

# **Die immunologische Kontrolle der murinen Cytomegalovirusinfektion im allogenen Knochenmarktransplantationsmodell**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Sina I. Schader

Aus dem Institut für Virologie der Justus Liebig-Universität  
Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel

**und**

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

Betreuer: Prof. Dr. Matthias J. Reddehase

**Die immunologische Kontrolle der murinen  
Cytomegalovirusinfektion im allogenen  
Knochenmarktransplantationsmodell**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus Liebig-Universität Giessen

Eingereicht von  
Sina I. Schader  
Tierärztin aus Alsfeld

Gießen 2010

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel

Prof. Dr. Matthias J. Reddehase

Tag der Disputation: 09.12.2010

Meinen Eltern in unendlicher Dankbarkeit

„Habe den Mut, Dich Deines Verstandes zu bedienen.“

-Immanuel Kant-

## Zusammenfassung/Summary

### Zusammenfassung

Die Knochenmarktransplantation (KMT) ist ein kuratives Therapieverfahren, das heute bei vielen hämatologisch-onkologischen Erkrankungen eingesetzt wird. Nach allogener KMT kann es allerdings zur klinischen Komplikation der *graft-versus-host-disease* (GvHD) kommen, die aufgrund der Histoinkompatibilität von Donor und Rezipient auftritt. Hohe Morbidität und Mortalität bedingt durch eine hCMV-Infektion kennzeichnen zudem das Krankheitsbild der immunsupprimierten Patienten nach allogener KMT.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden in einem murinen KMT Modell durchgeführt, bei dem die murine Cytomegalovirus (mCMV) Infektion ohne Transfer von Knochenmarkzellen (KMZ) letal verlaufen würde. Um die klinische Problematik der allogenen KMT zu studieren, wurden Mäuse der Stämme BALB/cJ ( $K^d$ ,  $D^d$ ,  $L^d$ ) und die  $L^d$  Deletionsmutante BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> ( $K^d$ ,  $D^d$ ) - beide des Haplotyps H-2<sup>d</sup> – verwendet, die sich in der Expression des MHC-Klasse-I-Moleküls  $L^d$  unterscheiden. Die beiden Mausstämme wurden wechselseitig als Donoren oder Rezipienten eingesetzt. Vorarbeiten hatten gezeigt, dass die Tiere nach *host-versus-graft*-KMT (HvG-KMT; BALB/cJ à BALB/c-H-2<sup>dm2</sup>) und konkurrierender mCMV-Infektion überleben, während die Tiere nach GvH-KMT (BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> à BALB/cJ) und konkurrierender mCMV-Infektion sterben. Warum die Tiere unter diesen Bedingungen sterben, war die Hauptfragestellung dieser Arbeit.

Die Ergebnisse weisen auf eine unterschiedliche Kontrolle der mCMV-Infektion nach HvG- und GvH-KMT hin. Nach GvH-KMT zeigten sich in der Leber viele infizierte Zellen. Die Infektion wurde trotz hoher Infiltration durch CD3 Zellen nicht kontrolliert. Die CD3 Zellen und die infizierten Zellen waren diffus verteilt, während sich nach HvG-KMT eine Fokusbildung zeigte, was auf eine zielgerichtete Infiltration und somit Protektion deutete. Zusätzlich wurden nach GvH-KMT im Vergleich zur HvG-KMT und syngenen KMT nur wenige mCMV-peptidspezifische CD8-T-Zellen nachgewiesen. Stattdessen kam es zur Aktivierung von alloreaktiven CD8 T-Zellen.

Nach GvH-KMT überlebten alle Tiere, sofern die Infektion mit der Immunevasin-Deletionsmutante mCMV- $\Delta$ vRAP erfolgte. Da auf mCMV- $\Delta$ vRAP infizierten Zellen die Peptidpräsentation im Vergleich zu mCMV-WT infizierten Zellen erhöht ist, ist die fehlende Protektion nach GvH-KMT und mCMV-WT Infektion vermutlich auf eine unzureichende Peptidpräsentation zurückzuführen. Dies hat wiederum ein geringes CD8 T-Zell-Priming zur Folge. Nach GvH-KMT und Infektion mit mCMV- $\Delta$ vRAP scheint die Menge präsentierten Peptids wieder auszureichen, um die mCMV-Infektion zu kontrollieren.

## Summary

CMV infection plays an important role in immunocompromised patients, especially in the context of allogeneic bone marrow transplantation (BMT). Histoincompatibility between donor and recipient is associated with the risk of graft-versus-host-disease (GvHD).

We established a murine model of cytomegalovirus (CMV) infection after allogeneic BMT. Specifically, we used two mouse strains (haplotype H-2<sup>d</sup>) with a single MHC class-I disparity as donors or recipients: the BALB/c mouse (K<sup>d</sup>, D<sup>d</sup>, L<sup>d</sup>) and the L<sup>d</sup>-deletion mutant BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> (K<sup>d</sup>, D<sup>d</sup>). Whereas most of the animals survive host-versus-graft-BMT (HvG-BMT; BALB/c à BALB/c-H-2<sup>dm2</sup>) and concurrent mCMV infection, GvH-BMT (BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> à BALB/c) is lethal. The clinically important question, why the GvH-BMT is associated with such a dramatic outcome was the subject of this work.

The control of mCMV-infection was impeded after GvH-BMT, associated with a high number of infected cells in the organs. Besides the high number of infected cells, there was also a high number of CD3 cells detectable in the liver. Nevertheless, the CD3 cells were not able to control the infection. After HvG-BMT, infected cells were organized in foci surrounded by CD3 cells, a histologic manifestation of control of mCMV-infection, whereas after GvH-BMT infected cells as well as CD3 cells were distributed randomly.

CD3 cells proved to be mCMV peptide-specific CD8 T cells as well as alloreactive cells. Remarkably, the number of mCMV peptide-specific CD8 T cells was very low after GvH-BMT compared to HvG-BMT and syngeneic BMT.

In contrast to mCMV-WT infection, the animals survive GvH-BMT and infection with mCMV-ΔvRAP, an immunoevasin gene deletion mutant of mCMV. After infection with mCMV-ΔvRAP, the infected cells present more peptide in comparison to cells infected with mCMV-WT. Therefore, the deficient control of mCMV-WT infection is probably based on an insufficient peptide presentation. After GvH-BMT and infection with mCMV-ΔvRAP, peptide presentation is apparently sufficient to support CD8 T cell priming and to prevent the lethal course of CMV disease.

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung/ <i>Summary</i> .....	V
Abbildungsverzeichnis .....	IX
Tabellenverzeichnis .....	XI
Abkürzungsverzeichnis .....	XII
1. Einleitung .....	14
1.1 Klassifizierung der Herpesviren .....	14
1.2 Eigenschaften von CMV .....	15
1.3 Immunevasion von mCMV .....	19
1.4 Die Knochenmarktransplantation (KMT) und mCMV-Infektion .....	20
1.5 Pathophysiologie der GvHD .....	24
1.6 Toleranzentwicklung nach allogener KMT .....	27
1.7 Zielsetzung .....	28
2. Material .....	30
2.1 Allgemeine Laborgeräte .....	30
2.2 Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien .....	31
2.3 Chemikalien und Zellkulturzusätze .....	34
2.4 Peptide .....	36
2.5 Antikörper (AK) und MicroBeads .....	36
2.6 Medien für die Zellkultur .....	38
2.7 Zelllinien .....	40
2.8 Virus und Virusmutanten .....	41
2.9 Versuchstiere .....	41
3. Methoden .....	42
3.1 Zellbiologische Methoden .....	42
3.1.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	42
3.1.2 Bestimmung der Zellzahl .....	43
3.1.3 Anlage von Murinen Embryonalen Fibroblasten (MEF) .....	44
3.1.3.1 Vorbehandlung von MEF mit IFN- $\gamma$ .....	45
3.1.4 Gewinnung von Lymphozyten aus Organen .....	46
3.1.4.1 Lunge .....	46
3.1.4.2 Leber .....	48
3.1.4.3 Milz .....	50
3.2 Immunologische Methoden .....	51
3.2.1 Enzyme-linked Immunospot Assay (ELISPOT-Assay) .....	51
3.2.2 Zytofluorometrische Analyse .....	54
3.2.3 <i>Magnetic Cell Separation</i> (MACS) .....	56
3.2.4 <i>Open Reading Frame</i> (ORF) <i>Library</i> -Analyse .....	58
3.2.5 Zytolysetest ( $^{51}\text{Cr}$ -Release-Assay) .....	61
3.3 Tierexperimentelle Methoden .....	63
3.3.1 KMT und Infektion .....	63
3.3.1.1 Immunsuppression .....	64
3.3.1.2 Intraplantare mCMV Infektion .....	64
3.3.1.3 Gewinnung von KMZ .....	64
3.3.1.4 KMT .....	65
3.4 Histologische Methoden .....	65
3.4.1 Immunhistologie .....	65
3.4.1.1 Fixierung der Organe .....	65

---

3.4.1.2 Einblocken der Organe .....	66
3.4.1.3 Schneiden der Organe .....	66
3.4.1.4 Entparaffinierung der Organschnitte .....	67
3.4.1.5 Färbung der Organschnitte .....	67
3.4.2 Kryostathistologie.....	72
3.4.2.1 Färbung der Organschnitte .....	72
3.5 Virologische Methoden .....	74
3.5.1 mCMV-Aufreinigung und Produktion .....	74
3.5.2 Virustiterbestimmung .....	75
3.6 Molekularbiologische Methoden.....	76
3.6.1 qPCR .....	76
4. Ergebnisse.....	81
4.1 Transplantationsmodell.....	81
4.2 Überlebensrate .....	82
4.3 Immunologische Charakterisierung der BALB/cJ und der BALB/c-H-2 <sup>dm2</sup> Maus.....	83
4.4 Untersuchung der mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellantwort nach allogener KMT .....	89
4.5 Untersuchung der Rekonstitution des Immunsystem nach allogener KMT .....	94
4.6 Untersuchung der hämatopoetischen Rekonstitution nach allogener KMT .....	95
4.7 Untersuchung der mCMV-Infektion nach allogener KMT in verschiedenen Organen ..	99
4.8 Analyse der Leberinfiltrate nach allogener KMT .....	100
4.9 Immunologische Charakterisierung der CD8 T-Zellen der Leber nach allogener KMT .....	103
4.10 Einfluss der vRAPs von mCMV auf die Immunkontrolle nach allogener KMT.....	106
4.11 Einfluss der vRAPs von mCMV auf die mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort nach GvH-KMT .....	110
4.12 Vergleich der funktionellen Avidität der mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellen nach allogener und syngener KMT.....	112
5. Diskussion .....	114
6. Literaturverzeichnis.....	123
7. Anhang .....	133

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Virionstruktur von Cytomegaloviren (nach: Streblow et al., 2006)	15
Abb. 1.2: Genomische Organisation der MIE-Region des mCMV	17
Abb. 1.3: Funktion der Immunevasine/vRAPs des mCMV	20
Abb. 1.4: MHC-Klasse-I Region der Mausstämme BALB/cJ und BALB/c-H-2 <sup>dm2</sup>	23
Abb. 1.5: MHC-Klasse-I-Molekül Expression der Mausstämme BALB/cJ und BALB/c-H-2 <sup>dm2</sup>	24
Abb. 4.1: Modell der allogenen, murinen Knochenmarktransplantation und mCMV Infektion	82
Abb. 4.2: Sterbekurve nach KMT und mCMV Infektion	82
Abb. 4.3: Vergleich der mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellfrequenzen im immunkompetenten Tier	86
Abb. 4.4: Genomweites Antigenitäts-Screening nach Infektion mit mCMV-WT.Smith	87
Abb. 4.5: Vergleich der lymphozytären Infiltration unter dem Einfluss der mCMV-Infektion im immunkompetenten Tier	88
Abb. 4.6: Vergleich der mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellfrequenzen nach HvG-KMT	91
Abb. 4.7 Vergleich der mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellfrequenzen nach GvH-KMT	92
Abb. 4.8: Herkunft der Effektorzellen von Donor oder Rezipient nach allogener KMT	93
Abb. 4.9: Rekonstitution des Immunsystems nach allogener KMT	94
Abb. 4.10: Hämatopoetische Rekonstitution des KM nach allogener KMT	96
Abb. 4.11: Infektionsverlauf in der Leber nach allogener KMT	97
Abb. 4.12: Immunhistologie der Leber nach allogener KMT	98
Abb. 4.13: Quantifizierung von infizierten Zellen in verschiedenen Organen nach allogener KMT und mCMV-Infektion	99
Abb. 4.14: Zytfluorometrische Analyse der CD3 Zellen der Leber nach allogener KMT	101
Abb. 4.15: Kryostathistologie der Leber nach allogener KMT	102
Abb. 4.16: Funktionelle Analyse mCMV-peptidspezifischer CD8 T-Zellen der Leber nach allogener KMT	104
Abb. 4.17: Nachweis und funktionelle Avidität der mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellen nach GvH-KMT	106
Abb. 4.18: Einfluss der vRAPs auf die Überlebensrate nach GvH-KMT	108
Abb. 4.19: Einfluss der vRAPs auf die Immunkontrolle nach GvH-KMT	109

Abb. 4.20: Einfluss der Immunevasionsproteine von mCMV auf die mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort nach GvH-KMT	111
Abb. 4.21: Nachweis und funktionelle Avidität der mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellen nach allogener und syngener KMT	113
Abb. 5.1: CD8 T-Zell-Priming nach GvH-KMT und Infektion mit mCMV-WT bzw. mCMV- $\Delta$ vRAP	119

**Tabellenverzeichnis**

Tab. 1: Antigene Peptide (H-2 <sup>d</sup> ) von mCMV	36
Tab. 2: AK für den ELISPOT-Assay	36
Tab. 3: <i>MicroBeads</i> für die MACS-Separation	36
Tab. 4: AK für die zytofluorometrische Analyse	37
Tab. 5: AK und Seren für die Immunhistologie	38
Tab. 6: Tabellarische Übersicht der murinen, allogenen KMT	63
Tab. 7.1 Zuordnung der ORF- <i>Library</i> Nummern zu den getesteten mCMV ORFs	133

## Abkürzungsverzeichnis

aa	<i>amino acid</i>
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex
Ag	Antigen
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
APC	Allophycocyanin
APC	<i>Antigen presenting cell</i>
Aqua bidest	Reinstwasser (Aqua bidestillata)
ATP	Adenosintriphosphat
BHV	Bovines Herpesvirus
BKF	Bösartiges Katarrhalfieber
BSA	Bovines Serum Albumin
BZ	B-Zellen
CID	<i>cytomegalic inclusion disease</i>
CMV	Cytomegalovirus
CTL	<i>cytolytic T lymphocyte</i>
CTLL	<i>cytolytic T lymphocyte line(s)</i>
DAB	Diaminobenzidin
Dendritische Zellen	DC; <i>dendritic cells</i>
DL	Detektionslimit
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHV	Equines Herpesvirus
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	Endoplasmatisches Retikulum-Golgi- <i>intermediate compartment</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FB	Flachbodenplatte
FCS	Fetales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxP3	<i>Forkhead box P3</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
GvH	<i>graft versus host</i>
GvHD	<i>graft versus host disease</i>
GvL	<i>graft versus leukemia</i>
Gy	Gray
hCMV	humanes Cytomegalovirus
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HHV	Humanes Herpesvirus
H <sub>2</sub> O-demin	Demineralisiertes Wasser
HvG	<i>host versus graft</i>
HvGD	<i>host versus graft disease</i>
HLA	Humane Leukozyten Antigene
IL	Interleukin
IE/ie	immediate early
IFN	Interferon
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
KMZ	Knochenmarkzellen

MACS	<i>magnetic cell sorting</i>
mCMV	murines Cytomegalovirus
ME	Mercaptoethanol
MEF	Murine embryofetale Fibroblasten
mHAgs	Minor Histokompatibilitäts Antigene
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIE	<i>major immediate early</i>
MIE-PEEP	<i>major immediate early promoter enhancer</i>
MPN	<i>most probable number</i>
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NN	Nebenniere
OHV	Ovines Herpes Virus
ORF	<i>open reading frame</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cyanin 5
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pepMHC	peptidbeladenes MHC-Molekül
PerCP	Peridinin Chlorophyll- $\alpha$ -Protein
PFA	Paraformaldehyd
PFU	<i>plaque forming units</i>
PHV	Porcines Herpesvirus
p.i.	<i>post infectionem</i>
POD	Peroxidase
qPCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
RBCLB	<i>Red Blood Cell Lysing Buffer</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
Sry	<i>sex determining region of Y</i>
SSC	<i>sideward scatter</i>
TAP	<i>Transporter associated with <u>antigen</u> presentation</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tregs	regulatorische T-Zellen
UV	Ultraviolette Strahlung
VZV	Varicella-Zoster-Virus
VPA	Valproat
vRAP	virale Regulatoren der Antigenpräsentation
VSP	Virus Standard Puffer
WT	Wildtyp

Anmerkung: International übliche Terminologie auf Englisch oder Latein wurde beibehalten und zur Kennzeichnung *kursiv* gesetzt.

# 1. Einleitung

## 1.1 Klassifizierung der Herpesviren

Herpesviren sind ubiquitär verbreitet. Eine Eigenschaft aller Herpesviren ist die Fähigkeit, bei Säugern eine lebenslange latente Infektion auszubilden. Roizman und Sears definierten die Latenz bei Herpesviren als das Überdauern des viralen Genoms in einem nicht replikativen Zustand (zur Übersicht: Roizman & Sears, 1987). Die Herpesviren lassen sich in die drei Subfamilien *Alpha*-, *Beta*- und *Gammaherpesvirinae* einordnen. Diese Einteilung erfolgte anhand des Wirtsspektrums, der Replikationsgeschwindigkeit und des Zelltropismus (Roizman *et al.*, 1981). Die Subfamilie ***Alphaherpesvirinae*** umfasst u.a. die humanen Herpes Simplex Viren (HSV bzw. Humane Herpesviren; HHV-1 und 2), das Varicella-Zoster-Virus (VZV) beim Menschen, sowie die equinen Herpesviren (EHV-1 und EHV-4), die bovinen Herpesviren (BHV-1) und das porcine Herpesvirus (PHV-1). Das Wirtsspektrum wie auch die Organmanifestationen der Alphaherpesvirinae sind sehr variabel. Sie besitzen einen kurzen Replikationszyklus und etablieren Latenz in den sensorischen Ganglienzellen des jeweiligen Wirtes. Der Subfamilie der ***Betaherpesvirinae*** sind u.a. alle Cytomegaloviren (CMV) der Säuger zugeordnet, ebenso wie die Viren HHV-6 und HHV-7 des Menschen. Zu den ***Gammaherpesvirinae*** gehören u.a. HHV-4 (Epstein-Barr-Virus; EBV) und HHV-8, der Erreger des Bösartigen Katarrhalfiebers (BKF) OHV-2 sowie das Virus der Marekschen Krankheit der Hühner (MDV). Die Betaherpesvirinae wie auch die Gammaherpesvirinae zeichnen sich durch ein enges Wirtsspektrum und lange Replikationszeiten aus. Die produktive Infektion und die Entwicklung von Latenz der Gammaherpesviren erfolgt in B- und T-Lymphozyten, während Betaherpesviren die Fähigkeit besitzen, Speicheldrüsenzellen, lymphoretikuläre Zellen sowie Zellen anderer Gewebe zu infizieren und dort zu persistieren (zur Übersicht: Rolle & Mayr, 2002; Roizman & Pellet, 2006).

## 1.2 Eigenschaften von CMV

### Morphologie

Morphologisch ist CMV den anderen Mitgliedern der Herpesvirusfamilie sehr ähnlich. Das CMV ist ein großes DNA-Virus mit einem Durchmesser von 150-200nm. Die lineare, doppelsträngige DNA liegt spindelförmig in einem ikosaedrischen Nukleokapsid, welches von einer elektronendichten Phosphoproteinschicht, dem Tegument, umgeben wird. In die das Virion umgebende Hüllmembran sind virale Glykoproteine eingelagert. Man vermutet, dass diese Glykoproteine für die Bindung an einen spezifischen Wirtszellrezeptor verantwortlich sind (Streblow *et al.*, 2006).

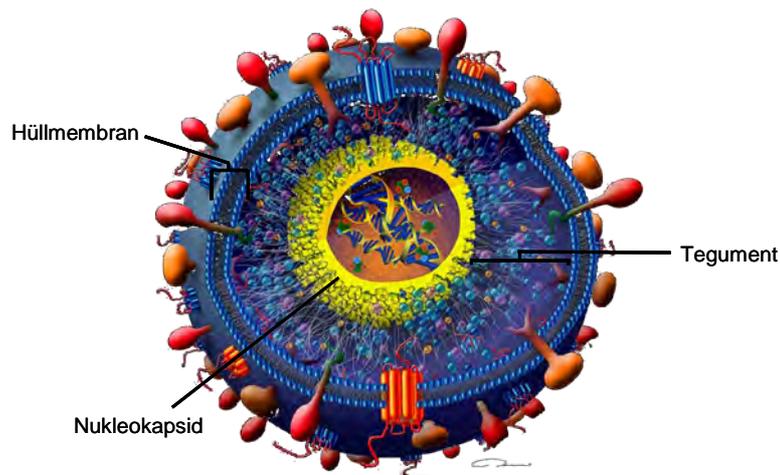


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Virionstruktur von Cytomegaloviren (nach: Streblow *et al.*, 2006)

### Genom

Cytomegaloviren besitzen ein lineares, doppelsträngiges DNA-Genom mit terminalen repetitiven Elementen, deren Länge bei CMV verschiedener Spezies variiert. Im Gegensatz zum Genom des murinen Cytomegalovirus (mCMV) enthält das Genom des humanen CMV (hCMV) zusätzliche interne repetitive Elemente (Mocarski *et al.*, 2006). Mit einer Länge von über 230 kbp besitzen die Vertreter der Betaherpesvirinae die größten herpesviralen Genome. Das mCMV-Genom enthält ca. 170 *open reading frames* (ORFs; offene Leserahmen) [Rawlinson *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 2006], während im Genom von hCMV 200 ORFs identifiziert wurden (Davison *et al.*, 2003). Den meisten dieser ORFs und ihren putativen Genprodukten kann gegenwärtig noch keine Funktion zugeordnet werden.

### Penetration der Wirtszelle

Die produktive Infektion durch CMV beginnt mit der Adsorption des Virions an der Zelloberfläche. An welchen Oberflächenrezeptor das Virion auf der Wirtszelle bindet ist bislang unbekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das Virus über den virus-kodierten Glykoproteinkomplex gM/gN mit einem Proteoglykankomplex auf der Zelloberfläche interagiert (Boyle & Compton, 1998). Der Glykoproteinkomplex gM/gN stellt die wichtigste Proteinkomponente der Hüllmembran des Virus dar. Experimente haben gezeigt, dass eine Deletion der viralen Gene, die für gM oder gN kodieren, einen limitierenden Effekt auf die Replikation des Virus hat (Mach *et al.*, 2005; Krzyzaniak *et al.*, 2007). Zusätzlich wurde eine Bindung des viralen Glykoproteins gB an den EGF- (epithelial growth factor) Rezeptor auf der Wirtszelloberfläche nachgewiesen (Wang *et al.*, 2003).

Nach der Adsorption kommt es zum Verschmelzen von Wirtszellmembran und viraler Hüllmembran (Navarro *et al.*, 1993). Dadurch wird das Nukleokapsid mit Tegument in das Zytoplasma der Wirtszelle entlassen. Von dort wird das Kapsid wahrscheinlich entlang der Mikrotubuli zum Zellkern transportiert (Ogawa-Goto *et al.*, 2003) und bindet an den Kernporenkomplex. Während das Kapsid an diesen gebunden bleibt, gelangt die virale DNA in das Nukleoplasma. Die lineare Virus-DNA zirkularisiert dort zu einem Histon-assoziierten Episom und die Transkription viraler Gene beginnt (Marks & Spector, 1988).

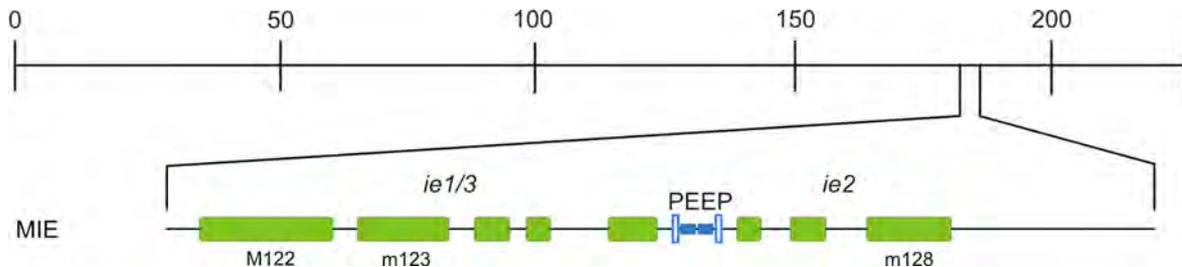
### Replikationszyklus

Bei allen Herpesviren erfolgt die Genexpression der viralen DNA kaskadenartig im Zellkern der Wirtszelle. Die virale Genexpression unterliegt einem zeitlichen Ablauf, der in drei Phasen unterteilt wird. Diese werden als *Immediate-Early* (IE), *Early* (E) und *Late* (L) Phasen bezeichnet (zur Übersicht: Mocarski & Courcelle, 2001).

Die IE-Genexpression beginnt unmittelbar nach Infektion unabhängig von der de novo Synthese viraler Proteine.

Der *major immediate early* (MIE) Locus umfasst bei mCMV drei Gene (Keil *et al.*, 1987), die Gene *ie1*, *ie2* und *ie3*. In diesem Locus befindet sich der *major immediate early promoter1-enhancer1-enhancer2-promoter2* (MIE-PEEP; Chatellard *et al.*, 2007; Kropp *et al.*, 2009), eine regulatorische DNA Sequenz der MIE-Gene (**Abb.1.2**). Der MIE-PEEP reguliert die Transkription der MIE-Gene. Das Genprodukt von *ie3* bei mCMV übernimmt als Transaktivator eine essentielle regulatorische Funktion für die koordinierte Expression der E-Gene (Messerle *et al.*, 1992). Mit der Aktivierung der E-Gene wird bei mCMV ca. 2 Stunden nach Beginn der Infektion die E-Phase der viralen Genexpression eingeleitet. E-Proteine werden unter anderem für die Replikation des viralen Genoms benötigt (Roizman & Batterson, 1986). Der Beginn der DNA Replikation definiert den Anfang der L-Phase, in

der vorwiegend Strukturproteine synthetisiert werden. Die DNA Replikation von CMV erfolgt nach dem Prinzip des *rolling circle*. Die dabei synthetisierten viralen Genome bleiben dabei mit der Matrix-DNA als Konkatemere kovalent verbunden. Der in vivo Replikationszyklus erfordert bei hCMV 48-72 Stunden (Mocarski & Courcelle, 2001), bei mCMV 24-36 Stunden (Moon *et al.*, 1976).



**Abb. 1.2: Genomische Organisation der MIE-Region des mCMV**

Der MIE-promoter1-enhancer1-enhancer2-promoter2 (PEEP) steuert die Expression der ie 1/3 Transkriptionseinheit (ORFs M122, m123) und in Gegenrichtung des ie2 Gens (ORF m128) mit ihrem jeweils spezifischen Promotor. Im MIE Locus bilden die grünen Boxen Exons der IE Gene, während die blauen Boxen die PEEP Anordnung der zweigeteilten, regulatorischen Region darstellen (nach: Kropp *et al.*, 2009).

### Übertragung und klinische Relevanz

Das hCMV ist ein weltweit verbreitetes Virus. In den Industrieländern sind ca. 50% der Bevölkerung infiziert, während die Infektionsrate in den Entwicklungsländern nahezu 100% beträgt, da dort die Bevölkerungsdichte höher ist (Zur Übersicht: Reddehase, 2002). CMV kann horizontal und vertikal übertragen werden. In den meisten Fällen erfolgt die **horizontale** Übertragung durch Tröpfchen- oder Schmierinfektion. Infektiöse Virionen werden über Urin, Speichel, Genitalsekrete, Tränenflüssigkeit sowie Muttermilch abgegeben (zur Übersicht: Reddehase, 2002; Mocarski *et al.*, 2006). Zu einer horizontalen Übertragung des Virus kann es auch durch die Bluttransfusion oder durch Transplantation von Organen seropositiver Donoren kommen. Eine **vertikale** Übertragung ist diaplazentar von der infizierten Mutter auf den ungeborenen Fötus oder Embryo sowie während des Geburtsvorgangs möglich (zur Übersicht: Reddehase, 2002; Mocarski *et al.*, 2006).

### Pathogenese

Die hCMV-Infektion von **immunkompetenten** Personen verläuft in den meisten Fällen klinisch inapparent. Gelegentlich zeigt sich eine leichte Mononukleose in der Labordiagnostik. Allerdings wird nach der Primärinfektion eine lebenslange **Latenz** etabliert (Roizman & Baines, 1991). Während der Latenz sind replikationskompetente virale Genome vorhanden, nicht aber infektiöse Viruspartikel (zur Übersicht: Reddehase,

2002). Auch wenn der Replikationszyklus nicht vollständig abläuft, ist das virale Genom während der Latenz transkriptionell aktiv, d.h. es können im geringen Maße *ie1* und *ie2* Transkripte nachgewiesen werden (Simon *et al.*, 2006). Eine **Rekurrenz**, d. h. eine Reaktivierung des viralen Genoms hin zur produktiven Infektion, ist spontan auch im immunkompetenten Organismus möglich. Sie verläuft meist asymptomatisch mit der Nachweismöglichkeit des Virus in Speichel und Urin (Meyers *et al.*, 1990), ist aber für die Virusübertragung von epidemiologischer Relevanz. Meist führen jedoch exogene Faktoren zur Reaktivierung des Virus (zur Übersicht: Reddehase *et al.*, 1994; Reddehase, 2002). Von besonderer klinischer Relevanz ist die CMV-Infektion bei **immunsupprimierten** Patienten, da bei ihnen immunologische Prozesse durch Immunsuppressiva, psychische und körperliche Überbelastung, Infektionskrankheiten oder auch tumoröse Erkrankungen unterdrückt werden. Risikogruppen stellen z.B. **Patienten mit angeborener** (*severe combined immunodeficiency*, SCID) **oder erworbener** (*acquired immunodeficiency syndrome*; AIDS) **Immundefizienz** dar, sowie Patienten, die eine immunsuppressive Behandlung aufgrund einer **Transplantation** erhalten haben.

Insbesondere nach allogener KMT stellt die hCMV-Infektion eine Komplikation dar. Sie ist eine mögliche Folge einer Reaktivierung von latentem hCMV aufgrund der Immunsuppression eines hCMV-seropositiven Rezipienten, oder einer Primärinfektion des Rezipienten durch Übertragung von KM eines hCMV-seropositiven Donors. Die Reaktivierung von CMV nach allogener KMT liegt bei 5% bei hCMV-seronegativem Rezipient und hCMV-seropositivem Donor, bei 14% bei hCMV-seropositivem Rezipient und hCMV-seronegativem Donor sowie bei 12 % bei hCMV-seropositivem Rezipient und Donor (Ljungman *et al.*, 1998).

Des Weiteren kann es bei Primärinfektion von Schwangeren nach transplazentarer Übertragung zur Infektion der immunologisch noch nicht ausgereiften **Embryonen oder Föten** kommen. Eine mögliche Folge dieser kongenitalen Infektion ist die *cytomegalic inclusion disease* (CID). Diese ist begleitet von Mikrocephalie, periventrikulärer Kalzifikation, zerebraler Hypoplasie und Augenanomalien (zur Übersicht: Reddehase, 2002).

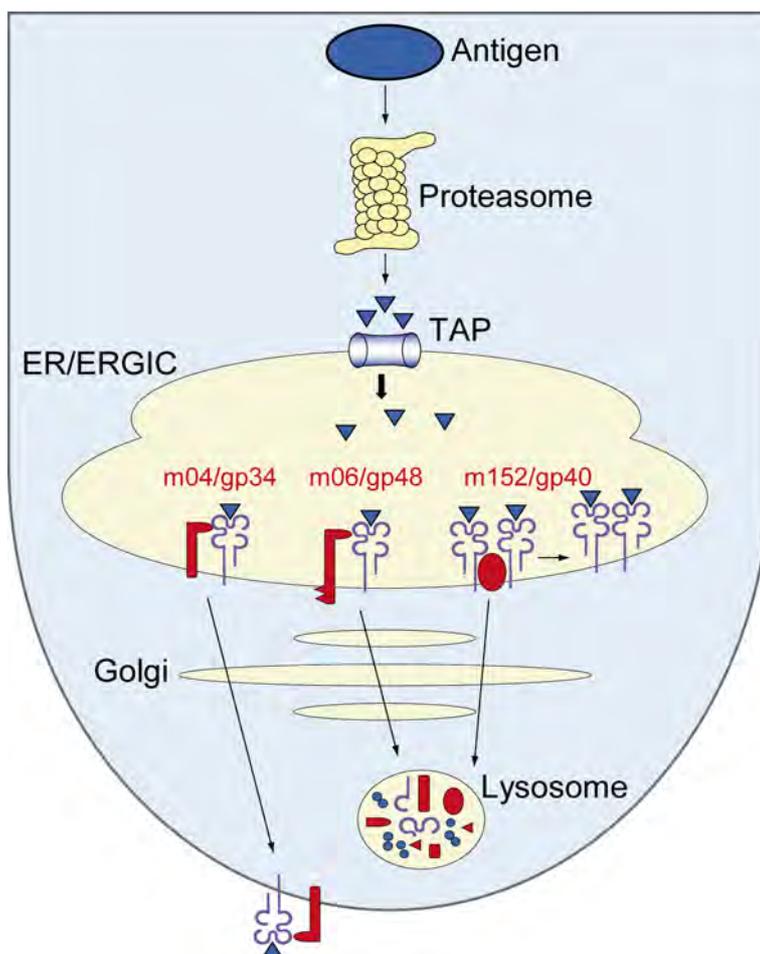
### 1.3 Immunevasion von mCMV

Die Strategie der Immunevasion wird von Pathogenen zum Unterlaufen der Immunabwehr genutzt. Ein Angriffspunkt von Immunevasionsproteinen ist die Beeinträchtigung der Antigenpräsentation und somit die Inhibition der CD8 T-Zell vermittelten Kontrolle der Infektion. Im mCMV-Genom sind bisher drei Gene beschrieben, die in die Antigenpräsentation über MHC-Klasse-I-Moleküle eingreifen: m152/gp40, m06/gp48 und m04/gp34 (zur Übersicht: Reddehase, 2002; Reddehase *et al.*, 2004; Holtappels *et al.*, 2006a; Doom & Hill, 2008).

Das Transmembranglykoprotein **m152/gp40** (kurz: m152) wurde als das erste und als das stärkste Immunevasionsprotein von mCMV beschrieben (Del Val *et al.*, 1992; Ziegler *et al.*, 1997; Krmpotic *et al.*, 1999; Ziegler *et al.*, 2000). Es induziert die Retention peptidbeladener MHC-Klasse-I-Komplexe im Endoplasmatischen Retikulum (ER) -Golgi-*intermediate compartment* (ERGIC) (Del Val *et al.*, 1992; Ziegler *et al.*, 1997; Ziegler *et al.*, 2000). m152 bindet transient an MHC-Klasse-I-Komplexe und modifiziert diese so, dass sie nicht mehr an obligatorische Transportrezeptoren, wie z.B. Cargo Rezeptoren, binden können (Ziegler *et al.*, 2000).

Die Transmembranglykoproteine **m06/gp48** (kurz: m06) und **m04/gp34** (kurz: m04) binden stabil an MHC-Klasse-I-Komplexe. m06 bindet an die lumenale Domäne der peptidbeladenen MHC-Klasse-I-Komplexe im ER und führt sie über den Golgi-Apparat der lysosomalen Degradation zu. Im Lysosom werden sowohl peptidbeladene MHC-Klasse-I-Komplexe als auch m06 abgebaut (zur Übersicht: Reddehase, 2002). m06 wird auch dann degradiert, wenn es nicht an MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden ist, allerdings nicht im Lysosom, sondern im zytosolischen Proteasom (Bubeck *et al.*, 2002). m04 bindet an die  $\beta$ -2-Mikroglobuline der MHC-Klasse-I-Komplexe im ER und bringt die MHC-Klasse-I-Komplexe an die Zelloberfläche (Kavanagh *et al.*, 2001). Der Beitrag von m04 zur mCMV-Immunevasion ist derzeit unklar. Die Eingliederung von m04 als Immunevasien beruht allein auf der Feststellung, dass die Infektion mit einer m04-Deletionsmutante zu einer im Vergleich zum mCMV-WT verbesserten Antigenpräsentation führt (Holtappels *et al.*, 2006a; Pinto *et al.*, 2006). m152 und m06 verursachen eine reduzierte Peptidpräsentation auf infizierten Zellen und vermindern damit die Erkennung und die Zytolyse infizierter Zellen durch Antigen-spezifische CD8 T-Zellen. Sie werden deshalb als negative Regulatoren der Antigenpräsentation bezeichnet (Holtappels *et al.*, 2006a; Böhm *et al.*, 2008b).

Da es negative wie auch positive Regulatoren der Antigenpräsentation gibt, wurde eine neue Terminologie für die Immunevasionsproteine von mCMV vorgeschlagen: virale Regulatoren der Antigen-Präsentation (vRAPs) [Holtappels *et al.*, 2006a].



**Abb. 1.3: Funktion der Immunevasine/vRAPs des mCMV**

m152 induziert die Retention peptidbeladener MHC-Klasse-I-Moleküle im ER. m06 bindet an peptidbeladene MHC-Klasse-I-Komplexe im ER und führt sie der lysosomalen Degradation zu. m152 und m06 sind somit negative Regulatoren der Antigenpräsentation, da sie die Präsentation viraler Peptide auf der Zelloberfläche inhibieren. m04 bindet ebenfalls an die peptidbeladenen MHC-Klasse-I-Moleküle und führt diese an die Zelloberfläche (aus: Reddehase 2002; modifiziert von Dr. Niels Lemmermann).

#### 1.4 Die Knochenmarktransplantation (KMT) und mCMV-Infektion

Die KMT wird heute als effiziente, kurative Therapie bei vielen hämatologisch-onkologischen Erkrankungen eingesetzt (zur Übersicht: Appelbaum, 2003; Shlomchik, 2007). 2007 wurden in Europa 25.563 Transplantationen von 613 Zentren in 42 Ländern durchgeführt (Gratwohl *et al.*, 2009). Für das Jahr 1939 ist die erste KMT dokumentiert. Die erfolglos verlaufene KMT wurde bei einer Patientin mit goldinduzierter Knochenmarkaplasie durchgeführt (Osgood *et al.*, 1939). Gegen Ende des zweiten Weltkriegs kam es zu einer Weiterentwicklung auf dem Gebiet der KMT. Aussichtsreiche Experimente zur klinischen Anwendung der KMT wurden aber erst ab 1960 in zahlreichen Hunderversuchen von E. D. Thomas durchgeführt, der 1990 für diese Leistungen den

Nobelpreis für Medizin erhielt (Thomas *et al.*, 1999). Bereits 1996 wurde die erste erfolgreich verlaufende KMT bei einer Katze mit akuter, myeloider Leukämie durchgeführt (Gasper *et al.*, 1996). Die Zukunft lässt vermuten, dass die KMT bei Haustieren wie z.B. Hund und Katze von immer größerer Bedeutung sein wird.

Bei der KMT werden in Abhängigkeit von der Herkunft des Donormaterials drei Transplantationsformen unterschieden:

Die **autologe** KMT wird bei myelosuppressiver Hochdosis-Chemotherapie oder Strahlentherapie bei malignen Erkrankungen mit Ausnahme von hämatologisch-onkologischen Erkrankungen eingesetzt. Bei der autologen KMT stammt das KM vom Patienten selbst und wird nach Aufreinigung und Entfernung der malignen Zellen retransplantiert. Allerdings besteht trotz aufwendigen Aufreinigens des entnommenen KM das Risiko, dass maligne Zellen von z.B. Metastasen im KM zurückbleiben und der Patient eine Remission aufgrund dieser Residualzellen erleidet. 2007 wurden 61% der KMT autolog durchgeführt (Gratwohl *et al.*, 2009).

Bei der **syngenen** KMT sind Rezipient und Donor genetisch identisch, d. h. eineiige Zwillinge. Diese Donor-Rezipienten-Konstellation ist der Idealfall, allerdings hat nur einer von hundert Patienten einen genetisch identischen Zwilling (zur Übersicht: Appelbaum, 2003).

Als **allogene** KMT wird eine Transplantation zwischen genetisch nicht-identischen Individuen der gleichen Spezies bezeichnet. 2007 wurden 39% aller KMT allogon durchgeführt, wobei die Hauptindikation für eine allogene KMT Leukämien waren (Gratwohl *et al.*, 2009). Die syngene und autologe KMT haben den prinzipiellen Vorteil, dass es zu keiner Komplikationen aufgrund von Histoinkompatibilitätsreaktionen kommt. Allerdings bleibt auch der erwünschte **Graft-versus-Leukemia** (GvL) Effekt aus. Dabei reagieren die Zellen des Transplantats gegen die im Körper verbliebenen Leukämiezellen und zerstören diese (zur Übersicht: Kolb, 2008). Anders als bei der syngenen oder autologen KMT fördert die allogene KMT den GvL Effekt (zur Übersicht: Kolb, 2008; Zheng *et al.*, 2009).

Der **Major Histokompatibilitäts Komplex** (MHC, *major histocompatibility complex*) des Menschen wird als HLA (Humane Leukozyten Antigene)-Komplex benannt, während der der Maus als H2-Komplex bezeichnet wird. Der HLA-Komplex des Menschen bezeichnet zentromernahe, im kurzen Arm des Chromosoms 6 gelegene allele Gene. Die Genregion wird als MHC bezeichnet. Der HLA-Komplex dient der Gewebstypisierung bei der Donor- und Empfängerenauswahl vor Transplantationen. Die Stärke einer Immunreaktion nach KMT ist primär abhängig von den Unterschieden im HLA zwischen Donor und Rezipient. Ein weiteres Problem nach allogener KMT stellen die **Minor Histokompatibilitäts Antigene** (mHAg) dar. mHAg sind Genprodukte von Genloci, die außerhalb des MHC liegen. Sie

kommen als Peptide vor, die von polymorphen, endogenen Proteinen abstammen (zur Übersicht: Falkenburg *et al.*, 2003; Bleakley & Riddell, 2004; Edinger *et al.*, 2009). Die mHAgs werden durch alloreaktive T-Zellen erkannt und verursachen, je nachdem an welchem Ort sie exprimiert werden (Darm, Leber, Lunge, Haut) eine **Graft-versus-Host-Disease** (GvHD) oder einen GvL Effekt (hämatopoetische/tumoröse Zellen) [zur Übersicht: Bleakley & Riddell, 2004]. Selbst bei vollständiger HLA-Identität kann es durch Inkompatibilität von mHAgs zur Komplikation der GvHD oder der **Host-versus-Graft-Disease** (HvGD) kommen (zur Übersicht: Goker *et al.*, 2001).

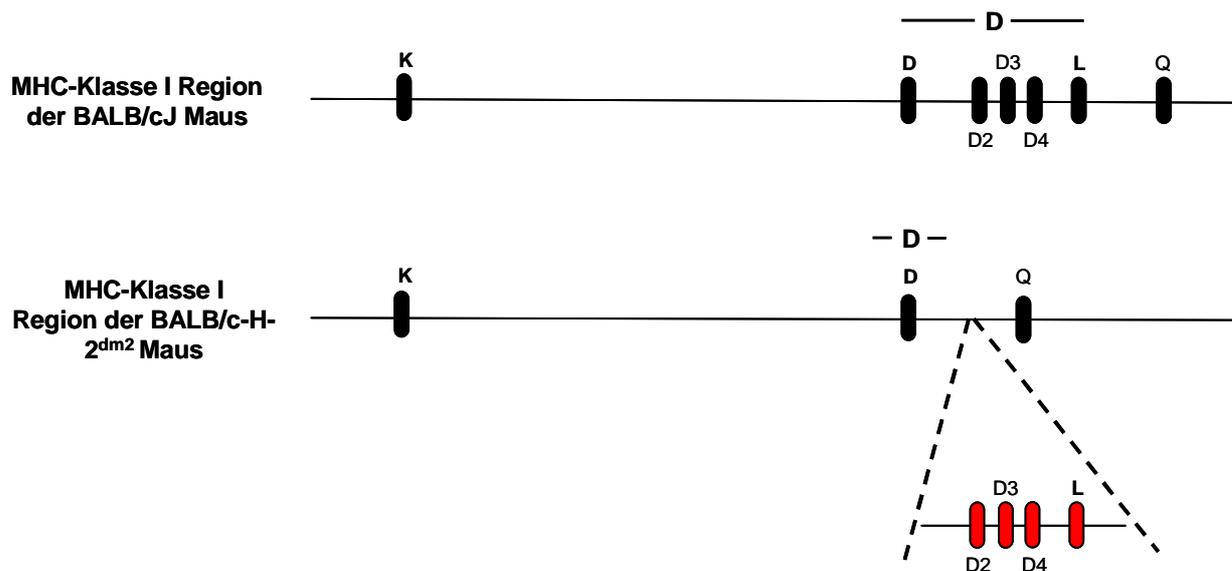
Nach allogener KMT kommt es bei nahezu 50% der Patienten zur Problematik der hCMV-Infektion. hCMV-Infektionen treten ebenfalls bei 40-45% der Rezipienten syngener oder autologer KMT auf, wobei jedoch symptomatische Infektionen seltener sind (Wingard *et al.*, 1990). In einem hCMV-seropositivem Rezipienten entwickelt sich eine hCMV-Infektion als Folge einer Reaktivierung von latenter hCMV. Generell kann die Gefahr einer Primärinfektion hCMV-seronegativer Rezipienten durch die Verwendung von KM und Blutprodukten eines hCMV-seronegativen Donors minimiert werden (Bowden *et al.*, 1991).

