

Ein verbreitungsdefizientes murines
Cytomegalovirus als Modellvakzine
gegen die Infektion mit β -
Herpesviren



Dissertation der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
zur Erlangung des Dr. rer. nat.

vorgelegt von
Christian A. Mohr

München, den 01.08.2010

-
1. Gutachterin: Prof. Dr. K. Jung
 2. Gutachter: Prof. Dr. M. Boshart
- Sondergutachter: Prof. Dr. U.H. Koszinowski

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Februar 2011

EHRENWÖRTLICHE VERSICHERUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwandt. Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung durchzuführen, noch habe ich diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

München, den 22. Juni 2011

Christian A. Mohr



DANKSAGUNG

An erster Stelle gilt mein Dank Dr. Torsten Sacher der über Jahre hinweg in der Betreuung dieser Arbeit stets ein offenes Ohr, seine Unterstützung und den Glauben an mich aufrechterhielt.

Herrn Prof. Dr. Dr. Ulrich H. Koszinowski danke ich für die Möglichkeit in seinem Institut dieses spannende Projekt bearbeiten zu dürfen, seine immer gewinnbringende Diskussionsbereitschaft und nicht zuletzt die Möglichkeit zur Freiheit meine eigenen Vorstellungen und Gedanken mit zu verwirklichen.

Dr. Zsolt Ruzsics stand mir stets mit Rat zur Seite - seine Ideen und Diskussionen die manchmal bis tief in die Nacht und weit über die Wissenschaft hinausgingen.

Bei Frau Prof. Dr. Kirsten Jung bedanke ich mich herzlich für die externe Betreuung dieser Arbeit und ihre stete Ermutigung meinen Weg zu suchen und zu gehen.

Die tatkräftige Beteiligung von Natalie Röder an diesem Projekt ist mit Worten kaum zu erfassen. Ihr erfrischender Tatendrang und Fleiß und ihre ansteckende gute Laune halfen durch viele Täler.

Dr. Lars Dölken danke ich für seine immerwährende Diskussionsbereitschaft und seine Ermutigungen, sowie den Ansporn einen immer größeren Fisch zu fangen.

Meinen Kooperationspartnern Dr. Jurica Arapovic und Prof. Dr. Stipan Jonjic bin ich in nun jahrelanger Freundschaft verbunden. Marc Panzer und PD Dr. David Vöhringer, sowie Dr. Anton Gruber und Prof. Dr. Thomas Bocker halfen mir mich in immunologischen Fragestellungen und Systemen zurecht zu finden.

Christian Giller, Trixi und Silke, sowie Jenny, Claudia, Saib und Olga danke ich für ihren großen Eifer bei der unkomplizierten Ermöglichung meiner Versuche.

Mareike Berning und Annelies Weyn waren für mich wichtige Wegbegleiterinnen.

Großer Dank gilt natürlich allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für das angenehme Arbeitsklima und die vielen schönen und hilfreichen Gespräche.

Ganz besonders aber sage ich meiner Frau ein großes Danke für ihre Unterstützung und ihren Glauben an mich und meine Arbeit, für ihre Geduld und ihre Liebe.

Nicht zuletzt geht ein herzlicher Dank an meine Eltern, ohne deren Unterstützung, Zuspruch und Liebe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.



ZUSAMMENFASSUNG

Das humane Cytomegalovirus (HCMV) ist ein ubiquitär vorkommendes humanes β -Herpesvirus. Die Infektion mit HCMV stellt die Hauptursache konnataler Infektionen dar und verursacht schwerwiegende Komplikationen in immun geschwächten Patienten. Bis heute gibt es keinen geeigneten Impfstoff.

In dieser Arbeit wurde ein neues Konzept für die Impfung gegen die Infektion mit β -Herpesviren getestet. Es wurde eine murine CMV (MCMV) Vakzine generiert, die alle viralen Gene bis auf das konservierte Gen *M94* exprimiert. Durch den Verlust dieses essentiellen Gens kann sich die Infektion des verbreitungsdefizienten Virus, nach Infektion der ersten Zielzellen *in vivo*, nicht zur Nachbarzellen verbreiten.

Selbst in stark anfälligen Interferon Typ-I Rezeptor defizienten $\text{IFN}\alpha\beta\text{R}^{-/-}$ Mäusen führt die Infektion mit $\text{MCMV-}\Delta\text{M94}$ nicht zur Ausprägung von Symptomen. Die Impfung mit $\text{MCMV-}\Delta\text{M94}$ induzierte eine neutralisierende Antikörperantwort sowie eine funktionelle CD8^+ T Zellantwort gegen verschiedene virale Peptide. Zudem konnte durch Zelltyp-spezifische Schaltung des Modellantigens Ovalbumin gezeigt werden, dass die Induktion der Antigenexpression in Endothelzellen ausreichend für die Stimulation der Proliferation von CD8^+ T Zellen ist. Außerdem konnten Genome von $\text{MCMV-}\Delta\text{M94}$ in Lungen noch ein Jahr nach Infektion nachgewiesen werden. Diese Studie demonstriert, dass die Infektion der ersten Zielzelle mit einem verbreitungsdefizienten β -Herpesvirus ausreichend ist, eine latente Infektion zu etablieren und Impfschutz gegen Wildtypinfektion zu generieren. Dass hierfür die Virusvermehrung und Virusverbreitung nicht notwendig sind, wird durch die Verbreitungsdefizienz des $\text{MCMV-}\Delta\text{M94}$ gezeigt.

SUMMARY

Human Cytomegalovirus (HCMV) is an ubiquitous human pathogen of the β -herpesvirus subfamily. Infection with HCMV is the major cause of congenital infection and causes severe complications in immunocompromised patients. Until now, no commercial vaccine is available.

In this study a novel concept for vaccination against infection with β -herpesviruses was assessed. A murine CMV (MCMV) vaccine was generated that expresses all viral genes despite the conserved late gene *M94*. Due to the lack of *M94* the infection with the spreaddeficient virus is restricted to the first target cell *in vivo* and no viral progeny is generated.

MCMV- $\Delta M94$ infection was proven to be safe and even in highly susceptible Interferon Typ-I Receptor knock-out mice, i.e. IFN $\alpha\beta$ R $^{-/-}$, vaccination did not cause overt symptoms. MCMV- $\Delta M94$ induced neutralising antibody response and functional T cell responses comparable to wildtype. In addition, cell type specific induction of the expression of Ovalbumin modelantigen proved the induction of antigen in endothelial cells to be sufficient for the stimulation of CD8 $^{+}$ T cell proliferation. Furthermore, genomes of MCMV- $\Delta M94$ could be isolated from lungs even one year after infection. Therefore, this study demonstrates that infection of the first target cell with a spread-deficient β -herpesvirus is sufficient to establish longterm infection and immunity against infection with wildtype. Since spread is abrogated in MCMV- $\Delta M94$, viral replication is not a prerequisite for latency and immunity.

Inhaltsverzeichnis	<i>i</i>
Abbildungsverzeichnis	<i>v</i>
1 EINLEITUNG	- 1 -
1.1 Die Familie der Herpesviren	- 1 -
Tabelle 1.1: Übersicht über humane Herpesviren	- 4 -
1.2 Das Humane Cytomegalovirus (HCMV)	- 6 -
1.2.1. Infektionszyklus von HCMV	- 6 -
1.2.2. Epidemiologie	- 10 -
1.2.3. Symptomatik der CMV-Infektion	- 11 -
1.2.4. Antivirale Therapie	- 13 -
1.3 Die Infektion mit CMV im Tier-Modell	- 15 -
1.3.1. Die Immunantwort gegen MCMV	- 17 -
1.3.2. Entwicklung von Impfstoffen gegen β -Herpesviren	- 23 -
1.3.3. Attenuierte Lebendimpfstoffe	- 24 -
Tabelle 1.2: Status klinischer Studien ausgewählter HCMV Vakzinen	- 24 -
1.3.4. Totimpfstoffe	- 28 -
1.4 Herstellung einer Modellvakzine durch gezielte Deletion	- 31 -
1.4.1. Die Herstellung eines attenuierten MCMV Impfstoffes durch gezielte Deletion immunevasiver Gene	- 31 -
1.4.2. Replikations-defiziente Herpesvirus Vakzinen	- 33 -
1.4.3. Die Auswahl des zu deletierenden Gens <i>M94</i> zur Erzeugung eines verbreitungsdefizienten MCMV Impfstoffes	- 35 -
1.5 Organ und Zelltropismus von CMV in vivo	- 36 -
1.5.1. Das Cre-loxP System zur Untersuchung Zelltyp-spezifischer Viruseigenschaften	- 36 -
1.6 Zielsetzung der Arbeit	- 39 -
2 MATERIAL	- 41 -
2.1 Geräte	- 41 -

2.2	Verbrauchsmaterialien	- 42 -
2.3	Reagenzien	- 43 -
2.4	Antikörper	- 45 -
2.5	Enzyme	- 46 -
2.6	Peptide	- 46 -
2.7	Kommerzielle Komplettsysteme	- 47 -
2.8	Bakterienstämme	- 47 -
2.9	Zellen	- 47 -
2.10	Oligonukleotide	- 48 -
2.11	Kulturmedien/ Seren	- 48 -
2.11.1.	Grundmedien	- 48 -
2.11.2.	Zusätze/ Seren	- 48 -
2.11.3.	Puffer und Lösungen	- 49 -
3	METHODEN	- 53 -
3.1	Arbeiten mit Bakterien	- 53 -
3.1.1.	Kultivierung von <i>E. coli</i>	- 53 -
3.1.2.	Herstellung elektrokompenter Bakterien	- 53 -
3.1.3.	Transformation durch Elektroporation	- 54 -
3.2	Arbeiten mit DNA	- 54 -
3.2.1.	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	- 54 -
3.2.2.	Isolierung von BAC-DNA in analytischem Maßstab	- 54 -
3.2.3.	Restriktion von DNA	- 55 -
3.2.4.	Dephosphorylierung von DNA-Enden	- 56 -
3.2.5.	Herstellung von blunt-Enden mit Klenow-Polymerase	- 56 -
3.2.6.	Agarose Gelelektrophorese	- 56 -
3.2.7.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	- 57 -
3.2.8.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	- 57 -
3.2.9.	Ligation	- 57 -
3.2.10.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	- 57 -
3.2.11.	Quantitative Realtime PCR (qPCR)	- 58 -
3.2.12.	Aufreinigung eines PCR-Fragments	- 59 -
3.2.13.	Herstellung rekombinanter BACs	- 59 -

3.2.14.	Herstellung rekombinanter Viren _____	- 61 -
3.2.15.	Herstellung verbreitungsdefizienter Virus Mutanten _____	- 62 -
3.2.16.	Sequenzierung _____	- 64 -
3.3	Zellkultur _____	- 64 -
3.3.1.	Haltung von Zellen _____	- 65 -
3.3.2.	Bestimmung der Zellzahl mit Neubauer-Zählkammer _____	- 66 -
3.3.3.	Herstellung der the trans-komplementierenden Zelllinie NT/M94-7 - 66 -	
3.4	Herstellung rekombinanter MCMV-Viren _____	- 67 -
3.4.1.	Virus-Rekonstitution _____	- 67 -
3.4.2.	Transfektion eukaryontischer Zellen _____	- 68 -
3.4.3.	Virusstock-Herstellung _____	- 69 -
3.4.4.	Virus-Titerbestimmung durch Standard Plaque-Assay _____	- 70 -
3.4.5.	Virustiterbestimmung mit TCID ₅₀ _____	- 70 -
3.4.6.	UV-Inaktivierung von Viren _____	- 71 -
3.5	Versuche im Mausmodell _____	- 72 -
3.5.1.	Zellen und Mäuse _____	- 72 -
3.5.2.	Immunisierung und Kontrollinfektion bei Mäusen _____	- 72 -
3.5.3.	Serumgewinnung bei der Maus _____	- 73 -
3.5.4.	Virus Neutralisations Assay _____	- 73 -
3.5.5.	<i>In vivo</i> Zytotoxizitäts-Assay _____	- 74 -
3.5.6.	Adoptiver Transfer und Durchflusszytometrische Analyse ____	- 75 -
3.5.7.	Quantifizierung viraler Genome in Organ-Homogenaten ____	- 76 -
3.5.8.	Statistische Analyse _____	- 76 -
4	ERGEBNISSE _____	- 79 -
4.1	MCMV-ΔM94 setzt keine Nachkommenschaft frei _____	- 79 -
4.2	Die DNA Replikation des MCMV-ΔM94 verläuft intakt _	- 84 -
4.3	Die Impfung mit MCMV-ΔM94 ist sicher und eine Reversion des Impfvirus zu verbreitungskompetenten Viren unterbleibt __	- 86 -
4.4	MCMV-ΔM94 induziert neutralisierende Antikörper ____	- 90 -
4.5	Inaktivierung von MCMV mittels Bestrahlung mit UV-Licht _	92 -
4.6	MCMV-ΔM94 induziert eine starke T Zellantwort _____	- 94 -

4.7	Der Beitrag der Infektion verschiedener Zelltypen zur antiviralen CD8 ⁺ T Zellantwort _____	- 98 -
4.8	MCMV- Δ M94 als Vakzine _____	- 108 -
4.9	MCMV- Δ M94 schützt IFN α β R ^{-/-} Mäuse _____	- 112 -
4.10	Das Genom von MCMV- Δ M94 verbleibt im Wirt _____	- 114 -
4.11	Die Vakzinierung mit MCMV- Δ M94 verhindert Transmission - 116 -	
5	<i>DISKUSSION</i> _____	- 119 -
5.1	Die Komplementation des deletierten Gens <i>M94</i> in trans- _____	- 119 -
5.2	Verbreitungsdefiziente Herpesvirus-Vakzinen _____	- 124 -
5.3	Die Immunantwort gegen MCMV- Δ M94 _____	- 128 -
5.4	Vergleich zwischen verbreitungsdefizientem MCMV mit attenuiertem MCMV _____	- 131 -
5.5	Die Rolle der primär infizierten Zielzellen für die antivirale Immunantwort _____	- 134 -
5.6	Die Rolle der primär infizierten Zielzellen für die virale Langzeit-Infektion _____	- 138 -
6	<i>LITERATURVERZEICHNIS</i> _____	- 143 -
7	<i>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</i> _____	- 173 -
8	<i>PUBLIKATIONSLISTE</i> _____	- 179 -
9	<i>CURRICULUM VITAE</i> _____	- 183 -

Abbildungsverzeichnis

- 1.1 Schematische Darstellung des Cytomegalovirus Virion___ - 1 -
- 1.2 Genkarten von HSV-1, HCMV und EBV Genomen_____ - 2 -
- 1.3 Cytomegalovirus-Zusammenbau_____ - 9 -
- 1.4 Klinische Manifestationen der CMV Infektion_____ - 12 -
- 1.5 Das Schema der adaptiven antiviralen Immunantwort___ - 22 -
- 1.6 Das MCMV Genom: Organisation in Genblöcken_____ - 32 -
- 1.7 Vergleich von Replikations-defizienten und DISC HSV___ - 34 -
- 1.8 Cre-vermittelte Rekombination viraler Genome _____ - 37 -
- 1.9 Projektübersicht: Charakterisierung der verbreitungsdefizienten MCMV-Vakzine MCMV- Δ M94 _____ - 40 -
- 4.1 Das Konzept induzierbarer Trans-Komplementation_____ - 80 -
- 4.2 MCMV- Δ M94 ist defekt und die Virusvermehrung ist abhängig von der Trans-Komplementation des pM94_____ - 81 -
- 4.3 MCMV- Δ M94 kann sich nicht Zell-assoziiert Verbreiten__ - 83 -
- 4.4 Quantifizierung der viralen Genome von MCMV- Δ M94__ - 84 -
- 4.5 MCMV- Δ M94 revertiert *in vivo* nicht zu verbreitungskompetentem Virus_____ - 87 -
- 4.6 Infektion mit MCMV- Δ M94 verläuft für immungeschwächte Mäuse ohne Nachweis von Symptomen_____ - 89 -
- 4.7 MCMV- Δ M94 induziert eine neutralisierende Antikörper Antwort, vergleichbar mit MCMV-*wt* _____ - 91 -
- 4.8 Inaktivierung von MCMV mittels UV Licht_____ - 93 -
- 4.9 MCMV-*ova*- Δ M94 induziert die Expansion adoptiv transferierter OVA spezifischer T Zellen_____ - 95 -
- 4.10 MCMV-*ova*- Δ M94 induziert zytotoxische CD8⁺ T Zellantwort gegen virale Peptide_____ - 96 -

- 4.11 Konstruktion einer verbesserten flox-Ovalbumin Kasette - 99 -
- 4.12 Der Beitrag verschiedener Zelltypen zur Proliferation adoptiv transferierter CD8⁺ T Zellen _____ - 100 -
- 4.13 Beitrag verschiedener Zelltypen zu zytotoxischer Ovalbumin spezifischer CD8⁺ T Zell Antwort _____ - 101 -
- 4.14 Einfluss der flox Stopp-Kasette auf basale Genexpression - 106 -
- 4.15 MCMV- $\Delta M94$ führt zur Kontrolle von MCMV-*wt* im BALB/c Stamm _____ - 108 -
- 4.16 Impfung mit MCMV- $\Delta M94$ vermittelt Schutz gegen Wildtyp Infektion in C57BL/6 Mäusen _____ - 110 -
- 4.17 MCMV- $\Delta M94$ schützt immungeschwächte IFN $\alpha\beta$ R^{-/-} Mäuse _____ - 113 -
- 4.18 Langzeit Nachweis von MCMV- $\Delta M94$ Genomen _____ - 115 -
- 4.19 Schutz durch MCMV- $\Delta M94$ zwölf Monate nach Infektion -117-

1 EINLEITUNG

1.1 Die Familie der Herpesviren

Die Familie der Herpesviren (*Herpesviridae*) umfasst Viren mit ähnlichen und charakteristischen Strukturmerkmalen, deren Vertreter bezüglich ihrer Morphologie und Genomgröße zu den größten und komplexesten der bekannten Viren gehören (Abb. 1.1). Alle Herpesvirus-Vertreter besitzen ein etwa 150nm großes, ikosaedrisch aufgebautes und aus 162 Kapsomeren bestehendes Kapsid, das ein lineares und doppelsträngiges DNA Genom beinhaltet (Abb. 1.2). Umgeben wird dieses Nukleokapsid von einer doppelschichtigen Lipidmembran, in die verschiedene Glykoproteine eingelagert sind. Der Zwischenraum zwischen Nukleokapsid und Lipidmembran wird von einer amorph strukturierten Tegumentschicht eingenommen (1).

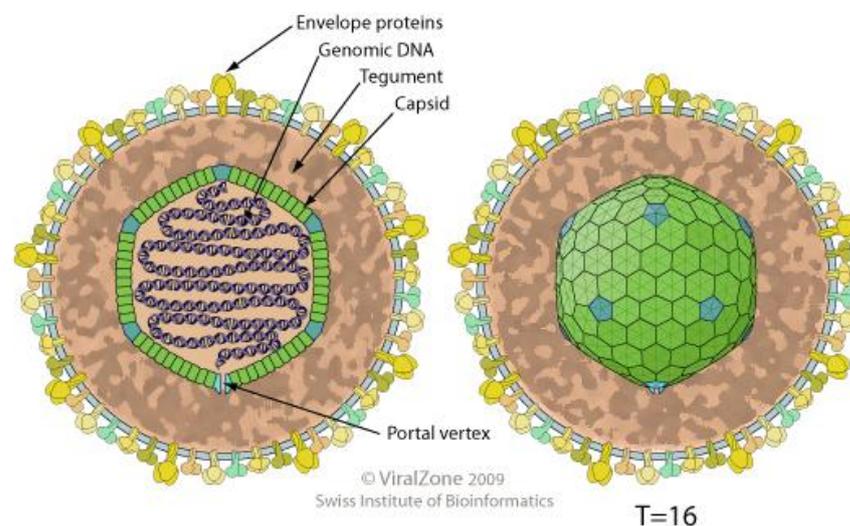


Abb. 1.1 Schematische Darstellung des Cytomegalovirus Virion

Die Erbinformation des Cytomegalovirus besteht aus einem langen (~230kb), linearen und doppelsträngigen DNA Genom. Das Genom wird von einem Kapsid (Capsid) mit etwa 150nm Durchmesser umgeben. Das Kapsid ikosaedrischer Symmetrie (T=16) besteht aus 162 Kapsomeren und wird von einer amorph strukturierten Tegumentschicht eingeschlossen. Umgeben wird dieses Nukleokapsid von einer Lipid-Doppelmembran, der Hüllmembran (Envelope), in die verschiedene Glykoproteine eingelagert sind.

Das doppelsträngige DNA Genom (130 bis mehr als 230kb Länge), das für 70 bis über 150 Gene kodiert, beinhaltet unter anderem die genetische Informationen über Strukturelemente, Glykoproteine, Enzyme, die im Nucleinsäurestoffwechsel und bei der Genomreplikation benötigt werden, sowie Genprodukte, die der adaptiven und angeborenen Immunantwort des Wirts entgegenwirken (2). Die Infektion mit Herpesviren persistiert lebenslang. Zu manchen Zeiten wird Latenz etabliert, ein Zustand in dem die viralen Genome, nicht aber infektiöse Partikel nachgewiesen werden können. Von Zeit zu Zeit werden durch die Reaktivierung der Genexpression lytische Infektionszyklen eingeleitet, die zur klinischen Ausprägung führen können, insbesondere dann, wenn die Kontrolle durch die Immunantwort beeinträchtigt ist (3).

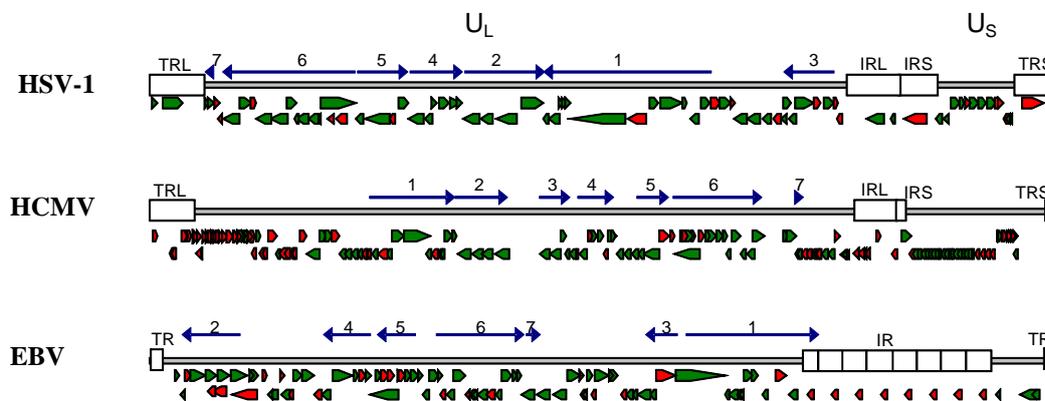


Abb. 1.2. Genkarten von HSV-1, HCMV und EBV Genomen.

Die relative Anordnung der bekannten Gene von HSV-1, CMV und EBV sind als Pfeilspitzen dargestellt (aus (4) modifiziert nach Fields, Virology (3)). Grüne Pfeile stellen Gene dar, deren Funktion bekannt oder vorgeschlagen ist. Rote Pfeile kennzeichnen Gene mit unbekannter Genfunktion (5). Allen Herpesviren ist eine Gruppe von 43 hoch konservierten und meist essentiellen Genen gemein, die in sieben zentralen Blöcken organisiert sind. Die relative Anordnung der zentralen Genblöcke ist hier durch dunkelblaue Pfeile dargestellt. Einige Funktionen dieser Gene sind beschrieben. Die meisten Gene mit noch unbekannter Funktion sind nicht-konservierte Gene an den Genomenden (accession numbers: HSV-1: X14112; HCMV: NC_001347; EBV: NC_007605). UL, US: unique region -long (L); -short (S); TR, TRL, TRS: terminal repeat; IR, IRL, IRS: internal repeats.

In verschiedenen Spezies konnten bisher über 170 unterschiedliche Herpesviren nachgewiesen werden, darunter Säugetiere, Vögel, Reptilien und Fische, sowie wenige Wirbellose. Historisch wurden die einzelnen Mitglieder der Herpesvirusfamilie, auf Basis ihrer biologischen Eigenschaften wie Wirtsspezifität, Dauer des Reproduktionszyklus und Charakteristik des Infektionsverlaufes *in vitro* in drei Unterfamilien, α -, β - und γ -*Herpesvirinae*, klassifiziert (6,7). Tabelle 1.1 liefert eine Übersicht über die acht humanen Herpesviren (HHV), die chronologisch in der Reihenfolge ihrer Entdeckung bezeichnet wurden, sowie den mit ihnen assoziierten Krankheitsbildern.

Die α -Herpesviren sind in der Lage Zellen anderer Spezies zu infizieren, persistieren in den Nervenzellen der Ganglien und zeichnen sich *in vitro* durch kurze Replikationszyklen von etwa 15 Stunden aus. Zu ihren Vertretern zählen das Herpes-Simplex- (HSV) sowie das Varicella-Zoster-Virus (VZV). Im Tier führen vor allem das Pseudorabiesvirus (PrV) im Schwein, sowie Marek's-Disease-Virus (MDV) im Huhn zu Ausfällen in der Massentierhaltung.

Die Vertreter der Unterfamilie der β -Herpesviren besitzen ein enges Wirtsspektrum, dagegen jedoch einen breiten Zelltropismus und einen relativ langen Replikationszyklus von etwa 72 Stunden. Im Menschen finden Infektionen mit humanem Cytomegalovirus (HCMV; HHV-5) und den humanen Herpesviren 6 und 7 (HHV-6 und HHV-7) statt. Hierbei verläuft die primäre Infektion des immunkompetenten Individuums meist symptomlos. Klinische Manifestationen der HCMV Infektion treten vor allem nach konnataler Infektion des Embryos oder bei Patienten mit angeborener und erworbener Immunschwäche bzw. bei immunsuppressiver Behandlung auf und werden im Kapitel 1.2.3 genauer beschrieben.

Tabelle 1.1: Übersicht über humane Herpesviren

Unterfamilie:	<i>α- Herpesvirinae</i>	<i>β- Herpesvirinae</i>	<i>γ- Herpesvirinae</i>
Humane Vertreter:	HHV-1 (HSV-1) HHV-2 (HSV-2) HHV-3 (VZV)	HHV-5 (HCMV) HHV-6 HHV-7	HHV-4 (EBV) HHV-8 (KSHV)
Dauer des Replikationszyklus	kurze Replikationszyklen von ca. 15 h (8)	lange Replikationszyklen von ca. 72 h (9)	Replikationszyklen verschieden
Tropismus	breites Spektrum infizierbarer Zelltypen persistieren in Nervenzellen der Ganglien	breites Spektrum infizierbarer Zelltypen; infizierte Zellen stark vergrößert (Cytomegalie)	enges Spektrum an infizierbaren Zelltypen Infektion und Latenz der B- oder T-Lymphozyten; lytische Infektion in Epithel und Fibroblasten
Speziesspezifität	breites Wirtsspektrum	enges Wirtsspektrum	sehr enges Wirtsspektrum
Klinische Manifestationen:	<u>HHV-1&2:</u> Herpes Simplex Keratitis, herpes labialis, herpes genitalis, <u>HHV-3:</u> Windpocken, Gürtelrose	<u>HHV-5:</u> Frühabort, Einschlusskörperchen-Krankheit (CID), Hepatitis, Pneumonitis, Taubheit, Erblinden, Myocarditis, Encephalitis <u>HHV-6:</u> Roseola infantum, Exanthem subitum <u>HHV-7:</u> Kein eindeutiges Krankheitsbild zugeordnet	<u>HHV-4:</u> Burkitt Lymphom, infektiöse Mononukleose, Pfeiffersches Drüsenfieber, Nasopharynxkarzinome, Morbus Hodgkin, Non-Hodgkin-Lymphome, PTLD <u>HHV-8:</u> Kaposi Sarkom, Morbus Castleman

Nach (10)

Die Vertreter der Unterfamilie der γ -Herpesviren sind durch ein sehr enges Wirtsspektrum charakterisiert. Die Infektion findet vor allem in Zellen des adaptiven Immunsystems statt, in denen das Virus latent verbleibt. Das Epstein-Barr-Virus (EBV; HHV-4) bspw. infiziert vor allem B-Lymphozyten. Die primäre EBV Infektion führt zu Pfeifferschem Drüsenfieber. Die Infektion mit γ -Herpesviren ist gelegentlich jedoch auch mit malignen Erkrankungen assoziiert. So führt die Infektion mit EBV außerdem zu Erkrankungen wie Nasopharynxkarzinomen, Morbus Hodgkin, Non-Hodgkin-Lymphomen sowie von Post-Transplantations-Lymphoproliferationen (PTLD). Das humane Herpesvirus-8 oder Kaposi-Sarkom-Virus (KSHV; HHV-8) verursacht das gleichnamige Kaposi-Sarkom, sowie Morbus Castleman.

1.2 Das Humane Cytomegalovirus (HCMV)

1.2.1. Infektionszyklus von HCMV

Die Ursache für die diversen Krankheitsbilder einer pathologischen HCMV Infektion können in dem breiten Zelltropismus von HCMV gesehen werden. *In vitro*, kann HCMV fast alle humanen Zelllinien infizieren (11). Ob CMV für bestimmte Zelltypen einen Tropismus besitzt, d.h. ob eine produktive Infektion der Zelle stattfinden kann, hängt grundsätzlich von mehreren Faktoren ab. Zum einen muss das Virus in die Zelle eindringen können (Entry), zum anderen, müssen DNA-Replikation, Genexpression, der Zusammenbau (Morphogenese) und letztlich die Freisetzung (Release) neuer Viruspartikel stattfinden. Das mögliche Eindringen des Virus in eine Zelle (Suszeptibilität) ist hierbei nicht notwendigerweise gleichbedeutend mit der Etablierung einer produktiven Infektion (Permissivität) – die Infektion kann abbrechen (abortiver Verlauf) oder Latenz kann etabliert werden.

Anheftung und Eintritt von CMV

Die initiale Anheftung von HCMV an die Zielzelle wird durch die reversible (12) Interaktion von Glykoproteinen der Virushülle (13) mit den auf fast allen Zellen exprimierten Heparansulfat-Proteoglykanen (14) vermittelt. Es wurden zudem Rezeptoren beschrieben, die nur von bestimmten Zelltypen exprimiert werden. Dendritische Zellen (Dendritic cells, DC) exprimieren beispielsweise das Lectin DC-SIGN (DC-Specific ICAM-Grabbing Nonintegrin). Eine Binding an DC-SIGN wird von einigen Viren, wie HIV oder Ebolavirus für die Anheftung an DC verwendet und wurde auch für virale Glykoproteine in HCMV beschrieben (15,16).

Nach der initialen Anheftung der Viren an die Zelloberfläche erfolgt eine stabilere Bindung viraler Glykoproteine/Glykoproteinkomplexe an spezifische Rezeptoren der Zelloberfläche. Für die Zusammensetzung dieser viralen Glykoproteine werden mitunter verschiedene alternative Formationen beschrieben (17,18). Es wurde gezeigt, dass unterschiedliche Formationen zur Infektion verschiedener Zelltypen führen (19,20,21). Mutationen in diesen Glykoproteinkomplexen, z.B. durch wiederholte Zellkulturpassage auf Fibroblasten, führen zu den genannten Zelltypen nicht mehr produktiv infizierenden Virusmutanten. Die Zusammensetzung der viralen Glykoproteinkomplexe definiert also den Tropismus für bestimmte Zelltypen.

Der eigentliche Eintritt des Virus in die Zelle kann durch direkte Fusion von Virushülle und Plasmamembran, oder nach Rezeptor-abhängiger Endozytose, durch Fusion der Virushülle mit Membranen endozytotischer Vesikel erfolgen (22). Die unterschiedlichen Formationen viraler Glykoproteinkomplexe bestimmen, ob die direkte Fusion von Virushülle und Plasmamembran (bsp. in Anwesenheit des gO) oder die Fusion nach Rezeptor-abhängiger Endozytose (bsp. in Abwesenheit des gO) stattfindet (23). Für den Eintritt des CMV in Endothelzellen wurden beide Wege beschrieben (24,25).

DNA-Replikation, Virusmorphogenese und Freisetzung

Den beschriebenen Fusionsereignissen folgt das Eindringen des Nukleokapsids, mitsamt Tegument in die Zelle. Das Nukleokapsid wird zu Kernporen transportiert und die virale DNA wird eingeschleust. Das lineare Genom wird im ersten Schritt des DNA-Replikationszyklus zirkularisiert und über die sog. „Rolling-Circle“ Amplifikation in Konkatameren vervielfältigt. Die Genexpression

im Zellkern verläuft kaskadenförmig in drei aufeinanderfolgenden Phasen (26) und beginnt unmittelbar nach Eintritt mit der Transkriptionsaktivierung der immediate early-Gene (IE). In der folgenden Früh-Phase (Early; E) werden zur DNA- und Proteinsynthese benötigte Proteine, wie die virale DNA-Polymerase, exprimiert. In der anschließenden Spät-Phase (Late; L) werden vor allem Strukturproteine generiert, die dem Viruszusammenbau im Kern dienen.

Das Andocken des Nucleokapsids an die innere Kernmembran wird durch bereits angelagertes Tegument im Zellkern ermöglicht (Abb. 1.3). Durch die Knospung an der inneren Kernmembran erhält das Kapsid die erste, vorübergehende, Membranhülle (sog. primary-envelopment). Über den perinuklearen Raum wird das Kapsid nach Fusion mit der äußeren Kernmembran aus dem Kern ausgeschleust und wird assoziiert mit Tegumentproteinen ins Zytoplasma entlassen. Die Reifung des Teguments erfolgt durch Anlagerung verschiedener Proteine im Zytoplasma (27,28), die sich in der späten Infektionsphase am Trans-Golgi Netzwerk fortsetzt. Hier erhalten die Kapside eine zweite und endgültige Virushülle (sog. secondary envelopment) (29). Der zweite Umhüllungsschritt im Zytoplasma ist ein Schlüsselereignis bevor der lytische Zyklus durch das Ausschleusen infektiöser Partikel aus der Zelle abgeschlossen wird und die Infektion weiterer Zellen stattfinden kann.

Der Nachweis nicht umhüllter Kapside bei Deletionsmutanten von *UL99* in HCMV (30) und *M94 (UL94)* in murinem CMV (MCMV) (Maninger et al, Manuskript in Vorbereitung) legt die Beteiligung dieser Proteine an einem essentiellen Schritt des secondary envelopment oder der Rekrutierung der zweiten Lipidhülle nahe.

Das Verständnis der einzelnen Schritte des Viruszusammenbaus bietet hierbei ein großes Potential für das gezielte Eingreifen zur

Generierung rekombinanter Impfviren oder der Verbesserung der antiviralen Therapiemethoden.

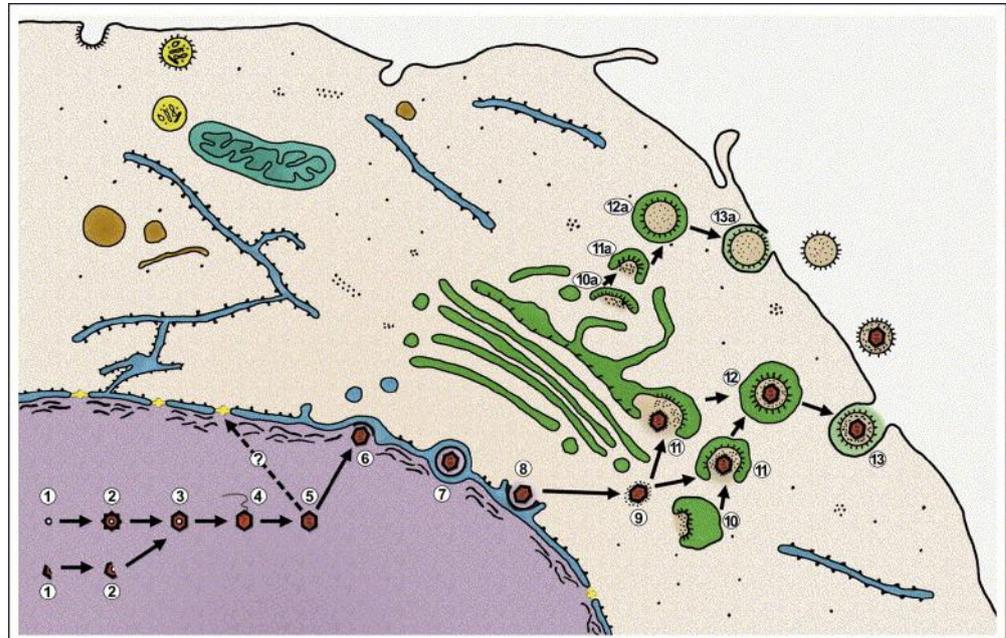


Abb. 1.3: Cytomegalovirus-Zusammenbau

Im Kern findet die Reifung der Kapside (1-3) und die Verpackung der DNA statt (4). DNA-bepackte Kapside (5) binden an die Kerninnenmembran, an der lokal die Kernlamina aufgelöst ist (6). Die Knospung an der inneren Kernmembran resultiert in primär umhüllte Virionen im perinuklearen Raum (7). Die primäre Lipidhülle fusioniert mit der äußeren Kernmembran (8) und zur Freisetzung des Nukleokapsids in das Zytosol. Proteine des inneren Teguments lagern sich an (9). Glykoproteine und Proteine der äußeren Tegumentschicht sammeln sich an Membranen des Golgi-Apparates oder vesikulären Strukturen (10) und binden das Kapsid mit der inneren Tegumentschicht während des zweiten Umhüllungsschrittes (11). Die umhüllten Virionen werden in Vesikeln (12) zur Plasmamembran transportiert (13) und freigesetzt. Zudem wurde die Bildung und Freisetzung von Partikeln ohne Kapsid beschrieben (10a-13a). Aus Herpesvirus assembly: a tale of two membranes (31).

MCMV in latenter Infektion

Alternativ zum lytischen Zyklus, kann nach der Relokalisation des viralen Genoms auch die Etablierung einer lebenslangen (latenten) Infektion erfolgen. Die Aktivierung der viralen Genexpression findet nicht statt und die vollständige Replikation viraler DNA unterbleibt (32,33). *In vivo* konnte die virale Erbinformation des Virus nach Ablauf der akuten Infektion in Endothelzellen (EC),

Makrophagen (MΦ) und Knochenmarkzellen (34) nachgewiesen werden. Sog. „Immediate early“ (IE) Gentranskripte treten in den ersten 4 Stunden nach Infektion auf, wenn regulatorische Schlüsselproteine exprimiert werden, die dem Virus die Kontrolle über die zelluläre Replikations-Maschinerie erlauben. Da die Genprodukte der IE Region damit essentiell für die virale Replikation sind, spricht die Präsenz der IE Transkripte eher für eine Persistenz in der geringe Mengen infektiösen MCMV lediglich nicht nachgewiesen werden können (35). Es gibt also Unstimmigkeit, ob MCMV tatsächlich latent, persistent, oder sowohl als auch nach abgelaufener akuter Infektion im Körper verbleibt.

1.2.2. Epidemiologie

HCMV, als Hauptvertreter der β -Herpesviren, ist in der menschlichen Population ubiquitär verbreitet, wobei die Prävalenz abhängig von Alter und sozioökonomischen Faktoren wie z.B. Kinderzahl und Hygienestatus ist. In Mitteleuropa und Nordamerika können in ca. 50% der Erwachsenen HCMV-Antikörper nachgewiesen werden. In Entwicklungsländern kann die Durchseuchungsrate bereits im Kindesalter bei annähernd 100% liegen (36). Die unterschiedliche Prävalenz der HCMV-Infektion liegt wohl in den viralen Übertragungswegen begründet. Da die Infektion meist über direkten Körperkontakt als Tröpfchen- oder Schmierinfektion erfolgt, erhöht ein geringes Hygieneniveau die Infektionswahrscheinlichkeit. Neben Speichel, Sperma, Zervixsekret, Muttermilch und Urin ist auch Blut als infektiös anzusehen, mit der Folge, dass auch eine Übertragung über Bluttransfusionen möglich ist. Abgrenzend zur horizontalen Übertragung kann HCMV auch als konnatale Infektion, d.h. im Mutterleib oder während der Geburt übertragen werden. Die

Inzidenz der konnatalen HCMV-Infektion beträgt etwa 0,2-2,3% aller Schwangerschaften und 10% aller Infektionen verlaufen symptomatisch. Die HCMV-Infektion ist damit die häufigste, konnatale virale Infektion. Die Wahrscheinlichkeit einer Infektion des Kindes ist nach Primärinfektion der Mutter deutlich höher (ca. 40%) als nach einer Reaktivierung (ca. 1%) (37,38). Tatsächlich stellen (eigene) Kinder in Tagesstätten hierbei eine der Haupt-Infektionsquellen für Mütter während einer Schwangerschaft dar (39). Immunkompetente Kinder oder Mütter mit Kinderwunsch stellen demnach einen interessanten Ansatz für eine mögliche prophylaktische Impfung dar, die einfacher zu erreichen scheint, als die erfolgreiche Impfung von Patienten unter Immunsuppression.

1.2.3. Symptomatik der CMV-Infektion

Der klinische Verlauf einer Primärinfektion mit HCMV ist abhängig vom Immunstatus und dem Zeitpunkt der Infektion. In selteneren Fällen werden Symptome, die einer infektiösen Mononukleose ähneln, beobachtet. Überwiegend jedoch verläuft die Primärinfektion im immunkompetenten Individuum symptomlos (40).

Schwerwiegende klinische Verläufe werden vor allem dann beobachtet, wenn immunologisch unreife Individuen z.B. ungeborene Kinder einer Primärinfektion ausgesetzt sind oder Immungeschwächte, wie z.B. Patienten mit „acquired immune deficiency syndrom“ (AIDS) oder Immunsupprimierte, wie z.B. nach Organ- oder Knochenmarkstransplantation eine Primärinfektion oder Reaktivierung durchlaufen.

Vorhandene maternale, antivirale Antikörper erschweren die konnatale Infektion des Fetus nach Reaktivierung in Schwangeren (41,42). Als problematisch ist hingegen die Primärinfektion während der Schwangerschaft anzusehen, deren Folge die

konnatale Infektion des Embryos oder Fötus darstellt. Hieraus resultieren schwere Embryopathien oder Fetopathien, wie die Schäden des Nervensystems, Chorioretinitis, Hepatosplenomegalie oder Thrombozytopenien (43,44), die sich nach der Geburt in einseitigem Hörverlust, allgemeinen Entwicklungsstörungen, sowie mentaler Retardierung manifestieren (45,46).



Abb. 1.4 Klinische Manifestationen der CMV Infektion

Beim Blueberry-Muffin-Syndrom bei konnataler Cytomegalovirus-Infektion (links) zeigen sich blaubeerenfarbene Papeln in Gesicht, am Rumpf und an den Extremitäten. Die Infektion der Retina mit CMV (rechts) wird vor allem in AIDS Patienten oder Organtransplantat-Empfängern beobachtet (rechts). Die Symptomatik der CMV-Retinitis sind Mouches volantes (englisch: floater), Lichtblitze und verschwommene Sicht. Unbehandelt kann die CMV assoziierte Retinitis zur vollen Erblindung führen.

Quelle: www.chicagolandretinal.com und www.cehjournal.org

Obwohl die Anwendung der „highly active antiretroviral therapy“ (HAART) das Auftreten der symptomatischen HCMV-Infektion bei AIDS-Patienten in Industrieländern bereits deutlich vermindern konnte, stellt die HCMV-Infektion in Entwicklungsländer noch heute eine der häufigsten opportunistischen Virus-Infektionen in HIV Infizierten dar. Hier führt die symptomatische HCMV-Infektion zu klinischen Symptomen bei Infektion der Lunge, des zentralen Nervensystems, des Gastrointestinaltrakts oder der Retina (Abb. 1.4) (47,48).

Schwere klinische Verläufe wie Hepatitis oder Pneumonie werden zudem in Organ- und Knochenmarkstransplantatempfängern oder Krebspatienten beobachtet, die unter immunsuppressiver

Behandlung stehen (49,50). Hierbei finden Reaktivierungen der HCMV-Infektion aus dem Stadium der Latenz statt und zeigen schwere klinische Verläufe, wenn seronegativen Empfängern, ein Organ eines seropositiven Spenders transplantiert wird (51,52).

1.2.4. Antivirale Therapie

Bisher gelang trotz mittlerweile 30 Jahre zählender Anstrengung nicht, einen erfolgreichen Impfstoff gegen CMV zu entwickeln. Dennoch finden als Prävention oder Therapie gegen CMV Infektion verschiedene Strategien Anwendung.

Die antivirale CMV Chemotherapie wirkt durch verschiedene lizenzierte Substanzen, die die Inhibition der viralen DNA Polymerase zum Ziel haben. Der Wirkmechanismus beispielsweise von Ganciclovir beruht auf seiner Eigenschaft als synthetisches acyclisches Nukleinbasen-Analog mit Strukturähnlichkeit zu Guanin. Die bevorzugte Phosphorylierung in infizierten Zellen durch virale Kinasen zum Monophosphat und die folgende Umwandlung durch die zelluläre Guaninkinase zum 5'-Triphosphat erlaubt den Einbau in die virale DNA und verursacht hierdurch einen Abbruch der DNA-Kettenverlängerung.(53,54) Die Aktivität der Nukleosidanaloga ist durch die Schädigung elementarer Zellfunktionen begründet, die vor allem, aber nicht ausschließlich, in infizierten Zellen stattfindet (53). Dies ist der Grund für die starke Toxizität, die die Therapie mit Virostatika wie Ganciclovir durch massive Nebenwirkungen begleitet, die Blutbildveränderungen (Anämie, Neutropenie, Thrombozytopenie und Eosinophilie), Veränderungen von Leber- und Nierenfunktion und eine Beeinträchtigung des zentralen Nervensystems (Schwindel, Kopfschmerzen, Halluzinationen, Krämpfe, Symptome im Bereich des Magen-Darm-Trakts) einschließen (55). Diese schweren Begleiterscheinungen limitieren den Einsatz der

Virostatika auf Patienten mit schweren Krankheitsverläufen (vitale Indikation, drohende Erblindung).

