spezifität	Referenz
Cos7	Nierengewebezellen transformiert mit SV40	grüne Meerkatze		
27-39	B-Zell-Hybridom	Maus IgG2a	hgB	(Utz et al., 1989)
27-287	B-Zell-Hybridom	Maus IgG2b	AD-1 hgB	(Utz et al., 1989)
SM5-1	B-Zell-Hybridom	Mensch IgG1	AD-4 hgB	(Potsch et al., 2011)
C23	B-Zell-Hybridom	Mensch	AD-2 hgB	(Masuho et al., 1987)
Croma101	B-Zell-Hybridom	Maus	MCMV IE1	eigene Arbeitsgruppe
p63-27	B-Zell-Hybridom	Maus IgG2a	HCMV IE1	Prof. Dr. W. Britt, University Alabama, USA
<b>primäre Zellen</b>				
HFF	Vorhautfibroblasten	Mensch		isoliert von B. Kropff, Virologie Erlangen
MEF	embryonale Fibroblasten	Maus		isoliert von J. Horlitz, BTE Erlangen

#### 6.4.4 *In vitro* verwendete Antikörper und Konjugate

Zielantigen	Konjugat	Spezies, Isotyp, Klon	Firma, Katalognummer	Anwendung	Verdünnungsstufe/ Konzentration
m CD16/23	-	r IgG2b, κ, 2.4G2	BD 553142	FC	1:100
<b><u>direkt farbstoffgekoppelte Antikörper für die Durchflusszytometrie</u></b>					
m CD3ε	APC	Armenischer Hamster, IgG1, 145-2C11	ebioscience 17-0031-82	FC	1:200
m CD3 Komplex	PE	r IgG2b, κ, 17A2	BD 555275	FC	1:400
m CD4	AF 700	r IgG2b, κ, GK1.5	ebioscience 56-0041-82	FC	1:400
	PE		BD 553730		1:800
m CD8a	AF 700	r IgG2a, κ, 53-6.7	ebioscience 56-0081-82	FC	1:200
m CD335	FITC	r IgG2a, κ, 29A1.4	ebioscience 11-3351-82	FC	1:300
m TCRβ	PE-Cy7	Armenischer Hamster, H57-597	biolegend 109222	FC	1:300
m TCRγδ	FITC	GL3	BD 552177	FC	1:200
<b><u>Antikörper für ELISA und WB</u></b>					
h IgG Fcγ	-	g	JIR 109-005-098	B	2 µg/ml
	-	Chrome Pure h IgG	JIR 009-000-003	Standard	0,5 µg/ml
h IgG	HRP	k	Dako P0214	Detektion	1:6 000
m IgG (H+L)	-	g	JIR 115-005-003	B	2 µg/ml
	-	Chrome Pure m IgG	JIR 015-000-003	Standard	0,5 µg/ml
m IgG Fcγ	HRP	g	JIR 115-035-071	Detektion	1:5 000
m IgG	HRP	g polyklonales IgG	Dako P 0447	Detektion	1:1 000
r IgG (H+L)	-	g	JIR 112-005-003	B	2 µg/ml
	-	Chrome Pure r IgG	JIR 012-000-003	Standard	0,5 µg/ml
r IgG Fcγ	HRP	g	JIR 112-035-008	Detektion	1:5 000

<b>Weitere Sekundärantikörper</b>					
m IgG+M (H+L)	Cy3	g	JIR 115-165-044	IF	1:400
h IgG	FITC	k	Dako F0202	IF	1:100
m IgG	FITC	k	Dako F0232	IF	1:200
m IgG Fcγ	FITC	g	JIR 115-095-071	FC	1:200

**Abkürzungen:** H schwere Kette, L leichte Kette, AF Alexa Fluor, HRP Meerrettich Peroxidase, d Esel, m Maus, g Ziege, k Kanninchen, r Ratte, JIR Jackson Immuno Research, B Beschichtung, E ELISA, FC Durchflusszytometrie, IF Immunfluoreszenz, NT Neutralisationstest

#### 6.4.5 Proteine und *in vivo* applizierte Reagenzien

Injektionsfertige Luziferin Lösung wurde aus einem Teil PBS pH 8,5, eingestellt mit NaOH, vier Teilen PBS pH 8,0, eingestellt mit NaHO<sub>3</sub>, und 2,5 mg/ml D-Luziferin (P.J.K. GmbH, Kleinblittersdorf) hergestellt und steriltfiltriert. Die Antikörper YTS 191 gegen CD4 (Cobbold et al., 1984) und PK 136 gegen NK1.1 zur Depletion *in vivo* wurden bei bioxcell (West Lebanon, USA) bestellt. YTS 191 Antikörper wurde außerdem von Prof. Dr. S. Jonjic (Universität Rijeka, Kroatien) erhalten. Größere Mengen an *in vivo* applizierten 27-39 und 27-287 Antikörpern wurden von Prof. Dr. William Britt (University Alabama, USA) bereitgestellt. SM5-1 Antikörper für den Schutzversuch waren ein Geschenk der Firma 4-Antibody (Jena). Das rekombinant hergestellte hGB (Gonczol and Plotkin, 2001) wurde von Sanofi Pasteur (Marcy L'Etoile, Frankreich) zur Verfügung gestellt.

#### 6.4.6 Versuchstiere

Alle verwendeten Versuchstiere entstammten eigenen Zuchten. Sie wurden im Biologisch-Technischen Entwicklungsgebäude (Erlangen) in IVC-Käfigen (*isolated ventilated cages*) unter SPF-Bedingungen (*specific pathogen free*) gehalten und basierten, soweit nicht anders angegeben, auf Mäusen von Charles River (Sulzfeld). Zusätzlich wurden auch vom Anbieter bezogene C57BL/6 wt Tiere direkt in Versuchen eingesetzt.

CD8<sup>-/-</sup>JHT<sup>-/-</sup> wurden durch Kreuzung von CD8<sup>-/-</sup> und JHT<sup>-/-</sup> Mäusen generiert und vor dem ersten Einsatz in Versuchen für 8 Generationen überwacht. JHT<sup>-/-</sup> Mäuse (Chen et al., 1993) wurden von Prof. Dr. Hans-Martin Jäck (Universität Erlangen) erhalten. C57BL/6-RAG1<sup>-/-</sup> Mäuse (RAG<sup>-/-</sup>, Mombaerts et al., 1992) wurden von Prof. Dr. Irmgard Förster (Universität München) zur Verfügung gestellt. Genotypisierungen erfolgten mittels durchflusszytometrischer Analysen oder nach DNA-Isolierung aus Schwanzbiopsien durch PCR. Für die Versuche wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere mit einem Mindestalter von sechs Wochen eingesetzt.

## 6.5 Geräte

Ultrazentrifugationen wurden in der Sorvall® RC-58 (Du Pont Instruments, USA) durchgeführt. Im Zusammenhang mit Zellkultur oder Zellreinigung wurde die Rotina 420R von Andreas Hettich (Tuttlingen) benutzt. Für alle weiteren Zentrifugationen wurden die Centrifuge 5424 (Eppendorf, Hamburg) und die Universal 30RF (Andreas Hettich, Tuttlingen) eingesetzt.

## 7 Methoden

### 7.1 Generierung der rekombinanten hgB-Viren

Die rekombinanten Viren wurden nach der Methode von Warming et al. (2005) generiert. Im Ergebnisteil ist die Anwendung beschrieben (3.1).

#### 7.1.1 Klonierungen

##### Isolierung von Plasmid und BAC-DNA

Plasmidisolierungen aus Bakterien erfolgten nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) mit dem Hi Pure Kit bzw. dem PureLink™ Quick Miniprep Kit (Invitrogen, Karlsruhe) nach Protokoll des Herstellers. Die Durchführung einer Midi- oder Maxipräparation zur Gewinnung größerer Mengen an DNA verlief analog. BAC-DNA wurde mit dem NucleoBond BAC 100-Kit (Macherey-Nagel, Düren) gewonnen. Die Konzentration der DNA wurde im Nanodrop (Peqlab, Erlangen) bestimmt.

##### PCR

Die DNA-Amplifikation wurde im Wesentlichen nach der Methode von Saiki et al (1988) durchgeführt. Für alle PCRs im Zusammenhang mit Klonierungen wurde das Expand™ High Fidelity PCR System dNTPack (Roche, Mannheim), für analytische Kolonie PCRs das DreamTaq™ DNA-Polymerase Kit (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. In einem Ansatz von 50 µl wurden 50 ng DNA oder plasmidhaltige Bakterien mit je 20 pmol der beiden Oligonukleotide, 2,5 Units (U) Expand™ High Fidelity Taq-Polymerase (Boehringer, Mannheim), 800 µmol Desoxyribonukleotiden (dNTPs) und der entsprechenden Puffermenge gemischt. Die DNA wurde in einem Thermocycler (Eppendorf, Hamburg) in 30 Zyklen unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

Initiale Denaturierung 94°C, 5 Min;  
30 x Denaturierung der DNA, 95°C, 30 Sek;  
    Anlagerung der Oligonukleotide, 45°C, 1 Min;  
    Elongation, 72°C, 2 Min;  
Finale Elongation 72°C, 5 Min:  
18°C ∞ Ende

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Hersteller-Protokoll (Spin-Protokoll). Mittels horizontaler Agarose Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte analysiert.

### **DNA-Restriktionsverdau**

Für die Klonierung wurden gereinigte PCR-Produkte oder Vektor DNA im präparativen Restriktionsverdau geschnitten. Dieser wurde mit einem Gesamtvolumen von 100 µl angesetzt. Je 3 µg PCR-Produkt oder Vektor-DNA wurden mit 30 U des jeweiligen Restriktionsenzym (10 U/1 µg DNA) im hauseigenen T4 Puffer oder passendem NEB Puffer verdaut. Der Verdau erfolgte für zwei bis drei Stunden bei 37°C bzw. 55°C, je nach Temperaturoptimum des Restriktionsenzym. Vektor-DNA wurde zusätzlich für 30 Min bei 37°C mit 1 U SAP dephosphoryliert. Beim präparativen Verdau von PCR-Produkten mit Plasmid Matrize wurde entweder zusätzlich für 30 Min bei 37°C mit dem Enzym *DpnI* inkubiert, um Rückstände von Plasmid-DNA zu beseitigen, oder eine Gelextraktion des entsprechenden PCR-Produkts nach Gelelektrophorese mit dem QIAquick Gel Extraction Kit durchgeführt. Eine Inaktivierung der Enzyme erfolgte für 20 Min bei 65°C.

Für die Kontrolle der generierten Plasmide wurde ein analytischer Verdau als 20 µl-Ansatz durchgeführt. Hier wurden 0,25 - 1 µg Plasmid-DNA mit 2 - 3 U Restriktionsenzym für 1 - 1,5 Stunden bei 37°C verdaut. Sowohl der präparative als auch der analytische Verdau wurde mittels Agarose Gelelektrophorese kontrolliert.

### **Agarose Gelelektrophorese**

Die Trennung von DNA-Fragmenten nach der Größe erfolgte in horizontalen 0,6 - 2 %-igen Agarose-Gelen bei maximal 160 V. Der in TBE-Puffer gelösten Agarose wurde 1 µg/ml Ethidiumbromid (Serva, Heidelberg) beigemischt. Die Proben wurden in sechsfach DNA-Auftragspuffer (Fermentas, St. Leon) auf das Gel geladen. TBE diente als Laufpuffer. Als Größenstandard wurde der GeneRuler™ DNA-Ladder Mix (Fermentas, St. Leon) verwendet. Die Gele wurden unter UV-Licht (254 nm) analysiert und mit EasyWin 32 Gel Dokumentation (Herolab GmbH, Wiesloch) dokumentiert. Für die Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose Gelen wurde der QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) verwendet.

### **DNA-Anlagerung**

Oligonukleotide wurden aneinander gelagert indem sie mit gleicher Molarität gemischt und mit dem entsprechenden Volumen doppelt konzentriertem STE Puffer versetzt wurden. Das Gemisch wurde 5 Min bei 95°C inkubiert.

### **Ligation**

Die Ligation erfolgte im 20 µl Ansatz bei 14°C über Nacht. Die Menge an verdautem PCR Produkt und Vektor-DNA wurden im Agarose-Gel abgeschätzt und etwa im Verhältnis 1:4 bis 1:5 eingesetzt. Der Ligations-Ansatz enthielt außerdem 4 µl des 5 x Ligasepuffers (Invitrogen, Karlsruhe), 2 µl 100 mM DTT, 1 µl 10 mM ATP und 1 µl Ligase.

### 7.1.2 Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurde der BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) benutzt. Dazu wurden in einen Ansatz von 20 µl 50 ng DNA mit 20 pmol des Sequenzierprimers, 3,5 µl BigDye-Puffer und 1 µl der BigDye-Lösung gemischt. Unter folgenden Bedingungen wurde die DNA amplifiziert: 25 Zyklen mit 10 Min bei 96°C zum Denaturieren der DNA, 10 Sek bei 50°C zum Anlagern der Primer, 4 Min bei 60°C zur Elongation der naszierenden DNA.