Da aus ethischen Gründen nicht alle Fragestellungen am Menschen untersucht werden können, ist es notwendig auf ein kliniknahes, **murines Tiermodell** zurückzugreifen, um die Problematik der CMV-Infektion nach allogener KMT zu studieren.

Das murine Tiermodell ist ein definiertes, etabliertes und akzeptiertes System, um die CMV-Infektion zu studieren (zur Übersicht: Hudson, 1979; Koszinowski *et al.*, 1990). Die Pathogenese der mCMV-Infektion ist in vielen Grundzügen vergleichbar mit der des hCMV, was auf der Tatsache beruht, dass die mCMV-Genom-Organisation und -Replikation viele Analogien zu der von hCMV aufweisen (Mocarski & Courcelle, 2001). Eine mCMV-Infektion führt nach subletaler  $\gamma$ -Bestrahlung zu einem massiven Anstieg der Virusproduktivität und schließlich zum Tod der Tiere (Reddehase *et al.*, 1985). Dabei kommt es zu Organmanifestationen wie interstitielle Pneumonie, Adrenitis und Knochenmarkversagen (Reddehase *et al.*, 1985; Mutter *et al.*, 1988; Reddehase *et al.*, 1988; Mayer *et al.*, 1997; Steffens *et al.*, 1998). Sowohl hCMV als auch mCMV haben Mechanismen zur Kontrolle der Immunantwort entwickelt, bei der virale Proteine in die Präsentation antigener Peptide eingreifen (zur Übersicht: Reddehase, 2002; Reddehase *et al.*, 2004). Damit können Erkenntnisse aus dem mCMV-Modell bezüglich funktioneller Zusammenhänge zwischen Immunkontrolle und Immunevasion auch auf hCMV übertragen werden.

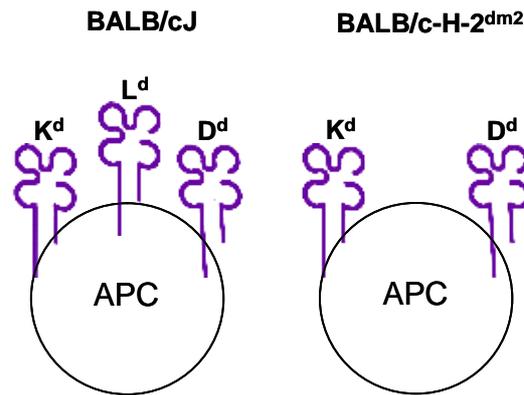
Um die klinische Problematik der allogenen KMT zu studieren, wurden Mäuse der Stämme BALB/cJ und BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> - beide des Haplotyps H-2<sup>d</sup> - verwendet, die sich in der Expression eines MHC-Klasse-I-Moleküls unterscheiden, dem L<sup>d</sup>-Molekül (Rubocki *et*

*al.*, 1986; Stephan *et al.*, 1986). Die Mäuse wurden wechselseitig als Donoren oder Rezipienten eingesetzt. Nach Verwendung von BALB/cJ Mäusen als Knochenmark (KM) Donoren und BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Mäusen als Rezipienten können die CD8 T-Zellen (L<sup>d+</sup>) des Rezipienten gegen die fremden Antigen-präsentierenden Zellen (APC) des Donors (L<sup>d+</sup>) reagieren und möglicherweise eine HvG-Reaktion auslösen. Werden BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Mäuse als Donoren und BALB/cJ Mäuse als Rezipienten eingesetzt, könnte dies eine Reaktivität der CD8 T-Zellen des Donors (L<sup>d+</sup>) gegen die fremden APC des Rezipienten (L<sup>d+</sup>) zur Folge haben. Die HvG-Reaktion ist von großer klinischer Relevanz nach Organtransplantation, da die T-Zellen des Rezipienten gegen die fremden Zellen des transplantierten Organs reagieren können. Nach KMT ist die GvH-Reaktion relevanter, da die transplantierten KMZ gegen die fremden Zellen des Rezipienten reagieren können. Eine HvG- oder GvH-Reaktion endet im schlimmsten Fall mit der entsprechenden Erkrankung. Durch Immunsuppression des Rezipienten vor KMT kann die Wahrscheinlichkeit einer HvG- und GvH-Reaktion aber deutlich reduziert werden (zur Übersicht: Goker *et al.*, 2001; Welniak *et al.*, 2007).



**Abb. 1.4: MHC-Klasse-I Region der Mausstämme BALB/cJ und BALB/c-H-2<sup>dm2</sup>**

Die D-Region der BALB/cJ Maus beinhaltet die fünf Gene D, D2, D3, D4 und L. Die Gene D und L kodieren die MHC-Klasse-I-Moleküle D<sup>d</sup> und L<sup>d</sup>. Die BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Maus ist eine natürliche Gendelektionsmutante, der die Gene L, D2, D3 und D4 fehlen (Rubocki *et al.*, 1986). D2, D3 und D4 sind zwischen D<sup>d</sup> und L<sup>d</sup> lokalisiert und kodieren nicht für funktionelle Genprodukte (Stephan *et al.*, 1986).



**Abb. 1.5: MHC-Klasse-I-Molekül Expression der Mausstämme BALB/cJ und BALB/c-H-2<sup>dm2</sup>**  
 Aufgrund des Gendefekts der BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Maus unterscheiden sich die beiden Mausstämme in der Expression eines MHC-Klasse-I-Moleküls, dem L<sup>d</sup>-Molekül. Während die BALB/cJ Maus die drei MHC-Klasse-I-Moleküle L<sup>d</sup>, D<sup>d</sup> und K<sup>d</sup> exprimiert, exprimiert die BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Maus nur D<sup>d</sup> und K<sup>d</sup>. Die BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Maus kann folglich keine L<sup>d</sup> abhängigen Peptide präsentieren.

### 1.5 Pathophysiologie der GvHD

Die akute und chronische GvHD ist die schwerwiegendste klinische Komplikation nach allogener KMT (zur Übersicht: Shlomchik, 2007; Reddy *et al.*, 2008; Edinger *et al.*, 2009). Die GvHD beginnt mit der Reaktivität der Donor T-Zellen eines Transplantates (KM oder Organ) gegen die Zellen des Rezipienten nach allogener KMT und endet mit den Folgen dieser Erkrankung (zur Übersicht: Shlomchik, 2007; Welniak *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2009). Das finale Stadium der GvHD ist durch eine massive Degeneration der Rezipientenzellen geprägt. Für den betroffenen Patienten ist die GvHD deshalb mit einer hohen Letalität und Morbidität verbunden (zur Übersicht: Goker *et al.*, 2001). Es müssen drei Voraussetzungen erfüllt sein, damit es zur Induktion einer GvHD kommt. Diese wurden 1995 durch Rupert Billingham festgelegt (zur Übersicht: Goker *et al.*, 2001):

- 1) Das Transplantat enthält vitale und funktionell aktive Lymphozyten.
- 2) Rezipient und Donor sind immunologisch verschieden, also histoinkompatibel.
- 3) Der Rezipient ist immunsupprimiert, um die transplantierten Zellen nicht eliminieren oder inaktivieren zu können.

Die GvHD wird in eine akute und eine chronische Phase unterteilt. Die **akute Phase** entwickelt sich innerhalb der ersten hundert Tage nach allogener Transplantation. Sie ist charakterisiert durch Zelldegeneration in der Haut, dem Darm, der Leber, dem Thymus, der Lunge und den sekundären lymphatischen Organen. Die Zelldegeneration wird durch

T-Helferzell-Typ-1 Zytokine wie z.B. IL (Interleukin)-12, IL-2 und IFN- $\gamma$  verursacht. Die **chronische GvHD** entwickelt sich jenseits von hundert Tagen nach allogener Transplantation mit der Freisetzung von T-Helferzell-Typ-2 Zytokinen wie z.B. IL-4 und IL-10. Die Zielorgane der T-Helferzell-Typ-2 Zytokine sind Haut und Schleimhäute. Ein weiteres Krankheitsbild der chronischen GvHD sind Autoimmunerkrankungen wie z.B. die eosinophile Fascikulitis und die *scleroderma-like-skin-disease* (zur Übersicht: Welniak *et al.*, 2007). Die Pathophysiologie der GvHD kann in drei Phasen unterteilt werden:

### 1. Phase: Konditionierung der APC

Die früheste Phase der GvHD beginnt noch vor der Gabe der KMZ. Die Ganzkörperbestrahlung oder Hochdosis-Chemotherapie zur Immunsuppression des Rezipienten schädigt den Organismus, was zu inflammatorischen Aktivierungs- und Abwehrreaktionen im Sinne eines physiologischen Reparationsvorgangs führt. Die Vorschädigung des Gewebes führt zu einer Aktivierung der APC des Rezipienten mit einer vermehrten Freisetzung von entzündungsvermittelnden Zytokinen wie Tumornekrosefaktor (TNF- $\alpha$ ), IL-1 und IL-6 (Xun *et al.*, 1994; zur Übersicht: Goker *et al.*, 2001; Reddy *et al.*, 2008). Die Anwesenheit von Zytokinen während dieser Phase führt zur Expression von Adhäsions- und kostimulatorischen Molekülen sowie zur Präsentation von Antigenen durch die APC des Rezipienten (Chang & Lee, 1986; Pober *et al.*, 1996). Die Antigene, die von den APC während dieser Phase präsentiert werden, sind Selbstpeptide und daher nicht limitiert (zur Übersicht: Shlomchik, 2007).

### 2. Phase: Aktivierung der Donor T-Zellen

Im Zentrum der Pathogenese der GvHD stehen alloreaktive T-Zellen des Donors, wobei Alloreaktivität sowohl von CD4 als auch von CD8 T-Zellen ausgehen kann (Deeg *et al.*, 1999; zur Übersicht: Shlomchik, 2007; Zheng *et al.*, 2009). Nach Transplantation des Donor KM wandern die KMZ zur Ausreifung in das KM ein. Anschließend differenzieren sie im Thymus im Rahmen der positiven und negativen Selektion zu reifen T-Zellen. Die reifen T-Zellen gelangen dann über den *Ductus thoracicus* zu den sekundären Lymphorganen des Rezipienten. Dort exprimieren die T-Zellen den CCR7 und den CCL21 Rezeptor. Der CCR7 Rezeptor wird von T-Zellen für die Migration in die sekundären Lymphorgane benötigt. Nach dem Erreichen der sekundären Lymphorgane wird der CCR7 herunterreguliert und nur noch der CCL21 Rezeptor exprimiert. Dieser Rezeptor ist notwendig, um die T-Zellen zu ihren Zielorganen zu führen (zur Übersicht: Welniak *et al.*, 2007). Im Zielorgan reagieren die T-Zellen des übertragenen Donor KM gegen den histoinkompatiblen peptidbeladenen MHC-Komplex (pepMHC) [zur Übersicht: Shlomchik, 2007; Welniak *et al.*, 2007; Reddy *et al.*, 2008]. Peptide können direkt von APC des Rezipienten als auch indirekt von APC des Donors den alloreaktiven T-Zellen aus dem

KM des Donors präsentiert werden (Shlomchik *et al.*, 1999; Teshima *et al.*, 2002; zur Übersicht: Shlomchik, 2007). Bei den APC handelt es sich hauptsächlich um DC, MØ und Monozyten, die durch die vorherige Zellschädigung aktiviert wurden (zur Übersicht: Matzinger, 2002). Die alloreaktiven T-Zellen des Donors benötigen zur Aktivierung ein zweites Signal von den kostimulatorischen Molekülen der APC (zur Übersicht: Dustin, 2001). Eine Blockade dieser kostimulatorischen Moleküle führte in einem murinen Model zu Reduzierung der GvHD (Murphy & Blazar, 1999). Zur Induktion einer GvHD spielt der T-Zellrezeptor (TCR) als kostimulatorisches Signal eine essentielle Rolle. Er und die CD28:B7 Interaktion wirken als aktivierendes Signal auf T-Zellen und induzieren eine GvHD. Im Gegensatz wirkt die CTLA-4:B7 Interaktion als negatives Signal auf T-Zellen und reduziert das Risiko einer GvHD (Welniak *et al.*, 2007). Der Rezeptor OX40 wird auf CD8 und CD4 T-Zellen exprimiert. Eine GvHD kann nur dann nachgewiesen werden, wenn OX40 auf CD4 T-Zellen exprimiert wird (Blazar *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu OX40 wird CD40L nur auf CD4 T-Zellen exprimiert. Durch die endogene CD40:CD40L Interaktion lässt sich eine akute GvHD nachweisen (Blazar *et al.*, 1997).

### 3. Phase: Zelluläre und inflammatorische Effektorphase

In der dritten Phase des pathophysiologischen Prozess der GvHD führt die Zerstörung der Zielzellen durch die alloreaktiven T-Zellen des Donors zur Freisetzung von verschiedenen Zytokinen wie z.B. TNF, IL-1 und IFN- $\gamma$  (zur Übersicht: Welniak *et al.*, 2007; Hill, 2009). Durch die freigesetzten Mediatoren können CD4 T-Zellen indirekt durch Makrophagen (MØ) bzw. Dendritische Zellen (DC) aktiviert werden, um erneut inflammatorische Mediatoren freizusetzen. Der Überschuss an Zytokinen, ergänzt durch die Reaktivität der alloreaktiven T-Zellen, verursacht eine lokale Zellschädigung mit nachfolgender Zytokinkaskade, die mit massiver Zelldegeneration in Haut, Darm und Leber der betroffenen Patienten endet (zur Übersicht: Goker *et al.*, 2001; Shlomchik, 2007).

## 1.6 Toleranzentwicklung nach allogener KMT

Toleranz beschreibt einen Zustand, in dem das Immunsystem eine Unterscheidung zwischen selbst und fremd zulässt und sich nicht gegen den eigenen Organismus richtet. Im Organismus wird zwischen der zentralen und der peripheren Toleranz unterschieden. **Zentrale Toleranz** entsteht bei der T-Zellentwicklung in der kortikalen und medullären Region des Thymus (zur Übersicht: Sprent & Kishimoto, 2001; Kyewski & Klein, 2006). Hierbei spielen Prozesse der **positiven** und **negativen Selektion** eine entscheidende Rolle. Der Hauptprozess der T-Zellentwicklung ist die klonale Deletion (zur Übersicht: Hogquist *et al.*, 2005; Powell, 2006). In dieser Phase kommt es zur Interaktion von Thymozyten mit dem pepMHC der APC aus dem KM. Thymozyten, deren TCR eine hohe Affinität zum pepMHC der APC haben, werden im Rahmen der negativen Selektion eliminiert (zur Übersicht: Cohn, 2004). Thymozyten mit niedriger Affinität zum pepMHC der APC entwickeln sich von doppelpositiven, CD8 und CD4 exprimierenden T-Zellen zu einfachpositiven, CD8 oder CD4 exprimierenden T-Zellen und gelangen anschließend in die Peripherie. Dieser Prozess wird als positive Selektion bezeichnet (Starr *et al.*, 2003; zur Übersicht: Cohn, 2004). Die negative Selektion vermindert das Risiko von Autoimmunkrankheiten, indem sie Selbsttoleranz induziert. T-Zellen, die eine zu hohe Affinität gegen körpereigene pepMHC haben, werden eliminiert (Surh & Sprent, 1995; zur Übersicht: Kyewski & Klein, 2006.). Im Rahmen der negativen Selektion werden 95% der Thymozyten beseitigt (zur Übersicht: Kyewski & Klein, 2006). Das bedeutet, dass lediglich 5% der Thymozyten in die Peripherie gelangen und zu T-Zellen reifen (Starr *et al.*, 2003). Im Rahmen der allogenen KMT ist die zentrale Toleranz von essentieller Bedeutung, da bei KM-Chimären die Donor-spezifische Toleranzentwicklung durch die negative Selektion erfolgt (van Pel *et al.*, 2003; zur Übersicht: Starzl, 2004; Bigenzahn *et al.*, 2005). Nach Verabreichung von Donor KM vor der Transplantation an den Rezipienten soll dessen Immunsystem mit Hilfe eines gemischten Chimärismus toleriert werden. Durch die Einwanderung von APC des Donors in den Thymus des Rezipienten erfolgt dort die Deletion Donor-reaktiver Zellen im Sinne der klonalen Deletion (zur Übersicht: Sykes, 2001).

Während der klonalen Deletion im Thymus können hochaffine Lymphozyten, die auf körpereigene Antigene reagieren der negativen Selektion entkommen (zur Übersicht: Kiselow & Boehmer, 1995). Diese autoreaktiven Lymphozyten werden nicht alle durch die negative Selektion im Thymus eliminiert und gelangen über die Blut- bzw. Lymphbahn in die Peripherie (zur Übersicht: Weinreich & Hogquist, 2008). Autoreaktive Lymphozyten entstehen direkt in der Peripherie, wenn sie dort auf körpereigene Antigene reagieren gegen die sie eine hohe Affinität haben. Um die Selbsttoleranz im Organismus zu erhalten und Autoimmunkrankheiten vorzubeugen, hat der Körper periphere Mechanismen gegen

autoreaktive Lymphozyten entwickelt. Diese Mechanismen werden unter dem Begriff der **peripheren Toleranz** zusammengefasst (zur Übersicht: Sprent & Kishimoto, 2001; Wu *et al.*, 2008). Ein Mechanismus der peripheren Toleranz ist die **klonale Deletion**. Dieser Art der Eliminierung unterliegen sowohl autoreaktive T-Zellen als auch autoreaktive B-Zellen. Autoreaktive Zellen werden durch Aktivierung der FAS/FASL vermittelten Lyse deletiert (Wells *et al.*, 2001). Ein weiterer Mechanismus, um autoreaktive T-Zellen zu neutralisieren, ist die **Anergie**. Anergie bezeichnet einen Zustand fehlender Reaktivität. T-Zellen, die dem Zustand der Anergie unterliegen, hatten Kontakt zu ihrem Antigen, aber ohne kostimulatorische Signale zu erhalten und reagieren deshalb nicht auf das Antigen. Studien deuten daraufhin, dass der kostimulatorische Rezeptor das *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4* (CTLA4) sein könnte. CTLA4 wird auf aktivierten T-Zellen exprimiert und könnte durch die Interaktion mit dem B7-Liganden der APC eine Inaktivierung von autoreaktiven T-Zellen induzieren (zur Übersicht: Clarkson & Sayegh, 2005; Powell, 2006). Eine weitere Theorie, die den Zustand der Anergie erklären könnte, ist die fehlende IL-2 Expression und Sekretion nach T-Zellaktivierung (Li *et al.*, 1996). Es ist bekannt, dass die Anergie eine essentielle Rolle bei der Vorbeugung von Autoimmunerkrankungen und bei der Transplantatabstoßung spielt (zur Übersicht: Powell, 2006). Im Rahmen der **Suppression** von autoreaktiven T-Zellen sind CD4 und CD25 exprimierende T-Zellen essentiell. Die Suppression wird durch Zellkontakt und Zytokinabhängige Mechanismen vermittelt. CD4 und CD25 exprimierende T-Zellen werden als regulatorische T-Zellen (Tregs) bezeichnet. Interessanterweise haben Tregs *in vivo* eine suppressive Wirkung auf die GvHD. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass transferierte Tregs nach allogener KMT eine akute GvHD verhindern (zur Übersicht: Welniak *et al.*, 2007). Darüber hinaus reduzieren vom Rezipienten stammende Tregs ebenso eine GvHD und fördern den GvL Effekt (zur Übersicht: Welniak *et al.*, 2007).

## 1.7 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es, ein besseres Verständnis von Pathogenese und Kontrolle der CMV-Infektion nach allogener KMT unter Berücksichtigung möglicher Komplikationen aufgrund einer MHC-Klasse-I Disparität zu erlangen.

hCMV ist aufgrund der hohen Durchseuchung und weltweiten Verbreitung ein Erreger von erheblicher klinischer Bedeutung. Hohe Letalität und Morbidität bedingt durch eine hCMV-Infektion kennzeichnen das Krankheitsbild immunsupprimierter Patienten. Eine Immunsuppression ist beispielsweise erforderlich bei Transplantationen von KM oder Organen. Die allogene KMT wird heute in der Medizin als effiziente, kurative Therapie bei

vielen hämatologisch-onkologischen Erkrankungen eingesetzt. Zusätzlich birgt jede allogene KMT das Risiko einer GvHD, die eine weitere klinische Komplikation für den Patienten darstellt.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden in einem murinen KMT Modell durchgeführt, bei dem die CMV-Infektion unter den gewählten Bedingungen ohne Transplantation von KMT letal verlaufen würde. Um den pathophysiologischen Mechanismus einer möglichen HvG- oder GvH-Reaktion zu analysieren, wurden zwei Mausstämme gewählt, die sich in der Expression eines MHC-Klasse-I-Moleküls unterscheiden. Der wechselseitige Einsatz der beiden Mausstämme als Donoren oder Rezipienten ermöglichte eine gezielte Simulation einer HvG- oder GvH-Reaktion. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Koszinowski und Reddehase haben gezeigt, dass die Tiere nach HvG-KMT überleben, während die Tiere nach GvH-KMT überraschenderweise sterben. Warum die Tiere nach GvH-KMT sterben, war die Hauptfragestellung dieser Arbeit.

Nach immunologischer Charakterisierung der beiden Mausstämme BALB/cJ und BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> sollte zunächst die mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort nach allogener KMT mit Hilfe des ELISPOT-Assay ermittelt werden, um zu überprüfen, ob sich die Frequenzen mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen nach HvG-KMT und GvH-KMT unterscheiden. Zusätzlich sollte die Rekonstitution des Immunsystems nach HvG- und GvH-KMT mittels zytofluorometrischer Analyse untersucht werden, um eine mögliche verringerte lymphozytäre Infiltration von Lunge und Milz nach GvH-KMT auszuschließen. Um anschließend die hämatopoetische Rekonstitution zu analysieren, wurde die sehr sensitive Methode der quantitativen *real-time* PCR (qPCR) angewandt. Im Anschluss an die Quantifizierung erfolgte eine Analyse der Leberinfiltrate nach allogener KMT mittels Immunhistologie. Die Leberinfiltrate nach GvH-KMT wurden anschließend immunologisch weiter charakterisiert.

Ebenfalls sollte *in vivo* und *in vitro* untersucht werden, welchen Einfluss die Immunevasionsproteine (vRAPs) von mCMV auf die immunologische Kontrolle nach allogener KMT haben.

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zum besseren Verständnis der CMV-Infektion nach allogener KMT leisten.

## 2. Material

### 2.1 Allgemeine Laborgeräte

autoMACS	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Brutschrank Hera cell 240	Heraeus (Hanau)
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus (Hanau)
Dounce-Homogenisator	Braun (Melsungen, Nr. 530830815)
FACSsort	Becton Dickinson (Heidelberg)
FACSVantage SE	Becton Dickinson (Heidelberg)
FACS FC500	Beckman Coulter (Krefeld)
Flüssigstickstofftank	Messer (Griesheim)
Gamma-Counter Cobra II	Packard Canberra (Frankfurt a. M.)
Heizplatte/Magnetrührer IKA Combimag RET	Janke & Kunkel (Staufen)
Invertfluoreszenzmikroskop Leica DM IRB SL	Leica (Wetzlar)
Invertmikroskop Leica DM	Leica (Wetzlar)
Labofuge 200	Heraeus (Hanau)
Multifuge 3 S-R	Heraeus (Hanau)
3 L	Heraeus (Hanau)
Ultrazentrifuge Sorvall RC5C	Heraeus (Hanau)
Ultrazentrifuge Optima™ L-90K	Beckman und Coulter (Krefeld)
Mikrotom HM355	Mikrotom (Walldorf)
Mikrozentrifuge AL	Roth (Karlsruhe)
Mikrozentrifuge C-1200	National Labnet (Woodbridge, NY, USA)
Multikanalpipette: Finnpipette	Labsystems Helsinki (Finnland)
	Gilson (Villies Le Bel, Frankreich)
Multistepper	Eppendorf (Hamburg)
Ultrazentrifuge Sorvall Combi Plus	Heraeus (Hanau)
Paraffinerhitzer Hiso TAPplus	Leica (Wetzlar)
Peristaltikpumpe Reglo Digital	Ismatec (Wertheim-Mondfel)
Phasenmikroskop Nikon SE	Nikon (Düsseldorf)
Photometer	Nanodrop, PEQLAB (Erlangen)
Pipetten	Gilson (Villies Le Bel, Frankreich)
	Eppendorf (Hamburg)
	Rainin (Mettler Toledo, Oakland, CA, USA)
Pipettiergerät Pipetboy	INTEGRA Biosciences (Fernwald)

Sterile Werkbank Typ HS 18	Heraeus (Hanau)
Tischzentrifugen 5417	Eppendorf (Hamburg)
5417C	Eppendorf (Hamburg)
5417R	Eppendorf (Hamburg)
Mikrozentrifuge Force 7	Roth (Karlsruhe)
Vollschutz-Kleintierbestrahlungsanlage	Buchler (Braunschweig, Typ OB 58-BA)
Waage BP 61	Sartorius (Göttingen)
Waage Kern 510	Kern (Albstadt)
Wasserbad	Memmert GmbH (Schwabach)
Zählmikroskop Zellen Nikon SE	Nikon (Düsseldorf)

## 2.2 Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien

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

Counterröhrchen*	6,0x38mm GLKL, 0,6ml, Sarstedt (Nürnberg, Nr. 55.673)
Einblock-Kassetten*	Tissue Tek III, Sakura Finetek BV (Zoeterwoude, Niederlande)
Einmal-Plastikpipetten	5ml serologische Pipette, Sarstedt (Nürnberg, Nr. 86.1259.001)
	10ml serologische Pipette, Sarstedt (Nürnberg, Nr. 86.1254.001)
	25ml serologische Pipette, Sarstedt (Nürnberg, Nr. 86.1685.001)
Einmal-Pipettenspitzen	für 1ml-Pipette Greiner (Frickenhausen)
	für 200µl-Pipette Greiner (Frickenhausen)
	für 10µl-Pipette Greiner (Frickenhausen)

---

Einmal-Spritzen	1ml Braun (Melsungen, Nr. 916 140/6) 2ml Braun (Melsungen, Nr. 4606027V)
	5ml Henke-Sass, Wolf GmbH (Tuttlingen, Nr. 4050.000DO)
	10ml Braun (Melsungen, Nr. 04606108)
	50ml Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 308500)
FACS-Röhrchen*	12x75mm <i>round bottom RIA tube</i> , Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 2008)
Einfrierröhrchen	2ml <i>Cryo`s</i> , Greiner (Frickenhausen, Nr. 126263)
Kanülen	0,40x20mm, Braun (Melsungen) 0,45x12mm, Braun (Melsungen)
MACS Zubehör*	<i>autoMACS Columns</i> , Miltenyi Biotech GmbH (Bergisch Gladbach, Nr. 130-021-101)
Reaktionsgefäße*	0,05ml PCR Tube, Greiner (Nürtingen, Nr. 6722019)
	0,5ml, Eppendorf (Hamburg, Nr. 35325)
	1,5ml, Eppendorf (Hamburg, Nr. 0030 102.002)
	2ml, Eppendorf (Hamburg, Nr. 0030 120.086)
Skalpell	Braun, Aesculap AG & Co KG (Tuttlingen, Nr. 5518075)
Sterilfilter	Spritzenvorsatzfilter 0,45µm VWR (Darmstadt, Nr. 28145-481)
	Spritzenvorsatzfilter 0,8µm Whatman GmbH (Dassel, Nr. 10462241)
	150ml Stericup Express Plus 0,22µm Millipore (Schwalbach, Nr. SCGPUO1RE)

---

6-Wellplatten Flachbodenplatten (FB), für adhärenente Zellen	500ml Stericup Express Plus 0,22µm Millipore (Schwalbach, Nr. SCGPU05RE) Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 35 3046)
24-Wellplatten FB, für adhärenente Zellen	Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 35 3047)
48-Wellplatten FB, für adhärenente Zellen	Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 35 3078)
96-Well-ELISPOTplatte	MultiScreen <sub>HTS</sub> -IP, Millipore (Schwalbach, Nr. MSIPN45, hydrophobes PVDF, unsteril, mit underdrain )
96-Wellplatten Rundboden (RB), für nicht adhärenente Zellen	Greiner (Frickenhausen, Nr. 650101)
Zellkulturflaschen für adhärenente Zellen	25cm <sup>2</sup> Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 353024)  25cm <sup>2</sup> , Greiner (Frickenhausen, Nr. 690175 und 690160)  75cm <sup>2</sup> Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 353135)  75cm <sup>2</sup> , Greiner (Frickenhausen, Nr. 658190 und 658195)
Zellkulturschalen für adhärenente Zellen	6cm Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 353004)  10cm Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 353003)  14,5cm Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 353025)
Zellkulturschalen für nicht adhärenente Zellen	10cm, Greiner (Frickenhausen, Nr. 664102)
Zentrifugenröhrchen	14ml Spitzboden Falcon (Heidelberg, Nr. 352096)  50ml Spitzboden Falcon (Heidelberg, Nr. 352070)  5ml Greiner (Nürtingen, Nr. 115261)
Zell-Nylonsieb	40µm Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 352340)  100µm Falcon, Becton Dickinson

	(Heidelberg, Nr. 352360)
Zellschaber	Sarstedt (USA, Nr. 83.1830)

### 2.3 Chemikalien und Zellkulturzusätze

Alle aufgelisteten Chemikalien und Reagenzien wurden, wenn nicht anders vermerkt, in p. a. Qualität bezogen. Zur Herstellung von Puffern und Lösungen wurde Aqua bidest. (*Aqua ad iniectabilia*, Braun Melsungen, Nr. 3703452) verwendet.

Aceton	Fluka ( Schweiz, Nr. 00570)
3-Aminopropyltriethoxysilan (APES)	Sigma (Deisenhofen, Nr. A-3648)
Ammonium-Nickelsulfat-Hexahydrat	Sigma (Taufkirchen, Nr. 09885)
Amphotericin B	Squibb (München)
5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate /nitroblue tetrazolium (BCIP/NBTplus)	MABTECH (Hamburg, Nr. 3650)
Biotin <i>Blocking System</i>	DakoCytomation (Hamburg, Nr. XO590)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Ortho-Clinical Diagnostics Inc. (Neckargemünd, Nr. 718110)
$^{51}\text{Cr}$ ( $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ )	Perkin Elmer (Zaventem, Belgien, Nr. NEZ-030)
Cryo-Block	Medim (Giessen, Nr. 10-0187)
3,3' Diaminobenzidin (DAB)	Sigma (Taufkirchen, Nr. D5637)
3,3 Dimethylformamid (DMF)	Sigma (Steinheim, Nr. D15,855-0)
n,n-Dimethylformamid (DMF)	Sigma (Steinheim, Nr. D15.855-0)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt, Nr. 1.02951.1000)
Entellan	Merck (Darmstadt, Nr. 1.07960)
Ethanol (100%)	Appli Chem (Darmstadt, Nr. A1613)
Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Roth (Karlsruhe, Nr. 8043.2)
Essigsäure (100%)	Roth (Karlsruhe, Nr. 3738.2)
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories (Pasching, Österreich, Nr. A15-151)
Formalin (37%ig)	Merck (Darmstadt)
L-Glutamin	Invitrogen (Karlsruhe, Nr. 25030-024)
Haemalaun nach Mayer	Waldeck GmbH & Co KG (Nr. 2E010)
Heparin	Ratiopharm (Ulm, 25000 I.E/5ml)

---

HEPES, 1M	Gibco (Eggenstein, Nr. 15630-056)
	Roth (Karlsruhe, Nr. 91054)
Isopropanol	Hedinger (Stuttgart)
Kaliumchlorid (KCl)	Roth (Karlsruhe, Nr. 6781.1)
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Roth (Karlsruhe, Nr. 3904.1)
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ )	Roth (Karlsruhe, Nr. 2189.1)
Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ )	Roth (Karlsruhe, Nr. 2379168)
2-Mercaptoethanol	Sigma (Deisenhofen, Nr. M7522)
Methanol	Becton Dickinson (Poole, England, Nr. 10158BG)
Methylcellulose	Prolabo (Leuven, Nr. 25499.182)
	Roth (Karlsruhe, Nr. 8421.1)
Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	Roth (Karlsruhe, Nr. 8563.1)
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Roth (Karlsruhe, Nr. 6885.1)
Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )	Roth (Karlsruhe, Nr. 2370.1)
Paraffin, 56°C	Tissue Tek (Nr. VO-S-1002)
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen (Karlsruhe, Nr. 15140-122)
<i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	Invitrogen (Karlsruhe, Nr. 14190-094)
<i>Red Blood Cell Lysing Buffer</i> (RBCLB)	Sigma (Deisenhofen, Nr. R7757)
Tris	Roth (Karlsruhe, Nr. 4855.2)
Trypanblau	Biochrom (Berlin, Nr. L6323)
Trypsin	Difco (Michigan, USA, Nr. 0152-1)
Trypsin-EDTA	Invitrogen (Karlsruhe, Nr. 15400054)
Türcks Lösung	Merck (Darmstadt, Nr. HX778468)
Tween 20	Sigma (Deisenhofen, Nr. P1379)
Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (30%)	Roth (Karlsruhe, Nr. 80701)
Xylol	Merck (Darmstadt, Nr. 1.08685.2500)

## 2.4 Peptide

Die für diese Arbeit verwendeten antigenen Peptide von mCMV wurden von der Firma JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin synthetisiert. Die Peptide wurden HPLC-gereinigt (*Counter-Ion*: Trifluoracetat) und in einer Reinheit von >80% verwendet. Sie sind in der nachfolgenden **Tab. 1** gelistet (Holtappels *et al.*, 2006b, Reddehase *et al.*, 2002)

**Tab. 1: Antigene Peptide (H-2<sup>d</sup>) von mCMV**

ORF	Phase	Peptidsequenz	MHC I Restriktion	Immunogenität
m04	E	<sup>243</sup> YGPSLYRRF <sup>251</sup>	D <sup>d</sup>	subdominant
m18	E	<sup>346</sup> SGPSRGRII <sup>354</sup>	D <sup>d</sup>	subdominant
M45	E	<sup>507</sup> VGPALGRGL <sup>515</sup>	D <sup>d</sup>	subdominant
M83	E/L	<sup>761</sup> YPSKEPFNF <sup>769</sup>	L <sup>d</sup>	subdominant
M84	E	<sup>297</sup> AYAGLFTPL <sup>305</sup>	K <sup>d</sup>	subdominant
M105	E	<sup>207</sup> TYWPVVSDI <sup>215</sup>	K <sup>d</sup>	dominant
m123	IE	<sup>168</sup> YPHFMPNTL <sup>176</sup>	L <sup>d</sup>	dominant
m145	E	<sup>451</sup> CYYASRTKL <sup>459</sup>	K <sup>d</sup>	dominant
m164	E	<sup>167</sup> AGPPRYSRI <sup>175</sup>	D <sup>d</sup>	dominant

IE = *immediate early*; E = *early*; L = *late*

ORF = *Open Reading Frame*

## 2.5 Antikörper (AK) und MicroBeads

**Tab. 2: AK für den ELISPOT-Assay**

Bezeichnung	Isotyp	Quelle und Produktnummer	Klon	Eingesetzte Menge
Primär-AK anti-Maus IFN- $\gamma$	Ratte anti-Maus IgG1	Biosource Europe (Solingen, Nr. AMC4834)	RMMG-1	5 $\mu$ g/ml
Sekundär-AK anti-Maus IFN- $\gamma$ (Biotin gekoppelt)	Ratte anti-Maus IgG1	Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 18112D)	XMG1.2	1 $\mu$ g/ml

**Tab. 3: MicroBeads für die MACS-Separation**

Bezeichnung	Isotyp	Quelle und Produktnummer	Eingesetzte Menge
CD8a (Ly-2) MicroBeads	Ratte anti-Maus IgG2a	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Nr.130-049-401)	10 $\mu$ l/10 <sup>7</sup> Zellen

Tab. 4: AK für die zytofluorometrische Analyse

Bezeichnung	Isotyp	Quelle und Produktnummer	Klon	Eingesetzte Menge
TCR $\beta$ PE	Hamster anti-Maus IgG2	Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 553172)	H57-597	1 $\mu$ l/100 $\mu$ l für 1x10 <sup>6</sup> Zellen
CD4 PE CY5	Ratte anti-Maus IgG2ak	Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 553050)	RM4-5	1 $\mu$ l/100 $\mu$ l für 1x10 <sup>6</sup> Zellen
CD8a FITC	Ratte anti-Maus IgG2ak	Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 553031)	53-6.7	1 $\mu$ l/100 $\mu$ l für 1x10 <sup>6</sup> Zellen
CD8a PE Cy5	Ratte anti-Maus IgG2ak	Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 553034)	53-6.7	1 $\mu$ l/100 $\mu$ l für 1x10 <sup>6</sup> Zellen
CD3 PE	Ratte anti-Maus IgG2bk	Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 555275)	17A2	1 $\mu$ l/100 $\mu$ l für 1x10 <sup>6</sup> Zellen
CD19 PE	Ratte anti-Maus IgG2ak	Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 557399)	1D3	1 $\mu$ l/100 $\mu$ l für 1x10 <sup>6</sup> Zellen
CD45R/B220 PerCP	Ratte anti-Maus IgG2ak	Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 553093)	RA3-6B2	1 $\mu$ l/100 $\mu$ l für 1x10 <sup>6</sup> Zellen
CD49b/Pan-NK FITC	Ratte anti-Maus IgMk	Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 553857)	DX5	1 $\mu$ l/100 $\mu$ l für 1x10 <sup>6</sup> Zellen
NKG2D APC	Ratte anti-Maus IgG1ak	Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 17-5882-82)	CX5	1 $\mu$ l/100 $\mu$ l für 1x10 <sup>6</sup> Zellen
$\alpha$ -H-2L <sup>d</sup> PE	Ratte anti-Maus IgG2ak	Cedarlane Laboratories Ltd. (Hornby, Ontario, Canada, Nr. CL9011PE)	NLDC-145	20 $\mu$ l/100 $\mu$ l für 1x10 <sup>6</sup> Zellen
IFN- $\gamma$ FITC	Ratte anti-Maus IgG1ak	Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 554411)	XMG1.2	1 $\mu$ l/100 $\mu$ l für 1x10 <sup>6</sup> Zellen
CD16/CD32 Fc Block <sup>TM</sup>	Ratte anti-Maus IgG2bk	Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 553142)	2.4G2	1 $\mu$ l/100 $\mu$ l für 1x10 <sup>6</sup> Zellen

**Tab. 5: AK und Seren für die Immunhistologie**

Bezeichnung	Isotyp	Quelle und Produktnummer	Klon
anti-mCMV-IE1(pp76/89)	Maus IgG1	Prof. Jonjic, Rijeka (Kroatien)	Croma101
CD3	Ratte IgG1	Novocastra (Newcastle, Nr. NCL-CD3-12)	CD3-12
CD8a	Ratte IgG2ak	Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 550281)	53-6.7
CD4	Ratte IgG2ak	Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 550278)	H129.19
Ratte (Biotin gekoppelt)	Ziege Ig	Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 559286)	polyklonal
Ziegenserum	Ziege Ig	Lifetechnologis (Nr. 16210064)	polyklonal
anti-Maus-IgG (Brücken-AK für APAAP)	Ziege Ig	Sigma (Taufkirchen, Nr. M 5899)	polyklonal
APAAP-Maus- Komplex	Maus IgG1	Sigma (Deisenhofen, Nr. A 7827)	AP1B9
F4/80	Ratte anti- Maus IgG2ak	Serotec (Düsseldorf, Nr. MCA497G)	C1:A3-1

## 2.6 Medien für die Zellkultur

Die Medien wurden steril von der Firma Gibco (Karlsruhe) bezogen, bei 4°C gelagert und mit den jeweils gelisteten Zusätzen supplementiert.

### RPMI 1640 (Rosewell Park Memorial Institute) + GlutaMAX™ (Nr.61870-010)

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

<b>DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium) + GlutaMAX™</b>		(Nr. 61965-026)
Penicillin	100U/ml	
Streptomycin	0,1mg/ml	
FCS	10% (v/v)	

<b>IMEM (Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium) + GlutaMAX™</b>		(Nr. 31980-022)
Penicillin	100U/ml	
Streptomycin	0,1mg/ml	
FCS	10% (v/v)	

<b>MEM (Minimum Essential Medium) + GlutaMAX™</b>		(Nr. 41090-028)
Penicillin	100U/ml	
Streptomycin	0,1mg/ml	
FCS	5-10% (v/v)	
Amphotericin B	1,4µg/ml	
(Zugesetzt bei Lagerung von Organen)		

<b>MEM alpha + GlutaMAX™</b>		(Nr. 32561-029)
Penicillin	100U/ml	
Streptomycin	0,1mg/ml	
2-Mercaptoethanol	5x10 <sup>-5</sup> M	
HEPES	10mM	
FCS	7,5% (v/v)	

### **Methylzellulose-Medium**

Für ~ 400ml Methylzellulose-Medium:

Methylzellulose	8,8g
Aqua bidest	360ml
Magnetührstäbchen	

Nach dem Ansetzen wurde die Suspension autoklaviert. Danach wurde sie bis zum vollständigen Lösen der Methylzellulose gerührt und bei 4°C aufbewahrt. Direkt vor Gebrauch wurden folgende Zusätze zugegeben:

---

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

Einstellen auf pH 7,5; das Medium sollte dann lachsrot sein.

## 2.7 Zelllinien

### P815

Es handelt sich um eine Maus-Mastozytom-Zelllinie (Mausstamm DBA/2), die in Suspension gehalten wird. Sie wurde als antigenpräsentierende Zelle (APC) für antigene Peptide des Haplotyps H-2<sup>d</sup> im Zytolysetest und im ELISPOT-Assay eingesetzt. Die durch P815 im Zytolysetest erfasste Lyse ist Perforin-vermittelt.

Haplotyp:	H-2 <sup>d</sup> , MHC-Klasse-II negativ
Kulturmedium:	RPMI + 5% FCS (v/v)
Passagierung:	1:5 Titration mit 0,5ml resuspendierten Zellen in 2ml frischem Kulturmedium in 24-Wellplatte FB, 1x pro Woche

### SV40-transformierte BALB/cJ-Fibroblasten (BALB/SV40)

Diese Zellen wurden mit den Plasmiden der mCMV ORF *Library*-Analyse transfiziert (siehe 3.2.4) und dienen der Aktivierung mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von D. Johnson, Oregon Health & Science University, OR, USA zur Verfügung gestellt.

Kulturmedium:	DMEM + 10% FCS (v/v)
Passagierung:	1:40 Verdünnung in Petrischalen (PS)/Ø10cm für adhärenente Zellen, 2x pro Woche

## 2.8 Virus und Virusmutanten

Zur Infektion von Versuchstieren und Zellen wurden folgende Viren verwendet.

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

Von diesem Virusstamm ausgehend wurde das gesamte mCMV Genom sequenziert (Rawlinson *et al.*, 1996).

### **mCMV-WT.BAC (MW97.01)**

Das mittels BAC (*bacterial artificial chromosome*)-Technologie hergestellte Virus mCMV MW97.01 (Messerle *et al.*, 1997, Wagner *et al.*, 1999) entspricht in seinen biologischen Infektionsparametern dem Stamm mCMV-WT.Smith. Es wurde daher in Versuchen, in denen mCMV-Mutanten untersucht wurden, als mCMV-WT eingesetzt. mCMV-WT.BAC wurde unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von U. H. Koszinowski, Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Mikrobiologie, München, zur Verfügung gestellt.

### **mCMV-ΔvRAP (mCMV-Δm04+m06+m152)**

In der Gendelektionsmutante mCMV-ΔvRAP sind die drei viralen Regulatoren der Antigen-Präsentation (vRAP) m04, m06 und m152 deletiert. Diese Mutante wurde von Markus Wagner hergestellt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Wagner *et al.*, 2002).

## 2.9 Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der klinisch-theoretischen Institute der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter SPF (*specified pathogen free*)-Bedingungen gezüchtet. Es wurden männliche und weibliche Mäuse der folgenden Inzuchtstämme verwendet:

**BALB/cJ** Haplotyp H-2<sup>d</sup> MHC-Klasse I Moleküle: (K<sup>d</sup>, D<sup>d</sup>, L<sup>d</sup>)

**BALB/c-H-2<sup>dm2</sup>** Haplotyp H-2<sup>d</sup> MHC-Klasse I Moleküle: (K<sup>d</sup>, D<sup>d</sup>, -)  
Es handelt sich um eine natürliche MHC-Klasse I L<sup>d</sup>  
Deletionsmutante (Rubocki *et al.*, 1986)

Die Genehmigungsnummer der Bezirksregierung Rheinhessen-Pfalz für alle tierexperimentellen Arbeiten war 177-07-04/051-61.