Die Anwendung der passiven (Immun-) Therapie mittels CMV Immunglobulinen erfolgt durch Applikation eines hochtitrigen Immunglobulin-Gemisches von Spendern mit hohen Titern CMV spezifischer Antikörper. Der Wirkmechanismus ist die Neutralisierung der Virusinfektion durch die Wechselwirkung der Antikörper mit viralen Hüllmembran-Glykoproteinen. CMV Immunglobulin wird entweder alleine, auch während Schwangerschaft, oder in Kombination mit Nukleosid-Analogen als Prophylaxe bei Organtransplantat-Empfängern verabreicht. Durch die Behandlung mit CMV-Immunglobulinen konnte die Häufigkeit symptomatischer kongenitaler CMV-Infektionen, die Virusübertragung auf das ungeborene Kind (56) aber auch das Risiko von Lymphomen nach Organtransplantationen signifikant reduziert werden.

Natürlich bleibt der Einsatz von Immunglobulinen, wenn auch erfolgreich, eine prophylaktische Maßnahme. Verdeutlicht wird jedoch eine Grundvoraussetzung einer anti-herpesviralen Vakzine, eine effektive Antwort Virus neutralisierender Antikörper.

1.3 Die Infektion mit CMV im Tier-Modell

Die antivirale Therapie stellt aufgrund der massiven Nebenwirkungen ein nur limitiert einsetzbares Prinzip gegen die Infektion mit HCMV dar. Die Entwicklung eines präventiv schützenden Impfstoffes wäre daher wünschenswert. Impfstoffe wirken, indem sie die vorhandene Immunantwort stimulieren und auf eine Infektion mit dem Pathogen vorbereiten. Die Entwicklung einer effektiven CMV Vakzine wurde mit herkömmlichen Methoden bereits mit mäßigem Erfolg über 30 Jahre lang versucht und bis heute steht kein kommerzieller Impfstoff gegen HCMV zur Verfügung. Bevor Kapitel 1.4 einen Einblick in die bereits unternommenen Anstrengungen gibt, gilt es die Voraussetzungen für die Entwicklung eines solchen Impfstoffes zu klären.

Obwohl der Ablauf der Infektion in der Zelle *in vitro* bereits relativ gut verstanden wird und der Fortschritt molekularbiologischer Methoden (57) zudem das gezielte Manipulieren viraler Genome (als Bacterial Artificial Chromosomen sog. BACs) sehr erleichtert, stellt das mangelnde Verstehen komplexer Abläufe der antiviralen Immunantwort im Menschen, die eigentliche Barriere der Impfstoff-Entwicklung dar. Die starke Wirtsspezifität der Cytomegaloviren (Speziesbarriere)(58) vergrößert diese Problematik. CMV können nur in Zellen ihrer Wirtsspezies oder einer sehr nah verwandten Art replizieren. Simian CMV kann beispielsweise in humanen Fibroblasten (59) und HCMV in Affenfibroblasten (60) replizieren; MCMV kann in Rattenzellen replizieren (61,62) aber Ratten CMV nicht in murinen Zellen (61). In Zellen entfernterer Spezies, können CMV jedoch nicht infizieren. Einige Studien konnten zeigen, dass CMV zwar in die Zellen fremder Spezies eindringen und einen Teil der viralen Genen exprimieren können (59,63,64), dass aber die

Infektion (von z.B. MCMV in humanen Zellen) Apoptose in diesen Zellen nicht inhibieren kann (65). Die Folge ist eine ineffiziente Replikation viraler DNA und die mangelnde Expression der späten Gene in den bereits apoptotischen Zellen, in denen der verhältnismäßig lange Replikationszyklus der CMV nicht vollendet wird.

Um die Abläufe der antiviralen Immunantwort genauer zu verstehen ist man deshalb auf ein Tiermodell angewiesen, in dem nicht HCMV selbst, sondern das Spezies-spezifische CMV eingesetzt und die Immunantwort und Infektionsabläufe möglichst ähnlich der humanen Situation nachgestellt werden können.

Die Infektion der Maus mit MCMV stellt hierbei das am besten untersuchte Modell der HCMV-Infektion dar (66). Sowohl das humane wie auch das murine CMV weisen jedoch ähnliche Zelltyp-Spezifitäten, Krankheitsverläufe und Immunantworten auf, was ein ausgedehntes Studium der Infektionsabläufe und der Immunantwort *in vivo* sowohl im immunkompetenten wie auch im immungeschwächten Tier erlaubt.

Die Infektion beginnt vermutlich in Epithelzellen des oberen respiratorischen Trakts und verbreitet sich möglicherweise über die Blutbahn durch Monozyten (Mo) / Makrophagen (MΦ) (67,68), Endothelzellen (EC) und dendritische Zellen (DC). Bei systemischer Ausbreitung (z.B. nach intra venöser Infektion) werden zuerst Milz und Leber und anschließend Lunge, Nieren und letztendlich Speicheldrüsen infiziert. Auch die Infektion immunkompetenter Mäuse verläuft, wie beim Mensch, asymptomatisch.

Eine Limitierung erfährt das System dort wo Maus und Mensch, oder HCMV und MCMV sich grundlegend unterscheiden. Beispielsweise ist die Untersuchung konnataler Infektionen im Mausmodell nicht möglich, da MCMV nicht an den Fetus übertragen wird.

1.3.1. Die Immunantwort gegen MCMV

Der asymptomatische Verlauf der MCMV Infektion im gesunden Individuum ist das Resultat einer Immunantwort, die erreicht, dass das Virus im Körper weitestgehend eingedämmt und einer pathologischen Schädigung von Organen vorgebeugt wird (69). Gleichzeitig wirken virale Immunregulatoren den verschiedenen Komponenten des Immunsystems entgegen (Abb. 1.6) und tragen wahrscheinlich dazu bei, die vollständige Eliminierung der infizierten Einzelzellen zu vermeiden. Im immunkompetenten Patienten, wie z.B. der werdenden Mutter, muss ein geeignetes CMV Impfvirus die nachhaltige Stimulation der verschiedenen, zur Kontrolle der Infektion notwendigen, Teile des Immunsystems erreichen. Vor allem die erworbene (adaptive) Immunantwort, also Antikörper und T- und B-Zell-vermittelte Wirkmechanismen, scheinen diesen Schutz gewährleisten zu können. In der frühen Phase der Infektion ist jedoch die angeborene Immunantwort z.B. in Form der Natürlichen Killer- Zellen (NK-Zellen) für die Kontrolle der Virusinfektion dominierend.

Angeborene Immunantwort in der MCMV Infektion

Die angeborene Immunantwort ist nicht nur essentiell als erste Abwehrmechanismen gegen Infektionen, sondern liefert auch den Kontext für die Aktivierung und Ausrichtung der adaptiven Immunantwort.

Eine der ersten Antwortmöglichkeiten auf die virale Infektion von Zellen stellen Pattern-Recognition Rezeptoren (PRRs), wie die Membran gebundenen Toll-like Rezeptoren (TLRs) oder zytoplasmatische Rezeptoren wie RIG-I oder MDA5 dar. Diese PRRs kommen als im Blut gelöste, an Oberflächen von Immunzellen assoziierte oder intrazelluläre Moleküle vor, die charakteristische Pathogen-assoziierte Strukturen (pathogen-

associated molecular pattern, PAMPs) z.B. virale DNA erkennen und zu einer Freisetzung stimulatorischer Botenstoffe (Zytokinen) wie Interferone (IFN), Interleukine (IL) oder Tumor Nekrose Faktor (TNF) und letztlich hierdurch zu einer starken Aktivierung der Immunzellen führen (70,71).

Interferone des Typ-I (IFN- α , IFN- β) binden an den gleichen, spezifischen Rezeptor (IFN- α Rezeptor, IFNAR) und bewirken so eine Aktivierung Rezeptor-assoziiierter Kinasen (JAK-STAT-Signalweg). Das Auslösen dieser Signalkaskade führt zu einer erhöhten Expression einer Vielzahl von Genen. IFN- α und IFN- β aktivieren benachbarte Zellen und induzieren damit die Hemmung der (Virus-)Proteinsynthese.

Interferone aktivieren zudem Immunzellen wie NK-Zellen und M Φ . Die Aktivierung phagozytierenden Zellen wie M Φ durch Interferone führt zur Phagozytose der infizierten Zelle und letztlich der Präsentation an Zellen des adaptiven Immunsystems.

Die aktivierten NK-Zellen nehmen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort ein. NK-Zellen gehören zur Gruppe der Lymphozyten und besitzen keine Pathogen spezifischen Rezeptoren. Vielmehr führt das veränderte Verhältnis aktivierender und inhibierender Rezeptorinteraktionen dazu, dass NK-Zellen infizierte Zellen eliminieren.

Neben der Aktivierung durch beispielsweise sezerniertes Typ-I Interferon oder IL-12, das zu vermehrter Produktion von IFN- γ führt, erkennen NK-Zellen virusinfizierte Zellen mit Hilfe spezieller Rezeptoren, die mit MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche der Zielzellen interagieren (72). Allerdings, im Unterschied zur Interaktion mit T Zellen, können NK-Zellen nach der „missing self“ Hypothese nur die Zellen erkennen und eliminieren, die körpereigene MHC-Liganden nicht ausreichend exprimieren (73,74).

Zu den Zielen der NK-Zellen gehören Virus infizierte Zellen, die veränderte Peptidmuster auf ihren MHC-Klasse-I-Molekülen präsentieren (75) oder deren MHC-Klasse-I vermittelte Präsentation durch immunregulatorische Mechanismen unterbunden ist (76). Obwohl proinflammatorische Zytokine während der frühen Phase der MCMV Infektion die NK-Aktivierung induzieren, reicht dies in der Regel zur Viruskontrolle nicht aus (77). Tatsächlich sind in den meisten Mausstämmen keine effektiven NK-Zellantworten vorhanden (2).

Die NK-Zellantwort der MCMV Infektion verläuft in verschiedenen Mausstämmen dennoch sehr unterschiedlich. Ein Grund ist das Produkt des MCMV-Gens *m157*, ein MHC-Klasse-I Homolog (78,79), das den Ligand des aktivierenden NK-Zell-Rezeptors Ly49H der C57BL/6-Maus darstellt (80,81,82). Die Bindung an der Oberfläche von infizierten Zellen durch NK-Zellen führt wiederum zur Induktion der Apoptose (78). Durch die hierdurch in C57BL/6 Mäusen bedingte starke NK-Zellantwort sind diese sehr resistent für MCMV und tolerieren 50 fach höhere Virusdosen als BALB/c Mäuse.

Adaptive Immunantwort (nach 69)

Im späteren Verlauf der MCMV Infektion übernehmen zunehmend Zellen der adaptiven Immunantwort, die Kontrolle der Virusreplikation im Körper. Die adaptive Immunantwort besteht aus Antigen-spezifischen Mechanismen und kann in zwei Hauptarme unterteilt werden. Die humorale Immunantwort, die die Produktion von Antikörper durch B-Lymphozyten vermittelt und die Zell-vermittelte Immunantwort, die die Produktion zytotoxischer T Zellen, Zytokinen, aber auch aktivierter NK Zellen und Makrophagen vermittelt.

Professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC; z.B. dendritische Zellen, Makrophagen oder B-Lymphozyten) exprimieren sowohl MHC-Klasse-I als auch MHC-Klasse-II-Moleküle und vermitteln zum einen das Aufnehmen und das Prozessieren der Antigene für die Präsentation an T-Lymphozyten und zum anderen die Produktion von Signalmolekülen, die für die Proliferation der Lymphozyten benötigt werden. Auf MHC-Klasse-I Molekülen werden Körper-eigene oder Pathogen-abstammende Antigene präsentiert, die in einer Zelle exprimiert wurden, wohingegen exogene Antigene, die durch Endozytose aufgenommen wurden, auf MHC-Klasse-II Molekülen an CD4⁺ T Zellen präsentiert werden.

Dendritische Zellen (DC) sind im Epithel der Haut, des respiratorischen Traktes und dem Gastrointestinal-Traktes, aber auch in Lymphorganen und inneren Organen zu finden. Die unreifen DC nehmen Antigen auf (oder werden selbst infiziert), werden durch Zytokine aktiviert und migrieren durch die Lymphgefäße zu den in der Nähe liegenden Lymphknoten. Da DC Antigen sowohl auf MHC-Klasse-I als auch MHC-Klasse-II Molekülen exprimieren werden im Lymphknoten Antigene an naive CD8⁺ und CD4⁺ T Lymphozyten präsentieren. Die Interaktionen der T-Zell-Rezeptoren von CD8⁺ T Zellen mit MHC-Klasse-I Molekülen und von CD4⁺ T Zellen mit MHC-Klasse-II Molekülen führt zu deren Aktivierung, Proliferation und Differenzierung zu Effektorzellen. Hierbei binden MHC-Klasse-II Moleküle Peptidpitope vor allem exogener Antigene, die von naiven CD4⁺ T-Zellen mit passender T-Zell-Rezeptor-Spezifität erkannt werden. Von DC exprimierte MHC-I Moleküle binden dagegen Peptidpitope endogener Antigene. DC sind zudem darauf spezialisiert, exogenes Antigen gebunden an MHC-Klasse-I Moleküle durch sog. Kreuz-Präsentation (cross-presentation) an

CD8⁺ T-Zellen zu präsentieren. MHC-Klasse-I Moleküle werden auch von nicht-Immunzellen exprimiert. Deshalb werden auch auf infizierten Körperzellen Peptide viraler Proteine an MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche den CD8⁺ T Zellen präsentiert und können von diesen durch den spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) gebunden werden. Die Bindung der CD8⁺ T-Zelle führt zu ihrer Aktivierung und resultiert in der Lyse infizierter Zellen. Aktivierte CD8⁺ T-Zellen produzieren zudem IFN- γ , das in Nachbarzellen wiederum zur erhöhten Produktion von MHC-I-Proteinen führt.

CD4⁺ T-Zellen (T-Helfer-Zellen) helfen anderen Effektorzellen wie B- und zytotoxischen CD8⁺ T-Lymphozyten durch Sezernieren von stimulierenden Zytokinen.

Antivirale CD8⁺ T Zellen sind als Effektorzellen zur Eliminierung des MCMV während der akuten Infektion von entscheidender Bedeutung und vermitteln Schutz gegen CMV (83). Antivirale CD4⁺ T Helferzellen werden vor allem zur Kontrolle persistierender CMV Infektionen benötigt (84,85). In der Kontrolle der CMV Infektion nehmen zudem B-Zell sezernierte Antikörper eine wichtige Stellung ein (86). B-Lymphozyten zirkulieren in Blut und lymphatischen Organen und nehmen Peptidpitope exogener Antigene auf, die sie gebunden an MHC-Klasse-II Moleküle auf ihrer Oberfläche an Effektor-CD4⁺-T-Lymphozyten präsentieren. Diese Interaktion stimuliert die Effektor CD4⁺-T-Zelle zur Produktion und Sezernierung verschiedener Zytokine die, der B-Zelle die Proliferation und Differenzierung in eine Antikörper-sezernierende Plasma-Zelle erlaubt. Eine insuffiziente Induktion antiviraler Antikörper, die freies Virus vor Zellinfektion neutralisieren, stellt hierbei ein Hauptproblem der Immunantwort gegenüber CMV Infektion dar (zusammengefasst in (87)).

Die Kontrolle der CMV Infektion in der latenten Phase erfolgt vorwiegend durch virus-spezifische CD8⁺ T-Gedächtniszellen (88,89,90). Diese werden im Laufe der latenten Infektion wahrscheinlich durch

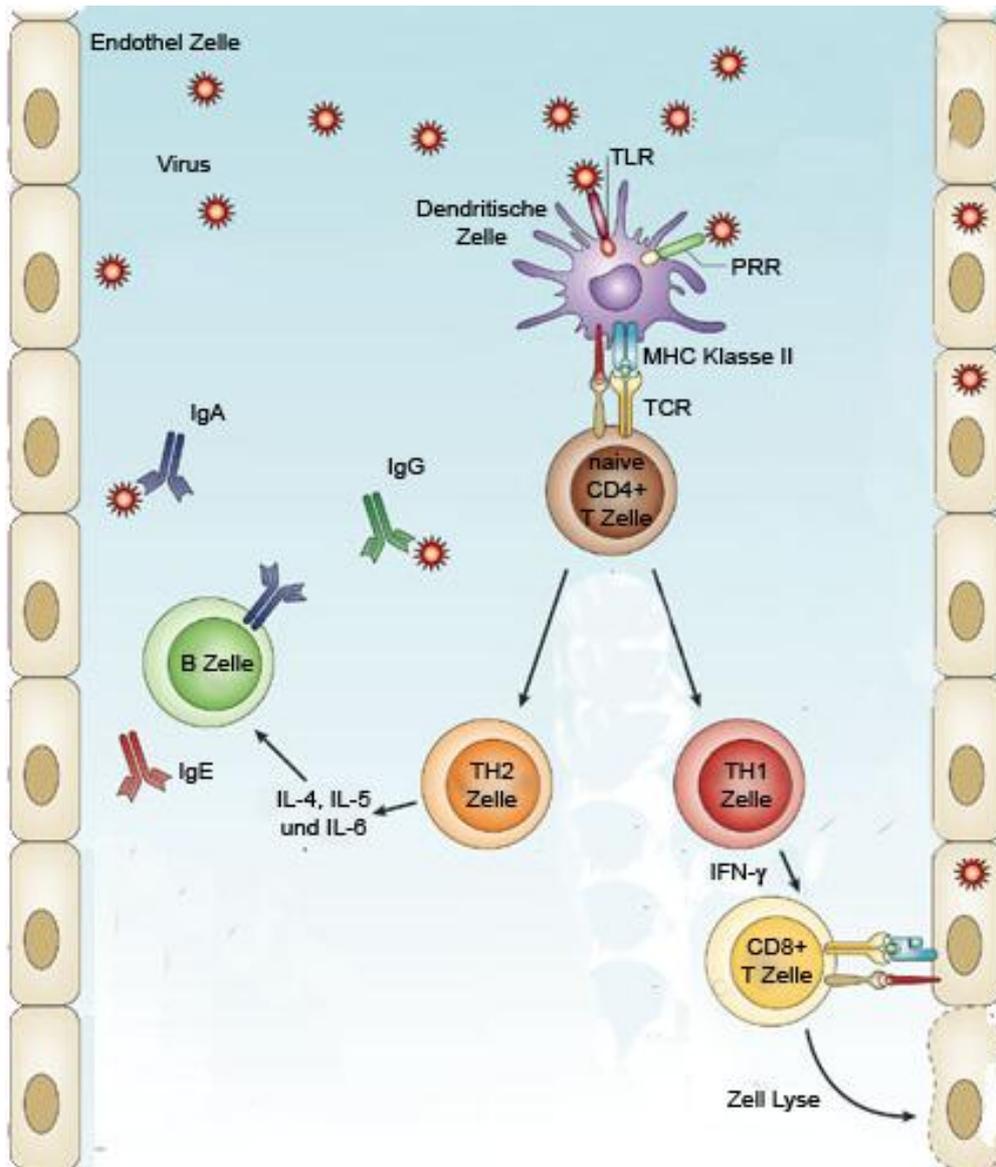


Abb.1.5 Das Schema der adaptiven antiviralen Immunantwort

Das Binden charakteristischer Pathogen-assoziiierter Strukturen an Organismus-spezifische Rezeptoren (engl. sog. „Pattern-Recognition Rezeptoren“, PRRs), wie Toll-like Rezeptoren (TLRs) auf der Zelloberfläche von Makrophagen und dendritischen Zellen aktiviert die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine, die andere Effektorzellen zur Infektionsstelle lotsen. Pathogen-aktivierte dendritische Zellen präsentieren Antigene an T-Zellen und vermitteln die Differenzierung naiver T Zellen zu effektor CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen. CD4⁺ T

Helfer 1 (TH1) Zellen sekretieren Interferon- γ (IFN- γ), das die anti-mikrobielle Aktivität der Makrophagen aktiviert und B-Zellen zur Produktion von IgG2a Antikörpern anregt. CD4⁺ T Helfer 2 (TH2) Zellen helfen B-Zellen bei der Produktion von IgG1, IgA und IgE Antikörpern. CD8⁺ T Zellen lysieren Virus-infizierte Zellen. IL, Interleukin; TCR, T-Zell Rezeptor; TNF, Tumor-Nekrose Faktor. Nach (91)

regelmäßige Restimulations-Ereignisse über die Maßen vermehrt (memory inflation) (91,92). Die Abwesenheit der Reaktivierung nach Depletion von CD8⁺ T-Zellen *in vivo* zeigt jedoch, dass die verbleibenden Zellen dennoch in der Lage sind die CMV-Infektion zu kontrollieren (93).

Die Replikation des Genoms und die Expression der für die Virus Morphogenese notwendigen Proteine in der Zielzelle stellen deshalb nicht nur eine Notwendigkeit für die Erzeugung neuer infektiöser Viruspartikel dar, die Neusynthese der Virusbestandteile scheint auch essentiell für die Etablierung einer schützenden Immunantwort.

1.3.2. Entwicklung von Impfstoffen gegen β -Herpesviren

Unter Berücksichtigung der Lebensqualität wie auch der Kosteneffizienz, hat das „Institut of Medicine“ unlängst die Entwicklung eines Impfstoffes gegen HCMV in die Kategorie mit höchster Dringlichkeit eingestuft (95). Obwohl es gelungen ist, gegen zahlreiche virale Erreger Impfstoffe unter Verwendung verschiedenster Konzepte erfolgreich herzustellen, ist die Entwicklung einer effektiven und gleichsam sicheren CMV-Vakzine ein bisher nicht erreichtes Ziel extensiver Bemühungen mehrerer Jahrzehnte. Bisher scheiterten alle Bemühungen an mangelndem Schutz oder mangelnder Impfsicherheit der getesteten Vakzine.

Ein Überblick über die verschiedenen Studien von HCMV-Vakzineansätzen ist in Tabelle 1.2 gegeben.

1.3.3. Attenuierte Lebendimpfstoffe

Im Allgemeinen können Impfstoffe, die Verwendung in der Prävention gegen virale Infektionskrankheiten finden, in Totimpfstoffe oder Lebend-Impfstoffe unterschieden werden. Lebendimpfstoffe sind durch Passage von Virus Isolaten in Zellkulturen abgeschwächte (attenuierte) Viren, die sich *in vitro* noch vermehren lassen, im Patienten eine Immunantwort auslösen, verschiedene (Nicht Herpes-) Viren konnten bereits attenuierte in der Regel jedoch keine Erkrankung hervorrufen (96). Für Lebend-Impfstoffe hergestellt werden (z.B. gegen Gelbfieber oder Mumps-Masern-Röteln, MMR). Durch kontinuierliche Passage des klinischen Virusisolats unter Zellkulturbedingungen erfolgt hierbei eine Selektion durch Anreicherung von Mutationen und Anpassung an eine schnelle Replikation des Virus im gewählten Zelltyp. Der Verlust viraler Gene, die lediglich für die Replikation *in vivo* notwendig sind (z.B. immunmodulatorische Gene) oder der Verlust des Tropismus für *in vivo* relevante Ziel-Zelltypen führt dabei zur Abschwächung des Virus.

Tabelle 1.2: Status klinischer Studien ausgewählter HCMV

Vakzinen

Vakzine	Teststatus			
	prä-klinisch	Im Menschen		
		Sicherheit	Immunoogenität	Effizienz
Towne	+	+	+	+
gB Untereinheiten-Vakzine	+	+	+	*
ALVAC-basierende Vakzine‡	+	+	+	-
Towne/Toledo Chimäre Vakzine	+	+	-	-
DNA Vakzinen	+	+	-	-

Peptid Vakzinen	+	-	-	-
Dense body Vakzine	+	-	-	-

Nach (114)

*Diese Studie ist noch nicht abgeschlossen und Daten über die Effizienz sind noch nicht verfügbar.

‡CMV Vakzinen basierend auf anderen Vektorsystemen wie Alphavirusvektoren, wurden nicht in humanen Studien getestet.

ALVAC: Recombinantes Kanarienspockenvirus

Eine Reversion durch Mutation des Impfvirus zur nicht attenuierten Ausgangsform im Patienten zeigt hierbei jedoch deutlich die problematische Abwägung von Schutz und Sicherheit. Die in Europa mittlerweile aufgegebene Polio-Schluckimpfung ist nur ein Beispiel; wird doch durch Impfung in seltenen Fällen Impfpoliomyelitis ausgelöst.

Attenuierte Lebend-Impfstoffe gegen α -Herpesviren

Gegen humane Herpesviren ist derzeit ein einziger Impfstoff gegen das Varizella-Zoster-Virus (VZV), einem α -Herpesvirus, das vor allem durch die klinische Manifestation der Primärinfektion als Windpocken, oder der Reaktivierung als Gürtelrose bekannt ist kommerziell erhältlich. Das Impfvirus ist ein attenuiertes Lebendvirus, das durch Passage in Zellkultur an Virulenz verloren hat. Die Vakzine gilt als sicher, wird weit verbreitet angewandt und ist im Allgemeinen protektiv. Dennoch werden auch hier (obwohl selten) Reaktivierungen des Impfvirus beobachtet, die sich teilweise in klinischen Verläufen manifestieren (97).

Auch in der Haltung von Schweinen, Hühnern, Kühen und Pferden verursachen Infektionen mit α -Herpesviren hohe ökonomische Schäden. Vakzinen werden vorwiegend als attenuierte Lebendimpfstoffe hergestellt und verbleiben meist latent in den Nutztieren. Sie verhindern keine Reinfektion mit Wildtypstämmen, sondern schwächen bzw. verhindern die Symptome der Erkrankungen.

Attenuierte Lebendimpfstoffe gegen CMV

Der Erfolg bei der Herstellung eines attenuierten Lebendimpfstoffes gegen Gelbfieber (Nobelpreis für Physiologie oder Medizin, 1951), sowie der erfolgreichen Anwendung des Konzeptes für weitere antivirale Impfstoffe (z.B. Mumps-Masern-Röteln, MMR), begründen auch die ersten Bemühungen, einen CMV Impfstoff, auf Basis eines lebend-attenuierten Impfstoffes zu entwickeln. Vor allem zwei derartige HCMV Impfstoffe, wurden im Menschen getestet und sind abgeleitet von den HCMV-Stämmen AD169 und Towne. Beide Isolate wurden extensiv in humanen Fibroblasten attenuiert (98). Als Vakzine waren AD169 und Towne grundsätzlich sicher und wurde von der Mehrzahl der HCMV-seronegativen Studienteilnehmer gut vertragen (99,100). Bei AD169 traten jedoch lokale Symptome an der Injektionsstelle auf und mehrere der Studienteilnehmer entwickelten zudem milde systemische Symptome wie Fieber, Kopfschmerz, Müdigkeit und Myalgie. Die Mehrzahl der mit AD169 oder Towne geimpften, seronegativen Erwachsenen entwickelte eine CMV-spezifische Antikörperantwort (101,102). Bei bereits existierender Immunität konnte jedoch keine Erhöhung des Antikörpertiters durch Impfung erreicht werden (103). Der hohe Grad an Attenuierung der beiden Impfstämme ist dadurch belegt, dass bei keinem Studienteilnehmer das Ausscheiden von Impfvirus nachgewiesen werden konnte. Weitere klinische Erprobungen mit der Towne Vakzine bestätigten die Induktion von Antikörperantworten und zudem eine CMV-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort (101,102,104,105,106,107,108).

Die Bemühungen mit AD169 zu impfen wurden auf Grund nach Impfung auftretender Symptome aufgegeben, wohingegen die Impfung mit Towne in einer Studie untersucht wurde, bei der gesunde erwachsene CMV-seronegative Männer mit Towne

geimpft und anschließend der Infektion mit nicht-attenuiertem, wenig passagiertem, Wildtyp-isolat Toledo ausgesetzt wurden (106). Ungeimpfte seronegative Patienten denen Toledo subkutan appliziert wurde, entwickelten klinische Symptome und Virus konnte aus Blut, Urin und Speichel isoliert werden. Unabhängig von der Dosis des verabreichten Toledovirus zeigten seropositive Studienteilnehmern keine Symptome, wohingegen mit Towne geimpfte Probanden nur bei Applikation niedriger, nicht aber bei Applikation höherer Dosen Toledo geschützt waren.

Zusammenfassend zeigen diese Studien, dass die auf attenuierten Viren basierenden Vakzinen sowohl humorale als auch zellvermittelte Immunantworten induzierten. Der von Towne vermittelte Schutz war im Vergleich zur natürlichen Immunität jedoch deutlich vermindert.

Die Misserfolge in den Vakzineversuchen mit Towne und AD169 verdeutlichen eines der Kernprobleme der Herstellung attenuierter Lebendimpfstoffe. Die empirisch durch Zellkulturpassage erzeugte Attenuierung ist in der (unkontrollierten) Mutation von Genen begründet. Die Attenuierung in Towne und AD169 erfolgte mit dem Ziel ein sicheres Impfvirus herzustellen, die Folge war jedoch der unerwünschte Verlust der Immunogenität.

Die extensive Zellkulturpassage erfolgte mit Selektion auf schnelle *in vitro* Replikation. Offenbar wurden durch die Attenuierung jedoch auch Genfunktionen betroffen, die für die Erzeugung einer protektiven Immunantwort oder für die Infektion der dafür relevanten Zelltypen notwendig sind.

Sowohl in Towne als auch in AD169 ist der zur Infektion von Epithelzellen, EC und DC essentielle Glykoproteinkomplex *UL128-131A* deletiert. Die Folge ist eine Reduktion des Infektionspotentials der Impfviren für die entsprechenden Zelltypen. Ist dies der Grund

sowohl für Attenuierung und Sicherheit, aber auch für den Verlust der Immunogenität und damit Schutz?

Derzeit wird in einer Studie eine chimäre CMV Vakzine getestet. Hierbei werden Regionen des kaum attenuierten Toledo Stammes mit entsprechenden Regionen des Towne-Genoms ersetzt. Vier unabhängige chimäre Impfstoffe wurden bisher getestet und wurden zunächst von den Patienten gut vertragen.

1.3.4. Totimpfstoffe

Neben Lebendimpfstoffen finden Totimpfstoffe bei der antiviralen Impfung Verwendung. Totimpfstoffe enthalten inaktivierte Viren (Vollpartikelimpfstoffe) oder Bestandteile von Viren (Teilpartikelimpfstoffe oder Spaltvakzinen) und sind nicht infektiös. Die Immunantwort gegen Totimpfstoffe wird meist als Induktion von Antikörpern gemessen und erklärt, weshalb im Allgemeinen Totimpfstoffe sicher, jedoch weniger protektiv als Lebendvakzinen sind. Dennoch wurde dieses Konzept sehr erfolgreich eingesetzt, wie Totimpfstoffe gegen Influenza oder Hepatitis A Viren zeigen.

Vollpartikelimpfstoffe, die durch chemische Behandlung mit UV-Licht, Formaldehyd, β -Propiolacton oder Psoralen inaktiviert wurden zeigen bereits im Tiermodell bei der Impfung gegen MCMV nur bedingten oder keinen Effekt und wurden deshalb als CMV Impfstoffe im Menschen nicht weiter verfolgt (109,110).

Untereinheiten-Impfstoffe gegen CMV

Da die Attenuierung von Lebendvakzinen invers mit Schutz und Sicherheit korrelierte, fokussieren sich neuere Impfstrategien auf sog. Untereinheiten-Impfstoffe oder Spaltvakzinen, bei denen die Expression viraler Genprodukte auf wenige spezifische Antigene des Erregers beschränkt ist. Im Allgemeinen sind Untereinheiten-Vakzinen weniger immunogen als Vollpartikelimpfstoffe, weil

ihnen wichtige Antigene fehlen. Durch die intensivere Reinigung des Erregers wird zudem ein höheres Sicherheitsprofil erreicht, da geringere Nebenwirkungen als bei Vollpartikelimpfstoffen auftreten. Die schwächere Immunantwort im Vergleich zu Lebendimpfstoffen verlangt dennoch häufig eine Mehrfach-Applikation (sog. Boosten). Die erreichte Immunität ist zudem meist zeitlich beschränkt.

Der vielversprechendste Kandidat einer HCMV Untereinheiten-Vakzine ist das immundominante Hüllmembran-Glykoprotein gB (das *UL55* Genprodukt), basierend auf seiner Kapazität in der natürlichen HCMV Infektion hohe Titer Virus-neutralisierender Antikörper zu erzeugen (111). CMV gB als Proteinvakzine ist ein rekombinantes, in CHO (Chinesischen Hamster Ovarien Zellen) exprimiertes Protein das bereits in einer klinischen Studie in Erwachsenen mit verschiedenen Adjuvanzen kombiniert verabreicht wurde. Adjuvanzen können die Wirksamkeit von Impfstoffen erhöhen, indem sie zum einen die angeborene Immunantwort in Form lokaler Gewebereizung aktivieren, zum anderen in dem sie durch Bindung des Antigens eine verzögerte Freisetzung erreichen. Somit wird eine verstärkte Immunantwort durch erhöhte Antikörperbildung erreicht.

Durch Applikation der gB Vakzine konnten neutralisierende Antikörpertiter erreicht werden, die die Titer in der für CMV seropositiven Kontrollgruppe überstiegen. In allen weiteren Studien wurde bis heute die Verabreichung als sehr sicher charakterisiert; mit Ausnahme von leichtem Schmerz an der Injektionsstelle wurden keine Nebenwirkungen beobachtet. Derzeit wird in einer klinischen Studie die gB/Adjuvans Vakzine in jungen CMV-seronegativen Frauen getestet. Diese Frauen stellen, vor allem während der Schwangerschaft eine der Hauptrisikogruppen für eine CMV-Erstinfektion dar. Zwar korreliert das Vorhandensein

von Antikörpern nicht immer mit dem Schutz vor Reinfektion mit neuen CMV Stämmen die zur kongenitaler Infektion führen können (44), dennoch besteht für Kinder deren Müttern eine Primärinfektion während der Schwangerschaft durchlaufen ein deutlich höheres Risiko, als für Kinder die während der Schwangerschaft sero-positiver Mütter angesteckt wurden. Fowler et al. konnten in derselben Studie nachweisen, dass lediglich Kinder von Müttern, die während der Schwangerschaft eine Primärinfektion durchlaufen, bei Geburt symptomatische Krankheitsverläufe zeigten und einem signifikant höheren Risiko für Spätkomplikationen ausgesetzt sind (112).

Weitere virale Proteine zur Verwendung als Untereinheitenimpfstoff, sind bereits als Kandidaten identifiziert, so z.B. das Tegument-Phosphoprotein pp65 (das *UL83* Genprodukt) und IE1 (das *UL123* Genprodukt), die beide effizient T-Zell Antworten induzieren können (113). DNA Vakzinen oder vektorbasierte Vakzinen (nicht-replizierender viraler Vektor) gegen CMV, die sich auf die antigenen Proteine gB, IE1 und pp65 fokussieren werden in klinischen Studien erprobt und haben sich bisher wie erwartet als sicher erwiesen.

1.4 Herstellung einer Modellvakzine durch gezielte Deletion

Die BAC-Technologie erlaubt auf einfache Weise gezielte Mutationen des viralen Genoms. Wie können die beschriebenen Erkenntnisse für das Design einer rekombinanten CMV Vakzine mittels dieser Methode nutzbar gemacht werden?

Da viele Gene von CMV der angeborenen und adaptiven Immunantwort entgegenwirken (2), könnte deren Deletion von Vorteil sein. Das Fehlen der viralen Immunmodulatoren, würde demnach zu einer stärkeren (nicht-modulierten) Immunantwort führen. Durch die breite Kenntnis der immunmodulatorischen Mechanismen des Virus, sollten ein gezieltes Eingreifen und damit eine Verbesserung der Vakzineigenschaften möglich sein. Genauer, sollte die Deletion bekannter immunmodulatorischer Gene, ohne Verlust von immunogenem Potential, zu einer gezielten Attenuierung des Impfvirus *in vivo* führen, da die Virusvermehrung durch die fehlenden, der Immunantwort entgegenwirkenden Mechanismen der Immunregulation beeinträchtigt wird. Ohne Deletion von Glykoproteinen, sollte dennoch die Virushülle der des Wildtypvirus entsprechen und damit den Tropismus des Virus für die primäre Infektion nicht verändern - ein Konzept, an dessen Etablierung im Rahmen dieser Arbeit mitgewirkt wurde (109,115).

1.4.1. Die Herstellung eines attenuierten MCMV Impfstoffes durch gezielte Deletion immunevasiver Gene

Durch Deletion von insgesamt 32 Genen gelang die Herstellung einer attenuierten MCMV Vakzine (109). Dem daraus resultierenden Impfvirus $\Delta m01-17+m144-158$ -MCMV fehlen so alle bekannten Gene, die die MHC-Klasse-I Präsentation regulieren und

die Mehrheit der Gene, die die NK Zellantwort kontrollieren. Die fehlenden Gene waren nicht essentiell für die Virusvermehrung *in vitro*. In der Maus war $\Delta m01-17+m144-158$ -MCMV jedoch stark attenuiert und konnte bereits kurz nach Immunisierung nicht mehr nachgewiesen werden. Die Impfung resultierte dennoch in einer protektiven Immunantwort gegen Infektion mit MCMV-*wt*, assoziiert mit der Induktion von CD8⁺ T Zell- und Antikörperantworten.

Das vorgestellte Konzept konnte als relativ sicher getestet werden. Trotz massiver Immunsuppression wurde keine Reaktivierung nachgewiesen. Der Erfolg der Impfung, einem Schutz von etwa Faktor 1000 in der Lunge, nach einmaliger Applikation von $\Delta m01-17+m144-158$ -MCMV war dennoch überraschend, war doch bisher die Verwendung attenuierter CMV Stämme als Vakzinen an mangelnder Protektion gescheitert.

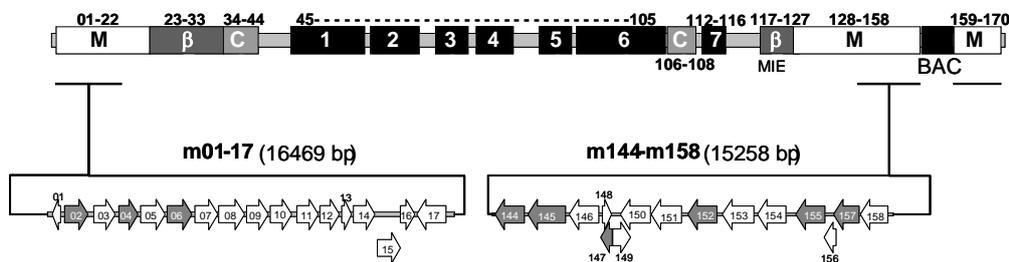


Abb. 1.6: Das MCMV Genom: Organisation in Genblöcken

Die konservierten Genblöcke 1-7 sind im Zentrum des MCMV-Genoms angeordnet. Genblock 7 ist getrennt durch einen Genblock der nur innerhalb der Cytomegaloviren konserviert ist (hellgrau: c). Ein weiterer Cytomegalovirus spezifischer Genblock ist neben dem Genblock 1 lokalisiert. Zusätzliche Genblöcke spezifisch für die beta-Herpesvirus Unterfamilie (dunkel grau: beta) werden von den Genen m23 bis M33 und m117 bis m127 gebildet. Gene die nur in MCMV gefunden werden, sind am Genom-Ende angeordnet (weiß: M). Stark konservierte Gen-Familien beinhalten vorwiegend essentielle Gene. Mehrere Gene an den Genom-Enden kodieren Funktionen, die die angeborene und adaptive Immunantwort modulieren. Gene mit bekannter immunmodulatorischer Funktion sind als graue Pfeile dargestellt. Aus (115).

Die erfolgreiche Testung von $\Delta m01-17+m144-158$ -MCMV im Tiermodell wirft die Frage nach der Translation in das humane

System und somit die Erzeugung einer am Menschen anwendbaren Vakzine auf. Die Gene immunmodulatorischer Funktion finden sich vorwiegend in Genom-Bereichen mit nur geringer Sequenzhomologie zwischen MCMV und HCMV. Dennoch sind für HCMV funktionell ähnliche Immunmodulatoren teilweise bekannt (116) und die notwendigen molekularbiologischen Methoden, sowie verschiedene HCMV-Stämme als BAC sind vorhanden. Es wäre interessant, eine gezielt attenuierte HCMV Vakzine, basierend auf einem klonalen rekombinanten Herpesvirusgenom, im Menschen zu erproben. Es bleibt zu untersuchen, ob die gezielte Attenuierung ausreicht und eine theoretisch noch mögliche Replikation oder Reaktivierung unterbleibt.

1.4.2. Replikations-defiziente Herpesvirus Vakzinen

Obwohl die Experimente im Mausmodell erfolgreich die Sicherheit der Vakzine verdeutlichten, ist die Replikation eines attenuierten Impfvirus nach dem Konzept des $\Delta m01-17+m144-158$ -MCMV im Menschen nicht formell ausgeschlossen. Starke Immunsuppression beispielsweise nach Organtransplantation, könnte eine Reaktivierung eines attenuierten Impfvirus begünstigen. Deshalb sollte die Virusvermehrung völlig unterbunden sein andererseits die Antigenexpression intakt und der Tropismus für primäre Zielzellen (vor allem Endothelzellen) ungestört bleiben.

Versuche in diese Richtung wurden bereits in der Unterfamilie der α -Herpesviren durch die Applikation Replikations-defizienter Vakzinen beschrieben (zusammengefasst in (117)). Um eine sichere Vakzine durch Replikations-defizienz zu erreichen, wurden in diesen Arbeiten zwei technisch unterschiedliche Prinzipien verwendet (Abb.1.7). In einem Ansatz wurden Gene deletiert, die essential für die virale DNA Replikation (118) sind und führten zu Replikations-defizienten Virusmutanten mit beeinträchtigter

Genexpression und ohne die Produktion viraler Nachkommen. Durch die Unterbrechung des viralen Replikationszyklus an verschiedenen Schlüsselpunkten konnte hierbei gezeigt werden, dass die Antikörperantwort stärker war, je später die Unterbrechung stattfand und unterstrich damit die Wichtigkeit der intakten DNA Replikation (118,119). Die Viren mit beeinträchtigter DNA-Replikation wurden im Mausmodell getestet und konnten unter bestimmten Bedingungen eine schützende Immunantwort gegen HSV-1 und HSV-2 hervorrufen (120,121).

Das zweite Konzept, die Deletion Tropismus-definierender Glykoproteine wie gH oder gB erlaubt die Herstellung von Viren mit unterbrochenem Infektionszyklus (disabled infectious single cycle virus; DISC) bei denen in der ersten Zielzelle nicht-infektiöse Viruspartikel mit limitiertem oder verlorenem Tropismus für bestimmte Zelltypen erzeugt werden (122). Grundsätzlich konnten DISC Vakzinen Immunantworten induzieren und Protektion vermitteln.

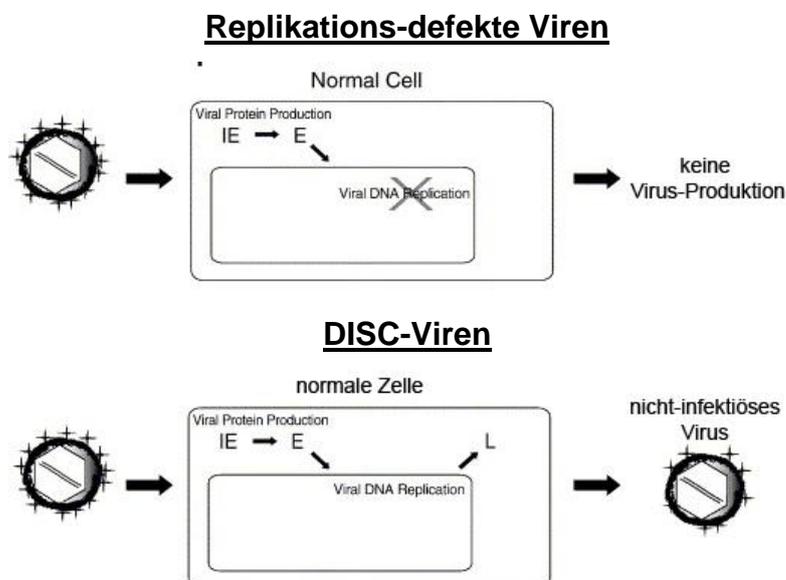


Abb. 1.7 Vergleich von Replikations-defizienten und DISC HSV
 Oberer Teil: Die biologischen Eigenschaften einer Replikations-defizienten HSV Mutante. Durch Unterbrechung der Replikation werden keine Tochterviren produziert. Unterer Teil: Die biologischen Eigenschaften von HSV DISC Mutanten. Die Deletion eines Glykoproteins verhindert nicht die Produktion von

Tochternviren. Das fehlende Glykoprotein ist jedoch für die Infektion essentiell und damit die Tochternviren nicht infektiös. Aus (117).

Welche Schlüsse sind aus diesen Erkenntnissen zu ziehen? Die Deletion eines essentiellen Gens erlaubt zunächst die Erzeugung eines konzeptionell sicheren Impfvirus. Dennoch sollte die Genexpression möglichst vollständig ablaufen, um viele Antigene zu exprimieren. Die Deletion eines Glykoproteins zur Erzeugung einer DISC CMV Vakzine scheint aus zwei Gründen unattraktiv. Zum einen stellen Glykoproteine potente Ziele der Antikörperantwort dar (mangelnde Immunogenität war ein Argument gegen Towne), zum anderen stellt der Rezeptor-vermittelte Eintritt des Virus über Glykoproteine nicht den einzig denkbaren Infektions- und Verbreitungsweg dar. Die Zell-zu-Zell Infektion *in vivo* könnte davon unabhängig und damit der Block in der Virusausbreitung bei Deletion des Glykoproteins nicht vollständig unterbunden sein (123).

