

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

**Infektion dendritischer Zellen mit murinem Zytomegalovirus:
Virus-induzierte Veränderungen des zellulären Phänotyps und
ihre Bedeutung für die antivirale Immunantwort**

vorgelegt von
Sibylle Mathys
am
3. Februar 2003

Erstgutachterin: PD Dr. Ruth Brack-Werner

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Elisabeth H. Weiss

Sondergutachter: Dr. Martin Messerle

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Juni 2003

I ZUSAMMENFASSUNG	4
II EINLEITUNG	6
II.1 ZYTOMEGALOVIRUS, EIN MITGLIED DER HERPESVIRUSFAMILIE	6
II.1.1 Virusstruktur und Organisation des CMV-Genoms	7
II.1.2 Genexpression und Replikation von Zytomegalieviren	10
II.1.3 Biologie der Infektion, Persistenz und Latenz von CMV	14
II.1.4 Klinische Relevanz einer CMV-Infektion	16
II.1.5 Murines Zytomegalovirus als Modell für HCMV	18
II.1.6 Immunantwort gegen MCMV	18
II.2 DENDRITISCHE ZELLEN UND IHRE ROLLE IN DER IMMUNANTWORT	21
II.2.1 Herkunft und Entwicklung humaner und muriner dendritischer Zellen	22
II.2.2 Antigen-Aufnahme, Migration und Reifung von DCs	24
II.2.3 Antigen-Prozessierung und Antigen-Präsentation durch DCs	25
II.2.4 T-Zell-DC Interaktion	27
II.2.5 Virale Interaktion mit dendritischen Zellen	29
II.2.6 Zytomegalovirus und DCs	32
II.3 FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT	33
III MATERIAL UND METHODEN	34
III.1 MATERIAL	34
III.1.1 Reagenzien	34
III.1.2 Antikörper	36
III.1.3 Oligonukleotide	37
III.1.4 Plasmide	37
III.1.4.A Erhaltene oder kommerziell erworbene Plasmide und MCMV-BAC-Plasmide	37
III.1.4.B Beschreibung selbst-konstruierter Plasmide und MCMV-BAC-Plasmide	38
III.1.5 Im Southern Blot Verwendete Sonden	41
III.1.6 Zellen und Viren	42
III.2 METHODEN	43
III.2.1 Molekularbiologische Methoden	43
III.2.1.A Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren	43
III.2.1.A.1 Präparation von Plasmid-DNA	43
III.2.1.A.2 Isolierung von BAC-DNA	44
III.2.1.A.3 Isolierung viraler DNA aus Zellen	45
III.2.1.A.4 Isolierung von MCMV-DNA aus Virionen	46
III.2.1.A.5 Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von DNA	46
III.2.1.B Klonierung von Plasmiden	46
III.2.1.B.1 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen	46
III.2.1.B.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	47
III.2.1.B.3 Ligation	47
III.2.1.B.4 Oligonukleotide: Zusammenführung zum Doppelstrang und Klonierung in Plasmide	47
III.2.1.B.5 Herstellung elektrokompetenter Bakterien	48
III.2.1.B.6 Transformation von elektrokompetenten Bakterien	48
III.2.1.B.7 Herstellung von Glycerinstammkulturen	48
III.2.1.C Methoden zur DNA-Analyse	50
III.2.1.C.1 Gelelektrophorese	50
III.2.1.C.2 Southern Blot	50
III.2.1.D Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	53
III.2.1.E Mutagenese von MCMV-BAC Plasmiden in <i>E. coli</i> Bakterien	53
III.2.1.E.1 Herstellung elektrokompetenter und Arabinose-induzierter DH10B-Bakterien	54
III.2.1.E.2 Transformation linearer Fragmente in Rekombinations-kompetente Bakterien	54
III.2.1.E.3 Entfernung des mit FRT-Sequenzen flankierten Kanamycin-Selektionsmarkers	55

III.2.2 Zellkultur	55
III.2.2.A Kultivierung von NIH3T3, M2-10B4 und MEF-Zellen.....	55
III.2.2.B FDCP-Mix Zellkultur.....	56
III.2.2.C Auftauen von Zellen	56
III.2.2.D Abtrennung toter Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation.....	56
III.2.2.E Einfrieren von Zellen	57
III.2.2.F Herstellung von konditionierten Medien	57
III.2.2.G Differenzierung der FDCP-Mix-Zellen in dendritische Zellen	59
III.2.2.H Differenzierung von FDCP-Mix-Zellen in Makrophagen	60
III.2.2.I Transfektion eukaryontischer Zellen und Virus-Rekonstitution	60
III.2.2.J Herstellung eines MCMV-Virusstocks	61
III.2.2.K Standard Plaque Assay zur Bestimmung des Virustiters.....	61
III.2.2.L Infektion der Zellen mit MCMV	62
III.2.3 Herstellung von Zytospin-Präparaten.....	62
III.2.4 Immunfluoreszenz	62
III.2.5 Zytofluorometrische Analyse (FACS-Analyse)	63
III.2.6 β -Lactamase Reporter-Assay	63
III.2.7 Lymphozyten-Proliferations-Assay (Mixed Lymphocyte Reaction, MLR)	64
IV ERGEBNISSE	65
IV.1 INFektION VON ZELLEN DES HÄMATOPOETISCHEN SYSTEMS MIT MCMV	65
IV.1.1 Das lac-Operator-Repressor System zum Nachweis viraler DNA im Zellkern....	65
IV.1.1.A Die lac-Operator-Repetitionssequenz ist im viralen Genom nicht stabil	66
IV.1.2 Etablierung von Southern Blot und Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum	
Nachweis von MCMV-Genomen in hämatopoetischen Zellen	69
IV.1.2.A Nachweis viraler DNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion	69
IV.1.2.B Etablierung des Southern Blots zum Nachweis zirkulärer MCMV-Genome	
nach Infektion.....	71
IV.1.3 Markierung des kleinen MCMV-Kapsid-Proteins (<i>small capsid protein</i>) mit GFP	
für Infektionsstudien	72
IV.1.3.A Konstruktion eines SCP-GFP Fusionsprotein-kodierenden MCMV-Genoms	73
IV.1.3.B Das kleine Kapsid-Protein (SCP) von MCMV ist für das virale Wachstum	
essentiell	74
IV.1.4 MCMV-Mutanten zum Nachweis viraler Genexpression in hämatopoetischen	
Zellen.....	75
IV.1.4.A Herstellung einer MCMV-Mutante mit GFP als Reportergen.....	75
IV.1.4.B Herstellung und Test einer β -Lactamase-exprimierenden MCMV-Mutante .	78
IV.2 INFektION DENDRITISCHER ZELLEN MIT MCMV UND CHARAKTERISIERUNG DER	
AUSWIRKUNGEN DER INFektION AUF DIE IMMUNANTWORT	81
IV.2.1 Charakterisierung muriner DCs differenziert aus FDCP-Mix-Zellen.....	82
IV.2.2 Infektion undifferenzierter FDCP-Mix-Zellen und FDCP-Mix-abgeleiteter	
dendritischen Zellen mit MCMV	83
IV.2.2.A MCMV-Infektion undifferenzierter FDCP-Mix-Zellen	84
IV.2.2.B Infektion dendritischer Zellen mit MCMV	85
IV.2.3 Infektionseffizienz dendritischer Zellen mit MCMV	86
IV.2.4 MCMV-Genexpression in DCs unterschiedlicher Reifungsstadien	88
IV.2.5 Produktive MCMV-Infektion unreifer, nicht aber reifer DCs	91
IV.2.6 MCMV-induzierte phänotypische Veränderungen von DCs.....	92
IV.2.7 Beeinträchtigte T-Zell-Stimulation durch MCMV-infizierte DCs	99
IV.2.7.A Effiziente Stimulation der autologen T-Zell-Proliferation durch aktivierte	
MCMV-infizierte DCs	99

<i>IV.2.7.B MCMV-infizierte DCs inhibieren in der späten Phase der Replikation die autologe T-Zell-Proliferation</i>	100
<i>IV.2.7.C MCMV interferiert mit der Stimulation allogener T-Zellen durch MHC-unabhängige Mechanismen.....</i>	101
V DISKUSSION	104
V.1 METHODEN UND MCMV-REKOMBINANTEN ZUM NACHWEIS DER INFIZIERBARKEIT VON ZELLEN DES HÄMATOPOETISCHEN SYSTEMS	104
V.1.1 Instabilität der Lac-Operator-Repetitionssequenzen im viralen Genom	104
V.1.2 Das Small Capsid Protein (SCP) ist für das MCMV-Wachstum essentiell	105
V.1.3 Nachweis viraler Genexpression in hämatopoetischen Zellen mit Hilfe von MCMV-Mutanten.....	107
V.2 NICHT-PERMISSIVE INFektION MULTIPOTENTER HÄMATO-POETISCHER STAMMZELLEN MIT MCMV	108
V.3 DIE ROLLE DENDRITISCHER ZELLEN IN MCMV-INDUZIERTER IMMUNSUPPRESSION....	110
V.3.1 Infektion und Replikation von MCMV in murinen DCs	112
V.3.2 MCMV-induzierte Veränderungen des DC-Phänotyps und mögliche Auswirkungen auf die Immunantwort.....	113
V.3.3 Immunsuppression durch funktionelle Beeinträchtigung von DCs durch MCMV	115
V.3.3.A Unterschiede in der Stimulationsfähigkeit autologer und allogener T-Zellen durch MCMV-infizierte DCs	115
V.3.3.B Phänotypische und funktionelle Beeinflussung umliegender DCs durch MCMV-infizierte DCs	117
V.3.4 Kontrolle der CMV-Infektion trotz viraler Immunevasionsstrategien.....	118
VI LITERATURVERZEICHNIS.....	120
VII ABKÜRZUNGEN	150
VIII PUBLIKATIONEN	152
IX DANKSAGUNG.....	153
X LEBENSLAUF	154

I ZUSAMMENFASSUNG

Aufgrund der Zunahme an Organ- und Knochenmarktransplantationen und der damit verbundenen Immunsuppression bzw. immunsuppressiven Therapie sowie der zunehmenden Zahl an AIDS-Patienten ist das Zytomegalovirus (CMV) als Pathogen in den letzten zwanzig Jahren trotz der Einführung wirksamer antiviraler Medikamente bis heute von großer klinischer Bedeutung. Während bei immunkompetenten Personen eine primäre CMV-Infektion durch das Immunsystem kontrolliert werden kann, führt eine Primärinfektion oder eine Reaktivierung einer latenten CMV-Infektion in immunsupprimierten Patienten zu lebensbedrohlichen Komplikationen. Die Pathogenese einer CMV-Infektion wird entscheidend von der Qualität der antiviralen Immunantwort des Wirtes beeinflusst und Kenntnisse über die Interaktion von CMV mit dem Immunsystem sind für die Prophylaxe und Behandlung einer CMV-Infektion von großer Bedeutung. Dendritische Zellen (DCs) sind die wichtigsten Antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems und spielen bei der Initiierung einer antiviralen Immunantwort eine zentrale Rolle. Die Stimulation von naiven T-Zellen durch DCs und die Auslösung einer zytotoxischen T-Lymphozyten-Antwort trägt entscheidend zur Eliminierung von viral-infizierten Zellen bei. Die Interaktion des Zytomegalovirus mit dendritischen Zellen gibt dem Virus eine Möglichkeit, seine Eliminierung durch das Immunsystem des Wirtes entscheidend zu beeinflussen.

Zur Identifikation von Zielzellen für latente und lytische Infektionen durch MCMV und zur Untersuchung der Auswirkungen einer MCMV-Infektion auf den Phänotyp und die Funktion der Zellen wurde die murine hämatopoetische Stammzelllinie FDCP-Mix als Modellsystem verwendet. Definierte Differenzierungsstadien der Zellen entlang der dendritischen Reihe wurden hierzu mit einer GFP-exprimierenden MCMV-Mutante infiziert. Während undifferenzierte FDCP-Mix-Zellen und von FDCP-Mix-Zellen abgeleitete reife DCs nicht produktiv infizierbar waren, setzten unreife DCs infektiöse Virusnachkommen frei. In reifen DCs wurden nur virale Proteine der sehr frühen und frühen Phase der viralen Genexpression synthetisiert, während späte Genprodukte nicht nachgewiesen werden konnten. Die Infektion unreifer und reifer DCs resultierte anfänglich in deren Aktivierung, erkennbar an der vorübergehend verstärkten Expression der Oberflächenmoleküle CD80, CD86, CD40, MHC-Klasse-I und Klasse-II. Die verstärkte Expression der MHC- und ko-stimulatorischen Moleküle auf reifen DCs einige Stunden nach Infektion spiegelte sich in einer gesteigerten Stimulation naiver autologer T-Zellen durch infizierte DCs wider. In der späten Phase der Infektion war die Aktivierung von autologen T-Zellen beeinträchtigt. Dies korrelierte mit der reduzierten Oberflächenexpression der MHC- und ko-stimulatorischen Moleküle auf infizierten reifen DCs. Allogene T-Zellen konnten durch MCMV-infizierte DCs weder in der frühen noch in der späten Phase der Infektion stimuliert werden.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass DCs im Laufe einer MCMV-Infektion mehrere Rollen spielen: (1) unreife DCs produzieren MCMV-Nachkommen und können so zur Verbreitung des Virus im Wirt beitragen; (2) in einem frühen Stadium der Infektion aktivieren DCs naive T-Zellen und initiieren damit eine antivirale Immunantwort, die einer Ausbreitung der viralen Infektion entgegenwirkt. (3) Zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion ist die Stimulation der T-Zell-Proliferation durch MCMV-infizierte DCs beeinträchtigt. Dies ist einer der Mechanismen, welche die Persistenz des Virus in seinem Wirt ermöglichen.

Unabhängig vom Zeitpunkt der Infektion ist bei der allogenen Transplantation die Induktion der T-Zell-Antwort immer beeinträchtigt. Die Unfähigkeit der CMV-infizierten DCs, naive allogene T-Zellen zu stimulieren, trägt so zu einer reduzierten antiviralen Kontrolle bei, was CMV-verbundene Krankheiten nach allogenen Knochenmarktransplantationen begünstigt und gravierende gesundheitliche Probleme zur Folge hat.

II EINLEITUNG

II.1 ZYTOMEGALOVIRUS, EIN MITGLIED DER HERPESVIRUSFAMILIE

Zytomegalieviren (*Cytomegalovirus*, CMV) gehören zur Familie der *Herpesviridae*. Bis heute wurden zirka 130 verschiedene human- und tierpathogene Herpesviren identifiziert (Roizman und Pellett, 2002). Herpesviren besitzen ein doppelsträngiges DNA-Genom (120 bis 250 kb), das von einem 100 bis 110 nm großen ikosaedrischen Kapsid umgeben ist. Zwischen Kapsid und Virushülle befindet sich das Tegument, eine Proteinmatrix bestehend aus bis zu 20 Proteinen (Abb. 1). Die von der Wirtszelle stammenden Virushülle (*Envelope*) enthält virale Glykoproteine (Abb. 1). Die Virionen haben einen Durchmesser von 120 bis 300 nm. Herpesviren teilen eine Reihe gemeinsamer Eigenschaften (Roizman und Pellett, 2002). Sie besitzen eine ähnliche Partikelmorphologie und ein großes Genom, welches für eine Reihe von Enzymen kodiert, die am Nukleinsäuremetabolismus, der DNA-Synthese und der Prozessierung von Proteinen beteiligt sind. Die Synthese der viralen DNA und der Zusammenbau des Kapsides finden im Zellkern statt. Die Produktion von Viruspartikeln während des lytischen Zyklus endet mit der Lyse der infizierten Zellen. Herpesviren haben die Fähigkeit, lebenslang im Wirtsorganismus zu verbleiben, ohne chronische Krankheitsbilder auszulösen. In diesem Zustand viraler Latenz liegt das virale Genom zirkulär in der Zelle vor und es werden nur wenige virale Gene exprimiert und keine infektiösen Viruspartikel produziert. Durch endogene oder exogene Faktoren (z. B. Differenzierung der Zellen oder inflammatorische Zytokine) kann es zur Reaktivierung des Virus, d.h. erneuter Virusproduktion, kommen.

Die Mitglieder der Familie der *Herpesviridae* werden aufgrund ihres Wirtsspektrums, Replikationsgeschwindigkeit und Pathogenität in drei Unterfamilien eingeteilt: α -, β - und γ -Herpesviren. α -Herpesviren, wie z.B. Herpes Simplex Virus Typ I (HSV-I), HSV-II und Varizella Zoster Virus (VZV, Erreger von Windpocken und Gürtelrose), haben einen kurzen Replikationszyklus und ein breites Wirtsspektrum. Während der Latenz persistieren α -Herpesviren in Ganglienzellen. β -Herpesviren dagegen haben ein enges Wirtsspektrum und einen langsamen Vermehrungszyklus. Virale Genome dieser Unterfamilie liegen latent in Endothelzellen und Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems vor. Zytomegalieviren (CMV) sind die Hauptvertreter dieser Unterfamilie, zu der auch die humanen Herpesviren 6 und 7 (HHV-6 und HHV-7) gehören. Der Name Zytomegalie leitet sich von der Größenzunahme infizierter Zellen und den sich bildenden nukleären sowie zytoplasmatischen

Einschlüssen ab. γ -Herpesviren zeigen ebenfalls ein enges Wirtsspektrum, die Replikationszeiten sind jedoch bei den einzelnen Vertretern der Familie unterschiedlich lang. Sie infizieren Zellen des lymphatischen Systems (B- und T-Zellen), in denen sie auch latent persistieren. Bekannteste humanpathogene Vertreter sind das Epstein-Barr Virus (EBV) und das humane Herpesvirus 8 (HHV-8).

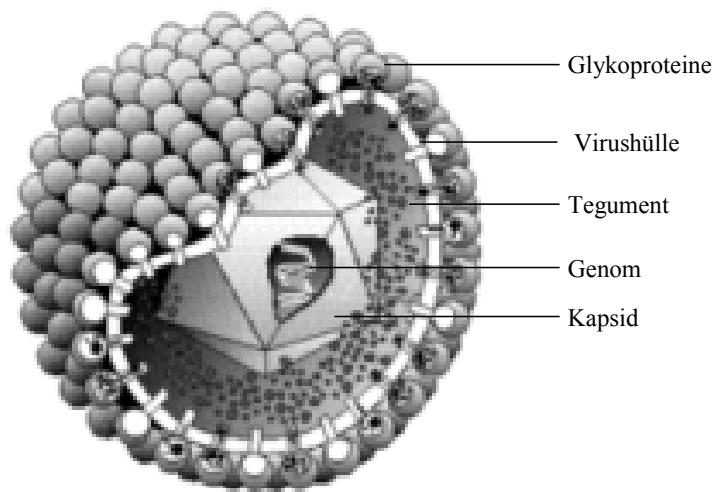


Abb. 1 Aufbau des Zytomegalovirus-Virions. (Modifiziert von <http://www.biografix.de>; M. Reschke und M. Eikmann)

II.1.1 VIRUSSTRUKTUR UND ORGANISATION DES CMV-GENOMS

Das Virion von CMV besteht aus einem für Herpesviren typischen ikosaedrischen Kapsid, das das 230 kbp große, lineare DNA-Genom umgibt, dem Tegument und als äußerste Schicht einem Lipid-Bilayer (Virushülle), der eine große Anzahl von virus-kodierten Glykoproteinen enthält (Abb. 1). In Zellen, die mit humanem CMV (HCMV) infiziert sind, entstehen neben intakten Virionen auch nicht-infektiöse, umhüllte Viruspartikel und so genannte *Dense bodies*. Während die nicht-infektiösen Partikel ein Kapsid besitzen, das jedoch keine virale DNA enthält (Irmiere et al., 1983), fehlt den *Dense bodies* sowohl die virale DNA als auch das Kapsid. *Dense bodies* bestehen aus verschiedenen viralen Tegument-Proteinen, die von einer Zytoplasma-Membran abgeleiteten Hülle umgeben sind (Sarov und Abady., 1975). Im Gegensatz zu HCMV werden in Zellen, die mit murinem CMV (MCMV) infiziert sind, keine

Dense bodies gebildet. Dafür kommt es zur Bildung von MCMV-Virionen mit mehreren Kapsiden (Chong und Mims, 1981).

Das HCMV-Kapsid selbst besteht aus sieben Proteinen: dem *Major Capsid Protein* (MCP), dem *Minor Capsid Protein* (mCP), dem *Minor Capsid-Binding Protein* (mC-BP), dem *Small Capsid Protein* (SCP) und drei verschiedenen Assembly-Proteinen (AP), die zeitweise mit dem Kapsid assoziiert sind (Chen et al., 1999; Gibson et al., 1996). Die Gene für diese Proteine gehören dem für alle Herpesviren konservierten Satz an Genen an. *Major Capsid* Proteine lagern sich zu zwei Typen von Kapsomeren zusammen, den Hexonen und den Pentonen, welche die Hauptbestandteile der ikosaedrischen Kapside darstellen. Pentone bilden die Ecken und Hexone die Flächen und Kanten des Ikosaeders. Ein weiterer Kapsidbestandteil sind Triplexe, die aus zwei *Minor Capsid* Proteinen und einem *Minor Capsid-Binding* Protein aufgebaut sind und mit Hexonen und Pentonen interagieren (Chen et al., 1999). Das kleinste Kapsidprotein (SCP) ist als Sechser-Ring auf der Spitze der Hexone lokalisiert. Sowohl Hexone, Pentone als auch Triplexe interagieren mit Tegumentproteinen und dienen als Gerüst für den Aufbau einer geordneten Tegumentschicht zwischen dem Kapsid und der viralen Hülle (Gibson et al., 1996). Der Erwerb der Virushülle und der assoziierten Glykoproteine erfolgt sowohl im Kernbereich als auch im Zytoplasma. Die Hüll-Glykoproteine sind ein bevorzugtes Ziel der antiviralen Immunantwort. Das Glykoprotein B, gB, ist das am besten konservierte Glykoprotein bei Säugetier-infizierenden Herpesviren (Britt und Mach, 1996). Es hat Einfluss auf die Bindung und den Eintritt des Virus in die Zelle und spielt bei der Zell-zu-Zell Ausbreitung eine wichtige Rolle.

Die DNA-Moleküle der Zytomegalieviren sind erheblich größer als die anderer Herpesviren und die ca. 230 kb großen DNA-Genome des humanen (HCMV) und murinen (MCMV) CMV gehören zu den größten Genomen bei Säugetier-infizierenden Viren. Das Genom von HCMV wird in ein langes Fragment (*unique long region*, UL-Region) und ein kurzes Fragment (*unique short region*, US-Region) eingeteilt, die von invertierten Sequenzwiederholungen (*inverted repeats b* und *c*) flankiert werden (Abb. 2). Entsprechend der Lokalisation der Gene im HCMV-Genom werden die Gene als UL- oder US-Gene bezeichnet und sind fortlaufend nummeriert. An beiden Genomenden ist eine direkte Sequenzwiederholung *a* und zwischen der UL und US-Region eine invertierte Sequenzwiederholung *a'* lokalisiert (Mocarski et al., 1996). Diese Anordnung der *a*-Sequenzen kann zu Inversionen der Genom-Fragmente führen, wodurch vier potentielle Isoformen des HCMV-Genoms resultieren können. Die *a*-Sequenzen enthalten die Signale *pac-1* und *pac-2*, welche für die Verpackung und Spaltung der viralen Genome essentiell sind

(Abb. 2) (Mc Voy et al., 1998; Mocarski et al., 1987). Die Sequenzelemente *pac-1* und *pac-2* sind in allen Herpesvirusgenomen konserviert (Mocarski et al., 1987). Das HCMV-Genom ist sehr G+C reich und enthält eine große Zahl an invertierten und direkten Sequenzwiederholungen. Neben der *α*-Sequenz zeigen drei weitere Regionen eine hohe dichte an Sequenzwiederholungen: der DNA-Replikationsursprung, *oriLyt* (Masse et al., 1992), zwei Transkriptionsenhancer, *ie1/ie2*, und das Gen US3.

Das MCMV-Genom ist, im Gegensatz zum HCMV-Genom, eine einzige lange Sequenz mit kurzen direkten Sequenzwiederholungen an beiden Enden (*direct terminal repeats*) (Abb. 2) (Rawlinson et al., 1996). Dabei liegen die Verpackungssignale nicht wie bei HCMV innerhalb, sondern außerhalb der Sequenzwiederholungen (Abb. 2).

Die Genome von Zytomegalieviren besitzen mit 230 kb eine sehr große Kodierungskapazität. Die Sequenzierung des HCMV-Laborstammes AD169 ergab 208 potentielle offene Leserahmen (ORFs), während in weniger passagierten Stämmen wie Toledo und Towne 22 zusätzliche ORFs identifiziert werden konnten (Chee et al., 1990; Cha et al., 1996). Wie alle β -Herpesviren enthält das CMV-Genom Gen-Familien, die aufgrund von Genduplikationen entstanden sein könnten (Mocarski, 1996). Während die Ähnlichkeiten der DNA-Sequenzen der tierischen β -Herpesviren sehr gering sind, zeigen 80 ORFs eine beträchtliche Aminosäurensequenzhomologie (Vink et al., 2000; Rawlinson et al., 1996; Gompels et al., 1995). Die ORFs des HCMV-Genoms sind größtenteils kolinear zu denen des MCMV-Genoms, dessen Sequenzierung 170 potentielle ORFs ergab (Rawlinson et al., 1996). Charakteristisch für das HCMV- und das MCMV-Genom ist ein konservierter Kernbereich des Genoms (ca. 180 kb), der Gruppen von Genen enthält, die homolog zu Genen anderer Herpesviren sind. Diese Gene sind meist essentiell und kodieren für Faktoren/Proteine, die an DNA-Replikation, Metabolismus, Zusammenbau und Struktur des Virions beteiligt sind (Chee et al., 1990). Die den konservierten Kernbereich flankierenden Sequenzen am rechten und linken Ende der viralen Genome enthalten eine Vielzahl von meist nicht-essentiellen Genen. Vermutlich sind etwa 70 ORFs nicht essentiell für die produktive Replikation des Virus in Zellkultur.

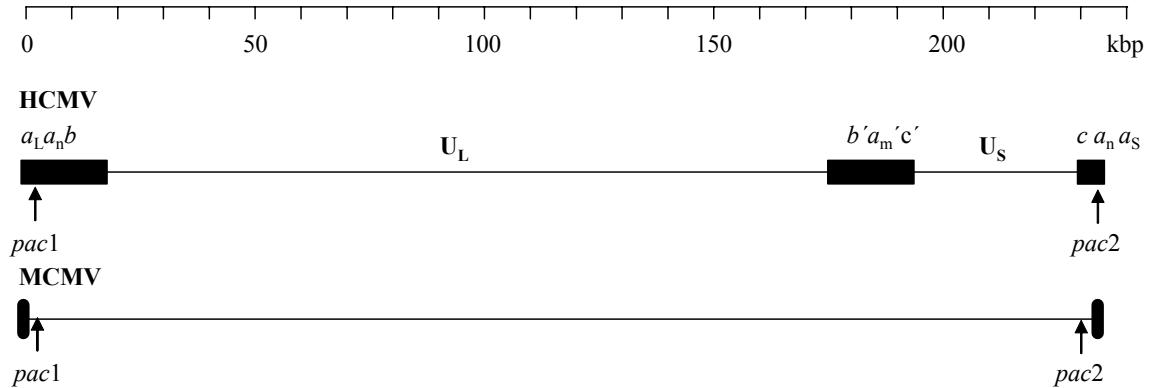


Abb. 2 Schematische Darstellung der Genomsequenz von Zytomegalieviren. Die Struktur des Genoms des humanen Zytomegalovirus (HCMV) besteht aus einer einmalig vorkommenden Sequenz (dünne schwarze Linie), die in ein langes Fragment (*unique long region*, U_L) und ein kurzes Fragment (*unique short region*, U_S) unterteilt ist. Die Fragmente werden von invertierten Sequenzwiederholungen flankiert (schwarze Kästen). Die Buchstaben über dem HCMV-Genom haben folgende Bedeutung: a_L ist die L-terminale a-Sequenzwiederholung; a_n, 0 bis acht zusätzlichen a-Sequenzwiederholungen; b, L-terminale b-Sequenzwiederholung; b', invertierte b-Sequenzwiederholung am Übergang vom L- zum S-Fragment; a_m', eine bis mehrere Kopien der invertierten a-Sequenzwiederholung; c', invertierte c-Sequenzwiederholung; a_S, S-terminale a-Sequenzwiederholung; c, S-terminale c-Sequenzwiederholung. Das MCMV-Genom besteht aus einer einmalig vorkommenden Sequenz (dünne schwarze Linie) und kurzen direkten Sequenzwiederholungen an beiden Enden (vertikale schwarze Linien). pac1 und pac2 sind Sequenzen, die bei der Spaltung und Verpackung der viralen Genome eine essentielle Rolle spielen. (Modifiziert in Anlehnung an Mocarski, 1996).

II.1.2 GENEXPRESSION UND REPLIKATION VON ZYTOMEGALIEVIREN

Die ersten Schritte einer CMV-Infektion sind die Bindung und Eintritt des Virus in die Zellen, was sowohl bei permissiven Zellen als auch bei nicht permissiven Zellen schnell und effizient erfolgt. Ob eine Zelle permissiv infiziert werden kann, hängt nicht so sehr vom Viruseintritt, sondern vielmehr von der Expression früher viralen Gene und der nachfolgenden DNA-Replikation ab. Wie für andere Herpesviren auch, konnte die Bindung von CMV-Virushüllproteinen an den unspezifischen Rezeptor Heparin-Sulfat-Proteoglycan nachgewiesen werden (Compton, 1993) und an mindestens einen weiteren Rezeptor der Zielzelle (Keay et al., 1989; Taylor and Cooper, 1990). Nach der Adsorption des Virus an die Zelloberfläche folgt die Penetration durch Fusion der Virushülle mit der Zellmembran. Tegumentproteine und Kapsid werden dabei freigesetzt, sodass bereits 20 bis 30 min nach Kontakt der Zellen mit dem Virus Tegumentproteine im Zytosol nachgewiesen werden können. Die freigesetzten Kapside werden dann durch das Zytosol zum Zellkern transportiert, wo die virale DNA durch Kernporen ins Nukleoplasma gelangt und innerhalb der ersten vier Stunden zu einem Episom zirkularisiert (LaFemina und Hayward, 1983; Marks

and Spector, 1984; Marks and Spector, 1988). Genexpression und Replikation der CMV-Genome erfolgt im Zellkern.

Die produktive Replikation folgt einer strikt geregelten zeitlichen Abfolge der viralen Genexpression, welche in drei Phasen eingeteilt wird: sehr frühe (*immediate early*, IE), frühe (*early*, E) und späte (*late*, L) Phase (Mocarski, 2001). Die Expression der IE-Gene erfolgt unmittelbar nach Eintritt des Virus und ist unabhängig von der Expression anderer viralen Gene. Die Expression der ie1- und ie2-Gene, die für eine Reihe von IE-regulatorischen Proteinen kodieren (Stenberg, 1996), steht dabei unter Kontrolle des starken *major immediate early* (MIE)-Promotor/Enhancers (Abb. 3). Aufgrund der hohen Dichte an Bindungsstellen in der MIE-Promotor/Enhancer-Sequenz für zelluläre Transkriptionsfaktoren, wie CREB/ATF, Sp1, AP1, NF-κB, YY1 und anderen (Niller und Hennighausen, 1991; Meier und Stinski 1996), ist seine Aktivität von der Anwesenheit der geeigneten Transkriptionsfaktoren in der infizierten Zelle abhängig. Die Bindung des Transkriptionsfaktors YY1 an den MIE-Promotor/Enhancer zum Beispiel führt zur dessen Repression (Liu et al., 1994). Die Abhängigkeit von zellulären Transkriptionsfaktoren ist eine Erklärung für seine von Zelltyp- und Differenzierungsstadium-abhängige Funktionalität. Der MIE-Promotor/Enhancer wird auch durch Signale ausgehend vom zellulären Oberflächenrezeptor (Boyle et al., 1999) und anderen viralen regulatorischen Proteinen aktiviert (Meier und Stinski 1996). Die Transkription ausgehend vom ie1/ie2-Promotor-Enhancer resultiert in den differenziell gespleißten Haupttranskripten, IE1 (IE1pp72) und IE2 (IE1pp86) und zwei weiteren IE2-Varianten, IE2pp55 und IE2late (Abb. 3). Während die IE1-Expression in allen viralen Replikationsphasen erfolgt, nimmt die IE2pp86-Expression in der frühen Phase der Infektion ab und nimmt in der späten Phase wieder zu (Stamminger et al., 1991; Stenberg et al., 1989). Die Proteine IE1pp72 und IE2pp86 sind nukleäre Phosphoproteine. IE1pp72 werden zwei Rollen zugeordnet, zum einen die Aktivierung des ie1/ie2 Promotor-Enhancers (Mocarski et al., 1996) und zum anderen als Transaktivator die Kontrolle der Expression der E- und L-Proteine sowie zellulärer Proteine. IE2pp86 ist verantwortlich für den Übergang von der sehr frühen zur frühen und späten Genexpression in der produktiven Infektion und der Repression der sehr frühen Gene in der späten Phase der Infektion. Außerdem ist IE2pp86 in der Blockade des Zellzyklus der Wirtszelle involviert (Wiebusch und Hagemeier, 1999). Neben den wichtigen Funktionen der MIE-Produkte in der viralen Replikation, spielen andere sehr frühe Gene eine Rolle in der Regulation (TRS1/IRS1) (Stasiak und Mocarski, 1992), in der Inhibition der Apoptose (UL36 und UL37) (Skaletskaya et al., 2001; Hayajneh et al., 2001), und der Modulation der zellulären MHC-Klasse I-Expression (US3) (Jones et al., 1996).

MCMV zeigt, wie andere tierische Zytomegalieviren, ein ähnliches mRNA-Spleißmuster der Transkripte des MIE-Genlocus (Abb. 3). Obwohl die Aminosäuren-Identität der kodierten Proteine im Vergleich mit den Produkten von HCMV nur sehr gering ist, haben die Proteine eine ähnliche Funktion, wobei das HCMV-IE2 Produkt mit dem MCMV-IE3 Produkt korreliert.

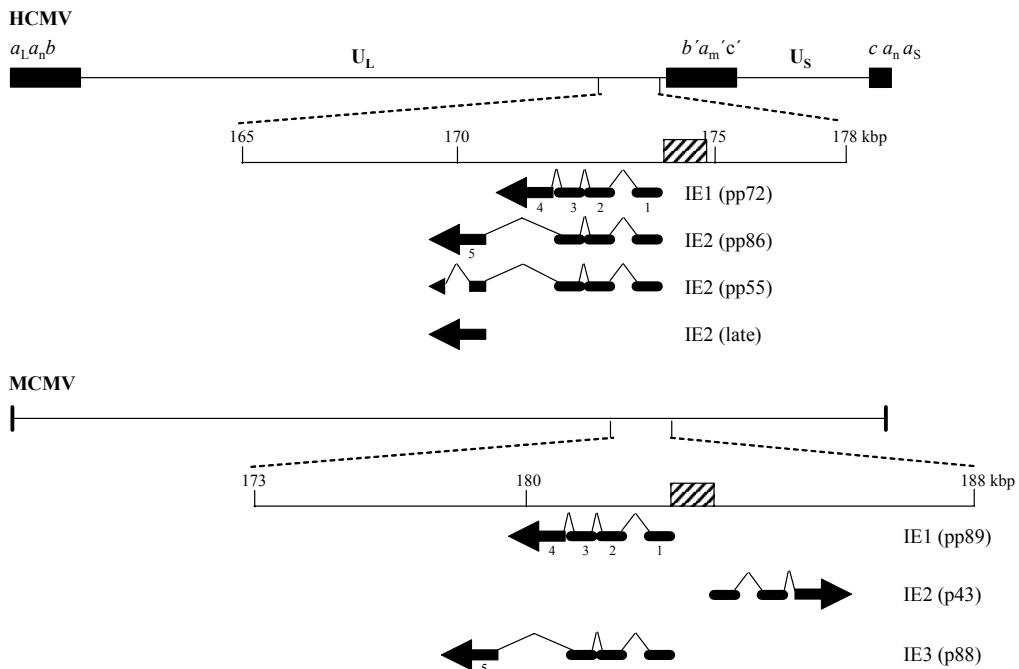


Abb. 3 Strukturelle Organisation des humanen und murinen Major immediate early (MIE)-Lokus. **Oben:** Das Genom des humanen CMV (HCMV) ist in der obersten Linie schematisch dargestellt. Darunter ist eine Vergrößerung der Genomregion mit dem MIE-Lokus abgebildet. Der gestreifte Kasten repräsentiert den MIE-Enhancer. Darunter sind die differenziell gespleißten Transkripte der ie1/ie2-Genreigion mit den Nummern der enthaltenen Exons abgebildet. Den Transkripten ie1 und ie2 sind die Exons 1, 2 und 3 gemeinsam. Es gibt drei ie2-Transkripte, wobei das Hauptgenprodukt pp86 ist. Das ie2-Gen kodiert auch für ein spätes Genprodukt, IE2late, das ausgehend von einem Transkriptionsstart im Exon 5 transkribiert wird. **Unten:** Das murine CMV-Genom (MCMV) mit der vergrößert dargestellten Region des MIE-Genlokus. Der gestreifte Kasten repräsentiert den MIE-Enhancer. Die drei gespleißten ie-Transkripte der Region mit ihren Exons sind darunter dargestellt. (Modifiziert in Anlehnung an Mocarski, 1996).

Die Expression der frühen und späten viralen Gene hängt von der Expression sehr früher Genprodukte ab. Während die Transkription der frühen Gene bereits 4 bis 12 Stunden nach Infektion beginnt, werden späte Gene erst nach 24 Stunden transkribiert. Die Funktion der Produkte der am stärksten vertretenen frühen Transkripte $\beta1.2$ und $\beta2.7$ ist bisher noch nicht untersucht. Andere frühe Genprodukte sind in der DNA Replikation (UL112-UL113, UL54/DNA Polymerase, UL44) oder in der Immunmodulation (US11) involviert, und ein frühes Glykoprotein (UL4) konnte ebenfalls identifiziert werden (Spector, 1996). Zuletzt werden die späten Gene transkribiert, die für Strukturproteine des Virions (Kapsidproteine,

Tegmentproteine, Glykoproteine) und Proteine kodieren, die am Zusammenbau des Virus beteiligt sind.

Die Replikation der HCMV-DNA beginnt ungefähr 16 Stunden nach Infektion und erreicht ihren Höhepunkt 60 bis 80 Stunden nach Infektion, an dem dann einige tausend Genomkopien pro Zelle produziert werden (Stinski et al., 1979). Die Genome von HCMV und MCMV besitzen beide nur einen einzigen Replikationsursprung (ORI), den *oriLyt*. Obwohl das virale Genom während der Latenz als extrachromosomal Molekül in den Zellen vorliegt, konnte bisher kein latenter ORI identifiziert werden. Für die DNA-Synthese bei CMV ausgehend vom *oriLyt* sind sechs, bei allen Herpesviren konservierte Proteine notwendig: die DNA Polymerase (pUL54) und der assoziierte Faktor ppUL44, welcher die Dissoziation der DNA Polymerase von der DNA verhindert, das DNA-Einzel-Strang-bindende Protein ppUL57, und ein Helicase-Primase-Komplex aus drei Untereinheiten (pUL70, pUL102 und pUL105). Die Replikation des viralen Genoms erfolgt nach dem „*Rolling-Circle*“-Mechanismus (McVoy und Adler, 1994), wobei Konkatemere gebildet werden. Die Synthese der HCMV-DNA erfolgt in definierten, kugelförmigen im Kern gelegenen Strukturen, die den Replikationszentren von HSV-1 gleichen (Penfold und Mocarski, 1997). Die Genominversion bei HCMV erfolgt während oder nach der Replikation im Kern und wahrscheinlich vor der Spaltung und Verpackung der konkatemeren viralen DNA (McVoy und Adler, 1994). Wie andere Herpesviren, verpackt HCMV sein Genom in vorgeformte B-Kapside, die aus *Major Capsid* Proteinen, *minor Capsid* Proteinen, *minor Capsid*-Bindungs-Proteinen, *Small Capsid* Proteinen und *Assembly*-Proteinen bestehen (Gibson, 1996). Es sind vorwiegend Tegmentproteine (UL56, ein DNA-Bindungs-Protein, UL89, ein Terminase-Homolog und UL104), die bei diesem Vorgang eine Rolle spielen und die Verpackung einer Genomlänge pro Kapsid kontrollieren (Bogner et al., 1998). Die essentiellen Verpackungs- und Spaltungssignale des CMV-Genoms, *pac1* und *pac2*, sind höchst konservierte kurze Sequenzelemente, die bei allen Herpesviren an den Genomenden zu finden sind. Sowohl für HCMV und MCMV als auch für HSV-1 wurde beobachtet, dass bevorzugt das Genomende, welches die *pac2*-Sequenz trägt, als erstes von der Verpackungsmaschinerie in die reifenden Kapside eingeschleust wird (McVoy et al., 2000). Der Spaltungs-/Verpackungsprozess resultiert in einer variablen Anzahl (1-8) an *a*-Sequenzen an den HCMV-Genomenden und am U_L/U_S-Übergang, sowie einer veränderlichen Anzahl an 30 bp-terminalen Sequenzwiederholungen bei MCMV.

Die Reifung der viralen Partikel beginnt im Nukleus, wo der Zusammenbau der B-Kapside in unmittelbarer Nähe der DNA-Replikationszentren erfolgt (Penfold und Mocarski, 1997).

Major Capsid Proteine werden mit Hilfe von *Assembly*-Proteinen in den Zellkern transloziert (Plafker und Gibson, 1998), wo der Kapsidzusammenbau initiiert wird. Domänen der *Assembly*-Proteine begünstigen die Oligomerisierung der Kapsidproteine zu Hexonen, Pentonen und Triplexen (Gibson, 1996). Zuletzt assoziieren *Small Capsid* Proteine an die Oberfläche der Kapside und die *Assembly*-Proteine werden mit Hilfe von Proteasen von den *Major Capsid* Proteinen getrennt. In diese vorgeformten B-Kapside wird die virale DNA verpackt. Die neu produzierten Nukleokapside sammeln sich an der inneren Kernmembran, wo sie in perinukleäre Zisternen austreten (Gibson, 1996). Die Kernmembran ist mit viralen Glykoproteinen durchsetzt, die später auch in der viralen Hülle zu finden sind (Radsak et al., 1990). Demnach beginnt die Umhüllung des Virions bereits an der inneren Kernmembran. Anschließend wird das Virion in Vesikeln durch den Golgi Apparat zur Zelloberfläche transportiert. Die finale Umhüllung findet dann entweder an der zytoplasmatischen Membran statt, wo eine Enthüllung gefolgt von einer neuen Umhüllung des Kapsides geschieht oder das Kapsid wird im Zytoplasma aus seiner ersten Hülle freigesetzt und die endgültige Umhüllung geschieht dann am Golgi Apparat oder an vom Golgi abgeleiteten Strukturen (Sanchez et al., 2000). Im Falle von HCMV erfolgt die Freisetzung viraler Nachkommen ca. 48 bis 72 Stunden nach Viruseintritt, während MCMV nur 24 bis 36 Stunden für den kompletten Replikationszyklus braucht. Sowohl für HCMV als auch für MCMV hängt eine effiziente Replikation von der Stimulation der Wirtszelle ab (Landini et al., 1979; Muller et al., 1978).

II.1.3 BIOLOGIE DER INFektION, PERSISTENZ UND LATENZ VON CMV

Eine Primärinfektion des Virus kann üblicherweise mit Hilfe des angeborenen und erworbenen Immunsystems unter Kontrolle gehalten werden. Das Immunsystem ist jedoch nicht in der Lage, das Virus vollständig zu eliminieren, was in einer lebenslangen, latenten viralen Infektion resultiert. CMV kann jederzeit durch endogene und exogene Faktoren sowie Immunsuppression aus der Latenz reaktiviert werden, was zu wiederkehrenden Infektionen und Virusfreisetzung führt (Mocarski, 1996). Eine Primärinfektion, Latenz und zeitweise Reaktivierung des Virus verlaufen üblicherweise ohne apparante klinische Konsequenzen. Eine Primärinfektion beginnt typischerweise mit der Replikation des Virus in Epithelzellen der Schleimhäute, als Resultat eines direkten Kontakts mit infektiösen Sekreten eines infizierten Individuums. Die Verbreitung der Viren im gesamten Organismus erfolgt dann über den Blutstrom, wobei Monozyten, neutrophile Leukozyten und zirkulierende Endothelzellen als Virusträger identifiziert worden sind (Gerna et al., 1999; Stoddart et al.,

1994). Zellen verschiedenster Organe wie Speicheldrüse, Niere, Nebenniere, Leber, Milz, Lunge, Auge, Plazenta, Gehirn, Haut sowie Zellen des Knochenmarks können von CMV infiziert werden (Pass, 2001; Plachter et al., 1996; Sinzger und Jahn, 1996). Während der produktiven Phase der Infektion wird CMV in Körperflüssigkeiten wie Speichel, Urin, Tränen, Muttermilch und Samenflüssigkeit ausgeschieden. Die Anwesenheit von Viren in verschiedenen Körperflüssigkeiten kann noch lange nach dem Einsetzen der adaptiven Immunantwort nachgewiesen werden (Revello et al., 1998). Nach der akuten Infektion folgt die latente Infektion. Zellen im Knochenmark, dem peripheren Blut, sowie Endothelzellen stellen das Hauptreservoir für latente CMV-Genome dar. Es wurde gezeigt, dass frühe hämatopoetische CD34⁺-Vorläuferzellen (Maciejewski et al., 1992; Mendelson et al., 1996; Minton et al., 1994; Movassagh et al., 1996; vonLaer et al., 1995) ebenso wie Monozyten-/Dendriten-Vorläuferzellen (Hahn et al., 1998) nicht produktiv infiziert werden können, jedoch als Reservoir für latente CMV-Genome dienen. Erst die terminale Differenzierung der infizierten Vorläuferzellen führt zur Reaktivierung und Produktion von CMV (Soderberg-Naucler et al., 1997b; Soderberg-Naucler et al., 2001). Latentes Virus spielt somit eine wichtige Rolle als Infektionsquelle bei Organ- und Knochenmarktransplantationen und Transfusionen von Blutprodukten, bei denen Leukozyten als Virusreservoir identifiziert wurden.

Das latente CMV-Genom liegt im Kern der Wirtszellen als zirkuläres Molekül vor (Bolovan-Fritts et al., 1999). Die virale Genexpression in latent infizierten CD33⁺-Vorläuferzellen ist auf einige wenige Latenz-assoziierte Transkripte (LAT) beschränkt. Die LAT von HCMV stammen von beiden DNA-Strängen der ie1/ie2-Genregion und sind die einzigen viralen Genprodukte, die mit der latenten Infektion einhergehen (Kondo et al., 1996). Dabei handelt es sich um *sense* LAT, die für 4 ORFs kodieren (ORF55, ORF42, ORF45 und ORF94) und *antisense* LAT, die für die ORFs 59, 154 und ORF152/UL124 kodieren (Kondo et al., 1996). Der Effekt von Mutationen in diesen Genprodukten auf die virale Latenz wurde bisher noch nicht untersucht und so ist bisher unklar, ob die Etablierung und Erhaltung der Latenz spezifische virale Genexpression benötigt.

Der viralen Reaktivierung wird in immunkomprimierten Individuen als Quelle viraler Erkrankungen eine größere Bedeutung beigemessen als der primären Infektion. Reaktivierung kann aufgrund von Ereignissen geschehen, wie Differenzierung von latent infizierten Zellen in einen permissiven Zelltyp unter Einfluss von Zytokinen (Hahn et al., 1998; Kondo et al., 1994; Soderberg-Naucler et al., 1997b; Soderberg-Naucler et al., 2001) oder Immunsuppression, die jedoch alleine nicht für eine Reaktivierung ausreicht.

Proinflammatorische Zytokine spielen in immunkomprimierten Wirten eine entscheidende Rolle bei der Reaktivierung (Koffron et al., 1999). Solche proinflammatorische Signale werden bei einer allogenen Transplantatabstoßung erzeugt, was auf eine klare Verbindung zwischen inflammatorischen Signalen, allogener Abstoßung und Reaktivierung hinweist.

II.1.4 KLINISCHE RELEVANZ EINER CMV-INFektION

Geografische Lage und sozialer Status bestimmen die Durchseuchungsrate mit HCMV. Während in ländlichen Gegenden ca. 50% der Bevölkerung infiziert sind, tragen in Ballungsräumen sowie in der dritten Welt zwischen 80% und 100% der Menschen das Virus in sich (Ho, 1990; Pass, 2001). Die Übertragung des Virus erfolgt über Speichel, Schmierkontaminationen und in seltenen Fällen über Muttermilch. Des Weiteren ist eine Übertragung durch Sexualkontakt möglich, da Viren auch im Zervixsekret und der Samenflüssigkeit nachgewiesen wurden (Pass, 2001). Bluttransfusionen und Organtransplantationen sind weitere potentielle Übertragungsmöglichkeiten. Eine Primärinfektion mit HCMV verläuft beim gesunden Menschen meist inapparent. Studien zeigten, dass weniger als 5% der Infektionen bei schwangeren Frauen symptomatisch sind (Boppana et al., 1999). Ein apparenter Infektionsverlauf ist bei Kindern, die CMV während der Geburt oder durch die Muttermilch erwerben, ebenso unüblich, wie bei immunkompetenten Patienten, die über Transfusionen mit CMV infiziert werden (Cohen und Corey, 1985). Gelegentlich kann jedoch eine CMV-Infektion zu einer Mononukleose führen. Die klinischen Symptome einer CMV-Mononukleose sind Fieber, Kopfschmerzen und Unbehagen, die für Wochen anhalten können. In ca. 30% der Fälle kommt es zu Pharyngitis, Splenomegalie und Ausschlag. In seltenen Fällen kommt es zu Krankheiten wie Pneumonien, Hepatitis, dem Guillain-Barre Syndrome, Retinitis oder Meningoencephalitis (Pass, 2001). Die klinischen CMV-Mononukleose-Syndrome sind denen einer EBV-Infektion sehr ähnlich. Eine HCMV-Infektion ist die häufigste, kongenitale virale Infektion bei Neugeborenen und stellt ein wichtiges medizinisches und öffentliches Gesundheitsproblem dar. 5% bis 10% der Neugeborenen mit kongenitaler CMV-Infektion zeigen Symptome wie geistige Behinderung, Gehörverlust oder Sehstörungen (Bale et al., 1990; Ramsay et al., 1991). Auch erleiden ca. 7% bis 25% der CMV-infizierten Neugeborenen, die asymptomatisch bei Geburt sind, Störungen des zentralen Nervensystems, vorwiegend Gehörverlust. Ob eine kongenitale HCMV-Infektion apparent oder inapparent verläuft, ist mit davon abhängig, ob die Mutter zum Zeitpunkt der Schwangerschaft eine Primärinfektion oder eine Reaktivierung durchlebt.

Eine Primärinfektion resultiert mehrheitlich in einer apparenten kongenitalen Infektion des Kindes, deren Symptome von Hepatosplenomegalie, Thrombozytopenie, Hepatitis bis zu neurologischen Störungen und schweren lebensbedrohlichen Organschäden mit einer Sterberate von 11% bis 20% reicht (Boppana et al., 1992; Hanshaw und Dudgeon, 1978; Stagno und Whitley, 1985).

Eine HCMV-Infektion stellt bei Allotransplantationen von Organen und Knochenmark ebenfalls ein lebensbedrohliches Risiko dar. Erhalten seronegative Transplantatempfänger ein Organ von einem seropositiven Spender kann daraus eine Primärinfektion mit schweren Folgen resultieren. Neben dem serologischen Status des Spenders und Empfängers spielen auch der Typ der Immunsuppression, die verwendeten Blutprodukte, die Herkunft des Transplantates und die HLA-Übereinstimmung eine wichtige Rolle für eine auftretende Infektion in der Zeit nach der Transplantation (Mocarski, 1996). Empfänger von Allotransplantaten können, einhergehend mit der CMV-Infektion, eine Reihe von Krankheiten wie starkes Fieber, Leukopenie, Thrombozytopenie, Retinitis, oder Pneumonien entwickeln. Eine Primärinfektion geht außerdem in den meisten Fällen mit einer Funktionsstörung des transplantierten Organs einher (Meyers, 1984; Mocarski, 1996; Moskowitz et al., 1985). Bei Empfängern von allogenem Knochenmark ist die CMV-Infektion die häufigste Virusbedingte Todesursache. Die Sterblichkeitsrate liegt bei einer unbehandelten CMV-bedingten Pneumonie zwischen 80% und 90% (Meyers, 1984; Enright et al., 1993; Wingard et al., 1988). Außerdem gibt es Hinweise, dass die CMV-Infektion mit der Abstoßungsreaktion [*graft versus host disease (GVHD)*] assoziiert ist. Das Risiko einer CMV-Infektion kann im Fall von allogenen Knochenmarktransplantationen aufgrund der Verwendung von seronegativen Blutprodukten sowie Blutprodukten, aus denen die Leukozyten entfernt wurden, minimiert werden.

Das Risiko HIV-infizierter Patienten sich mit HCMV zu infizieren und an CMV-induzierten Krankheiten zu erkranken, ist erhöht aufgrund der Beeinträchtigung des Immunsystems durch HIV (Shepp et al., 1996). Neben Pneumonien treten bei AIDS-Patienten Retinitis, Encephalitis, Gastritis und Hepatitis als Krankheiten auf, die in Verbindung mit der CMV-Infektion stehen (Bower et al., 1990; Jacobson et al., 1991). Ob eine CMV-Infektion ein Fortschreiten der HIV-Infektion begünstigt oder nicht, ist bisher nicht klar.