## 3. Methoden

### 3.1 Zellbiologische Methoden

Die Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt, um Kontaminationen durch Pilze und Bakterien zu verhindern. Die verwendeten Plastikwaren wurden steril bezogen und die Glaswaren wurden vor Gebrauch sterilisiert.

Die Zellen wurden in CO<sub>2</sub>-Inkubatoren (37°C/5%CO<sub>2</sub>) in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre kultiviert. In dieser Atmosphäre werden die auf physiologische Werte eingestellten pH-Werte der CO<sub>2</sub>/Bicarbonat-gepufferten Medien aufrechterhalten.

#### 3.1.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

##### Material:

- Einfriermedium: 90% FCS (v/v)  
10% DMSO (v/v)
- Einfrierröhrchen

##### Durchführung:

##### Einfrieren

Das dem Einfriermedium zugesetzte Dimethylsulfoxid (DMSO) verhindert durch seine hygroskopischen Eigenschaften die Bildung von Eiskristallen, die die Zellen beim Einfrieren schädigen könnten.

Die pelletierten Zellen wurden in gewünschter Zellzahl ( $1-5 \times 10^6$ /ml) in kaltem Einfriermedium aufgenommen und in Aliquots von je 1ml auf sterile Einfrierröhrchen auf Eis verteilt. Die Röhrchen wurden mit Papier umschlagenden Plastikboxen bei -70°C eingefroren und nach 24h zur Lagerung bei -196°C in die Dampfphase von flüssigen N<sub>2</sub> überführt.

##### Auftauen

Zur Rekultivierung wurden die eingefrorenen Zellen im Wasserbad (37°C) aufgetaut und sofort in einem möglichst großen Volumen Kulturmedium aufgenommen, um das DMSO des Einfriermediums zu verdünnen. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugieren (4 min bei 423xg) pelletiert, erneut in Kulturmedium aufgenommen und schließlich in Zellkulturplatten oder -Flaschen ausgesät.

### 3.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Der Vitalfarbstoff Trypanblau dient der Unterscheidung von toten und lebenden Zellen. Der Farbstoff wird von toten Zellen sofort aufgenommen und führt dadurch zu einer Blaufärbung des Zytoplasmas. Die Zellmembran lebender Zellen bleibt für den Farbstoff 5-10min impermeabel. Es werden die ungefärbten Zellen gezählt.

Zur Differenzierung von kernhaltigen Leukozyten und kernlosen Erythrozyten wurde Türks-Lösung verwendet. Sie färbt die Zellkerne der Leukozyten blau an. Eine Unterscheidung zwischen toten und lebendigen Zellen ist damit allerdings nicht möglich.

#### Material:

- Trypanblau-Lösung
- Türks-Lösung
- Neubauerzählkammer *improved*

#### Durchführung:

Zur Ermittlung der Zellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension in einem definierten Verhältnis mit Trypanblau oder Türks-Lösung gemischt und in eine Neubauerzählkammer (Kammertiefe: 0,1mm) überführt. Anschließend wurden 25 Kleinquadrate (das entspricht einem Großquadrat) ausgezählt und die Zellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

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

N = Zahl der gezählten Zellen

n = Zahl der ausgezählten Großquadrate

V = Verdünnungsfaktor

$10^4$  = Kammerfaktor

### 3.1.3 Anlage von Murinen Embrionalen Fibroblasten (MEF)

#### Material:

- Maus (BALB/cJ oder BALB/c-H-2<sup>dm2</sup>), ca. 17.Tag der Gravidität
- sterilen Erlenmeyerkolben mit Glasperlen und Magnetrührstäbchen
- steriles Metallsieb
- 100µm *Cell Strainer*
- zwei sterile PS/Ø10cm
- sterile PS/Ø14,5cm
- steriles 50ml Röhrchen
- Einfrierröhrchen
- Kulturmedium: MEM + 10% FCS (v/v)
- Einfriermedium: 90% FCS + 10% DMSO (v/v)
- Trypsin-EDTA-Lösung (v/v) (1:10 mit PBS verdünnt)
- Methylzellulose (siehe 2.6)

#### Durchführung:

##### 1. Tag

---

Einer Maus wurden am Tag 17 der Gravidität die Embryonen steril entnommen und sofort in eine PS/Ø10cm auf Eis gestellt. Die Embryonen wurden von Plazenta, Gehirn, Augenanlagen und Innereien befreit. Anschließend wurden die Embryonen zuerst mit einer gebogenen Schere und danach mit zwei parallel gehaltenen Skalpellern zerkleinert, bis eine homogene Zellmasse entstanden ist. Diese Zellmasse wurde in 15ml PBS suspendiert und mit 15ml Trypsin-EDTA-Lösung in einen Erlenmeyerkolben mit Glasperlen und Magnetrührstäbchen überführt. Die Zellsuspension wurde langsam gerührt (30min/37°C). Danach wurde noch 2x im Abstand von je 30min 15ml PBS + 15ml Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben und unter Rühren inkubiert (30min/37°C). Im Anschluss wurde die Zellsuspension über ein steriles Metallsieb gegeben, mit Medium nachgespült und das Filtrat 10min bei 311xg abzentrifugiert. Die Zellen wurden 1x mit Medium gewaschen, das Pellet in 10ml Medium aufgenommen und zur Entfernung von Gewebeteilen über ein 100µm *Cell Strainer* gegeben. Nach Bestimmung der Zellzahl (3.1.2) wurden die Zellen in einer Dichte von  $2-3 \times 10^7$ /25ml Medium pro PS/Ø14,5cm ausgesät (1. Passage).

##### 2. Tag

---

Um nicht adhärente Zellen und Erythrozyten zu entfernen, wurden die Zellkulturen 3x mit PBS gespült. Anschließend wurde 25ml frisches Medium zugegeben.

3.Tag/4.Tag:

Sobald sich ein konfluenter Zellrasen gebildet hatte, wurden die MEF eingefroren oder weiter passagiert. Hierzu wurden die Zellen zunächst abgelöst: Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen wurden mit 10ml PBS pro PS gespült. Anschließend wurde 3ml Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben. Die PS wurde vorsichtig geklopft bis sich die Zellen vom Boden gelöst hatten. Dann wurden die Zellen in ein 50ml Röhrchen überführt und 10min bei 311xg abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen durch Splitten (1:3 oder 1:4) in die 2. Passage überführt oder eingefroren. Um die Zellen einzufrieren, wurde der Überstand verworfen, das Pellet in vorgekühltem Einfriermedium aufgenommen und je 1ml in ebenfalls vorgekühlte Einfrieröhrchen gegeben (3-4 Aliquots pro PS). Danach wurden die Aliquots bei -196°C eingefroren (siehe 3.1.1).

### 3.1.3.1 Vorbehandlung von MEF mit IFN- $\gamma$

Wenn die Fragestellung es erforderte, mussten die MEF im ELISPOT-Assay 48 Stunden bevor sie eingesetzt wurden mit IFN- $\gamma$  vorbehandelt werden.

Rechnung:

Stock IFN- $\gamma$ :     100 $\mu$ g/1000 $\mu$ l  
                      20ng/ml IFN- $\gamma$   
                      2 $\mu$ l/ PS/Ø10cm

Endkonzentration:

Pro PS/Ø10cm: 2 $\mu$ l IFN- $\gamma$  in 10ml MEM + 10% FCS (v/v).

### 3.1.4 Gewinnung von Lymphozyten aus Organen

Die aus verschiedenen Organen isolierten Lymphozyten wurden für folgende Tests eingesetzt:

- zytofluorometrische Charakterisierung der lymphozytären Subpopulationen
- Testen der Effektorfunktionen von CD8 T-Zellen (mit und ohne Anreicherung mittels autoMACS)

#### 3.1.4.1 Lunge

##### Material:

- Lungen (BALB/cJ und BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Mäuse)
- 50ml Spritze mit Infusionsschlauch und 0,9x40mm Kanüle
- Steriles Metallsieb
- Erlenmeyerkolben
- 100µm Cell Strainer
- 2ml Spritze
- Pasteurpipette
  
- Medium: DMEM + 10% FCS (v/v)  
RPMI + 5% FCS (v/v)  
LSM 1077 *Lymphocyte Separation* Medium (Ficoll), PAA Laboratories GmbH (Österreich)
  
- Enzyme: DNase (Stock: 3mg/ml; Endkonzentration: 0,05mg/ml),  
Sigma (Deisenhofen, Nr. 32H5545)  
  
Kollagenase Typ II (Stock:10mg/ml; Endkonzentration:0,7mg/ml)
  
- Puffer und Lösungen:  
PBS/Heparin-Lösung zur Lungenspülung: (v/v)  
Heparin (25000IE/5ml) 500µl  
PBS ad 500ml  
Lagerung 4°C

**Durchführung:**

Die Mäuse wurden zuerst mit CO<sub>2</sub> narkotisiert und anschließend wurden Bauchraum und Halsbereich freigelegt. *Vena* und *Arteria subclavia*, *Aorta abdominalis* und *Vena cava inferior* wurden inzisiert. Das Herz wurde punktiert und der kleine Lungenkreislauf mit PBS/Heparin-Lösung (25°C) gespült. Es wurde solange gespült, bis sich eine Volumenzunahme und eine deutliche Weißfärbung der Lunge zeigten. Die Lungen wurden entnommen und mit zwei feinen Pinzetten zerkleinert. Hilare Lymphknoten, Trachea und Bronchien wurden entfernt. Als nächstes wurden die Lungen mit einer kleinen Schere zu einer homogenen Masse zerkleinert. Das Homogenat wurde mit zwei Magnetrührstäbchen und 15ml Medium (DMEM) in einen Erlenmeyerkolben überführt (3-5 Lungen/Kolben). Zum Verdau des Bindegewebes wurden 300µl DNase und 1ml Kollagenase zugesetzt und 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension über ein Metallsieb gegeben und mit dem Stempel einer 2ml Spritze zerrieben. Das Sieb wurde mehrmals gespült, die Zellsuspension in ein 50ml Röhrchen aufgenommen und abzentrifugiert (7min bei 552xg). Der Überstand wurde in ein separates 50 ml Röhrchen überführt. Auf das Pellet wurde ein dem Überstand entsprechendes Volumen Medium (DMEM) gegeben und das Pellet darin resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation beider Röhrchen (7min bei 552xg) wurden beide Pellets mit 16ml Medium (RPMI) vereint und über einen 100µl *Cell Strainer* filtriert. Jeweils 4ml LSM wurde in ein 15ml Röhrchen vorgelegt und langsam mit jeweils 8ml Zellsuspension überschichtet. Die Suspension wurde ohne Bremse zentrifugiert (30min bei 779xg). Mit Hilfe dieser Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation wurden die mononukleären Zellen als Bande angereichert, während sich Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen im Sediment absetzten. Als letztes wurde die Lymphozytenbande zwischen LSM und Medium mit einer Pasteurpipette abgezogen und mit 20ml Medium (RPMI) gewaschen (4min bei 423xg). Das Pellet wurde in 3-4ml Medium (RPMI) aufgenommen und über einen 100µl *Cell Strainer* filtriert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt (siehe 3.1.2).

---

Erwartete Zellzahlen: unbehandelt	0,5 -1x10 <sup>6</sup> /Maus
nach KMT und mCMV-Infektion	1-7x10 <sup>6</sup> /Maus

---

### 3.1.4.2 Leber

#### Material:

- Leber (n)
- 100ml Erlenmeyerkolben
- sterile Metallzellsiebe
- 10cm Petrischalen
- 50ml Röhrchen
- 15ml Röhrchen
- 100µm und 40µm *Cell Strainer*
- 1ml Spritze
- Enzyme: Kollagenase A, (Stock: 25mg/ml)  
Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Nr. 10103586/001)
- DNase, (Stock: 3mg/ml),  
Sigma (Deisenhofen, Nr. 32H5545)

- Puffer und Lösungen:  
Optiprep 60% (w/v)  
PROGEN (Biotechnik GmbH, Nr. 1114542)  
bei 25°C im Dunkeln lagern

#### GBSS (w/v)

4M	NaCl	85,75ml
1M	KCl	12,5ml
1M	CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	4ml
1M	MgCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O	2,25ml
1M	MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	0,75ml
1M	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5ml
0,25M	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	17ml
0,5M	NaHCO <sub>3</sub>	13,5ml
	D(+)-Glukose	2,475g
	HEPES	29,75g
	Aqua bidest.	ad 2,5l
	einstellen auf pH 7,4; 0,2µm filtrieren; bei 4°C lagern.	

**Durchführung:**

Erwärmen	des GBSS auf 25°C
Leberentnahme	nach CO <sub>2</sub> -Begasung
Leberlagerung	mit 4ml GBSS pro Leber bei 25°C in 50ml Röhrchen

## Dissoziation des Lebergewebes

Entfernen	des Bindegewebes und der Gallenblase
Ausstreichen	der Leber(n) in PS/Ø10cm mit Hilfe einer kleiner gebogener Schere und einer gebogener Pinzette
Aufnehmen	der Leber(n) in 30ml GBSS + 0,05% Kollagenase + DNase (600µl/Erlenmeyerkolben/max. drei Lebern) in Erlenmeyerkolben (damit auch PS spülen)
Inkubieren	30 min bei 37° C auf Magnetrührer
Pürieren	der Leber(n) über PS durch steriles Zellsieb mit Spritzenstempel
Auffüllen	mit GBSS auf 50ml --- Waschschrift 1
Zentrifugieren	10min bei 552xg

## Filtration des Gewebes

Abziehen	des Überstandes mit Pipette und werfen
Lyse	3ml/Leber/1,5min (RBCLB) unter leichten Schwenken
Auffüllen	mit GBSS auf 50ml --- Waschschrift 2
Zentrifugieren	10min bei 552xg
Abziehen	des Überstandes und werfen
Resuspendieren	des Pellets und danach die Zellsuspension über 100 µm <i>Cell strainer</i> geben
Auffüllen	mit GBSS auf 50ml --- Waschschrift 3
Zentrifugieren	10min bei 552xg
Abziehen	des Überstandes mit Pipette und werfen

## Lymphozytengewinnung per Optiprep Dichtegradient

## Bei Einzelaufreinigungen der Lebern:

Aufnehmen	des Pellets in 3ml GBSS/Leber (15ml Röhrchen)
Zugeben	von 4ml 30% (w/v) Optiprep (Optiprep Stocklösung 1:1 mit GBSS verdünnen)
Durchmischen	mit Pipette

Überschichten des Zell/Optiprepgemisches mit 2ml GBSS (Da sich die Zellen an der Oberfläche des Optiprepdichtegradienten befinden, müssen diese vor Austrocknung durch Überschichtung mit GBSS geschützt werden. Um ein Aufwirbeln der Zellen zu vermeiden, muss langsam überschichtet werden.)

Zentrifugieren 15min bei 552xg ohne Bremse

---

Bei Mehrfachaufreinigungen der Lebern: (Max. 3 Leber pro 50ml Röhrchen)

---

Aufnehmen des Pellets in 10ml GBSS

Zugabe von 4ml Optiprep (Endlösung ist 17% (w/v) konzentriert)

Durchmischen mit Pipette

Aufteilen auf zwei 15ml Röhrchen (jeweils 7ml)

Überschichten des Zell/Optiprepgemisches mit 2ml GBSS

Zentrifugieren 15min bei 552xg ohne Bremse

---

Interphase abnehmen

---

Abziehen der Interphase mit Pasteurpipette (Volumen: 2-4ml)

Filtration der Zellsuspension über 40µm *Cell Strainer*

Zellzahl bestimmen (siehe 3.1.2)

---

Erwartete Zellzahl: nach KMT und mCMV-Infektion:  $4-9 \times 10^7$ /Leber

---

### 3.1.4.3 Milz

#### Material:

- Milzen (BALB/cJ und BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Mäuse)
- Steriles Metallsieb
- 2ml Spritze
- 100µl *Cell Strainer*
- 50ml Röhrchen
- RBCLB
- Medium: RPMI + 5% FCS (v/v)

**Durchführung:**

Die Milzen wurden steril entnommen und in ein mit 4ml Medium befülltes 50ml Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Milzen mit dem Stempel einer 2 ml Spritze auf einem Metallsieb zerrieben, das auf eine geöffnete PS/Ø5cm gelegt wurde. Das Sieb wurde mit Medium gespült. Die in der PS abgefangene Zellsuspension wurde in ein 50ml Röhrchen überführt und zentrifugiert (5min bei 552xg). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zur Lyse der Erythrocyten in Lysepuffer resuspendiert (pro Milz 2ml RBCLB). Die Milzzellen wurden unter kontinuierlichem Schwenken 1min/25°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3x mit Medium gewaschen, so dass der Überstand klar wurde. Das Zellpellet wurde in einem definierten Volumen resuspendiert, die Zellsuspension über einem 100µl *Cell Strainer* filtriert und die Zellzahl bestimmt (siehe 3.1.2).

Erwartete Zellzahlen: unbehandelt	5-7x10 <sup>7</sup> /Milz
mCMV-infiziert	1x10 <sup>8</sup> /Milz

**3.2 Immunologische Methoden****3.2.1 Enzyme-linked Immunospot Assay (ELISPOT-Assay)**

Der IFN-γ ELISPOT-Assay ist eine Methode um IFN-γ produzierende Zellen auf Einzelzellebene nachzuweisen (Huang *et al.*, 1995).

Die Membran einer Mikrotiterplatte wird mit dem Primär-AK (anti-Maus IFN-γ) beschichtet. Auf der Mikrotiterplatte werden antigenpräsentierende Zellen (APC) und Effektoren inkubiert. Das von den Effektoren produzierte IFN-γ bindet direkt an den Primär-AK. Mit Hilfe des Sekundär-AK (anti-Maus IFN-γ biotinyliert), dem Enzym Streptavidin-Alkalin-Phosphatase und dem Substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium (BCIP/NBTplus) können die Spots visualisiert werden. Ein Spot entspricht einer aktivierten Effektorzelle.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivierung von CD8 T-Zellen durch mCMV-spezifische Epitope untersucht. Durch die exogene Beladung von Stimulatorzellen mit synthetischem Peptid konnte die mCMV-peptid-spezifische CD8 T-Zellantwort ex vivo isolierter Leber-, Milz- und Lungenzellen gezeigt werden.

**Material:**

- ELISPOT-Platte: Millipore MultiScreen<sub>HTS</sub>-IP
- Medium: MEM $\alpha$  + 7,5% FCS (v/v)
- Waschpuffer: PBS + 0,01% Tween20 (v/v)
- Ethanol 35% (absoluter Alkohol/Aqua dest. (v/v))
- Enzym: Streptavidin-Alkalin-Phosphatase,  
MABTECH (Hamburg, Nr. 3310-10)
- Substrat: BCIP/NBTplus
- AK: Primär-AK (500 $\mu$ g/100 $\mu$ l in PBS) und Sekundär-AK (0,5mg/ml)

**Durchführung:**

## Tag 1

---

Anfeuchten	der Membran mit je 15 $\mu$ l/Well 35% Ethanol; genau 1min
Waschen	3x mit 200 $\mu$ l/Well PBS
Pipettieren	55 $\mu$ l/Well Primär-AK: 5 $\mu$ g/ml in PBS
Inkubation	4°C über Nacht

## Tag 2

---

Ausklopfen	der Platte
Waschen	2x mit 200 $\mu$ l/Well Aqua dest.
Blocken	der Membran mit 200 $\mu$ l/Well Medium
Inkubation	2h/37°C
Ausklopfen	der Platte
Pipettieren	von APC und Effektoren

APC

P815: Am Versuchstag wurden die P815 gewaschen (4min bei 423xg), die Zellzahl bestimmt (siehe 3.1.2) und auf eine Konzentration von  $1 \times 10^5$ /50 $\mu$ l/Well eingestellt. Anschließend wurden die P815 mit einer Peptid-Konzentration von  $10^{-7}$ M exogen beladen. Dazu wurden 10 $\mu$ l/Well  $10^{-6}$ M des zu testenden Peptides in eine 96-Wellplatte RB pipettiert. Diese Peptidplatte kann bei -70°C gelagert werden. Je 90 $\mu$ l der eingestellten P815 ( $1 \times 10^5$ /50 $\mu$ l) wurde pro Well auspipettiert und 1h bei 25°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 50 $\mu$ l/Well in die ELISPOTplatte überführt.

Sollte die Avidität von Effektoren bestimmt werden, wurde die Peptid-Konzentration in  $\log_{10}$ -Schritten im Bereich von  $10^{-6}$ M bis  $10^{-12}$ M titriert und die Verdünnungsreihe zur Beladung der APC verwendet.

MEF: MEF wurden in der 3. Passage verwendet. Sie wurden so auf PS/Ø10cm gesplittet, dass diese am Versuchstag konfluent waren. Sie wurden durch trypsinieren abgelöst und analog wie die P815 exogen mit Peptid beladen.

### Effektoren

Als Effektoren wurden aus Lunge, Leber oder Milz mittels MACS-Separation (siehe 3.2.3) isolierte CD8 T-Zellen eingesetzt. Sie wurden in unterschiedlichen Konzentrationen und als Triplikate auf die ELISPOTplatte in je 100µl/Well ausgesät.

Inkubation 16-18h/37°C

### Tag 3:

---

Ausklopfen	der Platte
Waschen	10x mit PBS + 0,01% (v/v) Tween20 (50µl Tween20/500ml PBS)
Ansetzen	des Sekundär-AK (0,5mg/ml): immer frisch 1µg AK/ml in PBS + 0,5% BSA (136µl 22,1% BSA/6ml PBS/Platte) benötigt: 55µl/Well, d.h. pro Platte 6µg/6ml, d.h. 12µl Sekundär-AK/6ml PBS + BSA
Pipettieren	55µl/Well des Sekundär-AK
Inkubation	2h/37°C
Ansetzen	der Streptavidin-Alkalin-Phosphatase: immer frisch 1:1000 verdünnen à pro Platte: 10µl Streptavidin-Alkalin-Phosphatase/10ml steriles PBS
Waschen	6x mit PBS + 0,01% (v/v) Tween 20
Pipettieren	100µl/Well Streptavidin-Alkalin-Phosphatase
Inkubation	45min/25°C (Anmerkung: max. 1h, sonst entwickelt sich ein hoher Hintergrund)
Waschen	3x mit PBS + 0,01% (v/v) Tween 20, dann 3x mit PBS
Pipettieren	100µl/Well BCIP/NBTplus, vorher 0,45µl filtrieren
Inkubation	20-40min, bis Spots sichtbar werden
Waschen	der Membran von oben und unten mit Wasser; zwischenzeitlich <i>underdrain</i> abnehmen, weiter waschen.
Trocknen	der Platte mit Zellulose und dann über Nacht im Dunklen

Auswertung am nächsten Tag bei 10facher Vergrößerung im Mikroskop Spots auszählen

### **Frequenzauswertung des ELISPOT-Assays**

Mit Hilfe einer Regressionsanalyse erfolgte die Frequenzauswertung der IFN- $\gamma$  sezernierenden Zellen. Dabei wird die Zahl der Effektorzellen auf der X-Achse und zugehörige Spotfrequenz auf der Y-Achse abgetragen. Die zugehörige Regressionsgerade kann über eine einfache Geradengleichung  $y=ax$  beschrieben werden. Anhand dieser Gleichung kann die *most probable number* (MPN) der Spotfrequenz bestimmt werden. Die Ermittlung der Geradengleichung erfolgte mit Hilfe der Software Mathematica 6, „Linear-Regression“ (Wolfram Research Inc., Champaign, IL). Zusätzlich wurde das 95% Konfidenzintervall und der zugehörige p-Wert errechnet.

### **3.2.2 Zytofluorometrische Analyse**

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Charakterisierung und Quantifizierung einzelner Zellen.

Die Zellen werden mit AK inkubiert, die gegen definierte zelluläre Strukturen gerichtet sind und an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt sind. Die auf diese Weise markierten Zellen werden stark verdünnt und in ein Durchflusszytometer überführt. Anschließend wandern sie vereinzelt an einem Laser vorbei. Dieser regt den fluoreszierenden Farbstoff an, der daraufhin Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert. Diese Fluoreszenz wird von einem Linsensystem mit speziellen Filtern auf Photomultiplier gelenkt, die die Fluoreszenz detektieren, verstärken und in ein elektronisches Signal umwandeln. Dieses wird dann am Computer aufgezeichnet und graphisch dargestellt.

Unabhängig von der Detektion über fluoreszenzmarkierte AK mittels Durchflusszytometrie kann eine Aussage über Größe und Granulierung der Zellen gemacht werden. Ungefärbte Zellen werden mit Hilfe ihrer Streulichteigenschaften charakterisiert. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter* (FCS)) stellt ein Maß für die Zellgröße dar und das in einem Winkel von 90° entstehende Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter* (SSC)) ein Maß für die Granularität einer Zelle.

Ein Problem bei Mehrfachfärbungen stellt die Überlappung von Wellenlängenbereichen zweier Fluorochrome dar. Dieses führt zu falsch positiven Signalen. Um dies zu vermeiden, sollten die Überlappungen durch Messung von ungefärbten und einzeln gefärbten Proben kompensiert werden.

Die für diese Arbeit verwendeten AK waren mit den folgenden Farbstoffen gekoppelt:

Fluoreszenz 1 (FI-1):

Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)

Fluoreszenz 2 (FI-2):

Phycoerythrin (PE)

Fluoreszenz 3 (FI-3):

Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP)

Phycoerythrin-Cyanin 5 (PE-Cy5)

Fluoreszenz 4 (FI-4):

Allophycocyanin (APC)

Die Durchflusszytometrie wurde angewendet, um den Anteil verschiedener Zellpopulationen in unterschiedlichen Organen zu quantifizieren. Außerdem wurde die Aktivierung von CD8 T-Zellen anhand des intrazellulär synthetisierten IFN- $\gamma$  nachgewiesen. Diese Analyse erfolgte am FACSSort oder am FC500. CD8/Ld<sup>-</sup> und CD8/Ld<sup>+</sup> T-Zellen wurden zytofluorometrisch mit Hilfe des Sort Systems FACSVantage SE sortiert und später im ELISPOT-Assay eingesetzt.

**Material:**

- Organe
- FACS-Röhrchen
- 2ml Eppendorfggefäße
- AK: siehe 2.5
- Puffer und Lösungen:

FACS-Puffer	BSA	2g
	EDTA	1,99g
	HEPES	2,383g
	NaN <sub>3</sub>	1,5mg
	PBS	ad 500ml

FACS-FLOW	Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 342003)
-----------	---

FACS-Clean	Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 340345)
------------	---

FACS-Rinse	Becton Dickinson (Heidelberg, Nr. 340346)
------------	---

**Durchführung:**

Die zytofluorometrische Analyse nach HvG-KMT und GvH-KMT erfolgte mit einem FACSSort. Die zytofluorometrische Analyse der CD8/Ld<sup>-</sup> und CD8/Ld<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte mit dem Sort Systems FACSVantage SE in der FACS *Core Facility* der Universität Mainz. Die Organe wurden, wie unter 3.3.2 beschrieben, aufgearbeitet. Anschließend wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 100 µl FACS-Puffer in einem 2ml Eppendorfgefäß aufgenommen. Die Zellen wurden mit dem CD16/CD32 Fc-Block Antikörper 15min/4°C inkubiert, um unspezifische Fc-Rezeptor Bindungen zu vermeiden. Danach wurden sie 30min/4°C im Dunkeln mit dem entsprechenden AK (siehe 2.5) inkubiert. Anschließend wurde 2x mit 500 µl FACS-Puffer gewaschen, um die nicht gebundenen AK zu entfernen. Danach wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer in FACS-Röhrchen aufgenommen und am FACSSort analysiert.

Anmerkung: Da sämtliche fluoreszierenden Farbstoffe durch Licht anregbar sind, wurden die Proben im Dunkeln gelagert.

**3.2.3 Magnetic Cell Separation (MACS)**

Die immunomagnetische Zellseparation arbeitet mit *MicroBeads*, mit deren Hilfe Subpopulationen aus Zellgemischen isoliert werden. *MicroBeads* sind 50nm große Partikel, die mit spezifischen monoklonalen AK konjugiert sind. Zudem sind sie paramagnetisch, d.h. dass sie ihre magnetischen Eigenschaften nur in der Nähe eines Magnetfeldes besitzen und so nicht verklumpen können (Miltenyi *et al.*, 1990). Die *MicroBeads* binden an den Fc-Teil des monoklonalen AK. Sie sind gut geeignet für in vivo Versuche, da sie biologisch abbaubar und sehr klein sind.

Die mit *MicroBeads* markierten Zellen werden auf eine Säule gegeben, die sich innerhalb eines starken Magnetfeldes befindet. Die markierten Zellen bleiben auf der Säule zurück, während die unmarkierten durchfließen. Durch die Inaktivierung des Magnetfeldes können die markierten Zellen aus der Säule gewaschen und in einem Röhrchen aufgefangen werden. Dieses Verfahren nennt sich Positiv-Selektion. Die Separation mittels *MicroBeads* wurde in dieser Arbeit verwendet, um CD8 T-Zellen aus Leber, Lunge und Milz zu isolieren.

**Material:**

- Organe
- autoMACS Säulen
- MicroBeads: siehe 2.5
- Puffer und Lösungen:

MACS-Puffer

Stammlösung mit BSA, 5x (w/v)	BSA	25g
	EDTA	3,72g
	PBS	ad 1l

Gebrauchslösung 1x: 1:5 Verdünnen der Stammlösung mit PBS; Einstellen auf pH 7,2

Stammlösung ohne BSA, 10x (w/v)	EDTA	7,44g
	PBS	ad 1l

Gebrauchslösung 1x: 1:10 Verdünnen der Stammlösung mit PBS; Einstellen auf pH 7,2

Ethanol 70% (v/v)	absoluter Alkohol	700ml
	Aqua bidest	ad 1l

**Durchführung:**

Die Aufarbeitung der Organe wurde mit 1x MACS-Puffer mit BSA durchgeführt.

Die Organe wurden aufgearbeitet und die Zellzahl bestimmt (siehe 3.3.2 und 3.1.2). Die Zellen wurden 5min bei 552xg abzentrifugiert, und das Pellet wurde in 80 bzw. 90µl 1x MACS-Puffer pro  $1 \times 10^7$  Zellen aufgenommen. Dann wurden 10 bzw. 20µl *MicroBeads* hinzugegeben und gut resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 15min/4°C auf einem Drehinkubator inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit dem 20fachen Volumen MACS-Puffer gewaschen (10min bei 311xg), um ungebundene *MicroBeads* zu entfernen. Das Pellet wurde in 500µl MACS-Puffer pro  $1 \times 10^8$  Zellen aufgenommen.

Zur positiven CD8 T-Zellseparation wurde das Programm "Posseld" verwendet. Es handelt sich hierbei um eine Aufreinigung über 2 Säulen. Diese Aufreinigung gewährt eine hohe Reinheit der isolierten Zellen.

Anmerkung: Bei der Separation von Lungen- oder Leberzellen wurde die Menge an *MicroBeads* verdoppelt, um die CD8 T-Zell-Ausbeute zu erhöhen.

### 3.2.4 Open Reading Frame (ORF) Library-Analyse

Mit Hilfe der von M. Munks generierten ORF-*Library* (Munks *et al.*, 2006) ist es möglich, die Antigenität jedes ORF von mCMV zu testen.

Für diese Analyse werden SV40-transformierte Fibroblasten mit Plasmiden transfiziert, die jeweils einen mCMV-ORF enthalten. Die auf den Plasmiden codierten ORFs werden in den Fibroblasten exprimiert, die entsprechenden Proteine translatiert und prozessiert. Die entstandenen Peptide werden durch Bindung an die MHC-Komplexe auf der Zelloberfläche präsentiert. Diese, als APC dienenden, transfizierten Fibroblasten werden mit Milzzellen mCMV-infizierter Mäusen inkubiert. Die für antigene Peptide des jeweiligen ORF spezifischen CD8 T-Zellen werden aktiviert und bilden IFN- $\gamma$ . Mittels zytofluorometrische Analyse wird die intrazelluläre IFN- $\gamma$  Konzentration gemessen. Durch den Nachweis einer erhöhten IFN- $\gamma$  Konzentration werden dann die aktivierten CD8 T-Zellen nachgewiesen.

Mit Hilfe der ORF *Library*-Analyse wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit das mCMV-spezifische CD8 T-Zellimmunom der beiden Mausstämme BALB/cJ und BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> in der akuten und in der memory Phase der Infektion miteinander verglichen.

#### Material:

- Milzzellen (BALB/cJ und BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Mäuse)
- BALB SV40 (B2)
- ORF-*Library*: (batch 1):
  - Plasmidpräparationen 1-182 (2 DNA-Platten),
  - Kontrolle: pEGFP N1 (3 $\mu$ g/ $\mu$ l)
  - in 96-Wellplatte FB vorgelegt: 2x0,25 $\mu$ g/DNA in 20 $\mu$ l; für 2 Transfektionsansätze à 10 $\mu$ l pro Versuch (Duplikate)
  - DNA-Endkonzentration pro Transfektionswell: 0,25 $\mu$ g DNA
- FuGENE 6 Transfection Reagent, Roche (Mannheim, Nr. 11814443001)
- Cytofix/Cytoperm™ plus kit with GolgiPlug™, Becton Dickinson (Pharmingen, Nr. 555028)
- Peptide: IE1, m164, m18, m04, M83, M84, M45, M105, m145 (je 20 $\mu$ l 10<sup>-5</sup>M) in 96-Wellplatte RB

- Medien: Foetal Bovine Serum Gold  
D-MEM  
OptiMEM $\alpha$  I + GlutaMAX™ I, Gibco (Karlsruhe, Nr. 51985-026)  
MEM $\alpha$  Medium
- AK: (siehe 2.5)

**Durchführung:**

## Tag 1 - Aussäen der APC

---

Ernte	der APC aus Kulturschale
Auszählen	der APC
Ansatz	6000 Zellen/100 $\mu$ l DMEM+10%FCS/Well in 96-Wellplatte FB
Aussäen	100 $\mu$ l/Well

## Tag 2 - Transfektion der APC

---

Ansatz	30 $\mu$ l/Well Opti-MEM/Fugene
Erwärmen	des Fugene auf 25°C (Lagerung 4-8°C)
Vortexen	des Fugene 10s
Benötigt	Fugene 3:1 (3 $\mu$ l Fugene:1 $\mu$ g DNA) Zu testende DNA Menge 25 $\mu$ g, d.h. pro Well 0,75 $\mu$ l Fugene pro 0,25 $\mu$ g DNA ansetzen.
Vortexen	des Fugene-Opti-MEM-Gemisch 1s
Inkubation	5min/25°C
Zentrifugation	der DNA-Platten 1min/100xg
Pipettieren	50 $\mu$ l/Well Fugene-Opti-MEM-Gemisch
Inkubation	15min/25°C
Abnehmen	des Kulturmediums von APC und durch 40 $\mu$ l Opti-MEM/Well ersetzt
Zugabe	von je 28 $\mu$ l Transfektionsgemisch (Opti-MEM+Fugene+DNA) zu den APC tropfenweise
Inkubation	3h/37°C
Zugabe	von 100 $\mu$ l/Well DMEM+10%FCS
Inkubation	2d/37°C

Tag 4 – Stimulation der Effektoren mit den transfizierten APC

Präparation	der Milzen (siehe 3.1.4.3)
Auszählen	der Milzzellen
Ansatz	1x10 <sup>6</sup> Milzzellen/Well/100µl in MEMα ohne IL2
Ansatz	der Peptidverdünnung: 2x10 <sup>6</sup> Milzzellen/Well/130µl Peptid in MEMα ohne IL2
Aussäen	130µl Zellsuspension/Well in Peptidplatte (enthält je 20µl der Peptidverdünnung in einer Konzentration von 10 <sup>-5</sup> M, vorgelegt in eine 96-Well-Rundbodenplatte; Endkonzentration mit Golgi-Plug: 1x10 <sup>-6</sup> M)
Abnehmen	des Mediums der transfizierten Zellen und durch 50µl/Well MEMα ohne IL2 ersetzen
Zugabe	von 100µl/Well Effektoren
Auftauen	von Golgi-Plug (BFA)
Ansatz	der Endkonzentration Golgi-Plug: 1:1000 da Zugabe in 50µl/200µl erfolgt, muss Golgi-Plug 1:250 mit Mema verdünnt werden (GP 4x)
Pipettieren	von 50µl/Well GP 4x

Schema:

Transfektionsansätze	50µl Mema	100µl Effektoren	50µl GP 4x
Peptidkontrollen	20µl Peptid	130µl Effektoren	50µl GP 4x

Zentrifugation	der Transfektionsplatten 1min/216xg/25°C (Nicht die Peptidplatte)
Inkubation	aller Platten 6h/37°C
Trennen	der Effektoren von Stimulatorzellen nach Inkubationszeit
Verwerfen	von 100µl Überstand/Well der Transfektionsplatten
Vereinen	der Duplikate der Transfektionsansätze (2x100µl) in neuer 96-Well Rundbodenplatte
Zentrifugation	aller Platten 3min/261xg/4°C
Verwerfen	der Überstände
Aufnehmen	der Pellets in 100µl/Well FACS-Puffer
Zentrifugation	aller Platten 3min/261xg/4°C
Verwerfen	der Überstände
Zugabe	von 50µl/Well Ratte anti-Maus CD8a (Ly-2) PE Cy5: 1:200
Inkubation	20min/4°C
Zentrifugation	aller Platten 3min/261xg/4°C
Verwerfen	der Überstände

Zugabe	von 75µl/Well Cytotfix/Cytoperm™
Inkubation	20min/4°C
Zentrifugation	aller Platten 3min/261xg/4°C
Verwerfen	der Überstände
Ansetzen	Perm/Wash-Puffer 10x, 1:10 mit Aqua bidest. verdünnen: 1x Perm/Wash-Puffer Ratte anti-Maus IFN-γ FITC – Puffer Lösung: AK mit 1x Perm/Wash-Puffer 1:200 verdünnen
Zugabe	von 50µl/Well Ratte anti-Maus IFN-γ FITC /Perm-Wash-Puffer-Lösung
Inkubation	20min/4°C
Waschen	der Zellen 3x 100µl/Well mit 1x Perm-Wash-Puffer-Lösung
Zugabe	von 100µl/Well FACS-Puffer
Transferieren	der Zellen in <i>Microtubes</i>

---

#### Tag 5 – zytofluorometrische Analyse

---

(siehe 3.2.2)

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

Der Zytolysetest ist eine klassische Methode zum Nachweis der zytolytischen Aktivität von CD8 T-Zellen.

Bei diesem Verfahren werden die APC radioaktiv (<sup>51</sup>Cr) markiert und mit Peptid beladen. Diese werden dann mit den CD8 T-Zellen inkubiert, bis durch Lyse der APC das <sup>51</sup>Cr in den Überstand freigesetzt wird. Die Menge des freigesetzten <sup>51</sup>Cr kann mittels γ-Counter quantifiziert werden. Sie ist proportional zur Zahl lysierter Zellen.

Der Zytolysetest wurde für die vorliegende Arbeit verwendet, um die zytolytische Aktivität der *ex vivo* isolierten CD8 T-Zellen aus der Leber nach HvG-KMT und GvH-KMT zu vergleichen. Die mCMV-peptid-spezifischen CD8 T-Zellen wurden mit synthetischem Peptid beladenen APC zur Lyse stimuliert oder ohne Peptid auf ihre Alloreaktivität untersucht.

**Material:**

- Effektoren: CD8 T-Zellen aus Leber und Milz
- APC: P815
- Synthetische Peptide: IE1- <sup>168</sup>YPHFMPTNL<sup>176</sup>  
m164-<sup>167</sup>AGPPRYSRI<sup>175</sup>  
M105-<sup>207</sup>TYWPVVSDI<sup>215</sup>  
M145-<sup>451</sup>CYYASRTKL<sup>459</sup>
- Medium: RPMI + 5%FCS
- <sup>51</sup>Cr (Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>)

**Durchführung:***Vorbereitung der APC*

Die P815 wurden geerntet und ihre Zellzahl wurde bestimmt (siehe 3.1.2). Dann wurden 1x10<sup>6</sup> P815 zur Markierung mit <sup>51</sup>Cr in einem 1,5ml Eppendorfgesäß pipettiert. Die Zellen wurden dann im gleichen Volumen aufgenommen, in dem zum Schluss die Zugabe der <sup>51</sup>Cr-Lösung erfolgte. Für die Markierung von 1x10<sup>6</sup> Zellen wurden 100µCi<sup>51</sup>Cr eingesetzt. Bei der Berechnung des Volumens muss das Äquilibrierungsdatum des <sup>51</sup>Cr beachtet werden. Nach einer Inkubation von 75min/25°C wurden die P815 3x mit Medium gewaschen (4min bei 423xg) und die Zellzahl bestimmt. Anschließend erfolgte die exogene Beladung mit synthetischem Peptid (30min/25°C). Anschließend wurden die Zellen 4x mit Medium gewaschen. Die radioaktiv-markierten und peptidbeladenen Zellen wurden auf eine Endkonzentration von 1x10<sup>3</sup>/Well/100µl eingestellt.

*Vorbereitung der Effektoren*

CD8 T-Zellen wurden aus den verschiedenen Organen mittels MACS (siehe 3.2.3) gewonnen. Die Zellzahl wurde bestimmt (siehe 3.1.2) und die Effektoren wurden auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Dann wurde eine 96-Wellplatte RB ab der zweiten Reihe mit 100µl Medium befüllt. In die oberste Reihe wurden 200µl der Effektoren Zellsuspension ausgesät und mit 100µl eine Titrationsreihe (1:2) erstellt. Anschließend wurden 1x10<sup>3</sup> APC /100µl/Well ausgesät, so dass das Endvolumen 200µl/Well betrug. Für jeden Wert wurden Triplikate angelegt.

Die 96-Wellplatten RB wurden 5 min bei 110xg zur besseren Kontaktaufnahme von APC und Effektoren zentrifugiert und 3,5h/37°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten erneut 5min bei 500xg zentrifugiert, um dann 100µl Überstand in Counterröhrchen zur Messung der Radioaktivität im γ-Counter überführt. Es wurden Proben zur high control und low control mitgeführt. Bei beiden Kontrollen wurden 1x10<sup>3</sup> P815/200µl ohne Effektoren in 12facher Wiederholung eingesetzt. Bei den Proben der high control wurde

zur Bestimmung der Gesamtaktivität der markierten P815 die Radioaktivität von 100µl der APC Zellsuspension gemessen. Bei den Proben der low control wurde die durch Spontanlyse freigesetzte Radioaktivität in 100µl zellfreiem Überstand gemessen.

Zur Bestimmung der antigenunabhängigen, unspezifischen Lyse wurden APC und Effektoren ohne Zugabe des Antigens inkubiert. Alloreaktive, Ld-spezifische Effektoren werden hiermit ebenfalls erfasst. Mit Hilfe der Werte der *high control* und *low control* lässt sich die spezifische Lyse berechnen.

### 3.3 Tierexperimentelle Methoden

#### 3.3.1 KMT und Infektion

Die hCMV-Infektion immunsupprimierter Patienten ist ein Problem in der Transplantationsmedizin, insbesondere nach KMT. Um die Pathogenese der CMV-Infektion im Kontext einer KMT besser zu verstehen, wurde ein murines KMT Modell entwickelt (Koszinowski *et al.*, 1990; Reddehase *et al.*, 1991). Es eignet sich zur Untersuchung von Pathogenese, Organotropismus und Latenz der CMV-Infektion und ist ein anerkanntes *in vivo* Modell (zur Übersicht: Hudson, 1979; Koszinowski *et al.*, 1990).

Die Inzuchtstämme BALB/cJ und BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> wurden für die vorliegende Arbeit als Donoren oder als Rezipienten verwendet (siehe Tab. 6). Ihr hämatopoetisches System wurde durch Bestrahlung zerstört, welches durch eine allogene KMT wieder rekonstituiert wurde. Anschließend wurden die Tiere mit mCMV infiziert.

**Tab. 6: Tabellarische Übersicht der murinen, allogenen KMT**

Donor	Rezipient	KMT
BALB/cJ	BALB/c-H-2 <sup>dm2</sup>	Allogen (HvG-KMT)
BALB/c-H-2 <sup>dm2</sup>	BALB/cJ	Allogen (GvH-KMT)

**Material:**

- Mäuse (BALB/cJ und BALB/c-H-2<sup>dm2</sup>)
- 10ml, 2ml und 1ml Spritzen
- Kanülen (0,4x12mm und 0,45x12mm)
- PBS + 2,5% FCS (v/v)
- mCMV-WT (Strain Smith; ATCC VR-1399)
- mCMV-WT.BAC (MW97.01)
- mCMV- $\Delta$ vRAP (mCMV- $\Delta$ m04+m06+m152)

**Durchführung:****3.3.1.1 Immunsuppression**

Für alle Experimente wurden 8-10 Wochen alte weibliche BALB/cJ und BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Mäuse als Rezipienten verwendet, welche in einer Kleintierbestrahlungsanlage (zwei <sup>137</sup>Cs Quellen) mit einer Dosis von 6 Gray (Gy) bestrahlt wurden. Die jeweilige Dosis wurde monatlich entsprechend der Halbwertszeit von <sup>137</sup>Cs ( $T_{1/2}=30a$ ) angepasst. Die  $\gamma$ -Bestrahlung führt zu einer Aplasie des KM durch Auslöschung hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen (Mutter *et al.*, 1988).