1.4.3. Die Auswahl des zu deletierenden Gens M94 zur Erzeugung eines verbreitungsdefizienten MCMV Impfstoffes

Das Gen der Wahl zur Erzeugung eines verbreitungsdefizienten CMV Impfstoffes sollte verschiedene Kriterien erfüllen: Es sollte essentiell sein und möglichst spät im Viruszyklus exprimiert werden, zum anderen sollte die Deletion weder die Erzeugung nicht-infektiöser Partikel erlauben, noch sollte das zu deletierende Gen ein Tropismus definierendes Gen sein und im Speziellen nicht für wesentliche Glykoprotein-Antigene kodieren.

Das Produkt des *UL94*-Gens von HCMV konnte in Virionen nachgewiesen werden (124). *UL94* ist in allen Herpesvirus Unterfamilien konserviert und wird zu spätem Zeitpunkt der Infektion exprimiert (125,126). Zudem wurde mittels Transposon-

vermittelter Mutagenese gezeigt, dass pUL94 für die Virusvermehrung des HCMV essentiell ist (127).

Ergebnisse der Gruppe zeigen für M94, dem Homolog des UL94 in MCMV, die Expression in der späten Phase der Infektion und eine essentielle Rolle während der Akquirierung der zweiten Virushülle nachgewiesen werden (Maninger et al, Manuskript in Vorbereitung). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine entsprechende Deletionsmutante MCMV- Δ M94 generiert und als Vakzine getestet.

1.5 Organ und Zelltropismus von CMV in vivo

Während es gelungen ist, Funktionsprinzipien verschiedener viraler Gene *in vitro* zu erklären, ist das Studium biologischer Funktionen und der Anteil einzelner Zelltypen an immunologischen Mechanismen *in vivo* unbefriedigend. Um zu verstehen, ob der Tropismus (die Möglichkeit bestimmte Zelltypen zu infizieren) für die Immunogenität einer Vakzine bedeutsam ist, ist das Verständnis der Rolle verschiedener Zelltypen bei Infektion und Virusausbreitung im Körper notwendig. Die beschriebenen Studien mit attenuierten HCMV Stämmen konkretisieren dieses Problem. CMV Stämme wie AD169 und Towne, die durch *in vitro* Passage Mutationen z.B. im Locus *UL128-131A* erworben und so die Möglichkeit verloren haben, beispielsweise Endothelzellen (EC) zu infizieren, schützen nicht effektiv gegen HCMV (20,128,129). Der kausale Zusammenhang ist allerdings nicht bewiesen.

1.5.1. Das Cre-loxP System zur Untersuchung Zelltypspezifischer Viruseigenschaften

Das Cre-loxP System als Marker viraler Dissemination

Im Cre/*loxP*-System (130) erkennt das Cre Enzym hintereinander folgende *loxP* (locus of X-over P1) Sequenzen und vermittelt das

Ausschneiden der DNA dazwischen (131,132). Hierdurch kann eine Zelltyp-spezifische Gen-Aktivierung erreicht werden, wenn eine von *loxP* Sequenzen flankierte (gefloxt) 'Stopp'-Sequenz (z.B. Stopcodons und Polyadenylierungs-Sequenzen) zwischen Promotor und der kodierenden Sequenz (z.B. dem *egfp* Markergen) entfernt wird (Abb. 1.8). Die Zelltyp-spezifische Cre Expression führt zum Ausschneiden der 'Stopp' Sequenz und zur Zelltyp-spezifischen Aktivierung der Gentranskription (132).

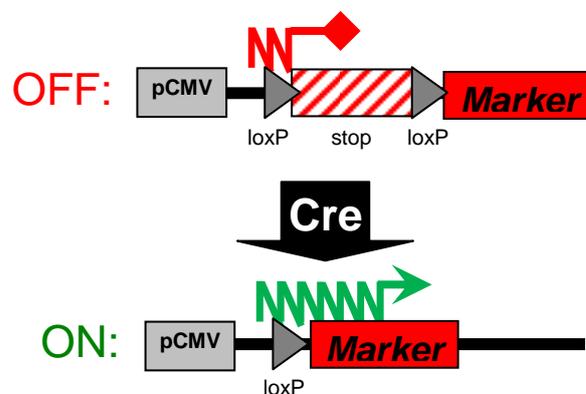


Abb. 1.8: Cre-vermittelte Rekombination viraler Genome

Das Reportervirus beinhaltet eine gefloxt 'Stopp'-Kassette zwischen der kodierenden Sequenz des Markergens und dem „Haupt-unmittelbar-früh-Promotor des HCMV (engl. „major immediate early promoter“). Nach Infektion eines Cre exprimierenden Zelltyps wird die 'Stopp'-Sequenz ausgeschnitten und der rekombinierte Reporterlokus bleibt in der Virusnachkommenschaft erhalten. In anderen Zelltypen findet keine Rekombination des viralen Genoms statt und produziertes Virus ist nicht genetisch markiert (aus (133)).

Um die Rolle einzelner Zelltypen (u.a. die der Endothelzellen) während der viralen Infektion zu untersuchen wurden transgene Mauslinien verwendet, die Cre unter Kontrolle eines Zelltyp-spezifischen Promotors exprimieren (133). Hierbei wurde ein rekombinantes MCMV Reportervirus getestet, das konditional das enhanced green fluorescent protein (EGFP) als Reporter unter Kontrolle des HCMV major immediate-early Promotors exprimiert. Wenn das Reportervirus einen Zelltyp infiziert, der Cre exprimiert

wird das virale Genom rekombiniert, die geflochte 'Stopp' Kasette ausgeschnitten und das Reportergen exprimiert. Die Verwendung eines nach diesem Prinzip getesteten Reportervirus erlaubte uns, die Rolle bestimmter Zelltypen, speziell aber die Rolle der Endothelzellen in der MCMV Infektion und Dissemination zu untersuchen (133). Hierbei konnte gezeigt werden, dass während der Infektion mit MCMV Endothelzellen eine dominante Rolle einnehmen. Endothelzellen stellen einen der ersten infizierten Zelltypen in Leber, Lunge, Milz und Herz dar. In den meisten Organen (mit Ausnahme der Leber) stammt die initiale Viruslast aus Endothelzellen. Endothelzellen stellen somit eine wichtige Produktionsstätte für die Virusvermehrung und Ausbreitung dar.

Die Beschränkung der Infektion mit MCMV- $\Delta M94$ auf die erste Zielzelle bietet die Möglichkeit den Beitrag der infizierten Endothelzelle zur Stimulation der adaptiven Immunantwort zu untersuchen.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das humane Cytomegalovirus (HCMV) ist derzeit die häufigste Ursache der Übertragung einer Virusinfektion der Schwangeren auf das Kind. Allein in den USA sind 30.000 Neugeborene jährlich betroffen, wovon 8.000 permanente Schädigungen erleiden, die von mentaler Retardierung zu Seh- und Hörverlust reichen. Versuche einen geeigneten Impfstoff herzustellen, scheiterten bisher.

Die hier vorgestellte Impfstrategie beruht auf der gezielten Deletion des essentiellen Gens *M94*. Die Deletion des essentiellen Gens verursacht die Unterbrechung des Virus-Zusammenbaus und verhindert die Bildung infektiöser Partikel. Die Möglichkeit die Zielzelle vergleichbar mit dem Wildtyp zu infizieren, das virale Genom vollständig zu replizieren und durch Expression des vollständigen Antigen-Repertoires eine schützende Immunantwort hervorzurufen bleibt hingegen erhalten. Das Impfvirus MCMV- Δ M94 wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt, auf die Induktion funktioneller humoraler und zellulärer Immunantworten und den durch Vakzinierung vermittelten Schutz gegen Infektion mit Wildtypvirus, in immunkompetenten wie auch in immungeschwächten Mäusen auf Apathogenität und Protektion getestet.

Die Verbreitungsdefizienz, das Unterbleiben einer replikativen, lytischen Infektion und damit die Beschränkung der Infektion auf die zuerst-infizierte Zelle, erlaubt zudem die Verwendung des MCMV- Δ M94 als interessantes Werkzeug zur Charakterisierung der Rolle dieser Zelle. So sollte geklärt werden, ob Unterschiede im Beitrag verschiedener Zelltypen zur Immunantwort bestehen und ob replikative Infektionszyklen eine Notwendigkeit für die Etablierung einer protektiven Immunantwort oder dem Erreichen des Stadiums der Viruslatenz darstellen.

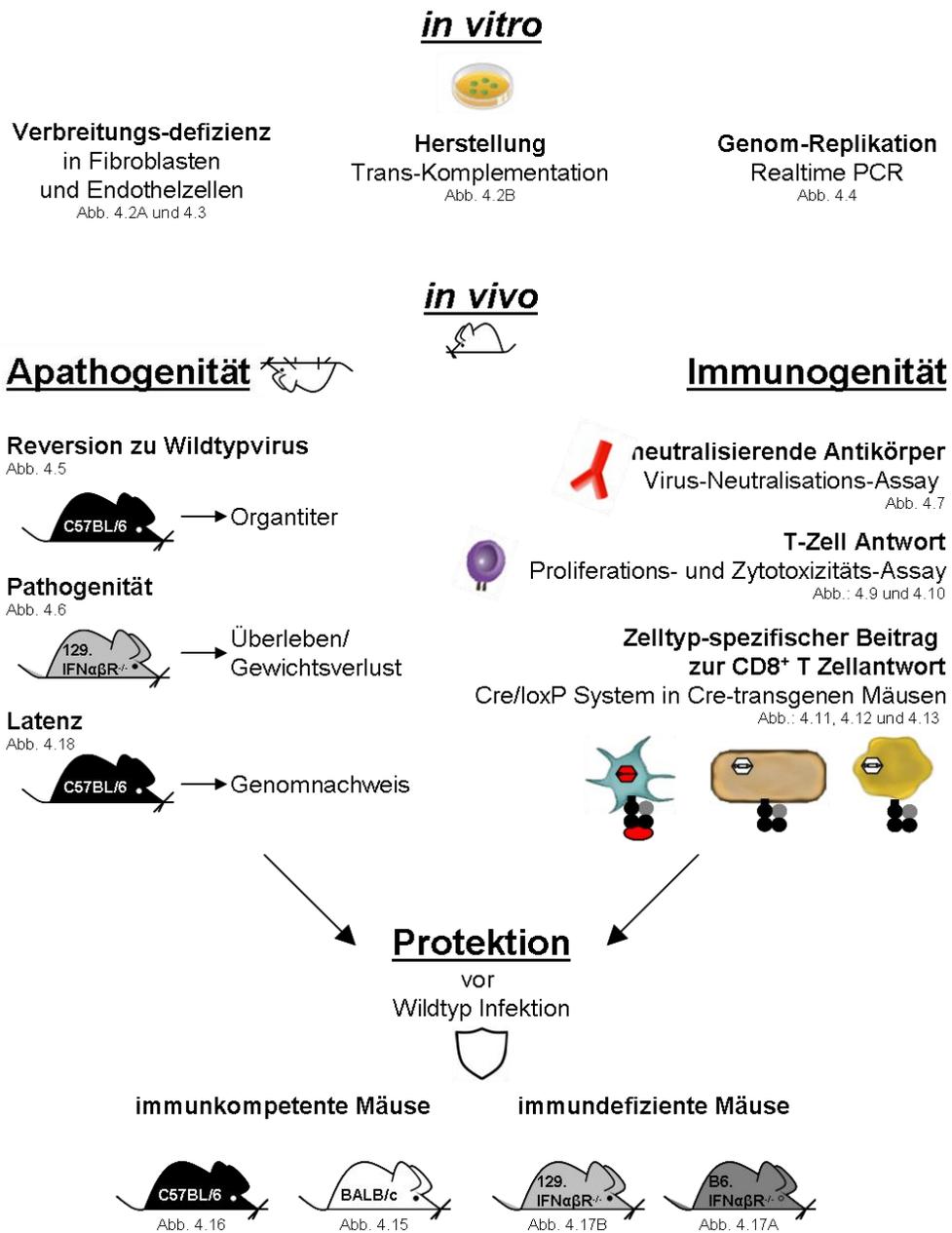


Abb. 1.9: Projektübersicht: Charakterisierung der verbreitungsdefizienten MCMV-Vakzine MCMV-ΔM94

2 MATERIAL

2.1 Geräte

Bakterienschüttler (ISF- 1- W)	Kühner, Adolf AG, Birsfelden, Schweiz
Brutschrank (B5050E)	Heraeus Instruments, Gera, D
Durchflusszytometer (Epics XL-MCL)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, D
Fluoreszenzmikroskop (1x71)	Olympus, Hamburg, D
Fotodokumentationsgerät (EagleEye)	Bio-Rad, München, D
Gene Pulser™	Bio-Rad, München, D
Inkubator BB16CU	Heraeus Instruments, Gera, D
Lichtmikroskop (Axiovert 25)	Zeiss Carl AG, Göttingen, D
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D
Vortex-Mischer	Bender/Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad F10	Julabo, Seelbach, D
<i>Zentrifugen</i>	
Avanti™J-20xp	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, D
L8-55M	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, D
Multifuge 3 S-R	Heraeus Instruments, Gera, D
Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, D

2.2 Verbrauchsmaterialien

Durchflusscytometer-Röhrchen (5 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 + 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Falcon-Reaktionsgefäße (15 + 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Elektroporations-Küvetten	Bio-Rad, München, D
<i>Kulturschalen:</i>	
Schalen	Grainer, Frickenhausen, D
(9 cm Durchmesser für Agarplatten)	
60 x 15 mm (20 cm ²)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
100 x 20 mm (55 cm ²)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
150 x 20 mm (145 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht, D
<i>Pipetten:</i>	
5ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
10ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
25ml	Sarstedt, Nümbrecht, D

Ultrazentrifugenröhrchen
(25x 89 mm)

Beckman Coulter
GmbH, Krefeld, D

Zellkulturplatten:

24 Lochplatte

Becton Dickinson,
Heidelberg, D

48 Lochplatte

Becton Dickinson,
Heidelberg, D

Zellschaber:

25 cm

Costar,
Bodenheim, D

39 cm

Costar,
Bodenheim, D

2.3 Reagenzien

1kb Leiter

BioLabs,
Frankfurt/ Main, D

Agarose

Invitrogen,
Karlsruhe, D

Agar

Becton Dickinson,
Heidelberg, D

Ampicillin

Sigma,
Deisenhofen, D

Borsäure

Carl Roth GmbH Co,
Karlsruhe, D

Carboxymethyl-Cellulose

Sigma,
Deisenhofen, D

Chloramphenicol

Sigma,
Deisenhofen, D

MATERIAL

Chloroform	Merck, Darmstadt, D
Cyclohexamide	Merck, Darmstadt, D
Dimethylsulfat (DMSO)	Merck, Darmstadt, D
Essigsäure	Merck, Darmstadt, D
Ethylendiamin-tetraessigsäure	Fluka, Neu-Ulm, D
Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	
Fc-Block	BD Biosciences, Heidelberg, D
Fugene HD	Roche, Basel, CH
Glycerin	Carl Roth GmbH Co, Karlsruhe, D
Glycin	Carl Roth GmbH Co, Karlsruhe, D
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen, D
Methanol	Carl Roth GmbH Co, Karlsruhe, D
NaCl	Merck, Darmstadt, D
PharmLyse	BD Biosciences, Heidelberg, D
Phenol/ Chlorophorm (Roti-Phenol/C/I)	Carl Roth GmbH Co, Karlsruhe, D
(D+)Saccharose	Carl Roth GmbH Co, Karlsruhe, D
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH Co, Karlsruhe, D
Superfekt	Quiagen, Hilden, D
TEMED	Sigma, Deisenhofen, D
Tris	Carl Roth GmbH Co,

	Karlsruhe, D
Triton X 100	Carl Roth GmbH Co., Karlsruhe, D
Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Yeast Extract	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Zeocin	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.4 Antikörper

verwendete primäre Antikörper:

CD8a-FITC	BD Biosciences, Heidelberg, D
PE-TexasRed coupled α -CD8 α 5H10	Caltag, Sacramento, USA
PE coupled α -CD45.1 A20	BD Biosciences Pharmingen
PE conjugated α -CD90.1 HIS51	eBioscience
PE-Cy5.5 coupled α -CD4 RM 4-5	eBioscience.

verwendete sekundäre Antikörper:

Alle sekundären Antikörper wurden 1:8000 verdünnt eingesetzt.

Ziege anti Maus IgG	Dianova, Hamburg, D
Meerrettich-Peroxidase konjugiert	
Ziege anti Kanninchen IgG	Dianova, Hamburg, D
Meerrettich-Peroxidase konjugiert	

2.5 Enzyme

AmpliTaq DNA-Polymerase	Roche, Mannheim, D
DNase I und 10 x Puffer	Invitrogen, Karlsruhe, D
Expand high fidelity Polymerase	Roche, Mannheim, D
Klenow-Polymerase	BioLabs, Frankfurt/ Main, D
Restriktionsenzyme und zugehörige Puffer	BioLabs, Frankfurt/ Main, D
SAP (shrimp alkaline phosphatase)	Roche, Mannheim, D
T4-DNA-Ligase	BioLabs, Frankfurt/ Main, D

2.6 Peptide

Die verwendeten Peptide wurden von der Firma Metabion, Martinsried bei München hergestellt. Sie besitzen eine Reinheit von >95 %.

Ovalbumin	SIINFEKL
<i>m139</i>	TVYGFCLL
<i>ie3</i>	RALEYKNL
<i>M57</i>	SCLEFWQRV
<i>M45</i>	HGIRNASFI

Alle Peptide wurden mit DMSO auf eine Konzentration von 1 mM eingestellt und in 100 µl Aliquots bei -80 C eingefroren.

2.7 Kommerzielle Komplettsysteme

DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden, D
GFX Micro Plasmid Prep Kit	Amersham Bosc., Freiburg, D
GFX PCR DNA and	Amersham Bosc., Freiburg, D
CD8 α ⁺ T Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Gel Band Purification Kit	
NucleoBond PC100	Macherey- Nagel, Düren, D
Plasmid-Midi-Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, D

2.8 Bakterienstämme

Escharichia coli:

DH10B recA ⁻ für pCR3	Invitrogen, Karlsruhe, D
Pir1 für pOriR6K	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.9 Zellen

293T	Adenovirus transformierte humane Nierenkarzinomzellen (ATCC Nr:CRL-11268)
M2-10B4	Stromazelllinie aus Knochenmark der BALB/c-Maus (ATCC Nr: CRL-1972)
MEF	primäre murine embryonale Fibroblasten

	aus der BALB/c-Maus
NIH/3T3	murine Fibroblasten
	aus der BALB/c-Maus (ECACC Nr: 93061524)
NT/M94-7	auf NIH/3T3 basierende murine Fibroblasten-Zelllinie zur Trans- komplementation des pM94 und Vermehrung von MCMV- Δ M94 Virusmutanten

2.10 Oligonukleotide

Die für Klonierungen und Sequenzierungen verwendeten Oligonukleotide wurden alle von der Firma Metabion (Martinsried bei München) hergestellt.

2.11 Kulturmedien/ Seren

Alle Kulturmedien und Seren werden von der Firma Invitrogen (Gibco) bezogen.

2.11.1. Grundmedien

D-MEM (+ 4500 mg/L-Glucose; + L-Glutamin; - Pyruvate)

10x MEM (+ Earle's; - L-Glutamin; - NaHCO₃)

RPMI 1640 (+ L-Glutamin)

2.11.2. Zusätze/ Seren

D-PBS (-CaCl₂; -MgCl₂)

Foetal Bovine Serum (FCS)

L-Glutamin 200mM (100 x)

NEAS (nicht essentielle Aminosäuren (100x))

Newborn Calf Serum (NCS)

Penicillin-Streptomycin

Sodium Bicarbonat (7,5%)

Trypsin EDTA (1 x) (0,25 % Trypsin mit EDTA-4Na)

2.11.3. Puffer und Lösungen

ACK-Lyse-Puffer:

für 1 l

0,15M NH ₄	8,29 g
1 mM KHCO ₃	1 g
0,1 mM Na ₂ EDTA	37,2 mg
H ₂ O	800 ml

1 N HCl auf pH 7,2- 7,4 einstellen

H₂O auf 1 l auffüllen

steril filtrieren

HEPES-Puffer:

16 g/l	NaCl
0,72 g/l	KCl
0,25 g/l	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
10 g/l	HEPES
2 g/l	Glucose

mit NaOH auf pH 7,05 einstellen

sterilfiltrieren

6x Ladepuffer:

50 % (v/v) Glycerin	5ml
0,05 M EDTA (pH 8,0-7,5)	2ml
0,25 % (w/v) Bromphenolblau	0,025 g

dH₂O auf 10 ml auffüllen

LB-Medium:

10 g/l	Trypton
5 g/l	Yeast- Extract
4 g/l	NaCl

autoklavieren

Methylzellulose:

für 500 ml

Carboxymethyl-Zellulose 3,75 ml

H₂O 388 ml

Autoklavieren

FCS 25 ml

10 x MEM 50 ml

Glutamin 5 ml

NEAS 2,5 ml

Penicillin/Streptomycin 5 ml

NaHCO₃ (7,5 %) 24,7 ml

TAE-Puffer (50fach):

2 M Tris 484,6 g

0,25 M Na-Acetat 41 g

0,05 M EDTA 37,2 g

Mit Essigsäure auf pH 7,3 einstellen und auf 2 l auffüllen

TBE-Puffer (10fach):

Tris 108 g

Borsäure 55 g

0,5 M EDTA 40 g

auf 1 l mit dH₂O auffüllen

autoklavieren

TE-Puffer:

10 mM Tris/ HCl pH 8,0

1 ml 1 M Tris/HCl

3 METHODEN

3.1 Arbeiten mit Bakterien

3.1.1. Kultivierung von *E. coli*

In dieser Arbeit wurden die *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterienstämme DH10B und PIR1 verwendet. Kulturen dieser Bakterien wurden in der Regel bei 37°C in Luria Broth (LB) Medium angezogen. Um Einzelkolonien zu erhalten wurden Bakterien auf Petrischalen mit LB-Agar Medium ausgestrichen. Flüssigkulturen wurden mit Einzelkolonien oder aus Glycerolstocks angeimpft und bei geeigneter Temperatur und 180rpm inkubiert. Zur Lagerung von rekombinanten *E. coli* wurden Kulturen, mit 25% (v/v) Glycerol, bei -80°C verwahrt.

3.1.2. Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Bevor Bakterien durch Elektroporation transformiert werden können, müssen diese zuvor kompetent gemacht werden. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis mit vorgekühlten Instrumenten und Lösungen durchgeführt. 100 ml LB-Medium wurden mit 2 ml einer stationären Vorkultur angeimpft und bei 37°C bzw. 32°C im Bakterienerschüttler bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,3 - 0,5 angezogen. Nach einer Inkubation von 15 Minuten auf Eis wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 5000x g bei 4°C pelletiert und anschließend in 100 ml 10%igem Glycerin resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde weitere zweimal wiederholt, um Salze zu entfernen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Bakterienpellet in 900 µl 10 %-igem Glycerin resuspendiert, in 60 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schock-gefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

3.1.3. Transformation durch Elektroporation

Die Elektroporation ist eine sehr effiziente Methode, um genetisches Material in Bakterien einzubringen. Für die Transformation wurden elektrokompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und entweder 7 µl eines Ligationsansatzes oder 2-3 µl eines PCR Ansatzes zu den Bakterien gegeben und diese in vorgekühlte Kondensator-Küvetten (0,2 mm Durchmesser) überführt. Die Elektroporation erfolgte durch einen kurzen Puls von 2,5 kV, 25µF und 400 Ω. Nach sofortiger Zugabe von 1 ml LB-Medium ohne Antibiotika wurden die Bakterien in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 37°C bzw 30°C für 1-2 h auf einem Tischschüttler (1100 rpm) inkubiert. Einzelkolonien wurden durch Ausplattieren und Inkubation von 100-200 µl transformierten Bakterien auf LB-Agar-Platten mit geeignetem Antibiotikum gewonnen.

3.2 Arbeiten mit DNA

3.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Für die Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (DNA-Minipräparation) wurde der GFX Micro Plasmid Prep Kit der Firma Amersham Biosciences verwendet. Plasmid-DNA-Isolierung im quantitativen Maßstab (DNA-Midipräparation) wurde mit dem Plasmid DNA Purification Kit NucleoBond PC100 von Macherey-Nagel durchgeführt. Alle Arbeiten wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.2. Isolierung von BAC-DNA in analytischem Maßstab

Für die Präparation von BAC-DNA, die für das 230kbp MCMV Genom kodiert, sind kommerzielle Mini-Plasmid Kits mittels Säulen-Aufreinigung ungeeignet. Daher wurden 10ml einer stationären Kultur BAC-DNA enthaltende Bakterien mittels

alkalischer Lyse aufgeschlossen und über eine Phenol-Chloroform Extraktion sowie anschließender DNA-Fällung gewonnen. Dazu wurde die Bakteriensuspension in 15 ml-Falcon-Reaktionsgefäße überführt und bei $2600 \times g$ (3500 rpm Heraeus-Zentrifuge) für 15 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde in 300 μ l Lösung I (25 mM Tris/HCl und 10 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert und in 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurde 300 μ l Lösung II (0,2 M NaOH, 1 % SDS) zugegeben und vorsichtig durch Invertieren gemischt. Nach einer drei-minütigen Inkubationszeit wurden 300 μ l Lösung III (3 M KAc, pH 4,8) zugegeben und die Proben ebenfalls über Kopf gemischt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten auf Eis wurden die Lösung bei $20800 \times g$ (14000 rpm 5417-R-Zentrifuge) für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand mit abgeschnittener 1 ml-Pipettenspitze in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 1 ml Phenol/Chloroform und fünf-minütiger Inkubation auf einem Rollmischer wurden die BAC-DNA durch Zentrifugation der Probe bei $20800 \times g$ für 5 Minuten extrahiert. Danach wurde die obere, wässrige Phase, mit einer abgeschnittenen 1 ml-Pipettenspitze abgenommen und mit 1 ml Isopropanol gemischt. Nach einer Zentrifugation bei $20800 \times g$ für 20 Minuten wurde der Überstand abgeschüttet und das Pellet mit 500 μ l 70 %igem Ethanol gewaschen. Das luftgetrocknete Pellet wurde in 100 μ l TE-Puffer gelöst. Für einen Testverdau wurden 50 μ l der BAC-präparation verwendet.

3.2.3. Restriktion von DNA

Die Spaltung von Plasmid-DNA wurde in der Regel in einem Gesamtvolumen von 20 μ l und für BAC-DNA in 60 μ l durchgeführt. Für 1 μ g DNA wurden mindestens 3 Units des Restriktionsenzym (NEB) im entsprechenden Restriktionspuffer verwendet. Die

Inkubation fand bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur für 1-2 Stunden statt. Gegebenenfalls wurde das Restriktionsenzym hitzeinaktiviert.

3.2.4. Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um Rezirkularisierung von Plasmidvektoren mit kompatiblen Restriktionsenden zu verhindern, wurden DNA-Enden dephosphoryliert. Dazu wurde hitzeinaktivierter Restriktionsverdau anschließend mit alkalischer Phosphatase (SAP, shrimp alkaline phosphatase, Roche), die 5'-terminale Phosphatgruppen an DNA-Enden entfernt, behandelt. Pro pmol linearer DNA wurden mindestens 1 Unit SAP im dazugehörigen Puffer für eine Stunde inkubiert. Darauf wurde das Enzym 15 Minuten bei 65 °C inaktiviert.

3.2.5. Herstellung von blunt-Enden mit Klenow-Polymerase

Um eine Ligation von DNA-Fragmenten mit terminalen nicht-komplementären DNA-überhängen zu ermöglichen, wurden die DNA-Enden mit Hilfe der Klenow-Polymerase, aufgrund ihrer 3'-5' Exonukleaseaktivität zum Doppelstrang ergänzt oder abgedaut. Für die Reaktion wurden 1 µg DNA in wässriger Lösung mit 1x Klenow-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5; 50 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM DTT), 1 mM dNTP und 1 Unit Klenow-Polymerase für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 20 Minuten bei 65 °C inaktiviert.

3.2.6. Agarose Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der kontinuierlichen Auftrennung von DNA-Fragmenten nach deren Größe, sowie der Bestimmung von Konzentration und Reinheitsgehalt. DNA wurde in 1x Ladepuffer aufgetragen und Ethidiumbromid in einer finalen Konzentration von 0.005%(v/v) beim Gel gießen zugefügt.

Gelelektrophoresen von BAC-DNA wurden typischerweise bei 60 V für 20 h in 0.8%-TBE-Gelen durchgeführt. Plasmidverdaue und PCR-Produkte wurden in 1- 2% igen TAE-Gelen bei 120 V für 1 h aufgetrennt. Analyse und Dokumentation erfolgte mittels des Eagle Eye UV-Transilluminators (BioRad).

3.2.7. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte am UV/VIS- Spektralphotometer (Nanodrop ND-100, Peqlab) bei einer Absorbtion von 260 nm. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doppelsträngiger DNA.

3.2.8. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen auf einem langwelligen UV-Transiluminator ausgeschnitten und mit Hilfe des GFX PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

3.2.9. Ligation

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase in einem molaren Verhältnis von 1: 3 (Vektor und Insert) kovalent verbunden. Der Ligationsansatz wurde in einem Gesamtvolumen von 20 μl mit 400 U T4-DNA Ligase (NEB) und entsprechendem Ligationspuffer bei 16°C über Nacht durchgeführt. Rezirkularisierung des Vektors wurde durch eine Reaktion ohne Insert- Fragment kontrolliert. Elektrokompetente Bakterien wurden mit 7 μl des Ligationsansatzes transformiert.

3.2.10. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine Technik zur Amplifizierung von geringen DNA Mengen und

wurden in Rahmen dieser Arbeit sowohl zum Erzeugen von DNA-Fragmenten für Klonierungen (Expand-High-Fidelity PCR System, Roche) als auch zur Genotypisierung eingesetzt (Ampli-Taq PCR System, Applied Biosystems). Reaktionen wurden entsprechend Herstellerangaben angesetzt. Generell wurde eine „Touch-Down“-PCR nach folgendem Programm durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklus	
1.	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	
2.	Denaturierung	95 °C	30 sec	-1 °C bei jedem Zyklus; 17x
3.	Anlagerung	62-45 °C	30 sec	
4.	Elongation	72 °C	2 min	
5.	Denaturierung	95 °C	30 sec	
6.	Anlagerung	45 °C	45 sec	18x
7.	Elongation	72 °C	2 min	
8.	Finale Elongation	72 °C	5 min	
9.	Lagerung	4 °C		

3.2.11. Quantitative Realtime PCR (qPCR)

Zur Bestimmung von viralen Genomen in Organen oder Zellen wurde eine quantitative PCR mit dem Taqman System (Applied Biosystems) durchgeführt. Dazu wurden spezifische DNA-Sonden gegen das virale Polymerasegen (*M54*) und zur Kontrolle gegen das zelluläre Lamin-B-Rezeptorgen (*lbr*) erzeugt. Die Sonden wurden von der Firma Metabion hergestellt und 3'- FAM und 5' TAMRA markiert. PCR Reaktionen wurden mit dem Taqman-1000 RXN Core Reagent- Kit (Applied Biosystems) angesetzt. Standardkurven

für die einzelnen PCRs wurden mit Plasmidverdünnungen erstellt, Effizienzen bestimmt und anschließend gegeneinander verrechnet, um eine relative Quantifizierung zu ermöglichen.

Sonde	Sequenz
5' FAM-Ibr-sense-TAMRA 3'	CTGAGCCACGACAACAATCCCAGCTCTAC
5' FAM M54 TAMRA 3'	AACGTACATCGCTCTCTGCTGGCCG

Komponente		Programm		
Vorwärts-Primer	2,5 µl	1x	50°C	Degradierung von Uracil enthaltener DNA
Rückwärts-Primer	2,5 µl		2 min	
Taqman-Sonde	5 µl		95°C 10 min	Initiale Denaturierung
Puffer A	5 µl			
MgCl ₂	8 µl			
dXTP-Mix	4 µl	50x	95°C	Denaturierung
UNG	0,5 µl		15s	
AmpliTaQGold	0,25 µl		60°C 1 min	Anlagerung, Elongation und Fluoreszenzmessung
Wasser (ROTH)	12,25 µl			
Template	10 µl		4°C	Lagerung

3.2.12. Aufreinigung eines PCR-Fragments

Für die Aufreinigung von PCR-Fragmenten wird der QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen entsprechend Herstellerangaben verwendet.

3.2.13. Herstellung rekombinanter BACs

Die Mutagenese des 240 kbp umfassenden MCMV Genoms, kodiert auf einem bacterial artificial chromosome (BAC), wurde mit Hilfe homologer Rekombination von linearen Fragmenten durchgeführt (ET-Rekombination, ZITAT Wagner 2004). Die Rekombination

erfolgt durch crossing-over von homologen linearen Fragmenten und den entsprechenden Sequenzen im BAC mit Hilfe der Rekombinasen $red\alpha$ und $red\beta$ des Bakteriophagen γ . Diese Rekombinasen, sowie der Exonuclease-Inhibitor $red\gamma$, der die Degradation von linearen DNA-Fragmenten in *E. coli* verhindert, sind auf dem temperatur-sensitiven Plasmid pKD46 unter Kontrolle eines Arabinose induzierbaren Promoter kodiert. DH10B *E. coli*, die bereits das gewünschte BAC enthalten, wurden mit pKD46 transformiert und bei 30°C kultiviert. Zur Induktion der Rekombinasen wurde 0,1% (w/v) L-Arabinose zum LB-Medium für 3-5 h, während der Anzucht zur Herstellung von elektrokompente Bakterien, hinzugefügt. Diese wurden mit 500ng DpnI verdaulichem PCR-Produkt transformiert, das die gewünschten Modifikationen, eine FRT-flankierte Kanamycin-Selektionskassette sowie mindestens 40 bp homologe Sequenzen enthält. Transformierte Bakterien wurden auf 25µg/ml Chloramphenicol (CAM) und 50µg/ml Kanamycin (KAN)- LB- Agar Platten ausplattiert und bei 43°C kultiviert. Dies führt zum Verlust des pKD46 Plasmids und selektiert zudem auf erfolgreiche Insertion der Kan-Kassette im BAC. Zur Bestätigung der Mutagenese wurden RFLP-Analysen durchgeführt.

Die Kanamycin-Kassette wurde durch anschließende FRT-FLP-Rekombination entfernt. Dazu wurden die Bakterien zusätzlich mit dem ebenfalls temperatursensitiven Plasmid pCP20 transformiert, das für die FLP Recombinase kodiert. Die Transformanten wurden auf CAM-Platten bei 37°C angezogen und durch Doppelpicken auf LB-KAN-CAM Platten auf den Verlust der Kanamycin Resistenz überprüft. Kandidaten wurden durch Testverdaulichkeit überprüft und durch Sequenzierungen bestätigt.

3.2.14. Herstellung rekombinanter Viren

Rekombinante MCMV Mutanten basieren auf dem bacterial artificial chromosome (BAC) Clon pSM3fr, der ursprünglich aus dem MCMV Stamm Smith hergestellt wurde (134). Nukleotidpositionen sind gemäß Rawlinson et al. angegeben (135). Das 1.4 kbp große SmaI Fragment aus dem Plasmid pCP15 trägt ein mit FRT Sequenzen flankiertes Kanamycin-Resistenzgen (*Kan^r*), das in die BssHIII Stelle des Plasmides pCR3 (Invitrogen, Basel, Switzerland) eingefügt und somit das Plasmid pCR3-FRT-*Kan^r*-FRT erzeugt wurde. Ein, ein ATG Startcodon und eine loxP-Stelle beinhaltendes Fragment wurde hergestellt durch Annealing des Oligonukleotids

ATGlox1

(5'-AATTCATGATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTATCCGGAGATATCCACCGGTCTGGCGGCCGC -3') und ATGlox2

(5'-TCGAGCGGCCGCCAGACCGGTGGATATCTCCGGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATCATG -3'). Dieses Fragment wurde in die EcoRI und XhoI Stelle eingefügt, die sich zwischen dem major immediate early Promoter des HCMV (IEP) und dem polyA Signal des bovinen Wachstumshormones des pCR3-FRT-*Kan^r*-FRT befindet, um das Konstrukt pCR3-FRT-*Kan^r*-FRT-ATG-loxP zu erhalten. Das Ovalbumingen (*ova*) wurde synthetisiert (ATG:biosynthetics) und dabei GGAA nach der nt Position 9 eingefügt, was zu einer BspEI Restriktionsschnittstelle zum weiteren Klonieren führt. *Ova* wurde in frame mittels BspEI und NotI in pCR3-FRT-*Kan^r*-FRT-ATG-loxP eingefügt, was zu einem full length *ova* mit inserierten loxP Stellen nach dem initialen ATG führt und unter Kontrolle des IEP exprimiert werden kann. Das resultierende Plasmid ist pCR3-FRT-*Kan^r*-FRT-ATG-loxP-*ova*. Um ein Konstrukt mit Cre induzierbarer Ovalbumin (OVA) Expression zu erhalten wurde eine floxstop-Kassette (133) in die

EcoRI und BspEI Stellen des pCR3-ATG-loxP-*ova* eingefügt und so pCR3-ATG-flox-stop-*ova* erzeugt. Unter Verwendung dieser Konstrukte als Templates und der Oligonukleotide 5'- $\Delta m157$ -pCR3-FRT-*Kan^r*-FRT (5'- CGT GGT CAA GCC GGT CGT GTT GTA CCA GAA CTC GAC TTC GGT CGC GTT GCT TAC AAT TTA CGC GCG GG -3'; nt position 216243 bis 216290) und 3'- $\Delta m157$ -flox-*egfp* (5'- CCC CGA TAT TTG AGA AAG TGT ACC CCG ATA TTC AGT ACC TCT TGA CTA AGA AGC CAT AGA GCC CAC CGC -3'; nt position 216885 bis 216930) als Primer wird ein lineares, die IEP-*ova* Kasette, die FRT flankierte *Kan^r* und die Sequenzen mit viralen Homologien zur Zielstelle *m157* im MCMV-Genom beinhaltendes DNA-Fragment erzeugt. In einem ähnlichen Verfahren wird das firefly Luziferasegen (*luc*) unter Kontrolle des IEP in den die FRT flankierte *Kan^r*beinhaltenden pCP15 Vektor kloniert. Diese Fragmente wurden in *m157* des pSM3fr wie in Sacher et al (133) beschrieben eingefügt und so pSM3fr- $\Delta m157$ -*ova*, pSM3fr- $\Delta m157$ -flox-*ova* und pSM3fr- $\Delta m157$ -*luc* erzeugt. Zum Ausschneiden der FRT flankierten *Kan^r* wird FLP Rekombinase transient vom Plasmid pCP20 exprimiert.

3.2.15. Herstellung verbreitungsdefizienter Virus Mutanten

Zu Herstellung der rekombinanten MCMV, denen die *M94* Sequenz fehlt werden die parentalen Ursprungs-MCMV BACs pSM3fr (MCMV-*wt*), pSM3fr- $\Delta m157$ -*ova* (MCMV-*ova*) und pSM3fr- $\Delta m157$ -*rec-egfp* (MCMV- $\Delta m157$ -*rec-egfp*) (133) einem zweiten Mutageneseschritt unterworfen. Hierzu wurde das Plasmid pO6-*tTA*-mFRT-*Kan^r*-mFRT erzeugt, indem die *Kan^r*, an beiden Seiten flankiert mit mutierten 34 bp FRT Sequenzen, aus pO6ie-F5 in pO6-*tTA* inseriert (136) und so die Expression des *tTA* Transaktivatorgens unter Kontrolle des IEP notwendig zur Trans-

Komplementation des pM94 ermöglicht wird. Ein lineares DNA Fragment, das die *tTA* Kasette, die *Kan^r* und virale Sequenzen homolog zur Zielstelle im MCMV Genom (MCMV upstream-Homologie: nt position 136189 bis 136234 und MCMV downstream-Homologie: nt position 137256 bis 137309) enthält wurde unter Verwendung von Primer 5' Δ M94-pO6-*tTA* (5'- TGC TTC CCG GCG GCT TCT GCG CGA CCT TCC AGC TGC AGG TAG ACC ACG GCG ACG TCC AGA CTA TCC GTG AAA AGT TTG AGA AGC ATC AGT AGC CGA TTT CGG CCT ATT GGT T -3'), Primer 3'- Δ M94-pO6-*tTA* (5'- CAT GGA TGG GTT GGT TGA TTT GTA TGT CTG TTG GCT ACT CAC ATG TGC TCG AGA AGC CAG TGT GAT GGA TGA TCC TC -3') und Plasmid pO6-*tTA*-mFRT-*Kan^r*-mFRT als Template hergestellt. Dieses PCR Fragment wurde in die verschiedenen parentalen pSM3fr Klone inseriert, wobei das *M94* Gen deletiert wird. Da die ORFs des *M94* und *M93* überlappen mussten 47 bp der Homologie am 5'-Ende des *M94* erhalten bleiben um den *M93* ORF intakt zu halten. 17 bp Homologie sind am vormaligen 3'-Ende des *M94* erhalten. Wiederum wird FLP Rekombinase zum Ausschneiden der *Kan^r* exprimiert. Die Konstruktion von pSM3fr- Δ M94, pSM3fr-*ova*- Δ M94, pSM3fr-flox-*ova*- Δ M94 und pSM3fr- Δ m157-*rec-egfp*- Δ M94 wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzieren überprüft und bestätigt.

Viren wurden aus der BAC DNA rekonstituiert, auf der komplementierenden Zelllinie NT/M94-7 vermehrt und durch ein Saccharose-Kissen aufgereinigt (133). Zur Analyse der Virus-Replikation werden Überstände von infizierten Zellen alle 24h entnommen. Die Quantifizierung infektiösen Virus wurde unter Verwendung der TCID₅₀ (median tissue culture infectious dose) Titrationmethode auf NIH/3T3 oder komplementierenden NT/M94-7 Zellen durchgeführt. Zur Untersuchung der Virusreplikation des Virus *in vivo* wurde die Viruslast durch

Standard plaque assay als Plaque bildende Einheiten (PFU) pro Gramm Organwie beschrieben (133) bestimmt. Die Verbreitungsdefizienz jeder Viruspräparation einer *M94* defizienten Mutante (MCMV- $\Delta M94$, MCMV-*ova*- $\Delta M94$, MCMV-*flox-ova*- $\Delta M94$ and MCMV- $\Delta m157-rec-egfp$ - $\Delta M94$) wurde durch Abwesenheit von Plaquebildung nach Infektion nicht-komplementierender MEF bestimmt, wobei CPE einzelner infizierter Zellen beobachtet werden kann.

3.2.16. Sequenzierung

Zur Verifizierung von rekombinierter Plasmiden und BACs wurde die DNA sequenziert. Sequenzierungen von DNA-Fragmenten werden bei der Firma GATC in Konstanz durchgeführt. Die Sequenzierung von MCMV-BAC-DNA wurde bei der Firma SEQUISERVE in Vaterstetten durchgeführt. Hierfür werden 5 μ g DNA auf 200 μ l TE-Puffer aufgefüllt und fünf mal drei Sekunden mit Ultraschall (120 W) behandelt. Nach DNA-Fällung mit zwei Vol. Ethanol und Waschen mit 70 % Ethanol wird die so zerstückelte DNA in 10 μ l Wasser aufgenommen und für die Sequenzierung verwendet.

3.3 Zellkultur

Alle Zelllinien werden unter 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit und bei 37 °C in einem Inkubator (Heraeus Instruments) kultiviert. Jede Zelllinie braucht ein auf ihre Bedürfnisse abgestimmtes Kultivierungsmedium. Bevor FCS bzw. NCS zum Medium dazugegeben wird, muss dieses 45 Minuten bei 56 °C inkubiert werden um das Komplementsystem, welches in unbehandelten Seren aktiv ist, zu deaktivieren.

	Medium	Serum	Antibiotika
MEF	D-MEM	10 % FCS	5 ml Pen/Strep

M2-10B4	RPMI	10 % FCS	5 ml Pen/Strep
293T	D-MEM	10 % FCS	5 ml Pen/Strep
NIH/3T3	D-MEM	5 % NCS	5 ml Pen/Strep
NT/M94-7	D-MEM	5 % NCS	5 ml Pen/Strep + 50µg/ml Hygromycin B

3.3.1. Haltung von Zellen

Bei -80 °C eingefrorene Zellen werden im 37 °C Wasserbad aufgetaut, in supplementiertem Medium gewaschen (Zentrifugation bei 311 x g (1200 rpm Heraeus-Zentrifuge) und in supplementiertes Medium aufgenommen und auf Zellkulturschalen überführt. Beginnt nach ungefähr drei Tagen das Medium, welches durch Zusatz von Phenolrot gefärbt ist, sich ins Gelbliche zu verfärben, zeigt dies eine Änderung des pH-Wertes an. Das verbrauchte Medium muss durch Frisches ersetzt werden. Haben die Zellen die gewünschte Dichte erreicht, können sie entweder passagiert oder für Versuche eingesetzt werden. Eine plötzliche Änderung der Medienfarbe von rot nach gelb und die Trübung des Mediums weist auf eine Kontamination der Kultur durch Bakterien oder Pilze hin. Für das Passagieren wird das Medium von den Zellen abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Durch die Zugabe von Trypsin/EDTA (0,5 g Trypsin 1:250 in PBS und 0,2 g EDTA/L) für 2-3 Minuten lösen sich die Zellen von der Kulturschale ab. Sie werden in etwas Medium aufgenommen und für 5 Minuten bei 311 x g (1200 rpm Heraeus-Zentrifuge) bei RT sedimentiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen werden in frischem Medium aufgenommen und auf neue Zellkulturschalen ausgelegt. Um Zellen von ihren Kulturschalen zu ernten, werden die Zellen mit Trypsin behandelt und nach einer Inkubation bei RT für etwa 1-3 Minuten von den Schalen abgenommen. Alternativ

werden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von der Kulturschale abgeschabt. Der Zellkulturüberstand kann bei -70°C eingefroren oder für weitere Experimente verwendet werden.