II.1.5 MURINES ZYTOMEGALOVIRUS ALS MODELL FÜR HCMV

Zytomegalieviren sind strikt speziespezifisch, sodass HCMV nicht im Tiermodell untersucht werden kann. Aufgrund der Ähnlichkeit des Infektionsverlaufes, der Etablierung der Latenz (Bruggeman, 1993) und des Krankheitsbildes bei MCMV und HCMV im entsprechenden Wirt (Hudson, 1979; Kelsey et al., 1977; Sweet, 1999), ist die Infektion der Maus mit MCMV das am meisten verwendete Modellsystem. Wie beim Menschen verläuft die Infektion einer immunkompetenten Maus inapparent und führt zur viralen Latenz. Immunsupprimierte Mäuse zeigen nach MCMV-Infektion tödlich verlaufende interstitielle Pneumonien (Brody und Craighead, 1974), Entzündungen der Nebennieren (Smith und Wehner, 1980) und Hepatiden (Bolger et al., 1999). Die Reaktivierung von MCMV aus der Latenz ist mit der von HCMV vergleichbar (Gonczol et al., 1985; Jordan, 2002; Mayo et al., 1977).

Auf Genomebene weisen MCMV und HCMV große Homologien auf. Die Sequenzierung des Smith-Stammes von MCMV sagt 170 potentielle offene Leserahmen (ORF) voraus (Rawlinson et al., 1996), während für HCMV bis zu 230 potentielle ORFs identifiziert wurden (Chee et al., 1990). 78 ORFs von MCMV und HCMV zeigen in einem Vergleich signifikante Aminosäuren-Homologien zueinander (Rawlinson et al., 1996). 33 der 78 ORFs sind wiederum bei allen Herpesviren zu finden (Chee et al., 1990).

II.1.6 IMMUNANTWORT GEGEN MCMV

Die Immunantwort baut sich aus den Mechanismen der unspezifischen angeborenen Immunität und der Antigen-spezifischen erworbenen Immunität auf (Fearon und Locksley, 1996; Hoffmann et al., 1999). Die zwei Hauptfunktionen des angeborenen Immunsystems sind erstens die schnelle Erkennung und Eliminierung von Pathogenen und zweitens die Signalisierung einer Gefahr an die Zellen des erworbenen Immunsystems (Matzinger, 1994). Eine der ersten Reaktionen eines Organismus auf eine virale Infektion ist die Synthese von antiviralen Zytokinen wie Interferone (IFN), Interleukine (IL) und Chemokine (Goodbourn et al., 2000; Grandvaux et al., 2002). Interferone wirken aktivierend auf Zellen des angeborenen Immunsystems (Makrophagen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen)) und signalisieren die Anwesenheit eines viralen Pathogens dem adaptiven Zweig des Immunsystems.

Die inapparent verlaufende Primärinfektion mit CMV im immunkompetenten Wirt lässt auf eine effiziente Kontrolle der Infektion durch das Immunsystem schließen. In den ersten Tagen nach der MCMV-Infektion spielt das angeborene Immunsystem, insbesondere NK-Zellen, bei

der Bekämpfung der viralen Infektion eine essentielle Rolle (Bukowski et al., 1984; Orange et al., 1995; Orange und Biron, 1996; Scalzo et al., 1992; Tay et al., 1995; Welsh et al., 1994). Die Wichtigkeit von NK-Zellen im Kampf gegen CMV konnte anhand von Infektionsstudien an Mäusen gezeigt werden, die keine funktionellen NK-Zellen produzieren können (Shellam et al., 1981) und bei Tieren, denen die NK-Zellen depletiert wurden (Bukowski et al., 1984, Welsh et al., 1994). Diese Mäuse sind für letale Infektionen empfänglicher und entwickeln höhere Virustiter nach subletalen Infektionen, was zeigt, dass NK-Zellen entscheidend zur Kontrolle einer MCMV-Infektion zu einem frühen Zeitpunkt beitragen. Im Gegensatz zu B- und T-Zellen erkennen NK-Zellen virale Antigene nicht über spezifische Rezeptoren, sondern erkennen und eliminieren Zellen, die keine oder eine veränderte Expression an Oberflächenmolekülen aufweisen (Moretta et al., 2002; Biron, 1997; Scott und Trinchieri, 1995). Insbesondere die Expression von MHC-Klasse-I Molekülen und den ko-stimulatorischen Molekülen CD80, CD86 und CD40 ist für die Inhibition, respektive Auslösung der NK-vermittelten Zytotoxizität von entscheidender Bedeutung. Während die Abwesenheit von MHC-Klasse-I Molekülen auf Zellen zu einer gesteigerten NK-Zell-vermittelten Lyse führt (Ljunggren und Kärre, 1990; Lanier, 1998), resultiert eine reduzierte Expression der ko-stimulatorischen Moleküle in einer Inhibition der NK-Zell-vermittelten Zytolyse (Chambers et al., 1996; Geldhof et al., 1998; Carbone et al., 1997).

Für eine effiziente Kontrolle einer MCMV-Infektion ist jedoch der Aufbau einer spezifischen Immunantwort notwendig. Die erworbene, spezifische Immunität setzt sich aus humoralen und zellulären Komponenten zusammen. Das Hauptelement der spezifischen Immunantwort sind zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs, CD8⁺), die endogen synthetisierte virale Antigene, präsentiert von MHC-Klasse-I Komplexen, auf der Oberfläche anderer Zellen mit Hilfe spezifischer T-Zell-Rezeptoren erkennen, dadurch aktiviert werden und infizierte Zellen lysieren. MCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung einer akuten MCMV-Infektion. Mittels adoptivem Transfer von CD8⁺ T-Lymphozyten konnte gezeigt werden, dass diese Zellen für die Kontrolle der MCMV-Infektion essentiell sind (Reddehase et al., 1985; Reddehase et al., 1988). Letal infizierte, immunkomprimierte Empfängermäuse überlebten nur nach Infusion von CD8⁺-CTLs aus MCMV-infizierten Spender-Mäusen, während der Transfer von CD4⁺ T-Helferzellen nicht vor der tödlichen Infektion schützen konnte. Es wurden CD8⁺ T-Zellen identifiziert, die für Struktur- und Nicht-Strukturproteine von MCMV spezifisch sind (Fernandez et al., 1999; Ye et al., 2002; Reddehase et al., 1984; Reddehase et al., 1988).

CD4⁺ T-Helfer-Zellen (Th-Zellen) tragen ebenfalls auf ihre Weise zur antiviralen Immunantwort bei. Sie erkennen MHC-Klasse-II Moleküle auf der Oberfläche professioneller Antigen-präsentierender Zellen (APCs), die mit exogenen viralen Proteinen beladen sind, welche über den endosomalen/lysosomalen Weg in die Zelle gelangten. Während MHC-Klasse-I Moleküle auf nahezu allen Zellen exprimiert werden, sind MHC-Klasse-II Moleküle nur auf APCs, wie Makrophagen, B-Lymphozyten, dendritischen Zellen (DCs) und Epithelzellen des Thymus, konstitutiv exprimiert. Andere Zelltypen können durch Interferone zur Expression von MHC-Klasse-II Moleküle angeregt werden. Die Antigenerkennung der CD4⁺-Zellen führt zu ihrer Aktivierung und Produktion von Zytokinen (wie Interferone und Interleukine), welche die Proliferation der Zellen selbst anregen, B-Zellen und Makrophagen aktivieren und die Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen in CTLs induzieren. Für IFN- γ konnte gezeigt werden, dass es der Virus-induzierten Hemmung der MHC-Klasse-I-vermittelten Antigen-Präsentation entgegenwirken kann und dadurch eine CMV-spezifische CTL-Antwort begünstigt (Hengel et al., 1994). Außerdem hemmt IFN- γ in Verbindung mit *Tumor Necrosis Factor α* (TNF- α) effizient die Virusreplikation in der späten Phase und interferiert mit der Bildung von Nukleokapsiden (Lucin et al., 1994). IFN- α und IFN- β aktivieren in Zellen ebenfalls antivirale Mechanismen, welche zur Hemmung der viralen Replikation führen (Goodbourn et al., 2000; Grandvaux et al., 2002). CD4⁺-Zellen haben außerdem die Fähigkeit, Zellen direkt über Zell-Zell-Kontakt zu aktivieren (z.B. dendritische Zellen) (Benett et al., 1998; Schoenberger et al., 1998).

MCMV-spezifische Antikörper spielen bei der Kontrolle einer akuten Infektion nur eine untergeordnete Rolle (Jonjic et al., 1994). Mäuse, die keine Antikörper produzieren können, zeigen einen ähnlichen Verlauf der Infektion wie Wildtyp-Mäuse. MCMV-spezifische Antikörper wirken jedoch der Virusausbreitung nach der Virusreaktivierung aus der Latenz entgegen (Jonjic et al., 1994). Es wurde jedoch auch gezeigt, dass passive und aktive Immunisierung gegen das Glykoprotein B (gB) der Virushülle Mäuse gegen eine letale Infektionsdosis schützen kann (Rapp et al., 1992).

Obwohl im immunkompetenten Wirt die MCMV-Infektion kontrolliert werden kann, ist eine vollständige Eliminierung des Virus nicht möglich und eine Etablierung der Latenz kann nicht verhindert werden. Es wurde gezeigt, dass während der nicht-produktiven Phase CD8⁺ T-Zellen, NK-Zellen und CD4⁺ T-Zellen auf hierarchische und redundante Weise die Virusreplikation und die Ausbreitung des Virus nach Reaktivierung verhindern (Polic et al., 1998).

II.2 DENDRITISCHE ZELLEN UND IHRE ROLLE IN DER IMMUNANTWORT

DCs spielen für die Immunantwort eine einzigartige Rolle: sie sind die einzigen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs), die eine primäre Immunantwort induzieren können (Banchereau und Steinman, 1998; Bell et al., 1999; Hart, 1997). Aus DC-Vorläuferzellen des Knochenmarks entstehen zirkulierende Vorläuferzellen, die in Gewebe wandern und dort als unreife DCs Antigene aufnehmen (Abb. 4). Anschließend migrieren sie in lymphoide Organe, wo sie naiven T-Zellen Antigene präsentieren, was zur Initiierung der Immunantwort führt. Aktivierte CD4⁺ T-Zellen wiederum nehmen Einfluss auf die Entwicklung von CTLs, B-Zellen, Makrophagen, Eosinophile und NK-Zellen. DCs durchlaufen in ihrem Leben vier Entwicklungsstufen (Abb. 4): (1) Knochenmark-Vorläufer, (2) DC-Vorläufer, welche im Blut und lymphoiden Geweben patrouillieren und nach Antigen-Erkennung Interferone ausschütten, was sich limitierend auf die Ausbreitung einer Infektion auswirkt, (3) unreife DCs in Geweben, die Antigene mit hoher Effizienz phago- oder endozytieren und (4) reife DCs, die in sekundären lymphoiden Organen effizient Antigene präsentieren.

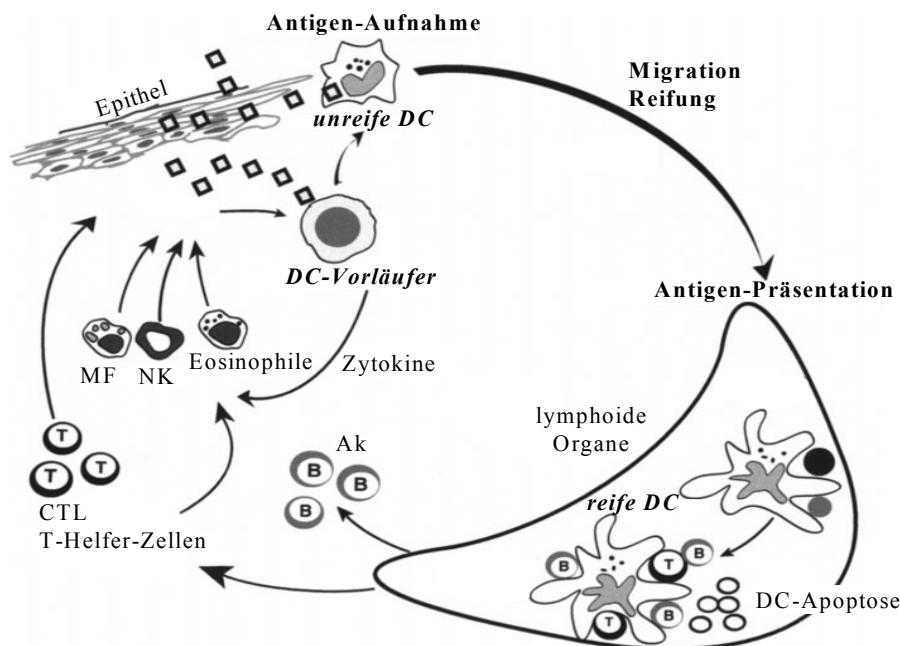


Abb. 4 Lebenszyklus dendritischer Zellen (DCs). DC-Vorläuferzellen migrieren zum Ort der Infektion, wo sie als unreife DCs Antigene aufnehmen. Abhängig von der Art des Pathogens wird in DCs direkt die Sekretion von Zytokinen induziert, welche ihrerseits Eosinophile, Makrophagen (MF) und natürliche Killerzellen (NK) aktivieren. Nach der Antigenaufnahme, wandern die unreifen DCs in lymphoide Organe, wo sie reifen und MHC-Peptid-Komplexe Antigen-spezifischen T-Zellen präsentieren und deren Differenzierung und klonale Expansion induzieren. T-Helfer-Zellen und zytotoxische T-Zellen (CTL) können dann zum Ort der Infektion migrieren, wo sie Zytokine sekretieren, respektive infizierte Zellen lysieren. Durch den Kontakt mit T-Zellen und DCs werden B-Zellen aktiviert und produzieren, nach ihrer Reifung in Plasmazellen, Antikörper (Ak). DCs sterben nach der Interaktion mit Lymphozyten durch Apoptose. (Abbildung modifiziert nach Banchereau et al., 2000).

II.2.1 HERKUNFT UND ENTWICKLUNG HUMANER UND MURINER DENDRITISCHER ZELLEN

DCs können je nach Herkunft, Merkmalen und Fähigkeiten in verschiedene Untergruppen eingeteilt werden. Im Menschen entwickeln sich ausgehend von myeloischen CD34⁺-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark zwei Typen von DCs: epidermale Langerhans-Zellen (LCs) und dermale oder interstitielle DCs (intDCs) (Abb. 5). Aus den CD34⁺-Vorläuferzellen differenzieren Monozyten (CD14⁺ CD11c⁺) (Romani et al., 1994; Zhou und Tedder, 1996), welche sich unter Einfluss von *Granulocyte Macrophage Colony stimulating Factor* (GM-CSF) und IL-4 in unreife DCs (Palucka et al., 1998) entwickeln oder in Makrophagen differenzieren als Antwort auf M-CSF (Caux et al., 1996). Myeloische Vorläuferzellen differenzieren ebenfalls in CD14⁻ CD11c⁺-Zellen, die sich als Antwort auf GM-CSF, IL-4 und *transforming growth factor β* (TGF- β) in LCs entwickeln (Ito et al., 1999). Die Differenzierung der Vorläuferzellen in intDCs und LCs wird zwar durch dieselben Zytokine induziert, die reifen DCs unterscheiden sich jedoch in ihrer Funktion. Während beide DC-Typen die Proliferation von naiven T-Zellen stimulieren können, können nur intDCs die IL-2-vermittelte Differenzierung von naiven B-Zellen in Plasmazellen und die damit verbundene Antikörperproduktion induzieren (Caux et al., 1997). IntDCs produzieren, im Gegensatz zu LCs, IL-10 (Saint-Vis et al., 1998) und sind effizienter bei der Antigen-Aufnahme. Im Vergleich mit intDCs sind LCs schlechte Stimulatoren von Antigen-spezifischen CD4⁺-T-Zellen (Mommaas et al., 1999), wohingegen LCs effizienter in der Sensibilisierung (*Priming*) von CD8⁺-T-Zellen sind (Mortarini et al., 1997).

Ein weiterer DC-Typ, der in der Induktion der Immuntoleranz eine wichtige Rolle spielen soll (Suss und Shortman, 1996), entsteht aus einem lymphoiden CD34⁺-Vorläufer (Abb. 5), aus dem sich auch T-Zellen entwickeln können (Ardavin et al., 1993). Diese lymphoiden DCs entwickeln sich unter Einfluss von IL-3 und CD40-Ligand (CD40L) und tragen keine myeloischen Markermoleküle (wie CD11c, CD11b, CD33 oder CD14) auf ihrer Oberfläche (Grouard et al., 1997; Saunders et al., 1996) (Abb. 5).

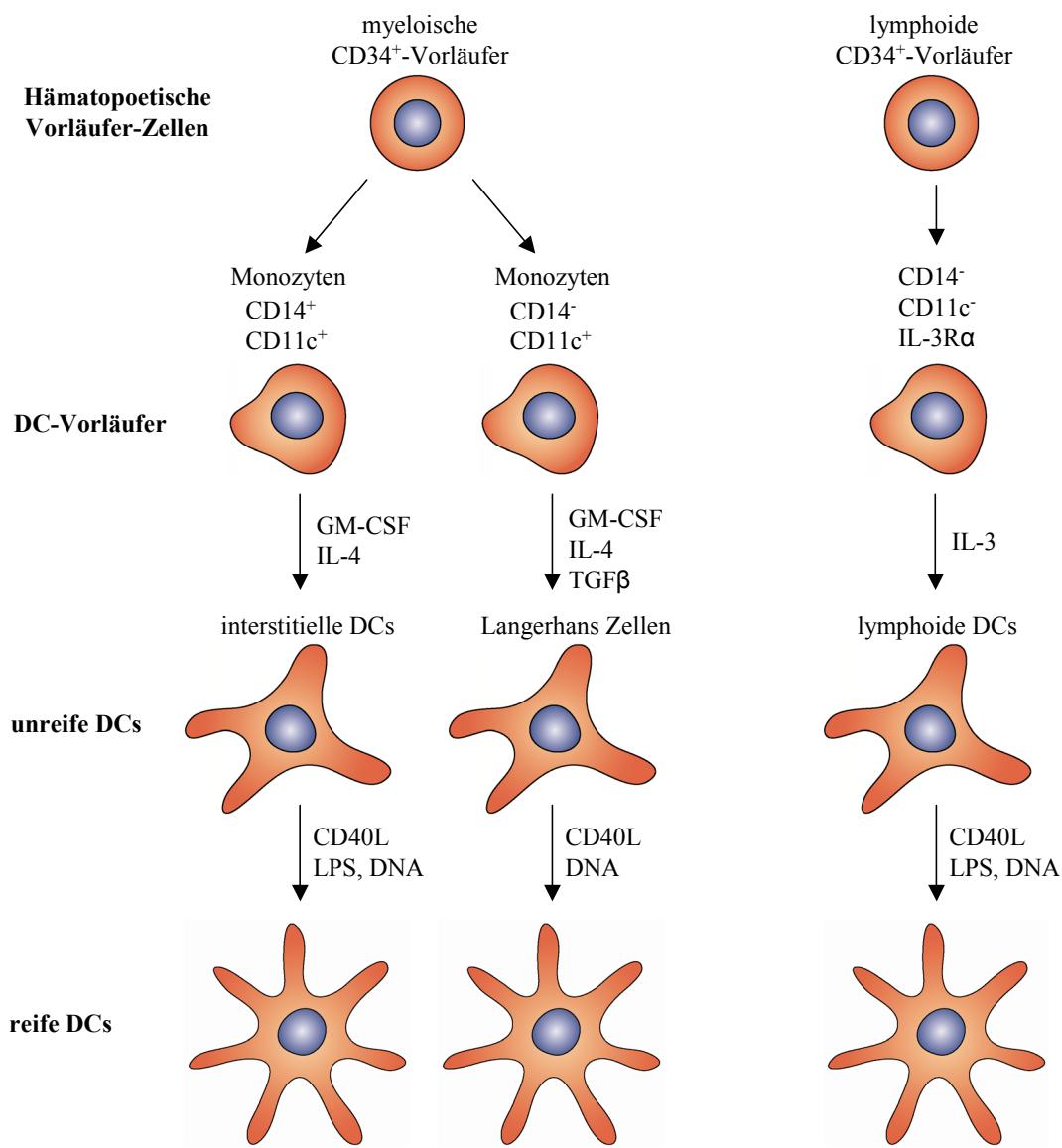


Abb. 5 Die Entwicklung der unterschiedlichen humanen DC-Typen. Myeloische CD34⁺-Vorläuferzellen differenzieren in CD14⁺ CD11c⁺-Monozyten, die unter Einfluss von GM-CSF und IL-4 sich zu unreifen interstitiellen DCs entwickeln. Myeloische Vorläufer differenzieren auch in CD14⁻ CD11c⁻ Vorläuferzellen, aus denen unter Einfluss von GM-CSF, IL-4 und TGF-β (transforming growth factor) Langerhans Zellen entstehen. Aus den lymphoiden Vorläufern entwickeln sich CD14⁻ CD11c⁻ IL-3Rα⁺ DC-Vorläuferzellen, die in Anwesenheit von IL-3 in unreife DCs differenzieren. Zytokine, Lipopolysaccharid (LPS), DNA oder CD40-Ligand (CD40L) können die Reifung der unreifen DCs induzieren. (Abbildung in Anlehnung an Banchereau et al., 2000).

In Mäusen wurden ebenfalls mehrere Typen von DCs identifiziert: DCs myeloischer Abstammung und DCs lymphoider Abstammung. Myeloische DCs entstehen, unter Einfluss von GM-CSF, aus myeloisch-geprägten Vorläuferzellen, welche auch in Granulozyten/Makrophagen differenzieren können (Inaba et al., 1992; Scheicher et al., 1992). Aus lymphoid-geprägten Vorläuferzellen, aus denen sich auch T-Zellen entwickeln können, können ebenfalls DCs entstehen (Ardavin et al., 1993; Wu et al., 1996). Ein wichtiges

Unterscheidungsmerkmal der beiden DC-Typen ist das Oberflächenmolekül CD8 α . Der Marker CD8 α ist nur auf lymphoiden DCs exprimiert, nicht aber auf myeloischen DCs (Scheicher et al., 1992; Wu et al., 1996). Dieses DC-Differenzierungsmodell wurde jedoch kürzlich in Frage gestellt, da gezeigt werden konnte, dass sowohl CD8 α^+ als auch CD8 α^- DCs entweder aus lymphoiden oder myeloischen Vorläuferzellen entstehen können (Manz et al., 2001b; Traver et al., 2000), bzw. dass alle DC-Typen aus einer DC-Vorläuferpopulation entstehen (Manz et al., 2001a; Martinez et al., 2002). Die vermeintlich lymphoiden (CD8 α^+), respektive myeloischen (CD8 α^-) DCs unterscheiden sich sowohl im Phänotyp, der Lokalisation als auch in ihrer Funktion. Beide DC-Typen exprimieren CD11c, MHC-Klasse-II und die ko-stimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 auf ihrer Oberfläche. CD8 α^+ -DCs sind in T-Zell-reichen Gebieten der Milz und Lymphknoten lokalisiert, während CD8 α^- -DCs in der Marginalzone der Milz ansässig sind (Steinman et al., 1997) und erst nach Stimulation durch pro-inflammatorische Signale in die T-Zell-reichen Gebiete der Milz wandern (De Smedt et al., 1996). CD8 α^+ -DCs produzieren im Vergleich mehr IL-12 und zeigen eine schlechtere Phagozytosefähigkeit als CD8 α^- -DCs (Ohteki et al., 1999; Pulendran et al., 1997). Beide DC-Typen sensibilisieren *in vivo* effizient Antigen-spezifische CD4 $^+$ T-Zellen (Maldonado-Lopez et al., 1999; Pulendran et al., 1999). Ein anderer muriner DC-Typ exprimiert Langerin auf seiner Oberfläche, das ein für LCs typischer Marker ist (Henri et al., 2001). Dieser DC-Typ besitzt außerdem eine Reihe von myeloischen Markermolekülen auf seiner Oberfläche und zeigt eine starke Expression der Marker MHC-Klasse-II, CD40, CD80 und CD86 (Salomon et al., 1998).

II.2.2 ANTIGEN-AUFGNAHME, MIGRATION UND REIFUNG VON DCs

Eine der wichtigsten Eigenschaften von DCs verschiedener Differenzierungsstadien ist ihre Mobilität (Austyn et al., 1988). Neu generierte DCs migrieren, wahrscheinlich über den Blutstrom, vom Knochenmark in nicht-lymphoide Gewebe. Es wurde gezeigt, dass DCs innerhalb kurzer Zeit an Orten, wo Pathogene auftreten, akkumulieren können. Die zirkulierenden DC-Vorläufer werden aufgrund von Chemokinen, die in Folge einer Pathogen-induzierten Entzündungsreaktion sekretiert wurden, angelockt (McWilliam et al., 1996). Unreife DCs können Antigene über verschiedene Wege aufnehmen: Makropinozytose (Engering et al., 1997), Rezeptor-vermittelte Endozytose über Typ-C Lectin-Rezeptoren (wie z.B. den Mannose-Rezeptor (Sallusto et al., 1995) oder DEC-205 (Jiang et al., 1995) oder

Phagozytose (Reis e Sousa et al., 1993). Dabei ist die Antigen-Präsentation nach Makropinozytose und Rezeptor-vermittelter Endozytose so effizient, dass Antigenkonzentrationen im Pico- und Nanomolar-Bereich ausreichen, während andere APCs Konzentrationen von mehreren Mikromolar für dieselbe Präsentationseffizienz brauchen (Sallusto et al., 1995). Nach Aufnahme eines Antigens nimmt die Fähigkeit der DCs weitere Antigene aufzunehmen rapide ab und der nächste Schritt im Lebenszyklus einer DC, die Migration und Reifung, wird initiiert. Dabei durchlaufen die unreifen DCs einen funktionellen und phänotypischen Wandel (Abb. 6). Die Reifung der DCs kann zum einen durch Pathogen-assoziierte Moleküle, wie Lipopolysaccharide (LPS) (Rescigno et al., 1999), bakterielle DNA (Hartmann et al., 1999) oder doppelsträngige RNA (dsRNA) (Cella et al., 1999), zum anderen aufgrund von pro- oder anti-inflammatorischen Signalen (wie TNF, IL-1, IL-6, IL-10 etc.), als auch durch Signale von T-Zellen, induziert, respektive inhibiert werden. Der Reifungsprozess geht mit dem Verlust der Endo-/Phagozytosefähigkeit der DCs, der verstärkten Expression von MHC-Molekülen als auch der ko-stimulatorischen Molekülen (CD80, CD86 und CD40) sowie Veränderung der Morphologie einher (Abb. 6). Reifungs-abhängige morphologische Veränderungen äußern sich im Verlust von Adhäsionsmolekülen, Reorganisation des Zytoskeletts und dem Erwerb zellulärer Bewegungsfähigkeit (Winzler et al., 1997). Im Falle von LCs wird z.B. das Adhäsionsmolekül E-Cadherin vermindert exprimiert, was den LCs erlaubt, die Haut zu verlassen (Tang et al., 1993). Die Migration reifender DCs in T-zellreiche Bereiche lymphoider Organe (wie Milz oder Lymphknoten) wird unter anderem durch LPS, TNF- α und verschiedenen Chemokinen (MIP-3 β (*macrophage inflammatory protein*) und 6Ckine (*secondary lymphoid-tissue chemokine*)) ausgelöst. Die Chemokine locken sowohl reife DCs (Saeki et al., 1999) als auch naive T-Zellen (Gunn et al., 1998) an und begünstigen somit die Begegnung Antigen-präsentierender DCs mit Antigen-spezifischen T-Zellen.

II.2.3 ANTIGEN-PROZESSIERUNG UND ANTIGEN-PRÄSENTATION DURCH DCs

Unreife DCs können mit hoher Effizienz Antigene über Phagozytose, Makropinozytose oder Rezeptor-vermittelte Endozytose aufnehmen. Die Antigene werden anschließend in Endosomen degradiert und die Peptid-Bruchstücke von dort aus in MHC-Klasse-II-reiche Kompartimente (MIIC) transportiert. Dort werden die Peptide von MHC-Klasse-II Molekülen, nach Beseitigung der MHC-Klasse-II invarianten Kette (*invariant chain, Ii chain*), gebunden (Castellino et al., 1997; Cresswell, 1996). In unreifen DCs ist Cathepsin S, das für die Degradation der *Ii chain* verantwortlich ist, durch Cystatin C inhibiert. Während

der Reifung der DCs wird die Expression von Cystatin C reduziert, was zu einer gesteigerten Degradation der *Ii chain* führt und somit die Beladung der MHC-Klasse-II Molekülen mit Antigenen und den Export der Komplexe begünstigt (Pierre und Mellman, 1998). Dies führt zu einem erheblichen Anstieg an MHC-Klasse-II-Komplexen auf der Oberfläche von reifen DCs. Die Antigen-MHC-Komplexe auf reifen DCs sind mehrere Tage stabil, im Gegensatz zu ihrer kurzen Halbwertszeit auf unreifen DCs, und können von CD4⁺ T-Zellen erkannt werden (Inaba et al., 1997; Pierre et al., 1997). Interessanterweise kann IL-10 die Reifung der DCs inhibieren, einhergehend mit einem Block der Translokation der MHC-Klasse-II-Peptid-Komplexe zur Plasmamembran (Koppelman et al., 1997).

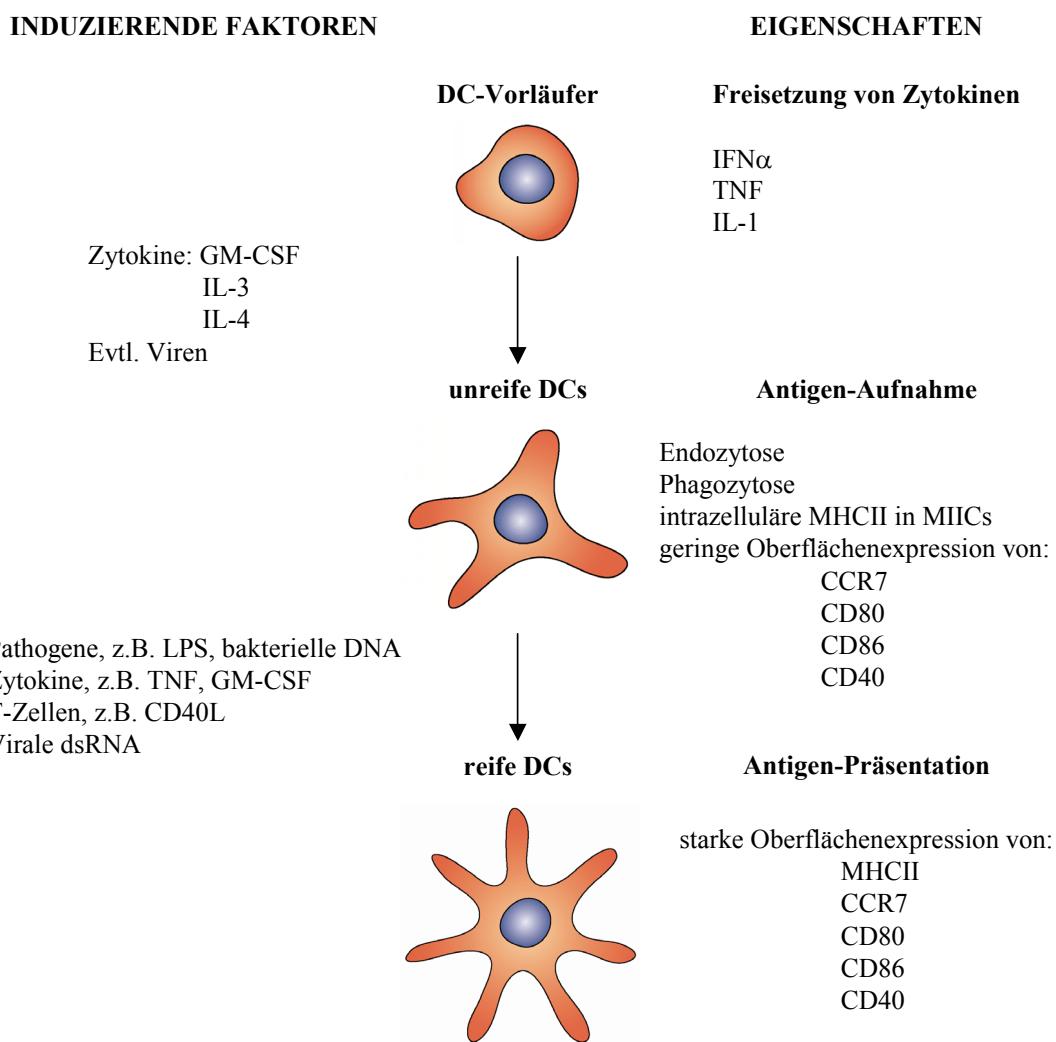


Abb. 6 Reifung von dendritischen Zellen (DCs). Die für die Entwicklung der DCs notwendigen Faktoren sind auf der linken Seite des Schemas angegeben: GM-CSF (*granulocyte/macrophage colony stimulating factor*); IL (Interleukin); LPS (*Lipopolysaccharid*); TNF (*tumor necrosis factor*); dsRNA (*Doppelstrang-RNA*). Auf der rechten Seite des Schemas sind die wichtigsten Eigenschaften der verschiedenen Entwicklungsstufen der DCs zu sehen: IFN (Interferon); MHCII (*major histocompatibility complex II*); MIIC (MHCII-reiche Kompartimente); CCR (Chemokin-Rezeptor). (Abbildung modifiziert nach Banchereau et al., 2000).

Um CD8⁺ zytotoxische Killer-Zellen zu aktivieren, präsentieren DCs MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe, welche sowohl über einen endogenen als auch exogenen Weg beladen werden können (Pamer und Cresswell, 1998; Rock und Goldberg, 1999). Im klassischen endogenen Weg werden intrazelluläre Pathogene im Zytosol mit Hilfe eines ATP-abhängigen proteolytischen Systems prozessiert. Der erste Schritt ist dabei die Ubiquitinierung, welche eine effizientere Antigenverarbeitung erlaubt (Bates et al., 1997). Die ubiquitinierten Proteine werden in Proteasomen geleitet, wo sie in Peptide gespalten werden. Die Peptide werden anschließend über einen ATP-abhängigen Transmembrantransporter (TAP, (*transporter associated with antigen processing*)) ins endoplasmatische Reticulum (ER) transferiert und dort auf MHC-Klasse-I Moleküle geladen. Für die Prozessierung exogener Antigene wurden bisher zwei mögliche Wege beschrieben, ein TAP-abhängiger Weg und ein TAP-unabhängiger Weg. Im TAP-unabhängigen Fall werden die Antigene in Endosomen hydrolysiert (Pfeifer et al., 1993), während im TAP-abhängigen Fall die Antigene mit Hilfe von Phagosomen internalisiert werden. Von dort aus werden die prozessierten Antigene ins Zytosol transferiert und treten in den klassischen MHC-Klasse-I-Weg ein (Kovacsovics-Bankowski und Rock, 1995). Bei der Präsentation exogener Antigene, bei denen es sich um Antigene von Tumoren (Huang et al., 1994), Transplantaten (Bevan, 1976) oder Viren (Sigal et al., 1999) handeln kann, ist dieser TAP-abhängige MHC-Klasse-I-Präsentationsweg (auch *Cross-priming* genannt) von zentraler Bedeutung.

II.2.4 T-ZELL-DC INTERAKTION

In vitro und *in vivo* sind nur wenige DCs nötig, um eine starke T-Zell-Antwort auszulösen. *In vivo* spielt dabei die Interaktion zwischen DCs und T-Zellen in lymphoiden Organen eine essentielle Rolle (Guermonprez et al., 2002). In diesen Organen bilden DCs und T-Zellen Cluster, sodass in ihnen eine Mikroumgebung entsteht, in der sich die Immunität entwickeln kann (Ingulli et al., 1997). Die Bildung von Clustern wird durch verschiedene Adhäsionsmoleküle, wie $\beta 1$ - und $\beta 2$ -Integrine und Mitglieder der Immunglobulin Superfamilie (CD3, CD50, CD54 und CD58) vermittelt. Bisher konnte jedoch noch kein spezifisches Molekül identifiziert werden, welches die hohe Effizienz der DCs, T-Zellen zu binden und zu aktivieren, erklären könnte. Der Effekt scheint sich einzig in der höheren Dichte der Moleküle, die in der DC-T-Zell-Interaktion involviert sind, zu begründen. Zum Beispiel sind MHC-Peptid-Komplexe und CD86 auf DCs 10-100fach dichter angesiedelt als auf anderen APCs wie B-Zellen oder Monozyten (Inaba et al., 1997). Die Erkennung der

MHC-Peptid-Komplexe auf DCs durch Antigen-spezifische T-Zell-Rezeptoren (TCR) ist das erste Signal, das für die Aktivierung der T-Zellen notwendig ist. Das zweite absolut essentielle Signal für die T-Zell-Aktivierung ist die Interaktion zwischen den kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD86) exprimiert auf DCs und dem T-Zell-Liganden CD28. Das gleichzeitige Triggern der beiden Rezeptoren (TCR und CD28) auf T-Zellen ist entscheidend für deren Aktivierung (Caux et al., 1994; Vasilevko et al., 2002). Die T-Zellen üben ihrerseits auch Einfluss auf DCs aus. T-Zellen können DCs über den CD40-Ligand-CD40 Signalweg zusätzlich aktivieren, was zu einer gesteigerten CD80/CD86 Expression auf DCs und der Freisetzung von Zytokinen (IL-1, TNF, Chemokinen und IL-12) führt (Bennett et al., 1998; Caux et al., 1994; Schoenberger et al., 1998). Die Interaktion zwischen dem erst kürzlich beschriebenen RANK/TRANCE Rezeptor auf DCs und dem Liganden (RANKL/TRANCE) auf aktivierten T-Zellen stimuliert die Sekretion von Zytokinen wie IL-1, IL-6 und IL-12 durch DCs, was die Lebensdauer der DCs entscheidend verlängert (Josien et al., 1999; Wong et al., 1997).

Die Sensibilisierung (*Priming*) von spezifischen naiven CD4⁺ T-Zellen für ein Antigen und der damit verbundenen Initiierung einer Immunantwort ist einzigartig für DCs. DCs präsentieren naiven CD4⁺ T-Zellen MHC-Klasse-II-Antigen-Komplexe auf ihrer Oberfläche und generieren so eine Antigen-spezifische T-Zell-Antwort. Die T-Zellen produzieren daraufhin Zytokine (z.B. IL-2), die auf sie selbst und Zellen in der näheren Umgebung wirken, was zur Proliferation und klonalen Expansion der T-Zellen führt. Für die Entwicklung der unterschiedlichen T-Helfer-Zell-Typen ist gezeigt worden, dass sie abhängig vom DC-Typ sind. Monozyten-abgeleitete CD11c⁺ DCs begünstigen durch die Sekretion von IL-12 die Entwicklung naiver T-Zellen in Richtung IFN- γ produzierenden T-Helfer-Zellen vom Typ1 (Th1) (Cella et al., 1996; Macatonia et al., 1995). CD11c⁻ DCs dagegen stimulieren die Differenzierung von T-Zellen, die hauptsächlich Th2-Zytokine exprimieren (Rissoan et al., 1999). Dies bedeutet, dass DCs zusätzlich zur Induktion der Proliferation und klonalen Expansion auch direkt die Art einer T-Zell-Antwort beeinflussen können.

Das *Priming* von naiven CD8⁺ T-Zellen durch DCs ist ebenfalls essentiell für eine effiziente Immunantwort. Neben der Erkennung von Antigenen, präsentiert von MHC-Klasse-I-Molekülen, ist meistens ein zweiter Stimulus, vermittelt durch Zytokine (IL-2) oder den APCs selbst, für eine vollständige Aktivierung und Differenzierung der CD8⁺ T-Zellen in zytotoxische T-Zellen (CTLs) notwendig. Es ist gezeigt worden, dass DCs CD8⁺ T-Zellen direkt aktivieren können, indem eine gleichzeitige Bindung der CD8⁺ und der CD4⁺ T-Zellen an dieselbe APC erfolgt (Keene und Forman, 1982). Vieles spricht jedoch für ein neues

Modell, in dem gezeigt wird, dass eine gleichzeitige Bindung der CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen auf derselben APC für die Aktivierung nicht notwendig ist. Stattdessen werden DCs von T-Helfer-Zellen durch Interaktion des Oberflächenmoleküls CD40 und dem CD40-Ligand auf der CD4⁺ T-Zelle zu einem früheren Zeitpunkt konditioniert (Bennett et al., 1998). Die so aktivierten DCs können dann in Abwesenheit der CD4⁺ T-Zelle CD8⁺-T-Zellen stimulieren (Ridge et al., 1998).

II.2.5 VIRALE INTERAKTION MIT DENDRITISCHEN ZELLEN

Viele Pathogene haben Immunevasionsstrategien entwickelt, welche mit der Erkennung von infizierten Zellen interferieren oder Resistenz gegen Immuneffektormechanismen vermitteln (Maksymowych und Kane, 2000; Tortorella et al., 2000). Erst kürzlich veröffentlichte Studien haben gezeigt, dass Evasionsstrategien von Pathogenen auch gegen die Induktion, respektive Regulation der Immunantwort gerichtet sein können, indem sie mit DCs interferieren. Dabei können verschiedene Schritte des DC-Lebenszyklus, von der Entwicklung der DCs bis zur Interaktion der reifen DCs mit T-Zellen in lymphoiden Geweben, beeinflusst werden: sei es (A) die Reduktion der Ausbildung funktioneller DC-Vorläufer, (B) die Beeinträchtigung der Rekrutierung von DCs zu Orten der Infektion, (C) die Beeinflussung der Antigenaufnahme und Prozessierung, (D) die Infektion und Zerstörung von unreifen DCs, (E) die Interferenz mit der DC-Aktivierung, (F) die Verhinderung der Reifung der DCs und Migration in lymphoide Organe, oder auch (G) die Störung der T-Zell-Aktivierung durch DCs.

(A, D) Eine Reduktion der DC-Anzahl kann entweder auf der Zerstörung der DC-Vorläufer durch Lyse oder Induktion der Apoptose beruhen, oder auf der Beeinträchtigung der Differenzierung der Vorläuferzellen in unreife DCs, wie es z.B. für das humane T-Zell-Leukämie-Virus Typ-1 (HTLV-1) gezeigt werden konnte. HTLV-1 kann Monozyten infizieren und deren Differenzierung in funktionelle unreife DCs verhindern (Makino et al., 2000). Der Verlust von DCs während einer HIV (*Human Immunodeficiency Virus*)-Infektion kann sowohl aus der Inhibition der DC-Entwicklung aus peripheren Stammzellen (Patterson et al., 1998), als auch der CTL-vermittelte Lyse von DCs als Antwort auf die antivirale T-Zellstimulation (Knight et al., 1997) resultieren. Die Infektion unreifer DCs als auch reifer DCs mit Vaccinia Virus endet in abortiver Replikation und induziert Apoptose (Engelmayer et al., 1999). Auch für EBV, wie CMV ein Herpesvirus, konnte gezeigt werden, dass das Virus die Entwicklung von DCs inhibieren kann. Die Bindung von EBV an Monozyten-Vorläufer genügt dabei, um deren Apoptose zu induzieren (Li et al., 2002). Außerdem können

EBV-Antigene von DCs cross-präsentiert werden, was die Etablierung einer EBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort erlaubt (Subklewe, 2002) und die Eliminierung der präsentierenden Zellen zur Folge hat. HSV-1 kann sowohl unreife wie reife DCs infizieren. Während die Infektion von reifen DCs abortiv verläuft, endet die permissive virale Vermehrung von HSV-1 in unreifen DCs mit der Lyse der Zellen und trägt so zur Reduktion der DC-Population bei (Kruse et al., 2000; Mikloska et al., 2001).

(B) Mit Hilfe von viral sekretierten Chemokin-Rezeptor-Homologen, welche lokal produzierte Chemokine binden und somit für die Rekrutierung der DCs nicht mehr zur Verfügung stehen, verhindern eine Reihe von Poxviren (Smith et al., 1997) und Herpesviren den Zustrom von DCs in infizierte Gewebe (Tortorella et al., 2000).

(C) Aufgrund der Fähigkeit der DCs exogene virale Proteine aufzunehmen und präsentieren zu können (*Cross-Priming*), wäre eine Beeinträchtigung der Antigen-Prozessierung in infizierten DCs durch Viren nicht sonderlich effektiv in der Inhibierung einer Immunantwort.

(E, F) Die Interferenz mit der Ausreifung der unreifen DCs scheint da ein effizienterer Weg zur Hemmung der antiviralen Immunantwort zu sein. Sowohl für HSV-1 (Salio et al., 1999) als auch Vaccinia Virus (Drillien et al., 2000; Engelmayer et al., 1999) konnte eine Inhibierung der DC-Reifung beobachtet werden. Es wird angenommen, dass HSV-1 dabei mit Signalwegen, die in der DC-Reifung involviert sind, interferiert, während Vaccinia Zytokin-Rezeptor-Homologe exprimiert und dadurch die Wirkung von Zytokinen verantwortlich für die DC-Reifung inhibiert. Für andere Viren wie z.B. Influenza oder Masernvirus (MV), wurde ein gegenteiliger Effekt beobachtet. Die virale Infektion stimuliert die Reifung der DCs, was jedoch nur im Falle von Influenza die Eliminierung des Virus begünstigt (Cella et al., 1999). MV-infizierte DCs beginnen analog wie LPS-stimulierte DCs mit dem Reifungsprozess, die endgültige CD40-Ligand-vermittelte Reifung durch aktivierte T-Zellen ist jedoch inhibiert (Servet-Delprat et al., 2000), was darauf hinweist, dass die MV-Replikation mit dem CD40-Signalweg in DCs interferiert.

Die Inhibition der Reifung von DCs kann sich auch auf die Migrationsfähigkeit der DCs vom Ort der Antigen-Aufnahme in T-zellreiche Gebiete lymphoider Gewebe auswirken. Die verstärkte Expression des Chemokinrezeptors CCR7 ist im Falle HSV-1-infizierter DCs blockiert (Salio et al., 1999), was die Reaktion der DCs auf Chemokine, welche die Migration lenken, verhindert.

(G) Eine weitere Möglichkeit mit der DC-Funktion zu interferieren, ist die Beeinflussung der Interaktion zwischen DCs und T-Zellen. Wie bereits oben erwähnt, inhibiert MV die terminale CD40L-vermittelte Ausreifung von DCs (Servet-Delprat et al., 2000). Dies

verhindert eine maximale Expression der ko-stimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86, als auch die Produktion von IL-12-, respektive Induktion der IL-10 mRNA-Synthese. IL-12 ist essentiell für die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen in T-Helfer-Zellen vom Typ1, welche das antivirale Zytokin IFN- γ und das T-Zell-stimulierende Zytokin IL-2 produzieren (Abbas et al., 1996). Die MV-inhibierte Reifung der DCs macht ebenfalls eine vollständige Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen unmöglich (Servet-Delprat et al., 2000). Trotz reduzierter Oberflächenexpression von CD80 auf DCs nach Infektion, konnten Vaccinia-infizierte DCs sowohl Gedächtniszellen als auch naive Zellen stimulieren (Drillien et al., 2000). Für HIV-1 konnte zwei Tage nach Infektion eine reduzierte T-Zell-Stimulation durch HIV-infizierte DCs nachgewiesen werden. Zu einem früheren Zeitpunkt nach Infektion wurde dagegen sowohl eine primäre proliferative T-Zell-Antwort, als auch eine CTL-Antwort beobachtet (Knight et al., 1993; Knight et al., 1997). Erst kürzlich wurde beschrieben, dass intDCs in lymphoiden Geweben von Patienten mit einer akuten HIV-Infektion eine reduzierte Expression der ko-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 zeigen, was ein Grund für eine beeinträchtigte HIV-spezifische T-Zell-Antwort sein kann (Lore et al., 2002). Unreife HSV-1-infizierte DCs zeigten innerhalb der ersten 24 Stunden nach Infektion eine reduzierte Oberflächenexpression funktioneller Moleküle wie CD40, CD54, CD80 und CD86, während die Expression von MHC-Klasse-I und Klasse-II Molekülen unverändert war (Kruse et al., 2000; Mikloska et al., 2001). Sowohl die reduzierte Expression von CD40, die eine verminderte Sekretion von IL-12 zur Folge hat (Snijders et al., 1998), als auch die Reduktion von CD54, die in einer gesteigerten IL-4 Sekretion resultiert, wirken einer Entwicklung von Th1-Zellen und somit einer antiviralen Kontrolle entgegen (Mikloska et al., 1998). Reife HSV-1-infizierte DCs zeigen eine stark reduzierte Expression des Oberflächenmoleküls CD83, während die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-II nur leicht und die Expression von CD40, CD80, CD86 und MHC-Klasse-I Molekülen gar nicht beeinträchtigt ist (Kruse et al., 2000). Die viral-inhibierte Expression von CD83 resultiert in einer stark reduzierten T-Zell-Stimulation durch die HSV-1 infizierten DCs.

Eine weitere Rolle, die DCs bei einer viralen Infektion spielen können, ist die Verbreitung des Virus im Körper. Für HIV-1 konnte z.B. gezeigt werden, dass infizierte DCs und LCs dem Virus als Transportmittel zu den Lymphknoten dienen (Masurier et al., 1998). Während reife DCs die Replikation von HIV-1 blockieren, produzieren unreife DCs Viren, die aktivierte T-Zellen infizieren können (Compton et al., 1996; Warren et al., 1997). Reife DCs produzieren zwar keine neuen Viren, jedoch binden sie Virus und transportieren es in lymphoide Gewebe,

wo HIV-1 T-Zellen infizieren kann, was zu deren Tod führt (Geijtenbeek et al., 2000; Ludewig et al., 1996).

II.2.6 ZYTOMEGALOVIRUS UND DCs

Die langsame Replikation, der eingeschränkte Zelltropismus und die begrenzte Zell-zu-Zell-Verbreitung von CMV wie auch die klinische Inapparenz einer CMV-Infektion in normalen Wirtsorganismen weisen auf eine Kontrolle des Viruswachstums durch das Immunsystem hin. Die HCMV-spezifische Immunantwort muss dabei als effizient angesehen werden, da CMV-vermittelte Erkrankungen in immunkompetenten Wirten äußerst selten sind. Die Interaktion von CMV mit dem Immunsystem, um dessen Kontrolle zu entgehen oder die Immunantwort zu unterdrücken, ist somit ein wichtiger Faktor, der die Pathogenese von CMV beeinflusst. Eine Reihe von Effektormechanismen wie CTLs, NK und Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität werden bei einer akuten Infektion initiiert, wobei die Präsentation von viralen Antigenen durch APCs von zentraler Bedeutung ist. Wie in Kapitel I.2.5 beschrieben, haben verschiedenste Viren Strategien entwickelt mit DCs, die zu den wichtigsten APCs gehören, zu interferieren und so die antivirale Immunantwort zu beeinflussen. Über die Infektion von DCs mit CMV und deren Auswirkung auf die Immunantwort ist jedoch bisher wenig bekannt. Vor ein paar Jahren wurde gezeigt, dass CMV primitive CD34⁺ hämatopoetische, sowie CD33⁺-Vorläuferzellen infizieren kann, die Infektion jedoch nicht produktiv verläuft (Hahn et al., 1998; Mendelson et al., 1996). CD33⁺-Zellen, sowohl Vorläufer von DCs als auch von Makrophagen, stellen damit ein wichtiges Reservoir für latente CMV-Genome dar und können außerdem zur Verbreitung des Virus beitragen (Stoddart et al., 1994).

Die ersten Resultate zur Infizierbarkeit von DCs mit CMV zeigten (Soderberg-Naucler et al., 1997b; Soderberg-Naucler et al., 1998), dass CMV DCs *in vitro* nicht permissiv infizieren kann, in klarem Gegensatz zu Makrophagen. Eine andere Gruppe jedoch konnte nachweisen, dass unreife DCs sich permissiv von CMV infizieren lassen, der Ablauf des vollständigen Replikationszyklus jedoch vom Virusstamm abhängig ist (Riegler et al., 2000). Während HCMV-Stämme, die auf Fibroblasten vermehrt wurden, in unreifen DCs nicht replizieren können, durchlaufen klinische Virus-Isolate und HCMV-Stämme, die auf Endothelzellen gehalten wurden, den vollen Replikationszyklus in unreifen DCs und es werden infektiöse Virionen freigesetzt.

II.3 FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Primäre CMV-Infektionen werden in immunkompetenten Wirten mit Hilfe des Immunsystems weitgehend kontrolliert. Nach einer primären Infektion ist CMV jedoch in der Lage, eine lebenslange latente Infektion in seinem natürlichen Wirt zu etablieren. Dies legt nahe, dass die antivirale Immunantwort nicht in der Lage ist, das Virus vollständig zu eliminieren. Die Reaktivierung von latent vorliegendem HCMV führt besonders in immungeschwächten Individuen zu lebensbedrohlichen Komplikationen. Um das Virus und seine Pathogenese besser verstehen zu lernen, ist es von großer Wichtigkeit, infizierbare Gewebe- und Zelltypen zu identifizieren, in denen sich eine latente Infektion etablieren kann. In diesem Zusammenhang sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob MCMV in primitive, murine hämatopoetische Zellen der Stammzelllinie FDCP-Mix eindringen und replizieren kann. MCMV ist wie HCMV Spezies-spezifisch, zeigt aber sowohl in seinem Genomaufbau als auch in seiner Pathogenese große Ähnlichkeiten, sodass es häufig als Modell für HCMV verwendet wird. Zur Identifikation MCMV-infizierter hämatopoetischer Stammzellen sollten Verfahren zum Nachweis viraler Komponenten in latent infizierten Zellen entwickelt werden. Dazu sollten Methoden, die die Identifizierung viraler Genome in Zellen unabhängig von der viralen Replikation erlauben, etabliert werden, sowie auch MCMV-Mutanten zur Detektion viraler Genexpression konstruiert werden.

Darüber hinaus soll die Infektion dendritischer Zellen mit MCMV untersucht werden. DCs sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen und spielen die Hauptrolle bei der Initiierung einer antiviralen T-Zellantwort. Diese Eigenschaften machen DCs zu einem attraktiven Ziel viraler Immunevasionsstrategien, um einer antiviralen Immunantwort entgegenzuwirken. Als Zellsystem, dessen Zellen unbeschränkt expandiert und in synchroner und gerichteter Art und Weise in DCs differenziert werden können, sollten die murinen hämatopoetischen FDCP-Mix-Zellen dienen. Ob MCMV von FDCP-Mix Zellen abgeleitete DCs produktiv infizieren kann und welche Auswirkungen die Infektion auf den Phänotyp und die Funktion der Zellen hat, insbesondere die Stimulation von T-Zellen, sollte hierbei im Besonderen untersucht werden.

