

**Untersuchungen des Einflusses von
regulatorischen T-Zellen
in heterologen Virusinfektionen**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat

der Fakultät für
Biologie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Janine-Minette Jill Duppach
aus Duisburg

Juli 2013

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Virologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter : Professor Dr. Ulf Dittmer

2. Gutachter: Professorin Dr. Wiebke Hansen

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Professorin Dr. Perihan Nalbant

Tag der mündlichen Prüfung: 20. November 2013

Die Weisheit eines Menschen misst man nicht
nach seinen Erfahrungen, sondern nach seiner Fähigkeit,
Erfahrungen zu machen.
(Georg Bernhard Shaw)

2.1.1 Zelllinien.....	35
2.1.2 Zellkulturmedium und Zusätze.....	35
2.2 Puffer und Lösungen	36
2.3 Antikörper	38
2.4 Lebend-tot Marker	39
2.5 FV Tetramere.....	39
2.6 mCMV-spezifische MHC-Klasse-I-Peptide	40
2.7 Biochemikalien.....	40
2.7.1 Proteine und Enzyme	40
2.7.2 MuLV-ELISA Coating-Antigen.....	40
2.8 Chemikalien	41
2.9 Oligonukleotide.....	41
2.10 Komplettsysteme.....	42
2.11 Versuchstiere.....	42
2.12 Viren	44
2.12.1 Friend Retrovirus Komplex (FV)	44
2.12.2 Murines Cytomegalovirus (mCMV).....	44
2.13 Verbrauchsmaterialien	44
2.14 Geräte	45
2.15 Computer-Software	46
3. Methoden.....	47
3.1 Versuchstiere.....	47
3.1.1 Infektionen.....	47
3.1.1.1 Intravenöse Infektion	47
3.1.1.2 Intraperitoneale Infektion.....	47
3.1.2 Intraperitoneale Injektionen.....	47
3.1.2.1 Depletion von regulatorischen T-Zellen	47
3.1.3 Betäubung der Mäuse mit Isofluran®	48
3.1.4 Blutabnahme	48
3.1.5 Gewinnung von peritonealen Exsudatzellen.....	49
3.1.6 Organentnahme.....	49
3.2 Herstellung der Virusstocks	49
3.2.1 <i>In vivo</i> -Herstellung des Friend Virus Stocks	49
3.2.2 <i>In vivo</i> -Herstellung des mCMV-Stocks.....	50
3.3 Herstellung von Organhomogenisaten	50
3.4 Herstellung von Einzelzellsuspensionen	50

3.4.1 Isolierung von Milzzellen	50
3.4.2 Isolierung von Lymphozyten aus der Leber	50
3.5 Zellzahlbestimmung/Vitalitätstest	51
3.6 Zellkultur.....	52
3.6.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen	52
3.6.2 Auftauen und Kryokonservierung von Zellen	52
3.6.3 Zellpassage	52
3.7 Virusnachweis	53
3.7.1 Nachweis von infektiösen Zellen mittels des <i>Infectious Center Assays</i>	53
3.7.2 Nachweis von FV mittels quantitativer <i>Real Time</i> Polymerase-Ketten- reaktion (qRT-PCR)	54
3.7.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA mittels peqGold RNAPure®	54
3.7.2.2 Relative Quantifizierung der Genexpression mittels <i>Real Time</i> SYBR® Green PCR	55
3.7.2.2 Two Step TaqMan-PCR zur Quantifizierung von Friend Virus.....	56
3.7.3 Nachweis von mCMV mittels <i>Plaque Assay</i> (PA).....	58
3.8 Magnetisch-Aktivierte Zell-Sortierung (MACS).....	59
3.9 Durchflusszytometrie (FACS)	60
3.9.1 Oberflächenfärbung von Immunzellen	61
3.9.2 Ausschluss toter Zellen.....	62
3.9.3 Nachweis von FV-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen	63
3.9.4 Nachweis von funktionellen FV-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen	64
3.9.5 Nachweis von mCMV-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen mittels intrazellulärer Zytokinfärbung (ICS)	64
3.9.5.1 MHC-I Peptid-Stimulation.....	64
3.9.5.2 Intrazelluläre Zytokinfärbung (ICS)	65
3.9.6 Nachweis von Treg-Zellen	65
3.9.7 Nachweis von proliferierenden Zellen.....	66
3.9.7.1 Intrazelluläre Ki67-Färbung.....	66
3.9.7.2 Intrazelluläre BrdU-Färbung.....	66
3.10 Nachweis von FV-bindenden Antikörpern (ELISA).....	67
4. Ergebnisse	69
4.1 Untersuchungen des Einflusses von Treg-Zellen in chronisch FV- infizierten Tieren auf eine primäre mCMV-Infektion	69
4.1.1 Untersuchung des mCMV-Titers und der mCMV-spezifischen T- Zellantwort in mCMV-infizierten naiven bzw. chronisch FV-infizierten Mäusen	69

4.1.2 Erhöhte Anzahl an regulatorischen T-Zellen während einer chronischen FV-Infektion.....	73
4.1.3 Einfluss von Treg-Zellen auf die mCMV-spezifische T-Zellantwort von CD8 ⁺ T-Zellen in chronisch FV-infizierten Mäusen.....	74
4.1.4 Die mCMV-spezifische Immunantwort in peripheren Organen	77
4.1.5 Die mCMV-spezifische Immunantwort 15 Wochen nach primärer mCMV-Infektion in naiven und chronisch FV-infizierten Mäusen.....	80
4.2 Untersuchungen des Einflusses einer primären mCMV-Superinfektion auf eine chronische FV-Infektion	82
4.2.1 Effekt der mCMV-Infektion auf den FV-Titer	82
4.2.2 Einfluss einer primären mCMV-Superinfektion auf die Modulation des Immunsystems von chronisch FV-infizierten Tieren.....	83
4.2.3. Erhöhte Anzahl an F-MuLV-bindenden Antikörpern nach mCMV-Superinfektion in chronisch FV-infizierten Mäusen.....	89
4.2.4 Einfluss einer primären mCMV-Infektion auf die FV-spezifische Immunantwort	90
4.2.5 Treg-Zellen von FV-infizierten Tieren haben einen anderen Phänotyp als Treg-Zellen von mCMV-infizierten Tieren.....	95
5. Diskussion	99
5.1 Untersuchungen des Einflusses von Treg-Zellen in chronisch FV-infizierten Tieren auf eine primäre mCMV-Infektion	99
5.2 Untersuchungen des Einflusses einer primären mCMV-Superinfektion auf eine chronische FV-Infektion	106
6. Zusammenfassung.....	113
7. Literaturverzeichnis.....	114
8. Anhang	129
8.1 Abkürzungsverzeichnis	129
8.2 Abbildungsverzeichnis	136
8.3 Tabellenverzeichnis	139
8.4 Danksagungen.....	140
9. Lebenslauf.....	141
Erklärung:.....	144

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem

Im Laufe der Evolution haben Säugetiere und Insekten ein komplexes Netzwerk aus verschiedenen Zellen und löslichen Faktoren entwickelt, welches zur Abwehr von potentiell schädlichen Lebensformen dient und als Immunsystem bezeichnet wird. Das Immunsystem dient der Abwehr von Pathogenen und dem Erhalt von körpereigenen Geweben durch die Eliminierung alternder, entarteter oder infizierter Zellen. Während Wirbellose, wie Würmer, nur ein unspezifisches Immunsystem (angeborenes Immunsystem) besitzen, entwickelte sich das Immunsystem von Wirbeltieren zu einem komplexen System, welches zusätzlich zum angeborenen Immunsystem einen spezifischen Schutz gegen einzelne Erreger und ein immunologisches Gedächtnis für eine schnellere Abwehr bei einer Reinfektion mit dem gleichen Erreger bietet (206). Dieses wird als erworbenes Immunsystem bezeichnet.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Die angeborene Immunität wird innerhalb kürzester Zeit nach einer Infektion aktiv, weist aber keine Spezifität gegen das Pathogen auf. Zellen des angeborenen Immunsystems, zu denen dendritische Zellen (DCs), Makrophagen, Monozyten, neutrophile Granulozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gehören, erkennen über *Pattern recognition receptors* (PRR), wie den auf der Zelloberfläche oder endosomal vorkommenden *Toll-like* Rezeptoren (TLR-Rezeptoren), oder *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD) –ähnlichen Rezeptoren (NLR), spezielle pathogenassoziierte molekulare Muster (PAMPs). Bei den PAMPs handelt es sich um Strukturen, die ausschließlich auf oder in Krankheitserregern vorkommen. Hierzu gehört unter anderem (u.a.) das Lipopolysaccharid (LPS) auf gram-negativen Bakterien oder das Glykoprotein-G des *Vesicular Stomatitisvirus* (VSV), die vom TLR-4 erkannt werden (59,108,160), oder das vom TLR-5 erkannte Flagellin auf Bakteriengeißeln (133). Des Weiteren können virale Nukleinsäuren durch in der Endosomenmembran verankerten TLR-3, 7, 8 oder 9 erkannt werden (4,76). Die Aktivierung von TLR induziert eine intrazelluläre Signalkaskade, die u.a. zur Produktion von Zytokinen, wie Typ-I IFN, IL-6 und IL-12 führt. Durch die Produktion dieser pro-inflammatorischen Zytokine werden wiederum andere Immunzellen wie NK-Zellen aktiviert (28).

Lösliche Produkte des angeborenen Immunsystems, wie C3-Komponenten des Komplementsystems, das C-reaktive Protein (CRP), aber auch Effektormoleküle, zu denen z. B. Zytokine gehören, werden ebenfalls von Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt

und aktivieren Signalkaskaden, die eine Inflammation induzieren. Um infiziertes Gewebe zu erreichen, verlassen die Immunzellen in einem Adhäsionsmolekül und Chemokin vermittelten Prozess den Blutstrom. Nach Migration in das betroffene Gebiet wandern die Immunzellen entlang eines Konzentrationsgradienten von Chemokinen zum Entzündungs- bzw. Infektionsort (201). Die Eliminierung von Erregern erfolgt hauptsächlich über zwei Mechanismen: Über die Exozytose intrazellulärer Granula zwischen Zielzelle und Effektorzelle, oder durch Endozytose der Erreger mit anschließendem intrazellulärem Verdau in Endosomen oder Phagolysosomen.

DCs und Makrophagen sind in der Lage, die Erreger selbst oder Partikel von Erregern zu phagozytieren und diese in speziellen Phagolysosomen abzubauen (29). Eine rezeptor-vermittelte Endozytose ist ebenfalls möglich. Anschließend präsentieren sie die prozessierten Erregerpartikel über Haupthistokompatibilitätskomplexe der Klasse I (MHC-I) oder II (MHC-II) auf der Zelloberfläche und leiten als antigen-präsentierende Zellen (APCs) die Abwehrreaktionen des spezifischen Immunsystems ein (296).

Neutrophile Granulozyten besitzen in ihrem Zytoplasma eine Vielzahl von Lysosomen, die aufgrund ihres mikroskopischen Erscheinungsbildes als Granula bezeichnet werden. Bei Kontakt mit Erregern phagozytieren neutrophile Granulozyten die Erreger oder degradieren diese durch Ausschüttung ihrer intrazellulären Granula. In beiden Fällen werden die Erreger durch degradierende Enzyme abgetötet. Die Interaktion von neutrophilen Granulozyten mit Pathogenen stimuliert zudem die Sezernierung von pro-inflammatorischen Zytokinen und Prostaglandinen, die weitere Granulozyten und auch T-Zellen an den Infektionsort locken.

Die Hauptfunktion von NK-Zellen ist die Erkennung und Eliminierung intrazellulär infizierter Zellen und Tumorzellen (332). Für ihre Effektorfunktion besitzen NK-Zellen inhibierende und aktivierende Rezeptoren auf ihrer Oberfläche (164,174,315,317). Die Nomenklatur der NK-Zellrezeptoren unterscheidet sich zwischen Menschen und Mäusen. Zu den humanen inhibierenden Rezeptoren gehören z. B. die *killer cell-inhibitory cell receptors* (KIR-Rezeptoren) (222). Zu den aktivierenden Rezeptoren gehört z. B. DNAM-1 (164,281). Als Beispiel für einen murinen inhibierenden Rezeptor wird an dieser Stelle der Ly49I Rezeptor genannt (13,72) und für einen aktivierenden Rezeptore der Ly49H Rezeptor (290). Die Aktivierung einer NK-Zelle führt zur Sezernierung von zytotoxischen Molekülen, wie Perforin und Granzymen, was zur Lyse der Zielzelle führt (43,332).

1.1.2 Das erworbene Immunsystem

Charakteristisch für das erworbene Immunsystem ist eine ausgeprägte Spezifität gegen körperfremde Strukturen, sowie eine effiziente Zweitantwort bei wiederholtem Antigenkontakt, das als immunologisches Gedächtnis bezeichnet wird. Das erworbene Immunsystem besteht aus einer humoralen, B-Lymphozyten (B-Zellen) vermittelten und der zellulären, T-Lymphozyten (T-Zellen) vermittelten Immunantwort. Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem entfaltet das erworbene Immunsystem erst Tage nach der Infektion seine volle Funktionalität. B-Zellen entwickeln sich direkt aus hämatopoetischen Knochenmarkstammzellen und reifen im Knochenmark zu naiven B-Zellen heran. Nach Antigenkontakt differenzieren B-Zellen in Keimzentren (*germinal centers*) zu Antikörperproduzierenden Plasmazellen oder zu antigen-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen (180,283). T-Zellen entwickeln sich ebenfalls aus Knochenmarkstammzellen. Die Ausreifung von naiven $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen erfolgt im Thymus (119). Die Funktion von $CD8^+$ T-Zellen liegt in der Eliminierung infizierter und entarteter Zellen. $CD4^+$ T-Zellen regulieren durch die Sezernierung verschiedener Zytokine die Aktivität und die Rekrutierung von Effektorzellen wie Makrophagen. Zudem induzieren $CD4^+$ T-Zellen die Aktivierung und den Klassenwechsel von B-Zellen (210).

1.1.2.1 Die zelluläre Immunantwort

Nach der Reifung der T-Zellen verlassen die naiven $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen den Thymus und zirkulieren im Blut und in den peripheren lymphatischen Organen. Die Aktivierung von T-Zellen wird durch APCs, die körperfremde Peptide über MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche präsentieren, eingeleitet. Hierbei erkennen $CD4^+$ T-Zellen mithilfe ihres T-Zellrezeptors (TZR) Erreger, die ihnen von APCs über MHC-II Moleküle präsentiert werden (156). $CD8^+$ T-Zellen, erkennen hingegen Antigene, die ihnen von infizierten Zellen über MHC-Klasse-I Moleküle präsentiert werden (339); Parnes J.R., 1989), oder durch die so genannte *Cross-presentation*. Ein ko-stimulierendes Signal ist für eine vollständige Aktivierung notwendig. Dieses wird z. B. durch die Interaktion von B7-Proteinen (B7.1 oder B7.2) auf APCs mit CD28-Proteinen auf T-Zellen vermittelt (12). Ohne ein ko-stimulierendes Signal wird eine T-Zelle anerg, d.h. sie reagiert nicht mehr auf einen Antigenstimulus und ist funktionell inaktiv (267). Nach Antigenkontakt differenziert eine naive T-Zelle aus.

1.1.2.1.1 Zytotoxische T-Zellen (CTL)

Die Hauptfunktion von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen (CTL) ist die Erkennung und die Eliminierung von intrazellulär infizierten Zellen. Die Erkennung von infizierten Zellen führt zur Aktivierung einer CTL und zur Exozytose von intrazellulären zytotoxischen Granula, die mit verschiedenen zytotoxischen Molekülen, wie Zytokinen (TNF α , IFN γ), Proteasen (Granzymen) und lytischen Molekülen (Perforin) (255) gefüllt sind. Die Freisetzung von zytotoxischen Molekülen in den interzellulären Spalt zwischen der CTL und der Zielzelle induziert die Apoptose in der Zielzelle. Für die induzierte Apoptose sind im wesentlichen Granzyme und Perforine verantwortlich (36). Letztere rekrutieren die zytotoxischen Granula zur Membran der Zielzelle und führen selbst, unter dem Einfluss von Kalziumionen, zur Porenbildung in der Zellmembran der als fremd erkannten Zelle und folglich zur Lyse dieser Zelle (36). Granzyme gehören zur Familie der Serinproteasen. Das Granzym B (GzmB) aktiviert im Zytoplasma der Zielzelle die Cystein-Kaspase-3, was letztendlich zur Degradierung der DNA der Zielzelle führt (255). Darüberhinaus aktiviert GzmB das pro-apoptotische Protein BID, welches über die Freisetzung von Cytochrom-C aus den Mitochondrien zur Induktion der Apoptose führt (19,178). Das Granzym A gelangt nach der Freisetzung von Perforin, welches in der Zellkernmembran Poren bildet, in den Zellkern und induziert dort die Apoptose. Die Freisetzung von IFN γ steigert die Expression von MHC-I- und Fas-Molekülen auf Zellen (99,205) und aktiviert Makrophagen.

Neben dem Granula-Exozytose-Weg verfügen CTL auch über eine Fas/FasL vermittelte Zytotoxizität (294). Bei Antigenkontakt der CTL mit einer infizierten Zelle bindet der FasL einer CTL an den auf der Zielzelle befindlichen Fas-Rezeptor. Durch diese Interaktion kommt es zur Aktivierung von pro-apoptotischen Kaspasen, was zur Induktion der Apoptose in der Zielzelle führt (213). Neben der zytotoxischen Funktion haben CTL, durch die Freisetzung verschiedener Zytokine und Chemokine, wie zum Beispiel IFN γ , TNF α und Lymphotoxin- α (LT- α), eine antivirale Funktion (236). So hat das IFN γ neben einer direkten antiviralen Wirkung (121) auch eine indirekte Wirkung, in dem es die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf Zellen verstärkt (99), Makrophagen aktiviert (234), oder die Expression von Fas auf infizierten Zellen erhöht (205). TNF α und LT- α synergieren mit IFN γ und führen ebenfalls zu einer Aktivierung von Makrophagen. Zusätzlich führt die Bindung von TNF α und LT- α an den TNFR-1 zur Induktion der Apoptose der Zielzelle (318). Die beschriebenen Abläufe der direkten Zytotoxizität von CTL sind in Abbildung 1.1 dargestellt.

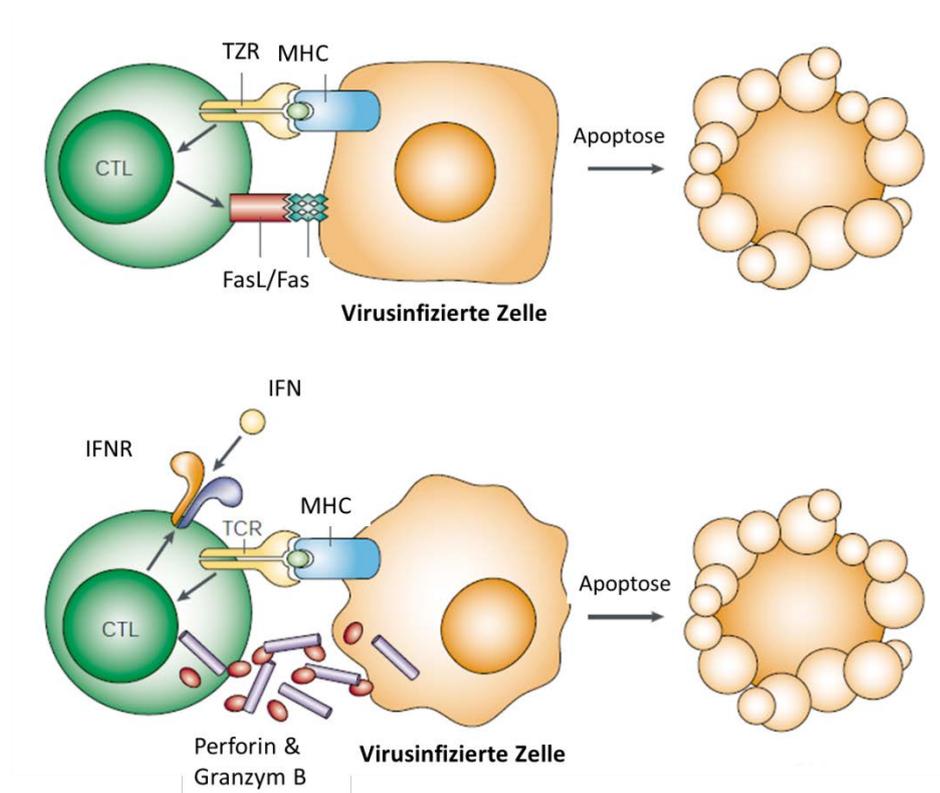


Abbildung 1.1: Mechanismen der T-Zell vermittelten Zytotoxizität.

Abgebildet ist der Fas/FasL vermittelte (obere Abbildung) und der Perforin/Granzym (untere Abbildung) Exozytose vermittelte Apoptoseweg. Modifiziert nach Trapani et al. (309).

1.1.2.1.2 T-Helferzellen

Zur Gruppe der $CD4^+$ T-Zellen gehören neben den T-Helferzellen (Th-Zellen) wie Th1-, Th2- und Th17-Zellen auch regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen). Gemeinsam ist diesen Zellen, dass sie mit Hilfe ihres TZR in Kombination mit dem CD4 Rezeptor Peptid-MHC-Klasse-II Komplexe auf APCs erkennen und so aktiviert werden. Th-Zellen besitzen im Gegensatz zu CTL kaum zytotoxische Aktivität, sie sind hingegen an vielen immunologischen Prozessen beteiligt und stimulieren über die Freisetzung verschiedener Zytokine die Aktivität anderer immunologisch aktiver Zellen. Ausschlaggebend für die weitere Differenzierung einer Th0-Zelle ist das umliegende Zytokinmilieu, das durch APCs bestimmt wird. So fördert die Sezernierung von IL-12 und $IFN\gamma$ die Differenzierung von naiven Th0-Zellen zu Th1-Zellen (138,269) und die Synthese des Zytokins IL-4 die Entwicklung von naiven Th0-Zellen zu Th2-Zellen (338). Die antigenspezifische Th-Zellantwort unterscheidet sich in ihrer Effektorfunktion und in ihrer Sekretion von Zytokinen (271). So sezernieren Th1-Zellen Zytokine wie IL-2, $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ und dominieren somit bei viralen Infektionen oder bei intrazellulären Bakterieninfektionen. Eine weitere wichtige Aufgabe von Th1-Zellen besteht

in der Aktivierung von Makrophagen. Th2-Zellen sezernieren vor allem IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Th2-Zellen sind somit überwiegend beteiligt an der Eliminierung von extrazellulären Pathogenen, wie Würmern und extrazellulären Bakterien (203). Sie stimulieren aber auch die Proliferation und Differenzierung von Prä-B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen.

1.1.2.1.3 Regulatorische T-Zellen

Bereits vor 1985 gab es erste Hinweise darauf, dass T-Zellen an der Verhinderung von Autoimmunerkrankungen beteiligt sind (257) und die Fähigkeit besitzen, die Immunantwort auf körpereigene und fremde Antigene zu kontrollieren (185). Aufgrund ihres suppressiven Phänotyps wurde diesen Zellen zuerst die Bezeichnung „Suppressor-T-Zellen“ zugeteilt (14). Sakaguchi *et al.*, fanden 1995 heraus, dass die Depletion von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in der Maus die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen zur Folge hatte, während der Transfer von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in depletierte Mäuse den Effekt wieder aufhob (258). Anhand dieser Experimente wurden regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen) als T-Zellen charakterisiert (258), die eine hohe Expression der alpha-Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) aufweisen und unabhängig von der Antigenpezifität regulierend und suppressiv auf die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen wirken (Abbildung 1.2) (280). Durch diese Erkenntnis, dass Treg-Zellen nicht nur einen suppressiven Phänotyp, sondern auch einen regulierenden Phänotyp haben, spricht man heutzutage von Treg-Zellen (21).

Grundsätzlich können Treg-Zellen in zwei Klassen unterteilt werden (Abbildung 1.2): Natürlich vorkommende Treg-Zellen (nTreg-Zellen) werden im Thymus generiert und repräsentieren etwa 5-10% aller CD4⁺ T-Zellen (195,277). Es wird vermutet, dass nTreg-Zellen potentiell autoreaktive T-Zellen sind, die im Thymus durch hochaffine Bindung an MHC-Moleküle mit Selbst-Antigen selektioniert werden und einen funktionellen $\alpha:\beta$ TZR aufweisen (279). Charakteristisch für nTreg-Zellen ist die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 (94,137) und eine starke Expression der α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) (14,258,302). Mit Hilfe von FoxP3 Knockout-Mäuse konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor FoxP3 essentiell für die Entstehung und die Funktion von nTreg-Zellen ist. So zeigten z. B. Fontenot *et al.*, dass die Abwesenheit von FoxP3, ebenso wie Mutationen im FoxP3 Gen, zu autoaggressiven T-Zellen (94) und zur Entstehung des sogenannten *scurfy mice* Syndroms führt (327), welches lethal ist und sich durch hyperreaktive CD4⁺ T-Zellen manifestiert. Beim Menschen entspricht diese Mutation dem Krankheitsbild des IPEX-Syndroms (*immune dysregulation, polyendocrinopathy and*

enteropathy, X-linked syndrome). Diese Autoimmunerkrankung ist gekennzeichnet durch eine Autoimmunität gegenüber endokrinen Organen und der Haut (24).

Der Transkriptionsfaktor FoxP3 repräsentiert zurzeit das spezifischste und bewährteste Markermolekül für murine Treg-Zellen (94,95). Im menschlichen Organismus exprimieren aber auch einige aktivierte T-Zellen ohne regulatorischen Charakter FoxP3, so dass FoxP3 im Menschen als Marker für Treg-Zellen nur bedingt geeignet ist (6,202). Die α -Kette des IL-2-Rezeptors ist ebenfalls kein spezifischer Marker für nTreg-Zellen, da sowohl murine als auch humane konventionelle T-Zellen diesen Rezeptor nach Aktivierung auf ihrer Oberfläche tragen. Es wurde jedoch gezeigt, dass für humane Treg-Zellen eine niedrige Expression der IL-7 α -Kette (CD127) charakteristisch ist (173,270). Daher können humane Treg-Zellen am besten mittels der Expression von $CD3^+CD4^+CD25^{high}CD127^{low}FoxP3^+$ identifiziert werden (145). Ihre immunsuppressive Rolle üben nTreg-Zellen u.a. auf $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und DCs auf.

Demgegenüber stehen induzierte Treg-Zellen (iTreg-Zellen), die in der Peripherie aus naiven $CD4^+$ T-Zellen durch Antigenstimulation (68,196) in Anwesenheit von TGF- β und IL-10 (53,93,196) oder durch orale Antigengabe (204,322) entstehen. Diese iTreg-Zellen zeigen eine variable FoxP3 und CD25 Expression. iTreg-Zellen stellen eine heterogene Zellpopulation dar, zu denen u.a. die T-Helferzellen 3 (Th3) und T-regulatorische Zellen-1 (Tr1) gehören (81,126). Neben den $CD4^+$ iTreg-Zellen existieren auch $CD8^+$ iTreg-Zellen, die ebenfalls regulatorische Eigenschaften besitzen (32,233). $CD8^+$ iTreg-Zellen wurden im Menschen und der Maus beschrieben (32). Von im Thymus generierten murinen $CD8^+$ nTreg-Zellen wurde ebenfalls berichtet. Das Vorkommen von humanen $CD8^+$ nTreg-Zellen wird diskutiert (66,233).

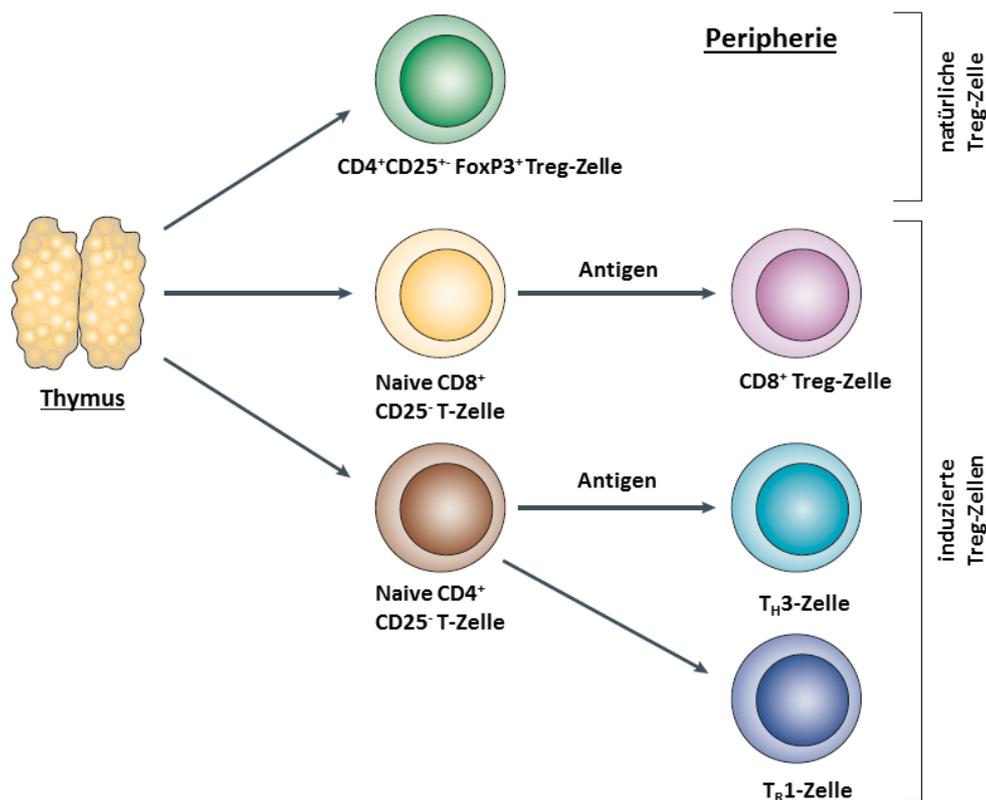


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung regulatorischer T-Zellpopulationen.

Regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen) können in mehrere Subpopulationen eingeteilt werden, zu denen die im Thymus generierten natürlichen $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen (nTreg-Zellen) und die in der Peripherie generierten induzierten Treg-Zellen (iTreg-Zellen) gehören. Werden naive $CD4^+$ T-Zellen mit Antigenen und TGF- β aktiviert, können Th3-Treg-Zellen entstehen. Antigenstimulation in Gegenwart von IL-10 führt hingegen zur Entwicklung von Tr1-iTreg-Zellen. Eine weitere Subpopulation stellen die $CD8^+$ iTreg-Zellen, die sich aus naiven $CD8^+$ T-Zellen nach Antigenstimulation entwickeln. Modifiziert nach Mill et al. (196).

Die Hauptaufgabe von Treg-Zellen besteht in der Regulierung des Gleichgewichts zwischen pro-inflammatorischen und anti-inflammatorischen Immunantworten (195). Dies ist von Bedeutung, da eine überschießende pro-inflammatorische Immunantwort zu schweren Gewebeschädigungen führen kann (22). Die Suppression von Immunzellen kann aber auch dazu führen, dass z. B. anti-tumorspezifische (147,158,329) und antivirale Immunantworten reduziert oder supprimiert werden (Abschnitt 1.1.2.4.1) (23,253). Des Weiteren sind Treg-Zellen an der Kontrolle der peripheren Toleranz und somit an der Verhinderung von Autoimmunerkrankungen beteiligt (137,259,277).

Für ihre suppressive Aktivität nutzen Treg-Zellen verschiedene direkte oder indirekte Mechanismen. Durch *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass Treg-Zellen durch die Sezernierung von Zytokinen, wie IL-10 und TGF- β (215,230), oder zytolytischen Molekülen,

wie Granzym A/B (117,125), eine direkte immunsuppressive Wirkung auf FoxP3⁻ Zellen erzielen. Weiterhin können Treg-Zellen durch die Konsumierung von IL-2 die Proliferation von FoxP3⁻ T-Zellen hemmen (225). Ein weiterer Mechanismus, durch den Treg-Zellen FoxP3⁻ T-Zellen supprimieren können, ist die Expression des Galaktose bindenden Proteins Galektin-1 (107). In allen Fällen führen die beschriebenen Mechanismen entweder zum Zellzyklusarrest oder zur Apoptose der Zielzelle (Abbildung 1.3).

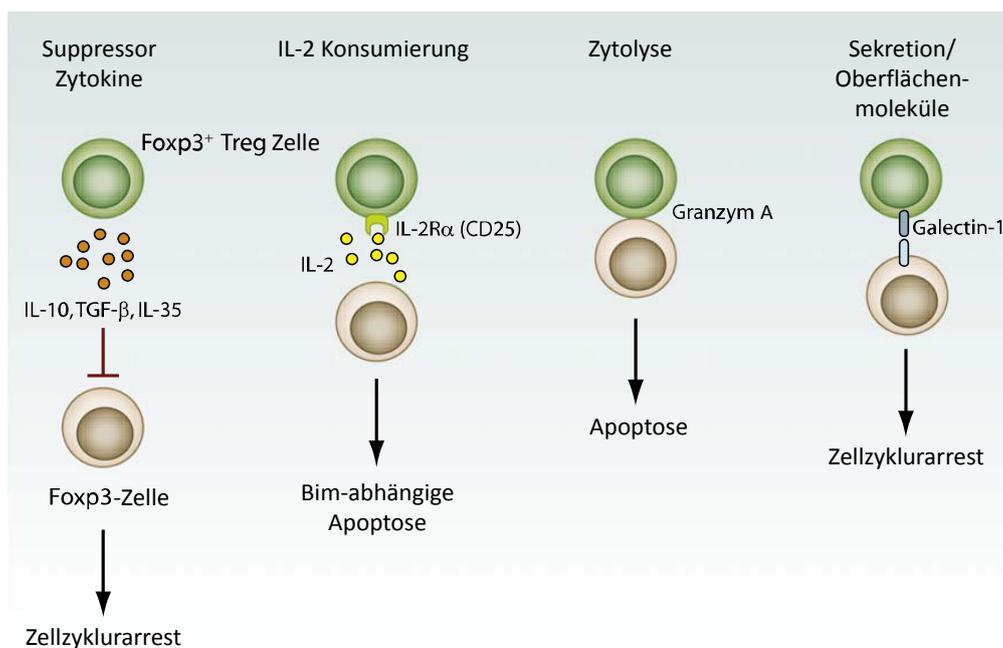


Abbildung 1.3: Hauptmechanismen, durch den Treg-Zellen Effektor T-Zellen supprimieren können.

Es sind bisher vier Hauptmechanismen bekannt, durch die Treg-Zellen FoxP3⁻-Zellen supprimieren können: **1.** Die Sezernierung von Zytokinen supprimiert FoxP3⁻ Zellen und führt zum Zellzyklusarrest. **2.** Die Konsumierung von IL-2 über den hochaffinen IL-2-Rezeptor einer Treg Zelle bewirkt die Einleitung der Apoptose über den proapoptotischen Faktor Bim in Foxp3⁻-Zellen. **3.** Die Ausschüttung von Granzymen führt zur Induktion der Apoptose in den Zielzellen. **4.** Die Bindung von Galektin-1 an die Responderzelle stoppt den Zellzyklus. Modifiziert nach Shevach et al. (278).

Indirekt sind Treg-Zellen in der Lage, über verschiedene Oberflächenrezeptoren, wie dem zytotoxischen T-Lymphozyten Antigen-4 (CTLA-4) (219,241), dem Lymphozyten-aktivierenden Antigen-3 (LAG-3) (170), CD39 (37) oder Neuropilin (Nrp-1) (261), die Aktivierung von DCs zu reduzieren. Dies führt letztendlich zu einer verminderten Kostimulation, oder zu einer verminderten Antigenpräsentation, wodurch die Aktivierung von Th-Zellen reduziert wird (Abbildung 1.4).

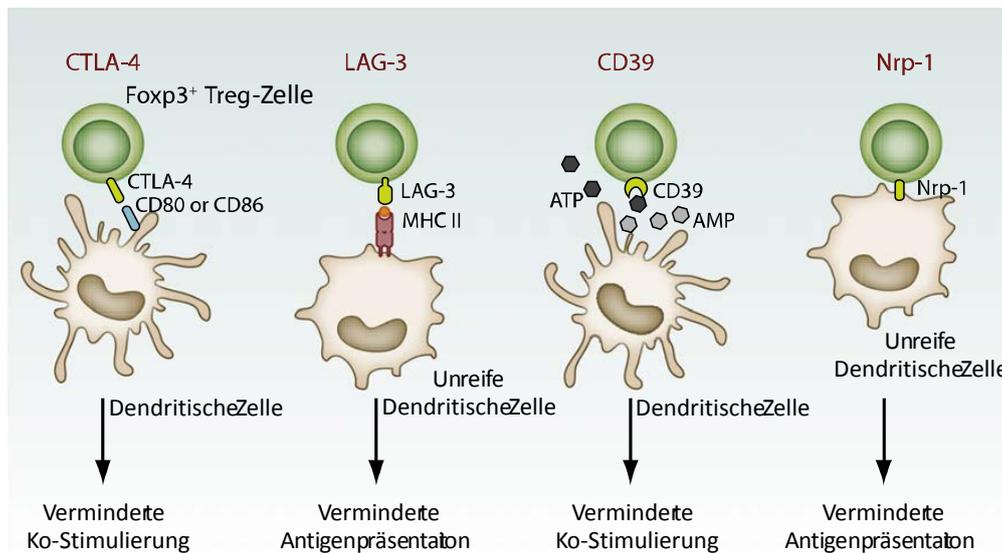


Abbildung 1.4: Hauptmechanismen, durch den Treg-Zellen die Funktion von antigenpräsentierenden Zellen supprimieren und indirekt die Aktivierung von Foxp3⁺ Zellen blockieren.

1. Die Expression von CTLA-4 auf der Oberfläche von Treg-Zellen führt zur verminderten Expression von CD80 und CD86 auf APCs. Durch diese Runterregulierung fehlt ein Ko-Stimulus, der wichtig für die Aktivierung von APCs und somit auch von T-Zellen ist. 2. Die Bindung der LAG-3 Moleküle auf Treg-Zellen mit MHC-II Molekülen von unreifen DCs führt zu einem inhibierenden Signal, das die Reifung von DCs verhindert und eine verminderte Antigenpräsentation zur Folge hat. 3. Extrazelluläres ATP fungiert als Indikator von Zellschäden und führt zur Aktivierung von DCs. Durch die Expression von CD39 kann extrazelluläres ATP entfernt werden. 4. Die Bindung von Neuropilin (Nrp-1) an DCs führt zu einer langanhaltenden Bindung zwischen der Treg-Zelle und DCs und verhindert so die Aktivierung von Effektorzellen. Modifiziert nach Shevach et al. (278).

1.1.2.1.3.1 Regulatorische T-Zellen in chronischen Virusinfektionen

Treg-Zellen spielen eine besondere Rolle in chronischen Virusinfektionen. In Studien konnte gezeigt werden, dass es in chronischen Virusinfektionen, wie z. B. den *Herpes-Simplex-Viren Typ-1/Typ-2* (HSV-1/HSV-2), dem *Hepatitis-C-Virus* (HCV), dem *Humanen-Immundefizienz-Virus-1* (HIV-1) oder dem *Friend Virus*, im Verlauf der akuten Phase der Infektion zu einer Expansion an Treg-Zellen kommen kann (128,184,298). Die erhöhte Anzahl an Treg-Zellen in diesen Infektionen ist wiederum mit einer Suppression von virusspezifischen T-Zellantworten assoziiert (9,75,254). Auf der einen Seite verhindert die Suppression von virusspezifischen T-Zellantworten, dass eine überschießende pro-inflammatorische Immunantwort und somit Gewebeschädigungen entstehen können. Auf der anderen Seite führt dies aber dazu, dass das Virus nicht vollständig eliminiert wird, was wiederum die Etablierung einer chronischen Infektion begünstigt (23) (Abbildung 1.5). Einige Viren haben Strategien entwickelt, die die antivirale T-Zellantwort reduzieren um eine Viruspersistenz

erleichtern. So stimulieren z. B. HIV und CMV Makrophagen zur Sezernierung von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 oder TGF- β (244). Sowohl TGF- β als auch IL-10 inhibieren über die Runterregulierung von MHC- und kostimulierenden Molekülen auf APCs die Proliferation von T-Zellen (195,200). Gleichzeitig induzieren TGF- β und IL-10 die Generierung von Treg-Zellen aus naiven CD4⁺ T-Zellen, die wiederum die Aktivität von Effektor T-Zellen supprimieren (53,188).

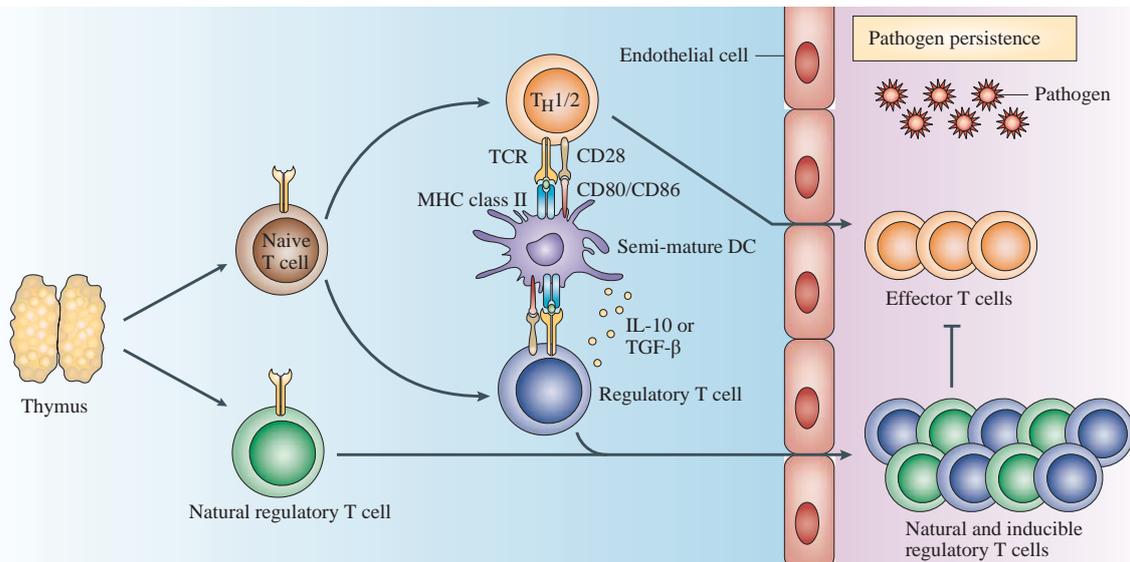


Abbildung 1.5: Protektive Immunität und Etablierung einer chronischen Infektion.

Die Aktivierung von T-Zellen in der Peripherie durch APCs wie DCs führt zur Differenzierung der T-Zellen in Effektor-T-Zellen und zur Sezernierung von pro-inflammatorischen Zytokinen. Die Aufgabe von Treg-Zellen ist es eine überschießende Immunantwort und somit eine Immunpathologie zu verhindern. Einige Pathogene sind in der Lage Zellen des angeborenen Immunsystems zur Produktion von IL-10 und TGF- β anzuregen, was in Kombination mit Treg-Zellen zur Suppression von pathogen-spezifischen T-Zellantworten und somit zur Verhinderung der Pathogenbeseitigung führt. Entnommen von Mills et al. (195).

Im Folgenden werden einige Beispiele für chronische Virusinfektionen erwähnt, in denen die erhöhte Anzahl an Treg-Zellen virusspezifische Immunantworten supprimieren. So ist zum Beispiel eine chronische HIV-Infektion nicht nur durch eine dauerhafte Aktivierung des Immunsystems gekennzeichnet (25,58,141), sondern auch durch eine Expansion von Treg-Zellen (58,146,218). Durch die Expansion von Treg-Zellen kommt es bereits vor dem Rückgang der CD4⁺ Zellen zur Suppression von HIV-spezifischen Immunantworten (1,9,323), was wiederum die Persistenz des Virus begünstigt.

Die Suppression von HCV-spezifischen T-Zellen durch IL-10 sezernierende Treg-Zellen in HCV-infizierten Patienten verhindert einerseits eine Leberentzündung, andererseits führt die Suppression von HCV-spezifischen T-Zellen dazu, dass das Virus im Körper persistieren

kann (45). Eine Treg-abhängige Suppression von virusspezifischen Immunantworten wurde ebenfalls für eine EBV-Infektion (316) und für eine HSV-1- (304,308) und HSV-2-Infektion beschrieben (75). Im entsprechenden HSV-1 Mausmodell konnte durch die Depletion von CD25⁺ T-Zellen eine erhöhte HSV-spezifische T-Zellantwort erreicht werden (304). Die Reduktion von pathogen-spezifischen Immunantworten durch Treg-Zellen wurde auch in bakteriellen Infektionen mit *Pneumocystis carini* und *Schistosoma mansoni* beschrieben (22,134,190).

1.1.2.1.3.1.1 Die Rolle von regulatorischen T-Zellen während einer Friend Virus Infektion

Charakteristisch für eine retrovirale Infektion mit dem Friend Virus ist ein durch Treg-Zellen vermittelter Funktionsverlust von FV-spezifischen T-Zellen. Innerhalb der ersten 10 Tage der Virusinfektion kommt es zu einer starken Aktivierung von FV-spezifischen CTL. FV-spezifische T-Zellen sind in der Lage, über die Sezernierung von zytotoxischen Molekülen wie GzmB und Perforin, FV-infizierte Zellen abzutöten. Die Sezernierung von IFN γ hat zudem eine direkte antivirale Wirkung (214,333,336). Der Peak dieser FV-spezifischen T-Zellantwort an Tag 10 korreliert somit mit einer abnehmenden Viruslast (335). FV-spezifische T-Zellen verlieren aber bereits am Tag 12 nach primärer FV-Infektion signifikant an Effektorfunktion (335) und bleiben im weiteren Verlauf der FV-Infektion dysfunktional (78,337). Dieser Funktionsverlust konnte auf eine starke Expansion von Treg-Zellen in unterschiedlichen Organen, wie der Milz und den Lymphknoten, zurückgeführt werden (334,336). Hierbei korreliert die Dysfunktion der FV-spezifischen T-Zellen mit der Expansion an Treg-Zellen (335). Durch die selektive Depletion von Treg-Zellen in DEREK-Mäusen konnte die Treg-vermittelte Suppression von FV-spezifischen T-Zellen aufgehoben werden, so dass FV-spezifische T-Zellen wieder expandierten und funktionell waren (77,335). Diese Depletionsexperimente zeigen, dass die Suppression der FV-spezifischen T-Zellantwort *in vivo* eine entscheidende Rolle spielt, um der FV-spezifischen Immunantwort zu entgehen, was in diesem Zusammenhang sehr wahrscheinlich zur Manifestation der viralen Persistenz beiträgt (77,335).

1.2 Heterologe Immunität

Gedächtnisimmunantworten aus einer früheren Virusinfektion können die Immunantwort und den Krankheitsverlauf mit nicht verwandten Infektionen beeinflussen (Heterologe Immunität) (272,326). Heterologe Immunreaktionen wurden bereits zwischen verschiedenen Pathogenen, wie Protozoen, Parasiten, Bakterien und Viren nachgewiesen (60,186,272). Die Auswirkungen der heterologen Immunität können jedoch in verschiedenen Individuen sehr unterschiedlich sein: So kann der Verlauf einer Infektion entweder positiv beeinflusst werden und zu einer schützenden Immunität mit reduzierter Pathogenlast führen, oder andererseits zu einer verstärkten Pathologie und zur Persistenz des Pathogens (51,52,272,325). Bis vor einigen Jahren wurde angenommen, dass diese unterschiedliche Pathogenese auf genetischen Varianzen, den Virusstamm und die Infektionsdosis zurückzuführen ist. Neuere Studien zeigen hingegen, dass die Immunantwort und der Verlauf einer zweiten Infektion durch die Reaktivierung bereits existierender Gedächtnis-T-Zellen, Antikörpern sowie durch ein moduliertes angeborenes Immunsystem, die in früheren Infektionen mit nicht verwandten Pathogenen entstanden sind, beeinflusst werden kann (64,272,273,321). Zu beachten bleibt, dass die heterologe Immunität nicht unmittelbar reziprok ist. So kann z. B. eine akute *Vaccinia-Virus* (VV) Infektion in *lymphozytären Choriomeningitis-Virus* (LCMV), *Pichinde-Virus* (PV) oder *Cytomegalovirus* (CMV)-immunisierten Mäusen zu einer Reduktion der VV-Last führen, während eine akute LCMV-Infektion in VV-immunisierten Mäusen zu keiner schützenden Immunität vor LCMV führt (Abbildung 1.6) (51,65).

		Challenge virus			
		LCMV	PV	MCMV	VV
Immunizing virus	LCMV	ND	+	+/-	++
	PV	+/-	ND	+	++
	MCMV	+	+/-	ND	++
	VV	-	-	-	ND

Abbildung 1.6: Schützende heterologe Immunität zwischen Viren.

Naive Mäuse wurden mit verschiedenen Viren immunisiert (Y-Achse) und mit anderen Viren sequentiell infiziert (X-Achse). 3-4 Tage nach der sequentiellen Infektion wurde der Virustiter des sequentiellen Virus analysiert. Die Abbildung zeigt die Stärke der schützenden Immunität, gemessen an der Reduktion der Virusreplikation. **LCMV**: lymphozytäres Choriomeningitis-Virus, **PV**: Pichinde-Virus, **MCMV**: murines Cytomegalovirus, **VV**: Vaccinia-Virus. **N.D.** unbestimmt, -: keine Veränderung im Virustiter, +/-: 2-5fache Reduktion des Virustiters, +: ~ 10fache Reduktion des Virustiters, ++, ~ 100fache Reduktion des Virustiters. Übernommen von Welsh et al. (326).

1.2.1 Mechanismen und Beispiele für Superinfektionen / sequentielle Infektionen

Bei der heterologen Immunität wird zwischen den so genannten Superinfektionen und den sequentiellen Infektionen unterschieden. Als Superinfektion werden primäre Infektionen in einem chronisch infizierten Wirt bezeichnet. Sequentielle Infektionen sind hingegen primäre Infektionen in einem immunen, also nicht chronisch infizierten Wirt.

Bisher stammen die meisten Informationen über die heterologe Immunität aus Studien zu heterologen sequentiellen Infektionen. Verschiedene Arbeitsgruppen haben z. B. gezeigt, dass heterologe Immunreaktionen durch die Reaktivierung von kreuzreaktiven T-Zellen hervorgehen können, die kreuzreaktive Epitope erkennen. Als kreuzreaktive Epitope werden Antigene von Erregern bezeichnet, die eine Ähnlichkeit zu Antigenen von anderen Erregern aufweisen und somit in der Lage sind, sowohl eine Immunantwort auf das Immunogen selbst, als auch auf das andere Antigen zu induzieren (273). Eine solche heterologe Immunität wurde z. B. für *Epstein-Barr-Virus* (EBV)-infizierte Menschen beschrieben (65), die eine infektiöse

Mononukleose haben (63). In dieser Studie von Clute et al. wird gezeigt, dass die Reaktivierung von kreuzreaktiven *Influenza-A Virus* (IVA)-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in Patienten mit einer akuten primären EBV-Infektion zu der, für eine infektiöse Mononukleose charakteristische, Proliferation von CD8⁺ T-Zellen beitragen und diese verstärken (63). Ebenso konnte die Entstehung einer fulminanten Hepatitis in HCV-infizierten Patienten mit IVA-kreuzreaktiven T-Zellen assoziiert werden (321).

