

**Das Verhalten virusspezifischer CD8⁺ T-Zellen und
regulatorischer T-Zellen während einer akuten
Friend Retrovirus-Infektion *in vivo***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für

Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Lucas Otto

aus Heilbad Heiligenstadt

Februar 2019

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Experimentelle Immunologie und Bildgebung (AG Gunzer) und am Institut für Virologie (AG Dittmer) der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online



Offen im Denken



Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/70161
URN: urn:nbn:de:hbz:465-20231024-124123-7



Dieses Werk kann unter einer Creative Commons Namensnennung 4.0 Lizenz (CC BY 4.0) genutzt werden.

1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Gunzer
2. Gutachter: Prof. Dr. Hendrik Streeck

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Astrid M. Westendorf

Tag der mündlichen Prüfung: 10.05.2019

Die folgenden wissenschaftlichen Artikel wurden im Verlauf dieser Doktorarbeit veröffentlicht. Inhalte dieser Veröffentlichungen wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls verwendet und mit entsprechenden Verweisen versehen.

Imaging of cytotoxic antiviral immunity while considering the 3R principle of animal research.

Lucas Otto, Gennadiy Zelinskyy, Marc Schuster, Ulf Dittmer, Matthias Gunzer
Journal of Molecular Medicine, 2018 Apr, 96(3-4):349-360, Epub 2018 Feb 19.
DOI: 10.1007/s00109-018-1628-7

(Otto L. *et al.* 2018)

Infection of B cell follicle-resident cells by Friend retrovirus occurs during acute infection and is maintained during viral persistence.

Sonja Windmann, **Lucas Otto**, Camilla Patrizia Hrycak, Anna Malyshkina, Nadine Bongard, Paul David, Matthias Gunzer, Ulf Dittmer, Wibke Bayer
mBio, 2019 (angenommen 07.01.2019)
DOI: 10.1128/mBio.00004-19

(Windmann S. *et al.* 2019)

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	8
Summary	10
1 Einleitung.....	12
1.1 Immunsystem	12
1.1.1 Angeborenes Immunsystem	12
1.1.2 Adaptives Immunsystem.....	14
1.1.2.1 Zytotoxische CD8 ⁺ T-Zellen.....	15
1.1.2.2 Regulatorische T-Zellen	18
1.2 Retroviren	21
1.2.1 Struktur und Aufbau der Retroviren	22
1.2.2 Replikationszyklus der Retroviren.....	23
1.2.3 Das humane Immundefizienzvirus - HIV	24
1.2.4 Tiermodelle zur Erforschung von HIV	25
1.2.5 Friend Virus (FV) - ein retrovirales Modellsystem	26
1.2.6 Immunität gegen eine FV-Infektion	27
1.2.7 Regulatorische T-Zellen während der FV-Infektion.....	28
1.3 Zielsetzung	30
2 Material.....	31
2.1 Geräte	31
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	32
2.3 Antikörper und weitere Fluoreszenzfarbstoffe	32
2.4 Fluorochrome und Fluoreszenzproteine	34
2.5 Primer.....	34
2.6 Plasmide.....	35
2.7 Enzyme	35
2.8 Chemikalien und Lösungen	36
2.9 Puffer und Medien	38
2.10 Antibiotika.....	40
2.11 Kits	40
2.12 Versuchstiere	41

2.13	Viren und Bakterien.....	44
2.14	Zelllinien	44
2.15	Software	45
3	Methoden	46
3.1	Molekularbiologische Methoden	46
3.1.1	Primerdesign.....	46
3.1.2	Polymerase-Kettenreaktion.....	46
3.1.3	Agarose-Gelelektrophorese	47
3.1.4	TA-Klonierung.....	48
3.1.5	Restriktionsverdau	48
3.1.6	Ligation	49
3.1.7	Transformation und Plasmid-Isolation.....	49
3.1.8	DNA-Sequenzierung	50
3.1.9	DNA-Fällung	50
3.1.10	Transfektion.....	50
3.2	Tierversuche.....	51
3.2.1	Herstellung eines FV-Stocks <i>in vivo</i>	51
3.2.2	FV-Infektion.....	51
3.2.3	Narkose	51
3.2.4	Retrobulbäre Blutentnahme	52
3.2.5	Typisierung der Versuchstiere	52
3.2.6	Organentnahme und Herstellung von Einzelzellsuspensionen	52
3.2.7	Adoptiver Zelltransfer	53
3.2.8	Depletion regulatorischer T-Zellen in DEREK-Mäusen.....	53
3.2.9	Intravitale Zwei-Photonenmikroskopie des tibialen Knochenmark	53
3.2.10	Zwei-Photonenmikroskopie fixierter & CUBIC-behandelter Organe ..	55
3.3	Zellbiologische Methoden.....	56
3.3.1	Bestimmung der Zellzahl	56
3.3.2	Magnetische Separation von Zellen.....	56
3.3.3	Durchflusszytometrie	57
3.3.4	Kultivierung von Zellen.....	59
3.3.5	Nachweis FV-infizierter Zellen - <i>infectious center assay</i>	60
3.3.6	Herstellung eines F-MuLV-Stocks <i>in vitro</i>	60
3.4	Datenbearbeitung und Auswertung	61