III MATERIAL UND METHODEN

III.1 MATERIAL

III.1.1 REAGENZIEN

Agar	Life Technologies, Deutschland
Agarose	Sigma, München
Ampicillin	Roche, Deutschland
AmpliTaq Gold™-DNA-Polymerase	Roche, Deutschland
Bacto Hefe-Extract	Life Technologies, Deutschland
Bacto Trypton	Life Technologies, Deutschland
Carboxymethylzellulose	Sigma, Deutschland
Chloramphenicol	Life Technologies, Deutschland
<i>DIG High Prime DNA labeling and Detection Starter Kit II</i>	Roche, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Deutschland
DNA-Größenstandard (Marker III)	Roche, Deutschland
dNTPs	Roche, Deutschland
Dulbecco´s modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Deutschland
DMEM mit HEPES (25 mM)	Gibco, Deutschland
Essigsäure	Roth, Deutschland
Ethanol	Riedel-de Haen, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat-Na-Salz (EDTA)	Roth, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma, Deutschland
Filme (BioMax MR und BioMax Light)	Kodak, USA
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	Sigma, Deutschland
GeneBLAzer™ Loading Kit	Aurora Biosciences, USA
Geniticinsulfat (G418)	Gibco, Deutschland
GFX™ Purification Kit	Pharmacia, Deutschland
L-Glutamin	Life Technologies, Deutschland
Glycerin	Roth, Deutschland
Rekombinantes murines Interleukin-3 (mIL-3)	Roche, Deutschland
Rekombinantes humanes Interleukin-2 (hIL-2)	Roche, Deutschland

III Material und Methoden

Iscove's modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Gibco, USA
Isopropanol	Riedel-de Haen, Deutschland
Kaliumacetat	Riedel-de Haen, Deutschland
Keyhole limpet hemocyanin (KLH)	Sigma, Deutschland
Klenow-Polymerase	NEB, USA
Lipopolsaccharid (LPS)	Sigma, Deutschland
Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF)	Roche, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Merck, Deutschland
10x Modified Eagle Medium	Life Technologies, Deutschland
Natriumacetat (NaAc)	Riedel-de Haen, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	J.T. Baker B.V., Holland
Neugeborenen Kälberserum (NCS)	PAA, Deutschland
Nucleobond AX DNA Isolierungskit	Machinery & Nagel
Nylonmembran	Schleicher & Schuell, Deutschland
Ficoll Nycoprep	Nycomed, Europa
PBS (Phosphate-buffered saline)	Life Technologies, Deutschland
Penicillin	Life Technologies, Deutschland
Pferdeserum (HS)	Sigma und JRH, Deutschland
Phenol/Chloroform	Roth, Deutschland
Phytohemagglutinin-M (PHA-M)	Sigma, Deutschland
Proteinase K	Roche, Deutschland
Qiaprep Spin Plasmid Miniprep Kit	Qiagen, Deutschland
Restriktionsenzyme	NEB, USA
RNAse A	Roche, Deutschland
RPMI 1640	Life Technologies, Deutschland
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Roth, Deutschland
T4-DNA-Ligase	Roche, Deutschland
Tetanus Toxin C-Fragment (TTC)	Calbiochem, Deutschland
H ³ -Thymidin	Amersham, Deutschland
Trypsin/EDTA	Life Technologies, Deutschland

Alle anderen Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Deutschland) und Sigma (Deutschland) bezogen.

III.1.2 ANTIKÖRPER

Antikörper für die Immunfluoreszenz:

Erstantikörper:

Croma 101	Maus anti-ie1-Protein von MCMV, Zellkultur-Überstand (Stipan Jonjic, Universität Rijeka, unveröffentlicht)
20/238/28	Maus anti-e1-Protein von MCMV, Zellkultur-Überstand (Buhler et al., 1990)
Croma 7	Maus anti-gB-Protein von MCMV, Zellkultur-Überstand (Stipan Jonjic, Universität Rijeka, unveröffentlicht)

Zweitantikörper:

Ziege anti-Maus IgG- Cy3-konjugiert	Becton Dickinson, USA
--	-----------------------

Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte monoklonale anti-Maus-Antikörper für die FACS-Analyse:
(Fluoreszenzfarbstoffe: FITC, Fluoroisothioyanat; PE, Phytoerytrin; APC, Allophytocyanat)

Alle Antikörper wurden von Pharmingen, Europe bezogen:

Antikörper:	Katalognummern:
anti-Maus CD86-PE- und –Biotin-konjugiert	#09275 und #09272
anti-Maus CD80-Biotin-konjugiert	#09602
anti-Maus CD40-FITC- und -Biotin-konjugiert	#09664 und #09662
anti-Maus MHCII-FITC- und -Biotin-konjugiert	#06044 und #06042
anti-Maus MHCI-FITC- und -Biotin-konjugiert	#06105 und #06102
anti-Maus Mac-1-FITC-, -PE- und -APC-konjugiert	#01714, 01715 und 01719
anti-Maus CD11c-PE-konjugiert	#09705
anti-Maus CD14-PE-konjugiert	#09575
anti-Maus CD34-FITC-konjugiert	#09434
anti-Maus CD16/CD32 (Fc-Block)	#01241
Streptavidin-APC-Konjugat	#13049

III.1.3 OLIGONUKLEOTIDE

III.1.4 PLASMIDE

III.1.4.A Erhaltene oder kommerziell erworbene Plasmide und MCMV-BAC-Plasmide

p3`SSdimerClonEGFP	Robinett et. al., 1996
pACYC177	NEB, USA
pAR2.5	M. Messerle, LMU München, unveröffentlicht
pBAD $\alpha\beta\gamma$	Zhang et al., 1998
pBAM25, auch pAMB25 genannt	Keil et al., 1984
pBluescript II KS	Stratagene, USA

pCP15	Wackernagel et al., 1995
pCP20	Wackernagel et al., 1995
pE1	Angulo et al., 1998
pEcoO	Thäle et al., 1996
pEGFP-C1	Clonetech, USA
pIE111	Messerle et al., 1992
pLRL	M. Messerle, LMU München, unveröffentlicht
pSM3fr	Wagner et al., 1999
pSV2-dhfr 8.32	Robinett et al., 1996
pUC19	NEB, USA

III.1.4.B Beschreibung selbst-konstruierter Plasmide und MCMV-BAC-Plasmide

pACYC-lacO

Das Plasmid pACYC177 wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xho*I verdaut und das doppelsträngige Oligonukleotid sib1 (bestehend aus sib1.for und sib1.rev) mit den Schnittstellen *Bam*HI-*Ascl*-*Eco*RI-*SaI*-*Xba*I-*Mun*I-*Ascl*-*Xho*I in das aufgeschnittene Plasmid ligiert. Dabei sind die Spaltstellen *Bam*HI und *Xho*I zerstört worden. Das so entstandene pACYC-Oligo Plasmid wurde dann mit *Xba*I und *Mun*I geschnitten und ein 2,5 kb großes Fragment (Nukleotid (nt)-Position 187119 bis nt-Position 189670 des wt MCMV-Genoms, entsprechend der Nomenklatur von Rawlinson et al., 1996) eingefügt, welches aus pAR2.5 mit *Nhe*I und *Eco*RI herausgeschnitten wurde (pACYC2.5). Aus pIE111 wurde mit *Eco*RI ein 7,2 kb großes Fragment herausgeschnitten, das die Sequenzen des MCMV-Enhancerbereichs und der ie1/ie3 Region von MCMV enthält (nt-Position 177008 bis nt-Position 184236) und in die singuläre *Eco*RI-Schnittstelle von pACYC2.5 inseriert, wodurch pACYC7.2 entstand. pACYC7.2 wurde dann mit *SaI* geöffnet und ein lacO-Repetitionssequenzen enthaltendes 10,1 kb Fragment wurde mit *SaI* aus pSV2-dhfr 8.32 isoliert und in pACYC7.2 ligiert. Die lac-Operatorsequenz von 10,1 kb besteht aus 32 lac-Operator Octameren (je 292 bp), die sich wiederholend aneinandergereiht sind (Robinett et al., 1996). Das so entstandene Plasmid wurde pACYC-lacO genannt.

pE1-lacO BAC-Plasmid

Das MCMV BAC-Plasmid pE1, welches eine 1,6 kb große Deletion hat, die sowohl den *immediate-early (ie) Enhancer*-Bereich und das Exon1 der ie1/ie3-Region umfasst (nt-Position 182605 bis nt-Position 184236, entsprechend der Nomenklatur von Rawlinson et al., 1996, wurde zusammen mit *Ascl*-linearisiertem Fragment aus pACYC-lacO in NIH3T3 Zellen transfiziert. Nach erfolgreicher Rekombination zwischen dem Fragment und dem BAC-Plasmid über die homologen Sequenzen wird die Deletion im Enhancer-Bereich und der ie1/ie3 Region aufgehoben und die lacO-Repetitionssequenz eingefügt, sodass das replikationskompetente MCMV-BAC-Plasmid namens pE1-lacO entstand. Dieses BAC-Plasmid trägt, aufgrund der gewählten Homologien, eine 2,9 kb große Deletion (von nt-Position 184236 bis nt-Position 187119) in der *in vitro* nicht-essentiellen ie2-Region des MCMV-Genoms.

pSCP-GFP-Kan (auch p73Kan-EGFP genannt)

Ausgehend von dem MCMV-BAC-Plasmid pSM3fr (Wagner et al., 1999) wurden mit den Primerpaaren 73051.for/73560.rev und 73561.for/74530.rev mittels PCR zwei Fragmente amplifiziert, welche dem MCMV-Genomabschnitt nt 73051 bis nt 74530 entsprechen (nach der Nomenklatur von Rawlinson et al., 1996). Diese Fragmente wurden, über die an den Primern angehängten Schnittstellen *EcoRI-BamHI*, respektive *BamHI-HindIII*, in das mit *EcoRI* und *HindIII* verdaute Plasmid pUC19 ligiert. Das resultierende Plasmid p73051-73561 kodiert für das kleine Kapsid-Protein (*small capsid protein*, SCP). Die von FRT-Sequenzen flankierte Kanamycin-Kassette wurde über *SmaI*-Schnittstellen aus dem Plasmid pCP15 herausgeschnitten und in die *EcoRV*-Schnittstelle inseriert, wenige Nukleotide nach dem Stopcodon des SCP-Leserahmens (p73-Kan). Der EGFP-ORF (*open reading frame*) wurde mittels PCR, ausgehend von dem Plasmid pEGFP-C1, mit den Primern EGFPSalI.for und EGFPSalI.rev amplifiziert. Das GFP-Leseraster, ohne ATG Startcodon, wurde dabei an beiden Enden mit jeweils einer *SalI*-Schnittstelle versehen. Mit Hilfe dieser *SalI*-Schnittstellen wurde der GFP-ORF, im gleichen Leseraster wie das SCP-Gen (*in frame*), in die *SalI*-Schnittstelle am Anfang des m48.2 (SCP) Leserahmens kloniert. Das daraus entstandene Plasmid wurde pSCP-GFP-Kan genannt.

pSM3fr::SCP-GFP

Das oben beschriebene Plasmid pSCP-GFP-Kan wurde mit *Eco*RI und *Hind*III gespalten und das daraus isolierte 1,5 kb große lineare Fragment wurde zur Mutagenese des wt MCMV-BAC-Plasmid pSM3fr verwendet. Das Fragment enthält die Kanamycin-Resistenzkassette, das *Small Capsid*-Leseraster *in frame* mit dem GFP-ORF und die Homologien zu den flankierenden Regionen des SCP-Gens. Das MCMV-BAC-Plasmid pSM3fr wurde unter Anwendung des „Ein-Schritt-Mutagenese Verfahrens“ (siehe II.2.1.E) in *E. coli* mutagenisiert. Dem neu entstandenen MCMV-BAC-Plasmid pSM3fr::SCP-GFP-Kan wurde in einem weiteren Schritt mit Hilfe der FLP-Rekombinase die FRT-flankierte Kanamycin-Resistenzkassette herausgeschnitten (siehe II.2.1.E.3). Das so entstandene BAC-Plasmid trägt die Bezeichnung pSM3fr::SCP-GFP.

pΔm152-EGFP (auch pEcoO-EGFP genannt)

Das Plasmid pEcoO enthält die wt MCMV-Sequenz von nt-Position 209750 bis 215428. Nach dem Verdau des Plasmides mit *Xho*I und *Nhe*I, wodurch die MCMV-Sequenz von nt-Position 210185 bis 211385 entfernt wurde, folgte die Insertion des *Xho*I-*Pme*I-Stop-*Bam*HI-*Nsi*I-*Nhe*I-Polylinkers (Oligonukleotide m152.for und m152.rev) an dieser Stelle. Dabei wurde die *Nhe*I-Schnittstelle zerstört. Die mit FRT-Sequenzen flankierte Kanamycin-Resistenzkassette wurde über *Sma*I-Schnittstellen aus dem Plasmid pCP15 herausgeschnitten und in die *Pme*I-Schnittstelle des Polylinkers vor die Stopcodons (in allen drei Leseraster) inseriert (pΔ152-Kan). In die *Nsi*I- und *Bam*HI-Schnittstelle des Polylinkers wurde der GFP-ORF unter der Kontrolle des HCMV-Promotors kloniert, welches mit *Bgl*II und *Nsi*I aus dem Plasmid pEGFP-C1 ausgeschnitten wurde. Aus dem entstandenen Plasmid pΔm152-EGFP-Kan wurde mit *Eco*RI und *Sac*I ein lineares Fragment ausgeschnitten, welches homologe MCMV-Sequenzen von nt-Position 209756 bis 212677, die mit FRT-Sequenzen flankierte Kanamycin-Resistenzkassette und das GFP-Leseraster mit HCMV-Promotor enthält. Das MCMV-BAC Plasmid pSM3fr wurde dann mit diesem linearen Fragment mit Hilfe der „Ein-Schritt-Rekombinationsmutagenese“ (siehe II.2.1.E) mutagenisiert. Anschließend wurde die Kanamycin-Resistenzkassette durch Expression der FLP-Rekombinase über die FRT-Sequenzen ausgeschnitten, wodurch das BAC-Plasmid pΔm152-EGFP entstand. Dieses MCMV-BAC-Plasmid trägt das GFP-Leseraster unter Kontrolle des HCMV-Promotors und eine FRT-Sequenz anstelle des Gens m152.

pΔm152-Lactamase (auch pEcoO-Lactamase genannt)

Das offene Leseraster der β -Lactamase wurde ausgehend von dem Plasmid pBluescript mit den Primer β -lactamase.for/ β -lactamase.rev amplifiziert, wobei am 5'-Ende des Genes über die Primer die Nukleotide kodierend für eine *NheI*-Schnittstelle, die Kozak-Sequenz und die Codons für Methionin und Glycin eingefügt wurden und am 3'-Ende eine *BamHI*-Schnittstelle. Das PCR-Produkt wurde mit den Enzymen *NheI* und *BamHI* geschnitten und in den *NheI* und *BamHI* verdaulichen Vektor pEGFP-C1 ligiert. Im neu entstandenen Plasmid p β -Lactamase wird die β -Lactamase unter der Kontrolle des HCMV-Promotors exprimiert. In die *NsiI* und *BamHI* Schnittstellen des Polylinkers des oben beschriebenen Plasmides pΔm152-Kan wurde das β -Lactamase-Leseraster unter Kontrolle des HCMV-Promotors kloniert, welches mit *BamHI* und *NsiI* aus dem Plasmid p β -Lactamase ausgeschnitten wurde. Aus dem entstandenen Plasmid pΔm152-Lactamase-Kan wurde mit *EcoRI* und *SacI* ein lineares Fragment ausgeschnitten, welches homologe MCMV-Sequenzen von nt-Position 209756 bis 212677, die mit FRT-Sequenzen flankierte Kanamycin-Resistenzkassette und den Lactamase-ORF mit HCMV-Promotor enthält. Das MCMV-BAC-Plasmid pSM3fr wurde mit diesem linearen Fragment unter Verwendung der „Ein-Schritt-Rekombinationsmutagenese“ (siehe II.2.1.E) mutagenisiert. Der mit FRT-Sequenzen flankierte Resistenzmarker wurde anschließend eliminiert, wodurch das BAC-Plasmid pΔm152-Lactamase entstand. Dieses rekombinante MCMV-BAC-Plasmid trägt das β -Lactamase-Leseraster unter Kontrolle des HCMV-Promotors und eine FRT-Sequenz anstelle des m152-Gens.

III.1.5 IM SOUTHERN BLOT VERWENDETE SONDEN

LRL-Sonde: Das Plasmid pLRL wurde mit *BamHI* und *NotI* gespalten. Das resultierende 1,5 kb große Fragment, welches das linke und rechte Ende des MCMV-Genoms überspannt, wurde mit DIG-dUTP markiert

lacO-Sonde: Die Spaltung des Plasmides pSV2-dhfr 8.32 mit der Restriktionsendonuklease *XbaI* resultierte in 310 bp großen DNA-Fragmenten, welche komplementär zu der lac-Operatorsequenz sind. Die lacO-Sonde wurde mit DIG-dUTP markiert.

ie1/ie3-Sonde: Die ie1/ie3-Sonde wurde mit *Pst*I aus dem Plasmid pACYC-lacO herausgeschnitten. Sie ist komplementär zur MCMV-DNA-Sequenz von nt-Position 182117 bis nt-Position 182850.

III.1.6 ZELLEN UND VIREN

M2-10B4	Stromazelllinie aus dem Knochenmark der Maus (Lutarewych et al., 1997)
MEF	murine embryonale Fibroblasten aus der BALB/c-Maus
NIH3T3	ATCC CRL 1658, Kontakt-inhibierte, embryonale Zelllinie aus der NIH Swiss-Maus
FDCP-Mix	<i>factor dependent cells Paterson</i> , faktorabhängige hämatopoetische Maus-Stammzelllinie aus dem Paterson-Institut mit gemischtem Differenzierungspotential (Spooncer et al., 1984; Spooncer et al., 1986)
1F5	GM-CSF produzierende B-Zell-Lymphoma-Zelllinie (Schroeder et al., 2000) zur Produktion von GM-CSF konditioniertem Medium.
X63Ag8-653-IL-4	IL-4 produzierende Myeloma-Zelllinie zur Herstellung von IL-4 konditioniertem Medium (Egger et al., 1995)
C2GM	GM-CSF abhängige hämatopoetische Stammzelllinie (Hagenaars et al., 1991)
TS1-C3	IL-4 abhängige Mastzelllinie (Hültner et al., 1989)
MCMV	ATCC VR-194, murines Zytomegalovirus, Stamm Smith
GFP-MCMV	MCMV mit Insertion des ORF's des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) unter Kontrolle des HCMV <i>immediate early</i> -Promotors in der ie2-Region des Virusgenoms (Mathys et al., 2003)

III.2 METHODEN

III.2.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

III.2.1.A Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

III.2.1.A.1 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung von kleinen Mengen Plasmid-DNA (DNA-Minipräparation) wurde der Qiaprep Spin Plasmid Miniprep Kit (Qiagen) verwendet. Drei Milliliter (ml) LB-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie, die auf Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika zur Selektion auf enthaltene Plasmide gewachsen war, angeimpft. Die Bakterienkulturen wurden über Nacht (ÜN) bei 37°C geschüttelt. 1,5 ml der ÜN-Kultur wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßchen pelletiert und das Pellet in 150 µl Lösung P1 resuspendiert. Die Bakterien wurden nach Zugabe von 150 µl Lösung P2 lysiert. SDS, chromosomal DNA und Proteine wurden durch Zugabe von 300 µl Lösung N3 ausgefällt und pelletiert (5 min, 14000 rpm in einer Eppendorfzentrifuge 5415C). Der Überstand wurde auf Qiagen-Kit Säulchen überführt, wo die Plasmid-DNA an die Säulchenmatrix bindet. Nach Zentrifugation (1 min, 14000 rpm) wurde die DNA mit 400 µl Waschpuffer gewaschen und in 100 µl destilliertem Wasser eluiert (1 min, 14000 rpm).

LB-Medium: 10 g Bacto-Trypton
5 g Hefe-Extrakt
8 g Natriumchlorid
pro Liter (l) Wasser

LB-Agar-Platten: LB-Medium mit 18g Bacto-Agar pro Liter Medium

Lösung P1: 25 mM Tris/HCl
10 mM EDTA, pH 8,0
100 µg/ml RNase A)

Lösung P2: 0,2 M NaOH
1% (w/v) SDS

Lösung N3: 3 M KAc, pH 4,8

Um größere Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien (Maxi-Präparation) zu isolieren, wurde der Nucleobond AX 500 Maxi Prep Kit verwendet. 400 ml LB-Medium wurden mit ca. 100 µl

Bakterien einer Vorkultur angeimpft und ÜN bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden bei 6000 rpm für 15 min in einer Sorvall RC 5C Plus-Zentrifuge (GS3-Rotor) pelletiert und in 12 ml Lösung S1 resuspendiert und anschließend in 12 ml Lösung S2 lysiert. Nach Zugabe von 12 ml Lösung S3 und 10 minütiger Inkubation auf Eis zur Ausfällung von SDS, chromosomal DNA und Proteinen wurde das Gemisch durch ein Filterpapier auf die äquilierte Säule (5 ml N2) geladen. Es folgten zwei Waschschritte mit jeweils 12 ml Puffer N3. Nach Elution der DNA mit zweimal 6 ml Puffer N5, wurde die DNA mit je 4,2 ml Isopropanol gefällt und 30 min bei 11000 rpm bei 4°C zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge, SM24-Rotor). Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Die trockene DNA wurde in 100 µl Tris/EDTA (TE)-Puffer gelöst.

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl
1 mM EDTA, pH 8,0

III.2.1.A.2 Isolierung von BAC-DNA

Aufgrund der Größe der BAC-DNA (230 kb) wurden während des Isolationsvorganges größere Scherkräfte durch Schütteln vermieden.

Für eine BAC-DNA-Minipräparation wurden 10 ml LB-Medium in 15 ml-Falcon-Röhrchen mit einer Bakterienkolonie angeimpft und ÜN bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die gewachsene Bakterienkultur wurde bei 3500 rpm in einer Heraeus-Zentrifuge (Varifuge 3.OR) für 5 min zentrifugiert und das Pellet anschließend in 200 µl Lösung I plus RNase A (100 µg/ml) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 300 µl Lösung II zur alkalischen Lyse zugegeben. SDS, chromosomal DNA und Proteine wurden durch Zugabe von 300 µl Lösung III und Inkubation für 10 min auf Eis ausgefällt. Nach Zentrifugation in der Eppendorfzentrifuge (10 min, 14000 rpm, 4 °C), wurde der Überstand mit 1 ml Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert und für weitere 5 min zentrifugiert. Die DNA in der wässrigen Phase wurde anschließend mit 1 ml Isopropanol gefällt und 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit Ethanol (70%) gewaschen, luftgetrocknet und in 100 µl TE-Puffer gelöst.

Lösung I: 50 mM Glucose
25 mM Tris/HCl
10 mM EDTA, pH 8,0
plus RNase A (100 µg/ml)

Lösung II: 0,2 M NaOH
1% (w/v) SDS

Lösung III: 3 M KAc, pH 4,8

Die Isolierung von BAC-DNA in größeren Mengen wurde mit Hilfe des Nucleobond-Kits AX 500 durchgeführt. 400 ml LB-Medium wurden mit ca. 100 µl Bakterien einer Vorkultur angeimpft und ÜN bei 37°C inkubiert. Die Bakterien werden bei 6000 rpm für 15 min in einer Sorvall RC 5C Plus-Zentrifuge (GS3-Rotor) pelletiert. Das weitere Protokoll entspricht dem der Aufreinigung von normaler Plasmid-DNA, ausgenommen die Verwendung von größeren Mengen an Puffer und nochmaligen Ladens des ersten Eluates auf die Säule. Die eluierte DNA wurde mit Isopropanol gefällt, in 70%igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Die trockene DNA wurde in 100 µl TE-Puffer gelöst.

III.2.1.A.3 Isolierung viraler DNA aus Zellen

Zellen wurden mit einer *Multiplicity of Infection* (MOI) von 0,1 infiziert, d.h. auf 10 Zellen kommt ein infektiöses Viruspartikel. Zeigten 90% der Zellen einen zytopatischen Effekt wurde der Überstand abgenommen und die verbleibenden Zellen mit Trypsin abgelöst. Die Zellen wurden pelletiert (5 min, 1500 rpm, 4°C, Heraeus-Zentrifuge) und einmal mit DMEM Medium plus Serum gewaschen. Das Pellet wird in 250 µl 2x Lysispuffer resuspendiert. Die Zellen wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und mit 250 µl 1% (w/v) SDS und 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) gemischt. Nach ÜN-Inkubation bei 56°C, wurde die DNA zweimal mit 600 µl Phenol/Chloroform extrahiert und die obere Phase mit 1/10 Volumen (Vol.). Natriumacetat (3 M) und 0,8 Vol. Isopropanol gefällt (10 min, 14000 rpm, 4°C, Eppendorf-Tischzentrifuge). Das Pellet wurde in 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 100 µl TE-Puffer gelöst.

2x Lysispuffer: 100 mM Tris/HCl
20 mM EDTA, pH 8,0

III.2.1.A.4 Isolierung von MCMV-DNA aus Virionen

Für die Isolierung von MCMV-DNA aus Virionen wurde ein Sucrose-gereinigter Virusstock verwendet (Aufreinigung siehe II.2.2.J). 100 µl der gereinigten Virussuspension wurde mit 50 µl 1% (w/v) SDS und 6 µl Proteinase K (20 mg/ml) gemischt und bei 56°C für 3 Stunden inkubiert. Dabei werden die Strukturproteine des Virions abgebaut und die lineare virale DNA freigesetzt. Nach Extraktion mit Phenol/Chloroform, wurde die DNA mit 1/10 Vol. Natriumacetat (3 M) und 2 Vol. Ethanol gefällt, in 70%igem Ethanol gewaschen und in 50 µl TE-Puffer gelöst.

III.2.1.A.5 Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von DNA

Um die DNA-Konzentration zu erhöhen, wurde DNA mit Hilfe von Natriumacetat (Endkonzentration 300 mM) und zwei Volumen Ethanol bei -20°C für 30 min gefällt. Das Präzipitat wurde für 20 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert, mit Ethanol (70%) gewaschen, luftgetrocknet und in gewünschter Menge an TE-Puffer oder destilliertem Wasser gelöst.

Die DNA-Konzentration wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm im Spektralphotometer (Beckmann) bestimmt. Der Absorptionskoeffizient 260 nm zu 280 nm gibt die Reinheit der gemessenen DNA wieder. Idealerweise liegt dieser Koeffizient zwischen 1,8 und 1,95.

III.2.1.B Klonierung von Plasmiden

III.2.1.B.1 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

Es wurden jeweils 1 µg DNA (Vektor oder Insert) in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit 5-10 Units Enzymaktivität verdaut. Die DNA wurde in 1/10 Volumen des vom Hersteller mitgelieferten 10x Restriktionspuffers bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur für 1-2 Stunden inkubiert.

Um die Religation der geschnittenen Plasmide zu verhindern, wurden mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (*SAP, shrimp alkaline phosphatase*) die 5'-terminalen Phosphatgruppen an den DNA-Enden entfernt. Den Proben wurden mindestens 10000 Units SAP zugegeben und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die SAP wurde anschließend bei 75°C für 20 min inaktiviert.

III.2.1.B.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach erfolgter enzymatischer Spaltung wurden DNA-Fragmente in einem 0,6% bis 1%igen TAE-Agarosegel in TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidumbromid gefärbt. Unter UV-Licht wurden die gewünschten Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit dem GFXTM Purification Kit (Pharmacia) aufgereinigt.

1x TAE-Puffer: 40 mM Tris/HCl
 1mM EDTA
 20 mM Eisessig, pH 7,8

III.2.1.B.3 Ligation

Aufgereinigte DNA wurde im molaren Verhältnis von 1:3 zwischen Vektor und Insert in einem Volumen von 20 µl zur Ligation eingesetzt. Dem Reaktionsansatz wurden 1 Unit T4-DNA-Ligase und 2 µl des mitgelieferten 10x Inkubationspuffers zugesetzt. Die Ligation erfolgte entweder 3 Stunden bei RT oder bei 16°C ÜN.

III.2.1.B.4 Oligonukleotide: Zusammenführung zum Doppelstrang und Klonierung in Plasmide

Komplementäre einzelsträngige Oligonukleotide mit gewünschten Schnittstellen und Überhängen, die für eine Restriktionsenzymsschnittstelle kodieren, müssen zum Doppelstrang zusammengeführt werden, bevor sie in Plasmide ligiert werden können. 10 µg von jedem Oligonukleotid werden mit 10 µl Tris/HCl, pH 8,0 (1 M) und 1 µl MgCl₂ (1 M) mit Wasser auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt. Die DNA wird für 5 min bei 100°C denaturiert und danach bei RT abgekühlt. 1 µl der 100 µl doppelsträngiges Oligonukleotid, 1 µl einer 1:10 Verdünnung und 1 µl einer 1:100 Verdünnung werden zur Ligation mit 50-100 ng verdautem Plasmidvektor eingesetzt.

III.2.1.B.5 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Für die Herstellung elektrokompetenter Bakterien (DH10B (Life Technologies, Deutschland), DH5 α (Life Technologies, Deutschland), oder CHTS (Kempkes et al., 1995) wurden 400 ml LB-Medium mit 5 ml einer ÜN-Vorkultur angeimpft und bei 37°C im Inkubator geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ (optischen Dichte bei 600 nm) von 0,5 bis 0,6 (nach 3-5 Stunden Inkubation) wurden die Bakterien bei 6000 rpm, 4°C für 15 min pelletiert. Alle weiteren Schritte werden auf Eis durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in eisgekühltem Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt und zuletzt wurde das Pellet in 10 ml 15%igem Glycerin resuspendiert, in ein 15 ml-Falcon überführt und 10 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 μ l bis 900 μ l 10%igem Glycerin resuspendiert. Aliquots von 50 μ l wurden in Eppendorf-Röhrchen pipettiert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

III.2.1.B.6 Transformation von elektrokompetenten Bakterien

Ligationsansätze, PCR-Ansätze oder Plasmidpräparationen wurden vor der Elektroporation, zur Verringerung des Salzgehaltes, für 30 min auf einer 200 μ m Filtermembran gegen 1x TE-Puffer dialysiert. 1 μ l des dialysierten Ligationsansatzes oder sonstige zu transformierende DNA wurde zu einem 50 μ l-Aliquot elektrokompetenter Bakterien gegeben. Das Bakterien-DNA-Gemisch wurde in eine eisgekühlte Elektroporations-Küvette (0,2 μ m Durchmesser) pipettiert und bei 2,5 kV, 400 Ω und 25 mF elektroporiert (Gene Pulser, Perkin Elmer). Die Elektroporation von BAC-DNA erfolgte bei 200 Ω . Den transformierten Bakterien wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und sie wurden für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. 100 μ l der Kultur wurde dann auf Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika zur Selektion ausgestrichen.

III.2.1.B.7 Herstellung von Glycerinstammkulturen

Langzeit-Bakterienstammkulturen wurden in Glycerin angelegt. Dafür wurden 900 μ l einer ÜN-Bakterienkultur mit 900 μ l 50%igem Glycerin gemischt und bei -80°C eingefroren und gelagert.

III.2.1.C

Methoden zur DNA-Analyse

III.2.1.C.1 Gelelektrophorese

DNA, die mit Restriktionsenzymen gespalten wurde, wurde zur Analyse oder Aufreinigung in horizontalen Agarosegelen nach Fragmentgröße aufgetrennt. Die gespaltene DNA wurde vor dem Auftragen auf das Gel mit 1/10 Vol. Ladepuffer gemischt. TAE-Agarosegele waren in der Regel 0,6% bis 1%ig, während TBE-Agarosegele für die Auf trennung von BAC-DNA 0,8%ig waren. Die Agarose wurde aufgekocht und nach dem Abkühlen auf Handwärme wurde den TBE-Gelen Ethidiumbromid zugegeben. Als Laupuffer wurden 1x TAE, respektive 0,5x TBE, verwendet. Die Auf trennung erfolgte bei einer Spannung von 80 bis 130 mV für 1 bis 2 Stunden im Falle der kleinen TAE-Gele. Zur Auf trennung der BAC-DNA-Fragmente liefen die großen TBE-Gele bei 70 mV für 14 Stunden.

DNA-Ladepuffer: 15 % (v/v) Ficoll 400
 0,25 % (w/v) Bromphenolblau

1x TAE-Puffer: 40 mM Tris/HCl
 1 mM EDTA
 20 mM Eisessig, pH 7,8

0,5x TBE-Puffer: 90 mM Tris
 90 mM Borsäure
 1 mM EDTA pH 8,0

III.2.1.C.2 Southern Blot

Zum Nachweis von spezifischen DNA-Sequenzen wurde das DNA-Fragmentgemisch auf einem Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer Digoxigenin (DIG)-markierten Sonde hybridisiert. Das anti-DIG-Alkalische Phosphatase (AP) Konjugat bindet an die spezifisch gebundene DIG-Sonde. Die enzymatische Dephosphorylierung des Substrates CSPD durch die alkalische Phosphatase führt zur Emission von Licht, welches

photochemisch nachgewiesen werden kann. Für die Markierung der Sonde und den Nachweis wurde der *DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II* von Roche verwendet.

III.2.1.C.2.1 Transfer der DNA auf die Nylonmembran

Das Agarosegel mit der zu transferierenden DNA wird vor dem Transfer 10 min in 0,25 M HCl inkubiert, dann 45 min in Denaturierungspuffer gelegt und anschließend in Neutralisationspuffer erst 30 min, dann nochmals 15 min inkubiert. Zwischen den Schritten wurde das Gel kurz mit Wasser abgespült. Der Transfer der DNA aus der Agarose auf die Nylonmembran erfolgte mit 20x SSC-Puffer. Nach dem Transfer ÜN wurde die Membran getrocknet und die DNA mit Hilfe von UV-Licht (1 min bei 180 Joules) auf der Membran fixiert.

Denaturierungspuffer: 0,5 M NaOH
 1,5 M NaCl

Neutralisationspuffer: 1 M Tris/HCl
 1,5 M NaCl
 pH 7,4

20x SSC-Puffer: 0,3 M Natriumcitrat
 3 M NaCl
 pH 7,0

III.2.1.C.2.2 Markierung der Sonde mit DIG-dUTP

Die Markierung der DNA erfolgt mit Hilfe von Random-Primer, die an die denaturierte, zu markierende DNA binden und durch die Klenow-Polymerase verlängert werden. Das Desoxyribonukleotidgemisch zur Synthese des komplementären DNA-Stranges enthält neben dATP, dGTP und dCTP, das DIG-markierte-dUTP. Es wurde jeweils 1 µg des zu markierenden DNA-Fragmentes in die Markierungsreaktion eingesetzt. Die DNA wurde für 10 min bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurde von dem *DIG-High Prime*-Gemisch zugegeben und das Markierungs-Gemisch bei 37°C ÜN inkubiert. Die

Reaktion wurde mit 0,2 M EDTA (pH 8,0) gestoppt. Überflüssige Oligonukleotide, dNTPs und Enzyme wurden durch Ausschlusschromatographie mit einer *ProbeQuantG50MicroColumn* (Pharmacia) entfernt.

III.2.1.C.2.3 Hybridisierung und photochemischer Nachweis

Vor der eigentlichen Hybridisierung mit der Sonde, wurde die Membran mit *DIG Easy Hyb* (Roche) für 30 min bei 45°C vorhybridisiert. Die DIG-markierte Sonde wurde vor der Hybridisierung 5 min bei 95°C gekocht und in Eiswasser abgekühlt. Die 1 µg denaturierte Sonde werden zu 25 ml *DIG Easy Hyb* pipettiert und mit der Nylonmembran ÜN bei 45°C inkubiert. Nach der Hybridisierung wurde die Membran zweimal für 5 min mit 2x SSC/0,1% (w/v) SDS bei 45°C gewaschen und 2x für 15 min mit 0,5x SSC/0,1% (w/v) SDS bei 68°C.

Zum photochemischen Nachweis wurde die Membran 5 min im Waschpuffer bei RT äquilibriert und 30 min in Blocking-Puffer inkubiert. Die Bindung des AP-gekoppelten Antikörpers an die DIG-Sonde erfolgte in 20 ml Blocking-Puffer mit 75 mU/ml anti-DIG-AP, worin die Membran 30 min bei RT inkubiert wurde. Nach zweimaligem Waschen (je 15 min) in Waschpuffer, wurde die Membran in Detektions-Puffer für 5 min inkubiert. Die Membran wurde anschließend mit dem Substrat CSPD für 5 min bei RT bedeckt und nachdem die überflüssige Flüssigkeit entfernt wurde, für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Schließlich wurde ein Kodak Biomax-Light Film für 5 bis 10 min exponiert.

Waschpuffer: 0,1 M Maleinsäure
0,15 M NaCl
0,3% (v/v) Tween 20, pH 7,5

Blocking-Puffer: 1% (w/v) Blocking-Reagenz
0,1 M Maleinsäure
0,15 M NaCl
pH 7,5

Detektions-Puffer: 0,1 M Tris/HCl
0,1 M NaCl
pH 9,5

III.2.1.D Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die PCR in der Regel in einem 100- μ l-Reaktionsansatz mit dem Thermocycler T 2400 von Perkin Elmer durchgeführt.

Die Mengen an eingesetzten Reagenzien sahen in der Regel folgendermaßen aus:

50 ng bis 500 ng	Matrizen-DNA (Template)
je 100 pmol	Oligonukleotide (Primer)
je 200 μ M	dATP, dGTP, dCTP, dTTP
10 μ l	AmpliTaq Gold Reaktionspuffer
1 Unit	AmpliTaq Gold DNA-Polymerase

Die PCR-Bedingungen waren:

- einmalige Denaturierung für 5 min bei 95°C
- 28 bis 35 sich wiederholende Zyklen mit:
 - 30 sek. bei 94°C
 - 1 min bei der Hybridisierungstemperatur (*Annealing*) von 55°C oder 62°C
 - 2 min Elongationszeit bei 72°C
- abschließende Elongation für 8 min bei 72°C

III.2.1.E Mutagenese von MCMV-BAC Plasmiden in E. coli Bakterien

In einem ersten Schritt wurden Plasmide hergestellt, welche sowohl die einzubringende Mutation, als auch die Kanamycin-Resistenzkassette flankiert mit FRT-Sequenzen und homologe Sequenzen zu der Stelle tragen, an der die Veränderung vorgenommen werden soll. Für die Mutagenese wurde ein lineares Fragment, welches die entsprechenden Sequenzen enthält, aus den jeweiligen Plasmiden ausgeschnitten, aufgereinigt (siehe II.2.1.B.2), gefällt (siehe II.2.1.A.5) und in einem kleinen Volumen Wasser (10 μ l) aufgenommen. Die linearen Fragmente wurden anschließend in Rekombinations-kompetente Bakterien (II.2.1.E.1) elektroporiert, die das MCMV-BAC Plasmid pSM3fr tragen.

III.2.1.E.1 Herstellung elektrokompetenter und Arabinose-induzierter DH10B-Bakterien

Bakterien des Stammes DH10B (Life Technologies, Deutschland), welche sowohl das zu mutierende pSM3fr MCMV-BAC-Plasmid, als auch das Plasmid pBAD $\alpha\beta\gamma$ tragen, wurden zum Animpfen von 5 ml LB-Medium mit 25 μ g/ml Chloramphenicol und 100 μ g/ml Ampicillin verwendet. Das Plasmid pBAD $\alpha\beta\gamma$ trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette und kodiert für die Gene der Rekombinationsproteine Red α , Red β und Red γ , deren Expression durch Zugabe von Arabinose induziert werden kann (Zhang et al., 1998). Die Vorkultur wurde ÜN bei 37°C inkubiert. 200 ml LB-Medium mit ebenfalls 25 μ g/ml Chloramphenicol und 100 μ g/ml Ampicillin wurden am nächsten Tag mit 2 ml der ÜN-Kultur angeimpft und weiter bei 37°C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,15 bis 0,18 erreicht war. Dann wurden der Bakterienkultur 2 ml einer frisch hergestellten Arabinoselösung (10% (w/v) Arabinose in LB-Medium) zugegeben und weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Die OD₆₀₀ sollte zu diesem Zeitpunkt zwischen 0,25 und 0,35 liegen.

Bei der Herstellung Arabinose-induzierter Rekombinations-kompetenter Bakterien muss darauf geachtet werden, dass alle Materialien und Lösungen auf unter 0°C vorgekühlt werden. Die Bakterienkultur mit einer OD₆₀₀ von 0,25 wurde dann für 15 min auf Eis gestellt und in einer vorgekühlten Sorvall-Zentrifuge (SLA-1500-Rotor) für 10 min bei 6000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10%iger Glycerin-Lösung resuspendiert, der Zentrifugenbecher mit 10%igem Glycerin aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Nachdem dieser Schritt noch zweimal wiederholt wurde, wurde mit einem Papiertuch der Zentrifugenbecherrand abgewischt, d.h. die dort vorhandene Glycerinlösung entfernt, und das Pellet in der im Becher verbliebenen Glycerinlösung resuspendiert. 60- μ l-Aliquots elektrokompetenter Bakterien wurden in Eppendorfröhrchen pipettiert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

III.2.1.E.2 Transformation linearer Fragmente in Rekombinations-kompetente Bakterien

Jeweils 5 μ l der aufkonzentrierten linearen Fragmente, welche sowohl die einzubringende Mutation als auch die Kanamycin-Resistenzkassette flankiert mit FRT-Sequenzen und homologe Sequenzen zu der Stelle tragen, die mutagenisiert werden soll, wurde zu einem Aliquot (60 μ l) Arabinose-induzierter elektrokompetenter Bakterien, die das MCMV-BAC-Plasmid enthalten, pipettiert und bei 2,5 kV, 200 Ω , und 25 mF elektroporiert (GenePulser,

Perkin Elmer). Es wurde unverzüglich 1 ml LB-Medium zugegeben und die transformierten Bakterien für 1,5 Std. bei 37°C geschüttelt, bevor der gesamte Transformationsansatz auf LB-Agarplatten (mit 25 µg/ml Chloramphenicol und 25 µg/ml Kanamycin) ausgestrichen wurde. Bakterien, in denen homologe Rekombination zwischen dem BAC-Plasmid pSM3fr und dem linearen Fragment mit Hilfe der in den Bakterien vorhandenen Arabinose-induzierten Rekombinationsproteine stattfand, bildeten ÜN bei 37°C sichtbare Kolonien.

III.2.1.E.3 Entfernung des mit FRT-Sequenzen flankierten Kanamycin-Selektionsmarkers

Nach erfolgreicher Mutation der BAC-Plasmide wurde die als Selektionsmarker gewählte und eingebrachte Kanamycin-Resistenzkassette mit Hilfe der flankierenden FRT-Sequenzen aus den BAC-Plasmiden entfernt. Die DH10B-Bakterien, welche das mutante MCMV-BAC-Plasmid tragen, wurden hierfür mit dem Plasmid pCP20, welches für die FLP-Rekombinase kodiert, transformiert. Die transformierten Bakterien wurden 1 Stunde bei 30°C geschüttelt und 100 µl des Transformationsansatzes wurden auf LB-Agar-Platten mit Chloramphenicol (25 µg/ml) und Ampicillin (100 µg/ml) ausgestrichen. Nach ÜN-Inkubation bei 30°C wurden 10 Bakterienkolonien erneut auf LB-Agarplatten mit Chloramphenicol ausgestrichen und bei 43°C inkubiert (Verlust des pCP20-Plasmides). Zuletzt wurden ca. 50 Kolonien auf LB-Agarplatten mit Kanamycin und parallel auf LB-Agarplatten mit Chloramphenicol umgepickt und bei 37°C auf Sensitivität gegen Kanamycin getestet.

III.2.2 ZELLKULTUR

III.2.2.A Kultivierung von NIH3T3, M2-10B4 und MEF-Zellen

Die Zelllinie NIH3T3, M2-10B4 und MEF Zellen wurde in supplementiertem DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) kultiviert. Die Zellen wurden alle 3 Tage 1:3 bis 1:5 umgesetzt, indem sie mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA abgelöst wurden. Die Zellen wurden dann in Kulturmedium aufgenommen und auf 10-cm-Zellkulturschalen ausgesät. Die Zellen werden in einem Brutschrank (Heraeus) mit 5% CO₂, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 37°C kultiviert.

DMEM supplementiert: 3% (v/v) NCS (für NIH3T3 Zellen), 5% (v/v) FCS (für M2-10B4 und MEF Zellen), Seren wurde für 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert
0,3 mg/ml L-Glutamin
10 IU/ml Penicillin und 10 IU/ml Streptomycin in DMEM

III.2.2.B FDCP-Mix Zellkultur

Die FDCP-Mix Zelllinie A4 (Spooncer et al., 1984; Spooncer et al., 1986) wurde in IMDM mit einer Osmolarität von 310 bis 320 Milliosmol/kg, 20% (v/v) vorgetestetem Pferdeserum (HS) und mit 20% (v/v) murinem Interleukin-3 (mIL-3) konditioniertem Medium (KM) kultiviert. Dies entspricht einer IL-3 Endkonzentration von 150 U/ml im Medium. Zellen wurden in einer Dichte zwischen 6×10^4 und 10^6 pro ml gehalten. Die Zellzahlen wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt, tote Zellen wurden dabei durch Färbung mit Trypanblau ausgeschlossen. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in einem BB6220 Inkubator (Heraeus, Deutschland) gehalten.

FDCP-Mix Proliferationsmedium: 20% (v/v) vorgetestetes HS
20% (v/v) mIL-3 KM (entspricht einer Endkonzentration von 150 U/ml IL-3)
in IMDM

III.2.2.C Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden im 37°C-Wasserbad schnell aufgetaut und 10 ml Zelltyp-spezifisches Medium wurde langsam über 10 min zugetropft. Die Zellen wurden 10 min bei RT stehen gelassen, anschließend zentrifugiert (Heraeus-Zentrifuge, 5 min, 1200 rpm, RT) und in entsprechendem Medium in Kultur genommen.

III.2.2.D Abtrennung toter Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation

Tote FDCP-Mix-Zellen wurden über einen Ficoll-Dichtegradienten entfernt. Die Zellen wurden dazu in Medium über Ficoll Nycoprep für mononukleäre Zellen (Dichte 1,077) geschichtet und 20 min bei 400 x g zentrifugiert. Lebende Zellen wurden mit einer Pipette aus

der Phasengrenzschicht in IMDM mit Zytokinen und Serum übertragen, zentrifugiert (6 min, 1200 rpm, 20°C, Heraeus-Zentrifuge), in frischem Medium resuspendiert und weiterkultiviert.

III.2.2.E Einfrieren von Zellen

Adhäsente Zellen (NIH3T3, MEF, M10-B4) wurden von den Zellkulturschalen mit Trypsin/EDTA abgelöst, in Medium mit Serum gewaschen (5 min, 1200 rpm, Heraeus-Zentrifuge) und das Pellet in Einfriermedium aufgenommen. Die Zellen wurden schrittweise in Cryo 1°C Freezing Container (Nalgene, Deutschland) auf –80°C heruntergekühlt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Einfriermedium für Fibroblasten: 10% (v/v) DMSO
50% (v/v) DMEM
40% (v/v) FCS oder NCS

Suspensionszellen (FDCP-Mix-Zellen) wurden abzentrifugiert und in Pferdeserum mit 10% (v/v) DMSO in einer Dichte von 10^6 bis 5×10^6 /ml schrittweise ÜN in Cryo 1°C Freezing Container (Nalgene, Deutschland) auf -80°C heruntergekühlt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Einfriermedium für FDCP-Mix-Zellen: 90% (v/v) HS
10% (v/v) DMSO

III.2.2.F Herstellung von konditionierten Medien

Zur Herstellung von mit mIL-4 und mGM-CSF konditionierten Medien wurden die Zelllinien 1F5 für die Produktion von mGM-CSF (Schroeder et al., 2000) und X63Ag8-653-IL-4 für die Produktion von mIL-4 (Egger et al., 1995) verwendet. Die Zellen wurden wie oben beschrieben aufgetaut und in supplementiertem RPMI 1640 Medium (1F5 Zellen), bzw. in supplementiertem IMDM (X63Ag8-653-IL-4) kultiviert. 48 Stunden nach dem Auftauen wurde den Zellen 0,5 mg/ml, bzw. 1 mg/ml G418 zugegeben und die Zellen auf eine Dichte von 1 bis 2×10^5 eingestellt. Daraufhin wurden die Zellen auf total 5×10^8 Zellen expandiert. Die 5×10^8 Zellen wurden in Medium ohne G418 gewaschen und resuspendiert. Die Zellen

III Material und Methoden

wurden mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen/ml ausgesät und für zwei weitere Tage kultiviert. Zum Ernten des mGM-CSF-haltigen und mIL-4-haltigen Überstandes wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min bei 3200 rpm, Heraeus-Zentrifuge) und der Überstand durch einen 0,45 μm Filter filtriert. Das Filtrat wurde in 40 ml Aliquots aufgeteilt und bei -20°C gelagert.

Proliferationsmedium für 1F5 Zellen:

5% (v/v) FCS
2 mM Glutamin
79,6 mg/ml nicht-essentielle Aminosäuren
50 μM 2-Mercaptoethanol
(0,5 mg/ml G418)
in RPMI 1640

Proliferationsmedium für X63Ag8-653-IL-4 Zellen:

15% (v/v) FCS
(1 mg/ml G418)
in IMDM

Die Zytokinkonzentration in den konditionierten Medien wurde durch Messung der Zellproliferation (H^3 -Thymidineinbau) Zytokin-abhängiger Zelllinien bestimmt. GM-CSF abhängige Zellen (C2GM) (Hagenaars et al., 1991) wurden in IMDM plus 20% (v/v) HS und IL-4-abhängige Zellen (TS1-C3) (Hültner et al., 1989) in RPMI 1640 plus 10% (v/v) FCS und 10 μM 2-Mercaptoethanol in 96-Lochplatten ausgesät ($1,2 \times 10^4$ Zellen pro Loch). Verdünnungen des zu testenden konditionierten Mediums wurden in Triplikaten auf die ausgesäten Zellen pipettiert. Zur Berechnung der Zytokinkonzentration im Medium wurden bekannte Mengen (U/ml) an rekombinantem mGM-CSF, respektive rmIL-4 auf die Zytokin-abhängigen Zellen pipettiert. Nach 2 Tagen, wurden 0,5 μCi H^3 -Thymidin pro Loch zugegeben und 24 Stunden danach wurden die Zellen auf *UniFilterPlate-96* Filterplatten (Canberra-Packard, Deutschland) geerntet. Der H^3 -Thymidineinbau wurde mit einem Top-Counter (Packard) nach Standardmethode gemessen.

Proliferationsmedium für C2GM Zellen:

20% (v/v) HS
20% (v/v) IL-3 konditioniertes Medium (entspricht einer Endkonzentration von 150 U/ml IL-3)
in IMDM

Proliferationsmedium für TS1-C3 Zellen:

10% (v/v) FCS
10 – 20 U/ml rmIL-4
10 µM 2-Mercaptoethanol
in RPMI 1640

III.2.2.G Differenzierung der FDCP-Mix-Zellen in dendritische Zellen

Die Differenzierung der FDCP-Mix-Zellen wurde durch einen Wechsel der Zytokine und des Serums im Medium induziert. Die Zellen wurden in IL-3-freiem Medium gewaschen und mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen per ml in Dendriten-Differenzierungsmedium ausgesät. Es wurden jeweils 3 ml der Zellsuspension pro Loch einer 6-Lochplatte kultiviert. Nach 4 Tagen wurde 2 ml frisches Medium (mit 40% (v/v) GM-CSF KM und ohne rIL-3) zugefüttert und nach 7 Tagen wurden die Zellen 1:2 verdünnt. Ab Tag 8 wurde dem Medium zusätzlich 10% (v/v) mIL-4 KM (entspricht 500 U/ml IL-4) zugegeben. An Tag 9 wurden die entstandenen unreifen DCs erneut 1:2 verdünnt und ab Tag 11 für weiterführende Experimente verwendet. Um reife DCs zu erzeugen, wurde den unreifen DCs, 12 Tage nach Start der Differenzierung, für zwei weitere Tage LPS (1 µg/ml) ins Medium gegeben.

Dendriten-Differenzierungsmedium: 20% (v/v) FCS
20% (v/v) (entspricht einer Endkonzentration von 500 U/ml GM-CSF) oder 40% (v/v) GM-CSF KM
50 µM 2-Mercaptoethanol
3 U/ml rmIL-3, bis Tag 2 der Differenzierung
10% (v/v) mIL-4 KM, entspricht einer Endkonzentration von 500 U/ml IL-4, ab Tag 9 der Differenzierung
in IMDM

III.2.2.H Differenzierung von FDCP-Mix-Zellen in Makrophagen

Die Differenzierung der FDCP-Mix-Zellen in Makrophagen wurde durch einen Mediumswechsel induziert. Die Zellen wurden in IL-3-freiem Medium gewaschen und mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen per ml in Makrophagen-Differenzierungsmedium ausgesät. Es wurden jeweils 3 ml der Zellsuspension pro Loch einer 6-Lochplatte kultiviert. Ab Tag 2 wurde frisches Medium ohne rmIL-3, dafür mit rmM-CSF (*recombinant murine macrophage colony stimulating factor*, 20 U/ml) und nur noch 50 U/ml rmGM-CSF gefüttert und die Zellen auf 1×10^5 Zellen/ml verdünnt. Die Zellen wurden weiterhin alle 2 Tage gefüttert, verdünnt und ab Tag 11 für weiterführende Experimente verwendet.