3.3.2. Bestimmung der Zellzahl mit Neubauer-Zählkammer

10 μl der Zellsuspension werden 1:10 mit Trypanblau-Lösung verdünnt. Trypanblau dringt über die geschädigte Zellmembran nicht vitaler Zellen ein und färbt diese blau an. Aus der Verdünnung werden 10 μl unter das fixierte Deckgläschen der Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Anzahl vitaler Zellen wird im Mikroskop bestimmt indem 4 große Eckquadrate der Zählkammer ausgezählt werden. Die Kantenlänge eines großen Eckquadrates beträgt 1 mm und der Abstand zwischen Neubauer-Zählkammer und Deckgläschen ist 0,1 mm groß, so erhält ein Teilquadrat 0,1 μl Zellsuspension. Pro Milliliter beträgt demnach die Zellzahl:

Zellzahl (eines Teilquadrates) x Verdünnungsfaktor (1:10) x 10000
(1 ml/0,1 μl)

3.3.3. Herstellung der the trans-komplementierenden Zelllinie NT/M94-7

Die conditional trans-komplementierende Zelllinie NT/M94-7 wurde hergestellt indem der M94 ORF aus pSM3fr (133) unter Verwendung der Primer HAM94for (5'-GTGGGATCCACCATGTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCACGTCCAGACTATCC -3') und M94rev (5'-ACTCTAGAGTCGACTTCACATGTGCTCGAGAACA -3') amplifiziert, wobei ein HA-Tag am N-terminus eingeführt wird. Das PCR-Produkt wurde mit BamHI und XbaI geschnitten und in den mit BamHI- und NheI-geschnittenen pTRE2Hyg Vektor (BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Germany) eingefügt, wobei der Vektor pTRE-HAM94 entsteht und Die Expression von HAM94

unter die Kontrolle des Tetracycline (tet) induzierbaren Promoters gestellt wird. Stabile NIH/3T3 Transfektanten, die das pTRE-HAM94 beinhalten wurden mit 50µg/ml Hygromycin B selektioniert. Die Deletionsviren MCMV-ΔM94 wurden durch Transfektion verschiedener NT/M94 Zellklone mit den entsprechenden BACs rekonstituiert. Die am produktivsten infizierbare trans-komplementierende Zelllinie NT/M94-7 wurde mittels limiting dilution subkloniert.

3.4 Herstellung rekombinanter MCMV-Viren

Werden Zellen mit MCMV-BAC-Plasmiden transfiziert, so gelangen die Plasmide in den Zellkern und werden dort von der zellulären Maschinerie transkribiert. Die entstehenden gespleißten mRNA werden im Zytoplasma translatiert. Es entstehen virale Proteine, die das frisch gebildete Virusgenom umschließen und sich zu einem funktionellen Virus zusammenbauen können. Das Virus verlässt die Zelle und kann Nachbarzellen infizieren. Auf diese Weise entstehen Plaques, die 5-9 Tagen nach erfolgreicher Transfektion sichtbar werden. Sobald eine 20 cm² Kulturschale durchlysiert ist, kann diese geerntet und als Ausgangspunkt für die Herstellung eines Virusstocks verwendet werden.

3.4.1. Virus-Rekonstitution

Transfektion mit Superfekt

Transfektionen zur Rekonstitution von MCMV-Viren werden auf MEF-Zellen mit Superfekt durchgeführt. Da Primärkulturen empfindlicher als Zelllinien sind, wird weniger Superfektreagenz und DNA als im Hersteller-Protokoll angegeben verwendet. Für eine 20 cm² Schale werden 1,5 µg MCMV-BAC-Plasmid-DNA verwendet. Der Stock sollte eine Konzentration über 0,1 µg/µl besitzen. Zu der DNA wird D-MEM-Kulturmedium ohne Zusätze

gegeben, so dass ein Endvolumen von 150 µl vorliegt. Nach gründlichem Mischen werden 10 µl Superfekt hinzugegeben und für 10-15 Minuten bei RT inkubiert. Die Zellen werden mit PBS gewaschen und nach der Inkubation wird 1 ml supplementiertes Medium zum Superfektansatz gegeben und dieser vorsichtig auf die Zellen gegeben. Nach etwa 2½ Stunden wird das Superfektmedium gegen supplementiertes Medium ausgetauscht. Bei erfolgreicher Transfektion sollten nach 5-9 Tagen Plaques zu sehen sein.

3.4.2. Transfektion eukaryontischer Zellen

Fugene HD

Die Transfektion der MCMV-ΔM94 BAC-DNA-Konstrukte in NT/M94-7 Fibroblasten-Zellen erfolgte mittels Fugene HD (Roche, Mannheim, Deutschland). Bei der Transfektion mit Fugene HD handelt es sich wie bei der Transfektion mit Superfekt um einen Liposomen-vermittelten Gentransfer. Die zu transfizierende DNA wird von polykationischen Lipiden komplexiert und in dieser Form durch Verschmelzung mit der Zellmembran oder über Endozytose in die eukaryontischen Zellen aufgenommen. 24h vor der Transfektion mit DNA der MCMV-Konstrukte wurden die Fibroblasten-Zellen in einer Dichte von 1×10^5 Zellen in 35mm-Schalen ausplattiert.

Für die Transfektion wurden je 2,5 µg der jeweiligen BAC-DNA in 100 µl Optimem verdünnt und 6 µl Fugene HD zugegeben. Nach 15 min Inkubation bei RT wird das BAC-DNA/Fugene HD-Gemisch tropfenweise zu den Zellen in DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin gegeben.

Nach etwa 5-7 Tagen können erste infizierte Zellen beobachtet werden. Durch vorsichtiges Splitten der Zellen kann eine

durchlysierte Zellkultur erreicht werden, die als Inokulum zur weiteren Virusvermehrung dienen kann.

3.4.3. Virusstock-Herstellung

NT/M94-7, NIH/3T3 oder M2-10B4-Zellen werden in 20-30 145 cm²-Kulturschalen ausgelegt und bei ca. 80 % Konfluenz pro Platte mit ca. 1 ml Virus-Inokulum infiziert. Es ist ebenso möglich die Zellen bei bekanntem Virustiter mit einer MOI von 0,5 zu infizieren. Sind die Zellen lysiert, so werden sie wie durch Abschaben in 250 ml Zentrifugenbecher geerntet und entweder sofort weiterpräpariert oder bei -70 °C eingefroren. Alle Schritte der Viruspräparation werden bei 4 °C bzw. auf Eis durchgeführt. Der geerntete Überstand wird 15 Minuten bei 5400 x g (6000 rpm (AvantiTMJ-20xp-Zentrifuge) zentrifugiert. Im Überstand befinden sich freie Viruspartikel wobei im Pellet Zellen mit zellassoziierten Viruspartikeln vorhanden sind. Nach der Zentrifugation wird der Überstand auf Eis gestellt und das Pellet in ca. 4 ml Medium resuspendiert. Zur Isolierung der zellassoziierten Virionen wird das Pellet 20-mal mit dem Douncer-Homogenisator behandelt. Um Zellreste zu beseitigen wird erneut zentrifugiert (10 Minuten bei 17400 x g (12000 rpm AvantiTMJ-20xp-Zentrifuge). Der Überstand wird mit dem vorherigen vereinigt und 3 Stunden bei 25000 x g (13000 rpm AvantiTMJ-20xp-Zentrifuge) zentrifugiert. Das Pellet wird in wenig Medium resuspendiert und erneut mit dem Douncer-Homogenisator 20 Mal behandelt. In ein Ultrazentrifugenröhrchen werden 10 ml 15 % Sucrose/VSB-Lösung vorgelegt und schließlich das Homogenat vorsichtig überschichtet. Das nach einstündiger Zentrifugation (20000 rpm, SW28-Rotor, Beckman-Ultrazentrifuge) gewonnene Virus-Pellet wird mit 1-2 ml VSB-Lösung resuspendiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Das Pellet wird erneut homogenisiert 20-mal) und für 1 Minute bei 20800 x g (14000 rpm

5417-R-Zentrifuge) bei 4 °C zentrifugiert. Der überstand wird in 50-100 µl Einheiten aliquotiert und bei -70 °C eingefroren.

3.4.4. Virus-Titerbestimmung durch Standard Plaque-Assay

Zur Bestimmung des Virustiters werden MEF-Zellen in 48-Loch-Kulturplatten ausgelegt. Nach Erreichen einer 100 %igen Konfluenz wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit 200 µl Verdünnungen der zu titrierenden Virussuspension (1×10^{-2} bis 1×10^{-7} in supplementiertem DMEM (10 % FCS und Penicillin/Streptomycin) infiziert. Nach einer Stunde Inkubation der Zellen im CO₂-Inkubator, das die Adsorption der Viren ermöglicht, werden die Kulturüberstände abgesaugt und die Zellen mit Carboxymethylzellulose-Medium überschichtet. Dies verhindert die Ausbreitung von Viren über das Medium. Nach 4 Tagen können die durch Virusinfektion entstandenen Plaques unter dem Licht-Mikroskop ausgezählt und der Virustiter bestimmt werden. Hierbei wird folgende Gleichung verwendet:

Virustiter (PFU/ml) = gezählte Plaques x Verdünnungsfaktor / Vol. der Virusverdünnung

Titrationen werden jeweils in zweifacher Bestimmung durchgeführt.

3.4.5. Virustiterbestimmung mit TCID₅₀

Zur Titerbestimmung nach Kaerber und Spearman oder auch Tissue Culture Median Infectious Dose (TCID₅₀) wird ein 100µl Aliquot zu analysierenden Virus-Zellkulturüberstand verwendet. Hierzu wird eine 96 Napf Mikrotiterplatte mit $2,5 \times 10^4$ NIH/3T3 oder NT/M94-7 in 100 µl Zellkulturmedium pro Well für sechs Stunden bis zur Zelladhärenz inkubiert. Nach der Inkubation wird

nun eine Verdünnungsreihe angesetzt. Dazu werden die zu testenden Virusüberstände logarithmisch in Zellkulturmedium von 10^{-1} bis 10^{-8} verdünnt. Zuerst wird der Mediumüberstand abgenommen und mit 100 μ l Virusverdünnung beimpft. Pro Verdünnungsstufe werden jeweils zwölf Wells infiziert. Zur Virusinokulation wird die Mikrotiterplatte im Brutschrank inkubiert. Nach 4-tägiger Inkubation wird bestimmt in wievielen Wells pro Verdünnung eine Virusinfektion erkennbar ist. Danach kann nach der Methode von Spearman und Karber die $TCID_{50}$ berechnet werden:

(n=Mikrokulturen/Verdünnungsstufe):

$$\log TCID \text{ pro } 100 \mu\text{l} = \Sigma \text{ Produkte} / n = - 39 / 8 = -4,875$$

(Titerverdünnung)

$$TCID_{50} \text{ pro } 100\mu\text{l} = 10^{-4,875} \text{ (Titer)}$$

3.4.6. UV-Inaktivierung von Viren

Zur *in vivo* Applikation wurde ein Teil der zur Immunisierung verwendeten MCMV-*wt* Viruspräparation inaktiviert in dem die Viruspräparation 1.5 kJ/cm² UV Licht bei einer Entfernung von 5cm in einem UV-Crosslinker (Stratagene, Amsterdam, Netherlands) und bei 4°C ausgesetzt wurde. Hierdurch wird die Infektiosität der Viruspräparation um das 2.4×10^7 -fache vermindert. Dieselbe Behandlung war ausreichend um die virale Genexpression zu unterbinden wenn MCMV- $\Delta m157$ -*rec-egfp* verschiedenen Dosen (0.5, 1.0 und 1.5 kJ/cm²) UV Licht ausgesetzt und anschließend auf MEF titriert wurde. 4 Tage nach Infektion wurde die EGFP Expression in einzelnen infizierten Zellen beobachtet, wenn die Viruspräparation mit einer geringen Dosis UV-Licht (0.5 kJ/cm²) bestrahlt wurde und keine EGFP Expression wurde gesehen nach

einer starken Bestrahlung (1.5 kJ/cm²). Unbehandeltes MCMV- $\Delta m157-rec-egfp$ erzeugte EGFP⁺ Plaques.

3.5 Versuche im Mausmodell

3.5.1. Zellen und Mäuse

C57BL/6 (B6) Mäuse, B6.SJL-Ptpr^c (Ptpr^c) Mäuse and 129.IFN $\alpha\beta$ R^{-/-} Mäuse wurden jeweils von Elevage Janvier (Le Genest Saint Isle, France), Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA) und B&K Universal Limited (Grimston, England) bezogen. 129.IFN $\alpha\beta$ R^{-/-} Mäuse (137) wurden auf den B6 Hintergrund zurückgekreuzt (B6.IFN $\alpha\beta$ R^{-/-}). T-Zell Rezeptor transgene Mäuse OT-I (138) und OT-II (139) wurden auf Ptpr^c (CD45.1) oder Thy1.1 (CD90.1) congenen Hintergrund zurückgekreuzt. Alb-*cre* (140) und Tie2-*cre* (141) wurden auf dem B6 Hintergrund gehalten. Mäuse wurden unter spezifiziert Pathogen freien Bedingungen gehalten.

3.5.2. Immunisierung und Kontrollinfektion bei Mäusen

8 bis 10 Wochen alte weibliche B6 Mäuse wurden mittels intraperitonealer (i.p.) oder subcutaner (s.c.) Injektion entweder mit MCMV-*wt* oder MCMV-Mutante immunisiert. Jede Maus erhielt 100 μ l der Virussuspension s.c. oder 300 μ l i.p. C57BL/6 Mäuse wurde mit 1×10^5 TCID₅₀ MCMV-*wt* oder MCMV- $\Delta M94$, 129.IFN $\alpha\beta$ R^{-/-} mit $2,5 \times 10^5$ TCID₅₀ MCMV- $\Delta M94$ oder UV bestrahltem MCMV-*wt*, und B6.IFN $\alpha\beta$ R^{-/-} mit 3×10^5 TCID₅₀ MCMV- $\Delta M94$ oder MCMV-*wt* immunisiert. Nicht-immunisierte Mäuse erhielten das selbe Volumen an PBS (Mock-Immunisierung). Um die Immunantwort zu boosten wurde dieses Verfahren 14 Tage nach Infektion wiederholt. Seren von Mäusen 12 Wochen nach Infektion wurden verwendet, um die Menge Virus-spezifischer Antikörper mittels Virus-Neutralisations-Assays zu bestimmen.

28 Tage oder 20 Wochen nach primärer Immunisierung (Priming), wurden Mäuse einer Kontrollinfektion (Challenge) ausgesetzt mittels intravenöser (i.v.) Injektion von 10^6 PFU Zellkultur-generiertem MCMV-*wt*. Fünf Tage nach Kontrollinfektion wurden Lunge, Leber und Milz unter sterile Bedingungen entnommen und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Organhomogenate wurden auf infektiöse Viruslast mittels Standard Plaque Assay auf MEF Zellen untersucht. Speicheldrüsen generiertes MCMV (sgMCMV-*wt*) wurde hergestellt indem ein Homogenat aus Speicheldrüsen von Mäusen, die mit Zellkultur-generiertem MCMV-*wt* infiziert waren verwendet wurde (142). Das isolierte sgMCMV-*wt* ist virulenter im Vergleich zu Zellkultur-generiertem MCMV-*wt* (143). Geimpfte B6.IFN $\alpha\beta$ R^{-/-} Mäuse wurden einer Kontrollinfektion mit 2×10^5 PFU sgMCMV-*wt* ausgesetzt und 129.IFN $\alpha\beta$ R^{-/-} Mäuse wurden einer Kontrollinfektion mit 2.5×10^5 TCID₅₀ Zellkultur-generiertem MCMV-*wt* ausgesetzt.

3.5.3. Serumgewinnung bei der Maus

Die Serumgewinnung erfolgte durch Punktion der Schwanzvene. Das Blut wurde in 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen ohne Anti-Koagulanzen aufgefangen und für 1h bei 37°C und dann über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 10000 g wurde das Serum abgenommen und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

3.5.4. Virus Neutralisations Assay

Hitze-inaktiviertes Serum (56°C , 30min) von 5 immunisierten Mäusen 12 Wochen nach Infektion wurde gemischt und seriell in DMEM 1:2 verdünnt, wobei in allen Verdünnungen eine Konzentration von 10% Meerschweinchenkomplement beibehalten

wurde. Jede Verdünnung wurde mit 50 PFU MCMV-*luc* gemischt und für 90min bei 37°C inkubiert und anschließend auf NIH/3T3 Zellen auf einer 96-Well Mikrotiterplatte gegeben. Nach 1h bei 37°C wurde das Virusinokulum entfernt und NIH/3T3 Medium wurde hinzugegeben. Die Kulturen wurden für 24h inkubiert und die Luciferase Aktivität wurde in Zellextrakten mittels Luciferase Assay (Promega, Mannheim, Germany) in einem Luminometer (Berthold, Bad Wildbad, Germany) gemäß den Herstellervorgaben bestimmt.

3.5.5. *In vivo* Zytotoxizitäts-Assay

Um die CD8⁺ T Zell Effektorfunktion *in vivo* zu ermitteln, wurden Milzzellen congener CD45.1⁺ Ptp^{rc} Mäuse mit 2µM des angegebenen Peptides inkubiert und mit 2µM, 0.7µM, oder 0.1µM carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) und PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit nach Herstellerangaben (Sigma-Aldrich) gefärbt. Am Tag 6 nach Infektion wurden gefärbte CD45.1⁺ Zellen in B6 (CD45.2⁺) Empfänger transferriert. Nach 16h wurden die Milzen der Empfängermäuse entnommen und Durchflusszytometrische Analysen der Zielzellen durchgeführt. Die spezifische Zytotoxizität der Zielzellen wurde mit folgender Gleichung berechnet: % spezifische Lyse = (1 - Verhältnis ungeprimte / Verhältnis geprimte)*100 = (% CFSE low / % CFSE high) (144). Das OVA Klasse I Peptid (SIINFEKL) und MCMV spezifische Peptide *m139* (TVYGFCLL), *ie3* (RALEYKNL), *M57* (SCLEFWQRV) und *M45* (HGIRNASFI) (92) wurden von Metabion, Germany bezogen und nach Herstellerangaben verdünnt und aufbewahrt.

3.5.6. Adoptiver Transfer und Durchflusszytometrische Analyse

OVA spezifische CD8⁺ T Zellen wurden aus Milz und cervicalen, axillaren, brachialen und inguinalen Lymphknoten OT-I TCR transgener, auf kongene CD45.1⁺ zurückgekreuzte Mäuse gewonnen. OT-I Zellen wurden mittels negativer Selektion unter Verwendung des CD8 α +T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) aufgereinigt. 3×10^5 transgene T Zellen wurden B6 Empfängermäusen einen Tag vor der i.p. Infektion mit 10^5 TCID₅₀ MCMV i.v. injiziert. Um die Expansion der transferierten OT-I T Zellen zu verfolgen, wurden 100 μ l Blut 3, 6 und 8 Tage nach Infektion genommen, Erythrozyten wurden lysiert (PharmLyse, BD Biosciences, Heidelberg, Germany) und verbleibende Zellen wurden mit PE-TexasRed gekoppeltem α -CD8 α (5H10; Caltag, Sacramento, CA, USA) und PE gekoppeltem α -CD45.1 Antikörper (A20; BD Biosciences Pharmingen) inkubiert. Durchflusszytometrische Analysen wurden unter Verwendung eines Epics XL-MCL (Beckman-Coulter) Durchflusszytometers durchgeführt und mittels FlowJo Software (Tristar, Ashland, OR, USA) analysiert.

OVA spezifische CD4⁺ T Zellen wurden aus Milz und cervicalen, axillaren, brachialen und inguinalen Lymphknoten von OT-II TCR transgenen Mäusen zurückgekreuzt mit congenen CD90.1⁺ Mäusen isoliert. Nach Lyse von Erythrozyten wurden 3×10^5 transgene T Zellen einen Tag vor Infektion mit 10^5 TCID₅₀ MCMV i.v. in Empfängermäuse injiziert. Milzen wurden entnommen Milzzellen wurden mit Fc block (2.4G2; BD Biosciences) inkubiert und anschließend mit PE konjugiertem α -CD90.1 (HIS51; eBioscience) und PE-Cy5.5 gekoppeltem α -CD4 (RM 4-5; eBioscience) gefärbt. Durchflusszytometrische Analyse wurden unter Verwendung eines

FACS Calibur (BD Biosciences) durchgeführt und Daten wurden unter Verwendung von FlowJo Software analysiert.

3.5.7. Quantifizierung viraler Genome in Organ-Homogenaten

Lungen wurden Mäusen zwölf Monate nach Infektion entnommen. Organe wurden homogenisiert und DNA wurde unter Verwendung des DNeasy Blood & Tissue Kit von Qiagen (Hilden, Germany) extrahiert. Die Elution wurde mit 100 µl des Elutionspuffers vorgenommen und die genomische DNA Konzentration jeder Probe wurde in Duplikaten mittels eines NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spektrophotometer quantifiziert. Um die virale DNA zu quantifizieren wurde eine realtime PCR spezifisch für das MCMV *M54* Gen unter Verwendung einer spezifischen Taqman-Probe (5'-FAM-AACGTACATCGCTCTCTGCTGGCCG-TAMRA-3') und dem Taqman 1000 RXN PCR Core Reagents Kit auf einem ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) durchgeführt (145). Um die Kopien viraler Genome zu berechnen wurde eine Standard Kurve des BAC Plasmides pSM3fr, das ein *M54* Gen enthält generiert.

3.5.8. Statistische Analyse

Statistische Analysen wurden unter Verwendung der Software GraphPad Prism 4 (GraphPad Software La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Zum Wachstumsvergleich *in vitro* von Viren, Neutralisierenden Antikörper Assay, realtime PCR und T Zellproliferation wurde der Mittelwert mit Standardabweichung (SD) berechnet. In allen Zeichnungen, die die Viruslast in Organen oder *in vivo* Zytotoxizität zeigen, ist der Median angegeben. Der Vergleich der neutralisierenden Antikörper Antwort in mit MCMV-

wt oder MCMV- $\Delta M94$ vakzinierten Mäusen wurde mittels eines zwei-seitigen ANOVA Tests durchgeführt. Der Vergleich des prozentualen Anteils der T Zellproliferation und die Quantifizierung des Virus in Organen oder viraler Genome wurde mittels zwei-seitigem Wilcoxon Rangsummentest durchgeführt (<http://elegans.swmed.edu/~leon/stats/utest.cgi>). Sterne geben unterschiedliche statistische Signifikanzen an (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

4 ERGEBNISSE

4.1 MCMV- Δ M94 setzt keine Nachkommenschaft frei

Das Virionprotein pUL94 ist essentiell für die Morphogenese von HCMV (127). Es wird zu einem späten Zeitpunkt (late) der Infektion exprimiert (126). Das von *M94* kodierte Protein pM94 ist das Homolog von pUL94 in MCMV und Ergebnisse unserer Gruppe weisen darauf hin, dass pM94 eine entscheidende und essentielle Rolle in einem postnukleären Schritt der Virusreifung spielt (Maninger et al, Manuskript in Vorbereitung). Um das essentielle *M94* Genprodukt für die Rekonstitution einer entsprechenden Deletionsmutante zu trans-komplementieren, wurde die von der NIH/3T3 Fibroblastenzelllinie abstammende komplementierende Zelllinie NT/M94-7 hergestellt, die das *M94* Gen unter Kontrolle des TRE (Tetracycline-Responsive Element) Promotors exprimiert. Der TRE Promotor ist nur in Gegenwart des Tetrazyklin-Transaktivators (tTA) aktiv. Um tTA für die Induktion der Transkomplementation von pM94 bereitzustellen, wurde die tTA exprimierende Kasette in das BAC Genom pSM3fr eingefügt und hierbei das für *M94* kodierende Gen ersetzt (pSM3fr- Δ M94). Das hieraus resultierende Virus MCMV- Δ M94 wurde nach Transfektion in trans-komplementierenden NT/M94-7 Zellen rekonstituiert (Abb. 4.1).

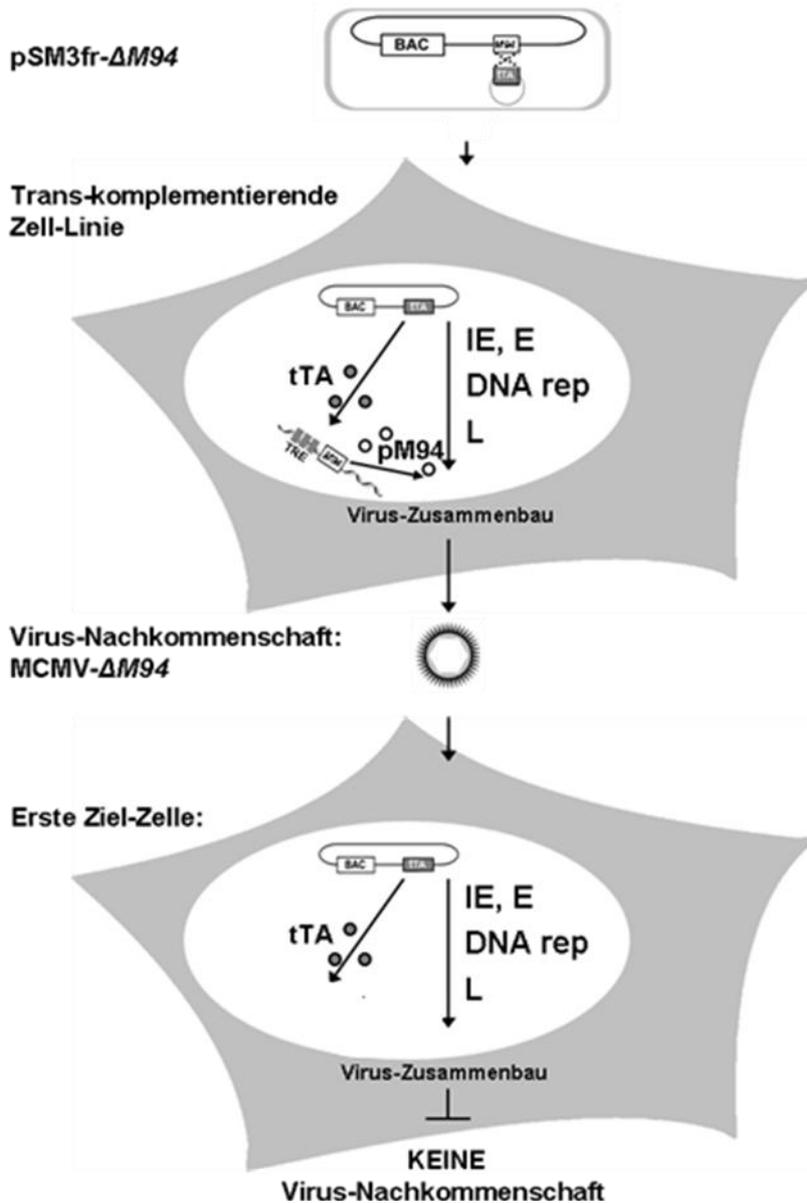


Abb. 4.1 Das Konzept induzierbarer Trans-Komplementation

Die trans-komplementierende Zelllinie NT/M94-7 exprimiert pM94 unter Kontrolle des tet induzierbaren Promotors. Nach Transfektion mit pSM3fr- $\Delta M94$ induziert die Expression des tTA vom viralen Genom, die Expression von pM94 durch die Zelle. Dies führt zur Produktion von trans-komplementiertem MCMV- $\Delta M94$. Dieses Virus kann nicht-komplementierende Zellen infizieren, durch das Fehlen des essentiellen Gens *M94* jedoch, wird das Freisetzen infektiöser Viruspartikel unmöglich. IE, E, L: Expression von viralen immediate early, early und late Genen; DNA rep: virale DNA Replikation

Wachstumskurven wurden durchgeführt, um die Essentialität von *M94* zu prüfen und die virale Replikation von MCMV- $\Delta M94$ und MCMV-*wt* auf der komplementierenden Zelllinie zu vergleichen. Hierzu wurden NT/M94-7 Zellen, sowie parentale NIH/3T3 Fibroblasten mit MCMV- $\Delta M94$ oder MCMV-*wt* infiziert. Während MCMV- $\Delta M94$ auf NT/M94-7 Zellen zu MCMV-*wt* ähnlichem Titer repliziert (Abb. 4.2A), war im Überstand von NIH/3T3 Zellen kein infektiöses Virus detektierbar (Abb. 4.2B).

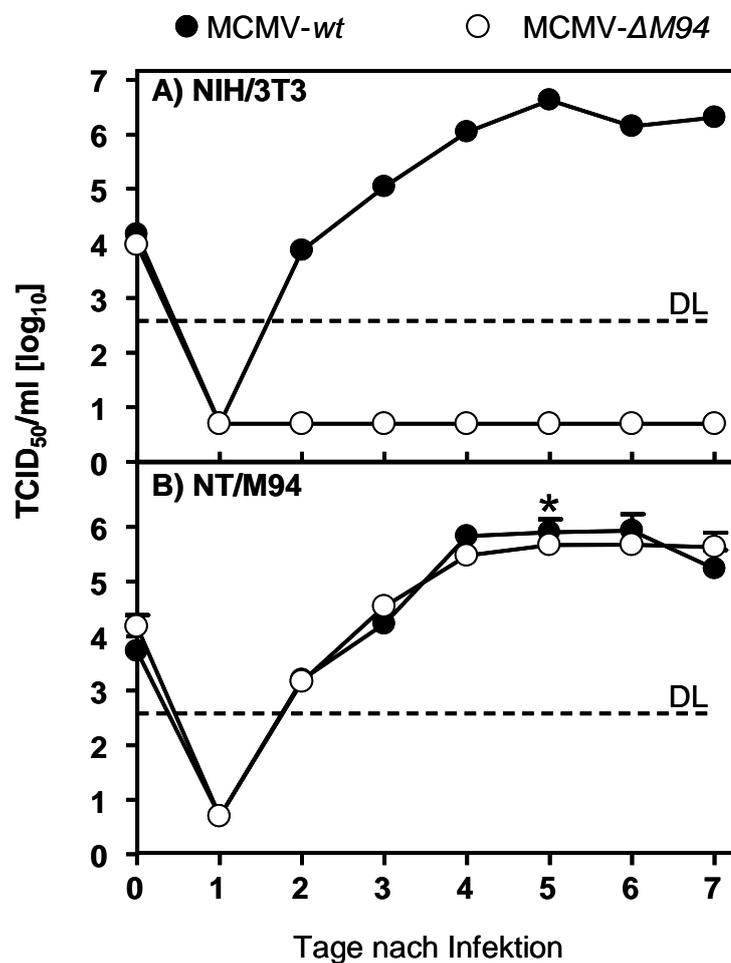


Abb. 4.2 MCMV- $\Delta M94$ ist defekt und die Virusvermehrung ist abhängig von der Trans-Komplementation des pM94

Parentale NIH/3T3 (A) Zellen und trans-komplementierende NT/M94-7 Fibroblasten (B) wurden mit 0.1 TCID₅₀/Zelle MCMV-*wt* (schwarze Symbole) oder MCMV- $\Delta M94$ (weiße Symbole) infiziert. An den angegebenen Tagen (Tage nach Infektion) wurde infektiöses Virus im Überstand auf NT/M94-7 Zellen durch Endpunkttitration quantifiziert. Am Tag 5 nach Infektion (*) wurden Überstände zusätzlich auf embryonalen Mausfibroblasten (MEF) getestet. Hierbei konnte in 1 ml getestetem Überstand von MCMV- $\Delta M94$ keine produktive Infektion nachgewiesen werden.

Das Fehlen infektiöser Viruspartikel von MCMV- $\Delta M94$ im Überstand schließt die Zell-assoziierte Virusausbreitung nicht aus. Deshalb wurde ein verbreitungsdefizientes $\Delta M94$ Virus konstruiert, das das enhanced green fluorescent protein EGFP (MCMV- $\Delta m157$ -*rec-egfp*- $\Delta M94$) exprimiert. Dieses Virus macht die Virusverbreitung *in vitro* auf verschiedenen Zelllinien sichtbar. Während das verbreitungsdefiziente MCMV- $\Delta m157$ -*rec-egfp*- $\Delta M94$ sich mit ähnlicher Kinetik wie MCMV- $\Delta m157$ -*rec-egfp* auf komplementierenden NT/M94-7 Zellen ausbreitet (Abb. 4.3), blieb die Infektion mit MCMV- $\Delta m157$ -*rec-egfp*- $\Delta M94$ strikt auf die erstinfizierten NIH/3T3 Zellen begrenzt. Endothelzellen sind ein produktiv infizierbarer Zielzelltyp *in vivo*. Es zeigte sich, dass der Ausbreitungsblock auch für die Infektion der Maus-Herz-Endothelzelllinie (engl. myocardium-derived endothelial cells) MHEC5-T gilt.

Zusammenfassend konnte hierdurch gezeigt werden, dass *M94* essentiell für die Virusvermehrung von MCMV ist und Deletion des Gens Virusfreisetzung sowie Zell-assoziierte Verbreitung unterbindet. Zusätzlich kann durch Trans-komplementation verbreitungsdefizientes MCMV- $\Delta M94$ effizient produziert und in weiteren Experimenten eingesetzt werden.

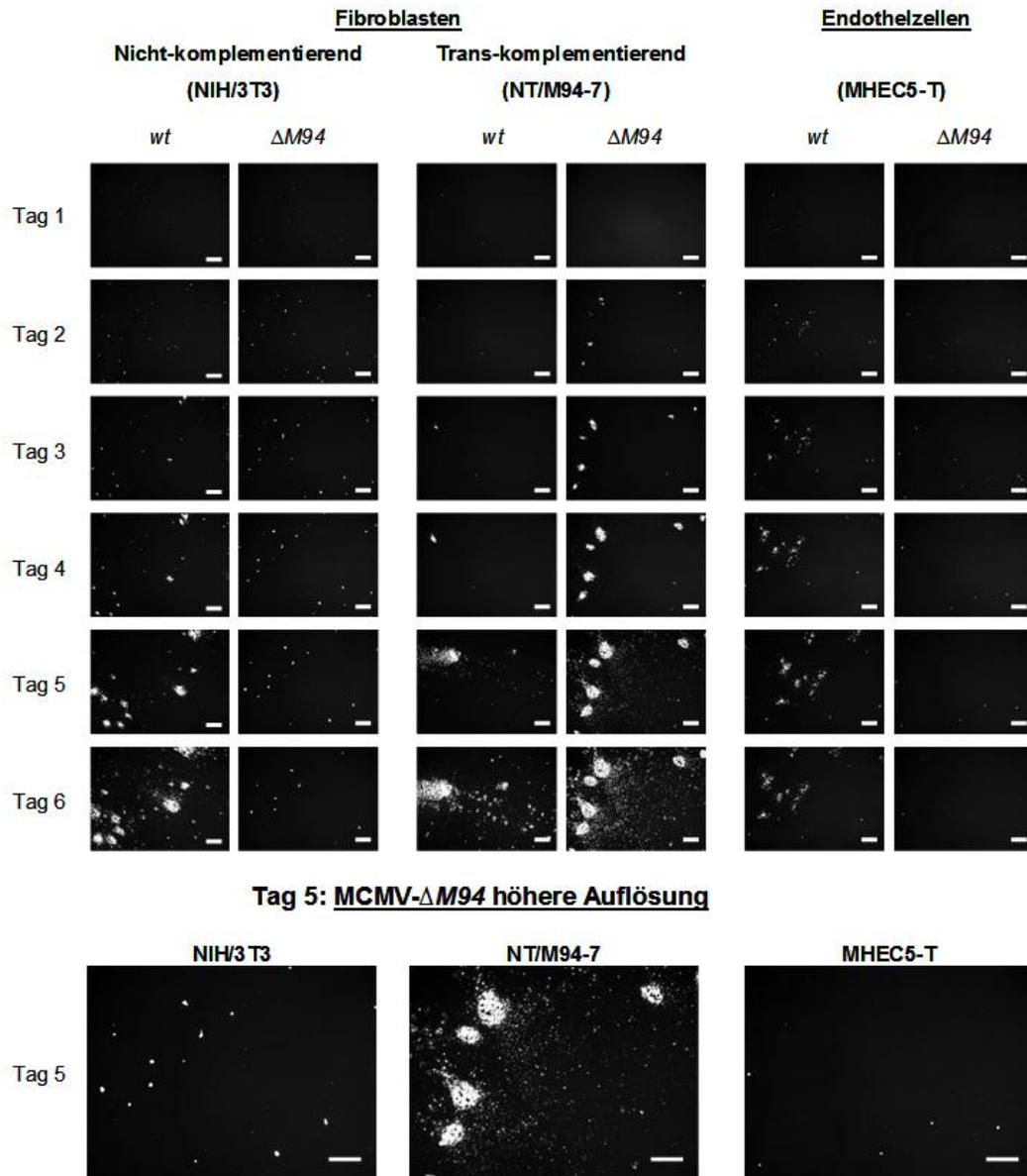


Abb. 4.3 MCMV- $\Delta M94$ kann sich nicht Zell-assoziiert verbreiten
 Parentale NIH/3T3 Zellen (links), trans-komplementierende NT/M94-7 Fibroblasten (Mitte) und Maus Herz Endothelzellen (MHEC) (rechts) wurden mit 0.1 TCID₅₀/Zelle MCMV- $\Delta m157$ -rec-egfp (*wt*) oder MCMV- $\Delta m157$ -rec-egfp- $\Delta M94$ ($\Delta M94$) infiziert. An den angegebenen Zeitpunkten wurde die EGFP exprimierenden Zellen dokumentiert. (Scale Bar entspricht 100 μ m)

4.2 Die DNA Replikation des MCMV- $\Delta M94$ verläuft intakt

Die Stimulation des Immunsystems soll jedoch nicht allein auf der Verabreichung von viralen Partikeln beruhen, sondern vielmehr soll MCMV- $\Delta M94$ die primäre Zielzelle infizieren, die virale DNA Replikation soll stattfinden und die wesentlichen viralen Antigene deren Expression erst nach DNA Replikation beginnt sollten exprimiert werden. Die Infektion von Fibroblasten und Endothelzellen mit MCMV- $\Delta m157$ -rec-egfp- $\Delta M94$ und die Expression des EGFP (unter Kontrolle des humanen immediate early Promotors) konnten bereits *in vitro* nachgewiesen werden. Durch die Deletion des spät exprimierten viralen *M94* Gens, sollte die virale DNA Replikation unbeeinträchtigt bleiben, da pM94 erst nach dem Ablauf der viralen DNA Replikation exprimiert wird. Um dies zu bestätigen wurde die virale Genomlast nach Infektion mittels quantitativer realtime-PCR bestimmt (Abb. 4.4).

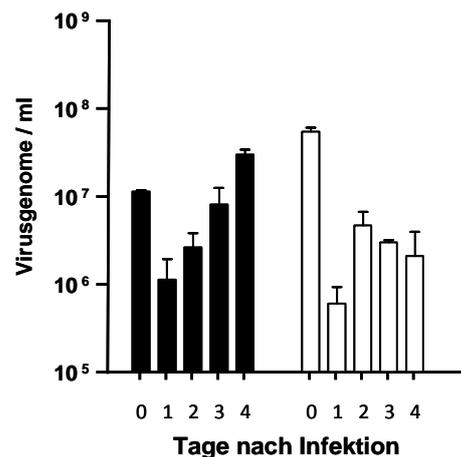


Abb. 4.4 Quantifizierung der viralen Genome von MCMV- $\Delta M94$

Parentale NIH/3T3 Zellen wurden mit 0.1 TCID₅₀/Zelle MCMV-*wt* (schwarze Symbole) oder MCMV- $\Delta M94$ (weiße Symbole) infiziert. An den angegebenen Tagen wurde die absolute Kopienzahl des viralen Gens *M54* mittels realtime-PCR quantifiziert (Virusgenome). Hier dargestellt ist die absolute Kopienzahl in 1 ml Überstand der Zellkultur an den angegebenen Zeitpunkten.

Die Quantifizierung der viralen DNA Kopien des MCMV-*wt* zeigt deutlich, dass nach Auswaschen überschüssiger Virionen die Anzahl der viralen Genkopien beginnend mit dem zweiten Tag nach Infektion (Abb. 4.4) kontinuierlich ansteigt. Die Infektion mit MCMV- $\Delta M94$ verläuft hierzu zu Beginn ähnlich; In der ersten infizierten Zelle wird die virale DNA repliziert. Im Anschluss kann MCMV- $\Delta M94$ sich aber in der Zellkultur nicht ausbreiten und die weitere Zunahme der viralen Genome wie bei MCMV-*wt* unterbleibt.

4.3 Die Impfung mit MCMV- Δ M94 ist sicher und eine Reversion des Impfvirus zu verbreitungskompetenten Viren unterbleibt

Ein Risiko bei der Verwendung attenuierter Lebendimpfstoffe ist die Möglichkeit der Reversion der Vakzine zu replikationskompetenten Viren; bereits während der Replikation *in vitro* (146) zum Wildtyp im Patienten *in vivo* (97). Um die Aufnahme des M94 Gens durch homologe Rekombination vom Virusgenom des MCMV- Δ M94 mit der komplementierenden Zelllinie auszuschließen, wurden während der Viruskonstruktion Genomhomologien in den flankierenden Bereichen vermieden. Nun wurde *in vitro* produziertes Virus vor der Verwendung *in vivo* auf nicht komplementierenden Zelllinien getestet. Dabei wurde in keiner Präparation verbreitungskompetentes Virus, als Resultat von Rekombinationen zwischen Mutante und M94 Gensequenzen in NT/M94-7 beobachtet.

Um nachzuweisen, ob MCMV- Δ M94 *in vivo* zu verbreitungskompetentem MCMV revertieren kann, wurden C57BL/6 Mäuse mit 10^5 TCID₅₀ MCMV- Δ M94 oder MCMV-*wt* i.p. infiziert (Abb.4.5A). Anschließend wurden an den angegebenen Tagen nach Infektion Organe entnommen und die Viruslast mittels Standard-Plaque-Assay auf MEF ermittelt. In keinem der getesteten Organe konnte hierbei verbreitungskompetentes Virus nachgewiesen werden, wenn MCMV- Δ M94 appliziert wurde. In Mäusen, die hingegen MCMV-*wt* erhalten haben, konnte Virus mit bekannter Kinetik nachgewiesen werden (133).

Zusätzlich wurde in denselben Mäusen die Replikation der viralen DNA im Verhältnis zu Kopien zellulärer DNA quantifiziert (Abb. 4.5B). Auch *in vivo* wurde nach Infektion der primären Zielzellen

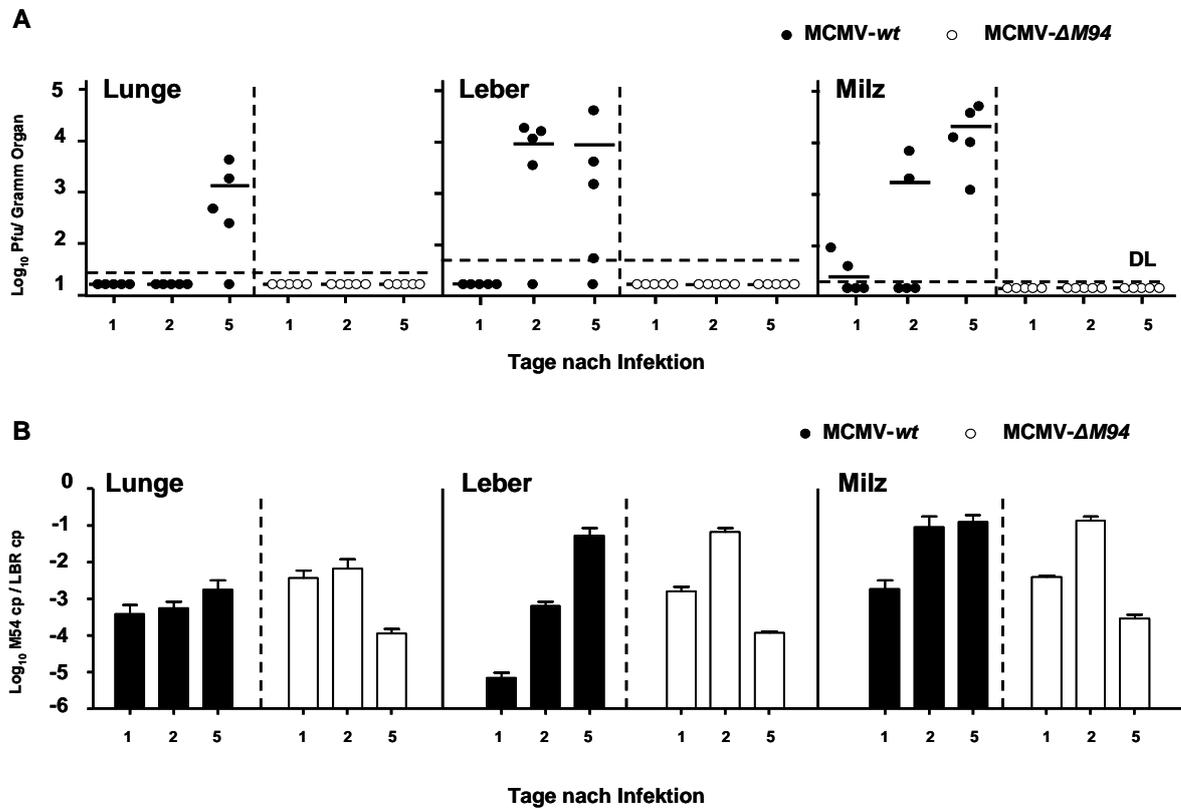


Abb.4.5 MCMV- Δ M94 revertiert *in vivo* nicht zu verbreitungskompetentem Virus

C57BL/6 Mäuse wurden mit 10^5 TCID₅₀ i.p. infiziert und an den angegebenen Tagen wurden Organe entnommen. Die zur Infektion verwendete Dosis wurde gemäß der hierin unter 3.4.5 „Virustiterbestimmung mit TCID₅₀“ durchgeführten Titrationmethode zur Titerbestimmung bestimmt (engl. „Tissue Culture Median Infectious Dose“). Anschließend wurde die (A) Viruslast mittels Standard Plaque Assay auf Mausembryo-Fibroblaste, MEF, wie hierin beschrieben unter 3.4.4. „Virus-Titerbestimmung durch Standard Plaque Assay“, sowie (B) die Kopienzahl der viralen DNA mittels realtime PCR quantifiziert. Pfu=plaque forming units; cp=Kopien; LBR=Lamin-B Rezeptor als zelluläres Vergleichsgen; M54=Gen der viralen Polymerase zur Bestimmung der Kopienzahl viraler Genome; Die gestrichelte Linie gibt das Detektionslimit im Standard Plaque Assay an. Der zugehörige Titer wurde unter der Annahme ermittelt, dass ein einziger Plaque in der jeweiligen getesteten niedrigsten Verdünnung gefunden worden wäre.

mit MCMV- $\Delta M94$ die virale DNA repliziert (vergl. Tag 1 mit Tag 2). Im Vergleich zur Infektion mit MCMV-*wt* verringert sich anschließend die Zahl der Genomkopien von MCMV- $\Delta M94$. Dies kann mehrere Ursachen haben. Durch fehlende Ausbreitung des Virus zu Nachbarzellen wird die Initiation neuer Replikationszyklen in neuen Zellen unterbunden. Sowohl das Zugrundegehen der Zellen aufgrund der Virusinfektion, ferner die Eliminierung infizierter Zellen durch Effekormechanismen der antiviralen Immunantwort könnten zum Ergebnis beitragen.