Die Sequenzbestimmung erfolgte im Sequenzierer ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer mit Applied Biosystems Sequence Analysis (Applied Biosystems, USA) und die Auswertung mit Vector NTI 9.1. (Invitrogen, Karlsruhe).

### 7.1.3 Transformation von Plasmiden und BACs

Elektrokompetente SW102 Bakterien mit hitzeaktivierbarer Rekombinase wurden, wie von Warming et al. (2005) beschrieben, durch Schütteln in Eiswasser gewonnen.

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden die elektrokompetenten ElectroMAX™ DH10B™ E. coli Bakterien von Invitrogen verwendet.

Die Elektroporation erfolgte mit Gene Pulser™ (Bio Rad, USA) bei 2 kV, 200 Ω und 25 µF. Danach wurden die Bakterien in SOC-Medium aufgenommen, für eine Stunde bei 32 bzw. 37°C geschüttelt und auf entsprechenden LB Agar-Platten (100 µg/ml Antibiotikum, Minimalmedium mit Galaktose oder Desoxygalaktose und Glycerol) ausgestrichen.

### 7.1.4 Transfektion der BACs und Rekonstitution der Viren

BAC-DNA wurde mit dem FuGene HDKit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers in MEF transfiziert. Diese wurden 24 Stunden vor Transfektion mit 250 000 Zellen/Vertiefung in einer 6-Loch Platte (Nunc, Dänemark) ausgesät. Virionen aus dem Überstand infizierter Zellen wurden durch PCR kontrolliert.

### 7.1.5 *In vitro* Amplifikation und Reinigung von Virionen

Die Vermehrung von MCMV Virionen erfolgte *in vitro* durch Infektion primärer MEF. Diese wurden in großen Zellkulturflaschen kultiviert und bei einer Konfluenz von etwa 90 % passagiert. Hierzu wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen abgegossen, Mediumrückstände abpipettiert und die adhärennten Zellen mit Trypsin/ EDTA (0,02 %-ig in PBS) fünf Min bei 37°C inkubiert. Nach dem Ablösen wurden die Zellen zu gleichen Teilen auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt und mit frischem Medium weiter kultiviert. Die Infektion von 8 - 16 Flaschen erfolgte einen Tag nach dem Splitten der Zellen bei einer Konfluenz von ca. 40 % durch Zugabe von Überstand einer infizierten Kultur (10<sup>5</sup> pfu/Flasche). Gewöhnlich erreichten die Zellen einen zytopathischen Effektes von etwa 80 - 90 % zwischen Tag 8 und 10 nach Infektion. Dann wurden die Zellkulturüberstände bei 3 000 rpm für 20 Min zentrifugiert, um Zellen und Debris zu entfernen. Der Überstand wurde in SW27/28 Polyallomer-Röhrchen überführt und die Viruspartikel in einer Ultrazentri-

fuge mit 14 000 rpm bei 4°C für drei Stunden pelletiert. Die Pellets wurden auf Eis bei 4°C gelagert, am nächsten Tag in den Medienrückständen resuspendiert, gepoolt und zehnfach durch eine Kanüle geschert. In SW41 Röhrchen wurde jeweils 1 ml Virussuspension auf ein 9 ml Sucrosekissen (15 % in VSP) geschichtet und mit 14 000 rpm bei 4°C für zwei Stunden pelletiert. Der Überstand wurde völlig abgesaugt und die Pellets nach Lagerung über Nacht bei 4°C in VSP aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Die Virustiter wurden durch Endpunkttitration mittels indirekter Immunfluoreszenz bestimmt. Hierzu wurden MEF in einer Zelldichte von 15 000 Zellen pro Vertiefung einer 96-Loch Flachbodenplatte ausgesät und 24 Stunden später mit 1:2 Verdünnungsreihen der jeweiligen Viruspräparationen infiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen mit Ethanol (EtOH) fixiert und mit dem mab Croma101 inkubiert, der das virale IE1 Protein von MCMV erkennt (Trgovcich et al., 2000). Zur Detektion wurde ein FITC-gekoppelter, mausspezifischer Antikörper aus der Ziege eingesetzt. Bestimmungen der pfu erfolgten nach Reed und Münch (1938).

## **7.2 Weitere Molekularbiologische und zellbiologische Methoden**

### **7.2.1 Quantitative Proteinbestimmung**

Der Proteingehalt von Lösungen wurde mit dem BCA-Kit der Firma Pierce in F96 Maxi Sorp Immuno-Platten (Nunc, Wiesbaden) in 1:2 Verdünnungen nach Protokoll des Herstellers bestimmt. Als Standard diente eine Albumin Lösung (Pierce, Rockford, USA). Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 562 nm im SpectraMax 190 Photometer (Molecular Devices, USA) gemessen. Mit Hilfe der Eichgeraden wurde die Proteinkonzentration der Proben im Programm SOFTmax Pro bestimmt.

### **7.2.2 Zellkulturverfahren**

Soweit nicht anders vermerkt wurden alle Kultivierungen in RPMI-1640 Medium mit 10 % FKS (PAN Biotech, Aidenbach), 2 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 80 % relativer Luftfeuchtigkeit durchgeführt. Hybridomzelllinien wurden als Suspensionskultur gehalten, nach visueller Beurteilung der Zelldichte sedimentiert und mit frischem Medium auf neue Kulturflaschen verteilt. Der antikörperhaltige Überstand wurde bei 4°C aufbewahrt. Adhärent wachsende Zellen wurden bei Konfluenz mit 0,05 % Trypsin/EDTA (Gibco, Invitrogen, Germany) vom Flaschenboden abgelöst, pelletiert und mit frischem Medium auf neue Kulturflaschen verteilt. MEF wurden für Assays in 96-Loch Flachbodenplatten immer am Vortag mit  $1,2 \times 10^4$  Zellen/Vertiefung in 100 µl Medium ausgesät.

### **Plaque Assay**

Für die Testung auf infektiöses Virus wurden die Organe gewogen und nach Zugabe von 1 ml VSP pro mg Organ für 1 Min mit dem Ultra-Turrax T18 basic (IKA Werke; Staufen) auf Stufe 2,5 homogenisiert. Das Gerät wurde nach jedem Homogenat mit 70 %-igem EtOH

gesäubert. Die Homogenate wurden im Verhältnis 1:10 und 1:100 mit Zellkulturmedium verdünnt. Jeweils 100 µl wurden in Doppeltansätzen bei 1 900 g für 20 Min auf MEF zentrifugiert. Durch die Zentrifugation ließ sich die Infektionsrate in Vorversuchen um das Sechsfache steigern und die Nachweisgrenze auf 10 pfu/mg Organ herabsetzen. Als Kontrolle diente Homogenat aus naiven Organen, dem pro Vertiefung 10 pfu gereinigte Viren zugegeben wurden, woraus nach Zentrifugation eine moi von 60 resultierte. Nach drei Stunden wurden die Homogenate durch frisches Medium ersetzt. Infizierte Zellen wurden drei Tage später durch indirekte Immunfluoreszenz detektiert.

### **Neutralisationstest**

Für die Testung der Neutralisationskapazitäten verschiedener, mabs gegen die rekombinanten, murinen Viren, wurden Dreifachansätze der zu testenden Antikörper in einer 96-Loch Rundbodenplatte (Nunculon<sup>TM</sup> Surface) mit einer Anfangsverdünnung von 10 µg/ml seriell in log<sub>2</sub> Schritten mit Zellkulturmedium in einem Endvolumen von 45 µl verdünnt. 3 x 1 200 pfu Virus wurden im gleichen Volumen Medium zugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Um die Neutralisationskapazität von Seren zu bestimmen, wurden serielle log<sub>2</sub> Verdünnungen von Seren mit 2 000 pfu MCMV157luc inkubiert. Das Virus-Antikörper Gemisch wurde auf MEF in 96-Loch Platten übertragen, um eine Infektion durch nicht neutralisiertes Virus zu erlauben. Zwei Tage später konnte die Luziferaseaktivität im Luminometer ermittelt werden, da alle verwendeten Viren das Luziferase Gen unter dem MIEP trugen. Zur Berechnung der prozentualen Neutralisation wurden Kontrollinfektionen angesetzt, die kein Virus oder keine Antikörper enthielten, woraus die minimale bzw. maximal mögliche Luziferaseexpression resultierte. Weiterhin wurde eine log<sub>2</sub> Titration des Virus, beginnend mit 1 200 pfu/Loch, durchgeführt. Der lineare Zusammenhang zwischen der Anzahl infektiöser Partikel und gemessener Luziferaseaktivität stellt eine Grundvoraussetzung für den Neutralisationstest dar. Zur Messung der Luziferaseaktivität und somit der Menge der infizierten Zellen wurden die Platten 10 Min bei 1 200 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl Glo-Lysis Puffer (Promega, USA) pro Vertiefung lysiert und je 30 µl des Lysats in eine weiße CostarR 96-Loch Platte überführt, die mit 50 µl/Loch LAP beschickt war. Die Luziferaseaktivität wurde durch Detektion der Chemilumineszenz nach Injektion von 50 µl/Loch LS im Orion II-Microplate Luminometer (Berthold Detection Systems, Bad Wildbad) mit dem Programm Simplicity 4 (Berthold Detection Systems, Pforzheim) gemessen. Als Substrat enthielt die LS D-Luziferin. Das transmittierte Licht wurde in Form von RLU quantifiziert.

Da 100 %-ige Neutralisation einem RLU Wert von kleiner oder gleich Null entspricht und dieser auch erreicht wird, wenn keine oder nur tote Zellen in der Vertiefung lysiert werden, wurde für Vergleiche der Neutralisationskapazität die 50 %-ige Neutralisation herangezogen. Diese ist erreicht, wenn genug Antikörper vorhanden sind, um genau die Hälfte des eingesetzten Virus zu neutralisieren. Die prozentuale Neutralisation wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ Neutralisation} = 100 \% - \frac{(\text{gemessener RLU-Wert der Probe}) - (\text{Mittelwert der Negativ-Kontrollen})}{(\text{Mittelwert der Positiv-Kontrollen}) - (\text{Mittelwert der Negativ-Kontrollen})} \times 100$$

Für die Berechnung der Neutralisation von HCMV durch verschiedene Seren oder Antikörper wurden HFF mit 15 000 Zellen pro Vertiefung in 96-Loch Platten ausgesät. Serielle 1:3 Verdünnungen von Seren oder Antikörpern wurden für eine Stunde bei 37°C mit jeweils 2 000 pfu AD196 inkubiert und anschließend zu den HFF gegeben. Nach 24 Stunden wurde das Medium entfernt und die Zellen mit EtOH fixiert. Infizierte Zellen wurden mit Antikörpern gegen HCMV IE1 (p63-27) und FITC-gekoppeltem Sekundärantikörper gefärbt. Unter einem inversen Fluoreszenzmikroskop wurde die Anzahl infizierter Zellen in einem Gesichtsfeld pro Vertiefung bei zwanzigfacher Vergrößerung bestimmt. Die Neutralisationsfähigkeit des Serums oder Antikörpers wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ Neutralisation} = 100 \% - \frac{\text{Anzahl infizierter Zellen mit Antikörper}}{\text{Anzahl infizierter Zellen ohne Antikörper}} \times 100$$

Die Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse des Neutralisationstests erfolgte in Excel und GraphPad Prism® 5.

### **Zytolysetest (<sup>51</sup>Cr-Release Assay)**

Die Zytolysetests nach Brunner et al. (1968) wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Rafaela Holtappels in Mainz durchgeführt.

Als Zielzellen dienten MEF der Passage drei die 24 Stunden vor Verwendung mit ein pfu MCMV wt pro Zelle zentrifugal für 30 Min bei 760 g infiziert wurden. Bis zum Einsatz im Test wurde der vollständige Replikationszyklus durchlaufen, und es konnten Antigene aus allen Phasen präsentiert werden. Um Antigene der frühen Phase zu testen, wurde bei Infektion 5 µl/ml PAA zugegeben. Die Zugabe dieses DNA-Polymerase-Inhibitors bewirkte ein Arretieren des Replikationszyklus in der frühen Phase, die bei Einsetzen der DNA-Replikation ca. 16 Stunden nach Infektion beendet ist (Keil et al., 1984). So konnten nur IE- und E-Gene Transkriptionsprodukte präsentiert werden. Zusätzlich wurde ein Teil der Zielzellen 48 Stunden vor Infektion mit 20 ng/ml IFN $\gamma$  behandelt, wodurch die Expression von viralen Proteinen auf der Oberfläche verstärkt werden sollte. Um das unspezifische Gesamtzytolysepotential der Effektorzellen zu bestimmen wurden CD3 $\epsilon$ -Hybridomzellen als Zielzellen eingesetzt. Diese aktivierten die Effektoren durch antigenunabhängige Bindung an ihre CD3 $\epsilon$  Kette. Die verschiedenen Zielzellen wurden geerntet, gewaschen, gezählt und mit radioaktivem <sup>51</sup>Cr-markiert, wobei für 0,5 - 1 x 10<sup>6</sup> Zellen 100 µCi des Radionuklids eingesetzt wurde. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurden die Zellen drei Mal gewaschen und auf eine Zelldichte von 1 x 10<sup>3</sup> pro Vertiefung einer 96 Loch Platte eingestellt. Für jeden zu ermittelnden Wert wurden Triplikate angelegt. Zur Diskriminierung zwischen spezifischer und Spontanlyse wurden stets "high control" und "low

*control*" mitgeführt. Hierfür wurden die Zielzellen ohne Effektoren in neunfacher Wiederholung angelegt. In einer 1:2 Verdünnungsreihe und einem Endvolumen von 200 µl wurden die Effektoren zu den Zielzellen gegeben. Für eine bessere Kontaktaufnahme wurden sie für 5 Min bei 120 g zentrifugiert und für vier Stunden bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch 10-minütige Zentrifugation bei 681 g pelletiert und jeweils 100 µl Überstand in vorbereitete Counter-Röhrchen pipettiert. Bei den "*high controls*" wurde zur Bestimmung der Gesamtaktivität der markierten Zielzellen die Radioaktivität von 100 µl suspendierter Zellen gemessen. Bei den "*low controls*" wurde die durch Spontanlyse freigesetzte Radioaktivität in 100 µl zellfreiem Überstand bestimmt.