Makrophagen-Differenzierungsmedium: 20% (v/v) FCS
100 U/ml rmGM-CSF oder 50 U/ml rmGM-CSF
2 U/ml rmIL-3, bis Tag 2 der Differenzierung
20 U/ml rmM-CSF, ab Tag 2 der Differenzierung
in IMDM

III.2.2.1 Transfektion eukaryontischer Zellen und Virus-Rekonstitution

Für die Transfektion von MEF Zellen wurde das *Superfect Transfection*-Reagenz von Qiagen verwendet. Es wurden 2 µg Plasmid oder MCMV-BAC-DNA in TE-Puffer mit DMEM ohne Serum und Antibiotika auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt. Zu der DNA-Lösung wurden dann 10 µl *SuperFect*-Transfektionsreagenz gegeben, vorsichtig gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Eine Zellkulturschale (mit einem Durchmesser von 6 cm), zu 60% mit MEF Zellen bewachsen, wurde in der Zwischenzeit mit 4 ml PBS gewaschen. Dem Transfektionsgemisch wurden schließlich 600 µl DMEM mit Serum und Antibiotika zugegeben und auf die Zellkulturschale übertragen. Nach Inkubation für 2 bis 3 Stunden im Brutschrank wurden die Zellen mit 4 ml PBS gewaschen und mit neuem supplementiertem DMEM bedeckt.

Handelte es sich bei der transfizierten DNA um MCMV-BAC-Plasmide, wurden ca. 4 Tage nach der Transfektion Virusplaques sichtbar. Nach mehreren Tagen zeigte ein Großteil der Zellen einen zytopathischen Effekt und der Überstand wurde zur Infektion von M2-10B4 Zellen und Herstellung eines größeren Virusstocks verwendet.

III.2.2.J Herstellung eines MCMV-Virusstocks

Zur Vermehrung von Viren, wurden 15 bis 30 Zellkulturschalen (Durchmesser von 14,5 cm), zu 50% mit M2-10B4 Zellen bewachsen, mit einer MOI von 0,1 infiziert. Nach 4 bis 5 Tagen wurde der Überstand der infizierten Zellen geerntet und Zelltrümmer bei 6000 rpm für 20 min in einer Sorvall-Zentrifuge (GS3-Rotor) pelletiert. Der zellfreie Überstand wurde 3 Stunden bei 13000 rpm und 4°C erneut zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge, SLA-1500-Rotor). Das Viruspellet wurde in 4 ml DMEM resuspendiert und mit einem Dountcer homogenisiert. Das Homogenat wurde vorsichtig auf ein 15%iges (w/v) Sucrosekissen (Sucrose in PBS) geladen und 1 Stunde bei 20000 rpm in einer Ultrazentrifuge (Beckmann L8-80M, SW28-Rotor) zentrifugiert. Das gereinigte Viruspellet wurde in 1 ml bis 2 ml 15%iger Sucrose in PBS resuspendiert, im Dountcer homogenisiert und in 50- μ l-Aliquots aufgeteilt. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert.

III.2.2.K Standard Plaque Assay zur Bestimmung des Virustiters

Zur Bestimmung des Virustiters wurden MEF Zellen in 48-Lochplatten ausgesät. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie mit Verdünnungen (10^{-3} bis 10^{-8} in DMEM) der zu titrierenden Virusstocks oder Zellkulturüberstände infiziert. Dafür wurde von den Zellen das Medium abgesaugt und jeweils 100 μ l der Verdünnungen (jeweils im Triplikat) direkt auf die Zellen pipettiert. Zur Virusaufnahme wurden die Zellen eine Stunde im Brutschrank inkubiert und anschließend mit 500 μ l Carboxymethylcellulose-Medium überschichtet. Nach 5 Tagen Inkubation wurden die entstandenen Plaques unter dem Mikroskop ausgezählt und der Virustiter berechnet. Der Virustiter wurde mit folgender Gleichung bestimmt:

$$\text{Virustiter (pfu/ml)} = \frac{\text{gezählte Plaques} \times \text{Verdünnung}}{\text{Volumen der Verdünnung, welches auf die Zellen gegeben wurde (0,1 ml)}}$$

Carboxymethylzellulose-Medium (500 ml):

3,75 g Carboxymethylcellulose (Sigma)
388 ml Wasser
25 ml FCS
50 ml 10x MEM
0,3 mg/ml L-Glutamin
2,5 ml Lösung an nicht-essentiellen Aminosäuren (Gibco)
10 IU/ml Penicillin/ 10 IU/ml Streptomycin
24,7 ml 7,5%ige NaHCO₃-Lösung

III.2.2.L Infektion der Zellen mit MCMV

Zellen wurden entweder mit oder ohne zentrifugationsverstärkter Adhäsion der Viren infiziert. Ohne Zentrifugation wurde den Zellen die entsprechende Menge an Viruspartikeln ins Medium gegeben und für eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und in frischem Medium weiterkultiviert.

Für die zentrifugationsverstärkte Infektion wurden die Zellen in 6-Lochplatten gehalten. Die der angegebenen MOI entsprechenden Menge an MCMV-Suspension wurde dann pro Loch zugegeben und die Platten wurden 2 x 15 min bei 1500 rpm (Heraeus-Zentrifuge) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen 3 Mal mit PBS gewaschen und in entsprechendem Medium kultiviert.

III.2.3 HERSTELLUNG VON ZYTO SPIN-PRÄPARATEN

Für die Herstellung von Zytospin-Präparaten von Suspensionszellen wurden jeweils 5×10^4 Zellen durch Zentrifugation bei 800 rpm für 6 min mit einer Zytospin3 Zentrifuge (Shandon, England) auf Objektträger aufgebracht und anschließend an der Luft für mindestens 15 min getrocknet.

III.2.4 IMMUNFLUORESZENZ

Zum Nachweis und zur Lokalisation von Proteinen wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Es wurden Zytospins von Suspensionszellen (5×10^4 Zellen pro Spin)

hergestellt, getrocknet und die Zellen in Methanol fixiert (10 min bei RT). Die fixierten Zellen wurden dann mit 0,2% (v/v) Triton X100 in PBS behandelt (10 min bei RT) und zweimal mit PBS gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Proben mit 10% (v/v) FCS in PBS (FCS/PBS) für 15 min bei RT inkubiert. Die Zytospins wurden anschließend 1 Stunde bei 37°C mit dem Erstantikörper (siehe II.1.2) (plus 3% (v/v) FCS) inkubiert. Nach 3 Waschschritten mit PBS wurde der Zweit-Antikörper 1:100 in 3% (v/v) FCS/PBS verdünnt zugegeben und bei 37°C im Dunkeln für 1 Stunde inkubiert. Die Zellen wurden anschließend 3 Mal in PBS gewaschen und mit Eideckmedium (Dako, Deutschland) unter einem Glasplättchen eingebettet.

Für Mikrophotographien mit einem Axiophot Mikroskop (Zeiss, Deutschland) wurden für alle Aufnahmen identische Belichtungszeiten und ein Objektiv mit 63facher Vergrößerung verwendet.

III.2.5 ZYTOFLUOROMETRISCHE ANALYSE (FACS-ANALYSE)

Zur Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen auf Zellen wurden jeweils 5×10^4 bis 10^6 Zellen pelletiert (10 min, 1000 rpm, Heraeus-Zentrifuge) und 5 min bei RT in 50 µl 5% (v/v) FCS/PBS mit Fc-Block (siehe II.1.2) (1:100) (Pharmingen) inkubiert. Die spezifischen, mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FITC, PE oder APC) konjugierten Antikörper (siehe II.1.2) wurden anschließend in einer Verdünnung von 1:200 zugegeben und die Zellen für 20 min im Dunkeln gefärbt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 2% (v/v) FCS/PBS mit 2 µg/ml Propidiumiodid resuspendiert. Die Analyse der Proben wurde mit einem FACScalibur-Durchflusszytometer (Becton Dickinson, USA) durchgeführt und die Ergebnisse mit der Software CellQuest (Becton Dickinson, USA) ausgewertet.

III.2.6 β -LACTAMASE REPORTER-ASSAY

Für den Nachweis der β -Lactamaseaktivität in Zellen, wurden die Zellen mit dem Substrat CCF2/AM beladen, welches von der β -Lactamase hydrolysiert werden kann. Die Hydrolyse des Substrates hat eine Änderung in der Fluoreszenzemissionswellenlänge des Produktes zur Folge, d.h. das ungespaltene Substrat emittiert grüne Fluoreszenz, während das Spaltprodukt blau fluoresziert.

Die Zellen wurden mit rekombinantem MCMV infiziert (MOI = 0,5 bis 5), welches die β -Lactamase exprimiert. Ein Tag nach Infektion wurde das Medium von den Zellen entfernt und 1 ml Ladepuffer zugegeben. Die Zellen wurden in dem Substrat 1 Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ladepuffer entfernt und den Zellen frisches Medium zugegeben. Der Farbumschlag wurde unter dem UV-Mikroskop verfolgt und fotografisch festgehalten

Ladepuffer: 1 μ M CCF2/AM
1 mg/ml Pluronic-F127®
0,001% (v/v) Essigsäure
in 1ml DMEM mit HEPES (25 mM)

III.2.7 LYMPHOZYTEN-PROLIFERATIONS-ASSAY (MIXED LYMPHOCYTE REACTION, MLR)

In vitro hergestellten dendritischen Zellen (DCs) wurde üblicherweise an Tag 11 nach Beginn der Differenzierung das Antigen KLH (*keyhole limpet hemocyanin*, 25 μ g/ml) oder das Tetanus Toxin C-Fragment (TTC, 1 μ g/ml) ins Medium zugegeben. 1 oder 2 Tage danach wurde der Assay angesetzt. Wurden infizierte dendritische Zellen in der MLR verwendet, so wurden diese für einen oder zwei weitere Tage mit MCMV-GFP infiziert und dann wurde der Assay erst angesetzt. Ebenso wurden dendritische Zellen für ein oder zwei Tage mit UV-inaktiviertem GFP-MCMV behandelt, bevor die MLR angesetzt wurde. Für den Assay wurden die Zellen abzentrifugiert und mit RPMI 1640 supplementiert mit 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin und 50 μ M 2-Mercaptoethanol auf 7×10^5 Zellen pro ml eingestellt. Davon ausgehend wurden von den DCs Verdünnungen (1:10, 1:30 und 1:100) hergestellt, jeweils 100 μ l pro 96-Loch ausgesät und für 20 min mit 20 Gy bestrahlt. Jeweils 2×10^5 autologe (aus der B₆D₂F₁ Maus) oder allogene (aus der BALB/c Maus) T-Zellen wurden pro 96er-Loch zu den Verdünnungen der DCs gegeben, sodass die Verhältnisse von T-Zellen zu dendritischen Zellen 3:1, 10:1, 30:1 und 100:1 waren. Als Positivkontrolle der T-Zellproliferation, wurden T-Zellen mit PHA-M (4 μ g/ml) und rhIL-2 (40 U/ml) inkubiert. T-Zellen und DCs alleine dienten als Negativkontrollen. Von allen Verdünnungen und Kontrollen wurden Triplikate angesetzt. Nach 5 Tagen wurde den Zellen 1 μ Ci H³-Thymidin pro Well zugegeben und 18 Stunden später wurden die Zellen auf *UniFilterPlate-96* Filterplatten (Canberra-Packard, Deutschland) geerntet. Der H³-Thymidineinbau wurde mit einem Top-Counter (Packard) nach Standardmethode gemessen.

IV ERGEBNISSE

IV.1 INFektION VON ZELLEN DES HÄMATOPOETISCHEN SYSTEMS MIT MCMV

Um das Virus und seine Pathogenese besser verstehen zu lernen, ist es wichtig, infizierbare Zelltypen, in denen sich das Virus latent etablieren kann, zu identifizieren und zu charakterisieren.

In dieser Arbeit wurde die murine hämatopoetische Stammzelllinie FDCP-Mix (Spooncer et al., 1984; Spooncer et al., 1986) verwendet, um die Frage zu prüfen, ob MCMV in hämatopoetische Vorläuferzellen eindringen und sich das virale Genom latent in den Zellen etablieren kann. FDCP-Mix-Zellen sind unreife, multipotente Vorläuferzellen, die die Stammzellmarker Sca-1 und CD34 auf ihrer Oberfläche exprimieren (Ford et al., 1992). Frühe Zellisolate sind fähig, die Hämatopoiese in letal bestrahlten Mäusen zu rekonstituieren (Spooncer et al., 1984).

Zur Untersuchung der Infizierbarkeit von undifferenzierten FDCP-Mix-Zellen mit MCMV wurden Strategien verfolgt, die unabhängig von der viralen Replikation und Genexpression sind, da - basierend auf den Kenntnissen von HCMV - keine oder nur schwache virale Genexpression in diesen Zellen erwartet wurde. Neben der Etablierung von DNA-Nachweismethoden (PCR und Southern Blot) wurden MCMV-Mutanten hergestellt, deren Eindringen in Zellen auch dann nachgewiesen werden kann, wenn die Infektion nicht zur viralen Genexpression führt. Die MCMV-Genome wurden einerseits so verändert, dass die virale DNA optisch durch Bindung von GFP an die DNA in den Zellen lokalisiert werden kann. Zum anderen sollte das Viruskapsid mit GFP markiert werden, um den Eintritt der Viren in Zielzellen zu verfolgen. Für weitere Infektionsstudien wurden außerdem rekombinante Viren hergestellt, welche leicht nachweisbare Reportergene (GFP oder β -Lactamase) exprimieren.

IV.1.1 DAS LAC-OPERATOR-REPRESSOR SYSTEM ZUM NACHWEIS VIRALER DNA IM ZELLKERN

Für den Nachweis viraler DNA in Zellen, die keine virale Genexpression erlauben, sollte das lac-Operator-Repressor System (Robinett et al., 1996) verwendet werden. Diese Methode erlaubt die *in situ* Lokalisierung von DNA-Sequenzen und basiert auf der Bindung von Sequenz-spezifischen DNA-Bindungs-Proteinen, wobei der lac-Repressor (lacI) mit großer

Affinität an die lac-Operatorsequenz (lacO) bindet. DNA, die lac-Operatorsequenzen enthält, kann somit optisch nach spezifischer Bindung von GFP-lac-Repressor-Fusionsproteinen (GFP-lacI) durch UV-Mikroskopie in Zellen nachgewiesen werden.

IV.1.1.A Die lac-Operator-Repetitionssequenz ist im viralen Genom nicht stabil

Durch homologe Rekombination in murinen Fibroblasten (NIH3T3) zwischen dem MCMV-BAC-Plasmid pE1 (Angulo et al., 1998) und einem linearen Fragment aus pACYC-lacO (lacO-Fragment) (siehe III.1.4.B), welches die lac-Operator-Repetitionssequenzen (Robinett et al., 1996) und Homologien zu den MCMV-*immediate early* (ie) Regionen trägt, sollte das rekombinante MCMV-BAC-Plasmid pE1-lacO entstehen (siehe III.1.4.B). pE1 trägt eine 1,6 kb große Deletion im MCMV-Genom, welche den Enhancerbereich und das erste Exon der Region ie1/ie3 betrifft (Angulo et al., 1998). Das pE1 BAC-Plasmid ist in NIH3T3 Zellen aufgrund dieser Deletion Replikations-inkompetent, sodass nur nach erfolgreicher Rekombination, d.h. Wiederherstellung des Enhancerbereiches und der fehlenden ie1/ie3 Region, infektiöses Virus entstehen kann. Die aus der Rekombination entstehenden MCMV-Genome haben im Vergleich zum wt MCMV-Genom aufgrund der zusätzlich eingebrachten lacO-Repetitionssequenz eine Überlänge von 7,1 kb (siehe III.1.4.B).

Das MCMV-BAC-Plasmid pE1 und das lacO-Fragment aus pACYC-lacO wurden in NIH3T3 Zellen ko-transfiziert. Als Kontrollen wurden das Plasmid pE1 alleine und pE1 zusammen mit dem Plasmid pBAM25 (Keil et al., 1984), das ebenfalls Sequenzen zur Komplementation (nt-Position 176441 bis nt-Position 187035) der Deletion in pE1 enthält, transfiziert. Vier Tage nach der Transfektion waren bei den Transfektionsansätzen pE1+lacO-Fragment und pE1+pBAM25 Plaques im Zellrasen zu sehen, während das bei der Kontrolltransfektion mit pE1 alleine nicht der Fall war. Nach vollständiger Lyse der mit pE1+lacO-Fragment transfizierten Zellen wurde virale DNA isoliert. Die gereinigte virale pE1-lacO-DNA wurde zur Analyse mit der Restriktionsendonuklease *Hind*III gespalten und auf einem Agarosegel aufgetrennt (Abb. 7A). Die gespaltene pE1-lacO-DNA und das wt MCMV-BAC-Plasmid pSM3fr wurden im Southern Blot zum einen mit der ie1/ie3-Sonde (siehe III.1.5) und zum anderen mit einer Sonde, die komplementär zu den lacO-Sequenzen ist (siehe III.1.5), hybridisiert (Abb. 7B). Die Spaltung des wt MCMV-BAC-Plasmides pSM3fr mit *Hind*III diente als Kontrolle.

Die Spaltung des BAC-Plasmides pSM3fr mit *Hind*III und Hybridisierung mit der zur ie1/ie3-Region von MCMV komplementären Sonde zeigte erwartungsgemäß eine Bande bei 7,1 kb

(Abb. 7B, pSM3fr). Nach erfolgreicher homologer Rekombination zwischen dem BAC-Plasmid pE1 und dem lacO-Fragment, resultierend in der Rekonstitution des Enhancerbereiches und der Integration der lacO-Sequenzen ins virale Genom, sollte für beide Sonden ein Hybridisierungssignal bei 14,2 kb zu sehen sein (Abb. 7C, pE1-lacO). Für die aus Zellen isolierte pE1-lacO-DNA waren jedoch statt einer 14,2-kb-Bande, mehrere Banden zu sehen, die alle kleiner waren (Abb. 7C). Diese Banden repräsentierten ein Gemisch von rekombinanten Virus-Genomen, bei denen die Zahl der integrierten lac-Operatorsequenzen variierte. Alle Hybridisierungssignale konnten sowohl mit der ie1/ie3-Sonde als auch der lacO-Sonde detektiert werden, mit Ausnahme der 5,5-kb-Bande. Das 5,5-kb-*HindIII*-Fragment repräsentierte MCMV-Genome, die entsprechend dem pE1 MCMV-BAC-Plasmid, eine 1,6 kb große Deletion im Enhancerbereich trugen. Diese deletierten Virusgenome konnten nur in Anwesenheit anderer replikations-kompetenter Viren, welche virale Proteine *in trans* zur Verfügung stellen, replizieren und verpackt werden. Die Abbildung 7D stellt die im Southern Blot (Abb. 7C) beobachteten Fragmenten des *HindIII*-Verdaus von pE1-lacO-DNA schematisch dar. Die 6,9 kb, 6 kb und die 4,5 kb-Bande repräsentieren virale MCMV-Genome, bei denen das Exon 1 der ie1/ie3-Region und der MCMV-Enhancer erfolgreich wiederhergestellt wurde. Sie unterscheiden sich jedoch in der Anzahl integrierter lac-Operatorsequenzen. Während die 6,9-kb-Bande MCMV-Genome mit neun integrierten lac-Operator Octameren zu je 292 bp repräsentiert, sind in den Genomen mit einer 6-kb-Bande nur sechs lacO-Octamere, bzw. bei der 4,4-kb-Bande nur ein lacO-Octamer integriert. Diese Daten zeigten, dass aus der homologen Rekombination zwischen dem BAC-Plasmid pE1 und dem lacO-Fragment in eukaryontischen Zellen ein Gemisch aus MCMV-Mutanten entstand, von denen keine die vollständige Anzahl (256) an lac-Operatoren (je 32 bp) trug. Es wurden maximal 90 lac-Operatoren (was ca. 2,7 kb entspricht) stabil in das MCMV-Genom integriert. Diese 2,7 kb große lacO-Sequenz hatte ungefähr die Größe der aus der Rekombination resultierenden 2,9 kb großen Deletion in der ie2-Region, sodass die Gesamtgenomgröße des rekombinanten MCMV-Genoms die Größe des wt MCMV-Genoms nicht überschritt. Diese Resultate bestätigten, dass MCMV-Genome mit Überlänge in Zellen nicht stabil sind (Wagner et al., 1999) und daher kaum in Kapside verpackt werden.

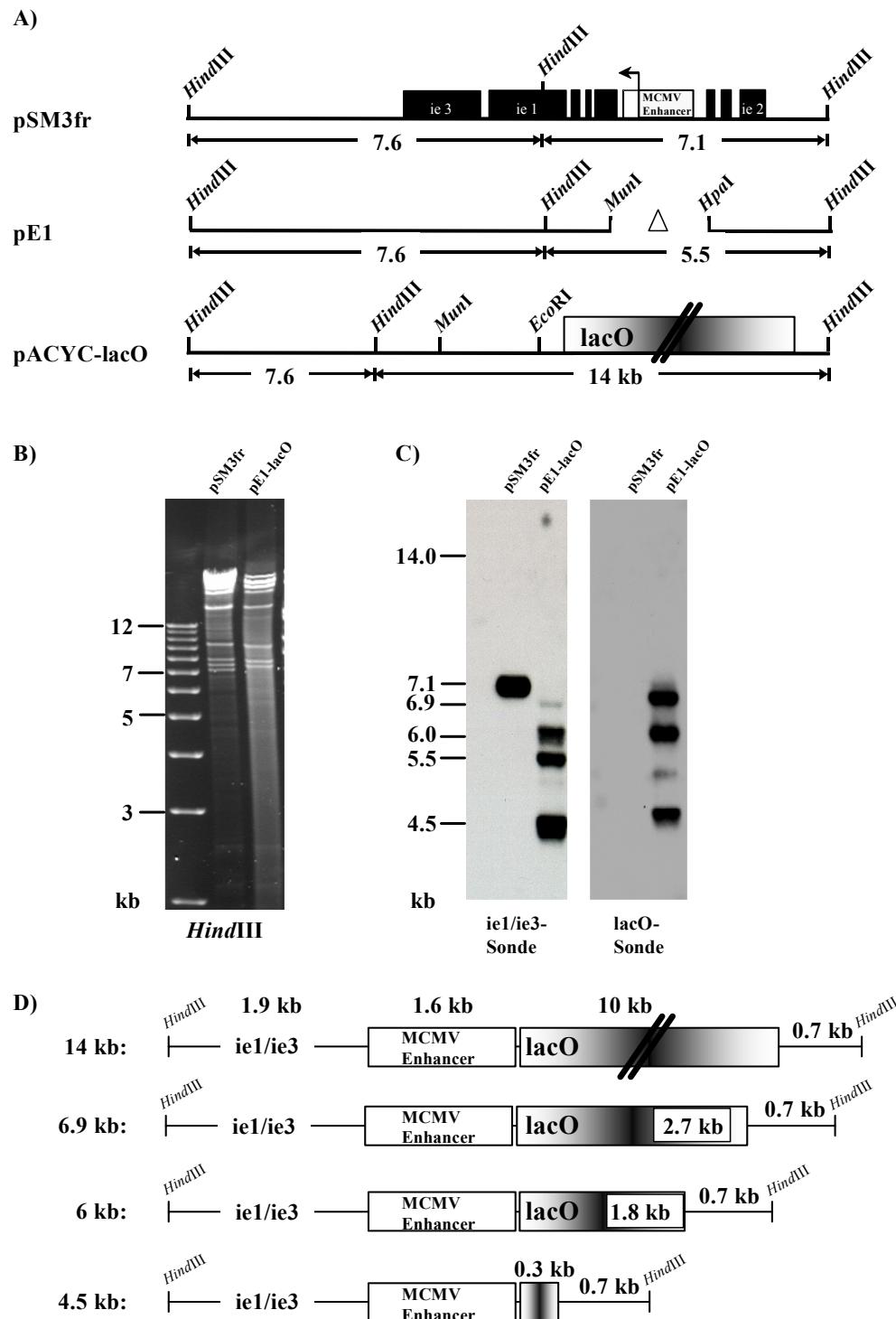


Abb. 7 Insertion von lac-Operatorsequenzen (lacO) in das MCMV-Genom. (A) Schematische Darstellung der Genomregion des wt MCMV-BAC-Plasmides pSM3fr, in der die *immediate early* Gene ie1/ie3 und ie2 lokalisiert sind. Das MCMV-BAC-Plasmid pE1 trägt eine 1,6 kb große Deletion in diesem Bereich. Mittels homologer Rekombination zwischen dem lacO-Fragment aus dem Plasmid pACYC-lacO, das die lac-Operatorsequenz und Homologien zu den MCMV-*immediate early* Regionen trägt, sollte das rekombinante MCMV-BAC-Plasmid pE1-lacO entstehen. **(B)** NIH3T3 Zellen wurden mit dem MCMV-BAC-Plasmid pE1 und dem lacO-Fragment aus pACYC-lacO transfiziert und die virale DNA pE1-lacO, das Resultat homologer Rekombination, isoliert. Die pE1-lacO-DNA und das wt BAC-Plasmid pSM3fr wurden mit HindIII gespalten, auf einem 0,7%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. **(C)** Mit einer DIG-dUTP markierten DNA-Sonde, die komplementär zum Anfang der ie1/ie3-Region (nt-Position 182117 bis nt-Position 182850) von MCMV ist, respektive mit einer DNA-Sonde, die mit den lacO-Sequenzen hybridisiert, wurde die DNA im Southern Blot analysiert. Die Größe der Fragmente und Banden ist links neben den Abbildungen in Kilobasenpaaren (kb) angegeben. **(D)** Schematische Darstellung der im Southern Blot beobachteten Fragmente des HindIII-Verdaus von pE1-lacO-DNA.

Mit Hilfe von NIH3T3-Zellklonen, die mit dem Plasmid p3'SSClonEGFP (kodiert für das Fusionsprotein lacI-GFP) transfiziert worden waren, wurde überprüft, ob auch virale Genome mit nur 90 integrierten lac-Operatoren nach Bindung des Fusionsproteins lacI-GFP in den Zellen detektiert werden können. Leider konnte jedoch nach Infektion der Zellen mit der MCMV-Mutante pE1-lacO keine punktuell starke grüne Fluoreszenz in den Zellen beobachtet werden. Dies bedeutete, dass die geringe Anzahl an stabil integrierten lac-Operatoren und die entsprechend reduzierte Anzahl an lacI-GFP-Fusionsproteinen, die zur Detektion der DNA an die virale DNA gebunden hatten, zu gering war. Von der Verwendung dieses Systems als DNA-Nachweismethode für weitere Experimente wurde somit abgesehen.

IV.1.2 ETABLIERUNG VON SOUTHERN BLOT UND POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR) ZUM NACHWEIS VON MCMV-GENOMEN IN HÄMATOPOETISCHEN ZELLEN

Als Alternative zum Nachweis viraler DNA mit dem lac-Operator-Repressor-System (siehe IV.1.1) wurde der Virus-DNA-Nachweis mittels Southern Blot und PCR etabliert.

IV.1.2.A Nachweis viraler DNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion

Der Nachweis viraler Infektion mittels PCR basiert auf der Tatsache, dass das MCMV-Genom nach seinem Eintritt in den Kern zirkuliert (Marks und Spector, 1984), während es im Virion linear vorliegt. Für die PCR wurden Primer verwendet, welche rechts von dem *pac1*-Sequenzelement am linken Genomende und links von der *pac2*-Sequenz am rechten Ende des Genoms binden (Abb. 2) und aus dem Genom hinaus verlängert werden. Liegen die MCMV-Genome in linearem Zustand vor, wird kein PCR-Produkt synthetisiert. Ist das MCMV-Genom jedoch zirkulär, wird über das Genomende bzw. den Genomanfang hinweg, ein PCR-Produkt gebildet. Im Gegensatz zu dem Ansatz des DNA-Nachweises mit dem lac-Operator-Repressor System (IV.1.1), müssen bei dieser Methode die Zellen für die Isolation viraler DNA lysiert werden.

Zur Etablierung der PCR mit viraler DNA wurden NIH3T3 Zellen mit einer MOI von 0,3 mit MCMV infiziert, zwei Stunden nach Infektion die Zellen abgelöst und die Gesamt-DNA aus den Zellen isoliert. Neben der isolierten viralen DNA wurde DNA aus nicht-infizierten NIH3T3 Zellen als Negativkontrolle, BAC-Plasmid pSM3fr als zirkuläre Positivkontrolle und lineare virale DNA aus Sucrose-gereinigtem wt MCMV-Virusstock als Matrize (*Template*) in die PCR eingesetzt. Im Falle vorliegender zirkulärer MCMV-Genome erlauben die Primer Term.for/Term.rev (siehe III.1.3) die Synthese eines 570 bp langen PCR-Produktes. Liegen

die MCMV-Genome jedoch in linearem Zustand vor, sollte kein PCR-Produkt synthetisiert werden. Die Auftrennung der PCR-Produkte auf einem 1,5%igen Agarosegel zeigte für nicht-infizierte Zellen kein PCR-Produkt (Abb. 8, Spur 2), während für das zirkuläre BAC-Plasmid pSM3fr die erwartete Bande bei 570 bp (Abb. 8, Spur 3) zu sehen war. Die PCR, für die isolierte MCMV-DNA aus den Fibroblasten als Template verwendet wurde, wies neben der erwarteten 570 bp-Bande zwei weitere Banden der Größe 540 bp und 630 bp auf (Abb. 8, Spur 4). Auch die PCR, mit DNA-Template isoliert aus gereinigten MCMV-Virionen, zeigte drei Banden der Größe 540 bp, 570 bp und 630 bp (Abb. 8, Spur 5).

Da das wt MCMV-Genom an jedem Ende kurze (31 bp) direkte Wiederholungssequenzen (*direct terminal repeats*) trägt (Rawlinson et al., 1996), ist es möglich, dass die verschiedenen großen PCR-Produkte zirkularisierte MCMV-Genome mit unterschiedlicher Anzahl an terminalen Repetitionssequenzen repräsentierten. Ist an jedem viralen Genomende jeweils eine Repetitionssequenz vorhanden, erhält man ein 570 bp großes PCR-Produkt. Besitzen die MCMV-Genome jedoch nur eine Wiederholungssequenz oder fand eine Verdopplung der terminalen Repetitionssequenzen statt, sind die PCR-Produkte 540 bp, respektive 630 bp groß. Ein möglicher Grund für die Synthese zirkulärer PCR-Produkte, ausgehend von der linearen DNA aus MCMV-Virionen, kann sein, dass die Repetitionssequenzen der beiden Genomenden sich während des Hybridisierungsschrittes der PCR aneinander anlagern. Die Hybridisierung der Genomenden führt so zur Bildung eines zirkulären Templates, das die Basis für zirkuläre PCR-Produkte sein könnte. Eine andere Erklärung für die unerwarteten zirkulären PCR-Produkte in Spur 5 ist, dass die Virionenpräparation nicht rein war, d.h. dass die Präparation mit zirkulären MCMV-Genomen aus der Zellkultur kontaminiert war.

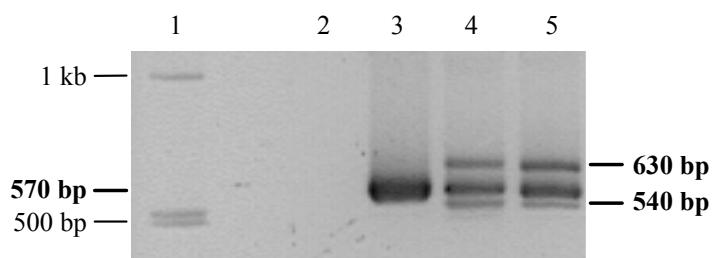


Abb. 8 Zirkuläre MCMV-PCR-Produkte trotz linearem viralem Template. Isolierte virale, zelluläre und Plasmid-DNA wurden als Matrizen in die PCR eingesetzt und unter Verwendung der Primer Term.for/Term.rev amplifiziert. PCR-Produkte und der Größenstandardmarker (Spur 1) wurden in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Als Negativkontrolle, bzw. Positivkontrolle wurde aus nicht-infizierten NIH3T3 Zellen isolierte DNA (Spur 2), respektive zirkuläre MCMV-BAC-Plasmid DNA pSM3fr (Spur 3) verwendet. NIH3T3 Zellen wurden mit wt MCMV (MOI von 0,3) infiziert und die DNA zwei Stunden nach Infektion isoliert. Das PCR-Produkt ausgehend von viraler DNA aus infizierten Zellen ist in Spur 4 aufgetragen. In Spur 5 wurde das PCR-Produkt ausgehend von der aus MCMV-Virionen isolierten DNA geladen.

Diese Resultate weisen auf eine Reihe von Schwierigkeiten hin, die bei der Durchführung der PCR zum Nachweis einer MCMV-Infektion auftreten können, sodass auf die Verwendung dieser Methode für weitere Versuche verzichtet wurde.

IV.1.2.B Etablierung des Southern Blots zum Nachweis zirkulärer MCMV-Genome nach Infektion

Im vorliegenden Versuch wurde untersucht, ob der Southern Blot eine Unterscheidung zwischen zirkularisierter MCMV-DNA und linearen MCMV-Genomen erlaubt. Zu diesem Zweck wurden Fibroblasten mit MCMV infiziert und Gesamt-DNA (setzt sich aus viraler und zellulärer DNA zusammen) zu verschiedenen Zeitpunkten aus den Zellen isoliert. Nach einer Restriktionsspaltung der DNA mit *Sall*, wurde die DNA im Southern Blot auf ihren Zustand hin analysiert. Die dazu verwendetet Sonde LRL (siehe III.1.5) überspannte das linke und rechte Ende das MCMV-Genoms. Lag das MCMV-Genom in zirkulärer Form vor, war auf dem Blot eine Bande bei 2,7 kb zu erwarten. War das Genom jedoch linear, sollten zwei Banden von 1,5 kb und 1,2 kb Größe zu sehen sein. Zur Etablierung des Infektionsnachweises mit Hilfe des Southern Blots wurden Fibroblasten mit MCMV (MOI = 5) infiziert. Zwei, vier, sechs, acht und 24 Stunden nach Infektion wurde DNA aus den infizierten Zellen isoliert und im Southern Blot mit der LRL-Sonde hybridisiert. In Abbildung 9 ist das Ergebnis dieses Versuches zu sehen.

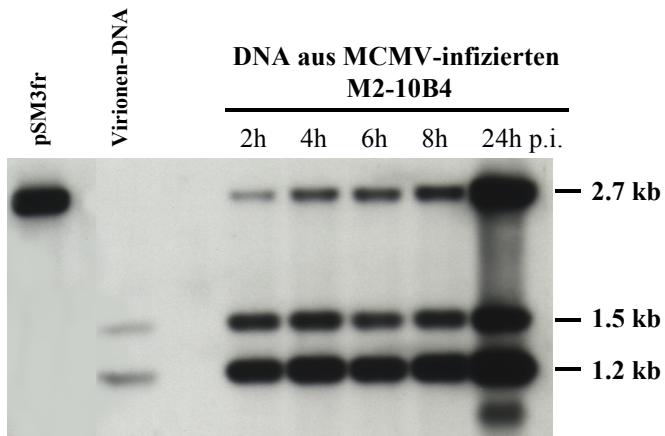


Abb. 9 Anstieg der Anzahl zirkulärer MCMV-Genome in Fibroblasten. M2-10B4 Zellen wurden mit MCMV infiziert (MOI von 5) und Gesamt-DNA zu den Zeitpunkten zwei, vier, sechs, acht und 24 Stunden nach Infektion (h p.i.) isoliert. Aus Zellen und Virionen isolierte DNA sowie BAC-Plasmid-DNA wurde, nach der Spaltung mit *Sall*, in einem 0,7%igen Agarosegel aufgetrennt und im Southern Blot auf eine Nylonmembran übertragen. Der Blot wurde mit der DIG-dUTP markierter LRL-Sonde hybridisiert. Die charakteristische Bandengröße für zirkuläre MCMV-Genome von 2,7 kb ist in durch das MCMV-BAC-Plasmid pSM3fr repräsentiert. Aus Sucrose-gereinigten Virionen isolierte DNA repräsentiert die Bandengrößen linearer viraler Genome. Virale DNA, welche zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion aus Fibroblasten isoliert wurde, ist unter den jeweiligen Zeitpunkten aufgetragen. Die Bandengrößen sind rechts neben der Abbildung in Kilobasenpaaren (kb) angegeben.

Als Kontrolle für die zirkuläre DNA diente das MCMV-BAC-Plasmid pSM3fr (Abb. 9), welches das erwartete Signal bei 2,7 kb zeigte, und daneben waren die erwarteten Banden bei 1,5 kb und 1,2 kb für lineare virale DNA (Virionen-DNA) zu sehen, die aus gereinigten MCMV-Virionen isoliert worden war. Die Intensität des Signals zirkularisierter MCMV-DNA (2,7 kb) aus infizierten Fibroblasten wurde mit zunehmender Infektionsdauer deutlich stärker (Abb. 9). Dies spiegelte eine steigende Anzahl an zirkularisierten MCMV-Genomen in den Zellen wider, die mit der einsetzenden Replikation des Virus nach 24 Stunden einherging. Diese Resultate zeigten, dass im Southern Blot zwischen linearen und zirkulären DNA-Molekülen unterschieden werden kann und sich diese Methode somit zum Nachweis viraler zirkularisierter DNA in Zielzellen eignete.

IV.1.3 MARKIERUNG DES KLEINEN MCMV-KAPSID-PROTEINS (*SMALL CAPSID PROTEIN*) MIT GFP FÜR INFektionsstudien

Mit Hilfe eines rekombinanten MCMV mit *Green Fluorescent Protein* (GFP)-markiertem Kapsid konnte zusätzlich zum Eintritt des Virus in die Zelle der Zusammenbau des Kapsides und der Austritt neu synthetisierter Virionen aus den Zellen verfolgt werden. Das Kapsid, welches das CMV-Genom umgibt, ist ikosaedrisch aufgebaut und besteht im Fall von HCMV aus mindestens 4 Proteinen (Gibson, 1996). Dabei handelt es sich um das *Major Capsid Protein*, das *Minor Capsid Protein*, das *Minor Capsid-Binding Protein* und das *Small Capsid Protein* (SCP). Das MCMV-SCP ist homolog zum HCMV-SCP und dem Kapsid-Protein VP26 von HSV-1 (Gibson et al., 1996). Für HCMV (Butcher et al., 1998; Chen et al., 1999) und HSV-1 (Zhou et al., 1995; Zhou et al., 2000) wurde gezeigt, dass das SCP bzw. das VP26 von HSV-1 auf der Spitze von hexameren Kapsomeren lokalisiert ist. VP26 ist für HSV-1 *in vitro* nicht essentiell (Desai et al., 1998) und die Klonierung des GFP-ORFs *in frame* mit dem VP26-Gen resultierte in der Expression eines VP26-GFP Fusionsproteins, das in das HSV-1 Kapsid und in infektiöse Virionen eingebaut wurde (Desai und Person, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine ähnliche MCMV-Mutante hergestellt werden, welche für ein Fusionsprotein, bestehend aus dem MCMV-SCP (m48.2) und dem GFP, kodiert.

IV.1.3.A Konstruktion eines SCP-GFP Fusionsprotein-kodierenden MCMV-Genoms

Aufgrund der Sequenzhomologien der SCPs von HCMV, HSV-1 und MCMV (Gibson et al., 1996) wurde angenommen, dass das MCMV-SCP eine ähnliche Struktur wie das HSV-1 VP26 Protein aufweist. Analog zu der HSV-1 Mutante (Desai und Person, 1998) wurde das GFP am Amino-Terminus des SCPs (offener Leserahmen (ORF) m48.2) von MCMV eingefügt. Mit Hilfe des „Ein-Schritt-Mutagenese-Verfahrens“ (siehe III.2.1.E) wurde eine MCMV-BAC-Mutante in *E. coli* hergestellt, welche für das SCP-GFP Fusionsprotein kodiert. Hierfür wurde das Plasmid pSCP-GFP-Kan konstruiert, das den offenen Leserahmen (ORF) m48.2 von MCMV trägt, sowie die für die Rekombination in das MCMV-Genom notwendigen flankierenden homologen Sequenzen. Der GFP-ORF, ohne Startcodon, wurde *in frame* mit dem SCP-ORF in die *SalI*-Schnittstelle am 5'-Ende des SCP-ORFs inseriert. Das resultierende SCP-GFP Fusionsprotein trägt am Amino-Terminus vier Aminosäuren des SCPs, gefolgt von dem GFP, das in den Carboxy-Terminus des SCPs übergeht. Unmittelbar nach dem Stopcodon des SCP-GFP-ORFs wurde als Selektionsmarker eine Kanamycin-Kassette, flankiert mit FRT-Sequenzen, inseriert. Mit Hilfe homologer Rekombination in *E. coli* wurde der wt SCP-ORF durch den SCP-GFP-ORF im MCMV-BAC-Plasmid pSM3fr (Abb. 10A, Zeile 1) ersetzt und zusätzlich die Kanamycin-Resistenzkassette inseriert. Das hieraus resultierende BAC-Plasmid pSM3fr::SCP-GFP-Kan (Abb. 10A, Zeile 2) wurde mit der Restriktionsendonuklease *SalI* gespalten und im Agarosegel analysiert (Abb. 10B, Spur 2). Während das mit *SalI* gespaltene parentale BAC-Plasmid pSM3fr ein 4,5 kb großes *SalI*-Fragment aufwies (Abb. 10B, Spur 1), wurde dieses 4,5 kb-Fragment, nach erfolgreicher Rekombination des pSM3fr mit dem SCP-GFP-Kan-Fragment, durch ein 5,9 kb großes *SalI*-Fragment ersetzt (Abb. 10B, Spur 2). Da die Insertion der Kanamycin-Kassette zu einer Destabilisierung der viralen Transkripte führen oder mit der korrekten Termination des SCP-GFP-ORFs interferieren kann, wurde diese mit Hilfe der FLP-Rekombinase über die FRT-Sequenzen aus dem BAC-Plasmid pSM3fr::SCP-GFP-Kan entfernt (siehe II.2.1.E.3), resultierend in dem MCMV-BAC-Plasmid pSM3fr::SCP-GFP (Abb. 10A, Zeile 3). Nach dem Entfernen der Kanamycin-Resistenzkassette war im *SalI*-Restriktionsverdau des MCMV-BAC-Plasmides pSM3fr::SCP-GFP erwartungsgemäß eine 4,6 kb Bande anstelle der 5,9-kb-Bande zu sehen (Abb. 10B, Spur 3). Eine Sequenzierung des rekombinanten MCMV-BAC-Plasmides pSM3fr::SCP-GFP zeigte die erwartete DNA-Sequenz an der Insertionsstelle.

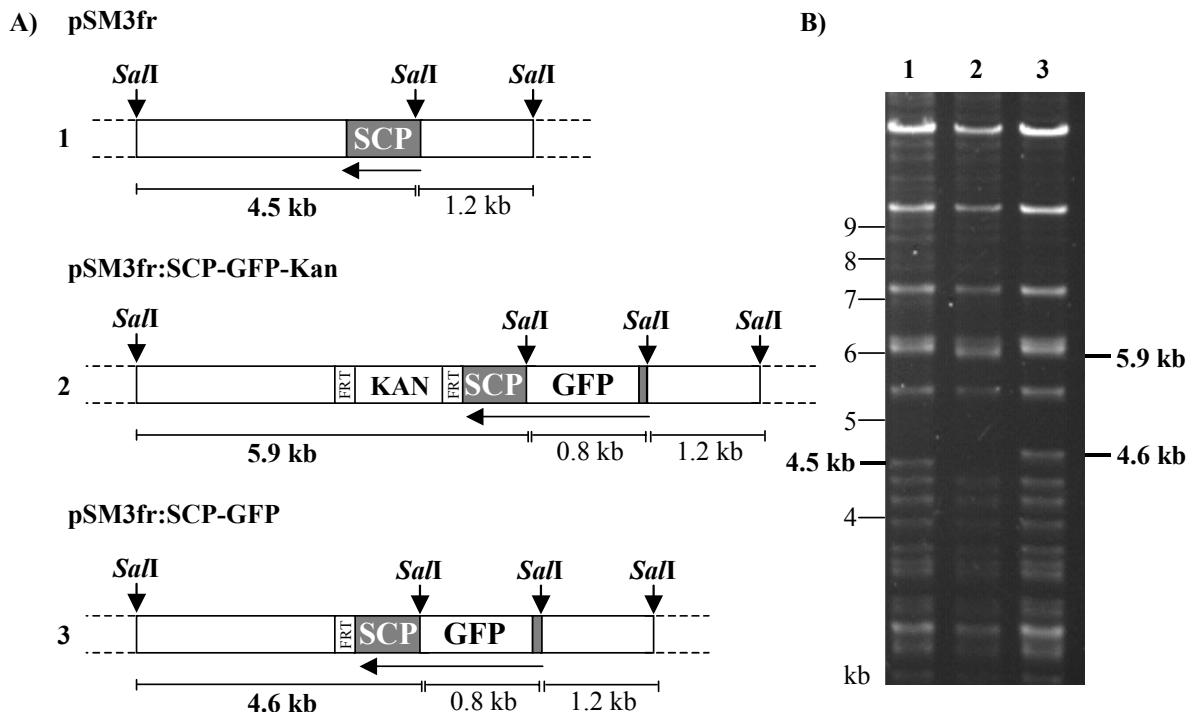


Abb. 10 Konstruktion der MCMV-Mutante pSM3fr::SCP-GFP kodierend für das SCP-GFP Fusionsprotein. (A) Schematische Darstellung der Genomregion des wt MCMV-BAC-Plasmides pSM3fr, welche für das SCP kodiert (Zeile 1) und des mutierten BAC-Plasmides pSM3fr::SCP-GFP-Kan nach erfolgreicher Insertion des SCP-GFP-ORFs und der Kanamycin-Resistenzkassette mittels homologer Rekombination in *E. coli* (Zeile 2). Die Kanamycin-Resistenzkassette wurde unter Verwendung der FLP-Rekombinase aus dem BAC-Plasmid pSM3fr::SCP-GFP-Kan ausgeschnitten, woraus das BAC-Plasmid pSM3fr::SCP-GFP entstand (Zeile 3). **(B)** Die BAC-Plasmide (1) pSM3fr, (2) pSM3fr::SCP-GFP-Kan und (3) pSM3fr::SCP-GFP wurden mit der Restriktionsendonuklease *SalI* gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt und das 0,7%ige Agarosegel mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Fragmentgrößen sind in Kilobasenpaaren (kb) angegeben.

IV.1.3.B Das kleine Kapsid-Protein (SCP) von MCMV ist für das virale Wachstum essentiell

Zur Rekonstitution von SCP-GFP-exprimierendem MCMV wurde das BAC-Plasmid pSM3fr::SCP-GFP in NIH3T3 Zellen transfiziert. Erfolgreich transfizierte Zellen zeigten nach einem Tag ausschließlich im Zellkern lokalisierte punktuelle grüne Fluoreszenz (Abb. 11). Die Fluoreszenz war über eine Woche stabil und änderte weder ihre Lokalisation noch ihre Form. Es wurden keine Virusnachkommen freigesetzt, da die umliegenden Zellen keinen zytopatischen Effekt zeigten und sich die Fluoreszenz nicht ausbreitete. Des Weiteren konnte keine Zellteilung der Zellen mit grüner Fluoreszenz im Kern beobachtet werden. Offensichtlich wurde das SCP-GFP-Fusionsprotein vom Virusgenom exprimiert, der Zusammenbau oder der Austritt der Kapside war jedoch durch die Fusion des GFPs an das

SCP behindert. Es handelte sich somit bei dem MCMV pSM3fr::SCP-GFP um eine Replikations-inkompetente Mutante.

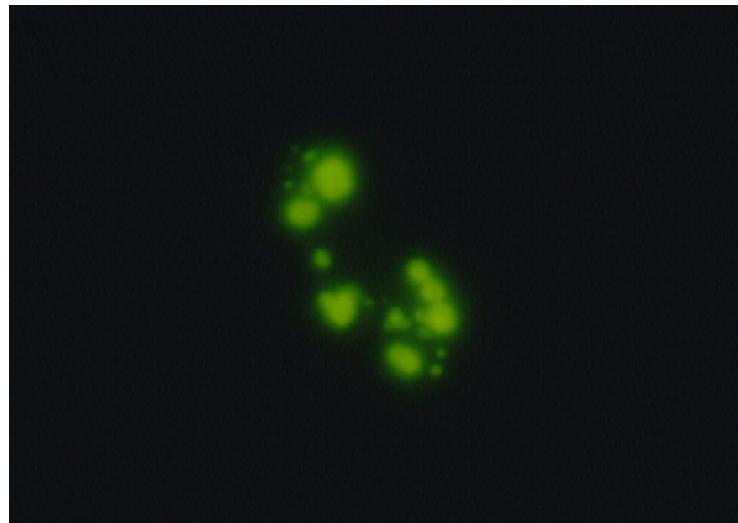


Abb. 11 Lokalisation der SCP-GFP-Fusionproteine im Zellkern. Das MCMV-BAC-Plasmid pSM3fr::SCP-GFP wurde in NIH3T3 Zellen transfiziert. Die SCP-GFP Expression wurde zwei Tage später im UV-Mikroskop analysiert.

IV.1.4 MCMV-MUTANTEN ZUM NACHWEIS VIRALER GENEXPRESSION IN HÄMATOPOETISCHEN ZELLEN

Zusätzlich zum Nachweis viraler DNA in infizierten hämatopoetischen Zellen wurden MCMV-Mutanten hergestellt, welche die Identifizierung von Zelltypen erlauben, die virale Genexpression ermöglichen. Mit Hilfe von MCMV-Mutanten, die im lytischen Zyklus leicht nachweisbare Reporterproteine exprimieren, kann ebenfalls die Reaktivierung von latent vorliegendem CMV verfolgt werden.

Als Reportergene wurden das GFP- und das β -Lactamase-Gen - unter Kontrolle des HCMV *major immediate early* Promotors - verwendet und mit Hilfe homologer Rekombination in das *in vitro* nicht-essentielle Gen m152 (Ziegler et al., 1997) des MCMV-Genoms inseriert.

IV.1.4.A Herstellung einer MCMV-Mutante mit GFP als Reportergen

Unter Verwendung des „Ein-Schritt-Rekombinationsmutagenese-Verfahrens“ in *E. coli* (siehe II.2.1.E) wurde das m152-Gen durch den EGFP-ORF unter Kontrolle des HCMV-*immediate-*

early-Promotors im wt MCMV-BAC-Plasmid pSM3fr ersetzt (Deletion der wt MCMV-Sequenz von nt-Position 210185 bis 211385). Das rekombinante MCMV-BAC-Plasmid pSM3fr::Δm152-EGFP-Kan (Abb. 12A, Zeile 2) entstand hierbei aus der homologen Rekombination zwischen dem wt MCMV-BAC-Plasmid pSM3fr (Abb. 12A, Zeile 1) und dem *EcoRI-SacI*-Fragment aus pΔm152-EGFP-Kan, das die HCMV-Promoter-EGFP-Kan-Sequenz enthält (siehe II.1.4.B). Die Insertion des EGFP-ORFs und des Resistenzvermittelnden Kanamycingens in das MCMV-BAC-Plasmid pSM3fr wurde mit Hilfe eines *EcoRI*-Restriktionsverdaus nachgewiesen. Das 5,6 kb große *EcoRI*-Fragment des wt MCMV-BAC-Plasmides pSM3fr (Abb. 12B, Spur 1) wuchs im Falle des rekombinanten MCMV-BAC-Plasmides pSM3fr::Δm152-EGFP-Kan auf eine Größe von 7,3 kb (ergibt eine Doppelbande) (Abb. 12B, Spur 2) an.

Anschließend wurde unter Zuhilfenahme des FLP-Rekombinase-Systems (siehe III.2.1.E.3) die Kanamycin-Resistenzkassette entfernt und es entstand das MCMV-BAC-Plasmid pSM3fr::Δm152-EGFP (Abb. 12A, Zeile 3). Die Spaltung des MCMV-BAC-Plasmides pSM3fr::Δm152-EGFP mit *EcoRI* zeigte erwartungsgemäß eine 5,8 kb-Bande (Abb. 12B, Spur 3), die im Falle von pSM3fr::Δm152-EGFP-Kan nicht sichtbar war (Abb. 12B, Spur 2). Das Gen m152 von MCMV wurde als nicht essentiell für die Replikation des Virus in Zellkultur beschrieben (Ziegler et al., 1997), sodass eine erfolgreiche Rekonstitution des rekombinanten GFP-exprimierenden Virus Δm152-EGFP erwartet wurde. Das pSM3fr::Δm152-EGFP BAC-Plasmid wurde in MEF-Zellen transfiziert und ein Tag nach Transfektion konnte im UV-Mikroskop GFP-Expression in den transfizierten Zellen beobachtet werden. Nachdem der Zellrasen vollständig lysiert war, wurde Virus-DNA isoliert und nach Spaltung mit dem *EcoRI*-Restriktionsenzym analysiert (Abb. 12B, Spur 4). Die Restriktionsfragmentanalyse zeigte für DNA des rekonstituierten Virus Δm152-EGFP eine 5,8-kb-Bande, die identisch mit der 5,8-kb-Bande des BAC-Plasmides pSM3fr::Δm152-EGFP war. Dieses Resultat bestätigte die korrekte Insertion des EGFP-ORFs anstelle des m152-Gens in der MCMV-Mutante Δm152-EGFP.