Um die Impfsicherheit von MCMV- $\Delta M94$ *in vivo* in einem sensitiven Maus-Modell zu untersuchen, wurden IFN $\alpha\beta$ R^{-/-} Mäuse mit MCMV-*wt* oder MCMV- $\Delta M94$ infiziert. IFN $\alpha\beta$ R^{-/-} Mäuse sind um mehr als 1000-fach anfälliger gegen MCMV Infektion als parentale Mausstämme (147).

Während alle 129 IFN $\alpha\beta$ R^{-/-} Mäuse (Abb. 4.6A), die mit MCMV-*wt* infiziert wurden innerhalb von 14 Tagen der Infektion erlagen, überlebten alle Tiere, die mit MCMV- $\Delta M94$ infiziert wurden und zeigten keinen oder nur minimalen Gewichtsverlust. (Abb. 4.6B). Insgesamt konnte MCMV- $\Delta M94$ ohne das Auftreten von Reversionen produziert und immungeschächte Mäuse infiziert werden, wobei die Infektion im Tier ohne merkliche Symptome verlief.

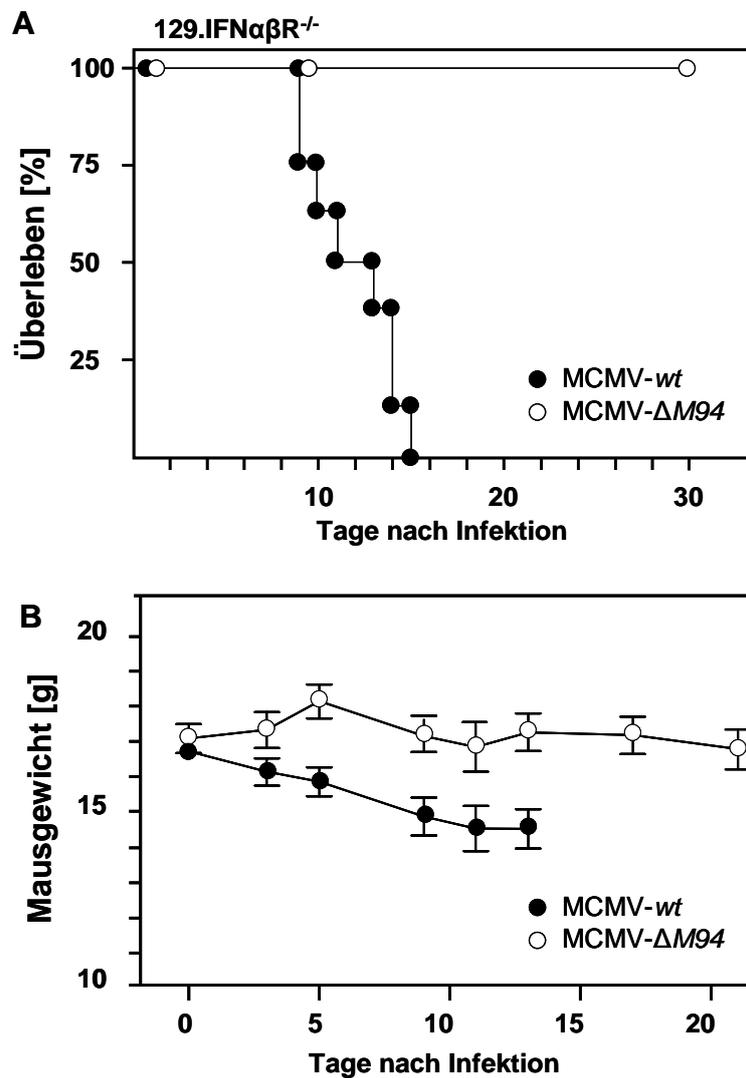


Abb. 4.6 Infektion mit MCMV- Δ M94 verläuft für immungeschwächte Mäuse ohne Nachweis von Symptomen

Immungeschwächte 129.IFN $\alpha\beta$ R^{-/-} Mäuse (n=15 für MCMV- Δ M94, weiße Symbole; n=8 für MCMV-wt, schwarze Symbole) wurden mit 2.5×10^5 TCID₅₀ i.p. infiziert und ihr Überleben (A) wurde für 28 Tage nach Infektion verfolgt. (B) An den angegebenen Zeitpunkten wurde der Gewichtsverlauf der Mäuse dokumentiert. days p.i. = Tage nach Infektion

4.4 MCMV- Δ M94 induziert neutralisierende Antikörper

Mangelhafte Induktion von Antikörpern, die das Eindringen des Virus in die Zelle verhindern, stellt ein Hauptproblem ineffektiver Immunantwort gegen HCMV dar (87). Die Durchführung eines Virus-Neutralisierungs-Assays mit Seren von immunisierten Mäusen erlaubt den Vergleich der Antikörperantwort gegen MCMV-*wt* und MCMV- Δ M94. Hierzu wurden serielle Verdünnungen von Seren aus C57BL/6 Mäusen, 12 Wochen nach Immunisierung mit MCMV- Δ M94 oder MCMV-*wt*, mit einem Luciferase exprimierenden MCMV (MCMV-*luc*) inkubiert. Nach anschließender Inkubation von MEF Zellen dient die Reduktion des gemessenen Luciferase-Signals als Maß der Kapazität des Antiserums zur Neutralisierung infektiöser Viruspartikel *in vitro*. Hierbei korreliert die Höhe des Luciferase-Signals mit der Anzahl infizierter Zellen. Interessanterweise induzierte MCMV- Δ M94 eine Antikörperantwort mit einer neutralisierenden Kapazität vergleichbar zur Infektion mit MCMV-*wt* (Abb. 4.7). Eine zweite Applikation gleicher Dosis 14 Tage später konnte die neutralisierende Kapazität nicht signifikant erhöhen (Abb. 4.7A). Bei Immunisierung mit UV bestrahltem MCMV ergaben sich lediglich deutlich niedrigere bzw. keine neutralisierenden Antikörper (Abb. 4.7B). Dies bestätigt bereits publizierte Daten (109,148).

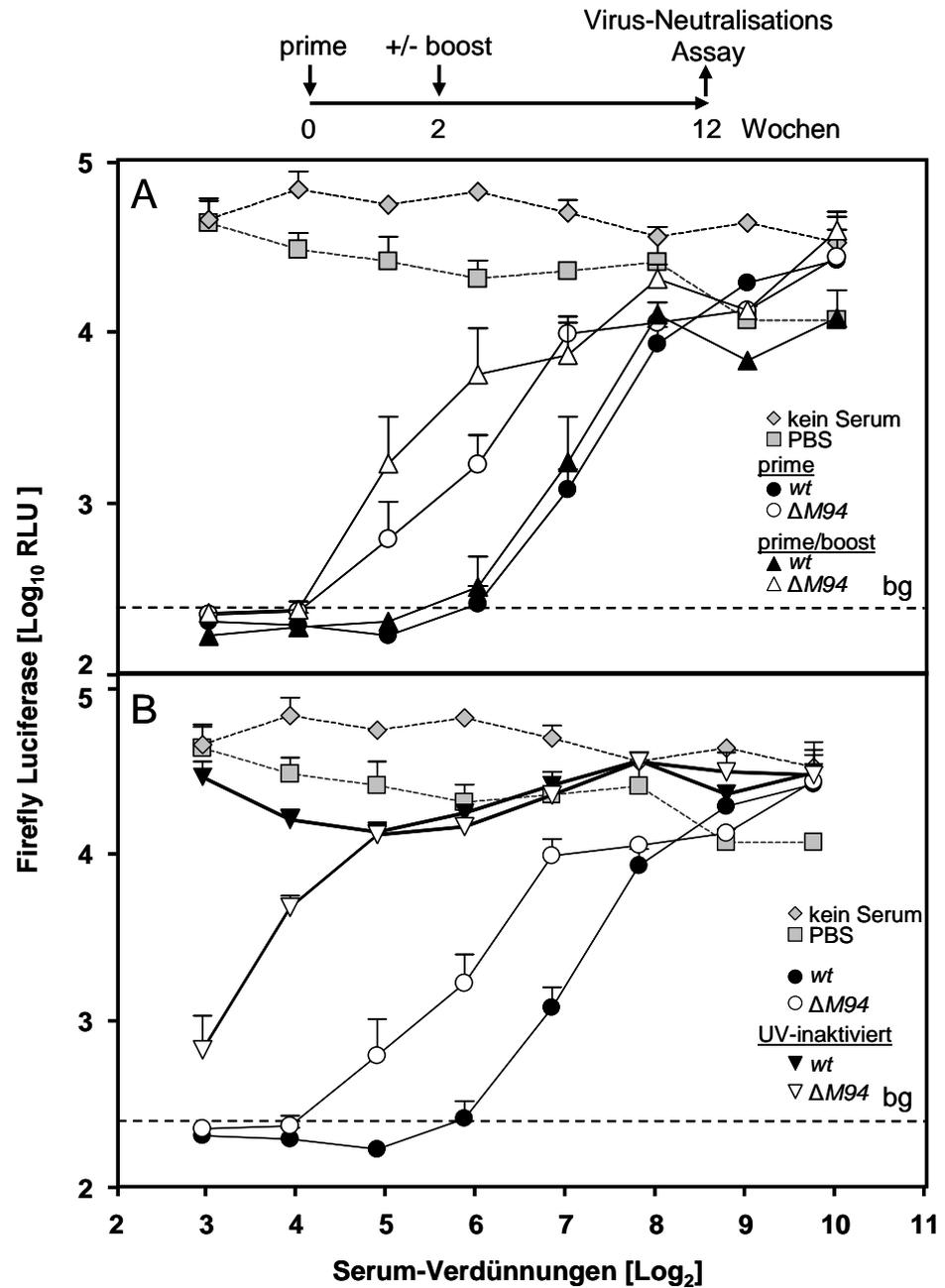


Abb. 4.7 MCMV-ΔM94 induziert eine neutralisierende Antikörper Antwort, vergleichbar mit MCMV-wt

C57BL/6 Mäusen wurde 105 TCID₅₀ MCMV-wt (schwarze Symbole), MCMV-ΔM94 (weiße Symbole) oder PBS (graue Quadrate) i.p. injiziert. Blut wurde 12 Wochen nach Infektion gewonnen und die Virus neutralisierende Kapazität des Serums wurde durch Inkubation mit MCMV-luc und anschließender Infektion von NIH/3T3 Zellen bestimmt. Neutralisation von MCMV-luc führt zu einem geringeren Signal der Luciferase Expression. Als Negativ-Kontrolle wurde MCMV-luc ohne Serum zur Infektion verwendet (graue Rauten). (A) Optional wurde Mäusen 14 Tage nach Erst-Injektion (prime) eine zweite Dosis (boost) Impfvirus appliziert (Pfeilspitzen nach oben). (B) Um die stimulatorische Kapazität von inaktiviertem Virus zu testen, wurden die Impfviren vor Applikation mit UV-Licht inaktiviert (MCMV-wt: schwarze Pfeilspitzen nach unten; MCMV-ΔM94: weiße Pfeilspitzen nach unten). Die angegebenen Werte repräsentieren den Mittelwert + SD der gemessenen Serumpools. RLU = Relative Luciferase Units, bg = Hintergrund

4.5 Inaktivierung von MCMV mittels Bestrahlung mit UV-Licht

Ohne Adjuvantien stellen inaktivierte Viruspräparationen von CMV kein geeignetes Vakzine-Konzept dar. Bereits in der Antikörperantwort (Abb. 4.7 B) kann eine gegenüber replikationsfähigem Virus verminderte Immunstimulation nachgewiesen werden. Der Inaktivierung des Virus mit UV Licht liegt die Schädigung der viralen DNA zu Grunde. So unterbleibt DNA Replikation und Protein-Neusynthese. Die gemessene Antikörperantwort richtet sich bei inaktivierten Präparationen gegen strukturelle Proteine. Bei UV behandelten Präparationen unterbleibt die virale Genexpression. Nach Infektion mit MCMV- $\Delta M94$ hingegen, sollten alle viralen Proteine exprimiert werden.

Um die zur Unterbindung der viralen Genexpression notwendige Dosis UV Licht zu bestimmen, wurde MCMV- $\Delta m157$ -rec-*egfp*, weil die EGFP Genexpression in der Zellkultur leicht zu verfolgen ist, mit verschiedenen Dosen UV Licht behandelt und anschließend Infektiosität und Genexpression mittels Titration auf MEF Zellen getestet (Abb. 4.8). Die Dosis von 1,5 kJ/cm² war ausreichend, Genexpression und Virusvermehrung von MCMV- $\Delta m157$ -rec-*egfp* zu unterbinden. Vier Tage nach Infektion konnte keine EGFP Expression nachgewiesen werden. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle konnte damit die virale Infektiosität um mindestens Faktor $2,4 \times 10^7$ vermindert werden. Für die Applikation von UV inaktiviertem Virus *in vivo* wurden deshalb entsprechende Viruspräparationen mit 1.5 kJ/cm² UV Licht inaktiviert.

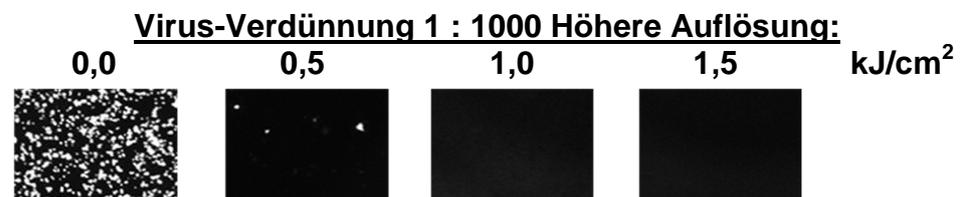
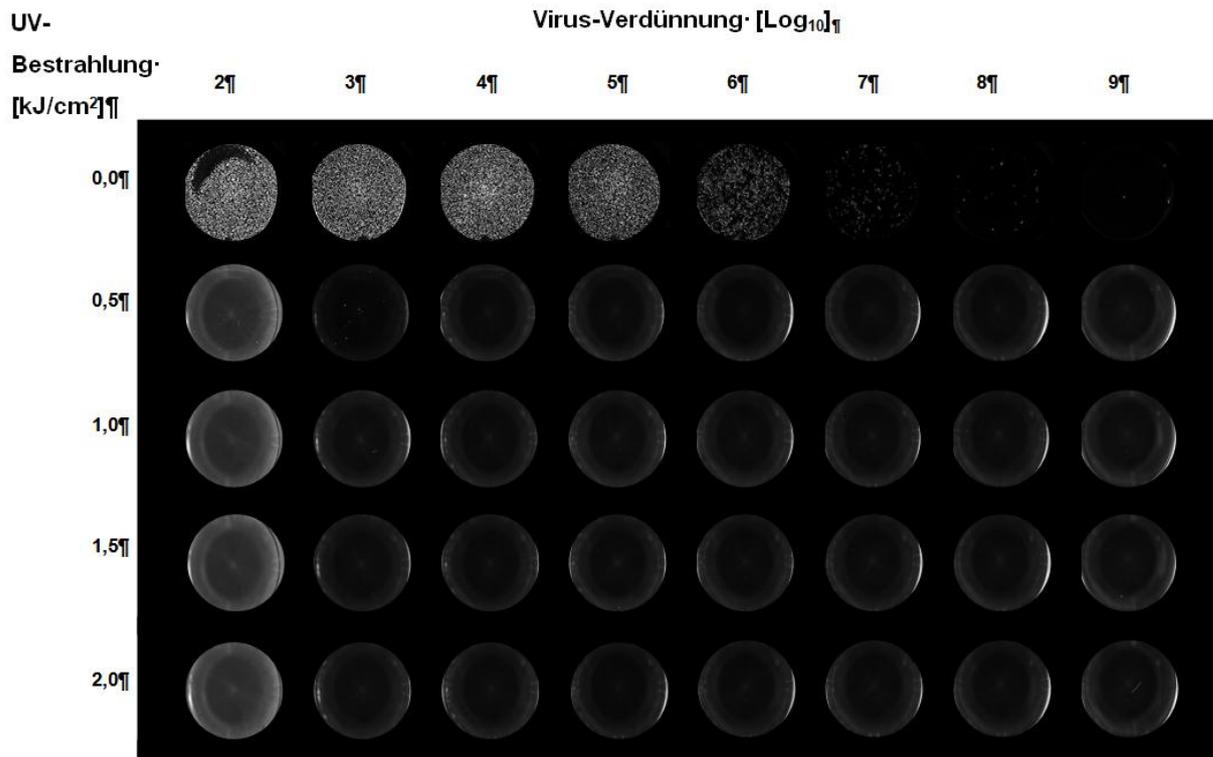


Abb. 4.8 Inaktivierung von MCMV mittels UV Licht

MCMV- $\Delta m157$ -rec-egfp wurde in einem UV-Crosslinker in einem Abstand von 5 cm und auf Eis verschiedenen Dosen (0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 kJ/cm²) UV Licht ausgesetzt. Anschließend wurde das Virus in 1:10 Verdünnungsstufen auf MEF titriert und 4 Tage nach Infektion die Expression des EGFP dokumentiert. Die Expression von EGFP wurde in einzelnen infizierten Zellen nachgewiesen, wenn MCMV- $\Delta m157$ -rec-egfp einer geringen Dosis (0.5 kJ/cm²) UV Licht ausgesetzt war. Nach Bestrahlung mit hoher Dosis UV Licht (ab 1.5 kJ/cm²) konnte keine EGFP Expression detektiert werden. Unbestrahltes MCMV- $\Delta m157$ -rec-egfp (0.0 kJ/cm²) bildete EGFP⁺ Plaques.

4.6 MCMV- Δ M94 induziert eine starke T Zellantwort

Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Wirtsabwehr gegen CMV. Antivirale CD8⁺ T Zellen tragen effektiv zur Immunkontrolle der akuten MCMV Infektion bei und vermitteln Schutz nach Immunisierung (83). Für die Kontrolle der persistierenden CMV Infektion werden zusätzlich CD4⁺ T Helferzellen benötigt (85). Um nach Infektionen mit MCMV-*wt* oder MCMV- Δ M94 die induzierten CD4⁺ und CD8⁺ T Zellantworten zu vergleichen, wurde Ovalbumin (OVA) als Modellantigen gewählt und MCMV-*ova* sowie MCMV-*ova*- Δ M94 konstruiert. OVA ist ein immunologisch hervorragend charakterisiertes Modellantigen. Die von MHC-Komplexen präsentierten Epitope sind bekannt, T-Zell-Rezeptor-transgene Mauslinien, geeignete Antikörper oder Pentamere stehen zur Verfügung und erlauben durch Verwendung adoptiver Transfers sensitive quantitative Analysen der T-Zell Antwort. In MCMV-*ova* infizierten C57BL/6 Mäusen, denen zuvor adoptiv OVA spezifische CD4⁺ oder CD8⁺ T Zellen transferiert wurden, erreicht die Expansion der OVA spezifischen CD4⁺ bzw. CD8⁺ T Zellen übereinstimmend mit publizierten Daten ihr Maximum 6 Tage nach Infektion (149). Das verbreitungsdefiziente MCMV-*ova*- Δ M94 stimulierte die Proliferation der OVA spezifischen CD8⁺ (Abb. 4.9A) und CD4⁺ (Abb. 4.9B) T Zellen ähnlich stark wie Wildtyp MCMV-*ova*.

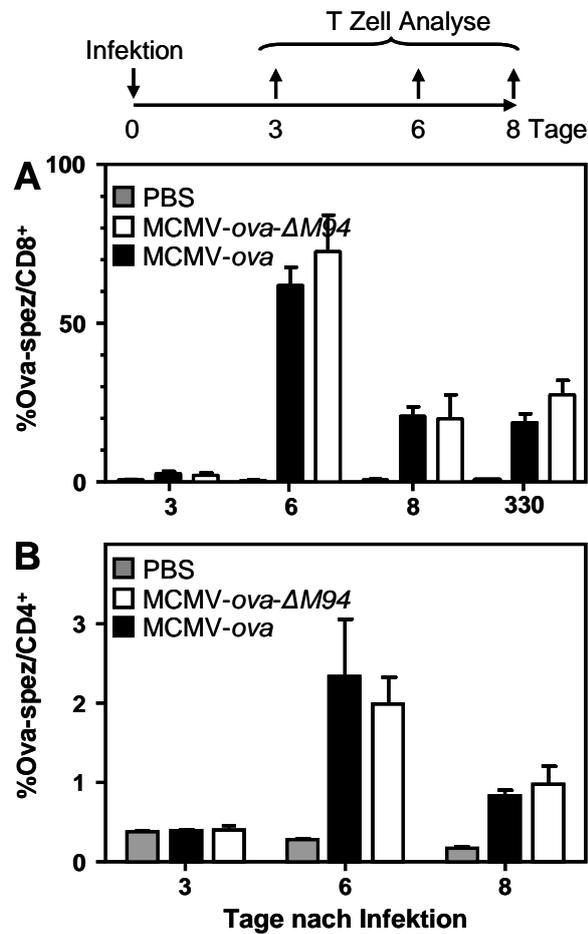


Abb.: 4.9 MCMV-ova-ΔM94 induziert die Expansion adoptiv transferierter OVA spezifischer T Zellen

(A) Nach adoptivem Transfer von 3×10^5 OT-I CD8⁺ T Zellen (CD45.1⁺) wurden C57BL/6 Mäuse (CD45.2⁺) (n=5) i.p. 10^5 TCID₅₀ MCMV-ova (M-ova; schwarze Balken), MCMV-ova-ΔM94 (M-ova-ΔM94; weiße Balken) oder PBS (graue Balken) injiziert. 3, 6, 8 und 330 Tage nach Infektion wurde entnommenes Blut mittels Durchflußzytometrie der Marker CD45.1 und CD8 analysiert.

(B) Nach adoptivem Transfer von 3×10^5 OT-II CD4⁺ T cells, T Zellen wurden C57BL/6 Mäuse (n=5) i.p. wie in (A) infiziert. Nach 3, 6 und 8 Tagen nach Infektion wurden Splenozyten mittels Durchflußzytometrie der Marker CD90.1 and CD4 analysiert. In (A) und (B) ist der Mittelwert + SD dargestellt.

Um den Effekt hinsichtlich der Expression eines Modellantigens zu bestätigen, wurde auch die CD8⁺ T Zellantwort gegen MCMV Antigene untersucht. Hierzu wurden C57BL/6 Mäuse mit MCMV-ΔM94, MCMV-wt oder UV inaktiviertem MCMV-wt infiziert. Sechs Tage nach Infektion, dem Höhepunkt der relativen Anzahl

spezifischer CD8⁺ T Zellen wurden Ziel-Zellen mit MCMV-Peptiden abstammend von m139, m141, ie3, M57 und M45 (92), beladen, mit CFSE markiert und anschließend injiziert. Nach 14 Stunden wurde die Anzahl überlebender Zeller erfasst und deren Zytolyse analysiert (Abb. 4.10).

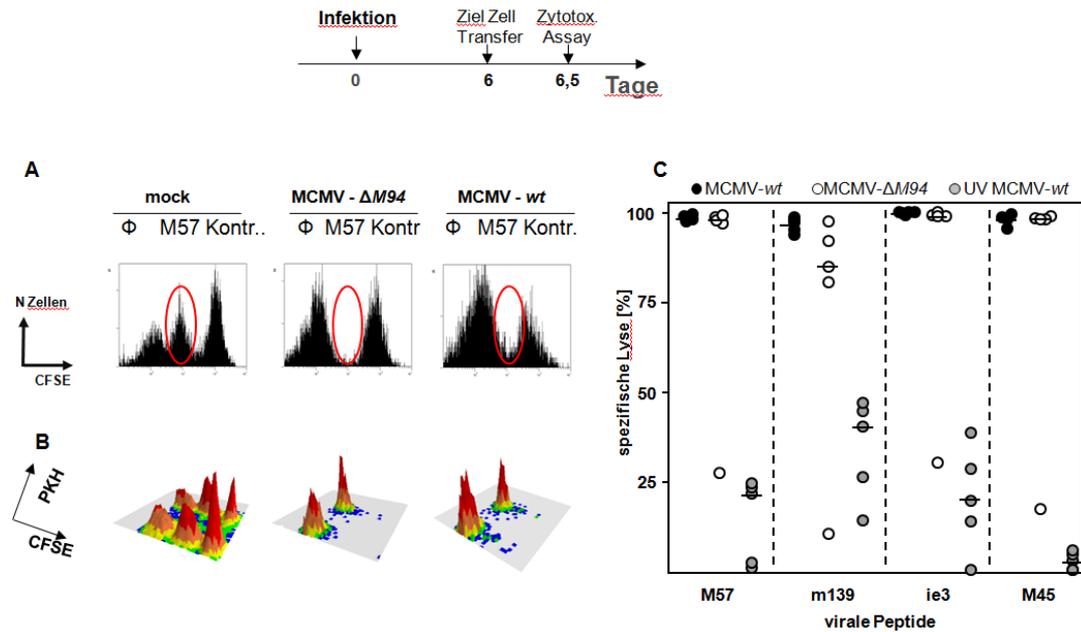


Abb.: 4.10 MCMV-*ova*-ΔM94 induziert zytotoxische CD8⁺ T Zellantwort gegen virale Peptide

C57BL/6 Mäusen wurden i.p. 10⁵ TCID₅₀ MCMV-*wt* (schwarze Symbole in C), MCMV-ΔM94 (weiße Symbole in C) oder UV inaktiviertes MCMV-*wt* (graue Symbole in C) injiziert. Sechs Tage nach Infektion wurde ein *in vivo* Zytotoxizitäts-Assay mit den angegebenen viralen Peptiden durchgeführt. Hierfür wurden Milzzellen nichtinfizierter Mäuse mit dem angegebenen Peptid beladen und mit unterschiedlichen Konzentrationen CFSE (A) oder CFSE und PKH21 (B) markiert. Die Eliminierung einer mit Peptid beladenen Zell-Population im Verhältnis zur nicht beladenen Kontrolle (Φ) zeigt an, dass durch Immunisierung stimulierte CD8⁺ T Zellen spezifisch die Peptid beladene Zelle erkannt und eliminiert haben (Zellpopulation in Ovalen). In A sind CFSE markierte Populationen in drei Einzeltieren dargestellt. In B oben finden sich exemplarisch Durchflusszytometrische Analysen von Mäusen, die mit zwei Farbstoffen markierte Milzzellen erhalten haben. Dieser sog. „dual-colour“ *in vivo* kill-Assay erlaubt die Analyse der zytotoxischen Aktivität der CD8⁺ T Zellen von insgesamt vier verschiedenen Peptiden in einzelnen Mäusen (C). Die Symbole (in C) repräsentieren die hieraus errechnete spezifische Lyse-Aktivität gegen die angegebenen Peptide in Einzeltieren. Der Querstrich stellt den Median der analysierten Gruppen dar.

Die von MCMV- $\Delta M94$ induzierte zytotoxische CD8⁺ T Zellantwort war mit der des MCMV-*wt* vergleichbar. Im Gegensatz hierzu konnte nach Injektion UV inaktivierten MCMV, ähnlich wie bei der Induktion der Antikörperantwort, keine oder nur wenig antivirale CD8⁺ T Zell vermittelte Zytotoxizität nachgewiesen werden. Zusammenfassend, ist die virale Genexpression für die Induktion einer effizienten adaptiven Immunantwort erforderlich. Das verbreitungsdefiziente MCMV induziert eine humorale und eine zelluläre Immunantwort, vergleichbar der MCMV-*wt* Infektion.

4.7 Der Beitrag der Infektion verschiedener Zelltypen zur antiviralen CD8⁺ T Zellantwort

Endothelzellen und Hepatozyten sind primäre Zielzellen, die *in vivo* von MCMV infiziert werden (133). Ob sie in vergleichbarer Weise zur Aktivierung der CD8⁺ T Zellen beitragen ist nicht bekannt. Um den Beitrag verschiedener infizierter Zelltypen zur Generierung einer effizienten CD8⁺ T Zellantwort zu untersuchen, wurde das Konzept der Verbreitungsdefizienz mit der konditionalen Aktivierung eines Markergens kombiniert (133). Hierzu wurde das verbreitungsdefiziente MCMV-*flox-ova-ΔM94* generiert (Abb. 4.11A), das Ovalbumin (OVA) nur nach Cre-vermittelter Rekombination exprimieren kann. In Mäusen, die Cre-Rekombinase selektiv in bestimmten Zelltypen exprimieren, wird in bestimmten (Cre-positiven) Zelltypen die Ovalbumin-Expression nach Infektion erzielt. Die Zelltyp-Spezifität der Cre-Expression in *cre*-transgenen Mäusen wird durch die Verwendung von Promotoren (Tie2-, Alb- oder CD11c-Promotor) gewährleistet, die nur in bestimmten Zelltypen aktiv sind. Die Verwendung von CD11c-*cre* Mäusen (zur Verfügung gestellt von Prof. I. Förster), die Cre unter Kontrolle des CD11c Promotors und damit vorwiegend in dendritischen Zellen exprimieren, erlaubt so die Untersuchung des Beitrages der professionellen Antigen präsentierenden Zellen zur CD8⁺ T Zell Antwort. Durch Infektion von Mäusen, die Cre-Rekombinase selektiv in vaskularen Endothelzellen (Tie2-*cre*) oder Hepatozyten (Alb-*cre*) exprimieren, kann der Beitrag auch dieser Zellen zur CD8⁺ T Zellantwort untersucht werden.

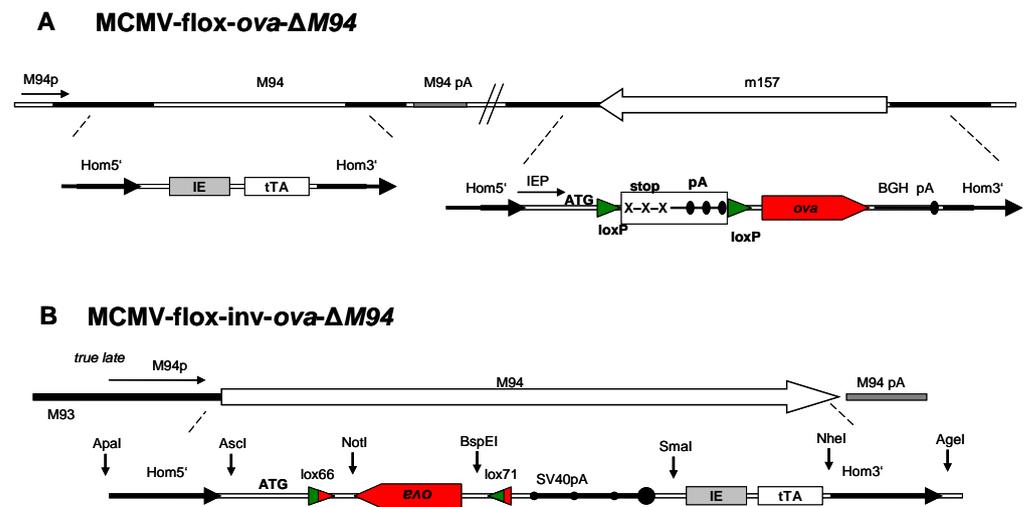


Abb.: 4.11 Konstruktion einer verbesserten flox-Ovalbumin Kasette

In A ist schematisch der Aufbau des MCMV-flox-*ova-ΔM94* dargestellt, in B der Aufbau des neuen, verbesserten Konstrukts von MCMV-flox-inv-*ova-ΔM94*. pA= poly Adenylierungssequenz; Hom=Homologie zur viralen Sequenz; IEP=humaner immediate early CMV Promotor; M94p= endogener viraler Promotor des M94;

Ein Tag nach adoptivem Transfer OVA spezifischer CD8⁺ T Zellen, wurden Mäuse mit 10⁵ TCID₅₀ verbreitungsdefizientem MCMV-flox-*ova-ΔM94* oder verbreitungskompetentem MCMV-flox-*ova* infiziert. Obwohl Hepatozyten die Hauptproduzenten von infektiösem Virus während der ersten Tage der Infektion darstellen und sehr effektiv das konditionale Markergen durch Cre-Rekombinase anschalten (133), konnte die selektive Induktion der OVA Expression in MCMV infizierten Hepatozyten keine signifikante Proliferation OVA spezifischer CD8⁺ T Zellen induzieren (Abb. 4.12). Im Gegensatz hierzu, konnte eine signifikant höhere Proliferation (p<0,001) der OVA spezifischen CD8⁺ T Zellen beobachtet werden, wenn die OVA Expression in EC in *Tie2-cre* oder vorwiegend in professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) in *CD11c-cre* Mäusen mit der Infektion von C57BL/6 Mäusen verglichen wurde. Die Proliferation in *Tie2-cre* war vergleichbar mit

der Induktion in *CD11c-cre*, bei Verwendung des verbreitungsdefizienten MCMV-*flox-ova-ΔM94* sogar leicht erhöht ($p < 0,05$). Hieraus lässt sich schließen, dass die Infektion von EC, nicht aber von Hepatozyten, zu einer Induktion der antiviralen $CD8^+$ T Zellantwort beiträgt und der Beitrag der Infektion vaskularer Endothelzellen zur Proliferation der antiviralen $CD8^+$ T Zellantwort in etwa dem der Infektion dendritischer Zellen entspricht.

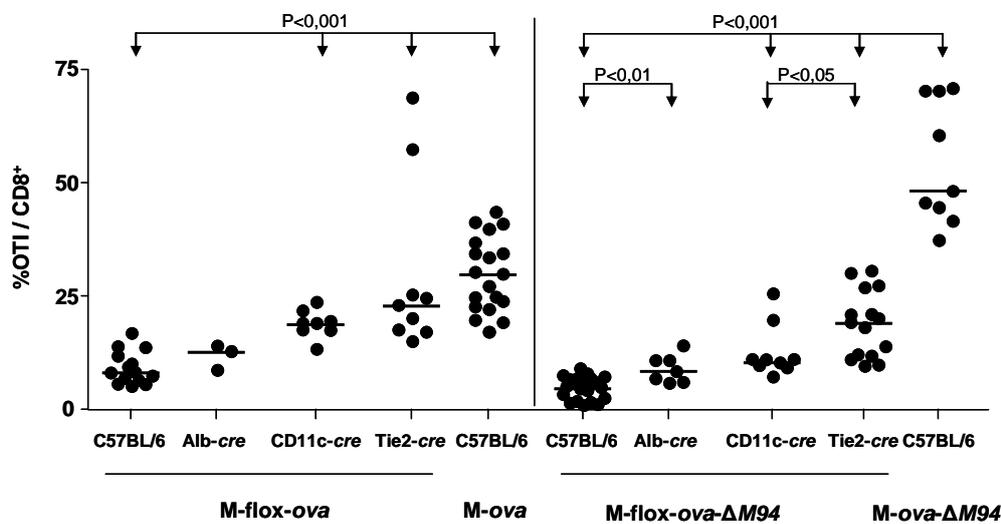


Abb.: 4.12 Der Beitrag verschiedener Zelltypen zur Proliferation adoptiv transferierter $CD8^+$ T Zellen

Einen Tag vor i.p. Injektion von 10^5 TCID₅₀ MCMV-*flox-ova* (*M-flox-ova*), MCMV-*flox-ova-ΔM94* (*M-flox-ova-ΔM94*), MCMV-*ova* (*M-ova*) oder MCMV-*ova-ΔM94* (*M-ova-ΔM94*) wurden 3×10^5 kongene OT-I $CD8^+$ T-Zellen i.v. in C57BL/6, *Alb-cre*, *Tie2-cre* oder *CD11c-cre* Mäuse transferiert. Sechs Tage nach Infektion wurde die Expansion der transferierten OT-I $CD8^+$ T-Zellen im peripheren Blut mittels durchflusszytometrischer Analyse anhand des kongenen Markers CD45.1 und CD8 ermittelt. Die Symbole repräsentieren das Verhältnis der OT-I Zellen pro $CD8^+$ Zellen in einzelnen Tieren, durchgeführt in 6 unabhängigen Experimenten. Der Querstrich stellt den Median der analysierten Gruppe dar. Die P-Werte wurden mittels beidseitigen Wilcoxon-Rangsummentest berechnet.

Nach Rekombination der „flox-stopp“ Kasette in infizierten Cre exprimierenden Endothelzellen, führt die Expression von Ovalbumin als Marker-Antigen zu einer Expansion der Ovalbumin spezifischen OT-I $CD8^+$ T Zellen. Bei Verwendung des verbreitungsdefizienten MCMV wird gesichert, dass Ovalbumin

nicht durch die Virusverbreitung und Neuinfektion anderer Zellen präsentiert wird. Allerdings kann das exprimierte Protein von anderen Zellen (z.B. DC) aufgenommen und präsentiert werden, obwohl die aufnehmende Zelle selbst nicht infiziert ist (Kreuz-Präsentation). Endothelzellen sind also Antigenproduzenten welche entweder direkt oder mit Hilfe professioneller Antigen-präsentierender Zellen die CD8⁺ T Zellantwort stimulieren.

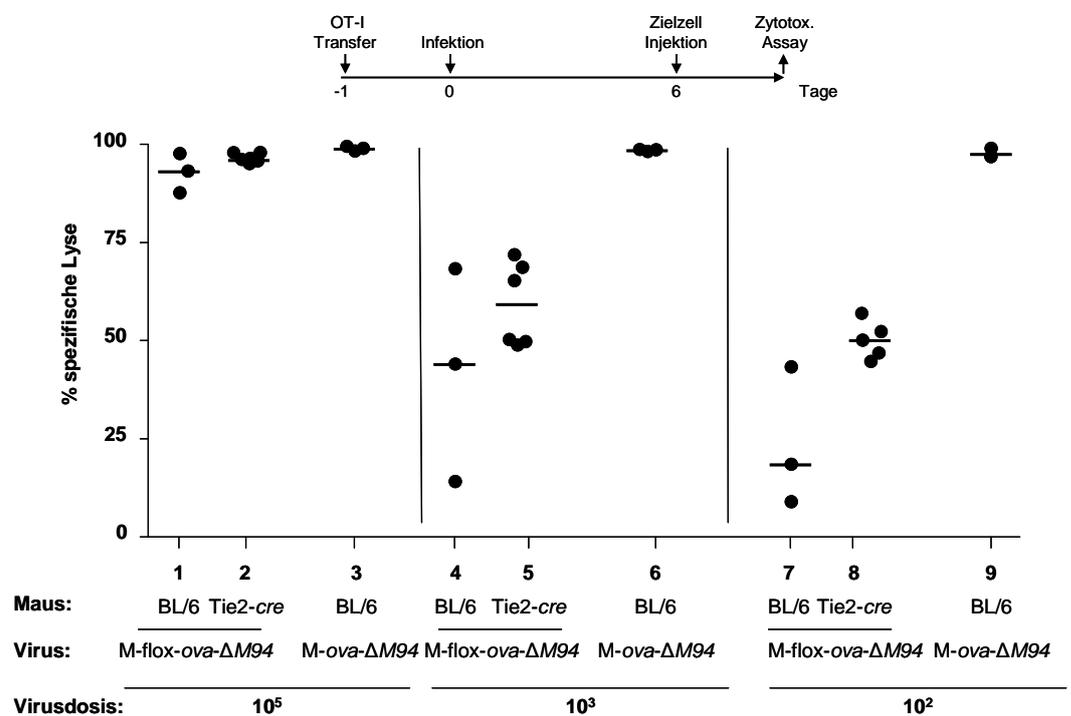


Abb.: 4.13 Beitrag verschiedener Zelltypen zu zytotoxischer Ovalbumin spezifischer CD8⁺ T Zell Antwort

Einen Tag vor i.p. Injektion von 10⁵, 10³ oder 10² TCID₅₀ MCMV-flox-ova-ΔM94 (M-flox-ova-ΔM94) oder MCMV-ova-ΔM94 (M-ova-ΔM94) wurden 3x10⁵ OT-I CD8⁺ T-Zellen i.v. in C57BL/6 (BL/6) oder Tie2-cre Mäuse transferiert. Sechs Tage nach Infektion wurde ein *in vivo* Zytotoxizitäts-Assay mit Ovalbumin-Peptid (SIINFEKL) beladenen Milzzellen durchgeführt. Zur Analyse wurden 4 Stunden nach Transfer der Zielzellen, Milzen entnommen und mittels Durchflusszytometrie die transferierten und CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) markierten CD45.1⁺ Zielzellen quantifiziert. Die Symbole repräsentieren die hieraus errechnete spezifische Lyseaktivität gegen Ovalbumin-Peptid beladene Zielzellen in Einzeltieren. Der Querstrich stellt den Median der analysierten Gruppe dar.

Im Rahmen der Untersuchung der Effektorfunktion mittels *in vivo* Zytotoxizitäts-Assay nach adoptivem OT-I Transfer (Abb. 4.13) fiel auf, dass auch in C57BL/6 Mäusen, welche die Transgen-Expressionskassette nicht anschalten können, Peptid beladenen Zellen nach Infektion mit MCMV-flox-*ova*- $\Delta M94$ (Abb. 4.13 Gruppe 1, 4 und 7), fast vollständig eliminiert wurden. Dies zeigt die Durchlässigkeit der Stopp-Kassette im schaltbaren Konstrukt MCMV-flox-*ova*- $\Delta M94$. Bereits in Abb. 4.12 ist die Proliferation nach Infektion von C57BL/6 (ohne Schaltung der Kassette) mit verbreitungskompetentem MCMV-flox-*ova* höher als nach Infektion mit verbreitungsdefizientem MCMV-flox-*ova*- $\Delta M94$. Die plausibelste Erklärung für diese Durchlässigkeit der Kassette, stellt die unvollständige Expressions-Unterbrechung durch die gefloxt 'Stopp'-Sequenz (Stoppcodons und Polyadenylierungs-Sequenzen; Abb. 4.11A) zwischen Promotor und Start-ATG und der restlichen kodierenden Sequenz des Ovalbumin dar. Durch Experimente mit entsprechend konstruierten, jedoch Luciferase exprimierenden Viren konnte diese Vermutung bestätigt werden: Luciferase Aktivität konnte bereits in flox-Stopp Konstrukten nachgewiesen werden (Weyn et al., nicht publizierte Beobachtungen). Wird allerdings das Antigen Ovalbumin in Endothelzellen (in *Tie2-cre*) geschaltet, so kann bei Injektion einer geringen Virusdosis MCMV-flox-*ova*- $\Delta M94$ (Abb.: 4.13 Gruppen 2, 5 und 8) eine erhöhte zytotoxische Aktivität gemessen werden, als bei Infektion von C57BL/6, der negativ-Kontrolle (Abb.: 4.13 vgl. Gruppen 1-2, 4-5 und 7-8). Die Durchlässigkeit der Kassette, relativiert deshalb die Beobachtungen nicht, da Rekombination in EC zu einer signifikant höheren Proliferation der transferierten OT-I CD8⁺ T Zellen und einer deutlich erhöhten zytotoxischen Aktivität bei geeigneten Konditionen (niedriger Virustiter) führt. Der hochsensitive *in vivo*-Zytotoxizitäts-Assay zeigt allerdings, dass MCMV-flox-*ova*- $\Delta M94$ in

Abwesenheit von Cre bereits eine gegen Ovalbumin gerichtete CD8⁺ T Zell Antwort induziert.

Wenn das Konzept des Cre/loxP vermittelten Zelltyp-spezifischen Schaltens der Ovalbumin Expression mittels verbreitungsdefizientem MCMV in weiterführenden immunologischen Studien breitere Verwendung finden sollte, ist eine Verbesserung der Dichte der Kasette, in Bezug auf die wünschenswerterweise nicht vorhandene Expression im nicht geschalteten Zustand, notwendig. Die verwendete Stopp-Kasette war trotz mehrerer Transkriptions-Stopps und poly-Adenylierungs-Signalen nicht ausreichend. Die Verwendung des immediate early CMV (IE) Promotors in der gleichen Orientierung wie die der Leserichtung des OVA-ORFs in MCMV-flox-*ova*- Δ M94 reicht, um eine basale Expression von Ovalbumin trotz Stopp-Kasette zu erreichen. Bei der Verbesserung der Konstrukte, müssten zwei Punkte vermieden werden: die Verwendung eines starken Promotors und die Verwendung einer Stopp-Kasette, die die Durchlässigkeit erlaubt. In den verbesserten Konstrukten wurde für die Ovalbumin-Expression statt des relativ starken und früh aktiven IE Promotors, der endogene Promotor des M94 verwendet. Wie könnte die Verwendung einer Stopp-Kasette in diesem System vermieden werden?