Die Menge des durch Lyse freigesetzten Radionuklids im Überstand wurde in einem γ-Counter quantifiziert und die spezifische Lyse nach folgender Formel berechnet:

$$(cpm - lc) : (hc - lc) \times 100 = \% \text{ spezifische Lyse}$$

cpm = radioaktive *Counts*/Min der gemessenen Probe  
 hc = *high control*  
 lc = *low control*

## 7.3 Immunologische Methoden

### 7.3.1 Immunfluoreszenzfärbung

Alle Verdünnungen oder Waschschriffe erfolgten in PBS mit 1 % BSA oder 2 % FKS. MEF oder Cos7-Zellen wurden auf Deckgläschen in 24-Loch Platten ausgesät. Zwei Tage nach Infektion oder Transfektion wurden sie gewaschen und mit 3 % PFA in PBS für 30 Min fixiert. Nach dreimaligem Waschen wurden freie Aldehydgruppen durch 10-minütige Inkubation mit 50 mM Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl) in PBS gesättigt. Für Gesamtfärbungen wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen für vier Min mit 0,1 % Triton X-100 in Puffer permeabilisiert. Alle Zellen wurden nach zweimaligem Waschen für 15 Min mit naivem Mausserum (1:100 in Puffer) blockiert. Anschließend wurden sie mit 3,75 µg/ml SM5-1 Antikörper oder 1:50 verdünnten Seren für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen erfolgte die Detektion mit FITC-gekoppeltem, mensch- (1:80) oder mausspezifischem (1:200) Kaninchenantikörper. Die Deckgläschen wurden mit DAPI-haltigem Vectashield™-Eindeckmedium (Vector Laboratories, USA) eingedeckt und einlackiert. Am Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 (Carl Zeiss, Jena) wurden die Immunfluoreszenzen analysiert und mit MetaVue (Molecular devices Corporation, USA) dokumentiert.

### 7.3.2 Enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest (ELISA)

Alle ELISA-Analysen nach Engvall and Perlmann (1971; 1972) wurden in F96 Maxi Sorp Immuno-Platten der Firma Nunc (Wiesbaden) durchgeführt.

### **Quantitative Bestimmung der Virus- bzw. hgB-spezifischen Serumtitler**

Die Platten wurden über Nacht bei 4°C mit 2 µg/ml gereinigten HCMV oder MCMV Partikeln bzw. 0,5 µg/ml löslichem hgB (Sanofi Pasteur) in einem Volumen von 50 µl Koppungspuffer pro Vertiefung beschichtet. Nach einem Waschschrift wurde mit 150 µl/Vertiefung 5 % FKS in PBS für eine Stunde blockiert. Alle Inkubationsschritte erfolgten in einer feuchten Kammer bei 37°C. Gewaschen wurde mit 0,05 % Tween 20 in PBS. Zu testende Proben (Seren oder antikörperhaltige Zellkulturüberstände) wurden in Zweierschritten titriert und nach Ausschlagen des Blocks für 90 Min in den ELISA-Platten inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen wurden die gebundenen Antikörper mit einem 1:2 000 verdünnten, HRP-gekoppeltem, mausspezifischem Ziegenantikörper in 50 µl Puffer pro Vertiefung detektiert. Durch Zugabe von 100 µl einer wasserstoff-peroxidhaltigen Lösung (TMB Reagenz, KPL, USA) wurden sie nach erneutem fünfmaligem Waschen sichtbar gemacht. Bei Erreichen des optimalen Rausch-Signal-Verhältnisses wurde die Substratreaktion mit 100 µl/Vertiefung 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Im ELISA Photometer Emax (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) wurde die optische Dichte bei 492 nm bestimmt. Die Aquirierung der Messung erfolgte mit der Software SOFTmax Pro v3.0 (Molecular Devices, USA). Mit der Software MS Excel wurden die graphische Darstellung der Messdaten und die statistische Auswertungen durchgeführt.

### **Bestimmung der IgG Konzentration in Antikörperpräparationen**

Konzentrationsbestimmungen von IgG Antikörpern aus Mensch, Maus oder Ratte wurden in ELISA-Platten mit 2 µg/ml gekoppelten, speziesspezifischen Antikörpern durchgeführt. Zu testende Proben wurden nach Blockierung der Platten in Zweierschritten titriert. Als Standardreihe fungierte IgG mit einer Anfangskonzentration von 500 ng/ml. Als Sekundäantikörper wurden HRP-konjugierte, speziesspezifische Antikörper eingesetzt. Nach Substratreaktion erfolgte die quantitative Auswertung der einzelnen Proben anhand der Immunglobulin Standardkurve.

### **7.3.3 SDS-PAGE und Western Blot Analyse (WB)**

Die Auftrennung der viralen Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch SDS-PAGE nach Laemmli (1970) unter reduzierenden Bedingungen durch Zugabe von 10 % β-Mercaptoethanol zum Auftragspuffer. Gele wurden mit dem Rotiphorese Gel System von Roth hergestellt. Eine 10 %-ige Acrylamid-Bisacrylamidkonzentration des Trenngels erlaubte die Auftrennung der Virusproteine über den gesamten Größenbereich.

Die aufgetrennten Proteine wurden nach der Methode von Burnette (1981) auf eine Protran Nitrozellulosemembran übertragen (Porengröße 0,2 µm, Schleicher und Schuell, Dassel). Färbung mit Ponceau S (Sigma-Aldrich, Steinheim) ermöglichte eine Überprüfung des Transfers und im Falle der Serentestung das Zurechtschneiden einzelner Spuren in Streifen. Anschließend wurden die Membranen für 10 Min in Waschpuffer mit 0,1 % Tween 20 in PBS entfärbt und über Nacht bei 4°C in 5 % Milchpulver in Waschpuffer blockiert. Dann wurden die Proteine der rekombinanten Viren mit 27-287 antikörperhalti-

gem Zellkulturüberstand, die einzelnen Streifen mit 1:100 verdünnten Mausseren für zwei Stunden inkubiert. Nach dreimaligem Waschen folgte eine einstündige Inkubation mit 1:3 000 verdünntem HRP-gekoppeltem anti-Maus-Antikörper. Die beiden Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Es folgten eine 15-minütige und zwei fünfminütige Waschungen und zwei fünfminütige Inkubationen in PBS. Der Nachweis der Antikörper erfolgte schließlich durch Zugabe von ECL Reagenz (Pierce, Helsingborg, Schweden). Die detektierten Proteine wurden mit der CCD Kamera LAS-1000 (Fujitsu Siemens) festgehalten.

### 7.3.4 Durchflusszytometrie

#### Durchflusszytometrische Analysen von isolierten Zellen

MEF wurden in 6-Loch Platten mit  $1,5 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung ausgesät und am nächsten Tag mit je  $0,5 \times 10^5$  pfu/Loch der rekombinanten Viren infiziert (moi 0,33). Die Zellen einer Vertiefung waren ausreichend für drei Färbungen. Nach zwei Tagen wurden infizierte MEF durch fünfminütige Inkubation bei 37°C mit 1 mg/ml Collagenase D in PBS vom Zellkulturschalenboden abgelöst und nach Virusinfekten gepoolt. Sie wurden gewaschen, mit 5 ml 3 %-igem PFA in PBS für 10 Min fixiert, erneut gewaschen und mit 2 ml  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50 mM für 20 Min inkubiert. Jeweils die Hälfte der Zellen wurde mit 1 ml 0,1 % Triton X-100 für vier Min permeabilisiert. Blockiert wurde durch 20-minütige Inkubation mit PBS, 1 % BSA, 2 % humanes CMV Serum, 10 % FKS und 1:100 verdünnter Fc-Rezeptor-Block (BD). Die Zellen wurden in einzelne Röhrchen mit einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  aufgeteilt und mit dem gleichen Volumen 8  $\mu\text{g/ml}$  konzentriertem Primärantikörper (27-39, 27-287, IgG2a) oder antikörperhaltigem Zellkulturüberstand (Croma101) für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen für eine Stunde mit 1:100 verdünntem FITC-gekoppeltem Ziege-anti-Maus-Antikörper inkubiert. Sofern nicht anders vermerkt wurden alle Inkubationsschritte im Dunkeln bei Raumtemperatur in FACS-Puffer durchgeführt. Waschungen erfolgten durch Auffüllen des Reaktionsgefäßes mit FACS-Puffer und anschließender Zentrifugation bei 1 200 rpm für eine Min pro 2 ml Volumen.

Primäre, murine Zellen aus Milz und Lymphknoten wurden wie in 7.4.6 beschrieben gewonnen und nach Lyse der Erythrozyten für durchflusszytometrische Analysen eingesetzt. Ca.  $1 \times 10^7$  Zellen wurden für 20 Min mit CD16/32-spezifischen Antikörpern (s.o.) blockiert, gewaschen und für 30 Min mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen CD3 (APC), CD4,  $\text{TCR}\alpha\beta$  (PE-Cy7) und  $\text{TCR}\gamma\delta$  (FITC) gefärbt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, mit 3 % PFA fixiert und durch Pre-Separation Filter mit einer Maschenweite von 30  $\mu\text{m}$  filtriert. Aquirierung und Analyse erfolgten am FACS LSRII mit der Software FACSDiva (BD). Die graphische Darstellung der Messdaten und statistische Auswertungen wurden mit der Software FACSEXPRESS (De Novo Software, USA) durchgeführt.

### **Durchflusszytometrische Analysen aus murinem Vollblut**

Zu 30 - 50 µl heparinisiertem (Liquemin N 2500, Roche, Mannheim) Blut wurde das gleiche Volumen einer doppelt konzentrierten Mischung aller Primärantikörper für die jeweilige Färbung in FACS-Puffer gegeben. Bei durchflusszytometrischen Analysen aus Vollblut wurden nur direktkonjugierte Primärantikörper eingesetzt. Nach 30-minütiger Inkubation wurde jeder Ansatz mit 800 µl FACS Lysing Solution (#349202, BD) versetzt und 10 Min bei RT inkubiert, was zur Fixierung der Zellen und zur Erythrozytenlyse führte. Die Zellen wurden gewaschen, in FACS Puffer aufgenommen und analysiert.

Für Bestimmungen der Zellzahlen im Blut, wurde dieses direkt in spezielle Röhrchen entnommen, welche mit getrocknetem Heparin beschichtet waren (Greiner Bio one). Jeweils 25 µl Vollblut wurden mit 25 µl Färbeansatz versetzt. Dieser enthielt 1 µl Fc-Rezeptor-Block, eine doppelt konzentrierte Mischung aller Primärantikörper und 2 500 truecount beads, welche aus den lyophilisierten Pellets von Truecount Röhrchen (BD) rekonstituiert wurden. Nach 30-minütiger Inkubation wurden 45 µl FACS Lysing Solution zugegeben und der Ansatz ohne Waschschriffe analysiert. Am Durchflusszytometer wurde die Aquirierung der Zellen so eingestellt, dass jeweils 750 beads aufgenommen wurden, welche einem Blutvolumen von 7,5 µl entsprachen. Daraus wurde die Zellzahl pro µl berechnet.

## **7.4 Tierexperimentelle Techniken**

### **7.4.1 Infektionen und Überleben**

Die Versuchstiere wurden, soweit nicht anders vermerkt, immer mit  $1 \times 10^5$  pfu infiziert. Sie wurden mindestens wöchentlich, bei Bedarf täglich, untersucht und bewertet. Folgende Kriterien wurden bei der Evaluation berücksichtigt: struppiges Fell, krummer Rücken, Ascites, Gewichtsverlust und Aktivität. Bei entsprechendem Zustand wurden sie gemäß den Tierschutzbestimmungen euthanasiert. Alle Versuchstiere wurden durch kraniale Dislokation getötet.

### **7.4.2 Blutentnahme und Serumgewinnung**

Die Versuchstiere wurden einige Minuten unter Rotlicht aufgewärmt und durch Anritzen der Schwanzvene direkt in heparinisierte Röhrchen oder spezielle Microtainer (Microtainer SST, BD, USA) geblutet. Zur Serumgewinnung wurden die zellulären Blutbestandteile für 10 Min bei 9 000 rpm und Raumtemperatur unter die Trennschicht im Microtainer abzentrifugiert und das gesamte Röhrchen bei -20°C gelagert. Das finale Ausbluten erfolgte, nach Betäubung mit Diethyläther, durch Glaskapillaren aus dem Augensinus.