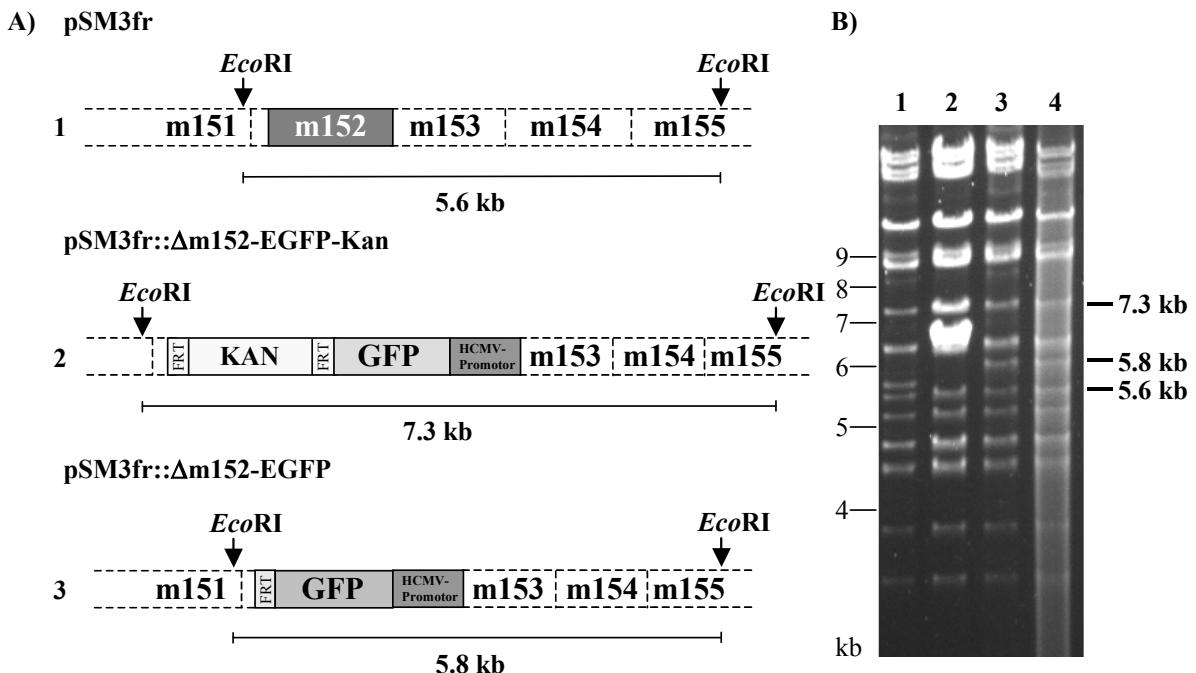


Abb. 12 Konstruktion der GFP-exprimierenden MCMV-Mutante Δm152-EGFP. (A) Schematische Darstellung der Genomorganisation des EcoO-Fragmentes (nt-Position 209756 bis nt-Position 215428) des wt MCMV-BAC-Plasmides pSM3fr, auf dem das Gen m152 lokalisiert ist (Zeile 1). Das Gen m152 wurde mittels homologer Rekombination durch den EGFP-ORF (unter Kontrolle des HCMV-Promotors) und der Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt, woraus pSM3fr::Δm152-EGFP-Kan entstand (Zeile 2). Das Kanamycin-Gen wurde anschließend unter Verwendung der FLP-Rekombinase über die flankierenden FRT-Sequenzen aus dem BAC-Plasmid pSM3fr::Δm152-EGFP-Kan entfernt, woraus das BAC-Plasmid pSM3fr::Δm152-EGFP resultierte (Zeile 3). (B) BAC-Plasmid-DNA wurde mit EcoRI gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt und das 0,7%ige Agarosegel mit Ethidiumbromid gefärbt. Die charakteristischen Größen der EcoRI-Fragmente des parentalen BAC-Plasmides pSM3fr (Spur 1) und der rekombinanten BAC-Plasmide pSM3fr::Δm152-EGFP-Kan (Spur 2) und pSM3fr::Δm152-EGFP (Spur 3) sind rechts der Abbildung in Kilobasenpaaren (kb) angegeben. Das BAC-Plasmid pSM3fr::Δm152-EGFP wurde in MEF Zellen transfiziert und nach Rekonstitution rekombinante virale DNA isoliert, mit EcoRI gespalten und analysiert (Spur 4).

Um einen möglichen Einfluss der Integration des EGFP-ORFs auf das Wachstumsverhalten des rekombinanten Virus Δm152-EGFP auszuschließen, wurden NIH3T3 Zellen mit einer MOI von 0,1 infiziert und Zellkulturüberstand während vier Tagen alle 24 Stunden gesammelt und anschließend zur Bestimmung des Virustiter titriert (siehe III.2.2.K) (Abb. 13). Die Virusmutante zeigte eine mit wt MCMV vergleichbare Vermehrung, d.h. die Replikation und Freisetzung von neu synthetisierten infektiösen Viruspartikeln war durch die Insertion des GFP-ORFs nicht beeinträchtigt.

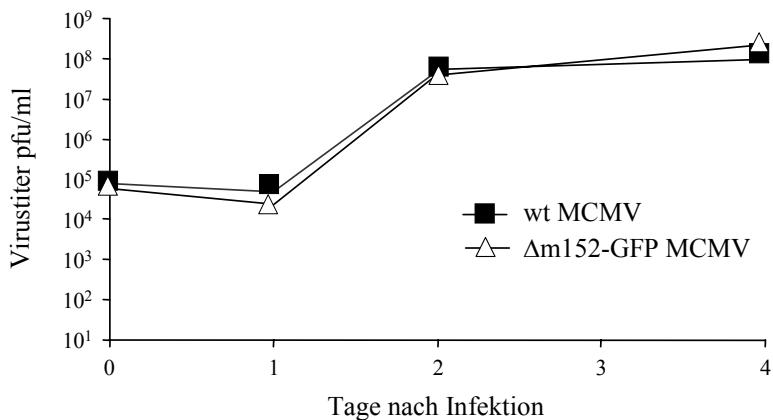


Abb. 13 Wachstum der MCMV-Mutante Δm152-EGFP im Vergleich zu wt MCMV. Nach Infektion von NIH3T3-Zellen mit einer MOI von 0,1 wurden Zellkulturüberstände während 4 Tagen alle 24 Stunden geerntet und die Menge an freigesetztem Virus mittels Standard-Plaque-Assay bestimmt. Die Virusmenge ist in *plaque forming units* pro ml (pfu/ml) angegeben.

IV.1.4.B Herstellung und Test einer β-Lactamase-exprimierenden MCMV-Mutante

Im Gegensatz zu dem Reporter GFP ist die β-Lactamase ein katalytisch aktiver Reporter. Dies resultiert in einer höheren Nachweisempfindlichkeit der β-Lactamase im Vergleich zu der von GFP. Die Detektionsgrenze der Fluoreszenz von GFP liegt bei 10^5 bis 10^6 Molekülen pro Zelle (Niswender et al., 1995), während im Falle der β-Lactamase bereits 100 β-Lactamase-Moleküle ausreichen, um einen detektierbaren Farbumschlag zu bewirken (Zlokarnik et al., 1998). Dabei wird das spezifische, grün-fluoreszierende Substrat CCF2 in Zellen von der β-Lactamase hydrolysiert, was eine Veränderung der Emissionswellenlänge des Substrates von grün nach blau zur Folge hat. Die Expression dieses Reportergens unter der Kontrolle eines viralen Promotors soll selbst den Nachweis schwacher viraler Promotoraktivität in Zellen ermöglichen.

Analog zur Vorgehensweise bei der Herstellung der MCMV-Mutante Δm152-EGFP, wurde mit Hilfe homologer Rekombination in *E. coli* (siehe II.2.1.E) die Kanamycin-Resistenzkassette (Kan) sowie der β-Lactamase-ORF unter Kontrolle des HCMV-*immediate-early*-Promotors in das Gen m152 des MCMV-BAC-Plasmid pSM3fr inseriert. Die Insertion der Kan-β-Lactamase-HCMV-Promotor-Sequenz (siehe II.1.4.B) führte dabei zur Deletion des m152-Gens in dem entstandenen MCMV-BAC-Plasmid pSM3fr::Δm152-Lactamase-Kan (Abb. 14A, Zeile 2). Das MCMV-BAC-Plasmid pSM3fr::Δm152-Lactamase-Kan wurde zur Überprüfung der Insertion mit der Restriktionsendonuklease *Eco*RI gespalten. Das 5,6 kb große *Eco*RI-Fragment des wt MCMV-BAC-Plasmides pSM3fr (Abb. 14A) wuchs im Falle des rekombinanten MCMV-BAC-Plasmides pSM3fr::Δm152-Lactamase-Kan auf eine Größe

von 7,3 kb (ist eine Doppelbande) (Abb. 14B, Spur 2) an. Anschließend wurde unter Zuhilfenahme das FLP-Rekombinase-Systems (siehe III.2.1.E.3) die Kanamycin-Resistenzkassette entfernt und es entstand das MCMV-BAC-Plasmid pSM3fr::Δm152-Lactamase (Abb. 14A, Zeile 3). Die Spaltung des MCMV-BAC-Plasmides pSM3fr::Δm152-Lactamase mit *EcoRI* zeigte erwartungsgemäß eine 5,8-kb-Bande (Abb. 14B, Spur 3).

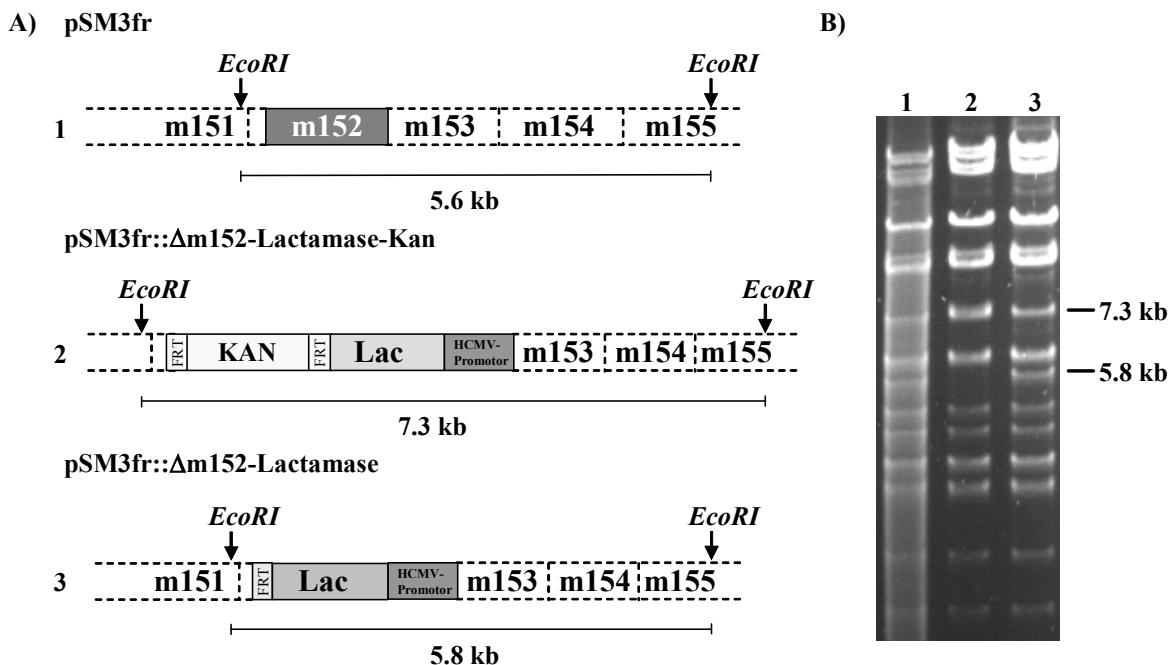


Abb. 14 Konstruktion der β -Lactamase-exprimierenden MCMV-Mutante $\Delta m152$ -Lactamase. (A) Schematische Darstellung der Genomorganisation des EcoO-Fragmentes (nt-Position 209756 bis nt-Position 215428) des wt MCMV-BAC-Plasmides pSM3fr, auf der das Gen m152 lokalisiert ist (Zeile 1). Das Gen m152 wurde mittels homologer Rekombination durch den β -Lactamase-ORF (unter Kontrolle des HCMV-Promotors) und der Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt, woraus pSM3fr::Am152-Lactamase-Kan entstand (Zeile 2). Das Kanamycingen wurde unter Verwendung der FLP-Rekombinase über die flankierenden FRT-Sequenzen aus dem BAC-Plasmid pSM3fr::Am152-Lactamase-Kan entfernt, resultierend in das BAC-Plasmid pSM3fr::Am152-Lactamase (Zeile 3). (B) BAC-Plasmid-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt und das 0,7%ige Agarosegel mit Ethidiumbromid gefärbt. Die charakteristischen Größen der *EcoRI*-Fragmente der rekombinanten BAC-Plasmide pSM3fr::Am152-Lactamase-Kan (Spur 2) und pSM3fr::Am152-Lactamase (Spur 3) sind rechts von der Abbildung in Kilobasenpaaren (kb) angegeben. Das BAC-Plasmid pSM3fr::Am152-Lactamase wurde in MEF Zellen transfiziert und nach Rekonstitution rekombinante virale DNA isoliert, die mit *EcoRI* gespalten wurde (Spur 1).

Zur Rekonstitution von rekombinantem Virus wurde das BAC-Plasmid pSM3fr::pΔm152-Lactamase in MEF-Zellen transfiziert. Nachdem der Zellrasen vollständig lysiert war, wurde die Virus-DNA isoliert und nach Spaltung mit dem *EcoRI*-Restriktionsenzym analysiert (Abb. 14B, Spur 1). Die Restriktionsfragmentanalyse zeigte für DNA des rekonstituierten Virus $\Delta m152$ -Lactamase eine 5,8 kb-Bande, die identisch mit der 5,8-kb-Bande des BAC-

Plasmides pSM3fr::Δm152-Lactamase war. Dieses Resultat bestätigte die korrekte Insertion des β -Lactamase-ORFs anstelle des m152-Gens in der MCMV-Mutante Δm152-Lactamase.

Um die Funktionalität des mutanten Δm152-Lactamase-MCMV Virus zu testen, wurde der β -Lactamase-Reporter-Assay (siehe III.2.6) durchgeführt. In Abbildung 15 ist das Prinzip des β -Lactamase-Reporter-Assays schematisch dargestellt. Das ungeladene Substrat CCF2/AM kann in die Zellen diffundieren, wo es von zytoplasmatischen Esterasen hydrolysiert wird. Durch die Hydrolyse entstehen an dem Substrat geladene Gruppen, welche einen Wiederaustritt der Moleküle aus der Zelle verhindern (Abb. 15A). Das polyanionische CCF2 dient als Substrat für die β -Lactamase. Die Hydrolyse des CCF2 durch die β -Lactamase ändert die Emissionswellenlänge des Substrates. Während das ungespaltene CCF2 grüne Fluoreszenz emittiert (520nm), fluoresziert das Spaltprodukt in infizierten Zellen blau (447 nm) (Abb. 15B).

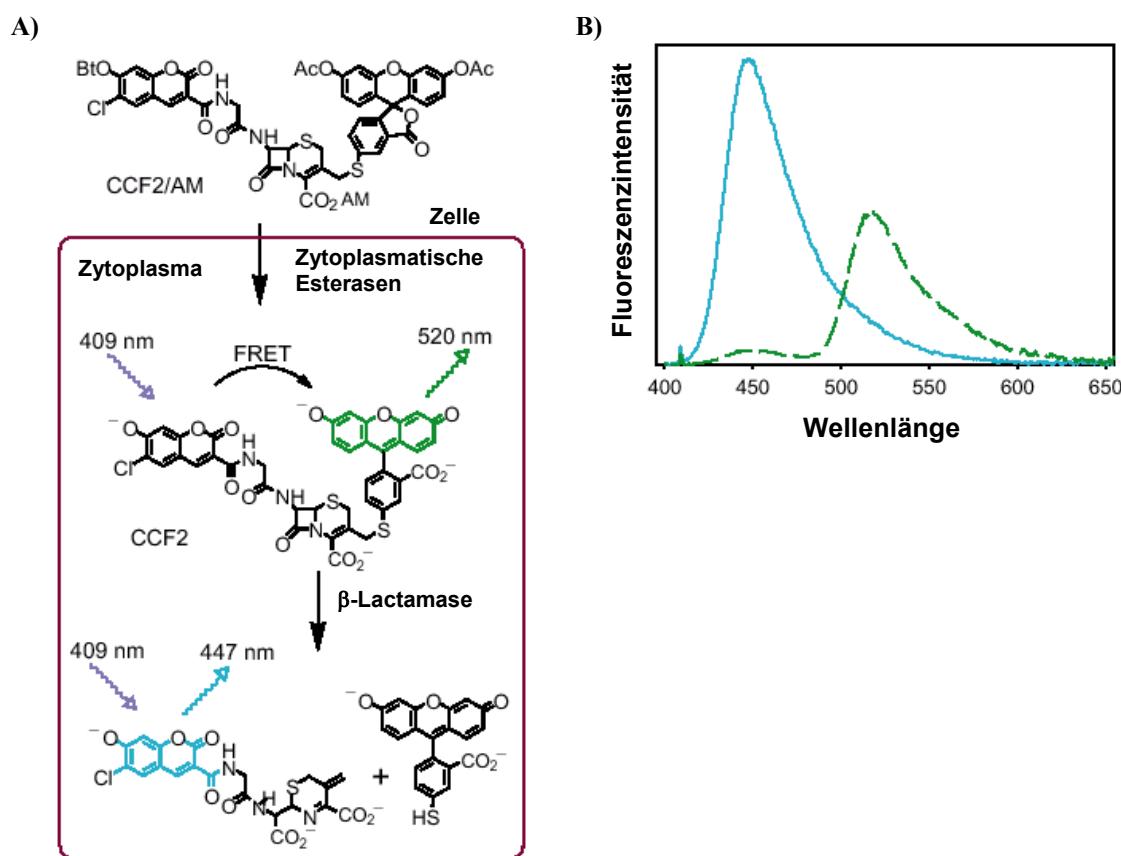


Abb. 15 Prinzip des β -Lactamase-Reporter-Assays. (A) Schematische Darstellung des Beladens einer Zelle mit dem Substrat CCF2/AM. Ungeladene CCF2/AM Moleküle können aus dem Medium in die Zellen diffundieren. Im Zytoplasma der Zellen wird das Substrat von zytoplasmatischen Esterasen hydrolysiert. Das daraus resultierende polyanionische CCF2 kann die Zelle aufgrund seiner Ladungen nicht mehr verlassen und dient der β -Lactamase als Substrat. Aufgrund der Hydrolyse durch die β -Lactamase ändert sich die Emissionswellenlänge der Fluoreszenz des Substrates. (B) Während das intakte Substrat CCF2 grüne Fluoreszenz (520 nm) emittiert, fluoresziert das Spaltprodukt blau (447 nm). FRET: Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (Modifiziert nach Zlokarnik et al., 1998).

Im hier durchgeführten Reportergen-Assay wurden NIH3T3-Zellen mit dem rekombinanten Virus $\Delta m152$ -Lactamase infiziert (MOI = 0,5). Ein Tag nach Infektion wurden infizierte und nicht-infizierte Zellen mit dem nicht-toxischen Substrat CCF2/AM inkubiert. In der Abb. 16A sind nicht-infizierte Fibroblasten zu sehen, die mit dem Substrat CCF2/AM inkubiert wurden. Während nicht-infizierte Zellen grün fluoreszierten, änderte sich die Fluoreszenzfarbe der infizierten Fibroblasten von grün nach blau (Abb. 16B). Diese Beobachtung bestätigte eine korrekte und funktionelle Expression der β -Lactamase durch die MCMV-Mutante $\Delta m152$ -Lactamase in den Zellen. Somit standen zwei MCMV-Mutanten, $\Delta m152$ -Lactamase und $\Delta m152$ -GFP, zum Nachweis viraler Genexpression in hämatopoetischen Zellen zur Verfügung.

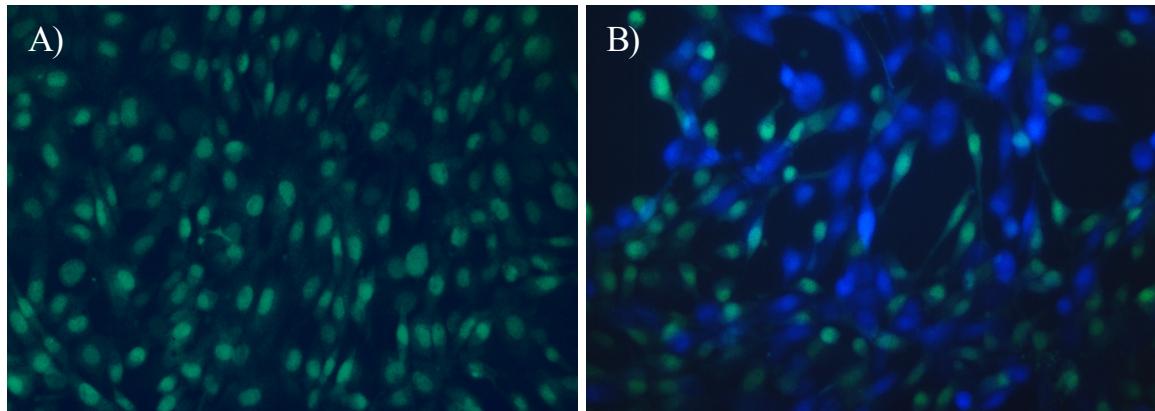


Abb. 16 Virale β -Lactamase-Expression in NIH3T3-Zellen. (A) Nicht-infizierte NIH3T3-Zellen und (B) mit rekombinantem MCMV $\Delta m152$ -Lactamase-infizierte Zellen (MOI = 0,5) wurden ein Tag nach Infektion mit $1\mu M$ CCF2/AM in DMEM mit 25 mM Hepes für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Aufnahmen wurde ein Axiophot Mikroskop mit 63facher Vergrößerung verwendet.

IV.2 INFektION DENDRITISCHER ZELLEN MIT MCMV UND CHARAKTERISIERUNG DER AUSWIRKUNGEN DER INFektION AUF DIE IMMUNANTWORT

DCs spielen eine zentrale Rolle bei der Induktion einer antiviralen Immunantwort (Sigal et al., 1999), was sie zu einem prädestinierten Ziel viraler Immunevasionsmechanismen macht. Die Infektion von DCs abgeleitet aus FDCP-Mix-Zellen mit MCMV sollte zur Beantwortung der Frage beitragen, welchen Einfluss MCMV auf den Phänotyp von DCs und ihrer Fähigkeit T-Zellen zu stimulieren hat.

IV.2.1 CHARAKTERISIERUNG MURINER DCs DIFFERENZIERT AUS FDCP-MIX-ZELLEN

Die multipotenten, hämatopoetischen, murinen FDCP-Mix-Zellen (Spooncer et al., 1986) wurden unter Einfluss von GM-CSF und IL-4 (siehe III.2.2.G) in unreife DCs differenziert (Schroeder et al., 2000). Die Differenzierung der FDCP-Mix-Zellen in DCs ließ sich zunächst morphologisch beobachten. Während der Differenzierung formten die Zellen Aggregate und bildeten längliche Ausläufer aus. An Tag 12 nach Beginn der Differenzierung wurden die unreifen DCs anhand ihrer Oberflächenmarker charakterisiert. Die Zellen wurden in der zytofluorometrischen (FACS-) Analyse auf die Expression von CD11c und MHC-Klasse-II (MHCII) sowie den ko-stimulatorischen Molekülen CD40, CD86 und CD80 untersucht. Die unreifen DCs exprimierten auf ihrer Oberfläche CD11c und CD80 stark sowie MHC-Klasse-II, CD86 und CD40 in geringen Mengen und waren negativ für den Stammzellmarker CD34 sowie den Makrophagenmarker CD14 ($CD34^-$, $CD11c^+$, $CD14^-$, $CD80^+$, $CD86^{\text{schwach}/-}$, $CD40^{\text{schwach}/-}$, $MHCII^{\text{schwach}/-}$) (Abb. 17). Mit Hilfe von LPS wurde die Reifung der DCs an Tag 12 der Differenzierung induziert. Reife DCs waren stärker adhärent und zeigten, zusätzlich zu der starken CD80- und CD11c-Expression, eine starke Expression der Oberflächenmarker CD86, MHC-Klasse-II und CD40 (Abb. 17B).

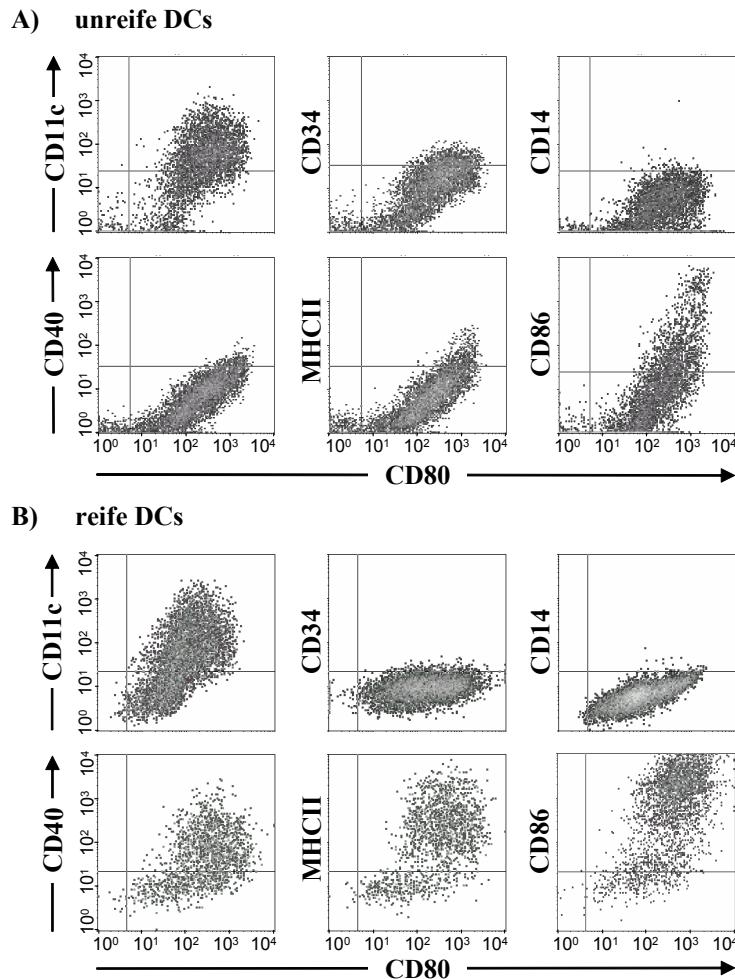


Abb. 17 Charakterisierung unreifer und reifer von FDCP-Mix-Zellen abgeleitete dendritische Zellen (DCs). Die Differenzierung von FDCP-Mix-Zellen in DCs wurde unter Verwendung von GM-CSF (500 U/ml) und IL-4 (500 U/ml, ab Tag 9) induziert. Unreife DCs (A) wurden nach 12 Tagen in der Durchflusszytometrie auf die Expression der Oberflächenmoleküle CD11c, CD40, CD80, CD86, MHC-Klasse-II, CD34 und CD14 analysiert. Unreife DCs wurden mit LPS (1 μ g/ml für 2 Tage) behandelt. Die reifen DCs (B) wurden anhand der Expression der oben angegebenen Oberflächenmoleküle in der zytofluorometrischen Analyse charakterisiert.

IV.2.2 INFektION UNDIFFERENZIERTER FDCP-Mix-ZELLEN UND FDCP-Mix-ABGELEITETER DENDRITISCHEN ZELLEN MIT MCMV

Für HCMV wurde gezeigt, dass die Infizierbarkeit von Zellen von deren Zelltyp und Differenzierungsstadium abhängig ist. Während HCMV in hämatopoetische CD34⁺-Vorläuferzellen (Maciejewski et al., 1992; Mendelson et al., 1996; Movassagh et al., 1996; vonLaer et al., 1995), sowie Monozyten (Hahn et al., 1998; Soderberg-Naucler et al., 1997b) eindringen kann, jedoch keine virale Genexpression erfolgt, wird HCMV in terminal differenzierten Zellen wie Makrophagen reaktiviert und der vollständige virale

Replikationszyklus läuft ab (Hahn et al., 1998; Minton et al., 1994; Soderberg-Naucler et al., 1997b; Soderberg-Naucler et al., 2001).

Mit Hilfe des Southern Blots wurde in einem ersten Schritt untersucht, ob in Analogie zu HCMV, undifferenzierte CD34⁺ FDCP-Mix-Zellen mit MCMV latent infiziert werden können, bzw. ob die von FDCP-Mix-Zellen abgeleiteten DCs permissiv infizierbar sind.

IV.2.2.A MCMV-Infektion undifferenzierter FDCP-Mix-Zellen

Die murine hämatopoetische Stammzelllinie FDCP-Mix wurde mit MCMV mit verschiedenen MOI (1, 10 und 50) infiziert und die virale DNA acht und 24 Stunden nach Infektion aus den Zellen isoliert. Entsprechend dem Versuch IV.1.2.B wurde ein Southern Blot-Experiment durchgeführt. Das *Sal*I-verdaute BAC-Plasmid pSM3fr, welches als zirkuläre Kontrolle diente, zeigte nach Hybridisierung mit der LRL-Sonde erwartungsgemäß eine Bande von 2,7 kb im Southern Blot (Abb. 18). Acht Stunden nach Infektion waren bei einer MOI von 50, sowie nach längerer Exposition des Blots (Abb. 18, rechte Seite) auch sehr schwach bei einer MOI von 10, Signale für zirkularisierte MCMV-Genome zu sehen. Das *Sal*I-Fragment der zirkularisierten viralen Genome, die aus FDCP-Mix-Zellen isoliert worden waren, lag jedoch geringfügig unterhalb der 2,7 kb Kontrollbande. 24 Stunden nach Infektion war weder bei einer MOI von 50 noch bei einer MOI von 10 ein Signal für zirkularisierte Genome bei 2,7 kb erkennbar. Im Gegensatz zu der viralen DNA aus infizierten Fibroblasten, bei denen die Menge an zirkulären MCMV-Genomen in den Zellen nach 24 Stunden stark zugenommen hatte (siehe Abb. 9), waren in den undifferenzierten FDCP-Mix-Zellen 24 Stunden nach Infektion keine zirkulären Genome mehr nachweisbar (Abb. 18). Acht und 24 Stunden nach Infektion waren sowohl bei einer MOI von 50 als auch bei einer MOI von 10 die Intensität der beiden Banden, welche nach der Spaltung linearer MCMV-Genome entstehen, unterschiedlich. Die 1,2-kb-Bande, die das *Sal*I-Fragment am rechten Genomende repräsentierte, war in beiden Fällen stärker wie die 1,5-kb-Bande, die das *Sal*I-Fragment des linken Genomendes darstellte (Abb. 18). Die unterschiedlichen Intensitäten der linearen Fragment-Banden können auf die unterschiedliche Bindungsfähigkeit der Sonde an die DNA-Fragmente zurückzuführen sein. Diese Ergebnisse zeigten, dass MCMV in die hämatopoetischen CD34⁺-Vorläuferzellen eindringen konnte, die viralen Genome sich jedoch nicht latent in den Zellen etablieren konnten.

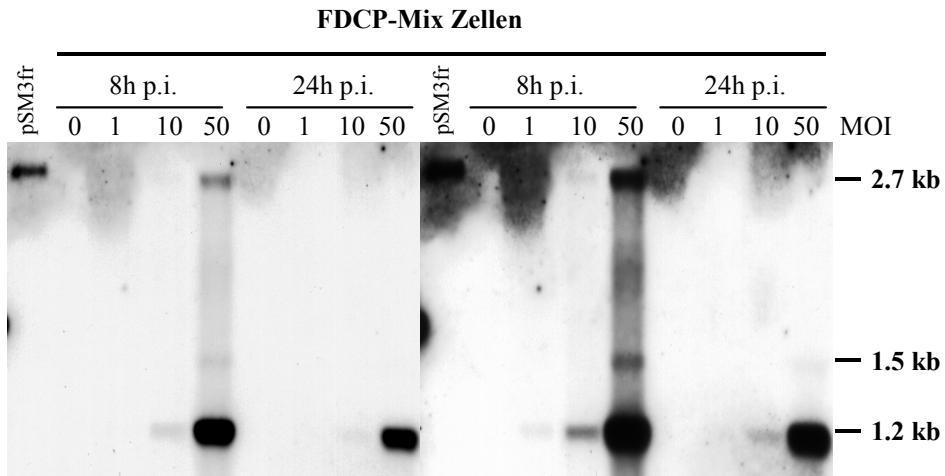


Abb. 18 MCMV-Infektion undifferenzierter FDCP-Mix-Zellen. FDCP-Mix-Zellen wurden mit MCMV infiziert (MOI von 1, 10 und 50) und Gesamt-DNA zu den Zeitpunkten 8 und 24 Stunden nach Infektion (h p.i.) isoliert. Gleiche Mengen an DNA wurden, nach Spaltung mit *SalI*, in einem 0,7%igen Agarosegel aufgetrennt und im Southern Blot mit der DIG-dUTP markierten LRL-Sonde, welche die beiden MCMV-Genomenden überspannt, hybridisiert. Das MCMV-BAC-Plasmid pSM3fr stellt die Positivkontrolle für zirkuläre MCMV-Genome dar und zeigt die charakteristische Bande von 2,7 kb für *SalI*-Fragmente von viralen Genomen mit fusionierten Enden. Die 1,2 kb und 1,5 kb Banden entsprechen den *SalI*-Fragmenten linearer MCMV-Genome. Der linke und rechte Blot sind identisch bis auf die Expositionszeit: links 1 Minute; rechts 5 Minuten. Die Bandengrößen sind rechts neben der Abbildung in Kilobasenpaaren (kb) angegeben.

IV.2.2.B Infektion dendritischer Zellen mit MCMV

Nach Differenzierung der undifferenzierten FDCP-Mix-Zellen in unreife DCs, wurden die Zellen mit MCMV (mit einer MOI von 10) infiziert und die virale DNA acht Stunden nach Infektion aus den infizierten Zellen isoliert. Die virale DNA wurde mit *SalI* gespalten und im Southern Blot mit der Sonde LRL (siehe II.1.5), welche die viralen Genomenden überspannt, hybridisiert. *SalI*-verdautes MCMV-BAC-Plasmid pSM3fr diente als zirkuläre Kontrolle und zeigte ein Hybridisierungssignal der erwarteten Größe von 2,7 kb (Abb. 19). Bei der DNA, die aus nicht-infizierten DCs (Negativkontrolle) isoliert worden war, war keine Bande sichtbar (Abb. 19, 0h p.i.). Virale DNA, welche acht Stunden nach Infektion aus dendritischen Zellen isoliert wurde, zeigte dagegen drei Hybridisierungssignale, identisch mit denen der MCMV-DNA isoliert aus infizierten Fibroblasten (siehe Abb. 9). Dieses Ergebnis zeigte, dass MCMV die aus FDCP-Mix-Zellen abgeleiteten unreifen DCs infizieren konnte, während die undifferenzierten hämatopoetischen Vorläuferzellen zwar den Eintritt des Virus in die Zelle erlaubten, nicht aber permissiv für die virale Replikation waren (siehe IV.2.2.A).

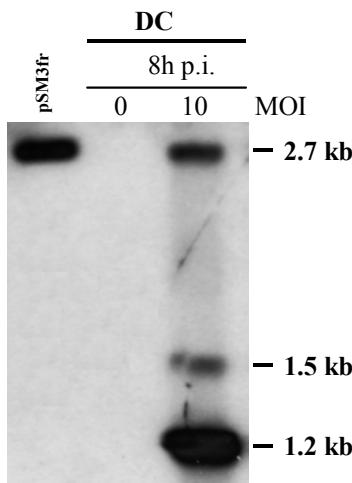


Abb. 19 Infektion von FDCP-Mix-Zellen abgeleiteten dendritischen Zellen (DCs) mit MCMV. DCs wurden mock oder mit MCMV infiziert (MOI = 10) und Gesamt-DNA acht Stunden nach Infektion (h p.i.) isoliert. Die DNA und das MCMV-BAC-Plasmid pSM3fr wurden, nach der Spaltung mit *Sall*, in einem 0,7%igen Agarosegel aufgetrennt und im Southern Blot mit der DIG-dUTP markierten LRL-Sonde, welche die beiden MCMV-Genomenden überspannt, hybridisiert. Das MCMV-BAC-Plasmid pSM3fr stellt die Positivkontrolle für zirkuläre MCMV-Genome dar und zeigt die charakteristische Bande von 2,7 kb für *Sall*-Fragmente von viralen Genomen mit fusionierten Enden. Die 1,2 kb und 1,5 kb Banden entsprechen den *Sall*-Fragmenten linearer MCMV-Genome. Die Bandengrößen sind rechts neben der Abbildung in Kilobasenpaaren (kb) angegeben.

IV.2.3 INFektionseffizienz dendritischer Zellen mit MCMV

Anhand der Resultate im Southern Blot (siehe IV.2.2.B) konnte keine Aussage darüber gemacht werden, ob virale Gene in MCMV-infizierten DCs exprimiert wurden und mit welcher Effizienz MCMV in die DCs eingedrungen ist. Zur Beantwortung dieser Fragen wurde das rekombinante Virus GFP-MCMV verwendet, welches den GFP-ORF unter Kontrolle des HCMV-*immediate early* (ie)-Promotors in der ie2-Region trägt (Abb. 20) (Mathys et al., 2003). Dieser Promotor ist in der sehr frühen Phase der viralen Infektion aktiv, was eine sehr frühe Expression der GFP-Proteine zu Folge hat. Während der ie2-Region von MCMV bisher keine Funktion zugeordnet werden konnte, interferiert das Genprodukt von m152, welches in den MCMV-Mutanten Δ m152-EGFP und Δ m152-Lactamase deletiert wurde (siehe IV.1.4.A, respektive IV.1.4.B), mit der MHC-Klasse-I-gebundenen Antigen-Präsentation (Ziegler et al., 1997). Aus diesem Grund wurden - zur Untersuchung der Auswirkungen einer CMV-Infektion auf die Expression von Oberflächenmolekülen und die Antigen-präsentierende Funktion der DCs - das GFP-MCMV Virus der MCMV-Mutante Δ m152-EGFP vorgezogen und für die weiteren Versuche verwendet.

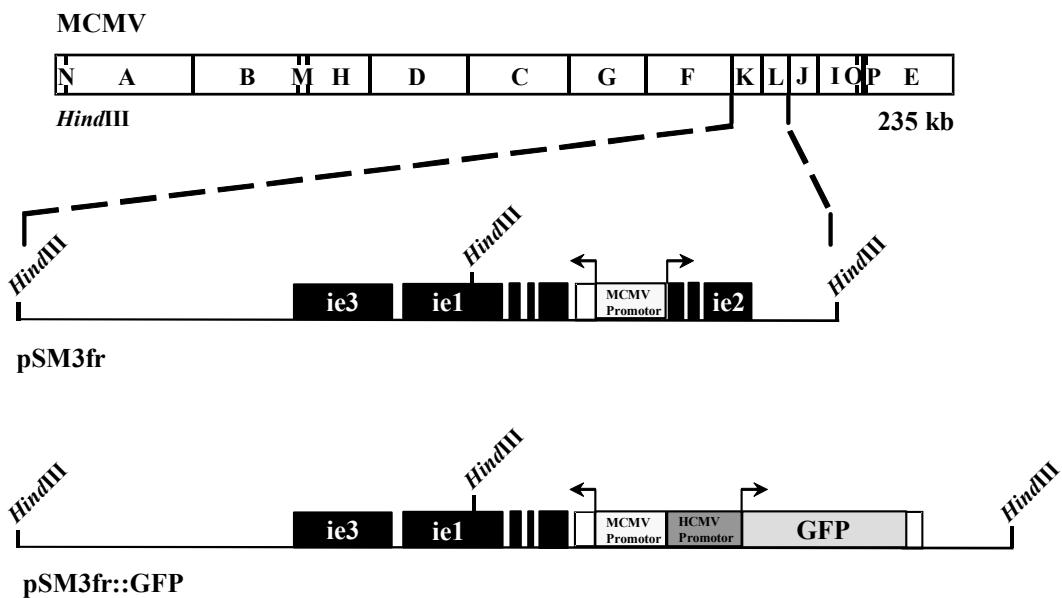


Abb. 20 Die GFP-MCMV Mutante. In der obersten Linie ist die *HindIII*-Fragmentkarte des wildtyp (wt) MCMV-Genoms abgebildet. Vergrößert sind darunter die *HindIII*-K- und L-Fragmente des wt MCMV-BAC-Plasmides pSM3fr dargestellt, in denen die *immediate early* (ie)-Region mit den Genen ie1, ie2 und ie3 lokalisiert ist. Mittels homologer Rekombination in *E. coli* wurde im rekombinanten BAC-Plasmid pSM3fr::GFP die ie2-Region durch den offenen Leserahmen (ORF) des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) unter Kontrolle des humanen CMV (HCMV) ie-Promotors ersetzt. Das rekombinante Virus GFP-MCMV wurde nach Transfektion des BAC-Plasmides pSM3fr::GFP in murinen embryonalen Fibroblasten rekonstituiert.

Die Expression der GFPs durch das GFP-MCMV Virus während der Infektion ermöglichte die Unterscheidung zwischen infizierten und nicht-infizierten DCs und daher eine quantitative Auswertung der Infektionseffizienz mittels zytofluorometrischer Analyse. Unreife und reife DCs wurden mit GFP-MCMV und einer MOI von eins, drei, 10, 30 und 100 infiziert und acht Stunden nach Infektion mittels Durchflusszytometrie auf GFP-Expression untersucht. Für unreife DCs (Abb. 21A) sowie für reife DCs (Abb. 21B) wurde mit steigender MOI ein zunehmender Anteil an grün-fluoreszierenden und somit infizierten DCs gemessen. Es ließen sich jedoch auch bei Virusüberschuss (MOI größer als eins) nicht alle Zellen mit MCMV infizieren. Die Anzahl an infizierten DCs nahm mit steigender MOI bis zu einer Infektionsrate von 60% zu, ging aber auch bei einer MOI von 100 nicht über diesen Prozentsatz an infizierten Zellen hinaus (Abb. 21). Diese Daten zeigten, dass eine Subpopulation der DCs mit MCMV infiziert werden konnte und GFP, repräsentativ für sehr frühe virale Genprodukte, in unreifen und reifen DCs exprimiert wurde. Die Effizienz der Infektion mit MCMV war unabhängig vom Reifungsgrad der DCs, da sich der Prozentsatz an infizierten unreifen DCs von dem von reifen DCs bei gleicher MOI kaum unterschied. Ob die nicht-GFP-exprimierenden DCs ebenfalls MCMV aufgenommen hatten, die virale Genexpression jedoch inhibiert war, wurde nicht untersucht.

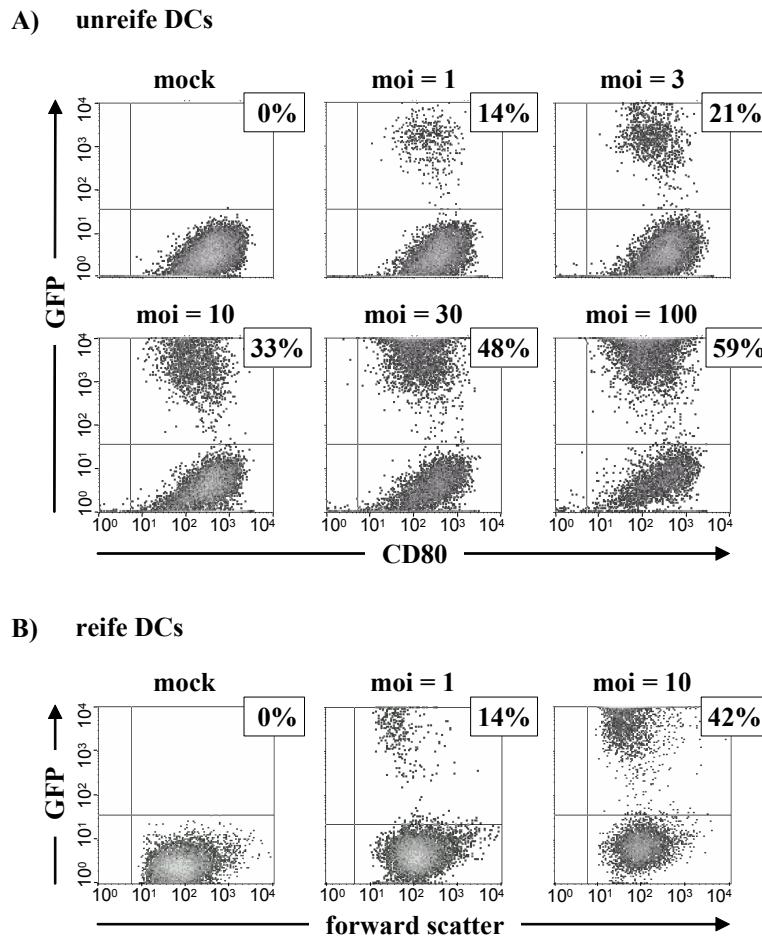


Abb. 21 Infektionseffizienz unreifer und reifer dendritischer Zellen (DCs) mit dem Virus GFP-MCMV. Unreife (A) und reife (B) von FDCP-Mix-Zellen abgeleitete DCs wurden mit GFP-MCMV und verschiedenen MOI (wie angegeben) infiziert und acht Stunden nach Infektion mittels Durchflusszytometrie auf intrazelluläre GFP-Expression und CD80-Oberflächenexpression untersucht. Die angegebenen Prozentzahlen repräsentieren den Anteil an GFP-positiven (= MCMV-infizierten) DCs in der Zellpopulation.

IV.2.4 MCMV-GENEXPRESSION IN DCs UNTERSCHIEDLICHER REIFUNGSTADIEN

Die zytofluorometrische Analyse der GFP-MCMV-infizierten DCs hatte gezeigt, dass sowohl in unreifen als auch in reifen DCs zumindest sehr frühe virale Genprodukte synthetisiert wurden, da das GFP unter Kontrolle des HCMV-*immediate early* Promotors in beiden DC-Typen exprimiert wurde (siehe IV.2.3). Mit Antikörpern, die spezifisch mit viralen Proteinen der verschiedenen Genexpressionsphasen interagieren, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob alle drei Phasen (sehr früh, früh und spät) der Genexpression von MCMV in DCs durchlaufen werden. Hierfür wurden unreife und LPS-gereifte DCs mit GFP-MCMV infiziert (MOI = 10). Von den infizierten Zellen wurden acht Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden nach Infektion zum Nachweis sehr früher, früher und später viraler Genexpression Zytospin-

IV Ergebnisse

Präparate hergestellt und mit spezifischen Antikörper gefärbt (siehe III.1.2), die gegen typische virale Proteine der drei Infektions-Phasen gerichtet waren.

Für unreife MCMV-infizierte DCs (iDC) konnten Genprodukte aus allen drei Replikationszyklus-Phasen in der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (Abb. 22). Das sehr frühe (ie1, pp89) und frühe (e1) Protein zeigten die für sie charakteristische Lokalisation im Kern, während das späte Protein (gB) im Zytoplasma der Zelle akkumulierte (Abb. 22). In MCMV-infizierten Kulturen reifer DCs (mDC) konnten im Gegensatz dazu nur Proteine der sehr frühen (ie1) und der frühen Phase (e1) detektiert werden (Abb. 22). Das Protein gB, das normalerweise in der späten Phase des viralen Replikationszyklus exprimiert wird, konnte in der Immunfluoreszenz in infizierten mDCs nicht nachgewiesen werden (Abb. 22). Diese Ergebnisse zeigten, dass nur in unreifen DCs der virale Replikationszyklus vollständig abließ, während in reifen DCs die Expression der späten Proteine nicht erfolgte.

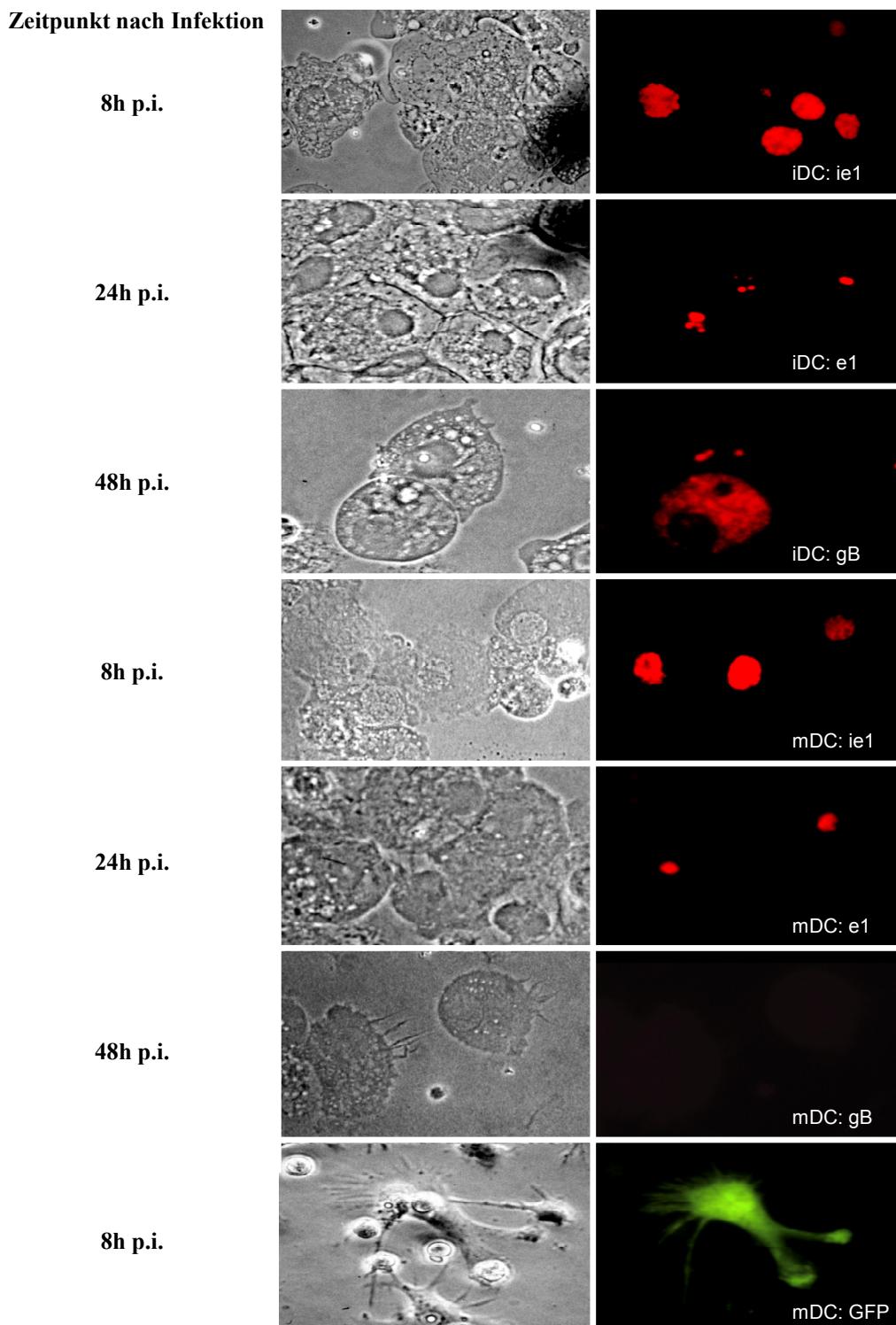


Abb. 22 Expression viraler Antigene in MCMV-infizierten DCs. Unreife (iDC) und reife (mDC) DCs wurden mit GFP-MCMV infiziert (MOI von 10) und auf virale Genexpression acht Stunden (sehr frühe Proteine, ie1), 24 Stunden (frühe Proteine, e1) und 48 Stunden (späte Proteine, gB) nach Infektion (h p.i.) untersucht. Die Expression der viralen Proteine wurde in der Immunfluoreszenz mit monoklonalen Antikörpern gegen typische MCMV-Proteine (pp89, e1 und gB) der drei Expressionsphasen nachgewiesen. Die linke Hälfte der Abbildung zeigt die Phasenkontrast-Aufnahmen der Zellen, rechts sind die entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen zu sehen. Für die Aufnahmen wurde ein Axiophot Mikroskop mit 63facher Vergrößerung verwendet.

IV.2.5 PRODUKTIVE MCMV-INFektION UNREIFER, NICHT ABER REIFER DCs

Als Nächstes stellte sich die Frage, ob MCMV-infizierte unreife und reife DCs, was nach den Ergebnissen der Abb. 22 nicht zu erwarten war, infektiöse Viruspartikel freisetzen. Hierzu wurden unreife und reife DCs mit einer MOI von 10 mit GFP-MCMV infiziert und sechs Tage in Kultur gehalten. Täglich wurde von den infizierten Kulturen Überstand abgenommen. Um die Produktion infektiöser Nachkommen-Viren nachweisen und quantifizieren zu können, wurden die Überstände auf permissiven Fibroblasten titriert. Als Kontrolle dienten Überstände einer MCMV-infizierten Makrophagenkultur. Makrophagen sind ebenso wie DCs Antigen-präsentierende Zellen und lassen sich produktiv infizieren (Soderberg-Naucler et al., 1998). Der erste Wert wurde zwei Stunden nach Infektion erhoben und repräsentierte Viren des Inokulums, die nur vorübergehend an Zellen hafteten, jedoch nicht in diese eindrangen. Über die Tage wurden in den Überständen MCMV-infizierter unreifer DCs ähnlich hohe Titer gemessen wie im Überstand MCMV-infizierter Makrophagen (Abb. 23). Beide Zelltypen produzierten Nachkommen-Viren, die vier bis fünf Tage nach Infektion einen Titer von bis zu 10^5 pfu (*Plaque forming units*) pro 2×10^5 Zellen erreichten. Für die reifen DCs konnte im Gegensatz zu den unreifen DCs keine Zunahme des Virustiters im Überstand gemessen werden (Abb. 23). Diese Daten zeigten, dass nur in unreifen DCs der volle virale Replikationszyklus ablief und infektiöse Nachkommenviren freigesetzt wurden. MCMV konnte zwar in reife DCs eindringen, die Produktion neuer Viren war aber inhibiert, wie aufgrund der Immunfluoreszenz (IV.2.4) erwartet worden war.