3.4.1	Bildbearbeitung und Analyse der Zellbewegung	61
3.4.2	Durchflusszytometrische Analysen	62
3.4.3	Statistik und weitere Software	62
4	Ergebnisse	64
4.1	Ein reproduzierbarer Zelltransferansatz für virusspezifische CD8 ⁺ T-Zellen und deren Visualisierung unter physiologischen Bedingungen	64
4.1.1	Transferierte und endogene ZTLs zeigen ein vergleichbares Proliferationsverhalten	66
4.1.2	Transferierte und endogene ZTLs werden gleichermaßen aktiviert	66
4.1.3	Transferierte CD8 ⁺ T-Zellen entwickeln zytotoxische Effektorfunktionen	70
4.1.4	Der Transfer von nur 1000 FV-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen resultiert in einem unveränderten Infektionsverlauf	70
4.1.5	Transferierte fluoreszierende CD8 ⁺ T-Zellen können in der Milz und dem Knochenmark dargestellt werden	73
4.2	Intravitale Analyse virusspezifischer CD8 ⁺ T-Zellen und regulatorischer T-Zellen im tibialen Knochenmark	76
4.2.1	Die Motilität virusspezifischer CD8 ⁺ T-Zellen verändert sich im Verlauf der akuten FV-Infektion	76
4.2.2	Regulatorische T-Zellen zeigen eine unveränderte Motilität im Verlauf der akuten FV-Infektion	79
4.2.3	Viruspezifische CD8 ⁺ T-Zellen und regulatorische T-Zellen interagieren miteinander und bilden direkte Zell-Zellkontakte aus	82
4.2.4	Regulatorische T-Zellen hemmen die Motilität virusspezifischer CD8 ⁺ T-Zellen während der akuten FV-Infektion	86
4.3	Intravitale Visualisierung FV-infizierter Zellen im tibialen Knochenmark	88
4.3.1	FV-mWasabi-infizierte Zellen bilden Cluster im tibialen Knochenmark während der frühen Phase der akuten FV-Infektion	88
4.3.2	TurboFP650 - eine mit EGFP und tdTomato kombinierbare Fluoreszenz für ein modifiziertes FV	91
5	Diskussion	94
6	Literaturverzeichnis	107
7	Anhang	125
7.1	Filmbeschreibungen	125
7.2	Abkürzungsverzeichnis	126

7.3	Abbildungsverzeichnis.....	131
7.4	Tabellenverzeichnis.....	132
7.5	Danksagung	133
7.6	Lebenslauf.....	134
7.7	Eidesstattliche Erklärungen.....	138

Zusammenfassung

Chronische virale Infektionen betreffen viele Millionen Menschen weltweit und sind durch eine eingeschränkte adaptive Immunantwort gekennzeichnet. Während der akuten Infektionsphase kontrollieren zytotoxische CD8⁺ T-Zellen (ZTLs), durch die Abtötung infizierter Zellen, noch sehr effizient die Infektion. Mit fortschreitender Infektionsdauer verlieren diese jedoch zunehmend ihre Funktionalität. Begünstigt wird diese Entwicklung durch regulatorische T-Zellen (Tregs), welche virusinduziert in der späten akuten Infektionsphase expandieren und immunsuppressive Effekte vermitteln. Die zugrundeliegenden Mechanismen der Interaktion zwischen ZTLs und Tregs sind speziell bei retroviralen Infektionen, z.B. mit HIV (humanes Immundefizienzvirus), nur unzureichend aufgeklärt. Aus diesem Grund wurde das gut etablierte Friend Retrovirus (FV)-Mausmodell angewendet um das komplexe Wechselspiel zwischen Tregs und ZTLs, vor der Ausbildung einer chronischen Infektion, mit der Zwei-Photonenmikroskopie *in vivo* zu untersuchen.