Um heterologe Infektionen unter standardisierten Bedingungen zu untersuchen, wurden Mausmodelle zur Untersuchung der heterologen Immunität entwickelt (326). Ein Beispiel für die Folgen einer von murinen kreuzreaktiven T-Zellen vermittelten heterologen Immunreaktion ist in der Abbildung 1.7 dargestellt. Abgebildet ist die Erkennung von VV-Peptiden durch kreuzreaktive LCMV-spezifische CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen. Die Bindung von kreuzreaktiven LCMV-spezifischen T-Zellen an VV-Peptid/MHC-I-Komplexe aktiviert LCMV-spezifische T-Zellen, was zur Sezernierung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IFN γ führt. Die Produktion von IFN γ hat einerseits eine direkte antivirale Wirkung und reduziert die Virusreplikation. Andererseits steigert IFN γ die Aktivität von APCs, so dass eine starke Inflammation in der Lunge ausgelöst wird, die zu einer Pathologie in der Lunge führen kann (51).

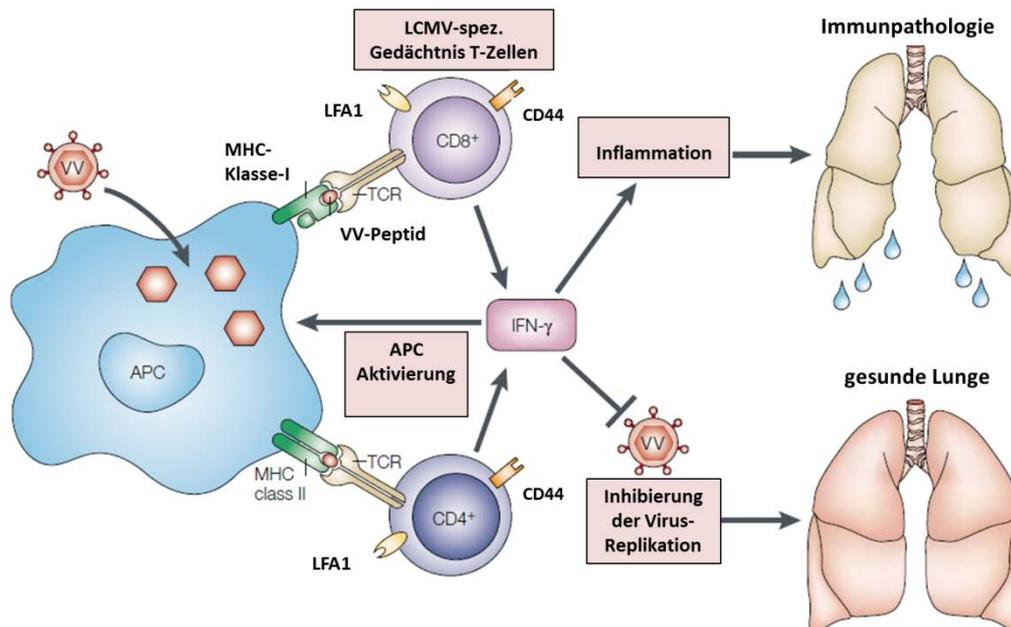


Abbildung 1.7: Modell für eine heterologe Immunreaktion in der Lunge.

Kreuzreaktive LCMV-spezifische Gedächtnis-T-Zellen werden durch VV-Antigene aktiviert und produzieren auf diesen Stimulus pro-inflammatorische Zytokine wie IFN γ . Die Sezernierung von IFN γ führt zu einer verstärkten Aktivierung von APCs und erhöht auf diesen Zellen die Expression von MHC-Molekülen. Durch die erhöhte Expression von MHC-Molekülen können weitere CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen aktiviert werden, was mit einer erhöhten Produktion an Effektormolekülen, wie IFN γ , einhergeht. Auf der einen Seite führt dies dazu, dass die Replikation des VV inhibiert und das

Lungengewebe vor Läsionen geschützt wird. Ist die pro-inflammatorische Immunantwort sehr stark, kann dies jedoch zu einer verstärkten Pathologie in der Lunge führen. Modifiziert nach Welsh et al. (326).

Heterologe Immunreaktionen können aber auch durch andere Immunzellpopulationen wie, Makrophagen und NK-Zellen, vermittelt werden. In einer Studie von Mackaness et al. wurde z. B. gezeigt, dass *Listeria monocytogenes* oder *Mycobakterium tuberculosis* aktivierte Makrophagen vor einer Infektion mit anderen Bakterien schützen (179). Des Weiteren können heterologe Immunreaktionen auch durch die Stimulierung von T-Zellen durch pathogen-induzierte Zytokine vermittelt werden. Eine Studie von Raue et al. zeigte z. B., dass LCMV-spezifische T-Zellen mit LPS-induziertem IL-12 und IL-18 zur Synthese von IFN γ stimuliert werden konnten (240).

Bisher gibt es nur wenige Studien, die sich mit Superinfektionen mit heterologen, d.h. nicht artverwandten Viren, beschäftigen. Im Folgenden werden einige Beispiele und Mechanismen von heterologen Superinfektionen beschrieben. So z. B. wurde in einer Studie Francois et al. nachgewiesen, dass die Sezernierung von IFN γ durch mCMV-induzierte NK-Zellen in persistierend mCMV-infizierten Mäusen, die mit dem *Friend Virus* superinfiziert wurden, zu einer Reduktion der FV-Last in der Milz führte (96). Des Weiteren zeigten Bukowski et al., dass NK-Zellen aus persistierend LCMV-infizierten Mäusen *in vitro* und *in vivo* in der Lage waren Tumorzellen zu lysieren. Somit konnten Bukowski et al. zeigen, dass NK-Zellen von persistierend LCMV-infizierten Mäusen zu einer schützenden Immunität gegen Tumorerkrankungen beitragen (42). Dass Makrophagen aus einer chronischen murinen Gammaherpesvirus-68 (γ HV68)-Infektion einen schützenden Effekt auf eine bakterielle Infektion mit *Listeria monocytogenes* und *Yersina pestis* haben können, geht aus der Studie von Barton et al. hervor (20). Auch hier trägt die transiente Produktion von IFN γ , sowie die transiente systemische Aktivierung von Makrophagen dazu bei, eine Abwehr gegen die genannten bakteriellen Erreger zu entwickeln. Zuniga et al. zeigten hingegen, dass eine persistierende LCMV-Infektion zu einer starken Reduzierung der Typ-I IFN Produktion durch plasmazytoide DCs (pDCs) führte, was mit der Dysfunktionalität von NK-Zellen korrelierte und zu signifikant höheren mCMV-Titern in LCMV+mCMV superinfizierten Mäusen führte (340).

1.3 Retroviren

Retroviren wurden zum ersten Mal Anfang des 20. Jahrhunderts beschrieben. In Studien zur Leukämie in Hühnern gelang es Vilhelm Ellermann und Oluf Bang 1908, Mäuseleukämieviren durch Ultrafiltration auf gesunde Hühner zu übertragen (89,90). 1911 entdeckte Peyton Rous, dass er mit ultrafiltrierten Extrakten aus Geflügelsarkomen diese Tumorerkrankung auf gesunde Hühner übertragen konnte (252). Rous erhielt hierfür 1966 den Nobelpreis für Medizin und das in den Extrakten enthaltene Retrovirus wurde nach ihm *Rous-Sarkomvirus* (RSV) benannt (303). In Untersuchungen zur Entstehung von malignen Milchdrüsenerkrankungen identifizierte John Bittner 1936 das *Maus-Mammatumor-Virus* (MMTV). In den darauf folgenden Jahren wurde eine weitere Vielzahl an Retroviren entdeckt, darunter das von Charlotte Friend entdeckte *Friend Virus* (FV) (98), das 1964 entdeckte *feline Leukämie-Virus* (FIV) (144), das 1980 beschriebene *humane T-Zell-Leukämie Virus* (HTLV-1) (103) und das erstmals 1983 in Affen gefundene *Simian-Immundefizienz-Virus* (SIV) (167). Lug Montaganier und Françoise Barre-Sinoussi charakterisierten um 1983 ein Retrovirus aus einem kaukasischen Patienten, der Symptome der erworbenen Immunschwäche AIDS (*acquired immune deficiency syndrome*) aufwies (18). Dieses humane Retrovirus wurde nach dem Erscheinungsbild der Erkrankung *humanes Immundefizienz-Virus* (HIV) genannt und ist heutzutage weltweit bekannt und verbreitet.

1.3.1 Der Aufbau von Retroviren

Die Familie der Retroviren gehört zu den RNA-Viren. Sie besitzen ein lineares, einzelsträngiges RNA-Genom mit positiver Polarität und einer Größe von 7-12 Kilobasenpaaren (Kbp). Retroviren weisen alle einen ähnlichen Aufbau mit einem Durchmesser von 80-120 nm auf. Die Hüllmembran stammt von der Lipiddoppelschicht der Wirtszelle und enthält das virale Hüllprotein (Env), das aus einem Transmembranprotein (TM) und einem an der Außenseite der Virushülle an das TM-Protein gekoppelten Oberflächenprotein (SU) besteht. Diese Glykoproteine vermitteln die Aufnahme des Virus über bestimmte Rezeptoren in die Wirtszelle. Auf der Innenseite der Hüllmembran befinden sich Matrixproteine (MA), die das Viruskapsid umgeben. Das Kapsid bildet eine Schale um den viralen Nukleoproteinkomplex (Core), der zwei Kopien einzelsträngiger genomischer RNA, die viruscodierende Reverse-Transkriptase, die Integrase und das Nukleokapsidprotein enthält (Abbildung 1.8).

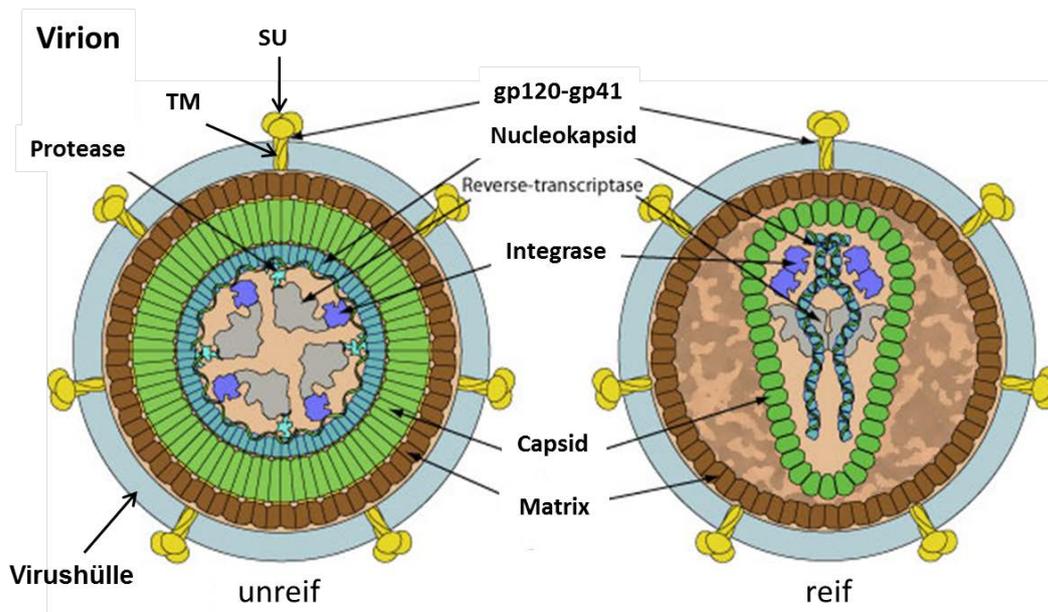


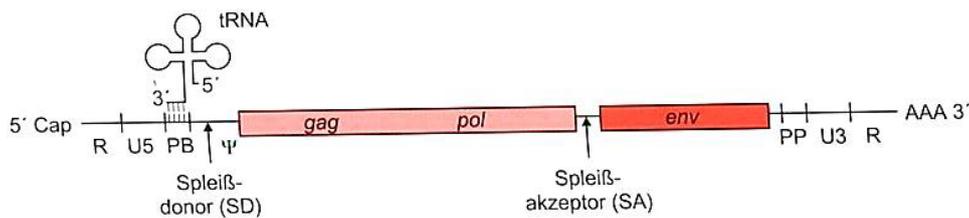
Abbildung 1.8: Aufbau von Retroviren am Modell des HIV.

Retroviren bestehen aus einer Lipiddoppelmembran, in die virale Glykoproteine (TM & SU) integriert sind. Die Bindung an zelluläre Rezeptoren wird durch die viralen Hüllproteine ermöglicht. Die Hülle umgibt das Kapsid, in welchem sich zwei Kopien viraler RNA befinden, sowie virale Proteine, wie die Integrase, die Reverse Transkriptase und das Nucleokapsidprotein, welches die RNA bindet. Matrixproteine verbinden das Kapsid direkt mit der Hüllmembran.

Modifiziert nach http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/7.html.

Das retrovirale Genom besteht in der Regel aus drei Genen: 1. das *gag*-Gen für die viralen Kapsidproteine (Kapsid, Matrix, Nucleokapsid), die die innere Struktur des Virus ausbilden. 2. das *pol*-Gen für die reverse Transkriptase, die Integrase sowie die Protease und 3. das *env*-Gen für die Hüllproteine (TM und SU) (Abbildung 1.9). Je nach Retrovirus sind aber noch weitere Proteine im Genom kodiert. Nach Umschreibung der RNA in doppelsträngige DNA durch die reverse Transkriptase vermittelt die Integrase den gerichteten Transport der viralen DNA in den Zellkern der infizierten Zelle, sowie den Einbau der viralen DNA in die zelluläre DNA, bevorzugt in Bereichen von aktivem Chromatin (114). Nach der Integration wird die DNA des Provirus durch die RNA-Polymerase-II und verschiedenen Transkriptionsfaktoren transkribiert. Die entstandene mRNA wird anschließend in das Zytoplasma transportiert und in virale Vorläuferproteine translatiert, so dass sich neue Viruspartikel zu Virionen zusammenbauen können, die nach der Reifung über Knospung freigesetzt werden. Neben den bereits beschriebenen Komponenten besitzen alle Retroviren das sogenannte *pro-Gen*, welches die Virusprotease synthetisiert.

A RNA-Genom des infektiösen Viruspartikels



B Integrierte Provirus-DNA

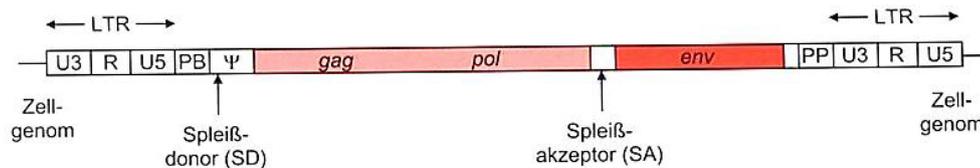


Abbildung 1.9: Genomorganisation der Retroviren.

Dargestellt sind für Retroviren charakteristische Sequenzelemente und Gene. (A) Anordnung der Sequenzelemente und offenen Leserahmen im RNA-Genom von infektiösen Viruspartikeln. Am 5'Ende ist das Genom mit einer Cap-Gruppe modifiziert, das 3'Ende ist polyadenyliert. An die Primerbindungsstelle (PB) ist eine tRNA gebunden, Ψ gibt die Sequenzfolge an, über die das RNA Genom mit den NucleoKapsidproteinen wechselwirkt. R: redundante Regionen, U3 und U5: unique Regionen am 3'und am 5'Ende; PP: Polyurindinstelle. SD kennzeichnet die Spleißdonor und SA die Spleißakzeptorstelle für die Synthese von env-codierten Proteinen. Die gag, pol und env-Proteine sind in Rot abgebildet. (B) Anordnung der Sequenzelemente und offenen Leserahmen im Genom des Provirus nach der Integration in das Wirtszellgenom. Die Long terminal repeats (LTR) kennzeichnen die Anordnung der Sequenzelemente, die im Verlauf der reversen Transkription entstehen. Entnommen aus Molekulare Virologie (303).

1.3.2 Die Biologie von Retroviren

Unterteilt wird die Familie der Retroviren in zwei Unterfamilien, zu denen die Orthoretrovirinae und die Spumavirinae gehören. Während die Spumavirinae nur die Gattung Spumavirus umfasst, wird die Orthoretrovirinae in sechs Genera unterteilt (α-, β-, γ-, δ-, ε-Retroviren, sowie die Gruppe der Lentiviren). Der Name Retroviren leitet sich von der für Retroviren charakteristischen **R**eversen **T**ranskriptase (16) und dem onkogenen Potential (**O**nkoviren) ab. Unterschieden wird zwischen *exogenen* und *endogenen* Retroviren. Exogene Retroviren besitzen in ihrem Genom alle notwendigen Informationen zum Ablauf eines Infektionszyklus und zur Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln. Die Übertragung von Viruspartikeln erfolgt horizontal von einem Organismus auf den anderen. Endogene Retroviren sind hingegen fest im Genom der Zellen des Wirtes integriert und werden vertikal über die Keimbahn übertragen. Fast alle diese Viren sind nicht infektiös, da ihnen essentielle genetische Informationen fehlen, wie zum Beispiel bestimmte Gene für Oberflächenproteine,

die für einen produktiven Infektionszyklus notwendig sind (303). Für die Verbreitung benötigen diese Viren ein Helfervirus, das ihnen die genetische Information für die Produktion infektiöser Partikel liefert.

1.3.3 Der Replikationszyklus von Retroviren

Damit Retroviren sich replizieren können, ist eine Infektion einer Wirtszelle notwendig. Hierfür bindet das Virus über die externen viralen Glykoproteine der Virushülle an seinen Rezeptor auf der Wirtszelle. Im Falle des HIV ist dies das gp120 Protein, welches mit dem CXCR4-Rezeptor auf CD4⁺ T-Zellen oder dem CCR5-Rezeptor auf CD4⁺ T-Zellen und Makrophagen, interagiert (Abbildung 1.10, Schritt 1). Durch strukturelle Umlagerungen der Hüllproteine wird die Fusion der Virushüllmembran mit der Zytoplasmamembran der Wirtszelle eingeleitet. Nach der Fusion gelangt das Kapsid in das Zytoplasma der Wirtszelle (2). Im Zytoplasma löst sich das Kapsid auf, und das RNA-Genom und virale Enzyme werden freigesetzt (3). Das einzelsträngige RNA-Genom des Virus wird anschließend durch die Reverse Transkriptase in doppelsträngige komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Nach der Transkription wird die cDNA durch zelluläre, als auch virale, Proteine in den Zellkern transportiert und mit Hilfe der Integrase in das Wirtszellgenom integriert (4). Die Provirus-DNA wird anschließend durch die RNA-Polymerase II und verschiedenen Transkriptionsfaktoren der Zelle transkribiert. Die entstandene mRNA wird ins Zytoplasma geschleust und hier translatiert (5). Die viralen Proteine lagern sich an der Zytoplasmamembran zusammen (6). In Folge dessen kommt es zur Knospung unreifer Viruspartikel von der Zelloberfläche. Durch das sogenannte *Budding* schnüren sich die Viruspartikel von der Zytoplasmamembran ab. Innerhalb des unreifen Partikels schneidet die Protease autokatalytisch das Vorläuferpolyprotein und spaltet die *Gag*- und *Pol*-Vorläuferproteine im Viruspartikel. Die Reifung des neuen Viruspartikels erfolgt durch Zusammenlagerung der Kapsidproteine, und die Spaltung der Vorläuferproteine wird abgeschlossen (7) (Abbildung 1.10).

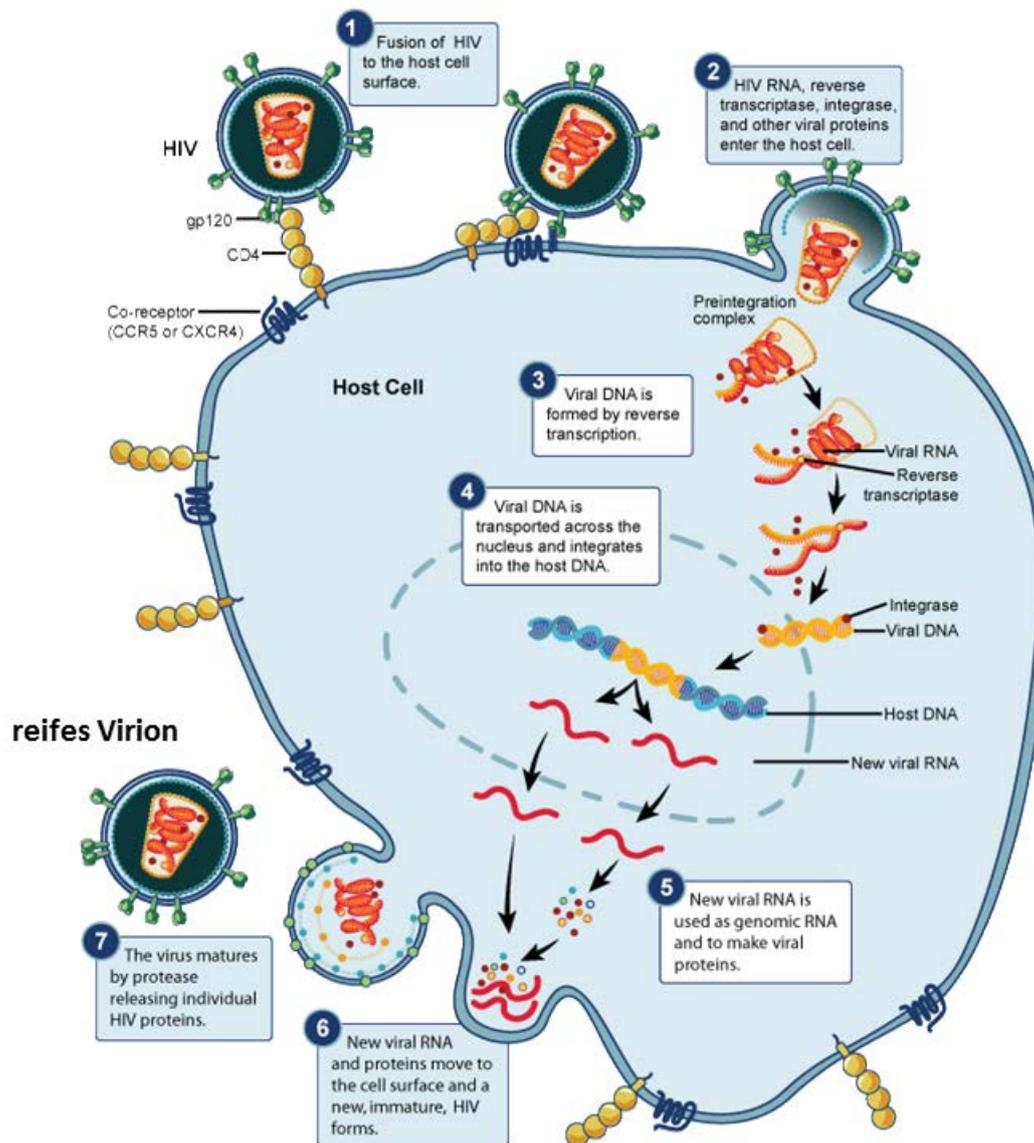


Abbildung 1.10: Replikationszyklus von Retroviren.

1. Bindung des Viruspartikels an den virusspezifischen Rezeptor an der Wirtszelloberfläche
2. Fusion der Virushüllmembran mit der Wirtszellmembran mit anschließender Integration des Viruskapsids
3. Reverse Transkription der viralen RNA in cDNA
4. Transport der DNA in den Zellkern und Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom mit anschließender Transkription des Provirus
5. Transport viraler RNA in das Zytoplasma und Translation der genomischen RNA in virale Proteine
6. Assemblierung der viralen Proteine an der Zellmembran und Bildung von unreifen Viruspartikeln
7. Reifung der neuen Viruspartikel

Modifiziert nach <http://www.niaid.nih.gov/topics/HIVAIDS/Understanding/Biology/pages/hivreplicationcycle.aspx>.

1.3.4 Das humane Immundefizienz Virus (HIV)

Die ersten Berichte über die heute weltweit verbreitete Immunschwäche AIDS wurden 1981 über die amerikanische Behörde *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) veröffentlicht. Bei einer Gruppe von fünf Männern wurde damals eine schwere, opportunistische Lungeninfektion festgestellt, deren Übertragung schon damals auf ein im Blut oder Blutprodukt vorhandenes Virus schließen ließ (Modrow, Allgemein Virologie). 1983 entdeckte die Forschergruppe um F. Barre-Sinoussi, J.C Chermann und L. Montagnier am Pasteur Institut in Paris ein bisher unbekanntes Retrovirus (18), das bald darauf mit der erworbenen Immunschwäche AIDS in Verbindung gebracht wurde (40). Das Virus wurde ab 1986, den Krankheitssymptomen entsprechend, als humanes Immundefizienz-Virus Typ-1 (HIV-1) bezeichnet. Forschungen haben ergeben, dass das HIV-1 das Resultat zoonotischer Übertragungen des bei Schimpansen vorkommenden SIV auf den Menschen ist, und seinen Ursprung in Afrika hat (104,275). 1986 wurde ein zweites HI Virus (HIV-2) aus einem westafrikanischen AIDS-Patienten isoliert (61). Auch hier scheint das Virus von Mangaben (SIVsm) auf den Menschen übertragen worden zu sein (105,245,275). Obwohl HIV-1 nur zu 60% sequenzhomolog zu HIV-2 ist, unterscheiden sich die zwei Subtypen kaum hinsichtlich ihres Krankheitsverlaufs (40). Im Unterschied zu einer HIV-1 verläuft eine Infektion mit HIV-2 jedoch weniger progressiv und ist mit einem niedrigeren Virustiter verbunden (10,26). Dementsprechend ist eine HIV-2-Infektion mit einer geringeren Sterberate verbunden (182). Nach Schätzungen sind etwa 1-2 Millionen Menschen in Westafrika mit HIV-2 infiziert, in anderen Regionen der Welt tritt das HIV-2 weniger häufig auf (46). Demgegenüber sind heutzutage etwa 34 Millionen Menschen weltweit mit HIV-1 infiziert und jedes Jahr infizieren sich etwa weitere 2,5 Millionen Menschen mit HIV-1 (WHO, Stand November 2011). Im Jahr 2011 sind weltweit etwa 1,7 Millionen Menschen an AIDS verstorben, darunter 230.000 Kinder unter 15 Jahren (WHO, Stand November 2011). Bis jetzt gibt es keinen Impfstoff, der vor einer HIV-Infektion schützt. Die hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) stellt zurzeit die wirksamste antiretrovirale Therapie dar (165). Bei dieser Therapie handelt es sich um eine Kombination mehrerer antiviraler Wirkstoffe, zu denen mindestens zwei reverse-Transkriptase-Hemmer und ein Proteaseinhibitor gehören (165).

Gemeinsam ist den HI-Viren, dass sie spezifisch Zellen infizieren, die den CD4-Rezeptor auf der Zelloberfläche tragen (245). Hierzu gehören neben T- und B-Zellen, auch Monozyten und Makrophagen (70,154,262). T-Zell-trope (X4-Viren) HI-Viren infizieren Zellen, die den CD4 Rezeptor und den Chemokinrezeptor CXCR4 auf der Zelloberfläche tragen (246,285). HI-Viren, die CD4⁺ Zellen in Kombination mit dem CCR5-Rezeptor erkennen und bevorzugt

Makrophagen oder Monozyten infizierten, werden den R5-tropen Viren zugeordnet (39,74,135). Infolge einer HIV-Infektion kommt es zu einer fortschreitenden Abnahme von CD4⁺ Zellen. Ist die Anzahl an CD4⁺ Zellen unterhalb von 200 Zellen/μl, treten häufig opportunistische Infektionen auf, die die Replikation des HI-Virus begünstigen (Abbildung 1.11). Oftmals versterben HIV-Patienten im AIDS-Stadium an den Folgen einer opportunistischen Infektion (siehe 1.3.4.1).

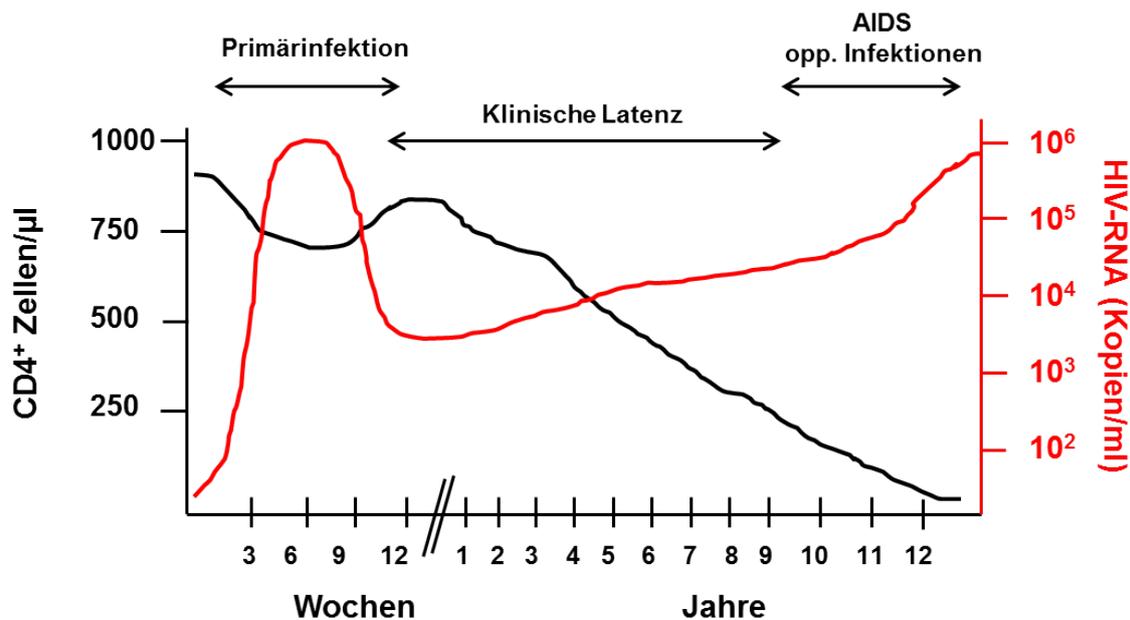


Abbildung 1.11: Verlauf einer HIV-Infektion.

In schwarz abgebildet ist der zeitliche Verlauf der CD4⁺ T-Zellen/μl Blut, in rot sind die HIV RNA-Kopien/ml Blut dargestellt. Auf der X-Achse ist der zeitliche Verlauf, von der Primärinfektion über die klinische Latenzphase bis zur Entwicklung von AIDS, abgebildet. Mit Abnahme der CD4⁺ T-Zellen kommt es zur rapiden Zunahme der Viruslast und zur Entwicklung von opportunistischen Infektionen. Der Patient verstirbt im AIDS-Stadium, unter dem Versagen der Immunabwehr, an opportunistischen Erregern. Modifiziert nach Molekulare Virologie (303).

1.3.4.1 HIV und Koinfektionen

Nach einer meist asymptomatischen Phase kommt es mit dem Fortschreiten einer HIV-Infektion zur Entwicklung von AIDS und vermehrt zu klinischen Symptomen, wie Fieber, Nachtschweiß sowie zu einem Gewichtsverlust. Opportunistische Infektionen und/oder maligne Tumoren, wie das Kaposi-Sarkom, treten in diesem Stadium immer häufiger auf und gelten allgemein als AIDS-definierte Markerinfektionen (303). Als Anzeichen für das Fortschreiten einer HIV-Infektion gilt die Reduktion der Anzahl an CD4⁺ T-Zellen. Als kritischer Wert gilt eine Anzahl von 200 CD4⁺ T-Zellen pro μl (73). Die meisten AIDS-Patienten versterben jedoch nicht aufgrund des HI-Virus, sondern an den Folgen der HIV-

vermittelten Immunsuppression und an den Folgen von opportunistischen Infektionen (123). Neben bakteriellen Infektionen, wie die von *Pneumocystis-carinii* ausgelöste Pneumonie, treten Pilzinfektionen, wie die durch *Candida-albicans* hervorgerufenen Infektionen der oberen und unteren Atemwege, oder Parasiteninfektionen, wie die durch *Toxoplasma-gondii* ausgelöste Toxoplasmose, auf (48). Häufig kommt es im dritten Stadium der HIV-Infektionen zur Reaktivierung latenter Viren. So leiden AIDS-Patienten oft an durch *Herpes-Simplex-Viren* verursachten Ulzerationen (15) oder an einer Ösophagitis (216). Besonders häufig kommt es in diesem Stadium der AIDS-Erkrankung zu einer Reaktivierung einer latenten *Cytomegalovirusinfektion* (CMV) (102,216,289). Eine CMV-Infektion ist assoziiert mit der Progression einer HIV-1-Infektion und erhöht die Sterblichkeit in adulten Patienten (123,256,320). Patienten ohne HAART, deren Anzahl an CD4⁺ T-Zellen unter 200/μl liegen, haben ein sehr hohes Risiko an einer CMV-Retinitis, an gastrointestinalen Ulzerationen oder an einer Enzephalitis zu erkranken (85,102,109,260). Neben diesen opportunistischen Effekten, kann eine CMV-Infektion synergistisch auf eine HIV-Infektion wirken (115). So kann es zum Beispiel in Folge einer CMV Reaktivierung zur Sezernierung von Zytokinen kommen, die zu einer Transaktivierung der HIV-1-Genexpression und in Folge dessen, zu einer Aktivierung von latentem HIV-Provirus führen (62), wodurch die Progression von AIDS gefördert wird (123). Zudem kann eine CMV-Infektion über die Induktion der Expression von Fc-Rezeptoren auf CMV-infizierten Zellen dazu beitragen, dass auch Zellen wie Fibroblasten, die normalerweise nicht suszeptibel für das Virus sind, mit HIV infiziert werden können (189). Auch in HIV-Patienten unter HAART sind Reaktivierungen von latentem CMV immer noch häufig, die klinische Manifestation ist hingegen stark gesunken (73). Durch eine Therapie von HIV-Patienten mit u.a. Ganciclovir soll das Risiko einer Reaktivierung von latentem CMV zusätzlich vermindert werden.

1.3.5 Das Friend Retrovirus

Das *Friend Virus* (FV) ist ein murines onkogenes γ -Retrovirus, das Mitte des 20. Jahrhunderts durch Charlotte Friend entdeckt wurde (98). Das FV ist ein Komplex aus dem pathogenen replikationsdefizienten *spleen focus-forming Virus* (SFFV) und dem replikationskompetenten apathogenen *Friend Murine Leukemia Virus* (F-MuLV). Beide Viren weisen hohe Sequenzhomologien auf, jedoch ist das SFFV durch größere Deletionen im *gag*-Gen nicht in der Lage, virale Partikel zu bilden. Die Koinfektion einer Wirtszelle mit beiden Viren (F-MuLV und SFFV) ermöglicht es dem SFFV, seine RNA in F-MuLV kodierende Viruspartikel zu verpacken und führt somit zur Verbreitung des SFFV. Eine Infektion mit F-

MuLV verläuft in adulten Mäusen apathogen. In neugeborenen Mäusen, die noch kein voll ausgebildetes Immunsystem haben, verursacht F-MuLV hingegen eine Splenomegalie, Anämie sowie eine Erythroleukämie (98). Die Infektion von F-MuLV findet über den mCAT-1-Rezeptor statt (3), der auf fast allen Mauszellen (331) wie Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Erythrozytenvorläuferzellen vorkommt (80). Der Rezeptor für das SFFV ist bisher noch unbekannt (69).

Wichtig für den Verlauf einer FV-Infektion ist u.a. der genetische Hintergrund des Mausstamms. Hierbei werden Mäuse, die nach der FV-Infektion eine maligne Erythroleukämie entwickeln, als FV-suszeptibler Mausstamm bezeichnet (z. B. CB6F1-Mäuse) und Mäuse, die nach der FV-Infektion eine vorübergehende Splenomegalie entwickeln, die FV Replikation jedoch kontrollieren können, als FV-resistenter Mausstamm (z. B. C57BL/6-Mäuse). Die Resistenz gegen FV wird durch eine Reihe von Genen vermittelt, wozu vier MHC (H-2)-Gene (55,171) gehören, die die zelluläre und humorale Immunantwort beeinflussen, sowie das *Recovery from FV gene-3* (Rfv-3), das die FV Virämie kontrolliert und die Bildung von FV-spezifischen Antikörpern begünstigt (56). Zusätzlich existieren sechs Gene (Fv1-Fv6), die eine Resistenz auf nicht-immunologischer Grundlage induzieren (299). Die in dieser Arbeit verwendeten C57BL/6-Mäuse mit einem H-2^b-Haplotyp gehören aufgrund des Fv-2 Gens zum FV-resistenten Mausstamm (136,227), während z. B. CB6F1-Mäuse mit einem H2-^{a/b}-Haplotyp suszeptibel sind und drei bis vier Wochen nach primärer FV-Infektion eine letale Erythroleukämie ausbilden (131).

1.3.5.1 Pathogenese einer FV-Infektion

In der akuten Phase der FV-Infektion werden hauptsächlich die Erythrozytenvorläuferzellen, sowie sich teilende Zellen, wie Lymphozyten, mit FV infiziert (80,131). Die Infektion mit SFFV führt zur Expression des *env*-kodierte Glykoproteins gp55, welches in kleinen Mengen auf der Oberfläche von infizierten Zellen detektierbar ist (47). Das gp55 bindet und aktiviert den Erythropoetin-Rezeptor auf kernhaltigen Ter119⁺ Erythrozytenvorläuferzellen und wirkt somit als konstitutives Mitogen, welches zu einer polyklonalen Proliferation der Zielzellen führt (69). Die in dieser Arbeit verwendeten C57BL/6-Mäuse bilden eine schützende Immunantwort gegen das FV aus und erkranken nicht an einer Erythroleukämie. Diese Mäuse entwickeln aber aufgrund der Integration in das Wirtszellgenom eine lebenslange Persistenz des FV (129). Während der akuten FV-Infektion kommt es in diesen Mäusen durch die FV-induzierte Proliferation von Ter119⁺ Erythrozytenvorläuferzellen zu

einer milden Splenomegalie, die sich innerhalb von 2-3 Wochen zurückbildet (132). Obwohl die Mäuse durch eine effektive T- und B-Zellantwort in der Lage sind, die Virusinfektion zu kontrollieren, ist es diesen Mäusen nicht möglich, das FV vollständig zu eliminieren (54). Das FV persistiert hierbei lebenslang in einer kleinen Subpopulation von B-Zellen (130) und auch in Granulozyten (Zelinskyy et al., unpublizierte Daten).

1.3.5.2 Die chronische FV-Infektion

Während der chronischen FV-Infektion kontrollieren vor allem Th1-Zellen die FV-Infektion (130,142). Die direkte antivirale Wirkung von CD4⁺ T-Zellen wird vor allem über die Produktion von IFN γ gesteuert. Die Sezernierung von IFN γ hat einen direkten inhibierenden Effekt auf die Virusproduktion und erhöht zudem die Zytotoxizität von FV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen. Interessanterweise wurde gezeigt, dass CD8⁺ T-Zellen, welche essentiell für die Kontrolle der akuten FV-Infektion sind (247), nicht an der Kontrolle einer chronischen FV-Infektion beteiligt sind (78,130). Studien zur Funktionalität von virusspezifischen CD8⁺ T-Zellen in chronisch FV-infizierten Mäusen zeigten, dass diese dysfunktional sind und weder IFN γ sezernierten noch andere antivirale Moleküle wie GzmB degranulierten (78,249,337). Iwashiro et al. zeigte bereits 2001, dass eine chronische FV-Infektion mit einer erhöhten Anzahl an Treg-Zellen verbunden ist, die die Generierung von CTL und anti-Tumor-CD8⁺ T-Zellantworten supprimierten (142). In darauf folgenden Transferexperimenten konnte gezeigt werden, dass der Transfer von Treg-Zellen aus chronisch FV-infizierten Mäusen in akut FV-infizierten Mäusen virusspezifische CD8⁺ T-Zellen supprimieren konnten, während der Transfer von Treg-Zellen aus naiven Mäusen zu keiner Suppression von FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen führte (78). Diese Experimente zeigten zum ersten Mal, dass Treg-Zellen nicht nur Autoimmunantworten supprimieren, sondern auch virusspezifische Immunantworten.

In Kinetikexperimenten wurde der Funktionsverlust von FV-spezifischen CTL genauer analysiert. Es zeigte sich, dass FV-spezifische CD8⁺ T-Zellen bereits an Tag 14 nach primärer FV-Infektion ihre antivirale Effektorfunktion verloren. Hierbei korrelierte die FV-spezifische Immunantwort an Tag 10 nach FV-Infektion mit einer signifikanten Zunahme an GITR⁺ und CD103⁺ Treg-Zellen (336). Mit Hilfe von genetisch veränderten DEREK-Mäusen, die ein Diphtheriatoxinrezeptor/eGFP-Fusionsprotein unter der Kontrolle des FoxP3 Promotors exprimieren (162), wurden daraufhin selektiv FoxP3 exprimierende T-Zellen durch Injektionen mit Diphtheriatoxin (DT) depletiert. Die *in vivo*-Depletion von Treg-Zellen bestätigte, dass die Suppression von FV-spezifischen CTLs, die zwischen den ersten 12-20

Tagen nach primärer FV-Infektion beginnt, auf Treg-Zellen zurückzuführen war (335,336). Durch die Depletion von Treg-Zellen in chronisch FV-infizierten Mäusen kann somit die Treg-vermittelte Suppression von FV-spezifischen T-Zellen aufgehoben werden, so dass FV-spezifische CTL wieder in der Lage sind, antivirale Moleküle, wie $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$, zu sezernieren, was zu einer Reduktion der FV Viruslast führt (77). Trotz Behandlung mit DT ist eine vollständige Eliminierung von Treg-Zellen in DEREK-Mäusen jedoch nicht möglich.

1.4 Herpesviren

Herpesviren gehören zur Familie der Herpesviridae, infizieren Wirbeltiere und lassen sich anhand ihrer Pathogenität, der Wirtsspezifität und ihrer Vermehrungseigenschaften in α -, β - und γ -Herpesviren einteilen. Herpesviren zeigen alle eine sehr große Homologie im Aufbau ihres Genoms, welches > 200 kB groß sein kann, als auch in ihrer Partikelmorphologie. Aufgrund ihrer Wirtsspezifität und ihres Zelltropismus infizieren Herpesviren nur bestimmte Spezies und Zellen. Die Infektion ist hierbei - je nach Herpesvirus - gegen eine Vielzahl von Zellen wie B-Zellen, Epithelzellen, Monozyten, Makrophagen und Nervenzellen gerichtet. Charakteristisch für Herpesviren ist die Fähigkeit, nach der Erstinfektion lebenslang im Körper zu bleiben. Zumeist gehen Herpesviren in eine Latenzphase über, in der kaum eine Virusreplikation stattfindet, eine Reaktivierung der Replikation aber möglich ist.

1.4.1 Der Aufbau von Herpesviren

Die Herpesviren sind umhüllte DNA-Viren mit einem doppelsträngigen, linearen DNA-Genom mit einer Größe von etwa 120 bis 230 kB, welches von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben ist. Insgesamt kodiert die doppelsträngige DNA für bis zu über 200 Genprodukte. Die Expression der einzelnen Gene wird jeweils durch einen eigenen Promotor kontrolliert. Im Inneren des Nukleokapsids findet man zudem das Virus-Core, eine fibrilläre Proteinmatrix, die mit dem DNA-Genom assoziiert ist (Abbildung 1.12). Zwischen dem Kapsid und der von der Zellkernmembran abgeleiteten Hüllmembran befindet sich das Tegument, welches verschiedene regulatorische Proteine enthält. Umgeben sind Herpesviren von einer Hüllmembran, in die unterschiedliche virale Glykoproteine integriert sind. Die Virionen der Herpesviren haben einen Durchmesser von etwa 150-200 nm (250).

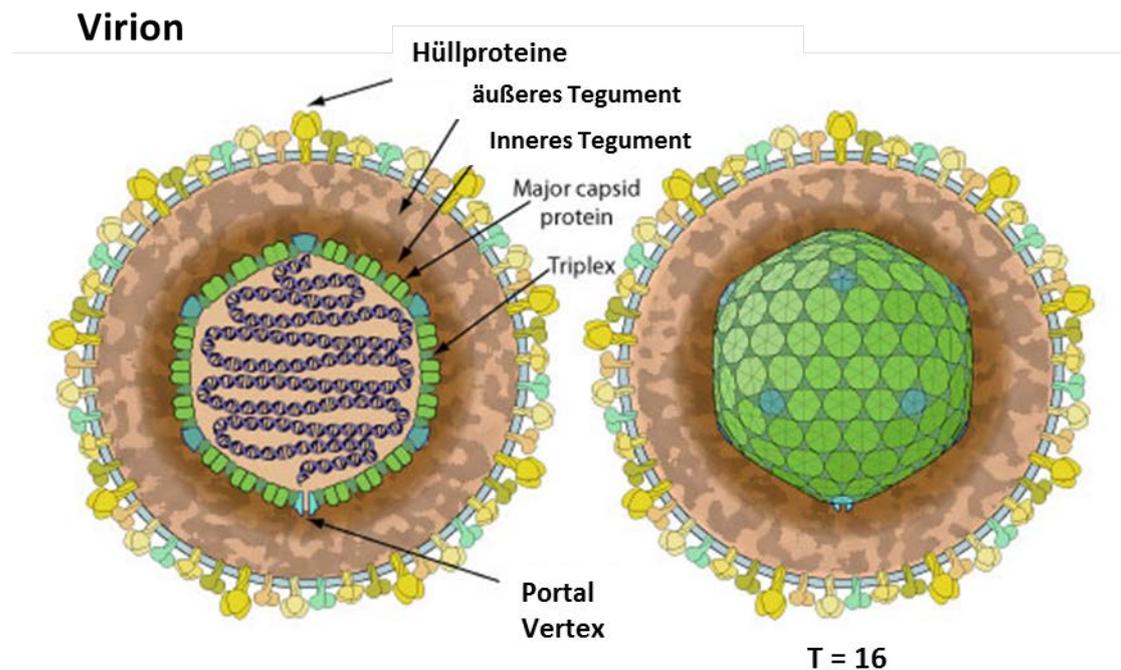


Abbildung 1.12: Struktur eines Herpesvirus am Beispiel des Cytomegalovirus.

Herpesviren sind umgeben von einer Hüllmembran, in die verschiedene virale Glykoproteine eingelagert sind. Im Inneren der Virions befindet sich das Kapsid, in welchem das lineare DNA-Genom von dem fibrillären Core-Protein umgeben ist. Der zwischen dem Kapsid und der Membran lokalisierte Bereich wird als Tegument bezeichnet. Das Tegument enthält eine unstrukturierte Proteinmischung, die bis zu 20 Viruskomponenten enthält.

Modifiziert nach http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/180.html.

1.4.2 Der Replikationszyklus von Herpesviren

Herpesviren haben einen lytischen Replikationszyklus, das bedeutet, für die Freisetzung von infektiösen Viren muss die Wirtszelle lysiert werden. Im Gegensatz zu vielen anderen Vireninfektionen, findet die lytische Infektion jedoch nicht in Zellen statt, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden, sondern in der G₁/G₀ Phase. Somit muss das Virus nicht mit der zellulären Vermehrung um Nukleotide konkurrieren (303).

Eingeleitet wird die Infektion durch die Kontaktaufnahme des Virus über virale Glykoproteine wie z. B. gB, an zelluläre Oberflächenproteine, wie z. B. das Heparansulfat der Wirtszelle (111) (Abbildung 1.13 (1)). Virusspezifische Proteine, wie das Glykoprotein gD des *Herpes Simplex Virus-1* interagieren anschließend mit zellulären Rezeptoren, wie z. B. Nectin 1 und *herpes virus entry mediator* (HVEM), was die Absorption an die Zelloberfläche einleitet und schließlich zur Verschmelzung der Membranen des Viruspartikels mit der Zellmembran führt (303) (1). Eine rezeptorvermittelte Endozytose von Herpesviren wurde ebenfalls beobachtet (67). Nach der Fusion gelangen das Kapsid und das Tegument in das

Zytoplasma der Wirtszelle (2). Die Kapside lagern sich an die Mikrotubuli an und werden durch die Kernporen in das Nukleoplasma transportiert (3). Hier zirkularisiert das lineare Genom und liegt als Episom vor. Die Expression des Virusgenoms erfolgt kaskadenartig, zuerst werden die *immediate early* (IE)-Proteine synthetisiert (152,157). Diese umfassen wichtige Regulatoren, die die Virusreplikation steuern (122,193). Nach der Expression der *delayed early* Proteine, die wichtig für die Replikation des Virusgenoms sind, erfolgt die Replikation der Virus-DNA sowie die Expression der späten Virusgene (*late*) (4). An der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) erfolgt zeitgleich die Bildung der Glykoproteine, die anschließend in Golgi-Vesikeln mit Kohlenhydratgruppen modifiziert werden (5) (303). Ein Teil der Glykoproteine wird zur Zelloberfläche transportiert und in die Zytoplasmamembran eingelagert (6). Gegen diese Polypeptide richtet sich sowohl die antikörpervermittelte zytotoxische NK-Antwort, die zur Lyse der so als infiziert erkennbaren Zellen führt (303), als auch die T-Zell-vermittelte virusspezifische Immunantwort. Die Kapsidproteinkomponenten werden nach ihrer Synthese am ER in den Zellkern transportiert, wo der Zusammenbau der Strukturproteine zu Kapsiden stattfindet (7) (303). Die nun DNA-haltigen Kapside werden durch Knospung mit der Kernmembran umhüllt und gelangen so in die Zwischenräume des ER, wo die Virushülle mit der ER-Membran verschmilzt (8). Über mehrere Reifungsschritte, die hauptsächlich am ER und dem Golgi-Apparat stattfinden, werden infektiöse Partikel gebildet, die über Golgivesikel zur Zelloberfläche transportiert und durch die Lyse der Wirtszellmembran in die Umgebung entlassen werden (9). Der Replikationszyklus des murinen Cytomegalovirus dauert circa 30-36h (265).

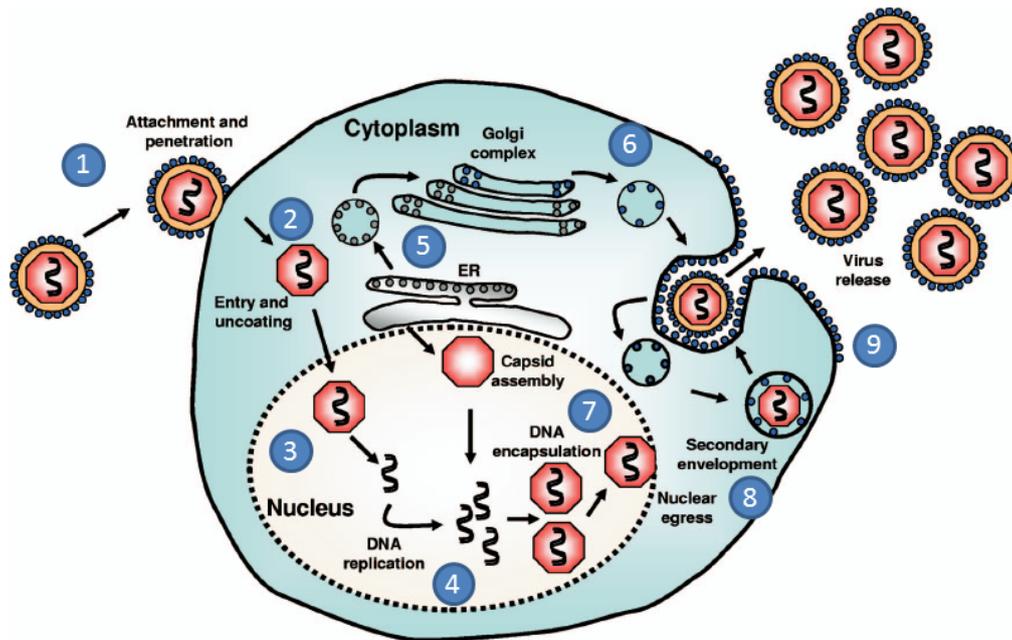


Abbildung 1.12: Replikationszyklus von Herpesviren.