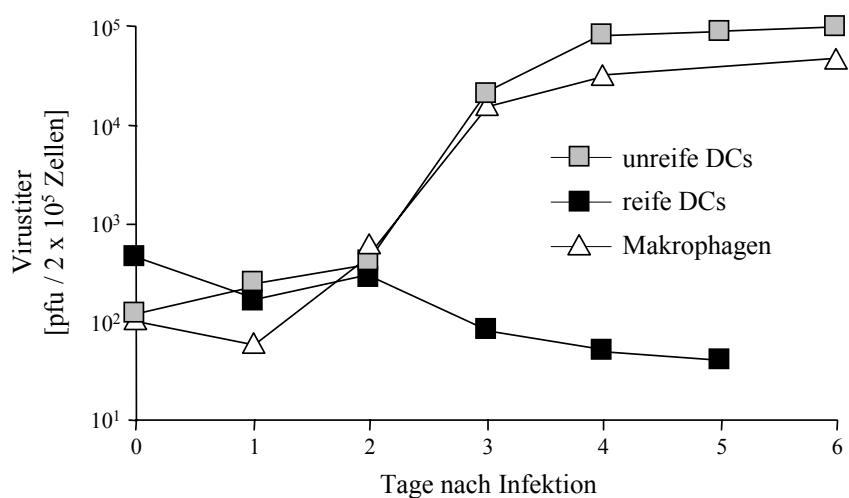


Abb. 23 Freisetzung von MCMV-Nachkommen durch unreife und reife dendritische Zellen (DCs). Unreife und reife DCs, als auch von FDCP-Mix-Zellen abgeleitete Makrophagen wurden an Tag 12 nach Beginn der Differenzierung, bzw. an Tag 14 im Fall reifer DCs, mit GFP-MCMV infiziert (MOI = 10). Während 5 bis 6 Tagen wurden alle 24 Stunden Zellkulturüberstände geerntet und die Virustiter mittels Standard-Plaque-Assay bestimmt. Die Virusmenge ist in *plaque forming units* (pfu) pro 2×10^5 Zellen angegeben.

IV.2.6 MCMV-INDUZIERTE PHÄNOTYPISCHE VERÄNDERUNGEN VON DCs

Nachdem hier gezeigt werden konnte, dass MCMV DCs infizieren kann, wurde im folgenden untersucht, ob MCMV, wie einige andere Viren (siehe I.2.5), die Möglichkeit besitzt, die Expression funktioneller Oberflächenmoleküle auf DCs zu beeinflussen und mit der Stimulation der T-Zell-Proliferation zu interferieren.

Um eine mögliche Auswirkung der MCMV-Infektion auf die Expression zellulärer Oberflächenmoleküle auf DCs zu analysieren, wurden reife und unreife DCs mit GFP-MCMV infiziert (MOI = 10) und acht, 24 bzw. 48 Stunden nach Infektion mittels Durchflusszytometrie untersucht (Abb. 24 und Abb. 25). Die Infektion der DCs mit dem GFP-exprimierenden Virus GFP-MCMV machte die Identifikation und spezifische Analyse infizierter Zellen möglich. Die GFP-positiven DCs (= infizierte DCs) wurden getrennt von den GFP-negativen DCs aus der gleichen Zellkultur charakterisiert. Die Daten der beiden Populationen wurden außerdem mit denen von mock-infizierten DCs verglichen. Die Expression der Oberflächenmoleküle MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II, als auch CD40, CD80 und CD86, welche in der Antigen-Präsentation eine wichtige Rolle spielen, wurde hierbei verfolgt. Als Kontrolle wurde der Makrophagenmarker Mac-1 verwendet, der nicht in der Antigen-Präsentation involviert ist. Aus diesem Grund wurde kein Virus-vermittelter Effekt auf die Expression von Mac-1 erwartet. Den Erwartungen entsprechend veränderte sich die Expressionsstärke von Mac-1 nach der MCMV-Infektion der DCs nicht wesentlich (Abb. 24 und Abb. 25), während für die Oberflächenmoleküle MHC-Klasse-I und Klasse-II und die ko-stimulatorischen Moleküle Veränderungen der Expressionsstärke auf den infizierten DCs beobachtet wurden.

Die vorangegangene Charakterisierung der hergestellten DCs (IV.2.1) hatte gezeigt, dass CD80 auf unreifen DCs bereits stark exprimiert wurde. Während nun die Oberflächenexpression von CD80 acht Stunden nach Infektion auf unreifen infizierten DCs nicht weiter erhöht wurde (Abb. 24), zeigten unreife GFP-positive DCs für die Marker CD86, CD40 und MHC-Klasse-I und Klasse-II in der frühen Phase des viralen Replikationszyklus (acht bis 24 Stunden p.i.) eine leicht erhöhte Expression dieser Oberflächenmoleküle im Vergleich zu nicht-infizierten DCs (Abb. 24). 24 Stunden nach Infektion zeigten die GFP-negativen Zellen ebenfalls eine erhöhte Expression der Marker CD40, MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II. Diese Beobachtung implizierte, dass infizierte (GFP-positive) DCs direkt durch die Infektion mit MCMV in einer frühen Phase der Infektion aktiviert wurden. Die

Anwesenheit infizierter Zellen schien sich ebenfalls, wenn auch mit einigen Stunden Verzögerung, aktivierend auf die GFP-negativen Zellen auszuwirken.

Zu einem späteren Zeitpunkt nach Infektion (48h p.i.) der unreifen DCs war jedoch kein signifikanter Unterschied in der Expressionsstärke der Oberflächenmoleküle CD86, CD40, MHC-Klasse-I und Klasse-II zwischen den GFP-positiven, GFP-negativen und nicht-infizierten DCs mehr zu beobachten (Abb. 24). Die zuerst stimulierte Expression der Oberflächenmoleküle auf den GFP-positiven und GFP-negativen Zellen war, mit Ausnahme der CD80-Expression, auf das Expressionslevel nicht-infizierter DCs zurückgegangen. Die Oberflächenexpression von CD80 hingegen war auf MCMV-infizierten (GFP-positiven) unreifen DCs reduziert, während sich die Expression auf GFP-negativen und nicht-infizierten DCs relativ zu der Expressionsstärke acht Stunden p.i. nicht verändert hatte (Abb. 24). Dies ließ den Schluss zu, dass MCMV die Expression des ko-stimulatorischen Moleküls CD80 auf infizierten unreifen DCs spezifisch reduzierte.

Unreife DCs

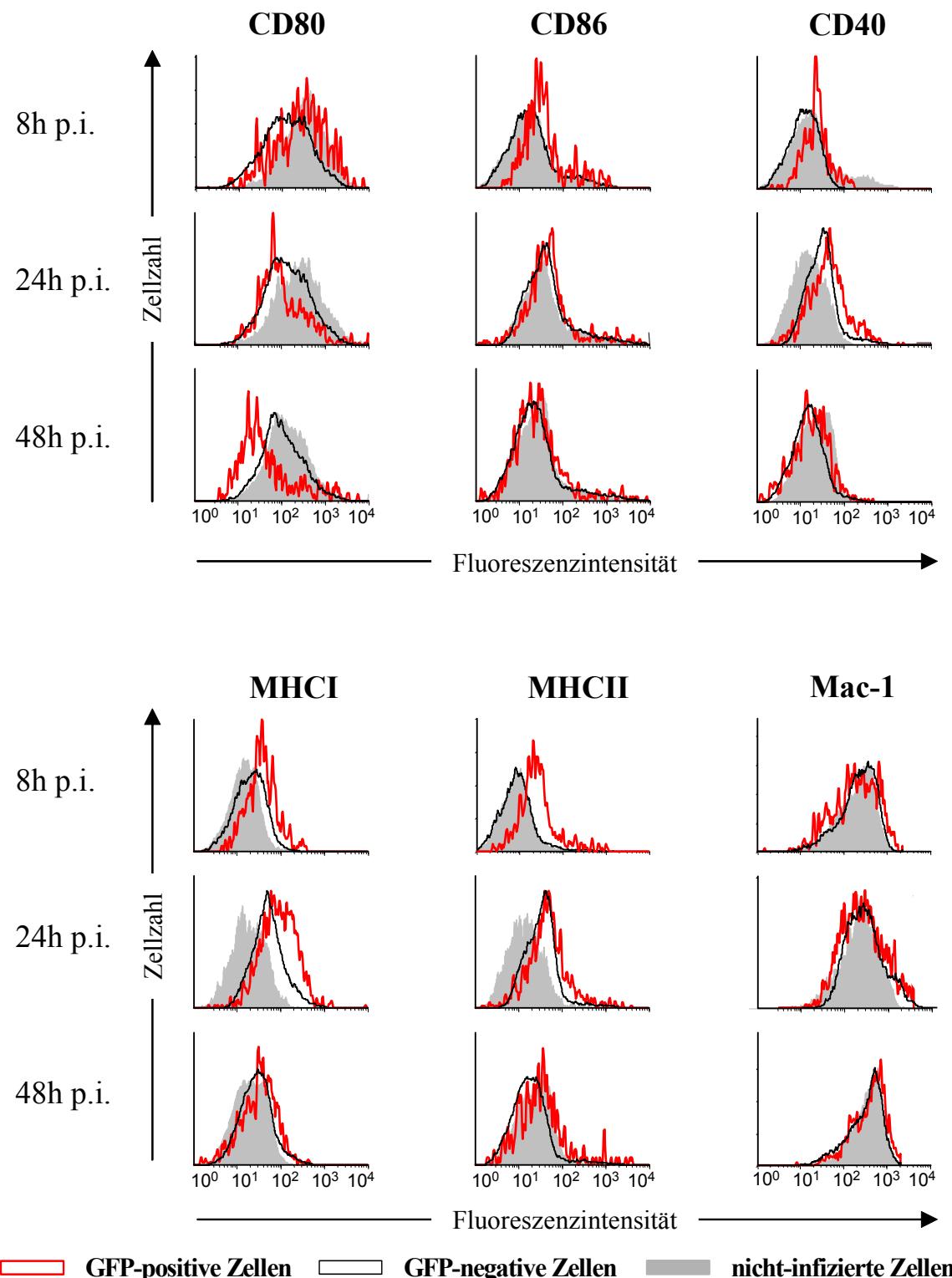


Abb. 24 Expression der Oberflächenmoleküle auf unreifen MCMV-infizierten dendritischen Zellen (DCs). Unreife DCs wurden mittels Durchflusszytometrie 8, 24 und 48 Stunden nach Infektion (h p.i.) mit GFP-MCMV (MOI = 10) analysiert. Als Kontrolle wurden nicht-infizierte DCs verwendet. Die Expression der angegebenen Oberflächenmoleküle auf MCMV-infizierten (GFP-positiven) DCs ist durch die rote Linie, auf GFP-negativen DCs durch die schwarze Linie und auf nicht-infizierten DCs durch die graue Schattierung dargestellt. Die GFP-negativen DCs stammen aus derselben Kultur wie die GFP-positiven DCs, wurden jedoch getrennt voneinander analysiert. Dieses Experiment wurde viermal wiederholt mit jeweils identischen Ergebnissen.

Während die Fluoreszenzintensitäten auf den unreifen DCs innerhalb einer Zellpopulation nicht stark variierten, spalteten sich die reifen DC-Populationen meist in eine Zellgruppe, die eine schwache Oberflächenmolekülexpression (Fluoreszenzintensität kleiner als 10^2) zeigte, und in eine Gruppe von Zellen, bei denen die Fluoreszenzintensitäten für die verschiedenen Marker hoch waren (Fluoreszenzintensität größer als 10^2). Diese Beobachtung war unabhängig vom Zellmarker und vom Infektionszeitpunkt der reifen DCs (Abb. 25A).

In der zytofluorometrischen Analyse infizierter reifer DCs zeigten sowohl ein Teil der GFP-positiven als auch GFP-negativen DCs acht Stunden nach Zugabe des GFP-MCMV ins Medium eine erhöhte Expression der Oberflächenmoleküle CD86, CD40, MHC-Klasse-I und Klasse-II im Vergleich zu den nicht-infizierten reifen DCs (Abb. 25A, 8h p.i.). Die Zahlen in Abb. 25B belegten, dass die Prozentsätze der GFP-positiven und GFP-negativen Zellen mit hohen Fluoreszenzintensitäten für die Marker CD86, CD40, MHC-Klasse-I und Klasse-II eindeutig höher waren, als bei den nicht-infizierten DCs. Die Expressionsstärke von CD80 war dagegen bei allen Zellpopulationen gleich stark. Die bereits bei den unreifen infizierten DCs beobachtete Aktivierung der Zellen durch Zugabe des Virus und/oder Infektion fand demnach auch bei einer Gruppe von reifen DCs statt.

48 Stunden nach Infektion konnten starke Veränderungen in den Expressionsprofilen der Marker auf den verschiedenen reifen DC-Populationen beobachtet werden (Abb. 25). Die Expression der Oberflächenmoleküle CD80, CD86, CD40 und MHC-Klasse-II war auf infizierten reifen (GFP-positiven) DCs im Vergleich zu nicht-infizierten DCs reduziert (Abb. 25A, 48h p.i.). Bis zu 80% der GFP-positiven DCs zeigten für die Marker CD80, CD86, CD40 und MHC-Klasse-II eine schwache Expression (Abb. 25C), während noch acht Stunden nach Infektion der Großteil der Zellen eine starke Expression dieser Marker gezeigt hatte (Abb. 25B). Der Anteil an schwach exprimierenden GFP-negativen DCs hatte 48 Stunden p.i. (Abb. 25C) für die Oberflächenmoleküle CD80, CD86, CD40 und MHC-Klasse-II im Vergleich zu acht Stunden p.i. (Abb. 25B) ebenfalls zugenommen. Der Prozentsatz dieser schwach exprimierenden GFP-negativen Zellen war 48 Stunden p.i. im Vergleich zu nicht-infizierten DCs leicht erhöht (Abb. 25C). Der Prozentsatz an nicht-infizierten DCs mit niedriger Fluoreszenzintensität hatte dagegen 48 Stunden nach Infektion abgenommen. Diese Ergebnisse zeigten eine zeitabhängige, reduzierte Markerexpression bei einem Teil der GFP-negativen DCs. Die Expressionsstärke von MHC-Klasse-I war spät nach Infektion weder auf den GFP-positiven noch auf den GFP-negativen unter die Expressionsstärke der nicht-infizierten DCs gesunken, sondern unterschied sich von der kaum (Abb. 25A).

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die Infektion von DCs mit MCMV anfänglich eine Aktivierung der DCs bewirkte, gefolgt von einer Reduktion spezifischer Oberflächenmoleküle. Die Expression der zellulären Oberflächenmoleküle CD80, CD86, CD40 sowie MHC-Klasse-I und Klasse-II, die in der Antigen-Präsentation eine entscheidende Rolle spielen, wurden spezifisch auf MCMV-infizierten reifen DCs reduziert. Des Weiteren wurde ein Einfluss der infizierten DCs auf die reifen GFP-negativen DCs derselben Kultur beobachtet. Die Auswirkungen der Reduktion funktioneller Oberflächenmoleküle auf reifen DCs in Bezug auf ihre T-Zell-stimulierenden Fähigkeiten wurden im folgenden Kapitel untersucht.

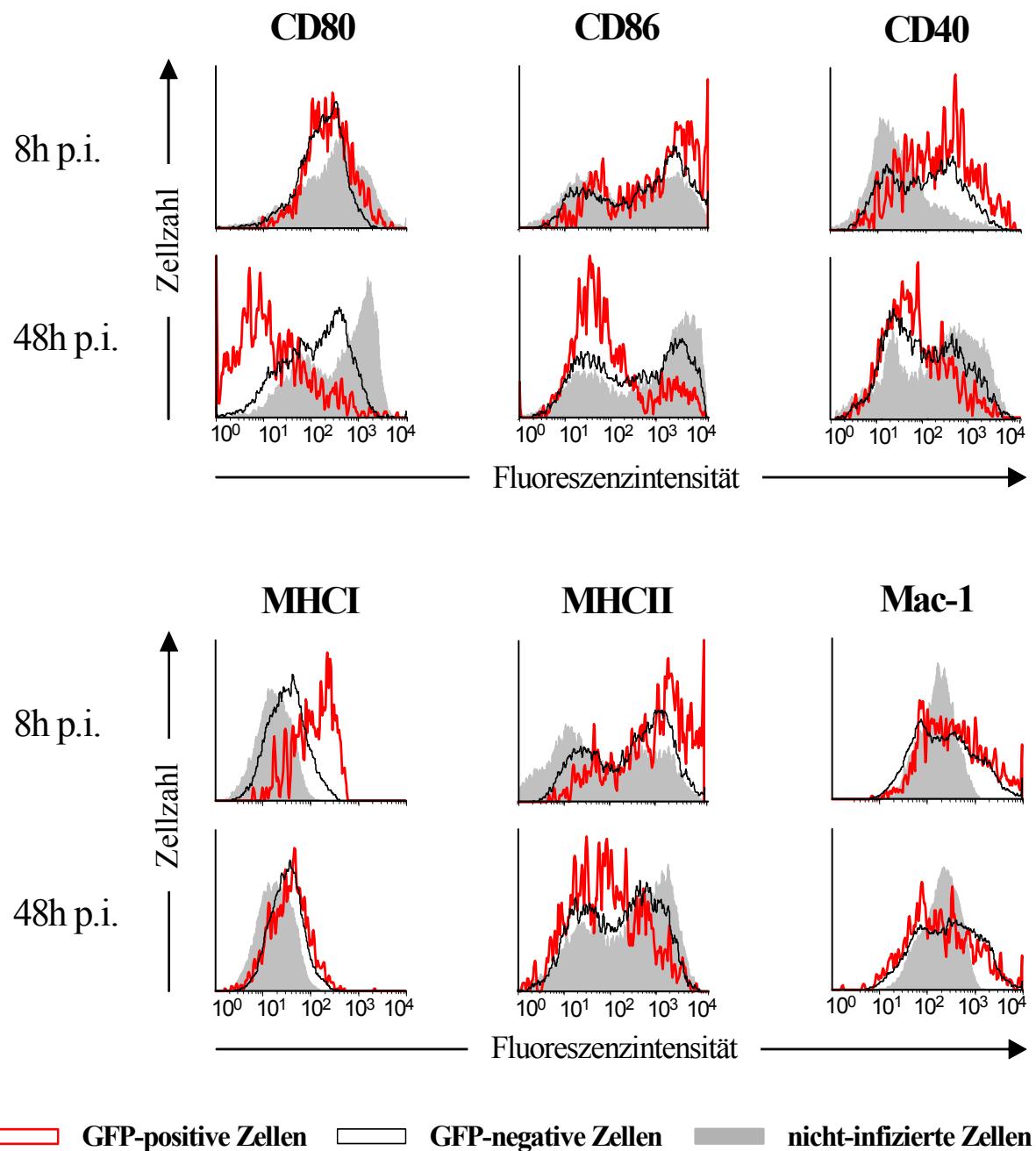
A) reife DCs

Abb. 25 MCMV-modulierte Expression der Oberflächenmoleküle auf reifen dendritischen Zellen (DCs).
A) Reife DCs wurden mittels Durchflusszytometrie 8 und 48 Stunden nach Infektion (h p.i.) mit GFP-MCMV (MOI = 10) analysiert. Als Kontrolle wurden nicht-infizierte DCs verwendet. Die Expression der angegebenen Oberflächenmoleküle auf MCMV-infizierten (GFP-positiven) DCs ist durch die rote Linie, auf GFP-negativen DCs durch die schwarze Linie und auf nicht-infizierten DCs durch die graue Schattierung dargestellt. Die GFP-negativen DCs stammen aus derselben Kultur wie die GFP-positiven DCs, wurden jedoch getrennt voneinander analysiert. Dieses Experiment wurde viermal wiederholt mit jeweils identischen Ergebnissen.
B) und C) Für das in A) dargestellte FACS-Experiment wurden die Prozentsätze der DCs mit starker bzw. schwacher Oberflächenmolekülexpression der jeweiligen DC-Populationen, nicht-infizierte, GFP-positive und GFP-negative DCs, berechnet. Als schwach wurden Fluoreszenzintensitäten kleiner als 10^2 definiert. Fluoreszenzintensitäten größer als 10^2 wurden als starke Expression bezeichnet. B) repräsentiert die Werte 8h p.i. und C) 48h p.i. Die Gesamtheit der Zellen einer DC-Population beträgt 100%.

B)

8h p.i.	Prozentanteil an Zellen mit starker bzw. schwacher Oberflächenmarkerexpression verschiedener DC-Populationen		
	nicht-infizierte DCs [%]	GFP-positive DCs [%]	GFP-negative DCs [%]
Oberflächenexpression:			
CD80 schwach	28	27,3	37,1
CD80 stark	72	72,2	62,9
CD86 schwach	45,1	26,9	32,8
CD86 stark	54,9	73,1	67,2
CD40 schwach	84,4	32,1	42,6
CD40 stark	15,2	67,9	57,4
MHCII schwach	49,9	20,7	32,2
MHCII stark	50,1	79,3	67,8
MHCI schwach	99	80	90,8
MHCI stark	1	20	9,2

C)

48h p.i.	Prozentanteil an Zellen mit starker bzw. schwacher Oberflächenmarkerexpression verschiedener DC-Populationen		
	nicht-infizierte DCs [%]	GFP-positive DCs [%]	GFP-negative DCs [%]
Oberflächenexpression:			
CD80 schwach	16,5	83,5	43,3
CD80 stark	83,5	16,5	56,7
CD86 schwach	23,5	85,3	43,3
CD86 stark	76,5	14,7	56,7
CD40 schwach	38,5	60,6	59
CD40 stark	61,5	39,4	41
MHCII schwach	27,8	72,5	43,3
MHCII stark	72,2	27,5	56,7
MHCI schwach	99	93,3	96,8
MHCI stark	1	4,7	3,2

IV.2.7 BEEINTRÄCHTIGTE T-ZELL-STIMULATION DURCH MCMV-INFIZIERTE DCs

Für die Aktivierung und Differenzierung der T-Zellen ist die Erkennung von Antigenen essentiell, die von MHC-Klasse-I und Klasse-II Molekülen auf APCs (z.B. DCs oder Makrophagen) präsentiert werden. Die Anzahl an Antigen-MHC-Komplexen und die Anwesenheit von ko-stimulatorischen Molekülen, wie CD80, CD86 und CD40, auf der Oberfläche der APCs ist dabei ausschlaggebend für eine erfolgreiche Aktivierung der T-Zellen und deren Proliferation (Lanzavecchia und Sallusto, 2001). In der nächsten Versuchsreihe wurden die Auswirkungen der phänotypischen Veränderungen, die nach der Infektion der reifen DCs mit MCMV auftraten (Abb. 25), auf die Funktion der DCs untersucht. Mit Hilfe des Lymphozyten-Proliferations-Assays (MLR) wurde analysiert, inwieweit die anfängliche Aktivierung der DCs durch die MCMV-Infektion, d.h. die verstärkte Expression der Oberflächenmolekülen, die in der Antigen-Präsentation eine wichtige Rolle spielen, zu einer gesteigerten Stimulation der T-Zell-Antwort führt. Weiter wurde untersucht, ob die reduzierte Expression der MHC-Klasse-I und Klasse-II Moleküle sowie der ko-stimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 zu einem späteren Zeitpunkt (48h p.i.) der Infektion die Proliferation autologer und allogener T-Zellen negativ beeinflusste.

IV.2.7.A Effiziente Stimulation der autologen T-Zell-Proliferation durch aktivierte MCMV-infizierte DCs

Früh nach Infektion, als die reifen DCs eine leicht erhöhte Expression der ko-stimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD86 und der MHC-Klasse-I und Klasse-II Moleküle auf der Oberfläche zeigten (Abb. 25B, 8h p.i.), wurden autologe naive T-Zellen zu MCMV-infizierten DCs in verschiedenen Mengenverhältnissen hinzugefügt. Als Kontrollen wurden T-Zellen zu DCs, denen UV-inaktiviertes MCMV zugegeben wurden, oder zu nicht-infizierten DCs gegeben. Fünf Tage nach Zugabe der T-Zellen zu den DCs wurde die T-Zell-Proliferation gemessen. Hierbei wurde beobachtet, dass die Stimulation der Proliferation autologer T-Zellen durch MCMV-infizierte aktivierte DCs deutlich stärker war als die T-Zell-Stimulation durch nicht-infizierte DCs oder DCs, die mit UV-inaktiviertem MCMV behandelt worden waren (Abb. 26A). MCMV-infizierte DCs riefen demnach eine stärkere Aktivierung naiver autologer T-Zellen hervor als nicht-infizierte oder mit UV-inaktiviertem Virus

behandelte DCs. Dies zeigte, dass MCMV-infizierte DCs früh nach Infektion starke und spezifische Aktivatoren von naiven T-Zellen sind.

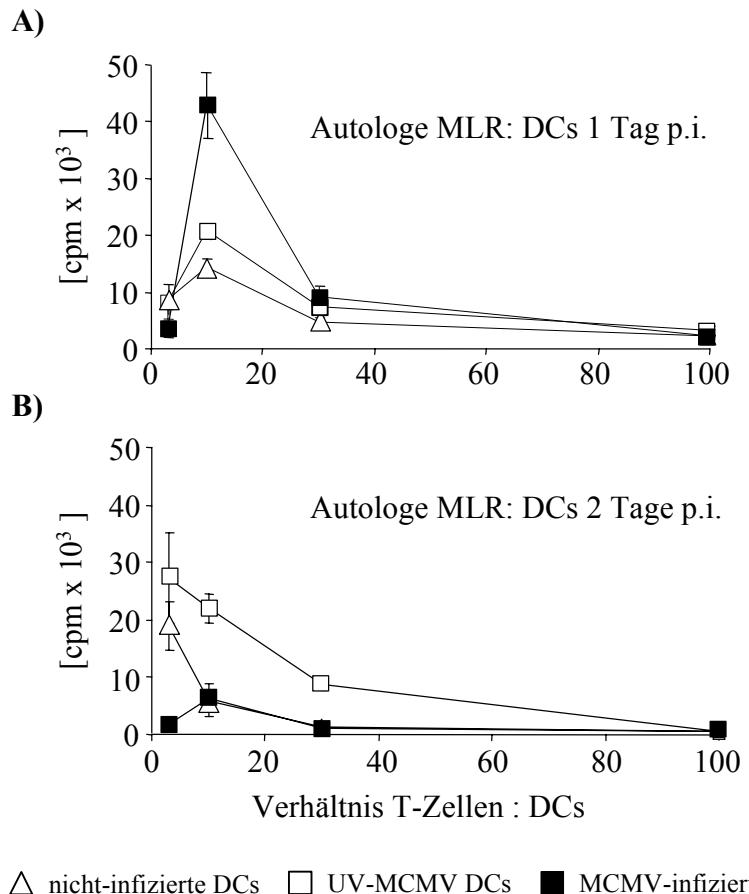


Abb. 26 Autologe T-Zell-Stimulation durch MCMV-infizierte dendritische Zellen (DCs). Reife DCs wurden entweder mit GFP-MCMV infiziert, nicht infiziert oder mit UV-inaktiviertem MCMV (UV-MCMV) behandelt. Einen Tag (**A**) oder zwei (**B**) Tage nach Infektion wurden autologe Splenozyten zu unterschiedlichen Mengen an DCs hinzugefügt. Fünf Tage nach Beginn des Lymphozyten-Proliferations-Assays (MLR) wurde die Proliferation der T-Zellen gemessen. Die MLR wurde jeweils dreifach angesetzt und die angegebenen Werte (*counts per minute*, cpm) sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung der 3 Parallelansätze eines repräsentativen Experiments. Dieses Experiment wurde viermal wiederholt.

IV.2.7.B MCMV-infizierte DCs inhibieren in der späten Phase der Replikation die autologe T-Zell-Proliferation

Um zu prüfen, ob sich die T-Zell-Stimulation durch infizierte DCs im Verlauf der Infektion ändert, wurde der Lymphozyten-Proliferations-Assay mit DCs, die bereits 2 Tage infiziert waren, durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt war die Expression der Oberflächenmoleküle auf den infizierten DCs deutlich reduziert (siehe Abb. 25A, 48 h p.i.). DCs wurden in verschiedenen Mengenverhältnissen mit autologen T-Zellen gemischt. Als Kontrollen dienten

mit UV-inaktiviertem MCMV-behandelte DCs und nicht-infizierte DCs. Die T-Zell-Proliferation wurde fünf Tage nach Beginn des Assays gemessen. Die Messungen ergaben, dass nicht-infizierte DCs und mit UV-inaktiviertem MCMV-behandelte DCs die Vermehrung der autologen T-Zellen effizient stimulierten (Abb. 26B). Die proliferative Antwort der T-Zellen auf die Stimulation durch MCMV-infizierte reife DCs war zwei Tage nach Infektion im Vergleich dazu deutlich reduziert (Abb. 26B).

Diese Ergebnisse legten nahe, dass die in der Durchflusszytometrie beobachtete Reduktion der Expression der Antigen-präsentierenden Oberflächenmoleküle auf MCMV-infizierten reifen DCs die T-Zell-stimulierenden Fähigkeiten dieser Zellen negativ beeinflussten.

IV.2.7.C MCMV interferiert mit der Stimulation allogener T-Zellen durch MHC-unabhängige Mechanismen

Im Gegensatz zur autologen Situation werden bei allogenen Immunantworten von T-Zellen nicht nur MHC-präsentierte Antigene als „fremd“ erkannt, sondern auch die MHC-Moleküle selbst als Fremdantigen wahrgenommen. Die Aktivierung und Stimulation der T-Zell-Proliferation ist somit in der allogenen Situation ebenfalls von der Expressionsstärke der MHC-Moleküle abhängig.

Um zu prüfen, ob sich die allogene T-Zell-Stimulation in Abhängigkeit der Expressionsstärke der MHC-Moleküle verändert, wurden MLRs mit DCs, die entweder bereits einen oder zwei Tage infiziert waren, durchgeführt. Allogene T-Zellen wurden zu verschiedenen Mengen an DCs zugegeben. Als Kontrollen dienten mit UV-inaktiviertem MCMV-behandelte DCs und nicht-infizierte DCs. Fünf Tage nach Zugabe der T-Zellen zu den DCs wurde die T-Zell-Proliferation gemessen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der autologen MLR (Abb. 26A), wurde ein Tag nach Infektion der DCs mit MCMV, trotz der nachgewiesenen verstärkten Expression der MHC-Moleküle zu diesem Zeitpunkt (Abb. 25A, 8h p.i.), keine verstärkte Stimulation der allogenen T-Zell-Proliferation gemessen (Abb. 27A). Die T-Zell-Stimulation durch infizierte aktivierte DCs war im Vergleich zur Stimulation durch nicht-infizierten DCs in der frühen Phase der viralen Replikation deutlich reduziert (Abb. 27A).

In der späten Phase der viralen Replikation (2 Tage p.i.) war die Stimulation der Proliferation der allogenen T-Zellen durch MCMV-infizierte DCs ebenso signifikant inhibiert (Abb. 27B) wie in der autologen MLR (Abb. 26B), während nicht-infizierte DCs in der Lage waren, die allogenen T-Zellen effizient zu stimulieren (Abb. 27B). Unabhängig von der

Expressionsstärke der Antigen-präsentierenden Oberflächenmoleküle auf den DCs war die Stimulation der T-Zell-Proliferation durch MCMV-infizierte DCs in der allogenen MLR reduziert.

Die Zugabe von UV-inaktiviertem MCMV zu DCs hatte in der allogenen Situation (Abb. 27), wie auch in autologen MLR (Abb. 26) eine gesteigerte Stimulation der T-Zell-Proliferation zur Folge, was für eine hohe Immunogenität der viralen Strukturproteine sprach.

Diese Daten zeigten, dass die Stimulation der T-Zell-Proliferation in der allogenen Situation unabhängig von der Stärke der MHC-Expression auf den infizierten DCs war. Sowohl ein wie auch zwei Tage nach Infektion der DCs wurde eine inhibierte Stimulation der Proliferation der T-Zellen gemessen, obwohl die Expressionsstärke der Oberflächenmoleküle an den beiden Zeitpunkten unterschiedlich war. Dies widersprach den Erwartungen, dass die Stimulation der allogenen T-Zellen mit der Expressionsstärke der MHC-Moleküle korreliert. Wäre dies der Fall gewesen, hätten die allogenen T-Zellen von DCs, die nur einen Tag infiziert waren und ein aktiviertes Expressionsprofil der Oberflächenmoleküle zeigten, ebenso effizient stimuliert werden müssen, wie dies für die autologen T-Zellen beobachtet wurde. Da dies nicht der Fall war, scheint in der allogenen Situation ein MHC-unabhängiger Mechanismus zum Tragen gekommen zu sein, der sich negativ auf die Proliferation der T-Zellen auswirkte.

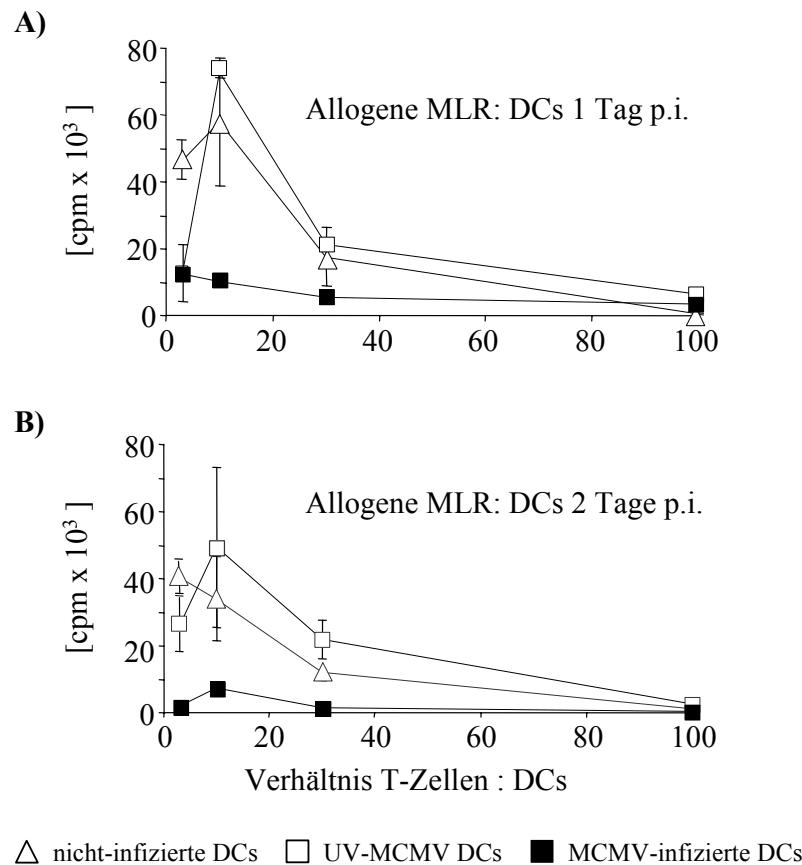


Abb. 27 Reduzierte allogene T-Zell-Stimulation durch MCMV-infizierte DCs. Reife DCs wurden entweder mit GFP-MCMV infiziert, nicht infiziert oder mit UV-inaktiviertem MCMV (UV-MCMV) behandelt. Einen Tag (A) oder zwei (B) Tage nach Infektion wurden allogene Splenozyten zu unterschiedlichen Mengen an DCs hinzugefügt. Fünf Tage nach Beginn des Lymphozyten-Proliferations-Assays (MLR) wurde die Proliferation der T-Zellen gemessen. Die MLR wurde jeweils dreifach angesetzt und die angegebenen Werte (*counts per minute, cpm*) sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung der 3 Parallelansätze eines repräsentativen Experiments. Dieses Experiment wurde dreimal wiederholt.

V DISKUSSION

V.1 METHODEN UND MCMV-REKOMBINANTEN ZUM NACHWEIS DER INFIZIERBARKEIT VON ZELLEN DES HÄMATOPOETISCHEN SYSTEMS

V.1.1 INSTABILITÄT DER LAC-OPERATOR-REPETITIONSEQUENZEN IM VIRALEN GENOM

Mit Hilfe des Expressions-unabhängigen lac-Operator-Repressor-Nachweissystems (Robinett et al., 1996) sollte die Infizierbarkeit von Zellen mit MCMV nachgewiesen werden, die keine virale Genexpression erlauben. Zu diesem Zweck sollte eine MCMV-Mutante hergestellt werden, die eine Reihe von lac-Operator-Sequenzen im Genom enthält, an die lac-Repressor-Proteine spezifisch binden können. Die Bindung von GFP-markierten lac-Repressor-Fusionsproteinen an die in der viralen DNA integrierten lac-Operatoren (lacO) sollte die Lokalisation der DNA, anhand der grünen Fluoreszenz, in der Zelle ermöglichen. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass die 10 kb große lacO-Repetitionssequenz in den viralen Genomen nicht stabil war. Es wurden maximal 90 lac-Operatoren (2,7 kb) stabil ins virale Genom integriert. Die Bindung von lacI-GFP Fusionsproteinen an diese reduzierte Anzahl an lacO-Sequenzen reichte nicht aus, dass die viralen Genome in Zellen detektiert werden konnten. Die lacO-Sequenzlänge von 2,7 kb hatte ungefähr die Größe der aus der Rekombination resultierenden Deletion in der ie2-Region, sodass die Gesamtgenomgröße der verpackten rekombinanten MCMV-Genome die Größe des wt MCMV-Genoms nicht überschritt.

Die Konstruktion einer MCMV-Mutante mit der vollen Anzahl an lac-Operatoren scheiterte sowohl an der limitierten Verpackungskapazität des viralen Kapsides als auch am Aufbau der einzubringenden Repetitionssequenzen. Repetitionssequenzen dienen als Substrat für die homologe Rekombination in Bakterien und in eukaryontischen Zellen. Während die homologe Rekombination zum einen gezielt zum Entfernen von Sequenzen genutzt werden kann (Wagner et al., 1999), führt sie zum anderen zu ungewolltem Verlust von Sequenzen in viralen Genomen (Adler et al., 2000). Genome ohne Überlänge werden im Fall von CMV außerdem bevorzugt verpackt, sodass dies, auch wenn homologe Rekombinationsereignisse in Zellen äußerst selten sind, zu einer Anhäufung von Genomen mit wt-Genomlänge in der Population der Virusnachkommen führt (Wagner et al., 1999). Auch für andere Viren wurde beobachtet, dass Genome mit Überlänge kaum verpackt werden. Eine Überlänge von mehr als 5% der wt Genomgröße führte bei Adenovirus zur Instabilität des Genoms (Bett et al., 1993).

Für das Epstein-Barr Virus wurde gezeigt, dass die DNA-Länge einen erheblichen Einfluss auf die Effizienz hat, mit der die DNA verpackt wird (Bloss und Sugden, 1994).

Um die Größenlimitation der verpackbaren DNA durch das MCMV-Kapsid zu umgehen, könnte in einem ersten Schritt eine MCMV-Mutante hergestellt werden, der 10 kb der viralen Sequenz deletiert werden, sodass nach Integration der vollständigen lacO-Repetitionssequenz die resultierenden MCMV-Genome keine Überlänge haben. Ob die Integration der vollständigen lacO-Repetitionssequenz in ein deletiertes MCMV-Genom tatsächlich stabil ist, wurde jedoch nicht getestet. Außerdem kann eine solche Deletion CMV-Gene betreffen, die zwar in Zellkultur für die virale Replikation nicht essentiell sein mögen, jedoch im Infektionsverlauf *in vivo* durchaus eine Rolle spielen könnten.

V.1.2 DAS SMALL CAPSID PROTEIN (SCP) IST FÜR DAS MCMV-WACHSTUM ESSENTIELL

Der Versuch eine MCMV-Mutante zu generieren, die ein SCP-GFP Fusionsprotein exprimiert, wurde in dieser Arbeit beschrieben. Die MCMV-Mutante mit GFP-markiertem Kapsid sollte es möglich machen, den Eintritt des Virus in Zellen unabhängig von der viralen Genexpression verfolgen zu können. Zusätzlich zum Eintritt des Virus in die Zelle könnte mit einer solchen Mutante der Transport einzelner Kapside zum Kern, bzw. der Zusammenbau des Kapsides und der Austritt neu synthetisierter Virionen aus den Zellen im Falle einer produktiven Infektion untersucht werden. Mit Hilfe des Ein-Schritt-Rekombinationsverfahrens (Wagner, 2001) wurde ein MCMV-BAC-Plasmid hergestellt, das für das SCP-GFP Fusionsprotein kodiert. Diese Methode erlaubt Mutationen in CMV-Genome in einem Schritt mit Hilfe homologer Rekombination in *E.coli* zu inserieren und den Phänotyp der Mutante nach Transfektion des BAC-Plasmides in permissive Zellen zu analysieren. Die Konstruktion des mutanten MCMV-Genoms ist komplett unabhängig von der Lebensfähigkeit oder den Wachstumseigenschaften der Mutante. Während eine HSV-1 Mutante, an deren SCP-Gen, UL35 (VP26), ebenfalls das GFP-Gen im selben Leseraster kloniert wurde, erfolgreich rekonstituiert werden konnte und die Fusionsproteine VP26-GFP exprimiert und ins Kapsid eingebaut wurden (Desai und Person, 1998), gelang die Rekonstitution der SCP-GFP exprimierenden MCMV-Mutante im Rahmen dieser Arbeit nicht. Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass es Unterschiede zwischen dem Aufbau der CMV-Virionen und dem der HSV-1 Virionen gibt.

Die ikosaedrischen Kapside der Herpesviren sind aus zwei Typen von Kapsomeren aufgebaut: Zum einen aus Pentonen, welche die Ecken bilden, und zum anderen aus Hexonen, welche die Flächen und Kanten des Ikosaeders bilden. Jeweils sechs SCP-Moleküle bilden auf der Spitze der 150 im Kapsid vorhandenen Hexone einen Ring (Booy et al., 1994; Chen et al., 1999; Zhou et al., 2000). Die Analyse der 3D Struktur des HCMV-Virions zeigte jedoch Unterschiede in der Interaktion des Kapsides mit den Proteinen des Teguments im Vergleich zu HSV-1 (Chen et al., 1999). Während bei HSV-1 die Tegumentproteine vorwiegend mit den Pentonen interagieren (Zhou et al., 1999), binden CMV-Tegumentproteine sowohl an Hexone als auch an Pentone des Kapsids (Chen et al., 1999). Dieser Unterschied kann eine mögliche Erklärung sein, dass das VP26-GFP von HSV-1 in Virionen inkorporiert werden konnte, jedoch die Bildung von CMV-Virionen mit eingebauten SCP-GFP Fusionsproteinen nicht möglich war. Im Falle von HSV-1 ist das SCP ausschließlich auf den Spitzen von Hexonen lokalisiert, welche nicht mit dem Tegument interagieren und somit die Anordnung der Tegumentproteine nicht gestört ist. Bei CMV dagegen interagieren Tegumentproteine mit beiden Typen von Kapsomeren, sodass der Einbau der SCP-GFP Fusionsproteine in CMV-Partikel die Interaktion zwischen Kapsid- und Tegumentproteinen möglicherweise blockiert. Dass eine Interaktion zwischen dem SCP des Kapsids und den Tegumentproteinen essentiell für das Virus ist, konnte mit Hilfe einer HCMV-Mutante, bei der das SCP deletiert wurde, gezeigt werden (Borst et al., 2001). Im Gegensatz dazu wurde für das SCP von HSV-1 gezeigt, dass das Protein für die virale Replikation *in vitro* nicht essentiell ist und die Deletion des Genes lediglich zu einer reduzierten Virusproduktion in infizierten Zellen führte (Desai et al., 1998). Das CMV-Kapsid dient offenbar als Gerüst für eine geordnete Anordnung der Tegumentproteine (Chen et al., 1999) und einen korrekten Zusammenbau des CMV-Virions, während das VP26 bei HSV-1 nicht entscheidend für die Partikelmorphogenese ist (Chen et al., 2001).

Nach Transfektion des rekombinanten MCMV-BAC-Plasmides pSM3fr:SCP-GFP in permissive Zellen konnte die Expression eines grün-fluoreszierenden Proteins beobachtet werden. Die Fluoreszenz war in abgegrenzten rundlichen Strukturen im Zellkern lokalisiert. Die kugelförmige Form und Lokalisation der grünen Fluoreszenz in den Zellen ließ vermuten, dass die SCP-GFP Fusionsproteine immer noch in der Lage sind, mit anderen viralen Proteinen zu interagieren, die für den Transport der Proteine in den Kern verantwortlich sind und/oder sie in diesen nukleären Kompartimenten zurückhalten. Für HSV-1 konnten Interaktionen des VP26 mit anderen HSV-1 Kapsidproteinen nachgewiesen werden (Chi und Wilson, 2000; Desai et al., 1994; Rixon et al., 1996; Zhou et al., 1999). Die Strukturen, in

denen die SCP-GFP Fusionsproteine lokalisiert sind, stellen möglicherweise Orte des Kapsidzusammenbaus dar, entsprechend den so genannten „Assemblons“ bei HSV-1 (Ward et al., 1996). Die Anwesenheit von VP26 in solchen Strukturen ist für HSV-1 gezeigt worden (Chi und Wilson, 2000).

Als Alternative zum SCP könnten andere CMV-Strukturproteine mit GFP markiert werden. Hierfür würden sich Tegumentproteine anbieten, die ebenso wie die Kapsidproteine während des Infektionsvorganges in die Zellen eintreten, während die Hüllproteine außerhalb der Zellen verbleiben. Im Gegensatz zu den Kapsidproteinen sind die CMV-Tegumentproteine nicht in derart starren Strukturen angeordnet, dass kein Platz für zusätzliche Proteine ist (Chen et al., 1999). Ein markiertes Tegumentprotein würde zwar den Nachweis des Viruseintritts und seiner Expression bei einer produktiven Infektion erlauben, nicht aber die Identifizierung latent infizierter Zellen. Während der viralen latenten Infektion werden nur wenige frühe virale Produkte gemacht (Kondo et al., 1996), nicht aber späte Proteine, zu denen die Tegumentproteine gehören.

V.1.3 NACHWEIS VIRALER GENEXPRESSION IN HÄMATOPOETISCHEN ZELLEN MIT HILFE VON MCMV-MUTANTEN

Für die Herstellung von Reportergen-exprimierenden MCMV-Mutanten wurden die Gene des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) und der β -Lactamase verwendet. Die erfolgreiche Insertion der Reportergene in MCMV-Genome und deren funktionelle Expression im Virusgenomkontext sollten die Identifizierung von Zellen des hämatopoetischen Systems ermöglichen, die infizierbar sind und virale Genexpression erlauben. Mit Hilfe von MCMV-Mutanten, die leicht nachweisbare Reporterproteine exprimieren, könnte ebenfalls die Reaktivierung von latent vorliegendem CMV verfolgt werden.

Mit Hilfe homologer Rekombination wurden der GFP-ORF und der ORF der β -Lactamase unter Kontrolle des HCMV-*immediate early*-Promotors in das *in vitro* nicht-essentielle Gen m152 (Ziegler et al., 1997) des MCMV-Genoms inseriert. Nach erfolgreicher Rekonstitution der MCMV-Mutanten (Δ m152-EGFP und Δ m152-Lactamase) wurden Fibroblasten infiziert und die GFP-Expression konnte im UV-Mikroskop beobachtet werden. Für den Nachweis der β -Lactamase-Aktivität mussten die Zellen mit dem Substrat CCF2/AM beladen werden. Das Substrat kann, ohne dass die Zellen permeabilisiert werden müssen, durch die Zellmembran in die Zellen diffundieren, wo es von der β -Lactamase hydrolysiert wird. Die funktionelle virale

Expression der β -Lactamase konnte anhand einer Farbänderung des Substrates nachgewiesen werden. Das ungespaltene Substrat in uninfizierten Zellen emittierte grüne Fluoreszenz, während das Spaltprodukt in $\Delta m152$ -Lactamase-infizierten Zellen blau fluoreszierte.

Im Gegensatz zu dem Reporter GFP ist die β -Lactamase ein katalytisch aktiver Reporter, was bedeutet, dass die Nachweisempfindlichkeit der β -Lactamase im Vergleich zu der von GFP höher ist. Die Detektionsgrenze der Fluoreszenz von GFP liegt bei 10^5 bis 10^6 Molekülen pro Zelle (Niswender et al., 1995), während im Falle der β -Lactamase bereits 100 β -Lactamase-Moleküle ausreichen, um einen detektierbaren Farbumschlag zu bewirken (Zlokarnik et al., 1998). Mit der β -Lactamase-MCMV-Mutante sollte somit eine sehr schwache virale *immediate-early* Genexpression nachzuweisen sein. Während jedoch keine weiteren Arbeitsschritte zur Detektion der GFP-Expression in Zellen notwendig sind, müssen die Zellen für den Nachweis der β -Lactamase-Expression erst mit Substrat beladen werden. In beiden Fällen werden die Zellen jedoch nicht lysiert und der infizierte Zelltyp kann identifiziert und weiterkultiviert werden.

Ist die Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen auf Zellen nach einer MCMV-Infektion vorgesehen, ist jedoch von der Verwendung dieser Virus-Mutanten abzusehen. Es ist bekannt, dass das Genprodukt von m152, welches in den MCMV-Mutanten $\Delta m152$ -EGFP und $\Delta m152$ -Lactamase deletiert wurde, mit der MHC-Klasse-I-gebundenen Antigenpräsentation interferiert (Ziegler et al., 1997). Dies könnte einen Phänotyp der infizierten Zellen zur Folge haben, der sich hinsichtlich der MHC-Klasse-I-Expression von dem von wt MCMV-infizierten Zellen unterscheidet. Stattdessen wurde die GFP-exprimierende MCMV-Mutante, GFP-MCMV, welche den GFP-ORF unter Kontrolle des HCMV-*immediate early*-Promotors in der ie2-Region trägt (Mathys et al., 2003) für Infektionsstudien mit dendritischen Zellen verwendet. Der ie2-Region von MCMV konnte bisher keine Funktion zugeordnet werden.

V.2 NICHT-PERMISSIVE INFEKTION MULTIPOTENTER HÄMATO-POETISCHER STAMMZELLEN MIT MCMV

Nach einer primären Infektion etabliert CMV eine lebenslange latente Infektion in seinem natürlichen Wirt. Im Falle von HCMV konnten latent vorliegende HCMV-Genome in CD34 $^{+}$ pluripotenten Stammzellen sowohl *in vitro* (Maciejewski et al., 1992; Minton et al., 1994; Movassagh et al., 1996) als auch *in vivo* (Mendelson et al., 1996; vonLaer et al., 1995)

nachgewiesen werden. Die Infektion verläuft jedoch nicht lytisch und die virale Genexpression ist sehr limitiert. Dies konnte auch für Monozyten-/Dendriten-Vorläuferzellen (Hahn et al., 1998) gezeigt werden. Erst die terminale Differenzierung der CMV-infizierten Vorläuferzellen führt zur Reaktivierung und Produktion von Virusnachkommen (Soderberg-Naucler et al., 1997b; Soderberg-Naucler et al., 2001). Auch MCMV-Genome konnten in Zellen des Knochenmarks nachgewiesen werden, jedoch wurde die Identität dieser Zellen bisher nicht näher bestimmt (Koffron et al., 1998).

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten zur Klärung der Frage beitragen, ob und welche Differenzierungsstufen der hämatopoetischen Vorläuferzellen CMV infizieren kann. Als Zellsystem wurde die murine hämatopoetische Stammzelllinie FDCP-Mix verwendet. Die multipotente Stammzelllinie FDCP-Mix (Spooncer et al., 1986) hat einen normalen Karyotyp und ist nicht leukämisch. FDCP-Mix-Zellen können in bestrahlten Mäusen Milzkolonien bilden, und frühe Zellisolate sind fähig, die Hämatopoese in letal bestrahlten Mäusen zu rekonstituieren (Spooncer et al., 1984). Morphologisch sehen undifferenzierte FDCP-Mix-Zellen aus wie unreife Blasten und exprimieren die murinen Stammzellmarker Sca-1 und CD34 auf ihrer Oberfläche (Ford et al., 1992). FDCP-Mix-Zellen können *in vitro* sowohl in neutrophile und erythroide Zellen als auch in dendritische Zellen, Makrophagen, Granulozyten oder Megakaryozyten differenziert werden (Ford et al., 1992; Hagenaars et al., 1991; Heyworth et al., 1990; Heyworth et al., 1995; Just et al., 1991; Schroeder et al., 2000; Spooncer et al., 1986). Dieses Zellsystem ermöglicht, die Infizierbarkeit hämatopoetischer Zellen verschiedener Differenzierungsstufen zu untersuchen und eröffnet auch die Möglichkeit, das Phänomen der Latenz und die Mechanismen der Reaktivierung von CMV in Stammzellen zu erforschen.

In der vorliegenden Arbeit konnten acht Stunden nach Infektion zirkularisierte MCMV-Genome in undifferenzierten CD34⁺ FDCP-Mix-Zellen detektiert werden. Zu einem späteren Zeitpunkt (24 Stunden nach Infektion) war jedoch keine zirkuläre MCMV-DNA mehr in den Zellen nachweisbar. Es stellte sich somit die Frage, ob die acht Stunden nach Infektion detektierten zirkulären Genome nicht etwa von einer bereits spontan differenzierten Zellpopulation stammten, die permissiv für virale Replikation war und zum späteren Zeitpunkt der Infektion bereits lysiert worden war. Dies würde jedoch den Beobachtungen für HCMV widersprechen. Im Falle von HCMV wurde gezeigt, dass auch CD33⁺ myeloische Vorläuferzellen, die aus CD34⁺ primitiven hämatopoetischen Zellen spontan differenziert waren, virale Latenz unterstützten (Hahn et al., 1998; Kondo et al., 1994) und erst die

terminale Differenzierung infizierter Vorläuferzellen zu einer Reaktivierung und produktiven Replikation von CMV führte (Hahn et al., 1998; Soderberg-Naucler et al., 1997b; Soderberg-Naucler et al., 2001). Außerdem konnte kürzlich gezeigt werden, dass in nicht-permissiven Vorläuferzellen wie Monozyten hohe Konzentrationen an Histon-Deacetylasen, die für die Deacetylierung der Histone verantwortlich sind, und Faktoren, die zur Stilllegung des viralen Promotors (*major immediate early promotor*, MIEP) führen, vorhanden sind, sodass die Replikation von HCMV in diesen unreifen Zellen inhibiert ist (Murphy et al., 2002). Diese Kenntnisse unterstützen die Erwartung, dass MCMV myeloische Zellen früh in der Hämatopoiese infizieren kann und sich latent in den Zellen etabliert.

Obwohl HCMV und MCMV in vielen Fällen ähnliche Mechanismen oder Strategien entwickelt haben, sind die Fähigkeiten der beiden Viren nicht gleichzusetzen. So war es vielleicht falsch zu erwarten, dass MCMV ebenso wie HCMV, CD34⁺ hämatopoetische Zellen latent infizieren kann. Außerdem sollte bei dem verwendeten Zellsystem beachtet werden, dass die *in vitro* gehaltenen FDCP-Mix-Zellen proliferieren, während Stammzellen *in vivo* meist ruhende Zellen sind. Dies mag für die Etablierung und Erhaltung einer latenten CMV-Infektion von entscheidender Bedeutung sein.