Genutzt wurden DEREK-Mäuse, welche grün fluoreszierende (EGFP) Tregs aufweisen. Die Tiere wurden infiziert und erhielten anschließend einen adoptiven Zelltransfer von nur 1000 FV-spezifischen rot fluoreszierenden (tdTomato) CD8⁺ T-Zellen. Die transferierten Zellen proliferierten, waren aktiviert und entwickelten antivirale Eigenschaften ohne die natürliche Immunantwort zu verändern. Zusätzlich war die Anzahl an ZTLs optimal für die intravitale Zwei-Photonenmikroskopie der Zellen. ZTLs und Tregs konnten dadurch unter physiologischen Bedingungen im intakten Knochenmark, einem typischen Infektionsherd während der akuten FV-Infektion, in lebenden Mäusen mikroskopiert werden. Die Motilität der ZTLs veränderte sich im Verlauf der akuten Infektion und war am stärksten ausgeprägt nach 10 Tagen, dem Zeitpunkt der stärksten ZTL-Funktionalität. In der frühen (Tag 8) und späten (Tag 14) akuten Infektionsphase zeigte sich hingegen eine geringere Beweglichkeit der Zellen. Gegensätzlich dazu wiesen die Tregs eine unveränderte Bewegungsfähigkeit zu allen Zeitpunkten auf. Die suppressiven Effekte der Tregs konnten daher primär auf deren Zellzahl zurückgeführt werden, welche nach 14 Tagen Infektion am höchsten war. Beide Zelltypen interagierten häufig miteinander und bildeten Zell-Zellkontakte von 2-3 min Dauer. Vor allem in der späten akuten Infektionsphase (14 Tage) reduzierte dies die Motilität der ZTLs, ein Effekt welcher durch eine Treg-Depletion aufgehoben werden konnte. Dementsprechend beeinflussten die Tregs

maßgeblich die Motilität der ZTLs, welche wiederum mit deren Funktionalität korrelierte.

Für ein besseres Verständnis der ZTL-Antwort wurden ebenfalls FV-infizierte Zellen, durch die Nutzung von FV-mWasabi, visualisiert. Im Knochenmark zeigten sich initial (Tag 8) große Cluster grün fluoreszierender FV-infizierter Zellen, welche von ZTLs infiltriert wurden. Die Wasabi⁺ Zellen wurden vermutlich durch die ZTLs eliminiert, sodass in der späten akuten Infektionsphase (Tag 14) nur vereinzelte infizierte Zellen umgeben von vielen ZTLs sichtbar waren. Für die gleichzeitige Mikroskopie von ZTLs, Tregs und FV-infizierten Zellen wurde ein weiteres modifiziertes FV hergestellt. Genutzt wurde dazu TurboFP650, ein Fluoreszenzprotein im nahen Infrarotbereich, welches optimal mit EGFP und tdTomato kombinierbar ist und eine unterscheidbare Analyse aller drei Zellpopulationen gewährleistet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben einen Einblick in die Mechanismen der ZTL-Treg-Interaktion in der lebenden Maus, welche zu der Ausbildung chronischer retroviraler Infektionen beitragen. Dieses Verständnis kann entscheidend für die Entwicklung neuer Treg- oder ZTL-basierter Immuntherapien sein und zusätzlich bei anderen chronischen Infektionen Anwendung finden.

Summary

Chronic viral infections affect millions of people worldwide and are characterized by a restricted adaptive immune response. During the acute infection, infected cells are efficiently killed by cytotoxic CD8⁺ T cells (CTLs). However, these cells lose their functionality when infection progresses. Regulatory T cells (Tregs) that expand after virus infection in the late acute phase promote this process through immunosuppressive effects. The underlying mechanisms of the interaction between CTLs and Tregs are insufficiently clarified, especially for infections with retroviruses like HIV (human immunodeficiency virus). Therefore, the well-established Friend retrovirus (FV) mouse model was applied to investigate the complex interaction between CTLs and Tregs via two-photon microscopy, before viral chronicity is established.