LoxP (locus of X-over P) bestehen aus 34 bp, wobei zwei 13 bp lange zu einander palindromische Sequenzen eine nicht palindromische 8bp lange Sequenz in der Mitte flankieren. Daraus ergibt sich, dass die Orientierung der 8bp langen Sequenz in der Mitte der LoxP Sequenz, der gesamten loxP Sequenz eine Orientierung gibt. Zhang et al. (150) und Oberdoerffer et al. (151) schlugen vor, DNA Fragmente mit mutierten loxP Sequenzen (lox66 und lox71), die in Bezug auf ihren nicht palindromischen 8bp Mittelteil einander entgegen gerichtet sind, zu flankieren. Dies führt bei

Rekombination mit Cre zu einer Inversion der geflochten DNA Sequenz. Die mutierten Enden in lox66 und lox71 führen nach Rekombination zu einer Wildtyp-loxP Sequenz und zu einer loxP Stelle die Cre schlechter erkennen kann (lockP). Damit wird die Wahrscheinlichkeit der Rückreaktion (die ohne diese Strategie bei 50% liegen würde) deutlich erniedrigt.

Im nicht rekombinierten Zustand wurde der Ovalbumin-ORF zwischen lox66 und lox71 antisense eingefügt und MCMV-flox-inv-*ova-ΔM94* generiert (Abb.4.13 B). Die Orientierung des OVA-ORF in antisense zum verwendeten Promotor sollte eine Expression des Ovalbumin ohne Cre-vermittelte Rekombination unterbinden. Nach Cre-vermittelter Rekombination wird der Ovalbumin-ORF in sense-Richtung gedreht und durch die Eigenschaften der mutierten loxP Seiten in dieser Orientierung fixiert. Zur Verbesserung des MCMV-flox-inv-*ova-ΔM94* (Abb. 4.13B) gegenüber MCMV-flox-*ova-ΔM94* (Abb. 4.13A) wurden zusätzliche Änderungen verwirklicht. Die Generierung des MCMV-flox-*ova-ΔM94* erfolgte über die Insertion der Ovalbumin exprimierenden Kasette an Stelle des *m157* Gens und der tTA exprimierenden Kasette an Stelle des Gens *M94*. In MCMV-flox-inv-*ova-ΔM94* wurden beide Kassetten vereint und an Stelle des Gens *M94* eingefügt, der *m157* Genlokus blieb unberührt. Ein weiterer positiver Nebenaspekt ist, dass die beiden Versionen des MCMV-flox-inv-*ova-ΔM94* vor (OFF) und nach (ON) Rekombination Längen-neutral sind, wohingegen in MCMV-flox-*ova-ΔM94* durch die Rekombination die Stopp-Kasette ausgeschnitten und das Virusgenom verkürzt wird.

Die Herstellung des MCMV-flox-inv-*ova-ΔM94* mit dem endogenen *M94* Promotor sollte vor allem der verminderten Transkription in Abwesenheit von Cre Rekombinase dienen. In einem ersten Experiment wurden MCMV-flox-inv-*ova-ΔM94* (Abb.4.13 B) und MCMV-flox-*ova-ΔM94* (Abb.4.13 A) hinsichtlich der Proliferation

(Abb. 4.14A) transferierter OT-I CD8⁺ T Zellen und deren zytotoxischer Aktivität (Abb. 4.14B) in C57BL/6 Mäusen verglichen. Zusätzlich wurde die Cre vermittelte Induzierbarkeit des MCMV-flox-inv-*ova*- Δ M94 in Endothelzellen (*Tie2-cre*) und dendritischen Zellen (*CD11c-cre*) getestet.

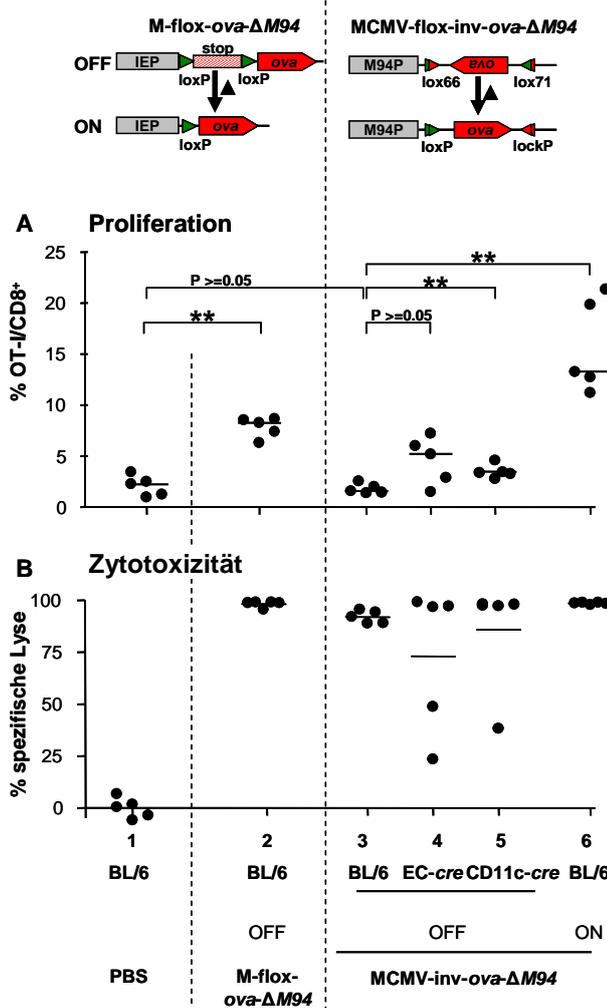


Abb.: 4.14 Einfluss der flox Stopp-Kassette auf basale Genexpression

Die Cre-vermittelten Rekombinationsereignisse von M(CMV)-flox-ova-ΔM94 und M(CMV)-flox-inv-ova-ΔM94 sind zur Veranschaulichung schematisch dargestellt. Einen Tag vor i.p. Injektion von PBS oder 10⁵ TCID₅₀ MCMV-flox-ova-ΔM94 (M-flox-ova-ΔM94), MCMV-flox-inv-ova-ΔM94 (OFF) oder des bereits *in vitro* rekombinierten Konstrukts des MCMV-flox-inv-ova-ΔM94 (ON) wurden 3x10⁵ kongene OT-I CD8⁺ T-Zellen i.v. in C57BL/6 (BL/6), Tie2-cre oder CD11c-cre Mäuse transfertiert. Sechs Tage nach Infektion wurde (A) die Expansion der transfertierten OT-I CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut mittels durchflusszytometrischer Analyse anhand des kongenen Markers CD45.1 und CD8 ermittelt. Die Symbole repräsentieren das Verhältnis der OT-I Zellen pro CD8⁺ Zellen in einzelnen Tieren. (B) Am selben Tag wurde mit den Tieren aus (A) ein *in vivo* Zytotoxizitäts-Assay mit Ovalbumin-Peptid (SIINFEKL) beladenen Milzzellen durchgeführt. Zur Analyse wurden 24 Stunden nach Transfer der Zielzellen, Milzen entnommen und mittels Durchflusszytometrie die transfertierten und CFSE markierten CD45.1⁺ Zielzellen analysiert. Die Symbole repräsentieren die hieraus errechnete spezifische Lyseaktivität gegen Ovalbumin-Peptid beladene Zielzellen in Einzeltieren. Der Querstrich stellt den Mittelwert der analysierten Gruppe dar.

Die Proliferation transferierter OT-I CD8⁺ T Zellen in C57BL/6, in Abwesenheit von Cre, war bei MCMV-flox-inv-*ova*- Δ M94 (Abb. 4.14A Gruppe 3) gegenüber MCMV-flox-*ova*- Δ M94 (Abb. 4.14A Gruppe 2) deutlich verringert. Der Vergleich mit PBS behandelten Mäusen (Abb. 4.14A vgl. Gruppe 1 und 2) zeigt nochmals, dass die Proliferation nach Infektion mit MCMV-flox-*ova*- Δ M94 erhöht ist. Die Proliferation der OT-I Zellen nach Infektion mit rekombiniertem MCMV-flox-inv-*ova*- Δ M94 (Abb. 4.14A Gruppe 6; ON) in C57BL/6 ist schwächer als bei MCMV-*ova*- Δ M94 (vgl. Abb.: 4.12). Die erwartete schwächere Expression des Ovalbumin in MCMV-flox-inv-*ova*- Δ M94 nach Rekombination führt aber auch zu einer geringeren Proliferation in den getesteten *cre*-transgenen Mäusen (Abb. 4.14A Gruppe 4 und 5 vgl. mit Abb. 4.12). Die Analyse der Zytotoxizität der OT-I Zellen zeigt aber (Abb.: 4.14B), dass in diesem sensitiven System selbst die Inversion der Ovalbumin-Kassette nicht zum gewünschten Ergebnis, dem Unterbinden jeglicher Ovalbumin-Expression führt. Obwohl die verringerte Proliferation (Abb. 4.14A Gruppe 2 und 3), auch eine verringerte Durchlässigkeit der neuen Kassette versprach, ist dieser Vorteil bei Betrachtung der zytotoxischen Aktivität der Zellen (eine sensitivere Analyse) kaum sichtbar (Abb. 4.14B Gruppe 2 und 3). Wahrscheinlich liegen die Ursachen in bidirektionaler Transkriptionsaktivität in dem Genbereich, der bislang nicht hinreichend charakterisiert wurde.

4.8 MCMV- $\Delta M94$ als Vakzine

Um MCMV- $\Delta M94$ als Vakzine zu testen, wurden BALB/c Mäuse mit verbreitungsdefizientem MCMV- $\Delta M94$ oder MCMV-*wt* s.c. geimpft. Eine zweite Applikation wurde zwei Wochen später mit derselben Dosis i.p. vorgenommen. Vier Wochen nach Primärimmunisierung wurden Mäuse i.v. mit 10^6 TCID₅₀ MCMV-*wt* infiziert. Die Immunisierung mit MCMV- $\Delta M94$ war hierbei ausreichend, um die MCMV Replikation des verabreichten Wildtypvirus, um etwa 1000-fach gegenüber nicht-immunisierten Tieren in Lunge, Leber und Milz zu verringern (Abb. 4.15).

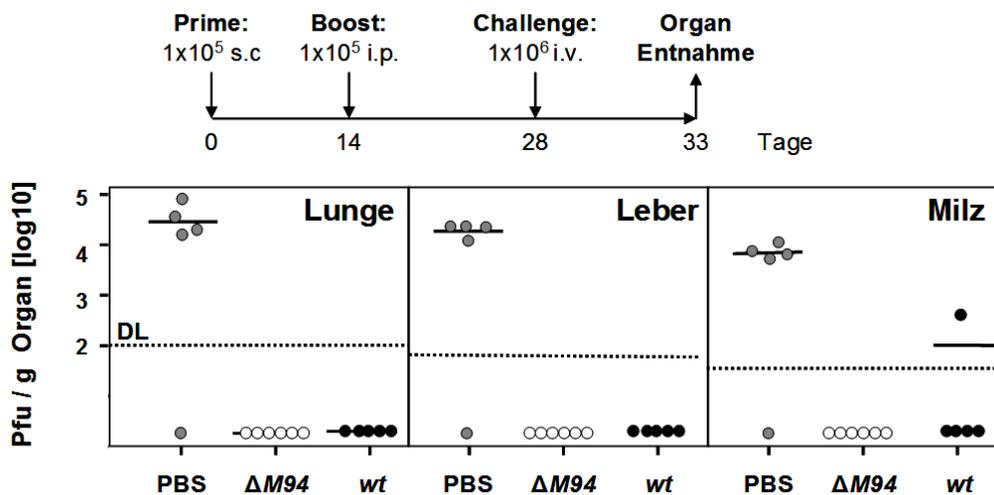


Abb.: 4.15 MCMV- $\Delta M94$ führt zur Kontrolle von MCMV-*wt* im BALB/c Stamm

BALB/c Mäuse wurde s.c. 10^5 TCID₅₀ MCMV-*wt* (schwarze Symbole), MCMV- $\Delta M94$ (weiße Symbole) oder PBS (hellgraue Symbole) injiziert. Zwei Wochen später wurde eine weitere Dosis Impfvirus i.p. appliziert. Die Wildtyp Infektion wurde i.v. vier Wochen nach der ersten Impfung mit 10^6 PFU MCMV-*wt* durchgeführt. Fünf Tage nach Infektion mit MCMV-*wt* wurde die Viruslast in den angegebenen Organen mittels Plaque Assay untersucht. Horizontale Linien zeigen den Median jeder Gruppe. Jedes Symbol repräsentiert ein Einzeltier. DL= Detektionslimit (gestrichelte Linie).

Die Wirkung von MCMV- $\Delta M94$ wurde eingehender im C57BL/6-Stamm getestet. Hierbei wurde zudem getestet, ob eine zweite Applikation des Impfvirus (boost) gegenüber Einmalgabe sich positiv auf den Schutz auswirken kann. Nach Injektion von 10^5 TCID₅₀ MCMV- $\Delta M94$, MCMV-*wt* oder dem attenuierten Lebendimpfstoff $\Delta m01-17+m144-158$ -MCMV i.p. wurde die zweite Applikation optional vier Wochen später mit derselben Dosis und Route vorgenommen. Zwanzig Wochen später wurden die Tiere i.v. mit 10^6 TCID₅₀ MCMV-*wt* infiziert. Bereits die einmalige Dosis des MCMV- $\Delta M94$ war ausreichend, um die MCMV Replikation nach Kontrollinfektion um 10,000-fach in Lunge, 1,000-fach in Leber und zumindest 100-fach in Milz gegenüber nicht-immunisierten Tieren zu verringern (Abb. 4.16A). Insgesamt war der Schutz mittels MCMV- $\Delta M94$ vergleichbar mit der Impfung mit MCMV-*wt* oder $\Delta m01-17+m144-158$ -MCMV. Wegen der starken Wirkung der einmaligen Impfung konnte ein additiver Effekt der Zweitapplikation des MCMV- $\Delta M94$ nicht dargestellt werden. Wenn jedoch UV inaktiviertes MCMV-*wt* oder UV inaktiviertes MCMV- $\Delta M94$ Virus zur Immunisierung verwandt wurde, war die Einfachgabe unzureichend. Die Applikation einer zweiten Dosis des UV-inaktivierten Virus, konnte daher den protektiven Effekt verbessern. Dennoch blieb der erzielte Effekt deutlich geringer, als bei einmaliger Applikation von MCMV- $\Delta M94$. Die Stärke der Reduktion der Viruslast, korrelierte mit der Stärke der neutralisierenden Antikörperantwort, die durch die jeweiligen Vakzinen induziert wurde (vgl. mit Abb. 4.7).

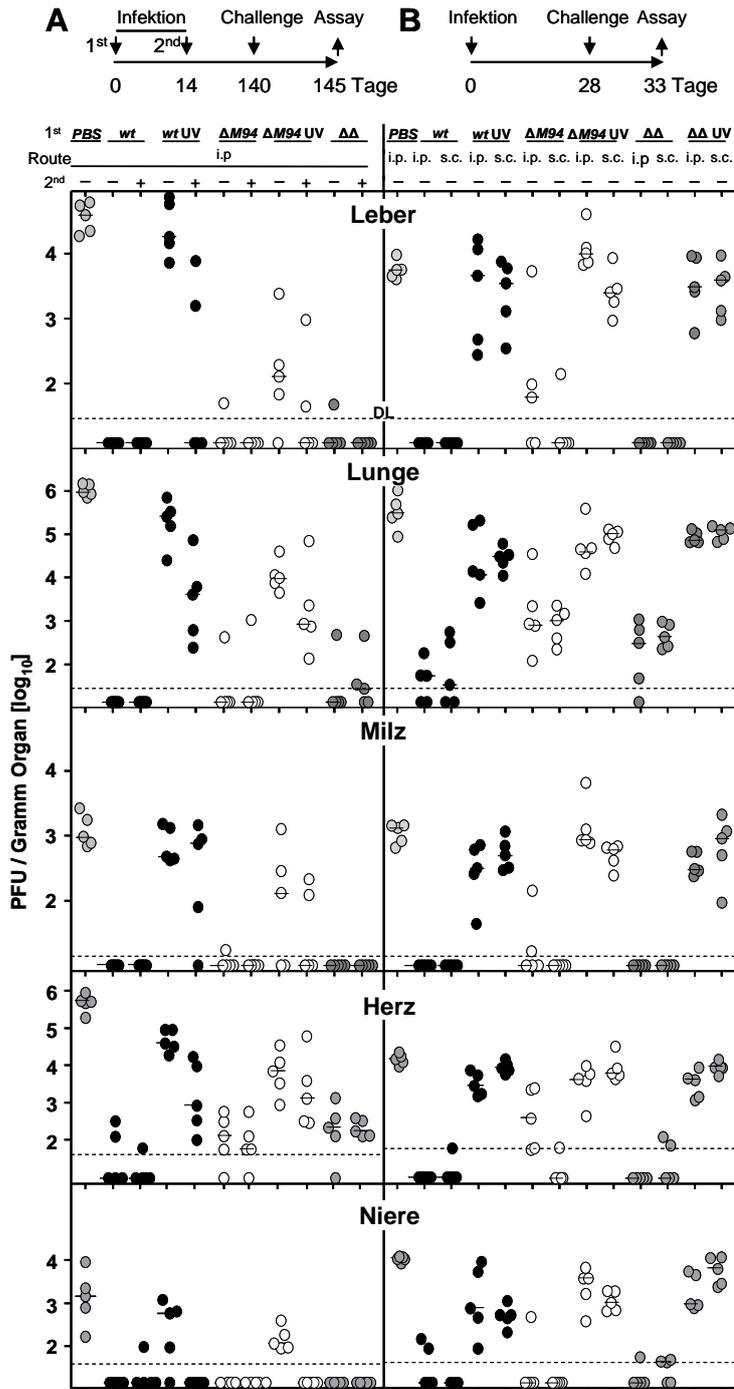


Abb.: 4.16 Impfung mit MCMV- Δ M94 vermittelt Schutz gegen Wildtyp Infektion in C57BL/6 Mäusen

C57BL/6 Mäuse (n=5) wurden s.c. oder. i.p. mit 10^5 TCID₅₀ MCMV-wt (wt; schwarze Symbole), MCMV- Δ M94 (Δ M94; weiße Symbole), Δ m01-17+m144-158-MCMV ($\Delta\Delta$; graue Symbole) oder PBS (hellgraue Symbole) immunisiert (1st). Optional wurden die Virus Präparationen vor der Immunisierung mit UV inaktiviert (UV). Zwei Wochen später wurde optional (2nd) mit derselben Dosis, Route und Virus eine zweite Impfdosis verabreicht. Die Kontrollinfektion wurde i.v. 20 (A) oder vier (B) Wochen nach der ersten Impfung mit 10^6 PFU MCMV-wt durchgeführt. Fünf Tage später wurde die Viruslast in den Organen mittels Plaque Assay bestimmt. Horizontale Linien zeigen den Median jeder Gruppe. Jedes Symbol repräsentiert die Analyse eines Einzeltieres. DL=Detektionslimit.

Die intra peritoneale Gabe des Impfvirus ist keine attraktive Impfroute. In einem weiteren Experiment wurden Applikationsrouten verglichen. C57BL/6 Mäuse wurden entweder i.p. oder s.c. geimpft und vier Wochen später dem MCMV-wt

Die Vakzinierung mit MCMV- $\Delta M94$ resultierte in einer etwa 100-fach verminderten Viruslast in Leber, Lungen und Milz (Abb. 4.16B), vergleichbar mit der Immunisierung mit $\Delta m01-17+m144-158$ -MCMV. Die Impfung mit MCMV-*wt* führte zu einer Reduktion der Viruslast um den Faktor 1000. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen i.p. oder s.c. Applikation, obwohl s.c.-Gabe eine etwas bessere Protektion in Milz und Herz zu erzielen schien. Die Ergebnisse waren bei Kontrollinfektion nach 4 Wochen und nach etwa 6 Monaten durchaus vergleichbar.

Zusammenfassend konnten durch Impfung mit MCMV- $\Delta M94$ immunkompetente Mäuse vor MCMV-*wt* geschützt werden. Ein vergleichbarer Effekt konnte selbst nach Mehrfachgabe mit inaktiviertem Virus nicht erreicht werden.

4.9 MCMV- $\Delta M94$ schützt IFN $\alpha\beta$ R $^{-/-}$ Mäuse

Typ I Interferone sind Schlüsselzytokine bei der Immunantwort gegen CMV. Die Deletion des Typ I Interferon-Rezeptors resultiert daher in etwa 1000-fach erhöhter Anfälligkeit für MCMV (147). MCMV- $\Delta M94$ ist für IFN $\alpha\beta$ R $^{-/-}$ Mäuse gut verträglich (Abb. 4.6A). Die Vakzine-Eigenschaft von MCMV- $\Delta M94$ wurde in diesen Mäusen getestet. Hierzu wurden B6.IFN $\alpha\beta$ R $^{-/-}$ Mäuse mit MCMV- $\Delta M94$ oder einer subletalen Dosis MCMV-*wt* immunisiert (Abb. 4.17A). Alle Tiere der geimpften Gruppen überlebten. Während MCMV-*wt* infizierte Mäuse vorübergehend etwa 15% Gewicht verloren (Arapovic et al., nicht veröffentlicht) zeigten Mäuse, die mit MCMV- $\Delta M94$ immunisiert wurden, keinen Gewichtsverlust. Vier Wochen später erfolgte die Kontrollinfektion mit einer letalen Dosis aus Speicheldrüsen isoliertem virulentem MCMV. Alle mit MCMV- $\Delta M94$ oder MCMV-*wt* vakzinierten Tiere überlebten.

Das Produkt des MCMV-Gens *m157* (78,79), stellt den Ligand des aktivierenden NK-Zell-Rezeptors Ly49H der C57BL/6-Maus dar (80,81,82). Deshalb profitieren C57BL/6 Mäuse von einer Ly49H abhängigen Aktivierung natürlicher Killerzellen, die als Konsequenz eine effiziente Reduzierung des MCMV Titers zur Folge hat (152). 129.IFN $\alpha\beta$ R $^{-/-}$ Mäuse exprimieren Ly49H nicht und sind deshalb etwa 10-fach anfälliger gegen Infektion mit MCMV. Stimmig mit in der Literatur beschriebenen Daten, schützt die Applikation von UV inaktiviertem Virus in 129.IFN $\alpha\beta$ R $^{-/-}$ Mäusen nicht vor letaler MCMV-*wt* Infektion (Abb. 4.17B). MCMV- $\Delta M94$ vakzinierte Mäuse überlebten die Dosis von 10x LD_{50/11d} MCMV-*wt*. Zusammengefasst, vermittelt die Impfung mit MCMV- $\Delta M94$ auch in stark immungeschwächten Mäusen Schutz gegen letale MCMV Infektion.

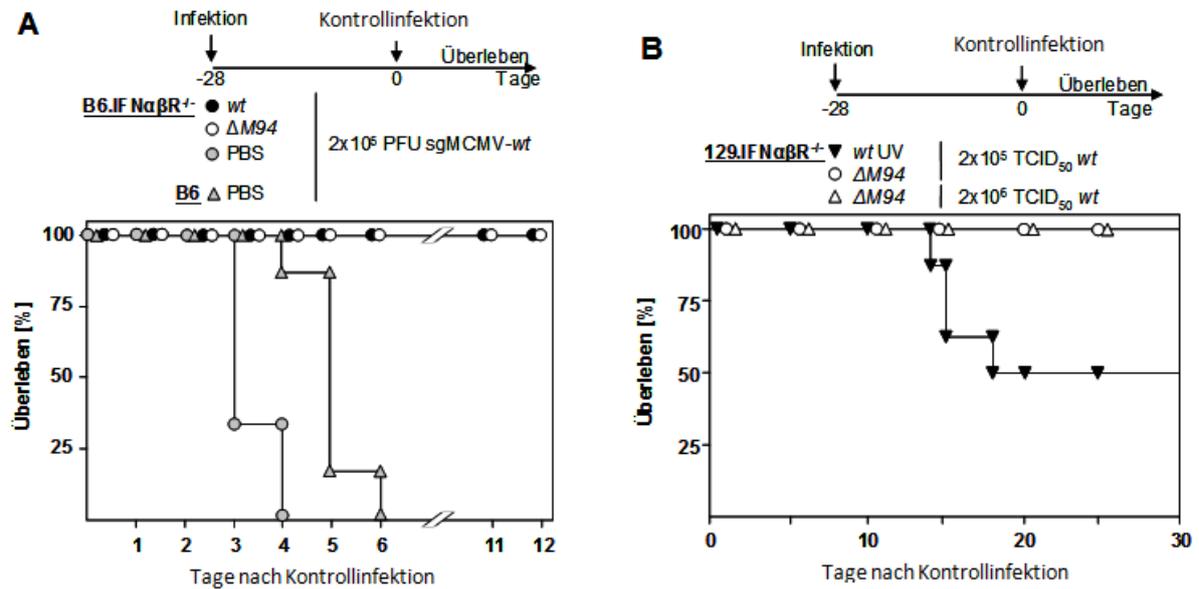


Abb.: 4.17 MCMV- $\Delta M94$ schützt immungeschwächte IFN $\alpha\beta R^{-/-}$ Mäuse

(A) B6.IFN $\alpha\beta R^{-/-}$ (n=6) Mäuse wurden i.p. mit 3×10^5 TCID₅₀ MCMV-wt (wt; schwarze Kreise) oder MCMV- $\Delta M94$ ($\Delta M94$; weiße Kreise) immunisiert. Kontrollgruppen B6.IFN $\alpha\beta R^{-/-}$ (graue Kreise) oder C57BL/6 (graue Pfeilspitzen) wurde PBS appliziert. Vier Wochen später wurde i.p. mit 2×10^5 PFU Speicheldrüsen passagiertem MCMV (sgMCMV-wt) infiziert und das Überleben dokumentiert.

(B) Vier Wochen nach Immunisierung mit 2.5×10^5 TCID₅₀ MCMV- $\Delta M94$ ($\Delta M94$; weiße Kreise, n=8), oder UV inaktiviertem MCMV-wt (wt UV; schwarze abwärtsgerichtete Pfeilspitzen, n=8) wurden 129.IFN $\alpha\beta R^{-/-}$ Mäuse mit einer letalen Dosis MCMV-wt (siehe Abb. 4.6) infiziert und das Überleben dokumentiert. Eine Gruppe Mäuse, immunisiert mit MCMV- $\Delta M94$ (n=7) (weiße Pfeilspitzen) wurde einer 10-fach höheren Dosis MCMV-wt ausgesetzt.

4.10 Das Genom von MCMV- Δ M94 verbleibt im Wirt

Ein Argument gegen die Verabreichung attenuierter Herpes-Lebendimpfstoffe ist die Möglichkeit der Etablierung einer latenten Infektion, die das Risiko der Reaktivierung beinhaltet (97). Abortive Reaktivierungsreaktionen, die bei fehlender Immunkontrolle erfolgen, könnten jedoch zur Stimulation der antiviralen Immunantwort führen. Es war deshalb von großem Interesse, zu testen, ob das MCMV- Δ M94 Genom im vakzinierten Wirt erhalten bleibt. Um diese Frage zu adressieren, wurden quantitative Realtime-PCR-Analysen mit Total-DNA extrahiert aus Lungen zwölf Monate nach Infektion durchgeführt. Das Genom von MCMV- Δ M94 konnte in der Lunge aller getesteter Mäuse zwölf Monate nach Primärinfektion detektiert werden (Abb.: 4.18 A und B). Interessanterweise waren die Anzahl der Virusgenome des MCMV- Δ M94 und MCMV-wt nicht einmal signifikant unterschiedlich ($P > 0.05$). Dies beweist, dass das Genom von MCMV- Δ M94 lange Zeit erhalten bleibt. Es ist denkbar, dass die Expression der viralen Antigene durch persistierende Genome zu einer Restimulation der Immunantwort führt. Dies könnte die über die Zeit erhöhte Protektion erklären (Abb.: 4.16A und 4.16B). Zusammengefasst bieten diese Daten den ersten Hinweis, dass Virusausbreitung von Zelle zu Zelle für die Genom-Persistenz nicht notwendig ist.

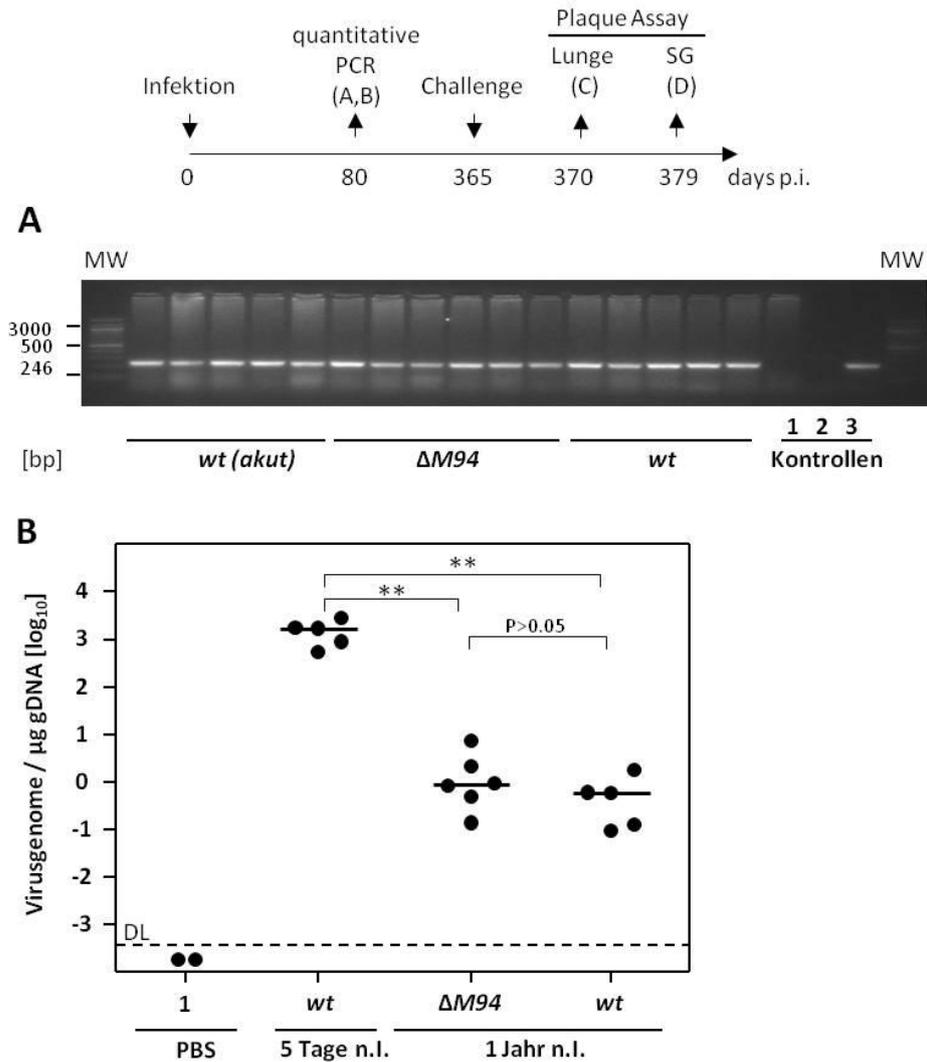


Abb.: 4.18 Langzeit Nachweis von MCMV- $\Delta M94$ Genomen

C57BL/6 Mäuse wurden i.p. mit 10^5 TCID₅₀ MCMV-*wt* (*wt*, n=5), MCMV- $\Delta M94$ ($\Delta M94$) (n=6) infiziert. Zwölf Monate nach Infektion wurde Total-DNA aus der Lunge extrahiert. (A) PCR Analysen liefern ein spezifisches 246 bp langes Fragment des viralen Polymerasegens *M54*. Als Kontrollen wurde DNA akut infizierter Lungen (10^5 TCID₅₀ MCMV-*wt*; *wt* akut; n=5) fünf Tage nach Infektion, PBS (1), Wasser (2) oder das BAC Plasmid pSM3fr (3) verwendet. (B) Mittels quantitativer realtime-PCR Analyse wurde die Kopienzahl des viralen *M54* Gens pro μg genomischer DNA bestimmt. Die Anzahl der Genomkopien von MCMV-*wt* (*wt*) und MCMV- $\Delta M94$ ($\Delta M94$) sind nicht signifikant unterschiedlich ($P > 0.05$). Beide Gruppen unterscheiden sich signifikant von der Anzahl an Genomkopien in akut infizierten Lungen (*wt* 5 Tage nach Infektion, n.I.) (**, $P < 0.01$).

4.11 Die Vakzinierung mit MCMV- Δ M94 verhindert Transmission

Epidemiologische Studien zeigen, dass die Übertragung durch Speichel eine wichtige Route der Transmission von HCMV darstellt (39). Um zu untersuchen, ob die Vakzine MCMV- Δ M94 die Virus-Replikation in Speicheldrüsen und Lungen von C57BL/6 Mäusen verhindert, wurden die zwölf Monate zuvor geimpften Mäuse einer Kontrollinfektion mit 10^6 PFU MCMV-*wt* i.v. ausgesetzt (Abb.4.19). Eine einfache Dosis MCMV- Δ M94 war hierbei ausreichend um in 4 von 6 Tieren die Viruslast der Kontrollinfektion um mehr als 1000-fach in Lungen zu vermindern (Abb.4.19). Keinerlei Kontrollvirus konnte in Speicheldrüsen 14 Tage nach Kontrollinfektion nachgewiesen werden (Abb.4.19). Dies legt nahe, dass keine Virusausbreitung aus dem respiratorischen Trakt und über den Speichel stattfindet und deshalb horizontale Transmission über diese Route durch Impfung mit verbreitungs-defizientem MCMV verhindert werden kann.

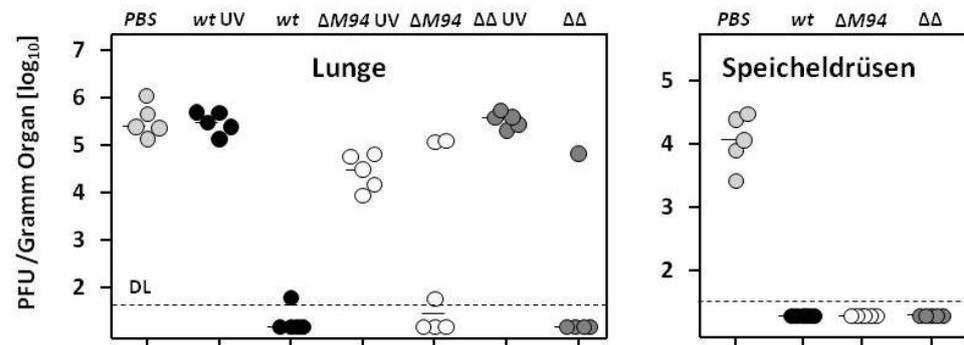


Abb.: 4.19 Schutz durch MCMV- Δ M94 zwölf Monate nach Infektion

B6 Mäuse ($n=5$) wurden i.p. mit 10^5 TCID₅₀ MCMV-*wt* (*wt*; schwarze Symbole), MCMV- Δ M94 (Δ M94; weiße Symbole), Δ m01-17+m144-158-MCMV ($\Delta\Delta$; dunkelgraue Symbole) oder PBS (hellgraue Symbole) immunisiert. Wenn angegeben wurden UV bestrahlte Viruspräparationen (UV) zur Immunisierung verwendet. Die Kontrollinfektion wurde i.v. ein Jahr nach Immunisierung mit 10^6 PFU MCMV-*wt* durchgeführt. Die Viruslast in den Organen wurde mittels Plaque-Assay 5 Tage nach Kontrollinfektion in Lungen (links) und 14 Tage nach Kontrollinfektion in Speicheldrüsen (rechts) bestimmt. Horizontale Linien zeigen den Median jeder Gruppe. Jedes Symbol stellt die Analyse eines Einzeltiers dar. MW=molekularer Größenstandard; DL= Detektionslimit (gestrichelte Linie).

5 DISKUSSION

In dieser Arbeit wird ein neues Vakzinierungskonzept zur Impfung gegen die Infektion mit β -Herpesviren vorgestellt. Die Modellvakzine besteht aus einem verbreitungsdefizienten Virus. Die Deletion des Gens *M94* führt zur Unterbrechung der Morphogenese im Zytoplasma. Durch die Unterbrechung der Virusmorphogenese, genauer dem Unterbleiben der zweiten Virusumhüllung, infiziert MCMV- $\Delta M94$ nur die primäre Zielzelle. Dennoch kann MCMV- $\Delta M94$ eine schützende Immunantwort induzieren. Damit ist die Infektion der primären Zielzelle für eine erfolgreiche Impfung ausreichend. Die Vakzinierung mit MCMV- $\Delta M94$ verläuft ohne erkennbare Symptome selbst in stark immungeschwächten Mäusen und induziert sowohl eine starke T Zellantwort wie auch eine starke Antwort neutralisierender Antikörper die mit der Wildtyp-Infektion vergleichbar ist. Die durch MCMV- $\Delta M94$ induzierte Immunantwort schützt selbst immungeschwächte Mäuse gegen Infektion mit letalen Dosen virulenten Wildtypvirus.

5.1 Die Komplementation des deletierten Gens *M94* in trans

Für die Anwendung einer Vakzine ist neben der Induktion der protektiven Immunantwort und der Impfsicherheit auch die Rentabilität der Produktion von Bedeutung. Die Vermehrung attenuierter Viren in Zellkultur ist durch die ursächliche Anpassung der Viren an *in vitro* Bedingungen leicht und mit herkömmlichen Zellkulturmethoden zu erreichen. Die Deletion eines essentiellen Gens aus dem Virusgenom hingegen erfordert die

Komplementation des Genproduktes durch die Zelle. Diese Komplementation muss, um das Sicherheitskonzept der Vakzine nicht zu gefährden, die Rückrekombination der deletierten Gensequenz (aus der Zelle in das Genom des Virus) und damit die Reversion zu Wildtyp ähnlichem Virus vermeiden. Rekombinationsereignisse sind vor allem dann zu erwarten, wenn homologe Gensequenzen vorliegen. Solche homologe Sequenzen wurden u.a. dafür genutzt mittels homologer Rekombination nach Ko-Transfektion (hier zwischen zwei viralen Gensequenzen) mit einem Set an Cosmiden, infektiöse Viren in Zellkultur zu rekonstruieren (153). In Abwesenheit von Rekombinasen, die die Rekombination selbst kurzer Homologieabschnitten vermitteln, ist die Nachweisbarkeit für ein spontanes homologes Rekombinationsereignis abhängig von der Länge der Homologie und dem Selektionsvorteil der Rekombination (154). Ein Beispiel hierfür wäre die Vermeidung der Überlänge des viralen Genoms, da längere Genome die Verpackung der DNA stören und Druck auf das Virus entsteht das Genom zu verkürzen. Bereits die Organisation des Herpesvirusgenoms schränkt die Auswahl deletierbarer Gene ein. Verschiedene Gene überlappen, indem sie gleich- oder gegengerichtet gemeinsame Sequenzen nutzen (135). Das Gen *M94* überlappt (am 5' Ende) mit dem benachbarten Gen *M93* über 47 bp. Bei der Konstruktion des MCMV- $\Delta M94$ musste der kurze überlappende Teil im Virusgenom erhalten bleiben. Zur Komplementation muss in der Zelllinie natürlich der gesamte *M94* ORF zur Komplementation und damit auch die entsprechenden Gensequenzen des *M93* verwendet werden. Ferner bleibt eine 17 bp Homologie des 3'-Endes von *M94* zwischen komplementierender Zelllinie und MCMV- $\Delta M94$ erhalten. Homologien von etwa 30-40bp können auch in der Abwesenheit von Rekombinasen zur Rekombination führen (Ruzsics et al, nicht veröffentlichte

Beobachtungen). Die Rückrekombination der *M94* Gensequenz in das *MCMV-ΔM94* Genom und damit die Reversion zu einem Wildtyp ähnlichen Virus wird deshalb für jede eingesetzte Viruspräparation getestet, allerdings nie beobachtet. Es ist deshalb anzunehmen, dass für spontane Rekombinationsereignisse eine 17bp kurze Homologie (in Kombination mit der 47bp langen Homologie am 5'-Ende) eher ungünstig ist. Für die Herstellung von Viren durch Deletion eines essentiellen Gens, speziell für die Verwendung des Virus als Vakzine, müssen dennoch die entsprechenden Loci mit Bedacht ausgewählt und die Möglichkeit der Reversion durch homologe Rekombination getestet werden. Im vorliegenden Fall wäre es möglich, durch Codon-Veränderung das Risiko weiter zu reduzieren.

Im Allgemeinen ist die Komplementation abhängig vom betroffenen Genlokus der gewählten Zelllinie und der Kinetik und Stärke der Expression des Transgens sowie der Rolle des Gens in der Virusreplikation. Die Komplementation eines essentiellen Gens kann auf verschiedene Weise erreicht werden. Die (transiente) Ko-Transfektion eines Expressionsplasmids zusammen mit der entsprechenden BAC DNA kann bereits zur Komplementation verbreitungsdefizienter und zur Rekonstitution infektiöser Viren ausreichen (155). Für die Herstellung einer Vakzine basierend auf der Deletion eines essentiellen Gens ist ein stabiles Komplementationssystem erforderlich. Das stabile Einbringen des entsprechenden Gens in die komplementierende Zelle kann durch retrovirale Vektorplasmide erreicht werden und auch die gleichzeitige Komplementation von zwei Genen wurde beschrieben (156). Nicht alle Gene sind zur Komplementation geeignet. Studien mit HSV-1, das als verbreitungsdefizientes Virus für die Verwendung in der Gentherapie erprobt wird, zeigen, dass die Komplementation von für die virale DNA Replikation essentiellen

Genen stark von der Aktivität verwendeter Promotoren und der zum Teil aufrecht erhaltenen Expressionsabfolge des Virus (und des komplementierten Gens) abhängig sind (157). Einige Genprodukte scheiden aufgrund von schädlichen Effekten für die Zelle aus (158). Die Etablierung von stabilen und induzierbaren Trans-Komplementationssystemen wurde intensiv vorangetrieben und in verschiedenen Ansätzen umgesetzt. Die Expression verschiedener Virus-kodierter Rekombinasen wie Cre oder FLP erlaubt z.B. die Schaltung der Expression verschiedener viraler Proteine zu verschiedenen Zeitpunkten der Virusreplikation (159). Für eine Vakzine scheint die Expression von Rekombinasen zur Transkomplementation jedoch unerwünscht, da deren Aktivität im Genom des Patienten bei Präsenz entsprechender Zielsequenzen zu unkontrollierbaren Rekombinationsereignissen führen könnte. In MCMV- $\Delta M94$ wird deshalb eine Expressionskassette des Tetrazyklin Transaktivators (tTA, engl. tetracycline-responsive transcriptional activator) in das Virusgenom eingefügt. Die zwei zentralen Elemente des Tet-Systems, der tTA (im Virus: statt M94) und der entsprechende Promotor TRE, der in der Zelle die Expression des M94 steuert, stammen aus dem bakteriellen Tetrazyklin Resistenz Operon. Das Tetracycline-Resistenz Operon wird durch den Tet-Repressor (TetR) negativ reguliert, indem dieser die Transkription der nachgeschalteten Gene durch Bindung an die Tet-Operator-Sequenzen (*tetO*) in Abwesenheit von Tetrazyklin aktiviert. In Bakterien ist aus diesem Zusammenspiel dieser zwei Komponenten durch evolutionären Druck ein hoch sensitives System gegen Tetrazykline entstanden. Der eukaryontische Transkriptionsaktivator tTA ist ein Fusionsprotein aus Tet-Repressor des Tn10-Transposons und der VP16-Aktivierungsdomäne des HSV. In der Abwesenheit von Tetrazyklin bindet tTA an den TRE Promotor und aktiviert so die

Transkription des dahinterliegenden Gens. Zudem sind *tetO* Sequenzen in den Minimalpromotor eingefügt, um einen sehr starken Tet-aktivierbaren Promotor (TRE) zu generieren. Da die *tetO* Sequenzen in Säugerzellen nicht vorkommen, ist das Risiko pleiotroper Effekte gering (160). Zumindest für die Rekombinase Cre werden allerdings im Säuger genom das Vorkommen aktiver Rekombinase-Erkennungssequenzen beschrieben (161). Der Ansatz der Virus-vermittelten tTA Expression bietet experimentell für die Infektions-abhängige Virus-induzierte Komplementation in trans eine gute Grundlage.

Tatsächlich ermöglicht die Virus-vermittelte Expression des tTA die Produktion des MCMV- Δ M94 auf der trans-komplementierenden Zelllinie NT/M94-7 (Abb.4.2 und 4.3). Grundsätzlich reicht die induzierte Komplementation aus, um eine mit dem Wildtyp vergleichbare Virusproduktion zu gewährleisten. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der mit MCMV- Δ M94 infizierte NT/M94-7 Zelllinie zeigen jedoch deutlich weniger Viruspartikel während des zweiten Umhüllungsschrittes verglichen mit MCMV-*wt* (Bosse et al., nichtpublizierte Daten). Während der Herstellung von Viruspräparationen in größerem Maßstab (20 Kulturplatten mit 15cm Durchmesser) kann zudem beobachtet werden, dass die Produktion des MCMV- Δ M94 auf NT/M94-7 gegenüber MCMV-*wt* deutlich beeinträchtigt ist. Ob dies an der mangelnden Induktion, der Expression des M94 Proteins selbst oder dem teilweisen Verlust oder Silencing des TRE Konstruktes liegt wird nicht weiter untersucht. Die Verbesserung der trans-komplementierenden Zellsysteme wird allerdings über die Verwendbarkeit von Impfviren mit deletierten essentiellen Genen als Vakzinen entscheiden Dies könnte beinhalten, dass das Virusgenom keinerlei Fremdsequenzen enthalten sollte. In dieser grundsätzlichen Arbeit wird nicht untersucht, ob das Virus-kodierte

tTA im Vakzinierten als Antigen erkannt wird und selbst eine Immunantwort auslöst. Dies ist wahrscheinlich der Fall. Das lange Verbleiben des Virusgenoms in den Zellen bis 12 Monate nach Impfung weist aber darauf hin, dass eine Immunantwort gegen tTA (im Umfeld des ohnehin hochimmunogenen Impfvirus) nicht zur Eliminierung der infizierten Zellen führt.