V.3 DIE ROLLE DENDRITISCHER ZELLEN IN MCMV-INDUZIERTER IMMUNSUPPRESSION

Eine der ersten Reaktionen eines Organismus auf eine virale Infektion ist die Synthese von antiviralen Zytokinen, die aktivierend auf Zellen des angeborenen Immunsystems (Makrophagen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen)) wirken. Das angeborene Immunsystem, insbesondere NK-Zellen, sind in den ersten Tagen nach Infektion in der Lage, die Ausbreitung der viralen Infektion einzuschränken. Für eine effiziente Kontrolle einer MCMV-Infektion ist jedoch der Aufbau einer spezifischen Immunantwort notwendig. Sind Viren nun in der Lage die Immunantwort gegen sich und auch unbeteiligte Pathogene zu unterdrücken, indem sie mit Zellen des spezifischen Immunsystems interferieren, kann dies für den Wirt schwerwiegende Folgen haben. Eine Suppression der Immunantwort gibt Pathogenen die Chance, erfolgreich in ihrem Wirt zu replizieren, auf neue Wirtsindividuen übertragen zu werden und in einer Wirtspopulation zu persistieren. Um bessere Therapien gegen virale Erkrankungen entwickeln zu können, ist es entscheidend, die Mechanismen der viral-induzierten Immunsuppression zu verstehen.

DCs sind professionelle APCs und spielen die Hauptrolle bei der Initiierung einer antiviralen T-Zellantwort (Banchereau et al., 2000; Banchereau und Steinman, 1998). Aufgrund dieser Eigenschaft sind DCs ein prädestiniertes Ziel viraler Immunevasionsstrategien, um einer antiviralen Immunantwort entgegenzuwirken, wie für HIV, Masernvirus, Vaccinia oder HSV-1 gezeigt werden konnte. Diese Viren haben Mechanismen entwickelt, die der Etablierung einer effizienten antiviralen T-Zellantwort entgegenwirken (Engelmayer et al., 1999; Fugier-Vivier et al., 1997; Knight et al., 1997; Kruse et al., 2000; Salio et al., 1999). Zu Beginn dieser Arbeit war nicht bekannt, welche Strategien CMV bei der Infektion von dendritischen Zellen verfolgt und welche Mechanismen der CMV-induzierten Immunsuppression zu Grunde liegen.

Für die Infektionsstudien wurden murine multipotente FDCP-Mix Zellen in funktionelle DCs differenziert. Die hier benutzten Zellkulturbedingungen erlaubten die Differenzierung der FDCP-Mix-Zellen in myeloische DCs. Ob FDCP-Mix-Zellen auch in lymphoide DCs oder Langerhans Zellen differenzieren können, ist bisher nicht bekannt. In den letzten Jahren wurde eine Reihe von anderen Zelllinien beschrieben, die phänotypisch und funktionell DCs ähnlich sind. Ausser den Zellen der aus Milz-Zellen abgeleiteten DC-Zelllinie D1 (Winzler et al., 1997), unterscheiden sich die anderen Zelllinien in mancherlei Hinsicht von den von FDCP-Mix-Zellen abgeleiteten DCs. Zum einen können DCs mit einem unreifen Phänotyp, wie die aus Zellen der Epidermis abgeleitete DC-Zelllinie XS (Xu et al., 1995) und die aus Zellen der Milz gewonnene Zelllinie CB1 (Paglia et al., 1993), *in vitro* nicht in reife DCs differenzieren werden, zum anderen sind die Zelllinien tumorbildend (Rasko et al., 1997) oder mit Onkogenen transformiert. Die FDCP-Mix-Zelllinie ist die mir einzige bekannte murine Zelllinie, deren Zellen von einem undifferenzierten Stammzell-Phänotyp in DCs differenziert werden können und das in gerichteter und synchroner Art und Weise. Eine Alternative zu den FDCP-Mix-Zellen ist die Herstellung von DCs aus murinem Knochenmark oder Blut der Maus. Die Isolierung der Zellen ist jedoch aufwendig und die Ausbeute je nach Verfahren gering (Inaba et al., 1992; Lutz et al., 1999; Scheicher et al., 1992). Außerdem variieren die so hergestellten DCs in ihrem Reifungsstadium und die Zellpopulation ist mit anderen Zelltypen, wie B-Zellen oder Granulozyten, durchsetzt.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob MCMV DCs infizieren kann und die phänotypischen und funktionellen Konsequenzen der MCMV-Infektion auf DCs analysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl unreife als auch reife murine DCs von MCMV infiziert werden können. Während in reifen DCs der virale Replikationszyklus in der späten

Phase blockiert ist, produzieren unreife DCs infektiöse Virusnachkommen. Die anfänglich gesteigerte Expression der MHC- und ko-stimulatorischen Moleküle auf infizierten reifen DCs, gefolgt von einer späteren Reduktion dieser Moleküle, hat funktionelle Konsequenzen für die Induktion der Immunantwort. Zu einem frühen Zeitpunkt nach Infektion konnten reife MCMV-infizierte DCs die Proliferation autologer T-Zellen effizient stimulieren, während die T-Zellaktivierung durch MCMV-infizierte DCs zu einem späteren Zeitpunkt beeinträchtigt war. Die Proliferation allogener T-Zellen durch MCMV-infizierte DCs konnte weder in der frühen noch in der späten Phase der Infektion stimuliert werden. Diese Beobachtungen legen nahe, dass DCs eine Doppelrolle in der CMV-Infektion spielen: zum einen initiieren sie früh nach Infektion eine spezifische Immunantwort und zum anderen begrenzen sie später den Umfang der T-Zellaktivierung, was CMV immunsuppressive Fähigkeiten verleiht.

V.3.1 INFektION UND REPLIKATION VON MCMV IN MURINEN DCs

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MCMV murine dendritische Zellen infizieren kann. Während reife MCMV-infizierte DCs keine infektiöse Virionen produzierten, setzten unreife MCMV-infizierte DCs virale Nachkommen frei. Die permissive Infektion von unreifen DCs eröffnet dem Virus die Möglichkeit, mit der Aktivierung und Reifung der DCs zu interferieren. Die Migration unreifer DCs aus der Peripherie in lymphoide Organe kann außerdem zur Verbreitung und Pathogenese des Virus beitragen. Als potentielles Transportmittel wurde für MCMV bereits ein mononukleärer phagozytierender Zelltyp beschrieben (Stoddart et al., 1994). Unreife DCs spielen auch in der Verbreitung von HIV-1 (Cameron et al., 1992) und HSV-1 (Mikloska et al., 2001) eine wichtige Rolle. Interessanterweise war die Infektionseffizienz unreifer und reifer DCs für MCMV gleich, obwohl die Infektion in reifen DCs nicht-produktiv verlief. Dies spricht dafür, dass nicht der Eintritt der Viren in reife DCs gehemmt war, sondern die virale Replikation. Die Beobachtung, dass sehr frühe und frühe Proteine in reifen DCs nachgewiesen wurden, während Proteine der späten Phase nicht detektiert werden konnten, unterstützt diese Annahme. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten, bezüglich der produktiven Infizierbarkeit von DCs mit MCMV, unterscheiden sich von anderen Infektionsstudien mit MCMV. Dort wurde berichtet, dass MCMV auch in reifen DCs replizieren konnte (Andrews et al., 2001). Die Virusproduktion erfolgte jedoch mit zeitlicher Verzögerung und war deutlich reduziert im Vergleich zu unreifen DCs (Andrews et al., 2001). Es kann dabei nicht ausgeschlossen werden, dass nicht alle Zellen in der Zellpopulation der LPS-behandelten D1-Zellen, die von

Andrews et al. verwendet wurden, einen reifen Phänotyp hatten und die Nachkommenviren nicht von noch vorhandenen unreifen DCs produziert wurden. Im Falle von HCMV wurden ebenfalls unterschiedliche Beobachtungen hinsichtlich der Infizierbarkeit von DCs gemacht. Während die von Raftery et al., 2001 beschriebenen Infektionen von unreifen und reifen DCs mit HCMV nicht-lytisch verliefen, sondern nur Zell-assoziierte infektiöse Nachkommenviren nachgewiesen werden konnten, zeigte eine andere Gruppe, dass reife DCs nur zu einem sehr geringen Prozentsatz mit HCMV infizierbar sind (Moutaftsi et al., 2002). Ob sich HCMV wirklich von MCMV hinsichtlich produktiver Infizierbarkeit von DCs unterscheidet oder ob in diesem Fall nicht einfach der unterschiedliche DC-Typ, der für die Studien verwendet wurde, Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse war, ist im Moment nicht klar.

Die hier beschriebene Resistenz der reifen DCs gegen die virale Replikation von MCMV konnte sowohl für HCMV (Moutaftsi et al., 2002) als auch für andere Viren wie Vaccinia, HIV-1 oder HSV-1 beobachtet werden (Engelmayer et al., 1999; Granelli-Piperno et al., 1999; Salio et al., 1999). HSV-1 kann reife DCs effizient infizieren, aber späte Transkripte und neu synthetisierte Viruspartikel konnten nicht nachgewiesen werden (Kruse et al., 2000). Dass trotz inhibierter Expression viraler Proteine der späten Phase phänotypische und funktionelle Veränderungen auf reifen MCMV-infizierten DCs beobachtet werden konnten, legt nahe, dass virale Genprodukte der sehr frühen und/oder frühen Phase für die Veränderung des DC-Phänotyps und der Beeinträchtigung der DC-Funktion verantwortlich sind. Die Blockade der späten viralen Genexpression in reifen DCs bedarf der weiteren Untersuchung, um den Mechanismus zu verstehen. Die Frage, ob sich CMV in reifen DCs latent etabliert und diese Zellen dem Virus als Reservoir dienen, ist bisher nicht geklärt.

V.3.2 MCMV-INDUZIERTE VERÄNDERUNGEN DES DC-PHÄNOTYPUS UND MÖGLICHE AUSWIRKUNGEN AUF DIE IMMUNANTWORT

Nachdem die Infizierbarkeit von unreifen und reifen DCs mit MCMV gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob MCMV den Phänotyp und die Funktion von DCs beeinflusst. Sowohl unreife als auch reife DCs wurden anfänglich durch die virale Infektion aktiviert, erkennbar an einer verstärkten Expression der MHC-Moleküle und ko-stimulatorischen Marker auf ihrer Oberfläche. Die beobachteten Effekte waren spezifisch auf MCMV-infizierten DCs zu sehen. Der transienten Hochregulation der Marker folgte eine Reduktion der Expression von MHC-Klasse-II, CD80, CD86 und CD40 Molekülen auf MCMV-infizierten reifen DCs. Auf infizierten unreifen DCs wurde nur das ko-stimulatorische

Moleköl CD80 vermindert exprimiert. Die Expression des Markers Mac-1 blieb unverändert, womit ein unspezifischer Effekt auf die Expression der Oberflächenmoleküle ausgeschlossen werden konnte.

Die anfängliche Aktivierung der DCs durch die MCMV-Infektion spiegelt eine übliche Reaktion von DCs auf vorhandene Pathogene wieder. MCMV ist jedoch rasch in der Lage, mit dieser DC-Reaktion zu interferieren, wie die reduzierte Expression der Oberflächenmoleküle zwei Tage nach Infektion zeigte. Der zeitliche Abstand zwischen Aktivierung und dem Einsetzen der inhibierenden Reaktion durch das Virus spiegelt wahrscheinlich die für die virale Replikation benötigte Zeit zur Synthese spezifisch wirksamer viraler Proteine wider. Für die DC-Zelllinie D1 konnte nach Infektion mit MCMV ebenfalls eine anfängliche Aktivierung unreifer DCs gezeigt werden, der eine Reduktion der Expression der Oberflächenmoleküle MHC-Klasse-II, MHC-Klasse-I, CD80, CD86 und CD40 auf MCMV-infizierten DCs folgte (Andrews et al., 2001). Die von dieser Gruppe verwendeten unreifen DCs haben im Vergleich zu den unreifen FDCP-Mix abgeleiteten DCs am Tag der Infektion bereits einen reiferen Phänotypen (Andrews et al., 2001), worauf zurückgeführt werden kann, dass der Expressionsverlauf der Oberflächenmoleküle mehr dem unserer reifen DCs entsprach. Für die Infektion unreifer DCs mit HSV-1 konnte für keinen der Marker zu keinem Zeitpunkt eine erhöhte Oberflächenexpression gemessen werden, jedoch konnte bereits 12 Stunden nach Infektion eine Reduktion der Oberflächenmoleküle CD40 und CD80, nicht aber der MHC-Moleküle, beobachtet werden (Mikloska et al., 2001). Die hier präsentierten Daten zeigten eine MCMV-induzierte Reduktion der MHC-Klasse-II, CD80, CD86 und CD40 Oberflächenmoleküle auf den wichtigsten APCs des Immunsystems. Auf Makrophagen, wie DCs wichtige APCs des Immunsystems, wurde ebenfalls eine MCMV-induzierte Reduktion von MHC-Klasse-II Molekülen beobachtet (Redpath et al., 1999). Im Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnissen für DCs hatte die Infektion von Makrophagen mit MCMV jedoch keinen Effekt auf die Expression von CD86 (Redpath et al., 1999). DCs akkumulieren MHC-Klasse-II und CD86 Moleküle selektiv in spezialisierten Vesikeln vor dem Transport zur Plasmamembran (Turley et al., 2000). Die beobachtete Reduktion der beiden Moleküle könnte dementsprechend auf eine MCMV-inhibierte Freisetzung der Moleküle aus den Vesikeln und/oder auf eine verstärkte Internalisierung der Moleküle zurückgehen. Für HCMV wurde ein Protein (US2) identifiziert, das mit Proteinen des MHC-Klasse-II-Antigen-Präsentation-Weges interferiert, und dadurch die Expression von MHC-Klasse-II Molekülen an der Oberfläche reduziert (Tomazin et al., 1999). Durch die Reduktion von MHC-Klasse-II-Antigen-Komplexen auf der Zelloberfläche kann HCMV die

Präsentation von Antigenen an CD4⁺ T-Zellen beeinträchtigen und eine antivirale Immunantwort schwächen. Ein anderer Vorteil der virus-induzierten Reduktion der MHC-Klasse-II Moleküle könnte die verlängerte Lebensdauer der CMV-infizierten Zellen sein, da MHC-Klasse-II-vermittelte Signale zum Tode reifer DCs führen können (Bertho et al., 2000). Die Reduktion des ko-stimulatorischen Moleküls CD80 auf unreifen bzw. reifen DCs ist für MCMV in zweierlei Hinsicht vorteilhaft. Während die reduzierte Expression von MHC-Klasse-I Molekülen auf der Oberfläche von Zellen eine NK-Zell-vermittelte Lyse potentiell begünstigt (Karre und Welsh, 1997), hat die Reduktion von CD80 einen gegenteiligen Effekt. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen ohne CD80 der Erkennung und Lyse von NK-Zellen entgehen können (Chambers et al., 1996). Des Weiteren kann die fehlende Ko-stimulation der T-Zellen über CD28 - aufgrund der reduzierten CD80 und CD86 Expression - in einer T-Zell-Anergie resultieren (Powell et al., 1998) und begünstigt somit die Persistenz des Virus im Wirt.

Die Bindung des T-Zell-Moleküls CD40-Ligand (CD40L) an CD40 auf DCs bewirkt eine terminale Differenzierung der DCs (Servet-Delprat et al., 2000). Die Interaktion induziert sowohl die Expression der MHC-Klasse-I, Klasse-II und ko-stimulatorischen Moleküle auf DCs als auch die Produktion von Zytokinen (IL-12, TNF- α , IL-8), die für die volle Aktivierung, Differenzierung und Zytokinproduktion von naiven CD4⁺ T-Zellen notwendig sind (Cella et al., 1996; Schlienger et al., 2000). Die hier beschriebene Reduktion von CD40 auf infizierten DCs kann somit mit der terminalen Differenzierung der DCs interferieren und Auswirkungen auf die CD4⁺ T-Zell-Antwort haben. Eine eingeschränkte CD40-CD40L Interaktion hat außerdem negative Auswirkungen auf die Ausbildung einer CD8⁺ CTL-Antwort (Bennett et al., 1998; Schoenberger et al., 1998), da erst die Interaktion der DCs mit CD4⁺ T-Zellen diese in die Lage versetzt, CTLs direkt primen und vollständig aktivieren zu können.

V.3.3 IMMUNSUPPRESSION DURCH FUNKTIONELLE BEEINTRÄCHTIGUNG VON DCs DURCH MCMV

V.3.3.A Unterschiede in der Stimulationsfähigkeit autologer und allogener T-Zellen durch MCMV-infizierte DCs

Die beobachteten Effekte der MCMV-Infektion auf die Expression der Oberflächenmoleküle auf DCs legten die Vermutung nahe, dass die aktivierte infizierte DCs zu einem frühen Zeitpunkt nach der Infektion T-Zellen effizient stimulieren und zur Proliferation anregen

können, zu einem späteren Zeitpunkt jedoch dazu nicht mehr in der Lage sind. In der autologen Situation konnte in der Tat beobachtet werden, dass die Fähigkeit der MCMV-infizierten DCs, T-Zellen zu stimulieren, abhängig von der Expressionsstärke der MHC- und ko-stimulatorischen Moleküle auf deren Oberfläche war. In der autologen MLR stimulierten infizierte DCs naive autologe T-Zellen einen Tag nach Infektion effizient. Dies bedeutete, dass die akute CMV-Infektion, obwohl CMV eine Reihe von immunevasiven Strategien entwickelt hat, erst einmal antivirale Mechanismen initiiert und der Kontrolle durch das Immunsystem unterworfen ist. Die Entwicklung einer antiviralen CD8⁺ T-Zellantwort ist der Hauptmechanismus, um eine CMV-Infektion in Schach zu halten (Koszinowski et al., 1990; Reusser et al., 1991). Für die Entwicklung antiviraler zytotoxischer T-Zellen sind APCs wie DCs essentiell (Sigal et al., 1999). Sie präsentieren den CD8⁺ T-Zellen MHC-Klasse-I-Antigen-Komplexe und sorgen für deren volle Aktivierung als CTLs (Ridge et al., 1998). CMV-infizierte DCs können auf diese Weise schnell und effizient eine antivirale CMV-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort zur Kontrolle der Infektion induzieren.

Im Gegensatz zur autologen MLR, waren MCMV-infizierte DCs 24 Stunden nach Infektion nicht fähig, die Proliferation allogener T-Zellen zu stimulieren. Während die autologe MLR ein Modell für das Priming naiver T-Zellen gegen ein fremdes Antigen ist, dient die allogene MLR zur Analyse der T-Zellantwort gegen nicht-eigene MHC-Moleküle, was der Situation nach allogenen Transplantationen entspricht. In beiden Fällen ist die Präsenz und Interaktion der MHC-Moleküle und ko-stimulatorischen Moleküle für die Stimulation der T-Zell-Proliferation erforderlich. Es wurde gezeigt, dass DCs allogene T-Zellen stimulieren, indem sie MHC-Klasse-II Moleküle auf allogene DCs übertragen, die dann syngene T-Zellen aktivieren (Bedford et al., 1999). Da die Anwesenheit von syngenen DCs in unseren T-Zell-Präparationen nicht ausgeschlossen werden kann, ist es möglich, dass CMV DCs derartig verändert, dass sie nicht mehr fähig sind, MHC-Klasse-II Moleküle auf andere DCs zu übertragen, wie für HIV-1 vorgeschlagen wurde (Knight, 2001), sodass die Stimulation von T-Zellen aus diesem Grund in der allogenen MLR inhibiert ist.

Die unterschiedlichen Resultate der beiden MLRs früh nach Infektion können auch auf einer CMV-induzierten Veränderung der Zytokinexpression der DCs beruhen. Eine durch CMV beeinträchtigte Sekretion von IL-2 und IL-12 durch DCs, wie sie für MCMV (Andrews et al., 2001) und HCMV (Moutaftsi et al., 2002) beschrieben wurde, kann für eine reduzierte Aktivierung allogener T-Zellen, trotz verstärkter Expression von MHC und ko-stimulatorischen Molekülen, verantwortlich sein. Reife DCs exprimieren IL-2 und IL-12

(Granucci et al., 2001), welche früh in der allogenen MLR, nicht aber in der autologen sekretiert werden (Moudgil et al., 1997), sodass eine durch CMV-inhibierte Sekretion der beiden Zytokine eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der allogenen T-Zellen spielen kann. Für das Hepatitis C Virus (HCV) wurden ähnliche Beobachtungen gemacht. DCs aus HCMV-infizierten Individuen zeigten beeinträchtigte allostimulatorische Fähigkeiten, einhergehend mit einer reduzierten IL-2 und IL-12 Sekretion der infizierten DCs (Kanto et al., 1999). Mehrere Studien haben einen Defekt in der IL-2 Produktion bei mononukleären Blutzellen und Milzzellen nach CMV-Infektionen beschrieben und ihn mit der Entwicklung einer T-Zell-Anergie in Verbindung gebracht (Blackett und Mims, 1988; Kapasi und Rice, 1988). Tatsächlich kann eine IL-2 Therapie eine beeinträchtigte T-Zell-Antwort teilweise aufheben (Kapasi und Rice, 1988) und verstärkt *in vivo* den antiviralen Effekt CD8⁺ zytotoxischer T-Zellen (Reddehase et al., 1987).

Ob jedoch bereits die Aktivierung der allogenen T-Zellen oder erst die Proliferation der T-Zellen in Anwesenheit von CMV-infizierten DCs inhibiert ist, wie es für HCMV vorgeschlagen wurde (Raftery et al., 2001), ist nicht weiter bekannt. Raftery et al. zeigten, dass CMV-infizierte DCs immer noch fähig waren, allogene T-Zellen zu aktivieren, aber die Interaktion der infizierten DCs mit den T-Zellen deren Apoptose induzierte. Die hier gezeigten Resultate der MLRs tragen zu einer Erklärung für die Unterschiede im Wiederaufbau einer anti-CMV-Immunantwort nach einer autologen bzw. allogenen Knochenmarktransplantation bei (Mendes et al., 2002; Rubin, 1999). Die Unfähigkeit CMV-infizierter DCs, allogene naive T-Zellen zu primen, kann zu einer reduzierten antiviralen Kontrolle und zu dem erhöhten Risiko einer auftretenden CMV-Pathogenese bei Histoinkompatibilität zwischen Spender und Empfänger beitragen.

V.3.3.B Phänotypische und funktionelle Beeinflussung umliegender DCs durch MCMV-infizierte DCs

CMV hat eine breite Vielfalt an Immunevasionsmechanismen entwickelt, um in einem immunkompetenten Wirt replizieren und persistieren zu können. Einmal mehr wurde bestätigt, dass das Virus in der Lage ist, die Funktion der Zellen zu verändern, die für die adaptive Immunantwort eine kritische Rolle spielen. Die reduzierte Expression der MHC und ko-stimulatorischen Moleküle auf CMV-infizierten reifen DCs wirkt sich negativ auf die Aktivierung naiver T-Zellen aus und verhindert auch das Primen naiver CD4⁺ T-Helfer-Zellen und CD8⁺ Gedächtniszellen. Neben der CMV-induzierten selektiven Reduktion der

Expression der MHC und ko-stimulatorischen Moleküle auf infizierten DCs, die direkt von viralen Proteinen induziert zu werden scheint, ist auch die Expression der MHC und ko-stimulatorischen Moleküle auf nicht-infizierten DCs in infizierten Kulturen reduziert, wenn auch viel schwächer. Dies weist darauf hin, dass die Expression der Oberflächenmoleküle zusätzlich durch lösliche Faktoren beeinflusst wurde, ähnlich der beschriebenen MHC-Klasse-II-Reduktion auf Makrophagen durch die MCMV-induzierte IL-10 Sekretion (Redpath et al., 1999) oder der CMV-induzierten Modulation der Expression von CD83 durch TGF- β infizierter Zellen (Arrode et al., 2002). Zytokin-vermittelte Mechanismen scheinen demnach auch nicht-infizierte DCs in der Expression von Oberflächenmolekülen zu beeinflussen und zusätzlich zur Beeinträchtigung der T-Zell-Antwort beizutragen.

DCs, die mit UV-inaktiviertem MCMV infiziert wurden, zeigten eine ähnliche Stimulation der T-Zell-Proliferation wie DCs aus nicht-infizierten Kulturen und unterschieden sich somit von der T-Zell-Antwort, die durch DCs, die mit replikations-kompetentem MCMV infiziert waren, induziert wurde. Dies bedeutet, dass virale Genexpression eine Voraussetzung für eine reduzierte T-Zell-Stimulation durch infizierte DCs ist und die Interaktion des Virus mit dem zellulären Rezeptor alleine nicht ausreicht, um die Funktion der DCs zu beeinflussen. Ein Effekt der UV-inaktivierten Viren auf die Zellen hätte vermutet werden können, da für die Bindung des HCMV-Virions an seinen zellulären Rezeptor via das Glykoprotein B beschrieben worden war, dass diese Interaktion eine Veränderung der Expression zellulärer Gene induziert und im besonderen Interferon-induzierbare Gene davon betroffen sind (Boyle et al., 1999; Simmen et al., 2001).

V.3.4 KONTROLLE DER CMV-INFektION TROTZ VIRALER IMMUNEVASIONSSTRATEGIEN

Trotz einer breiten Vielfalt an entwickelten Immunevasionsstrategien, ist ein immunkompetenter Wirt in der Lage, eine CMV-Infektion zu kontrollieren und eine CMV-spezifische T-Zell-Antwort zu etablieren. Dies kann zum einen darauf beruhen, dass virale Proteine von APCs präsentiert werden können, bevor die viralen immunmodulatorischen Genprodukte darauf Einfluss nehmen können. Zum anderen sind die Viren nicht in der Lage die Expression sämtlicher MHC und ko-stimulatorischen Moleküle auf den Zellen zu unterbinden, sodass die Immunantwort zwar abgeschwächt und verzögert, nicht aber vollständig inhibiert werden kann. Eine weitere Möglichkeit, wie das Immunsystem die Inhibitionsversuche von CMV umgeht, kann die Cross-Präsentation von CMV-Antigenen sein (Tabi et al., 2001). Dabei nehmen nicht-infizierte unreife DCs CMV-Antigene von infizierten

apoptotischen, nekrotischen oder auch lebenden Zellen (Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen oder DCs) auf, reifen und präsentieren CMV-Antigene den CD8⁺ CTLs (Harshyne et al., 2001; Rovere et al., 1998). Erst kürzlich wurde eine weitere Erklärungsmöglichkeit für dieses Phänomen beschrieben. Es wurde ein virales *early* (E)-Peptid identifiziert, das während der frühen und späten Phase der viralen Genexpression auf derselben Zelle präsentiert wird, in der die Präsentation des antigenen IE1-Peptides durch Immunevasionsmechanismen behindert ist. Dieses E-Peptid entkommt offensichtlich den Immunevasionsproteinen und ermöglicht die Erkennung der infizierten Zellen durch CTLs (Holtappels et al., 2002).

Die Identifizierung und Charakterisierung der viralen Gene, die für die Reduktion der MHC- und ko-stimulatorischen Moleküle verantwortlich sind, würde erheblich zu einem besseren Verständnis der Interferenz des Virus mit der Antigen-Präsentation beitragen. Kenntnisse über Mechanismen sind besonders für die Entwicklung einer CMV-Vakzine und der Unterbindung der CMV-induzierten Immunsuppression von großer Bedeutung.

VI LITERATURVERZEICHNIS

Abbas, A.K., Murphy, K.M., and Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793.

Adler, H., Messerle, M., Wagner, M., and Koszinowski, U.H. (2000). Cloning and mutagenesis of the murine gammaherpesvirus 68 genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *J. Virol.* 74, 6964-6974.

Ahn, K., Angulo, A., Ghazal, P., Peterson, P.A., Yang, Y., and Fruh, K. (1996). Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10990-10995.

Albert, M.L., Sauter, B., and Bhardwaj, N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I- restricted CTLs. *Nature* 392, 86-89.

Alcami, A. and Koszinowski, U.H. (2000). Viral mechanisms of immune evasion. *Immunol. Today* 21, 447-455.

Andrews, D.M., Andoniou, C.E., Granucci, F., Ricciardi-Castagnoli, P., and Degli-Esposti, M.A. (2001). Infection of dendritic cells by murine cytomegalovirus induces functional paralysis. *Nat. Immunol.* 2, 1077-1084.

Angulo, A., Messerle, M., Koszinowski, U.H., and Ghazal, P. (1998). Enhancer requirement for murine cytomegalovirus growth and genetic complementation by the human cytomegalovirus enhancer. *J. Virol.* 72, 8502-8509.

Ardavin, C., Wu, L., Li, C.L., and Shortman, K. (1993). Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* 362, 761-763.

Arrode, G., Boccaccio, C., Abastado, J.P., and Davrinche, C. (2002). Cross-presentation of human cytomegalovirus pp65 (UL83) to CD8+ T cells is regulated by virus-induced, soluble-mediator-dependent maturation of dendritic cells. *J. Virol.* 76, 142-150.

Austyn, J.M., Kupiec-Weglinski, J.W., Hankins, D.F., and Morris, P.J. (1988). Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Homing to T cell- dependent areas of spleen, and binding within marginal zone. *J. Exp. Med.* 167, 646-651.

Bale, J.F. Jr, Blackman, J.A., and Sato, Y. (1990). Outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J. Child Neurol.* 5, 131-136.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 767-811.

- Banchereau, J. and Steinman, R.M. (1998).** Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Bates, E.E., Ravel, O., Dieu, M.C., Ho, S., Guret, C., Bridon, J.M., Ait-Yahia, S., Briere, F., Caux, C., Banchereau, J., and Lebecque, S. (1997).** Identification and analysis of a novel member of the ubiquitin family expressed in dendritic cells and mature B cells. *Eur. J. Immunol.* 27, 2471-2477.
- Bedford, P., Garner, K., and Knight, S.C. (1999).** MHC class II molecules transferred between allogeneic dendritic cells stimulate primary mixed leukocyte reactions. *Int. Immunol.* 11, 1739-1744.
- Bell, D., Young, J.W., and Banchereau, J. (1999).** Dendritic cells. *Adv. Immunol.* 72, 255-324.
- Bennett, S.R., Carbone, F.R., Karamalis, F., Flavell, R.A., Miller, J.F., and Heath, W.R. (1998).** Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393, 478-480.
- Bertho, N., Drenou, B., Laupeze, B., Berre, C.L., Amiot, L., Grosset, J.M., Fardel, O., Charron, D., Mooney, N., and Fauchet, R. (2000).** HLA-DR-mediated apoptosis susceptibility discriminates differentiation stages of dendritic/monocytic APC. *J. Immunol.* 164, 2379-2385.
- Bett, A.J., Prevec, L., and Graham, F.L. (1993).** Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J. Virol.* 67, 5911-5921.
- Bevan, M.J. (1976).** Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J. Immunol.* 117, 2233-2238.
- Billstrom, M.A., Johnson, G.L., Avdi, N.J., and Worthen, G.S. (1998).** Intracellular signaling by the chemokine receptor US28 during human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* 72, 5535-5544.
- Biron, C.A. (1997).** Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 24-34.
- Blackett, S. and Mims, C.A. (1988).** Studies of depressed interleukin-2 production by spleen cells from mice following infection with cytomegalovirus. *Arch. Virol.* 99, 1-8.
- Bloss, T.A., and Sugden, B. (1994).** Optimal lengths for DNAs encapsidated by Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 68, 8217-8222.
- Bodaghi, B., Jones, T.R., Zipeto, D., Vita, C., Sun, L., Laurent, L., Arenzana, S.F., Virelizier, J.L., and Michelson, S. (1998).** Chemokine sequestration by viral chemoreceptors as a novel viral escape strategy: withdrawal of chemokines from the environment of cytomegalovirus-infected cells. *J. Exp. Med.* 188, 855-866.

- Bogner, E., Radsak, K., and Stinski, M.F. (1998).** The gene product of human cytomegalovirus open reading frame UL56 binds the pac motif and has specific nuclease activity. *J. Virol.* *72*, 2259-2264.
- Bolger, G., Lapeyre, N., Rheaume, M., Kibler, P., Bousquet, C., Garneau, M., and Cordingley, M. (1999).** Acute murine cytomegalovirus infection: a model for determining antiviral activity against CMV induced hepatitis. *Antiviral Res.* *44*, 155-165.
- Bolovan-Fritts, C.A., Mocarski, E.S., and Wiedeman, J.A. (1999).** Peripheral blood CD14(+) cells from healthy subjects carry a circular conformation of latent cytomegalovirus genome. *Blood* *93*, 394-398.
- Booy, F.P., Trus, B.L., Newcomb, W.W., Brown, J.C., Conway, J.F., and Steven, A.C. (1994).** Finding a needle in a haystack: detection of a small protein (the 12-kDa VP26) in a large complex (the 200-MDa capsid of herpes simplex virus). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *91*, 5652-5656.
- Boppana, S.B., Pass, R.F., Britt, W.J., Stagno, S., and Alford, C.A. (1992).** Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatr. Infect. Dis. J.* *11*, 93-99.
- Boppana, S.B., Fowler, K.B., Britt, W.J., Stagno, S., and Pass, R.F. (1999).** Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus. *Pediatrics* *104*, 55-60.
- Borst, E.M., Mathys, S., Wagner, M., Muranyi, W., and Messerle, M. (2001).** Genetic evidence of an essential role for cytomegalovirus small capsid protein in viral growth. *J. Virol.* *75*, 1450-1458.
- Bower, M., Barton, S.E., Nelson, M.R., Bobby, J., Smith, D., Youle, M., and Gazzard, B.G. (1990).** The significance of the detection of cytomegalovirus in the bronchoalveolar lavage fluid in AIDS patients with pneumonia. *AIDS* *4*, 317-320.
- Boyle, K.A., Pietropaolo, R.L., and Compton, T. (1999).** Engagement of the cellular receptor for glycoprotein B of human cytomegalovirus activates the interferon-responsive pathway. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 3607-3613.
- Britt, W.J., and Mach, M. (1996).** Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology* *39*, 401-412.
- Brody, A.R. and Craighead, J.E. (1974).** Pathogenesis of pulmonary cytomegalovirus infection in immunosuppressed mice. *J. Infect. Dis.* *129*, 677-689.
- Bruggeman, C.A. (1993).** Cytomegalovirus and latency: an overview. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* *64*, 325-333.

- Buhler, B., Keil, G.M., Weiland, F., and Koszinowski, U.H. (1990).** Characterization of the murine cytomegalovirus early transcription unit e1 that is induced by immediate-early proteins. *J. Virol.* *64*, 1907-1919.
- Bukowski, J.F., Woda, B.A., and Welsh, R.M. (1984).** Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell- depleted mice. *J. Virol.* *52*, 119-128.
- Butcher, S.J., Aitken, J., Mitchell, J., Gowen, B., and Dargan, D.J. (1998).** Structure of the human cytomegalovirus B capsid by electron cryomicroscopy and image reconstruction. *J. Struct. Biol.* *124*, 70-76.
- Cameron, P.U., Freudenthal, P.S., Barker, J.M., Gezelter, S., Inaba, K., and Steinman, R.M. (1992).** Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4+ T cells. *Science* *257*, 383-387.
- Carbone, E., Ruggiero, G., Terrazzano, G., Palomba, C., Manzo, C., Fontana, S., Spits, H., Karre, K., and Zappacosta, S. (1997).** A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction. *J. Exp. Med.* *185*, 2053-2060.
- Castellino, F., Zhong, G., and Germain, R.N. (1997).** Antigen presentation by MHC class II molecules: invariant chain function, protein trafficking, and the molecular basis of diverse determinant capture. *Hum. Immunol.* *54*, 159-169.
- Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I., and Banchereau, J. (1994).** Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J. Exp. Med.* *180*, 1263-1272.
- Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Dezutter-Dambuyant, C., Saint-Vis, B., Jacquet, C., Yoneda, K., Imamura, S., Schmitt, D., and Banchereau, J. (1996).** CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J. Exp. Med.* *184*, 695-706.
- Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Durand, I., Cella, M., Lanzavecchia, A., and Banchereau, J. (1997).** CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* *90*, 1458-1470.
- Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A., and Alber, G. (1996).** Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* *184*, 747-752.
- Cella, M., Salio, M., Sakakibara, Y., Langen, H., Julkunen, I., and Lanzavecchia, A. (1999).** Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J. Exp. Med.* *189*, 821-829.

- Cha, T.A., Tom, E., Kemble, G.W., Duke, G.M., Mocarski, E.S., and Spaete, R.R. (1996).** Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J. Virol.* *70*, 78-83.
- Chambers, B.J., Salcedo, M., and Ljunggren, H.G. (1996).** Triggering of natural killer cells by the costimulatory molecule CD80 (B7-1). *Immunity* *5*, 311-317.
- Chee, M.S., Bankier, A.T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C.M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison, C.A., Kouzarides, T., Martignetti, J.A., Preddie, E., Satchwell, S.C., Tomlinson, P., Weston, K.M., and Barrell, B.G. (1990).** Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *154*, 125-169.
- Chen, D.H., Jiang, H., Lee, M., Liu, F., and Zhou, Z.H. (1999).** Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. *Virology* *260*, 10-16.
- Chen, D.H., Jakanam J., McNabm D., Mitchell, J., Zhou, Z.H., Dougherty, M., Chiu, W., and Rixon, F.J. (2001).** The pattern of tegument-capsid interaction in the herpes simplex virus type 1 virion is not influenced by the small hexon-associated protein VP26. *J. Virol.* *75*, 11863-11867.
- Cheung, T.W., and Teich, S.A. (1999).** Cytomegalovirus infection in patients with HIV infection. *Mt. Sinai J. Med.* *66*, 113-124.
- Chi, J.H. and Wilson, D.W. (2000).** ATP-Dependent localization of the herpes simplex virus capsid protein VP26 to sites of procapsid maturation. *J. Virol.* *74*, 1468-1476.
- Chong, K.T., and Mims, C.A. (1981).** Murine cytomegalovirus particle types in relation to sources of virus and pathogenicity. *J. Gen. Virol.* *57*, 415-419.
- Cohen, J.I., and Corey, G.R. (1985).** Cytomegalovirus infection in the normal host. *Medicine* *64*, 100-114.
- Compton, C.C., Kupper, T.S., and Nadire, K.B. (1996).** HIV-infected Langerhans cells constitute a significant proportion of the epidermal Langerhans cell population throughout the course of HIV disease. *J. Invest. Dermatol.* *107*, 822-826.
- Compton, T. (1993).** An immortalized human fibroblast cell line is permissive for human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* *67*, 3644-3648.
- Cresswell, P. (1996).** Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* *84*, 505-507.
- Crnkovic, M.I., Messerle, M., Milotic, I., Szepan, U., Kucic, N., Krmpotic, A., Jonjic, S., and Koszinowski, U.H. (1998).** Virus attenuation after deletion of the cytomegalovirus Fc receptor gene is not due to antibody control. *J. Virol.* *72*, 1377-1382.

- Davis-Poynter, N.J., Lynch, D.M., Vally, H., Shellam, G.R., Rawlinson, W.D., Barrell, B.G., and Farrell, H.E. (1997).** Identification and characterization of a G protein-coupled receptor homolog encoded by murine cytomegalovirus. *J. Virol.* *71*, 1521-1529.
- De Smedt, T., Pajak, B., Muraille, E., Lespagnard, L., Heinen, E., De Baetselier, P., Urbain, J., Leo, O., and Moser, M. (1996).** Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J. Exp. Med.* *184*, 1413-1424.
- Desai, P., Watkins, S.C., and Person, S. (1994).** The size and symmetry of B capsids of herpes simplex virus type 1 are determined by the gene products of the UL26 open reading frame. *J. Virol.* *68*, 5365-5374.
- Desai, P., DeLuca, N.A., and Person, S. (1998).** Herpes simplex virus type 1 VP26 is not essential for replication in cell culture but influences production of infectious virus in the nervous system of infected mice. *Virology* *247*, 115-124.
- Desai, P. and Person, S. (1998).** Incorporation of the green fluorescent protein into the herpes simplex virus type 1 capsid. *J. Virol.* *72*, 7563-7568.
- Drillien, R., Spehner, D., Bohbot, A., and Hanau, D. (2000).** Vaccinia virus-related events and phenotypic changes after infection of dendritic cells derived from human monocytes. *Virology* *268*, 471-481.
- Egger, D., Geuenich, S., Denzlinger, C., Schmitt, E., Mailhammer, R., Ehrenreich, H., Dormer, P., and Hultner, L. (1995).** IL-4 renders mast cells functionally responsive to endothelin-1. *J. Immunol.* *154*, 1830-1837.
- Engelmayer, J., Larsson, M., Subklewe, M., Chahroudi, A., Cox, W.I., Steinman, R.M., and Bhardwaj, N. (1999).** Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion. *J. Immunol.* *163*, 6762-6768.
- Engering, A.J., Cella, M., Fluitsma, D.M., Hoefsmit, E.C., Lanzavecchia, A., and Pieters, J. (1997).** Mannose receptor mediated antigen uptake and presentation in human dendritic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* *417*, 183-187.
- Enright, H., Haake, R., Weisdorf, D., Ramsay, N., McGlave, P., Kersey, J., Thomas, W., McKenzie, D., and Miller, W. (1993).** Cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation. Risk factors and response to therapy. *Transplantation* *55*, 1339-1346.
- Farrell, H.E., Degli, E.M., and Davis, P.N. (1999).** Cytomegalovirus evasion of natural killer cell responses. *Immunol. Rev.* *168*, 187-197.
- Fearon, D.T. and Locksley, R.M. (1996).** The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* *272*, 50-53.

- Fernandez, J.A., Zavala, F., and Tsuji, M. (1999).** Phenotypic and functional characterization of CD8(+) T cell clones specific for a mouse cytomegalovirus epitope. *Virology* 255, 40-49.
- Flano, E., Husain, S.M., Sample, J.T., Woodland, D.L., and Blackman, M.A. (2000).** Latent murine gamma-herpesvirus infection is established in activated B cells, dendritic cells, and macrophages. *J. Immunol.* 165, 1074-1081.
- Fleming, P., Davis, P.N., Degli, E.M., Densley, E., Papadimitriou, J., Shellam, G., and Farrell, H. (1999).** The murine cytomegalovirus chemokine homolog, m131/129, is a determinant of viral pathogenicity. *J. Virol.* 73, 6800-6809.
- Ford, A.M., Healy, L.E., Bennett, C.A., Navarro, E., Spooncer, E., and Greaves, M.F. (1992).** Multilineage phenotypes of interleukin-3-dependent progenitor cells. *Blood* 79, 1962-1971.
- Fugier-Vivier, I., Servet-Delprat, C., Rivailler, P., Rissoan, M.C., Liu, Y.J., and Rabourdin-Combe, C. (1997).** Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. *J. Exp. Med.* 186, 813-823.
- Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., Figdor, C.G., and van Kooyk, Y. (2000).** DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100, 587-597.
- Geldhof, A.B., Moser, M., Lespagnard, L., Thielemans, K., and De Baetselier, P. (1998).** Interleukin-12-activated natural killer cells recognize B7 costimulatory molecules on tumor cells and autologous dendritic cells. *Blood* 91, 196-206.
- Gerna, G., Baldanti, F., Middeldorp, J.M., Furione, M., Zavattoni, M., Lilleri, D., and Revello, M.G. (1999).** Clinical significance of expression of human cytomegalovirus pp67 late transcript in heart, lung, and bone marrow transplant recipients as determined by nucleic acid sequence-based amplification. *J. Clin. Microbiol.* 37, 902-911.
- Gibson, W. (1996).** Structure and assembly of the virion. *Intervirology* 39, 389-400.
- Gibson, W., Clopper, K.S., Britt, W.J., and Baxter, M.K. (1996).** Human cytomegalovirus (HCMV) smallest capsid protein identified as product of short open reading frame located between HCMV UL48 and UL49. *J. Virol.* 70, 5680-5683.
- Gilbert, M.J., Riddell, S.R., Plachter, B., and Greenberg, P.D. (1996).** Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature* 383, 720-722.
- Gompels, U.A., Nicholas, J., Lawrence, G., Jones, M., Thomson, B.J., Martin, M.E., Efstathiou, S., Craxton, M., and Macaulay, H.A. (1995).** The DNA sequence of

human herpesvirus-6: structure, coding content, and genome evolution. *Virology* **209**, 29-51.

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

Goodbourn, S., Didcock, L., and Randall, R.E. (2000). Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* **81**, 2341-2364.

Grandvaux, N., tenOever, B.R., Servant, M.J., and Hiscott, J. (2002). The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **15**, 259-267.

Granelli-Piperno, A., Finkel, V., Delgado, E., and Steinman, R.M. (1999). Virus replication begins in dendritic cells during the transmission of HIV-1 from mature dendritic cells to T cells. *Curr. Biol.* **9**, 21-29.

Granucci, F., Vizzardielli, C., Pavelka, N., Feau, S., Persico, M., Virzi, E., Rescigno, M., Moro, G., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat. Immunol.* **2**, 882-888.

Grouard, G., Rissoan, M.C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., and Liu, Y.J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J. Exp. Med.* **185**, 1101-1111.

Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 621-667.

Gunn, M.D., Tangemann, K., Tam, C., Cyster, J.G., Rosen, S.D., and Williams, L.T. (1998). A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 258-263.

Hagenaars, C.E., Kawilarang-de Haas, E.W., van der Kraan, A.A., Spooncer, E., Dexter, T.M., and Nijweide, P.J. (1991). Interleukin-3-dependent hematopoietic stem cell lines capable of osteoclast formation in vitro. *J. Bone Miner. Res.* **6**, 947-954.

Hahn, G., Jores, R., and Mocarski, E.S. (1998). Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3937-3942.

Hanshaw, J.B. and Dudgeon, J.A. (1978). Congenital cytomegalovirus. *Major. Probl. Clin. Pediatr.* **17**, 97-152.

Harshyne, L.A., Watkins, S.C., Gambotto, A., and Barratt-Boyces, S.M. (2001). Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J. Immunol.* **166**, 3717-3723.

- Hart, D.N. (1997).** Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* *90*, 3245-3287.
- Hartmann, G., Weiner, G.J., and Krieg, A.M. (1999).** CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *96*, 9305-9310.
- Hayajneh, W.A., Colberg-Poley, A.M., Skaletskaya, A., Bartle, L.M., Lesperance, M.M., Contopoulos-Ioannidis, D.G., Kedersha, N.L., and Goldmacher, V.S. (2001).** The sequence and antiapoptotic functional domains of the human cytomegalovirus UL37 exon 1 immediate early protein are conserved in multiple primary strains. *Virology* *279*, 233-240.
- Heise, M.T., Connick, M., and Virgin, H.W. (1998a).** Murine cytomegalovirus inhibits interferon gamma-induced antigen presentation to CD4 T cells by macrophages via regulation of expression of major histocompatibility complex class II-associated genes. *J. Exp. Med.* *187*, 1037-1046.
- Heise, M.T., Pollock, J.L., O'Guin, A., Barkon, M.L., Bormley, S., and Virgin, H.W. (1998b).** Murine cytomegalovirus infection inhibits IFN gamma-induced MHC class II expression on macrophages: the role of type I interferon. *Virology* *241*, 331-344.
- Hengel, H., Lucin, P., Jonjic, S., Ruppert, T., and Koszinowski, U.H. (1994).** Restoration of cytomegalovirus antigen presentation by gamma interferon combats viral escape. *J. Virol.* *68*, 289-297.
- Hengel, H., Esslinger, C., Pool, J., Goulmy, E., and Koszinowski, U.H. (1995).** Cytokines restore MHC class I complex formation and control antigen presentation in human cytomegalovirus-infected cells. *J. Gen. Virol.* *76 (Pt 12)*, 2987-2997.
- Hengel, H., Koopmann, J.O., Flohr, T., Muranyi, W., Goulmy, E., Hammerling, G.J., Koszinowski, U.H., and Momburg, F. (1997).** A viral ER-resident glycoprotein inactivates the MHC-encoded peptide transporter. *Immunity* *6*, 623-632.
- Hengel, H., Brune, W., and Koszinowski, U.H. (1998).** Immune evasion by cytomegalovirus--survival strategies of a highly adapted opportunist. *Trends Microbiol.* *6*, 190-197.
- Hengel, H., Reusch, U., Gutermann, A., Ziegler, H., Jonjic, S., Lucin, P., and Koszinowski, U.H. (1999).** Cytomegaloviral control of MHC class I function in the mouse. *Immunol Rev* *168*, 167-176.
- Hengel, H., Reusch, U., Geginat, G., Holtappels, R., Ruppert, T., Hellebrand, E., and Koszinowski, U.H. (2000).** Macrophages escape inhibition of major histocompatibility complex class I-dependent antigen presentation by cytomegalovirus. *J. Virol.* *74*, 7861-7868.

- Henri, S., Vremec, D., Kamath, A., Waithman, J., Williams, S., Benoist, C., Burnham, K., Saeland, S., Handman, E., and Shortman, K. (2001).** The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J. Immunol.* *167*, 741-748.
- Heyworth, C.M., Dexter, T.M., Kan, O., and Whetton, A.D. (1990).** The role of hemopoietic growth factors in self-renewal and differentiation of IL-3-dependent multipotential stem cells. *Growth Factors* *2*, 197-211.
- Heyworth, C.M., Alauldin, M., Cross, M.A., Fairbairn, L.J., Dexter, T.M., and Whetton, A.D. (1995).** Erythroid development of the FDCP-Mix A4 multipotent cell line is governed by the relative concentrations of erythropoietin and interleukin 3. *Br. J. Haematol.* *91*, 15-22.
- Ho, M. (1990).** Epidemiology of cytomegalovirus infection. *Rev. Infect. Dis.* *12*, S.701-S710.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., and Ezekowitz, R.A. (1999).** Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* *284*, 1313-1318.
- Holtappels, R., Thomas, D., Podlech, J., Geginat, G., Steffens, H.P., and Reddehase, M.J. (2000).** The putative natural killer decoy early gene m04 (gp34) of murine cytomegalovirus encodes an antigenic peptide recognized by protective antiviral CD8 T cells. *J. Virol.* *74*, 1871-1884.
- Holtappels, R., Grzimek, N.K., Simon, C.O., Thomas, D., Dreis, D., and Reddehase, M.J. (2002).** Processing and presentation of murine cytomegalovirus pORFm164-derived peptide in fibroblasts in the face of all viral immunosubversive early gene functions. *J. Virol.* *76*, 6044-6053.
- Hu, J., Pope, M., Brown, C., O'Doherty, U., and Miller, C.J. (1998).** Immunophenotypic characterization of simian immunodeficiency virus- infected dendritic cells in cervix, vagina, and draining lymph nodes of rhesus monkeys. *Lab Invest* *78*, 435-451.
- Huang, A.Y., Golumbek, P., Ahmadzadeh, M., Jaffee, E., Pardoll, D., and Levitsky, H. (1994).** Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* *264*, 961-965.
- Hudson, J.B. (1979).** The murine cytomegalovirus as a model for the study of viral pathogenesis and persistent infections. *Arch. Virol.* *62*, 1-29.
- Hültner, L., Moeller, J., Schmitt, E., Jäger, G., Reisbach, G., Ring, J., and Dörmer, P. (1989).** Thiol-sensitive mast cell lines derived from mouse bone marrow respond to a mast cell growth-enhancing activity different from both IL-3 and IL-4. *J. Immunol.* *142*, 3440-3446.
- Ibanez, C.E., Schrier, R., Ghazal, P., Wiley, C., and Nelson, J.A. (1991).** Human cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages. *J. Virol.* *65*, 6581-6588.

- Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., and Steinman, R.M. (1992).** Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* *176*, 1693-1702.
- Inaba, K., Pack, M., Inaba, M., Sakuta, H., Isdell, F., and Steinman, R.M. (1997).** High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J. Exp. Med.* *186*, 665-672.
- Ingulli, E., Mondino, A., Khoruts, A., and Jenkins, M.K. (1997).** In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4(+) T cells. *J. Exp. Med.* *185*, 2133-2141.
- Irmiere A., and Gibson W. (1983).** Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology* *15*, 118-133.
- Ito, T., Inaba, M., Inaba, K., Toki, J., Sogo, S., Iguchi, T., Adachi, Y., Yamaguchi, K., Amakawa, R., Valladeau, J., Saeland, S., Fukuhara, S., and Ikehara, S. (1999).** A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. *J. Immunol.* *163*, 1409-1419.
- Jacobson, M.A., Drew, W.L., Feinberg, J., O'Donnell, J.J., Whitmore, P.V., Miner, R.D., and Parenti, D. (1991).** Foscarnet therapy for ganciclovir-resistant cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* *163*, 1348-1351.
- Jahn, G., Stenglein, S., Riegler, S., Einsele, H., and Sinzger, C. (1999).** Human cytomegalovirus infection of immature dendritic cells and macrophages. *Intervirology* *42*, 365-372.
- Jiang, W., Swiggard, W.J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R.M., and Nussenzweig, M.C. (1995).** The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* *375*, 151-155.
- Jones, T.R., Wiertz, E.J., Sun, L., Fish, K.N., Nelson, J.A., and Ploegh, H.L. (1996).** Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *93*, 11327-11333.
- Jones, T.R. and Sun, L. (1997).** Human cytomegalovirus US2 destabilizes major histocompatibility complex class I heavy chains. *J. Virol.* *71*, 2970-2979.
- Jonjic, S., Pavic, I., Polic, B., Crnkovic, I., Lucin, P., and Koszinowski, U.H. (1994).** Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J. Exp. Med.* *179*, 1713-1717.
- Jordan, M.C..** Murine models of cytomegalovirus latency. In Stevens, JG., et al., S. 805-810.