DEREG mice, characterized by green fluorescent (EGFP) Tregs, were used. These animals were infected with FV followed by an adoptive transfer of only 1000 FV-specific red fluorescent (tdTomato) CD8⁺ T cells. The transferred cells became activated, expanded strongly, and developed anti-viral properties without modifying the endogenous immune response. Additionally, the cell frequency was in an optimal range for intravital two-photon microscopy. Both cell types were imaged in the living mouse under physiological conditions in the intact bone marrow, a typical site of FV infection. The motility of CTLs changed during the acute infection and was most pronounced after 10 days, the time point with the strongest CTL functionality. The early (day 8) and late (day 14) acute phase of infection showed a weaker motility of the CTLs. In contrast, the motility of Tregs was unaltered at all analyzed time points. Thus, the suppressive effects of the Tregs were mainly correlated to their cell number, which was highest after 14 days of infection. Tregs and CTLs showed frequent interactions and formed cell-cell contacts for 2-3 min. In the presence of Tregs the motility of CTLs was reduced, especially during the later phase of infection (14 days), an effect that was abrogated after Treg depletion. Accordingly, Tregs influenced the motility of CTLs, which correlated again with their functionality.

For a better understanding of the CTL response, FV-infected cells were also visualized using FV-mWasabi. These cells appeared as large green fluorescent clusters in the bone marrow, which were infiltrated by CTLs, during initial infection (day 8). The Wasabi⁺ cells were presumably eliminated by the CTLs, so that the FV-infected cells

became infrequent and scattered during the later phase of infection (14 days). At the same time many CTLs were present and surrounded the infected cells. For the simultaneous microscopy of CTLs, Tregs and FV-infected cells another modified FV was constructed. The near infrared fluorescent protein TurboFP650 was used for this purpose. TurboFP650 can be combined with EGFP and tdTomato and allows to analyze all three cell populations separately.

The results of this thesis provide insights into the nature of the CTL-Treg interaction in the living mouse that contribute to the development of chronic retroviral infections. This knowledge can be essential for the development of new Treg- or CTL-based immunotherapies, which could be further transferred to other chronic infections.

1 Einleitung

1.1 Immunsystem

Das Immunsystem stellt für sämtliche Säugetiere eine existentielle Schutzbarriere gegenüber Krankheitserregern oder entarteten Zellen dar. In der frühzeitigen Erkennung einer pathogenen Gefährdung und der Einleitung effektiver Abwehrmaßnahmen liegt dessen Hauptaufgabe. Immunzellen sowie lymphatische Gewebe sind dafür ubiquitär im gesamten Organismus verteilt und basieren auf den sich funktionell ergänzenden Systemen der angeborenen und adaptiven Immunität.

1.1.1 Angeborenes Immunsystem

Charakteristisch für das angeborene Immunsystem ist dessen unspezifisches Wirkprinzip gegenüber Pathogenen. Es besteht aus diversen Zelltypen, welche aus den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks hervorgehen. Granulozyten, Makrophagen, Monozyten, Dendritische Zellen (DC) und Mastzellen myeloiden Ursprungs bilden den Hauptanteil. Primär spezialisiert sind diese Zellen auf die Phagozytose von Krankheitserregern sowie die gezielte Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und weiteren Mediatoren zur Regulation der Immunantwort. Einerseits dient dies der direkten Erregerbeseitigung und andererseits der Aktivierung weiterer Immunzellen für eine gesteigerte Immunreaktion [149]. Insbesondere Makrophagen und DCs sind bedeutende Phagozyten, welche aufgenommene Erreger prozessieren und deren Antigene, als Peptidfragmente, über MHC-Komplexe (*major histocompatibility complex*) an der Zelloberfläche präsentieren. Bezeichnet werden sie daher als antigenpräsentierende Zellen (APC). Prinzipiell lassen sich MHC-I- und MHC-II-Moleküle unterscheiden. MHC-I-Moleküle finden sich auf allen kernhaltigen Zellen und kontrollieren das Zytosol auf Antigenpeptide (z.B. von Viren und Tumoren). MHC-II-Moleküle sind hingegen APC-ständig und dienen der Präsentation von phagozytiertem Fremdmaterial [69, 149].