**3.3.1.2 Intraplantare mCMV Infektion**

Das Virus wurde auf eine Konzentration von  $2 \times 10^5$  PFU mCMV in 50 $\mu$ l PBS pro Maus eingestellt und bis zur Injektion auf Eis gekühlt. Den Mäusen wurde das Virus mit einer 1ml Spritze und Kanülen der Dicke 0,4x12mm intraplantar in die rechte Hinterpfote injiziert. Die Infektionsdosis betrug ca.  $1 \times 10^5$  PFU mCMV pro Maus, da es bei der Infektion in der Regel zu einem Wiederaustreten und damit zu Verlusten der partiellen Viruslösung kommt.

**3.3.1.3 Gewinnung von KMZ**

Als KMZ Donor wurden 3-6 Monate alte weibliche BALB/cJ und BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Mäuse verwendet. Bei der qPCR wurden männliche Donoren verwendet. Nach CO<sub>2</sub>-Begasung wurden die Donoren zur Desinfektion kurz in 70%iges Ethanol getaucht. Die Hinterbeine wurden beidseitig entfernt, wobei der *Femur* von der Hüftgelenkspfanne abgetrennt wurde. Danach wurden *Femur* und *Tibia* freipräpariert. Die Knochen wurden in PBS und 2,5% FCS gesammelt, um ein Austrocknen des KM zu verhindern. Nach dem Abschneiden der Epiphysen wurde das KM aus den Markhöhlen der Knochen mit Hilfe einer 0,4x12mm Kanüle mit PBS + 2,5% FCS gespült und aufgefangen. Das gesammelte

---

KM wurde 3x mit PBS gewaschen (8min bei 699xg) und anschließend über ein 100µm *Cell Strainer* filtriert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt (siehe 3.1.2).

---

Erwartete Zellzahl:  $2-3 \times 10^7$  KMZ /Maus ( zwei *Tibiae* und zwei *Femura*)

---

#### 3.3.1.4 KMT

Die KMZ wurden den Mäusen in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  KMZ in 500µl PBS intravenös (i.v.) in eine der beiden lateralen Schwanzvenen injiziert. Nach Knochenmarkgabe wurden die Mäuse mit mCMV-WT.Smith intraplantar infiziert. Veränderte Versuchsbedingungen sind im Ergebnisteil vermerkt.

### 3.4 Histologische Methoden

#### 3.4.1 Immunhistologie

Die Immunhistologie dient dem Nachweis von Gewebeatigenen (z. B. Proteine) mit Hilfe von AK. Der hierzu verwendete AK muss spezifisch gegen das gesuchte Antigen gerichtet sein, damit es an dessen Strukturen im Gewebeschnitt binden kann. Gebräuchliche Protokolle in der Immunhistologie sind die Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex- (ABC) und die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP) -Technik, die auch beide in dieser Arbeit eingesetzt wurden.

Bei der ABC-Methode wird ein ungekoppelter Primär-AK und ein mit Biotin gekoppelter Sekundär-AK eingesetzt. Der Nachweis erfolgt mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex und DAB als Substrat. Zusätzlich verstärkt Nickel die Farbreaktion.

Bei der APAAP-Methode handelt sich um eine Enzym-anti-Enzymkomplex-Technik, bei der ein im Überschuss vorliegender Brücken-AK sowohl an den Primär-AK, als auch an den anti-Enzym-AK bindet. Als Chromogene werden Fast Red oder Neufuchsin verwendet.

Die Immunhistologie diente dieser Arbeit zum Nachweis von CD3 T-Zellen und mCMV-WT infizierten Leberzellen.

##### 3.4.1.1 Fixierung der Organe

Nach Organentnahme wurden die Organe für 8-18h in gepuffertes 4% (v/v) Formalin eingelegt.

### 3.4.1.2 Einblocken der Organe

Nach Auswaschen des Formalins mit Leitungswasser wurden die Gewebe mit Isopropanol entwässert, über Xylol in Paraffin überführt und schließlich in Paraffin eingeblockt.

#### Material:

- Isopropanol (20%, 40%, 60%, 80%, 90%, 100% (v/v)) Verdünnungen mit Aqua bidest.
- Xylol
- Paraffin, 60°C

#### Durchführung:

- |  |       |
|--|-------|
| • Spülen der Gewebe in Leitungswasser  | 2-6h  |
| • Isopropanol, 20% (v/v)               | 45min |
| • Isopropanol, 40% (v/v)               | 45min |
| • Isopropanol, 60% (v/v)               | 45min |
| • Isopropanol, 80% (v/v)               | 45min |
| • Isopropanol, 90% (v/v)               | 45min |
| • 1. Isopropanol, 100%                 | 45min |
| • 2. Isopropanol, 100%                 | 45min |
| • 3. Isopropanol, 100%                 | 45min |
| • 1. Xylol                             | 1h    |
| • 2. Xylol                             | 1h    |
| • 3. Xylol                             | 1h    |
| • 1. Paraffin, 60°C                    | 4h    |
| • 2. Paraffin, 60°C                    | 8-16h |
| • 3. Paraffin, 60°C                    | 4h    |
| • in heißem Paraffin (60°C) einblocken |       |

### 3.4.1.3 Schneiden der Organe

Um die Blöckchen am Mikrotom schneiden zu können, wurden sie auf -20°C gekühlt. Die Schnittdicke wurde auf 2µm eingestellt. Die Serienschritte wurden zunächst im Kaltwasserbad (20°C) aufgefangen und dann in ein Warmwasserbad (45°C) zum Strecken überführt, damit sie glatt auf einen silanisierten Objektträger aufgezogen werden konnten. Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C getrocknet.

### 3.4.1.4 Entparaffinierung der Organschnitte

Bevor Organschnitte immunhistologisch gefärbt werden können, müssen sie entparaffiniert werden.

**Material:**

- Xylol
- Isopropanol (50%, 70%, 90%, 100% (v/v)) Verdünnungen mit Aqua bidest.
- Aqua bidest

**Durchführung:**

- 1. Xylol 5min
- 2. Xylol 5min
- 3. Xylol 5min
- 1. Isopropanol, 100% 3min
- 2. Isopropanol, 100% 3min
- Isopropanol, 90% (v/v) 3min
- Isopropanol, 70% (v/v) 3min
- Isopropanol, 50% (v/v) 3min
- Aqua bidest. 2min

### 3.4.1.5 Färbung der Organschnitte

**Nachweis von intrazellulärem mCMV-IE1**

Die Färbung des viralen mCMV-IE1 (pp76/89) wurde mit der ABC-Methode durchgeführt. Als Substrat wurde Diaminobenzidin (DAB) verwendet. Zusätzlich diente Nickel als Verstärker des spezifischen Signals. An den Stellen, an denen das IE1-Protein exprimiert wurde, kam es so zu einer Schwarzfärbung des Gewebes.

**Material:**

- Methanol
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%
- Hämalan
- Entellan
- Deckglas
- AK: (siehe 2.5)
- Puffer, Lösungen und Kits:

TBS-Puffer (Tris Buffered Saline)

Stammlösung 10x (w/v)

1M Tris-HCl	121g
0,15M NaCl	8,8g
Aqua bidest.	ad 1l; Einstellen auf pH 7,4

Gebrauchslösung, 1x (w/v) 1:10 Verdünnung der TBS-Stammlösung in  
Aqua bidest.; Lagerung bei 25°C

BSA-TBS

Stammlösung, BSA 10%ig (w/v)

BSA	10g
TBS (1x)	ad 100ml

Gebrauchslösung, BSA 1%ig (w/v) 1:10 Verdünnung der BSA-TBS-  
Stammlösung mit TBS; Lagerung -20°C

Gepuffertes Formalin (4%ig) (v/v)

66mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9,07g
84mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,86g
Aqua bidest.	ad 890ml
Formalin	110ml (Stammlösung 37%); Einstellen auf pH 7,4

Trypsin-Lösung (w/v)

NaCl	8g
KCl	0,2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15g
EDTA	1,25g
Aqua bidest.	ad 1l; Einstellen auf pH 7,4; Autoklavieren
Trypsin einrühren	1,25g; Lagerung bei 4°C

Vectastain Elite ABC-Peroxidase-Kit

Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA, USA, Nr. PK-6100)

Neufuchsin-Kit, DAKOCytomation (Hamburg, Nr. K 0625)

**Durchführung:**

Anmerkung	Die Inkubation erfolgt in einer feuchten Kammer
Inkubation	der entparaffinierten Schnitte in Trypsin (15min/37°C)
Spülen	in Aqua bidest. (3x1min)
Blocken	mit Methanol-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Block: 30ml Methanol, 30ml PBS und 1ml 30%iges H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (35min/20-25°C)
Spülen	in TBS (3x1min)
Inkubation	mit Kaninchenserum, Verdünnung 1:10 in BSA-TBS (1% (v/v)) (20min/20-25°C) danach nur abschütten, nicht waschen.
Inkubation	mit 1. AK: anti-mCMV-IE1, Verdünnung 1:250 in BSA-TBS (1% (v/v)) sowie Kaninchenserum 1:10 (1h/20-25°C)
Spülen	in TBS (3x1min)
Inkubation	mit 2. AK: Ziege anti-Maus IgG, Verdünnung 1:200 in BSA-TBS (1% (v/v)); (30min/20-25°C)
Spülen	in TBS (3x1min)
Inkubation	mit ABC-Reagenz (1µl Reagenz A und 1µl Reagenz B in 100µl BSA-TBS; (1% (v/v)/Objektträger)
Inkubation	20min/20-25°C
Spülen	in TBS auf Schüttler (3x10min/20-25°C)
Färbung	dazu werden 10mg DAB und 75mg Nickelsulfat in 50ml Trispuffer (50mM) gelöst und filtriert. Anschließend werden 17µl 30%iges H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (v/v) zugegeben (20min/20-25°C)
Färbung	mit Hämalaun (3s/20-25°C)
Dehydrieren	jeweils in der „aufsteigenden“ Isopropanolreihe 1x50% (v/v), 1x70% (v/v), 1x90% (v/v), 2x100% (v/v) (30s/20-25°C)
Trocknen	20-25°C
Inkubation	mit Xylol (30s/20-25°C)
Eindecken	mit Entellan und einem Deckgläschen

### Nachweis von intrazellulärem Protein mCMV-IE1 und membranständigem CD3

Die ABC-Methode für den CD3 Nachweis wurde mit der APAAP-Methode für den Nachweis von mCMV-IE1 kombiniert. Bei dieser Doppelfärbung werden mCMV-IE1- (pp76/89) rot und CD3 positive Zellen schwarz gefärbt. Das mCMV-IE1 (pp76/89) findet sich im Zellkern und das CD3-Molekül in der Zellmembran positiver Zellen.

Mit Hilfe der Doppelfärbung wurde die Verteilung und die Anzahl der infizierten sowie der CD3 positiven Zellen im Gewebe von Tieren nach allogener KMT untersucht.

#### Material:

- Citrat-Puffer
- Methanol
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%
- TBS (siehe 3.4.1.5)
- BSA (siehe 3.4.1.5)
- ABC
- Hämalaun
- Nickelsulfat
- Trispuffer
- Isopropanol (50%, 70%,90% (v/v), 100%)
- Paraclear®
- Paramount®
- AK: (siehe 2.5)

#### Durchführung:

Die Demaskierung der Schnitte in der Mikrowelle erfolgte in Citrat-Puffer. Hierzu wurden die Schnitte in ein mikrowellene geeignetes Gefäß gestellt und etwa 1min sprudelnd gekocht (100% Leistung = 1000W). Um Siedeverzug zu vermeiden, wurde die Mikrowellenleistung nach Einsetzen des Kochvorganges reduziert (30% Leistung = 300W).

Spülen	in Aqua bidest. (3x1min/20-25°C)
Blocken	mit Methanol-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Block: 30ml Methanol, 30ml PBS und 1ml 30%iges H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (v/v) (35min/20-25°C)
Spülen	in TBS (3x1min)
Inkubation	mit Avidin-Biotin-Blocking Kit- Avidin-Block-Lösung (20min/20-25°C)
Waschen	mit TBS (1min/20-25°C)
Inkubation	mit Avidin-Biotin-Blocking Kit- Biotin-Block-Lösung (20min/20-25°C)
Waschen	mit TBS (1min/20-25°C)

---

Inkubation	mit Pferdeserum, Verdünnung 1:10 in BSA-TBS (1% (v/v)); (20min/20-25°C). Danach nur abschütten, nicht waschen.
Inkubation	mit 1. AK: anti-CD3, Verdünnung 1:20 in BSA-TBS (1% (v/v)); (18h/20-25°C)
Spülen	in TBS (3x1min)
Inkubation	mit 2. AK: anti-Ratte-Biotin, Verdünnung 1:100 in BSA-TBS (1% (v/v)); (30min/20-25°C)
Spülen	in TBS (3x1min)
Inkubation	mit ABC-Reagenz (1µl Reagenz A und 1µl Reagenz B in 100µl BSA-TBS; (1% (v/v)/Objektträger)
Inkubation	20min/20-25°C
Spülen	in TBS auf Schüttler (3x10min/20-25°C)
Färbung	von 10mg DAB und 75mg Nickelsulfat in 50ml Trispuffer (50mM) gelöst und filtriert. Anschließend wurden 17µl 30%iges H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (v/v) zugegeben (20min/20-25°C)
Spülen	in TBS (3x1min)
Inkubation	mit 1. AK: anti -mCMV-IE1, Verdünnung 1:250 in BSA-TBS (1% (v/v)); (1h/20-25°C)
Spülen	in TBS (3x1min)
Inkubation	mit 2. AK: Ziege anti-Maus, Verdünnung 1:20 in BSA-TBS (1% (v/v)); (30min/20-25°C)
Spülen	in TBS (3x1min)
Inkubation	mit APAAP-Komplex, Verdünnung 1:50 in BSA-TBS (1% (v/v)); (30min/20-25°C)
Spülen	in TBS (3x10min/20-25°C)
Färbung	mit Neufuchsin-Kit: Ansetzen der Reagenz wie im Beipackzettel beschrieben
Inkubation	20min/20-25°C
Färbung	mit Hämalaun (3s/20-25°C)
Dehydrieren	in der „aufsteigenden“ Isopropanolreihe 1x50%, 1x70%,1x90% (v/v), 2x100% (30s/20-25°C)
Trocknen	30s/20-25°C
Inkubation	mit Xylol (30s/20-25°C)
Eindecken	mit Entellan und einem Deckgläschen

### 3.4.2 Kryostathistologie

Die Kryostathistologie ist eine weitere Methode zur Anfertigung und Färbung von Gewebeschnitten, alternativ zur Einbettung in Paraffin. Bei dieser Methode wurden Organblöcke bis zu maximal 1cm<sup>3</sup> Größe entnommen und sofort bei -196°C in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden sie bei -75°C gelagert. Vor dem Schneiden wurden die Organblöcke mit einem Gewebeeinbettmedium für Gefrierschnitte (Cryo-Block) auf einen Träger aufgebracht. Der fixierte Gewebeblock wurde zum Angleichen an die Kryostat-Temperatur 15-30min im Kryostaten belassen. Es wurden Schnitte von 5µm Dicke angefertigt, auf einen silanisierten Objektträger aufgezogen und getrocknet. Danach erfolgte die Fixierung der Schnitte für 10min in einem eiskalten Aceton/Methanol-Gemisch (1:1). Nachdem die Schnitte luftgetrocknet waren, wurden sie bei 4°C über Nacht weitergetrocknet. Anschließend wurden die Schnitte gefärbt oder bei -20°C zwischengelagert.

Die Kryostathistologie diente dem Nachweis von CD4 und CD8 positiven T-Zellen in der Leber, da die entsprechenden Epitope nach Formalinfixierung und Paraffineinbettung durch alle derzeit verfügbaren AK nicht mehr nachgewiesen werden können.

#### 3.4.2.1 Färbung der Organschnitte

##### Nachweis von membranständigem CD4 oder CD8a

Die CD4- und CD8a-Färbung wurde für diese Arbeit verwendet, um die mittels Paraffinhistologie nachgewiesenen CD3 positiven Zellen weiter zu differenzieren.

##### Material:

- Methanol
- Avidin-Biotin-Block
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%
- TBS (siehe 3.4.1.5)
- BSA (siehe 3.4.1.5)
- Hämalaun
- Entellan
- AK: (siehe 2.5)

Waschen	in Wasser (1min)
Blocken	mit Methanol-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Block: 60ml Methanol und 0,6ml 30%iges (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (35min/20-25°C)
Waschen	in Wasser (2x1min)
Inkubation	mit Avidin-Biotin-Blocking Kit- Avidin-Block-Lösung (20min/20-25°C)

---

Waschen	mit TBS (1min/20-25°C)
Inkubation	mit Avidin-Biotin-Blocking Kit- Biotin-Block-Lösung (20min/20-25°C)
Waschen	mit TBS (1min/20-25°C)
Inkubation	mit Ziegen Serum, Verdünnung 1:10 in BSA-TBS (1% (v/v)) . Danach nur abschütten, nicht waschen (20min/20-25°C)
Inkubation	mit 1. AK: anti- CD4 (oder anti- CD8a), Verdünnung 1:50 (1:100) in BSA-TBS (1% (v/v)) , sowie 1:10 Ziegen Serum (4°C 16-20h)
Spülen	in TBS (2x1min)
Inkubation	mit 2. AK: anti-Ratte, Verdünnung 1:50 in BSA-TBS (1% (v/v)) ; (30min/20-25°C)
Spülen	in TBS (2x1min)
Anmischen	der ABC-Reagenz (1µl Reagenz A und 1µl Reagenz B in 100µl BSA-TBS; (1% (v/v)/Objektträger)
Inkubation	30min/20-25°C
Spülen	in TBS (2x1min)
Färbung	dazu werden 10mg DAB aus -20°C und 75mg Nickelsulfat in 50ml Trispuffer (50mM) gelöst und filtriert. Anschließend werden 17µl 30%iges H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (v/v) zugegeben (30min)
Färbung	mit Hämatoxylin (3min/20-25°C)
Dehydrieren	jeweils in der „aufsteigenden“ Isopropanolreihe 1x50%, 1x70%, 1x90% (v/v), 2x100% (10s/20-25°C)
Trocknen	30s/20-25°C
Inkubation	mit Xylol (30s/20-25°C)
Eindecken	mit Entellan und einem Deckgläschen

### 3.5 Virologische Methoden

#### 3.5.1 mCMV-Aufreinigung und Produktion

Zur Infektion von Versuchstieren wurden ausschließlich aus infizierten MEF hochgereinigte Viren verwendet. Dazu wurde mCMV in MEF vermehrt, anschließend isoliert und mit Hilfe eines Saccharose-Gradienten gereinigt. Zur Aufbewahrung wurde das Virusmaterial bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### Material:

- MEF der 3. Passage (BALB/cJ und BALB/c-H-2<sup>dm2</sup>)
- Zellschaber
- Dounce-Homogenisator
- Polyallomerröhrchen
- Lösungen: Virus-Standard-Puffer (VSP, siehe 2.1.11)  
VSP + 15% Succrose (15g Succrose/100ml VSP) (w/v)
- Medium: Mem + 10% FCS (v/v)

#### Durchführung:

Für eine Virusaufreinigung wurden 45 bis maximal 55 PS/Ø14,5cm MEF der 3. Passage benötigt. Diese wurden mit  $1 \times 10^5$  PFU mCMV/PS infiziert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und das Virus in einem Volumen von 5ml PS zugegeben. Anschließend wurden die PS 30min/25°C inkubiert und danach 20ml Medium zugegeben.

Nach 4-5 Tagen Inkubation bei 37°C war der Zellrasen durchinfiziert und die Zellen konnten mit einem Zellschaber abgelöst werden. Der Überstand mit den abgelösten Zellen wurde in sterilen 500ml Zentrifugenbechern gesammelt. Anschließend wurde zentrifugiert (20min/4°C bei 6387xg; Zentrifuge: Sorvall RC 5C, Rotor: SLA-3000). Ab diesem Zeitpunkt erfolgten alle Arbeitsschritte bei 4°C. Die Überstände wurden in sterilen 250ml Zentrifugenbechern gesammelt und die Pellets wurden in 2x10ml Medium aufgenommen, um in den Dounce-Homogenisator überführt zu werden. Zum Zellaufschluss musste der Stempel des Dounce-Homogenisator mindestens 20x auf und ab bewegt werden. Das Homogenat wurde in sterile 50ml Zentrifugenröhrchen überführt und erneut zentrifugiert (20min/4°C bei 3615xg; Zentrifuge: Sorvall RC 5C, Rotor: SS-34). Das Pellet bestand ausschließlich aus Zelltrümmern und konnte verworfen werden. Der Überstand wurde mit dem Überstand aus den 250ml Zentrifugenröhrchen vereinigt und alles zentrifugiert (3h/4°C bei 26.069xg; Zentrifuge: Sorvall RC 5C Rotor: SS-SLA-1500). Der Überstand wurde verworfen und die virushaltigen Pellets wurden über Nacht mit sehr wenig Medium bei 4°C auf Eis gelagert.

Am nächsten Tag wurden die Pellets ohne weitere Zugabe von Medium resuspendiert auf einen 2,5ml Dounce-Homogenisator verteilt und homogenisiert. Das gesamte Homogenat sollte ca. 10ml betragen. Vier Polyallomerröhrchen wurden mit je 22,5ml 15% Succrose/VSP gefüllt und mit 2,5ml Virussuspension überschichtet. Anschließend wurde zentrifugiert (1h/4°C bei 52.800xg; Zentrifuge: Sorvall Combi plus, Rotor: AH 629, Accel=N). Die Überstände wurden abgenommen und auf die Pellets wurde je 1ml 15% Succrose/VSP gegeben. Die Pellets wurden 4h/4°C auf Eis stehen gelassen. Danach wurden sie vorsichtig resuspendiert, nochmals homogenisiert und in Aliquots á 20 bis 100µl bei -70°C eingefroren.

Gereinigtes Virus kann unverdünnt bis zu 3x aufgetaut werden, ohne dass der Virustiter abnimmt. Virusverdünnungen sollten nicht wieder eingefroren werden.

### 3.5.2 Virustiterbestimmung

#### Material:

- Viruspräparationen
- MEF der 3. Passage (BALB/cJ und BALB/c-H-2<sup>dm2</sup>)
- 2ml Eppendorfgefäße
- Medium: MEM + 10% FCS (v/v)
- Methylcellulose (siehe 2.7)
- Puffer und Lösungen: VSP (Virus-Standard-Puffer)

1M Tris	50ml/l
1M KCL	12ml/l
0,1M Na-EDTA	50ml/l
Aqua bidest	ad 1l
pH einstellen auf 7,4 und anschließend autoklavieren	

#### Durchführung:

Zur Ermittlung des Titers einer Viruspräparation musste eine Titrationsreihe (1:10) des Virusstocks auf Eis hergestellt werden. Hierzu wurde je 450µl Medium in sechs 2ml Eppendorfgefäße vorgelegt. Dazu wurden 50µl des Virusstocks in das Eppendorfgefäß gegeben, ohne mit der Spitze einzutauchen, mit einer neuen Spitze wurde gemischt, 50µl

entnommen und ohne einzutauchen in das zweite Eppendorfgefäß überführt, etc. Anschließend wurde aus jeder Verdünnungsstufe je 100µl in Triplikaten auf MEF der 3.Passage, ausgesät in 48- Wellplatten FP, gegeben.

Diese wurden 1h/37°C inkubiert und anschließend mit 500µl Methylcellulose überschichtet. Nach vier Tagen wurde der Virustiter abgelesen und nach folgender Formel berechnet.

$$\text{Virustiter (PFU/ml)} = \text{Anzahl der Plaques} \times V \times 10$$

V = Verdünnungsfaktor

Triplikate wurden bei der Berechnung gemittelt. Die errechneten Werte entsprechen dem Virustiter pro ml (Reddehase et al., 1985).

### 3.6 Molekularbiologische Methoden

#### 3.6.1 qPCR

Im Gegensatz zur konventionellen PCR kann in der *real-time* PCR die Amplifikation von DNA quantitativ mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. SYBR-Green) verfolgt werden. SYBR *Green* ist ein Farbstoff, der nicht nur an doppelsträngige DNA, sondern auch an unspezifische Nebenprodukte und Primer-Dimere bindet. Um unspezifisch amplifizierte DNA oder die Bildung von Primer-Dimeren zu detektieren, sollte bei jeder Quantifizierung eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Dazu wird die Temperatur langsam und kontinuierlich erhöht (50-95°C), wodurch die dsDNA-Moleküle aufschmelzen und die interkalierenden Farbstoffmoleküle freigesetzt werden. Die Abnahme der Fluoreszenz wird gemessen, wobei die unspezifisch amplifizierte DNA und Primer-Dimere durch die abweichenden Schmelztemperaturen von den zu untersuchenden Amplifikaten unterschieden werden. Die Amplifikation von DNA lässt sich anhand von verschiedenen Phasen einer sigmoidalen Verlaufskurve beschreiben. Nach der Initialisierungsphase beginnt eine exponentielle Amplifikationsphase, in der sich unter optimalen Bedingungen die Zahl der DNA mit jedem Zyklus verdoppelt. Dieser exponentiellen Phase folgt eine Plateauphase, in der limitierende Faktoren, die Effizienz der PCR beeinträchtigen und die Amplifikation verlangsamen. Zu den limitierenden Faktoren zählen die abnehmende Menge an freien Primern und desoxy-Nukleotidtriphosphaten, die sich verringerende Stabilität der Polymerase und das häufige *Re-annealing* der Produkte. In der exponentiellen Wachstumsphase korreliert die Zunahme der Fluoreszenz direkt mit der

eingesetzten Menge an spezifischem *template*. Während der exponentiellen Wachstumsphase kann die Amplifikation wie folgt beschrieben werden:

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

E: PCR Effizienz

N: Anzahl der amplifizierten Moleküle

$N_0$ : Initiale Menge an Molekülen

n: Anzahl der Zyklen

Die maximal mögliche PCR Effizienz ist 2, also eine Verdopplung (100% Reaktionseffizienz) in jedem Zyklus, wobei das Minimum bei 1, also keiner Amplifikation, liegt. Vergleicht man zwei qPCR Reaktionen mit gleicher PCR Effizienz und definierter Anzahl von Zyklen, ist der Anstieg des Signals während der exponentiellen Phase nur von der Ausgangsmenge des *templates* abhängig. Aufgrund der Proportionalität von Fluoreszenzsignal und Kopienzahl des zu amplifizierenden Moleküls kann mit Hilfe von definierten Standards eine exakte Mengenbestimmung der zu untersuchenden Probe durchgeführt werden (absolute Quantifizierung).

Für diese Arbeit wurde die qPCR verwendet, um die Ansiedlung von Donor KMZ im Rezipienten KM zu untersuchen. Dazu wurden weibliche (XX, *sry*) BALB/cJ oder BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Tiere als Rezipienten und männliche (XY, *sry*<sup>+</sup>) BALB/cJ oder BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Tiere als Donoren eingesetzt. Um das Verhältnis von Donor zu Rezipienten KMZ zu bestimmen, wurde das Y-chromosomale *sry* Gen (Gubbay *et al.*, 1990; Koopman *et al.*, 1990) mit entsprechenden Primern amplifiziert (Seckert *et al.*, 2008). Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde die Anzahl der *pthrp* Gene (Mangin *et al.*, 1990) quantifiziert (Simon *et al.*, 2005).

#### Material:

- Knochenmark Rezipienten
- Oligonukleotide:

LCPTHrP\_For 5'-GGT ATC TGC CCT CAT CGT CTG3'

*GenBank Accession No.:* M60056; n'327-307

LCPTHrP\_Rev 5'-CGT TTC TTC CTC CAC CAT CTG-3'

*GenBank Accession No.:* M60056; n'186-206

Amplifikatgröße: 142bp

LCsry\_For 5'-ACA GAA GCC GAA AAA AGG CC-3'

GenBank Accession No.: 287804; n'236-255

LCsry\_Rev 5'-CAG GCT GTA AAA TGC CAC TCC-3'

GenBank Accession No.: 287804; n'371-351

Amplifikatgröße: 136bp

(Firma Operon Biotechnologies, Köln)

- Puffer und Kits:

TE-Puffer 10mM Tris                    1,211g

                  1mM EDTAx2H<sub>2</sub>O        0,372g

                  mit Aqua bidest.            ad 1000ml

Lösung mit HCl auf pH 8,0 einstellen und anschließend autoklavieren.

*DNeasy Blood & Tissue Kit*

QIAGEN (Hilden, Nr.69506)

QuantiTect SYBR Green PCR Kit

QIAGEN (Hilden, Nr. 204143)

### **Durchführung:**

#### **DNA-Isolierung aus Knochenmark**

Die KMZ wurden nach KMT aus den weiblichen Rezipienten gewonnen. Nach CO<sub>2</sub>-Betäubung wurden die Donoren zur Desinfektion kurz in 70% (v/v) Ethanol getaucht. Die Hinterbeine wurden beidseitig entfernt, wobei der Femur von der Hüftgelenkspfanne abgetrennt wurde. Danach wurden Femur und Tibia freipräpariert und die Knochen in PBS gesammelt, um ein Austrocknen zu verhindern. Nach dem Abschneiden der Epiphysen wurde das Knochenmark aus den Markhöhlen der Knochen mit Hilfe einer 0,4x12mm Kanüle mit 1ml PBS gespült und in 2ml Einfrierröhrchen aufgefangen. Das KM wurde dann 8min bei 699xg zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet bei -20°C gelagert. Zur DNA-Isolierung wurden die Zellen aufgetaut und in 200µl PBS resuspendiert. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll *DNeasy Blood & Tissue Kit* für Zellen.

Pipettieren        20µl Proteinase K zu Ansatz

Vortexen            der Probe

Pipettieren        200µl Puffer AL

Vortexen            der Probe

Inkubieren	10min/56°C
Pipettieren	200µl Ethanol (96-100%) zur Probe
Vortexen	der Probe
Überführen	den gesamten Ansatz auf Filtersäule, um eine Bindung der DNA an Silica Matrix der Filtersäule zu bewirken
Zentrifugation	1min/6.000xg
Waschen	Zugabe von 500µl Puffer AW1
Zentrifugation	1min/6.000xg
Waschen	Zugabe von 500µl Puffer AW2
Zentrifugation	3min/20.000xg
Überführen	Säule in neues Auffanggefäß
Zugabe	200µl Puffer AE direkt auf Membran
Inkubation	1min/25°C
Zentrifugation	1min/6.000xg

### Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

Die jeweilige DNA-Konzentration der aufgereinigten Proben wurde spektrophotometrisch am Nanodrop (Pepqlab) bestimmt. Den Konzentrationsberechnungen wurden folgende Werte zugrunde gelegt:

$$\text{Extinktion } 260\text{nm} = 1 \quad \rightarrow \quad 50\mu\text{g/ml bei doppelsträngiger DNA}$$

Um eine Verunreinigung der Proben durch Proteine auszuschließen, wurde die Extinktion ebenfalls bei 280nm, dem Extinktionsmaximum von Proteinen, gemessen. Der Quotient E260/E280 ist ein Maß für die Reinheit einer Probe. Proteinfreie DNA-Lösungen weisen üblicherweise ein Verhältnis von 1,8-2,0 auf (Sambrook & Russel, 2001).

### qPCR

Die qPCR für *sry* und *pthr* erfolgte auf einem TaqMan 7500 (Applied Biosystems, Darmstadt) mit Hilfe von SYBR Green. Die Quantifizierung wurde mit folgendem Amplifikationsprofil durchgeführt:

Initialer Aktivierungsschritt	15min	95°C	Aktivierung der HotStar Taq DNA Polymerase
<b>3-Schritt Cycling</b>			
Denaturierung	15s	94°C	

<i>Annealing</i>	30s	62°C	
Extension	45s	72°C	Datenakquisition
Zyklenzahl	50		
<hr/>			
Schmelzkurve			
Denaturierung	15s	95°C	
<i>Annealing</i>	1min	60°C	kontinuierliche Datenakquisition
<i>Set Ramp Time</i>	auto		
Denaturierung	15s	95°C	
<hr/>			

Bei jeder Quantifizierung wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um unspezifisch amplifizierte DNA oder die Bildung von Primer-Dimeren zu detektieren. Die Quantifizierung von *sry* und *pthrp* aus der isolierten DNA wurde jeweils in Triplikaten durchgeführt. Pro Ansatz wurden 4µl DNA (entspricht  $\frac{1}{50}$  des gesamten Elutionsvolumens) eingesetzt.

## 4. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der CMV-Infektion nach allogener KMT. Die Untersuchungen fokussierten sich dabei auf Pathogenese, Immunkontrolle und Organotropismus der CMV-Infektion bei gleichzeitig möglicher Abstoßungsreaktion.

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Koszinowski und Reddehase haben gezeigt, dass die Tiere nach **HvG-KMT** überleben, während die Tiere nach **GvH-KMT** sterben. Warum die Tiere nach GvH-KMT sterben, war die Hauptfragestellung dieser Arbeit.

### 4.1 Transplantationsmodell

Eine Untersuchung der CMV-Infektion am Menschen ist aus ethischen Gründen nur bedingt möglich. Deshalb ist es erforderlich, auf ein kliniknahes murines Modell zurückzugreifen. Das murine Modell wurde daher in der vorliegenden Arbeit eingesetzt, um die klinische Problematik der allogenen KMT zu studieren.

Dazu wurden Mäuse der Stämme BALB/cJ und BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> – beide des Haplotyps H-2<sup>d</sup> - wechselseitig als Donoren oder Rezipienten eingesetzt (**Abb. 4.1**). Die BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Maus ist eine natürliche Gendelektionsmutante, der das MHC-Klasse-I-Molekül L<sup>d</sup> fehlt. Eine Abstoßungsreaktion könnte auftreten, wenn BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> (L<sup>d</sup>-) Rezipienten KMZ von BALB/cJ (L<sup>d+</sup>) Donoren erhalten. Der Rezipient würde gegen das fremde L<sup>d</sup>-Molekül des Transplantates reagieren. Es würde sich hierbei um eine HvG-Reaktion handeln. Um eine GvH-Reaktion würde es sich handeln, wenn BALB/cJ Rezipienten KMZ von BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Donoren erhalten. Das Transplantat würde dann gegen das fremde L<sup>d</sup>-Molekül des Rezipienten reagieren. Eine HvG- oder GvH-Reaktion endet im schlimmsten Fall mit der entsprechenden Erkrankung (HvGD oder GvHD).

Die KMT Bedingungen basierten auf früheren Versuchen der Arbeitsgruppe. Alle Transplantationen wurden mit 6Gy, 5x10<sup>6</sup> KMZ und einer Infektionsdosis von 1x10<sup>5</sup> PFU mCMV-WT.Smith vorgenommen (siehe 3.3). Die Immunsuppression der Mäuse mit 6Gy erfolgte durch eine Ganzkörper- $\gamma$ -Bestrahlung. Diese subletale Bestrahlung stellt eine Bedingung dar, unter der eine Abstoßungsreaktion gegen das Transplantat durchaus noch erwartet werden kann.

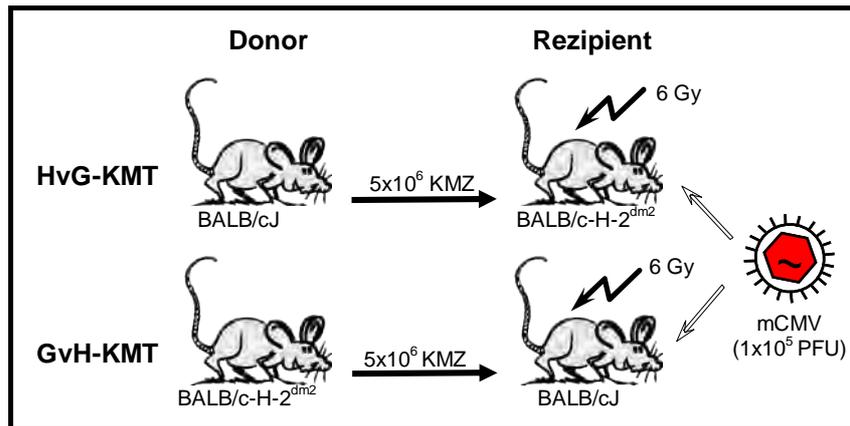


Abb. 4.1: Modell der allogenen, murinen Knochenmarkstransplantation und mCMV Infektion

#### 4.2 Überlebensrate

Um die Überlebensrate nach HvG- und GvH-KMT zu untersuchen, wurde eine Sterbekurven-Analyse nach Kaplan-Meier durchgeführt (Abb. 4.2). Dazu wurden pro Versuchsgruppe je zwanzig Tiere transplantiert. Die Tiere wurden täglich zum gleichen Zeitpunkt kontrolliert und Todesfälle notiert.

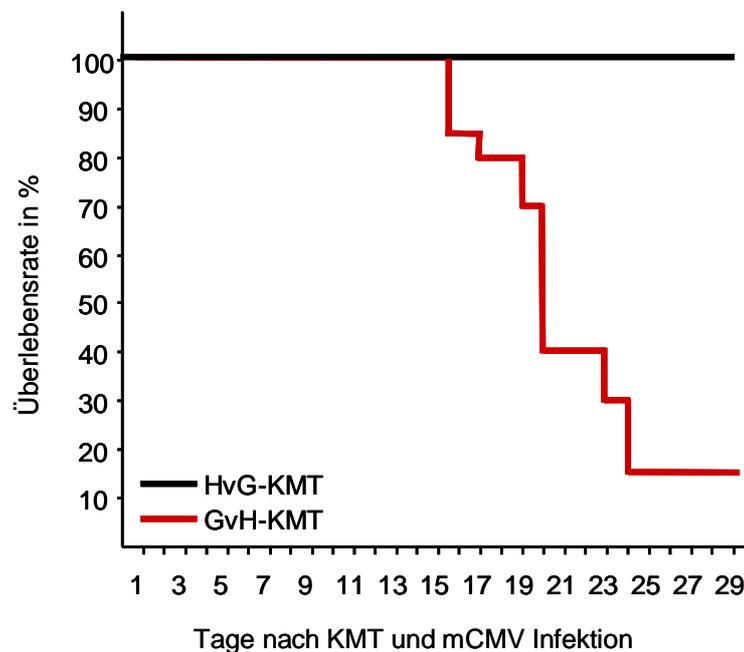


Abb. 4.2: Sterbekurve nach KMT und mCMV Infektion

In dem gezeigten Experiment betrug die Überlebensrate nach **HvG-KMT** 100% und 15% nach **GvH-KMT**. Von den insgesamt fünfzehn durchgeführten allogenen KMT betrug die Überlebensrate im Mittel 90% nach HvG-KMT und 5% nach GvH-KMT (nicht dargestellt). Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass ohne konkurrente mCMV-Infektion nach Übertragung von  $10^6$  bzw.  $10^7$  KMZ in beiden Transplantationsrichtungen bis zu 100% der Rezipienten überlebten (nicht dargestellt).

Schlussfolgerung: Nach HvG-KMT überleben fast alle Tiere, während die GvH-KMT mit einer Letalität von 90-100% assoziiert ist.

### 4.3 Immunologische Charakterisierung der BALB/cJ und der BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Maus

Die beiden Mausstämme wurden zunächst immunologisch charakterisiert, um zu prüfen, ob sich die Immunantwort nach mCMV-Infektion in den beiden Stämmen unterscheidet. Die Untersuchungen erfolgten mit immunkompetenten Tieren.

Mit Hilfe des ELISPOT-Assay wurde zunächst die mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort nach Infektion untersucht (siehe 3.2.1). Als APCs dienten P815, die mit synthetischen mCMV-Peptiden beladen wurden. Um die Frequenzen der im immunkompetenten Wirt gepriimten CD8 T-Zellen zu analysieren, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion mit mCMV-WT.Smith Milzen entnommen und daraus die CD8 T-Zellen mittels autoMACS isoliert. Diese wurden als Effektoren im ELISPOT-Assay eingesetzt.

**Abb. 4.3** zeigt das Immundominanzmuster der mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellantwort in der Milz nach mCMV-WT.Smith Infektion der BALB/cJ und BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Maus. Generell waren die mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellfrequenzen in der BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Maus geringer als in der BALB/cJ Maus. Wie zu erwarten, zeigte sich in der BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Maus eine nur geringe durch das IE1 Peptid induzierte mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort, da dieser Maus das zur Präsentation notwendige MHC-Klasse-I-Molekül L<sup>d</sup> fehlt. Die mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort wird in der BALB/cJ Maus durch die vier Peptidspezifitäten IE1, m164, M105 und m145 dominiert, während in der BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Maus die drei Peptidspezifitäten m164, M105, und m145 die mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort dominieren. Die übrigen getesteten Peptide sind als subdominant zu bewerten.

Schlussfolgerung: Die Immundominanzmuster der CD8 T-Zellspezifitäten in immunkompetenten Tieren der Stämme BALB/cJ und BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

Mit Hilfe des ELISPOT-Assay kann die mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort auf bekannte antigene Peptide von mCMV untersucht werden. Im Gegensatz dazu ist es mittels ORF Library-Analyse möglich, die Antigenität jedes ORF von mCMV zu testen (siehe 3.2.4). So können auch CD8 T-Zellen erfasst werden, die von nicht identifizierten Peptiden stammen. Es wurde das mCMV-spezifische CD8 T-Zellimmunom der akuten und *memory* Infektionsphase der beiden Mausstämme untersucht.

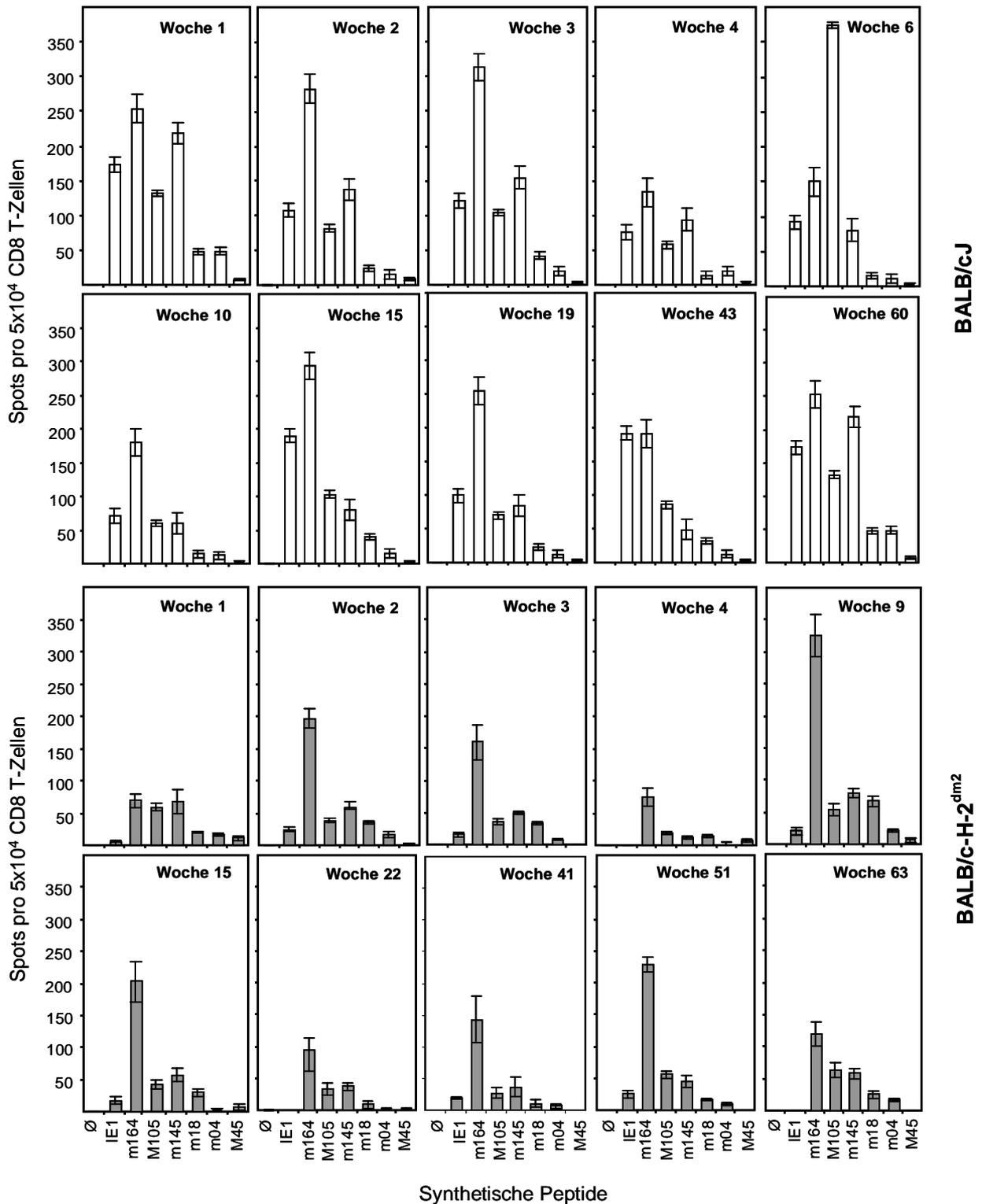
Für diese Analyse wurden BALB-SV40 mit Plasmiden transfiziert, die jeweils einen mCMV-ORF enthalten. Die ORFs wurden in den BALB-SV40 exprimiert, die entsprechenden Proteine translatiert und prozessiert. Die entstandenen Peptide wurden durch Bindung an die MHC-Komplexe auf der Zelloberfläche präsentiert. Diese, als APC dienenden transfizierten BALB-SV40, wurden mit Milzzellen der mit mCMV-WT.Smith infizierten Mäuse inkubiert. Die für antigene Peptide des jeweiligen ORF spezifischen CD8 T-Zellen wurden aktiviert und bilden IFN- $\gamma$ , welches zytofluorometrisch nachweisbar ist.