Die Gewinnung von hyperimmunem hgB-Serum wurde von Florian Weisel im Rahmen seiner Doktorarbeit (Lehrstuhl für Genetik, Universität Erlangen-Nürnberg) durchgeführt und das Serum zur Verfügung gestellt. Immunkompetente Versuchstiere wurden jeweils

dreimal im Abstand von sechs Wochen mit löslichem hgB (Sanofi Pasteur) immunisiert. Bei den ersten beiden Immunisierungen erfolgte eine intraperitoneale Applikation von je 5 µg Gesamtproteinmenge in Adjuvans (Imject Alum, Pierce, Rockford, USA) nach Anleitung des Herstellers. Die dritte Antigengabe von 2 µg Gesamtprotein in PBS erfolgte intravenös.

#### 7.4.3 Analyse der *in vivo* Biolumineszenz

Ventral enthaarten Versuchstieren wurde 0,5 mg D-Luziferin (P.J.K., Kleinblittersdorf) in 200 µl PBS intraperitoneal appliziert. Sie wurden mit Isofluran (Baxter, Unterschleißheim) über einen Atemtrichter narkotisiert, der an einen Verdampfer HNG6 (H. Hölzel) angeschlossen war. Für die Messdauer wurden sie in einer Dunkelkammer auf einem Objektisch am Atemtrichter fixiert. Mit einem gekühlten CCD Kamerasystem (Hamamatsu Photonics, Okayama City, Japan) wurde das bei der Substratumsetzungsreaktion frei werdende Licht über einen Zeitraum von 120 Sek aufgenommen. Die Fotodokumentation erfolgte mit Simplic software (Compix, Cranberry Township). Anschließend wurde die Intensität des transmittierten Lichts in dem Programm ImageJ (Wayne Rasband; National Institutes of Health, Bethesda) in Falschfarben dargestellt. Entsprechende Hell- und Fluoreszenzbilder wurden mit Adobe Photoshop SC3 Software (Adobe Systems, USA) übereinandergelegt.

#### 7.4.4 Bestimmung der Viruslast in den Organen

Die Bestimmung der Viruslast erfolgte über die Ermittlung der Luziferaseaktivität in 30 µg Organhomogenat. Von Florian Weisel wurde im Rahmen seiner Doktorarbeit (Universität Erlangen) gezeigt, dass sie in diesem Bereich korrelierten. Die Homogenate wurden mit dem Precellys Homogenisator System von Peqlab hergestellt. Hierfür wurden ca. 0,5 cm<sup>2</sup> Stücke der zu analysierenden Organe in passenden Röhrchen mit 0,6 - 0,7 g Keramikkügelchen (1,4 mm; für Speicheldrüse sechs Stück mit 2,4 mm) und 0,5 - 1 ml GloLysis Puffer (Promega, USA) versetzt und nach folgenden Vorgaben zerkleinert:

Leber:	1x15 Sek	bei 5 000 rpm
Lunge:	1x15 Sek	bei 6 500rpm
Niere und Speicheldrüse:	1x20 Sek	bei 6 000 rpm
Milz:	1x15 Sek	bei 6 500 rpm

Die Kügelchen und grobe Organstücke wurden durch zehnminütige Zentrifugation bei 13 000 rpm pelletiert und die Proteinkonzentration im Überstand bestimmt. In einer weißen CostarR 96-Loch Platte wurden 50 µl LAP pro Vertiefung vorgelegt und 30 µl Homogenat, eingestellt auf eine Konzentration von 1 µg/µl, zugegeben. Die Luziferaseaktivität wurde wie im Neutralisationstest durch Detektion der Chemilumineszenz nach Injektion von 50

$\mu\text{l}$ /Vertiefung LS, im Orion II-Microplate Luminometer gemessen und in Form von RLU quantifiziert. Gezeigt wurden jeweils die Mittelwerte aus zwei Ansätzen.

#### **7.4.5 *In vivo* Depletionen**

Alle Antikörper für *in vivo* Depletionen (bioxcell, West Lebanon, USA) wurden in einem Endvolumen von 200  $\mu\text{l}$  intraperitoneal appliziert. Das Volumen wurde auf 100  $\mu\text{l}$  reduziert, wenn am gleichen Tag noch andere Substanzen injiziert wurden.  $\text{CD4}^+$  T-Zellen wurden durch Verabreichen von 250  $\mu\text{g}$  YTS 191 Antikörper an Tag -1, 3 und 8 depletiert. Für Langzeitdepletion wurden 300  $\mu\text{g}$  an Tag -1, 3 und 35 sowie 700  $\mu\text{g}$  an Tag 7, 17 und 24 verabreicht. NK-Zelldepletion wurde durch Gabe von 500  $\mu\text{g}$  PK-136 Antikörper an Tag -1 und 6 erreicht. Bei zusätzlicher Depletion von  $\text{CD4}^+$  Zellen wurden an Tag -1, 3 und 6 je 250  $\mu\text{g}$  YTS 191 Antikörper injiziert. Für die Depletion von  $\text{CD3}^+$  Zellen war eine vorhergehende  $\text{CD4}^+$ -Depletion von Nöten, da der einzige vorhandene Antikörper gegen CD3 an die  $\text{CD3}\epsilon$  Kette bindet. Dadurch werden alle  $\text{CD3}^+$  Zellen unspezifisch aktiviert, was in Vorversuchen teilweise tödliche Auswirkungen hatte. Daher wurden zunächst an Tag -4 alle  $\text{CD4}^+$  T-Zellen mit 750  $\mu\text{g}$  YTS 191 Antikörper entfernt und an Tag -1 und 2 nach Infektion 250  $\mu\text{g}$  145-2C11 Antikörper verabreicht. Die  $\text{CD4}^+$ -depletierte Kontrollgruppe erhielt in diesem Versuch die gleiche Menge an YTS 191 Antikörpern und zusätzlich 250  $\mu\text{g}$  YTS 191 an Tag 2 nach Infektion. Die erfolgreiche Depletion wurde mittels durchflusszytometrischer Analysen des Blutes bestätigt.

#### **7.4.6 Isolation und Aufreinigung muriner Zellen**

##### **Aufreinigung von Zellen aus Milz und Lymphknoten**

Milzen und Lymphknoten wurden direkt nach dem Töten der Versuchstiere entnommen und bis zur baldmöglichsten Verarbeitung auf Eis gelagert. Soweit nicht anders vermerkt erfolgten alle Reinigungsschritte in FACS-Puffer bei 4°C. Die Organe wurden mechanisch zerkleinert und in FACS-Puffer mit dem Stempel einer 2 ml-Spritze durch ein Zellsieb (Cellstrainer 70  $\mu\text{m}$ , BD) gedrückt. Die erhaltene Einzelzellsuspension wurde in 15 ml Rundbodengefäße überführt und zentrifugiert. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C und 1 500 rpm für eine Min pro 2 ml Volumen durchgeführt.

##### **Erythrozytenlyse**

Die Pellets wurden in 500  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer resuspendiert und mit 5 ml Erythrozytenlysepuffer versetzt. Durch Zugabe von 10 ml FACS-Puffer wurde die Reaktion nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur abgestoppt und die Zellen gefiltert und pelletiert. Es wurden ausschließlich Zellsiebe mit einer Maschenweite von 30  $\mu\text{m}$  (MACS Pre-Separation Filters) verwendet.

### **Anreicherung CD4<sup>+</sup> Zellen mittels Ficoll und MACS Technologie**

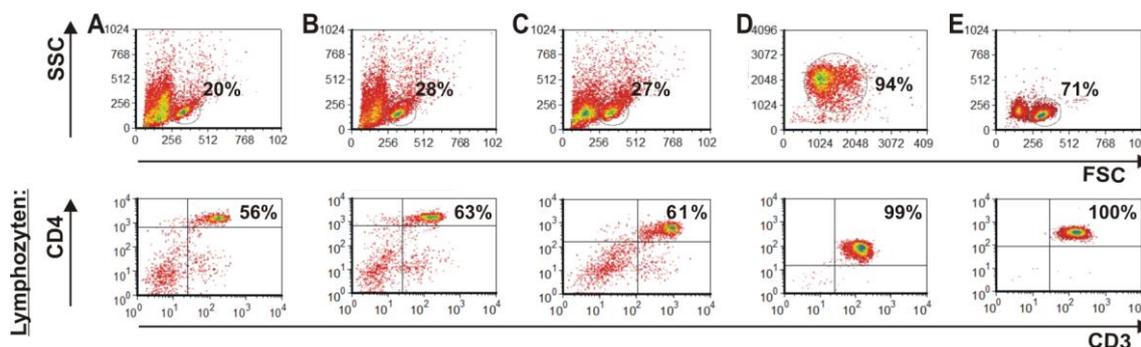
Nach Resuspension der Zellpellets in 10 ml FACS Puffer wurden diese mit 2 ml Lympholyte®-M (#CL5030 Biozol, Eching) unterschichtet und bei Raumtemperatur für 20 Min bei 2 000 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Der an der Grenze zwischen Medium und Ficoll entstandene Lymphozytenring wurde abgezogen, in FACS-Puffer gewaschen und die enthaltenen Zellen gezählt. Waschschriffe erfolgten durch Auffüllen des Reaktionsgefäßes mit FACS-Puffer und anschließender Pelletierung der Zellen. Die Zellen wurden in 90 µl FACS Puffer und 10 µl CD4-Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) pro  $1 \times 10^7$  Zellen resuspendiert. Überschüssige CD4-Microbeads wurden nach 15-minütiger Inkubation bei 4°C durch einen Waschschriff entfernt, die Zellen in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert und erneut gefiltert. Maximal  $1 \times 10^8$  Zellen/Säule wurden auf vorequibrierte MACS LS Separationssäulen im Magnetfeld des VarioMACS aufgetragen. Nach mehreren Waschschriffen wurde die Säulen aus den Magneten genommen, auf neue Auffangröhrchen gesetzt und die verbliebenen Zellen unter Druck mit 5 ml FACS-Puffer ausgespült und gezählt.

### **Färbung und MoFlo Zellsortierung**

Die Zellen wurden auf maximal  $5 \times 10^7$  Zellen/ml FACS Puffer eingestellt und im Dunkeln bei 4°C für 30 Min mit den entsprechenden fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen CD3, CD4, CD8, TCRαβ und TCRγδ inkubiert. Nach einem Waschschriff und Filtrierung wurden sie auf eine Dichte von ca.  $3 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zellsortierungen wurden von Herrn Uwe Appelt am MoFlo® High-speed sorter (Beckman Coulter, Krefeld) durchgeführt. Als Parameter für die Sortierung dienten Größe (FSC) und Granularität (SSC), sowie ein Dublettenausschluss durch die Pulsweite und die Fluoreszenz der jeweiligen verwendeten Antikörper. Die isolierten Zellen wurden in FKS-benetzte Auffanggefäße sortiert. Direkt im Anschluss wurde die Reinheit der isolierten Zellen im Zellsortierer überprüft. Anschließend wurden sie für 20 Min bei 2 000 rpm abzentrifugiert und für die jeweiligen Experimente eingesetzt.

### **Reinheit der isolierten Zellen**

Um die Aufreinigung der CD4<sup>+</sup> Zellen zu überprüfen, wurden nach den einzelnen Reinigungsschriffen Proben entnommen und nach Applikation der Zellen durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Abb. 32 zeigt, repräsentativ für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zell Isolationen, die Verteilung der CD4<sup>+</sup> Zellen nach den jeweiligen Reinigungsschriffen.



**Abb. 32: Durchflusszytometrische Analyse der Zellsuspension nach den einzelnen Reinigungsschritten. (A)** Einzelzellsuspension nach Lyse der Erythrozyten **(B)** Über Ficoll wurden Granulozyten, Thrombozyten und tote Zellen abgetrennt. **(C)** Mittels MACS Technologie sollten die  $CD4^+$  Zellen weiter angereichert werden. **(D)** Direkt nach Zellsortierung wurden die Zellen vor Ort analysiert. **(E)** Reanalyse nach Applikation der Zellen

Aus den Reanalysen ging hervor, dass durch Anwendung der MACS Technologie keine höhere Reinheit erreicht wurde. Das hier verwendete Aufreinigungsprotokoll erlaubte eine Anreicherung von  $CD4^+$  Zellen mit annähernd 100 %. Bis zur gesamten Reanalyse der isolierten Zellen vergingen mehrere Stunden. Es wurden nur noch 71 % lebende Zellen detektiert.

$DN\ TCR\alpha\beta^+$  und  $TCR\gamma\delta^+$  Zellen wurden aus  $CD8^{-/-}JHT^{-/-}$  Mäusen nach vorheriger *in vivo* Depletion der  $CD4^+$  Zellen isoliert. Dabei wurde die Anreicherung über Ficoll und MACS Säulen übersprungen und nach Erythrozytenlyse direkt zu Färbung für die Zellsortierung übergegangen. Dies bewirkte Reanalysen (nicht gezeigt) zufolge eine Reinheit von 99 %.