Grundsätzlich sind Makrophagen organständig, wohingegen DCs nach der Phagozytose aktiv in das nächstgelegene sekundäre lymphatische Organ migrieren. Dabei setzt die funktionelle Reifung mit vermehrter Expression von kostimulatorischen Molekülen (v.a. B7-Moleküle), Adhäsionsmolekülen und MHC-Komplexen ein. Dies

erleichtert den Kontakt mit antigenspezifischen naiven T-Zellen der adaptiven Immunabwehr und deren Priming zu aktivierten Effektorzellen. DCs bilden somit ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität [56, 68]. Makrophagen interagieren hingegen primär mit bereits aktivierten T-Zellen über MHC-Komplexe um deren Effektorfunktionen gezielt abzurufen. Beispielhaft hierfür ist eine T-Zell-vermittelte Freisetzung von Interferon γ (IFN γ) zur Förderung der intrazellulären Abtötung von Pathogenen [117].

Entscheidend für die Aktivierung der natürlichen Immunität und ihrer zellulären Komponenten ist die Erregererkennung. Sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors* - PRRs) in löslicher sowie zellständiger Form gewährleisten dies. Die keimbahnkodierten PRRs sind spezialisiert auf konservierte molekulare Strukturen klassischer Erreger, bekannt als PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*). Beispiele hierfür sind die Toll-ähnlichen Rezeptoren (*toll-like receptors* - TLR) auf der Zelloberfläche und den Endosomen sowie die zytosolisch vorliegenden PRRs RIG-I (*retinoic acid inducible gene 1*), MDA5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*) und NOD-ähnliche Rezeptoren (*nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors* - NLR). Eine PRR-Aktivierung initiiert die Expression proinflammatorischer Gene z.B. durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) und somit die Freisetzung passender Zytokine (z.B. Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interleukin 1 (IL-1) oder IL-12), wodurch ein erregerspezifisches Zytokinmilieu entsteht [5, 149]. Virale Infektionen induzieren in diesem Zusammenhang beispielsweise PRR-abhängig die Produktion antiviral wirksamer Interferone [121]. Alle PRRs haben eine essentielle Funktion für die Infektionsdetektion, die Aktivierung von Immunzellen und die Initiierung der adaptiven Immunantwort. Funktionell sind diese daher eng mit Prozessen der Phagozytose und Apoptose verbunden.

Weiterhin bedeutend für die angeborene Abwehr sind zytotoxisch aktive natürliche Killerzellen (NK-Zellen), immunregulatorisch wirksame ILCs (*innate lymphoid cells*) [11] sowie das humorale Komplementsystem. Komplementfaktoren zirkulieren in inaktiver Form im Blut und werden in Anwesenheit von Krankheitserregern aktiviert. Folglich kommt es zu lokalen Entzündungsreaktionen und der Inaktivierung der Erreger durch deren Lyse, Opsonisierung und Phagozytose. Bei der Opsonisierung bedecken Komplementproteine und/oder Antikörper (AK) die Oberfläche der Krankheitserreger und erleichtern deren Aufnahme durch Phagozyten [66, 149].

1.1.2 Adaptives Immunsystem

Typisch für das erworbene Immunsystem sind Lymphozyten mit hoher Spezifität und immunologischem Gedächtnis. Durch die somatische Rekombination der antigenerkennenden Rezeptoren in der Entwicklung der Zellen existiert eine enorme Rezeptorvielfalt innerhalb dieser Zellpopulation, wodurch mindestens 100 Millionen Antigene unterschieden werden können [149].

Die Lymphozyten lassen sich in T-Zellen und B-Zellen einteilen. Letztere bilden einen essentiellen Anteil der humoralen Immunität, durch die Produktion spezialisierter AK. Diese können Antigene binden und dadurch deren Neutralisierung und Phagozytose steigern. Zusätzlich erhöhen AK die Wirksamkeit des Komplementsystems. B-Zellen fungieren weiterhin als APCs gegenüber T-Lymphozyten. Ähnlich wie bei den Makrophagen werden dadurch Effektoraktivitäten der T-Zellen abgerufen, welche eine gesteigerte AK-Produktion und einen verstärkten Isotypwechsel induzieren [24, 149].