**Abb. 4.4** zeigt die ORF Library-Analyse beider Mausstämme in der akuten (eine Woche p.i.) und in der *memory* (>drei Monate p.i.) Phase der Infektion.

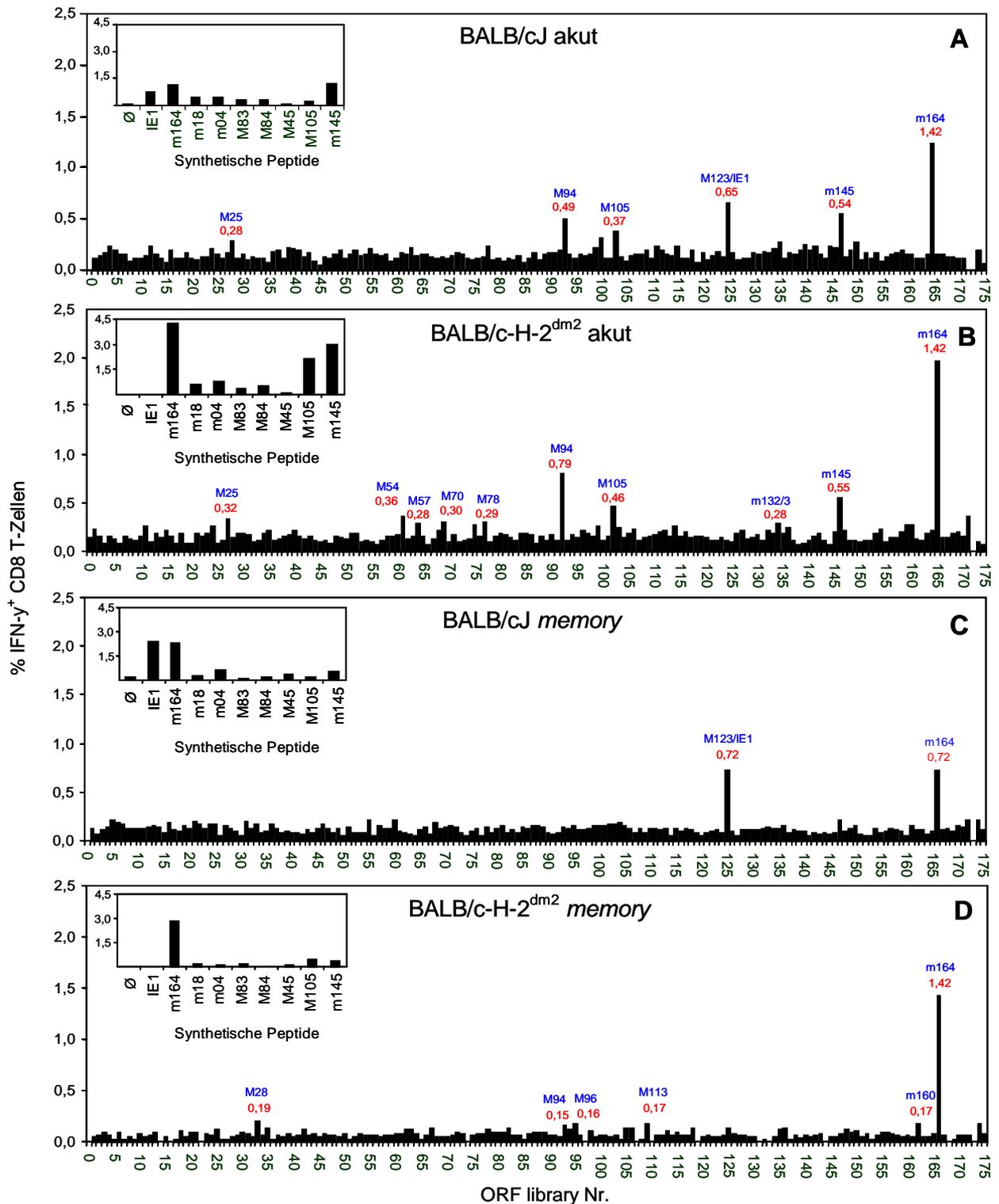
Wie schon im ELISPOT-Assay beobachtet wurde, erwies sich in der *akuten* Phase m164 als stärkstes Antigen in beiden Mausstämmen. Es zeigte sich eine starke mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort gegen ein oder mehrere vom ORF M94 kodierte antigene Peptide in der BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Maus. Wie erwartet, zeigte das immundominante IE1 Peptid keine mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellfrequenzen in der BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Maus. Unerwarteterweise zeigte die BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Maus eine stärkere mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort als die BALB/cJ Maus nach Stimulation der Effektoren mit synthetischen Peptiden (Einsätze). Wie in unserer Arbeitsgruppe mehrfach gezeigt werden konnte, ist die mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort der BALB/cJ Maus in der akut Phase vergleichbar mit der mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellantwort der BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Maus (nicht dargestellt).

In der *memory* Phase waren nur mit den IE1 und den m164 Peptid-codierenden ORFs signifikante mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellfrequenzen nachweisbar. Es fiel auf, dass in der BALB/cJ Maus die durch die Peptidspezifitäten M105 und m145 induzierte mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort im Vergleich zu Abb. 4.3 erniedrigt war. Da die Messung zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgte (Abb. 4.3: 60 Wo; Abb. 4.4: 96 Wo), könnte dies die niedrige mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort erklären.

Schlussfolgerung: Das Spezifitätsrepertoire der CD8 T-Zellen in den beiden Mausstämmen unterscheidet sich bis auf das Fehlen der IE1-Spezifität in der BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Maus nicht signifikant voneinander.



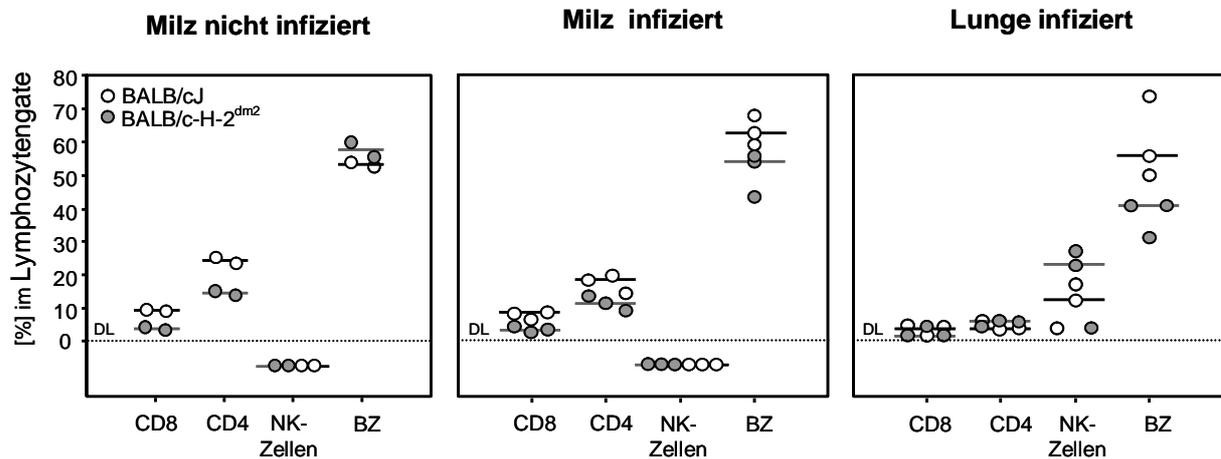
**Abb. 4.3: Vergleich der mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellfrequenzen im immunkompetenten Tier**  
 CD8 T-Zellen wurden mittels autoMACS zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion mit  $1 \times 10^5$  PFU mCMV-WT.Smith aus einem Pool von drei Milzen der BALB/cJ (weiße Balken) und der BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> (graue Balken) Maus isoliert und als Effektoren im ELISPOT-Assay eingesetzt. Die eingesetzten Effektoren wurden in einer Konzentration von  $2,5 \times 10^4$ - $1 \times 10^5$   $\log_2$  titriert. Als APC dienten mit den angegebenen synthetischen Peptiden in einer Konzentration von  $10^{-6}$ M beladene P815. Als Kontrolle dienten unbeladene P815 (Ø). Die Frequenzen IFN- $\gamma$ -produzierender CD8 T-Zellen wurden mittels linearer Regressionsanalyse mit Hilfe der Statistik-Software Mathematica V6.0.1.0 Statistics "Linear Regression" ermittelt.



**Abb. 4.4: Genomweites Antigenitäts-Screening nach Infektion mit mCMV-WT.Smith**

Mit Hilfe der ORF *Library*-Analyse wurde das mCMV-spezifische CD8 T-Zellimmunom der BALB/cJ (A+C) und der BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> (B+D) Maus in der akuten (1 Wo p.i.) und in der *memory* Phase der Infektion (BALB/cJ: 96 Wo p.i., BALB/c-H-2<sup>dm2</sup>: 56 Wo p.i.) erfasst. Tabelle 7.1 im Anhang ordnet die angegebenen ORF *Library*-Analyse Nummern den getesteten ORFs zu. Die als Effektoren verwendeten Milzzellen wurden aus jeweils sieben Versuchstieren pro Gruppe isoliert; als APCs dienten BALB-SV40, welche transient mit den Expressionsplasmiden transfiziert wurden. Die aus der Peptid-spezifischen Stimulation der Effektoren resultierende IFN- $\gamma$ -Synthese wurde zytofluorometrisch nachgewiesen. Elektronische Gates wurden dabei auf die Lymphozytenpopulation und zusätzlich auf die Population mit positiver PE-Cy5 (CD8)-Oberflächenfluoreszenz gesetzt. Als Kontrollen wurden die Effektoren mit  $1 \times 10^{-6}$  M der angegebenen synthetischen Peptide stimuliert (Einsätze). Inkubation von Effektoren mit unbeladenen APC ( $\emptyset$ ).

Als ein weiterer Parameter zum Monitoring von Unterschieden in der Immunantwort der beiden Mausstämme wurden die lymphozytären Infiltrate in den unterschiedlichen Organen zytofluorometrisch analysiert (siehe 3.2.2). Dazu wurden eine Woche nach Infektion mit mCMV-WT.Smith die Milzen und Lungen entnommen und CD8 sowie CD4 T-Zellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und B-Zellen (BZ) quantifiziert (**Abb. 4.5**).



**Abb. 4.5: Vergleich der lymphozytären Infiltration unter dem Einfluss der mCMV-Infektion im immunkompetenten Tier**

Die zytofluorometrische Analyse der BALB/cJ (weiße Symbole) und der BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> (graue Symbole) Maus erfolgte eine Woche p.i. mit  $1 \times 10^5$  mCMV-WT.Smith. CD4 und CD8 T-Zellen wurden mittels Dreifachfärbung gegen die Oberflächenmoleküle CD4, CD8 und CD3 identifiziert. B-Zellen wurden mittels Zweifachfärbung gegen die Oberflächenmoleküle CD19 und CD45R/B220, die NK-Zellen mit Hilfe der Oberflächenmarker CD49b und NKG2b identifiziert. Die Symbole stellen Einzeltierbestimmungen dar, die Mediane sind als horizontale Balken markiert. Die gestrichelte Linie markiert das Detektionslimit (DL). Gemessen wurden 30.000 Zellen im Lymphozytengate.

Es war kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der gemessenen Zellpopulationen in den beiden Mausstämmen nachweisbar, weder in den infizierten Tieren noch in den nicht infizierten Kontrolltieren. Auch organspezifische Unterschiede (Milz und Lunge) waren zwischen den beiden Mausstämmen nicht generell festzustellen. Allerdings zeigte sich ein Unterschied in der Infiltration der NK-Zellen zwischen infizierter Lunge und Milz. Während die Lunge eine deutliche Population an NK-Zellen aufwies, fehlte diese in der Milz vollständig.

Schlussfolgerung: Die lymphozytären Infiltrationen von Lunge und Milz mit und ohne mCMV-Infektion sind in beiden Mausstämmen vergleichbar.

#### 4.4 Untersuchung der mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellantwort nach allogener KMT

Mit Hilfe des ELISPOT-Assays wurde zunächst die mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort nach allogener KMT untersucht (siehe 3.2.1). Es sollte überprüft werden, ob sich die Frequenzen mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen nach HvG-KMT und GvH-KMT unterscheiden (**Abb. 4.6 und 4.7**).

Dazu wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach KMT und Infektion mit mCMV-WT.Smith Lungen und Milzen entnommen und daraus die CD8 T-Zellen mittels autoMACS isoliert. Diese wurden als Effektoren im ELISPOT-Assay eingesetzt. Als APCs dienten P815, die mit synthetischen mCMV-Peptiden beladen wurden.

Als weiterer Parameter zum Vergleich der Immunantwort nach allogener KMT und mCMV-Infektion wurden die Gesamtzellzahl (Gesamt-ZZ) und die Ausbeute an CD8 T-Zellen bestimmt. Zur Ermittlung des prozentualen Anteils der CD8 T-Zellen wurde bei der zytofluorometrischen Analyse ein Lymphozytengate gesetzt und der Anteil an T-Zellen ermittelt, die CD8 und TCR $\alpha/\beta$  exprimieren.

Generell waren die mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellfrequenzen nach GvH-KMT geringer als nach HvG-KMT. In beiden Transplantationsrichtungen wurde die mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort von den beiden Peptidspezifitäten m164 und M105 dominiert. Nach HvG-KMT war die durch das m145 Peptid induzierte mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort höher als nach GvH-KMT. Das im syngenem KMT Modell als dominant eingestufte IE1 Peptid induzierte in beiden allogenen Transplantationsrichtungen nur eine geringe mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort, die in der dritten und vierten Woche nach HvG-KMT am stärksten war. Möglicherweise erfordert die IE1 *memory* Inflation die Präsentation des IE1 Peptid auf den Rezipientenzellen. Folglich ist für den Erhalt einer IE1-spezifischen CD8 T-Zellantwort in der *memory* Phase die Expression des MHC-Klasse-I-Moleküls L<sup>d</sup> auf den Rezipientenzellen erforderlich. Nach GvH-KMT kann man den Einfluss des MHC-Klasse-I-Moleküls L<sup>d</sup> auf die IE1 *memory* Inflation nicht analysieren, da die Tiere bereits in der akuten Phase versterben. Es waren keine alloreaktiven L<sup>d</sup>-spezifischen CD8 T-Zellen nachweisbar.

Nach HvG-KMT war die Infiltration der Lunge durch CD8 T-Zellen deutlich stärker als in der Milz. Es fiel auf, dass die Gesamt-ZZ in der Milz höher war, aber der prozentuale Anteil an CD8 T-Zellen geringer. Nach GvH-KMT war die Gesamt-ZZ und der prozentuale Anteil an CD8 T-Zellen in der Milz geringer als in der Lunge.

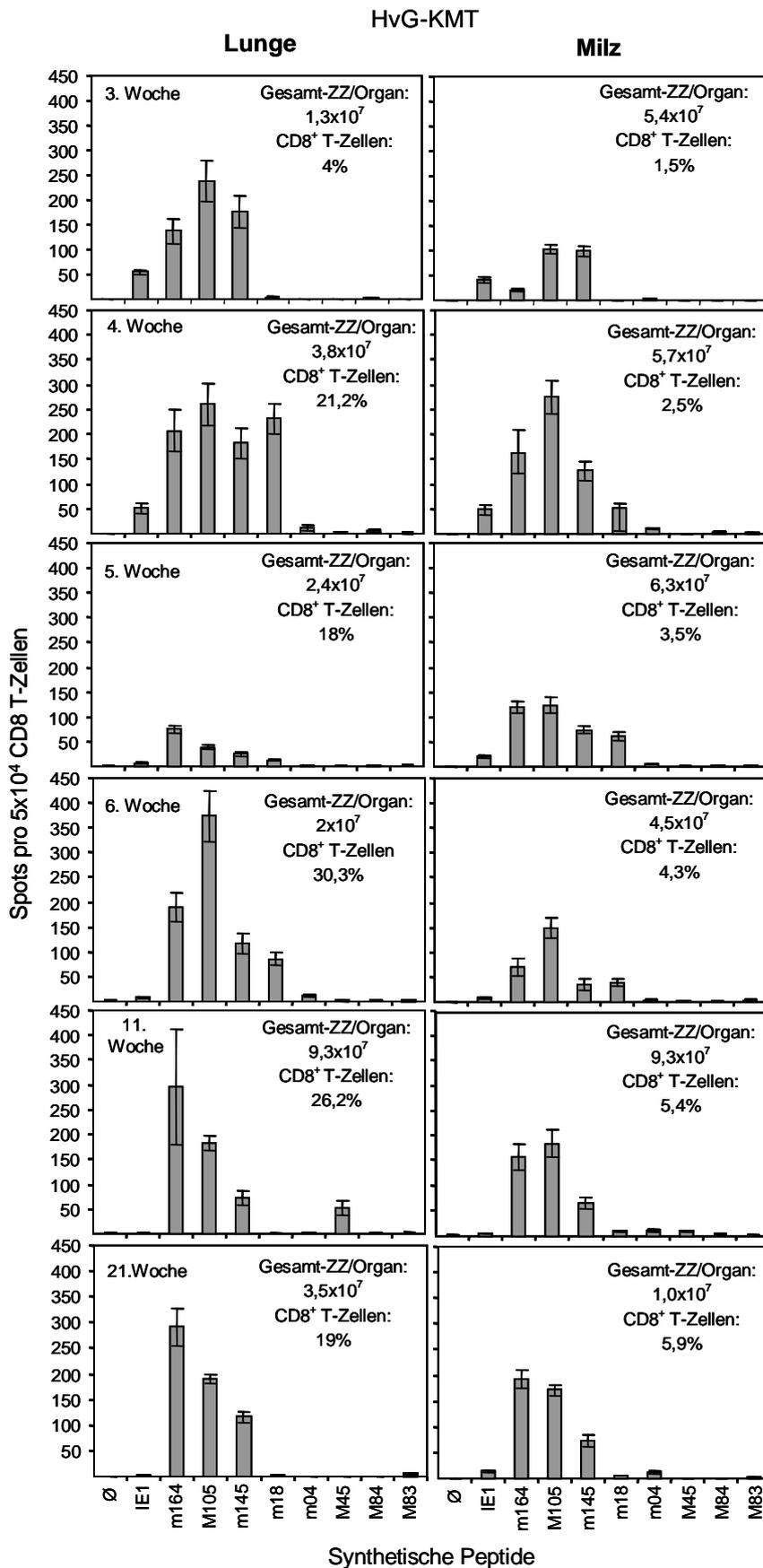
Schlussfolgerung: Nach GvH-KMT ist die mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort schwächer als nach HvG-KMT. In beiden Transplantationsrichtungen waren weder in der Lunge noch in der Milz alloreaktive L<sup>d</sup>-spezifische CD8 T-Zellen nachweisbar.

Um eine mögliche Abhängigkeit der Anwesenheit des L<sup>d</sup> Moleküls auf die mCMV-peptid-spezifische CD8 T-Zellantwort nach allogener KMT zu untersuchen, wurde eine Sortierung in L<sup>d+</sup> und L<sup>d-</sup> CD8 T-Zellen durchgeführt (**Abb. 4.8**). Das IE1 Peptid wird vom MHC-Klasse-I-Molekül L<sup>d</sup> präsentiert. Daher können ausschließlich Donoren bzw. Rezipienten, die das MHC-Klasse-I-Molekül L<sup>d</sup> exprimieren, das IE1 Peptid präsentieren. Es sollte u.a. die Frage beantwortet werden, ob es einer L<sup>d-</sup> CD8 T-Zelle möglich ist, ein L<sup>d+</sup> präsentiertes Peptid zu erkennen.

Dazu wurden drei Wochen nach KMT und Infektion mit mCMV-WT.Smith CD8 T-Zellen aus einem Pool von Lungeninfiltratzellen verwendet und mittels autoMACS isoliert. Diese wurden mittels FACSVantage SE in L<sup>d+</sup> und L<sup>d-</sup> CD8 T-Zellen sortiert. Sowohl die sortierten als auch die nicht sortierten CD8 T-Zellen wurden als Effektoren im ELISPOT-Assay eingesetzt. Als APCs dienten P815, die mit synthetischen mCMV-Peptiden beladen wurden.

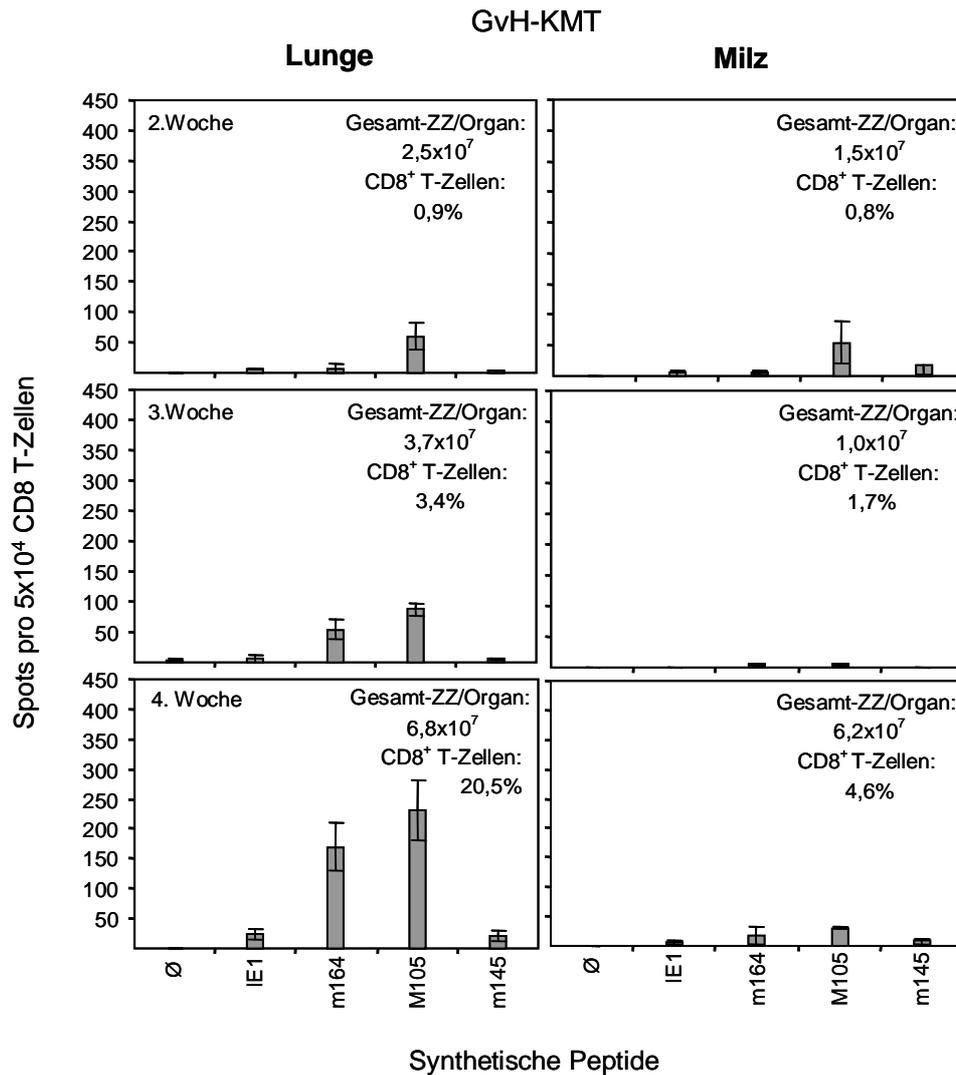
Nach HvG-KMT wurden unter den Lymphozyten 31% CD8/L<sup>d-</sup> und 34% CD8/L<sup>d+</sup> T-Zellen nachgewiesen. Es liegt folglich ein Chimärismus der CD8 T-Zellen vor. Nach GvH-KMT wurden hingegen 11% CD8/L<sup>d-</sup> und 20,6% CD8/L<sup>d+</sup> T-Zellen analysiert. Der Hauptteil der CD8 T-Zellen stammt somit vom Rezipienten ab. Beim ELISPOT-Assay wurden die eingesetzten Effektoren auf  $5 \times 10^4$ /Well genormt, um eine gleiche Ausgangssituation zur Beurteilung der mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellfrequenz der L<sup>d-</sup> und L<sup>d+</sup> CD8 T-Zellen zu schaffen. In Übereinstimmung mit dem vorherigen Ergebnis waren die mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellfrequenzen der nicht sortierten Gruppe nach GvH-KMT geringer als nach HvG-KMT. Die Spezifitätenverteilung der L<sup>d-</sup> und L<sup>d+</sup> CD8 T-Zellen war vergleichbar mit der nicht sortierten Gruppe. Die mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort wurde von den beiden Peptidspezifitäten m164 und M105 dominiert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellfrequenz zwischen beiden Transplantationsrichtungen.

Schlussfolgerung: Die Effektorzellen stammen nach HvG-KMT von Donor und Rezipient ab, während sie nach GvH-KMT hauptsächlich vom Rezipienten stammen.



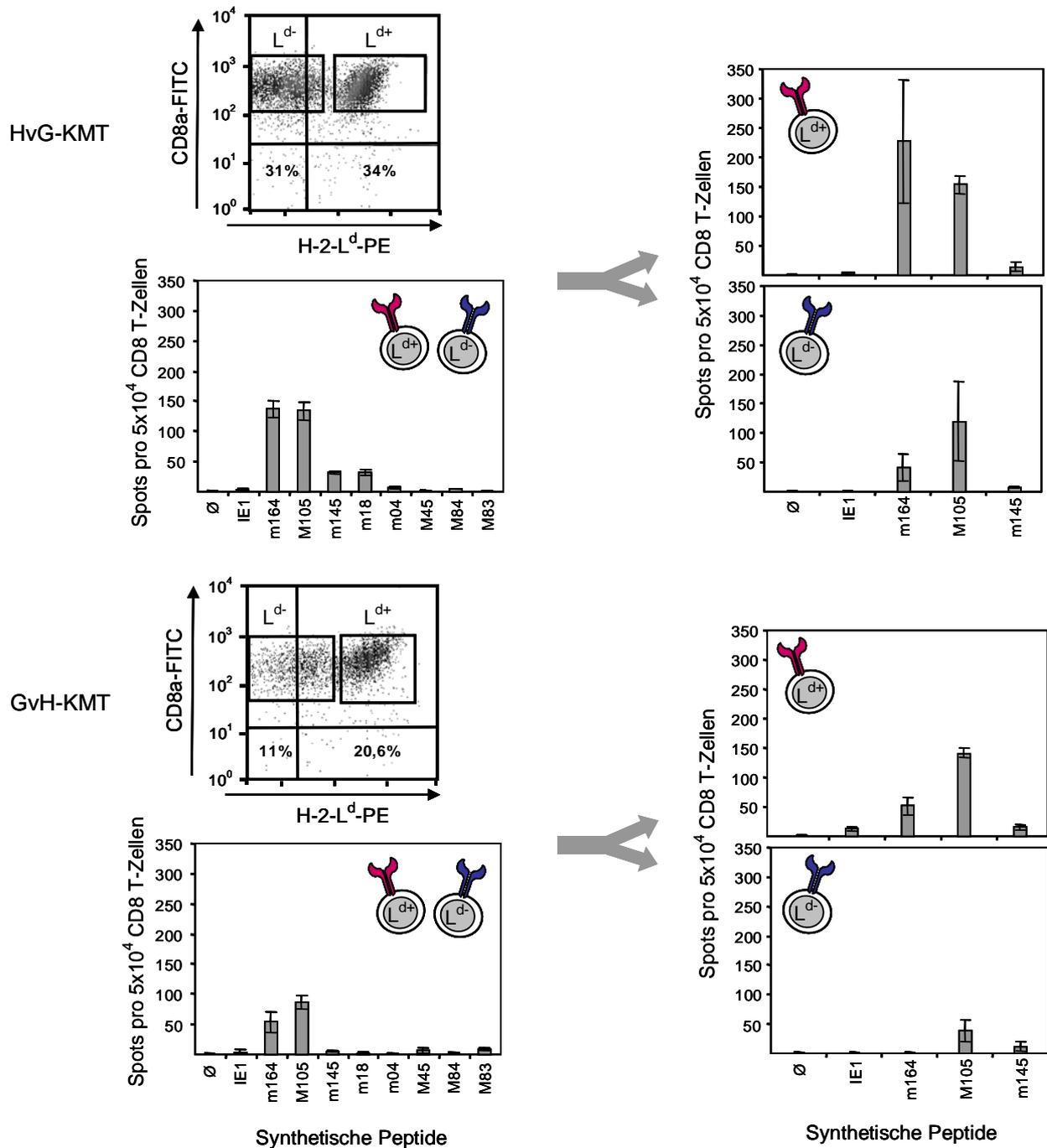
**Abb. 4.6: Vergleich der mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellfrequenzen nach HvG-KMT**

Die IFN- $\gamma$  ELISPOT Kinetik zeigt die mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort nach HvG-KMT. CD8 T-Zellen wurden mittels autoMACS zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion mit  $1 \times 10^5$  PFU mCMV-WT.Smith aus einem Pool von je neun Lungen und Milzen isoliert und als Effektoren im ELISPOT-Assay eingesetzt. Die eingesetzten Effektoren wurden in einer Konzentration von  $1,25 \times 10^4$ - $5 \times 10^4$  log<sub>2</sub> titriert. Als APC dienten mit den angegebenen synthetischen Peptiden in einer Konzentration von  $10^{-6}$ M beladene P815. Als Kontrolle für Alloreaktivität dienten unbeladene P815 ( $\emptyset$ ). Die Gesamt-ZZ pro Organ wurde mit Türcks-Lösung ermittelt und der prozentuale Anteil an CD8 T-Zellen zytofluorometrisch bestimmt. Gemessen wurden 30.000 Zellen im Lymphozytengate. Die Frequenzen IFN- $\gamma$ -produzierender CD8 T-Zellen wurden mittels linearer Regressionsanalyse mit Hilfe der Statistik-Software Mathematica V6.0.1.0 Statistics "Linear Regression" ermittelt.



**Abb. 4.7 Vergleich der mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellfrequenzen nach GvH-KMT**

Die IFN- $\gamma$  ELISPOT Kinetik zeigt die mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort nach GvH-KMT. CD8 T-Zellen wurden mittels autoMACS zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion mit  $1 \times 10^5$  PFU mCMV-WT.Smith aus einem Pool von je neun Lungen und Milzen isoliert und als Effektoren im ELISPOT-Assay eingesetzt. Die eingesetzten Effektoren wurden in einer Konzentration von  $1,25 \times 10^4$ - $5 \times 10^4$   $\log_2$  titriert. Als APC dienten mit den angegebenen synthetischen Peptiden in einer Konzentration von  $10^{-6}$ M beladene P815. Als Kontrolle für Alloreaktivität dienten unbeladene P815 ( $\emptyset$ ). Die Gesamt-ZZ pro Organ wurde mit Türcks-Lösung ermittelt und der prozentuale Anteil an CD8 T-Zellen zytofluorometrisch bestimmt. Gemessen wurden 30.000 Zellen im Lymphozytengate. Die Frequenzen IFN- $\gamma$ -produzierender CD8 T-Zellen wurden mittels linearer Regressionsanalyse mit Hilfe der Statistik-Software Mathematica V6.0.1.0 Statistics "Linear Regression" ermittelt.



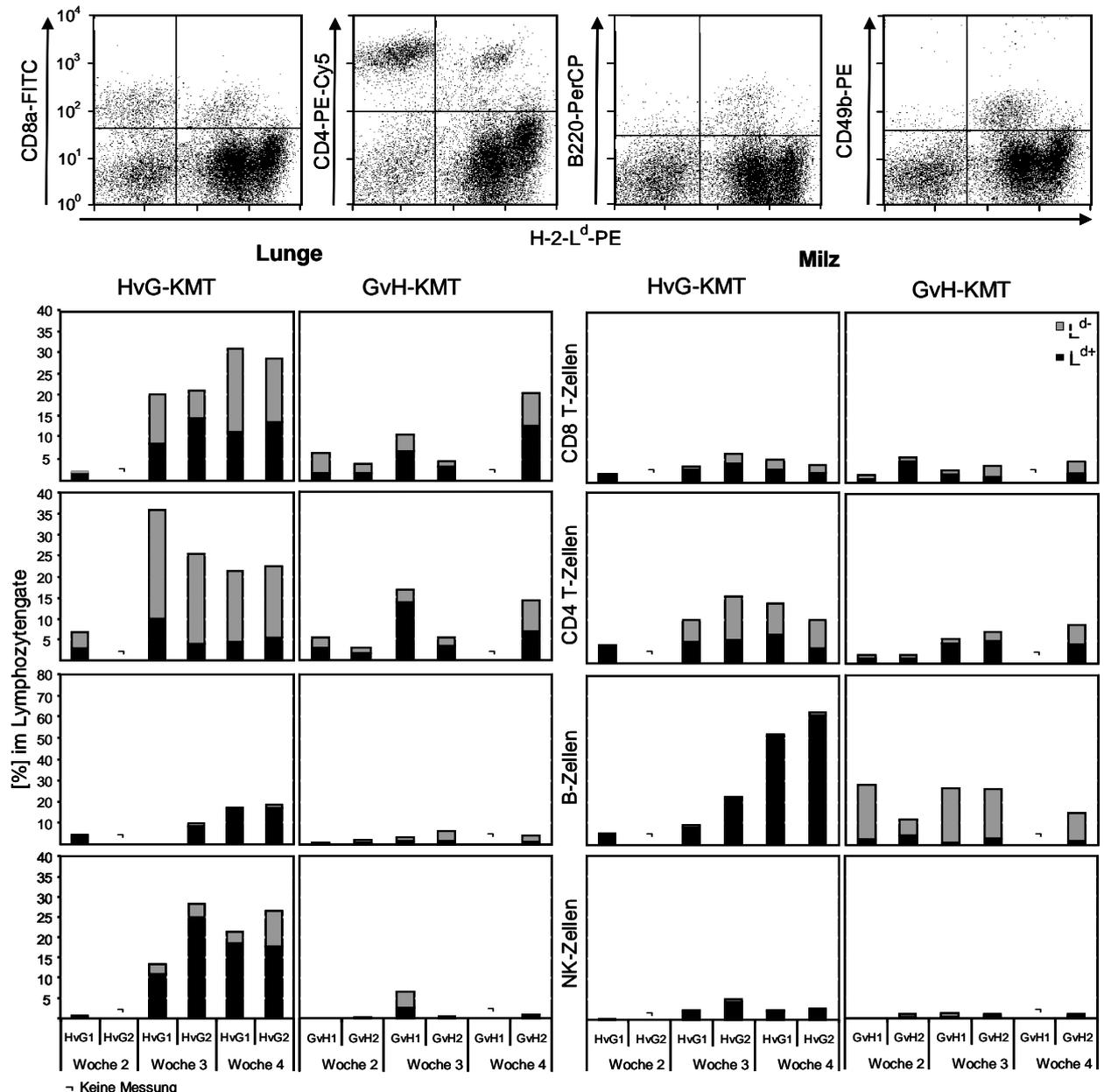
**Abb. 4.8: Herkunft der Effektorzellen von Donor oder Rezipient nach allogener KMT**

Der IFN- $\gamma$  ELISPOT Assay zeigt die mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort nach allogener KMT. CD8 T-Zellen wurden mittels autoMACS drei Wochen nach KMT und Infektion mit  $1 \times 10^5$  PFU mCMV-WT, Smith aus einem Pool von je zwanzig Lungen isoliert. Diese wurden mittels FACSVantage SE in CD8/L<sup>d+</sup> (rot) und CD8/L<sup>d-</sup> (blau) sortiert. Sowohl die sortierten als auch die nicht sortierten CD8 T-Zellen wurden als Effektoren im ELISPOT-Assay eingesetzt. Die eingesetzten Effektoren wurden in einer Konzentration von  $2,5 \times 10^4$  und  $5 \times 10^4$  eingesetzt. Als APC dienten mit den angegebenen synthetischen Peptiden in einer Konzentration von  $10^{-6}$  M beladene P815. Als Kontrolle für Alloreaktivität dienten unbeladene P815 ( $\emptyset$ ). Die Frequenzen IFN- $\gamma$ -produzierender CD8 T-Zellen wurden mittels linearer Regressionsanalyse mit Hilfe der Statistik-Software Mathematica V6.0.1.0 Statistics "Linear Regression" ermittelt.

#### 4.5 Untersuchung der Rekonstitution des Immunsystems nach allogener KMT

Als ein weiterer Parameter, um die Rekonstitution des Immunsystems nach HvG- und GvH-KMT zu vergleichen, wurden die lymphozytären Infiltrate von Lunge und Milz zytofluorometrisch analysiert (siehe 3.2.2).

Dazu wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach HvG- und GvH-KMT die Milzen und Lungen entnommen und die CD8 sowie CD4 T-Zellen, NK-Zellen und B-Zellen quantifiziert (**Abb. 4.9**).



**Abb. 4.9: Rekonstitution des Immunsystems nach allogener KMT**

Zytofluorometrische Analyse in der zweiten, dritten und vierten Woche nach HvG-KMT und GvH-KMT und Infektion mit  $1 \times 10^5$  PFU mCMV-WT.Smith. Es wurden jeweils Messungen aus zwei HvG-KMT (HvG1+HvG2) und zwei GvH-KMT (GvH1+GvH2) dargestellt. Pro Woche wurden je drei Organe isoliert und die Zellen gepoolt. CD4 und CD8 T-Zellen wurden mittels Dreifachfärbung gegen die Oberflächenmoleküle CD4, CD8 und CD3 analysiert. B-Zellen wurden mittels Zweifachfärbung gegen die Oberflächenmoleküle CD45R/B220 und CD3 analysiert. NK-Zellen wurden mittels Zweifachfärbung gegen die Oberflächenmoleküle CD49b und dem MHC-Klasse-I-Molekül L<sup>d</sup> identifiziert. Gemessen wurden 30.000 Zellen im Lymphozytengate. L<sup>d+</sup> Zellen sind schwarz dargestellt, L<sup>d-</sup> grau. An den mit einem Stern (\*) markierten Zeitpunkten erfolgte keine Messung.

In beiden Transplantationsrichtungen zeigte sich ein Donor/Rezipienten-Chimärismus, sowohl bei den CD8 als auch bei den CD4 T-Zellen. Der größte Anteil der B-Zellen und NK-Zellen stammte vom Donor. Ab der dritten Woche nach HvG-KMT zeigte sich in der Lunge eine starke Infiltration durch CD8 und CD4 T-Zellen und NK-Zellen. Nach GvH-KMT zeigte sich in der Lunge eine nur geringe Infiltration durch CD8 und CD4 T-Zellen, während die Infiltration durch NK- und B-Zellen fast vollständig fehlte. In der Milz war die Infiltration durch B-Zellen höher nach HvG-KMT als nach GvH-KMT.

Schlussfolgerung: Nach GvH-KMT ist die lymphozytäre Infiltration vor allem in der Lunge vermindert.

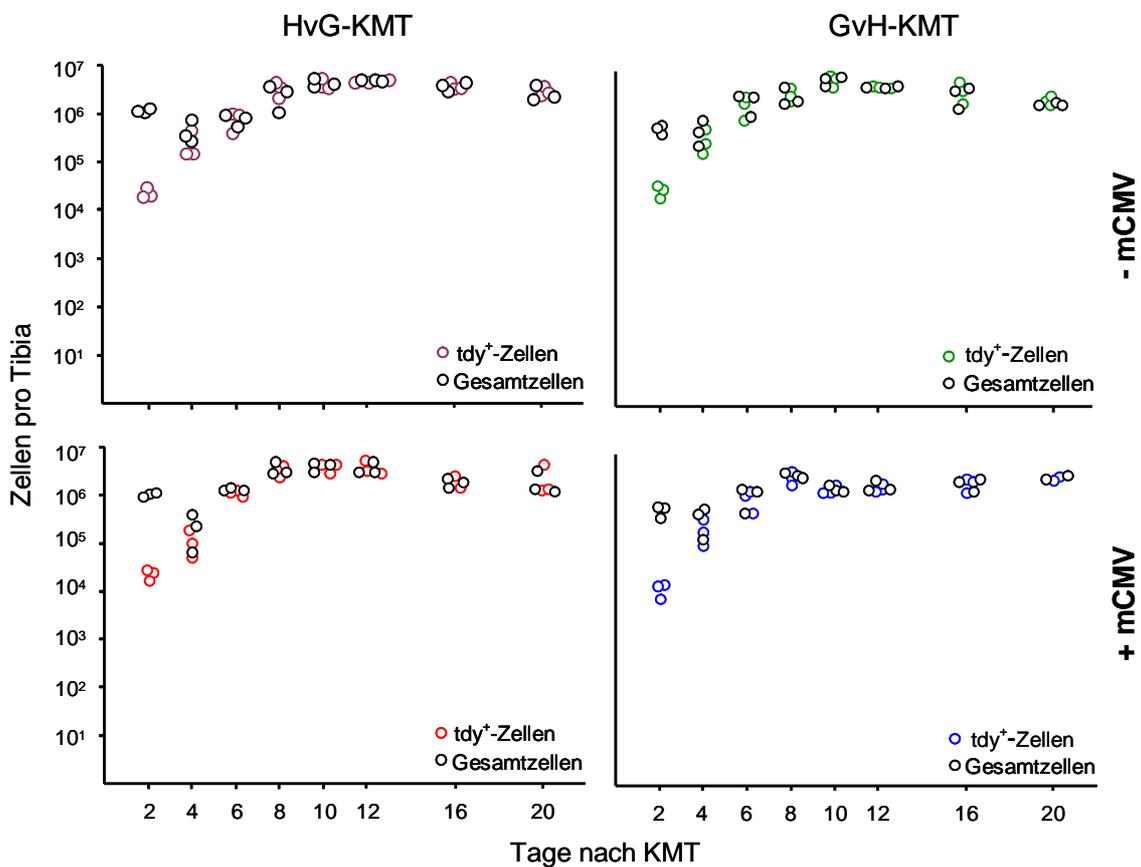
#### **4.6 Untersuchung der hämatopoetischen Rekonstitution nach allogener KMT**

Basierend auf der Kenntnis, dass es nach GvH-KMT zu einer Verminderung der lymphozytären Infiltrate in Lunge und Milz kommt, wurde die hämatopoetische Rekonstitution der Rezipienten untersucht. Die Untersuchung erfolgte in einer Kinetik, um den Zeitpunkt einer möglichen Beeinträchtigung der hämatopoetischen Rekonstitution zu erfassen. Die Transplantation erfolgte mit und ohne Infektion, um zwischen einer MHC-Klasse-I-Disparität bedingten und einer durch die mCMV-Infektion bedingten Beeinträchtigung der hämatopoetischen Rekonstitution zu differenzieren.

Zur Untersuchung der hämatopoetischen Rekonstitution wurden die KMZ männlicher Donoren verwendet, um die Donorzellen von den weiblichen Rezipientenzellen mittels qPCR unterscheiden zu können (siehe 3.6.1). Dazu wurde nach HvG-KMT und GvH-KMT zu verschiedenen Zeitpunkten aus den KMZ der Rezipienten DNA isoliert und quantifiziert. Um das Verhältnis von Donor zu Rezipienten KMZ zu bestimmen, wurde das Y-chromosomale *sry* Gen mit entsprechenden Primern amplifiziert. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde das *pthrp* Gen quantifiziert.

Die Untersuchung der hämatopoetischen Rekonstitution (**Abb. 4.10**) des KM zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Transplantationsrichtungen. Es fiel auf, dass auch kein Unterschied zwischen den infizierten und nicht infizierten Tieren bestand. Die Möglichkeit einer Störung der hämatopoetischen Rekonstitution aufgrund von MHC-Klasse-I-Disparität oder mCMV-Infektion ist somit auszuschließen.