#### 7.4.7 Adoptiver Zell- und Serumtransfer

Der adoptive Zelltransfer erfolgte intravenös in einem Volumen von 200  $\mu$ l PBS mit 2 % FKS oder in den Augensinus in einem Volumen von 100 - 150  $\mu$ l. Serum wurde immer intraperitoneal appliziert.

### 7.5 Statistische Auswertung

Signifikanzbestimmungen ( $P < 0,05$ ) wurden, soweit nicht anders vermerkt, mit dem zweiseitigen Mann-Whitney t-test durchgeführt. Zur Berechnung der Signifikanzen in Überlebenskurven wurde der Mantel-Cox Test benutzt.

## 8 Literaturverzeichnis

Akbar, A.N., and Fletcher, J.M. (2005). Memory T cell homeostasis and senescence during aging. *Current opinion in immunology* 17, 480-485.

Allison, J.P., and Havran, W.L. (1991). The immunobiology of T cells with invariant gamma delta antigen receptors. *Annual review of immunology* 9, 679-705.

Andoniou, C.E., Coudert, J.D., and Degli-Esposti, M.A. (2008). Killers and beyond: NK-cell-mediated control of immune responses. *European journal of immunology* 38, 2938-2942.

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

Arden, B., Clark, S.P., Kabelitz, D., and Mak, T.W. (1995). Mouse T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 42, 501-530.

Arens, R., Wang, P., Sidney, J., Loewendorf, A., Sette, A., Schoenberger, S.P., Peters, B., and Benedict, C.A. (2008). Cutting edge: murine cytomegalovirus induces a polyfunctional CD4 T cell response. *J Immunol* 180, 6472-6476.

Backovic, M., Longnecker, R., and Jardetzky, T.S. (2009). Structure of a trimeric variant of the Epstein-Barr virus glycoprotein B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 2880-2885.

Bale, J.F., Jr., Petheram, S.J., Souza, I.E., and Murph, J.R. (1996). Cytomegalovirus reinfection in young children. *The Journal of pediatrics* 128, 347-352.

Beitia Ortiz de Zarate, I., Cantero-Aguilar, L., Longo, M., Berlioz-Torrent, C., and Rozenberg, F. (2007). Contribution of endocytic motifs in the cytoplasmic tail of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B to virus replication and cell-cell fusion. *Journal of virology* 81, 13889-13903.

Beitia Ortiz de Zarate, I., Kaelin, K., and Rozenberg, F. (2004). Effects of mutations in the cytoplasmic domain of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B on intracellular transport and infectivity. *Journal of virology* 78, 1540-1551.

Biron, C.A., Nguyen, K.B., Pien, G.C., Cousens, L.P., and Salazar-Mather, T.P. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual review of immunology* 17, 189-220.

Bissinger, A.L., Sinzger, C., Kaiserling, E., and Jahn, G. (2002). Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *Journal of medical virology* 67, 200-206.

Bluestone, J.A., Khattri, R., Sciammas, R., and Sperling, A.I. (1995). TCR gamma delta cells: a specialized T-cell subset in the immune system. *Annual review of cell and developmental biology* 11, 307-353.

Boismenu, R., and Havran, W.L. (1997). An innate view of gamma delta T cells. *Current opinion in immunology* 9, 57-63.

- Bonifacino, J.S., and Traub, L.M. (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annual review of biochemistry* 72, 395-447.
- Bonneville, M., O'Brien, R.L., and Born, W.K. (2010). Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nature reviews Immunology* 10, 467-478.
- Born, W.K., Yin, Z., Hahn, Y.S., Sun, D., and O'Brien, R.L. (2010). Analysis of gamma delta T cell functions in the mouse. *J Immunol* 184, 4055-4061.
- Borysiewicz, L.K., Morris, S., Page, J.D., and Sissons, J.G. (1983). Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes: requirements for in vitro generation and specificity. *European journal of immunology* 13, 804-809.
- Boyle, K.A., and Compton, T. (1998). Receptor-binding properties of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B. *Journal of virology* 72, 1826-1833.
- Britt, W. (2008). Manifestations of human cytomegalovirus infection: proposed mechanisms of acute and chronic disease. *Current topics in microbiology and immunology* 325, 417-470.
- Britt, W.J. (1984). Neutralizing antibodies detect a disulfide-linked glycoprotein complex within the envelope of human cytomegalovirus. *Virology* 135, 369-378.
- Britt, W.J., and Auger, D. (1986). Synthesis and processing of the envelope gp55-116 complex of human cytomegalovirus. *Journal of virology* 58, 185-191.
- Britt, W.J., and Boppana, S. (2004). Human cytomegalovirus virion proteins. *Human immunology* 65, 395-402.
- Britt, W.J., and Mach, M. (1996). Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirolgy* 39, 401-412.
- Britt, W.J., Vugler, L., Butfiloski, E.J., and Stephens, E.B. (1990). Cell surface expression of human cytomegalovirus (HCMV) gp55-116 (gB): use of HCMV-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response. *Journal of virology* 64, 1079-1085.
- Britt, W.J., and Vugler, L.G. (1992). Oligomerization of the human cytomegalovirus major envelope glycoprotein complex gB (gp55-116). *Journal of virology* 66, 6747-6754.
- Britt, W.J.A., C.A. (1996). Cytomegalovirus. *Fields virology*, vol 2, p. 2493-2523.
- Brown, M.G., Dokun, A.O., Heusel, J.W., Smith, H.R., Beckman, D.L., Blattenberger, E.A., Dubbelde, C.E., Stone, L.R., Scalzo, A.A., and Yokoyama, W.M. (2001). Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* 292, 934-937.
- Bubic, I., Wagner, M., Krmpotic, A., Saulig, T., Kim, S., Yokoyama, W.M., Jonjic, S., and Koszinowski, U.H. (2004). Gain of virulence caused by loss of a gene in murine cytomegalovirus. *Journal of virology* 78, 7536-7544.
- Burton, D.R. (2002). Antibodies, viruses and vaccines. *Nature reviews Immunology* 2, 706-713.

- Cardin, R.D., Abenes, G.B., Stoddart, C.A., and Mocarski, E.S. (1995). Murine cytomegalovirus IE2, an activator of gene expression, is dispensable for growth and latency in mice. *Virology* 209, 236-241.
- Chee, M., and Barrell, B. (1990). Herpesviruses: a study of parts. *Trends in genetics* : TIG 6, 86-91.
- Chen, J., Trounstein, M., Alt, F.W., Young, F., Kurahara, C., Loring, J.F., and Huszar, D. (1993). Immunoglobulin gene rearrangement in B cell deficient mice generated by targeted deletion of the JH locus. *International immunology* 5, 647-656.
- Cheng, L., Cui, Y., Shao, H., Han, G., Zhu, L., Huang, Y., O'Brien, R.L., Born, W.K., Kaplan, H.J., and Sun, D. (2008). Mouse gammadelta T cells are capable of expressing MHC class II molecules, and of functioning as antigen-presenting cells. *Journal of neuroimmunology* 203, 3-11.
- Chennupati, V., Worbs, T., Liu, X., Malinarich, F.H., Schmitz, S., Haas, J.D., Malissen, B., Forster, R., and Prinz, I. (2010). Intra- and intercompartmental movement of gammadelta T cells: intestinal intraepithelial and peripheral gammadelta T cells represent exclusive nonoverlapping populations with distinct migration characteristics. *J Immunol* 185, 5160-5168.
- Chong, K.T., Gresser, I., and Mims, C.A. (1983). Interferon as a defence mechanism in mouse cytomegalovirus infection. *The Journal of general virology* 64 (Pt 2), 461-464.
- Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G., and Ravetch, J.V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature medicine* 6, 443-446.
- Cobbold, M., Khan, N., Pourgheysari, B., Tauro, S., McDonald, D., Osman, H., Assenmacher, M., Billingham, L., Steward, C., Crawley, C., *et al.* (2005). Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *The Journal of experimental medicine* 202, 379-386.
- Cobbold, S.P., Jayasuriya, A., Nash, A., Prospero, T.D., and Waldmann, H. (1984). Therapy with monoclonal antibodies by elimination of T-cell subsets in vivo. *Nature* 312, 548-551.
- Cook, L., Miyahara, N., Jin, N., Wands, J.M., Taube, C., Roark, C.L., Potter, T.A., Gelfand, E.W., O'Brien, R.L., and Born, W.K. (2008). Evidence that CD8+ dendritic cells enable the development of gammadelta T cells that modulate airway hyperresponsiveness. *J Immunol* 181, 309-319.
- Cranage, M.P., Kouzarides, T., Bankier, A.T., Satchwell, S., Weston, K., Tomlinson, P., Barrell, B., Hart, H., Bell, S.E., Minson, A.C., *et al.* (1986). Identification of the human cytomegalovirus glycoprotein B gene and induction of neutralizing antibodies via its expression in recombinant vaccinia virus. *The EMBO journal* 5, 3057-3063.
- Cron, R.Q., Gajewski, T.F., Sharrow, S.O., Fitch, F.W., Matis, L.A., and Bluestone, J.A. (1989). Phenotypic and functional analysis of murine CD3+,CD4-,CD8- TCR-gamma delta-expressing peripheral T cells. *J Immunol* 142, 3754-3762.
- Daniels, K.A., Devora, G., Lai, W.C., O'Donnell, C.L., Bennett, M., and Welsh, R.M. (2001). Murine cytomegalovirus is regulated by a discrete subset of natural killer cells reactive with monoclonal antibody to Ly49H. *The Journal of experimental medicine* 194, 29-44.

- Davignon, J.L., Castanie, P., Yorke, J.A., Gautier, N., Clement, D., and Davrinche, C. (1996). Anti-human cytomegalovirus activity of cytokines produced by CD4+ T-cell clones specifically activated by IE1 peptides in vitro. *Journal of virology* *70*, 2162-2169.
- Davison, A.J., Dolan, A., Akter, P., Addison, C., Dargan, D.J., Alcendor, D.J., McGeoch, D.J., and Hayward, G.S. (2003). The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *The Journal of general virology* *84*, 17-28.
- Dechanet, J., Merville, P., Lim, A., Retiere, C., Pitard, V., Lafarge, X., Michelson, S., Meric, C., Hallet, M.M., Kourilsky, P., *et al.* (1999). Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *The Journal of clinical investigation* *103*, 1437-1449.
- Dieli, F., Poccia, F., Lipp, M., Sireci, G., Caccamo, N., Di Sano, C., and Salerno, A. (2003). Differentiation of effector/memory Vdelta2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites. *The Journal of experimental medicine* *198*, 391-397.
- Dokun, A.O., Kim, S., Smith, H.R., Kang, H.S., Chu, D.T., and Yokoyama, W.M. (2001). Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection. *Nature immunology* *2*, 951-956.
- Drobyski, W.R., and Majewski, D. (1997). Donor gamma delta T lymphocytes promote allogeneic engraftment across the major histocompatibility barrier in mice. *Blood* *89*, 1100-1109.
- Erlach, K.C., Bohm, V., Seckert, C.K., Reddehase, M.J., and Podlech, J. (2006). Lymphoma cell apoptosis in the liver induced by distant murine cytomegalovirus infection. *Journal of virology* *80*, 4801-4819.
- Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M.A., Madhusudhan, M.S., Eramian, D., Shen, M.Y., Pieper, U., and Sali, A. (2006). Comparative protein structure modeling using Modeller. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D Baxevanis [et al] Chapter 5, Unit 5.6.*
- Fan, Z., Grantham, M.L., Smith, M.S., Anderson, E.S., Cardelli, J.A., and Muggeridge, M.I. (2002). Truncation of herpes simplex virus type 2 glycoprotein B increases its cell surface expression and activity in cell-cell fusion, but these properties are unrelated. *Journal of virology* *76*, 9271-9283.
- Farrell, H.E., and Shellam, G.R. (1991). Protection against murine cytomegalovirus infection by passive transfer of neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies. *The Journal of general virology* *72 ( Pt 1)*, 149-156.
- Favoreel, H.W., Van Minnebruggen, G., Nauwynck, H.J., Enquist, L.W., and Pensaert, M.B. (2002). A tyrosine-based motif in the cytoplasmic tail of pseudorabies virus glycoprotein B is important for both antibody-induced internalization of viral glycoproteins and efficient cell-to-cell spread. *Journal of virology* *76*, 6845-6851.
- Feire, A.L., Koss, H., and Compton, T. (2004). Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 15470-15475.
- Fish, K.N., Soderberg-Naucler, C., Mills, L.K., Stenglein, S., and Nelson, J.A. (1998). Human cytomegalovirus persistently infects aortic endothelial cells. *Journal of virology* *72*, 5661-5668.