1. Bindung des Viruspartikels an die Zellmembran mit Hilfe von Glykoproteinen.
 2. Eintritt des Nukleokapsids in die Zelle durch Fusion der Virushülle mit der Zellmembran oder über Endozytose.
 3. Transport des Nukleokapsids in den Zellkern mit anschließender Zirkularisierung der DNA.
 4. Replikation des Virusgenoms.
 5. Am endoplasmatischen Retikulum findet die Synthese von Glykoproteinen statt, diese werden im Golgi-Komplex mit Kohlenhydratketten modifiziert.
 6. Einige der Glykoproteine werden zur Zellmembran transportiert und in die Zellmembran eingelagert.
 7. Zusammenbau der Strukturproteine zu Kapsiden.
 8. Transport der Kapside in das Zytoplasma und Reifung der Kapside am endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Komplex zu infektiösen Partikeln.
 9. Freisetzung der Viren durch Exozytose.
- Entnommen von Crough et al. (67).

1.4.3 Die Biologie des humanen Cytomegalovirus

Das humane Cytomegalovirus (hCMV) gehört zur Familie der β -Herpesviren (HHV-5) und ist weltweit verbreitet, wobei die Seroprävalenz in Abhängigkeit vom sozioökonomischen Status steigt (295): So haben sich in Deutschland und den Vereinigten Staaten von Amerika 40-80% der Bevölkerung bis zu Ihrem 40. Lebensjahr mit hCMV infiziert (295), während in den Entwicklungsländern annähernd 100% der Bevölkerung seropositiv für hCMV sind (175,235). Ein Großteil der Primärinfektionen mit hCMV erfolgt bereits in der Kindheit. Primärinfektionen können aber auch in späteren Lebensphasen auftreten. Etwa 1 bis 4% aller schwangeren Frauen in den USA infiziert sich erst während der Schwangerschaft mit CMV (235).

1.4.4 Pathogenese einer Cytomegalovirusinfektion

In immunkompetenten Personen verläuft eine hCMV-Infektion meist asymptomatisch. In nur etwa 10% der Primärinfektionen treten Krankheitssymptome wie Fieber, Lymphknotenschwellungen, Gastritis, Ösophagitis oder grippeähnliche Erscheinungen auf, die denen einer Mononukleose ähneln (288,303). In immunsupprimierten Menschen, wie zum Beispiel Transplantatempfängern, Tumor- oder HIV-Patienten, kann das Virus Erkrankungen verursachen, die häufig mit schweren klinischen Verläufen, bis hin zum End-Organversagen, einhergehen (44,324). Die Übertragung des Virus erfolgt über eine Tröpfcheninfektion, die Muttermilch oder Schmierkontaminationen mit virushaltigem Blut oder Urin. Man findet das Virus auch in Cervixsekreten und in der Samenflüssigkeit. CMV-DNA wird in fast allen Zellen des Organismus gefunden, hierzu gehören Monozyten/Makrophagen (306), Lymphozyten (266), CD34⁺ Knochenmarkszellen (191), unreife DCs (274), Fibroblasten und Epithelzellen (120,287). Charakteristisch für eine CMV-Infektion ist, dass das Virus nach der Primärinfektion lebenslang latent im Organismus vorliegt und sowohl sporadisch, als auch in Phasen der Immunsuppression reaktiviert werden kann. Anhand dessen kann der Verlauf einer CMV-Infektion in drei Phasen eingeteilt werden. Während der akuten Phase repliziert das hCMV aktiv in verschiedenen Organen wie z. B. der Niere, den Speicheldrüsen und dem Knochenmark, aber auch in der Lunge, der Milz und der Leber (5,231,243,303). Der Organismus bildet in dieser Phase IgG- und IgM-Antikörper. Anhand des IgG- und IgM-Antikörperprofils (Anti-CMV IgG-Aviditätsbestimmung) lässt sich exakt bestimmen, wie weit die CMV Primärinfektion zurückliegt (87,166). Das Virus breitet sich nach der Primärinfektion über das Blut aus, wobei Monozyten wahrscheinlich als Virusträger fungieren (297). Nach der akuten Phase geht das Virus in eine persistierende/latente Phase über (149). In dieser Phase ist die Replikation und die Synthese viraler Proteine sehr niedrig (106). Das murine CMV persistiert überwiegend in den Speicheldrüsen und der Prostata, aber auch in Makrophagen aus der Lunge und in CD34⁺-unreifen hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks (57,155,191). Bei hCMV geht man davon aus, dass das Virus in myeloiden Zellen persistiert (286). Während der Latenz liegt die Virus-DNA als extrachromosomales Episom, assoziiert mit den Chromosomen der Wirtszelle, im Kernplasma vor. Die Menge an latenter DNA ist ausschlaggebend, ob es im Verlauf der Latenz zu einer spontanen Reaktivierung der CMV-Infektion kommt (242). Diese kann durch Stress oder eine Suppression des Immunsystems ausgelöst werden (161,199).

1.4.5 Das murine Cytomegalovirus

Das Wirtsspektrum von Cytomegaloviren ist sehr speziesspezifisch, daher infiziert das murine CMV (mCMV) nur Mäuse und das hCMV nur Menschen. Das mCMV ähnelt jedoch in Struktur und Biologie sehr stark dem hCMV (159,243). Ebenso ist der Verlauf der Infektion und die Etablierung der Latenz bei mCMV und hCMV im jeweiligen Wirt sehr ähnlich ist. Daher stellt mCMV ein sehr gutes experimentelles Mausmodell zur Untersuchung von hCMV Pathogenitätsmechanismen in der akuten- oder der Latenzphase, sowie der Reaktivierung dar (139,149,223). Das Mausmodell ermöglicht zudem den Einfluss von Zellpopulationen, wie NK-Zellen oder virusspezifischen T-Zellen, genauer zu charakterisieren.

1.4.5.1 Immunantwort auf eine mCMV-Infektion in C57BL/6-Mäusen

In den 2 bis 5 Tagen nach intraperitonealer mCMV-Infektion infiziert mCMV vor allem die viszerale Organe. Hierzu gehören u.a. die Leber und die Milz. Anschließend gelangt das Virus hämatogen zu weiter kranial gelegenen Organen, so dass am Tag 4 nach peritonealer mCMV-Infektion infektiöses mCMV auch in der Lunge, den Nieren und dem Herzen nachgewiesen werden kann (84). In der Speicheldrüse ist das Virus erst 2 Wochen nach intraperitonealer Infektion nachweisbar (148). Während der ersten zwei bis fünf Tage nach Primärinfektion trägt die, für eine akute mCMV-Infektion in C57BL/6-Mäusen charakteristische, starke NK-Zellantwort entscheidend zur frühen Kontrolle der Virusinfektion bei (112,239,314). Initiiert wird die NK-Zellantwort innerhalb der ersten ~4–6 h nach der Primärinfektion durch eine hohe Konzentration an systemischen $\text{IFN}\alpha\beta$, das von Stromazellen aus der Milz produziert wird (33,220). Die Sezernierung von IL-12 durch APCs induziert etwa 36 h nach Primärinfektion in NK-Zellen die Produktion von $\text{IFN-}\gamma$ (221), was eine direkte antivirale Wirkung hat (228). Das Maximum der NK-Zellantwort an Tag 2 nach der Primärinfektion korreliert somit mit dem Peak der $\text{IFN-}\gamma$ Produktion (34). Eine Besonderheit von NK-Zellen aus C57BL/6 Mäusen ist die Existenz des Ly49H Rezeptors, der auf etwa 50% der NK-Zellen vorhanden ist (264). Über die Interaktion des LY49H Rezeptors mit dem mCMV Protein-m157 (13,72) werden Ly49H^+ NK-Zellen aktiviert, was zur schnellen Zytolyse der Zielzellen führt (83). Die Aktivierung von Ly49H^+ NK-Zellen induziert die Expansion dieser Zellen, so dass ~90% der NK-Zellpopulation am tag 2-3 nach mCMV-Infektion Ly49H^+ sind (83). Insgesamt existiert eine Vielfalt an unterschiedlichen aktivierenden NK-Zellrezeptoren, deren Vorkommen in verschiedenen Mausstämmen

unterschiedlich ist (164,222). Die Dynamik der NK-Zellantwort ist somit abhängig vom Mausstamm und kann sich auch in den untersuchten Organen unterscheiden (50,305).

1.4.5.2 mCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort in C57BL/6-Mäusen

Die mCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort hat am Tag 7 nach intraperitonealer Infektion ihren Höhepunkt (84,207) und ist gegen bestimmte dominante (z. B. M45, M57) und subdominante Peptide (z. B. m102) gerichtet (208). Für C57BL/6-Mäuse sind zurzeit 27 Antigene bekannt, von denen 18 Epitope gut charakterisiert sind (208). Hierzu gehören u.a die Peptide M33, M45, M57, M38, M78, M86, M102, m139, m141 und m164 (208). In der akuten Phase wird die mCMV-spezifische Immunantwort in C57BL/6-Mäusen u.a. von den Peptiden M45, M57 und m164 dominiert (208). Nach der akuten Phase der mCMV-Infektion kontrahieren diese mCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (*stable memory* T-Zellen) und es bildet sich eine Gedächtnis-T-Zellantwort aus (150,207,284).

Eine Besonderheit der mCMV-spezifischen Immunantwort ist die antigenabhängige Akkumulierung bestimmter T-Zellpopulationen, welche als *memory inflation* bekannt ist (150,207,284). Diese so genannten *inflationary* mCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nehmen im Verlauf der mCMV-Infektion langsam zu, dominieren zahlenmäßig in der Persistenz und bleiben dem Organismus ebenfalls ein Leben lang erhalten (207,209). In C57BL/6-Mäusen sind diese mCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen spezifisch für die *inflationary* Peptide m139, M38 und IE3.

1.5 Zielsetzung

Viele chronische Virusinfektionen sind mit einer erhöhten Anzahl an Treg-Zellen assoziiert, die virusspezifische Immunantworten supprimieren können und somit die Etablierung einer chronischen Infektion begünstigen. Bisher gibt es nur wenige Hinweise, welchen Einfluss virusexpandierende Treg-Zellen während einer heterologen Infektion haben. Daher war es das Ziel in dieser Arbeit zu untersuchen, ob virusexpandierende Treg-Zellen einen Effekt auf eine sekundäre Virusinfektion haben und somit an heterologen Immunreaktionen beteiligt sind. Um unter standardisierten Bedingungen zu arbeiten wurde ein Mausmodell etabliert. Als Modell für eine chronische Infektion mit expandierten Treg-Zellen wurde das Friend Retrovirus verwendet und das murine Cytomegalovirus als Modell für eine Superinfektion. Mit Hilfe der genannten Viren sollte analysiert werden, ob eine heterologe Immunreaktion zwischen dem Friend Virus und dem murinen Cytomegalovirus besteht und, wie diese vermittelt wird. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde analysiert, welchen Einfluss FV-expandierte Treg-Zellen auf den Verlauf einer primären mCMV-Infektion haben. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss die primäre mCMV-Superinfektion auf eine chronische FV-Infektion hat.

2. Material

2.1. Zellkultur

2.1.1 Zelllinien

Tabelle 2.1 Zelllinien

Linie	Zelltyp	Spezifikation	Medium	Literatur
GTKO	Maus	Murine embryonale Fibroblasten	DMEM	Selin et al. (272)
<i>Mus Dunni</i>	Maus	Murine Fibroblasten	RPMI-1640	Lander et al. (163)

2.1.2 Zellkulturmedium und Zusätze

Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)

Zusätze:

- 10% hitzeinaktiviertes FCS
- 1% L-Glutamin
- 1% Penicillin/Streptomycin
- 1% HEPES

Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM)

Zusätze:

- 10% hitzeinaktiviertes FCS
- 2,5% L-Glutamin
- 2,5% Penicillin/Streptomycin
- 1% Fungizone

Rosewell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640)

Zusätze:

- 10% FCS
- 0,5% Penicillin/Streptomycin

RPMI-1640/+ L-Glutamin

Zusätze:

- 10% FCS
- 1% Penicillin/Streptomycin
- 1% L-Glutamin

Einfriermedium für GTKO

- 90% FCS
- 10% Dimethylsulfoxid

Einfriermedium für *Mus Dumni*

- 40% FCS
- 40% RPMI-1640
- 20% Dimethylsulfoxid

Falls es nicht anders erwähnt wird, handelt es sich immer um das entsprechende Vollmedium. Die verwendeten Medien und Zusätze wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Biochrome AG (Berlin, Deutschland), Life technologies (Darmstadt, Deutschland), Lonza (Köln, Deutschland), PAA (Pasching, Österreich) und Roche Diagnostik (Mannheim, Deutschland) bezogen.

2.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.2 Selbsthergestellte Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
ACK Puffer	155 mM Ammoniumchlorid 10 mM Kaliumhydrogencarbonat 0,5 M EDTA pH8 Σ 1 Liter mit Aqua dest. pH 7,2 sterilfiltrieren
AEC-Gebrauchslösung	AEC-Stocklösung (4 mg/ml) wird 1:20 in 0,05 M Natriumacetat angesetzt und durch Zugabe von 0,5 µl 30% H ₂ O ₂ /ml gestartet
AEC-Stocklösung (4 mg/ml)	20 AEC-Tabletten 100 ml N-N-Dimethylformamid
Bouin`s Lösung	75 ml gesättigte Pikrinsäure 25 ml 40% neutrales Formalin 5 ml Essigsäure

Kristallviolett-Lösung	400 ml D-PBS 40 ml 1% Kristallviolettstock-Lösung 4 ml Formalin
Leber-Enzymlösung	100 ml D-PBS 50 mg Collagenase Typ II 10,000 U DNase Typ I 10% FCS (hitzeinaktiviert)
FACS Puffer	D-PBS 0,1% BSA 0,02% Natriumazid
HBSS	12 mm Dextrose-H ₂ O 1,5 mm Dinatriumhydrogenphosphat 50 mM HEPES, pH 7,05 10 mM Kalziumchlorid 280 mM Natriumchlorid Σ 500 ml mit Aqua dest.
MuLV-ELISA Beschichtungspuffer	0,2 M Natriumcarbonat pH 9,6
MuLV-ELISA Waschpuffer	PBS + 0,5% Tween ²⁰
PBBS	0,2 g Kaliumhydrogenphosphat 1,15 g Natriumhydrogenphosphat 0,14 g Kalziumchlorid 0,32 g Kaliumchlorid 7,2 g Natriumchlorid 0,2 g Magnesiumchloridhexahydrat 0,2 g Magnesiumsulfatheptahydrat 1 ml Phenol Rot (1%) 1,0 g Glukose Σ 1 Liter mit Aqua dest.
36% Percoll-Lösung	72 ml Percoll 8 ml PBS (x10) 120 ml RPMI-1640 (+ 1% P/S + 1% L-Glutamin)

Tabelle 2.3 Gekaufte Puffer

Puffer	Hersteller
AutoMACS™ Pro Washing Solution	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
AutoMACS™ Running Buffer	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
FACSClean Solution	BD, Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACSFlow™ Sheath Fluid	BD, Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACSRinse Solution	BD, Biosciences, Heidelberg, Deutschland
D-PBS (10x)	Gibco™, life technologies, Darmstadt, Deutschland
D-PBS	Gibco™, life technologies, Darmstadt, Deutschland

2.3 Antikörper

Tabelle 2.4 Verwendete Antikörper

Spezifität	Klon	Hersteller
AK 720; monoklonaler Maus anti-MuLV env (IgG2 _b)		eigene Herstellung
B220-APC; monoklonaler Ratte anti Maus AK	RA36B2	eBioscience
BrdU-FITC	B44	BD
CD3-purified; monoklonaler Hamster anti Maus AK	145-2C11	eBioscience
CD3-AF700; monoklonaler Ratte anti Maus AK	17A2	eBioscience
CD4-PE Cy7; monoklonaler Ratte anti Maus AK	RM4-5	eBioscience
CD8-eFluor450; monoklonaler Ratte anti Maus AK	53-6.7	eBioscience
CD19-PE; monoklonaler Ratte anti Maus AK	MB191	eBioscience
CD25-PECy7; monoklonaler Ratte anti Maus AK	PC61.5	eBioscience
CD43-PerCP; monoklonaler Ratte anti Maus AK	1B11	BioLegend
CD44-AF700; monoklonaler Ratte anti Maus AK	IM7	eBioscience
CD69-FITC; monoklonaler Ratte anti Maus AK	H1.2F3	eBioscience
CD107a-FITC; monoklonaler Ratte anti Maus AK	1D4B	BioLegend
CD107a-AF647; monoklonaler Ratte anti Maus AK	1D4B	BioLegend
CTLA4-PE; monoklonaler Ratte anti Maus AK	UC10-4B9	eBioscience
DX5-PE; monoklonaler Ratte anti Maus AK	DX5	eBioscience

DX5-eFluor450; monoklonaler Ratte anti Maus AK	DX5	eBioscience
FoxP3-APC; monoklonaler Ratte anti Maus AK	FJK16s	eBioscience
GITR-PE; monoklonaler Ratte anti Maus AK	DTA-1	eBioscience
GzmB-APC; monoklonaler Maus anti Human AK	GB11	BioLegend
IFN γ -FITC; monoklonaler Ratte anti Maus AK	XMG1.2	eBioscience
IFN γ -APC; monoklonaler Ratte anti Maus AK	XMG1.2	eBioscience
IgG2 _b -IgHRP; monoklonaler Ziege anti Maus AK		Dako
Ki67-PE; monoklonaler Ratte anti Maus AK	B56	eBioscience
Ki67-PE-Cy7; monoklonaler Ratte anti Maus AK	SolA15	eBioscience
KLRG1-APC; monoklonaler Ratte anti Maus AK	2F1	eBioscience
Mac1-FITC; monoklonaler Ratte anti Maus AK	M1/70	eBioscience
NK1.1-PerCP Cy5.5; monoklonaler Ratte anti Maus AK	PK136	BD
Ter119-PE-Cy7; monoklonaler Ratte anti Maus AK	TER-119	eBioscience
TNF α -APC; monoklonaler Ratte anti Maus AK	MP6 XT22	eBioscience
Vbeta5-FITC; monoklonaler Ratte anti Maus AK	MR9-4	BD
Vbeta5-PE; monoklonaler Ratte anti Maus AK	B20.6	eBioscience

2.4 Lebend-tot Marker

Tabelle 2.5 Verwendete Lebend-tot-Marker

Farbstoff	Hersteller
Fixable Viability Dye-eFluor [®] 450	eBioscience
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich

2.5 FV Tetramere

Die in dieser Arbeit verwendeten PE-markierten MHC-Klasse-I H2-D^b-Tetramere sind spezifisch für das FV Glykoprotein GagL (8). Sie binden an das CTL-Epitop gPr80^{gag}85-93 von FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Bezogen wurden die Tetramere von der Firma Beckman & Coulter, Krefeld, Deutschland.

2.6 mCMV-spezifische MHC-Klasse-I-Peptide

Tabelle 2.6 Verwendete Peptide

ORF	MHC	Aminosäurepositionen	Peptidsequenzen	Inflation
M45	D ^b	985-993	HGIRNASFI	nein
M57	K ^b	816-824	SCLEFWQRV	nein
M102	K ^b	446-455	SIVDLRFAVL	nein
m139	K ^b	419-426	TVYGFCLV	ja
m141	K ^b	15-23	VIDAFSRL	nein
IE3	K ^b	416-423	RALEYKNL	ja
M38	K ^b	316-323	SSPPMFRV	ja

Die Peptide wurden von der Firma EMC microcollections GmbH (Tübingen, Deutschland) synthetisiert. Mittels HPLC, ESI-MS wurde die Reinheit überprüft (Reinheit von > 90%). Die Stocklösung der einzelnen mCMV-spezifischen Peptide (5-9 mg/ml in DMSO) wurde mit PBS vorverdünnt auf je 1 mg/ml. Die Lagerung der Peptidstocklösungen und der entsprechenden Verdünnungen erfolgte bei -20°C.

2.7 Biochemikalien

2.7.1 Proteine und Enzyme

Collagenase D Typ II (5 mg/ml)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Diphtheriatoxin	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
DNaseI (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trypsin	PAA, Pasching, Österreich

2.7.2 MuLV-ELISA Coating-Antigen

F-MuLV Virusantigen (2,17 mg/ml)	eigene Herstellung
----------------------------------	--------------------

2.8 Chemikalien

Tabelle 2.7 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ethanol absolut p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd 37%	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Isofluran [®]	Baxter, Deerfield, USA
Kristallviolett-Lösung	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Percoll	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
peqGold RNAPure [™]	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Pikrinsäure	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure (3M)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
TMB+Substrat-Chromogen	Dako, Eching, Deutschland
Trypanblau	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tween ^{®20}	Appllichem, Darmstadt, Deutschland

2.9 Oligonukleotide

Tabelle 2.8 Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz 5` - 3`	Referenz
β-Actin sense	aaa tcg tgc gtg aca tca aa	Miller et al. (194)
β-Actin antisense	caa gaa gga agg ctg gaa aa	Miller et al. (194)
F-MuLV env sense	aag tct ccc ccc gcc tct a	Stromnes et al. (300)
F-MuLV env antisense	agt gcc tgg taa get ccc tgt	Stromnes et al. (300)
Oligonukleotid Sonde	(TAMRA)	Stromnes et al. (300)

Die verwendeten Oligonukleotide und die Sonde wurden von der Firma Biomers (Ulm, Deutschland) synthetisiert.

2.10 Komplettsysteme

Tabelle 2.9 Verwendete Komplettsysteme

Standardtests	Bezugsquelle
<i>Anti-Ter119 MicroBeads</i> , mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>CD19 MicroBeads</i> , mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>Anti-PE Microbeads</i> , mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>BrdU Flow Kit</i>	BD, Heidelberg, Deutschland
<i>Cytofix/Cytoperm Intracellular staining kit including GolgiPlug</i>	BD, Heidelberg, Deutschland
<i>FoxP3 Intracellular staining kit</i>	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
<i>Mouse Vβ TCR Screening Panel</i>	BD, Heidelberg, Deutschland
<i>Maxima SYBR Green PCR Kit</i>	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
<i>PureLink[®] RNA Mini Kit</i>	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
<i>QuantiTect RT-PCR Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.11 Versuchstiere

Tabelle 2.10 Verwendete Mäusestämme

Bezeichnung	Bezugsquelle	Resistenzgene	Referenz
C57Bl/6	Harlan, Winkelmann GmbH	H-2D ^{b/b} , Fv2 ^{r/r}	
DEREG	eigene Zucht	DTR-eGFP H-2D ^{b/b} , Fv2 ^{r/r}	Lahl et al.. (162)
C57BL/10AxA.By , F1 Y10A)	eigene Zucht	H-2D ^{a/b} , Fv-2 ^{r/s}	Hasenkrug et al. (131)

Die Mäuse stammen aus einer speziell pathogenfreien Tierzuchtanlage und wurden für die Dauer der Versuche unter streng kontrollierten pathogenfreien Bedingungen gehalten. Die Tierexperimente wurden gemäß den Richtlinien der „*Federation of European Laboratory Animal Science Association*“ durchgeführt. Zu Beginn der Versuche hatten die Mäuse ein Alter

von 6-8 Wochen und hatten somit ein vollständig ausgebildetes Immunsystem. Für die Versuche wurden nur männliche Mäuse eingesetzt.

DEREG-Mäuse: Die in dieser Arbeit verwendeten DEREГ-Mäuse (**D**epletion of **R**egulatory T cell) wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tim Sparwasser (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene an der Technischen Universität in München, Deutschland) unter Verwendung der BAC (*bacterial artificial chromosome*)-Technologie hergestellt und anschließend im Zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen gehalten und gezüchtet. Diese Mäuse synthetisieren ein Fusionsprotein, bestehend aus einem Diphtheriatoxin-Rezeptor und dem *enhanced green fluorescent protein* (eGFP), unter der Kontrolle des FoxP3 Genlokus (Abbildung 2.1). Während im humanen Immunsystem auch aktivierte Effektor T-Zellen den Transkriptionsfaktor FoxP3 exprimieren (6), gilt FoxP3 im Mausmodell als ein spezifischer Marker für Treg-Zellen (41). Wird den Mäusen, die den Diphtheriatoxinrezeptor auf der Oberfläche von Treg-Zellen tragen, Diphtheriatoxin (DT) injiziert, so wird, durch die Bindung des DT an den DT Rezeptor, in diesen Zellen die Apoptose induziert (162). Da die Expression des DT Rezeptors an die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 und an das eGFP-Protein gekoppelt ist, ermöglicht das DEREГ-Mausmodell die selektive Depletion von allen FoxP3⁺ Treg-Zellen als auch, durch die Autofluoreszenz des eGFP, eine direkte Detektion von Treg-Zellen im Durchflusszytometer.



Abbildung 2.1: Darstellung des Diphtheriatoxin-eGFP (DTR-eGFP) Fusionsproteins im FoxP3 Lokus.

Abgebildet ist das in den FoxP3-Lokus integrierte BAC-Diphtheriatoxin-eGFP (DTR-eGFP) Genkonstrukt. Das DTR-eGFP Gen ist in das Exon I des FoxP3 Gens in die DNA integriert worden und untersteht somit der Kontrolle des FoxP3 Promotors. Die Expression des DTR-eGFP Gens ist dadurch an die Expression des FoxP3 Gens gebunden.

2.12 Viren

2.12.1 Friend Retrovirus Komplex (FV)

Das *Friend Virus* (FV) besteht aus einem Komplex von zwei Viren, dem *Spleen Focus-Forming Virus* (SFFV) und dem *Friend Murine Leukemia Virus* (F-MuLV) (siehe 1.3.5). Das verwendete FV wurde aus der Milz von infizierten Balb/c-Mäusen gewonnen (siehe 3.2.1) (79). Der verwendete FV-Stock war frei von dem *Lactat dehydrogenase-elevating Virus* (LDV).

2.12.2 Murines Cytomegalovirus (mCMV)

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten *murinen Cytomegalovirus* (mCMV) handelt es sich um den Smith Wildtyp-Stamm (292). Das Virus wurde freundlicherweise von Prof. Raymond M. Welsh zur Verfügung gestellt (Institut für Pathologie, Universität Massachusetts, USA). Das verwendete mCMV-Virus wurde *in vivo* in Balb/c-Mäusen hergestellt und aus den Speicheldrüsen isoliert (siehe 3.2.2).

2.13 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.11 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Bechergläser	Schott, Mainz
EDTA-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Einfrierröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalpipetten Cellstar [®] , steril (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Einmalspritzen, steril (1 ml, 2 ml, 10 ml)	Terumo, Eschborn
ELISA <i>Nunc[®] MaxiSorp[™]</i> -Platten	eBioscience, Frankfurt
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz
FACS-Röhrchen	Becton & Dickinson (BD), Heidelberg
G23-, G25-Kanülen, steril	BD, Heidelberg
NaHeparin-beschichtete Einmalkapillaren	HIRSCHMANN, Eberstadt

Realtime-PCR <i>MicroAmp</i> TM 48-Well Optical Adhesive Film Mikrotiter Platten	Applied Biosystems, Darmstadt
Parafilm	American National Can, Chicago, USA
Pinzetten	Braun, Tuttlingen
Pipettenspitzen <i>TipOne</i> mit Filter, steril	STARLAB, Ahrensberg
PP-Schraubverschluss Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Rundbodenplatte <i>Microtest</i> TM (96-well)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Scheren	Braun, Tuttlingen
Zellkulturflaschen <i>Cellstar</i> [®] , steril (T25, T75, T175)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatten <i>Cellstar</i> [®] Plates, steril (6-well, 12-well, 24-well)	Greiner bio-one, Frickenhausen
<i>Cellstar</i> [®] Tubes Zellkulturröhrchen (14 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkultursiebe (70 µm)	Falcon BD, Heidelberg

2.14 Geräte

Tabelle 2.12 Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Auflichtmikroskop <i>Axio Lab. A1</i>	Zeiss, Jena
Auflichtmikroskop <i>Wilovert S</i>	Hund, Wetzlar
<i>AutoMACS</i> [®] Pro	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CO ₂ Brutschrank <i>HERAcell 240i</i>	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
CO ₂ Brutschrank	ThermoForma, Schwerte
Durchflusszytometer <i>LSRII</i>	BD, Heidelberg
ELISA Reader <i>Expert Plus Microplate Reader</i>	Asys HITECH, Cambridge (England)
Gefrierschrank -86°C <i>ULT Freezer</i>	Thermo Electron Forma
Gefrierschrank	LIEBHERR, Ochsenhausen

Heizblock - <i>Thermomixer comfort</i>	Eppendorf, Hamburg
Homogenizer	OMNI International, Kennesaw (USA)
Kühlschrank	LIEBHERR, Ochsenhausen
Manuelle Pipetten <i>ErgoOne</i> (2, 10, 100, 200, 1000 µl)	STARLAB, Hamburg
<i>Multipipette® Plus</i>	Eppendorf, Hamburg
Multikanalpipetten (100 µl, 300 µl)	STARLAB, Hamburg
Neubauerzählkammer	Peqlab, Erlangen
PCR Werkbank <i>Air Clean 600 PCR Workstation</i>	STARLAB, Hamburg
Pipettierhilfe <i>Pipetus®</i>	HIRSCHMANN, Eberstadt
Real Time PCR Maschine <i>Step One™ Real Time PCR System</i>	Applied Biosystems, Darmstadt
Sterilbank	KOJAIR, Meckenheim
Sterilbank <i>HeraSafe</i>	Heraeus, München
Stereomikroskop	Novex, Arnheim (Holland)
Vortexer <i>Vortex Genius 3</i>	IKA®, Staufen
Waage <i>Scout™ Pro</i>	OHAUS, Nänikon (Schweiz)
Wärmelampe	Phillips, Amsterdam
Zentrifuge <i>4-16K</i>	Sigma, Hamburg
Zentrifuge <i>5430R</i>	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge <i>Heraeus Pico 17</i>	Thermo scientific, Schwerte

2.15 Computer-Software

Tabelle 2.13 Verwendete Computer-Software

Software	Hersteller
FACS Diva	BD, Heidelberg, Deutschland
FlowJo 7.6	Tree Star, Ashland, OR, USA
EndNote	Thomson Reuters, New York, USA
GraphPad Prism 5	Statcon, Statistiksoftware Shop, Witzenhausen, Deutschland
Microsoft Excel	Windows Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
Microsoft Word	Windows Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
StepOne Software v2.2	Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland

3. Methoden

3.1 Versuchstiere

3.1.1 Infektionen

3.1.1.1 Intravenöse Infektion

Die Infektion erfolgte intravenös (i.v.) mit einer G25-Kanüle in die laterale Schwanzvene. Für die chronische Infektion wurden die Mäuse mit je 40.000 SFFU des FV-Stocks in 0,5 ml sterilem PBS i.v. infiziert. Für die Untersuchung der akuten Phase wurden die Mäuse mit 20.000 SFFU FV infiziert.

3.1.1.2 Intraperitoneale Infektion

Damit während der intraperitonealen (i.p.) Infektion keine inneren Organe verletzt wurden, wurden die Mäuse in Rückenlage mit dem Kopf nach unten gehalten unter Spannung des Bauchfells. Unmittelbar vor der Infektion wurde das Fell mit Ethanol desinfiziert. Die Infektionen erfolgten mit einer G25-Kanüle in die Bauchhöhle. Für die akute und die chronische mCMV-Infektion sind die Mäuse mit 5×10^4 PFU des mCMV-Stocks in 100 μ l sterilem PBS i.p. infiziert worden.

3.1.2 Intraperitoneale Injektionen

3.1.2.1 Depletion von regulatorischen T-Zellen

Für die Depletion von regulatorischen T-Zellen in DEREK-Mäusen (siehe Tabelle 2.10) wurde den Tieren jeweils 0,5 μ g DT (gelöst in sterilem PBS) i.p. injiziert. Es erfolgten jeweils vier aufeinanderfolgende Injektionen in einem Abstand von 2 bis 3 Tagen, beginnend 4 Tage vor der mCMV-Infektion (siehe Abbildung 4.7).

Zur Überprüfung der Depletion wurden die Tiere am Tag 2 nach der letzten DT-Injektion getötet. Um die Effizienz der Depletion zu bestätigen, wurden Kontrollfärbungen angefertigt. Abbildung 3.1 zeigt repräsentative Dot-Plots dieser Kontrollfärbungen. In der Milz der undepletierten chronisch FV-infizierten DEREK-Maus (Abbildung 3.1A) betrug der prozentuale Anteil an eGFP⁺ CD4⁺ Treg-Zellen an der Gesamtanzahl der Lymphozyten 17,1%. Nach entsprechender Behandlung mit DT wies die chronisch FV-infizierte DEREK-Maus

(Abbildung 3.1B) nur noch einen Anteil von 0,183% $eGFP^+ CD4^+$ Treg-Zellen an der Gesamtanzahl der Lymphozyten auf. Die Treg-Zellen wurden also durch die DT Behandlung in der Milz etwa zu 98,8% depletiert.

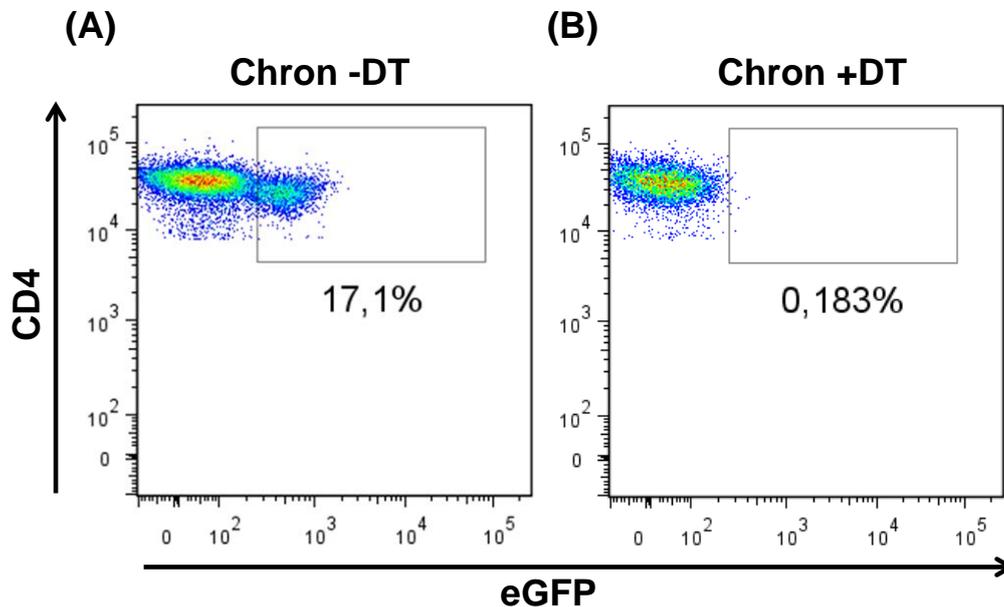


Abbildung 3.1: Durchflusszytometrische Analyse der Depletion von Treg-Zellen.

Milzellsuspensionen von infizierten, nicht Treg-depletierten DEREK-Mäusen (A) und nach Depletion von Treg-Zellen (B) wurden durchflusszytometrisch auf die Expression von eGFP in $CD4^+$ T-Zellen untersucht. Die angegebenen Zahlen entsprechen den prozentualen Anteilen von $CD25^+$ und $eGFP^+$ T-Zellen von der $CD4^+$ Lymphozytenpopulation.

3.1.3 Betäubung der Mäuse mit Isofluran®

Für die intraorbitale Blutabnahme wurden die Mäuse mit Isofluran® betäubt. Die Tiere wurden hierfür in einen Glasbehälter gesetzt, in dem sich ein mit Isofluran® getränktes Tuch befand.

3.1.4 Blutabnahme

Die intraorbitale Blutentnahme erfolgte an der betäubten Maus mit einer 3 mm Natriumheparin-beschichteten Glaskapillare. Das Blut wurde in einem sterilem 1,5 ml EDTA-Röhrchen aufgefangen und anschließend für 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das gewonnene Plasma (im Überstand) wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

3.1.5 Gewinnung von peritonealen Exsudatzellen

Zur Gewinnung von peritonealen Exsudatzellen (PECs) wurden die Mäuse getötet und deren Bauchhöhle mit 10 ml PBS gespült. Die Peritoneallavage wurde mit einer 10 ml Spritze und einer G23-Kanüle durchgeführt. Die PECs wurden anschließend zentrifugiert (1200 rpm, 5 min) und Erythrozyten in 1 ml ACK-Puffer lysiert. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit bei RT wurden die PECs mit 1 ml PBBS gewaschen (1200 rpm, 5 min) und anschließend in 1 ml RPMI aufgenommen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Trypan Blau-Färbung (siehe 3.5).

3.1.6 Organentnahme

Zur Organentnahme wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Es erfolgte anschließend die Organentnahme von Lunge, Milz, Niere und der Speicheldrüse. Vor der Entnahme der Leber, wurde die zwischen dem Lobus quadratum und dem Lobus dexter liegende Gallenblase entfernt. Bis zur Herstellung von Einzelzellsuspensionen wurden die Leber und die Milz in PBBS auf Eis gelagert. Für die Herstellung von Organhomogenisaten wurden die Organe in RPMI auf Eis aufbewahrt.

3.2 Herstellung der Virusstocks

3.2.1 *In vivo*-Herstellung des Friend Virus Stocks

Die *in vivo* Herstellung des Friend Virus Stocks erfolgte durch Infektion von Balb/c-Mäusen mit 3000 *Spleen Focus Forming Units* (SFFU) FV. Neun Tage nach FV-Infektion wurde den Mäusen die Milz entnommen und ein Milzzellhomogenisat (15%, wt/vol) in PBBS mit 2 mM EDTA hergestellt. Der Virusstock wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung der Virusstockkonzentration wurden Y10A-Mäuse (siehe Tabelle 2.10) mit dem FV infiziert (131). Vierzehn Tage nach Infektion wurde den Mäusen die Milz entnommen. Die durch die FV-Infektion entstandenen malignen Zellhaufen auf der Oberfläche der Milz, lassen sich mit Hilfe der sogenannten Bouin`s-Lösung anfärben. Die Anzahl der ausgezählten Foci ergab die Viruskonzentration des Stocks.

3.2.2 *In vivo*-Herstellung des mCMV-Stocks

Für die *in vivo* Herstellung des mCMV-Stocks wurden Balb/c-Mäuse mit 7×10^3 PFU mCMV infiziert. Nach durchschnittlich vierzehn Tagen wurden den Mäusen die Speicheldrüsen entnommen und in 1 ml sterilem HBSS mit einem Homogenizer homogenisiert. Die Homogenisate wurden anschließend für 20 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden auf Eis vereint, bevor diese aliquotiert und bei -80°C eingefroren wurden. Die Bestimmung des Virustiters erfolgte mittels des sogenannten *Plaque Assay* (siehe 3.7.3).

3.3 Herstellung von Organhomogenisaten

Organhomogenisate wurden für den Virusnachweis von mCMV, dem *Plaque Assay*, benötigt (siehe 3.7.3). Für die Herstellung der Organhomogenisate sind Leber und Lunge in 2 ml RPMI, Niere und Speicheldrüse in 1 ml und eine halbe Milz in 0,5 ml RPMI auf Eis aufbewahrt worden. Anschließend wurden die Organe mit einem Homogenizer homogenisiert und bei 4°C 2000 rpm für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils als 200 μl Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei -80°C aufbewahrt.

3.4 Herstellung von Einzelzellsuspensionen

3.4.1 Isolierung von Milzzellen

Für die Isolierung von Milzzellen wurden die entnommenen Milzen in PBBS auf Eis gelagert. Die Herstellung von Milzzellsuspensionen erfolgte durch Zerdrücken und Filtration des Milzgewebes mit einem sterilen Stößel durch ein steriles $70 \mu\text{m}$ Zellkultursieb (BD). Die Zellen wurden anschließend in 10 ml PBBS aufgenommen und gewaschen (10 min, 1200 rpm). Es erfolgte eine Vitalitätsüberprüfung der Zellen und die Gesamtzellzahl wurde ermittelt (siehe 3.5). Die Zellzahl wurde anschließend auf 1×10^8 Zellen/ml mit RPMI eingestellt.

3.4.2 Isolierung von Lymphozyten aus der Leber

Um Kontaminationen von zirkulierenden Lymphozyten aus dem Blut bei der Isolierung von Lymphozyten aus der Leber zu vermeiden, war es wichtig, die Tiere möglichst vollständig auszubluten (siehe 3.1.4). Gegebenenfalls wurde die Leber durch Injektion von RPMI über die Pfortader gespült. Nach der Entfernung der Gallenblase, wurde die Leber vollständig aus der

Bauchhöhle entfernt und in 5 ml RPMI auf Eis in kleine Stücke zerteilt. Die Leberzellsuspension wurde durch ein steriles 70 µm-Zellkultursieb filtriert und mit RPMI auf 20 ml aufgefüllt. Es erfolgte eine 10 min Zentrifugation bei 1500 rpm, 4°C. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert, das Zellpellet wurde in 5 ml 37°C warmer Leber-Enzymlösung aufgenommen und bei 37°C für 40 min im Wasserbad inkubiert. Mit 40 ml kaltem D-PBS wurde die Enzymreaktion gestoppt und die Enzymlösung durch Zentrifugation für 5 min bei 1500 rpm, 4°C von den Zellen entfernt. Das Zellpellet wurde in 6 ml 36% Percoll-Lösung (RT) aufgenommen und für 15 min bei 1400 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand ist anschließend dekantiert worden und das Zellpellet in 1 ml RPMI (+L-Glutamin) resuspendiert. Es erfolgte eine Vitalitätsüberprüfung der Zellen und die Ermittlung der Gesamtzellzahl (siehe 3.5).

3.5 Zellzahlbestimmung/Vitalitätstest

Die Gesamtzellzahl der Lymphozyten aus den untersuchten Organen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Hierfür wurde den Einzelzellsuspensionen (siehe 3.4) eine Probe entnommen und mit der zwanzigfachen Menge, beziehungsweise der doppelten Menge, an 0,4%igem Trypanblau verdünnt. Vitale Zellen besitzen eine intakte Zellmembran und sind für den Farbstoff undurchlässig. Abgestorbene Zellen haben hingegen eine veränderte Membrandurchlässigkeit und sind permeable für den Farbstoff Trypanblau. Es wurden jeweils bis zu vier große Eckquadranten des Zählnetzes ausgezählt. Da jeder Eckquadrant eine Fläche von 0,01 mm² besitzt und eine Tiefe von 1 mm aufweist, ergibt sich ein Volumen von 0,01 µl. Die Berechnung der Zellzahl/ml ergab sich aus dem Mittelwert der ausgezählten Eckquadranten multipliziert mit dem Faktor 10⁴. Für die Berechnung der Gesamtzellzahl wurde das Gesamtvolumen der Zellsuspension mit einberechnet:

$$\text{Mittelwert der Eckquadranten} \times 10^4 \times F_1 \times \text{Gesamtprobenvolumina} = \text{Gesamtzellzahl}$$

F_1 = Verdünnungsfaktor

3.6 Zellkultur

3.6.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen in Brutschränken bei 37°C in einer mit 5% CO₂ angereicherten Atmosphäre (siehe Tabelle 2.12).

3.6.2 Auftauen und Kryokonservierung von Zellen

Kryokonservierung von Zellen:

Zur längeren Lagerung von Zelllinien wurden diese in flüssigem Stickstoff in Einfriermedium mit DMSO eingefroren. Das Lösungsmittel DMSO diffundiert durch die Zellmembran in die Zelle und ersetzt dort das Wasser. DMSO verhindert so die Bildung von Eiskristallen, welche die Zellorganellen zerstören und zum Absterben der Zellen führen würde. Es wurden jeweils 1×10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium (siehe 2.1.2) in Einfrierröhrchen überführt. Vor der Überführung der Zellen in flüssigen Stickstoff wurden diese über Nacht bei -80°C gelagert.

Auftauen von Zellen:

Für das Auftauen der Zellen musste beachtet werden, dass das DMSO toxisch für die Zellen ist und nicht lange auf die Zellen einwirken darf. Daher wurden die Zellen zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und sofort in 15 ml angewärmtes Medium überführt. Um das DMSO anschließend restlos von den Zellen zu entfernen, wurden diese für 10 min bei 1000 rpm (RT) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde erneut mit Medium gewaschen, in 10 ml frischem Medium resuspendiert und anschließend im Verhältnis 1:4 und 3:4 in T25-Zellkulturflaschen ausgesät.

3.6.3 Zellpassage

Die kultivierten GTKO Zellen wurden bei einer Konfluenz von 60%, die kultivierten *Mus Dumni* Zellen wurden bei einer Konfluenz von 90-100% passagiert. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für einige Minuten mit Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert. Die Zellen sind anschließend in frischem Medium (siehe 2.1.2) aufgenommen und zelllinienspezifisch in neue Zellkulturflaschen passagiert worden.

Tabelle 3.1 Kulturbedingungen verschiedener Zelllinien

Zelllinie	Medium	Passage	Verdünnung
GTKO	DMEM	alle 3 Tage	1:40 bis 1:80
<i>Mus Dunningi</i>	RMPI-1640	alle 3 Tage	1x10 ⁵

3.7 Virusnachweis

3.7.1 Nachweis von infektiösen Zellen mittels des *Infectious Center Assays*

Mit dem sogenannten *Infectious Center Assays* (IC-Assay) wird die Anzahl von FV-infizierten Zellen in der Milz bestimmt. Hierfür wurden Verdünnungsstufen von Milzzellsuspensionen FV-infizierter Tiere hergestellt und mit Indikatorzellen (*Mus Dunningi*) für 3 Tage bei 37°C, 5% CO₂ ko-inkubiert. Infizierte Milzzellen infizieren die *Mus Dunningi* Zellen durch Zell-Zellkontakt. Durch die normale Zellteilung werden die infektiösen FV-Partikel an die Tochterzellen weitergegeben, wodurch ein Virus-Focus entsteht. Diese Foci können mittels des FV-spezifischen Antikörpers AK720, der an das F-MuLV Envelope-Protein bindet, nachgewiesen werden. Mit dem Sekundärantikörper, dem „Horse Radish Peroxidase“ (HRP) gekoppelten Ziege anti-Maus IgG_{2b} Antikörper, der an die Fc-Region des Primärantikörpers bindet, können nach Zugabe des löslichen Substrats (3-Amino-9-Ethylcarbazole, AEC) infektiöse Zellen bestimmt werden. Aufgrund der HRP vermittelten Farbumwandlung des AEC-Substrats in ein unlösliches rotes Produkt, entstehen überall dort, wo sich infektiöse Foci befinden, rote Punkte auf dem Zellrasen. Die Anzahl an infektiösen Zellen wird unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe und der Gesamtmilzzellzahl als IC pro Milz berechnet.

$$\frac{(\text{Anzahl der Foci})}{10^7} \times (\text{Gesamtzellzahl in der Milz}) = \text{Viruslast pro Milz}$$

Hierfür wurden am ersten Tag 2x10⁴ *Mus Dunningi* Zellen in 3 ml RPMI pro Vertiefung einer 6-Loch-Gewebekulturplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe von 10⁷ bis 10⁴ Milzzellen in einer 12-Loch-Gewebekulturplatte hergestellt. Von der Verdünnungsreihe wurden jeweils 1 ml der Verdünnung auf die *Mus Dunningi* Zellen gegeben. In chronisch FV-infizierten Mäusen wurde eine 3fach-Bestimmung der ersten Verdünnungen

vorgenommen (1×10^7). Der Test wurde für 3 Tage bei 37°C , 5% CO_2 inkubiert. Am fünften Tag wurde das Medium dekantiert, die *Mus Dumni* Zellen mit 96% Ethanol fixiert und zweimal mit PBS/0,1% BSA gewaschen. 800 μl AK720 Hybridomazellüberstand wurde pro Vertiefung auf die Zellen gegeben und zwischen 1 h bei RT oder bis zu 24 h bei 4°C inkubiert. Die Platten wurden danach 2x mit PBS/0,1% BSA gewaschen. Der zweite Antikörper (Ziege anti-Maus IgG_{2b}-HRP; 0,05 mol/l) wurde 1:500 in PBS verdünnt und jeweils 800 μl verdünnter IgG_{2b}-HRP-Antikörper wurden pro Vertiefung hinzugegeben. Gelagert wurden die Platten zwischen 1 h bei RT oder bis zu 24 h bei 4°C . Nach dem Waschen mit PBS wurden je 2 ml frisch angesetzte Substratlösung (AEC-Lösung) pro Vertiefung auf die Zellen gegeben und für 20 min bei RT im Dunkeln gelagert. Die Substratlösung wurde dekantiert und die Platten mit Wasser gewaschen. Nachdem die Platten getrocknet waren, wurden die Foci gezählt und die Viruslast in der Milz berechnet.

3.7.2 Nachweis von FV mittels quantitativer *Real Time* Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die quantitative *Real Time* PCR (qRT-PCR) dient hauptsächlich zur Quantifizierung von Nukleinsäuren wie DNA, mRNA oder miRNA. Die qRT-PCR ist hochsensitiv, eignet sich für die Quantifizierung von sehr geringen Transkriptionsmengen und erlaubt die Unterscheidung von kleinen Veränderungen in der Genexpression (229). Für den Nachweis von FV wurde in einem ersten Schritt die RNA aus den zu analysierenden Zellen isoliert. Mit Hilfe der reversen Transkription wurde anschließend die RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, um dann die Expressionsmenge an FV mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) quantifizieren zu können.

Arbeiten mit RNA

Für die Arbeiten mit RNA wurden spezielle RNase-freie Lösungen, RNA-freie Reaktionsgefäße sowie sterile, gestopfte Pipettenspitzen verwendet.

3.7.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA mittels peqGold RNAPure[®]

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus CD19⁺ und Ter119⁺ Zellen erfolgte mit peqGold RNAPure^{™®} nach dem Herstellerprotokoll der Firma PegLab (Erlangen). Nach der Isolierung der RNA wurden die Proben durch eine Ethanol-fällung aufkonzentriert und nach dem

Herstellerprotokoll der Firma Invitrogen (Darmstadt) mit dem *PureLink[®] RNA easy kit* aufgereinigt. Die RNA wurde in 20 µl RNase-freiem destilliertem Wasser eluiert und bei -80°C aufbewahrt.

3.7.2.2 Relative Quantifizierung der Genexpression mittels *Real Time SYBR[®] Green PCR*

„Bei der relativen Quantifizierung wird die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres Referenzgen bezogen. Als Referenzgene dienen nicht-regulierte Haushaltsgene (HKG), die am Grundstoffwechsel einer Zelle beteiligt sind und deren mRNA-Synthese in verschiedenen Geweben stabil und unabhängig von experimentellen Bedingungen sind“ (229). In dieser Arbeit wurde das β-Aktin Protein als HKG verwendet. Durch Normalisierung der Menge an FV PCR-Produkt in einer Probe auf 1×10^6 β-Aktin Moleküle, wurde sichergestellt, dass von allen Proben äquivalente cDNA Mengen berücksichtigt wurden. Die relative Quantifizierung der Menge an FV PCR-Produkt erfolgte anhand der folgenden Formel:

$$\frac{\text{Menge an FV RNA einer Probe} \times 1 \times 10^6 \beta\text{-Aktin Moleküle}}{\text{Menge an } \beta\text{-Aktin einer Probe}}$$

Die Amplifizierung und Detektion der PCR-Produkte erfolgte, unter Verwendung des *Maxima[™] SYBR Green qPCR Kit* (Fermentas), mittels der qRT-PCR. Der Farbstoff SYBR-Green bindet in der kleinen Furche der doppelsträngigen DNA. Nach jedem Amplifikationszyklus kann die Amplifikationsmenge anhand der Fluoreszenz bestimmt werden. Alle Ansätze wurden in einer Doppelbestimmung durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde Wasser anstelle von RNA in den Reaktionsansatz eingesetzt.