T-Zellen entstammen generell dem Knochenmark und reifen anschließend im Thymus, worauf deren Bezeichnung zurückzuführen ist. Dort bilden sich vielfältige T-Zell-Rezeptoren (TCR) zur späteren Antigenerkennung aus. Primär verlassen T-Zellen mit TCRs gegen körperfremde Proteine den Thymus. Selbstreaktive T-Zell-Varianten werden durch einen negativen Selektionsprozess aussortiert und vernichtet. Ausgenommen davon sind die immunsuppressiv wirkenden regulatorischen T-Zellen (Tregs), welche einem gesonderten Selektionsvorgang unterliegen und dadurch spezifisch für Autoantigene sind [195, 205]. Prinzipiell kann zwischen zwei Hauptpopulationen von T-Lymphozyten unterschieden werden, den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (*cluster of differentiation* - CD). Nach dem DC-vermittelten Priming, basierend auf einer passenden TCR-Antigen-MHC-Komplex-Interaktion und gleichzeitiger Kostimulation werden die naiven T-Zellen aktiviert [133]. CD8⁺ T-Zellen interagieren dazu spezifisch mit MHC-I-Molekülen und CD4⁺ T-Zellen mit MHC-II-Molekülen [69]. In Reaktion auf eine kognate Interaktion proliferieren und differenzieren diese zu Effektorzellen. Aus naiven CD8⁺ T-Zellen bilden sich zytotoxische CD8⁺ T-Zellen (ZTL), welche infizierte Zellen effizient abtöten können [233]. Analog entstehen aus naiven CD4⁺ T-Zellen in Abhängigkeit der Primingsignale funktionell unterschiedliche Effektorzelltypen. Die wichtigsten Subpopulationen sind die T-Helferzellen Th1, Th2, Th17, Tfh (follikuläre T-Helferzellen) und die Tregs. In der Regel liegt die Hauptaufgabe dieser CD4⁺ T-Zellen in der Freisetzung bestimmter

Zytokinkombinationen, welche die Zielzellen zu einer spezifischen Reaktion gegen das Pathogen stimulieren [203]. Besonders die Differenzierung und Proliferation von Immunzellen aber auch Apoptoseprozesse werden dadurch angeregt. Beispielhaft ist die Aktivierung von B-Zellen mit Affinitätsreifung und Isotypwechsel der AK durch T-Helferzellen. Im Zusammenspiel mit den Zellen der angeborenen Immunität (u.a. Makrophagen und ILCs) bilden sich sogenannte Immunmodule aus, welche auf die Beseitigung bestimmter Erregergruppen spezialisiert sind [149]. Abgesehen von den Tregs, welche supprimierende Eigenschaften aufweisen, wirken die anderen CD4⁺ T-Effektorzellen vorrangig als Aktivatoren, wobei diese unter bestimmten Bedingungen auch supprimierende Zytokine produzieren können [19]. Weiterhin zeigen die CD4⁺ T-Zellen eine gewisse Plastizität, was deren Umwandlung in andere Subpopulationen ermöglicht [4, 53, 203, 234].

Ein bestimmter Anteil der aktivierten T- und B-Lymphozyten differenziert zu langlebigen Gedächtniszellen. Diese gewährleisten einen schnelleren und effektiveren immunologischen Schutz beim Zweitkontakt mit dem entsprechenden Antigen [149].

1.1.2.1 Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen

Nach dem Priming expandieren die ZTLs und gelangen über das Blut und die Lymphe sowie chemokinvermittelt in ihre Zielgewebe. Dort angekommen erfolgt eine aktive Migration zu den infizierten oder entarteten Zellen, welche mit Hilfe effektiver und hochpräziser zytotoxischer Wirkmechanismen beseitigt werden können [233].

Insbesondere Viren, onkogene Veränderungen und einige Bakterien führen zu einer Anhäufung zellfremder Proteine im Zytoplasma. Diese werden prozessiert, gelangen in das endoplasmatische Retikulum, binden als Peptide an MHC-I-Moleküle und werden anschließend zwecks Antigenpräsentation an die Zelloberfläche transportiert. ZTLs erkennen mit Hilfe ihres spezifischen TCRs entsprechende Peptid-MHC-Komplexe und formen durch die Adhäsionsproteine LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*) und ICAM (*intercellular adhesion molecules*) eine stabile Kontaktstelle mit der Zielzelle, bekannt als zytotoxische immunologische Synapse (Abb.1.1) [42, 54]. Neben den soliden Synapsen können auch dynamische Kinapsen ausgebildet werden. Charakterisiert sind diese durch eine ununterbrochene Bewegung der ZTLs auf den Zielzellen, wobei beide Prozesse den programmierten Zelltod in der Zielzelle induzieren [81, 169]. Dieser wird durch Aktivierung des intrinsischen oder