- Fletcher, J.M., Vukmanovic-Stejic, M., Dunne, P.J., Birch, K.E., Cook, J.E., Jackson, S.E., Salmon, M., Rustin, M.H., and Akbar, A.N. (2005). Cytomegalovirus-specific CD4<sup>+</sup> T cells in healthy carriers are continuously driven to replicative exhaustion. *J Immunol* *175*, 8218-8225.
- Flint, S., Enquist, L., Racaniello, V., and Skalka, A. (2004). Principles of virology, volume 2 (American Society for Microbiology).
- French, A.R., Pingel, J.T., Wagner, M., Bubic, I., Yang, L., Kim, S., Koszinowski, U., Jonjic, S., and Yokoyama, W.M. (2004). Escape of mutant double-stranded DNA virus from innate immune control. *Immunity* *20*, 747-756.
- Garman, R.D., Doherty, P.J., and Raulet, D.H. (1986). Diversity, rearrangement, and expression of murine T cell gamma genes. *Cell* *45*, 733-742.
- Gibson, W. (2008). Structure and formation of the cytomegalovirus virion. *Current topics in microbiology and immunology* *325*, 187-204.
- Gicklhorn, D., Eickmann, M., Meyer, G., Ohlin, M., and Radsak, K. (2003). Differential effects of glycoprotein B epitope-specific antibodies on human cytomegalovirus-induced cell-cell fusion. *The Journal of general virology* *84*, 1859-1862.
- Gonczol, E., and Plotkin, S. (2001). Development of a cytomegalovirus vaccine: lessons from recent clinical trials. *Expert opinion on biological therapy* *1*, 401-412.
- Gorman, S., Harvey, N.L., Moro, D., Lloyd, M.L., Voigt, V., Smith, L.M., Lawson, M.A., and Shellam, G.R. (2006). Mixed infection with multiple strains of murine cytomegalovirus occurs following simultaneous or sequential infection of immunocompetent mice. *The Journal of general virology* *87*, 1123-1132.
- Gretch, D.R., Kari, B., Gehrz, R.C., and Stinski, M.F. (1988). A multigene family encodes the human cytomegalovirus glycoprotein complex gCII (gp47-52 complex). *Journal of virology* *62*, 1956-1962.
- Guidotti, L.G., and Chisari, F.V. (2000). Cytokine-mediated control of viral infections. *Virology* *273*, 221-227.
- Haas, W., Pereira, P., and Tonegawa, S. (1993). Gamma/delta cells. *Annual review of immunology* *11*, 637-685.
- Hahn, G., Jores, R., and Mocarski, E.S. (1998). Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 3937-3942.
- Halary, F., Pitard, V., Dlubek, D., Krzysiek, R., de la Salle, H., Merville, P., Dromer, C., Emilie, D., Moreau, J.F., and Dechanet-Merville, J. (2005). Shared reactivity of V $\delta$ 2<sup>(neg)</sup>  $\gamma\delta$  T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *The Journal of experimental medicine* *201*, 1567-1578.
- Havran, W.L., and Allison, J.P. (1988). Developmentally ordered appearance of thymocytes expressing different T-cell antigen receptors. *Nature* *335*, 443-445.
- Hayday, A.C. (2000).  $\gamma\delta$  cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annual review of immunology* *18*, 975-1026.

- Hebeis, B.J., Klenovsek, K., Rohwer, P., Ritter, U., Schneider, A., Mach, M., and Winkler, T.H. (2004). Activation of virus-specific memory B cells in the absence of T cell help. *The Journal of experimental medicine* 199, 593-602.
- Hegel, M.T., and Ahles, T.A. (1994). Appropriateness of the MMPI-2 in the psychological assessment of chronic pain patients. *Journal of pain and symptom management* 9, 1-2.
- Heilig, J.S., and Tonegawa, S. (1986). Diversity of murine gamma genes and expression in fetal and adult T lymphocytes. *Nature* 322, 836-840.
- Heineman, T.C., and Hall, S.L. (2002). Role of the varicella-zoster virus gB cytoplasmic domain in gB transport and viral egress. *Journal of virology* 76, 591-599.
- Heldwein, E.E., and Krummenacher, C. (2008). Entry of herpesviruses into mammalian cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65, 1653-1668.
- Heldwein, E.E., Lou, H., Bender, F.C., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., and Harrison, S.C. (2006). Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. *Science* 313, 217-220.
- Hirsch, R., Eckhaus, M., Auchincloss, H., Jr., Sachs, D.H., and Bluestone, J.A. (1988). Effects of in vivo administration of anti-T3 monoclonal antibody on T cell function in mice. I. Immunosuppression of transplantation responses. *J Immunol* 140, 3766-3772.
- Ho, M. (2008). The history of cytomegalovirus and its diseases. *Medical microbiology and immunology* 197, 65-73.
- Hobom, U., Brune, W., Messerle, M., Hahn, G., and Koszinowski, U.H. (2000). Fast screening procedures for random transposon libraries of cloned herpesvirus genomes: mutational analysis of human cytomegalovirus envelope glycoprotein genes. *Journal of virology* 74, 7720-7729.
- Hossain, M.S., Takimoto, H., Ninomiya, T., Yoshida, H., Kishihara, K., Matsuzaki, G., Kimura, G., and Nomoto, K. (2000). Characterization of CD4- CD8- CD3+ T-cell receptor-alpha-beta+ T cells in murine cytomegalovirus infection. *Immunology* 101, 19-29.
- Hsu, K.M., Pratt, J.R., Akers, W.J., Achilefu, S.I., and Yokoyama, W.M. (2009). Murine cytomegalovirus displays selective infection of cells within hours after systemic administration. *The Journal of general virology* 90, 33-43.
- Huang, H., Benoist, C., and Mathis, D. (2010). Rituximab specifically depletes short-lived autoreactive plasma cells in a mouse model of inflammatory arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 4658-4663.
- Ibanez, C.E., Schrier, R., Ghazal, P., Wiley, C., and Nelson, J.A. (1991). Human cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages. *Journal of virology* 65, 6581-6588.
- Jameson, J., and Havran, W.L. (2007). Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing. *Immunological reviews* 215, 114-122.

- Jarvis, M.A., Fish, K.N., Soderberg-Naucler, C., Streblow, D.N., Meyers, H.L., Thomas, G., and Nelson, J.A. (2002). Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from cell surface is not required for virus envelopment in astrocytoma cells. *Journal of virology* 76, 5147-5155.
- Jiang, X.J., Adler, B., Sampaio, K.L., Digel, M., Jahn, G., Ettischer, N., Stierhof, Y.D., Scrivano, L., Koszinowski, U., Mach, M., *et al.* (2008). UL74 of human cytomegalovirus contributes to virus release by promoting secondary envelopment of virions. *Journal of virology* 82, 2802-2812.
- Johnson, R.M., Lancki, D.W., Sperling, A.I., Dick, R.F., Spear, P.G., Fitch, F.W., and Bluestone, J.A. (1992). A murine CD4-, CD8- T cell receptor-gamma delta T lymphocyte clone specific for herpes simplex virus glycoprotein I. *J Immunol* 148, 983-988.
- Jones, C.A. (2003). Congenital cytomegalovirus infection. *Current problems in pediatric and adolescent health care* 33, 70-93.
- Jonjic, S., Mutter, W., Weiland, F., Reddehase, M.J., and Koszinowski, U.H. (1989). Site-restricted persistent cytomegalovirus infection after selective long-term depletion of CD4+ T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 169, 1199-1212.
- Jonjic, S., Pavic, I., Lucin, P., Rukavina, D., and Koszinowski, U.H. (1990). Efficacious control of cytomegalovirus infection after long-term depletion of CD8+ T lymphocytes. *Journal of virology* 64, 5457-5464.
- Jonjic, S., Pavic, I., Polic, B., Crnkovic, I., Lucin, P., and Koszinowski, U.H. (1994). Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *The Journal of experimental medicine* 179, 1713-1717.
- Jons, A., Dijkstra, J.M., and Mettenleiter, T.C. (1998). Glycoproteins M and N of pseudorabies virus form a disulfide-linked complex. *Journal of virology* 72, 550-557.
- Kamphuis, E., Junt, T., Waibler, Z., Forster, R., and Kalinke, U. (2006). Type I interferons directly regulate lymphocyte recirculation and cause transient blood lymphopenia. *Blood* 108, 3253-3261.
- Kapp, M., Tan, S.M., Einsele, H., and Grigoleit, G. (2007). Adoptive immunotherapy of HCMV infection. *Cytotherapy* 9, 699-711.
- Kari, B., and Gehrz, R. (1988). Isolation and characterization of a human cytomegalovirus glycoprotein containing a high content of O-linked oligosaccharides. *Archives of virology* 98, 171-188.
- Kari, B., and Gehrz, R. (1993). Structure, composition and heparin binding properties of a human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II. *The Journal of general virology* 74 ( Pt 2), 255-264.
- Karre, K. (1991). MHC gene control of the natural killer system at the level of the target and the host. *Seminars in cancer biology* 2, 295-309.
- Karrer, U., Sierro, S., Wagner, M., Oxenius, A., Hengel, H., Koszinowski, U.H., Phillips, R.E., and Klenerman, P. (2003). Memory inflation: continuous accumulation of antiviral CD8+ T cells over time. *J Immunol* 170, 2022-2029.

- Kattenhorn, L.M., Mills, R., Wagner, M., Lomsadze, A., Makeev, V., Borodovsky, M., Ploegh, H.L., and Kessler, B.M. (2004). Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions. *Journal of virology* *78*, 11187-11197.
- Kavanagh, D.G., Gold, M.C., Wagner, M., Koszinowski, U.H., and Hill, A.B. (2001). The multiple immune-evasion genes of murine cytomegalovirus are not redundant: m4 and m152 inhibit antigen presentation in a complementary and cooperative fashion. *The Journal of experimental medicine* *194*, 967-978.
- Kaye, J.F., Gompels, U.A., and Minson, A.C. (1992). Glycoprotein H of human cytomegalovirus (HCMV) forms a stable complex with the HCMV UL115 gene product. *The Journal of general virology* *73* ( Pt 10), 2693-2698.
- Keil, G.M., Ebeling-Keil, A., and Koszinowski, U.H. (1984). Temporal regulation of murine cytomegalovirus transcription and mapping of viral RNA synthesized at immediate early times after infection. *Journal of virology* *50*, 784-795.
- Kielczewska, A., Kim, H.S., Lanier, L.L., Dimasi, N., and Vidal, S.M. (2007). Critical residues at the Ly49 natural killer receptor's homodimer interface determine functional recognition of m157, a mouse cytomegalovirus MHC class I-like protein. *J Immunol* *178*, 369-377.
- Kinzler, E.R., and Compton, T. (2005). Characterization of human cytomegalovirus glycoprotein-induced cell-cell fusion. *Journal of virology* *79*, 7827-7837.
- Klenovsek, K., Weisel, F., Schneider, A., Appelt, U., Jonjic, S., Messerle, M., Bradel-Tretheway, B., Winkler, T.H., and Mach, M. (2007). Protection from CMV infection in immunodeficient hosts by adoptive transfer of memory B cells. *Blood* *110*, 3472-3479.
- Knight, A., Madrigal, A.J., Grace, S., Sivakumaran, J., Kottaridis, P., Mackinnon, S., Travers, P.J., and Lowdell, M.W. (2010). The role of Vdelta2-negative gammadelta T cells during cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic stem cell transplantation. *Blood* *116*, 2164-2172.
- Koyano, S., Mar, E.C., Stamey, F.R., and Inoue, N. (2003). Glycoproteins M and N of human herpesvirus 8 form a complex and inhibit cell fusion. *The Journal of general virology* *84*, 1485-1491.
- Krmpotic, A., Bubic, I., Polic, B., Lucin, P., and Jonjic, S. (2003). Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur* *5*, 1263-1277.
- Kropff, B., Koedel, Y., Britt, W., and Mach, M. (2010). Optimal replication of human cytomegalovirus correlates with endocytosis of glycoprotein gpUL132. *Journal of virology* *84*, 7039-7052.
- Krzyzaniak, M., Mach, M., and Britt, W.J. (2007). The cytoplasmic tail of glycoprotein M (gpUL100) expresses trafficking signals required for human cytomegalovirus assembly and replication. *Journal of virology* *81*, 10316-10328.
- Kurz, S.K., and Reddehase, M.J. (1999). Patchwork pattern of transcriptional reactivation in the lungs indicates sequential checkpoints in the transition from murine cytomegalovirus latency to recurrence. *Journal of virology* *73*, 8612-8622.