Reaktionsansatz:

<u>Master-Mix für eine Reaktion</u>	<u>Volumen</u>
RT-Mastermix (2x)	10 µl
3`Oligonukleotide (10 µM)	4 µl
5`Oligonukleotide (10 µM)	4 µl
H ₂ O	0,8 µl
<u>Reverse Transkriptase Mix</u>	<u>0,2 µl</u>
Gesamtvolumen	19 µl

19 µl des Mastermixes wurden auf Eis in eine MicroAmp 48-Loch-Reaktionsplatte vorgelegt. Anschließend wurde 1 µl isolierte RNA hinzupipettiert. Als Negativkontrolle wurde 1 µl H₂O anstelle von RNA eingesetzt. Für die Quantifizierung der PCR-Produkte wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe des β-Actin mRNA-Standards mit bekannter Konzentration verwendet. Die Reaktionsplatte wurde kurz bei 1200 rpm zentrifugiert und in das StepOne™ Real Time PCR-Gerät platziert. Die PCR wurde mit dem folgenden Temperaturprogramm durchgeführt.

Programm: 52°C 10 min, 95°C 30 min (c-DNA Synthese)
42 x (94°C 20 sec, 53°C 25 sec, 72°C 40 sec) (Amplifikationszyklus)
94°C 15 sec, 60°C 60 sec, 95°C 15 sec, 38°C 60 sec (Schmelzkurve)

3.7.2.2 Two Step TaqMan-PCR zur Quantifizierung von Friend Virus

Neben der Verwendung von SYBR® Green kann eine spezielle fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonde verwendet werden, die zur Erhöhung der Spezifität beiträgt. Die Sonde ist am 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporterfarbstoff (Fluorezein-Derivat) markiert, am 3'-Ende ist ein Quencher Farbstoff (Rhodamin-Derivat) konjugiert. Wird die Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge von 488 nm angeregt, wird die freiwerdende Energie des Reporterfarbstoffes strahlungslos auf den räumlich nahegelegenen Quencherfarbstoff übertragen. Durch diesen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) verringert sich die Intensität der Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs, ohne dass dieser zerstört wird. Während der PCR hybridisieren die Sonde und die Oligonukleotide an den Matrizenstrang. In der Extensionsphase der PCR kommt es durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase zur Hydrolyse der Sonde. Die räumliche Nähe zwischen dem Reporter- und dem Quencherfarbstoff wird durch die Hydrolyse der Sonde unterbrochen, und es findet kein FRET mehr statt. Die nun messbare Emission des Reporterfarbstoffs ist proportional zur Akkumulation an PCR-Produkten und kann als Signal gemessen werden. Freie, nicht gebundene Sonde wird nicht hydrolysiert.

Bei der *Two Step* TaqMan-PCR wurde im ersten Schritt cDNA durch die Reverse Transkription synthetisiert. Im Anschluss an die reverse Transkription wurde daraus ein Aliquot entnommen und in die PCR-Reaktion eingesetzt. Der Vorteil der *Two-Step*-PCR liegt größtenteils darin, dass die PCR-Bedingungen verändert und optimiert werden können, ohne dass die Reverse-Transkription beeinflusst wird.

1. cDNA Synthese

Zunächst wurde die Sekundärstruktur der DNA durch Aufbrechen der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen entfaltet. Hierfür wurden 10 µl RNA mit 2,5 µl antisense Primer (siehe Tabelle 2.8) für 5 min bei 70°C erhitzt. Als Negativkontrolle wurde Wasser anstelle von RNA in die PCR eingesetzt. Die Proben wurden danach auf Eis inkubiert. Für die RT-PCR wurde folgender Mastermix hergestellt:

<u>Master Mix für eine Reaktion</u>	<u>Volumen</u>
RT-Mastermix (2x)	10 µl
H ₂ O	2,8 µl
TaqMan-Sonde (4 pmol/µl)	1 µl
<u>RT-Mix</u>	<u>0,2 µl</u>
Gesamtvolumen	14,0 µl
+ cDNA Template	5,0 µl

Programm: 50°C 20 min (c-DNA Synthese)
 95°C 5 min (Stopp der Synthese)

2. Quantitative Real Time-PCR

Mit Hilfe der qRT-PCR wurde die Menge an FV-cDNA in CD19⁺ B-Zellen und Ter119⁺ Erythrozytenvorläuferzellen quantifiziert. Alle Ansätze wurden in einer Doppelbestimmung durchgeführt. Damit eine absolute Quantifizierung der cDNA Menge in den einzelnen Proben ermittelt werden konnte, wurde eine 1:10 Standardreihe der Friend Virus RNA mit bekannter Konzentration verwendet. Für die Amplifikation der cDNA wurde pro Probe je 1 µl des Oligonukleotids (sense Primer) vorgelegt (siehe Tabelle 2.8). Anschließend wurden 19 µl des cDNA-Synthese Ansatzes zugegeben.

Programm: 95°C 15 min (Hot-Start Aktivierung)
 45 x (96°C 15 sec, 53°C 60 sec) (Amplifikationszyklus)
 4°C 30 sec, 4°C Pause (∞) (Kühlung)

Das Ergebnis der qRT-PCR wurde anschließend mit Hilfe der StepOne Software (Applied Biosystems) analysiert.

3.7.3 Nachweis von mCMV mittels *Plaque Assay* (PA)

Mit Hilfe des *Plaque Assays* lässt sich die Anzahl infektiöses mCMV bestimmen. Hierfür werden definierte Volumina (0,1 ml) an Organhomogenisat-Überstand von mCMV-infizierten Mäusen mit Indikatorzellen (GTKO) Zellen ko-inkubiert. Die GTKOs werden von den im Überstand befindlichen Viren *in vitro* infiziert und produzieren anschließend neues Virus. Da das mCMV ein lytisches Virus ist, das seine Virionen durch Lyse der Wirtszelle freisetzt, werden durch die Lyse der Wirtszellen weitere GTKOs infiziert. Um eine spätere Infektion der GTKOs zu verhindern, wird der Zellrasen nach einer Inkubationszeit mit einem 1:1-Gemisch aus Agarose und EMEM-Medium überschichtet. Die Überschichtung der GTKOs gewährleistet, dass das Virus von einer infizierten Zelle nur lokal die direkt umliegenden Nachbarzellen infizieren kann, es entstehen vereinzelt Plaques. Im Anschluss werden die Zellen für 6 Tage bei 37°C inkubiert, bevor sie fixiert und durch eine Kristallviolett-Lösung angefärbt werden. Der mCMV-Titer wird unter Berücksichtigung der gezählten Plaques, der Verdünnungsstufe und der Gesamtzellzahl des Organs ermittelt. Es wurden nur Verdünnungen berücksichtigt, deren Plaqueanzahl < 60 Plaques pro Vertiefung lag. Berechnet wurde der mCMV-Titer als \log_{10} der Plaque-bildenden Einheiten (*plaque forming units*, PFU) pro Milliliter (ml).

Für den Plaque Assay wurden 8×10^4 GTKOs in je 2 ml DMEM pro Vertiefung einer 6-Loch-Gewebekulturplatte ausgesät und über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 ml Zellkulturüberstand von den GTKOs abgenommen und auf Eis eine 1:10 Verdünnungsreihe mit Überständen von zuvor homogenisierten Organen hergestellt (siehe 3.3). Je 100 µl der Verdünnungsstufen V⁰ bis V⁵ wurden zu den Indikatorzellen gegeben und für 1,5 h bei 37°C, 5% CO₂ kokultiviert. Die Zellen wurden anschließend mit einem 1:1- (vol/vol) Gemisch aus 1% Agarose und EMEM (siehe 2.1.2) überschichtet. Nach einer 6-tägigen Inkubation wurde die Agarose vorsichtig mit einem Spatel von dem Zellrasen entfernt und die Platten einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden für 5 min mit 1 ml Kristallviolettlösung (siehe Tabelle 2.2) fixiert und gefärbt. Die durch die mCMV-Infektion entstandenen Plaques sind als Löcher mit dunkelviolett-gefärbten Rändern im Zellrasen

erkennbar und können unter Verwendung eines Stereomikroskops ausgezählt werden. Berechnet wurde der mCMV-Titer mit der folgenden Formel:

$$(\text{PFU} \times F_1^*) \times F_2^+ = \text{Anzahl infektiöser Cytomegaloviren pro ml}$$

$$^*F_1 = \text{Organvorverd\u00fcnnung} \times \frac{1000 \mu\text{l}}{100 \mu\text{l}}$$

$$^+F_2 = \text{Volumen/Anzahl Organteile}$$

Angegeben wurde der mCMV-Titer als \log_{10} der Anzahl an infekti\u00f6sen Cytomegaloviren pro ml (\log_{10} PFU/ml).

3.8 Magnetisch-Aktivierte Zell-Sortierung (MACS)

Die MACS-Technologie (*Magnetic Cell Sorting*) kann zur Isolierung, oder zum Ausschluss (Depletion) einer Zellpopulation aus einer Gesamtzellpopulation, verwendet werden. Bei dieser Methode wird die Eigenschaft genutzt, dass unterschiedliche Zellen verschiedene Oberfl\u00e4chenantigene tragen. Die Zielzellen werden hierf\u00fcr mit MicroBeads[®]-gekoppelten monoklonalen Antik\u00f6rpern gegen ihre entsprechenden Oberfl\u00e4chen-antigene markiert und k\u00f6nnen in einem ferromagnetischen Feld an eine MACS-S\u00e4ule gebunden werden (positive Selektion), w\u00e4hrend Zellen, die nicht mit den Antik\u00f6rpern markiert wurden (negative Selektion), nicht an die S\u00e4ule binden und sich im Durchfluss befinden. Durch Entfernung des magnetischen Feldes, k\u00f6nnen die an die S\u00e4ule gebundenen Zellen mittels des MACS-Puffers eluiert werden (197). Die MACS-Technologie wurde in dieser Arbeit f\u00fcr die Isolierung von CD19⁺ B-Zellen und Ter119⁺ Erythrozyten-Vorl\u00e4uferzellen verwendet. Die MACS-Selektionen wurden nach Herstellerangaben durchgef\u00fchrt und mittels des autoMACS[®] Pro-Separators sortiert (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach). Die im MACS-Puffer eluierten Zellen wurden anschlie\u00dfend mit Hilfe einer Neubauer-Z\u00e4hlkammer ausgez\u00e4hlt (siehe 3.5). Die Qualit\u00e4t der Aufreinigung wurde anschlie\u00dfend im Durchflusszytometer analysiert (siehe 3.9).

3.9 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie (FACS) ermöglicht die Analyse und Charakterisierung einzelner Zellen in einer heterogenen Zellpopulation. Es können sowohl spezielle Oberflächenproteine als auch intrazelluläre Proteine identifiziert und quantifiziert werden. Hierzu werden die zu analysierenden Zellen vor der Analyse mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen bestimmte Oberflächen- oder intrazellulär befindliche Antigene markiert. Bei der Messung im FACS werden die Zellen durch eine Kapillare gesaugt. Durch die hydrodynamische Fokussierung werden die Zellen vereinzelt und gelangen in eine Durchflusszelle. Passieren die Zellen hier den geräteinternen Laserstrahl, entsteht ein Streu- und ein Fluoreszenzlicht, die von einem Computer separat erfasst werden. Die Menge des Vorwärtsstrelights (Forward Scatter, FSC) ist ein Maß für die Beugung des Lichts, sie korreliert mit der relativen Größe der Zelle. Das Seitwärtsstrelight (SSC), das um 90° von den Zellen abgelenkt wird, ist ein Maß für die Granularität der Zelle. Ein Fluoreszenzlicht entsteht, sobald der monochromatische Laserstrahl auf die Elektronen der Fluorochrome trifft und diese dadurch auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Unter Emission von Licht fallen die Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Die dabei frei werdende Energie ist abhängig von dem Energieniveau, auf das das Fluorochrom angehoben wird. Jedes Fluorochrom emittiert Licht in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen (siehe Tabelle 3.2) und fluoresziert somit jeweils in einer spezifischen Farbe.

Tabelle 3.2 Absorptionsspektren der Fluorochrome

Abkürzung	Bezeichnung	Absorption	Emission
AF647	Alexa Fluor 647	650 nm	668 nm
AF700	Alexa Fluor 700	696 nm	719 nm
APC	Allophycocyanin	650 nm	660 nm
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester	492 nm	517 nm
eFluor [®] 450	eFluor [®] 450	405 nm	450 nm
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat	494 nm	520 nm
PE	R-Phycoerythrin	496 nm	578 nm
PerCP	Peridinin-Chlorophyllprotein Komplex	482 nm	678 nm
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cy7	496 nm	785 nm
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cy5	496 nm	667 nm
PI	Propidiumiodid	535 nm	617 nm

Durch die charakteristischen Emissionsspektren ist es möglich, eine Zelle mit mehreren unterschiedlichen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern zu markieren. Ein Photonendetektor registriert die Lichtsignale und wandelt diese letztendlich in elektronische Signale um (Abbildung 3.2). Hierbei verhält sich die registrierte Photonenmenge proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle.

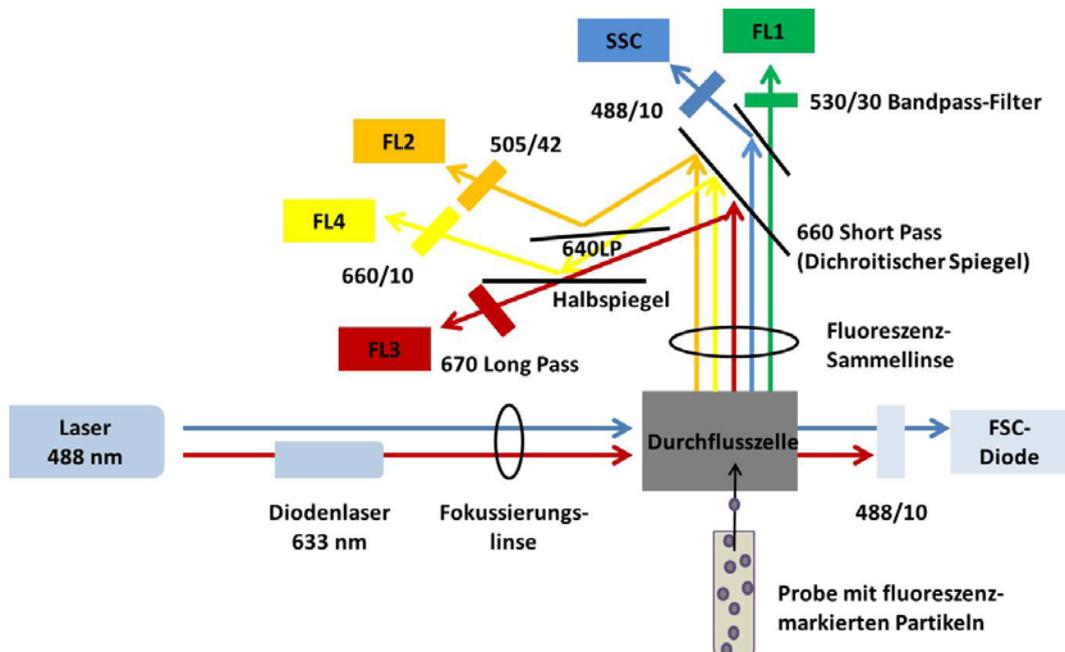


Abbildung 3.2: Funktionsweise eines Durchflusszytometers.
Modifiziert nach <http://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=1216>.

3.9.1 Oberflächenfärbung von Immunzellen

Die Oberflächenfärbung von Immunzellen diente der Markierung und Detektion einer Zellpopulation aus einer heterogenen Lymphozytenpopulation. Fluorochrom-gekoppelte monoklonale Antikörper gegen bestimmte zelltypische Antigene der Lymphozyten wurden verwendet, um die Zielzellen zu markieren. Jeweils $4 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ Lymphozyten aus der Milz, dem Peritoneum oder der Leber wurden mit 50 μl in FACS-Puffer verdünnter Antikörperlösung (siehe Tabelle 3.3) in einer 96-Loch-Platte für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 200 μl FACS-Puffer gewaschen (3 min; 1200 rpm). Die antikörpermarkierten Zellen wurden in 400 μl FACS-Puffer resuspendiert und mit Hilfe des FACS LSR-II (BD BioSciences) analysiert.

Tabelle 3.3 Verwendete Oberflächenantikörper und ihre Verdünnungen

Antikörper	Verdünnung	Art
B220-APC	1:200	primär
CD3-AF700	1:200	primär
CD4-PE Cy7	1:200	primär
CD8 α -eFluor450	1:200	primär
CD19-PE	1:200	primär
CD25-PECy7	1:200	primär
CD43-PerCP	1:200	primär
CD44-AF700	1:400	primär
CD69-FITC	1:200	primär
CD107a-FITC	1:200	primär
CD107a-AF647	1:200	primär
CTLA4-PE	1:200	primär
DX5-PE	1:200	primär
GITR-PE	1:200	primär
KLRG1-APC	1:200	primär
NK1.1-PerCP-Cy5.5	1:200	primär
Mac1-FITC	1:200	primär
V β 5-FITC	10 μ l	primär
V β 5-PE	1:200	primär

3.9.2 Ausschluss toter Zellen

Zum Ausschluss von toten Zellen und Zelltrümmern wurden diese Zellen mit dem eFluor[®] 450-gekoppelten Fixable Viability Dye (FvD) markiert. FvD hat den Vorteil, dass sich die Zellen anschließend fixieren, permeabilisieren und intrazellulär anfärben lassen, ohne dass sich das Färbesignal des FvD verringert. Tote Zellen wurden während der Oberflächenfärbung (siehe 3.9.1) der Lymphozyten mit FvD (1:200 Verdünnung) gefärbt. Anschließend wurden die Lymphozyten mit dem *Cytofix/Cytoperm-Kit* fixiert und permeabilisiert (siehe 3.9.5).

Bei Messungen von frischen, nicht fixierten Zellen wurde der Farbstoff Propidiumiodid (PI) verwendet. PI ist ein selbständig fluoreszierender DNA Farbstoff, der in die DNA interkaliert.

Vitale Zellen mit einer intakten Zellmembran nehmen sehr langsam PI auf und zeigen im Durchflusszytometer kein positives Signal für PI. Eine apoptotische oder bereits abgestorbene Zelle verliert ihre Membranintegrität und wird permeabel für PI. In die DNA eingelagertes PI kann im Durchflusszytometer bei einer Wellenlänge von 617 nm erfasst werden. Frische Zellen wurden kurz vor der Durchflusszytometrie mit 1:200-verdünntem PI angefärbt und sofort am LSR-II analysiert.

3.9.3 Nachweis von FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen

Eine Methode um antigenspezifische T-Zellen zu identifizieren und zu quantifizieren ist die Tetramerfärbung(11). Die verwendeten MHC-Klasse-I-Tetramere bestehen aus vier Peptid-MHC-Klasse-I Komplexen, die über eine Biotin-Streptavidin-Bindung kovalent miteinander verbunden sind. Zur durchflusszytometrischen Visualisierung ist an den Komplex der fluoreszierende Farbstoff R-Phycoerythrin konjugiert. Die Tetramerfärbung beruht auf den Prinzipien der Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen. Durch Bindung der Peptid-gebundenen MHC-I-Komplexe an den TZR von FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen werden diese Zellen markiert und können im Durchflusszytometer analysiert werden. Der Aufbau eines Tetramers ist in Abbildung 3.3 gezeigt.

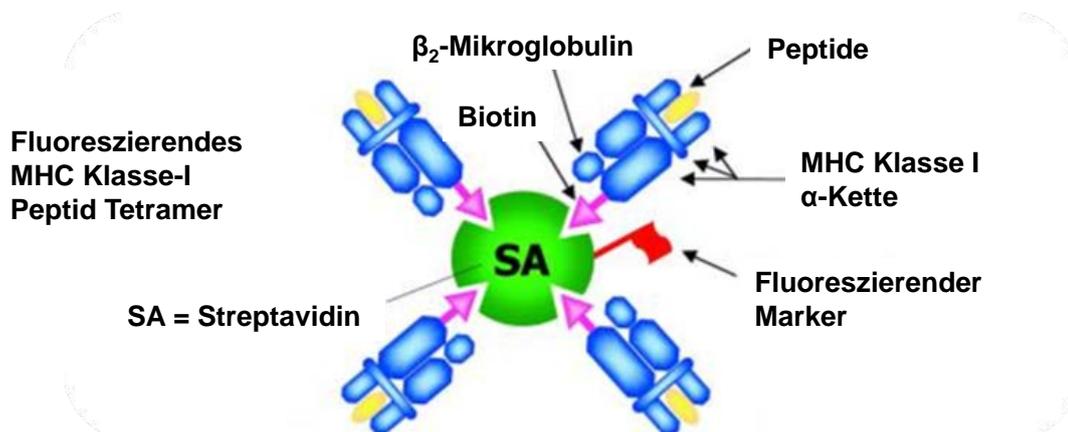


Abbildung 3.3: Aufbau eines MHC-Klasse I-Tetramers. Modifiziert nach Eisenbarth (88).

Für die Tetramerfärbung wurden 5×10^6 Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden zweimal in 200 μ l FACS-Puffer gewaschen (1200 rpm; 3 min) und nach Herstellerangaben (Beckman & Coulter, Krefeld, Deutschland) in einem Volumen von 50 μ l FACS-Puffer mit 1 μ l FV-Tetramer I für 20 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde ein Cocktail von

50 μl an erforderlichen Oberflächenantikörpern (αCD4 , αCD8 , αCD43 , αCD107a) hinzugegeben und weitere 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Proben wurden anschließend zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und gegebenenfalls eine intrazelluläre Granzym-B-Färbung durchgeführt (siehe 3.9.4).

3.9.4 Nachweis von funktionellen FV-spezifischen CD8^+ T-Zellen

Die intrazelluläre Färbung von Granzym-B (GzmB) diente dem Nachweis von funktionellen FV-spezifischen CD8^+ T-Zellen. Nach der Oberflächenfärbung (siehe 3.9.3) wurden die Milzzellen von chronisch FV und von FV+mCMV-superinfizierten Tieren einmal in FACS-Puffer gewaschen (1200 rpm 3min) und dann nach dem Protokoll des Herstellers des *Cytofix/Cytoperm* Kits fixiert und permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1x BD Perm/WashTM-Puffer wurden die Zellen mit 50 μl PermWash-Puffer mit GzmB-Antikörpern (1:200 Verdünnung) für 60 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden danach zweimal mit Perm/WashTM-Puffer und zweimal mit FACS-Puffer gewaschen (1400 rpm; 4 min), anschließend in je 400 μl FACS-Puffer resuspendiert und für die durchflusszytometrische Analyse in FACS Röhren überführt.

3.9.5 Nachweis von mCMV-spezifischen CD8^+ T-Zellen mittels intrazellulärer Zytokinfärbung (ICS)

3.9.5.1 MHC-I Peptid-Stimulation

Virusspezifische T-Zellen können durch die Verwendung von synthetisch hergestellten Peptiden stimuliert und zur Produktion von Zytokinen angeregt werden. In dieser Arbeit wurden Peptide verwendet, die über MHC-Klasse-I-Moleküle an den T-Zellrezeptor (TZR) von mCMV-spezifischen CD8^+ T-Zellen binden, wenn deren TZR das jeweils spezifische Epitop für das entsprechende Peptid besitzt. Die Bindung des Antigens an den TZR führt dann zur Aktivierung der T-Zelle und zur Produktion von Effektormolekülen wie $\text{INF}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$. Diese Effektormoleküle können intrazellulär durch das sogenannte *Intracellular cytokine staining* (ICS) nachgewiesen werden (siehe 3.9.5.2). Für die einzelnen Peptidstimulationen wurden je 1×10^7 Lymphozyten aus der Milz oder der Leber pro Stimulation in einer 96-Loch-Platte in insgesamt 200 μl RPMI mit 1 μl Peptid (siehe Tabelle 2.6), 0,4 μl IL-2 und 0,2 μl GolgiPlug bei 37°C, 5% CO_2 für 4,5 h inkubiert. Als Positivkontrolle wurden je 1×10^7 Zellen pro Maus mit 5 pg αCD3 stimuliert, als Negativkontrolle wurden je 1×10^7 Zellen pro Maus mit 0,4 μl IL-

2 und 0,2 µl GolgiPlug ohne Peptid stimuliert. Das sich im GolgiPlug befindliche Brefeldin-A, ein Protein-Transport-Inhibitor, blockiert den intrazellulären Protein-Transportprozess und verhindert so die Sezernierung der sich intrazellulär befindlichen Proteine. Dies resultiert in der Akkumulation von Zytokinen in der Zelle und ermöglicht so die Detektion von Zytokin-produzierenden Zellen. Die Zellen wurden nach der Stimulation zweimal in FACS-Puffer gewaschen (1200 rpm; 3 min) und in einem Volumen von je 50 µl FACS-Puffer mit Antikörpern gegen die Oberflächenproteine CD8, CD43 und CD44 für 10 min bei RT gefärbt (siehe 3.9.1, Tabelle 3.3). Die intrazelluläre Färbung von INF γ und TNF α erfolgte wie unter 3.9.5.2 beschrieben.

3.9.5.2 Intrazelluläre Zytokinfärbung (ICS)

Mit Hilfe der intrazellulären Zytokinfärbung (*intracellular cytokine staining*, ICS) können intrazelluläre Zytokine, wie INF γ und TNF α nachgewiesen werden. Der ICS erfolgte unter Verwendung des *Cytofix/Cytoperm-Kits* entsprechend des Herstellerprotokolls der Firma BD Pharmingen®. Hierzu wurden die Lymphozyten nach der Oberflächenfärbung (3.9.5.1) einmal in 200 µl FACS-Puffer gewaschen, bei 1200 rpm für 3 min zentrifugiert und das Zellpellet anschließend in 100 µl Fix/PermTM-Lösung resuspendiert. Nach 15 min wurden die Zellen zweimal in 1x BD Perm/WashTM Puffer gewaschen (1400 rpm; 4 min). Die intrazelluläre Färbung erfolgte anschließend für 30 min bei 4°C, die Verdünnung der Antikörper erfolgte entsprechend der Tabelle 3.3 in 50 µl BD Perm/WashTM Puffer. Nachdem die Zellen je zweimal in Perm/WashTM Puffer und FACS-Puffer gewaschen wurden (1400 rpm; 4 min), wurden die Zellen in je 400 µl FACS-Puffer resuspendiert und für die durchflusszytometrische Analyse in FACS Röhren überführt.

3.9.6 Nachweis von Treg-Zellen

Mit Hilfe der intrazellulären FoxP3-Färbung können FoxP3 exprimierende Treg-Zellen markiert werden. Da die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 im Zellkern der Zellen stattfindet, muss die Detektion durch Fluorochrom-gekoppelte monoklonale Antikörper erfolgen, die durch Permeabilisierung der Zellen in den Zellkern der Zellen gelangen. Die intrazelluläre FoxP3-Färbung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll der Firma eBioscience mit dem *FoxP3 Intracellular staining kit* (eBioscience, Frankfurt). Je 4×10^6 Zellen wurden in eine Vertiefung einer 96-Loch-Platte ausgesät und mit α CD4, α CD25, CD69 und gegebenenfalls mit

α CTLA4, α GITR, α KLRG1, und α Vbeta auf der Oberfläche markiert und danach zweimal mit FACS-Puffer gewaschen (3 min; 1200 rpm). Anschließend wurden die Zellen mit dem Fix/Perm[™]-Puffer über Nacht bei 4 °C im Dunkeln fixiert und permeabilisiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal mit 150 μ l FACS-Puffer und danach zweimal mit 200 μ l FoxP3-Waschpuffer gewaschen (4 min; 1300 rpm). Der FoxP3-Antikörper wurde anschließend in 50 μ l FoxP3-Waschpuffer 1:400 verdünnt (siehe Tabelle 3.4). Die intrazelluläre Färbung erfolgte für 30 min bei 4 °C im Dunkeln. Die Zellen wurden einmal in 150 μ l FoxP3-Waschpuffer und einmal in 200 μ l FACS-Puffer gewaschen (4 min, 1300 rpm), bevor diese für die durchflusszytometrische Analyse in 400 μ l FACS-Puffer resuspendiert wurden.

3.9.7 Nachweis von proliferierenden Zellen

3.9.7.1 Intrazelluläre Ki67-Färbung

Ki67 ist ein nukleäres Protein, das mit der Proliferation von Zellen assoziiert wird. Durch die Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen das intrazelluläre Ki67-Protein können proliferierende Zellen detektiert werden. Die Zellen wurden hierfür nach der Oberflächenfärbung (siehe 3.9.1) nach Herstellerangaben mit dem *Cytofix/Cytoperm Kit* von BD Pharmingen[®] fixiert, permeabilisiert und gewaschen. Die intrazelluläre Färbung erfolgte für 30 min bei RT im Dunkeln. Die Verdünnung des Ki67-Antikörpers erfolgte wie in der Tabelle 3.3 angegeben.

3.9.7.2 Intrazelluläre BrdU-Färbung

5-Bromo-2-deoxyuridin (BrdU) ist ein Uridin-Derivat, das für Zellproliferationsanalysen und zur Detektion von apoptotischen Zellen verwendet wird. BrdU besitzt strukturelle Ähnlichkeit mit dem Nukleotid Thymidin und wird während des Zellzyklus in der Synthese-Phase anstelle des üblicherweise inkorporierten Thymins in die DNA eingebaut.

Hierfür wurden die Mäuse an drei aufeinander folgenden Tagen vor Versuchsende mit 40 mg/50 ml BrdU getränkt, welches in das Trinkwasser gegeben wurde. Nach der Entnahme der Milzen und Herstellung der Einzelzellsuspensionen erfolgte die Oberflächenfärbung (siehe 3.9.1) der Lymphozyten. Die Lymphozyten wurden anschließend nach Herstellerangaben mit dem *Cytofix/Cytoperm-Kit* von BD Pharmingen[®] fixiert und permeabilisiert. Mit anti-BrdU Antikörpern wurden dann die in die DNA eingebauten BrdU Anteile markiert. Die Verdünnung

des BrdU Antikörpers erfolgte wie in der Tabelle 3.4 angegeben. Die BrdU-Inkorporation wurde anschließend im Durchflusszytometer analysiert.

Tabelle 3.4 Verwendete intrazelluläre Antikörper und ihre Verdünnungen

Antikörper	Verdünnung	Art
BrdU-FITC	1:50	primär
FoxP3-APC	1:400	primär
GzmB-APC	1:200	primär
IFN- γ -APC/FITC	1:200	primär
TNF- α -APC	1:200	primär
Ki67-PE	1:50	primär
Ki67-PeCy7	1:200	primär

3.10 Nachweis von FV-bindenden Antikörpern (ELISA)

Der Enzym-gekoppelte Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren zur qualitativen und quantitativen Analyse von Proteinen und Antikörpern in einer Probe (zum Beispiel Zellkulturüberstände, Blutplasma, Urin etc.). Das Prinzip des ELISAs beruht auf Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen in Kombination mit einer enzymatischen Farbreaktion. Beim sogenannten *Antikörper-ELISA* werden bestimmte Antikörper in einer Probe nachgewiesen. Hierbei wird das antikörperspezifische Antigen direkt auf die Oberfläche einer Mikrotiterplatte adsorbiert. Die in den Proben vorkommenden Antikörper binden über die F_{ab}-Region an die Antigene. Nachdem über mehrere Waschschriffe ungebundene Antikörper entfernt wurden, wurde ein Enzym-gekoppelter polyklonaler Sekundärantikörper hinzugegeben, der an die F_c-Region der gebundenen Probenantikörper bindet. Für den in dieser Arbeit durchgeführten ELISA wurde ein Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelter Antikörper verwendet. Ungebundene Antikörper wurden erneut durch Waschen der Platte entfernt, dann erfolgte die Zugabe einer Substratlösung. Als Substrat wurde in diesen Tests Tetramethylbenzidin (TMB, Dako) verwendet. Durch die Peroxidase wird das farblose Diamin TMB zu Diimin TMB oxidiert (Abbildung 3.4). Das Substrat absorbiert nun Licht im Bereich der sichtbaren Strahlung bei $\lambda = 285 \text{ nm}$. Dies ist als blauer Farbumschlag zu erkennen. Abgestoppt wird die Enzymreaktion durch Zugabe von Schwefelsäure. Hierbei wird

der instabile blaue Komplex in einen stabilen Komplex umgewandelt, der durch einen Farbumschlag von blau nach gelb gekennzeichnet ist. An einem Spektrometer kann die Absorption der Lösung bestimmt werden. Hierbei verhält sich die Farbkonzentration proportional zur gebundenen Proteinmenge. Die Messungen wurden mit dem ELISA Reader Expert Plus Microplate Reader (Asys HITECH) durchgeführt.

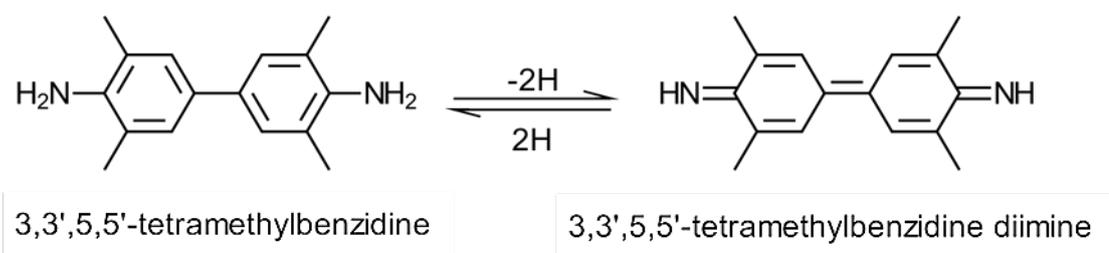


Abbildung 3.4: Chemische Struktur des Tetramethylbenzidin. Modifiziert nach Frey et al. (97).

Für den Nachweis von gesamt IgG F-MuLV-spezifischen Antikörpern aus dem Plasma von FV-infizierten Mäusen mittels ELISA wurden je 0,5 µg Virusantigen in 100 µl MuLV-ELISA-Beschichtungspuffer pro Vertiefung über Nacht bei 4°C an den Boden einer 96-Loch-ELISA Rundbodenplatte gebunden. Die Platte wurde fünfmal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen für 30 min bei RT mit PBS/10% FCS blockiert. Die Platte wurde ausgeklopft und erneut fünfmal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde mit den Plasmaproben eine Verdünnungsreihe (1:50 bis 1:6400) angefertigt. Die Proben wurden hierfür jeweils 1:2 in PBS/10% FCS verdünnt. Danach wurden je 100 µl verdünntes Plasma in die jeweiligen Vertiefungen gegeben und bei 4°C für 1h inkubiert. Es wurden von allen Proben Doppelbestimmungen angesetzt. Nach der Inkubation wurde die Platte fünfmal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 100 µl HRP-gekoppelten Esel-anti-Maus IgG-Zweitantikörpers (1:15.000 verdünnt in PBS/10% FCS) in jede Vertiefung gegeben und 1h bei RT inkubiert. Unspezifische Antikörper wurden durch fünfmaliges Waschen mit ELISA-Waschpuffer entfernt. Die Substratreaktion wurde mit dem TMB+Substrat-Chromogen (Dako, Eiching, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wurde je 100 µl TMB-Lösung pro Vertiefung gegeben und die Platte für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Abgestoppt wurde die Reaktion mit 50 µl 1M Schwefelsäure. Die Messung der Extinktion fand bei einer Wellenlänge von 490 nm in Referenz zur Wellenlänge von 620 nm statt. Für die Bestimmung des FV-spezifischen Antikörpertiters wurde der dreifache Extinktionswert des Plasmas einer naiven Maus als Grenze für eine positive Reaktion festgelegt.

4. Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von regulatorischen T-Zellen (Treg-Zellen) in chronisch retroviral-infizierten Tieren auf eine primäre CMV-Infektion zu untersuchen (Abschnitt 4.1). Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss einer primären CMV-Infektion auf eine etablierte chronische retrovirale Infektion analysiert (Abschnitt 4.2).

4.1 Untersuchungen des Einflusses von Treg-Zellen in chronisch FV-infizierten Tieren auf eine primäre mCMV-Infektion

Um den Einfluss von Treg-Zellen, welche vermehrt in chronisch FV-infizierten Mäusen vorhanden sind, auf eine primäre mCMV-Infektion zu untersuchen, wurden naive C57BL/6-Mäuse i.v. mit 40.000 SFFU FV infiziert. In der chronischen Phase (sechs Wochen nach der FV-Infektion) wurden die Mäuse i.p. mit 5×10^4 PFU mCMV superinfiziert. Als Kontrolle wurden naive C57BL/6-Mäuse mit mCMV infiziert (Abbildung 4.1).

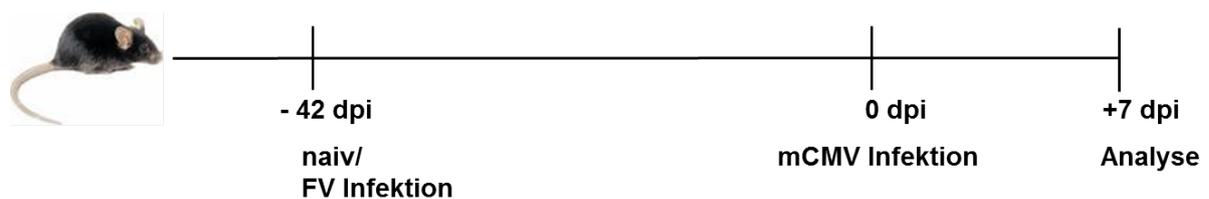


Abbildung 4.1: Versuchsverlauf zur Analyse, welchen Einfluss Treg-Zellen in chronisch FV-infizierten Tieren auf eine primäre mCMV-Infektion haben.

Naive C57BL/6-Mäuse wurden i.v. mit 40.000 SFFU FV infiziert. In der chronischen Phase der FV-Infektion, 42 Tage nach Infektion (dpi), wurden diese Mäuse i.p. mit 5×10^4 PFU mCMV superinfiziert (FV+mCMV). Als Kontrolle wurden naive C57BL/6-Mäuse mit mCMV infiziert (naiv+mCMV). Die Tiere wurden 7 Tage nach der mCMV-Infektion getötet.

4.1.1 Untersuchung des mCMV-Titers und der mCMV-spezifischen T-Zellantwort in mCMV-infizierten naiven bzw. chronisch FV-infizierten Mäusen

Als Erstes wurde untersucht, welchen Einfluss eine chronische FV-Infektion auf den mCMV-Titer nach mCMV-Superinfektion hat. Dazu wurde 7 Tage nach der mCMV-Infektion der mCMV-Titer mittels *Plaque Assays* in Milz, Leber, Lunge und Speicheldrüse analysiert. Zu diesem Zeitpunkt konnte infektiöses mCMV in der Milz, Leber und Lunge nachgewiesen werden, jedoch nicht in der Speicheldrüse. Es wurde kein Unterschied im mCMV-Titer zwischen

naiven und chronisch FV-infizierten Mäusen am Tag 7 nach mCMV-Infektion in den untersuchten Organen gefunden (Abbildung 4.2).

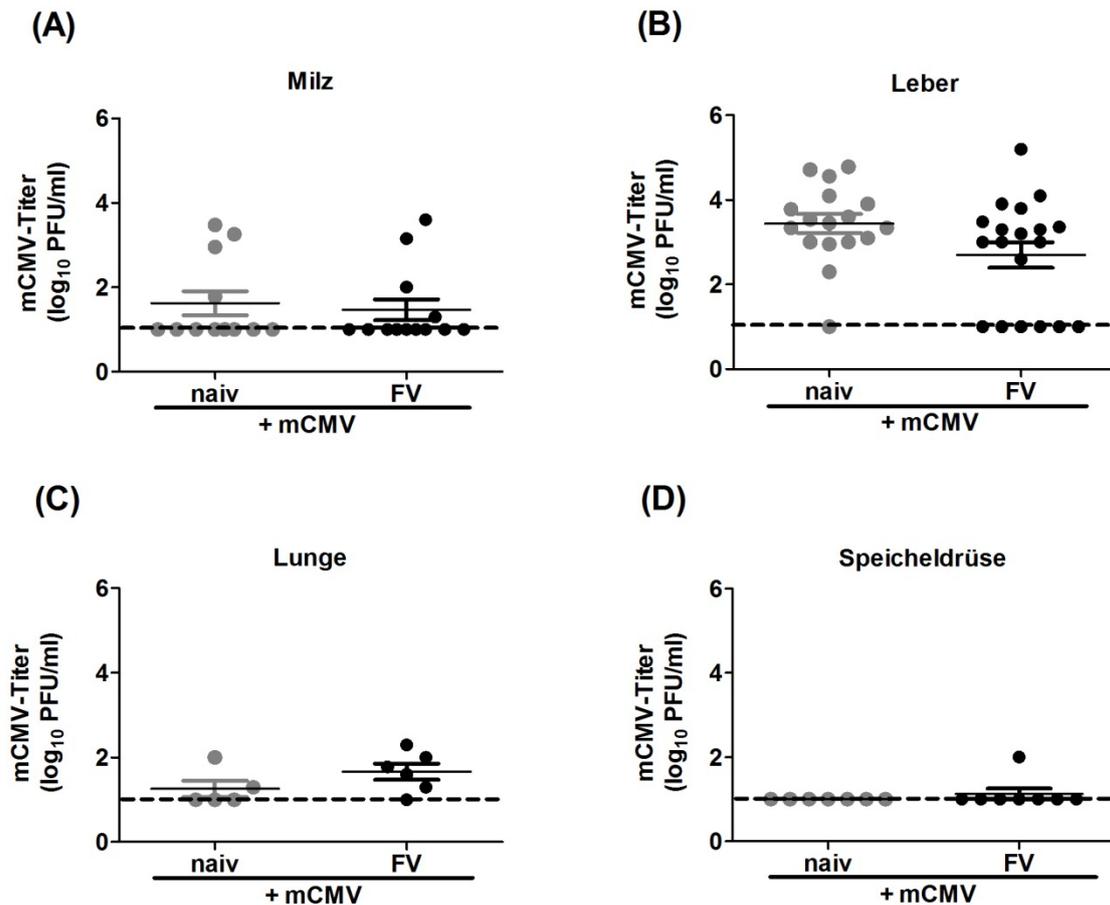


Abbildung 4.2: mCMV-Titerbestimmungen am Tag 7 nach primärer mCMV-Infektion.

Naive C57BL/6-Mäuse wurden, wie in Abbildung 4.1 gezeigt, infiziert. Am Tag 7 nach mCMV-Infektion wurde die Viruslast in Milz, Leber, Lunge und Speicheldrüse von naiv+mCMV (graue Punkte) und FV+mCMV (schwarze Punkte) mittels *Plaque Assays* bestimmt und als log₁₀ der Plaque formenden Einheiten (*Plaque forming units*, PFU) pro Milliliter (ml) aufgetragen. Die gestrichelte Linie zeigt die Nachweisgrenze an. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Maus. Die gezeigten Daten resultieren aus einem Pool von 2-4 unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des „*student t-Tests*“ durchgeführt.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die erhöhte Anzahl an Treg-Zellen in chronisch FV-infizierten Mäusen einen Einfluss auf die mCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort in der Milz hat. Dazu wurden Milzzellen von naiv+mCMV-infizierten und FV+mCMV-superinfizierten Tieren am Tag 7 nach mCMV-Infektion mit mCMV-spezifischen Peptiden stimuliert und die Expression von IFN γ und TNF α im Anschluss an die Oberflächenfärbung mit Hilfe der intrazellulären Zytokinfärbung (ICS) bestimmt. Die Abbildungen 4.3 und 4.4 zeigen die mCMV-

spezifische Immunantwort in den untersuchten Gruppen. Wie auf den repräsentativen Dot Plots zu erkennen ist, führte die Stimulation von mCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen von naiv+mCMV- (Abbildung 4.3B) und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen (Abbildung 4.3C) zu der Produktion von IFN γ und TNF α , während die Stimulation von CD8⁺ T-Zellen aus naiven Mäusen, wie erwartet, zu keiner Zytokinexpression führte (Abbildung 4.3A).

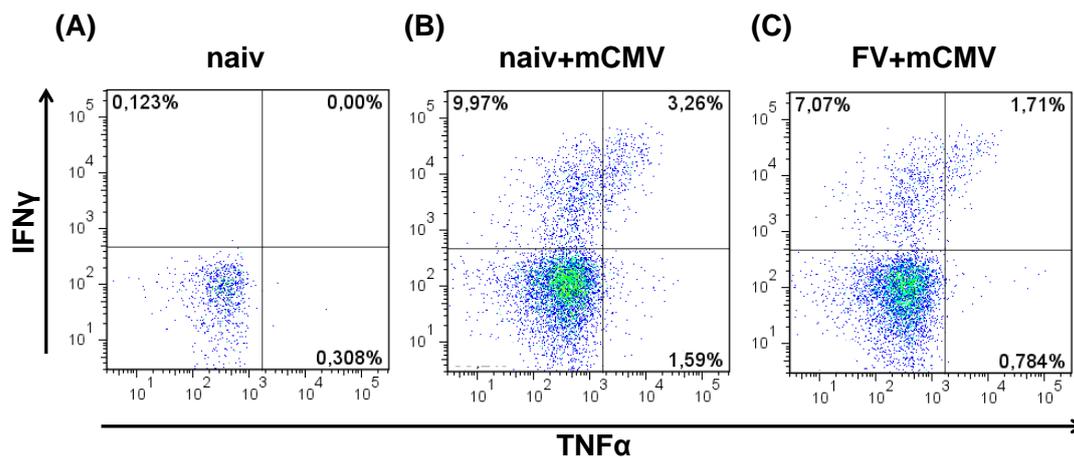


Abbildung 4.3: Dot Plot-Darstellung der Zytokinproduktion von mCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen.

Die Mäuse wurden, wie in Abbildung 4.1 gezeigt, infiziert. Die mCMV-spezifische T-Zellantwort von naiven (A), naiv+mCMV-infizierten (B) und FV+mCMV-superinfizierten (C) Mäusen wurde am Tag 7 nach mCMV-Infektion mittels ICS untersucht. Dargestellt sind exemplarisch repräsentative Dot Plots für die mCMV m45-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort. Gegated wurde auf CD8⁺ CD44⁺ T-Zellen.

Die Analyse der mCMV-spezifischen Immunantwort in der Milz von naiv+mCMV- und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen zeigte, dass die mCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort in FV+mCMV-superinfizierten Mäusen stark reduziert war (Abbildung 4.4). Es zeigte sich, dass die mCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort in der Milz von FV+mCMV-superinfizierten Tieren signifikant geringer war für M45-, M102- und m139-mCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellen und stark reduziert für M57- und m141-mCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu naiv+mCMV-infizierten Tieren.

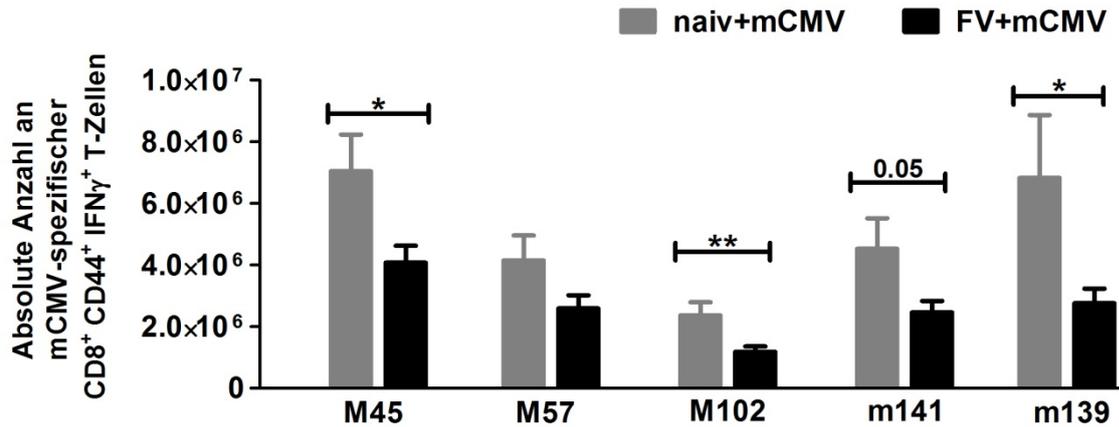


Abbildung 4.4: Reduktion der mCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort während einer primären mCMV-Infektion in chronisch FV-infizierten Mäusen.

Naive C57BL/6-Mäuse wurden, wie in Abbildung 4.1 gezeigt, infiziert. Am Tag 7 nach mCMV-Infektion wurden die Tiere getötet und die mCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort wurde in der Milz von naiv+mCMV-infizierten (graue Balken) und FV+mCMV-superinfizierten (schwarze Balken) Mäusen mittels ICS bestimmt. Die gezeigten Daten resultieren aus einem Pool von jeweils 11-17 Mäusen pro Gruppe aus 3 unabhängig gepoolten Experimenten. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des „student *t*-Tests“ durchgeführt (* < 0.05, ** < 0.005).

Neben den IFN γ ⁺ oder TNF α ⁺ einfach-positiven T-Zellen, geben besonders die Anteile an IFN γ ⁺ TNF α ⁺ doppelt-positiven T-Zellen einen Hinweis auf die Funktionalität von T-Zellen. In 2 von 3 Experimenten wurden weniger IFN γ ⁺ TNF α ⁺ doppelt-positive mCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellen in FV+mCMV-superinfizierten Mäusen, als im Vergleich zu naiv+mCMV-infizierten Mäusen, gefunden. Für die Berechnung der IFN γ bzw. TNF α einfach-positiven T-Zellen und IFN γ /TNF α doppelt-positiven T-Zellen wurde jeweils die Summe der gesamten mCMV-spezifischen (M45 + M57 + M102 + m139 + m141) CD8⁺ T-Zellantwort in naiv+mCMV und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen berechnet und miteinander verglichen. In der Abbildung 4.5 ist exemplarisch das Ergebnis eines Versuches gezeigt, in dem im Vergleich zu naiv+mCMV-infizierten Mäusen signifikant weniger IFN γ /TNF α doppelt-positive mCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellen in den Milzen von FV+mCMV-superinfizierten Mäusen gefunden wurden.

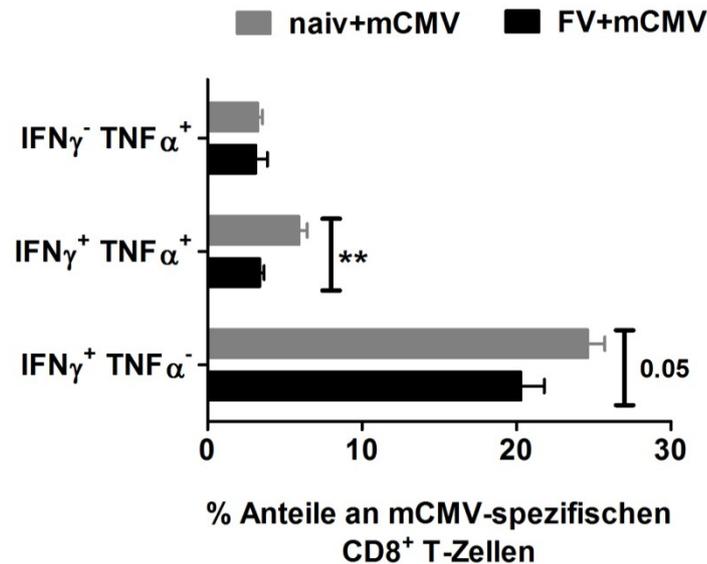


Abbildung 4.5: Übersicht über die Zytokinproduktion von mCMV-spezifischen T-Zellen in mCMV-infizierten naiven und chronisch FV-infizierten Mäusen.

Naive C57BL/6-Mäuse wurden, wie in Abbildung 4.1 gezeigt, infiziert. Am Tag 7 nach der mCMV-Infektion wurden die Tiere getötet und die mCMV-spezifische T-Zellantwort wurde bestimmt. Gezeigt ist jeweils die IFN γ - und TNF α -Produktion von mCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in der Milz. Hierfür wurde die Summe der IFN γ und TNF α einfach-positiven bzw. der IFN γ /TNF α doppelt-positiven CD8⁺ T-Zellen aus allen Peptidstimulationen (M45, M57, M102, m139 und m141) gebildet. Exemplarisch ist das Ergebnis eines Experimentes mit 5-6 Mäusen pro Gruppe abgebildet. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des „*student t-Tests*“ durchgeführt (** < 0.005).