5.2 Verbreitungsdefiziente Herpesvirus-Vakzinen

Inaktivierte virale Vakzinen induzieren vorwiegend CD4⁺ T Zell und Antikörper-vermittelte Immunantworten wohingegen attenuierte Lebendvakzinen, die im Patienten noch bedingt replizieren können, sowohl T-Zell- als auch Antikörper-vermittelte Immunantworten induzieren. Für chronische Virusinfektionen wie mit dem Human Immundefizienz Virus oder Herpesviren, sind diese klassischen Methoden wenig erfolgreich. Gegen humane Herpesviren existiert nur gegen Windpocken ein zugelassener Impfstoff, ein attenuiertes Lebendvirus. Gerade für Viren, die im Wirt persistieren, müssen neue Konzepte entwickelt werden. Bei der Immunisierung muss die Infektion auf ein Mindestmaß beschränkt sein, da die Infektion der entsprechenden Zellen zu einer latenten Infektion führen könnte. Die Schwächung des Immunsystems durch HIV oder medikamentöser Immunsuppression kann in diesen Fällen zu Reaktivierung und Krankheit führen.

Bereits zwei Tage nach Infektion können bei MCMV-*wt* Infektion Ansammlungen von T Zellen in der Nähe infizierter Zellen im Organ nachgewiesen werden. Es ist anzunehmen, dass im immunkompetenten Wirt die Immunantwort die Virusausbreitung auf die ersten und zweiten Zielzellen beschränkt (133). Die Infektion von Herpesviren interferiert mittels viraler immunregulatorischer Gene mit der antiviralen Immunantwort.

Nach Infektion beispielsweise mit Wildtyp HSV-2 ist die Produktion von Typ-I Interferonen vermindert (162), die Reifung dendritischer Zellen (163) und ihre Migrationsfähigkeit zu lymphoiden Organen beeinträchtigt (164) diese Effekte werden durch die Virusreplikation verstärkt (118). Es ist also durchaus möglich, dass die Virusreplikation zum Erreichen eines ausreichenden Impfschutzes nicht essentiell ist. Im Gegenteil, die virale Evasion der angeborenen und adaptiven Immunantworten könnte in Viren die nicht replizieren deutlich vermindert sein. Ein Virus dessen Vermehrung ausgeschlossen ist, stellt deshalb eine interessante Alternative dar, die Sicherheit attenuierter Lebendimpfstoffe zu erhöhen und dennoch Immunität zu erreichen. Die erste Verwendung fand ein verbreitungsdefizientes Virus als Vakzine-Vektor gegen Tollwut. Die Konstruktion eines rekombinanten Hühnergrippevirus, das ein Tollwut-Glykoprotein exprimiert nutzt lediglich die Eigenschaft des Hühnergrippevirus in nicht-Hühner Zellen eine abortive Infektion zu initiieren, die aber für Schutz gegen Tollwut nicht ausreicht (165). Das Prinzip der Sicherheit beruht auf der Spezifität des Virus. Um also eine gegen möglichst alle Komplexe viraler Antigene gerichtete Immunantwort zu erreichen (wie im Fall attenuierter Lebendvakzinen) kommt es sehr darauf an, an welcher Stelle im viralen Replikationsprogramm die abortive Vermehrung abbricht. Die Funktionsweise der DISC („disabled infectious single cycle“) Herpesvirus Mutanten als virale Vakzine beruht auf der Deletion eines Virionproteins, das erst nach dem Viruszusammenbau bei der Infektion der nächsten Zelle wichtig ist. Der Replikationszyklus verläuft normal und Viruspartikel werden produziert und freigesetzt (122). Die freigesetzten Virionen sind jedoch nicht infektiös und die Infektion verbreitet sich ausgehend von der zunächst infizierten Zelle nicht weiter (166). HSV DISC Mutanten

können in Kleintiermodellen erfolgreich zur Impfung eingesetzt werden (167). Obwohl die Infektion mit der DISC Mutante auf einen einzigen Replikationszyklus beschränkt sein sollte, gibt es Hinweise, dass der Verbreitungsdefekt *in vivo* unvollständig sein könnte (123). Erste HSV-2 DISC Mutanten scheitern nach zunächst vielversprechenden prä-klinischen Studien an mangelnder therapeutischer Wirksamkeit. Neben der Gefahr einer vom deletierten Genprodukt unabhängigen Verbreitungsweise, scheint dieser Ansatz für CMV auch aus einem weiteren Grund unattraktiv. Das zu deletierende Gen wäre ein den Zell-Tropismus bestimmendes Glykoprotein wie z.B. gH oder gB. Diese Proteine werden nach Vakzinierung mit DISC von der ersten infizierten Zelle nicht mehr exprimiert. Solche Glykoproteine stellen jedoch ein Hauptziel der neutralisierenden Antikörperantwort gegen CMV dar und die Deletion führt zum Verlust eines für die schützende Immunantwort wichtigen Antigens. Das durch *M94* kodierte Protein ist kein Glykoprotein und die durch Fehlen von *M94* verursachte Unterbrechung des Replikationszyklus behindert die Freisetzung viraler Partikel, anders als bei den beschriebenen DISC HSV Vakzinen. Die Infektion von Endothelzellen und Fibroblasten mit MCMV- $\Delta M94$ konnte gezeigt werden und der Tropismus erscheint gegenüber dem Wildtypvirus unverändert.

Insgesamt werden heute virale Vektorsysteme bevorzugt, die wie MCMV- $\Delta M94$ die Replikationsdefizienz durch gezielte Deletion eines für die Replikation essentiellen Gens verwirklichen. Vor allem entsprechende Alphaviren (der Familie der *Togaviridae* zugehörig) (168), Replikationsdefiziente Adenovirusvektoren (169) aber auch Adeno-assoziierte-, Polio-, und Sendai-Virusvektoren werden entwickelt.

Für α -Herpesviren haben David Knipe und Kollegen Vakzinen getestet, deren Replikation durch Deletion eines essentiellen Gens

unterbrochen ist (117). Verbreitungsdefiziente HSV Virusmutanten können sowohl in Mäusen gegen virulente HSV-1 Infektion (121,118), wie auch in Meerschweinchen gegen HSV-2 (170) erfolgreich als Impfviren eingesetzt werden.

Die Unterbrechung der herpesviralen Replikationskaskade an verschiedenen Stellen (118) zeigte, dass die Antikörperantwort umso stärker ist, je später die Replikation unterbrochen wird. Dies unterstreicht die Bedeutung der intakten und möglichst vollständigen viralen Genexpression und die Notwendigkeit der Neusynthese viraler Struktur-Proteine in der infizierten Zelle (119). Mit MCMV- $\Delta M94$ kann eine Antikörperantwort induziert werden, die nahezu dem der Wildtypinfektion entspricht. Die Inaktivierung von CMV durch UV Bestrahlung (109) oder durch chemische Behandlung (171) erzeugt nach Impfung nur bedingt schützende und wenn vor allem Antikörper-vermittelte Immunantworten. Attenuierte Lebendimpfstoffe zeigen hingegen eine wesentlich stärkere Immunantwort (109,148,172,173).

Um ein verbreitungsdefizientes β -Herpesvirus herzustellen wird zur Deletion das Gen *M94* ausgewählt.

M94 ist essentiell für die Virusvermehrung von MCMV und HCMV. Es wird zu einem späten Zeitpunkt produziert (125,126). Das Homolog in HSV pUL16 wird sowohl im Nukleus wie auch im Zytoplasma nachgewiesen (174); gebunden an Kapside wird es jedoch lediglich im Zytoplasma nachgewiesen (175). Die Funktion von pM94 oder der Homologe anderer Herpesviren ist nicht vollständig geklärt. Über eine Brückenfunktion zwischen Kapsid und der Kernmembran während des Ausschleusens des Kapsids aus dem Nukleus wird spekuliert, da eine Bindung des pUL16 Proteins an das Kapsid und Membran-assoziierte Tegument Protein pUL11 in HSV nachgewiesen wird (176). Durch

elektronenmikroskopische Analysen MCMV- $\Delta M94$ infizierter Zellen kann ein Defekt im sekundären Umhüllungsschritt nachgewiesen werden (Maninger et al., Manuskript in Vorbereitung). Der Defekt tritt spät im Replikationszyklus auf. Die DNA-Replikation verläuft vergleichbar mit MCMV-*wt* (Abb.4.4 und 4.5). Die Expression weiterer Gene (z.B. des Major Capsid Proteins) ist nicht beeinträchtigt (Maninger et al., Manuskript in Vorbereitung) und es gibt keine Anhaltspunkte, dass die Deletion des *M94* die Expression anderer (Anti)Gene beeinträchtigen würde. Die Auswahl von *M94* ist attraktiv, da auch das Homolog *UL94* in HCMV (126) essentiell ist. In HCMV ist pUL94 zudem Ziel autoreaktiver Antikörper, die assoziiert mit systemischer Sklerose nachgewiesen werden können (177,178). Die Deletion des *UL94* könnte aus diesem Grund von Vorteil sein.

5.3 Die Immunantwort gegen MCMV- $\Delta M94$

Das hier vorgestellte verbreitungsdefiziente β -Herpesvirus induziert eine starke, protektive und mit der Infektion mit MCMV-*wt* vergleichbare Immunantwort. Die induzierte Immunantwort kontrolliert die Virusreplikation in allen analysierten Organen und verhindert die Ausprägung von Symptomen.

Dennoch bestehen Unterschiede zwischen dem MCMV Tier-Modell (179) und der natürlichen Infektion mit HCMV im Menschen. Im Menschen finden durchaus Re-Infektionen mit HCMV statt. Dieses Phänomen ist nicht auf einzelne Patientengruppen beschränkt, sondern kommt auch in immunkompetenten Kindern, seropositiven Schwangeren, immunsupprimierten Transplantatempfängern und AIDS-Patienten vor (44,180,181,182). Es scheint also wahrscheinlich, dass eine Vakzine gegen HCMV, die auf dem vorgestellten Konzept der Verbreitungsdefizienz beruht nicht gegen Reinfektionen schützt. Ähnliche Beobachtungen

werden bei Primaten gemacht. Dort konnte gezeigt werden, dass die Reinfektion mit dem gleichen Virusstamm erfolgen kann, also nicht auf einer Stammdifferenz der Viren beruht (Hansen et al., Science 2010).

Es ist jedoch wahrscheinlich, dass eine solche Vakzine den symptomatischen Krankheitsverlauf verhindert, da auch die natürliche Infektion in Immunkompetenten eine weitgehend schützenden Immunität erzeugt. Das Infektionsrisiko ist bei sekundärer Infektion der Mutter deutlich geringer als bei Primärinfektion (183). Die Immunantwort der Mutter kann zwar nicht die Infektion verhindern, wohl aber die Wahrscheinlichkeit der Transmission und damit die HCMV-assoziierten Krankheitssymptome bei den Kindern verringern. Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass regelmäßige HCMV-Exposition, wie zum Beispiel in Kindertagesstätten, einen positiven Effekt auf die Immunität gegen Reinfektionen erzeugt (86).

In Speicheldrüsen von immunisierten Mäusen kann nach Virusbelastung kein infektiöses Virus nachgewiesen werden. Auch in den Lungen von (4 von 6) geimpften Mäusen ist die Viruslast deutlich reduziert. Speichel stellt einen der potentiellen Übertragungswege für HCMV dar (horizontalen Transmission). Da die Impfung mit MCMV- Δ M94 die Replikation des Kontrollvirus in der Speicheldrüse verhindert, kann davon ausgegangen werden, dass sich bei bestehendem Impfschutz Virus nicht über Speichel verbreitet.

Die für MCMV anfälligen IFN $\alpha\beta$ R^{-/-} Mäuse können die Sicherheit des Impfkzeptes verdeutlichen. Sogar in Mäusen mit stark beeinträchtigtem Immunsystem kann eine schützende Immunantwort gegen eine Wildtypinfektion induziert werden. MCMV induziert Typ-I Interferone sehr effizient (184), die Vakzinierung der IFN $\alpha\beta$ R^{-/-} Mäuse zeigt aber, dass die Typ-I

Interferon-abhängige Immunität für die schützende Immunantwort nicht unbedingt erforderlich ist.

Die durch verbreitungsdefizientes MCMV induzierte adaptive Immunantwort ist interessanterweise vergleichbar mit der nach Infektion mit Wildtypvirus. Sowohl CD4⁺, als auch CD8⁺ T Zellantworten sind ähnlich stark. Selbst neutralisierende Antikörper werden fast genauso effektiv induziert. Die etwas geringere Antikörperantwort (Faktor 2-3) war zu erwarten, da das Virus sich nicht ausbreiten kann und auch eine geringere Anzahl Zellen infiziert und deshalb eine geringere Menge an Antigen produziert.

Der T Zellantwort kommt bei der effektiven Kontrolle der akuten CMV Infektion eine entscheidende Rolle zu. Die Kontrolle der persistierenden CMV Infektion wird durch CD4⁺ T Helferzellen unterstützt (85). Vor allem CD8⁺ T Zellen vermitteln den Schutz nach Immunisierung (83). Je nach Mausstamm dominieren CD8⁺ T-Zellen mit Spezifitäten gegen verschiedene Epitope. In BALB/C Mäusen dominieren CD8⁺ T Zellen gegen ein Epitope des IE-1 (91). In C57BL/6 Mäusen ist das Repertoire deutlich diverser (185). Die Verwendung von Ovalbumin exprimierenden MCMV- Δ M94 als Surrogatantigen und der adoptive Transfer der Ovalbumin-spezifischen CD8⁺ und CD4⁺ T Zellen erlaubt in C57BL/6 Mäusen eine einfache quantitative Analyse der Expansion der T Zellen. Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T Zellen zeigen nach Infektion mit MCMV- Δ M94-*ova* eine mit dem replikationskompetenten Virus vergleichbare T Zell-Proliferation. Die Proliferation Ovalbumin-spezifischer CD8⁺ T Zellen ist gegenüber dem replikationskompetenten Virus sogar erhöht. Das verbreitungsdefiziente MCMV- Δ M94 bleibt auf die primäre Zielzelle beschränkt. Die Expression des Antigens dort ist für die starke Induktion der Proliferation verantwortlich. Auch unter Verwendung replikationsdefizienter HSV Mutanten können mit

Wildtypvirus vergleichbare T Zellantworten gemessen werden (118). Die Lyse der mit verschiedenen viralen Epitopen beladenen Zielzellen zeigt zudem, dass die durch MCMV- $\Delta M94$ induzierte CD8⁺ T Zellantwort auch in ihrer Effektivität gegen Antigen-präsentierende (-beladene) Zellen mit der Wildtypinfektion vergleichbar ist. Die Verbreitung des Virus stellt also keine Notwendigkeit für die Induktion einer effektiven T Zellantwort dar.

5.4 Vergleich zwischen verbreitungsdefizientem MCMV mit attenuiertem MCMV

Das Konzept der Vakzine $\Delta m01-17+m144-158$ -MCMV beruhte auf der gezielten Attenuierung durch Deletion nicht-essentieller Gene. Diese Vakzine ist bereits getestet (109) und wird hier mit MCMV- $\Delta M94$ verglichen. Interessanterweise können beide Vakzinen ähnlich starken Schutz gegen MCMV-*wt* erreichen.

Die konservierten Gene, die alle Herpesviren teilen, befinden sich in colinearen Bereichen der Genome von MCMV und HCMV. Diese Gene kodieren für essentielle Funktionen des Viruseintritts, der Morphogenese und des DNA Metabolismus. An den Genomenden finden sich Gene, die nur in spezifischen CMV-Spezies vorkommen. Viele dieser Gene sind nicht essentiell für die Virusreplikation und kodieren Funktionen, die die angeborene oder adaptive Immunantwort des Wirtes beeinflussen. Einige Gene modulieren Signalwege von Zytokinen oder Chemokinen (186,187,188,189), regulieren die natürliche Killer (NK) Zell Antwort (124,135,190,191) oder die Funktion der dendritischen Zellen (192), regulieren die Präsentation auf MHC-Klasse-I (193,194,195), verhindern Apoptose (196,197), kontrollieren die Interferon Antwort (198) oder die Aktivierung von Proteinkinase R (PKR) durch doppelsträngige RNA (199). Die Deletion von Genen, welche immunmodulatorische oder immunevasive Funktionen vermitteln, resultieren bei $\Delta m01$ -

17+m144-158-MCMV in einem Verlust von Virulenz *in vivo*. In MCMV- $\Delta M94$ sind hingegen alle Immunmodulatoren vorhanden. Die Virusproduktion von $\Delta m01-17+m144-158$ -MCMV in der Zellkultur, einer Voraussetzung für die Vakzineherstellung ist auf Komplementation essentieller Gene wie bei MCMV- $\Delta M94$ nicht angewiesen. In $\Delta m01-17+m144-158$ -MCMV blieben einige immunmodulatorische Funktionen, die die Replikation in der Zelle betreffen, wie Apoptose-Inhibitoren oder Gene, die Interferonresistenz vermitteln, bewusst erhalten, da die Deletion dieser Gene die Virusproduktion beeinträchtigen könnte (196,198). Der durch Deletion von Genblöcken entstandene Mutante $\Delta m01-17+m144-158$ -MCMV fehlen insgesamt 32 Gene (etwa 30kb) an beiden Enden des Virusgenoms (109). Damit werden die meisten bekannten Immunmodulatoren die die Funktion der NK Antwort und MHC-Klasse-I Präsentation regulieren entfernt. Der Verlust der Immunmodulatoren, der keine essentielle Funktion der Virusreplikation betrifft, führt zu keiner Einschränkung der Virusproduktion in Zellkultur. *In vivo* ist $\Delta m01-17+m144-158$ -MCMV in immunkompetenten BALB/c Mäusen *in vivo* stark attenuiert, induziert aber MCMV spezifische Antikörper und eine spezifische T Zellantwort. Durch eine nach der Impfung ausgeführte Kontrollinfektion mit MCMV-*wt* kann eine protektive Immunantwort, die mit dem der Wildtyp Impfung vergleichbar ist, nachgewiesen werden (109). Die erfolgreiche Testung der $\Delta m01-17+m144-158$ -MCMV Vakzine legt den Vergleich mit der Impfung mit MCMV- $\Delta M94$ nahe. Interessant ist das trotz völlig unterschiedlichem Konzept die Gemeinsamkeit beider Ansätze auf der gezielten Deletion von Genen beruht, die durch mehr oder weniger umfassenden Aufklärung von Genfunktionen begründet ist. Die gezielte Deletion von Genblöcken, die viele Immunmodulatoren kodieren, führt zu einer gezielt erreichten

Generierung eines attenuierten Lebendimpfstoffes. Die Deletion des essentiellen Gens *M94* führt zu einem Lebendimpfstoff dessen Grad an Attenuierung die Verbreitungsdefizienz erreicht.

Auch die Immunantwort gegen MCMV- $\Delta M94$ ist mit der des MCMV-*wt* vergleichbar und der vermittelte Schutz ist ähnlich wie nach Impfung mit $\Delta m01-17+m144-158$ -MCMV (Abb. 4.15). In beiden Konzepten wird zudem die Impfsicherheit durch die Infektion von IFN $\alpha\beta$ R^{-/-} Mäusen getestet, die hoch anfällig für die Infektion mit MCMV sind (Abb. 4.6 und 4.16). Auch bei Infektion mit $\Delta m01-17+m144-158$ -MCMV überleben alle Mäuse eine Dosis, die bei Applikation von MCMV-*wt* für alle Mäuse tödlich ist.

In weiteren Experimenten kann in $\Delta m01-17+m144-158$ -MCMV die Deletion auf die Gene *m159-m170* ausgedehnt werden (115) und ein rekombinantes Virus erzeugt werden indem insgesamt 43 der 170 MCMV Gene fehlen ($\Delta m01-17+\Delta m144-158+\Delta m159-m170$). Die Deletion von mehr als 40kb des Virusgenoms resultierte immer noch in einem verbreitungskompetenten Virus, dieses ist bereits in verschiedenen Zelltypen *in vitro* deutlich in der Replikationsfähigkeit eingeschränkt. Die Deletion jeder Genregion für sich allein oder die Kombination von je zwei Genblöcken resultiert nicht in einer Attenuierung. Die Replikation eines Virus mit Deletionen von z.B. *m144-158* und *m159-m170* ist vergleichbar mit dem des MCMV-*wt*. Diese Mutanten werden in diesem Kontext aus zwei Gründen genannt; erstens zeigt dies, dass große Teile des Genoms deletiert werden können ohne die Virusreplikation zu verhindern und zweitens dass mehr Wissen über Funktionen einzelner Gene eine bessere Selektion erlaubt, welche Gene deletiert und welche Gene erhalten bleiben müssen. In $\Delta m01-17+m144-158$ -MCMV werden immunmodulatorische Gene deletiert, um die antivirale Immunantwort zu verstärken und dabei das Virus zu attenuieren. Die Kombination beider Ansätze, die Deletion

mindestens eines essentiellen Gens einerseits kombiniert mit der Deletion ausgewählter Immunmodulatoren andererseits (2) verspricht Raum für eine verbesserte Immunogenität und verbesserte Sicherheit. Voraussetzung hierfür wäre die Aufklärung weiterer Genfunktionen immunmodulatorischer Gene im HCMV, da die in $\Delta m01-17+m144-158$ -MCMV deletierten Gene keine direkten Homologe in HCMV besitzen.

5.5 Die Rolle der primär infizierten Zielzellen für die antivirale Immunantwort

Im Vergleich des attenuierten $\Delta m01-17+m144-158$ -MCMV mit dem verbreitungsdefizienten MCMV- $\Delta M94$ blieb bisher ein Vorteil des verbreitungsdefizienten MCMV unerwähnt. Die Attenuierung des $\Delta m01-17+m144-158$ -MCMV führt unmittelbar in der zunächst infizierten Zelle zu einer verstärkten Immunantwort (durch Deletion der Immunmodulatoren). Die Verbreitung in Nachbarzellen schließt dies nicht aus, macht es aber unwahrscheinlich. MCMV- $\Delta M94$ und der Ausschluß der Verbreitungsdefizienz beschränkt die Infektion auf die primär infizierte Zielzelle. Dies eröffnet die Möglichkeit die erste Zielzelle in ihrer Rolle für die Immunantwort zu untersuchen. *In vivo* zählen Endothelzellen (EC), Hepatozyten (Hc) und Makrophagen zu diesen ersten Zielzellen der HCMV und MCMV Infektion (133,200). Ausserdem sind EC kürzlich als Ort der viralen CMV Latenz beschrieben worden (201) und zumindest EC der Leber können zudem direkt CD8⁺ T Zellen stimulieren (202).

Die Versuche mit konditionalen Cre-induzierbaren MCMV- $\Delta M94$ Konstrukten zeigen deutliche Unterschiede, zwischen EC und Hepatozyten in ihrer Kapazität CD8⁺ T Zellantworten zu aktivieren. Die Cre-vermittelte Schaltung in Hepatozyten, einem der für die Virusproduktion wichtigen primären Zielzelltypen während akuter

MCMV Infektion (133), kann im Gegensatz zu EC eine nur schwache CD8⁺ T Zellproliferation auslösen. Dieser Unterschied wird offensichtlich durch die Kreuzpräsentation vermittelt durch professionell Antigen präsentierende Zellen nicht kompensiert. Mittels Transfer infizierter Fibroblasten, die mit einer DISC-MCMV Mutante infiziert werden und Antigen nicht präsentieren können, kann gezeigt werden, dass die Kreuzpräsentation bereits für die Induktion der CD8⁺ T Zellantwort ausreicht (133). Andererseits scheinen professionelle Antigen präsentierende Knochenmarkszellen, die als wichtige kreuzpräsentierende Zellen gelten wurden, für die Aktivierung der CD8⁺ T Zellantwort gegen MCMV via Kreuzpräsentation nicht notwendig (202). Die konstitutive Ovalbumin-Expression in MCMV- $\Delta M94-ova$, also in den meisten infizierten Zellen, führt zu einer deutlich stärkeren T Zellproliferation, als bei Schaltung in EC alleine. Es müssen also neben EC weitere Zelltypen zur Stimulation der CD8⁺ T Zellen beitragen. Infizierte dendritische Zellen und Makrophagen können *in vitro* T Zellen aktivieren (203) und werden auch *in vivo* von MCMV infiziert (204). Es ist deshalb sehr naheliegend, dass professionelle Antigen präsentierende Zellen infiziert oder mittels kreuzpräsentation neben EC zur Stimulation der CD8⁺ T Zellen beitragen.

Werden diese Aussagen durch die Durchlässigkeit der verwendeten Kassetten relativiert? Auch nach Umbau des konditionalen Ovalbumin-Konstrukts wird eine starke zytotoxische Aktivität Ovalbumin-spezifischer CD8⁺ T Zellen, in Abwesenheit von Cre und Cre-vermittelter Schaltung nachgewiesen. Die basale Expression des Ovalbumin ist also auch im nicht-angeschalteten Virus präsent. Hierdurch wird die Aussagekraft der Ergebnisse jedoch nicht aufgehoben, sondern lediglich relativiert. Die

Schaltung erfolgt noch immer spezifisch, im durch die verwendete Maus bestimmten Zelltyp. Die induzierte Proliferation, wurde folglich also durch die Schaltung im betreffenden Zelltyp hervorgerufen. Nur das hoch empfindliche System der zytotoxischen Aktivität, lässt keine Differenzierung zu. Die Präsentation des Antigens ist hierbei offensichtlich nicht auf den cre⁺ Zelltyp beschränkt, doch kann angenommen werden, dass die Expression dennoch vorwiegend in diesen Zelltypen stattfindet (133). Auch die Unterschiede in der CD8⁺ T Zellproliferation zwischen den verschiedenen getesteten Cre-transgenen Mäusen macht dies deutlich.

Auch ohne basale Expression des Ovalbumin ist Antigen-Präsentation nicht allein auf den Cre-exprimierenden Zelltyp beschränkt. Antigen kann kreuzpräsentiert werden, d.h. Bestandteile infizierte Zellen können (mit Virus und bereits geschalteter Expressionskassette oder bereits exprimiertem Ovalbumin) phagozytiert und von dritten Zellen präsentiert werden. Wie könnte man den Beitrag der Kreuzpräsentation dennoch ausschliessen? T Zell-Rezeptor transgene OT-I T Zellen sind spezifisch für ein Ovalbumin-Peptid, das durch das MHC Klasse-I Molekül H-2K^b präsentiert wird. Eine Mutation in diesem Molekül (H2-K^{bm1}) verhindert die Präsentation des OVA Peptids für OT-I Zellen (205). Werden die H-2k^b Knochenmarkszellen in den Cre-transgenen Mäusen durch Bestrahlung abgetötet und mit Knochenmark aus H2-K^{bm1} Mäusen ersetzt würden aus den Knochenmarkzellen abgeleitete Zellen Ovalbumin nicht kreuzpräsentieren können. Diese Möglichkeit besteht auch, wenn auf andere Zelltyp-spezifische Systeme zurückgegriffen wird; z.B. zell- oder gewebespezifische Promotoren das Fremdantigen direkt im Viruskontext exprimieren würden. Die Zelltyp-spezifische Expression des Antigens *in vivo* ist dabei nicht auf eine schaltbare

Kassette angewiesen. Die Verwendung des Cre/loxP Systems und die Vielzahl verfügbarer Zelltyp-spezifisch Cre-exprimierender Mäuse war jedoch ein attraktiver Ansatz, da er die Verwendung ein und derselben Virusmutante, unter Verwendung ein und des selben Promotors, in allen Mäusen erlaubte. Die Steuerung von Transgenen durch Zelltyp-spezifische Promotoren zur Expression des Antigens im Virusgenom ist denkbar, jedoch abhängig von der Klonierkapazität des Virus und der Länge der einzufügenden Promotorsequenz. Letztlich bieten Zelltyp-spezifische Promotoren auch die Möglichkeit transgene Mäuse zu erzeugen, die die Präsentation des Ovalbumin-Peptids nur auf einem bestimmten Zelltyp zulassen. So kann die beschriebene H2-K^{bm1} Maus als Transgen das Konstrukt Tie2-H2-K^b tragen (206), was nun die Expression des MHC Klasse I-Moleküls das OVA präsentieren kann nur in Endothelzellen zulässt. Dies würde die weitere Charakterisierung der Endothelzellen in der antiviralen Immunantwort erlauben. Allerdings gilt auch für solche Ansätze, dass die Promotoren wirklich strikt Zelltyp spezifisch sind und auch unter Infektionsbedingungen bleiben. Immerhin kann bereits aus den hier vorgestellten Daten der Schluß gezogen werden, dass die Infektion von Endothelzellen zur antiviralen Immunantwort beiträgt.

Es scheint in diesem Zusammenhang nennenswert, dass attenuierte HCMV Stämme wie Towne und AD169, die sich durch eine 20-fach geringere Immunogenität und mit dem Unvermögen behaftet sind, ausreichend schützende Immunantworten zu etablieren (86). Diese Stämme beinhalten Mutationen, die die Infektion von EC, Epithelzellen, glatten Muskelzellen und Makrophagen ausschließt (20). Dieser eingeschränkte Zelltropismus könnte möglicherweise für das Versagen von Towne und AD169 als HCMV-Vakzinen verantwortlich sein. Schon allein deshalb wäre es von großem

Interesse die Rolle verschiedener Zelltypen in ihrem Beitrag zur CD8⁺ T Zellantwort und zur Protektion näher zu untersuchen.

5.6 Die Rolle der primär infizierten Zielzellen für die virale Langzeit-Infektion

Die Verwendung von MCMV- $\Delta M94$ als Vakzine, beruht auf seiner Eigenschaft, die primäre Zielzelle zu infizieren und dort analog zur Wildtyp-Infektion, virale DNA zu replizieren, Proteine zu exprimieren und bis zur späten mutationsbedingten Unterbrechung den Infektionsablauf fortzuführen. Solche Virusmutanten stellen jedoch genau aus diesem Grund, über den Impfgedanken hinaus interessante Werkzeuge dar, die das Studium allgemeiner Mechanismen im Infektionsablauf erlauben.

Auch das hier vorgestellte verbreitungsdefiziente MCMV- $\Delta M94$ bietet Möglichkeiten, offene Fragen der herpesviralen Infektion, bzw. der antiviralen Immunantwort gegen Herpesviren genauer zu untersuchen.

Warum ist die Immunantwort gegen MCMV- $\Delta M94$ mit der gegen MCMV-*wt* vergleichbar, obwohl MCMV- $\Delta M94$ sich nicht verbreiten kann? In Mäusen könnten noch ein Jahr nach Infektion mit MCMV- $\Delta M94$ virale Genome mittels PCR nachgewiesen werden (Abb.:4.17). Die Anzahl der nachgewiesenen Genome ist ähnlich wie nach Infektion mit MCMV-*wt*. Die klassische Definition herpesviraler Latenz beinhaltet das Potential der Reaktivierung von Genexpression und die Freisetzung infektiöser Viren (207). Die Möglichkeit zur Reaktivierung einer produktiven Infektion ist mit einem verbreitungsdefiziente Virus nicht gegeben. Der Begriff "Latenz" ist formal für diese Situation in Abwesenheit produktiver Infektion nicht anwendbar. Tibbets et al. schlugen für ihre Arbeiten mit verbreitungsdefizientem murinem γ -Herpesvirus deshalb eine Unterscheidung von Latent und Langzeit-Infektion vor (208).

Diesem Vorschlag soll hier gefolgt werden. Der Nachweis Langzeit-infizierter Zellen impliziert, dass bereits bestimmte primäre Zielzellen gegen Eliminierung durch die antivirale Immunantwort resistent sind.

Durch Mutation des DNA Einzelstrang-Bindeprotein des murinen γ -Herpesvirus MHV68 kann eine Virusmutante hergestellt werden, die weder reaktivieren noch replizieren kann (209). Nach i.p. Injektion einer hohen Virusdosis des verbreitungsdefizienten γ -Herpesvirus können virale Genomkopien in B-Zellen der Milz nachgewiesen werden (210). Selbst in Abwesenheit einer lytischen Replikation kann so eine Langzeit-Infektion erreicht werden, die der des Wildtypvirus vergleichbar ist. Dies erlaubt den Schluss, dass produktive Virusvermehrung keine Voraussetzung für die Langzeit-Infektion von Herpesviren darstellt. Zudem ist die Anzahl langzeit-infizierter Zellen in Mäusen ohne T und B Zellen nicht verändert. Dies ist eine interessante Beobachtung, die nahe legt, dass die adaptive Immunantwort, nach Ablauf der akuten Infektion, nicht mehr effektiv das verbreitungsdefiziente Virus reduziert und damit der Ort der Langzeit-Infektion immunologisch neutral bleibt (208). Diese Beobachtung könnte erklären, warum die Detektion der Genome verbreitungsdefizienter Viren möglich ist und infizierte Zellen nicht schließlich vom Immunsystem eliminiert werden. Für MCMV-*wt* wurde gezeigt, dass T Zellen gegen ein virales Epitope des M45 Proteins welches von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen präsentiert wird, dennoch die infizierten Zielzellen nicht eliminieren (211). Dieser Schutz wird durch das virale immunmodulatorische Gen *m152* vermittelt. *m152* reguliert MHC Klasse-I Moleküle herab und wirkt so Antigenpräsentation in der infizierten Zelle entgegen. Diejenigen Zielzellen, die der Eliminierung durch CD8⁺ T Zellen entgingen wurden nicht identifiziert. Die Infektion mit MCMV- Δ M94 zeigt,

dass zumindest einige dieser geschützten Zellen primäre Zielzellen der MCMV-Infektion darstellen müssen.

Zwischen den Unterfamilien der Herpesviren ist das Stadium der viralen Latenz und dessen Etablierung offensichtlich unterschiedlich. Durch Deletion eines DNA Einzelstrang-Bindeproteins (ICP8, pUL29) und eines Teils des Helikase-Primase-Komplexes (pUL5) aus HSV-2 entsteht ein replikationsdefektes HSV-2 Virus (212,213), das wie MCMV- $\Delta M94$ oder das MHV68-Pendant gegen Wildtypinfektion schützende Immunantworten stimuliert, die Durchsetzung oder Erhaltung einer Langzeit-Infektion jedoch stark beeinträchtigt. Nach subkutaner Injektion erreicht nur sehr wenig DNA die Ganglien und geht dort rasch verloren (212).

Der Status der β -Herpesvirusinfektion nach abgelaufener akuter Infektion wird kontrovers diskutiert. Dass MCMV eine echte molekulare Latenz etabliert, und nicht, wie zuerst angenommen, eine persistente produktive Infektion auf geringem Level, wird derzeit vorrangig angenommen. Die Abwesenheit von infektiösen Viren als Kriterium für die virale Latenz, hängt allerdings sehr von der Sensitivität der verwendeten Nachweismethoden, z.B. dem Standard-Plaque Assay ab. Offensichtlich liefert Abwesenheit von Infektiosität, beim Nachweis eingeschränkter Sensitivität, nicht den Beweis für das Vorhandensein einer molekularen Latenz und kann Persistenz auf geringem Niveau nicht ausschließen. Der Nachweis von IE1 Transkripten (35) in Abwesenheit nachweisbarer infektiöser Partikel in latent infizierten Lungen, wurde zunächst als Beweis für die Persistenz auf geringem Niveau gesehen, da IE Transkripte als Hinweis auf einen lytischen Replikationszyklus interpretiert wurden. Heute wird hingegen angenommen, dass Expression von IE1 ein zwar seltenes jedoch auch in der Latenz vorkommendes Ereignis darstellt (214). Neuere Studien sprechen für eine echte molekulare Latenz des MCMV in Milz und Niere (33) sowie in der

Lunge (215). Dass Genome des MCMV- $\Delta M94$ noch nach einem Jahr nach Infektion nachgewiesen werden kann unterstreicht zudem, dass ein Stadium echter molekularer Latenz (zumindest in der Lunge) existiert. Die Verbreitungsdefizienz des MCMV- $\Delta M94$ schließt lediglich das Vorhandensein infektiöser Partikel, aus. Der schützende Effekt des MCMV- $\Delta M94$ nahm über die Zeit eher zu als ab (Abb. 4.15). Es ist denkbar, dass durch Reaktivierungsereignisse eine periodische Restimulation des Immunsystems stattfindet und zur schützenden Immunantwort beiträgt. Es wäre zukünftig spannend, zu klären, ob die Reaktivierung der Genexpression, (z.B. durch Nachweis von IE1 Transkripten) bei Langzeit-Infektion mit MCMV- $\Delta M94$ nachweisbar ist.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Mocarski,E.S. & Courcelle,C.T. Cytomegaloviruses and their replication in Fields virology (eds. Knipe,D.M. & Howley,P.M.) 2629-2673 (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2000).
2. Scalzo,A.A., Corbett,A.J., Rawlinson,W.D., Scott,G.M., & Degli-Esposti,M.A. The interplay between host and viral factors in shaping the outcome of cytomegalovirus infection. *Immunol Cell Biol.* 85, 46-54 (2007).
3. Roizman,B. & Pellett,P.E. The family Herpesviridae: A Brief Introduction in Virology (eds. Fields,B.N., Knipe,D.M. & Howley,P.M.) 2479-2500 (Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, P.A.; USA, 2007).
4. Mohr,C.A., Mühlbach,H., Ruzsics,Z., & Koszinowski,U. Dominant-Negative Proteins in Herpesviruses - From Assigning Gene Function to Intracellular Immunization. *Viruses* 1, 420-440 (2009).
5. Salsman,J., Zimmerman,N., Chen,T., Domagala,M., & Frappier,L. Genome-wide screen of three herpesviruses for protein subcellular localization and alteration of PML nuclear bodies. *Plos Pathogens* 4, (2008).
6. Roizman,B. et al. Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* 16, 201-217 (1981).

7. Roizman,B. The structure and isomerization of herpes simplex virus genomes. *Cell* 16, 481-494 (1979).
8. Roizman,B. & Whitley,R.J. The nine ages of herpes simplex virus. *Herpes*. 8, 23-27 (2001).
9. Buhler,B., Keil,G.M., Weiland,F., & Koszinowski,U.H. Characterization of the murine cytomegalovirus early transcription unit e1 that is induced by immediate-early proteins. *J Virol* 64, 1907-1919 (1990).
10. Fauquet,C.M. & Mayo,M.A. The Double Stranded DNA Viruses in *Virus Taxonomy* (eds. Fauquet,C.M., Mayo,M.A., Maniloff,J., Desselberger,U. & Ball,L.A.) 33-276 (Elsevier Academic Press, San Diego, CA, USA, 2005).
11. Nowlin,D.M., Cooper,N.R., & Compton,T. Expression of a human cytomegalovirus receptor correlates with infectibility of cells. *J Virol* 65, 3114-3121 (1991).
12. Compton,T., Nowlin,D.M., & Cooper,N.R. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* 193, 834-841 (1993).
13. Kari,B. & Gehrz,R. Structure, composition and heparin binding properties of a human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II. *J Gen Virol* 74 (Pt 2), 255-264 (1993).
14. Carlson,C., Britt,W.J., & Compton,T. Expression, purification, and characterization of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B. *Virology* 239, 198-205 (1997).

15. Halary,F. et al. Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity* 17, 653-664 (2002).
16. Riegler,S. et al. Monocyte-derived dendritic cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 81, 393-399 (2000).
17. Huber,M.T. & Compton,T. The human cytomegalovirus UL74 gene encodes the third component of the glycoprotein H-glycoprotein L-containing envelope complex. *J Virol* 72, 8191-8197 (1998).
18. Adler,B. et al. Role of human cytomegalovirus UL131A in cell type-specific virus entry and release. *J Gen Virol.* 87, 2451-2460 (2006).
19. Graham,F.L., Smiley,J., Russell,W.C., & Nairn,R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 36, 59-74 (1977).
20. Hahn,G. et al. Human cytomegalovirus UL131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes. *J Virol.* 78, 10023-10033 (2004).
21. Wang,D. & Shenk,T. Human cytomegalovirus UL131 open reading frame is required for epithelial cell tropism. *J Virol.* 79, 10330-10338 (2005).
22. Bodaghi,B. et al. Entry of human cytomegalovirus into retinal pigment epithelial and endothelial cells by

- endocytosis. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 40, 2598-2607 (1999).
23. Scrivano,L. et al. The m74 gene product of murine cytomegalovirus (MCMV) is a functional homolog of human CMV gO and determines the entry pathway of MCMV. *J Virol* 84(9):4469-80. (2010).
24. Ryckman,B.J., Jarvis,M.A., Drummond,D.D., Nelson,J.A., & Johnson,D.C. Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. *J Virol* 80, 710-722 (2006).
25. Patrone,M., Secchi,M., Bonaparte,E., Milanesi,G., & Gallina,A. Cytomegalovirus UL131-128 products promote gB conformational transition and gB-gH interaction during entry into endothelial cells. *J Virol* 81, 11479-11488 (2007).
26. Stinski,M.F. Sequence of protein synthesis in cells infected by human cytomegalovirus: early and late virus-induced polypeptides. *J Virol* 26, 686-701 (1978).
27. Baxter,M.K. & Gibson,W. Cytomegalovirus basic phosphoprotein (pUL32) binds to capsids in vitro through its amino one-third. *J Virol* 75, 6865-6873 (2001).
28. Trus,B.L., Gibson,W., Cheng,N., & Steven,A.C. Capsid structure of simian cytomegalovirus from cryoelectron microscopy: evidence for tegument attachment sites. *J Virol* 73, 2181-2192 (1999).

29. Brack,A.R. et al. Role of the cytoplasmic tail of pseudorabies virus glycoprotein E in virion formation. *J Virol* 74, 4004-4016 (2000).
30. Silva,M.C., Yu,Q.C., Enquist,L., & Shenk,T. Human cytomegalovirus UL99-encoded pp28 is required for the cytoplasmic envelopment of tegument-associated capsids. . *J Virol* 77, 10594-10605 (2003).
31. Mettenleiter,T.C., Klupp,B.G., & Granzow,H. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr Opin. Microbiol* 9, 423-429 (2006).
32. Pollock,J.L., Presti,R.M., Paetzold,S., & Virgin,H.W. Latent murine cytomegalovirus infection in macrophages. *Virology* 227, 168-179 (1997).
33. Pollock,J.L. & Virgin,H.W. Latency, without persistence, of murine cytomegalovirus in the spleen and kidney. *J Virol* 69, 1762-1768 (1995).
34. Koffron,A.J. et al. Cellular localization of latent murine cytomegalovirus. *J Virol* 72, 95-103 (1998).[^]
35. Yuhasz,S.A., Dissette,V.B., Cook,M.L., & Stevens,J.G. Murine Cytomegalovirus Is Present in Both Chronic Active and Latent States in Persistently Infected Mice. *Virology*. 202, 272-280 (1994).
36. Mocarski,E.S., Shenk,T., & Pass,R.F. Cytomegaloviruses in Fields *Virology* (eds. Knipe,D.M. & Howley,P.M.) 2701-2772 (Lippincott Williams and Wilkins, a Wolters Kluwer Business, Philadelphia, PA, 2007).

37. Hanshaw,J.B. & Dudgeon,J.A. Congenital cytomegalovirus. Major Probl Clin Pediatr. 17, 97-152 (1978).
38. Stagno,S. & Whitley,R.J. Current Concepts - Herpesvirus Infections of Pregnancy .1. Cytomegalo-Virus and Epstein-Barr Virus-Infections. 313, 1270-1274 (1985).
39. Pass,R.F., Hutto,C., Ricks,R., & Cloud,G.A. Increased Rate of Cytomegalovirus-Infection Among Parents of Children Attending Day-Care-Centers. N Engl J Med. 314, 1414-1418 (1986).
40. KAARIAIN.L, Klemola,E., & PALOHEIM.J Rise of Cytomegalovirus Antibodies in An Infectious-Mononucleosis-Like Syndrome After Transfusion. Br Med J. 1, 1270-& (1966).
41. Stagno,S. et al. Congenital Cytomegalovirus-Infection - the Relative Importance of Primary and Recurrent Maternal Infection. N Engl J Med. 306, 945-949 (1982).
42. Whitley,R.J. Congenital cytomegalovirus infection: epidemiology and treatment. Adv. Exp Med Biol 549, 155-160 (2004).
43. Boppana,S.B. et al. Neuroradiographic findings in the newborn period and long-term outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. Pediatrics. 99, 409-414 (1997).
44. Boppana,S.B., Rivera,L.B., Fowler,K.B., Mach,M., & Britt,W.J. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. N Engl J Med. 344, 1366-1371 (2001).