- Josien, R., Wong, B.R., Li, H.L., Steinman, R.M., and Choi, Y. (1999).** TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells. *J. Immunol.* *162*, 2562-2568.
- Just, U., Stocking, C., Spooncer, E., Dexter, T.M., and Ostertag, W. (1991).** Expression of the GM-CSF gene after retroviral transfer in hematopoietic stem cell lines induces synchronous granulocyte- macrophage differentiation. *Cell* *64*, 1163-1173.
- Kanto, T., Hayashi, N., Takehara, T., Tatsumi, T., Kuzushita, N., Ito, A., Sasaki, Y., Kasahara, A., and Hori, M. (1999).** Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *J. Immunol.* *162*, 5584-5591.
- Kapasi, K. and Rice, G.P. (1988).** Cytomegalovirus infection of peripheral blood mononuclear cells: effects on interleukin-1 and -2 production and responsiveness. *J. Virol.* *62*, 3603-3607.
- Karre, K. and Welsh, R.M. (1997).** Viral decoy vetoes killer cell. *Nature* *386*, 446-447.
- Kavanagh, D.G., Koszinowski, U.H., and Hill, A.B. (2001).** The murine cytomegalovirus immune evasion protein m4/gp34 forms biochemically distinct complexes with class I MHC at the cell surface and in a pre-Golgi compartment. *J. Immunol.* *167*, 3894-3902.
- Keay, S., Merigan, T.C., and Rasmussen, L. (1989).** Identification of cell surface receptors for the 86-kilodalton glycoprotein of human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *86*, 10100-10103.
- Keene, J.A. and Forman, J. (1982).** Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* *155*, 768-782.
- Keil, G.M., Ebeling, K.A., and Koszinowski, U.H. (1984).** Temporal regulation of murine cytomegalovirus transcription and mapping of viral RNA synthesized at immediate early times after infection. *J. Virol.* *50*, 784-795.
- Kelsey, D.K., Olsen, G.A., Overall, J.C., Jr., and Glasgow, L.A. (1977).** Alteration of host defense mechanisms by murine cytomegalovirus infection. *Infect. Immun.* *18*, 754-760.
- Kleijnen, M.F., Huppa, J.B., Lucin, P., Mukherjee, S., Farrell, H., Campbell, A.E., Koszinowski, U.H., Hill, A.B., and Ploegh, H.L. (1997).** A mouse cytomegalovirus glycoprotein, gp34, forms a complex with folded class I MHC molecules in the ER which is not retained but is transported to the cell surface. *EMBO J.* *16*, 685-694.
- Kempkes, B., Pich, D., Zeidler, R., Sugden, B., and Hammerschmidt, B. (1995).** Immortalization of human B lymphocytes by a plasmid containing 71 kilobase pairs of Epstein-Barr virus DNA. *J. Virol.* *69*, 231-238.

- Knight, S.C., Macatonia, S.E., and Patterson, S. (1993).** Infection of dendritic cells with HIV1: virus load regulates stimulation and suppression of T-cell activity. *Res. Virol.* *144*, 75-80.
- Knight, S.C., Elsley, W., and Wang, H. (1997).** Mechanisms of loss of functional dendritic cells in HIV-1 infection. *J. Leukoc. Biol.* *62*, 78-81.
- Knight, S.C. (2001).** Dendritic cells and HIV infection; immunity with viral transmission versus compromised cellular immunity? *Immunobiology* *204*, 614-621.
- Koffron, A., Varghese, T., Hummel, M., Yan, S., Kaufman, D., Frye,r J., Leventhal, J., Stuart, F., and Abecassis, M. (1999).** Immunosuppression is not required for reactivation of latent murine cytomegalovirus. *Transplant Proc.* *31*, 1395-1396.
- Kondo, K., Kaneshima, H., and Mocarski, E.S. (1994).** Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *91*, 11879-11883.
- Kondo, K., Xu, J., and Mocarski, E.S. (1996).** Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocyte-macrophage progenitors in culture and in seropositive individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *93*, 11137-11142.
- Koppelman, B., Neefjes, J.J., de Vries, J.E., and de Waal, M.R. (1997).** Interleukin-10 down-regulates MHC class II alphabeta peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling. *Immunity* *7*, 861-871.
- Koszinowski, U.H., Del Val, M., and Reddehase, M.J. (1990).** Cellular and molecular basis of the protective immune response to cytomegalovirus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 154189-154220.
- Kotenko, S.V., Saccani, S., Izotova, L.S., Mirochnitchenko, O.V., and Pestka, S. (2000).** Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *97*, 1695-1700.
- Kovacs-Bankowski, M. and Rock, K.L. (1995).** A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* *267*, 243-246.
- Kowalik, T.F., Wing, B., Haskill, J.S., Azizkhan, J.C., Baldwin, A.S., Jr., and Huang, E.S. (1993).** Multiple mechanisms are implicated in the regulation of NF-kappa B activity during human cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *90*, 1107-1111.
- Kruse, M., Rosorius, O., Kratzer, F., Stelz, G., Kuhnt, C., Schuler, G., Hauber, J., and Steinkasserer, A. (2000).** Mature dendritic cells infected with herpes simplex virus type 1 exhibit inhibited T-cell stimulatory capacity. *J. Virol.* *74*, 7127-7136.

- LaFemina, R.L. and Hayward, G.S. (1983).** Replicative forms of human cytomegalovirus DNA with joined termini are found in permissively infected human cells but not in non-permissive Balb/c-3T3 mouse cells. *J. Gen. Virol.* *64*, 373-389.
- Landini, M.P., Musiani, M., Zerbini, M., Falcieri, E., and La Placa, M. (1979).** Inhibition of a complete replication cycle of human cytomegalovirus in actinomycin pre-treated cells. *J. Gen. Virol.* *42*, 423-428.
- Lanier, L.L. (1998).** Activating and inhibitory NK cell receptors. *Adv. Exp. Med. Biol.* *452*, 13-18.
- Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. (2001).** Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* *106*, 263-266.
- Le Roy, E., Muhlethaler-Mottet, A., Davrinche, C., Mach, B., and Davignon, J.L. (1999).** Escape of human cytomegalovirus from HLA-DR-restricted CD4(+) T-cell response is mediated by repression of gamma interferon-induced class II transactivator expression. *J. Virol.* *73*, 6582-6589.
- Lehner, P.J., Karttunen, J.T., Wilkinson, G.W., and Cresswell, P. (1997).** The human cytomegalovirus US6 glycoprotein inhibits transporter associated with antigen processing-dependent peptide translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *94*, 6904-6909.
- Leong, C.C., Chapman, T.L., Bjorkman, P.J., Formankova, D., Mocarski, E.S., Phillips, J.H., and Lanier, L.L. (1998).** Modulation of natural killer cell cytotoxicity in human cytomegalovirus infection: the role of endogenous class I major histocompatibility complex and a viral class I homolog [published erratum appears in *J. Exp. Med.* 1998, 188: following 614]. *J. Exp. Med.* *187*, 1681-1687.
- Li, L., Liu, D., Hutt-Fletcher, L., Morgan, A., Masucci, M.G., and Levitsky, V. (2002).** Epstein-Barr virus inhibits the development of dendritic cells by promoting apoptosis of their monocyte precursors in the presence of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-4. *Blood* *99*, 3725-3734.
- Liu, R., Baillie, J., Sissons, J.G., and Sinclair, J.H. (1994).** The transcription factor YY1 binds to negative regulatory elements in the human cytomegalovirus major immediate early enhancer/promoter and mediates repression in non-permissive cells. *Nucleic Acids Res.* *22*, 2453-2459.
- Ljunggren, H.G., and Karre, K. (1990).** In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* *11*, 237-244.
- Lore, K., Sonnerborg, A., Brostrom, C., Goh, L.E., Perrin, L., McDade, H., Stellbrink, H.J., Gazzard, B., Weber, R., Napolitano, L.A., van Kooyk, Y., and Andersson, J. (2002).** Accumulation of DC-SIGN+CD40+ dendritic cells with reduced CD80 and CD86 expression in lymphoid tissue during acute HIV-1 infection. *AIDS* *16*, 683-692.

- Lucin, P., Jonjic, S., Messerle, M., Polic, B., Hengel, H., and Koszinowski, U.H. (1994).** Late phase inhibition of murine cytomegalovirus replication by synergistic action of interferon-gamma and tumour necrosis factor. *J. Gen. Virol.* 75, 101-110.
- Ludewig, B., Gelderblom, H.R., Becker, Y., Schafer, A., and Pauli, G. (1996).** Transmission of HIV-1 from productively infected mature Langerhans cells to primary CD4+ T lymphocytes results in altered T cell responses with enhanced production of IFN-gamma and IL-10. *Virology* 215, 51-60.
- Lutarewych, M.A., Quirk, M.R., Kringstad, B.A., Li, W., Verfaillie, C.M., and Jordan, M.C. (1997).** Propagation and titration of murine cytomegalovirus in a continuous bone marrow-derived stromal cell line (M2-10B4). *J. Virol. Methods* 68, 193-198.
- Lutz, M.B., Kukutsch, N., Ogilvie, A.L., Rossner, S., Koch, F., Romani, N., and Schuler, G. (1999).** An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods* 223, 77-92.
- Macatonia, S.E., Hosken, N.A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C.S., Culpepper, J.A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K.M., and O'Garra, A. (1995).** Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J. Immunol.* 154, 5071-5079.
- MacCormac, L.P. and Grundy, J.E. (1996).** Human cytomegalovirus induces an Fc gamma receptor (Fc gammaR) in endothelial cells and fibroblasts that is distinct from the human cellular Fc gammaRs. *J. Infect. Dis.* 174, 1151-1161.
- Maciejewski, J.P., Bruening, E.E., Donahue, R.E., Mocarski, E.S., Young, N.S., and StJeor, S.C. (1992).** Infection of hematopoietic progenitor cells by human cytomegalovirus. *Blood* 80, 170-178.
- Makino, M., Wakamatsu, S., Shimokubo, S., Arima, N., and Baba, M. (2000).** Production of functionally deficient dendritic cells from HTLV-I- infected monocytes: implications for the dendritic cell defect in adult T cell leukemia. *Virology* 274, 140-148.
- Maksymowych, W.P. and Kane, K.P. (2000).** Bacterial modulation of antigen processing and presentation. *Microbes. Infect.* 2, 199-211.
- Maldonado-Lopez, R., De Smedt, T., Pajak, B., Heirman, C., Thielemans, K., Leo, O., Urbain, J., Maliszewski, C.R., and Moser, M. (1999).** Role of CD8alpha+ and CD8alpha- dendritic cells in the induction of primary immune responses in vivo. *J. Leukoc. Biol.* 66, 242-246.
- Manz, M.G., Traver, D., Akashi, K., Merad, M., Miyamoto, T., Engleman, E.G., and Weissman, I.L. (2001a).** Dendritic cell development from common myeloid progenitors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 938, 167-173.

- Manz, M.G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I.L., and Akashi, K. (2001b).** Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 97, 3333-3341.
- Marks, J.R. and Spector, D.H. (1984).** Fusion of the termini of the murine cytomegalovirus genome after infection. *J. Virol.* 52, 24-28.
- Marks, J.R. and Spector, D.H. (1988).** Replication of the murine cytomegalovirus genome: structure and role of the termini in the generation and cleavage of concatemates. *Virology* 162, 98-107.
- Martinez, d.H., Martin, P., Arias, C.F., Marin, A.R., and Ardavin, C. (2002).** CD8alpha+ dendritic cells originate from the CD8alpha- dendritic cell subset by a maturation process involving CD8alpha, DEC-205, and CD24 up- regulation. *Blood* 99, 999-1004.
- Masse, M.J., Karlin, S., Schachtel, G.A., and Mocarski, E.S. (1992).** Human cytomegalovirus origin of DNA replication (oriLyt) resides within a highly complex repetitive region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 15, 5246-5250.
- Masurier, C., Salomon, B., Guettari, N., Pioche, C., Lachapelle, F., Guigon, M., and Klatzmann, D. (1998).** Dendritic cells route human immunodeficiency virus to lymph nodes after vaginal or intravenous administration to mice. *J. Virol.* 72, 7822-7829.
- Mathys, S., Schroeder, T., Ellwart, J., Koszinowski, U.H., Messerle, M., and Just, U. (2003).** Dendritic cells under influence of cytomegalovirus have a physiological dual role: to initiate and to restrict T cell activation. *J. Infect. Dis.* 187, 988-999.
- Matzinger, P. (1994).** Immunology. Memories are made of this? *Nature* 369, 605-606.
- Mayo, D.R., Armstrong, J.A., and Ho, M. (1977).** Reactivation of murine cytomegalovirus by cyclophosphamide. *Nature* 267, 721-723.
- McVoy, M.A. and Adler, S.P. (1994).** Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J. Virol.* 68, 1040-1051.
- McVoy, M.A., Nixon, D.E., Adler, S.P., and Mocarski, E.S. (1998).** Sequences within the herpesvirus-conserved pac1 and pac2 motifs are required for cleavage and packaging of the murine cytomegalovirus genome. *J. Virol.* 72, 48-56.
- McVoy, M.A., Nixon, D.E., Hur, J.K., and Adler, S.P. (2000).** The ends on herpesvirus DNA replicative concatemers contain pac2 cis cleavage/packaging elements and their formation is controlled by terminal cis sequences. *J. Virol.* 74, 1587-1592.
- McWilliam, A.S., Napoli, S., Marsh, A.M., Pemper, F.L., Nelson, D.J., Pimm, C.L., Stumbles, P.A., Wells, T.N., and Holt, P.G. (1996).** Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli. *J. Exp. Med.* 184, 2429-2432.

- Mendelson, M., Monard, S., Sissons, P., and Sinclair, J. (1996).** Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *J. Gen. Virol.* *77*, 3099-3102.
- Mendes, A.V., Benard, G., Pereira, C.B., Kallas, E.G., Duarte, A.J., Pannuti, C.S., Dulley, F.L., and Machado, C.M. (2002).** Different kinetics in anti-cytomegalovirus immunity reconstitution evaluated by lymphocyte proliferation and IFN-gamma production in allogeneic and autologous bone marrow transplantation. *Acta Haematol.* *107*, 187-194.
- Meier, J.L., and Stinski, M.F. (1996).** Regulation of human cytomegalovirus immediate-early gene expression. *Intervirology* *39*, 331-342.
- Meyers, J.D. (1984).** Cytomegalovirus infection following marrow transplantation: risk, treatment, and prevention. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* *20*, 101-117.
- Mikloska, Z., Danis, V.A., Adams, S., Lloyd, A.R., Adrian, D.L., and Cunningham, A.L. (1998).** In vivo production of cytokines and beta (C-C) chemokines in human recurrent herpes simplex lesions--do herpes simplex virus-infected keratinocytes contribute to their production? *J. Infect. Dis.* *177*, 827-838.
- Mikloska, Z., Bosnjak, L., and Cunningham, A.L. (2001).** Immature monocyte-derived dendritic cells are productively infected with herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* *75*, 5958-5964.
- Miller, D.M., Rahill, B.M., Boss, J.M., Lairmore, M.D., Durbin, J.E., Waldman, J.W., and Sedmak, D.D. (1998).** Human cytomegalovirus inhibits major histocompatibility complex class II expression by disruption of the Jak/Stat pathway. *J. Exp. Med.* *187*, 675-683.
- Miller, D.M., Zhang, Y., Rahill, B.M., Waldman, W.J., and Sedmak, D.D. (1999).** Human cytomegalovirus inhibits IFN-alpha-stimulated antiviral and immunoregulatory responses by blocking multiple levels of IFN-alpha signal transduction. *J. Immunol.* *162*, 6107-6113.
- Minton, E.J., Tysoe, C., Sinclair, J.H., and Sissons, J.G. (1994).** Human cytomegalovirus infection of the monocyte/macrophage lineage in bone marrow. *J. Virol.* *68*, 4017-4021.
- Mocarski, E.S., Liu, A.C., and Spaete, R.R. (1987).** Structure and variability of the a sequence in the genome of human cytomegalovirus (Towne strain). *J. Gen. Virol.* *68*, 2223-2230.
- Mocarski, E.S., Jr., Abenes, G.B., Manning, W.C., Sambucetti, L.C., and Cherrington, J.M. (1990).** Molecular genetic analysis of cytomegalovirus gene regulation in growth, persistence and latency. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *154*, 47-74.

- Mocarski, E.S. (1996).** Cytomegaloviruses and their replication. In Fields Virology, B.N. Fields, D.M. Knipe, and P.M. Howley, eds. (Philadelphia, Pa.: Lippincott-Raven Publishers), pp. 2447-2492.
- Mocarski, E.S. (2001).** Cytomegalovirus and their replication. In Fields Virology, D.M. Knipe and P.M. Howley, eds. (Philadelphia, Pa: Lippincott Williams and Wilkins), pp. 2629-2673.
- Mommaas, A.M., Mulder, A.A., Jordens, R., Out, C., Tan, M.C., Cresswell, P., Kluin, P.M., and Koning, F. (1999).** Human epidermal Langerhans cells lack functional mannose receptors and a fully developed endosomal/lysosomal compartment for loading of HLA class II molecules. *Eur. J. Immunol.* 29, 571-580.
- Moretta, L., Bottino, C., Pende, D., Mingari, M.C., Biassoni, R., and Moretta, A. (2002).** Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur. J. Immunol.* 32, 1205-1211.
- Mortarini, R., Anichini, A., Di Nicola, M., Siena, S., Bregni, M., Belli, F., Molla, A., Gianni, A.M., and Parmiani, G. (1997).** Autologous dendritic cells derived from CD34+ progenitors and from monocytes are not functionally equivalent antigen-presenting cells in the induction of melan-A/Mart-1(27-35)-specific CTLs from peripheral blood lymphocytes of melanoma patients with low frequency of CTL precursors. *Cancer Res.* 57, 5534-5541.
- Moskowitz, L., Hensley, G.T., Chan, J.C., and Adams, K. (1985).** Immediate causes of death in acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Pathol. Lab Med.* 109, 735-738.
- Moudgil, A., Toyoda, M., Galfayan, K., and Jordan, S.C. (1997).** Selective expression of the interleukin-2 gene discriminates between the auto- and allo-mixed lymphocyte reaction. *Transpl. Immunol.* 5, 35-38.
- Moutaftsi, M., Mehl, A.M., Borysiewicz, L.K., and Tabi, Z. (2002).** Human cytomegalovirus inhibits maturation and impairs function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 99, 2913-2921.
- Movassagh, M., Gozlan, J., Senechal, B., Baillou, C., Petit, J.C., and Lemoine, F.M. (1996).** Direct infection of CD34+ progenitor cells by human cytomegalovirus: evidence for inhibition of hematopoiesis and viral replication. *Blood* 88, 1277-1283.
- Muller, M., Misra, V., Chantler, J.K., and Hudson, J.B. (1978).** Murine cytomegalovirus gene expression during nonproductive infection in Go-phase 3T3 cells. *Virology* 90, 279-287.
- Murphy, J.C., Fischle, W., Verdin, E., and Sinclair, J.H. (2002).** Control of cytomegalovirus lytic gene expression by histone acetylation. *EMBO J.* 21, 1112-1120.
- Naniche, D. and Oldstone, M.B. (2000).** Generalized immunosuppression: how viruses undermine the immune response. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 1399-1407.

- Nesmith, J.D., and Pass, R.F. (1995).** Cytomegalovirus Infection in Adolescents. *Adolesc. Med.* 6, 79-90.
- Nilller, H.H., and Hennighausen, L. (1991).** Formation of several specific nucleoprotein complexes on the human cytomegalovirus immediate early enhancer. *Nucleic Acids Res.* 19, 3715-3721.
- Niswender, K.D., Blackman, S.M., Rohde, L., Magnuson, M.A., and Piston, D.W. (1995).** Quantitative imaging of green fluorescent protein in cultured cells: comparison of microscopic techniques, use in fusion proteins and detection limits. *J. Microsc.* 180, 109-116.
- Ohteki, T., Fukao, T., Suzue, K., Maki, C., Ito, M., Nakamura, M., and Koyasu, S. (1999).** Interleukin 12-dependent interferon gamma production by CD8alpha⁺ lymphoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 189, 1981-1986.
- Orange, J.S., Wang, B., Terhorst, C., and Biron, C.A. (1995).** Requirement for natural killer cell-produced interferon gamma in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration. *J. Exp. Med.* 182, 1045-1056.
- Orange, J.S. and Biron, C.A. (1996).** Characterization of early IL-12, IFN-alphabeta, and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *J. Immunol.* 156, 4746-4756.
- Paglia, P., Girolomoni, G., Robbiati, F., Granucci, F., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1993).** Immortalized dendritic cell line fully competent in antigen presentation initiates primary T cell responses in vivo. *J. Exp. Med.* 178, 1893-1901.
- Palucka, K.A., Taquet, N., Sanchez-Chapuis, F., and Gluckman, J.C. (1998).** Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J. Immunol.* 160, 4587-4595.
- Pamer, E. and Cresswell, P. (1998).** Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 323-358.
- Pass, R.F. (2001).** Cytomegalovirus. In *Fields Virology*, D.M. Knipe and P.M. Howley, eds. (Philadelphia, Pa: Lippincott Williams and Wilkins), pp. 2675-2705.
- Patterson, S., English, N.R., Longhurst, H., Balfe, P., Helbert, M., Pinching, A.J., and Knight, S.C. (1998).** Analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants and levels of infection in dendritic and T cells from symptomatic HIV-1-infected patients. *J. Gen. Virol.* 79, 247-257.
- Penfол, M.E., and Mocarski, E.S. (1997).** Formation of cytomegalovirus DNA replication compartments defined by localization of viral proteins and DNA synthesis. *Virology* 239, 46-61.

- Penfold, M.E., Dairaghi, D.J., Duke, G.M., Saederup, N., Mocarski, E.S., Kemble, G.W., and Schall, T.J. (1999).** Cytomegalovirus encodes a potent alpha chemokine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *96*, 9839-9844.
- Pfeifer, J.D., Wick, M.J., Roberts, R.L., Findlay, K., Normark, S.J., and Harding, C.V. (1993).** Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* *361*, 359-362.
- Pierre, P., Turley, S.J., Gatti, E., Hull, M., Meltzer, J., Mirza, A., Inaba, K., Steinman, R.M., and Mellman, I. (1997).** Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* *388*, 787-792.
- Pierre, P. and Mellman, I. (1998).** Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells. *Cell* *93*, 1135-1145.
- Plachter, B., Sinzger, C., and Jahn, G. (1996).** Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus. *Adv. Virus Res.* *46*, 195-261.
- Plafker, S.M., and Gibson, W. (1998).** Cytomegalovirus assembly protein precursor and proteinase precursor contain two nuclear localization signals that mediate their own nuclear translocation and that of the major capsid protein. *J. Virol.* *72*, 7722-7732.
- Polic, B., Hengel, H., Krmpotic, A., Trgovcich, J., Pavic, I., Luccaroni, P., Jonjic, S., and Koszinowski, U.H. (1998).** Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *J. Exp. Med.* *188*, 1047-1054.
- Powell, J.D., Ragheb, J.A., Kitagawa-Sakakida, S., and Schwartz, R.H. (1998).** Molecular regulation of interleukin-2 expression by CD28 co-stimulation and anergy. *Immunol. Rev.* *165*, 287-300.
- Pulendran, B., Lingappa, J., Kennedy, M.K., Smith, J., Teepe, M., Rudensky, A., Maliszewski, C.R., and Maraskovsky, E. (1997).** Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand- treated mice. *J. Immunol.* *159*, 2222-2231.
- Pulendran, B., Smith, J.L., Caspary, G., Brasel, K., Pettit, D., Maraskovsky, E., and Maliszewski, C.R. (1999).** Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *96*, 1036-1041.
- Radsak, K., Brucher, K.H., Brit,t W., Shiou, H., Schneider, D., and Kollert, A. (1990).** Nuclear compartmentation of glycoprotein B of human cytomegalovirus. *Virology* *177*, 515-522.
- Raftery, M.J., Schwab, M., Eibert, S.M., Samstag, Y., Walzak, H., and Schönrich, G. (2001).** Targeting the function of mature dendritic cells by human cytomegalovirus: a multilayered viral defense strategy. *Immunity* *15*, 997-1009.

- Ramsay, M.E., Miller, E., and Peckham, C.S. (1991).** Outcome of confirmed symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Arch. Dis. Child.* *66*, 1068-1069.
- Rapp, M., Messerle, M., Bühler, B., Tannheimer, M., Keil, G.M., and Koszinowski, U.H. (1992).** Identification of the murine cytomegalovirus glycoprotein B gene and its expression by recombinant vaccinia virus. *J. Virol.* *66*, 4399-4406.
- Rasko, J.E., Metcalf, D., Alexander, B., Strasser, A., and Begley, C.G. (1997).** Establishment of multipotential and antigen presenting cell lines derived from myeloid leukemias in GM-CSF transgenic mice. *Leukemia* *11*, 732-742.
- Rawlinson, W.D., Farrell, H.E., and Barrell, B.G. (1996).** Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J. Virol.* *70*, 8833-8849.
- Reddehase, M.J., Keil, G.M., and Koszinowski, U.H. (1984).** The cytolytic T lymphocyte response to the murine cytomegalovirus. I. Distinct maturation stages of cytolytic T lymphocytes constitute the cellular immune response during acute infection of mice with the murine cytomegalovirus. *J. Immunol.* *132*, 482-489.
- Reddehase, M.J., Weiland, F., Munch, K., Jonjic, S., Luske, A., and Koszinowski, U.H. (1985).** Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *J. Virol.* *55*, 264-273.
- Reddehase, M.J., Mutter, W., and Koszinowski, U.H. (1987).** In vivo application of recombinant interleukin 2 in the immunotherapy of established cytomegalovirus infection. *J. Exp. Med.* *165*, 650-656.
- Reddehase, M.J., Jonjic, S., Weiland, F., Mutter, W., and Koszinowski, U.H. (1988).** Adoptive immunotherapy of murine cytomegalovirus adrenalitis in the immunocompromised host: CD4-helper-independent antiviral function of CD8-positive memory T lymphocytes derived from latently infected donors. *J. Virol.* *62*, 1061-1065.
- Redpath, S., Angulo, A., Gascoigne, N.R., and Ghazal, P. (1999).** Murine cytomegalovirus infection down-regulates MHC class II expression on macrophages by induction of IL-10. *J. Immunol.* *162*, 6701-6707.
- Reis e Sousa, Stahl, P.D., and Austyn, J.M. (1993).** Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J. Exp. Med.* *178*, 509-519.
- Rescigno, M., Granucci, F., Citterio, S., Foti, M., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1999).** Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. *Immunol. Today* *20*, 200-203.
- Reusch, U., Muranyi, W., Lucin, P., Burgert, H.G., Hengel, H., and Koszinowski, U.H. (1999).** A cytomegalovirus glycoprotein re-routes MHC class I complexes to lysosomes for degradation. *EMBO J.* *18*, 1081-1091.

- Reusser, P., Riddell, S.R., Meyers, J.D., and Greenberg, P.D. (1991).** Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* 78, 1373-1380.
- Revello, M.G., Zavattoni, M., Sarasini, A., Percivalle, E., Simoncini, L., and Gerna, G. (1998).** Human cytomegalovirus in blood of immunocompetent persons during primary infection: prognostic implications for pregnancy. *J. Infect. Dis.* 177, 1170-1175.
- Reyburn, H.T., Mandelboim, O., Vales, G.M., Davis, D.M., Pazmany, L., and Strominger, J.L. (1997).** The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature* 386, 514-517.
- Ridge, J.P., Di Rosa, F., and Matzinger, P. (1998).** A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393, 474-478.
- Rieglar, S., Hebart, H., Einsele, H., Brossart, P., Jahn, G., and Sinzger, C. (2000).** Monocyte-derived dendritic cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 81, 2393-2399.
- Rissoan, M.C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal, M.R., and Liu, Y.J. (1999).** Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283, 1183-1186.
- Rixon, F.J., Addison, C., McGregor, A., Macnab, S.J., Nicholson, P., Preston, V.G., and Tatman, J.D. (1996).** Multiple interactions control the intracellular localization of the herpes simplex virus type 1 capsid proteins. *J. Gen. Virol.* 77, 2251-2260.
- Robinett, C.C., Straight, A., Li, G., Willhelm, C., Sudlow, G., Murray, A., and Belmont, A.S. (1996).** In vivo localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator/repressor recognition. *J. Cell Biol.* 135, 1685-1700.
- Rock, K.L. and Goldberg, A.L. (1999).** Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I- presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 739-779.
- Roizman, B. and Pellett, P.E. (2002).** The family Herpesviridae: a brief introduction. In Fields Virology, D.M. Knipe and P.M. Howley, eds. (Philadelphia, Pa: Lippincott Williams and Wilkins), pp. 2381-2397.
- Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P.O., Steinman, R.M., and Schuler, G. (1994).** Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* 180, 83-93.
- Rovere, P., Manfredi, A.A., Vallinoto, C., Zimmermann, V.S., Fascio, U., Balestrieri, G., Ricciardi-Castagnoli, P., Rugarli, C., Tincani, A., and Sabbadini, M.G. (1998).** Dendritic cells preferentially internalize apoptotic cells opsonized by anti-beta2-glycoprotein I antibodies. *J. Autoimmun.* 11, 403-411.

- Rubin, R.H. (1999).** Importance of CMV in the transplant population. *Transpl Infect Dis 1, Suppl 1, 3-7.*
- Saederup, N., Lin, Y.C., Dairaghi, D.J., Schall, T.J., and Mocarski, E.S. (1999).** Cytomegalovirus-encoded beta chemokine promotes monocyte-associated viremia in the host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 10881-10886.*
- Saeki, H., Moore, A.M., Brown, M.J., and Hwang, S.T. (1999).** Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J. Immunol. 162, 2472-2475.*
- Saint-Vis, B., Fugier-Vivier, I., Massacrier, C., Gaillard, C., Vanbervliet, B., Ait-Yahia, S., Banchereau, J., Liu, Y.J., Lebecque, S., and Caux, C. (1998).** The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J. Immunol. 160, 1666-1676.*
- Salio, M., Cella, M., Suter, M., and Lanzavecchia, A. (1999).** Inhibition of dendritic cell maturation by herpes simplex virus. *Eur. J. Immunol. 29, 3245-3253.*
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995).** Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med. 182, 389-400.*
- Sanchez, V., Greis, K.D., Sztul, E., and Britt, W.J. (2000).** Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly. *J. Virol. 74, 975-986.*
- Salomon, B., Cohen, J.L., Masurier, C., and Klatzmann, D. (1998).** Three populations of mouse lymph node dendritic cells with different origins and dynamics. *J. Immunol. 160, 708-717.*
- Sarov, I., and Abady, I. (1975).** The morphogenesis of human cytomegalovirus. Isolation and polypeptide characterization of cytomegalovirions and dense bodies. *Virology 66, 464-473.*
- Saunders, D., Lucas, K., Ismaili, J., Wu, L., Maraskovsky, E., Dunn, A., and Shortman, K. (1996).** Dendritic cell development in culture from thymic precursor cells in the absence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med. 184, 2185-2196.*
- Scalzo, A.A., Fitzgerald, N.A., Wallace, C.R., Gibbons, A.E., Smart, Y.C., Burton, R.C., and Shellam, G.R. (1992).** The effect of the Cmv-1 resistance gene, which is linked to the natural killer cell gene complex, is mediated by natural killer cells. *J. Immunol. 149, 581-589.*

- Scheicher, C., Mehlig, M., Zecher, R., and Reske, K. (1992).** Dendritic cells from mouse bone marrow: in vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol. Methods* *154*, 253-264.
- Schlienger, K., Craighead, N., Lee, K.P., Levine, B.L., and June, C.H. (2000).** Efficient priming of protein antigen-specific human CD4(+) T cells by monocyte-derived dendritic cells. *Blood* *96*, 3490-3498.
- Schnorr, J.J., Xanthakos, S., Keikavoussi, P., Kampgen, E., ter, M., V, and Schneider-Schaulies, S. (1997).** Induction of maturation of human blood dendritic cell precursors by measles virus is associated with immunosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *94*, 5326-5331.
- Schoenberger, S.P., Toes, R.E., van der Voort, E.I., Offringa, R., and Melief, C.J. (1998).** T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* *393*, 480-483.
- Schroeder, T., Lange, C., Strehl, J., and Just, U. (2000).** Generation of functionally mature dendritic cells from the multipotential stem cell line FDCP-mix. *Br. J. Haematol.* *111*, 890-897.
- Scott, P., and Trinchieri, G. (1995).** The role of natural killer cells in host-parasite interactions. *Curr. Opin. Immunol.* *7*, 34-40.
- Servet-Delprat, C., Vidalain, P.O., Bausinger, H., Manie, S., Le Deist, F., Azocar, O., Hanau, D., Fischer, A., and Rabourdin-Combe, C. (2000).** Measles virus induces abnormal differentiation of CD40 ligand-activated human dendritic cells. *J. Immunol.* *164*, 1753-1760.
- Shepp, D.H., Moses, J.E., and Kaplan, M.H. (1996).** Seroepidemiology of cytomegalovirus in patients with advanced HIV disease: influence on disease expression and survival. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* *11*, 460-468.
- Shellam, G.R., Allan, J.E., Papadimitriou, J.M., and Bancroft, G.J. (1981).** Increased susceptibility to cytomegalovirus infection in beige mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *78*, 5104-5108.
- Sigal, L.J., Crotty, S., Andino, R., and Rock, K.L. (1999).** Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* *398*, 77-80.
- Simmen, K.A., Singh, J., Luukkonen, B.G., Lopper, M., Bittner, A., Miller, N.E., Jackson, M.R., Compton, T., and Fruh, K. (2001).** Global modulation of cellular transcription by human cytomegalovirus is initiated by viral glycoprotein B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *98*, 7140-7145.
- Simon, A.K., Williams, O., Mongkolsapaya, J., Jin, B., Xu, X.N., Walczak, H., and Sreaton, G.R. (2001).** Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in T

- cell development: sensitivity of human thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 5158-5163.
- Sinzger, C. and Jahn, G. (1996).** Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology* **39**, 302-319.
- Skaletskaya, A., Bartle, L.M., Chittenden, T., McCormick, A.L., Mocarski, E.S., and Goldmacher, V.S. (2001).** A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**, 7829-7834.
- Smith, G.L., Symons, J.A., Khanna, A., Vanderplasschen, A., and Alcami, A. (1997).** Vaccinia virus immune evasion. *Immunol. Rev.* **159**, 137-154.
- Smith, R.D. and Wehner, R.W. (1980).** Acute cytomegalovirus glomerulonephritis: an experimental model. *Lab Invest.* **43**, 278-286.
- Snijders, A., Kalinski, P., Hilkens, C.M., and Kapsenberg, M.L. (1998).** High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int. Immunol.* **10**, 1593-1598.
- Soderberg-Naucler, C., Fish, K.N., and Nelson, J.A. (1997a).** Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha specifically induce formation of cytomegalovirus-permissive monocyte-derived macrophages that are refractory to the antiviral activity of these cytokines. *J. Clin. Invest.* **100**, 3154-3163.
- Soderberg-Naucler, C., Fish, K.N., and Nelson, J.A. (1997b).** Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* **91**, 119-126.
- Soderberg-Naucler, C., Fish, K.N., and Nelson, J.A. (1998).** Growth of human cytomegalovirus in primary macrophages. *Methods* **16**, 126-138.
- Soderberg-Naucler, C., and Nelson, J.A. (1999).** Human cytomegalovirus latency and reactivation - a delicate balance between the virus and its host's immune system. *Intervirology* **42**, 314-321.
- Soderberg-Naucler, C., Streblow, D.N., Fish, K.N., Allan-Yorke, J., Smith, P.P., and Nelson, J.A. (2001).** Reactivation of latent human cytomegalovirus in CD14(+) monocytes is differentiation dependent. *J. Virol.* **75**, 7543-7554.
- Spector, D.H. (1996).** Activation and regulation of human cytomegalovirus early genes. *Intervirology* **39**, 361-377.
- Spencer, J.V., Lockridge, K.M., Barry, P.A., Lin, G., Tsang, M., Penfold, M.E., and Schall, T.J. (2002).** Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus-encoded interleukin-10. *J. Virol.* **76**, 1285-1292.

- Spooncer, E., Boettiger, D., and Dexter, T.M. (1984).** Continuous in vitro generation of multipotential stem cell clones from src-infected cultures. *Nature* *310*, 228-230.
- Spooncer, E., Heyworth, C.M., Dunn, A., and Dexter, T.M. (1986).** Self-renewal and differentiation of interleukin-3-dependent multipotent stem cells are modulated by stromal cells and serum factors. *Differentiation* *31*, 111-118.
- Stagno, S. and Whitley, R.J. (1985).** Herpesvirus infections of pregnancy. Part I: Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infections. *N. Engl. J. Med.* *313*, 1270-1274.
- Stamminger, T., Puchtler, E., and Fleckenstein, B. (1991).** Discordant expression of the immediate-early 1 and 2 gene regions of human cytomegalovirus at early times after infection involves posttranscriptional processing events. *J. Virol.* *65*, 2273-2282.
- Stannard, L.M. and Hardie, D.R. (1991).** An Fc receptor for human immunoglobulin G is located within the tegument of human cytomegalovirus. *J. Virol.* *65*, 3411-3415.
- Stasiak, P.C., and Mocarski, E.S. (1992).** Transactivation of the cytomegalovirus ICP36 gene promoter requires the alpha gene product TRS1 in addition to IE1 and IE2. *J. Virol.* *66*, 1050-1058.
- Steinman, R.M., Pack, M., and Inaba, K. (1997).** Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol. Rev.* *156*, 25-37.
- Stenberg, R.M., Depto, A.S., Fortney, J., and Nelson, J.A. (1989).** Regulated expression of early and late RNAs and proteins from the human cytomegalovirus immediate-early gene region. *J. Virol.* *63*, 2699-2708.
- Stenberg, R.M. (1996).** The human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Intervirology* *39*, 343-349.
- Stinski, M.F. (1978).** Sequence of protein synthesis in cells infected by human cytomegalovirus: early and late virus-induced polypeptides. *J. Virol.* *26*, 686-701.
- Stinski, M.F., Mocarski, E.S., and Thomsen, D.R. (1979).** DNA of human cytomegalovirus: size heterogeneity and defectiveness resulting from serial undiluted passage. *J. Virol.* *31*, 231-239.
- Stoddart, C.A., Cardin, R.D., Boname, J.M., Manning, W.C., Abenes, G.B., and Mocarski, E.S. (1994).** Peripheral blood mononuclear phagocytes mediate dissemination of murine cytomegalovirus. *J. Virol.* *68*, 6243-6253.
- Stratta, R.J., Shaefer, M.S., Markin, R.S., Wood, R.P., Kennedy, E.M., Langnas, A.N., Reed, E.C., Woods, G.L., Donovan, J.P., and Pillen, T.J. (1989).** Clinical patterns of cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Arch. Surg.* *124*, 1443-1450.

- Streblow, D.N., Soderberg, N.C., Vieira, J., Smith, P., Wakabayashi, E., Ruchti, F., Mattison, K., Altschuler, Y., and Nelson, J.A. (1999).** The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. *Cell* *99*, 511-520.
- Subklewe, M. (2002).** Dendritic cells for the induction of EBV immunity. *Recent Results Cancer Res.* *159*, 38-43.
- Suss, G. and Shortman, K. (1996).** A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand- induced apoptosis. *J. Exp. Med.* *183*, 1789-1796.
- Sweet, C. (1999).** The pathogenicity of cytomegalovirus. *FEMS Microbiol. Rev.* *23*, 457-482.
- Tabi, Z., Moutaftsi, M., and Borysiewicz, L.K. (2001).** Human cytomegalovirus pp65- and immediate early 1 antigen-specific HLA class I-restricted cytotoxic T cell responses induced by cross- presentation of viral antigens. *J. Immunol.* *166*, 5695-5703.
- Tang, A., Amagai, M., Granger, L.G., Stanley, J.R., and Udey, M.C. (1993).** Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E- cadherin. *Nature* *361*, 82-85.
- Tay, C.H., Welsh, R.M., and Brutkiewicz, R.R. (1995).** NK cell response to viral infections in beta 2-microglobulin-deficient mice. *J. Immunol.* *154*, 780-789.
- Taylor, H.P. and Cooper, N.R. (1990).** The human cytomegalovirus receptor on fibroblasts is a 30-kilodalton membrane protein. *J. Virol.* *64*, 2484-2490.
- Thale, R., Lucin, P., Schneider, K., Eggers, M., and Koszinowski, U.H. (1994).** Identification and expression of a murine cytomegalovirus early gene coding for an Fc receptor. *J. Virol.* *68*, 7757-7765.
- Tomasec, P., Braud, V.M., Rickards, C., Powell, M.B., McSharry, B.P., Gadola, S., Cerundolo, V., Borysiewicz, L.K., McMichael, A.J., and Wilkinson, G.W. (2000).** Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* *287*, 1031.
- Tomazin, R., Boname, J., Hegde, N.R., Lewinsohn, D.M., Altschuler, Y., Jones, T.R., Cresswell, P., Nelson, J.A., Riddell, S.R., and Johnson, D.C. (1999).** Cytomegalovirus US2 destroys two components of the MHC class II pathway, preventing recognition by CD4+ T cells. *Nat. Med.* *5*, 1039-1043.
- Tortorella, D., Gewurz, B.E., Furman, M.H., Schust, D.J., and Ploegh, H.L. (2000).** Viral subversion of the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* *18*, 861-926.
- Traver, D., Akashi, K., Manz, M., Merad, M., Miyamoto, T., Engleman, E.G., and Weissman, I.L. (2000).** Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* *290*, 2152-2154.

- Turley, S.J., Inaba, K., Garrett, W.S., Ebersold, M., Unternaehrer, J., Steinman, R.M., and Mellman, I. (2000).** Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science* 288, 522-527.
- Vasilevko, V., Ghochikyan, A., Holterman, M.J., and Agadjanyan, M.G. (2002).** CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) are functionally equivalent in the initiation and maintenance of CD4+ T-cell proliferation after activation with suboptimal doses of PHA. *DNA Cell Biol.* 21, 137-149.
- Vidalain, P.O., Azocar, O., Lamouille, B., Astier, A., Rabourdin-Combe, C., and Servet-Delprat, C. (2000).** Measles virus induces functional TRAIL production by human dendritic cells. *J. Virol.* 74, 556-559.
- Vink, C., Beisser, P.S., and Bruggeman, C.A. (1999).** Molecular mimicry by cytomegaloviruses. Function of cytomegalovirus- encoded homologues of G protein-coupled receptors, MHC class I heavy chains and chemokines. *Intervirology* 42, 342-349.
- Vink, C., Beuken, E., and Bruggeman, C.A. (2000).** Complete DNA sequence of the rat cytomegalovirus genome. *J. Virol.* 74, 7656-7665.
- vonLaer, D., Meyer-Koenig, U., Serr, A., Finke, J., Kanz, L., Fausser, A.A., Neumann-Haefelin, D., Brugger, W., and Hufert, F.T. (1995).** Detection of cytomegalovirus DNA in CD34+ cells from blood and bone marrow. *Blood* 86, 4086-4090.
- Wagner, M., Jonjic, S., Koszinowski, U.H., and Messerle, M. (1999).** Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *J. Virol.* 73, 7056-7060.
- Wagner, M. (2001).** Entwicklung von Mutageneseverfahren für klonierte Cytomegalovirusgenome. Universität Regensburg, Dissertation.
- Ward, P.L., Ogle, W.O., and Roizman, B. (1996).** Assemblons: nuclear structures defined by aggregation of immature capsids and some tegument proteins of herpes simplex virus 1. *J. Virol.* 70, 4623-4631.
- Warren, M.K., Rose, W.L., Cone, J.L., Rice, W.G., and Turpin, J.A. (1997).** Differential infection of CD34+ cell-derived dendritic cells and monocytes with lymphocyte-tropic and monocyte-tropic HIV-1 strains. *J. Immunol.* 158, 5035-5042.
- Welsh, R.M., O'Donnell, C.L., and Shultz, L.D. (1994).** Antiviral activity of NK 1.1+ natural killer cells in C57BL/6 SCID mice infected with murine cytomegalovirus. *Nat. Immun.* 13, 239-245.
- Wiebusch, L., and Hagemeier, C. (1999).** Human cytomegalovirus 86-kilodalton IE2 protein blocks cell cycle progression in G(1). *J. Virol.* 73, 9274-9283.

- Wiertz, E.J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T.R., Rapoport, T.A., and Ploegh, H.L. (1996).** Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction [see comments]. *Nature* *384*, 432-438.
- Wiertz, E., Hill, A., Tortorella, D., and Ploegh, H. (1997).** Cytomegaloviruses use multiple mechanisms to elude the host immune response. *Immunol. Lett.* *57*, 213-216.
- Wingard, J.R., Sostrin, M.B., Vriesendorp, H.M., Mellits, E.D., Santos, G.W., Fuller, D.J., Braine, H.G., Yeager, A.M., Burns, W.H., and Saral, R. (1988).** Interstitial pneumonitis following autologous bone marrow transplantation. *Transplantation* *46*, 61-65.
- Winzler, C., Rovere, P., Rescigno, M., Granucci, F., Penna, G., Adorini, L., Zimmermann, V.S., Davoust, J., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1997).** Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J. Exp. Med.* *185*, 317-328.
- Winzler, C., Rovere, P., Zimmermann, V.S., Davoust, J., Rescigno, M., Citterio, S., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1997).** Checkpoints and functional stages in DC maturation. *Adv. Exp. Med. Biol.* *417*, 59-64.
- Wong, B.R., Josien, R., Lee, S.Y., Sauter, B., Li, H.L., Steinman, R.M., and Choi, Y. (1997).** TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J. Exp. Med.* *186*, 2075-2080.
- Wu, L., Li, C.L., and Shortman, K. (1996).** Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J. Exp. Med.* *184*, 903-911.
- Wu, S.J., Grouard-Vogel, G., Sun, W., Mascola, J.R., Brachtel, E., Putvatana, R., Louder, M.K., Filgueira, L., Marovich, M.A., Wong, H.K., Blauvelt, A., Murphy, G.S., Robb, M.L., Innes, B.L., Birx, D.L., Hayes, C.G., and Frankel, S.S. (2000).** Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat. Med.* *6*, 816-820.
- Xu, B., Murayama, T., Ishida, K., and Furukawa, T. (1989).** Characterization of IgG Fc receptors induced by human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* *70* (Pt 4), 893-900.
- Xu, S., Ariizumi, K., Caceres-Dittmar, G., Edelbaum, D., Hashimoto, K., Bergstresser, P.R., and Takashima, A. (1995).** Successive generation of antigen-presenting, dendritic cell lines from murine epidermis. *J. Immunol.* *154*, 2697-2705.
- Ye, M., Morello, C.S., and Spector, D.H. (2002).** Strong CD8 T-cell responses following coimmunization with plasmids expressing the dominant pp89 and subdominant M84 antigens of murine cytomegalovirus correlate with long-term protection against subsequent viral challenge. *J. Virol.* *76*, 2100-2112.

- Zhang, Y., Buchholz, F., Muyrers, J.P., and Stewart, A.F. (1998).** A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat. Genet.* 20, 123-128.
- Zhou, Z.H., He, J., Jakana, J., Tatman, J.D., Rixon, F.J., and Chiu, W. (1995).** Assembly of VP26 in herpes simplex virus-1 inferred from structures of wild-type and recombinant capsids. *Nat. Struct. Biol.* 2, 1026-1030.
- Zhou, L.J. and Tedder, T.F. (1996).** CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2588-2592.
- Zhou, Z.H., Chen, D.H., Jakana, J., Rixon, F.J., and Chiu, W. (1999).** Visualization of tegument-capsid interactions and DNA in intact herpes simplex virus type 1 virions. *J. Virol.* 73, 3210-3218.
- Zhou, Z.H., Dougherty, M., Jakana, J., He, J., Rixon, F.J., and Chiu, W. (2000).** Seeing the herpesvirus capsid at 8.5 Å. *Science* 288, 877-880.
- Ziegler, H., Thale, R., Lucin, P., Muranyi, W., Flohr, T., Hengel, H., Farrell, H., Rawlinson, W., and Koszinowski, U.H. (1997).** A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/cis-Golgi compartments. *Immunity* 6, 57-66.
- Ziegler, H., Muranyi, W., Burgert, H.G., Kremmer, E., and Koszinowski, U.H. (2000).** The luminal part of the murine cytomegalovirus glycoprotein gp40 catalyzes the retention of MHC class I molecules. *EMBO J.* 19, 870-881.
- Zlokarnik, G., Negulescu, P.A., Knapp, T.E., Mere, L., Burres, N., Feng, L., Whitney, M., Roemer, K., and Tsien, R.Y. (1998).** Quantitation of transcription and clonal selection of single living cells with beta-lactamase as reporter. *Science* 279, 84-88.

VII ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
APC	<i>antigen presenting cells</i> , Antigen-präsentierende Zelle
ATCC	American Type Culture Collection
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
bp	Basenpaar(e)
CCR	Chemokin Rezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CMV	Cytomegalovirus
cpm	<i>counts per minute</i>
CROMA	<i>croatia monoclonal antibody</i>
CTL	cytotoxische T-Lymphocyten
DCs	dendritische Zellen
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
E oder e	<i>early</i>
EBV	Epstein-Barr Virus
E. coli	Escherichia Coli
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fötales Kälberserum
FDCP-Mix	<i>factor dependent cells Paterson</i> , faktorabhängige Zellen aus dem Paterson-Institut mit gemischem Differenzierungspotential
for	<i>forward</i>
gB	Glykoprotein B
g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
h	Stunde(n)
³ H	Tritium
HCMV	Humanes Zytomegalovirus
HHV	Humanes Herpes Virus
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HS	<i>Horse serum</i> , Pferdeserum
HSV	Herpes Simplex Virus
IE oder ie	<i>immediate-early</i>
IFN	Interferon
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's Medium
IntDCs	interstitielle dendritische Zellen
kb	Kilobasenpaare
KLH	<i>keyhole limpet hemocyanin</i>
kV	Kilo-Volt
L	<i>late</i>
l	Liter
lac	Laktose
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LC	Langerhans Zelle

LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
m	Milli
MCMV	Maus-Zytomegalovirus
M-CSF	<i>macrophage colony stimulating factor</i>
MEF	<i>mouse embryonic fibroblasts</i> , murine embryonale Fibroblasten
min	Minute(n)
F	Farad
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
MLR	<i>mixed lymphocyte reaction</i> , Lymphocyten-Proliferations-Assay
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MV	Masern Virus
NK-Zellen	<i>natural killer cells</i> , natürliche Killer-Zellen
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-KettenReaktion
pfu	<i>plaque forming units</i>
p.i.	<i>post infection</i> , nach Infektion
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
SCP	<i>small capsid protein</i> , kleines Kapsidprotein
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Th	T-Helfer
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
U	units, Einheit(en)
ÜN	über Nacht
Vol.	Volumen / Volumina
VZV	Varicella Zoster Virus
wt	Wildtyp
w/v	weight / volume
µl	Mikroliter
Ω	Ohm

VIII PUBLIKATIONEN

Teile dieser Arbeit sind oder werden wie folgt veröffentlicht:

Borst, E.M., Mathys, S., Wagner, M., Muranyi, W., and Messerle, M. (2000). Genetic evidence of an essential role for cytomegalovirus small capsid protein in viral growth. *J. Virol.* 75, 1450-1458.

Mathys, S., Schroeder, T., Ellwart, J., Koszinowski, U.H., Messerle, M., and Just, U. (2003). Dendritic cells under influence of cytomegalovirus have a physiological dual role: to initiate and to restrict T cell activation. *J. Infect. Dis.* 187, 988-999.

Weitere Publikationen:

Mathys, S., Evans, T.C., Chute, C.I., Wu, H., Chong, S., Benner, J., Liu, X.-Q., and Xu, M.-Q. (1999). Characterization of a self-splicing mini-intein and its conversion into autocatalytic N- and C-terminal cleavage elements: facile production of protein building blocks for protein ligation. *Gene* 231, 1-13.

IX DANKSAGUNG

Ich danke Frau PD Dr. Ruth Brack-Werner für das anhaltende Interesse, die konstruktiven Diskussionen und ganz besonders für die Vertretung meiner Arbeit an der Fakultät für Biologie an der LMU München.

Frau Prof. Elisabeth Weiss danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Martin Messerle für die fachlich und menschlich hervorragende Betreuung der Promotion sowie die immer vorhandene Diskussionsbereitschaft und sehr angenehme Zusammenarbeit. Es war eine sehr lehrreiche Zeit, die ich nicht vermissen möchte. Danke!

Bei Frau Dr. Ursula Just, Institut für klinische Molekularbiologie und Tumogenetik, GSF, München, möchte ich mich besonders für die Bereitstellung der FDCP-Mix-Zellen und das Einbringen ihrer unschätzbar wertvollen Zellkulturkenntnisse danken. Vielen Dank für die konstruktive und effektive Zusammenarbeit, ohne die das Projekt nicht durchführbar gewesen wäre!

Timm Schroeder und Eva Borst möchte ich ebenfalls besonders für ihre Geduld und Unterstützung bei der Durchführung der Experimente bedanken. Vielen Dank für eure immer offenen Ohren für meine alltäglichen Problemchen im Labor.

Für die Bereitstellung von Materialien und technischer Hilfe möchte ich mich bei Markus Wagner, Andrea Reus, Daniela Gast und Hella Kohlhof bedanken.

Außerdem möchte ich bei den Mitarbeitern des Max-von-Pettenkofer Institutes, des Genzentrums und der GSF für ihre Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima bedanken, besonders bei Brigitte Rupp, Max Nunziante, Mark Windheim, Carine Menard und Annette Hilgendorf.

Dr. Anja Bubeck und Andrea Löwendorf danke ich ganz herzlich für die Korrektur des Manuskripts. Es war sicher kein Zuckerschlecken!

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung und Geduld danken, insbesondere T.Z. und B.H. Ohne Euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!

X LEBENSLAUF

Name:	Sibylle Mathys
Geburtsdatum:	20.07.1973
Geburtsort:	Biel-Bienne, Schweiz
Nationalität:	Schweizerin
Schulbildung:	1980 - 1984 Primarschule Meinisberg, Schweiz 1984 – 1986 Sekundarschule Orpund, Schweiz 1986 - 1993 dt. Gymnasium Biel, Schweiz 1993 Erwerb der Matura, allgemeine Hochschulreife
Studium:	1993 - 1995 Biologiestudium an der Universität Bern, Schweiz Abschluss: Vordiplom 1995 - 1998 Biotechnologiestudium an der Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg (ESBS) Studienabschluss: Diplom in Biotechnologie 1998 Diplomarbeit bei New England Biolabs, Inc., Boston, USA, unter Anleitung von Dr. Ming Xu 1999 - 2003 Promotion an der Ludwig-Maximilian-Universität München, Max-von-Pettenkofer Institut für Virologie, unter Anleitung von Dr. Martin Messerle