Wir konnten zeigen, dass eine chronische FV-Infektion keinen Einfluss auf den Virustiter einer primären mCMV-Infektion hatte, jedoch zu einer starken Reduktion der primären mCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort führte. Da in chronisch FV-infizierten Mäusen signifikant mehr Treg-Zellen in der Milz nachweisbar sind (335), wurde nun untersucht, ob FV-expandierte Treg-Zellen, welche virusspezifische T-Zellantworten beeinflussen können (78), an der Reduktion der mCMV-spezifischen T-Zellantwort beteiligt waren.

4.1.2 Erhöhte Anzahl an regulatorischen T-Zellen während einer chronischen FV-Infektion

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass eine FV-Infektion mit einer starken Zunahme an Treg-Zellen assoziiert ist (78). Im Verlauf der FV-Infektion bleibt die Anzahl an Treg-Zellen signifikant erhöht, wodurch bereits am Tag 14 nach FV-Infektion ein Funktionsverlust von FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden konnte (77,334). Die erhöhte Anzahl an Treg-Zellen trägt dazu bei, dass FV-spezifische T-Zellen auch während der chronischen FV-Infektion

dysfunktional sind (78,337). Wie bereits publiziert, konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in der Milz von chronisch FV-infizierten Tieren signifikant mehr Treg-Zellen nachweisbar waren als im Vergleich zu naiven Tieren (Abbildung 4.6). Dieses Ergebnis sprach ebenfalls dafür, dass Treg-Zellen für die Reduzierung der mCMV-spezifischen Immunantwort in FV+mCMV-superinfizierten Mäusen verantwortlich sein könnten. Daher wurde in einem weiteren Experiment überprüft, ob Treg-Zellen in FV+mCMV-superinfizierten Mäusen an der reduzierten mCMV-spezifischen T-Zellantwort beteiligt sein könnten.

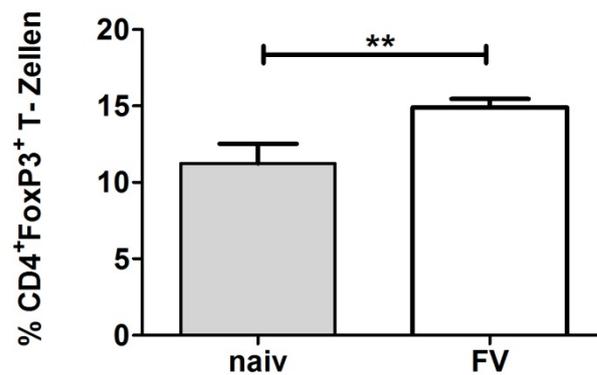


Abbildung 4.6: Treg-Zellen in naiven und chronisch FV-infizierten Tieren.

Naive C57BL/6-Mäuse wurden, wie in Abbildung 4.1 gezeigt, infiziert. Der prozentuale Anteil an CD4⁺FoxP3⁺ T-Zellen der CD4⁺ T Zellpopulation ist abgebildet. Es sind die Mittelwerte mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von 4 unabhängig gepoolten Experimenten mit jeweils 4-14 Tieren pro Gruppe dargestellt. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des „*student t-Tests*“ durchgeführt (** < 0.005).

4.1.3 Einfluss von Treg-Zellen auf die mCMV-spezifische T-Zellantwort von CD8⁺ T-Zellen in chronisch FV-infizierten Mäusen

Um die Fragestellung beantworten zu können, welchen Einfluss FV-expandierte Treg-Zellen in chronisch FV-infizierten Mäusen auf die mCMV-spezifische Immunantwort haben, wurden DEREK-Mäuse verwendet. Mit Hilfe der DEREK-Mäuse ist es möglich, selektiv alle FoxP3 exprimierenden T-Zellen zu depletieren (162). Zu diesem Zweck wurden DEREK-Mäuse chronisch mit FV infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der mCMV-Superinfektion mit Diphtheriatoxin (DT) behandelt (Abbildung 4.7). FV+mCMV-superinfizierte Tiere ohne DT Injektionen dienten als Kontrolle. Zwei Tage nach der letzten DT-Gabe wurde die mCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort in der Milz untersucht.

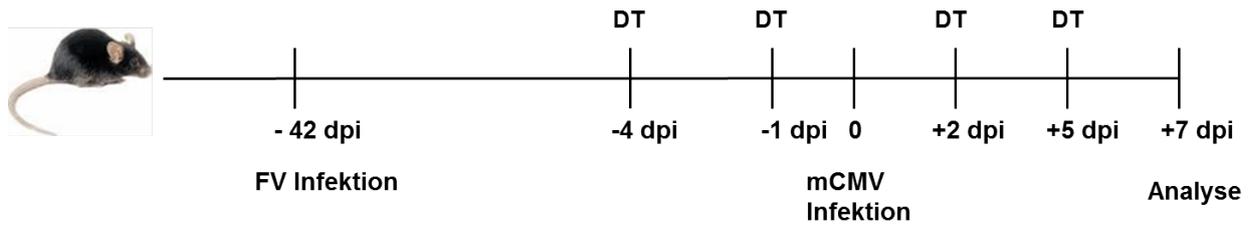


Abbildung 4.7: Versuchsschema zur Depletion von Treg-Zellen.

Naive DEREK-Mäuse wurden i.v. mit 40.000 SFFU FV infiziert. Für die Depletion von Treg-Zellen in chronisch FV-infizierten DEREK-Mäusen wurde den Tieren an den Tagen -4, -1, +2, +5 jeweils 0,5 μg DT i.p. injiziert. Am Tag 0, 42 Tage nach FV-Infektion, wurden diese Mäuse mit 5×10^4 PFU mCMV superinfiziert (FV+mCMV). Die Tiere wurden am Tag 7 nach der mCMV-Infektion getötet.

Zur Bestimmung der mCMV-spezifischen CD8^+ T-Zellantwort in unbehandelten und DT-behandelten FV+mCMV-superinfizierten Mäusen wurde ein ICS durchgeführt. Nach der Depletion von nahezu allen eGFP^+ Treg-Zellen (Abbildung 3.1) waren signifikant mehr $\text{IFN}\gamma$ - und $\text{TNF}\alpha$ -produzierende mCMV-spezifische CD8^+ T-Zellen in den Milzen von FV+mCMV-superinfizierten Mäusen vorhanden, als in den nicht Treg-depletieren Kontrollmäusen (Abbildung 4.8). So konnte in Mäusen, die mit DT behandelt wurden, eine um den Faktor 2 (M45, M102) bzw. den Faktor 4 (m139) bis 4,5 (M57, m141) gesteigerte Anzahl an mCMV-spezifischen CD8^+ T-Zellen nachgewiesen werden.

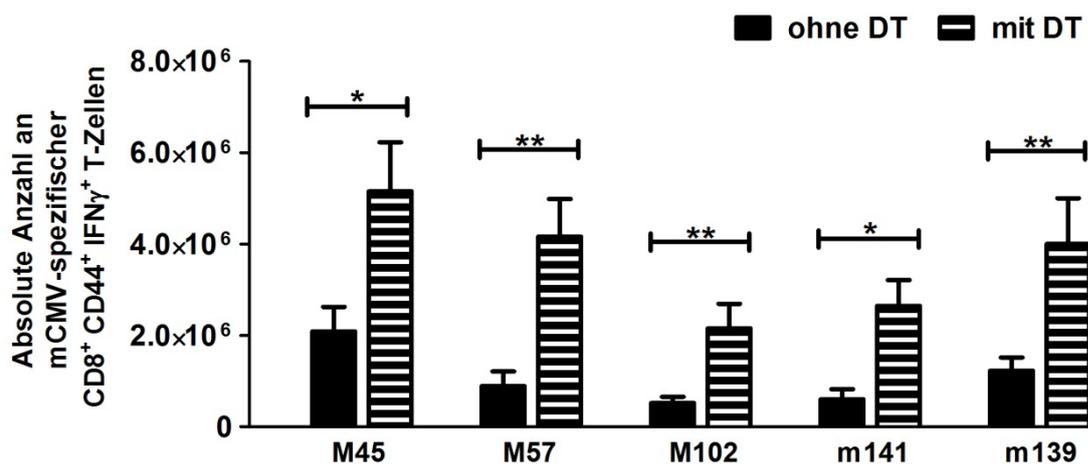


Abbildung 4.8: mCMV-spezifische CD8^+ T-Zellantwort in undepletierten und Treg-depletierten mCMV-superinfizierten chronischen FV-infizierten Mäusen.

Naive DEREK-Mäuse wurden, wie in Abbildung 4.7 gezeigt, infiziert. Die mCMV-spezifische CD8^+ T-Zellantwort in der Milz von DT-behandelten (schwarz-weiß-gestreifte Balken) und unbehandelten (schwarze Balken) FV+mCMV-superinfizierten Mäusen wurde mittels ICS am Tag 7 nach mCMV Superinfektion bestimmt. Es sind die Mittelwerte von 3 gepoolten Experimenten mit 6-11 Mäusen pro Gruppe mit dem SEM gezeigt. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des „student t-Tests“ durchgeführt (* < 0.05, ** < 0.005).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass FV-expandierte Treg-Zellen in chronisch FV-infizierten Mäusen einen Einfluss auf die primäre mCMV-spezifische Immunantwort hatten. Um nachzuweisen, dass dieser Treg-vermittelte Effekt abhängig von der FV-induzierten Expansion der Treg-Zellen ist, wurden FoxP3⁺ Treg-Zellen in naiv+mCMV-infizierten Mäusen depletiert. Die Depletion von Treg-Zellen erfolgte, analog dem in Abbildung 4.7 gezeigten Schema, in naiven Tieren, welche gleich alt zu den chronisch FV-infizierten Mäusen waren. Es zeigte sich, dass die Depletion von Treg-Zellen in naiv+mCMV-infizierten Mäusen keinen Effekt auf die mCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort hatte (Abbildung 4.9).

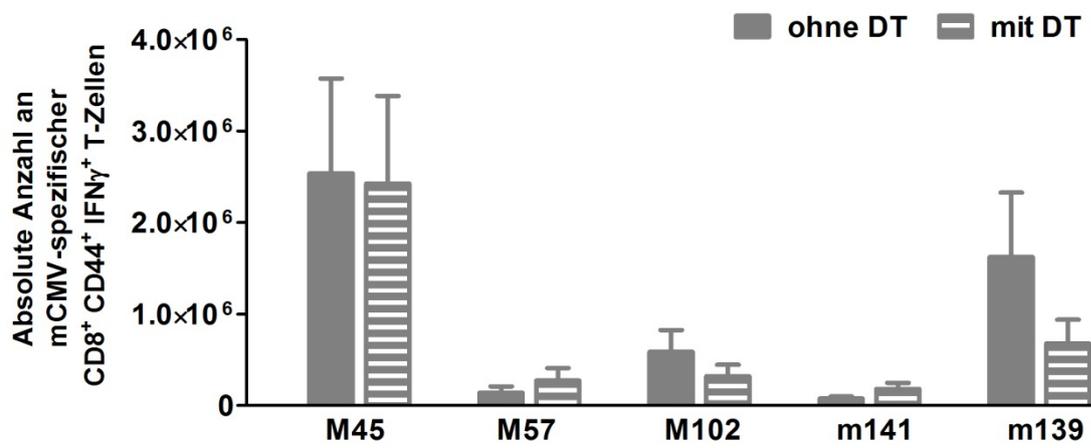


Abbildung 4.9: mCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort in undepletierten und Treg-depletierten nur mCMV-infizierten Mäusen.

Naive DEREG-Mäuse wurden, wie in Abbildung 4.7 gezeigt, infiziert. Die mCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort in der Milz von DT-behandelten (grau-weiß-gestreifte Balken) und unbehandelten (graue Balken) DEREG-Mäusen wurde mittels ICS am Tag 7 nach mCMV-Infektion analysiert. Es sind die Mittelwerte von 1-2 unabhängig gepoolten Experimenten mit jeweils 3-7 Mäusen pro Gruppe mit dem SEM gezeigt. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des „*student t-Tests*“ durchgeführt.

Die dargestellten Ergebnisse zeigten, dass FV-expandierte Treg-Zellen in FV+mCMV-superinfizierten Mäusen die T-Zellantwort einer primären mCMV-Infektion reduzieren konnte, während Treg-Zellen aus naiven Mäusen, die primär mit mCMV infiziert wurden, keinen Einfluss auf die mCMV-spezifische Immunantwort hatten.

Es war daher von Interesse, ob sich das Verhältnis von Treg-Zellen zu T-Zellen aus der Milz in naiv+mCMV- und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen unterschied. Hierfür wurde das Verhältnis von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen zu Treg-Zellen bestimmt. Signifikant mehr CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen zu Treg-Zellen sind in naiv+mCMV-infizierten Mäusen im Vergleich zu FV+mCMV-superinfizierten Mäusen vorhanden (Tabelle 4.1). FV+mCMV-superinfizierte Mäuse hatten ein geringeres Verhältnis von CD8⁺ T-Zellen zu Treg-Zellen als naiv+mCMV-

infizierte Mäuse. Ebenso war das Verhältnis von CD4⁺ T-Zellen zu Treg-Zellen in FV+mCMV-superinfizierten Mäusen geringer als in naiv+mCMV-infizierten Mäusen (Tabelle 4.1). Diese Daten zeigten, dass in FV+mCMV-superinfizierten Mäusen mehr Treg-Zellen pro CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen vorhanden waren als in naiv+mCMV-infizierten Mäusen. Diese Ergebnisse legten nahe, dass die Wahrscheinlichkeit, dass T-Zellen in FV+mCMV-superinfizierten Mäusen in ihrer Funktion durch Treg-Zellen supprimiert werden, im Vergleich zu naiv+mCMV-infizierten Mäusen um den Faktor 1,5 (CD8⁺) bzw. 1,3 (CD4⁺) höher war. Zudem waren in FV+mCMV-superinfizierten Mäusen mehr Treg-Zellen pro gesamt-IFN γ ⁺-mCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, als in naiv+mCMV-infizierten Mäusen vorhanden (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Verhältnis von T-Zellen zu Treg-Zellen in der Milz

Verhältnis	CD8 ⁺ / Treg	CD4 ⁺ / Treg	mCMV-spez. CD8 ⁺ IFN γ ⁺ / Treg
naiv+mCMV	21,5 ± 2,7	12,6 ± 1,2	1,1 ± 0,2
FV+mCMV	14,7 ± 1,1	9,4 ± 0,6	0,7 ± 0,1
p-Value	0.04	0.04	0.23

Das Verhältnis von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen zu Treg-Zellen, sowie das Verhältnis von mCMV-spezifischen gesamt-IFN γ ⁺ CD8⁺ T-Zellen (mCMV-spez. CD8⁺IFN γ ⁺) zu Treg-Zellen in der Milz von naiv+mCMV und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen ist dargestellt. Die gezeigten Daten stammen von 2 unabhängig gepoolten Experimenten mit jeweils 6-7 Mäusen pro Gruppe. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des „*student t-Tests*“ durchgeführt.

Diese Daten zeigten, dass die reduzierte Anzahl von mCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellantworten in FV+mCMV-superinfizierten Mäusen von den FV-expandierten Treg-Zellen abhängig war. Um zu überprüfen, ob dieses ein organspezifischer Treg-Zell-vermittelter Effekt war, wurde die mCMV-spezifische T-Zellantwort im Peritoneum (Ort der mCMV-Infektion) und der Leber untersucht.

4.1.4 Die mCMV-spezifische Immunantwort in peripheren Organen

Das FV persistiert hauptsächlich im Knochenmark, in der Milz und in den Lymphknoten (78), deshalb werden FV-expandierte Treg-Zellen hauptsächlich in diesen Organen gefunden. In Organen wie der Leber, in denen FV üblicherweise weder in der akuten, noch in der chronischen Phase der FV-Infektion repliziert (78), sind hingegen viel weniger Treg-Zellen als z. B. in der Milz vorhanden (212). Daher wurde untersucht, ob Treg-Zellen in chronisch FV-infizierten

Mäusen einen Effekt auf die mCMV-spezifische T-Zellantwort im Peritoneum (Ort der mCMV-Infektion), als auch in der Leber (mCMV-Replikation), haben könnten. Wir haben als erstes untersucht, ob das FV ebenfalls im Peritoneum persistiert, und wie hoch die Anzahl an Treg-Zellen im Peritoneum war. Hierfür haben wir den FV-Titer in peritonealen Exsudats-Zellen (PECs) aus chronisch FV-infizierten und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen mittels qRT-PCR untersucht und konnten tatsächlich FV-RNA in PECs von chronisch FV-infizierten und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen nachweisen. Die Ergebnisse der qRT-PCR waren jedoch wenig aufschlussreich, da die qRT-PCR keine zusätzlichen Informationen über eine mögliche erhöhte FV-Replikation in PECs von FV+mCMV-superinfizierten Mäusen im Vergleich zu chronisch FV-infizierten Mäusen lieferten konnten wie wir es in der Milz gesehen haben (Abbildung 4.14). Prozentual waren jedoch signifikant weniger Treg-Zellen im Peritoneum von chronisch FV-infizierten Mäusen ($4,2\% \pm 1,62\%$, $n = 5$) vorhanden, als in der Milz ($14,9\% \pm 0,553\%$, $n = 11$) (p -Value = 0,0001). Aufgrund dieser Ergebnisse interessierten wir uns dafür, wie die mCMV-spezifische Immunantwort in Organen, in denen kein hoher FV-Titer und keine Expansion von Treg-Zellen in der chronischen FV-Infektion beschrieben ist, aussieht. Um dies zu prüfen, wurde am Tag 7 nach der mCMV-Infektion, die mCMV-spezifische $CD8^+$ T-Zellantwort im Peritoneum und der Leber zwischen naiv+mCMV und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen untersucht. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der mCMV-spezifischen $CD8^+$ T-Zellantwort zwischen naiv+mCMV- und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen im Peritoneum und der Leber nachgewiesen werden (Abbildung 4.10).

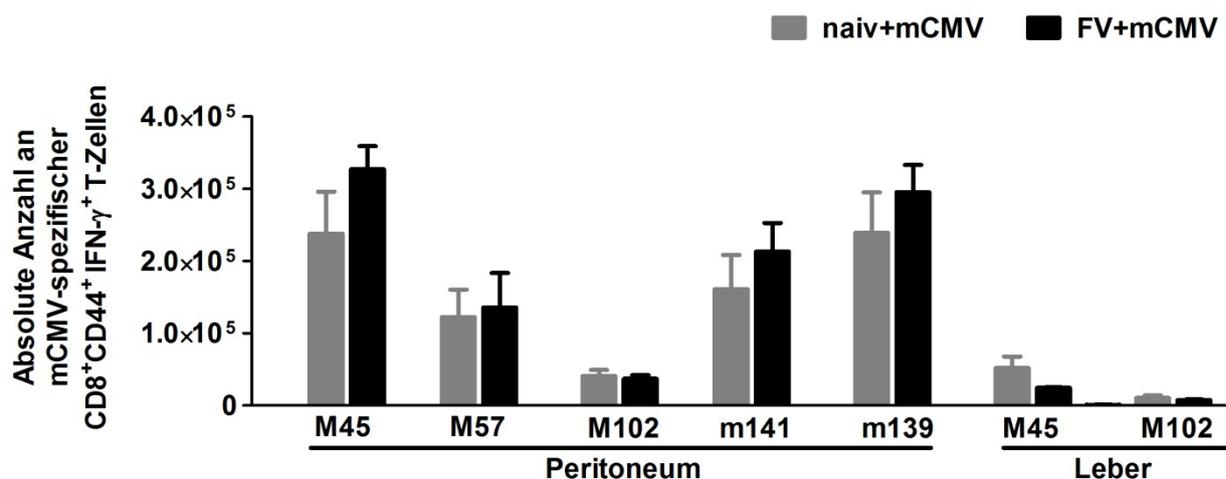


Abbildung 4.10: Die mCMV-spezifische Immunantwort im Peritoneum und in der Leber.

Naive C57BL/6-Mäuse wurden, wie in Abbildung 4.1 gezeigt, infiziert. Am Tag 7 nach der mCMV-Infektion wurden die Tiere getötet und die mCMV-spezifische Immunantwort wurde mittels ICS analysiert. Es werden die Mittelwerte von 1-2 unabhängig gepoolten Experimenten mit jeweils 3-10 Mäusen pro Gruppe mit dem SEM gezeigt. Die statistische Auswertung fand mit Hilfe des „student t-Tests“ statt.

Da sich die mCMV-spezifische Immunantwort im Peritoneum und der Leber von naiv+mCMV- und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen nicht unterschied, war es nahe liegend, dass in diesen Organen ein anderes Verhältnis von Treg-Zellen zu CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen als in der Milz von naiv+mCMV- und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen vorlag. Es konnten keine Unterschiede in dem Verhältnis von Treg-Zellen zu CD8⁺ T-Zellen bzw. CD4⁺ T-Zellen im Peritoneum und in der Leber von naiv+mCMV und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen gefunden werden (Tabelle 4.2). Des Weiteren wurden keine Unterschiede in dem Verhältnis von gesamt-IFN γ ⁺-mCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Peritoneum von naiv+mCMV und FV+mCMV gefunden (Tabelle 4.2). Das Verhältnis von gesamt-IFN γ ⁺ mCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in der Leber von naiv+mCMV infizierten Mäusen war um den Faktor 1,87 höher, unterschied sich jedoch ebenfalls nicht signifikant zu dem Verhältnis von gesamt-IFN γ ⁺ mCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in der Leber von FV+mCMV-superinfizierten Mäusen (Tabelle 4.2). Im Vergleich zur Milz wurden im Peritoneum und in der Leber von naiv+mCMV-infizierten und von FV+mCMV-superinfizierten Mäusen mehr T-Zellen als Treg-Zellen detektiert (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.2: Verhältnis von Treg-Zellen zu T-Zellen im Peritoneum und der Leber

Organ	Verhältnis	CD8 ⁺ / Treg	CD4 ⁺ / Treg	mCMV-spez. CD8 ⁺ IFN γ ⁺ / Treg
PECs	naiv+mCMV	142 ± 23,4	80 ± 8,6	62 ± 4,8
	FV+mCMV	156 ± 23,3	99 ± 13,9	62 ± 7,3
	p-Value	0.68	0.26	0.96
Leber	naiv+mCMV	75,9 ± 10,4	17,0 ± 0,7	6,0 ± 1,6
	FV+mCMV	82,8 ± 16,1	25,5 ± 4,2	3,2 ± 1,0
	p-Value	0.73	0.09	0.13

Dargestellt ist das Verhältnis von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen zu Treg-Zellen, sowie das Verhältnis von mCMV-spezifischen gesamt-IFN γ ⁺ CD8⁺ T-Zellen (mCMV-spez. CD8⁺IFN γ ⁺) zu Treg-Zellen im Peritoneum und in der Leber von naiv+mCMV- und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen. Die gezeigten PEC-Daten stammen von 1-2 gepoolten unabhängigen Experimenten mit jeweils 3-8 Mäusen pro Gruppe. Die gezeigten Leberdaten stammen von 1 Experiment mit jeweils 4 Mäusen pro Gruppe. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des „student t-Tests“ durchgeführt.

Diese Resultate zeigten, dass sich die mCMV-spezifische Immunantwort im Peritoneum und in der Leber von naiv+mCMV und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen nicht unterschied und, dass ein gleiches Verhältnis von Treg-Zellen zu T-Zellen vorlag. Im Vergleich zur Milz waren im Peritoneum und in der Leber jedoch insgesamt mehr T-Zellen als Treg-Zellen vorhanden.

4.1.5 Die mCMV-spezifische Immunantwort 15 Wochen nach primärer mCMV-Infektion in naiven und chronisch FV-infizierten Mäusen

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass die mCMV-spezifische T-Zellantwort in der Milz von FV+mCMV-superinfizierten Mäusen im Vergleich zu nur mCMV-infizierten Mäusen deutlich reduziert war (Abbildung 4.4). Daher sollte untersucht werden, ob sich die mCMV-spezifische T-Zellantwort auch noch in einer späten Phase nach mCMV-Infektion in den Gruppen unterscheidet.

Für die Untersuchung des Einflusses einer chronischen FV-Infektion auf die mCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort 15 Wochen nach primärer mCMV-Infektion, wurden die Tiere zuerst chronisch mit FV infiziert und nach 42 Tagen mit mCMV superinfiziert (Abbildung 4.11). Als Kontrolle wurden naive Mäuse mit mCMV infiziert. 15 Wochen nach der mCMV-Infektion wurden die Tiere für die Analyse der mCMV-spezifischen Immunantwort in der Milz getötet.

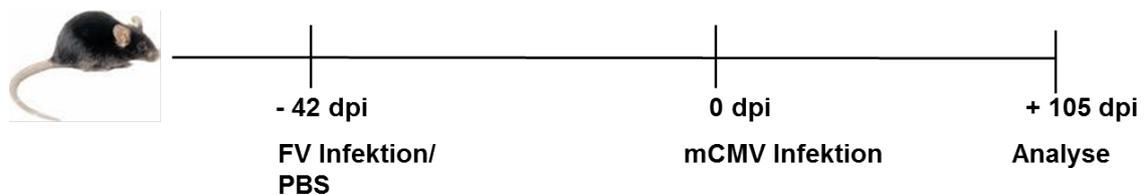


Abbildung 4.11: Infektionsschema zur Analyse der mCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort 15 Wochen nach mCMV-Infektion.

Naive C57BL/6-Mäuse wurden mit FV i.v. infiziert. 42 Tage nach der FV-Infektion wurden die Mäuse mit mCMV superinfiziert. Als Kontrolle wurden naive Mäuse mit mCMV infiziert. 105 Tage nach der mCMV-Infektion wurden die Tiere getötet und der mCMV-Titer, sowie die mCMV-spezifische Immunantwort in der Milz bestimmt.

Die mCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort in naiv+mCMV- und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen 15 Wochen nach primärer mCMV-Infektion unterschied sich nicht voneinander (Abbildung 4.12). Es wurden keine Unterschiede in der mCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort zwischen den *inflationary* Peptiden m139 M38 und IE3, als auch zwischen den *non-inflationary* Peptiden M45, M57, M102 und m141 beobachtet. Der Effekt der Treg-vermittelten Reduktion der mCMV-spezifischen T-Zellantwort war somit im späteren Verlauf der mCMV-Infektion nicht mehr vorhanden.

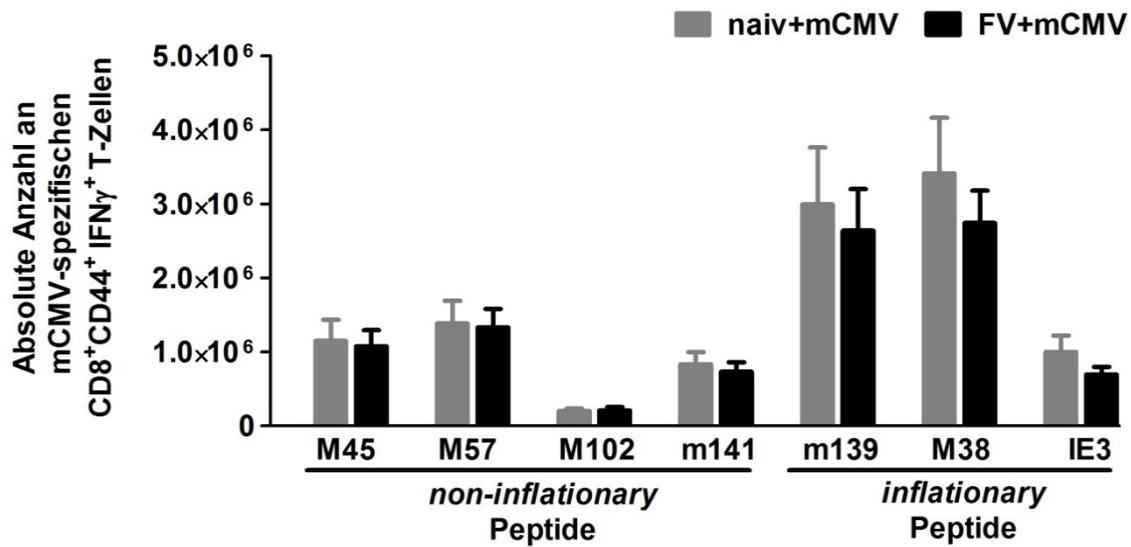


Abbildung 4.12: mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort 15 Wochen nach mCMV-Infektion.

Die Mäuse wurden wie in Abbildung 4.11 gezeigt infiziert. 15 Wochen nach der mCMV-Infektion wurden die Tiere getötet und die mCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort wurde in der Milz mittels ICS bestimmt. Es werden die Mittelwerte von einem Experiment mit jeweils 4-5 Mäusen pro Gruppe mit dem SEM dargestellt. Die statistische Auswertung fand mit Hilfe des „*student t-Tests*“ statt.

4.2 Untersuchungen des Einflusses einer primären mCMV-Superinfektion auf eine chronische FV-Infektion

Um die Auswirkungen einer primären mCMV-Infektion auf eine chronische FV-Infektion bestimmen zu können, wurden naive Mäuse i.v. mit 40.000 SFFU FV infiziert und in der chronischen Phase (sechs Wochen nach der FV-Infektion) mit mCMV superinfiziert. Chronisch FV-infizierte Tiere dienten als Kontrolle. Um die Folgen einer primären mCMV-Superinfektion auf den Krankheitsverlauf der chronischen FV-Infektion zu untersuchen, wurden die Tiere am Tag 7 nach der primären mCMV-Infektion getötet (Abbildung 4.13).

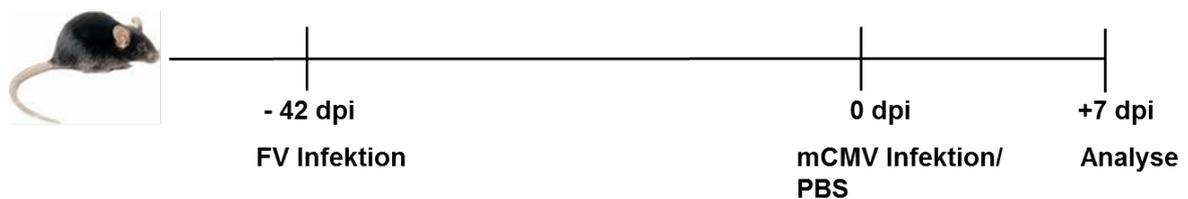


Abbildung 4.13: Infektionsschema zur Analyse des Einflusses einer primären mCMV-Infektion auf eine chronische FV-Infektion.

Naive C57BL/6-Mäuse wurden i.v. mit 40.000 SFFU FV infiziert. Die Versuchstiere wurden in der chronischen Phase der FV-Infektion (42 Tage nach der FV-Infektion) mit einer Viruslast von 5×10^4 PFU mCMV i.p. superinfiziert. Als Kontrolle dienten chronisch FV-infizierte Tiere, denen PBS injiziert wurde. 7 Tage nach der mCMV-Infektion wurden die Tiere getötet und die Viruslast in der Milz sowie die FV-spezifische Immunantwort analysiert.

4.2.1 Effekt der mCMV-Infektion auf den FV-Titer

Für die Analyse des FV-Titers in der Milz wurde der *Infectious Center Assay*'s (IC-Assay) verwendet. Die FV-Last in der Milz von FV+mCMV-superinfizierten Mäusen war zum Zeitpunkt 7 Tage nach mCMV-Infektion signifikant höher (1,6fach) als in chronisch FV-infizierten Kontrolltieren (Abbildung 4.14).

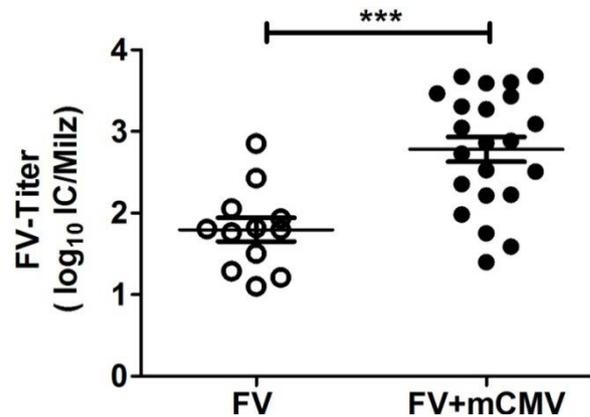


Abbildung 4.14: Einfluss einer mCMV-Infektion auf den FV-Titer in der Milz von chronisch FV-infizierten Mäusen.

Naive C57BL/6-Mäuse wurden, wie in Abbildung 4.13 gezeigt, infiziert. Der FV-Titer in der Milz wurde am Tag 7 nach mCMV-Superinfektion mittels des *IC-Assays* bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte von 5 unabhängig gepoolten Experimenten mit dem SEM. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe eines „*student t-Tests*“ durchgeführt (***) $< 0,0005$).

4.2.2 Einfluss einer primären mCMV-Superinfektion auf die Modulation des Immunsystems von chronisch FV-infizierten Tieren

Um den Einfluss einer mCMV-Superinfektion auf den Verlauf der chronischen FV-Infektion genauer zu analysieren, wurden die Versuchstiere zuerst auf Veränderungen des Milzgewichts und der absoluten Anzahl an Lymphozyten in der Milz untersucht. Während die Milzen von chronisch FV-infizierten Tieren mit durchschnittlich 0,14 g das gleiche durchschnittliche Milzgewicht wie naive Kontrolltiere hatten, führte die primäre mCMV-Infektion zu einer signifikanten Erhöhung des Milzgewichts in chronisch FV-infizierten und in naiven Kontrolltieren (Abbildung 4.15A). Chronisch FV-infizierte Mäuse, die mit mCMV superinfiziert wurden, hatten mit durchschnittlich 0,28 g ein identisches Milzgewicht wie naive Mäuse, die mit mCMV infiziert wurden (Abbildung 4.15A). Die Erhöhung des Milzgewichts ist somit ein Ergebnis der primären mCMV-Infektion. Die Analyse der absoluten Anzahl an Lymphozyten in der Milz zeigte, dass die primäre mCMV-Infektion zu einer Verdoppelung der Anzahl an Lymphozyten in der Milz von naiven und chronisch FV-infizierten Mäusen führte (Abbildung 4.15B). Das erhöhte Milzgewicht konnte somit auf die signifikant erhöhte Anzahl an Lymphozyten in der Milz zurückgeführt werden.

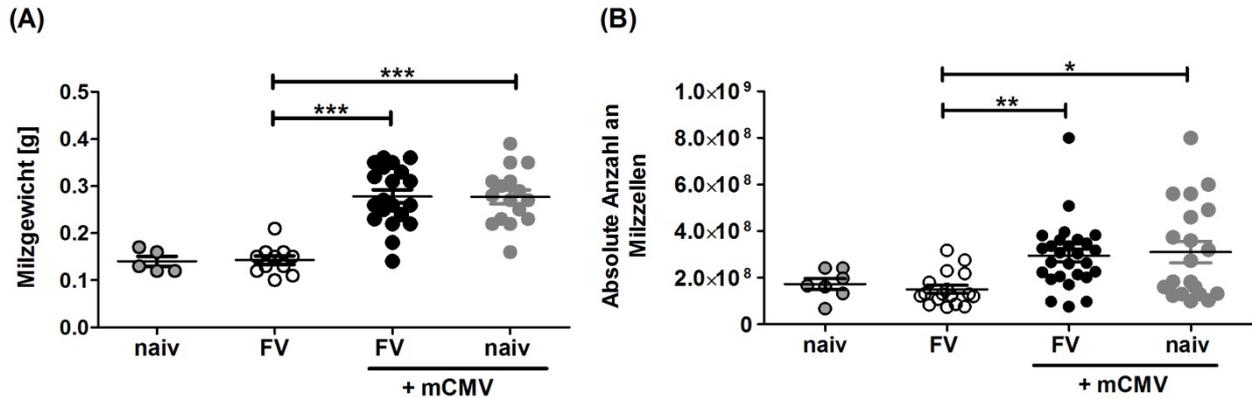


Abbildung 4.15: Milzgewichte und Anzahl an Milzzellen in der Milz von naiven und chronisch FV-infizierten Mäusen im Vergleich zu naiv+mCMV und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen.

Die Mäuse wurden, wie in Abbildung 4.13 gezeigt, infiziert. Am Tag 7 nach der mCMV-Infektion wurden die Tiere für die Analysen getötet und das Milzgewicht (A) sowie die Anzahl an Milzzellen (B) bestimmt. Es werden jeweils die Mittelwerte von 5 bzw. 7 unabhängig gepoolten Experimenten mit dem SEM gezeigt. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des *Kruskal-Wallis*- (A) bzw. des *Bonferroni*-Tests (B) durchgeführt (* < 0,05, ** < 0,005, *** < 0,0005).

Um zu untersuchen, ob alle Zellpopulationen in der Milz gleichmäßig expandieren, oder einige mehr als andere, wurden verschiedene Milzzellpopulationen mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt (Abbildung 4.16). Die primäre mCMV-Infektion führte zu einer signifikanten Erhöhung um den Faktor 13 für Ter119⁺ Erythrozytenvorläuferzellen (Zielzellen für FV) (Abbildung 4.16A) und zu einer signifikanten Zunahme um den Faktor 3 für CD8⁺ (Abbildung 4.16C) bzw. um den Faktor 2,4 für CD4⁺ T-Zellen (nicht abgebildet). Eine signifikante Zunahme um den Faktor 3,6 wurde für die Anzahl an Makrophagen festgestellt (nicht abgebildet). Des Weiteren wurde eine Verdoppelung für die Anzahl an CD19⁺ B-Zellen (Abbildung 4.16B) und eine Zunahme um den Faktor 1,5 für die CD3⁺NK1.1⁺ NK Zellpopulation festgestellt (Abbildung 4.16D).

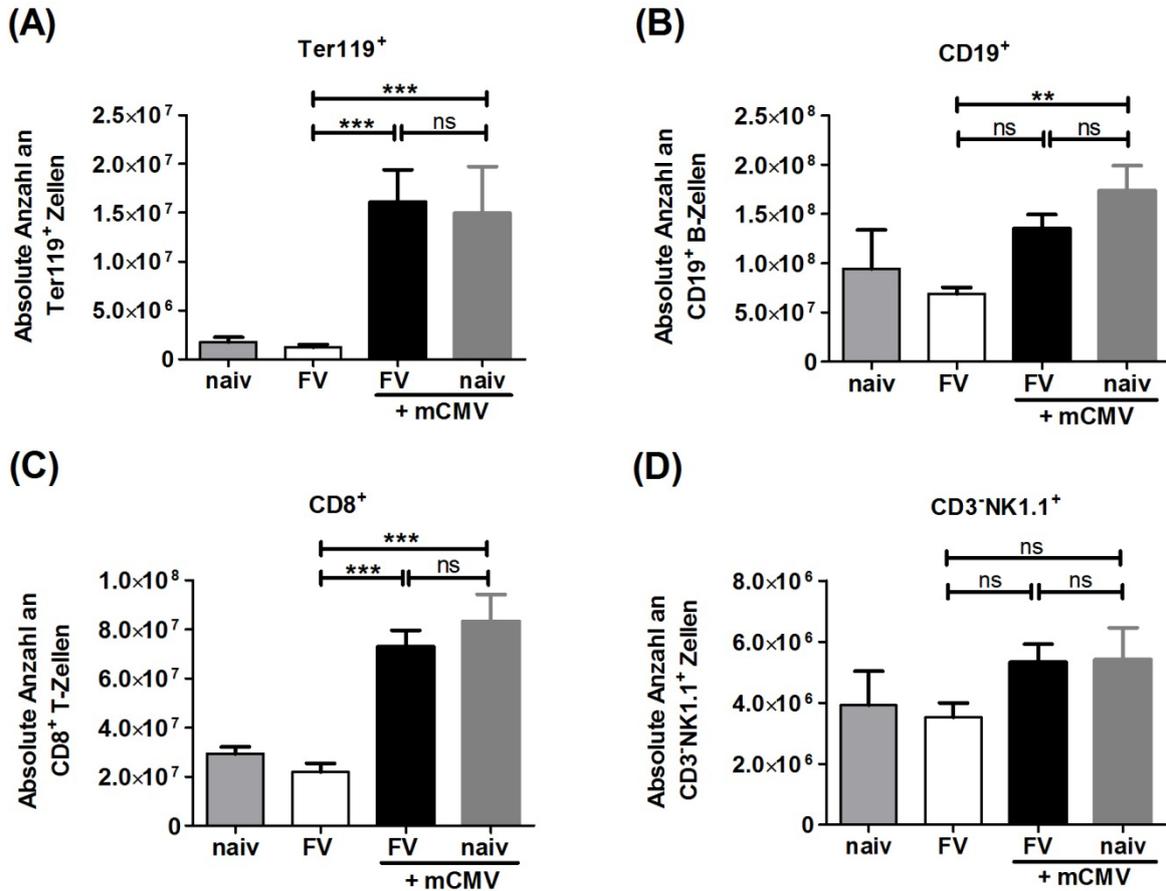


Abbildung 4.16: Milzzellpopulationen von naiven und chronisch FV-infizierten Mäusen im Vergleich zu naiv+mCMV- und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen.

Die Mäuse wurden, wie in Abbildung 4.13 gezeigt, infiziert. Am Tag 7 nach mCMV-Infektion wurden die Tiere getötet. Gezeigt sind die Mittelwerte der absoluten Zellzahlen von (A) Ter119⁺ Zellen, (B) CD19⁺ B-Zellen, (C) CD8⁺ T-Zellen, (D) CD3⁺NK1.1⁺ Zellen mit dem SEM. Die Ergebnisse stammen von 4-8 unabhängig gepoolten Experimenten mit 5-22 Mäusen pro Gruppe. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des *Kruskal-Wallis*- (A+C) bzw. des *Bonferroni*-Tests (B+D) durchgeführt (* < 0,05, *** < 0,0005).

Da die primäre mCMV-Infektion zu einer starken Erhöhung der FV-Zielzellen (Ter119⁺ Zellen und B-Zellen) führte, sollte in einem weiteren Experiment überprüft werden, ob das FV diese Zellen infiziert hatte. Hierfür wurden Ter119⁺ und CD19⁺ B-Zellen mit Hilfe der MACS-Technologie isoliert und anschließend, nach erfolgter Gesamt-RNA-Isolierung, die Menge an FV RNA mittels qRT-PCR bestimmt. FV-RNA-Moleküle wurden sowohl in Ter119⁺ Zellen als auch in CD19⁺ B-Zellen detektiert. Diese Resultate zeigten, dass das FV diese Zellen infizierte hatte. Die Ergebnisse der qRT-PCR hatten jedoch wenig Aussagekraft, da der mittels *IC-Assays* detektierte erhöhte FV-Titer in der Milz von FV+mCMV-superinfizierten Mäusen im Vergleich

zu chronisch FV-infizierten Mäusen (Abbildung 4.14) nicht durch die qRT-PCR reproduziert werden konnte.

Da die FV-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort in der chronischen FV-Infektion ständig neugebildet wird, stellte sich im Folgenden die Frage, ob sich durch die Reaktivierung von FV die FV-spezifische Immunantwort erhöhte. Um dies zu untersuchen, wurden CD8⁺ FV-spezifische T-Zellen mit Hilfe von Tetramer-Klasse-I-Komplexen markiert, die an das gPr80^{gag}85-93 von FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen binden. Es zeigte sich, dass die primäre mCMV-Infektion zu einer signifikant erhöhten Anzahl an CD8⁺CD43⁺ FV-spezifischen T-Zellen führte (Abbildung 4.17A).

Von der FV-Infektion war bekannt, dass FV-spezifische T-Zellen in der chronischen Phase der FV-Infektion durch Treg-Zellen supprimiert werden und kaum zytotoxische Aktivität aufweisen (78). Daher stellte sich nun die Frage, wie die FV-spezifische T-Zellantwort nach FV-Reaktivierung in den mCMV-superinfizierten Mäusen aussah. Hierfür wurde die Funktionalität von FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen anhand der GzmB-Expression untersucht (Abbildung 4.17B). Es zeigte sich, dass FV+mCMV-superinfizierte Mäuse nicht nur signifikant mehr FV-spezifische CD8⁺ T-Zellen hatten als chronisch FV-infizierte Mäuse (Abbildung 4.17A), sondern auch signifikant mehr GzmB produzierten (Abbildung 4.17B). Somit führte die primäre mCMV-Infektion zu einer signifikanten Zunahme an funktionellen FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, während FV-spezifische CD8⁺ T-Zellen aus chronisch FV-infizierten Mäusen - wie erwartet - einen dysfunktionalen Phänotyp aufwiesen (Abbildung 4.17) (77).

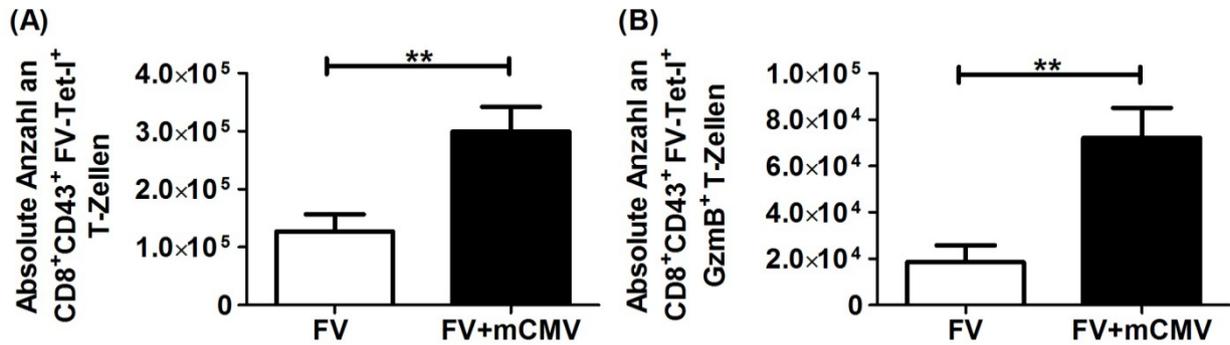


Abbildung 4.17: Untersuchung des Effektes einer primären mCMV-Infektion auf die Anzahl und die Funktion von FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in der Milz von chronisch FV-infizierten Mäusen.

Die Mäuse wurden, wie in Abbildung 4.13 gezeigt, infiziert. Milzzellen von chronisch FV- und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen wurden 7 Tage nach mCMV-Infektion auf die Anzahl an CD8⁺CD43⁺ FV-Tet-I⁺ T-Zellen (A) und auf die Anzahl an funktionellen CD8⁺CD43⁺ FV-Tet-I⁺ GzmB⁺ T-Zellen (B) untersucht. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert mit dem SEM von je 3 unabhängig gepoolten Experimenten mit 11–12 Mäusen pro Gruppe. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des „student *t*-Tests“ durchgeführt (** < 0,005).

Nach diesen Ergebnissen stellte sich die Frage, ob die Expansion von FV-spezifischen T-Zellen durch Rekrutierung CD8⁺ T-Zellen aus anderen Organen, oder durch Proliferation dieser Zellen, vermittelt wurde. Um diese Fragestellung zu bearbeiten, wurde den Mäusen täglich, beginnend drei Tage vor Versuchsende, jeweils 0,8 mg/ml Bromodesoxyuridin (BrdU) dem Trinkwasser zugemischt (Abbildung 4.18). Die Proliferationsrate von FV-spezifischen T-Zellen wurde anschließend am Tag 7 nach der primären mCMV-Infektion anhand der Interkalierung des BrdU in die DNA von FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Durchflusszytometer analysiert.



Abbildung 4.18: Versuchsschema zur Proliferation von FV-spezifischen T-Zellen aus chronisch FV- und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen.

Naive C57BL/6-Mäuse wurden mit FV i.v. infiziert. 42 Tage nach FV-Infektion wurden die Mäuse mit mCMV superinfiziert. Als Kontrolle dienen chronisch FV-infizierte Mäuse, denen PBS injiziert wurde. An den Tagen 4, 5 und 6 nach der mCMV-Superinfektion wurden die Mäuse mit jeweils 0,8 mg/ml Bromodeoxyuridin (BrdU) getränkt. Die Untersuchung der Proliferation von FV-spezifischen T-Zellen aus der Milz erfolgte am Tag 7 nach mCMV-Superinfektion.

Die durchflusszytometrische Analyse der BrdU-Inkorporation zeigte, dass die primäre mCMV-Superinfektion in chronisch FV-infizierten Mäusen zu einer um den Faktor 2 gesteigerten Proliferation von CD8⁺ FV-spezifischen T-Zellen führte (Abbildung 4.19). Dieses Ergebnis zeigte, dass FV-spezifische T-Zellen von FV+mCMV-superinfizierten Mäusen stärker proliferierten als FV-spezifische T-Zellen von chronisch FV-infizierten Mäusen.

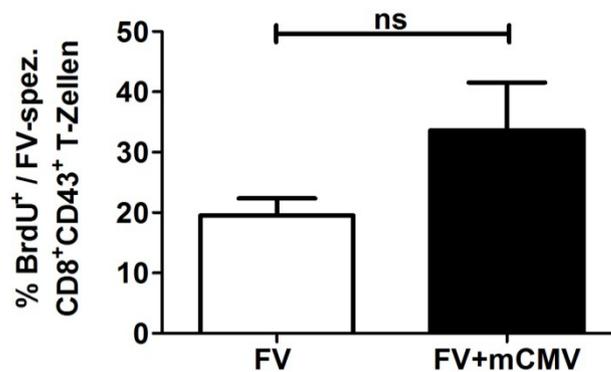


Abbildung 4.19: Proliferation von FV-spezifischen T-Zellen von chronisch FV-infizierten und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen.

Die Mäuse wurden, wie in der Abbildung 4.18 gezeigt, infiziert und mit BrdU behandelt. Milzzellsuspensionen der behandelten Tiere wurden anschließend auf BrdU⁺ aktivierte FV-spezifische CD8⁺CD43⁺ T-Zellen analysiert. Dargestellt ist das Ergebnis von 2 unabhängig gepoolten Experimenten mit 7 Tieren pro Gruppe und dem SEM. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des „*student t-Tests*“ durchgeführt.

Ausgehend davon, dass die primäre mCMV-Superinfektion zu einer erhöhten Viruslast und zu einer signifikanten Zunahme an funktionellen FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen führte, wurde untersucht, ob die erhöhte Anzahl an FV-spezifischen T-Zellen zu einer Reduktion der FV Viruslast führte. Zu diesem Zweck wurde der FV-Titer in der Milz am Tag 7, 10 und 14 nach der primären mCMV-Infektion analysiert. Der FV-Titer war am Tag 7 nach primärer mCMV-Superinfektion in den Milzen von chronisch FV-infizierten Tieren - wie erwartet - stark erhöht (vgl. Abbildung 4.14). Am Tag 10 nach primärer mCMV-Infektion wurde eine leichte Reduktion im FV-Titer in den Milzen festgestellt (Abbildung 4.20). Bis zum Tag 14 nach primärer mCMV-Infektion kam es zu einer signifikanten Reduktion der FV-Last in den Milzen von FV+mCMV-superinfizierten Tieren (Abbildung 4.20). Im Vergleich zu nur chronisch FV-infizierten Tieren blieb der FV-Titer jedoch deutlich erhöht in FV+mCMV-superinfizierten Tieren (nicht abgebildet).