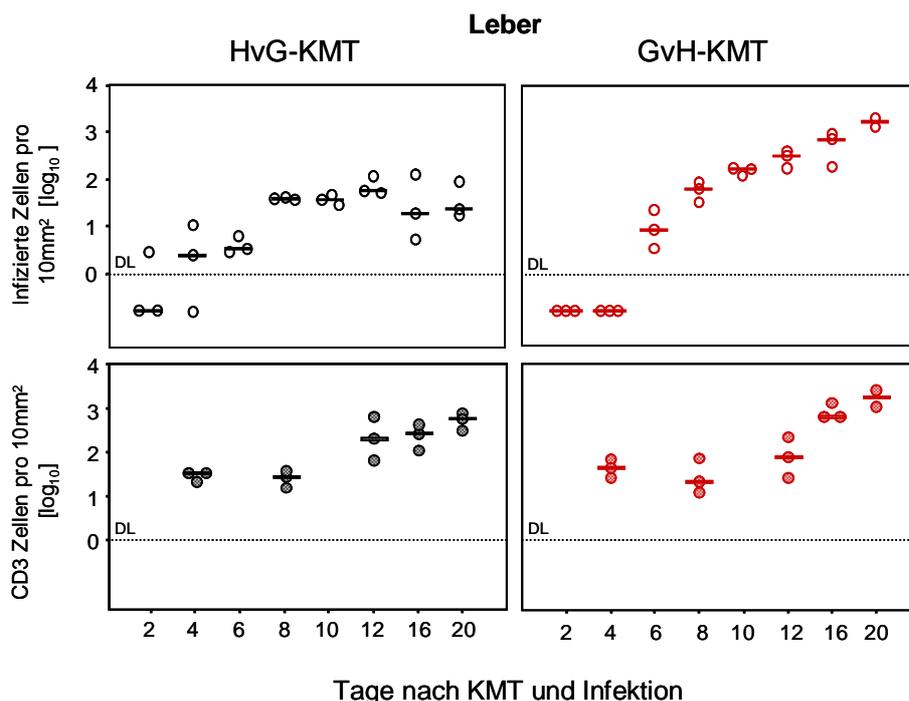
Die immunhistologische Untersuchung (**Abb. 4.11**) sollte weitere Erkenntnisse über die Zahl infizierter Zellen und CD3 Zellen nach allogener KMT liefern. Dazu wurden in dem in Abb. 4.10 dargestellten Experiment zu jedem Zeitpunkt zusätzlich die Lebern entnommen und immunhistologisch analysiert (siehe 3.4.1).



**Abb. 4.10: Hämatopoetische Rekonstitution des KM nach allogener KMT**

Die *sry* qPCR wurde durchgeführt, um die Ansiedlung von männlichen KMZ in weiblichen Rezipienten zu untersuchen. Die Tiere wurden mit 7Gy bestrahlt und es wurden  $1 \times 10^7$  KMZ transferiert. Die Hälfte der Mäuse jeder KMT-Gruppe wurde mit  $1 \times 10^5$  PFU mCMV-WT.Smith infiziert. Pro Zeitpunkt wurde KM von je drei Tieren aus beiden Tibiae pro Transplantationsrichtung isoliert. Anschließend wurde aus dem KM DNA gewonnen. Um das Verhältnis von Donor zu Rezipienten KMZ zu bestimmen, wurde das Y-chromosomale *sry* Gen und zur Bestimmung der Gesamtzellzahl das *pthrp* Gen quantifiziert. Die Symbole stellen Einzeltierbestimmungen dar.

**Abb. 4.11** zeigt die Zahl mCMV infizierter Zellen und CD3 Zellen in der Leber nach allogener KMT. Die Infiltration der Leber durch CD3 Zellen unterschied sich nicht signifikant in beiden Transplantationsrichtungen. Dagegen blieb die Zahl infizierter Leberzellen acht Tage nach HvG-KMT und Infektion konstant, während sie nach GvH-KMT weiter anstieg. Am zwanzigsten Tag nach GvH-KMT war die Zahl infizierter Zellen um zwei  $\log_{10}$  Stufen höher als nach HvG-KMT. Es fiel auf, dass trotz hoher Infiltration durch CD3 Zellen nach GvH-KMT viele infizierte Leberzellen nachweisbar waren.



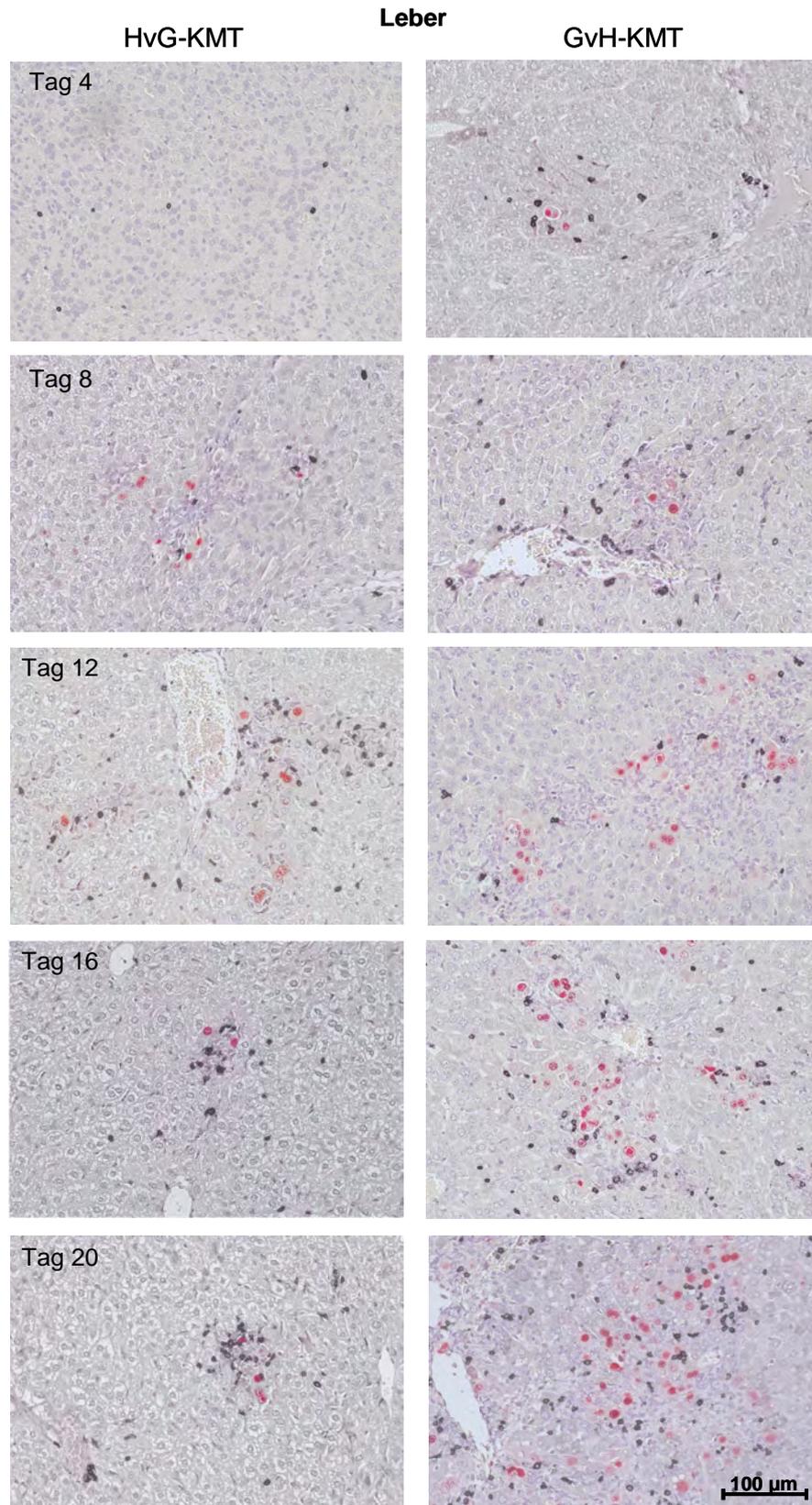
**Abb. 4.11: Infektionsverlauf in der Leber nach allogener KMT**

Die Zahl mCMV-infizierter Leberzellen wurde immunhistologisch durch den Nachweis des viralen mCMV-IE1-pp76/89 Proteins ermittelt, die Quantifizierung infiltrierender CD3 Zellen erfolgte parallel mittels Doppelfärbung für eine repräsentative Fläche von  $10\text{mm}^2$ . Pro Zeitpunkt und Transplantationsrichtung wurde von je drei Tieren die Leber untersucht. Die HvG-KMT ist in schwarz, die GvH-KMT in rot dargestellt. Die Mediane sind als horizontale Balken markiert. Die gestrichelte Linie markiert das Detektionslimit (DL).

**Abb. 4.12** zeigt immunhistologische Gewebeschnitte der Leber nach KMT. Nach HvG-KMT zeigte sich eine geringe Zahl infizierter Leberzellen (rot) und eine mässige Infiltration durch CD3 Zellen (schwarz). Ab Tag sechzehn trat eine verstärkte „Fokusbildung“ auf, wo die Mehrzahl der CD3 Zellen um infizierte Zellen gruppiert waren, also eine zielgerichtete Infiltration vermutet werden kann (Alterio de Goss *et al.*, 1998, Böhm *et al.*, 2008a). Nach GvH-KMT zeigte sich, dass mehr Leberzellen infiziert waren als nach HvG-KMT, trotz vergleichbarer Infiltration durch CD3 Zellen. Die infizierten Zellen und die CD3 Zellen waren überwiegend diffus verteilt. Eine Fokusbildung war nur im Ansatz erkennbar.

In beiden Transplantationsrichtungen fiel eine weitere Population von Zellen auf (nicht angefärbt), die weder infiziert noch CD3 positiv waren. Diese Zellen gruppierten sich um infizierte Leberzellen.

Schlussfolgerung: Nach GvH-KMT ist die hämatopoetische Rekonstitution weder aufgrund der MHC-Klasse-I-Disparität von Donor und Rezipient noch aufgrund der mCMV-Infektion gestört. Trotz der hohen Anzahl an CD3 Zellen konnte die mCMV-Infektion in der Leber nach GvH-KMT nicht kontrolliert werden. Nach HvG-KMT zeigte sich eine Fokusbildung, bei der infizierte Zellen von CD3 Zellen umringt sind, während nach GvH-KMT die CD3 Zellen und die infizierten Zellen diffus verteilt auftreten.



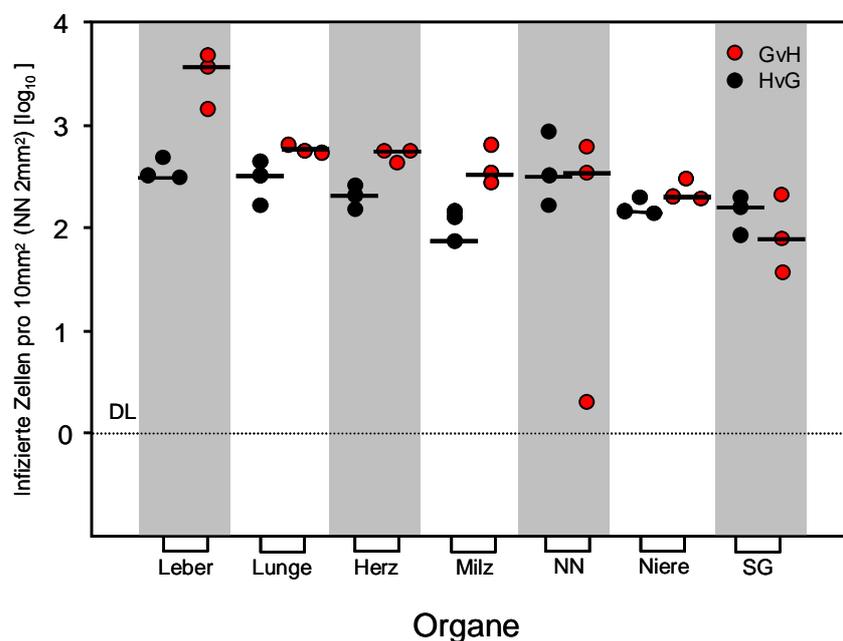
**Abb. 4.12: Immunhistologie der Leber nach allogener KMT**

Die Zahl mCMV-infizierter Leberzellen wurde immunhistologisch durch den Nachweis des viralen mCMV-IE1-pp76/89 Proteins (rot) ermittelt, die Quantifizierung infiltrierender CD3 Zellen (schwarz) erfolgte parallel mittels Doppelfärbung für eine repräsentative Fläche von  $10\text{mm}^2$ . Pro Zeitpunkt wurden je drei Organe pro Transplantationsrichtung untersucht. Dargestellt sind exemplarische Leberschnitte von je einem Tier nach HvG-KMT und GvH-KMT.

#### 4.7 Untersuchung der mCMV-Infektion nach allogener KMT in verschiedenen Organen

Die immunhistologischen Untersuchungen haben gezeigt, dass die Zahl infizierter Zellen in der Leber nach GvH-KMT deutlich höher war als nach HvG-KMT. Es stellte sich die Frage, ob dieser Unterschied auch in anderen Organen nach allogener KMT und mCMV-Infektion zu finden ist.

Dazu wurden am zwanzigsten Tag nach HvG- und GvH-KMT Leber, Lunge, Herz, Milz, Nebenniere (NN), Niere und Speicheldrüse (SG) entnommen und immunhistologisch (siehe 3.4.1) untersucht (**Abb. 4.13**).



**Abb. 4.13: Quantifizierung von infizierten Zellen in verschiedenen Organen nach allogener KMT und mCMV-Infektion**

Am zwanzigsten Tag nach KMT und Infektion mit  $1 \times 10^5$  PFU mCMV-WT.Smith wurden von je drei Tieren nach HvG-KMT und GvH-KMT verschiedene Organe entnommen. Die Zahl mCMV-infizierter Zellen wurde immunhistologisch durch den Nachweis des viralen mCMV-IE1-pp76/89 Proteins für eine repräsentative Fläche von  $10 \text{ mm}^2$  (bzw.  $\text{NN } 2 \text{ mm}^2$ ) ermittelt. Die Mediane sind als horizontale Balken markiert. Die gestrichelte Linie markiert das Detektionslimit (DL) des Assays.

Nach HvG-KMT zeigte die Zahl infizierter Zellen keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Organen. In Leber, Lunge, Herz und Milz war nach GvH-KMT die Zahl infizierter Zellen am höchsten. Bei NN, Niere und SG zeigte die Zahl infizierter Zellen keinen signifikanten Unterschied in beiden Transplantationsrichtungen. Nach GvH-KMT erwies sich die Leber als das Organ mit der höchsten Zahl infizierter Zellen.

Schlussfolgerung: Nach GvH-KMT ist die Leber das Organ mit der höchsten Zahl infizierter Zellen.

#### 4.8 Analyse der Leberinfiltrate nach allogener KMT

Die bisherigen immunhistologischen Ergebnisse zeigten, dass trotz hoher Infiltration durch CD3 Zellen **nach GvH-KMT** viele infizierte Leberzellen nachweisbar waren. Daher war das nächste Ziel der Arbeit die weitere Charakterisierung der CD3 Zellen.

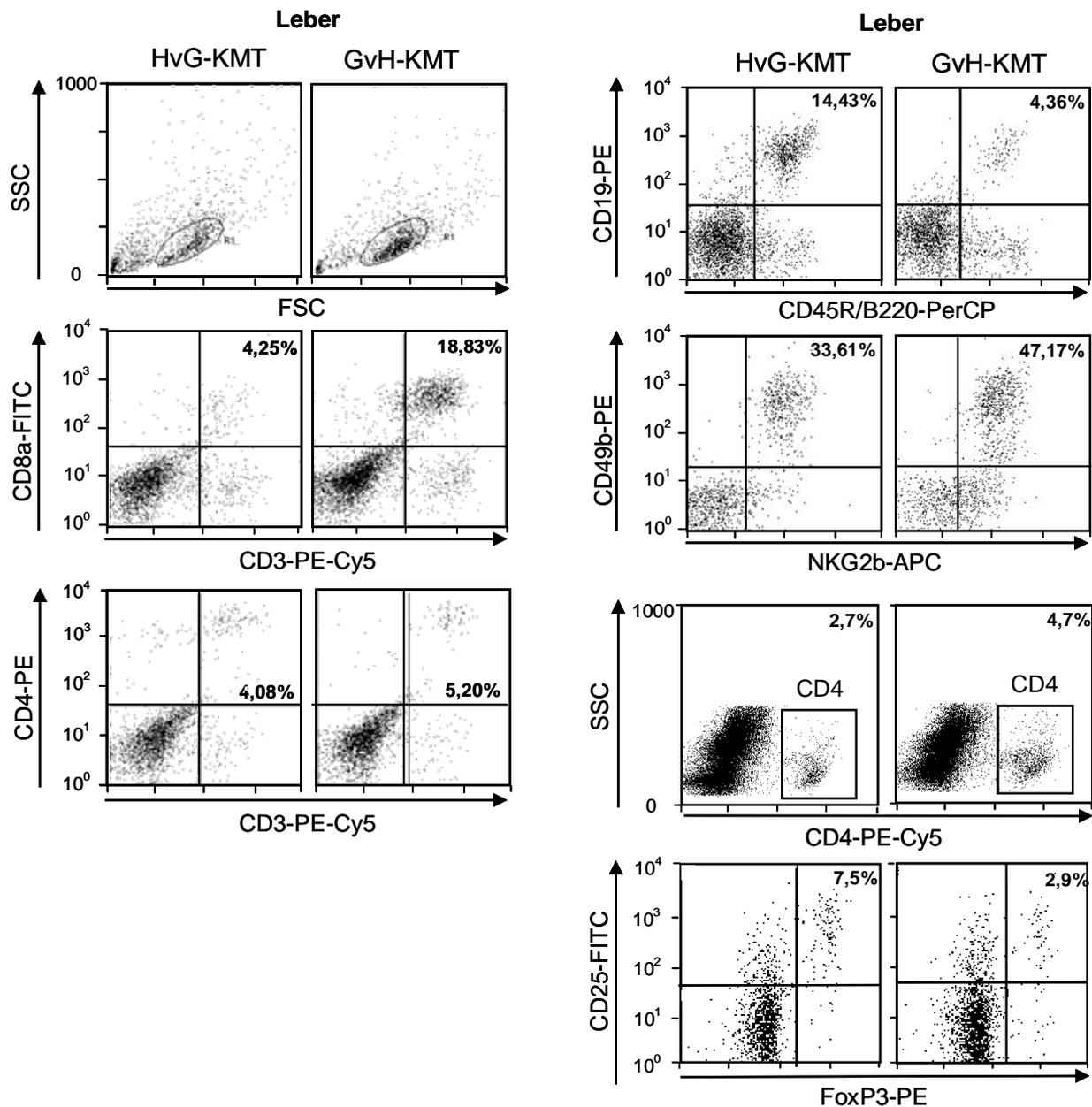
Dazu wurde von den CD3 Zellen in der Leber der prozentuale Anteil an CD4 bzw. CD8 T-Zellen ermittelt. Zusätzlich sollten die Zellen identifiziert werden, die sich um die infizierten Zellen gruppieren, aber CD3 negativ waren.

Am zwanzigsten Tag nach HvG- und GvH-KMT wurde eine zytofluorometrische Analyse der Leber durchgeführt. Besonderes Interesse galt auch den CD3 negativen Zellen, die immunhistologisch als signifikante Zellpopulation identifiziert worden waren. Daher wurden CD4 und CD8 T-Zellen (CD4, CD8, CD3), B-Zellen (CD19, CD45R/B220), NK-Zellen (CD49b, NKG2b) und Tregs (CD4, CD25, FoxP3) zytofluorometrisch quantifiziert (siehe 3.2.2).

Nach GvH-KMT lag der prozentuale Anteil der CD8 T-Zellen in der Leber bei ca.19%, während er nach HvG-KMT nur bei ca. 4% lag. Die Infiltration der Leber durch CD3/CD4 T-Zellen war in beiden Transplantationsrichtungen vergleichbar. Nach HvG-KMT war der prozentuale Anteil an B-Zellen um 10% höher als nach GvH-KMT. Die Infiltration der Leber durch NK-Zellen war nach HvG-KMT geringer als nach GvH-KMT. Der prozentuale Anteil der CD4 T-Zellen in der Leber lag nach HvG-KMT bei 2,7% und nach GvH-KMT bei 4,7%. Interessanterweise war der Anteil an CD25/FoxP3 T-Zellen unter den CD4 T-Zellen nach HvG-KMT höher als nach GvH-KMT (HvG-KMT: 7,5%; GvH-KMT: 2,9%). Wie bereits erwähnt, haben vom Rezipienten stammende Tregs in vivo eine suppressive Wirkung auf die GvHD, reduzieren somit eine GvHD und fördern den GvL Effekt (zur Übersicht: Welniak *et al.*, 2007). Ein geringerer Anteil von Tregs nach GvH-KMT im Vergleich zur HvG-KMT könnte sich nachteilig auf eine mögliche GvHD auswirken.

Wie bereits immunhistologisch gezeigt, ist eine signifikante Anzahl an CD3 Zellen mit einer für die beiden Transplantationsrichtungen **charakteristischen Verteilung** im Lebergewebe nachweisbar. Es stellte sich die Frage, um welche T-Zellsubpopulation es sich handelt: CD3/CD4 oder CD3/CD8 T-Zellen. Da die derzeit verfügbaren AK gegen CD4 und CD8 nicht paraffingängig sind, wurde eine Kryostathistologie durchgeführt. Gleichzeitig sollte mit dieser Technik geklärt werden, ob es sich bei der dritten Population, die histologisch deutlich sichtbar aber nicht angefärbt war, um Makrophagen oder NK-Zellen handelt.

Dazu wurden am zwanzigsten Tag nach HvG-KMT und GvH-KMT den Tieren die Lebern entnommen, Gefrierschnitte angefertigt und mit AK gegen CD4 T-Zellen, CD8 T-Zellen und Makrophagen (F4-80) gefärbt (**Abb. 4.15**).

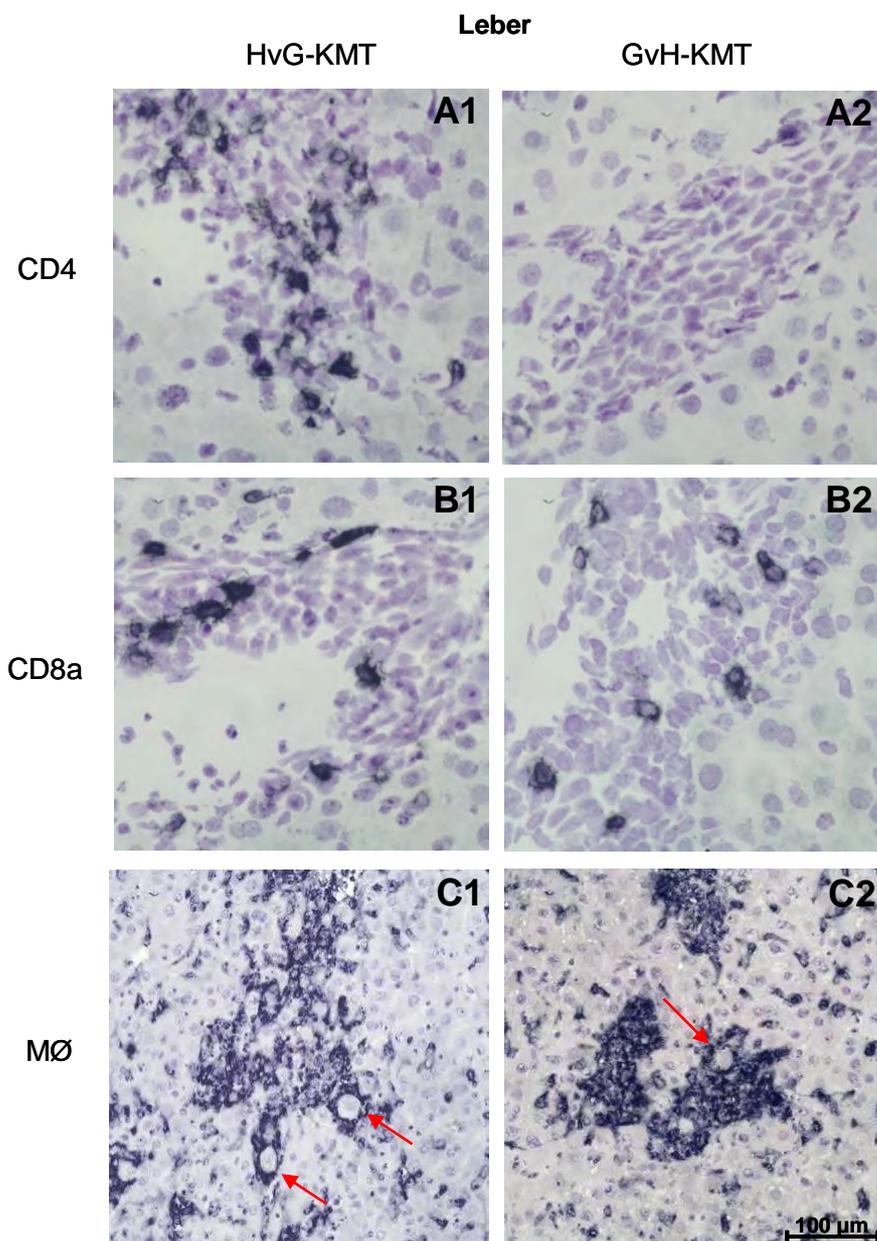


**Abb. 4.14: Zytofluorometrische Analyse der CD3 Zellen der Leber nach allogener KMT**

Zytofluorometrische Analyse der Leber am zwanzigsten Tag nach allogener KMT und Infektion mit  $1 \times 10^5$  PFU mCMV-WT.Smith. Pro Transplantationsrichtung wurde ein Pool aus drei Organen eingesetzt. CD4 und CD8 T-Zellen wurden mittels Dreifachfärbung gegen die Oberflächenmoleküle CD4, CD8 und CD3 identifiziert. B-Zellen wurden mittels Zweifachfärbung gegen die Oberflächenmoleküle CD19 und CD45R/B220, die NK-Zellen mit Hilfe der Oberflächenmarker CD49b und NKG2b identifiziert. Die *Dot Plots* repräsentieren die Fluoreszenzintensitäten von 30.000 Zellen im Lymphozytengate; dargestellt sind alle Zellen. Tregs wurden durch die Oberflächenfärbung von CD4 und CD25, sowie durch die intrazelluläre Färbung von FoxP3 nachgewiesen.

Nach GvH-KMT war die Zahl der CD4 T-Zellen geringer als nach HvG-KMT, wohingegen die Infiltration der Leber durch CD8 T-Zellen stärker war. In beiden Transplantationsrichtungen war eine massive Infiltration der Leber durch Makrophagen zu beobachten. Nach GvH-KMT schien die Infiltration der Leber durch Makrophagen noch ausgeprägter als nach HvG-KMT. In beiden Transplantationen gruppierten sich die Makrophagen um die infizierten Zellen.

Schlussfolgerung: Die Infiltration der Leber durch CD8 T-Zellen und NK-Zellen nach GvH-KMT ist stärker als nach HvG-KMT. Die Kryostathistologie zeigt, dass in beiden Transplantationsrichtungen eine massive Infiltration der Leber durch Makrophagen zu beobachten ist.



**Abb. 4.15:**  
**Kryostathistologie der Leber nach allogener KMT**  
 Kryostathistologie der Leber am zwanzigsten Tag nach allogener KMT und Infektion mit  $1 \times 10^5$  PFU mCMV-WT.Smith. Es wurden jeweils von fünf Tieren aus jeder Transplantationsrichtung Gewebeblöcke von  $1 \text{ cm}^3$  entnommen. Gefärbt wurde mit AK gegen CD4 T-Zellen (A1+A2), CD8 T-Zellen (B1+B2) und Makrophagen [MØ] (C1+C2) mittels Einfachfärbung (schwarz). Die roten Pfeile weisen auf mCMV infizierte, zytomegale Leberzellen, so genannte „Eulenaugenzellen“ hin. Dargestellt sind exemplarisch Leberschnitte von je einem Tier nach HvG-KMT und GvH-KMT.

#### 4.9 Immunologische Charakterisierung der CD8 T-Zellen der Leber nach allogener KMT

Die bisherigen immunhistologischen Ergebnisse zeigten, dass nach GvH-KMT viele Leberzellen infiziert waren, trotz Infiltration durch CD3 Zellen. Da zytofluorometrisch gezeigt werden konnte, dass der Anteil an CD8 T-Zellen unter den CD3 Zellen sehr hoch war, stellte sich die Frage, ob die CD8 T-Zellen eine schützende Wirkung haben.

Aus diesem Grunde war das nächste Ziel der Arbeit die **funktionelle** Untersuchung der CD8 T-Zellen in der Leber.

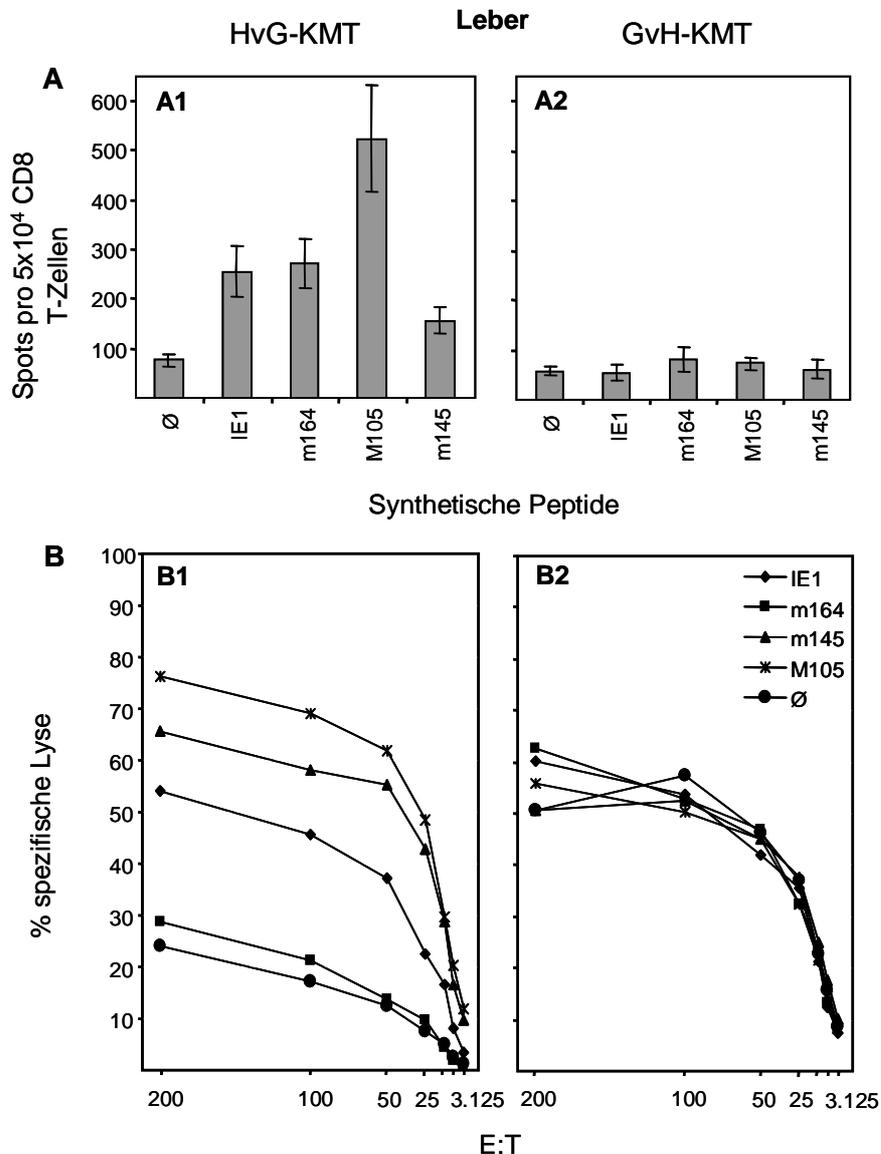
Mit Hilfe des ELISPOT-Assays wurde zunächst die mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort nach allogener KMT untersucht (siehe 3.2.1). Da es sich bei CD8 T-Zellen prinzipiell um zytolytisch aktive Zellen handelt, sollte außerdem die zytolytische Aktivität der CD8 T-Zellen mittels Zytolysetest überprüft werden (siehe 3.2.5). Während im ELISPOT-Assay die Effektoraktivität (IFN- $\gamma$  Produktion) auf Einzelzellebene abgefragt werden kann, ist es im Zytolysetest nicht möglich zu entscheiden, ob die gemessene Zytolyse auf die Aktivität aller eingesetzten Effektoren oder aber auf die Aktivität einiger weniger zytolytischer Effektorzellen im Testansatz zurückzuführen ist (**Abb. 4.16**).

Dazu wurden am zwanzigsten Tag nach KMT und Infektion mit mCMV-WT.Smith die Lebern entnommen und die CD8 T-Zellen mittels autoMACS isoliert. Diese wurden als Effektoren im ELISPOT-Assay und im Zytolysetest eingesetzt.

Im ELISPOT-Assay zeigte sich, dass die mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort nach GvH-KMT geringer ist als nach HvG-KMT. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass im ELISPOT-Assay nach syngener KMT P815 unspezifisch von CD8 T-Zellen erkannt werden können (nicht dargestellt). Diese unspezifische Erkennung erfolgte in beiden Transplantationsrichtungen ( $\emptyset$ ). Um nachzuweisen ob es sich bei den mCMV-spezifischen CD8 T-Zellen um alloreaktive CD8 T-Zellen handelt, müsste der Nachweis mit einer L<sup>d</sup> APC erfolgen.

Der Zytolysetest zeigte, dass nach HvG-KMT zytolytische Aktivität der mCMV-peptidspezifischen T-Zellen nachweisbar war. Da nach GvH-KMT die unspezifische CD8 T-Zellantwort höher ist als nach HvG-KMT, lässt dies auf alloreaktive CD8 T-Zellen schließen. Aufgrund der hohen zytolytischen Aktivität der alloreaktiven CD8 T-Zellen nach GvH-KMT lässt sich der prozentuale Anteil der mCMV-peptidspezifischen T-Zellen nicht differenzieren. Im ungünstigsten Fall sind nach GvH-KMT keine mCMV-peptidspezifischen T-Zellen vorhanden.

**Schlussfolgerung:** Nach GvH-KMT sind alloreaktive CD8 T-Zellen nachweisbar, die zytolytisch aktiv sind.



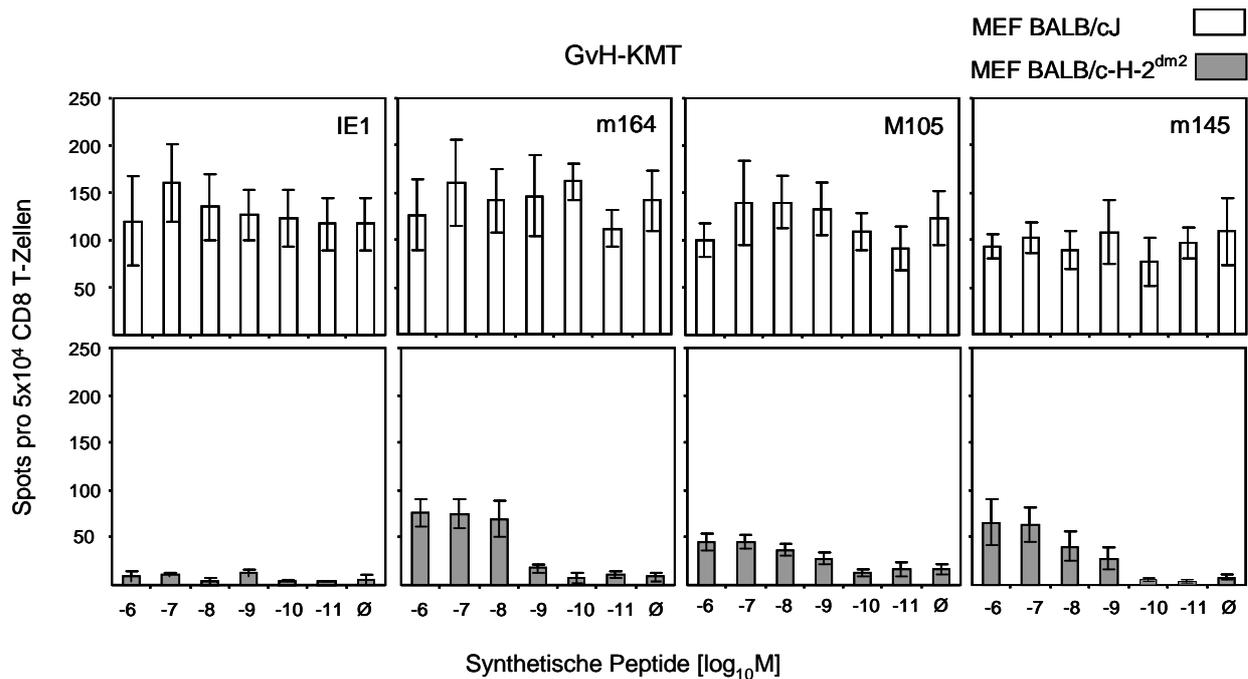
**Abb. 4.16: Funktionelle Analyse mCMV-peptidspezifischer CD8 T-Zellen der Leber nach allogener KMT**  
 Vergleich der Frequenzen (A) und der zytolytischen Aktivität (B) mCMV-peptidspezifischer CD8 T-Zellen nach allogener KMT und Infektion mit  $1 \times 10^5$  PFU mCMV-WT.Smith. CD8 T-Zellen wurden mittels autoMACS am zwanzigsten Tag aus einem Pool von je zwanzig Lebern isoliert und als Effektoren im ELISPOT-Assay sowie im Zytolysetest eingesetzt. Eingesetzte Effektorkonzentrationen im ELISPOT-Assay:  $1 \times 10^4$ ,  $2,5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ , im Zytolysetest:  $3,125 \times 10^3$  -  $2 \times 10^5$   $\log_2$  titriert. Die Experimente wurden parallel mit dem gleichen Effektorzellpool durchgeführt. Als APC dienten mit den angegebenen synthetischen Peptiden in einer Konzentration von  $10^{-6}$ M beladene P815. Im Zytolysetest wurden die P815 in einer Konzentration von  $1 \times 10^3$ /Well eingesetzt. Als Kontrolle für Alloreaktivität dienten unbeladene P815 (Ø). Die Frequenzen IFN- $\gamma$ -produzierender CD8 T-Zellen wurden mittels linearer Regressionsanalyse mit Hilfe der Statistik-Software Mathematica V6.0.1.0 Statistics "Linear Regression" ermittelt.

Der Zytolysetest zeigte, dass nach GvH-KMT alloreaktive CD8 T-Zellen auftraten. Mittels ELISPOT-Assay sollte die Frage geklärt werden, ob sich unter den alloreaktiven T-Zellen mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellen verbergen. Zur Differenzierung von alloreaktiven T-Zellen und mCMV-peptidspezifischen T-Zellen dienen  $L^{d+}$  und  $L^{d-}$  APC. Zusätzlich sollte die funktionelle Avidität der evt. vorhandenen mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellen untersucht werden (**Abb. 4.17**). Die funktionelle Avidität von CD8 T-Zellen hängt unter anderem von der Affinität des TCR für den pepMHC ab (zur Übersicht: Kedl *et al.*, 2003). Während in großer Zahl präsentierte antigene Peptide auch von CD8 T-Zellen niedrigerer Avidität erkannt werden und diese aktivieren, werden Peptide, die in geringer Menge präsentiert werden, wahrscheinlich nur von Effektorzellen mit hoher funktioneller Avidität erkannt (Alexander-Miller *et al.*, 1996; Holler & Kranz, 2003).

Als APC wurden MEF der BALB/cJ und der BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Maus verwendet. Während die BALB/cJ Maus alle drei MHC-Klasse-I-Moleküle  $D^d$ ,  $K^d$  und  $L^d$  exprimiert, fehlt der BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Maus das  $L^d$  Molekül. Während m164 und M105 durch  $D^d$ , m145 durch  $K^d$  präsentiert wird, wird IE1 durch das MHC-Klasse-I-Molekül  $L^d$  präsentiert. Zellen der BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Maus können somit das IE1 Peptid von mCMV nicht präsentieren. Außerdem dienen MEF der BALB/cJ Maus auch dem Nachweis alloreaktiver CD8 T-Zellen des  $L^{d-}$  Donors. Bei der Verwendung von MEF der BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Maus werden somit nur mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellen nachgewiesen.

Bei der Verwendung von MEF der BALB/cJ Maus als APC zeigte sich eine hohe Frequenz alloreaktiver CD8 T-Zellen. Die Frage, ob sich hinter dieser starken Alloreaktivität mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellen verbergen, konnte mit MEF der BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Maus geklärt werden. Es zeigte sich eine CD8 T-Zellantwort der Peptidspezifitäten m164, M105 und m145. Sie erkannten präsentierte Peptide bis zu einer Konzentration von  $10^{-9}$ M.

Schlussfolgerung: Nach GvH-KMT sind sowohl alloreaktive als auch mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellen nachweisbar; letztere erkennen präsentierte Peptide bis zu einer Konzentration von  $10^{-9}$ M.



**Abb. 4.17: Nachweis und funktionelle Avidität der mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellen nach GvH-KMT**

CD8 T-Zellen wurden mittels autoMACS am zwanzigsten Tag nach KMT und Infektion mit  $1 \times 10^5$  PFU mCMV-WT.Smith aus einem Pool von zehn Lebern isoliert und als Effektoren im ELISPOT-Assay eingesetzt. Die eingesetzten Effektoren wurden in einer Konzentration von  $2,5 \times 10^4$  und  $5 \times 10^4$  verwendet. Als APC dienen mit den angegebenen synthetischen Peptiden in einer Konzentration von  $10^{-6}$ - $10^{-11}$  M beladene BALB/cJ (weiß) und BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> (grau) MEF. Als Kontrolle für Alloreaktivität dienten unbeladene MEF (Ø). Die Frequenzen IFN- $\gamma$ -produzierender CD8 T-Zellen wurden mittels linearer Regressionsanalyse mit Hilfe der Statistik-Software Mathematica V6.0.1.0 Statistics "Linear Regression" ermittelt.

#### 4.10 Einfluss der vRAPs von mCMV auf die Immunkontrolle nach allogener KMT

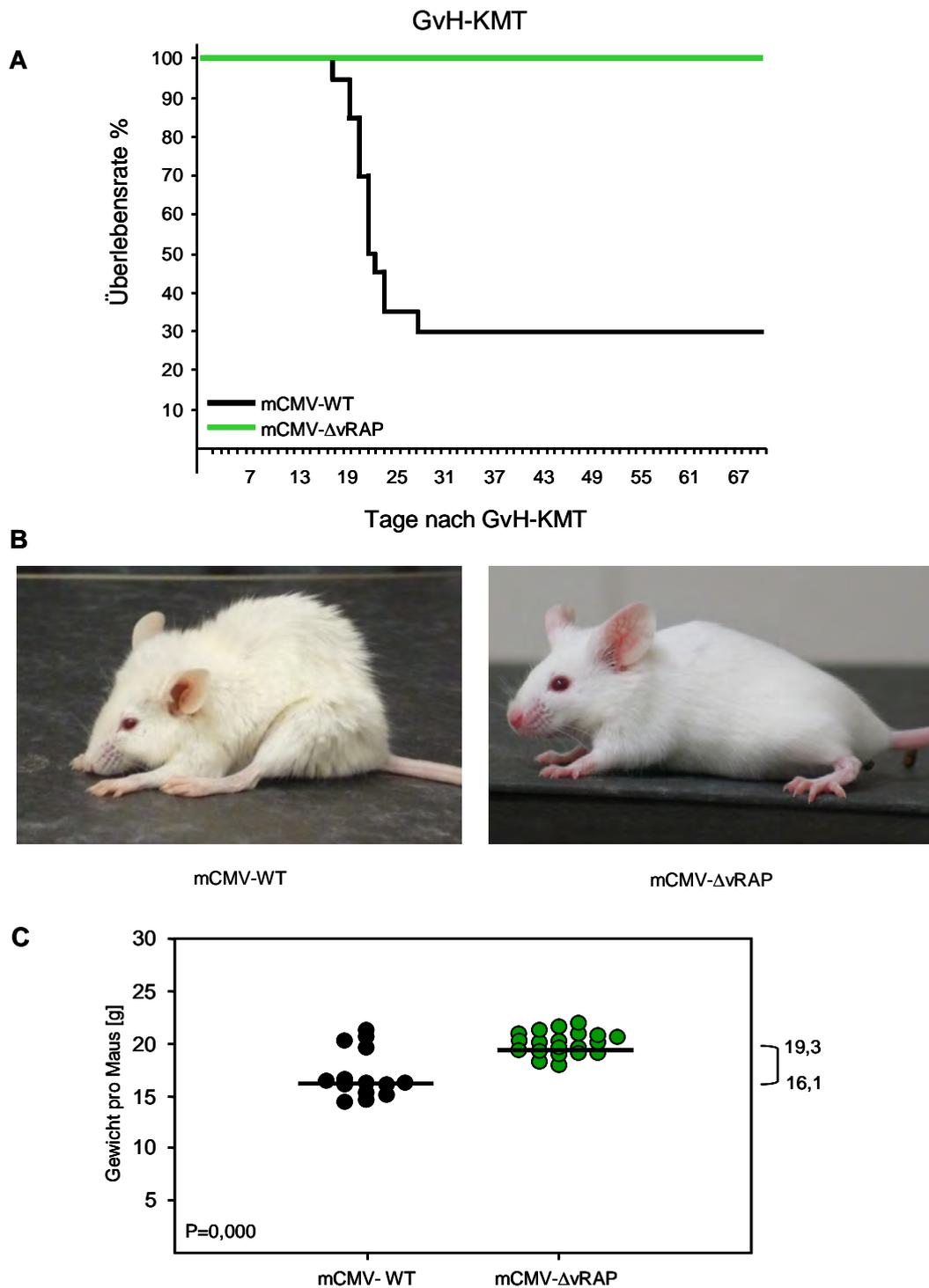
In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der vRAPs (Holtappels *et al.*, 2006a) von mCMV auf die Immunkontrolle nach GvH-KMT untersucht. vRAPs verursachen eine verminderte Peptidpräsentation auf infizierten Zellen. Daher bewirkt die Deletion der vRAPs eine effizientere Präsentation viraler Peptide auf der Oberfläche infizierter Zellen (Holtappels *et al.*, 2006a; Böhm *et al.*, 2008b; Lemmermann *et al.*, 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde die Deletionsmutante mCMV- $\Delta$ vRAP (Wagner *et al.*, 2002) genutzt, um den Einfluss der vRAPs auf die Kontrollierbarkeit der mCMV-Infektion nach GvH-KMT zu untersuchen. Die verbesserte Antigenpräsentation nach Infektion mit mCMV- $\Delta$ vRAP könnte zu einer verbesserten immunologischen Kontrolle der Infektion nach GvH-KMT führen.