45. Ross,S.A. et al. Association between genital tract cytomegalovirus infection and bacterial vaginosis. *J Infect Dis.* 192, 1727-1730 (2005).
46. Dahle,A.J. et al. Longitudinal investigation of hearing disorders in children with congenital cytomegalovirus. *J Am Acad Audiol.* 11, 283-290 (2000).
47. Moskowitz,L.B., Gregorios,J.B., Hensley,G.T., & Berger,J.R. Cytomegalovirus - Induced Demyelination Associated with "Acquired-Immune-Deficiency-Syndrome. *Arch Pathol Lab Med.* 108, 873-877 (1984).
48. Drew,W.L. Cytomegalovirus Disease in the Highly Active Antiretroviral Therapy Era *Curr Infect Dis Rep.* 5, 257-265 (2003).
49. Suwansirikul,S., Rao,N., Dowling,J.N., & Ho,M. Primary and Secondary Cytomegalovirus-Infection. *Arch Intern Med.* 137, 1026-1029 (1977).
50. Neiman,P.E. et al. Prospective Analysis of Interstitial Pneumonia and Opportunistic Viral-Infection Among Recipients of Allogeneic Bone-Marrow Grafts. *J Infect Dis.*136, 754-767 (1977).
51. Potena,L. et al. Frequent occult infection with cytomegalovirus in cardiac transplant recipients despite antiviral prophylaxis. *J Clin Microbiol.* 45, 1804-1810 (2007).
52. Reinke,P., Prosch,S., Kern,F., & Volk,H.D. Mechanisms of human cytomegalovirus (HCMV) (re)activation and its

- impact on organ transplant patients. *Transpl Infect Dis.* 1, 157-164 (1999).
53. Matthews,T. & Boehme,R. Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir. *Rev Infect Dis.* 10 Suppl 3, S490-S494 (1988).
54. Biron,K.K. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res.* 71, 154-163 (2006).
55. Markham,A. & Faulds,D. Ganciclovir. An update of its therapeutic use in cytomegalovirus infection. *Drugs.* 48, 455-484 (1994).
56. Nigro,G., Adler,S.P., La Torre,R., & Best,A.M. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med.* 353, 1350-1362 (2005).
57. Ruzsics,Z. & Koszinowski,U.H. Mutagenesis of the cytomegalovirus genome. *Curr Top Microbiol Immunol.* 325, 41-61 (2008).
58. Weller,T.H. Review. Cytomegaloviruses: the difficult years. *J Infect Dis.* 122, 532-539 (1970).
59. Lafemina,R.L. & Hayward,G.S. Differences in Cell Type-Specific Blocks to Immediate Early Gene-Expression and Dna-Replication of Human, Simian and Murine Cytomegalo-Virus. *J Gen Virol.* 69, 355-374 (1988).
60. Perot,K., Walker,C.M., & Spaete,R.R. Primary chimpanzee skin fibroblast cells are fully permissive for human

- cytomegalovirus replication. *J Gen Virol.*73 (Pt 12), 3281-3284 (1992).
61. Bruggeman,C.A. et al. Isolation of A Cytomegalovirus-Like Agent from Wild Rats. *Arch Virol.* 73, 231-241 (1982).
62. Smith,C.B., Wei,L.S., & Griffiths,M. Mouse Cytomegalovirus Is Infectious for Rats and Alters Lymphocyte Subsets and Spleen-Cell Proliferation. *Arch Virol* 90, 313-323 (1986).
63. Kim,K.S. & Carp,R.I. Abortive Infection of Human Diploid Cells by Murine Cytomegalovirus. *Infect Immun.* 6, 793-& (1972).
64. Fioretti,A., Furukawa,T., Santoli,D., & Plotkin,S.A. Nonproductive Infection of Guinea-Pig Cells with Human Cytomegalovirus. *J Virol.*11, 998-1003 (1973).
65. Jurak,I. & Brune,W. Induction of apoptosis limits cytomegalovirus cross-species infection. *EMBO J.* 25, 2634-2642 (2006).
66. Krmpotic,A., Bubic,I., Polic,B., Lucin,P., & Jonjic,S. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. *Microbes Infect.* 5, 1263-1277 (2003).
67. Stoddart,C.A. et al. Peripheral blood mononuclear phagocytes mediate dissemination of murine cytomegalovirus. *J Virol.*68, 6243-6253 (1994).
68. Saederup,N., Lin,Y.C., Dairaghi,D.J., Schall,T.J., & Mocarski,E.S. Cytomegalovirus-encoded beta chemokine

- promotes monocyte-associated viremia in the host. Proc Natl Acad Sci U S A. 96, 10881-10886 (1999).
- 69 Murphy,K.M., Travers,P., & Walport,M. Janeway's Immunobiology(2007).
70. Takeda,K. & Akira,S. Toll-like receptors in innate immunity. Infect Immun.17, 1-14 (2005).
71. Barton,G.M. Viral recognition by Toll-like receptors. Semin Immunol.19, 33-40 (2007).
72. French,A.R. & Yokoyama,W.M. Natural killer cells and viral infections Curr Opin Immunol. 15, 45-51 (2003).
73. Karre,K., Ljunggren,H.G., Piontek,G., & Kiessling,R. Selective Rejection of H-2-Deficient Lymphoma Variants Suggests Alternative Immune Defense Strategy. Nature319, 675-678 (1986).
74. Ljunggren,H.G. & Karre,K. In Search of the Missing Self - Mhc Molecules and Nk Cell Recognition. Immunol Today.11, 237-244 (1990).
75. Trinchieri,G. Biology of Natural-Killer Cells. Adv Immunol. 47, 187-376 (1989).
76. Benz,C., Reusch,U., Muranyi,W., & Hengel,H. Distinct regulation of MHC class I in human cytomegalovirus infected epithelial cells of hepatobiliary and intestinal origin. J Gen Virol. 118, A957 (2000).

77. Dokun,A.O. et al. Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection. *Nat Immunol.* 2, 951-956 (2001).
78. Arase,H., Mocarski,E.S., Campbell,A.E., Hill,A.B., & Lanier,L.L. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science.* 296, 1323-1326 (2002).
79. Smith,H.R.C. et al. Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 8826-8831 (2002).
80. Brown,M.G. et al. Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science.* 292, 934-937 (2001).
81. Daniels,K.A. et al. Murine cytomegalovirus is regulated by a discrete subset of natural killer cells reactive with monoclonal antibody to Ly49H. *J Exp Med.* 194, 29-44 (2001).
82. Lee,S.H. et al. Transgenic expression of the activating natural killer receptor Ly49H confers resistance to cytomegalovirus in genetically susceptible mice. *J Exp Med.* 197, 515-526 (2003).
83. Reddehase,M.J., Mutter,W., Munch,K., Buhring,H.J., & Koszinowski,U.H. CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *J Virol.* 61, 3102-3108 (1987).
84. Jonjic,S., Mutter,W., Weiland,F., Reddehase,M.J., & Koszinowski,U.H. Site-restricted persistent

- cytomegalovirus infection after selective long-term depletion of CD4⁺ T lymphocytes. *J Exp Med* 169, 1199-1212 (1989).
85. Walter, E.A. et al. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med.* 333, 1038-1044 (1995).
86. Adler, S.P. et al. Immunity induced by primary human cytomegalovirus infection protects against secondary infection among women of childbearing age. *J Infect Dis.* 171, 26-32 (1995).
87. Landini, M.P. & Laplaca, M. Humoral Immune-Response to Human Cytomegalovirus Proteins - A Brief Review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 14, 97-105 (1991).
88. Holtappels, R., Thomas, D., Podlech, J., & Reddehase, M.J. Two antigenic peptides from genes m123 and m164 of murine cytomegalovirus quantitatively dominate CD8 T-cell memory in the H-2(d) haplotype. *J Virol.* 76, 151-164 (2002).
89. Holtappels, R., Pahl-Seibert, M.F., Thomas, D., & Reddehase, M.J. Enrichment of immediate-early 1 (m123/pp89) peptide-specific CD8 T cells in a pulmonary CD62L(lo) memory-effector cell pool during latent murine cytomegalovirus infection of the lungs. *J Virol.* 74, 11495-11503 (2000).
90. Podlech, J., Holtappels, R., Pahl-Seibert, M.F., Steffens, H.P., & Reddehase, M.J. 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 (2000).
91. Karrer,U. et al. Memory inflation: continuous accumulation of antiviral CD8+ T cells over time. *J Immunol.* 170, 2022-2029 (2003).
92. Snyder,C.M. et al. Memory inflation during chronic viral infection is maintained by continuous production of short-lived, functional T cells. *Immunity.*29, 650-659 (2008).
93. Jonjic,S., Pavic,I., Lucin,P., Rukavina,D., & Koszinowski,U.H. Efficacious Control of Cytomegalovirus-Infection After Long-Term Depletion of Cd8+ Lymphocytes-T. *J Virol.* 64, 5457-5464 (1990).
94. Mills,K.H. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol.* 4, 841-855 (2004).
95. Stratton,K., Durch,J., & Lawrence,R. Vaccines for the 21st Century: A Tool for Decisionmaking(NATIONAL ACADEMY PRESS, Washington, D.C., 1999).
96. Barrett,P.N., Mundt,W., Kistner,O., & Howard,M.K. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 8, 607-618 (2009).
97. Iyer,S., Mittal,M.K., & Hodinka,R.L. Herpes Zoster and Meningitis Resulting From Reactivation of Varicella Vaccine Virus in an Immunocompetent Child. *Ann Emerg Med.* 53, 792-795 (2009).

98. Elek,S.D. & Stern,H. Development of a vaccine against mental retardation caused by cytomegalovirus infection in utero. *Lancet*.1, 1-5 (1974).
99. Neff,B.J., Weibel,R.E., Buynak,E.B., McLean,A.A., & Hilleman,M.R. Clinical and laboratory studies of live cytomegalovirus vaccine Ad-169. *Proc Soc Exp Biol Med*. 160, 32-37 (1979).
100. Stern,H. Live cytomegalovirus vaccination of healthy volunteers: eight-year follow-up studies. *Birth Defects Orig Artic Ser*.20, 263-269 (1984).
101. Adler,S.P., Hempfling,S.H., Starr,S.E., Plotkin,S.A., & Riddell,S. Safety and immunogenicity of the Towne strain cytomegalovirus vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 17, 200-206 (1998).
102. Gonczol,E., Ianacone,J., Furlini,G., Ho,W., & Plotkin,S.A. Humoral immune response to cytomegalovirus Towne vaccine strain and to Toledo low-passage strain. *J Infect Dis*. 159, 851-859 (1989).
103. Just,M., Buergin-Wolff,A., Emoedi,G., & Hernandez,R. Immunisation trials with live attenuated cytomegalovirus TOWNE 125. *Infection*. 3, 111-114 (1975).
104. Fleisher,G.R., Starr,S.E., Friedman,H.M., & Plotkin,S.A. Vaccination of pediatric nurses with live attenuated cytomegalovirus. *Am J Dis Child*. 136, 294-296 (1982).
105. Gehrz,R.C., Christianson,W.R., Linner,K.M., Groth,K.E., & Balfour,H.H., Jr. Cytomegalovirus vaccine. Specific

- humoral and cellular immune responses in human volunteers. *Arch Intern Med.* 140, 936-939 (1980).
106. Plotkin,S.A., Starr,S.E., Friedman,H.M., Gonczol,E., & Weibel,R.E. Protective effects of Towne cytomegalovirus vaccine against low-passage cytomegalovirus administered as a challenge. *J Infect Dis.*159, 860-865 (1989).
107. Quinnan,G.V., Jr. et al. Comparative virulence and immunogenicity of the Towne strain and a nonattenuated strain of cytomegalovirus. *Ann Intern Med.* 101, 478-483 (1984).
108. Starr,S.E., Glazer,J.P., Friedman,H.M., Farquhar,J.D., & Plotkin,S.A. Specific cellular and humoral immunity after immunization with live Towne strain cytomegalovirus vaccine. *J Infect Dis.*143, 585-589 (1981).
109. Cicin-Sain,L. et al. Targeted deletion of regions rich in immune-evasive genes from the cytomegalovirus genome as a novel vaccine strategy. *J. Virol* 81, 13825-13834 (2007).
110. Tolpin,M.D., Starr,S.E., Arbeter,A.M., & Plotkin,S.A. Inactivated mouse cytomegalovirus vaccine: preparation, immunogenicity, and protective effect. *J Infect Dis*142, 569-574 (1980).
111. Britt,W.J., Vugler,L., Butfiloski,E.J., & Stephens,E.B. Cell surface expression of human cytomegalovirus (HCMV) gp55-116 (gB): use of HCMV-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response. *J Virol.* 64, 1079-1085 (1990).

112. Fowler,K.B. et al. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med.*326, 663-667 (1992).
113. Sylwester,A.W. et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4(+) and CD8(+) T cells dominate the memory compartments of exposed subjects *J Exp Med.* 202, 673-685 (2005).
114. Schleiss,M.R. & Heineman,T.C. Progress toward an elusive goal: current status of cytomegalovirus vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 4, 381-406 (2005).
115. Mohr,C.A. et al. Engineering of cytomegalovirus genomes for recombinant live herpesvirus vaccines. *Int J Med Microbiol.* 298, 115-125 (2008).
116. Powers,C., DeFilippis,V., Malouli,D., & Fruh,K. Cytomegalovirus immune evasion. *Human Cytomegalovirus* 325, 333-359 (2008).
117. Dudek,T. & Knipe,D.M. Replication-defective viruses as vaccines and vaccine vectors. *Virology.*344, 230-239 (2006).
118. Nguyen,L.H., Knipe,D.M., & Finberg,R.W. Replication-defective mutants of herpes simplex virus (HSV) induce cellular immunity and protect against lethal HSV infection. *J Virol.* 66, 7067-7072 (1992).
119. Babu,J.S. et al. Viral replication is required for induction of ocular immunopathology by herpes simplex virus. *J Virol.* 70, 101-107 (1996).

120. Da Costa,X.J., Morrison,L.A., & Knipe,D.M. Comparison of different forms of herpes simplex replication-defective mutant viruses as vaccines in a mouse model of HSV-2 genital infection. *Virology*. 288, 256-263 (2001).
121. Morrison,L.A. & Knipe,D.M. Immunization with replication-defective mutants of herpes simplex virus type 1: sites of immune intervention in pathogenesis of challenge virus infection. *J Virol*. 68, 689-696 (1994).
122. Forrester,A. et al. Construction and properties of a mutant of herpes simplex virus type 1 with glycoprotein H coding sequences deleted. *J Virol*. 66, 341-348 (1992).
123. Loudon,P.T. et al. Preclinical safety testing of DISC-hGMCSF to support phase I clinical trials in cancer patients *J Gene Med..* 3, 458-467 (2001).
124. Kattenhorn,L.M. et al. Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions. *J Virol*. 78, 11187-11197 (2004).
125. Scott,G.M., Barrell,B.G., Oram,J., & Rawlinson,W.D. Characterisation of transcripts from the human cytomegalovirus genes TRL7, UL20a, UL36, UL65, UL94, US3 and US34. *Virus Genes*. 24, 39-48 (2002).
126. Wing,B.A., Lee,G.C., & Huang,E.S. The human cytomegalovirus UL94 open reading frame encodes a conserved herpesvirus capsid/tegument-associated virion protein that is expressed with true late kinetics. *J Virol*. 70, 3339-3345 (1996).

127. Dunn,W. et al. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. Proc Natl Acad Sci U S A. 100, 14223-14228 (2003).
128. Dolan,A. et al. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. J Gen Virol. 85, 1301-1312 (2004).
129. Revello,M.G. et al. In vitro selection of human cytomegalovirus variants unable to transfer virus and virus products from infected cells to polymorphonuclear leukocytes and to grow in endothelial cells. J Gen Virol. 82, 1429-1438 (2001).
130. Lewandoski,M. Conditional control of gene expression in the mouse. Nat Rev Genet. 2, 743-755 (2001).
131. Sternberg,N. & Hamilton,D. Bacteriophage-P1 Site-Specific Recombination .1. Recombination Between Loxp Sites. J Mol Biol. 150, 467-486 (1981).
132. Sauer,B. Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. Methods. 14, 381-392 (1998).
133. Sacher,T. et al. The major virus-producing cell type during murine cytomegalovirus infection, the hepatocyte, is not the source of virus dissemination in the host Cell Host Microbe.. 3, 263-272 (2008).
134. Messerle,M., Crnkovic,I., Hammerschmidt,W., Ziegler,H., & Koszinowski,U.H. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. Proc Natl Acad Sci U S A94, 14759-14763 (1997).

135. Rawlinson,W.D., Farrell,H.E., & Barrell,B.G. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. Proc Natl Acad Sci U S A 70, 8833-8849 (1996).
136. Lotzerich,M., Ruzsics,Z., & Koszinowski,U.H. Functional domains of murine cytomegalovirus nuclear egress protein M53/p38. J. Virol 80, 73-84 (2006).
137. Muller,U. et al. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. Science 264, 1918-1921 (1994).
138. Hogquist,K.A. et al. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. Cell. 76, 17-27 (1994).
139. Barnden,M.J., Allison,J., Heath,W.R., & Carbone,F.R. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. Immunol Cell Biol. 76, 34-40 (1998).
140. Postic,C. et al. Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. J Biol Chem. 274, 305-315 (1999).
141. Constien,R. et al. Characterization of a novel EGFP reporter mouse to monitor Cre recombination as demonstrated by a Tie2 Cre mouse line. Genesis. 30, 36-44 (2001).
142. Trgovcich,J. et al. Immune responses and cytokine induction in the development of severe hepatitis during acute infections with murine cytomegalovirus. Arch Virol 145, 2601-2618 (2000).

143. Pilgrim,M.J. et al. A focused salivary gland infection with attenuated MCMV: an animal model with prevention of pathology associated with systemic MCMV infection. *Exp Mol Pathol.* 82, 269-279 (2007).
144. Lauterbach,H., Ried,C., Epstein,A.L., Marconi,P., & Brocker,T. Reduced immune responses after vaccination with a recombinant herpes simplex virus type 1 vector in the presence of antiviral immunity. *J Gen Virol* 86, 2401-2410 (2005).
145. Cicin-Sain,L., Podlech,J., Messerle,M., Reddehase,M.J., & Koszinowski,U.H. Frequent coinfection of cells explains functional in vivo complementation between cytomegalovirus variants in the multiply infected host. *J. Virol* 79, 9492-9502 (2005).
146. Roizman,B. et al. Application of molecular genetics to the design of live herpes simplex virus vaccines. *Dev Biol Stand.* 52, 287-304 (1982).
147. Presti,R.M., Pollock,J.L., Dal Canto,A.J., O'Guin,A.K., & Virgin,H.W. Interferon gamma regulates acute and latent murine cytomegalovirus infection and chronic disease of the great vessels. *J Exp Med.* 188, 577-588 (1998).
148. Gill,T.A., Morley,P.J., & Sweet,C. Replication-defective mutants of mouse cytomegalovirus protect against wild-type virus challenge. *J Med Virol.* 62, 127-139 (2000).
149. Karrer,U. et al. Expansion of protective CD8+ T-cell responses driven by recombinant cytomegaloviruses. *J Virol.* 78, 2255-2264 (2004).

150. Zhang,Z.W. & Lutz,B. Cre recombinase-mediated inversion using lox66 and lox71: method to introduce conditional point mutations into the CREB-binding protein. *Nucleic Acids Res.* 30, (2002).
151. Oberdoerffer,P., Otipoby,K.L., Maruyama,M., & Rajewsky,K. Unidirectional Cre-mediated genetic inversion in mice using the mutant loxP pair lox66/lox71. *Nucleic Acids Res.* 31, (2003).
152. Sun,J.C. & Lanier,L.L. Tolerance of NK cells encountering their viral ligand during development. *J Exp Med.* 205, 1819-1828 (2008).
153. Vanzijl,M. et al. Regeneration of Herpesviruses from Molecularly Cloned ubgenomic Fragments. *J Virol.* 62, 2191-2195 (1988).
154. Wagner,M., Ruzsics,Z., & Koszinowski,U.H. Herpesvirus genetics has come of age. *Trends Microbiol.* 10, 318-324 (2002).
155. Aucoin,D.P., Smith,G.B., Meiering,C.D., & Mocarski,E.S. Betaherpesvirus-conserved cytomegalovirus tegument protein ppUL32 (pp150) controls cytoplasmic events during virion maturation. *J Virol.* 80, 8199-8210 (2006).
156. Valchanova,R.S., Picard-Maureau,M., Budt,M., & Brune,W. Murine cytomegalovirus m142 and m143 are both required to block protein kinase R-mediated shutdown of protein synthesis. *J Virol.*80, 10181-10190 (2006).

157. Grant,K.G., Krisky,D.M., Ataii,M.M., & Glorioso,J.C. Engineering Cell Lines for Production of Replication Defective HSV-1 Gene Therapy Vectors. *Biotechnol Bioeng.* 102, 1087-1097 (2009).
158. Dwarakanath,R.S., Clark,C.L., McElroy,A.K., & Spector,D.H. The use of recombinant baculoviruses for sustained expression of human cytomegalovirus immediate early proteins in fibroblasts. *Virology.* 284, 297-307 (2001).
159. Sanders,R.L., Clark,C.L., Morello,C.S., & Spector,D.H. Development of cell lines that provide tightly controlled temporal translation of the human cytomegalovirus IE2 proteins for complementation and functional analyses of growth-impaired and nonviable IE2 mutant viruses. *J Virol.* 82, 7059-7077 (2008).
160. Gossen,M. & Bujard,H. Tight Control of Gene-Expression in Mammalian-Cells by Tetracycline-Responsive Promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 5547-5551 (1992).
161. Thyagarajan,B., Guimaraes,M.J., Groth,A.C., & Calos,M.P. Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene.* 244, 47-54 (2000).
162. Murphy,J.A., Duerst,R.J., Smith,T.J., & Morrison,L.A. Herpes simplex virus type 2 virion host shutoff protein regulates alpha/beta interferon but not adaptive immune responses during primary infection in vivo. *J Virol.* 77, 9337-9345 (2003).
163. Samady,L. et al. Deletion of the virion host shutoff protein (vhs) from herpes simplex virus (HSV) relieves the viral block to dendritic cell activation: Potential of vhs(-) HSV

- vectors for dendritic cell-mediated immunotherapy. *J Virol.* 77, 3768-3776 (2003).
164. Prechtel,A.T. et al. Infection of mature dendritic cells with herpes simplex virus type 1 dramatically reduces lymphoid chemokine-mediated migration. *J Gen Virol.* 86, 1645-1657 (2005).
165. Taylor,J., Weinberg,R., Languet,B., Desmettre,P., & Paoletti,E. Recombinant fowlpox virus inducing protective immunity in non-avian species. *Vaccine.*6, 497-503 (1988).
166. Farrell,H.E. et al. Vaccine Potential of A Herpes-Simplex Virus Type-1 Mutant with An Essential Glycoprotein Deleted *J Virol.* 68, 927-932 (1994).
167. McLean,C.S. et al. Protective vaccination against primary and recurrent disease caused by herpes simplex virus (HSV) type 2 using a genetically disabled HSV-1. *J Infect Dis* 170, 1100-1109 (1994).
168. MacDonald,G.H. & Johnston,R.E. Role of dendritic cell targeting in Venezuelan equine encephalitis virus pathogenesis. *J Virol.*74, 914-922 (2000).
169. Mitani,K., Graham,F.L., Caskey,C.T., & Kochanek,S. Rescue, propagation, and partial purification of a helper virus-dependent adenovirus vector. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 3854-3858 (1995).
170. DaCosta,X.J., Bourne,N., Stanberry,L.R., & Knipe,D.M. Construction and characterization of a replication-defective herpes simplex virus 2 ICP8 mutant strain and its use in

- immunization studies in a guinea pig model of genital disease. *Virology*.232, 1-12 (1997).
171. Morello,C.S., Ye,M., & Spector,D.H. Development of a vaccine against murine cytomegalovirus (MCMV), consisting of plasmid DNA and formalin-inactivated MCMV, that provides long-term, complete protection against viral replication. . *J Virol*. 76, 4822-4835 (2002).
172. MacDonald,M.R., Li,X.Y., Stenberg,R.M., Campbell,A.E., & Virgin,H.W. Mucosal and parenteral vaccination against acute and latent murine cytomegalovirus (MCMV) infection by using an attenuated MCMV mutant. *J Virol*. 72, 442-451 (1998).
173. Morello,C.S., Cranmer,L.D., & Spector,D.H. In vivo replication, latency, and immunogenicity of murine cytomegalovirus mutants with deletions in the M83 and M84 genes, the putative homologs of human cytomegalovirus pp65 (UL83). *J Virol*. 73, 7678-7693 (1999).
174. Nalwanga,D., Rempel,S., Roizman,B., & Baines,J.D. The UL 16 gene product of herpes simplex virus 1 is a virion protein that colocalizes with intranuclear capsid proteins. *Virology*. 226, 236-242 (1996).
175. Meckes,D.G. & Wills,J.W. Dynamic interactions of the UL16 tegument protein with the capsid of herpes simplex virus. *J Virol*. 81, 13028-13036 (2007).
176. Loomis,J.S., Courtney,R.J., & Wills,J.W. Binding partners for the UL11 tegument protein of herpes simplex virus type 1. *J Virol*. 77, 11417-11424 (2003).

177. Lunardi,C. et al. Antibodies against human cytomegalovirus in the pathogenesis of systemic sclerosis: a gene array approach. *PLoS Med.*3, e2 (2006).
178. Lunardi,C. et al. Systemic sclerosis immunoglobulin G autoantibodies bind the human cytomegalovirus late protein UL94 and induce apoptosis in human endothelial cells. *Nat Med.* 6, 1183-1186 (2000).
179. Klotman,M.E., Starnes,D., & Hamilton,J.D. The Source of Murine Cytomegalo-Virus in Mice Receiving Kidney Allografts. *J Infect Dis.* 152, 1192-1196 (1985).
180. Bale,J.F., Petheram,S.J., Souza,I.E., & Murph,J.R. Cytomegalovirus reinfection in young children. *J Pediatr.* 128, 347-352 (1996).
181. Coaquette,A. et al. Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis.* 39, 155-161 (2004).
182. Rasmussen,L. et al. Cytomegalovirus gB genotype distribution differs in human immunodeficiency virus - Infected patients and immunocompromised allograft recipients. *J Infect Dis.* 175, 179-184 (1997).
183. Fowler,K.B., Stagno,S., & Pass,R.F. Maternal immunity and prevention of congenital cytomegalovirus infection. *JAMA.* 289, 1008-1011 (2003).
184. Hokeness-Antonelli,K.L., Crane,M.J., Dragoi,A.M., Chu,W.M., & Salazar-Mather,T.P. IFN-alpha beta-Mediated inflammatory responses and antiviral Defense in liver is TLR9-Independent but MyD88-Dependent during murine

- cytomegalovirus infection. *J Immunol.* 179, 6176-6183 (2007).
185. Munks,M.W. et al. Genome-wide analysis reveals a highly diverse CD8 T cell response to murine cytomegalovirus. *J Immunol.* 176, 3760-3766 (2006).
186. Fleming,P. et al. The murine cytomegalovirus chemokine homolog, m131/129, is a determinant of viral pathogenicity. *J Virol.* 73, 6800-6809 (1999).
187. Khan,S., Zimmermann,A., Basler,M., Groettrup,M., & Hengel,H. A cytomegalovirus inhibitor of gamma interferon signaling controls immunoproteasome induction. *J Virol.* 78, 1831-1842 (2004).
188. Lee,M. et al. Genetic analyses of gene function and pathogenesis of murine cytomegalovirus by transposon-mediated mutagenesis. *J Clin Virol.* 25, S111-S122 (2002).
189. Sweet,C., Ball,K., Morley,P.J., Guilfoyle,K., & Kirby,M. Mutations in the temperature-sensitive murine cytomegalovirus (MCMV) mutants tsm5 and tsm30: A study of genes involved in immune evasion, DNA packaging and processing, and DNA replication. *J Med Virol.* 79, 285-299 (2007).
190. Thale,R., Lucin,P., Schneider,K., Eggers,M., & Koszinowski,U.H. Identification and Expression of A Murine Cytomegalovirus Early Gene Coding for An Fc Receptor. *J Virol.* 68, 7757-7765 (1994).

191. Zhu,J.M. et al. In vitro and in vivo characterization of a murine cytomegalovirus with a mutation at open reading frame m166. *J Virol.* 77, 2882-2891 (2003).
192. Loewendorf,A. et al. Identification of a mouse cytomegalovirus gene selectively targeting CD86 expression on antigen-presenting cells. *J Virol.* 78, 13062-13071 (2004).
193. Kleijnen,M.F. et al. A mouse cytomegalovirus glycoprotein, gp34, forms a complex with folded class I MHC molecules in the ER which is not retained but is transported to the cell surface. *EMBO J.* 16, 685-694 (1997).
194. Reusch,U. et al. A cytomegalovirus glycoprotein re-routes MHC class I complexes to lysosomes for degradation. *EMBO J.* 18, 1081-1091 (1999).
195. Ziegler,H. et al. A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/cis-Golgi compartments. *Immunity.* 6, 57-66 (1997).
196. Menard,C. et al. Role of murine cytomegalovirus US22 gene family members in replication in macrophages. *J Virol.*77, 5557-5570 (2003).
197. Lembo,D. et al. The thymidylate synthase inhibitor ZD1694 potently inhibits murine and human cytomegalovirus replication in quiescent fibroblasts. *Antiviral Res.* 47, 111-120 (2000).
198. Zimmermann,A. et al. A cytomegaloviral protein reveals a dual role for STAT2 in IFN-gamma signaling and antiviral responses. *J Exp Med.* 201, 1543-1553 (2005).

199. Child,S.J., Jarrahan,S., Harper,V.M., & Geballe,A.P. Complementation of vaccinia virus lacking the double-stranded RNA-binding protein gene E3L by human cytomegalovirus. *J Virol.* 76, 4912-4918 (2002).
200. Hsu,K.M., Pratt,J.R., Akers,W.J., Achilefu,S.I., & Yokoyama,W.M. Murine cytomegalovirus displays selective infection of cells within hours after systemic administration. *J Gen Virol.* 90, 33-43 (2009).
201. Seckert,C.K. et al. Liver Sinusoidal Endothelial Cells Are a Site of Murine Cytomegalovirus Latency and Reactivation. *J Virol.*83, 8869-8884 (2009).
202. Kern,M. et al. Virally infected mouse liver endothelial cells trigger CD8+ T-cell immunity. *Gastroenterology.* 138, 336-346 (2010).
203. Mathys,S. et al. Dendritic cells under influence of mouse cytomegalovirus have a physiologic dual role: to initiate and to restrict T cell activation. *J Infect Dis.* 187, 988-999 (2003).
204. Andrews,D.M. et al. NK1.1(+) cells and murine cytomegalovirus infection: What happens in situ? *J Immunol.*166, 1796-1802 (2001).
205. Nikolic-Zugic,J. & Carbone,F.R. The effect of mutations in the MHC class I peptide binding groove on the cytotoxic T lymphocyte recognition of the Kb-restricted ovalbumin determinant. *Eur J Immunol.* 20, 2431-2437 (1990).

206. Limmer,A. et al. Cross-presentation of oral antigens by liver sinusoidal endothelial cells leads to CD8 T cell tolerance. *Eur J Immunol.* 35, 2970-2981 (2005).
207. Roizman,B. & Sears,A.E. An Inquiry Into the Mechanisms of Herpes-Simplex Virus Latency. *Annu Rev Microbiol.* 41, 543-571 (1987).
208. Tibbetts,S.A., Suarez,F., Steed,A.L., Simmons,J.A., & Virgin,H.W. A gamma-herpesvirus deficient in replication establishes chronic infection in vivo and is impervious to restriction by adaptive immune cells. *Virology.* 353, 210-219 (2006).
209. Jia,Q.M., Wu,T.T., Liao,H.I., Chernishof,V., & Sun,R. Murine gammaherpesvirus 68 open reading frame 31 is required for viral replication. *J Virol.* 78, 6610-6620 (2004).
210. Flano,E. et al. Early establishment of gamma-herpesvirus latency: Implications for immune control. *J Immunol.* 174, 4972-4978 (2005).
211. Holtappels,R. et al. 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 (2004).
212. Da Costa,X.J., Jones,C.A., & Knipe,D.M. Immunization against genital herpes with a vaccine virus that has defects in productive and latent infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.*96, 6994-6998 (1999).
213. Da Costa,X., Kramer,M.F., Zhu,J., Brockman,M.A., & Knipe,D.M. Construction, phenotypic analysis, and

- immunogenicity of a UL5/UL29 double deletion mutant of herpes simplex virus 2. *J Virol.* 74, 7963-7971 (2000).
214. Reddehase,M.J., Podlech,Y., & Grzimek,N.K.A. Mouse models of cytomegalovirus latency: overview. *J Clin Virol.* 25, S23-S36 (2002).
215. Kurz,S.K. & Reddehase,M.J. Patchwork pattern of transcriptional reactivation in the lungs indicates sequential checkpoints in the transition from murine cytomegalovirus latency to recurrence. *J Virol.* 73, 8612-8622 (1999).

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ab	antibody, Antikörper
Abb.	Abbildung
AD169	attenuierter HCMV-Labor-stamm
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome; erworbenes Immundefektsyndrom
Alb-cre	Transgene Mauslinie mit Cre Expression in Hepatozyten
Amp	Ampicillin
APC	antigen presenting cell; Antigen präsentierende Zellen, B6, C57BL/6 Labormaus Inzuchtlinie
BAC	Bacterial Artificial Chromosome; künstliches Chromosom entwickelt aus dem single-copy F-Plasmid von E. coli
BALB/c	Labormaus Inzuchtlinie,
Bg	background, Hintergrund
Boost	mehrfache (oder 2te) Applikation eines Impfstoffes zur Stimulierung des Immunsystems, vor allem der Antikörper Antwort
bp	Basenpaar(e)
C57BL/6, B6	Labormaus Inzuchtlinie
ca.	circa
Cam	Chloramphenicol
CD	Cluster of differentiation.
CD4	CD4-Rezeptor; Erkennungsmolekül in die Zellmembran von T-Helferzellen, Monocyten und Makrophagen
CD45	Tyrosinphosphatase nahezu aller Zellen des hämatopoetischen Systems

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CD45.1	congener Subtyp des CD45 in den verwendeten OT TCR-tg Mäusen
CD45.2	congener Subtyp des CD45 in C57BL/6
CD8	CD8-Rezeptor; Erkennungsmolekül in die Zellmembran von cytotoxische T-Zellen
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CMV	Cytomegalovirus
Cre	causes recombination; Rekombinase, die intramolekulare (exzusive oder inversive) und intermolekulare (integrative) Rekombination zwischen loxP Stellen vermittelt
cre-tg	cre transgene Maus
D	Deutschland
d	days, Tage
Days pi / dpi	Tage nach Infektion; days post infection
DC	dendritic cell; dendritische Zelle
DC-SIGN	DC-Specific ICAM-Grabbing Nonintegrin
DISC	disabled infectious single cycle virus
DNA rep	DNA Replikation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	early, früh exprimierte Gene nach CMV-Infektion
EBV	Epstein-Barr-Virus
EC	Endothelial Cells, Endothelzellen
EGFP	enhanced green flourescent protein, verbessertes Grün-fluoreszierendes Protein
ER	endoplasmatisches Reticulum
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
gB, gH, gL	Glykoprotein B, H oder L
gefloxt	flankiert von zwei loxP Stellen in gleicher Orientierung
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie

Hc	hepatocytes, Hepatozyten
HCMV	humanes Cytomegalovirus
HHV	humanes Herpesvirus
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HSV	Herpes Simplwx Virus
i.p.	intra peritoneal
i.v.	intra venös
ICAM	Intercellular adhesion molecules; Interzelluläre Adhäsionsmoleküle
IE	immediate early; die erst exprimierten Gene nach CMV-Infektion
IFN	Interferon
IFNAR	IFN-alpha/beta Rezeptor
IFN $\alpha\beta$ R-/-	Interferon Typ I Rezeptor knock-out
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IR	internal repeats
JAK	Januskinase
Kan	Kanamycin
Kb(p)	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilodalton
KIR	killer cell immunoglobulin-like receptor
KLRD1	Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1
Konz.	Konzentration
KSHV	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus
L	late, spät exprimierte Gene nach CMV-Infektion
LD	Letale Dosis, Bei LD _{50/30d} sterben 50 % nach 30 Tagen
Log ₁₀	Logarithmus, $x = \log_b a$ bei $a = b^x$
loxP	locus of X-ing over; besteht aus zwei 13 bp invertierten Repeats die durch eine 8 bp asymmetrische Spacerregion getrennt sind

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Lsg.	Lösung
luc	Firefly-Luciferase aus dem Leuchtkäfer
Ly49H	aktivierender NK Zell Rezeptor, der Resistenz gegen MCMV Infektion vermittelt
MCMV	murines Cytomegalovirus
MDA-5	melanoma differentiation-associated gene-5
MDV	Marek's disease virus
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast, embryonale Mausfibroblasten
MHC	Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
MHEC5-T	murine myocardium-derived endothelial cell line (mouse heart endothelial cell clone 5; MHEC5; spontaneously transformed variant (clone MHEC5-T))
MMR	Masern, Mumps und Röteln
Mo	Monozyte
MOI	multiplicity of infection
MΦ	Makrophage
NCS	newborn calf serum (neugeborenes Kälberserum)
NIH/3T3	Maus Fibroblasten Zell-Linie
NKG2	auch CD159a; ein aktivierender Rezeptor der NK-Zellen
NKG2D	Typ II Transmembranprotein der NKG2 Rezeptorfamilie mit einer extrazellulären C-type Lectin-ähnlichen Domäne
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NT/M94-7	Klon der Zelllinie, die zur Trans-Komplementation des M94 verwendet wurde
ORF	open reading frame; offenes Leseraster
OT-I	TCR transgener Mausstamm, CD8+ T Zellen spezifisch für MHC-I präsentiertes Ovalbumin Peptid

OT-II	TCR transgener Mausstamm, CD84 T Zellen spezifisch für MHC-II präsentierte Ovalbumin Peptid
OVA	Ovalbumin, Hauptbestandteil des Hühnereiweiß
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern; Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBL	peripheral blood lymphocytes, Lymphozyten im peripheren Blut
PBS	phosphate buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PFU	plaque forming unit, Plaque bildende Einheit
pp65	Phosphoprotein 65
Prime	erste Applikation einer Vakzine zur Stimulation der Immunantwort
PRR	Pattern-Recognition Receptors; mustererkennende Rezeptoren
PrV	Pseudorabies Virus
pSM3fr	molekularer BAC Clon des MCMV des Smith Stamms
PTLD	post-transplant lymphoproliferative disorders; Lymphoproliferative Erkrankung nach Transplantation
rec	recombined; rekombiniert
RIG-I	retinoic acid inducible gene I;
RLU	relative light units, relative Einheit der Lichtintensität als Maß der Luciferase-Aktivität
rpm	rounds per minute (Runden pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s.c.	sub cutan
SD	Standard Deviation, Standardabweichung
SEM	Standard Error of the Mean, Standardfehler
spez.	spezifisch

STAT	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
TCID ₅₀	median tissue culture infectious dose;
TCR	T-Zell-Rezeptor ; T cell receptor
TCR-tg	transgener T-Zell-Rezeptor
TGF	Transformations-Wachstumsfaktor
Th1	CD4 ⁺ -Lymphozyten, die Interferon- γ (IFN- γ), IL-2, und TNF- α sezernieren
Th2	CD4 ⁺ -Lymphozyten, die die Zytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 erzeugen
Tie2- <i>cre</i>	Transgene Mauslinie mit Cre Expression in vaskulären EC
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TR	terminal repeat
TRE	Tetracycline-Responsive Element
tTA	Tetracycline-controlled Transactivator; Fusionsprotein aus dem Tet-Repressor und der VP16-Aktivierungsdomäne; bindet spezifisch an TRE und aktiviert Transgenexpression in Abwesenheit von Doxycyclin
u.a.	unter anderem
UL	unique region -long
US	unique region -short
UV	Ultraviolettes Licht
vergl.	vergleiche
Vol.	Volumen
vs.	versus, gegen
VZV	Varizella-Zoster-Virus
wt	Wildtyp; MCMV- <i>wt</i> bezieht sich auf das Virus des molekularen Clons pSM3fr

8 PUBLIKATIONSLISTE

<i>Ein Teil der Promotionsarbeit wurde als</i>	
<i>Patentanmeldung beim Europ. Patentamt eingereicht:</i>	
Vaccine against β -herpesvirus infection and use thereof	05/2010 EP 10 005 045.9
 <i>Teile der Promotionsarbeit wurden/wird</i>	
<i>im Rahmen folgender Publikation veröffentlicht:</i>	
Intracellular Vaccination with dominant-negative proteins Mühlbach H, Mohr CA, Ruzsics Z, Wolf E, Koszinowski UH	2011 in preparation
Genetical Analysis of the dominant-negative MCMV protein M94 Maninger S, Mohr CA, Walter P, Loesing J, Ruzsics Z, Koszinowski UH	2011, submitted in preparation
The role of cell types in cytomegalovirus infection in vivo. Sacher T, Mohr CA, Weyn A, Schlichting C, Koszinowski UH, Ruzsics Z. Review	04/2011 Eur J Cell Biol.
A spread deficient cytomegalovirus for assessment of first target cells in vaccination Mohr CA, Arapovic J, Mühlbach H, Panzer M, Weyn A, Dölken L, Krmpotic A, Voehringer D, Ruzsics Z, Koszinowski U, Sacher T.	05/2010 J.Virol
The m74 gene product of MCMV, a functional homolog of HCMV gO, determines the entry pathway of MCMV Scrivano L, Esterlechner J, Mühlbach H, Mohr CA, Koszinowski UH, Adler B	02/2010 J.Virol

<p>Dominant-negative proteins – from assigning gene function to intracellular immunization</p> <p>Mohr CA, Mühlbach H, Ruzsics Z, Koszinowski UH</p> <p>special issue “antiviral responses to herpes viruses”, Review</p>	<p>10/2009</p> <p>Viruses</p>
<p>Conditional gene expression systems to study herpesvirus biology <i>in vivo</i></p> <p>Sacher T, Jordan S, Mohr CA, Vidy A, Weyn AM, Ruzsics Z, Koszinowski UH.</p> <p>Med Microbiol Immunol., Review</p>	<p>06/2008</p> <p>Med Microbiol Immunol.</p>
<p>The major virus-producing cell type during murine cytomegalovirus infection, the hepatocyte, is not the source of virus dissemination in the host</p> <p>Sacher T, Podlech J, Mohr CA, Jordan S, Ruzsics Z, Reddehase MJ, Koszinowski UH.</p>	<p>04/2008</p> <p>Cell Host Microbe</p>
<p>Targeted deletion of regions rich in immune-evasive genes from the cytomegalovirus genome as a novel vaccine strategy</p> <p>Cicin-Sain L, Bubić I, Schnee M, Ruzsics Z, Mohr C, Jonjić S, Koszinowski UH.</p>	<p>10/2007</p> <p>J Virol.</p>
<p>Engineering of cytomegalovirus genomes for recombinant live herpesvirus vaccines</p> <p>Mohr CA, Cîcîn-Saîn L, Wagner M, Sacher T, Schnee M, Ruzsics Z, Koszinowski UH.</p> <p>Review</p>	<p>08/2007</p> <p>Int J Med Microbiol.</p>

*Teile der Diplom-Arbeit wurden im Rahmen folgender
Publikation veröffentlicht:*

Phosphorylation-dependent maturation of
Neurospora circadian clock protein from a nuclear
repressor toward a cytoplasmic activator.
Schafmeier T, Káldi K, Diernfellner A, Mohr CA,
Brunner M.

01/2006
Genes Dev.

Die bei LION verrichtete Arbeit wurden anerkannt in:

Automated yeast two-hybrid screening
for nuclear receptor-interacting proteins
Albers M, Kranz H, [...], Suckow J, Kern R, Koegl M

12/2004
Mol Cell Proteomics

9 CURRICULUM VITAE

Christian A. Mohr

Diplom-Biologe

Gottfried-Böhm-Ring 63

81369 München

Persönliche Daten

geboren am 12.03.1979

in Heidelberg

verheiratet, 1 Kind

Werdegang

Ausbildung zum deutschen Patentanwalt und
European Patent and Trademark Attorney
Kanzlei bohmann | | bohmann, München 04/2010 – heute

Bayerischer Forschungsverbund FORPROTECT 01/2010 – 04/2010
Leitung der Geschäftsstelle
Koordination von Forschung in Industrie und
Universität

Promotion

Ein verbreitungsdefizientes murines
Cytomegalovirus als Modellvakzine gegen
die Infektion mit β -Herpesviren 04/2005 - 08/2010

Max von Pettenkofer-Institut;

AG Prof. Ulrich Koszinowski

Tätigkeiten begleitend zur Promotion

wissenschaftl. Arbeit am Max-von-Pettenkofer Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie, Lehrstuhl Virologie am Genzentrum der LMU München AG Prof. Ulrich Koszinowski	12/2004 – 12/2009
Sprecher der „junior faculty“ des DFG Sonderforschungsbereiches 455 „Virale Funktionen und Immunmodulation“ Durchführung und Planung von Vortragsreihen, Seminaren und Kongressen	10/2006 - 12/2009
Diagnostische Beratung im virologischen Notfalldienst am Max-von-Pettenkofer Institut	10/2006 – 12/2009
Virologisch-diagnostische Telefon-Beratung im 24 Stunden-Dienst, Durchführung von serologischen Tests und Befundung in der Transplantations-Serologie	
Erfolgreiche Teilnahme am „Versuchstierkundlichen Kurs für Personen, die für die Leitung von Tierversuchen verantwortlich sind“ Erlaubnis zur Leitung von Tierversuchsvorhaben	03/2007

Diplom-Studium

Studium Diplom-Biologie an der Universität 10/1998-9/2004
Heidelberg

Studienschwerpunkte:

Molekularbiologie und Biochemie/Biophysik

Nebenfach:

Rechtswissenschaften
(Schwerpunkt: Umwelt- und
Umweltverwaltungsrecht
sowie Verwaltungs- und Zivilrecht)

Teil-Note: 1,3

Diplomarbeit: 12/2003-09/2004

Biochemiezentrum der Universität Heidelberg
AG Prof. Michael Brunner
Funktionelle Charakterisierung der PEST-2-
Sequenz
von Frequency in *Neurospora crassa*

Note: 1,0

Abschluss:

Diplom-Biologe

Abschluss-Note: 1,7

sonstige Berufserfahrung

Hilfswissenschaftler bei AG Prof. Michael Brunner, Biochemie Zentrum Heidelberg	04/2002 – 09/2004
Labor-Student bei Lion Bioscience AG, im Bereich drug discovery	02/2001 – 03/2002
Hilfswissenschaftler bei AG Prof. Michael Brandt , Neurobiologie	09/2000 – 01/2001
Freiwilliges Laborpraktikum bei AG Prof. Werner Franke, DKFZ Heidelberg	04/2000

Mitgliedschaften:

Deutsche Vereinigung für gewerblichen Rechtsschutz und Urheberrecht (GRUR)	2010 - heute
Gesellschaft für Virologie (GfV)	2008 – heute
Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie e.V. (GBM)	2009 – heute
Federation of European Biochemical Societies (FEBS)	
International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB)	

Universitäre Projekte

Mitglied des Fakultätsrates der Fakultät für Biologie: Mitarbeit an verschiedenen Projekten als studentische Vertretung	WS 2000 – SS 2001
--	-------------------