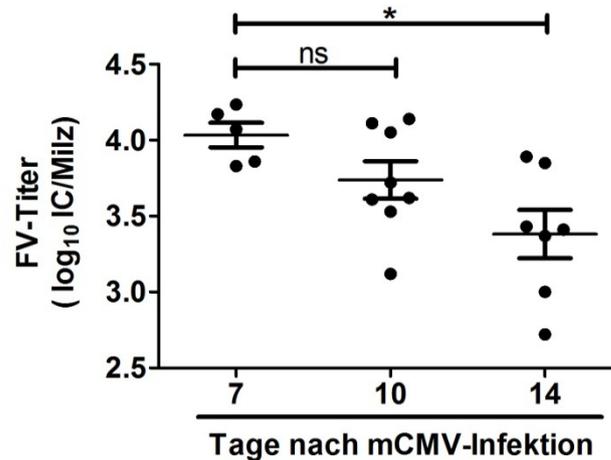


Abbildung 4.20: FV-Titer in der Milz zu verschiedenen Zeitpunkten nach primärer mCMV-Superinfektion in chronisch FV-infizierten Mäusen.

Naive C56BL/6 Mäuse wurden, wie in Abbildung 4.13 gezeigt, infiziert. Der FV-Titer in der Milz wurde am Tag 7, 10 und 14 nach der mCMV-Superinfektion mittels *IC-Assays* analysiert. Abgebildet sind jeweils die Mittelwerte von 2 unabhängig gepoolten Experimenten mit dem SEM. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des *Bonferroni*-Tests durchgeführt (* < 0,05).

4.2.3. Erhöhte Anzahl an F-MuLV-bindenden Antikörpern nach mCMV-Superinfektion in chronisch FV-infizierten Mäusen

Price et al. und Karupiah et al. zeigten, dass die Infektion mit mCMV zu einer Aktivierung und polyklonalen Proliferation von B-Zellen führt (151,237). Auf der Basis dieses Hintergrundwissens sollte untersucht werden, ob die mCMV-induzierte polyklonale B-Zellaktivierung einen Einfluss auf die Produktion von F-MuLV-bindenden Antikörpern hatte. Mit dem F-MuLV-bindenden Antikörpertest wurden FV-spezifische IgG-Gesamt Antikörper im ELISA bestimmt. Nach mCMV-Superinfektion wurden signifikant mehr F-MuLV-bindende Antikörper in Plasmen von FV+mCMV-superinfizierten Mäusen nachgewiesen, als in nur chronisch FV-infizierten Mäusen (Abbildung 4.21).

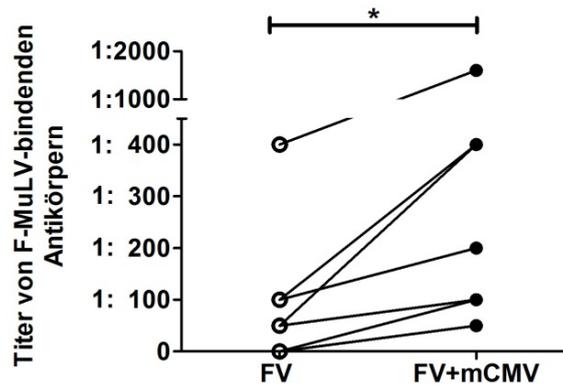


Abbildung 4.21: F-MuLV-bindende Antikörpertiter von FV-infizierten Mäusen vor und nach der mCMV-Superinfektion.

Naive C57BL/6-Mäuse wurden, wie in Abbildung 4.13 gezeigt, infiziert. 4 Wochen nach FV-Infektion und am Tag 7 nach primärer mCMV-Superinfektion wurden Plasmaproben von denselben chronisch FV-infizierten Tieren gewonnen. Die Plasmen wurden zur Bestimmung der bindenden F-MuLV-spezifischen Antikörpertiter verwendet. Jeder Punkt zeigt ein individuelles Tier. Dargestellt ist der Titer von F-MuLV bindenden Antikörpern von denselben chronisch FV-infizierten Mäusen vor (weiße Punkte) und nach der mCMV-Superinfektion (schwarze Punkte). Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des „paired-*t* Tests“ durchgeführt.

4.2.4 Einfluss einer primären mCMV-Infektion auf die FV-spezifische Immunantwort

Die Ergebnisse der FV-Titer in der Milz zeigten, dass die FV-Replikation 14 Tage nach primärer mCMV-Infektion, im Vergleich zu Tag 7, deutlich reduziert war (Abbildung 4.20). Es stellte sich daher die Frage, ob die mCMV-vermittelte Zunahme von funktionellen FV-spezifischen T-Zellen (Abbildung 4.17) an der Reduktion der Viruslast bis zum Tag 14 nach primärer mCMV-Infektion verantwortlich war. Um diese Fragestellung beantworten zu können wurde als erstes die Kinetik der FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort analysiert. Es zeigte sich, dass die primäre mCMV-Superinfektion in chronisch FV-infizierten Tieren zu einer anhaltenden Erhöhung von FV-spezifischen T-Zellen führte (Abbildung 4.22).

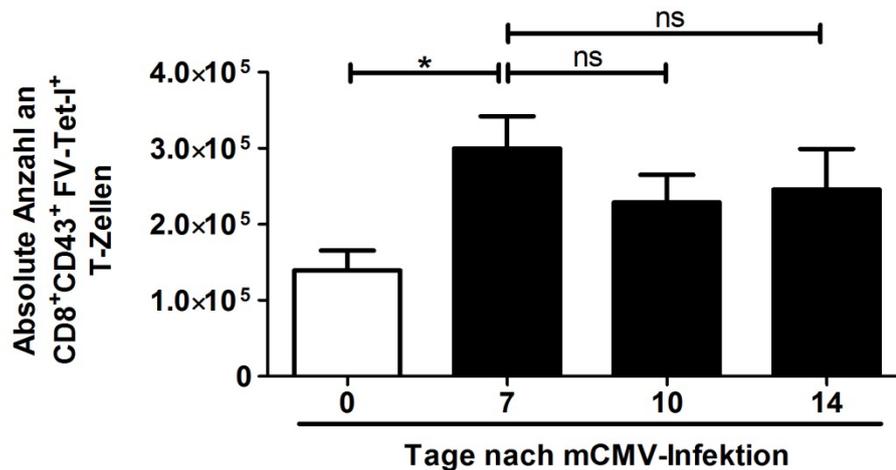


Abbildung 4.22: Kinetik der FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort nach mCMV-Superinfektion in chronisch FV-infizierten Mäusen.

Naive C57BL/6-Mäuse wurden, wie in Abbildung 4.13 gezeigt, infiziert. Milzzellen von chronisch FV-infizierten (weißer Balken) und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen (schwarze Balken) wurden am Tag 7, 10 und 14 nach mCMV-Superinfektion auf die Anzahl an FV-spezifischen (Tet-I⁺) T-Zellen untersucht. Es werden jeweils die Mittelwerte von 4 unabhängig gepoolten Experimenten mit jeweils 7–14 Tieren pro Gruppe mit dem SEM gezeigt. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des *Bonferroni*-Tests durchgeführt (* <0,05).

Aufgrund der konstanten Level an FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen an den Tagen 7, 10 und 14 nach mCMV-Superinfektion, stellte sich nun die Frage, warum es innerhalb des untersuchten Zeitraums nicht zu einer stärkeren Reduzierung der FV-Last kam. Hierfür wurde die zytolytische Aktivität von FV-spezifischen T-Zellen anhand der GzmB-Expression charakterisiert. Der Effekt der mCMV-induzierten Proliferation von funktionellen FV-spezifischen T-Zellen (Abbildung 4.17+18) war nur transient, so dass bereits am Tag 10 nach primärer mCMV-Infektion signifikant weniger funktionelle CD8⁺CD43⁺GzmB⁺ FV-spezifische T-Zellen in der Milz vorhanden waren (Abbildung 4.23). Die GzmB-Expression von FV-spezifischen T-Zellen aus FV+mCMV-superinfizierten Mäusen war am Tag 10 und 14 nach primärer mCMV-Superinfektion genauso hoch, wie die GzmB-Expression von FV-spezifischen T-Zellen aus chronisch FV-infizierten Mäusen, von denen bereits bekannt war, dass diese Zellen durch Treg-Zellen in ihrer Funktionalität supprimiert werden ($p = 0.7$) (77,335).

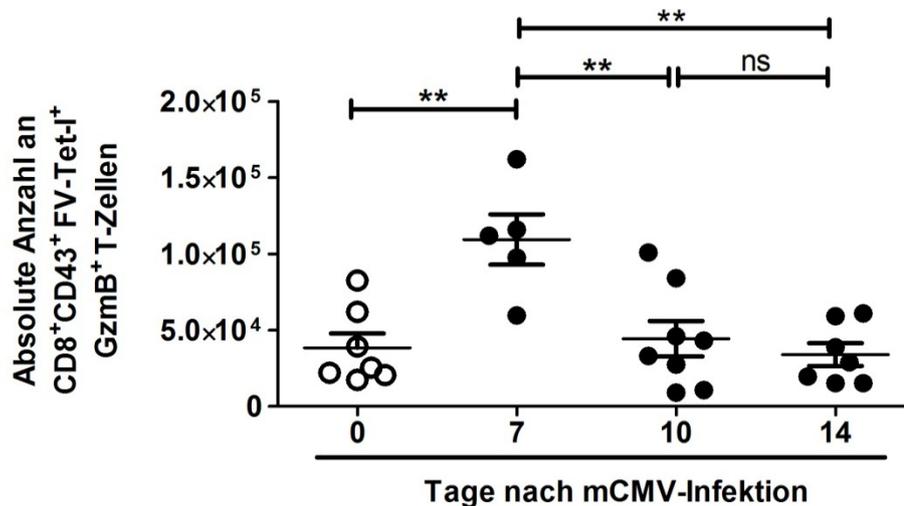


Abbildung 4.23: Kinetik von funktionellen FV-spezifischen T-Zellen nach mCMV-Superinfektion in chronisch FV-infizierten Mäusen.

Naive C57BL/6-Mäuse wurden, wie in Abbildung 4.13 gezeigt, infiziert. Zellsuspensionen aus der Milz von chronisch FV-infizierten (weiße Punkte) und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen (schwarze Punkte) wurden auf die Expression von GzmB in CD8⁺ FV-spezifischen T-Zellen (Tet-I⁺) untersucht. Es werden jeweils die Mittelwerte mit dem SEM von 2 unabhängig gepoolten Experimenten dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Maus. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des *Bonferroni*-Tests durchgeführt (** < 0,005).

Diese Ergebnisse zeigten, dass es durch die primäre mCMV-Superinfektion zu einer signifikanten und andauernden Zunahme an FV-spezifischen T-Zellen kam. Diese Zellen verloren bereits nach 10 Tagen ihre Funktionalität und hatten, bezüglich der GzmB-Expression, den gleichen Phänotyp wie Treg-Zellen supprimierte FV-spezifische T-Zellen von chronisch FV-infizierten Mäusen. Da bekannt war, dass Treg-Zellen am Funktionsverlust von FV-spezifischen T-Zellen beteiligt sind (77), gingen wir davon aus, dass Treg-Zellen ebenfalls an dem Funktionsverlust der FV-spezifischen T-Zellen aus FV+mCMV-superinfizierten Mäusen beteiligt waren. Um dies zu untersuchen, wurde zuerst die Anzahl an Treg-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten in chronisch FV und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen analysiert. Interessanterweise zeigte sich, dass die primäre mCMV-Superinfektion keinen Einfluss auf die FV-induzierte Erhöhung von Treg-Zellen in der Milz hatte (Abbildung 4.24). Die absolute Anzahl an Treg-Zellen war im Vergleich zu chronisch FV-infizierten Kontrolltieren nach der primären mCMV-Infektion nicht signifikant geringer.

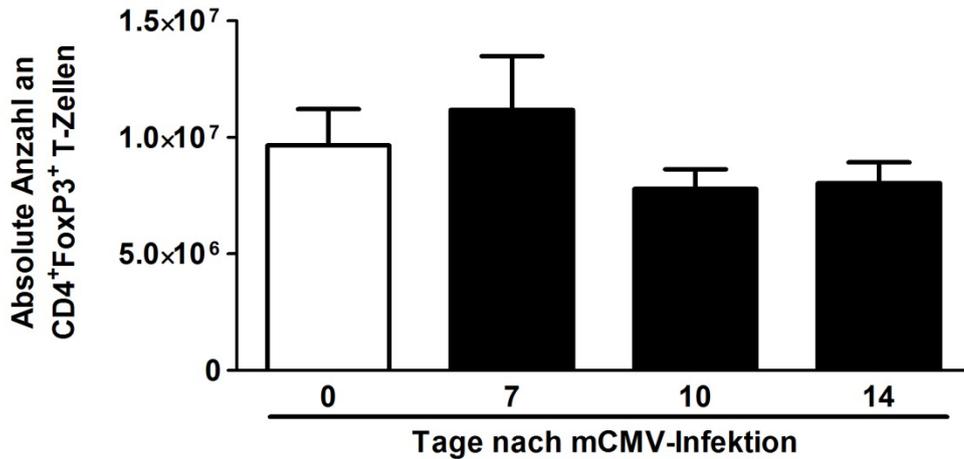


Abbildung 4.24: Kinetik der Anzahl an Treg-Zellen nach mCMV-Superinfektion in chronisch FV-infizierten Mäusen.

Naive C57BL/6-Mäuse wurden, wie in Abbildung 4.13 gezeigt, infiziert. Zellsuspensionen von chronisch FV-infizierten und FV mCMV superinfizierten Mäusen aus der Milz wurden auf die Anzahl an CD4⁺FoxP3⁺ Treg-Zellen untersucht. Es werden jeweils die Mittelwerte und der SEM von 4 unabhängig gepoolten Experimenten mit jeweils 7-16 Mäusen pro Gruppe und dem SEM gezeigt. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des *Bonferroni*-Tests ausgewertet.

Da die mCMV-Superinfektion die Anzahl an Treg-Zellen in der chronischen FV-Infektion nicht beeinflusste, sollte nun überprüft werden, ob Treg-Zellen tatsächlich an dem Funktionsverlust der durch die mCMV-Superinfektion induzierten erhöhten Funktionalität von FV-spezifischen T-Zellen beteiligt waren. Um diese Fragestellung beantworten zu können, wurden Treg-Zellen, wie bereits unter 4.1.3 eingeführt, in FV+mCMV-superinfizierten DEREK-Mäusen depletiert (Abbildung 4.25) und die Anzahl an funktionellen FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen bestimmt. FV+mCMV-superinfizierte Tiere ohne DT-Injektionen dienten als Kontrolle.

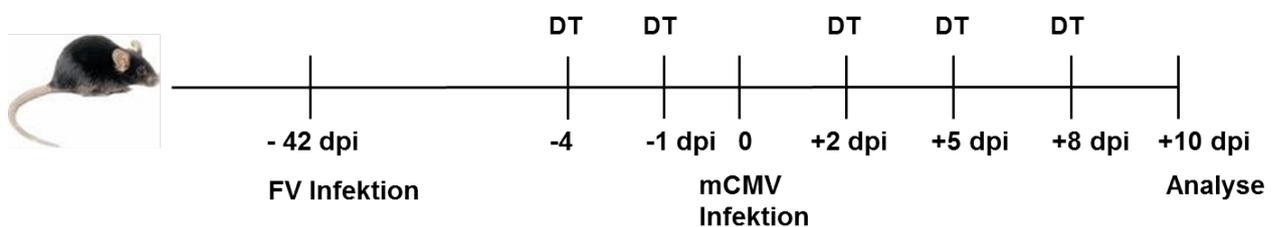


Abbildung 4.25: Versuchsschema zur Depletion von Treg-Zellen.

Naive DEREK-Mäuse wurden i.v. mit 40.000 SFFU FV infiziert. Für die Depletion von Treg-Zellen in chronisch FV-infizierten DEREK-Mäusen wurde den Tieren an den Tagen -4, -1, +2, +5 und +8 jeweils 0,5 µg DT i.p. injiziert. Am Tag 0, 42 Tage nach FV-Infektion, wurden diese Mäuse mit 5 × 10⁴ PFU mCMV superinfiziert (FV+mCMV). Die Tiere wurden am Tag 10 nach der mCMV-Infektion getötet.

Die Depletion von Treg-Zellen führte zu einer signifikant gesteigerten Anzahl an GzmB-produzierenden FV-spezifischen T-Zellen, so dass auch an Tag 10 nach akuter mCMV-Superinfektion funktionelle FV-spezifische T-Zellen detektiert werden konnten (Abbildung 4.26A). Die Expression des Degranulationsmarkers CD107a auf CD8⁺CD43⁺ FV-spezifischen T-Zellen verdeutlichte ebenfalls, dass die Depletion von Treg-Zellen zu einer signifikant gesteigerten Sezernierung von Effektormolekülen, wie z. B. GzmB, führte (Abbildung 4.26B). Diese Ergebnisse zeigten, dass der Effekt, der mCMV-vermittelten verbesserten Funktionalität von FV-spezifischen T-Zellen, durch Treg-Zellen supprimiert wurde. Dies erklärte ebenfalls, warum FV-spezifische T-Zellen aus C57BL/6-Mäusen bereits an Tag 10 nach akuter mCMV-Superinfektion den gleichen funktionellen Phänotyp aufwiesen, wie FV-spezifische T-Zellen aus chronisch FV-infizierten Mäusen (Abbildung 4.23). Die Depletion von Treg-Zellen in nur chronisch FV-infizierten Kontrolltieren führte hingegen zu keiner Steigerung der Funktionalität von FV-spezifischen T-Zellen (p-Value = 0.39) (nicht abgebildet).

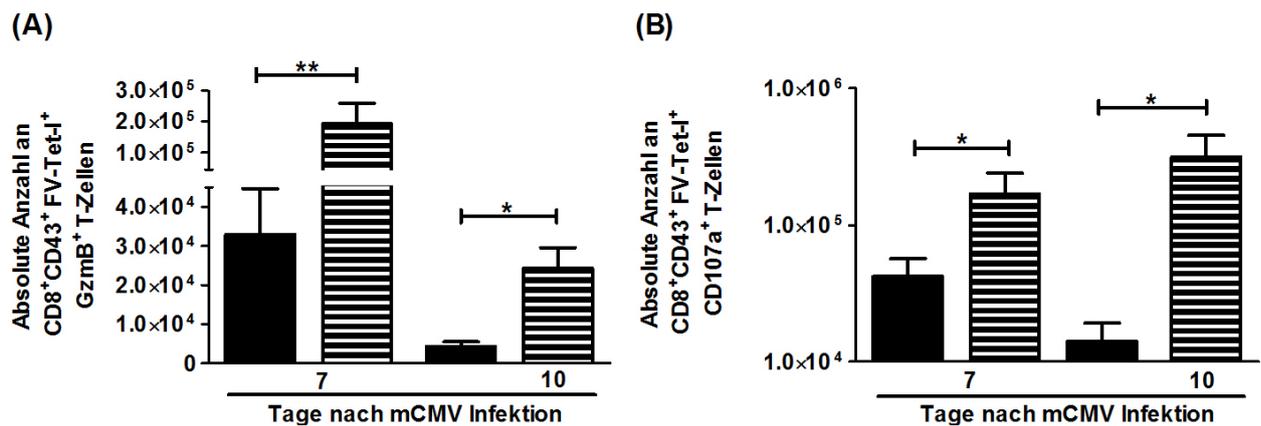


Abbildung 4.26: FV-spezifische Effektorzellantwort nach Depletion von Treg-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der mCMV-Superinfektion in chronisch FV-infizierten Mäusen.

Naive DEREK-Mäuse wurden, wie in Abbildung 4.25 gezeigt, infiziert. Die FV-spezifische CD8⁺T-Zellantwort in der Milz von DT-behandelten (schwarz-weiß-gestreifte Balken) und unbehandelten (schwarze Balken) FV+mCMV-superinfizierten Mäusen wurde anhand der Expression von GzmB⁺ (A) und der Degranulation von CD107a⁺ (B) bestimmt. Die Mittelwerte mit dem SEM von 5 unabhängig gepoolten Experimenten (Tag 7) bzw. von 2 unabhängig gepoolten Experimenten (Tag 10) mit jeweils 4-15 Mäusen pro Gruppe sind abgebildet. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des „student t-Tests“ durchgeführt (* < 0.05, ** < 0.005)

Da die Depletion von Treg-Zellen in FV+mCMV-superinfizierten Mäusen zu einer signifikant gesteigerten Funktionalität von FV-spezifischen T-Zellen führte, wurde darüberhinaus untersucht, ob die erhöhte Funktionalität von FV-spezifischen T-Zellen auch einen positiven

Effekt auf die FV-Last hatte. Hierfür wurde die FV-Last in der Milz von chronisch FV-infizierten Tieren und von FV+mCMV-superinfizierten Tieren vor und nach Depletion von Treg-Zellen mit Hilfe des *IC-Assays* analysiert. Die Depletion von Treg-Zellen in chronisch FV-infizierten Mäusen hatte keinen Einfluss auf den FV-Titer (Abbildung 4.27), eine reduzierte Viruslast hingegen wurde nach Depletion von Treg-Zellen in FV+mCMV-superinfizierten Mäusen gefunden. Die Viruslast von FV+mCMV-superinfizierten Mäusen war, wie bereits zuvor gezeigt, signifikant höher als in chronisch FV-infizierten Mäusen (Abbildung 4.27).

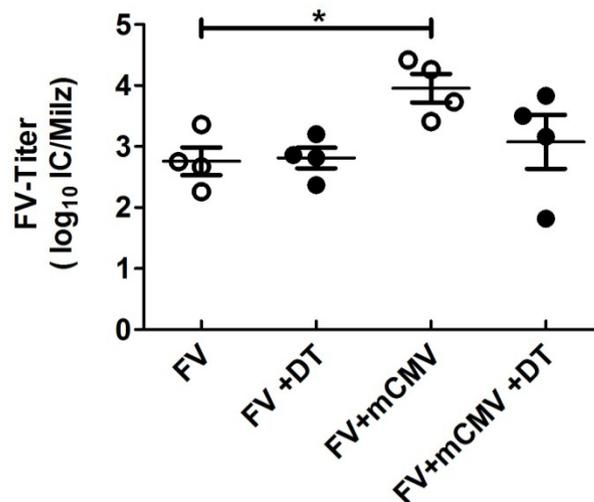


Abbildung 4.27: FV-Last nach Depletion von Treg-Zellen in chronisch FV- und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen.

Naive DEREK-Mäuse wurden, wie in Abbildung 4.13 gezeigt, infiziert und mit DT behandelt (Abbildung 4.7). Die FV-Last in der Milz von DT behandelten (schwarze Punkte) und unbehandelten (weiße Punkte) chronisch FV-infizierten Mäusen bzw. FV+mCMV-superinfizierten Mäusen wurde am Tag 7 nach mCMV-Superinfektion mittels *IC-Assays* analysiert. Gezeigt ist exemplarisch das Ergebnis eines von zwei Experimenten mit dem SEM. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des „*student t-Tests*“ durchgeführt (* < 0,05).

4.2.5 Treg-Zellen von FV-infizierten Tieren haben einen anderen Phänotyp als Treg-Zellen von mCMV-infizierten Tieren

In dem ersten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Treg-Zellen, die während einer FV-Infektion generiert wurden, auch virusspezifische T-Zellen einer heterologen Virusinfektion supprimieren konnten. Weiterhin wurde gezeigt, dass Treg-Zellen, die durch die primäre mCMV-Infektion induziert wurden, keine suppressive Aktivität auf mCMV-spezifische T-Zellen ausübten. Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Treg-Zellen mCMV-induzierte funktionelle FV-spezifischen T-Zellen relativ schnell in ihrer Funktion supprimierten,

so dass diese dysfunktional wurden. Es sollte daher untersucht werden, ob sich Treg-Zellen von FV- bzw. mCMV-infizierten Tieren in ihrem Phänotyp unterscheiden. Als Zeitpunkt für diese Analysen wurde der Peak der FV-spezifischen Immunantwort (Tag 10 nach FV-Infektion) gewählt, da zu diesem Zeitpunkt auch eine signifikante Expansion an Treg-Zellen in der Milz nachzuweisen ist (335). Treg-Zellen von akut mCMV infizierten Tieren glichen phänotypisch naiven Mäusen (Abbildung 4.28), während Treg-Zellen von akut FV-infizierten Tieren einen deutlich anderen Phänotyp aufwiesen (Abbildung 4.28). Akut FV-infizierte Tiere hatten nicht nur signifikant mehr Treg-Zellen in der Milz als naive bzw. akut mCMV-infizierte Tiere (A), sondern hatten signifikant mehr Aktivierungsmarker (B+C), sowie signifikant mehr kostimulierende (251) bzw. inhibierende Rezeptoren (31) (E+F) auf ihrer Zelloberfläche. Zudem proliferierten Treg-Zellen von akut FV-infizierten Tieren deutlich stärker, als Treg-Zellen von naiven bzw. akut mCMV-infizierten Tieren (D).

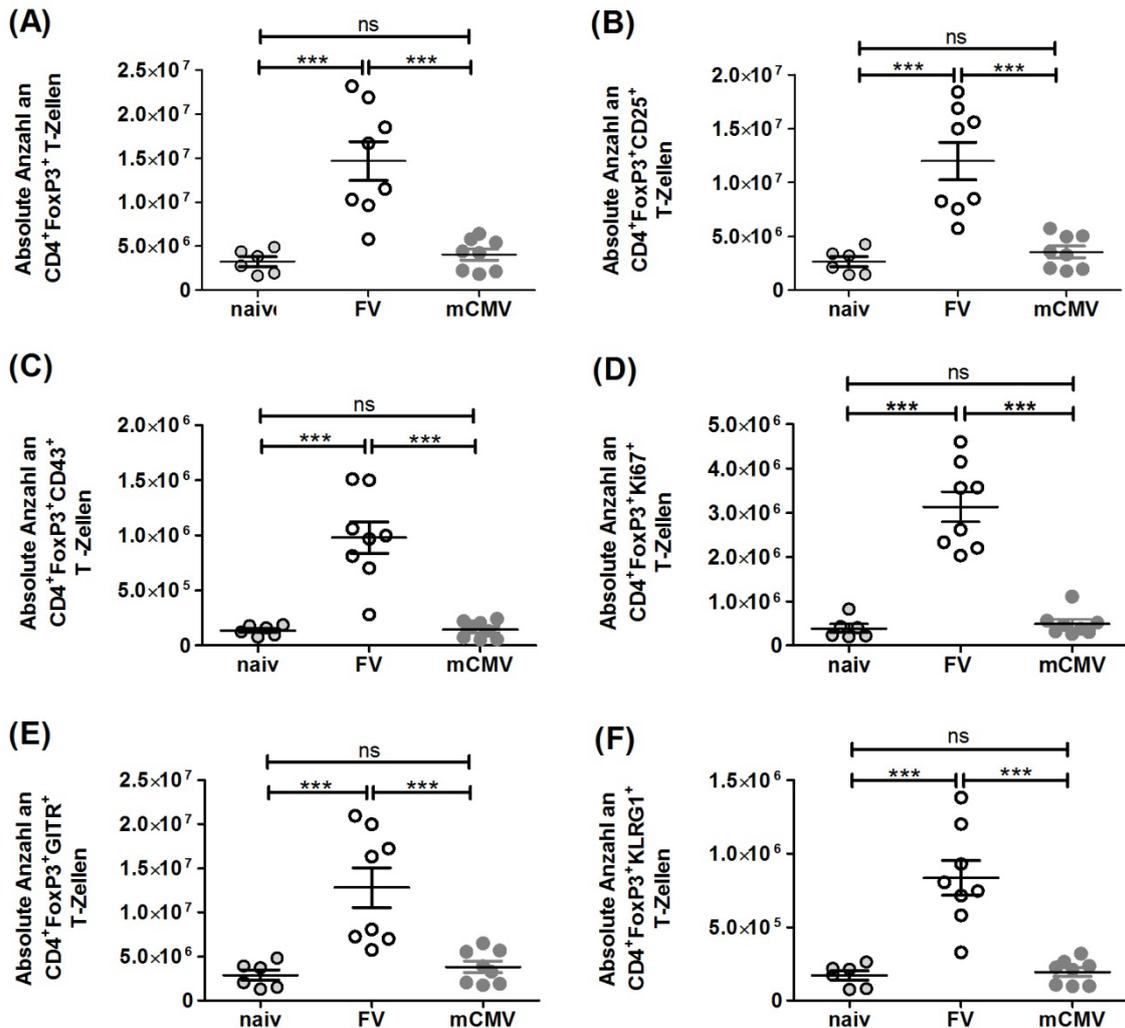


Abbildung 4.28: Phänotyp von Treg-Zellen in FV- und mCMV-infizierten Mäusen.

Milzzellsuspensionen von naiven, 10 Tage FV- bzw. mCMV-infizierten Mäusen wurden auf die Anzahl an $FoxP3^+$ Treg-Zellen untersucht. Analysiert wurde die Expression von Aktivierungsmarkern (B+C) sowie die Expression von ko-stimulierenden und inhibierenden Molekülen (E+F). Des Weiteren wurde die Proliferation von Treg-Zellen anhand der Expression von Ki67 untersucht (D).

Myers et al. beschreibt, dass es während der akuten FV-Infektion zu einer signifikanten Expansion von $V\beta 5^+ CD4^+FoxP3^+$ Treg-Zellen ($V\beta 5^+$ Treg-Zellen) kommt (211). Jene $V\beta 5^+$ Treg-Zellen sind von besonderem Interesse, da diese Treg-Zellpopulation spezifisch für endogene, retrovirus-kodierende Superantigene ist. $V\beta 5^+$ Treg-Zellen exprimieren viele Marker wie KLRG-1, die auf terminal differenzierten Effektorzellen zu finden sind (307) und können anhand der Expression von Nrp-1 (330) den nTreg-Zellen zugeordnet werden (211). Da wir zeigen konnten, dass sich Treg-Zellen in akut FV-infizierten Mäusen deutlich von naiven und akut mCMV-infizierten Mäusen unterscheiden, untersuchten wir die $V\beta 5^+$ Treg Population. Nur

in den akut FV-infizierten Mäusen kam es zu einer Expansion von $V\beta 5^+$ Treg-Zellen (Abbildung 4.29A). Diese $V\beta 5^+$ Treg-Zellpopulation unterschied sich im Vergleich zu naiven oder akut mCMV-infizierten Mäusen deutlich hinsichtlich ihres Aktivierungszustandes (Abbildung 4.29B), sowie in der Expression von inhibierenden Rezeptoren wie GITR und KLRG1 (Abbildung 4.29C-D).

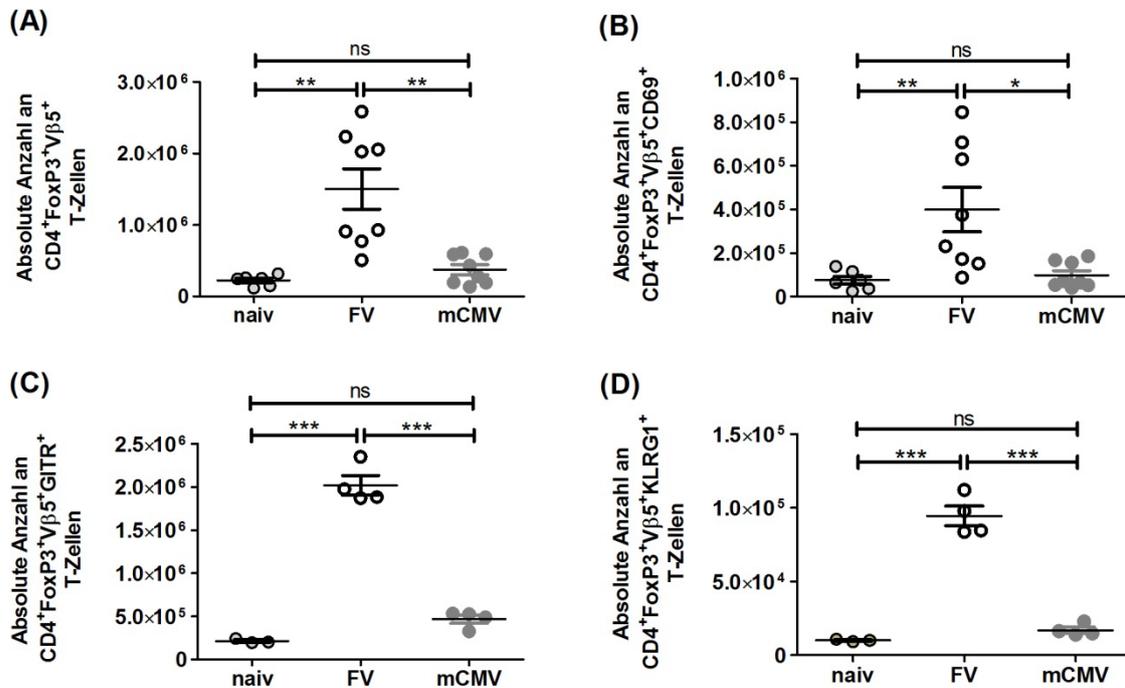


Abbildung 4.29: Phänotyp von $V\beta 5^+$ Treg-Zellen in FV- und mCMV-infizierten Mäusen.

Milzzellsuspensionen von naiven, 10 Tage FV- bzw. mCMV-infizierten Mäusen wurden auf die Anzahl an $CD4^+FoxP3^+$ Treg-Zellen (A), sowie die Expression von (B) CD69, (C) GITR und (D) KLRG1 untersucht.

Diese Resultate zeigten, dass Treg-Zellen und $V\beta 5^+$ Treg-Zellen aus FV-infizierten Mäusen bereits während der akuten Phase der FV-Infektion einen aktiveren Phänotyp hatten als Treg-Zellen von akut mCMV-infizierten Mäusen. Zudem exprimierten Treg-Zellen von akut FV-infizierten Mäusen signifikant mehr ko-stimulierende Moleküle wie GITR und inhibierende Rezeptoren wie KLRG-1 und scheinen somit, im Vergleich zu akut mCMV-infizierten Mäusen, aktiv virusspezifische Immunantworten zu unterdrücken.

5. Diskussion

Anhand einiger Studien konnte gezeigt werden, dass sequentielle Infektionen den Krankheitsverlauf des sequentiellen Virus in Dauer und Ausmaß beeinflussen können. Eine solche heterologe Immunreaktion wurde z. B. für HCV-Patienten beschrieben, die kreuzreaktive T-Zellen für *Influenza-A* Viren (IAV) haben (321). Diese HCV-Patienten entwickelten, im Vergleich zu anderen akut HCV-infizierten Patienten, eine fulminante Hepatitis (311). IAV-kreuzreaktive T-Zellen wurden ebenfalls in *Epstein-Barr-Virus* (EBV)-infizierten Menschen beschrieben, die eine infektiöse Mononukleose haben (65). Neben kreuzreaktiven T-Zellen (272,326), können aber auch NK-Zellen (42,96) und Makrophagen (20), sowie Antikörper und Zytokine (20,113,240) an heterologen Immunreaktionen beteiligt sein. Die Auswirkungen einer heterologen Infektion können im günstigsten Fall zu einer schützenden Immunität und einem subklinischen Verlauf der Infektion oder andererseits, zu einer verstärkten Immunpathologie führen (273). Eine Immunpathologie wird hierbei oft durch eine Dysbalance zwischen pro-inflammatorischen und anti-inflammatorischen Immunantworten verursacht (273). Eine zu starke Immunantwort kann somit auch schädlich für den Organismus sein (82,183).

5.1 Untersuchungen des Einflusses von Treg-Zellen in chronisch FV-infizierten Tieren auf eine primäre mCMV-Infektion

Zur Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts zwischen pro-inflammatorischen und anti-inflammatorischen Immunantworten sind Treg-Zellen essentiell. Treg-Zellen regulieren nicht nur die Homöostase des Immunsystems, sie sorgen zugleich dafür, dass Gewebeschädigungen und Autoimmunerkrankungen verhindert oder zumindest reduziert werden (23,196). Außerdem wird ihnen durch die Suppression von pathogenspezifischen Immunantworten eine Rolle bei der Etablierung einer chronischen Infektion zugesprochen (22). So führt zum Beispiel die Expansion an Treg-Zellen in einer HCV- oder einer FV-Infektion dazu, dass diese Treg-Zellen virusspezifische T-Zellantworten supprimieren, so dass das jeweilige Virus nicht vollständig eliminiert wird und das Virus im Körper persistieren kann (45,78). Im Hinblick darauf, dass bisher keine Informationen über die Beteiligung von Treg-Zellen an heterologen Immunreaktionen bekannt sind, war das Ziel dieser Arbeit, zu überprüfen, welchen Einfluss virusexpandierende Treg-Zellen auf eine sekundäre Virusinfektion haben und somit an heterologen Immunreaktionen beteiligt sind. Hierfür wurden C57BL/6-Mäuse mit dem Friend Retrovirus infiziert und in der chronischen Phase dieser FV-Infektion mit mCMV superinfiziert.

Wie bereits publiziert (192,310), konnten wir zeigen, dass der mCMV-Titer in verschiedenen Organen am Tag 7 nach mCMV-Infektion unterschiedlich hoch war. Es wurde jedoch kein signifikanter Unterschied im Virustiter zwischen naiv+mCMV und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen detektiert (Abbildung 4.2). FV-expandierte Treg-Zellen hatten somit keinen Einfluss auf den mCMV-Titer. In einer Studie von Mayo und Rapp aus dem Jahr 1980 wurde bereits der Einfluss einer Superinfektion zwischen FV und mCMV untersucht (187). Im Gegensatz zu der vorliegenden Studie wurden in der Studie von Mayo und Rapp jedoch akut FV-infizierte Mäuse am 3 Tag nach FV-Infektion mit mCMV superinfiziert (187). In diesen akut FV+mCMV-superinfizierten Mäusen konnten Mayo und Rapp mehr mCMV-Isolate nachweisen als in nur mCMV-infizierten Mäusen (187). Im Unterschied zu akut FV-infizierten Mäusen haben chronisch FV-infizierte Mäuse einen anderen Immunstatus, da die akute Phase der Infektion vorbei ist (Inflammation, Beteiligung des angeborenen Immunsystems) und FV-spezifische T-Zellantworten durch FV-expandierte Treg-Zellen supprimiert werden (78). Zudem bleibt zu beachten, dass Mayo und Rapp für ihre Experimente den Eckner-NB FV-Stamm (86) und DBA/2-Mäuse mit einem H2^d-Haplotyp verwendet haben. Im Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten C57BL/6-Mäusen mit einem H2^b-Haplotyp sind DBA/2-Mäuse (H2^d-Haplotyp) sehr suszeptibel für eine FV-Infektion (131,276). Des Weiteren bleibt zubeachten, dass der Smith-Stamm von mCMV in DBA/2-Mäusen virulenter ist als in C57BL/6-Mäusen und somit eine stärkere Modulation des Immunsystems erzeugt. Daher, sind die in meiner Arbeit gezeigten Ergebnisse nicht unmittelbar mit der Studie von Mayo und Rapp vergleichbar. Die unterschiedlichen Ergebnisse im mCMV-Titer zeigen aber, dass der Zeitpunkt einer Sekundärinfektion und der Immunstatus des Wirtes eine entscheidende Rolle für den Verlauf einer sequentiellen Infektion hat. Des Weiteren scheint der genetische Hintergrund eines Individuums eine wichtige Rolle für die Pathogenität einer Virusinfektion zu spielen. In anderen Studien wird ebenfalls beschrieben, dass opportunistische Infektionen einen Einfluss auf den Virustiter der Sekundärinfektion haben (49,123,226). So zeigten z. B. Peacock et al., dass eine Superinfektion mit mCMV in chronisch LP-BM5-MAIDS (*murine acquired immunodeficiency syndrome*)-infizierten Mäusen, im Vergleich zu nur mCMV-infizierten Kontrollmäusen, 6 Tage nach primärer mCMV-Infektion zu einem signifikant erhöhten mCMV-Titer in der Leber führte (226). Peacock et al. verwendeten jedoch, anstelle des in dieser Arbeit verwendeten FV Stocks und des Smith-Stamms von mCMV, das LP-BM5-Virus und den K181-mCMV Virus-Stamm. Im Gegensatz zu FV induziert das LP-BM5 einen ähnlichen Verlauf und ähnliche Symptome, die denen der erworbenen Immunschwäche AIDS stark ähneln (319). Im Vergleich zu dem in dieser Arbeit verwendeten Smith-Stamm von mCMV ist das K181-mCMV Virus virulenter und

führt zu höheren mCMV-Titern in den Speicheldrüsen (198,291). Zudem wurde für K181-mCMV-infizierte Mäuse eine höhere Sterberate detektiert als in Mäusen, die mit dem Smith-Stamm von mCMV infiziert wurden (140). Aufgrund dieser Divergenzen und ist davon auszugehen, dass dies die Ursache für die detektierten Unterschiede ist (291). Auch in der Studie von Zuniga et al. wurde gezeigt, dass eine chronische LCMV-Infektion in C57BL/6-Mäusen eine opportunistische mCMV-Infektion negativ beeinflussen kann und zu höheren mCMV-Titern führt (340).

Eine weitere Möglichkeit, warum in der vorliegenden Arbeit kein Unterschied im mCMV-Titer zwischen naiv+mCMV und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen detektiert wurde, könnte damit zusammenhängen, dass wir durch die mCMV-Infektion in C57BL/6-Mäusen eine starke NK-Zellantwort induziert haben (263). Dies ist auf die für NK-Zellen aus C57BL/6-Mäusen charakteristische Expression des aktivierenden Ly49H-Rezeptors zurückzuführen (159). Dieser NK-Zellrezeptor interagiert mit dem mCMV-spezifischen m157-Protein (13), was zur Aktivierung von Ly49H⁺-NK-Zellen und zur Sezernierung von Molekülen, wie IFN γ , führt (290). Daher ist davon auszugehen, dass die mCMV-induzierte starke NK-Zellantwort sowohl in naiv+mCMV- als auch in FV+mCMV-superinfizierten Mäusen zur frühen Kontrolle der mCMV-Infektion beigetragen hat und deshalb keine Unterschiede im mCMV-Titer detektiert werden konnten.

Die hier beschriebenen Beispiele zeigen, dass die Folgen einer heterologen Infektion von den heterologen Viren, als auch vom Zeitpunkt der Sekundärinfektion (Superinfektion oder sequentielle Infektion) und somit von einem durch die Primärinfektion moduliertem Immunsystem abhängig ist.

Aus vielen Studien ist bekannt, dass die FV-Infektion mit einer signifikant erhöhten Anzahl an Treg-Zellen assoziiert ist, die mit einer Dysfunktion der FV-spezifischen T-Zellantwort korreliert (77,335,337). Mit diesem Hintergrundwissen wurde daher getestet, ob FV-expandierte Treg-Zellen auch einen Einfluss auf die mCMV-spezifische Immunantwort haben. Die in der vorliegenden Arbeit dokumentierten Ergebnisse zeigten, dass eine chronische FV-Infektion ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion von mCMV-spezifischen Immunantworten in FV+mCMV-superinfizierten Mäusen führte (Abbildung 4.3 und 4.4). Da in den Milzen von FV+mCMV-superinfizierten Mäusen signifikant weniger IFN γ und TNF α sezernierende mCMV-spezifische T-Zellen detektiert wurden als in den Milzen von naiv+mCMV-infizierten Kontrolltieren (Abbildung 4.4), ließen diese Ergebnisse darauf schließen, dass womöglich Treg-Zellen, die während der FV-Infektion expandierten, für die Suppression der mCMV-spezifischen

Immunantwort verantwortlich sein könnten (78,335). Die Analyse der prozentualen Anteile an Treg-Zellen zeigte, dass signifikant mehr Treg-Zellen in chronisch FV-infizierten Mäusen vorhanden waren als in naiven Mäusen (Abbildung 4.6) (335). Zudem stellte sich heraus, dass das Verhältnis von Treg-Zellen zu T-Zellen in FV+mCMV-superinfizierten Mäusen, im Vergleich zu naiv+mCMV-infizierten Mäusen, signifikant geringer war und somit signifikant mehr Treg-Zellen pro T-Zellen in FV+mCMV-superinfizierte Mäusen vorhanden waren (Tabelle 4.1). Myers et al. zeigten bereits, dass das Verhältnis von CD8⁺ T-Zellen zu Treg-Zellen in der Milz von chronisch FV-infizierten Mäusen höher ist als in naiven Mäusen (212). Des Weiteren zeigten sie, dass das Verhältnis von Treg-Zellen zu FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in chronisch FV-infizierten Mäusen entscheidend für die Suppression von FV-spezifischen Immunantworten ist (212). Daher sprachen diese Ergebnisse ebenfalls dafür, dass Treg-Zellen für die Reduzierung der mCMV-spezifischen Immunantwort in FV+mCMV-superinfizierten Mäusen verantwortlich sein könnten. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden DEREK-Mäuse chronisch mit FV infiziert und zur Depletion von Treg-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach mCMV-Superinfektion mit Diphtheriatoxin behandelt. Da DEREK-Mäuse einen Diphtheriatoxinrezeptor unter der Kontrolle des FoxP3-Promotors exprimieren (162), können in diesen Mäusen selektiv, durch die Injektion von Diphtheriatoxin, FoxP3-exprimierende T-Zellen depletiert werden. Nach Depletion von Treg-Zellen hatten FV+mCMV-superinfizierte Mäuse signifikant mehr IFN γ - und TNF α -produzierende mCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellen, als nicht Treg-depletierte FV+mCMV-superinfizierte Kontrollmäuse (Abbildung 4.8). Diese Ergebnisse zeigten, dass Treg-Zellen aus chronisch FV-infizierten Mäusen für die Suppression der mCMV-spezifischen Immunantwort verantwortlich waren. Die Depletion von Treg-Zellen in naiv+mCMV-infizierten Mäusen hatte hingegen keinen Einfluss auf die mCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort (Abbildung 4.9). Diese Ergebnisse legten nahe, dass Treg-Zellen aus naiven Mäusen einen anderen Phänotyp hatten als FV-expandierte Treg-Zellen, und es in naiv+mCMV-infizierten Mäusen zu keiner Suppression von mCMV-spezifischen T-Zellantworten kam. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu anderen Studien. Untersuchungen, in denen Treg-Zellen vor der Infektion mit z. B. IAV, HSV oder dem respiratorischen-Syncytial-Virus (RSV) depletiert wurden, zeigten, dass die Depletion von Treg-Zellen in naiven Mäusen zu einer stärkeren virusspezifischen Immunantwort führte (38,177,304). So zeigten z. B. Fulton et al., dass RSV-infizierte Mäusen, die vor der Infektion von Treg-Zellen depletiert wurden, eine erhöhte RSV-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort hatten und mehr IFN γ und TNF α produzierten (100,304). Ähnliche Ergebnisse wurden von Lund et al. für eine HSV-2-Infektion (177) und von Zelinskyy et al. für eine akute FV-Infektion beschrieben (334). Des Weiteren konnten Aandahl et al. in *in vitro* Studien zeigen, dass die *in vitro*-Depletion

von Treg-Zellen von peripheren mononuklearen Zellen aus HIV+CMV-infizierten Patienten zu einer stärkeren HIV-spezifischen und hCMV-spezifischen Immunantwort führte (1). Dass iTreg-Zellen eine Rolle während der akuten mCMV-Infektion spielen, wurde durch Li et al. gezeigt. In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Ko-Kultivierung von Milzzellen mit mCMV-infizierten murinen Fibroblasten zur Induktion von iTreg-Zellen aus naiven T-Zellen führte. Diese iTreg-Zellen supprimierten anschließend *in vitro* mCMV-spezifische T-Zellantworten durch die Sezernierung von TGF- β (168). Dass in der Studie von Li et al. eine Treg-Zell-vermittelte Suppression von mCMV-spezifischen T-Zellantworten detektiert werden konnte, könnte daran liegen, dass das Verhältnis von Treg-Zellen zu T-Zellen und u.a. das Zytokinmilieu *in vitro* nicht identisch mit den *in vivo* vorliegenden Verhältnissen ist. Zudem sind *in vivo* weitere Immunzellen an der Abwehrreaktion gegen ein Pathogen beteiligt, so dass Treg-Zellen, zur Verhinderung einer überschießenden Immunreaktion, nicht nur T-Zellantworten supprimieren müssen, sondern z. B. auch die Aktivität von NK-Zellen (110). So zeigten z. B. Sungur et al., dass die Treg-Zell-vermittelte Suppression von mCMV-spezifischen Immunantworten in der akuten Phase der mCMV-Infektion vor allem gegen NK-Zellen gerichtet ist (301). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch durch die Depletion von Treg-Zellen kein positiver Effekt auf die Anzahl an NK-Zellen festgestellt werden (nicht abgebildet). Daher sprechen diese Ergebnisse dagegen, dass die suppressive Aktivität von Treg-Zellen aus naiv+mCMV-infizierten primär gegen NK-Zellen gerichtet ist. In einer Studie von Schwele et al. wurde überdies hinaus gezeigt, dass $V\beta 12^+CD25^+$ iTreg-Zellen aus hCMV-infizierten Nierentransplantationsempfängern *in vitro* hCMV-spezifische $CD4^+$ T-Zellantworten supprimierten (268). Diese Ergebnisse zeigen, dass iTreg-Zellen *in vitro* einen Einfluss auf mCMV-spezifische T-Zellantworten haben. Die suppressive Aktivität von nTreg-Zellen scheint hingegen *in vivo* nicht primär gegen mCMV-spezifische T-Zellantworten gerichtet zu sein. Hierfür sprach, dass es in der vorliegenden Arbeit durch die Depletion von Treg-Zellen in naiven Mäusen nicht zu einer erhöhten mCMV-spezifischen Immunantwort gekommen ist. Diese Ergebnisse weisen somit darauf hin, dass Treg-Zellen in der akuten Phase der mCMV-Infektion anscheinend keinen Einfluss auf die mCMV-spezifische $CD8^+$ T-Zellantwort haben. Hierfür sprach zudem, dass im Gegensatz zu einer IAV-, HSV-, HIV- und FV-Infektion keine Hinweise auf eine Expansion von Treg-Zellen während einer akuten mCMV-Infektion bekannt waren (169). Auch in den Untersuchungen dieser Arbeit wurde keine Expansion von Treg-Zellen während einer akuten mCMV-Infektion beobachtet. Diese Ergebnisse sprechen wiederum dafür, dass die Treg-vermittelte Reduktion der mCMV-spezifischen Immunantwort abhängig von FV-expandierten Treg-Zellen ist.

Diese Ergebnisse zeigen somit erstmals, dass Treg-Zellen, aus einer chronischen retroviralen-Infektion, Immunantworten einer Herpesvirusinfektion beeinflussen und beschreiben hiermit einen bisher unbekanntem Mechanismus in der heterologen Immunität.