Um den Einfluss der vRAPs auf die Überlebensrate nach GvH-KMT zu untersuchen, wurde zunächst eine Sterbekurven-Analyse nach Kaplan-Meier durchgeführt.

In dem in **Abb. 4.18** gezeigten Experiment betrug die Überlebensrate nach GvH-KMT und Infektion mit mCMV-WT.BAC 30%. Nach GvH-KMT und Infektion mit mCMV- $\Delta$ vRAP betrug die Überlebensrate 100%. Nach Infektion mit mCMV-WT.BAC zeigten die Mäuse eine deutliche Somnolenz, struppiges Fell, Abmagerung sowie eine gekrümmte Körperhaltung. Die Mäuse, die mit mCMV- $\Delta$ vRAP infiziert wurden, hatten ein glattes Fell, eine aufrechte Körperhaltung, waren normal aktiv sowie normalgewichtig. Die Gewichte der Mäuse nach Infektion mit mCMV-WT.BAC bzw. mCMV- $\Delta$ vRAP wurden am zwanzigsten Tag nach allogener KMT ermittelt und nach dem Kolmogorov-Smirnov Test errechnet. Der Kolmogorov-Smirnov Test ist eine statistische Analyse auf Übereinstimmungen zweier Wahrscheinlichkeiten. Er wurde verwendet, um signifikante Unterschiede zwischen den ermittelten Gewichten der unterschiedlichen Infektionsgruppen zu ermitteln. Die beiden Gruppen sind mit einer Wahrscheinlichkeit von 100% ( $p=0,000$ ) unterschiedlich.

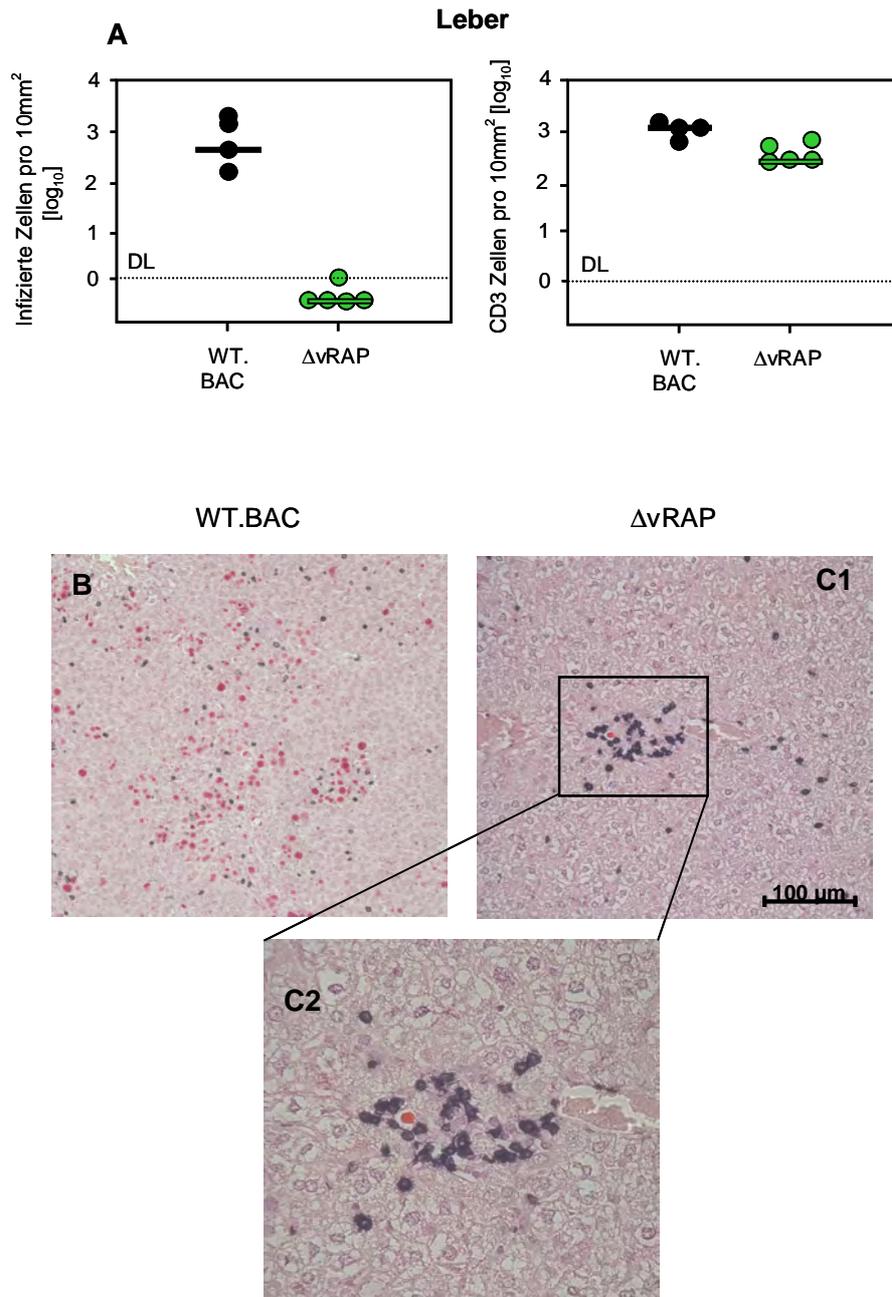
In der in **Abb. 4.19** gezeigten immunhistologischen Untersuchung der Leber nach Infektion mit mCMV-WT.BAC waren viele infizierte Zellen, nach Infektion mit mCMV- $\Delta$ vRAP keine infizierten Zellen nachweisbar. Die Infiltration der Leber durch CD3 Zellen unterschied sich nicht signifikant nach Infektion mit mCMV-WT.BAC bzw. mCMV- $\Delta$ vRAP. Nach Infektion mit mCMV- $\Delta$ vRAP trat jedoch eine deutliche Fokusbildung durch CD3 Zellen auf, wie bereits nach HvG-KMT beobachtet worden war (Abb. 4.12). Wie erwartet, zeigte sich nach Infektion mit mCMV-WT.BAC eine hohe Zahl infizierter Zellen, trotz vergleichbarer Infiltration durch CD3 Zellen. Die CD3 Zellen und die infizierten Zellen waren nach Infektion mit mCMV-WT.BAC diffus verteilt.

Schlussfolgerung: Nach GvH-KMT überleben alle Tiere, wenn die Infektion mit mCMV- $\Delta$ vRAP erfolgt. Es sind kaum infizierten Zellen mehr nachweisbar, aber viele die CD3 Zellen, die noch eine Fokusbildung zeigen.



**Abb. 4.18: Einfluss der vRAPs auf die Überlebensrate nach GvH-KMT**

**A:** Sterbekurve nach Kaplan-Meier nach GvH-KMT und Infektion von jeweils fünfundzwanzig Tieren mit  $1 \times 10^5$  PFU mCMV-WT.BAC (schwarz) bzw. mCMV-ΔvRAP (grün). **B:** Die Photographien zeigen exemplarisch je ein Tier nach GvH-KMT infiziert mit  $1 \times 10^5$  PFU mCMV-WT.BAC bzw. mCMV-ΔvRAP. **C:** Das Gewicht pro Maus wurde am zwanzigsten Tag nach allogener KMT nach Infektion mit mCMV-WT (14 Tiere) bzw. mCMV-ΔvRAP (20 Tiere) ermittelt und nach dem Kolmogorov-Smirnov Test errechnet ( $p=0.000$ ).



**Abb. 4.19: Einfluss der vRAPs auf die Immunkontrolle nach GvH-KMT**

Die Zahl mCMV-infizierter Leberzellen wurde am Tag zwanzig nach GvH-KMT und Infektion mit mCMV-WT.BAC bzw. mCMV-ΔvRAP immunhistologisch für je fünf Tiere durch den Nachweis des viralen mCMV-IE1-pp76/89 Protein (rot) ermittelt. Die Quantifizierung infiltrierender CD3 Zellen (schwarz) erfolgte parallel mittels Doppelfärbung für eine repräsentative Fläche von 10mm<sup>2</sup>. Die Mediane sind als horizontale Balken markiert. Die gestrichelte Linie markiert das Detektionslimit (DL). **B-C2:** Dargestellt sind exemplarisch Leberschnitte von je einem Tier.

#### 4.11 Einfluss der vRAPs von mCMV auf die mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort nach GvH-KMT

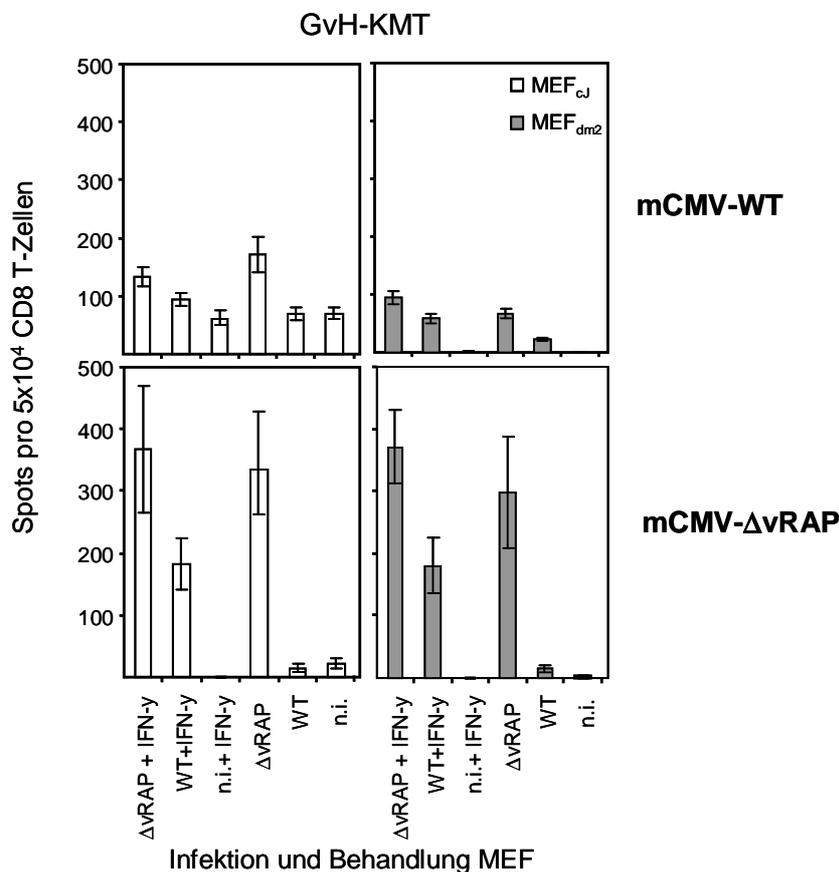
IFN- $\gamma$  ist ein zentrales Zytokin, das von CD8 T-Zellen freigesetzt wird. Es hemmt die virale Replikation und kann das Virus aus der Zelle eliminieren ohne dabei die Zelle zu zerstören. Indem es eine Erhöhung der Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen induziert, stimuliert es den Prozess der MHC-Klasse-I Antigenpräsentation. Damit beeinflusst IFN- $\gamma$ , ebenso wie die vRAPs, die Aktivierung von CD8 T-Zellen und könnte die Immunkontrolle der Tiere nach KMT und mCMV-Infektion verbessern.

Es sollte untersucht werden, wie sich die Infektion mit mCMV-WT.BAC bzw. mCMV- $\Delta$ vRAP nach GvH-KMT auf die mCMV-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen auswirkt. Dazu wurden sowohl die Tiere als auch die als APC im ELISPOT-Assay dienenden MEF mit mCMV-WT.BAC bzw. mCMV- $\Delta$ vRAP infiziert. Die Infektion mit mCMV- $\Delta$ vRAP sollte eine Erhöhung der Peptidpräsentation bewirken. Zusätzlich wurde untersucht, ob eine Vorbehandlung der APC mit IFN- $\gamma$  eine Frequenzerhöhung mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen zur Folge hat (**Abb. 4.20**).

Dazu wurden am zwanzigsten Tag nach GvH-KMT und Infektion mit mCMV-WT.BAC bzw. mCMV- $\Delta$ vRAP die Lebern entnommen und daraus die CD8 T-Zellen mittels autoMACS isoliert. Diese wurden als Effektoren im ELISPOT-Assay eingesetzt. Als APC dienten MEF (BALB/cJ und BALB/c-H-2<sup>dm2</sup>) mit mCMV-WT.BAC bzw. mCMV- $\Delta$ vRAP infiziert, mit und ohne IFN- $\gamma$  Vorbehandlung.

Generell waren die CD8 T-Zellfrequenzen nach Infektion der Tiere mit mCMV- $\Delta$ vRAP höher als nach Infektion mit mCMV-WT.BAC. Nach Infektion der Tiere mit **mCMV- $\Delta$ vRAP** führte die Vorbehandlung der APC mit IFN- $\gamma$  zur Erhöhung der Anzahl mCMV-reaktiver CD8 T-Zellen. Besonders die mit mCMV-WT.BAC infizierten MEF stimulierten nach IFN- $\gamma$  Vorbehandlung deutlich mehr CD8 T-Zellen als MEF ohne IFN- $\gamma$  Vorbehandlung. Unerwarteterweise hatte die Vorbehandlung mit IFN- $\gamma$  nach Infektion der Tiere mit **mCMV-WT.BAC** einen geringen Einfluss auf die Reaktivität mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen. Bei den mit mCMV- $\Delta$ vRAP infizierten MEF führt die zusätzliche IFN- $\gamma$  Vorbehandlung nur zu einer geringen Erhöhung der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen. Wahrscheinlich präsentieren mCMV- $\Delta$ vRAP infizierte MEF so viele Antigene, dass sich die Aktivität der CD8 T-Zellen nicht mehr durch IFN- $\gamma$  steigern lässt.

**Schlussfolgerung:** Die Reaktivität mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen ist nach Infektion mit mCMV- $\Delta$ vRAP höher als nach Infektion mit mCMV-WT.BAC. Nach Infektion mit mCMV-WT.BAC hat die Vorbehandlung mit IFN- $\gamma$  einen geringeren Einfluss auf die Reaktivität mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen als nach Infektion mit mCMV- $\Delta$ vRAP.



**Abb. 4.20: Einfluss der Immunevasionsproteine von mCMV auf die mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort nach GvH-KMT**

Der IFN- $\gamma$  ELISPOT zeigt die mCMV-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen nach GvH-KMT. CD8 T-Zellen wurden mittels autoMACS am zwanzigsten Tag nach Infektion mit  $1 \times 10^5$  PFU mCMV-WT.BAC bzw. mCMV- $\Delta$ vRAP aus einem Pool von je zehn Lebern isoliert und als Effektoren im ELISPOT-Assay eingesetzt. Die eingesetzten Effektoren wurden in einer Konzentration von  $2,5 \times 10^4$ - $1 \times 10^5$   $\log_2$  titriert. Als APC dienen BALB/cJ (weiß) und BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> (grau) MEF mit und ohne IFN- $\gamma$  Vorbehandlung, infiziert mit mCMV-WT.BAC bzw. mCMV- $\Delta$ vRAP. Als Kontrolle für Alloreaktivität dienten nicht infizierte MEF ( $\emptyset$ ). Die Frequenzen IFN- $\gamma$ -produzierender CD8 T-Zellen wurden mittels linearer Regressionsanalyse mit Hilfe der Statistik-Software Mathematica V6.0.1.0 Statistics "Linear Regression" ermittelt.

#### 4.12 Vergleich der funktionellen Avidität der mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellen nach allogener und syngener KMT

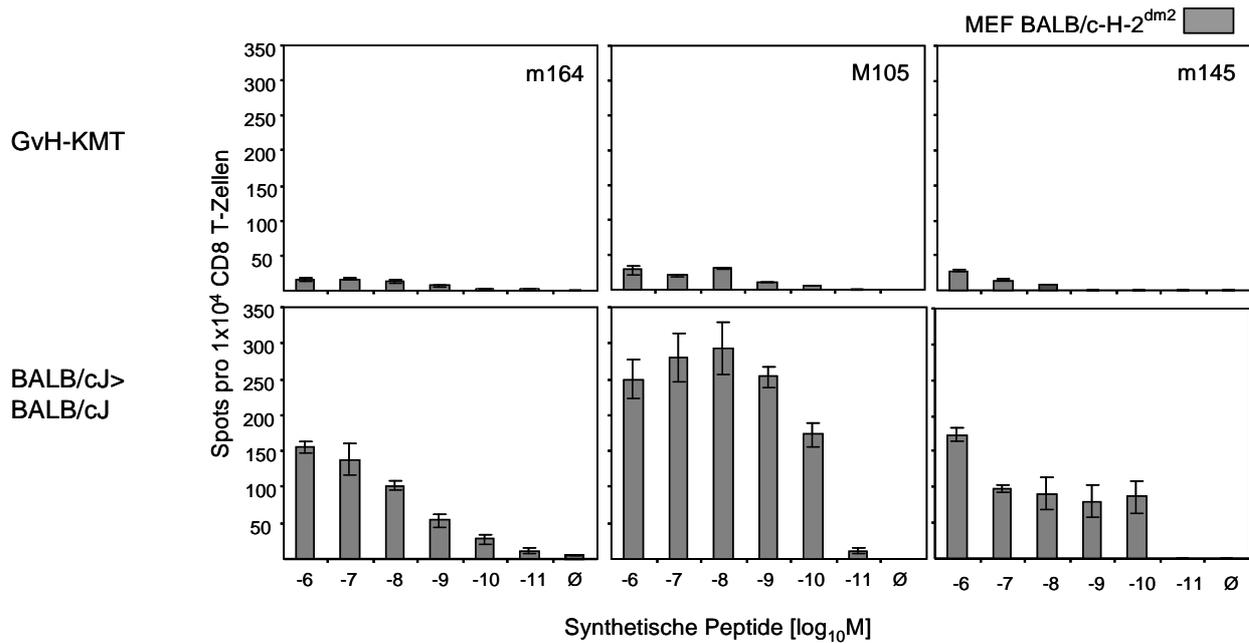
Da die Vorbehandlung mit IFN- $\gamma$  nur einen geringen Einfluss auf die Reaktivität mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen nach GvH-KMT und Infektion mit mCMV-WT.BAC hatte, sollte die funktionelle Avidität der mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellen nach allogener KMT im Vergleich zur syngener KMT (BALB/cJ in BALB/cJ) untersucht werden (**Abb. 4.21**). Anhand dieser Analyse sollte untersucht werden, inwiefern die Avidität einen Einfluss auf die Reaktivität mCMV-peptidspezifischer CD8 T-Zellen insbesondere nach GvH-KMT hat.

Dazu wurden am zwanzigsten Tag nach KMT und Infektion mit mCMV-WT.BAC die Lebern entnommen und die CD8 T-Zellen mittels autoMACS isoliert. Diese wurden als Effektoren im ELISPOT-Assay eingesetzt. Als APC wurden MEF der BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Maus verwendet, der das L<sup>d</sup> Molekül fehlt, um nur mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellen nachzuweisen.

Im ELISPOT-Assay zeigte sich, dass die mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort nach GvH-KMT geringer ist als nach syngener KMT. Anhand der niedrigen mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellantwort nach GvH-KMT kann keine Aussage über die funktionelle Avidität dieser Zellen gemacht werden.

Nach syngener KMT zeigte sich eine CD8 T-Zellantwort der Peptidspezifitäten m164, M105 und m145. Sie erkannten präsentierte Peptide bis zu einer Konzentration von  $10^{-10}$ M.

Schlussfolgerung: Nach GvH-KMT ist die mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort geringer als nach syngener KMT.



**Abb. 4.21: Nachweis und funktionelle Avidität der mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellen nach allogener und syngener KMT**

CD8 T-Zellen wurden mittels autoMACS am zwanzigsten Tag nach KMT und Infektion mit  $1 \times 10^5$  PFU mCMV-WT.BAC aus einem Pool von zehn Lebern pro Gruppe isoliert und als Effektoren im ELISPOT-Assay eingesetzt. Die eingesetzten Effektoren wurden in einer Konzentration von  $1,25 \times 10^4$ - $1 \times 10^5$   $\log_2$  (GvH-KMT) und  $1,25 \times 10^3$ - $1 \times 10^4$   $\log_2$  (BALBcJ>BALBcJ) titriert. Als APC dienen mit den angegebenen synthetischen Peptiden in einer Konzentration  $10^{-6}$ - $10^{-11}$ M beladene BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> MEF. Als Kontrolle dienten unbeladene MEF (Ø). Die Frequenzen IFN- $\gamma$ -produzierender CD8 T-Zellen wurden mittels linearer Regressionsanalyse mit Hilfe der Statistik-Software Mathematica V6.0.1.0 Statistics "Linear Regression" ermittelt.

## 5. Diskussion

### Transplantationsmodell zur Untersuchung der allogenen KMT

Cytomegaloviren sind strikt speziesspezifisch, weshalb das hCMV nicht im Tiermodell untersucht werden kann. Um die Fragestellung dieser Arbeit zu untersuchen, wurde daher ein murines Transplantationsmodell gewählt (Koszinowski *et al.*, 1990; Reddehase, 1991; Holtappels *et al.*, 2006b). Das murine Tiermodell ist ein definiertes, etabliertes und akzeptiertes System, um die CMV-Infektion zu studieren (zur Übersicht: Hudson, 1979; Koszinowski *et al.*, 1990; Krmpotic *et al.*, 2003). Im Tiermodell lassen sich zudem Fragestellungen untersuchen, die beim Menschen aus ethischen Gründen nicht durchführbar sind. In der medizinischen Grundlagenforschung spielen Tiermodelle zur Untersuchung der allogenen KMT eine zentrale Rolle. In vielen Arbeitsgruppen werden murine Tiermodelle zur Untersuchung der Pathologie nach allogener KMT genutzt (zur Übersicht: Reddy *et al.*, 2008). Hossain *et al.*, (2007) konnten beispielsweise in einem murinen Tiermodell zeigen, dass durch die chronische GvHD die antivirale Immunantwort nach allogener KMT und mCMV-Infektion reduziert wird.

Die Pathogenese der mCMV-Infektion ist in vielen Grundzügen vergleichbar mit der der hCMV-Infektion, was auf der Tatsache beruht, dass zwischen der mCMV-Genom-Organisation und -Replikation viele Analogien zu der von hCMV bestehen (Mocarski & Courcelle, 2001; Krmpotic *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten und der Verfügbarkeit geeigneter Mausstämmen wurde das mCMV-Modell verwendet, um die Problematik der CMV-Infektion nach allogener KMT zu studieren.

Bereits in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte in einem allogenen KMT-Modell mit singulärer MHC-Klasse-I Disparität gezeigt werden, dass nach **HvG-KMT** fast alle Tiere überleben, während die **GvH-KMT** mit einer Letalitätsrate von 90-100% assoziiert ist. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde dieses Ergebnis bestätigt. Dazu wurden Mäuse des Stammes BALB/cJ und BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> – beide des Haplotyps H-2<sup>d</sup>-eingesetzt. Aufgrund eines Gendefekts der BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> Maus (Rubocki *et al.*, 1986; Stephan *et al.*, 1986) unterscheiden sich die beiden Mausstämmen in der Expression eines MHC-Klasse-I-Moleküls, des L<sup>d</sup>-Moleküls. Die beiden Mausstämmen wurden wechselseitig als Donoren oder Rezipienten eingesetzt, so dass eine HvG- [BALB/cJ KMZ (L<sup>d+</sup>) in BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> (L<sup>d-</sup>) Rezipienten] oder GvH- [BALB/c-H-2<sup>dm2</sup> (L<sup>d-</sup>) KMZ in BALB/cJ (L<sup>d+</sup>) Rezipienten] Reaktion auftreten konnte. Bereits 1998 war in diesem murinen Transplantationsmodell gezeigt worden, dass nach allogener KMT die Rekonstitution der CD8 T-Zellantwort für die Kontrolle der mCMV-Infektion essentiell ist (Alterio de Goss *et al.*, 1998).

Basierend auf diesen Befunden sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, warum die Tiere nach GvH-KMT sterben, während sie nach HvG-KMT überleben.

### **Rekonstitution des Immunsystems nach allogener KMT**

Der Vergleich der Rekonstitution des Immunsystems nach HvG- und GvH-KMT in der vorliegenden Arbeit zeigte nach GvH-KMT eine verminderte lymphozytäre Infiltration vor allem in der Lunge, aber auch in der Milz. Die Rekonstitution des Immunsystems ist essentiell für die Prävention einer multiplen Organ-Histopathologie verursacht durch CMV (Podlech *et al.*, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Rekonstitution der CD8 T-Zellantwort nach syngener (Holtappels *et al.*, 1998; Podlech *et al.*, 1998; Podlech *et al.*, 2000) als auch nach allogener (Alterio de Goss *et al.*, 1998) KMT eine mCMV-Erkrankung verhinderte.

Um die Ursache der verminderten lymphozytären Infiltration der Lunge und Milz nach GvH-KMT zu klären, wurde in der vorliegenden Arbeit die hämatopoetische Rekonstitution des KM anhand der Ansiedlung von Donor KMZ im KM des Rezipienten untersucht (Mayer *et al.*, 1997; Alterio de Goss *et al.*, 1998; Seckert *et al.*, 2008). Bereits 1998 konnte gezeigt werden, dass die mCMV-Infektion eine schlechtere Ansiedlung der Stammzellen im KM bewirkt (Steffens *et al.*, 1998). Aus früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe war ebenfalls bekannt, dass ohne konkurrente mCMV-Infektion nach Übertragung von  $10^6$  bzw.  $10^7$  KMZ in beiden Transplantationsrichtungen bis zu 100% der Rezipienten überlebten. Mit konkurrenter mCMV-Infektion überlebten 100% der Rezipienten nach Übertragung von  $10^7$  KMZ nach HvG-KMT, während nach GvH-KMT fast 100% der transplantierten Mäuse starben. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Befunde bestätigt. Erstaunlicherweise zeigte sich bei der Untersuchung der hämatopoetischen Rekonstitution des KM kein signifikanter Unterschied zwischen den infizierten und nicht infizierten Tieren, weder nach HvG-KMT noch nach GvH-KMT. Dieser Befund zeigte, dass die hohe Letalität der Tiere nach GvH-KMT nicht auf einer Störung der hämatopoetischen Rekonstitution beruhte. Die hämatopoetische Rekonstitution ist weder aufgrund der MHC-Klasse-I-Disparität von Donor und Rezipient noch aufgrund der mCMV-Infektion gestört.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Leber nach GvH-KMT das Organ mit der höchsten Zahl infizierter Zellen war. In Lunge und Milz war die Zahl infizierter Zellen deutlich geringer. Interessanterweise wurde in der Leber nach GvH-KMT eine stärkere lymphozytäre Infiltration nachgewiesen als in Lunge und Milz. Die starke Infektion der Leber nach GvH-KMT könnte diese verstärkte lymphozytäre Infiltration

erklären. Da die Infiltration von Lunge und Milz geringer war, kann auf eine organspezifische lymphozytäre Infiltration geschlossen werden.

### **Einfluss von CD8 T-Zellen auf die mCMV-Infektion nach allogener KMT**

Zur Untersuchung der Frage, warum die Tiere nach GvH-KMT sterben und nach HvG-KMT überleben, wurde in der vorliegenden Arbeit eine vergleichende Analyse der mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellantwort in Lunge, Milz sowie in der Leber durchgeführt.

Schon in frühen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass T-Lymphozyten bei der Kontrolle der CMV-Infektion eine bedeutende Rolle spielen (Reddehase & Koszinowski, 1984; Reddehase *et al.*, 1985; Reddehase *et al.*, 1987). Ein adoptiver Transfer von CD8 T-Zellen schütze immunsupprimierte, mCMV-infizierte BALB/cJ Mäuse vor einer mCMV-Infektion (Reddehase *et al.*, 1985). Weitere Daten mit peptidspezifischen zytolytischen T-Lymphozyten Linien (*cytolytic T lymphocyte lines*, CTLL) bestätigten die essentielle Bedeutung von CD8 T-Zellen für die Kontrolle der CMV-Infektion (Holtappels *et al.*, 2006a; Holtappels *et al.*, 2008). Zusätzlich konnte die Kontrolle der mCMV-Infektion durch *ex vivo* isolierte, peptidspezifische CD8 T-Zellen gezeigt werden (Holtappels *et al.*, 2004; Pahl-Seibert *et al.*, 2005; Böhm *et al.*, 2008a).

Nach **GvH-KMT** war in Lunge, Milz sowie in der Leber nur eine **niedrige mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort** nachweisbar. Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung von CD8 T-Zellen für die immunologische Kontrolle einer mCMV-Infektion nach experimenteller KMT und legt nahe, dass bei konkurrierender mCMV-Infektion nach GvH-KMT die immunologische Kontrolle durch mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellen vermindert ist.

Die histologische Untersuchung der Leber nach **HvG-KMT** zeigte eine **Fokusbildung**, bei der die Mehrzahl der CD3 Zellen um infizierte Zellen gruppiert waren, also eine zielgerichtete Infiltration vermutet werden kann. Bereits 1998 konnte in unserer Arbeitsgruppe ein Zusammenhang zwischen Protektion und Fokusbildung gezeigt werden. Nach HvG-KMT wurden pulmonale Lymphozyten aus Rezipienten nach HvG-KMT isoliert. Nach adoptivem Transfer der pulmonalen Lymphozyten zeigte sich in BALB/cJ Rezipienten, die mit mCMV-WT infiziert waren, eine Fokusbildung in der Leber (Alterio de Goss *et al.*, 1998). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass nach adoptivem Transfer einer IE1-peptidspezifischen CTLL und Infektion mit einer Funktionsverlustmutante, der das korrespondierende immundominante IE1 Epitop von mCMV fehlte, keine Fokusbildung auftrat. Nach Infektion mit der Revertante kam es

wieder zur Fokusbildung durch IE1 CTLL (Pahl-Seibert *et al.*, 2005; Böhm *et al.*, 2008a).

Nach **GvH-KMT** fiel auf, dass trotz hoher Infiltration durch CD3 Zellen viele infizierte Leberzellen nachweisbar waren. Die infizierten Zellen und die CD3 Zellen waren überwiegend **diffus** verteilt. Der Zusammenhang zwischen Fokusbildung und Protektion lässt vermuten, dass die CD3 Zellen in der Leber nach GvH-KMT aufgrund ihrer diffusen Anordnung nicht protektiv sind. Insbesondere die hohe Zahl infizierter Zellen untermauert die mangelnde Protektion durch CD3 Zellen.

Es stellte sich die Frage, warum die CD3 Zellen in der Leber nach GvH-KMT nicht protektiv sind. Eine Erklärung wäre, dass es sich bei den CD3 Zellen um alloreaktive CD8 T-Zellen handelt; allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit nach GvH-KMT gezeigt werden, dass sowohl alloreaktive CD8 T-Zellen als auch mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellen in der Leber auftraten. Die wenigen mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellen reichen jedoch nicht aus, um die mCMV-Infektion zu kontrollieren.

Ebenso wie die vRAPs beeinflusst **IFN- $\gamma$**  die Peptidprozessierung und somit indirekt die Aktivierung von CD8 T-Zellen. 1994 konnten Hengel *et al.* den indirekten Einfluss von IFN- $\gamma$  auf die Funktionsweise der vRAPs zeigen. Durch einen parakrinen Effekt kann IFN- $\gamma$  den negativ regulierenden Effekt von mCMV auf die Antigenpräsentation durch die Verbesserung der Peptidprozessierung und die damit verbundene verbesserte Antigenpräsentation kompensieren (Hengel *et al.* 1994). Auch in weiteren Publikationen konnte gezeigt werden, dass nach IFN- $\gamma$  Vorbehandlung die Präsentation von Peptiden verstärkt wird (Geginat *et al.*, 1997; Khan *et al.*, 2004; Hengel *et al.*, 2005). Trotz dieses stimulierenden Einflusses zeigte sich jedoch, dass nach GvH-KMT und Infektion mit mCMV-WT.BAC die Vorbehandlung der APC mit IFN- $\gamma$  keinen signifikanten Einfluss auf die Frequenzen mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen hatte.

Eine Erklärung hierfür zeigte die Analyse der funktionellen Avidität der mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellen nach allogener KMT im Vergleich zur syngenen KMT. Dieses Experiment zeigt, dass nach GvH-KMT eine deutlich niedrigere mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort auftrat als nach syngener KMT. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass es trotz Erhöhung der Peptidmenge und Vorbehandlung der APC mit IFN- $\gamma$  zu keiner Zunahme der mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellen nach GvH-KMT kam. Die Vorbehandlung mit IFN- $\gamma$  hatte keinen Einfluss auf die Frequenz der mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellen nach GvH-KMT, weil bereits das Maximum an mCMV-peptidspezifischen CD8 T-Zellen nach GvH-KMT abgerufen worden war.

Bemerkenswerterweise überlebten alle Tiere eine GvH-KMT, wenn die Infektion mit **mCMV- $\Delta$ vRAP** erfolgte. Somit lag die Vermutung nahe, dass die fehlende Protektion nach mCMV-WT Infektion u.a. auf eine unzureichende Peptidpräsentation zurückzuführen sein könnte. vRAPs verursachen eine verminderte Peptidpräsentation auf infizierten Zellen. Daher bewirkt die Deletion der vRAPs eine effizientere Präsentation viraler Peptide auf der Oberfläche infizierter Zellen (Holtappels *et al.*, 2006a). Daraus resultierte die Hypothese, dass die Menge präsentierter Peptide nach GvH-KMT und Infektion mit mCMV- $\Delta$ vRAP ausreicht, um die Infektion zu kontrollieren.

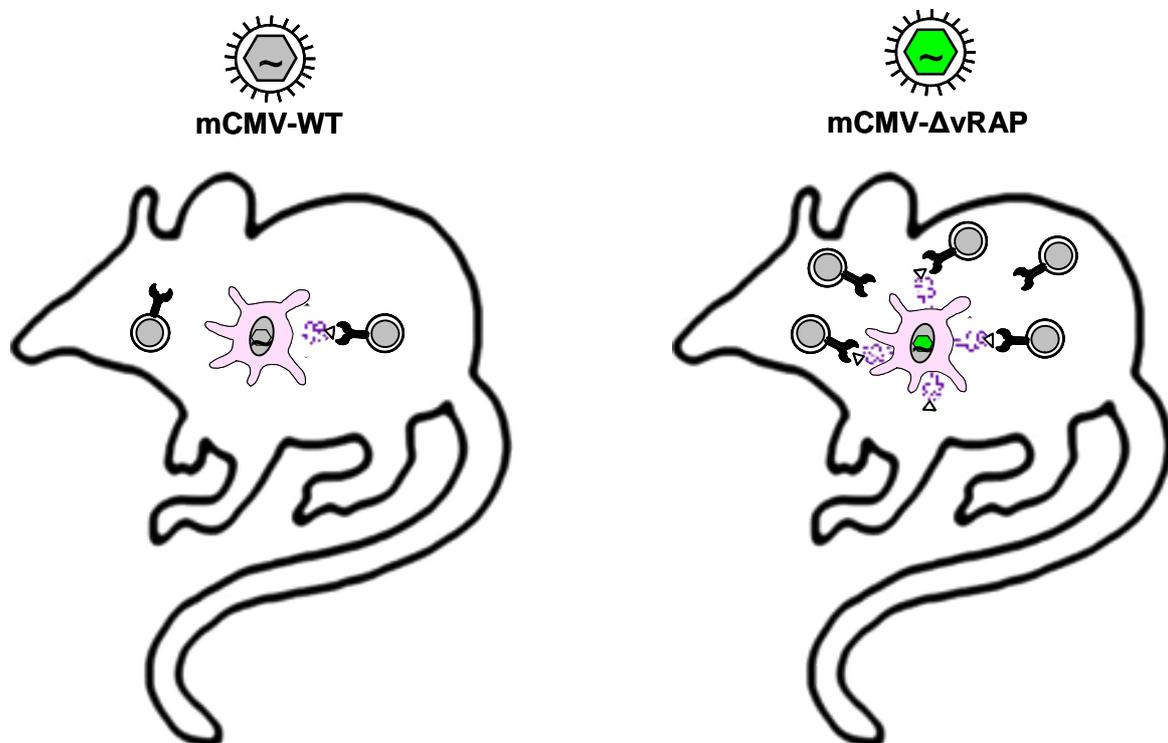
Es stellte sich die Frage, warum in der vorliegenden Arbeit die Frequenz mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen nach GvH-KMT und Infektion mit mCMV- $\Delta$ vRAP höher war als nach Infektion mit mCMV-WT. Die höhere Frequenz während der Induktion der Immunantwort ist wahrscheinlich auf eine effizientere Peptidpräsentation zurückzuführen. Dieser Befund scheint im Widerspruch zu bereits publizierten Daten zu stehen, die keine Erhöhung der Frequenz mCMV-peptidspezifischer CD8 T-Zellen nach Deletion der Immunevasine nachweisen konnten. Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit konnte in weiteren publizierten Arbeiten weder in immunkompetenten BALB/cJ Mäusen noch nach syngener KMT (Böhm *et al.*, 2009) ein im Vergleich zur Infektion mit mCMV-WT verbessertes CD8 T-Zell-Priming nach Infektion mit mCMV- $\Delta$ vRAP bestätigt werden. Weder in der akuten noch in der *memory* Phase der Infektion führte die Deletion des zentralen Immunevasins m152 oder aller drei vRAPs zu einer Frequenzsteigerung mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen (Gold *et al.*, 2002; Reddehase *et al.*, 2004; Holtappels *et al.*, 2006b; Munks *et al.*, 2007).

Eine mögliche Erklärung für diesen auf den ersten Blick widersprüchlichen Befund liefert das Modell der negativen *Feed-Back*-Regulation des CD8 T-Zell-Primings im drainierenden Lymphknoten (Böhm *et al.*, 2008b). In diesem Modell führt die Abwesenheit der vRAPs zu einem verminderten CD8 T-Zell-Priming aufgrund von initial geprimten CD8 T-Zellen. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die mCMV-Infektion während der frühen Phase der Infektion zur Freisetzung viraler Antigene aus infizierten Zellen führt, welche von nicht infizierten APC aufgenommen und *cross* präsentiert werden. Die *Cross*-Präsentation führt zur Aktivierung mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen. Nach Infektion mit mCMV- $\Delta$ vRAP werden die infizierten Zellen aufgrund der effizienten Präsentation antigenener Peptide von den initial geprimten CD8 T-Zellen erkannt und lysiert. Die Kontrolle der Infektion initiiert die negative *Feed-Back*-Regulation des CD8 T-Zell-Primings in Abwesenheit der vRAPs: die Reduktion der Anzahl infizierter Zellen limitiert die für weitere *Cross*-Präsentation zur Verfügung stehende Antigenmenge, so dass insgesamt vergleichsweise geringe Frequenzen mCMV-spezifische CD8 T-Zellen geprimt werden im Vergleich zur mCMV-WT Infektion. Die verminderte Kontrolle der Infektion mit mCMV-WT

führt zu einer größeren Menge viralen Antigens und dadurch zu höheren mCMV-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen.

Eine Erklärung für die höhere Frequenz mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen nach GvH-KMT und Infektion mit mCMV- $\Delta$ vRAP als nach Infektion mit mCMV-WT, wäre möglicherweise eine Inhibition der *Cross*-Präsentation. Durch die Inhibition der *Cross*-Präsentation könnte es zur direkten Präsentation des viralen Antigens kommen. Durch die effizientere Peptidpräsentation nach Infektion mit mCMV- $\Delta$ vRAP würden mehr mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellen geprimt und die mCMV-Infektion kontrolliert. Der Mechanismus der Inhibition bleibt allerdings ungeklärt und ist Ziel zukünftiger Arbeiten.

Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass nach Infektion mit mCMV- $\Delta$ vRAP kaum infizierten Zellen in der Leber mehr nachweisbar waren. Zudem zeigten die CD3 Zellen eine Fokusbildung (Alterio de Goss *et al.*, 1998; Böhm *et al.*, 2008a). Durch die effizientere Peptidpräsentation nach Infektion mit mCMV- $\Delta$ vRAP kann es vermutlich wieder zu einer zielgerichteten Infiltration und somit Protektion durch CD8 T-Zellen kommen. Das Auftreten einer Fokusbildung nach GvH-KMT und Infektion mit mCMV- $\Delta$ vRAP stützt die Vermutung, dass die effizientere Peptidpräsentation zu einer besseren immunologischen Kontrolle der mCMV-Infektion nach GvH-KMT führt.



**Abb. 5.1: CD8 T-Zell-Priming nach GvH-KMT und Infektion mit mCMV-WT bzw. mCMV- $\Delta$ vRAP**

Nach GvH-KMT und Infektion mit mCMV-WT wurde nur eine geringe mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort nachgewiesen. Durch die effizientere Peptidpräsentation nach Infektion mit mCMV- $\Delta$ vRAP werden mehr mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellen geprimt und die mCMV-Infektion wird kontrolliert.

## **Bedeutung von Alloreaktivität nach allogener KMT**

Bislang war unklar, ob die Tiere nach GvH-KMT aufgrund einer echten GvHD sterben. Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass nach GvH-KMT **alloreaktive CD8 T-Zellen** in der Leber auftraten. In Lunge und Milz wurden dagegen keine alloreaktiven CD8 T-Zellen nachgewiesen.

Bei der akuten GvHD kommt es zur Aktivierung, Expansion und Migration alloreaktiver T-Zellen in die Zielorgane (zur Übersicht: Reddy *et al.*, 2008). Die Leber zählt neben Haut und Darm zu den klassischen Zielorganen der GvHD (zur Übersicht: Shlomchik, 2007; Zheng *et al.*, 2009). Der Nachweis alloreaktiver T-Zellen in der Leber und die Tatsache, dass die Leber ein Hauptzielorgan alloreaktiver T-Zellen ist, ließe vermuten, dass die hohe Letalität auf einer echten GvHD beruht. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit eine echte GvHD histologisch nie nachgewiesen werden. Aus diesem Grunde bleibt die Frage offen, inwiefern die alloreaktiven T-Zellen den Krankheitsverlauf der Tiere nach GvH-KMT beeinflussen und ist Ziel zukünftiger Arbeiten.

In der vorliegenden Arbeit wurde stets mit vollständigem, nicht-depletiertem Donor KM gearbeitet. Eine in diesem Zusammenhang häufig diskutierte Maßnahme zur Prophylaxe der GvHD ist die Depletion von T-Lymphozyten (Prentice *et al.*, 1984), die allerdings häufiger zu einem fehlenden Anwachsen des Transplantats (*Engraftment*) führt und seltener einen GvL Effekt hervorruft als nicht-depletiertes KM (zur Übersicht: Fowler & Gress, 1998). Mit T-Zell-Depletion entwickeln dennoch ca. 10% der Rezipienten HLA-kompatibler Zellen und ca. 60% der Rezipienten histoinkompatibler Zellen eine signifikante akute GvHD (zur Übersicht: Appelbaum, 2003). Die T-Zell-Depletion birgt darüber hinaus das Risiko weiterer Infektionen und der Bildung von Metastasen. In früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Depletion von CD8 T-Zellen aus dem Donor KM nur einen geringen Einfluss auf die Überlebensrate nach GvH-KMT hat (nicht publizierte Daten). Aufgrund dieses Ergebnisses ist fraglich, ob die alloreaktiven CD8-T-Zellen einen Einfluss auf die Letalität nach GvH-KMT haben.