- Lafarge, X., Merville, P., Cazin, M.C., Berge, F., Potaux, L., Moreau, J.F., and Dechanet-Merville, J. (2001). Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *The Journal of infectious diseases* *184*, 533-541.
- Lake, C.M., and Hutt-Fletcher, L.M. (2000). Epstein-Barr virus that lacks glycoprotein gN is impaired in assembly and infection. *Journal of virology* *74*, 11162-11172.
- Lee, S.H., Girard, S., Macina, D., Busa, M., Zafer, A., Belouchi, A., Gros, P., and Vidal, S.M. (2001). Susceptibility to mouse cytomegalovirus is associated with deletion of an activating natural killer cell receptor of the C-type lectin superfamily. *Nature genetics* *28*, 42-45.
- Leo, O., Foo, M., Sachs, D.H., Samelson, L.E., and Bluestone, J.A. (1987). Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *84*, 1374-1378.
- Low, M.G. (1989). Glycosyl-phosphatidylinositol: a versatile anchor for cell surface proteins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *3*, 1600-1608.
- Lubinski, J.M., Lazear, H.M., Awasthi, S., Wang, F., and Friedman, H.M. (2011). The herpes simplex virus 1 IgG fc receptor blocks antibody-mediated complement activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity in vivo. *Journal of virology* *85*, 3239-3249.
- Lucin, P., Jonjic, S., Messerle, M., Polic, B., Hengel, H., and Koszinowski, U.H. (1994). Late phase inhibition of murine cytomegalovirus replication by synergistic action of interferon-gamma and tumour necrosis factor. *The Journal of general virology* *75 ( Pt 1)*, 101-110.
- Lucin, P., Pavic, I., Polic, B., Jonjic, S., and Koszinowski, U.H. (1992). Gamma interferon-dependent clearance of cytomegalovirus infection in salivary glands. *Journal of virology* *66*, 1977-1984.
- Mach, M., Kropff, B., Dal Monte, P., and Britt, W. (2000). Complex formation by human cytomegalovirus glycoproteins M (gpUL100) and N (gpUL73). *Journal of virology* *74*, 11881-11892.
- Mach, M., Osinski, K., Kropff, B., Schloetzer-Schrehardt, U., Krzyzaniak, M., and Britt, W. (2007). The carboxy-terminal domain of glycoprotein N of human cytomegalovirus is required for virion morphogenesis. *Journal of virology* *81*, 5212-5224.
- Manischewitz, J.E., and Quinnan, G.V., Jr. (1980). Antivirus antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity during murine cytomegalovirus infection. *Infection and immunity* *29*, 1050-1054.
- Manning, W.C., and Mocarski, E.S. (1988). Insertional mutagenesis of the murine cytomegalovirus genome: one prominent alpha gene (ie2) is dispensable for growth. *Virology* *167*, 477-484.
- Marshall, G.S., Rabalais, G.P., Stout, G.G., and Waldeyer, S.L. (1992). Antibodies to recombinant-derived glycoprotein B after natural human cytomegalovirus infection correlate with neutralizing activity. *The Journal of infectious diseases* *165*, 381-384.
- Masuho, Y., Matsumoto, Y., Sugano, T., Fujinaga, S., and Minamishima, Y. (1987). Human monoclonal antibodies neutralizing human cytomegalovirus. *The Journal of general virology* *68 ( Pt 5)*, 1457-1461.

- McGeoch, D.J., Cook, S., Dolan, A., Jamieson, F.E., and Telford, E.A. (1995). Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *Journal of molecular biology* 247, 443-458.
- McLaughlin-Taylor, E., Pande, H., Forman, S.J., Tanamachi, B., Li, C.R., Zaia, J.A., Greenberg, P.D., and Riddell, S.R. (1994). Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Journal of medical virology* 43, 103-110.
- Mendelson, M., Monard, S., Sissons, P., and Sinclair, J. (1996). Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *The Journal of general virology* 77 ( Pt 12), 3099-3102.
- Mettenleiter, T.C. (2002). Herpesvirus assembly and egress. *Journal of virology* 76, 1537-1547.
- Moffat, J., Mo, C., Cheng, J.J., Sommer, M., Zerboni, L., Stamatis, S., and Arvin, A.M. (2004). Functions of the C-terminal domain of varicella-zoster virus glycoprotein E in viral replication in vitro and skin and T-cell tropism in vivo. *Journal of virology* 78, 12406-12415.
- Morton, C.C., and Nance, W.E. (2006). Newborn hearing screening--a silent revolution. *The New England journal of medicine* 354, 2151-2164.
- Moss, P., and Khan, N. (2004). CD8(+) T-cell immunity to cytomegalovirus. *Human immunology* 65, 456-464.
- Mukasa, A., Born, W.K., and O'Brien, R.L. (1999). Inflammation alone evokes the response of a TCR-invariant mouse gamma delta T cell subset. *J Immunol* 162, 4910-4913.
- Myerson, D., Hackman, R.C., and Meyers, J.D. (1984). Diagnosis of cytomegaloviral pneumonia by in situ hybridization. *The Journal of infectious diseases* 150, 272-277.
- Navarro, D., Paz, P., Tugizov, S., Topp, K., La Vail, J., and Pereira, L. (1993). Glycoprotein B of human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. *Virology* 197, 143-158.
- Nixdorf, R., Klupp, B.G., Karger, A., and Mettenleiter, T.C. (2000). Effects of truncation of the carboxy terminus of pseudorabies virus glycoprotein B on infectivity. *Journal of virology* 74, 7137-7145.
- Novak, Z., Ross, S.A., Patro, R.K., Pati, S.K., Kumbla, R.A., Brice, S., and Boppana, S.B. (2008). Cytomegalovirus strain diversity in seropositive women. *Journal of clinical microbiology* 46, 882-886.
- Ohizumi, Y., Suzuki, H., Matsumoto, Y., Masuho, Y., and Numazaki, Y. (1992). Neutralizing mechanisms of two human monoclonal antibodies against human cytomegalovirus glycoprotein 130/55. *The Journal of general virology* 73 ( Pt 10), 2705-2707.
- Oie, H.K., Easton, J.M., Ablashi, D.V., and Baron, S. (1975). Murine cytomegalovirus: induction of and sensitivity to interferon in vitro. *Infection and immunity* 12, 1012-1017.
- Osborn, J.E., and Medearis, D.N., Jr. (1966). Studies of relationship between mouse cytomegalovirus and interferon. *Proc Soc Exp Biol Med* 121, 819-824.

- Pao, W., Wen, L., Smith, A.L., Gulbranson-Judge, A., Zheng, B., Kelsoe, G., MacLennan, I.C., Owen, M.J., and Hayday, A.C. (1996). Gamma delta T cell help of B cells is induced by repeated parasitic infection, in the absence of other T cells. *Current biology* : CB 6, 1317-1325.
- Paterson, D.A., Dyer, A.P., Milne, R.S., Sevilla-Reyes, E., and Gompels, U.A. (2002). A role for human cytomegalovirus glycoprotein O (gO) in cell fusion and a new hypervariable locus. *Virology* 293, 281-294.
- Paulick, M.G., and Bertozzi, C.R. (2008). The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins. *Biochemistry* 47, 6991-7000.
- Pavic, I., Polic, B., Crnkovic, I., Lucin, P., Jonjic, S., and Koszinowski, U.H. (1993). Participation of endogenous tumour necrosis factor alpha in host resistance to cytomegalovirus infection. *The Journal of general virology* 74 ( Pt 10), 2215-2223.
- Pepperl, S., Munster, J., Mach, M., Harris, J.R., and Plachter, B. (2000). Dense bodies of human cytomegalovirus induce both humoral and cellular immune responses in the absence of viral gene expression. *Journal of virology* 74, 6132-6146.
- Pereira, P., Gerber, D., Huang, S.Y., and Tonegawa, S. (1995). Ontogenic development and tissue distribution of V gamma 1-expressing gamma/delta T lymphocytes in normal mice. *The Journal of experimental medicine* 182, 1921-1930.
- Perlman, D., and Halvorson, H.O. (1983). A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides. *Journal of molecular biology* 167, 391-409.
- Pitard, V., Roumanes, D., Lafarge, X., Couzi, L., Garrigue, I., Lafon, M.E., Merville, P., Moreau, J.F., and Dechanet-Merville, J. (2008). Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Blood* 112, 1317-1324.
- Plotkin, S.A. (2004). Congenital cytomegalovirus infection and its prevention. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 38, 1038-1039.
- Polic, B., Hengel, H., Krmpotic, A., Trgovcich, J., Pavic, I., Luccaronin, P., Jonjic, S., and Koszinowski, U.H. (1998). Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *The Journal of experimental medicine* 188, 1047-1054.
- Ponniah, S., Doherty, P.C., and Eichelberger, M. (1996). Selective response of gamma delta T-cell hybridomas to orthomyxovirus-infected cells. *Journal of virology* 70, 17-22.
- Potzsch, S., Spindler, N., Wieggers, A.K., Fisch, T., Rucker, P., Sticht, H., Grieb, N., Baroti, T., Weisel, F., Stamming, T., *et al.* (2011). B cell repertoire analysis identifies new antigenic domains on glycoprotein B of human cytomegalovirus which are target of neutralizing antibodies. *PLoS pathogens* 7, e1002172.
- Quinnan, G.V., and Manischewitz, J.E. (1979). The role of natural killer cells and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity during murine cytomegalovirus infection. *The Journal of experimental medicine* 150, 1549-1554.
- Quinnan, G.V., Manischewitz, J.E., and Ennis, P.A. (1980). Role of cytotoxic T lymphocytes in murine cytomegalovirus infection. *The Journal of general virology* 47, 503-508.

- Radsak, K., Eickmann, M., Mockenhaupt, T., Bogner, E., Kern, H., Eis-Hubinger, A., and Reschke, M. (1996). Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from the infected cell surface for virus envelopment. *Archives of virology* *141*, 557-572.
- Rapp, M., Messerle, M., Buhler, B., Tannheimer, M., Keil, G.M., and Koszinowski, U.H. (1992). Identification of the murine cytomegalovirus glycoprotein B gene and its expression by recombinant vaccinia virus. *Journal of virology* *66*, 4399-4406.
- Rawlinson, W.D., Farrell, H.E., and Barrell, B.G. (1996). Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *Journal of virology* *70*, 8833-8849.
- Reddehase, M.J. (2002). Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nature reviews Immunology* *2*, 831-844.
- Reddehase, M.J., Mutter, W., Munch, K., Buhning, H.J., and Koszinowski, U.H. (1987). CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *Journal of virology* *61*, 3102-3108.
- Reddehase, M.J., Podlech, J., and Grzimek, N.K. (2002). Mouse models of cytomegalovirus latency: overview. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* *25 Suppl 2*, S23-36.
- Reddehase, M.J., Simon, C.O., Seckert, C.K., Lemmermann, N., and Grzimek, N.K. (2008). Murine model of cytomegalovirus latency and reactivation. *Current topics in microbiology and immunology* *325*, 315-331.
- Reddehase, M.J., Weiland, F., Munch, K., Jonjic, S., Luske, A., and Koszinowski, U.H. (1985). Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *Journal of virology* *55*, 264-273.
- Reschke, M., Reis, B., Noding, K., Rohsiepe, D., Richter, A., Mockenhaupt, T., Garten, W., and Radsak, K. (1995). Constitutive expression of human cytomegalovirus glycoprotein B (gpUL55) with mutagenized carboxy-terminal hydrophobic domains. *The Journal of general virology* *76 ( Pt 1)*, 113-122.
- Reusch, U., Muranyi, W., Lucin, P., Burgert, H.G., Hengel, H., and Koszinowski, U.H. (1999). A cytomegalovirus glycoprotein re-routes MHC class I complexes to lysosomes for degradation. *The EMBO journal* *18*, 1081-1091.
- Reusser, P., Riddell, S.R., Meyers, J.D., and Greenberg, P.D. (1991). Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* *78*, 1373-1380.
- Revello, M.G., and Gerna, G. (2010). Human cytomegalovirus tropism for endothelial/epithelial cells: scientific background and clinical implications. *Reviews in medical virology* *20*, 136-155.
- Riddell, S.R., Watanabe, K.S., Goodrich, J.M., Li, C.R., Agha, M.E., and Greenberg, P.D. (1992). Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* *257*, 238-241.
- Roark, C.L., Aydintug, M.K., Lewis, J., Yin, X., Lahn, M., Hahn, Y.S., Born, W.K., Tigelaar, R.E., and O'Brien, R.L. (2004). Subset-specific, uniform activation among V gamma 6/V delta 1+ gamma delta T cells elicited by inflammation. *Journal of leukocyte biology* *75*, 68-75.