Die bisher beschriebenen Experimente aus der Milz zeigen, dass die Reduktion von mCMV-spezifischen Immunantworten von FV-expandierten Treg-Zellen abhängig war. Daher interessierten wir uns dafür, wie die mCMV-spezifische Immunantwort in Organen, in denen kein hoher FV-Titer und keine Expansion von Treg-Zellen in der chronischen FV-Infektion beschrieben waren, aussah. Wir entschieden uns dafür, die mCMV-spezifische Immunantwort in der Leber zu untersuchen, da uns bekannt war, dass mCMV in der Leber repliziert (192), Hepatozyten jedoch nicht den für die FV-Infektion wichtigen Oberflächenrezeptor mCAT-1-Rezeptor auf der Zelloberfläche tragen (331). Daher sind in der akuten und in der chronischen Phase der FV-Infektion kaum FV-Partikel in der Leber zu finden (78). Aus Studien zur Replikation von FV in der Leber ging zudem hervor, dass signifikant weniger Treg-Zellen in der Leber vorhanden sind als in der Milz von chronisch FV-infizierten Mäusen (212). Aufgrund dessen, dass die intraperitoneale mCMV-Infektion eine mCMV-spezifische Immunantwort im Peritoneum induziert (232), und wir zeigen konnten, dass nur wenig FV RNA-Moleküle im Peritoneum von chronisch FV- und von FV+mCMV-superinfizierten Mäusen vorhanden waren, wurde die mCMV-spezifische Immunantwort und die Anzahl an Treg-Zellen im Peritoneum untersucht. Da keine Unterschiede in der mCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort zwischen naiv+mCMV- und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen im Peritoneum als auch in der Leber gefunden wurden (Abbildung 4.10) zeigte uns dies, dass die FV-induzierte Reduktion von mCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nur in Organen erfolgt, in denen eine starke Replikation von FV erfolgt und eine Expansion von Treg-Zellen stattfindet. Myers et al. zeigten bereits, dass FV-spezifische T-Zellen in der Leber von chronisch FV-infizierten Mäusen funktionell sind und große Mengen an GzmB und IFN γ sezernieren, während FV-spezifische T-Zellen in der Milz signifikant weniger Effektormoleküle sezernierten (212). Sie wiesen aber auch nach, dass Treg-Zellen aus der Leber FV-spezifische Immunantworten genauso effektiv supprimieren können wie Treg-Zellen aus der Milz (212). Daher war davon auszugehen, dass im Peritoneum und in der Leber im Vergleich zur Milz ein anderes Verhältnis von Treg-Zellen zu T-Zellen vorlag. Es wurde deutlich, dass etwa gleiche Anteile an CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen zu Treg-Zellen und gleiche Anteile an gesamt-IFN γ ⁺ CD8⁺ T-Zellen zu Treg-Zellen im Peritoneum und der Leber von naiv+mCMV- und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen vorlagen. Das Verhältnis von T-Zellen zu Treg-Zellen im Peritoneum von naiv+mCMV- und von FV+mCMV-superinfizierten Mäusen (Tabelle 4.2) war zudem viel höher als das Verhältnis von T-Zellen zu Treg-Zellen in

der Milz (Tabelle 4.1). Diese Ergebnisse bestätigen, dass eine erhöhte Anzahl an Treg-Zellen notwendig ist, damit Treg-Zellen einen Effekt auf die mCMV-spezifische T-Zellantwort haben können. Gleiches wird in der Studie von Myers et al beschrieben (212). Auch hier wurde nachgewiesen, dass die geringere Anzahl Treg-Zellen zu T-Zellen (1:1) in der Leber nicht zu einer Dysregulierung von FV-spezifischen T-Zellantworten führte (212).

Diese Daten zeigen, dass der Effekt der Reduktion von mCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen durch FV-expandierte Treg-Zellen organspezifisch ist und von dem Verhältnis von FV-expandierten Treg-Zellen zu T-Zellen abhängig ist.

Die Ergebnisse aus der Milz zum Zeitpunkt 7 Tage nach mCMV-Infektion zeigen, dass Treg-Zellen aus einer chronischen FV-Infektion die mCMV-spezifische Immunantwort supprimieren, so dass FV+mCMV-superinfizierte Mäuse signifikant weniger IFN γ produzierende mCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellen hatten als naiv+mCMV-infizierte Kontrollmäuse. Es war daher von Interesse, ob der Effekt der Treg-vermittelten Reduktion der mCMV-spezifischen T-Zellantwort auch im späteren Verlauf der mCMV-Infektion, wenn sich bereits ein immunologisches Gedächtnis entwickelt hat, noch vorhanden ist. Hierzu wurde die mCMV-spezifische Immunantwort 15 Wochen nach der mCMV-Infektion untersucht. Es zeigte sich, dass sich die mCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort sowohl auf die *non-inflationary* als auch auf die *inflationary* Peptide in der Milz von naiv+mCMV- und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen 15 Wochen nach primärer mCMV-Infektion nicht unterschied (Abbildung 4.12). Dass in der späten Phase der mCMV-Infektion kein Unterschied in der mCMV-spezifischen Immunantwort in der Milz von naiv+mCMV und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen detektiert werden konnte, könnte darauf hinweisen, dass eventuell das *Priming* von mCMV-spezifischen T-Zellen in chronisch FV-infizierten Mäusen durch Treg-Zellen beeinflusst wird. In naiv+mCMV-infizierten Mäusen, wo keine Expansion von Treg-Zellen stattfindet, verläuft die Aktivierung von T-Zellen hingegen normal, und es kommt durch den Kontakt mit APCs, die mCMV-spezifische Peptide gebunden an MHC-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche präsentieren, zur Aktivierung und Proliferation von virusspezifischen T-Zellen. Da das *Priming* von T-Zellen mit Hilfe von APCs erfolgt (29,30) und Treg-Zellen in der Lage sind, über direkten Zell-Zellkontakt, als auch über lösliche Moleküle wie IL-10, die Aktivierung von APCs zu beeinflussen (244,278), könnte dies erklären, warum in FV+mCMV-superinfizierten Mäusen teilweise signifikant weniger mCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellen als in den Milzen von naiv+mCMV-infizierten Mäusen gefunden wurden. Ein ähnlicher Einfluss von Treg-Zellen auf das *Priming* und auf die Expansion von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen wurde für eine HBV-Infektion beschrieben (101). In der

Studie von Furuichi et al. wurde untersucht, ob Treg-Zellen aus naiven Mäusen einen Einfluss auf das *Priming* von HBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen und auf die Modulierung der antiviralen T-Zellantwort haben. Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass signifikant mehr HBV-spezifische T-Zellen im Blut von HBV-immunisierten Mäusen vorhanden waren, wenn Treg-Zellen vor der Immunisierung depletiert wurden (101). Diese Resultate weisen darauf hin, dass Treg-Zellen aus chronisch FV-infizierten Mäusen wahrscheinlich das *Priming* von mCMV-spezifischen beeinflussen, so dass in Folge dessen weniger mCMV-spezifische T-Zellen in FV+mCMV-superinfizierten Mäusen aktiviert werden als in naiv+mCMV-infizierten Mäusen. Dies spiegelt sich in dieser Arbeit auch in den Anzahlen an aktivierten mCMV-spezifischen T-Zellen von FV+mCMV-superinfizierten Mäusen im Vergleich zu naiv+mCMV-infizierten Mäusen wieder (p-Value = 0.08) (nicht abgebildet). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass FV-expandierte Treg-Zellen die Funktion von mCMV-spezifischen T-Zellen supprimieren (280). Eine Methode, um eine direkte Aussage über die Anzahl von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen treffen zu können, ist die Verwendung von MHC-Klasse-I-Tetrameren (11). Mit Hilfe von mCMV-spezifischen Tetrameren-I könnten in weiteren Experimenten mCMV-spezifische T-Zellen markiert und die antivirale Funktion anhand der intrazellulären Expression von zytotoxischen Molekülen, wie GzmB, quantifiziert werden (127). Der Vorteil dieser Methode ist, dass intrazelluläre Effektormoleküle direkt detektiert werden können, ohne dass mCMV-spezifische T-Zellen restimuliert werden müssen.

5.2 Untersuchungen des Einflusses einer primären mCMV-Superinfektion auf eine chronische FV-Infektion

In der Zeit vor der HAART-Therapie war eine Koinfektion mit CMV die häufigste Todesursache von mit HIV-infizierten Patienten (71,92,224). Obwohl es durch die HAART-Therapie zu einer signifikanten Abnahme (75-80%) von CMV-induzierten Todesfällen von HIV-infizierten Patienten kam (17,116,118,217,224), ist die Inzidenz am End-Organ-Versagen zu sterben, in HIV+CMV-infizierten Patienten immer noch relativ hoch (143,153). Hierbei korreliert die Wahrscheinlichkeit an einer CMV-Infektion zu sterben, mit der Menge an CMV-DNA im Plasma von HIV-Patienten (293). Daher ist es sehr wichtig, die Risiken und die Folgen einer akuten CMV-Infektion in HIV-Patienten genauer zu untersuchen, um frühzeitig eine antivirale Therapie einleiten zu können. Da sich die meisten HIV-Patienten bereits im Laufe ihres Lebens mit CMV infiziert haben, gibt es viele Studien, die sich mit einer Reaktivierung von CMV in HIV-infizierten Patienten beschäftigen (73,289,328). Es gibt hingegen kaum Informationen über

die Folgen einer primären CMV-Infektion in HIV-infizierten Personen. Aus diesem Grund sollten in dieser Arbeit die Auswirkungen einer primären CMV-Infektion auf eine chronische HIV-Infektion experimentell am Mausmodell untersucht werden. Hierfür wurden C57BL/6-Mäuse mit dem Friend Retrovirus infiziert und in der chronischen Phase dieser FV-Infektion mit mCMV superinfiziert.

Um einen ersten Eindruck über den Effekt einer primären mCMV-Infektion auf eine chronische FV-Infektion zu bekommen, wurde der FV-Titer in der Milz analysiert. Mit Hilfe des *IC-Assays* konnte gezeigt werden, dass eine primäre mCMV-Infektion den Virustiter in der Milz von chronisch FV-infizierten Mäusen signifikant erhöhte (Abbildung 4.14). Weitere Analysen zeigten, dass das Milzgewicht und die Anzahl an Lymphozyten in der Milz von naiven und chronisch FV-infizierten Mäusen durch die akute mCMV-Infektion signifikant erhöht waren (Abbildung 4.15). Bereits in einer Studie von Lucia et al. wurde beschrieben, dass eine akute mCMV-Infektion mit einer Splenomegalie assoziiert ist (176). Eine genauere Analyse der Zellpopulationen in der Milz zeigte, dass es durch die primäre mCMV-Infektion zu einer starken Zunahme an Effektorzellen wie T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen als auch von Ter119⁺ Erythrozytenvorläuferzellen in naiven und chronisch FV-infizierten Mäusen kam (Abbildung 4.16). Diese signifikante Erhöhung von verschiedenen Milzzellpopulationen erklärten die signifikant erhöhten Milzgewichte und Gesamtzellzahlen in der Milz.

Da Ter119⁺-Zellen und B-Zellen die Zielzellen für das FV sind (80,130), nahmen wir an, dass die signifikante Erhöhung dieser FV-Zielzellen, die Erklärung für die signifikant erhöhte FV-Last in der Milz war. Mit Hilfe der qRT-PCR konnten wir nachweisen, dass Ter119⁺ Zellen und CD19⁺ B-Zellen tatsächlich mit FV infiziert waren. Auf molekularer Ebene spiegelte die qRT-PCR hingegen nicht die im *IC-Assay* gezeigte vermehrte Viruslast von FV in FV+mCMV-superinfizierten Mäusen wieder, da in Ter119⁺ Zellen und CD19⁺ B-Zellen von FV+mCMV-superinfizierten Mäusen nicht signifikant mehr FV-RNA-Moleküle gefunden wurden als in chronisch FV-infizierten Mäusen (nicht abgebildet). Eine mögliche Erklärung könnte die Fragilität der Ter119⁺ und CD19⁺ B-Zellen sein, so dass bereits während der MACS-Isolierung viele der FV-infizierten Zellen zerstört wurden. Zu Beginn dieser Arbeit wurde versucht FV in CD19⁺ B-Zellen mit Hilfe des *IC-Assays* nachzuweisen. Hierfür wurden CD19⁺ B-Zellen unter Verwendung der MACS-Technologie isoliert und mit *Mus Dunni* Zellen kokultiviert. Mit Hilfe des *IC-Assays* wurden infektiöse FV-Partikel in 1 von 3 Proben von chronisch FV-infizierten und in 3 von 3 Proben von FV+mCMV-superinfizierten Mäusen nachgewiesen. Jedoch war die Anzahl an infektiösen FV-Partikeln in der chronisch FV-infizierten Maus größer als in den

FV+mCMV-superinfizierten Mäusen. Dass der *IC-Assay* mit den B-Zellen das gleiche Resultat wie die qRT-PCR hervorbrachte, sprach ebenfalls dafür, dass FV-infizierte Zellen sehr fragil sind und eventuell während des MACS-Prozesses in ihrer Anzahl minimiert wurden. Hiergegen spricht, dass nur wenig tote Zellen in den MACS-isolierten Zellsuspensionen gefunden wurden. Ebenso war die Reinheit der Proben > 90%. Ein weiterer Hinweis, der für die aufgestellte Hypothese spricht, war, dass Hasenkrug und Myers et al. die gleichen Nachweisprobleme mit infektiösen Ter119⁺-Zellen hatten. Da wir jedoch ebenfalls mehr FV-infizierte Zellen pro 10⁷ Milzzellen detektieren konnten (IC/10⁷), ist es am wahrscheinlichsten, dass FV-infizierte Zellen sehr fragil sind und wir deshalb Nachweisprobleme von FV-infizierten Ter119⁺ und CD19⁺ B-Zellen mittels qRT-PCR hatten. Die Ergebnisse des *IC-Assays* mit Milzzellen aus FV+mCMV-infizierten Mäusen zeigten jedoch eindeutig, dass die primäre mCMV-Infektion zu einer `Reaktivierung` von FV führte (Abbildung 4.14).

Da ebenfalls festgestellt wurde, dass mehr CD8⁺ T-Zellen in der Milz von FV+mCMV-superinfizierten Mäusen vorhanden waren, wurde als nächstes überprüft, ob die `Reaktivierung` von FV ebenfalls mit einer `Reaktivierung` von FV-spezifischen Immunantworten verbunden war. Es zeigte sich, dass die mCMV-Superinfektion in chronisch FV-infizierten Mäusen nicht nur eine Expansion von FV-spezifischen T-Zellen induzierte (Abbildung 4.17), sondern auch zu funktionellen FV-spezifischen T-Zellen führte, so dass FV-spezifische CD8⁺ T-Zellen, im Gegensatz zu FV-spezifischen T-Zellen aus nur chronisch FV-infizierten Mäusen, signifikant mehr GzmB produzierten (Abbildung 4.17B). BrdU-Proliferationsexperimente von FV-spezifischen T-Zellen zeigten, dass diese Expansion an funktionellen FV-spezifischen T-Zellen in FV+mCMV-superinfizierten Mäusen auf eine Proliferation und nicht auf ein Rekrutment von FV-spezifischen T-Zellen aus anderen Organen zurückzuführen war (Abbildung 4.19). Anhand der BrdU-Experimente kann jedoch nicht eindeutig geschlossen werden, ob der generierte Pool an funktionellen FV-spezifischen T-Zellen aus bereits existierenden FV-spezifischen T-Zellen hervorgegangen ist, oder ob es sich hierbei um eine Neubildung von FV-spezifischen T-Zellen aus naiven T-Zellen handelt. Eine weitere Erklärung für die mCMV-induzierte `Reaktivierung` von FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellantworten könnte sein, dass sich durch die mCMV-Superinfektion in chronisch FV-infizierten Mäusen das Verhältnis an Treg-Zellen zu T-Zellen zu Gunsten der FV-spezifischen T-Zellen so verändert hat, dass FV-spezifische T-Zellen der Suppression durch FV-induzierte Treg-Zellen entgehen konnten und somit funktionell waren (Abbildung 4.17B). Hierfür spricht, dass es durch die mCMV-Superinfektion in chronisch FV+mCMV-infizierten Mäusen zu einer signifikanten Zunahme von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen kam (Abbildung 4.16). Es könnte außerdem sein, dass FV-induzierte Treg-Zellen ihre

suppressive Aktivität primär darauf konzentrierten die mCMV-Infektion unter Kontrolle zu halten, was wiederum erklären würde, warum die mCMV-spezifische Immunantwort in FV+mCMV-superinfizierten Mäusen geringer war als in naiv+mCMV-infizierten Mäusen, in denen keine Expansion an Treg-Zellen gefunden wurde. Dies würde auch für die gestellte Hypothese sprechen, dass FV-induzierte Treg-Zellen das *Priming* von mCMV-spezifischen T-Zellen beeinflussen. Aus einigen Studien war bereits bekannt, dass es durch heterologe Virusinfektionen zu einer Reaktivierung von chronischen Virusinfektionen kommen kann. So wurde z. B. gezeigt, dass es in chronisch HIV-infizierten Patienten, deren Anzahl an CD4⁺ T-Zellen unter 200/μl liegen, zu einer Reaktivierung einer latenten hCMV-Infektion kommen kann (124). Eine akute oder chronische HIV-Infektion kann aber auch eine latente Hepatitis-B Virus (HBV)-Infektion reaktivieren (181,313). Des Weiteren beschreiben andere Studien, dass eine chronische Hepatitis-C Virus (HCV)-Infektion eine Reaktivierung einer latenten Epstein-Barr-Virus (EBV)-Infektion induzieren kann (282). Diese Beispiele zeigen, dass Reaktivierungen von chronischen Virusinfektionen durch akute oder latente Superinfektionen nicht ungewöhnlich sind. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit konnten die oben genannten Studien jedoch nicht zeigen, dass die Reaktivierung einer chronischen Infektion einen positiven Einfluss auf die virusspezifische Immunantwort hatte. Dass eine akute hCMV-Infektion jedoch einen positiven Einfluss auf eine akute myeloische Leukämie (AML) haben kann, geht aus der Studie von Elmaagacli et al., hervor. In dieser Studie wird gezeigt, dass allogene stammzelltransplantierte AML-Patienten mit einer akuten hCMV-Infektion ein geringeres Abstoßungsrisiko hatten als AML-Patienten ohne eine akute hCMV-Infektion (91).

Aufgrund dessen, dass die mCMV-Superinfektion in chronisch FV-infizierten Mäusen zu einer signifikant gesteigerten Anzahl an funktionellen FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen führte, wurde analysiert, ob dies einen Einfluss auf den FV-Titer in der Milz hat. Es stellte sich heraus, dass der FV-Titer in der Milz bis zum Tag 14 nach primärer mCMV-Infektion signifikant abnahm (Abbildung 4.20). Die mCMV-Superinfektion hatte zudem in FV+mCMV-superinfizierten Mäusen, wahrscheinlich durch die Aktivierung und polyklonale Proliferation von B-Zellen (151,237) (Abbildung 4.16B), einen positiven Einfluss auf die Bildung von F-MuLV-bindenden Antikörpern (Abbildung 4.21). Die signifikante Erhöhung von F-MuLV-bindenden Antikörpern könnte somit ebenfalls zur Reduktion des FV-Titers beigetragen haben. Eine vollständige Eliminierung des FV war jedoch nicht zu beobachten. Da sich die Anzahl an FV-spezifischen T-Zellen (Abbildung 4.22) in dem untersuchten Zeitraum von 14 Tagen nach primärer mCMV-Superinfektion nicht signifikant änderte, vermuteten wir, dass sich eventuell die Funktionalität der FV-spezifischen T-Zellen nach Tag 7 nach primärer mCMV-Superinfektion verändert hatte,

und die Reaktivierung von FV-spezifischen T-Zellantworten nur transient war. Tatsächlich konnten wir nachweisen, dass FV-spezifische T-Zellen bereits an Tag 10 nach der mCMV-Superinfektion signifikant weniger GzmB produzierten und den gleichen funktionellen Phänotyp aufwiesen wie chronisch FV-infizierte Mäuse (Abbildung 4.23), von denen bekannt war, dass sie in der chronischen Phase der FV-Infektion von Treg-Zellen supprimiert werden und kaum GzmB produzieren (77,78,335,336). Da die primäre mCMV-Superinfektion ebenfalls keinen Einfluss auf die erhöhte Anzahl an Treg-Zellen in chronisch FV-infizierten Mäusen hatte (Abbildung 4.24), war es naheliegend, dass eventuell Treg-Zellen für die Suppression von FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in mCMV-superinfizierten Mäusen verantwortlich sein könnten. Hierfür wurden Treg-Zellen in DEREK-Mäusen (162) depletiert und die Funktionalität von FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen anhand der GzmB-Produktion und der Anzahl an CD107a Molekülen auf der Oberfläche von FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen bestimmt. CD107a ist ein Marker, der nach Degranulation auf der Oberfläche von Zellen zu finden ist und positiv mit der Produktion von zytotoxischen Molekülen, wie Perforin und GzmB, korreliert (2,7,27). Es stellte sich heraus, dass die Depletion von Treg-Zellen in FV+mCMV-superinfizierten Mäusen zu einer signifikanten Erhöhung der GzmB-Produktion, als auch zu einer Zunahme der Anzahl an CD107a-Molekülen auf der Oberfläche von FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen führte (Abbildung 4.26). Diese Ergebnisse zeigten, dass FV-induzierte Treg-Zellen für den Funktionsverlust von FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen mit verantwortlich waren und stimmte somit mit der Studie von Dietze et al. überein (77). Es konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht gezeigt werden, dass die Depletion von Treg-Zellen in nur chronisch FV-infizierten Mäusen zu einer signifikanten Steigerung von funktionellen FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen führte wie es in der Studie von Dietze et al. gezeigt wurde. Da jedoch in der Arbeit von Dietze et al. eine andere Virusdosis und ein anderer FV-Stock für die FV-Infektion verwendet wurde (172), der das *Lactat-dehydrogenase-elevating* Virus (LDV) enthielt, ist es wahrscheinlich, dass die unterschiedlichen Ergebnisse auf den verwendeten FV-Stock zurückzuführen sind.

Dass Treg-Zellen für die Suppression von FV-spezifischen T-Zellantworten in FV+mCMV-superinfizierten Mäusen verantwortlich waren, konnte durch den *IC-Assay* nochmals verdeutlicht werden (Abbildung 4.27). In FV+mCMV-superinfizierten Treg-depletierten Mäusen wurde weniger FV in den Milzen gefunden als in den Milzen von FV+mCMV-superinfizierten Kontrolltieren (Abbildung 4.27). Es konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass die Depletion von Treg-Zellen in nur chronisch FV-infizierten Mäusen einen positiven Einfluss auf den FV-Titer hatte. Laut der Studie von Dietze et al. wäre jedoch zu erwarten gewesen, dass die Depletion von Treg-Zellen in chronisch FV-infizierten Mäusen ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der

FV-Replikation in der Milz führt (77). Da die in Abbildung 4.27 gezeigten Ergebnisse aus nur einem Experiment mit jeweils 4 Mäusen pro Gruppe stammen, ist es nicht ungewöhnlich, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Treg-depletierten und den nichtdepletierten Mäusen detektiert wurde, zumal Dietze et al. für das äquivalente Experiment 17 chronisch FV-infizierte Kontrollmäuse und >20 chronisch FV-infizierte Treg-depletierte Mäuse verwendet haben. Auch hier wurde für die FV-Infektion der Mäuse ein anderer FV-Stock benutzt (172). Dies könnte die Erklärung für die detektierten Unterschiede sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen somit, dass Treg-Zellen aus chronisch FV-infizierten Mäusen sowohl einen Einfluss auf FV-spezifische, als auch auf mCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellantworten haben, während Treg-Zellen aus naiven Mäusen keinen Einfluss auf mCMV-spezifische T-Zellantworten haben.

Aus den Arbeiten von Zelinskyy et al. geht hervor, dass die Expansion von Treg-Zellen bereits in der akuten Phase der FV-Infektion erfolgt (335,336). Von einer Expansion von Treg-Zellen während einer akuten CMV-Infektion wurde bisher noch nicht berichtet (169,312). Es war daher davon auszugehen, dass sich Treg-Zellen aus naiv+mCMV- und aus naiv+FV-infizierten Mäusen bereits während der akuten Phase der jeweiligen Infektionen hinsichtlich ihrer Anzahl und ihres Phänotyps unterscheiden. Um dies zu untersuchen, wurden Treg-Zellen von akut mCMV- und von akut FV-infizierten Mäusen 10 Tage nach der Primärinfektion anhand der intrazellulären Expression von FoxP3 und ihrer Oberflächenmoleküle charakterisiert. Mäuse, die 10 Tage mit FV infiziert waren, hatten nicht nur signifikant mehr proliferierende Treg-Zellen in der Milz (Abbildung 4.28A+D), sondern exprimierten auch deutlich mehr Aktivierungsmarker (Abbildung 4.28B+C) und signifikant mehr kostimulierende Rezeptoren (Abbildung 4.28E+F) als mCMV-infizierte sowie naive Mäuse. Die Anzahlen und die Aktivierung der Treg-Zellen in mCMV-infizierten Mäusen zeigten keinen Unterschied zu naiven Mäusen.

Weiterhin wurden die Anzahlen und der Phänotyp von Vβ5⁺ Treg-Zellen analysiert. Vβ5⁺ Treg-Zellen erkennen Superantigene, welche vom endogenen Retrovirus MMTV9 (Maus-Mammataumor-Virus) exprimiert werden (35) und expandieren nach ihrer Aktivierung, so dass sie den Phänotyp von terminal differenzierten, kurzlebenden Effektorzellen aufweisen (211). Bisher wurde diese Expansion von Vβ5⁺ Treg-Zellen nur in FV- und LCMV-infizierten Mäusen beobachtet (211,238). Es stellte sich heraus, dass es nur in FV-infizierten Mäusen zu einer Expansion von Vβ5⁺ Treg-Zellen in der Milz kam (Abbildung 4.29A) und, dass sich diese Vβ5⁺ Treg Population deutlich hinsichtlich ihres Aktivierungszustandes (Abbildung 4.29B) von Treg-Zellen aus der Milz von naiven und mCMV-infizierten Mäusen unterschied. Der Phänotyp von

mCMV-infizierten Mäusen entsprach somit dem gleichen Phänotyp von Treg-Zellen aus naiven Mäusen und zeigte, dass Treg-Zellen aus FV-infizierten Mäusen bereits während der akuten Phase der FV-Infektion einen anderen Phänotyp hatten, als Treg-Zellen aus mCMV-infizierten Mäusen (Abbildung 4.29). Zudem zeigt die signifikant erhöhte Anzahl an kostimulierenden Rezeptoren, dass Treg-Zellen aus akut FV-infizierten Mäusen aktiv Immunantworten supprimieren, während Treg-Zellen aus akut mCMV-infizierten Mäusen signifikant weniger kostimulierende Rezeptoren exprimieren und keine suppressive Aktivität zeigen. Dass es in mCMV-infizierten Mäusen nicht zu einer Expansion von $V\beta 5^+$ Treg-Zellen gekommen ist, deutete ebenfalls darauf hin, dass Treg-Zellen von mCMV-infizierten Mäusen dem Phänotyp von Treg-Zellen aus naiven Mäusen gleichen (211). Dies zeigte ebenfalls, dass die Expansion von $V\beta 5^+$ Treg-Zellen ein uniques Ereignis einer FV- bzw. LCMV-Infektion ist und von virusspezifischen $CD8^+$ T-Zellen abhängig ist (211,238). Daher lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass es einen Unterschied in der Aktivierung von $V\beta 5^+$ Treg-Zellen in mCMV-infizierten Mäusen gibt, der keine Treg-Zell- bzw. $V\beta 5^+$ Treg-Zell- Expansion verursacht. Die Treg-Zell-vermittelte Suppression von virusspezifischen T-Zellantworten scheint hingegen nicht virusspezifisch zu sein. Das wurde in dieser Arbeit (Abbildung 4.4), als auch in der Studie von Robertson et al. gezeigt (248).

Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte dargestellt werden, dass Treg-Zellen aus chronischen Virusinfektionen auch Immunantworten von heterologen Virusinfektionen beeinflussen. Dies wurde bisher noch nicht gezeigt und beschreibt somit einen neuen Mechanismus der heterologen Immunität.

6. Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss Treg-Zellen aus chronisch FV-infizierten Mäusen auf den Verlauf einer primären mCMV-Infektion haben. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es durch die hohe Anzahl an FV-expandierten Treg-Zellen in der Milz von chronisch FV-infizierten Mäusen zu einer signifikanten Reduktion der mCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort in der akuten mCMV-Infektion kam. Dieses Ergebnis zeigte, dass FV-expandierte Treg-Zellen die Immunantwort gegen ein nicht verwandtes Virus beeinflussen konnten. Es konnte jedoch nicht festgestellt werden, dass die erhöhte Anzahl Treg-Zellen in FV+mCMV-superinfizierten Mäusen einen Einfluss auf den mCMV-Titer hatte. Die Ergebnisse aus dem Peritoneum und der Leber bestätigten, dass der Effekt der Reduktion der mCMV-spezifischen T-Zellantwort organspezifisch und auf Regionen des Körpers begrenzt ist, in denen das FV-Virus repliziert und somit eine erhöhte Anzahl an Treg-Zellen vorhanden ist. Das Verhältnis an Treg-Zellen zu T-Zellen ist hierbei entscheidend, ob es zu einer Suppression von virusspezifischen Immunantworten kommt. Diese Ergebnisse zeigen somit erstmals, dass Treg-Zellen, aus einer chronischen retroviralen-Infektion, Immunantworten einer Herpesvirusinfektion beeinflussen und beschreiben hiermit einen bisher unbekanntem Mechanismus in der heterologen Immunität.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss die primäre mCMV-Superinfektion auf eine chronische FV-Infektion hat. Eine primäre mCMV-Infektion hatte in chronisch FV-infizierten Mäusen eine gesteigerte Proliferation von Erythrozyten-Vorläuferzellen, den Zielzellen von FV, zur Folge, was mit einem signifikant erhöhten FV-Titer korrelierte. Diese `Reaktivierung` der FV-Infektion ging mit einer signifikant gesteigerten FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort einher. Es zeigte sich zudem, dass FV-spezifische T-Zellen in FV+mCMV-superinfizierten Mäusen, im Gegensatz zu FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen aus chronisch FV-infizierten Mäusen, eine signifikant gesteigerte zytotoxische Aktivität aufwiesen. Die hohe Anzahl an Treg-Zellen in chronisch FV-infizierten Mäusen führte jedoch innerhalb von 14 Tagen nach primärer mCMV-Superinfektion zu einer erneuten Suppression von FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Die durch die primäre mCMV-Infektion induzierte Erhöhung an F-MuLV-bindenden Antikörpern trugen - neben der FV-spezifischen Immunantwort - dazu bei, den FV-Titer in der Milz signifikant zu reduzieren. Eine Eliminierung des FV konnte jedoch aufgrund der Treg-vermittelten Suppression von FV-spezifischen T-Zellantworten nicht erreicht werden.

7. Literaturverzeichnis

- 1 Aandahl, E. M., Michaelsson, J., Moretto, W. J., Hecht, F. M. & Nixon, D. F. (2004) Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J Virol* **78**, 2454-2459.
- 2 Aktas, E., Kucuksezer, U. C., Bilgic, S., Erten, G. & Deniz, G. (2009) Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol* **254**, 149-154.
- 3 Albritton, L. M., Tseng, L., Scadden, D. & Cunningham, J. M. (1989) A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *Cell* **57**, 659-666.
- 4 Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-738.
- 5 Alford, C. A. *Cytomegalovirus*. 2493-2534 (Lippincott-Raven, 1996).
- 6 Allan, S. E. *et al.* (2007) Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol* **19**, 345-354.
- 7 Alter, G., Malenfant, J. M. & Altfeld, M. (2004) CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* **294**, 15-22.
- 8 Altman, J. D. *et al.* (1996) Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* **274**, 94-96.
- 9 Andersson, J. *et al.* (2005) The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients. *J Immunol* **174**, 3143-3147.
- 10 Andersson, S. *et al.* (2000) Plasma viral load in HIV-1 and HIV-2 singly and dually infected individuals in Guinea-Bissau, West Africa: significantly lower plasma virus set point in HIV-2 infection than in HIV-1 infection. *Arch Intern Med* **160**, 3286-3293.
- 11 Appay, V. & Rowland-Jones, S. L. (2002) The assessment of antigen-specific CD8⁺ T cells through the combination of MHC class I tetramer and intracellular staining. *J Immunol Methods* **268**, 9-19.
- 12 Appleman, L. J., Berezovskaya, A., Grass, I. & Boussiotis, V. A. (2000) CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression. *Journal of immunology* **164**, 144-151.
- 13 Arase, H., Mocarski, E. S., Campbell, A. E., Hill, A. B. & Lanier, L. L. (2002) Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* **296**, 1323-1326.
- 14 Asano, M., Toda, M., Sakaguchi, N. & Sakaguchi, S. (1996) Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* **184**, 387-396.
- 15 Bagdades, E. K. *et al.* (1992) Relationship between herpes simplex virus ulceration and CD4⁺ cell counts in patients with HIV infection. *AIDS* **6**, 1317-1320.
- 16 Baltimore, D. (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **226**, 1209-1211.
- 17 Baril, L. *et al.* (2000) Impact of highly active antiretroviral therapy on onset of Mycobacterium avium complex infection and cytomegalovirus disease in patients with AIDS. *AIDS* **14**, 2593-2596.
- 18 Barre-Sinoussi, F. *et al.* (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871.
- 19 Barry, M. *et al.* (2000) Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol Cell Biol* **20**, 3781-3794.
- 20 Barton, E. S. *et al.* (2007) Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature* **447**, 326-329.
- 21 Becker, C., Stoll, S., Bopp, T., Schmitt, E. & Jonuleit, H. (2006) Regulatory T cells: present facts and future hopes. *Med Microbiol Immunol* **195**, 113-124.
- 22 Belkaid, Y. & Rouse, B. T. (2005) Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* **6**, 353-360.
- 23 Belkaid, Y. & Tarbell, K. (2009) Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions (*). *Annu Rev Immunol* **27**, 551-589.

- 24 Bennett, C. L. *et al.* (2001) The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* **27**, 20-21.
- 25 Bentwich, Z., Kalinkovich, A., Weisman, Z. & Grossman, Z. (1998) Immune activation in the context of HIV infection. *Clin Exp Immunol* **111**, 1-2.
- 26 Berry, N. *et al.* (1998) Low peripheral blood viral HIV-2 RNA in individuals with high CD4 percentage differentiates HIV-2 from HIV-1 infection. *J Hum Virol* **1**, 457-468.
- 27 Betts, M. R. *et al.* (2003) Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* **281**, 65-78.
- 28 Beutler, B. *et al.* (2007) Genetic analysis of resistance to viral infection. *Nature reviews. Immunology* **7**, 753-766.
- 29 Bevan, M. J. (2006) Cross-priming. *Nat Immunol* **7**, 363-365.
- 30 Bevan, M. J. (1977) Priming for a cytotoxic response to minor histocompatibility antigens: antigen specificity and failure to demonstrate a carrier effect. *J Immunol* **118**, 1370-1374.
- 31 Beyersdorf, N., Ding, X., Tietze, J. K. & Hanke, T. (2007) Characterization of mouse CD4 T cell subsets defined by expression of KLRG1. *European journal of immunology* **37**, 3445-3454.
- 32 Billerbeck, E. & Thimme, R. (2008) CD8+ regulatory T cells in persistent human viral infections. *Hum Immunol* **69**, 771-775.
- 33 Biron, C. A. (1999) Initial and innate responses to viral infections--pattern setting in immunity or disease. *Curr Opin Microbiol* **2**, 374-381.
- 34 Biron, C. A., Su, H. C. & Orange, J. S. (1996) Function and Regulation of Natural Killer (NK) Cells during Viral Infections: Characterization of Responses in Vivo. *Methods* **9**, 379-393.
- 35 Blish, C. A. *et al.* (1999) Chronic modulation of the TCR repertoire in the lymphoid periphery. *Journal of immunology* **162**, 3131-3140.
- 36 Bolitho, P., Voskoboinik, I., Trapani, J. A. & Smyth, M. J. (2007) Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. *Curr Opin Immunol* **19**, 339-347.
- 37 Borsellino, G. *et al.* (2007) Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* **110**, 1225-1232.
- 38 Brincks, E. L. *et al.* (2013) Antigen-specific memory regulatory CD4+Foxp3+ T cells control memory responses to influenza virus infection. *J Immunol* **190**, 3438-3446.
- 39 Bron, R. *et al.* (1997) Promiscuous use of CC and CXC chemokine receptors in cell-to-cell fusion mediated by a human immunodeficiency virus type 2 envelope protein. *Journal of virology* **71**, 8405-8415.
- 40 Brun-Vezinet, F. *et al.* (1987) Lymphadenopathy-associated virus type 2 in AIDS and AIDS-related complex. Clinical and virological features in four patients. *Lancet* **1**, 128-132.
- 41 Brunkow, M. E. *et al.* (2001) Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* **27**, 68-73.
- 42 Bukowski, J. F., Biron, C. A. & Welsh, R. M. (1983) Elevated natural killer cell-mediated cytotoxicity, plasma interferon, and tumor cell rejection in mice persistently infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Immunol* **131**, 991-996.
- 43 Burkhardt, J. K., Hester, S. & Argon, Y. (1989) Two proteins targeted to the same lytic granule compartment undergo very different posttranslational processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 7128-7132.
- 44 Burns, W. H. & Saral, R. (1985) Opportunistic viral infections. *Br Med Bull* **41**, 46-49.
- 45 Cabrera, R. *et al.* (2004) An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* **40**, 1062-1071.
- 46 Camacho, R. J., Silva, J.C. (2010) HIV-1: das andere AIDS-Virus. *RetroVirus Bulletin-3*, 6-8.
- 47 Casadevall, N., Lacombe, C., Muller, O., Gisselbrecht, S. & Mayeux, P. (1991) Multimeric structure of the membrane erythropoietin receptor of murine erythroleukemia cells (Friend cells). Cross-linking of erythropoietin with the spleen focus-forming virus envelope protein. *The Journal of biological chemistry* **266**, 16015-16020.
- 48 CDC. Guidelines for the prevention and treatment of opportunistic infections among HIV-exposed and HIV-infected children. (2009).
- 49 Ceglowski, W. S., Campbell, B. P., Mortensen, R. F. & Friedman, H. (1974) Humoral and cellular immune responses in susceptible and resistant strains of mice infected with friend leukemia virus. *Proc Soc Exp Biol Med* **146**, 619-624.

- 50 Chalmer, J. E., Mackenzie, J. S. & Stanley, N. F. (1977) Resistance to murine cytomegalovirus linked to the major histocompatibility complex of the mouse. *J Gen Virol* **37**, 107-114.
- 51 Chen, H. D. *et al.* (2001) Memory CD8⁺ T cells in heterologous antiviral immunity and immunopathology in the lung. *Nat Immunol* **2**, 1067-1076.
- 52 Chen, H. D., Fraire, A. E., Joris, I., Welsh, R. M. & Selin, L. K. (2003) Specific history of heterologous virus infections determines anti-viral immunity and immunopathology in the lung. *The American journal of pathology* **163**, 1341-1355.
- 53 Chen, W. *et al.* (2003) Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* **198**, 1875-1886.
- 54 Chesebro, B., Bloom, M., Wehrly, K. & Nishio, J. (1979) Persistence of infectious Friend virus in spleens of mice after spontaneous recovery from virus-induced erythroleukemia. *J Virol* **32**, 832-837.
- 55 Chesebro, B. & Wehrly, K. (1978) Rfv-1 and Rfv-2, two H-2-associated genes that influence recovery from Friend leukemia virus-induced splenomegaly. *J Immunol* **120**, 1081-1085.
- 56 Chesebro, B., Wehrly, K., Doig, D. & Nishio, J. (1979) Antibody-induced modulation of Friend virus cell surface antigens decreases virus production by persistent erythroleukemia cells: influence of the Rfv-3 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 5784-5788.
- 57 Cheung, K. S. & Lang, D. J. (1977) Detection of latent cytomegalovirus in murine salivary and prostate explant cultures and cells. *Infect Immun* **15**, 568-575.
- 58 Chevalier, M. F. & Weiss, L. (2013) The split personality of regulatory T cells in HIV infection. *Blood* **121**, 29-37.
- 59 Chow, J. C., Young, D. W., Golenbock, D. T., Christ, W. J. & Gusovsky, F. (1999) Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *The Journal of biological chemistry* **274**, 10689-10692.
- 60 Clark, I. A. (2001) Heterologous immunity revisited. *Parasitology* **122 Suppl**, S51-59.
- 61 Clavel, F. *et al.* (1986) Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**, 343-346.
- 62 Clouse, K. A. *et al.* (1989) Monokine regulation of human immunodeficiency virus-1 expression in a chronically infected human T cell clone. *J Immunol* **142**, 431-438.
- 63 Clute, S. C. *et al.* (2005) Cross-reactive influenza virus-specific CD8⁺ T cells contribute to lymphoproliferation in Epstein-Barr virus-associated infectious mononucleosis. *J Clin Invest* **115**, 3602-3612.
- 64 Cornberg, M. *et al.* (2006) Narrowed TCR repertoire and viral escape as a consequence of heterologous immunity. *J Clin Invest* **116**, 1443-1456.
- 65 Cornberg, M. *et al.* (2010) CD8 T cell cross-reactivity networks mediate heterologous immunity in human EBV and murine vaccinia virus infections. *Journal of immunology* **184**, 2825-2838.
- 66 Cosmi, L. *et al.* (2003) Human CD8⁺CD25⁺ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4⁺CD25⁺ regulatory thymocytes. *Blood* **102**, 4107-4114.
- 67 Crough, T. & Khanna, R. (2009) Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev* **22**, 76-98, Table of Contents.
- 68 Curotto de Lafaille, M. A., Lino, A. C., Kutchukhidze, N. & Lafaille, J. J. (2004) CD25⁻ T cells generate CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells by peripheral expansion. *Journal of immunology* **173**, 7259-7268.
- 69 D'Andrea, A. D. (1992) The interaction of the erythropoietin receptor and gp55. *Cancer Surv* **15**, 19-36.
- 70 Dalgleish, A. G. *et al.* (1984) The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**, 763-767.
- 71 Dankner, W. M., Lindsey, J. C. & Levin, M. J. (2001) Correlates of opportunistic infections in children infected with the human immunodeficiency virus managed before highly active antiretroviral therapy. *Pediatr Infect Dis J* **20**, 40-48.
- 72 Davis, A. H., Guseva, N. V., Ball, B. L. & Heusel, J. W. (2008) Characterization of murine cytomegalovirus m157 from infected cells and identification of critical residues mediating recognition by the NK cell receptor Ly49H. *Journal of immunology* **181**, 265-275.

- 73 Deayton, J. R. *et al.* (2004) Importance of cytomegalovirus viraemia in risk of disease progression and death in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Lancet* **363**, 2116-2121.
- 74 Deng, H. K., Unutmaz, D., KewalRamani, V. N. & Littman, D. R. (1997) Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* **388**, 296-300.
- 75 Diaz, G. A. & Koelle, D. M. (2006) Human CD4+ CD25 high cells suppress proliferative memory lymphocyte responses to herpes simplex virus type 2. *Journal of virology* **80**, 8271-8273.
- 76 Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Reis e Sousa, C. (2004) Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529-1531.
- 77 Dietze, K. K. *et al.* (2011) Transient depletion of regulatory T cells in transgenic mice reactivates virus-specific CD8+ T cells and reduces chronic retroviral set points. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 2420-2425.
- 78 Dittmer, U. *et al.* (2004) Functional impairment of CD8(+) T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection. *Immunity* **20**, 293-303.
- 79 Dittmer, U., Race, B. & Hasenkrug, K. J. (1999) Kinetics of the development of protective immunity in mice vaccinated with a live attenuated retrovirus. *J Virol* **73**, 8435-8440.
- 80 Dittmer, U. *et al.* (2002) Essential roles for CD8+ T cells and gamma interferon in protection of mice against retrovirus-induced immunosuppression. *J Virol* **76**, 450-454.
- 81 Doetze, A. *et al.* (2000) Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by T(h)3/T(r)1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a T(h)1 to T(h)2 shift. *Int Immunol* **12**, 623-630.
- 82 Doherty, P. C. & Zinkernagel, R. M. (1974) T-cell-mediated immunopathology in viral infections. *Transplant Rev* **19**, 89-120.
- 83 Dokun, A. O. *et al.* (2001) Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection. *Nat Immunol* **2**, 951-956.
- 84 Doom, C. M. & Hill, A. B. (2008) MHC class I immune evasion in MCMV infection. *Med Microbiol Immunol* **197**, 191-204.
- 85 Drew, W. L. (1992) Nonpulmonary manifestations of cytomegalovirus infection in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* **5**, 204-210.
- 86 Eckner, R. J. (1973) Helper-dependent properties of Friend spleen focus-forming virus: effect of the Fv-1 gene on the late stages in virus synthesis. *Journal of virology* **12**, 523-533.
- 87 Eggers, M., Bader, U. & Enders, G. (2000) Combination of microneutralization and avidity assays: improved diagnosis of recent primary human cytomegalovirus infection in single serum sample of second trimester pregnancy. *J Med Virol* **60**, 324-330.
- 88 Eisenbarth, G. S. & Kotzin, B. L. (2003) Enumerating autoreactive T cells in peripheral blood: a big step in diabetes prediction. *J Clin Invest* **111**, 179-181.
- 89 Ellermann, V. *Experimentelle Leukämie bei Hühnern*. Vol. 1 (Centr. Bakt. 1te Abt. Orig., 1908, a, xlvi, 4, 1908).
- 90 Ellermann, V. (1921) A New Strain of Transmissible Leucemia in Fowls (Strain H). *The Journal of experimental medicine* **33**, 539-552.
- 91 Elmaagacli, A. H. *et al.* (2011) Early human cytomegalovirus replication after transplantation is associated with a decreased relapse risk: evidence for a putative virus-versus-leukemia effect in acute myeloid leukemia patients. *Blood* **118**, 1402-1412.
- 92 Erice, A. *et al.* (2003) Cytomegalovirus (CMV) and human immunodeficiency virus (HIV) burden, CMV end-organ disease, and survival in subjects with advanced HIV infection (AIDS Clinical Trials Group Protocol 360). *Clin Infect Dis* **37**, 567-578.
- 93 Fantini, M. C. *et al.* (2004) Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *Journal of immunology* **172**, 5149-5153.
- 94 Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* **4**, 330-336.
- 95 Fontenot, J. D. *et al.* (2005) Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* **22**, 329-341.
- 96 Francois, S. *et al.* (2013) NK cells improve control of friend virus infection in mice persistently infected with murine cytomegalovirus. *Retrovirology* **10**, 58.

- 97 Frey, A., Meckelein, B., Externest, D. & Schmidt, M. A. (2000) A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays. *J Immunol Methods* **233**, 47-56.
- 98 Friend, C. (1957) Leukemia of adult mice caused by a transmissible agent. *Ann N Y Acad Sci* **68**, 522-532.
- 99 Fruh, K. & Yang, Y. (1999) Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma. *Curr Opin Immunol* **11**, 76-81.
- 100 Fulton, R. B., Meyerholz, D. K. & Varga, S. M. (2010) Foxp3+ CD4 regulatory T cells limit pulmonary immunopathology by modulating the CD8 T cell response during respiratory syncytial virus infection. *J Immunol* **185**, 2382-2392.
- 101 Furuichi, Y. *et al.* (2005) Depletion of CD25+CD4+T cells (Tregs) enhances the HBV-specific CD8+ T cell response primed by DNA immunization. *World journal of gastroenterology : WJG* **11**, 3772-3777.
- 102 Gallant, J. E., Moore, R. D., Richman, D. D., Keruly, J. & Chaisson, R. E. (1992) Incidence and natural history of cytomegalovirus disease in patients with advanced human immunodeficiency virus disease treated with zidovudine. The Zidovudine Epidemiology Study Group. *J Infect Dis* **166**, 1223-1227.
- 103 Gallo, R. C. (1986) HTLV: the family of human T-lymphotropic retroviruses and their role in leukemia and AIDS. *Med Oncol Tumor Pharmacother* **3**, 265-267.
- 104 Gao, F. *et al.* (1999) Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. *Nature* **397**, 436-441.
- 105 Gao, F. *et al.* (1992) Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature* **358**, 495-499.
- 106 Gardner, M. B., Officer, J. E., Parker, J., Estes, J. D. & Rongey, R. W. (1974) Induction of disseminated virulent cytomegalovirus infection by immunosuppression of naturally chronically infected wild mice. *Infect Immun* **10**, 966-969.
- 107 Garin, M. I. *et al.* (2007) Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* **109**, 2058-2065.
- 108 Georgel, P. *et al.* (2007) Vesicular stomatitis virus glycoprotein G activates a specific antiviral Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Virology* **362**, 304-313.
- 109 Gerard, L. *et al.* (1997) Cytomegalovirus (CMV) viremia and the CD4+ lymphocyte count as predictors of CMV disease in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* **24**, 836-840.
- 110 Ghiringhelli, F. *et al.* (2005) CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* **202**, 1075-1085.
- 111 Gianni, T., Forghieri, C. & Campadelli-Fiume, G. (2006) The herpesvirus glycoproteins B and H.L are sequentially recruited to the receptor-bound gD to effect membrane fusion at virus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 14572-14577.
- 112 Gibbons, A. E., Shellam, G. R. & Price, P. (1997) Correlation between natural killer cell activation in the bone marrow and haemopoietic dysfunction following cytomegalovirus infection of mice. *Immunology* **91**, 227-233.
- 113 Gilbertson, B. *et al.* (2004) Bystander activation of CD8+ T lymphocytes during experimental mycobacterial infection. *Infect Immun* **72**, 6884-6891.
- 114 Goff, S. P. (1992) Genetics of retroviral integration. *Annu Rev Genet* **26**, 527-544.
- 115 Goh, L. in *The Body Pro.*
- 116 Gona, P. *et al.* (2006) Incidence of opportunistic and other infections in HIV-infected children in the HAART era. *Jama* **296**, 292-300.
- 117 Gondek, D. C., Lu, L. F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S. & Noelle, R. J. (2005) Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* **174**, 1783-1786.
- 118 Gortmaker, S. L. *et al.* (2001) Effect of combination therapy including protease inhibitors on mortality among children and adolescents infected with HIV-1. *The New England journal of medicine* **345**, 1522-1528.
- 119 Graf, T. (2008) Lymphoid myeloid lineage specification. *Semin Immunol* **20**, 205-206.
- 120 Grefte, A., van der Giessen, M., van Son, W. & The, T. H. (1993) Circulating cytomegalovirus (CMV)-infected endothelial cells in patients with an active CMV infection. *J Infect Dis* **167**, 270-277.

- 121 Gregory, S. H. & Wing, E. J. (1993) IFN-gamma inhibits the replication of *Listeria monocytogenes* in hepatocytes. *J Immunol* **151**, 1401-1409.
- 122 Gribaudo, G. *et al.* (1996) The murine cytomegalovirus immediate-early 1 protein stimulates NF-kappa B activity by transactivating the NF-kappa B p105/p50 promoter. *Virus Res* **45**, 15-27.
- 123 Griffiths, P. D. (2006) CMV as a cofactor enhancing progression of AIDS. *J Clin Virol* **35**, 489-492.
- 124 Griffiths, P. D. (1996) Herpesviruses and AIDS. *J Antimicrob Chemother* **37 Suppl B**, 87-95.
- 125 Grossman, W. J. *et al.* (2004) Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* **21**, 589-601.
- 126 Groux, H. *et al.* (1997) A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737-742.
- 127 Guidotti, L. G. & Chisari, F. V. (1996) To kill or to cure: options in host defense against viral infection. *Curr Opin Immunol* **8**, 478-483.
- 128 Hartling, H. J. *et al.* (2012) CD4(+) and CD8(+) regulatory T cells (Tregs) are elevated and display an active phenotype in patients with chronic HCV mono-infection and HIV/HCV co-infection. *Scand J Immunol* **76**, 294-305.
- 129 Hasenkrug, K. J. (1999) Lymphocyte deficiencies increase susceptibility to friend virus-induced erythroleukemia in Fv-2 genetically resistant mice. *J Virol* **73**, 6468-6473.
- 130 Hasenkrug, K. J., Brooks, D. M. & Dittmer, U. (1998) Critical role for CD4(+) T cells in controlling retrovirus replication and spread in persistently infected mice. *Journal of virology* **72**, 6559-6564.
- 131 Hasenkrug, K. J. & Chesebro, B. (1997) Immunity to retroviral infection: the Friend virus model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 7811-7816.
- 132 Hasenkrug, K. J. & Dittmer, U. (2000) The role of CD4 and CD8 T cells in recovery and protection from retroviral infection: lessons from the Friend virus model. *Virology* **272**, 244-249.
- 133 Hayashi, F. *et al.* (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**, 1099-1103.
- 134 Hesse, M. *et al.* (2004) The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *J Immunol* **172**, 3157-3166.
- 135 Hill, C. M. *et al.* (1997) Envelope glycoproteins from human immunodeficiency virus types 1 and 2 and simian immunodeficiency virus can use human CCR5 as a coreceptor for viral entry and make direct CD4-dependent interactions with this chemokine receptor. *Journal of virology* **71**, 6296-6304.
- 136 Hoatlin, M. E., Ferro, F. E., Jr., Kozak, S. L. & Kabat, D. (1994) A Friend virus mutant encodes a small glycoprotein that causes erythroleukemia. *J Virol* **68**, 4053-4056.
- 137 Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057-1061.
- 138 Hsieh, C. S. *et al.* (1993) Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* **260**, 547-549.
- 139 Hudson, J. B. (1970) The murine cytomegalovirus as a model for the study of viral pathogenesis and persistent infections. *Arch. Virol.* **62**, 1-29.
- 140 Hudson, J. B., Walker, D. G. & Altamirano, M. (1988) Analysis in vitro of two biologically distinct strains of murine cytomegalovirus. *Arch Virol* **102**, 289-295.
- 141 Hunt, P. W. *et al.* (2011) A low T regulatory cell response may contribute to both viral control and generalized immune activation in HIV controllers. *PLoS One* **6**, e15924.
- 142 Iwashiro, M. *et al.* (2001) Immunosuppression by CD4+ regulatory T cells induced by chronic retroviral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9226-9230.
- 143 Jacobson, M. A., Stanley, H., Holtzer, C., Margolis, T. P. & Cunningham, E. T. (2000) Natural history and outcome of new AIDS-related cytomegalovirus retinitis diagnosed in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* **30**, 231-233.
- 144 Jarrett, W. F., Crawford, E. M., Martin, W. B. & Davie, F. (1964) A Virus-Like Particle Associated with Leukemia (Lymphosarcoma). *Nature* **202**, 567-569.
- 145 Jenabian, M. A., Ancuta, P., Gilmore, N. & Routy, J. P. (2012) Regulatory T cells in HIV infection: can immunotherapy regulate the regulator? *Clin Dev Immunol* **2012**, 908314.