Des Weiteren stellte sich die Frage, inwiefern sich die Infektion mit mCMV- $\Delta$ vRAP auf die Alloreaktivität auswirkt. Theoretisch müsste eine gesteigerte MHC-Klasse-I Expression nach Infektion mit mCMV- $\Delta$ vRAP auch eine Zunahme alloreaktiver CD8 T-Zellen bewirken. Erstaunlicherweise konnte aber bereits in ersten Experimenten gezeigt werden, dass sich nach GvH-KMT die Infektion mit mCMV- $\Delta$ vRAP inhibierend auf die Frequenz alloreaktiver CD8 T-Zellen auswirkt.

Die Beantwortung der Fragen, ob alloreaktive T-Zellen einen Einfluss auf den Verlauf einer allogenen KMT haben und inwiefern sich die Infektion mit mCMV- $\Delta$ vRAP auf die Stärke der Alloreaktivität nach allogener KMT auswirkt, ist Ziel zukünftiger Arbeiten.

### **Infiltration der Leber nach allogener KMT**

In beiden Transplantationsrichtungen war eine massive Infiltration der Leber durch **Makrophagen** zu beobachten. Nach GvH-KMT schien die Infiltration der Leber durch Makrophagen noch ausgeprägter zu sein, als nach HvG-KMT. In beiden Transplantationsrichtungen gruppierten sich die Makrophagen um die infizierten Zellen. Makrophagen haben bei der angeborenen Immunabwehr eine wichtige Funktion, indem sie intrazelluläre Erreger mittels des Phagosoms eliminieren (Underhill *et al.*, 1999). Zusätzlich bauen sie Proteinantigene zu Peptiden ab und präsentieren diese an T-Zellen (zur Übersicht: Hu *et al.*, 2008). Die Expression von pepMHC führt zur Aktivierung der adaptiven Immunantwort und somit zu einer protektiven Immunität (Underhill *et al.*, 1999). IFN- $\gamma$  aktiviert über STAT1 Makrophagen, während IL-10 Makrophagen inhibiert (zur Übersicht: Shenoy *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2008). Bindet eine T-Zelle an einen infizierten Makrophagen, dann sezerniert die T-Zelle IFN- $\gamma$  und aktiviert den Makrophagen über den Toll-Like-Rezeptor-4. Der Toll-Like-Rezeptor-4 ist ein Transmembran-Lipopolysaccharid Rezeptor, dessen Aktivierung zur Freisetzung verschiedener Zytokine und zur Einleitung der angeborenen Immunantwort führt (Hu *et al.*, 2008). Die Aktivierung führt zur Bildung neuer Makrophagen. Aufgrund der mCMV-Infektion wandern T-Zellen in beiden Transplantationsrichtungen in die Leber ein und setzen IFN- $\gamma$  frei, was einen aktivierenden Effekt auf weitere Makrophagen hat. Dies erklärt die massive Infiltration der Leber durch Makrophagen nach allogener KMT.

### **Fazit und Ausblick**

In der Leber fanden sich nach GvH-KMT und Infektion mit mCMV-WT viele infizierte Zellen und infiltrierte CD3 Zellen, die überwiegend diffus verteilt waren. Es wurden nur wenige mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellen nachgewiesen. Es stellte sich die Frage, ob die vielen CD3 Zellen in der Leber alloreaktiv waren. Ausschließlich nach GvH-KMT konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sowohl alloreaktive CD8 T-Zellen als auch mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellen in der Leber auftraten. mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellen waren allerdings nur wenige nachweisbar, die nicht ausreichen, um die mCMV-Infektion zu kontrollieren.

Die Infektion mit mCMV- $\Delta$ vRAP und die damit verbundene effizientere Peptidpräsentation führte zum verbesserten CD8 T-Zell-Priming im Vergleich zur Infektion mit mCMV-WT nach GvH-KMT. Zusätzlich kam es zur Fokusbildung von infizierten Zellen und infiltrierenden T-Zellen, was auf eine zielgerichtete Infiltration und somit Schutz der Tiere durch CD8 T-Zellen hindeutet. Dies legt nahe, dass die Menge an präsentierten Peptiden

auf mCMV-WT infizierten Zellen nicht ausreicht, um genügend mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellen zu primen und/oder für protektive CD8 T-Zellen erkennbar zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei der GvH-KMT im Vergleich zur syngenen KMT nach Infektion mit mCMV-WT eine niedrige mCMV-peptidspezifische CD8 T-Zellantwort nachgewiesen. Basierend auf dieser grundlegenden Erkenntnis soll die funktionelle Avidität mCMV-peptidspezifischer CD8 T-Zellen nach allogener KMT sowohl im Vergleich zur syngenen KMT als auch nach Infektion mit mCMV- $\Delta$ vRAP untersucht werden. Damit soll geprüft werden, ob die effizientere Peptidpräsentation auf infizierten Zellen auch von niederaviden CD8 T-Zellen erkannt wird. Zusätzlich soll untersucht werden, inwiefern die Infektion mit mCMV- $\Delta$ vRAP einen Einfluss auf die Stärke der Alloreaktivität nach GvH-KMT hat.

Da die Infektion mit mCMV- $\Delta$ vRAP einen positiven Effekt auf die Überlebensrate nach GvH-KMT hat, versprechen die weiteren Untersuchungen, einen wichtigen Beitrag zur Prävention einer GvHD bei konkurrierender CMV-Infektion zu leisten.

## 6. Literaturverzeichnis

- Alexander-Miller, M. A., G. R. Leggatt, and J. A. Berzofsky.** 1996. Selective expansion of high- or low-avidity cytotoxic lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:4102-4107.
- Alterio de Goss, M., R. Holtappels, H. P. Steffens, J. Podlech, P. Angele, L. Dreher, D. Thomas, and M. J. Reddehase.** 1998. Control of cytomegalovirus in bone marrow transplantation chimeras lacking the prevailing antigen-presenting molecule in recipient tissues rests primarily on recipient-derived CD8 T cells. *J. Virol.* **72**:7733-7744.
- Appelbaum, F. R.** 2003. The current status of hematopoietic cell transplantation. *Annu. Rev. Med.* **54**:491-512.
- Bigenzahn, S., P. Blaha, Z. Koporc, I. Pree, E. Selzer, H. Bergmeister, F. Wrba, C. Heusser, K. Wagner, F. Muehlbacher, and T. Wekerle.** 2005. The role of non-deletional tolerance mechanisms in a murine model of mixed chimerism with costimulation blockade. *Am. J. Transplant.* **5**:1237-1247.
- Blazar, B.R., A. H. Sharp, A. I. Chen, A. Panoskaltis-Mortari, and C. Lees.** 2003. Ligation of OX40 (CD134) regulates graft-versus-host disease (GVHD) and graft rejection in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Blood* **101**:3741–3748.
- Blazar, B. R., P. A. Taylor, A. Panoskaltis-Mortari, J. Buhlman, and J. Xu.** 1997. Blockade of CD40 ligand-CD40 interaction impairs CD4 T cell-mediated alloreactivity by inhibiting mature donor T cell expansion and function after bone marrow transplantation. *J. Immunol.* **158**:29–39
- Blazar, B. R., P. A. Taylor, and D. A. Vallera.** 1997. CD4+ and CD8+ T cells each can utilize a perforin-dependent pathway to mediate lethal graft-versus-host disease in major histocompatibility complex disparate recipients. *Transplantation* **64**:571–576.
- Bleakley M., and S. R. Riddell.** 2004. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer.* **4**:371-380.
- Böhm, V., J. Podlech, D. Thomas, P. Deegen, M. F. Pahl-Seibert, N. A. Lemmermann, N. K. Grzimek, S. A. Oehrlein-Karpi, M. J. Reddehase, and R. Holtappels.** 2008a. Epitope-specific in vivo protection against cytomegalovirus disease by CD8 T cells in the murine model of preemptive immunotherapy. *Med. Microbiol. Immunol.* **197**:135-144.
- Böhm V., C. K. Seckert, C. O. Simon, D. Thomas, A. Renzaho, D. Gendig, R. Holtappels, and M. J. Reddehase.** 2009. Immune evasion proteins enhance cytomegalovirus latency in the lungs. *J Virol.* **83**:10293-10298.
- Böhm, V., C. O. Simon, J. Podlech, C. K. Seckert, D. Gendig, P. Deegen, D. Gillert-Marien, N. A. W. Lemmermann, R. Holtappels, and M. J. Reddehase.** 2008b. The immune evasion paradox: immunoevasins of murine cytomegalovirus enhance priming of CD8 T cells by preventing negative feed-back regulation. *J. Virol.* **82**:11637-11650.
- Bowden, R. A., S. J. Slichter, M. H. Sayers, M. Mori, M. J. Cays, and J. D. Meyers.** 1991. Use of leukocyte-depleted platelets and cytomegalovirus-seronegative blood products to prevent primary cytomegalovirus infection after bone marrow transplant. *Blood* **78**: 246-250.
- Boyle, K. A., and T. Compton.** 1998. Receptor-binding properties of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B. *J. Virol.* **72**:1826-1833.

- Bubeck, A., U. Reusch, M. Wagner, T. Ruppert, W. Muranyi, P. M. Kloetzel and U. H. Koszinowski.** 2002. The glycoprotein gp48 of murine cytomegalovirus: proteasomedependent cytosolic dislocation and degradation. *J. Biol. Chem.* **277**:2216-2224.
- Chang, R. J., and S. H. Lee.** 1986. Effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on the expression of an Ia antigen on a murine macrophage cell line. *J Immunol.* **137**:2853-2856.
- Chatellard, P., R. Pankiewicz, E. Meier, L. Durrer, C. Sauvage, and M. O. Imhof.** 2007. The IE2 promoter/enhancer region from mouse CMV provides high levels of therapeutic protein expression in mammalian cells. *Biotechnol Bioeng.* **96**:106-117.
- Clarkson M. R., and M. H. Sayegh.** 2005. T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. *Transplantation.* **80**:555-563.
- Cohn, M.** 2004. An alternative to current thinking about positive selection, negative selection and activation of T cells. *Immunology* **111**:375-380.
- Davison, A. J., A. Dolan, P. Akter, C. Addison, D. J. Dargan, D. J. Alcendor, D. J. McGeoch, and G. S. Hayward.** 2003. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J. Gen. Virol.* **84**:17-28.
- Deeg, H. J., K. Seidel, J. Casper, C. Anasetti, S. Davies, J. L. Gajewski, M. Territo, N. Ramsay, R. E. Harris, H. Catro-Malaspina, R. Collins, R. Champlin, G. Schoch, R. King, and C. Howe.** 1999. Marrow transplantation from unrelated donors for patients with severe aplastic anemia who have failed immunosuppressive therapy. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **5**:243-252.
- Del Val, M., H. Hengel, H. Haecker, U. Hartlaub, T. Ruppert, P. Lucin, and U. H. Koszinowski.** 1992. Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide-loaded major histocompatibility complex class I molecules into the medial-Golgi compartment. *J. Exp. Med.* **176**:729-738.
- Doom, C. M., and A. B. Hill.** 2008. MHC class I immune evasion in MCMV infection. *Med. Microbiol. Immunol.* **197**:191-204.
- Dustin, M. L.** 2001. Role of adhesion molecules in activation signaling in T lymphocytes. *J Clin Immunol.* **21**:258-263.
- Edinger M., F. Powrie, and R. Chakraverty.** 2009. Regulatory mechanisms in graft-versus-host responses. *Biol Blood Marrow Transplant.* **15**:2-6.
- Falkenburg J. H-, L. van de Corput, E. W. Marijt, and R. Willemze.** 2003. Minor histocompatibility antigens in human stem cell transplantation. *Exp Hematol.* **31**:743-751.
- Fowler, D. H., and R. E. Gress.** 1998. CD8+ T cells of Tc2 phenotype mediate a GVL effect and prevent marrow rejection. *Vox Sang.* **2**:331-340.
- Gaspar P. W., D.K. Rosen, and R. Fulton.** 1996. Allogeneic marrow transplantation in a cat with acute myeloid leukemia. *J Am Vet Med Assoc.* **208**:1280-1284.
- Geginat, G., T. Ruppert, H. Hengel, R. Holtappels, and U. H. Koszinowski.** 1997. IFN- $\gamma$  is a prerequisite for optimal antigen processing of viral peptides in vivo. *J. Immunol.* **158**:3303-3310.

- Goker, H., I. C. Haznedaroglu, and N. J. Chao.** 2001. Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. *Exp Hematol.* **29**:259-277.
- Gold, M. C., M. W. Munks, M. Wagner, U. H. Koszinowski, A. B. Hill, and S. P. Fling.** 2002. The murine cytomegalovirus immunomodulatory gene m152 prevents recognition of infected cells by M45-specific CTL but does not alter the immunodominance of the M45-specific CD8 T cell response in vivo. *J Immunol.* **169**:359-365.
- Gratwohl A., H. Baldomero, A. Schwendener, V. Rocha, J. Apperley, K. Frauendorfer, and D. Niederwieser.** 2009. The EBMT activity survey 2007 with focus on allogeneic HSCT for AML and novel cellular therapies. *Bone Marrow Transplant.* **43**:275-291.
- Gubbay, J., J. Collignon, P. Koopman, B. Capel, A. Economou, A. Münsterberg, N. Vivian, P. Goodfellow, and R. Lovell-Badge.** 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* **346**:245-250.
- Hengel, H., U. H. Koszinowski, and K. K. Conzelmann.** 2005. Viruses know it all: new insights into IFN networks. *Trends Immunol.* **26**:396-401.
- Hengel, H., P. Lucin, S. Jonjic, T. Ruppert, and U. H. Koszinowski.** 1994. Restoration of cytomegalovirus antigen presentation by gamma interferon combats viral escape. *J. Virol.* **68**:289-297.
- Hill, G. R.** 2009. Inflammation and bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* **15**:139-141.
- Hogquist, K. A., T. A. Baldwin, and S. C. Jameson.** 2005. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.* **5**:772-782.
- Holler, P. D., and D. M. Kranz.** 2003. Quantitative analysis of the contribution of TCR/pepMHC affinity and CD8 to T cell activation. *Immunity* **18**:255-264.
- Holtappels R., V. Böhm, J. Podlech, and M. J. Reddehase.** 2008. CD8 T-cell-based immunotherapy of cytomegalovirus infection: "proof of concept" provided by the murine model. *Med Microbiol Immunol.* **197**:125-134.
- Holtappels, R., D. Gillert-Marien, D. Thomas, J. Podlech, P. Deegen, S. Herter, S. A. Oehrlein-Karpi, D. Strand, M. Wagner, and M. J. Reddehase.** 2006a. Cytomegalovirus encodes a positive regulator of antigen presentation. *J. Virol.* **80**:7613-7624.
- Holtappels, R. N. K. Grzimek, C. O. Simon, D. Thomas, D. Dreis, and M. J. Reddehase.** 2002a. Processing and presentation of murine cytomegalovirus pORFm164-derived peptide in fibroblasts in the face of all viral immunosubversive early gene functions. *J. Virol.* **76**:6044-6053.
- Holtappels, R., N. K. A. Grzimek, D. Thomas, and M. J. Reddehase.** 2002b. Early gene m18, a novel player in the immune response to murine cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* **83**:311-316.
- Holtappels, R., M. W. Munks, J. Podlech and M. J. Reddehase.** 2006b. CD8 T-cellbased immunotherapy of cytomegalovirus disease in the mouse model of the immunocompromised bone marrow transplantation recipient, pp. 383-418. *In* Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology. Edited by M. J. Reddehase. Wymondham, Norfolk, United Kingdom. Caister Academic Press.

- Holtappels, R., J. Podlech, G. Geginat, H.-P. Steffens, D. Thomas, and M. J. Reddehase.** 1998. Control of murine cytomegalovirus in the lungs: relative but not absolute immunodominance of the immediate-early 1 nonapeptide during the antiviral cytolytic T-lymphocyte response in pulmonary infiltrates. *J. Virol.* **72**:7201–7212.
- Holtappels, R., J. Podlech, N. K. Grzimek, D. Thomas, M. F. Pahl-Seibert, and M. J. Reddehase.** 2001. Experimental preemptive immunotherapy of murine cytomegalovirus disease with CD8 T-cell lines specific for ppM83 and pM84, the two homologs of human cytomegalovirus tegument protein ppUL83 (pp65). *J. Virol.* **75**:6584-6600.
- Holtappels R., J. Podlech, M. F. Pahl-Seibert, M. Jülch, D. Thomas, C. O. Simon, M. Wagner, and M. J. Reddehase.** 2004. Cytomegalovirus misleads its host by priming of CD8 T cells specific for an epitope not presented in infected tissues *J Exp Med.* **199**:131-136.
- Hossain, M. S., J. D. Roback, B. P. Pollack, D. L. Jaye, A. Langston, and E. K. Waller.** 2007. Chronic GvHD decreases antiviral immune responses in allogeneic BMT. *Blood* **15**:4548-4556.
- Hu X., S. D. Chakravarty, and L. B. Ivashkiv.** 2008. Regulation of interferon and Toll-like receptor signaling during macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms. *Immunol Rev.* **226**:41-56.
- Huang, Y. H., J. Rönnelid, and J. Frostegård.** 1995. Oxidized LDL induces enhanced antibody formation and MHC class II-dependent IFN-gamma production in lymphocytes from healthy individuals. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**:1577-1583.
- Hudson, J. B.** 1979. The murine cytomegalovirus as a model for the study of viral pathogenesis and persistent infections. *Arch. Virol.* **62**:1-29.
- Kavanagh, D. G., U. H. Koszinowski and A. B. Hill.** 2001. The murine cytomegalovirus immune evasion protein m4/gp34 forms biochemically distinct complexes with class I MHC at the cell surface and in a pre-Golgi compartment. *J. Immunol.* **167**:3894-3902.
- Kedl, R. M., J. W. Kappler, and P. Marrack.** 2003. Epitope dominance, competition and T cell affinity maturation. *Curr. Opin. Immunol.* **15**:120-127.
- Keil, G. M., A. Ebeling-Keil, and U. H. Koszinowski.** 1987. Immediate-early genes of murine cytomegalovirus: location, transcripts, and translation products. *J. Virol.* **61**:526-533.
- Khan, A., Y. Tomita, and M. Sykes.** 1996. Thymic dependence of loss of tolerance in mixed allogeneic bone marrow chimeras after depletion of donor antigen. Peripheral mechanisms do not contribute to maintenance of tolerance. *Transplantation* **62**:380-387.
- Khan, S., A. Zimmermann, M. Basler, M. Groettrup, and H. Hengel.** 2004. A cytomegalovirus inhibitor of gamma interferon signaling controls immunoproteasome induction. *J. Virol.* **78**:1831-1842.
- Kisielow, P., and H. von Boehmer.** 1995. Development and selection of T cells: facts and puzzles. *Adv Immunol.* **58**:87-209.
- Kolb, H. J.** 2008. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood* **112**:4371-4383

- Koopman, P., A. Münsterberg, B. Capel, N. Vivian, and R. Lovell-Badge.** 1990. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 348:450-452.
- Kropp, K. A., C.O. Simon, A. Fink, A. Renzaho, B. Kühnapfel, J. Podlech, M. J. Reddehase, and N. K. Grzimek.** 2009. Synergism between the components of the bipartite major immediate-early transcriptional enhancer of murine cytomegalovirus does not accelerate virus replication in cell culture and host tissues. *J Gen Virol.* **90**:2395-2401.
- Koszinowski, U. H., M. Del Val, and M. J. Reddehase.** 1990. Cellular and molecular basis of the protective immune response to cytomegalovirus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **154**:189–220.
- Krmpotic, A., I. Bubic, B. Polic, P. Lucin, and S. Jonjic.** 2003. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. *Microbes. Infect.* **5**:1263-1277.
- Krmpotic, A., M. Messerle, I. Crnkovic-Mertens, B. Polic, S. Jonjic, and U. H. Koszinowski.** 1999. The immunoevasive function encoded by the mouse cytomegalovirus gene *m152* protects the virus against T cell control in vivo. *J. Exp. Med.* **190**:1285–1295.
- Krzyzaniak, M., M. Mach, and W. J. Britt.** 2007. The cytoplasmic tail of glycoprotein M (gpUL100) expresses trafficking signals required for human cytomegalovirus assembly and replication. *J. Virol.* **81**:10316-10328.
- Kyewski, B., and L. Klein.** 2006. A central role for central tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* **24**:571-606.
- Lemmermann, N. A., K. Gergely, V. Böhm, P. Deegen, T. Däubner, and M. J. Reddehase.** 2010. Immune evasion proteins of murine cytomegalovirus preferentially affect cell surface display of recently generated peptide presentation complexes. *J Virol.* **84**:1221-1236.
- Li, W., C. D. Whaley, A. Mondino, and D. L. Mueller.** 1996. Blocked signal transduction to the ERK and JNK protein kinases in anergic CD4+ T cells. *Science* **271**:1272-1276.
- Ljungman P., J. Aschan, I. Lewensohn-Fuchs, S. Carlens, K. Larsson, B. Lönnqvist, J. Mattsson, E. Sparrelid, J. Winiarski, and O. Ringdén.** 1998. Results of different strategies for reducing cytomegalovirus-associated mortality in allogeneic stem cell transplant recipients. *Transplantation* **66**:1330-1334.
- Mach, M., B. Kropff, M. Kryzaniak, and W. Britt.** 2005. Complex formation by glycoproteins M and N of human cytomegalovirus: structural and functional aspects. *J Virol.* Feb. **79**:2160-2170.
- Mangin, M., K. Ikeda, and A. E. Broadus.** 1990. Structure of the mouse gene encoding parathyroid hormone-related peptide. *Gene* **95**:195-202.
- Marks, J. R., and D. H. Spector.** 1988. Replication of the murine cytomegalovirus genome: structure and role of the termini in the generation and cleavage of concatemers. *Virology* **162**:98-107.
- Matzinger, P.** 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science.* **296**:301-305.

- Mayer, A., J. Podlech, S. Kurz, H.-P. Steffens, S. Maiberger, K. Thalmeier, P. Angele, L. Dreher, and M. J. Reddehase.** 1997. Bone marrow failure by cytomegalovirus is associated with an in vivo deficiency in the expression of essential stromal hemopoietin genes. *J. Virol.* **71**:4589–4598.
- Messerle, M., B. Bühler, G. M. Keil, and U. H. Koszinowski.** 1992. Structural organization, expression and functional characterization of the murine cytomegalovirus immediateearly gene 3. *J. Virol.* **66**:27-36.
- Messerle, M., and I. Crnkovic.** 1997. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:14759-14763.
- Meyers, J. D., P. Ljungman, and L. D. Fischer.** 1990. Cytomegalovirus excretion as a predictor of cytomegalovirus disease after marrow transplantation: importance of cytomegalovirus viremia. *J. Infect. Dis.* **162**:373-380.
- Miltenyi, S., W. Müller, W. Weichel, and A. Radbruch.** 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* **11**:231-238.
- Misra, V., M. T. Muller, J. K. Chantler, and J. B. Hudson.** 1978. Regulation of murine cytomegalovirus gene expression. I. Transcription during productive infection. *J. Virol.* **27**:263-268.
- Mocarski, E. S., and C. T. Courcelle.** 2001. Cytomegaloviruses and their replication, pp 2629-2674. *In*: D. M. Knipe and P. M. Howley (eds.), *Fields virology*, 4th ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
- Mocarski, E. S., T. Shenk, and R. F. Pass.** 2006. Cytomegaloviruses, pp. 2702-2772. *In*: D. M. Knipe and P. M. Howley (eds.), *Fields virology*, *Fields Virology* 5th ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
- Moon, H. M., V. J. Sapienza, R. I. Carp, and K. S. Kim.** 1976. DNA synthesis in mouse embryo fibroblast cells infected with murine cytomegalovirus. *Virology* **75**:376-383.
- Munks, M. W., M. C. Gold, A. L. Zajac, C. M. Doom, D. H. Morello, D. H. Spector, and A. B. Hill.** 2006. Genome-wide analysis reveals a highly diverse CD8 T cell response to murine cytomegalovirus. *J. Immunol.* **176**:3760-3766.
- Munks, M. W., A. K. Pinto, C. M. Doom, and A. B. Hill.** 2007. Viral interference with antigen presentation does not alter acute or chronic CD8 T cell immunodominance in murine cytomegalovirus infection. *J Immunol.* **178**:7235-7241.
- Murphy, W. J., and B. R. Blazar.** 1999. New strategies for preventing graft-versus-host disease. *Curr Opin Immunol.* **11**:509-515.
- Mutter, W., M. J. Reddehase, F. W. Busch, H.-J. Bühring, and U. H. Koszinowski.** 1988. Failure in generating hemopoietic stem cells is the primary cause of death from cytomegalovirus disease in the immunocompromised host. *J. Exp. Med.* **167**:1645–1658.
- Navarro, D., P. Paz, S. Tugizov, K. Topp, J. La Vail, and L. Pereira.** 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.

- Ogawa-Goto, K., K. Tanaka, W. Gibson, E. Moriishi, Y. Miura, T. Kurata, S. Irie, and T. Sata.** 2003. Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *J. Virol.* **77**:8541-8547.
- Osgood, E., E., M. C. Riddle, and T. J. Mathews.** 1939. Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow; Case report. *Ann. Intern. Med.* **13**:357-367.
- Pahl-Seibert, M. F., M. Juelch, J. Podlech, D. Thomas, P. Deegen, M. J. Reddehase, and R. Holtappels.** 2005. Highly protective in vivo function of cytomegalovirus IE1 epitope-specific memory CD8 T cells purified by T-cell receptor-based cell sorting. *J. Virol.* **79**:5400-5413.
- Pinto, A. K., M. W. Munks, U. H. Koszinowski, and A. B. Hill.** 2006. Coordinated function of murine cytomegalovirus genes completely inhibits CTL lysis. *J. Immunol.* **177**:3225-3234.
- Pober, J. S., C. G. Orosz, M. L. Rose, and C. O. Savage.** 1996. Can graft endothelial cells initiate a host anti-graft immune response? *Transplantation* **61**:343-349.
- Podlech, J., R. Holtappels, M. F. Pahl-Seibert, H.-P. Steffens, and M. J. Reddehase.** 2000. Murine model of interstitial cytomegalovirus pneumonia in syngeneic bone marrow transplantation: persistence of protective pulmonary CD8-T-cell infiltrates after clearance of acute infection. *J. Virol.* **74**:7496-7507.
- Podlech, J., R. Holtappels, N. Wirtz, H.-P. Steffens, and M. J. Reddehase.** 1998. Reconstitution of CD8 T cells is essential for the prevention of multiple-organ cytomegalovirus histopathology after bone marrow transplantation. *J. Gen. Virol.* **79**:2099-2104.
- Powell, J. D.** 2006. The induction and maintenance of T cell anergy. *Clin. Immunol.* **120**:239-246.
- Prentice, H. G., H. A. Blacklock, G. Janossy, M. J. Gilmore, L. Price-Jones, N. Tidman, L. K. Trejdosiewicz, D. B. Skeggs, D. Panjwani, and S. Ball.** 1984. Depletion of T lymphocytes in donor marrow prevents significant graft-versus-host disease in matched allogeneic leukaemic marrow transplant recipients. *Lancet* **1**:472-476.
- Rawlinson, W. D., H. E. Farrell, and B. G. Barrell.** 1996. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J. Virol.* **70**:8833-8849.
- Reddehase, M. J.** 1991. Bone marrow dysfunction in irradiated, cytomegalovirus-infected mice. *Transplant. Proc.* **3** Suppl. **23**:8-11.
- Reddehase, M. J.** 2002. Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat. Rev. Immunol.* **2**:831-844.
- Reddehase, M. J., M. Baltesen, M. Rapp, S. Jonjic, I. Pavic, and U. H. Koszinowski.** 1994. The conditions of primary infection define the load of latent viral genome in organs and the risk of recurrent cytomegalovirus disease. *J. Exp. Med.* **179**:185-193.
- Reddehase, M. J., and U. H. Koszinowski** 1984. Significance of herpesvirus immediate early gene expression in cellular immunity to cytomegalovirus infection. *Nature* **312**:369-371.

- Reddehase, M. J., S. Jonjic, F. Weiland, W. Mutter, and U. H. Koszinowski.** 1988. Adoptive immunotherapy of murine cytomegalovirus adenitis in the immunocompromised host: CD4-helper-independent antiviral function of CD8-positive memory T lymphocytes derived from latently infected donors. *J. Virol.* **62**:1061–1065.
- Reddehase, M. J., W. Mutter, and U. H. Koszinowski.** 1987. In vivo application of recombinant interleukin 2 in the immunotherapy of established cytomegalovirus infection. *J. Exp. Med.* **165**:650–656.
- Reddehase, M. J., C. O. Simon, J. Podlech, and R. Holtappels.** 2004. Stalemating a clever opportunist: lessons from murine cytomegalovirus. *Hum. Immunol.* **65**:446-455.
- Reddehase, M. J., F. Weiland, K. Münch, S. Jonjic, A. Lüske, and U. H. Koszinowski.** 1985. Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *J. Virol.* **55**:264–273.
- Reddy, P., M. Arora, M. Guimond, and C. L. Mackall.** 2008. GVHD: A continuing barrier to the safety of allogeneic transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **15**:162-168.
- Roizman, B., and J. Baines.** 1991. The diversity and unity of Herpesviridae. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **14**:63-79.
- Roizman, B., and W. Batterson.** 1986. Herpesviruses and their replication, pp. 607-636. *In: Fields, B. N. & D. M. Knipe (eds.), Fundamental Virology, Raven Press, New York.*
- Roizman B., L. E. Carmichael, F. Deinhardt, G. de-The, A. J. Nahmias, W. Plowright, F. Rapp, P. Sheldrick, M. Takahashi, and K. Wolf.** 1981. Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* **16**:201-217.
- Roizman, B., and E. P. Pellet.** 2006. The family herpesviridae: a brief introduction, pp. 2480-2499. *In: D. M. Knipe and P. M. Howley (eds.), Fields virology, 5th ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.*
- Roizman, B., and A. E. Sears.** 1987. An inquiry into the mechanisms of herpes simplex virus latency. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**:543-571.
- Rolle, M., and A. Mayr.** 2002. Herpesviridae, pp. 177-179. *In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 7th ed., Enke Verlag, Stuttgart.*
- Rubocki, R. J., T. H. Hansen, and D. R. Lee.** 1986. Molecular studies of murine mutant BALB/c-H-2-dm2 define a deletion of several class I genes including the entire H-2Ld gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**:9606–9610.
- Sambrook, J., and D. W. Russel.** 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual* 3rd ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Seckert, C. K., A. Renzaho, M. J. Reddehase, and N. K. Grzimek.** 2008. Hematopoietic stem cell transplantation with latently infected donors does not transmit virus to immunocompromised recipients in the murine model of cytomegalovirus infection. *Med. Microbiol. Immunol.* **197**:251-259.
- Shenoy A. R., B. H. Kim, H. P. Choi, T. Matsuzawa, S. Tiwari, and J. D. MacMicking.** 2007. Emerging themes in IFN-gamma-induced macrophage immunity by the p47 and p65 GTPase families. *Immunobiology* **212**:771-784.

- Shlomchik, W. D.** 2007. Graft-versus-host disease. *Nat. Rev. Immunol.* **7**:340-352.
- Shlomchik, W. D., M. S. Couzens, C. B. Tang, J. McNiff, M. E. Robert, J. Liu, M. J. Shlomchik, and S. G. Emerson.** 1999. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* **285**:412-415.
- Simon, C. O., R. Holtappels, H.-M. Tervo, V. Böhm, T. Däubner, S. A. Oehrlein-Karpi, B. Kühnapfel, A. Renzaho, D. Strand, J. Podlech, M. J. Reddehase, and N. K. A. Grzimek.** 2006. CD8 T cells control cytomegalovirus latency by epitope-specific sensing of transcriptional reactivation. *J. Virol.* **80**:10436-10456.
- Simon, C. O., C. K. Seckert, D. Dreis, M. J. Reddehase, and N. K. A. Grzimek.** 2005. Role for tumor necrosis factor alpha in murine cytomegalovirus transcriptional reactivation in latently infected lungs. *J. Virol.* **79**:326-340.
- Sprent, J., and H. Kishimoto.** 2001. The thymus and central tolerance. *Transplantation* **72**:25-28.
- Starr, T. K., S. C. Jameson, and K. A. Hogquist.** 2003. Positive and negative selection of T cells. *Annu. Rev. Immunol.* **21**:139-176.
- Starzl, T. E.** 2004. Chimerism and tolerance in transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:14607-14614.
- Steffens, H.-P., J. Podlech, S. Kurz, P. Angele, D. Dreis, and M. J. Reddehase.** 1998. Cytomegalovirus inhibits the engraftment of donor bone marrow cells by downregulation of hemopoietin gene expression in recipient stroma. *J. Virol.* **72**:5006–5115.
- Stephan, D., H. Sun, K. F. Lindahl, E. Meyer, G. Hämmerling, L. Hood, and M. Steinmetz.** 1986. Organization and evolution of D region class I genes in the mouse major histocompatibility complex. *J. Exp. Med.* **163**:1227-1244.
- Streblow, D. N., S. M. Varnum, R. D. Smith, and J. A. Nelson.** 2006. A proteomics analysis of human cytomegalovirus particles, pp. 91-110. *In* M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Surh, C. D., and J. Sprent.** 1994. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* **372**:100-103.
- Sykes, M.** 2001. Mixed chimerism and transplant tolerance. *Immunity* **14**:417-24.
- Tang, Q., E. A. Murphy, and G. Maul.** 2006. Experimental confirmation of global murine cytomegalovirus open reading frames by transcriptional detection and partial characterization of newly described gene products. *J. Virol.* **80**:6873-6882.
- Teshima, T., R. Ordemann, P. Reddy, S. Gagin, C. Liu, K. R. Cooke, and J. L. Ferrara.** 2002. Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat Med.* **8**:575-581.
- Thomas, E. D., and K. G. Blume.** 1999. Historical markers in the development of allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **5**:341-346.
- Underhill, D. M., M. Bassetti, A. Rudensky, and A. Aderem.** 1999. Dynamic interactions of macrophages with T cells during antigen presentation. *J Exp Med.* **190**:1909-1914.

- van Pel, M., D. W. van Breugel, M. van Wijk, S. Luypen, J. Vingerhoed, P. J Roholl, and C. J. Boog.** 2003. Donor-specific tolerance in a murine model: the result of extra-thymic T cell deletion? *Transpl. Immunol.* **11**:375-384.
- Wagner, M., A. Gutermann, J. Podlech, M. J. Reddehase, and U. H. Koszinowski.** 2002. MHC class I allele-specific cooperative and competitive interactions between immune evasion proteins of cytomegalovirus. *J. Exp. Med.* **196**:805-816.
- Wagner, M., S. Jonjic, U. H. Koszinowski, and M. Messerle.** 1999. Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *J. Virol.* **73**:7056-7060.
- Wang, X., S. M. Huong, M. L. Chiu, N. Raab-Traub, and E. S. Huang.** 2003. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* **424**:456-461.
- Weinreich, M. A., and K. A. Hogquist.** 2008. Thymic emigration: when and how T cells leave home. *J Immunol.* **181**:2265-2270.
- Wells, A. D., X. C. Li, T. B. Strom, and L. A. Turka.** 2001. The role of peripheral T-cell deletion in transplantation tolerance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **356**:617-623.
- Welniak, L. A., B. R. Blazar, and W. J. Murphy.** 2007. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu. Rev. Immunol.* **25**:139-170.
- Wingard, J. R., S. Piantadosi, W. H. Burns, M. L. Zahurak, G. W. Santos, and R. Saral.** 1990. Cytomegalovirus infections in bone marrow transplant recipients given intensive cytoreductive therapy. *Rev. Infect. Dis.* **12**: 793-804.
- Wu, Y., Z. Zheng, Y. Jiang, L. Chess, and H. Jiang.** 2009. The specificity of T cell regulation that enables self-nonsel self discrimination in the periphery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**:534-539.
- Xun, C. Q., J. S. Thompson, C. D. Jennings, S. A. Brown, and M. B. Widmer.** 1994. Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice. *Blood* **83**:2360-2367.
- Zheng, H., C. Matte-Martone, D. Jain, J McNiff, and W. D. Shlomchik.** 2009. Central memory CD8+ T cells induce graft-versus-host disease and mediate graft-versus-leukemia. *J. Immunol.* **182**:5938-5948.
- Ziegler, H., W. Muranyi, H. G. Burgert, E. Kremmer, and U. H. Koszinowski.** 2000. The luminal part of the murine cytomegalovirus glycoprotein gp40 catalyzes MHC class I molecules. *EMBO J.* **19**:870-881.
- Ziegler, H., R. Thäle, P. Lucin, W. Muranyi, T. Flohr, H. Hengel, H. Farrell, W. Rawlinson, and U. H. Koszinowski.** 1997. A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/*cis*-Golgi compartments. *Immunity* **6**:57-66.

## 7. Anhang

Tab. 7.1 Zuordnung der ORF-*Library* Nummern zu den getesteten mCMV ORFs

Nummer in ORF <i>library</i>	ORF	Bemerkung
0	nicht transfizierte Zellen	Negativkontrolle
1	leerer Vektor	pcDNA3.1/V5-His-TOPO; Negativkontrolle
2	Vektor+ LacZ	
3	m01	
4	m02	
5	m03	
6	m04	
7	m05	
8	m06	
9	m07	
10	m08	
11	m09	
12	m10	
13	m11	
14	m12	
15	m13	
16	m14	
17	m15	
18	m16	
19	m17	
20	m18	
21	m19	
22	m20	
23	m21	
24	m22	
25	M03	
26	m23.1	
27	M24	
28	M25	
29	m25.1	
30	m25.2	
31	M26	
32	M27	
33	M28	
34	m29	C-Terminus um 85 AA verkürzt
35	m29.1	Insertion an Position 464, resultierend in einem um 27 AA verlängerten Protein

Nummer in ORF <i>library</i>	ORF	Bemerkung
36	m30	
37	M31	
38	M32 <sup>-</sup>	
39	M33	
40	M34	
41	M35	
42	M36	
43	M37	
44	M38	
45	m39	
46	m40	
47	m41	
48	m42	
49	M43	
50	M44	
51	M45	M45+45.1
52	M46	
53	M47	
54	M48 <sup>-</sup>	
55	m48.1	
56	m48.2	
57	M49	
58	M50	
59	M51	
60	M52	
61	M53	
62	M54	
63	M55 AA 1-400	Klonierung des gesamten Gens ist nicht gelungen
64	M55 AA 730-937	Klonierung des gesamten Gens ist nicht gelungen
65	M56	
66	M57	
67	m58	
68	m59	75bp lange "In Frame" Deletion
69	M69 <sup>-</sup>	
70	m69.1	
71	M70	
72	M71	
73	M72	
74	M73	
75	M74	
76	M75	
77	M76	

Nummer in ORF library	ORF	Bemerkung
78	M77	
79	M78	
80	M79	
81	M80	
82	M82 <sup>-</sup>	
83	M83 <sup>-</sup>	
84	M84 <sup>-</sup>	
85	M85 <sup>-</sup>	
86	M86 <sup>-</sup>	
87	M87	
88	M88	
89	M89 Exon 1, 2	
90	m90	
91	M91	
92	M92	
93	M93	
94	M94	
95	M95	
96	M96	
97	M97	
98	M98	
99	M99	
100	M100	
101	M101	
102	M102	
103	M103	
104	M104	
105	M105	
106	m106	
107	m107	
108	m108	
109	M112 Exon 2, 3	
110	M113	
111	M114	
112	M115	
113	M116	
114	m117	
115	m117.1	
116	M118	
117	m119	
118	m119.1	
119	m119.2	
120	m119.3	
121	m119.4	
122	m119.5	
123	m120	
124	M121	
125	M122 Exon 2, 3, 4	IE3
126	m123 Exon 2, 3, 4	IE1
127	m124	
128	m124.1	

Nummer in ORF library	ORF	Bemerkung
129	m125	93 bp lange "In Frame"- Deletion
130	m126	
131	m127	
132	m128 Exon 3	IE2
133	m129	
134	m130	
135	m131	
136	m132/3	
137	m134	
138	m135	
139	m136	
140	m137	
141	m138	
142	m139	
143	m140	
144	m141	
145	m142	
146	m143	
147	m144	
148	m145	
149	m146	
150	m147	
151	m148	> 100 Punkt-Mutationen
152	m149	
153	m150	
154	m151	
155	m152	
156	m153	
157	m154	
158	m155	
159	m156	
160	m157	
161	m158	
162	m159	
163	m160	
164	m161	
165	m162	
166	m163	
167	m164	
168	m165	
169	m166	
170	m167	
171	m168	
172	m169	
173	m170	

Definition der ORFs nach Rawlinson *et al.*, 1996

- zugrunde liegender Virusstamm: mCMV K181, kloniert im Vektor pcDNA3 im Labor von D. H. Spector, Department of Cellular and Molecular Medicine, University of California, San Diego, USA

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**

### Artikel

N. Wirtz, **S. I. Schader**, R. Holtappels, C.O. Simon, N.A.W. Lemmermann, M.J. Reddehase, J. Podlech. 2008. Polyclonal cytomegalovirus-specific antibodies not only prevent virus dissemination from the portal of entry but also inhibit focal virus spread within target tissues. *MMI*. **197**:151-158.

Becke. S., Aue S, D. Thomas, **S. I. Schader**, J. Podlech, T. Bopp, T. Sedmak, U. Wolfrum, B. Plachter and S. Reyda. 2010. Optimized recombinant dense bodies of human cytomegalovirus efficiently prime virus specific lymphocytes and neutralizing antibodies without the addition of adjuvant. *Vaccine* **23**.

### Konferenzbeiträge

**S. I. Schader**, C. Seckert, J. Podlech, D. Thomas, P. Deegen, D. Gendig, M. Knabe, A. Renzaho, M.J. Reddehase, and R. Holtappels. 2008. Control of murine cytomegalovirus infection after allogeneic bone marrow transplantation. Poster auf der GfV Tagung in Heidelberg.

Gergely, K. M., **S. I. Schader**, M. Messerle M. J. Reddehase, and N. A. W. Lemmermann. 2009. Establishment of a murine challenge model for the optimization of immunotherapy and prophylaxis of cytomegalovirus disease. Poster auf der GfV Tagung in Leipzig.

**S. I. Schader**, D. Thomas, S. Scheller, C. Seckert, J. Podlech, M.J. Reddehase, and R. Holtappels. 2008. Control of murine cytomegalovirus infection after allogeneic bone marrow transplantation. Poster auf der IHW Tagung in Salt Lake City.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Matthias J. Reddehase für die sehr gute Betreuung meiner Arbeit. Die Zeit in seinem Labor an der Universitätsmedizin Mainz sowie die vielen interessanten Diskussionen haben mein Interesse für das Fach Virologie geweckt. Durch seine analytische Herangehensweise an wissenschaftliche Fragestellungen und seine fachliche Kompetenz prägte er ganz entscheidend meine wissenschaftliche Entwicklung.

Herrn Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel danke ich für die Betreuung und die Begutachtung der vorliegenden Arbeit und seine Bereitschaft, diese auch vor dem Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen zu vertreten.

Meiner Betreuerin Dr. Rafaela Holtappels-Geginat danke ich für die exzellente Betreuung, ihren Enthusiasmus und ihre ständige Diskussionsbereitschaft. Darüber hinaus danke ich für die hervorragende teamorientierte Arbeitsweise und ihre Menschlichkeit.

Ich bedanke mich herzlich bei meiner immunologischen Arbeitsgruppe, insbesondere bei Frau Doris Thomas, die mich immunologisch hervorragend unterwiesen hat, für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Ganz besonders möchte ich mich bei Sabine Scheller, Simone Emde und Kerstin Gergely bedanken, die mir stets bei meinen Experimenten geholfen haben. Aber auch für unsere Freundschaft und sehr gute Zusammenarbeit möchte ich mich auf diesem Wege bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Jürgen Podlech und Martin Knabe für die sehr gute histologische Arbeit.

Dr. Natascha Grzimek-Koschewa, Angelique Renzaho, Dorothea Gendig und Dr. Christof Seckert möchte ich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und sehr gute molekularbiologische Arbeit danken. Frau Dr. Grzimek-Koschewa danke ich zusätzlich für Ihre stete Förderung und Unterstützung in allen Dingen.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Virologie. Es war eine sehr schöne Zeit in dieser Arbeitsgruppe zu arbeiten und euch alle kennen gelernt zu haben.

Ich danke allen die diese Arbeit korrigiert haben.

Meinem Mentor Dr. Christian Euchenhofer und seiner Frau Dr. Dörte Euchenhofer danke ich für die Unterstützung während meiner Arbeit und die guten Ratschläge.

Meiner Familie danke ich für die große Unterstützung während des Studiums und der Promotion. Danke, dass ihr immer für mich da seid.

Besonderer Dank gilt meinem Vater, zu dem ich aufschauen kann, der immer Rat weiß, und, auch wenn eine Sache aussichtslos scheint, niemals aufgibt. Er ist mein Mentor des Lebens.

Zu guter Letzt danke ich Marc Hild, der immer zu mir hält und mich bei allem unterstützt. Danke, dass du an meiner Seite stehst.

## **Erklärung**

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Frankfurt, den 09.12.2010

Sina Schader