- Roche, S., Albertini, A.A., Lepault, J., Bressanelli, S., and Gaudin, Y. (2008). Structures of vesicular stomatitis virus glycoprotein: membrane fusion revisited. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS *65*, 1716-1728.
- Roizmann, B., Desrosiers, R.C., Fleckenstein, B., Lopez, C., Minson, A.C., and Studdert, M.J. (1992). The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of virology* *123*, 425-449.
- Russell, J.H., and Ley, T.J. (2002). Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annual review of immunology* *20*, 323-370.
- Sacher, T., Podlech, J., Mohr, C.A., Jordan, S., Ruzsics, Z., Reddehase, M.J., and Koszinowski, U.H. (2008). The major virus-producing cell type during murine cytomegalovirus infection, the hepatocyte, is not the source of virus dissemination in the host. *Cell host & microbe* *3*, 263-272.
- Scalzo, A.A., Fitzgerald, N.A., Simmons, A., La Vista, A.B., and Shellam, G.R. (1990). Cmv-1, a genetic locus that controls murine cytomegalovirus replication in the spleen. *The Journal of experimental medicine* *171*, 1469-1483.
- Scheffczik, H., Kraus, I., Kiermayer, S., Bogner, E., Holzenburg, A., Garten, W., and Eickmann, M. (2001). Multimerization potential of the cytoplasmic domain of the human cytomegalovirus glycoprotein B. *FEBS letters* *506*, 113-116.
- Sciammas, R., and Bluestone, J.A. (1998). HSV-1 glycoprotein I-reactive TCR gamma delta cells directly recognize the peptide backbone in a conformationally dependent manner. *J Immunol* *161*, 5187-5192.
- Scrivano, L., Esterlechner, J., Muhlbach, H., Ettischer, N., Hagen, C., Grunewald, K., Mohr, C.A., Ruzsics, Z., Koszinowski, U., and Adler, B. (2010). The m74 gene product of murine cytomegalovirus (MCMV) is a functional homolog of human CMV gO and determines the entry pathway of MCMV. *Journal of virology* *84*, 4469-4480.
- Seckert, C.K., Renzaho, A., Tervo, H.M., Krause, C., Deegen, P., Kuhnappel, B., Reddehase, M.J., and Grzimek, N.K. (2009). Liver sinusoidal endothelial cells are a site of murine cytomegalovirus latency and reactivation. *Journal of virology* *83*, 8869-8884.
- Selin, L.K., Santolucito, P.A., Pinto, A.K., Szomolanyi-Tsuda, E., and Welsh, R.M. (2001). Innate immunity to viruses: control of vaccinia virus infection by gamma delta T cells. *J Immunol* *166*, 6784-6794.
- Shanley, J.D., Jordan, M.C., and Stevens, J.G. (1981). Modification by adoptive humoral immunity of murine cytomegalovirus infection. *The Journal of infectious diseases* *143*, 231-237.
- Sinclair, J., and Sissons, P. (2006). Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *The Journal of general virology* *87*, 1763-1779.
- Sinzger, C., and Jahn, G. (1996). Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology* *39*, 302-319.
- Smith, H.R., Heusel, J.W., Mehta, I.K., Kim, S., Dorner, B.G., Naidenko, O.V., Iizuka, K., Furukawa, H., Beckman, D.L., Pingel, J.T., *et al.* (2002). Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 8826-8831.

- Sokos, D.R., Berger, M., and Lazarus, H.M. (2002). Intravenous immunoglobulin: appropriate indications and uses in hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 8, 117-130.
- Spaete, R.R., Saxena, A., Scott, P.I., Song, G.J., Probert, W.S., Britt, W.J., Gibson, W., Rasmussen, L., and Pahl, C. (1990). Sequence requirements for proteolytic processing of glycoprotein B of human cytomegalovirus strain Towne. *Journal of virology* 64, 2922-2931.
- Speckner, A., Glykofrydes, D., Ohlin, M., and Mach, M. (1999). Antigenic domain 1 of human cytomegalovirus glycoprotein B induces a multitude of different antibodies which, when combined, results in incomplete virus neutralization. *The Journal of general virology* 80 ( Pt 8), 2183-2191.
- Staczek, J. (1990). Animal cytomegaloviruses. *Microbiological reviews* 54, 247-265.
- Su, H.C., Nguyen, K.B., Salazar-Mather, T.P., Ruzek, M.C., Dalod, M.Y., and Biron, C.A. (2001). NK cell functions restrain T cell responses during viral infections. *European journal of immunology* 31, 3048-3055.
- Sweet, C. (1999). The pathogenicity of cytomegalovirus. *FEMS microbiology reviews* 23, 457-482.
- Sylwester, A.W., Mitchell, B.L., Edgar, J.B., Taormina, C., Pelte, C., Ruchti, F., Sleath, P.R., Grabstein, K.H., Hosken, N.A., Kern, F., *et al.* (2005). Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *The Journal of experimental medicine* 202, 673-685.
- Tang, Q., Murphy, E.A., and Maul, G.G. (2006). Experimental confirmation of global murine cytomegalovirus open reading frames by transcriptional detection and partial characterization of newly described gene products. *Journal of virology* 80, 6873-6882.
- Tanneau, F., McChesney, M., Lopez, O., Sansonetti, P., Montagnier, L., and Riviere, Y. (1990). Primary cytotoxicity against the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus-1: evidence for antibody-dependent cellular cytotoxicity in vivo. *The Journal of infectious diseases* 162, 837-843.
- Tay, C.H., Yu, L.Y., Kumar, V., Mason, L., Ortaldo, J.R., and Welsh, R.M. (1999). The role of LY49 NK cell subsets in the regulation of murine cytomegalovirus infections. *J Immunol* 162, 718-726.
- Taylor-Wiedeman, J., Sissons, J.G., Borysiewicz, L.K., and Sinclair, J.H. (1991). Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of general virology* 72 ( Pt 9), 2059-2064.
- Trgovcich, J., Stimac, D., Polic, B., Krmpotic, A., Pernjak-Pugel, E., Tomac, J., Hasan, M., Wraber, B., and Jonjic, S. (2000). Immune responses and cytokine induction in the development of severe hepatitis during acute infections with murine cytomegalovirus. *Archives of virology* 145, 2601-2618.
- Trobonjaca, Z., Leithauser, F., Moller, P., Bluethmann, H., Koezuka, Y., MacDonald, H.R., and Reimann, J. (2001). MHC-II-independent CD4+ T cells induce colitis in immunodeficient RAG-/- hosts. *J Immunol* 166, 3804-3812.
- Tugizov, S., Maidji, E., Xiao, J., and Pereira, L. (1999). An acidic cluster in the cytosolic domain of human cytomegalovirus glycoprotein B is a signal for endocytosis from the plasma membrane. *Journal of virology* 73, 8677-8688.

- Utz, U., Britt, W., Vugler, L., and Mach, M. (1989). Identification of a neutralizing epitope on glycoprotein gp58 of human cytomegalovirus. *Journal of virology* 63, 1995-2001.
- Varnum, S.M., Streblow, D.N., Monroe, M.E., Smith, P., Auberry, K.J., Pasa-Tolic, L., Wang, D., Camp, D.G., 2nd, Rodland, K., Wiley, S., *et al.* (2004). Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *Journal of virology* 78, 10960-10966.
- Vermijlen, D., Brouwer, M., Donner, C., Liesnard, C., Tackoen, M., Van Rysselberge, M., Twite, N., Goldman, M., Marchant, A., and Willems, F. (2010). Human cytomegalovirus elicits fetal gammadelta T cell responses in utero. *The Journal of experimental medicine* 207, 807-821.
- Vescovini, R., Biasini, C., Fagnoni, F.F., Telera, A.R., Zanlari, L., Pedrazzoni, M., Bucci, L., Monti, D., Medici, M.C., Chezzi, C., *et al.* (2007). Massive load of functional effector CD4+ and CD8+ T cells against cytomegalovirus in very old subjects. *J Immunol* 179, 4283-4291.
- Vidal, S.M., and Lanier, L.L. (2006). NK cell recognition of mouse cytomegalovirus-infected cells. *Current topics in microbiology and immunology* 298, 183-206.
- Vieira, P., and Rajewsky, K. (1988). The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice. *European journal of immunology* 18, 313-316.
- Voigt, V., Forbes, C.A., Tonkin, J.N., Degli-Esposti, M.A., Smith, H.R., Yokoyama, W.M., and Scalzo, A.A. (2003). Murine cytomegalovirus m157 mutation and variation leads to immune evasion of natural killer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 13483-13488.
- Wallace, M., Malkovsky, M., and Carding, S.R. (1995). Gamma/delta T lymphocytes in viral infections. *Journal of leukocyte biology* 58, 277-283.
- Walter, E.A., Greenberg, P.D., Gilbert, M.J., Finch, R.J., Watanabe, K.S., Thomas, E.D., and Riddell, S.R. (1995). Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *The New England journal of medicine* 333, 1038-1044.
- Walton, S.M., Mandaric, S., Torti, N., Zimmermann, A., Hengel, H., and Oxenius, A. (2011). Absence of cross-presenting cells in the salivary gland and viral immune evasion confine cytomegalovirus immune control to effector CD4 T cells. *PLoS pathogens* 7, e1002214.
- Wang, D., and Shenk, T. (2005). Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 18153-18158.
- Wang, T., Scully, E., Yin, Z., Kim, J.H., Wang, S., Yan, J., Mamula, M., Anderson, J.F., Craft, J., and Fikrig, E. (2003). IFN-gamma-producing gamma delta T cells help control murine West Nile virus infection. *J Immunol* 171, 2524-2531.
- Warming, S., Costantino, N., Court, D.L., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (2005). Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic acids research* 33, e36.
- Wen, L., Pao, W., Wong, F.S., Peng, Q., Craft, J., Zheng, B., Kelsoe, G., Dianda, L., Owen, M.J., and Hayday, A.C. (1996). Germinal center formation, immunoglobulin class switching, and autoantibody production driven by "non alpha/beta" T cells. *The Journal of experimental medicine* 183, 2271-2282.

Wren, L., and Kent, S.J. (2011). HIV Vaccine efficacy trial: glimmers of hope and the potential role of antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Human vaccines* 7, 466-473.

Wu, S.X., Zhu, X.P., and Letchworth, G.J. (1998). Bovine herpesvirus 1 glycoprotein M forms a disulfide-linked heterodimer with the U(L)49.5 protein. *Journal of virology* 72, 3029-3036.

Wu, Y., Wu, W., Wong, W.M., Ward, E., Thrasher, A.J., Goldblatt, D., Osman, M., Digard, P., Canaday, D.H., and Gustafsson, K. (2009). Human gamma delta T cells: a lymphoid lineage cell capable of professional phagocytosis. *J Immunol* 183, 5622-5629.

Yin, Z., Zhang, D.H., Welte, T., Bahtiyar, G., Jung, S., Liu, L., Fu, X.Y., Ray, A., and Craft, J. (2000). Dominance of IL-12 over IL-4 in gamma delta T cell differentiation leads to default production of IFN-gamma: failure to down-regulate IL-12 receptor beta 2-chain expression. *J Immunol* 164, 3056-3064.

## 9 Abkürzungen

<sup>51</sup> Cr	radioaktives <sup>51</sup> Chrom
AD	antigene Domäne
ADCC	<i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i> (antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität)
AF	Alexa Fluor
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
B	Beschichtung
BAC	Bacmid
BD	Becton Dickinson
bp	<i>base pairs</i> (Basenpaare)
BTE	biologisch-technisches Entwicklungsgebäude
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CMV	Cytomegalovirus
CTL	<i>cytotoxic T lymphocytes</i> (Zytotoxische T-Zellen)
Cy	Cychrom
d	<i>donkey</i> (Esel)
DETC	<i>dendritic epidermal T cells</i> (dendritische epidermale T-Zellen)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotide
DN	doppelt negativ
DTT	Dithiothreitol
E	<i>early</i> (früh)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA (E)	<i>Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay</i> (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EtOH	Ethanol
FC	<i>flow cytometry</i> (Durchflusszytometrie)
FCS	<i>forward scatter</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
g	<i>goat</i> (Ziege)
galK	Galaktokinasegen komplementierende Sequenz
gB	herpesvirales Glykoprotein B
gH	herpesvirales Glykoprotein H
gL	herpesvirales Glykoprotein L

---

Glu	Glutamin
gM	herpesvirales Glykoprotein M
gN	herpesvirales Glykoprotein N
gO	herpesvirales Glykoprotein O
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
H	<i>heavy chain</i> (schwere Kette)
HCMV	humanes Cytomegalovirus
hgB	Glykoprotein B des humanen Cytomegalovirus
HRP	<i>horse radish peroxidase</i> (Meerrettich Peroxidase)
HSP60	Hitzeschock Protein 60
HSV	Herpes simplex Virus
IE	<i>immediate early</i> (sehr früh)
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IF	Immunfluoreszenzanalysen
IL	Interleukin
IVC	<i>isolated ventilated cages</i> (Isolierkäfige mit eigener Luftversorgung)
JIR	Jackson Immuno Research
k	Kanninchen
L	<i>light chain</i> (leichte Kette)
LB	<i>Lysogenyc broth</i>
m	<i>mouse</i> (Maus)
mab	<i>monoclonal antibody</i> (monoklonaler Antikörper)
MCMV	murines Cytomegalovirus
MEF	Embryonale Mausfibroblasten
mgB	murines Glykoprotein B
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MIEP	<i>major immediately early promoter</i>
Min	Minuten
moi	<i>multiplicity of infection</i> (Multiplizität der Infektion)
MW	Molekulargewicht
NEB	New England Biolabs
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NT	Neutralisationstest
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (physiologischer Phosphatpuffer)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pfu	<i>plaque forming units</i> (infektiöse Einheiten)

---

pi	<i>post infectionem</i> (nach Infektion)
r	Ratte
RAG	Rekombinase aktivierende Gene
RLU	<i>relative light units</i> (relative Lichteinheiten)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SAP	<i>shrinp alkaline phosphatase</i>
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
Sek	Sekunden
SPF	<i>specific pathogen free</i> (spezifisch pathogenfrei)
SSC	<i>sideward scatter</i>
TCR	<i>t cell receptor</i> (T-Zell Rezeptor)
TGN	Trans-Golgi Netzwerk
U	<i>units</i> (Einheiten)
vgl	vergleiche
VZV	Varizella Zoster Virus
VSP	Virus Suspensionspuffer
WB	Western Blot Analyse
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
β-ME	β-Mercaptoethanol

---