- 146 Ji, J. & Cloyd, M. W. (2009) HIV-1 binding to CD4 on CD4+CD25+ regulatory T cells enhances their suppressive function and induces them to home to, and accumulate in, peripheral and mucosal lymphoid tissues: an additional mechanism of immunosuppression. *Int Immunol* **21**, 283-294.
- 147 Jones, E. *et al.* (2002) Depletion of CD25+ regulatory cells results in suppression of melanoma growth and induction of autoreactivity in mice. *Cancer Immunol* **2**, 1.
- 148 Jonjic, S. *et al.* (1994) Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J Exp Med* **179**, 1713-1717.
- 149 Jordan, M. C. (1983) Latent infection and the elusive cytomegalovirus. *Rev Infect Dis* **5**, 205-215.
- 150 Karrer, U. *et al.* (2003) Memory inflation: continuous accumulation of antiviral CD8+ T cells over time. *J Immunol* **170**, 2022-2029.
- 151 Karupiah, G. *et al.* (1998) Murine cytomegalovirus infection-induced polyclonal B cell activation is independent of CD4+ T cells and CD40. *Virology* **240**, 12-26.
- 152 Keil, G. M., Ebeling-Keil, A. & 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.
- 153 Kempen, J. H. *et al.* (2003) Mortality risk for patients with cytomegalovirus retinitis and acquired immune deficiency syndrome. *Clin Infect Dis* **37**, 1365-1373.
- 154 Klatzmann, D. *et al.* (1984) T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**, 767-768.
- 155 Koffron, A. J. *et al.* (1998) Cellular localization of latent murine cytomegalovirus. *J Virol* **72**, 95-103.
- 156 Konig, R., Huang, L. Y. & Germain, R. N. (1992) MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature* **356**, 796-798.
- 157 Koszinowski, U. H. *et al.* (1986) The 89,000-Mr murine cytomegalovirus immediate-early protein activates gene transcription. *J Virol* **58**, 59-66.
- 158 Kretschmer, K., Apostolou, I., Jaeckel, E., Khazaie, K. & von Boehmer, H. (2006) Making regulatory T cells with defined antigen specificity: role in autoimmunity and cancer. *Immunol Rev* **212**, 163-169.
- 159 Krmptic, A., Bubic, I., Polic, B., Lucin, P. & Jonjic, S. (2003) Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. *Microbes Infect* **5**, 1263-1277.
- 160 Kurt-Jones, E. A. *et al.* (2000) Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* **1**, 398-401.
- 161 Kurz, S. K. & Reddehase, M. J. (1999) Patchwork pattern of transcriptional reactivation in the lungs indicates sequential checkpoints in the transition from murine cytomegalovirus latency to recurrence. *Journal of virology* **73**, 8612-8622.
- 162 Lahl, K. *et al.* (2007) Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *The Journal of experimental medicine* **204**, 57-63.
- 163 Lander, M. R. & Chattopadhyay, S. K. (1984) A *Mus dunni* cell line that lacks sequences closely related to endogenous murine leukemia viruses and can be infected by ectropic, amphotropic, xenotropic, and mink cell focus-forming viruses. *Journal of virology* **52**, 695-698.
- 164 Lanier, L. L. (1998) NK cell receptors. *Annual review of immunology* **16**, 359-393.
- 165 Larder, B. (2001) Mechanisms of HIV-1 drug resistance. *AIDS* **15 Suppl 5**, S27-34.
- 166 Lazzarotto, T. *et al.* (1999) Anticytomegalovirus (anti-CMV) immunoglobulin G avidity in identification of pregnant women at risk of transmitting congenital CMV infection. *Clin Diagn Lab Immunol* **6**, 127-129.
- 167 Letvin, N. L. *et al.* (1983) Acquired immunodeficiency syndrome in a colony of macaque monkeys. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**, 2718-2722.
- 168 Li, Y. N. *et al.* (2010) CD4+CD25+ regulatory T cells suppress the immune responses of mouse embryo fibroblasts to murine cytomegalovirus infection. *Immunol Lett* **131**, 131-138.

- 169 Li, Y. N. *et al.* (2008) [Effects of acute and chronic murine cytomegalovirus infections on the ratio of regulatory T cells and expression of Th1/Th2 transcription factors T-bet/GATA-3]. *Zhonghua yi xue za zhi* **88**, 2999-3002.
- 170 Liang, B. *et al.* (2008) Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol* **180**, 5916-5926.
- 171 Lilly, F. (1968) The effect of histocompatibility-2 type on response to friend leukemia virus in mice. *J Exp Med* **127**, 465-473.
- 172 Lilly, F. & Steeves, R. A. (1973) B-tropic Friend virus: a host-range pseudotype of spleen focus-forming virus (SFFV). *Virology* **55**, 363-370.
- 173 Liu, W. *et al.* (2006) CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *The Journal of experimental medicine* **203**, 1701-1711.
- 174 Ljunggren, H. G. & Karre, K. (1985) Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *The Journal of experimental medicine* **162**, 1745-1759.
- 175 Loewendorf, A. & Benedict, C. A. (2010) Modulation of host innate and adaptive immune defenses by cytomegalovirus: timing is everything. *J Intern Med* **267**, 483-501.
- 176 Lucia, H. L. & Booss, J. (1981) Immune stimulation, inflammation, and changes in hematopoiesis. Host responses of the murine spleen to infection with cytomegalovirus. *The American journal of pathology* **104**, 90-97.
- 177 Lund, J. M., Hsing, L., Pham, T. T. & Rudensky, A. Y. (2008) Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells. *Science* **320**, 1220-1224.
- 178 Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**, 481-490.
- 179 Mackaness, G. B. (1964) The Immunological Basis of Acquired Cellular Resistance. *J Exp Med* **120**, 105-120.
- 180 MacLennan, I. C. (1994) Germinal centers. *Annu Rev Immunol* **12**, 117-139.
- 181 Manegold, C. *et al.* (2001) Reactivation of hepatitis B virus replication accompanied by acute hepatitis in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **32**, 144-148.
- 182 Marlink, R. *et al.* (1994) Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* **265**, 1587-1590.
- 183 Marshall, D. R. *et al.* (2001) Measuring the diaspora for virus-specific CD8+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 6313-6318.
- 184 Marshall, N. A., Vickers, M. A. & Barker, R. N. (2003) Regulatory T cells secreting IL-10 dominate the immune response to EBV latent membrane protein 1. *J Immunol* **170**, 6183-6189.
- 185 Mason, D. & Powrie, F. (1998) Control of immune pathology by regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* **10**, 649-655.
- 186 Mathurin, K. S., Martens, G. W., Kornfeld, H. & Welsh, R. M. (2009) CD4 T-cell-mediated heterologous immunity between mycobacteria and poxviruses. *J Virol* **83**, 3528-3539.
- 187 Mayo, D. R. & Rapp, F. (1980) Acute cytomegalovirus infections in leukemic mice. *Infect Immun* **29**, 311-315.
- 188 McGuirk, P. & Mills, K. H. (2002) Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends Immunol* **23**, 450-455.
- 189 McKeating, J. A., Griffiths, P. D. & Weiss, R. A. (1990) HIV susceptibility conferred to human fibroblasts by cytomegalovirus-induced Fc receptor. *Nature* **343**, 659-661.
- 190 McKinley, L. *et al.* (2006) Regulatory T cells dampen pulmonary inflammation and lung injury in an animal model of pneumocystis pneumonia. *J Immunol* **177**, 6215-6226.
- 191 Mendelson, M., Monard, S., Sissons, P. & Sinclair, J. (1996) Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *J Gen Virol* **77** (Pt 12), 3099-3102.
- 192 Mercer, J. A. & Spector, D. H. (1986) Pathogenesis of acute murine cytomegalovirus infection in resistant and susceptible strains of mice. *Journal of virology* **57**, 497-504.
- 193 Messerle, M., Buhler, B., Keil, G. M. & Koszinowski, U. H. (1992) Structural organization, expression, and functional characterization of the murine cytomegalovirus immediate-early gene 3. *J Virol* **66**, 27-36.

- 194 Miller, S. A., Brown, A. J., Farach-Carson, M. C. & Kirn-Safran, C. B. (2003) HIP/RPL29 down-regulation accompanies terminal chondrocyte differentiation. *Differentiation* **71**, 322-336.
- 195 Mills, K. H. (2004) Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* **4**, 841-855.
- 196 Mills, K. H. & McGuirk, P. (2004) Antigen-specific regulatory T cells--their induction and role in infection. *Semin Immunol* **16**, 107-117.
- 197 Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W. & Radbruch, A. (1990) High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* **11**, 231-238.
- 198 Misra, V. & Hudson, J. B. (1980) Minor base sequence differences between the genomes of two strains of murine cytomegalovirus differing in virulence. *Arch Virol* **64**, 1-8.
- 199 Mocarski, E. S., Jr. & Kemble, G. W. (1996) Recombinant cytomegaloviruses for study of replication and pathogenesis. *Intervirology* **39**, 320-330.
- 200 Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. & O'Garra, A. (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology* **19**, 683-765.
- 201 Moretta, A., Bottino, C., Mingari, M. C., Biassoni, R. & Moretta, L. (2002) What is a natural killer cell? *Nat Immunol* **3**, 6-8.
- 202 Morgan, M. E. *et al.* (2005) Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum Immunol* **66**, 13-20.
- 203 Mosmann, T. R. & Coffman, R. L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* **7**, 145-173.
- 204 Mucida, D. *et al.* (2005) Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J Clin Invest* **115**, 1923-1933.
- 205 Mullbacher, A. *et al.* (2002) Antigen-dependent release of IFN-gamma by cytotoxic T cells up-regulates Fas on target cells and facilitates exocytosis-independent specific target cell lysis. *J Immunol* **169**, 145-150.
- 206 Muller, U., Vogel, P., Alber, G. & Schaub, G. A. (2008) The innate immune system of mammals and insects. *Contrib Microbiol* **15**, 21-44.
- 207 Munks, M. W. *et al.* (2006) Four distinct patterns of memory CD8 T cell responses to chronic murine cytomegalovirus infection. *J Immunol* **177**, 450-458.
- 208 Munks, M. W. *et al.* (2006) Genome-wide analysis reveals a highly diverse CD8 T cell response to murine cytomegalovirus. *J Immunol* **176**, 3760-3766.
- 209 Munks, M. W., Pinto, A. K., Doom, C. M. & Hill, A. B. (2007) Viral interference with antigen presentation does not alter acute or chronic CD8 T cell immunodominance in murine cytomegalovirus infection. *J Immunol* **178**, 7235-7241.
- 210 Murphy, K. M. Vol. 7 (ed P. Travers, Walter, P.) (Garland Science, New York, 2008).
- 211 Myers, L. *et al.* (2013) IL-2-Independent and TNF-alpha-Dependent Expansion of Vbeta5+ Natural Regulatory T Cells during Retrovirus Infection. *Journal of immunology* **190**, 5485-5495.
- 212 Myers, L., Messer, R. J., Carmody, A. B. & Hasenkrug, K. J. (2009) Tissue-specific abundance of regulatory T cells correlates with CD8+ T cell dysfunction and chronic retrovirus loads. *Journal of immunology* **183**, 1636-1643.
- 213 Nagata, S. (1996) Fas-mediated apoptosis. *Adv Exp Med Biol* **406**, 119-124.
- 214 Nair, S. R. *et al.* (2010) Mechanisms of control of acute Friend virus infection by CD4+ T helper cells and their functional impairment by regulatory T cells. *The Journal of general virology* **91**, 440-451.
- 215 Nakamura, K., Kitani, A. & Strober, W. (2001) Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* **194**, 629-644.
- 216 Nelson, J. A., Ghazal, P. & Wiley, C. A. (1990) Role of opportunistic viral infections in AIDS. *AIDS* **4**, 1-10.
- 217 Nesheim, S. R. *et al.* (2007) Trends in opportunistic infections in the pre- and post-highly active antiretroviral therapy eras among HIV-infected children in the Perinatal AIDS Collaborative Transmission Study, 1986-2004. *Pediatrics* **120**, 100-109.
- 218 Nilsson, J. *et al.* (2006) HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS. *Blood* **108**, 3808-3817.

- 219 Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T. & Sakaguchi, S. (2008) Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 10113-10118.
- 220 Orange, J. S. & Biron, C. A. (1996) Characterization of early IL-12, IFN- α , and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *Journal of immunology* **156**, 4746-4756.
- 221 Orange, J. S., Wang, B., Terhorst, C. & 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. *The Journal of experimental medicine* **182**, 1045-1056.
- 222 Orr, M. T. & Lanier, L. L. (2011) Natural killer cell licensing during viral infection. *Advances in experimental medicine and biology* **780**, 37-44.
- 223 Osborn, J. E. *Cytomegalovirus and other herpesviruses*. Vol. 2 94-106 (Academic Press, Inc, 1982).
- 224 Palella, F. J., Jr. *et al.* (1998) Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* **338**, 853-860.
- 225 Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. & Lenardo, M. J. (2007) CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* **8**, 1353-1362.
- 226 Peacock, C. D., Olver, S. D. & Price, P. (1997) Effect of a retroviral immunodeficiency syndrome on murine cytomegalovirus-induced hepatitis. *Am J Pathol* **150**, 1089-1100.
- 227 Persons, D. A. *et al.* (1999) Fv2 encodes a truncated form of the Stk receptor tyrosine kinase. *Nat Genet* **23**, 159-165.
- 228 Perussia, B. (1991) Lymphokine-activated killer cells, natural killer cells and cytokines. *Current opinion in immunology* **3**, 49-55.
- 229 Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C. & Neuvians, T. P. (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* **26**, 509-515.
- 230 Piccirillo, C. A. *et al.* (2002) CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med* **196**, 237-246.
- 231 Podlech, J., Holtappels, R., Wirtz, N., Steffens, H. P. & Reddehase, M. J. (1998) Reconstitution of CD8 T cells is essential for the prevention of multiple-organ cytomegalovirus histopathology after bone marrow transplantation. *J Gen Virol* **79** (Pt 9), 2099-2104.
- 232 Pollock, J. L., Presti, R. M., Paetzold, S. & Virgin, H. W. t. (1997) Latent murine cytomegalovirus infection in macrophages. *Virology* **227**, 168-179.
- 233 Pomie, C., Menager-Marcq, I. & van Meerwijk, J. P. (2008) Murine CD8+ regulatory T lymphocytes: the new era. *Hum Immunol* **69**, 708-714.
- 234 Portnoy, D. A., Schreiber, R. D., Connelly, P. & Tilney, L. G. (1989) Gamma interferon limits access of *Listeria monocytogenes* to the macrophage cytoplasm. *J Exp Med* **170**, 2141-2146.
- 235 Prevention, C. f. D. C. a. *Cytomegalovirus (CMV) and Congenital CMV Infection*, <<http://www.cdc.gov/cmvtrends-stats.html>> (2013).
- 236 Price, D. A., Klenerman, P., Booth, B. L., Phillips, R. E. & Sewell, A. K. (1999) Cytotoxic T lymphocytes, chemokines and antiviral immunity. *Immunol Today* **20**, 212-216.
- 237 Price, P., Olver, S. D., Gibbons, A. E. & Shellam, G. R. (1993) B-cell activation following murine cytomegalovirus infection: implications for autoimmunity. *Immunology* **78**, 14-21.
- 238 Punkosdy, G. A. *et al.* (2011) Regulatory T-cell expansion during chronic viral infection is dependent on endogenous retroviral superantigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 3677-3682.
- 239 Quinnan, G. V., Jr., Manischewitz, J. F. & Kirmani, N. (1982) Involvement of natural killer cells in the pathogenesis of murine cytomegalovirus interstitial pneumonitis and the immune response to infection. *J Gen Virol* **58 Pt 1**, 173-180.
- 240 Raue, H. P., Brien, J. D., Hammarlund, E. & Slifka, M. K. (2004) Activation of virus-specific CD8+ T cells by lipopolysaccharide-induced IL-12 and IL-18. *J Immunol* **173**, 6873-6881.

- 241 Read, S., Malmstrom, V. & Powrie, F. (2000) Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* **192**, 295-302.
- 242 Reddehase, M. J. *et al.* (1994) The conditions of primary infection define the load of latent viral genome in organs and the risk of recurrent cytomegalovirus disease. *J Exp Med* **179**, 185-193.
- 243 Reddehase, M. J., Simon, C. O., Seckert, C. K., Lemmermann, N. & Grzimek, N. K. (2008) Murine model of cytomegalovirus latency and reactivation. *Curr Top Microbiol Immunol* **325**, 315-331.
- 244 Redpath, S., Ghazal, P. & Gascoigne, N. R. (2001) Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. *Trends Microbiol* **9**, 86-92.
- 245 Reeves, J. D. & Doms, R. W. (2002) Human immunodeficiency virus type 2. *The Journal of general virology* **83**, 1253-1265.
- 246 Reeves, J. D. *et al.* (1999) Primary human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) isolates infect CD4-negative cells via CCR5 and CXCR4: comparison with HIV-1 and simian immunodeficiency virus and relevance to cell tropism in vivo. *Journal of virology* **73**, 7795-7804.
- 247 Robertson, M. N. *et al.* (1992) Role and specificity of T-cell subsets in spontaneous recovery from Friend virus-induced leukemia in mice. *J Virol* **66**, 3271-3277.
- 248 Robertson, S. J. *et al.* (2008) Suppression of acute anti-friend virus CD8+ T-cell responses by coinfection with lactate dehydrogenase-elevating virus. *Journal of virology* **82**, 408-418.
- 249 Robertson, S. J., Messer, R. J., Carmody, A. B. & Hasenkrug, K. J. (2006) In vitro suppression of CD8+ T cell function by Friend virus-induced regulatory T cells. *Journal of immunology* **176**, 3342-3349.
- 250 Roizman, B. (ed D.M. Knipe, Howlex, P.M.) Ch. 2231-2230, (Lippincott-Raven, 1996).
- 251 Ronchetti, S. *et al.* (2004) GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations. *European journal of immunology* **34**, 613-622.
- 252 Rous, P. (1911) A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells. *The Journal of experimental medicine* **13**, 397-411.
- 253 Rouse, B. T., Sarangi, P. P. & Suvas, S. (2006) Regulatory T cells in virus infections. *Immunological reviews* **212**, 272-286.
- 254 Rushbrook, S. M. *et al.* (2005) Regulatory T cells suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during persistent hepatitis C virus infection. *Journal of virology* **79**, 7852-7859.
- 255 Russell, J. H. & Ley, T. J. (2002) Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* **20**, 323-370.
- 256 Sabin, C. A. *et al.* (2000) Cytomegalovirus seropositivity and human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in individuals with hemophilia. *J Infect Dis* **181**, 1800-1803.
- 257 Sakaguchi, S., Fukuma, K., Kuribayashi, K. & Masuda, T. (1985) Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med* **161**, 72-87.
- 258 Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* **155**, 1151-1164.
- 259 Sakaguchi, S. *et al.* (2001) Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* **182**, 18-32.
- 260 Salmon-Ceron, D. *et al.* (2000) Plasma cytomegalovirus DNA, pp65 antigenaemia and a low CD4 cell count remain risk factors for cytomegalovirus disease in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *AIDS* **14**, 1041-1049.
- 261 Sarris, M., Andersen, K. G., Randow, F., Mayr, L. & Betz, A. G. (2008) Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity* **28**, 402-413.
- 262 Sattentau, Q. J. & Weiss, R. A. (1988) The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor. *Cell* **52**, 631-633.

- 263 Scalzo, A. A. (2002) Successful control of viruses by NK cells--a balance of opposing forces? *Trends Microbiol* **10**, 470-474.
- 264 Scalzo, A. A. & Yokoyama, W. M. (2008) Cmv1 and natural killer cell responses to murine cytomegalovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* **321**, 101-122.
- 265 Schneider, K. *et al.* (2008) Lymphotoxin-mediated crosstalk between B cells and splenic stroma promotes the initial type I interferon response to cytomegalovirus. *Cell Host Microbe* **3**, 67-76.
- 266 Schrier, R. D., Nelson, J. A. & Oldstone, M. B. (1985) Detection of human cytomegalovirus in peripheral blood lymphocytes in a natural infection. *Science* **230**, 1048-1051.
- 267 Schwartz, R. H. (2003) T cell anergy. *Annual review of immunology* **21**, 305-334.
- 268 Schwele, S. *et al.* (2012) Cytomegalovirus-specific regulatory and effector T cells share TCR clonality--possible relation to repetitive CMV infections. *Am J Transplant* **12**, 669-681.
- 269 Scott, P. (1991) IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* **147**, 3149-3155.
- 270 Seddiki, N. *et al.* (2006) Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *The Journal of experimental medicine* **203**, 1693-1700.
- 271 Seder, R. A. (1994) Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *J Allergy Clin Immunol* **94**, 1195-1202.
- 272 Selin, L. K., Varga, S. M., Wong, I. C. & Welsh, R. M. (1998) Protective heterologous antiviral immunity and enhanced immunopathogenesis mediated by memory T cell populations. *The Journal of experimental medicine* **188**, 1705-1715.
- 273 Selin, L. K. *et al.* (2011) Heterologous immunity: immunopathology, autoimmunity and protection during viral infections. *Autoimmunity* **44**, 328-347.
- 274 Senechal, B., Boruchov, A. M., Reagan, J. L., Hart, D. N. & Young, J. W. (2004) Infection of mature monocyte-derived dendritic cells with human cytomegalovirus inhibits stimulation of T-cell proliferation via the release of soluble CD83. *Blood* **103**, 4207-4215.
- 275 Sharp, P. M. & Hahn, B. H. (2011) Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med* **1**, a006841.
- 276 Shellam, G. R., Flexman, J. P., Farrell, H. E. & Papadimitriou, J. M. (1985) The genetic background modulates the effect of the beige gene on susceptibility to cytomegalovirus infection in mice. *Scand J Immunol* **22**, 147-155.
- 277 Shevach, E. M. (2006) From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* **25**, 195-201.
- 278 Shevach, E. M. (2009) Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* **30**, 636-645.
- 279 Shevach, E. M. (2000) Suppressor T cells: Rebirth, function and homeostasis. *Curr Biol* **10**, R572-575.
- 280 Shevach, E. M., McHugh, R. S., Piccirillo, C. A. & Thornton, A. M. (2001) Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol Rev* **182**, 58-67.
- 281 Shibuya, A. *et al.* (1996) DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity* **4**, 573-581.
- 282 Shimozuma, Y. *et al.* (2010) Reactivation of Epstein-Barr virus in B cells of patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* **82**, 2064-2072.
- 283 Shlomchik, M. J. & Weisel, F. (2012) Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunol Rev* **247**, 52-63.
- 284 Sierro, S., Rothkopf, R. & Klenerman, P. (2005) Evolution of diverse antiviral CD8+ T cell populations after murine cytomegalovirus infection. *European journal of immunology* **35**, 1113-1123.
- 285 Simmons, G. *et al.* (2000) Co-receptor use by HIV and inhibition of HIV infection by chemokine receptor ligands. *Immunological reviews* **177**, 112-126.
- 286 Sinclair, J. & Sissons, P. (2006) Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *The Journal of general virology* **87**, 1763-1779.
- 287 Sinzger, C. *et al.* (1995) Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol* **76** (Pt 4), 741-750.

- 288 Sissons, J. G. & Carmichael, A. J. (2002) Clinical aspects and management of cytomegalovirus infection. *The Journal of infection* **44**, 78-83.
- 289 Slyker, J. A. *et al.* (2009) Acute cytomegalovirus infection in Kenyan HIV-infected infants. *AIDS* **23**, 2173-2181.
- 290 Smith, H. R. *et al.* (2002) Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8826-8831.
- 291 Smith, L. M., McWhorter, A. R., Masters, L. L., Shellam, G. R. & Redwood, A. J. (2008) Laboratory strains of murine cytomegalovirus are genetically similar to but phenotypically distinct from wild strains of virus. *J Virol* **82**, 6689-6696.
- 292 Smith, M. G. (1954) Propagation of salivary gland virus of the mouse in tissue cultures. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* **86**, 435-440.
- 293 Spector, S. A. *et al.* (1999) Cytomegalovirus (CMV) DNA load is an independent predictor of CMV disease and survival in advanced AIDS. *J Virol* **73**, 7027-7030.
- 294 Stalder, T., Hahn, S. & Erb, P. (1994) Fas antigen is the major target molecule for CD4+ T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* **152**, 1127-1133.
- 295 Staras, S. A. *et al.* (2006) Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **43**, 1143-1151.
- 296 Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. (1973) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* **137**, 1142-1162.
- 297 Stoddart, C. A. *et al.* (1994) Peripheral blood mononuclear phagocytes mediate dissemination of murine cytomegalovirus. *J Virol* **68**, 6243-6253.
- 298 Stoop, J. N. *et al.* (2005) Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* **41**, 771-778.
- 299 Stoye, J. P. (1998) Fv1, the mouse retrovirus resistance gene. *Rev Sci Tech* **17**, 269-277.
- 300 Stromnes, I. M. *et al.* (2002) Temporal effects of gamma interferon deficiency on the course of Friend retrovirus infection in mice. *Journal of virology* **76**, 2225-2232.
- 301 Sungur, C. M. *et al.* (2013) Murine natural killer cell licensing and regulation by T regulatory cells in viral responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 7401-7406.
- 302 Suri-Payer, E., Amar, A. Z., Thornton, A. M. & Shevach, E. M. (1998) CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *Journal of immunology* **160**, 1212-1218.
- 303 Susanne Modrow, M. V. *Molekulare Virologie*. Vol. 3 (Spektrum Akademischer Verlag, 2010).
- 304 Suvas, S., Kumaraguru, U., Pack, C. D., Lee, S. & Rouse, B. T. (2003) CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med* **198**, 889-901.
- 305 Tay, C. H. & Welsh, R. M. (1997) Distinct organ-dependent mechanisms for the control of murine cytomegalovirus infection by natural killer cells. *J Virol* **71**, 267-275.
- 306 Taylor-Wiedeman, J., Sissons, J. G., Borysiewicz, L. K. & Sinclair, J. H. (1991) Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol* **72** (Pt 9), 2059-2064.
- 307 Thimme, R. *et al.* (2005) Increased expression of the NK cell receptor KLRG1 by virus-specific CD8 T cells during persistent antigen stimulation. *Journal of virology* **79**, 12112-12116.
- 308 Toka, F. N., Suvas, S. & Rouse, B. T. (2004) CD4+ CD25+ T cells regulate vaccine-generated primary and memory CD8+ T-cell responses against herpes simplex virus type 1. *Journal of virology* **78**, 13082-13089.
- 309 Trapani, J. A. & Smyth, M. J. (2002) Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* **2**, 735-747.
- 310 Trgovcich, J. *et al.* (2000) Immune responses and cytokine induction in the development of severe hepatitis during acute infections with murine cytomegalovirus. *Arch Virol* **145**, 2601-2618.
- 311 Urbani, S. *et al.* (2005) Heterologous T cell immunity in severe hepatitis C virus infection. *J Exp Med* **201**, 675-680.

- 312 Velaga, S. *et al.* (2013) Reconstitution and phenotype of Tregs in CMV reactivating patients
following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Immunol Invest* **42**, 18-35.
- 313 Vento, S., Di Perri, G., Garofano, T., Concia, E. & Bassetti, D. (1989) Reactivation of
hepatitis B in AIDS. *Lancet* **2**, 108-109.
- 314 Vidal, S. M. & Lanier, L. L. (2006) NK cell recognition of mouse cytomegalovirus-infected
cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **298**, 183-206.
- 315 Vilches, C. & Parham, P. (2002) KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and
adaptive immunity. *Annual review of immunology* **20**, 217-251.
- 316 Voo, K. S. *et al.* (2005) Functional characterization of EBV-encoded nuclear antigen 1-
specific CD4+ helper and regulatory T cells elicited by in vitro peptide stimulation. *Cancer
Res* **65**, 1577-1586.
- 317 Wagtman, N., Rajagopalan, S., Winter, C. C., Peruzzi, M. & Long, E. O. (1995) Killer cell
inhibitory receptors specific for HLA-C and HLA-B identified by direct binding and by
functional transfer. *Immunity* **3**, 801-809.
- 318 Wallach, D. *et al.* (1999) Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu
Rev Immunol* **17**, 331-367.
- 319 Watson, R. R. (1992) LP-BM5, a murine model of acquired immunodeficiency syndrome: role
of cocaine, morphine, alcohol and carotenoids in nutritional immunomodulation. *J Nutr* **122**,
744-748.
- 320 Webster, A. *et al.* (1989) Cytomegalovirus infection and progression towards AIDS in
haemophiliacs with human immunodeficiency virus infection. *Lancet* **2**, 63-66.
- 321 Wedemeyer, H., Mizukoshi, E., Davis, A. R., Bennink, J. R. & Rehermann, B. (2001) Cross-
reactivity between hepatitis C virus and Influenza A virus determinant-specific cytotoxic T
cells. *J Virol* **75**, 11392-11400.
- 322 Weiner, H. L., da Cunha, A. P., Quintana, F. & Wu, H. (2011) Oral tolerance. *Immunological
reviews* **241**, 241-259.
- 323 Weiss, L. *et al.* (2004) Human immunodeficiency virus-driven expansion of CD4+CD25+
regulatory T cells, which suppress HIV-specific CD4 T-cell responses in HIV-infected
patients. *Blood* **104**, 3249-3256.
- 324 Weller, T. H. (1991) Pathogenesis of human cytomegalovirus-associated diseases. Historical
perspective. *Transplant Proc* **23**, 5-6, discussion 6-7.
- 325 Welsh, R. M., Che, J. W., Brehm, M. A. & Selin, L. K. (2010) Heterologous immunity
between viruses. *Immunological reviews* **235**, 244-266.
- 326 Welsh, R. M. & Selin, L. K. (2002) No one is naive: the significance of heterologous T-cell
immunity. *Nat Rev Immunol* **2**, 417-426.
- 327 Wildin, R. S., Smyk-Pearson, S. & Filipovich, A. H. (2002) Clinical and molecular features of
the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J
Med Genet* **39**, 537-545.
- 328 Wohl, D. A. *et al.* (2005) Cytomegalovirus viremia, mortality, and end-organ disease among
patients with AIDS receiving potent antiretroviral therapies. *J Acquir Immune Defic Syndr* **38**,
538-544.
- 329 Woo, E. Y. *et al.* (2002) Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly
inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol* **168**, 4272-4276.
- 330 Yadav, M. *et al.* (2012) Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells
among regulatory T cell subsets in vivo. *The Journal of experimental medicine* **209**, 1713-
1722, S1711-1719.
- 331 Yamaguchi, S. *et al.* (2003) In vivo distribution of receptor for ecotropic murine leukemia
virus and binding of envelope protein of Friend Murine leukemia virus. *Arch Virol* **148**, 1175-
1184.
- 332 Yokoyama, W. M. & Scalzo, A. A. (2002) Natural killer cell activation receptors in innate
immunity to infection. *Microbes Infect* **4**, 1513-1521.
- 333 Zelinsky, G. *et al.* (2004) Independent roles of perforin, granzymes, and Fas in the control of
Friend retrovirus infection. *Virology* **330**, 365-374.
- 334 Zelinsky, G., Dietze, K., Sparwasser, T. & Dittmer, U. (2009) Regulatory T cells suppress
antiviral immune responses and increase viral loads during acute infection with a
lymphotropic retrovirus. *PLoS Pathog* **5**, e1000406.

- 335 Zelinskyy, G. *et al.* (2009) The regulatory T-cell response during acute retroviral infection is locally defined and controls the magnitude and duration of the virus-specific cytotoxic T-cell response. *Blood* **114**, 3199-3207.
- 336 Zelinskyy, G., Kraft, A. R., Schimmer, S., Arndt, T. & Dittmer, U. (2006) Kinetics of CD8+ effector T cell responses and induced CD4+ regulatory T cell responses during Friend retrovirus infection. *Eur J Immunol* **36**, 2658-2670.
- 337 Zelinskyy, G. *et al.* (2005) CD8+ T-cell dysfunction due to cytolytic granule deficiency in persistent Friend retrovirus infection. *Journal of virology* **79**, 10619-10626.
- 338 Zhang, G. X. *et al.* (1997) Linomide suppresses both Th1 and Th2 cytokines in experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* **73**, 175-182.
- 339 Zinkernagel, R. M. & Doherty, P. C. (1974) Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* **248**, 701-702.
- 340 Zuniga, E. I., Liou, L. Y., Mack, L., Mendoza, M. & Oldstone, M. B. (2008) Persistent virus infection inhibits type I interferon production by plasmacytoid dendritic cells to facilitate opportunistic infections. *Cell Host Microbe* **4**, 374-386.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

γ HV68	Gammaherpesvirus 68
μ l	Mikroliter
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
%	Prozent
∞	unendlich

A

ADP	Adenosin-di-Phosphat
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazole
AF	Alexa Fluor
AIDS	erworbenes Immundefizienzsyndrom (<i>Acquired immune deficiency syndrome</i>)
AK	Antikörper
AMP	Adenosin-mono-Phosphat
APC	antigenpräsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
ART	antiretrovirale Therapie
ATP	Adenosin-tri-Phosphat

B

BAC	künstliches bakterielles Chromosom (<i>Bacterial artificial chromosome</i>)
BD	Firma Becton & Dickinson
BFA	Brefeldin-A
BID	pro-apoptotisches Protein
bp	Basenpaare
BrdU	Bromodesoxyuriding
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
B-Zelle	B-Lymphozyt

C

C	Celsius
CCR5	Chemokinrezeptor-5

CD	Nomenklatur für Zelloberflächenmoleküle (<i>Cluster of differentiation</i>)
CDC	amerikanische Behörde (<i>Centers for disease Control and prevention</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester
Chron	chronisch
CMV	Cytomegalovirus
CRP	C-reaktives Protein
CTL	zytotoxische T-Zelle
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen-4
CXCR4	Chemokinrezeptor-4

D

DC	dendritische Zelle
DEREG	Mausstamm zur Depletion von regulatorischen T-Zellen (<i>depletion of regulatory T-cells</i>)
DMEM	Zellkulturmedium „ <i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i> “
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleinacid</i>)
DNAM-1	
dpi	Tage nach Infektion (<i>days post infection</i>)
DT	Diphtheriatoxin

E

EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent proteine</i>)
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunosorbent Assay (<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>)
EMEM	Zellkulturmedium „ <i>Eagle`s Minimal Essential Medium</i> “
Env	Hülle (envelope)
ER	endoplasmatisches Retikulum

F

FACS	Verfahren der Durchflusszytometrie (<i>fluorescent activated cell sorting</i>)
Fas	Oberflächenrezeptor `Fas` von Immunzellen
Fas-L	Ligand von Fas
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FIV	<i>felines Leukämie-Virus</i>
F-MuLV	<i>Friend moloney-leukemia Virus</i>
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie Transfer
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
FV	<i>Friend Virus</i>
Fv1-6	Resistenzgene gegen eine FV-Infektion

G

gag	Gen von Retroviren für virale Kapsidproteine
gb	Glykoprotein
GITR	ko-stimulierender Rezeptor von T-Zellen und NK-Zellen (<i>Glucocorticoid-induced TNFR family related gene</i>)
gp55	<i>env</i> -kodierte Glykoprotein von FV
GTKO	Zelllinie zum Nachweis von mCMV (<i>Galactosyl-transferase-knockout</i>)
GzmB	Granzym B

H

h	Stunde
HAART	hochreaktive antiretrovirale Therapie (<i>highly active anti retroviral therapy</i>)
hCMV	<i>humanes Cytomegalovirus</i>
HBV	<i>Hepatitis-B Virus</i>
HCV	<i>Hepatitis-C Virus</i>
HHV-5	<i>humanes Herpesvirus-5</i>
HIV	<i>humanes Immundefizienz-Virus</i>
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
HSV	<i>Herpes-Simplex-Virus</i>
HTLV	<i>humanes T-Zell Leukämie Virus</i>
HVEM	Herpesvirus Eintrittrezeptoren (<i>herpesvirus entry receptor</i>)

I

IAV	<i>Influenza-A Virus</i>
IC	<i>infectious centers</i>
ICS	intrazelluläre Zytokinfärbung (<i>intracellular cytokine staining</i>)
IFN γ	Interferon-gamma
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IPEX	Autoimmunerkrankung (<i>immune dysregulation, polyendocrinopathy and enteropathy, X-linked syndrome</i>)
iTreg-Zelle	induzierte regulatorische T-Zelle
i.v.	intravenös

K

kBp	Kilobasenpaare
KIR	Killer-ähnliche Rezeptoren (<i>Killer-like receptors</i>)

L

LAG-3	Lymphozyten-aktivierenden Antigen-3
LCMV	lymphozytäres Choriomeningitis-Virus
LDV	<i>Laktate dehydrogenase-elevating Virus</i>
LFA	<i>lymphocyte function-associated antigen-1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LT- α	Lymphotoxin- α
LTR	lange terminale Wiederholungen im Genom von Retroviren (<i>long terminale repeats</i>)

M

M	Molar
MA	Matrixprotein
MACS	Magnetische Zellsortierung (<i>magnetic cell sorting</i>)
mCMV	murines Cytomegalovirus
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)

min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMTV	<i>Maus-Mammatumor-Virus</i>

N

NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NLR	NOD-ähnliche Rezeptoren (<i>NOD-like receptors</i>)
nm	Nanometer
NOD	Nukleotid bindende Oligomerziationsdomäne (<i>nucleotide binding oligomerization domain</i>)
Nrp-1	Neuropilin-1
nTreg	natürliche regulatorische T-Zelle

P

PAMP	pathogenassoziierte molekulare Muster (<i>pathogen-associated molecular pattern</i>)
PB	Primerbindungsstelle
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	R-Phycoerythrin
PEC	Peritoneale Exsudats Zellen (<i>peritoneal exsudate cells</i>)
PE-Cy	R-Phycoerythrin-Cy
PerCP	Peridinin-Chlorophyllprotein Komplex
PFU	Plaque-bildende Einheiten (<i>plaque forming units</i>)
PI	Propidiumiodid
pol	Gen von Retroviren für virale Enzyme
PP	Polyuridinstelle im RNA-Genom von Retroviren
PRR	mustererkennende Rezeptoren (<i>pattern recognition receptors</i>)
P/S	Penicillin/Streptomycin
PU.1	Transkriptionsfaktor
PV	<i>Pichinde-Virus</i>

Q

qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (<i>real-time quantitative PCR</i>)
---------	--

R

R	redundante Region im RNA-Genom von Retroviren
Rfv-3	Resistenzgen gegen eine Friend Virus Infektion (<i>recovery from FV gene-3</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleinacid</i>)
rpm	Rotationsgeschwindigkeit pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RPMI	Zellkulturmedium „ <i>Rosewell Park Memorial Institute 1640</i> “
RSV	<i>Rous-Sarkom</i> Virus
RSV	respiratorisches-Syncytial-Virus
RT	Raumtemperatur

S

SA	Spleißakzeptor Stelle im RNA-Genom von Retroviren
SD	Spleißdonor Stelle im RNA-Genom von Retroviren
sec	Sekunde
SFFU	<i>spleen focus-forming-units</i>
SFFV	<i>spleen focus-forming-Virus</i>
SIV	<i>Simian-Immundefizienz-Virus</i>
Spi-1	zelluläres Onkogen (<i>SFFV proviral integration site-1</i>)
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>sideward scatter</i>)
SU	Oberflächenprotein (<i>surface proteine</i>)

T

TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T-cell receptor</i>)
TGF	Tumor Wachstumsfaktor (<i>tumor growth factor</i>)
Th0-Zelle	nicht spezialisierte naive T-Helferzelle
Th1-Zelle	reife Effektor-T-Helferzelle des Th1 Typs
Th2-Zelle	reife Effektor-T-Helferzelle des Th2 Typs
TM	Transmembranprotein (<i>transmembrane proteine</i>)
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TNFR-1	Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor-1
Treg-Zelle	regulatorische T-Zelle
TLR	Toll-ähnliche Rezeptoren (<i>Toll like receptors</i>)
T-Zelle	T-Lymphozyt
TZR	T-Zell-Rezeptor

U

- U3 unique Region am 3`Ende des RNA-Genoms von Retroviren
U5 unique Region am 5`Ende des RNA-Genoms von Retroviren
u.a. unter Anderem

V

- VSV *Vesicular Stromatitisvirus*
VV *Vaccinia-Virus*

W

- WHO Weltgesundheitsorganisation (*world health organization*)

Z

- z. B. zum Beispiel

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Mechanismen der T-Zell vermittelten Zytotoxizität.....	5
Abbildung 1.2:	Schematische Darstellung regulatorischer T-Zellpopulationen.....	8
Abbildung 1.3:	Hauptmechanismen, durch den Treg-Zellen Effektor T-Zellen supprimieren können.	9
Abbildung 1.4:	Hauptmechanismen, durch den Treg-Zellen die Funktion von antigen- präsentierenden Zellen supprimieren und indirekt die Aktivierung von Foxp3 ⁻ Zellen blockieren.	10
Abbildung 1.5:	Protektive Immunität und Etablierung einer chronischen Infektion.....	11
Abbildung 1.6:	Schützende heterologe Immunität zwischen Viren.	14
Abbildung 1.7:	Modell für eine heterologe Immunreaktion in der Lunge.....	15
Abbildung 1.8:	Aufbau von Retroviren am Modell des HIV.	18
Abbildung 1.9:	Genomorganisation der Retroviren.....	19
Abbildung 1.10:	Replikationszyklus von Retroviren.....	21
Abbildung 1.11:	Verlauf einer HIV-Infektion.	23
Abbildung 1.12:	Struktur eines Herpesvirus am Beispiel des Cytomegalovirus.....	28
Abbildung 1.12:	Replikationszyklus von Herpesviren.	30
Abbildung 2.1:	Darstellung des Diphtheriatoxin-eGFP (DTR-eGFP) Fusionsproteins im FoxP3 Lokus.	43
Abbildung 3.1:	Durchflusszytometrische Analyse der Depletion von Treg-Zellen.	48
Abbildung 3.2:	Funktionsweise eines Durchflusszytometers. Modifiziert nach http://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=1216	61
Abbildung 3.3:	Aufbau eines MHC-Klasse I-Tetramers. Modifiziert nach Eisenbarth (88).	63
Abbildung 3.4:	Chemische Struktur des Tetramethylbenzidin. Modifiziert nach Frey et al. (97). ...	68
Abbildung 4.1:	Versuchsverlauf zur Analyse, welchen Einfluss Treg-Zellen in chronisch FV- infizierten Tieren auf eine primäre mCMV-Infektion haben.....	69
Abbildung 4.2:	mCMV-Titerbestimmungen am Tag 7 nach primärer mCMV-Infektion.....	70
Abbildung 4.3:	Dot Plot-Darstellung der Zytokinproduktion von mCMV-spezifischen CD8 ⁺ T- Zellen.	71
Abbildung 4.4:	Reduktion der mCMV-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellantwort während einer primären mCMV-Infektion in chronisch FV-infizierten Mäusen.	72
Abbildung 4.5:	Übersicht über die Zytokinproduktion von mCMV-spezifischen T-Zellen in mCMV- infizierten naiven und chronisch FV-infizierten Mäusen.	73

Abbildung 4.6:	Treg-Zellen in naiven und chronisch FV-infizierten Tieren.....	74
Abbildung 4.7:	Versuchsschema zur Depletion von Treg-Zellen.....	75
Abbildung 4.8:	mCMV-spezifische CD8 ⁺ T-Zellantwort in undepletierten und Treg-depletierten mCMV-superinfizierten chronischen FV-infizierten Mäusen.	75
Abbildung 4.9:	mCMV-spezifische CD8 ⁺ T-Zellantwort in undepletierten und Treg-depletierten nur mCMV-infizierten Mäusen.....	76
Abbildung 4.10:	Die mCMV-spezifische Immunantwort im Peritoneum und in der Leber.	78
Abbildung 4.11:	Infektionsschema zur Analyse der mCMV-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellantwort 15 Wochen nach mCMV-Infektion.	80
Abbildung 4.12:	mCMV-spezifische CD8 T-Zellantwort 15 Wochen nach mCMV-Infektion.	81
Abbildung 4.13:	Infektionsschema zur Analyse des Einflusses einer primären mCMV-Infektion auf eine chronische FV-Infektion.	82
Abbildung 4.14:	Einfluss einer mCMV-Infektion auf den FV-Titer in der Milz von chronisch FV-infizierten Mäusen.	83
Abbildung 4.15:	Milzgewichte und Anzahl an Milzzellen in der Milz von naiven und chronisch FV-infizierten Mäusen im Vergleich zu naiv+mCMV und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen.	84
Abbildung 4.16:	Milzpopulations von naiven und chronisch FV-infizierten Mäusen im Vergleich zu naiv+mCMV- und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen.	85
Abbildung 4.17:	Untersuchung des Effektes einer primären mCMV-Infektion auf die Anzahl und die Funktion von FV-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen in der Milz von chronisch FV-infizierten Mäusen.	87
Abbildung 4.18:	Versuchsschema zur Proliferation von FV-spezifischen T-Zellen aus chronisch FV- und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen.....	87
Abbildung 4.19:	Proliferation von FV-spezifischen T-Zellen von chronisch FV-infizierten und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen.....	88
Abbildung 4.20:	FV-Titer in der Milz zu verschiedenen Zeitpunkten nach primärer mCMV-Superinfektion in chronisch FV-infizierten Mäusen.	89
Abbildung 4.21:	F-MuLV-bindende Antikörpertiter von FV-infizierten Mäusen vor und nach der mCMV-Superinfektion.....	90
Abbildung 4.22:	Kinetik der FV-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellantwort nach mCMV-Superinfektion in chronisch FV-infizierten Mäusen.	91
Abbildung 4.23:	Kinetik von funktionellen FV-spezifischen T-Zellen nach mCMV-Superinfektion in chronisch FV-infizierten Mäusen.	92
Abbildung 4.24:	Kinetik der Anzahl an Treg-Zellen nach mCMV-Superinfektion in chronisch FV-infizierten Mäusen.	93
Abbildung 4.25:	Versuchsschema zur Depletion von Treg-Zellen.....	93

Abbildung 4.26: FV-spezifische Effektorzellantwort nach Depletion von Treg-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der mCMV-Superinfektion in chronisch FV-infizierten Mäusen. 94

Abbildung 4.27: FV-Last nach Depletion von Treg-Zellen in chronisch FV- und FV+mCMV-superinfizierten Mäusen. 95

Abbildung 4.28: Phänotyp von Treg-Zellen in FV- und mCMV-infizierten Mäusen. 97

Abbildung 4.29: Phänotyp von V β 5⁺ Treg-Zellen in FV- und mCMV-infizierten Mäusen..... 98

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Zelllinien	35
Tabelle 2.2 Selbsthergestellte Puffer und Lösungen	36
Tabelle 2.3 Gekaufte Puffer	38
Tabelle 2.4 Verwendete Antikörper	38
Tabelle 2.5 Verwendete Lebend-tot-Marker	39
Tabelle 2.6 Verwendete Peptide.....	40
Tabelle 2.7 Verwendete Chemikalien	41
Tabelle 2.8 Verwendete Oligonukleotide.....	41
Tabelle 2.9 Verwendete Komplettsysteme.....	42
Tabelle 2.10 Verwendete Mäusestämme.....	42
Tabelle 2.11 Verwendete Verbrauchsmaterialien	44
Tabelle 2.12 Verwendete Geräte	45
Tabelle 2.13 Verwendete Computer-Software	46
Tabelle 3.1 Kulturbedingungen verschiedener Zelllinien	53
Tabelle 3.2 Absorptionsspektren der Fluorochrome	60
Tabelle 3.3 Verwendete Oberflächenantikörper und ihre Verdünnungen.....	62
Tabelle 3.4 Verwendete intrazelluläre Antikörper und ihre Verdünnungen	67
Tabelle 4.1: Verhältnis von T-Zellen zu Treg-Zellen in der Milz.....	77
Tabelle 4.2: Verhältnis von Treg-Zellen zu T-Zellen im Peritoneum und der Leber.....	79

8.4 Danksagungen

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Doktormutter, Dr. Anke Kraft, für die intensive Betreuung meiner Arbeit bedanken. Ihre wertvollen Anregungen haben es mir ermöglicht, schnell und konstant gute Fortschritte und sehr interessante Ergebnisse zu erzielen. Ich bedanke mich für ihre Aufmerksamkeit und die besonderen Hilfestellungen meiner Person gegenüber. Ihre kompetenten Ratschläge haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Zudem möchte ich mich bei Prof. Dr. Dittmer bedanken für die Möglichkeit in seinem Institut meine Arbeiten durchzuführen. Ich bedanke mich ebenfalls für seine hilfreichen Ratschläge.

Besonderer Dank gilt auch Sandra Francois und Jing Peng für ihre allzeit bereiten Hilfestellungen und Unterstützungen im Labor. Darüber hinaus auch vielen Dank für die seelische Unterstützung und die vielen aufmunternden Worte. Desweiteren danke ich ganz herzlich Jara und Inga für ihre Unterstützung im Labor und für die gute Zusammenarbeit.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Arbeitsgruppe für die Unterstützungen und die Erleichterungen im Laboralltag. Danke euch allen für die schöne Zeit und die lustigen Gespräche. Ich danke Kathrin und Kirsten, dass sie mit mir ihre Erfahrung geteilt haben und immer Zeit hatten mir praktische Tipps zu geben. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Simone und Tanja für ihre Hilfsbereitschaft im Labor bedanken. Bei Siggi möchte ich mich herzlich für die IT-Unterstützung bedanken.

Ich bedanke mich bei Saskia und Meike für ihre Hilfsbereitschaft und dafür, dass sie mich immer durch ihre heitere Art zum Lachen gebracht haben.

Großer Dank gilt auch den Mitgliedern des Graduiertenkollegs 1045 und des Transregio 60 für die wissenschaftliche Unterstützung und die Gespräche in netter Atmosphäre.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie und meinem Freund Manuel für die ständige Unterstützung und das große Verständnis. Ihr seid während meiner gesamten Arbeit für mich da gewesen und habt mich immer wieder motiviert.

9. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Untersuchungen des Einflusses von regulatorischen T-Zellen in heterologen Virusinfektionen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Janine Duppach befürworte.

Essen, den _____

Unterschrift d. wiss. Betreuers/
Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Unterschrift der Doktorandin

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____

Unterschrift der Doktorandin