extrinsischen Apoptosewegs ausgelöst. Der seltenere extrinsische Weg ist an die Expression von Fas-Ligand (FasL) und TNF α oder TNF β seitens der ZTLs und deren Bindung an sogenannte Todesrezeptoren gekoppelt. Entsprechende Rezeptoren sind Fas und Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1). Der intrinsische Weg wird durch die zielgerichtete Freisetzung zytotoxischer Granula ermöglicht (Abb.1.1) [149]. Zytotoxische Granula sind strukturell vergleichbar mit modifizierten Lysosomen. Sie beinhalten Perforin, Granzyme sowie Granulysin als Effektorproteine, welche erst nach Freisetzung funktionell aktiv werden. Perforin steuert und unterstützt das Eindringen der Komponenten in das Zytosol der Zielzelle [124, 214]. Dort induzieren Granzyme (Serinproteasen) direkt die Apoptose durch die Aktivierung von Caspasen, welche die Mitochondrien schädigen und dadurch den Zelltod einleiten. Die Granzyme A und B treten am häufigsten auf. Bekannt sind jedoch fünf verschiedene humane sowie zehn verschiedene murine Granzyme. Granulysin ist typisch für den Menschen, besitzt antimikrobielle Eigenschaften und kann ebenfalls den programmierten Zelltod auslösen [149].

Beide Apoptosewege resultieren letztlich in der Aktivierung asparaginsäure-spezifischer Cysteinproteasen (Caspasen), welche den Zelltod einleiten. In diesem Zusammenhang aktivierte Nukleasen zerstören zelluläre sowie virale DNA (Desoxyribonukleinsäure) womit die Infektion weiterer Zellen durch deren Freisetzung ausgeschlossen ist. Somit wirkt die Apoptose auch direkt auf Krankheitserreger im Zytosol. Phagozyten wie Makrophagen beseitigen abschließend die vesikulären Überreste der apoptotischen Zellen [149].

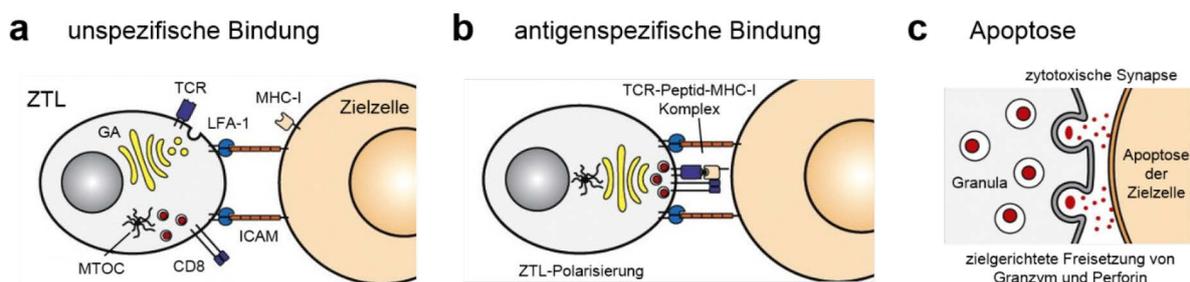


Abb.1.1: Zielzellerkennung und Apoptoseinduktion durch ZTLs

Der erste ZTL-Zielzell-Kontakt erfolgt über unspezifische Adhäsionsproteine (LFA-1 und ICAM) (a). Kommt es anschließend zur Bindung des TCRs an einen passenden Peptid-MHC-I-Komplex induziert dies die Polarisation der ZTL gegenüber der Zielzelle. Dazu wird an der Kontaktstelle das Aktinzytoskelett umorganisiert und folglich das MTOC (Mikrotubuliorganisationszentrum) sowie der Golgi-Apparat (GA) ausgerichtet (b). Es bildet sich eine zytotoxische Synapse, in welche die lytischen Granula der ZTL freigesetzt werden und den programmierten Zelltod der Zielzelle auslösen (c) (modifiziert nach [149]).

Neben der direkten Apoptoseinduktion können ZTLs auch Zytokine wie IL-12, IFN γ , TNF α sowie TNF β freisetzen und die Immunabwehr unterstützen. IFN γ inhibiert einerseits direkt die virale Replikation und fördert andererseits die MHC-I-gekoppelte Antigenpräsentation infizierter Zellen, wodurch diese besser von den ZTLs erkannt werden können. Zusätzlich werden Makrophagen durch IFN γ aktiviert und rekrutiert um als APCs oder Effektorzellen zu fungieren [186]. TNF α und TNF β verstärken diesen Effekt auf die Makrophagen durch die Wechselwirkung mit dem TNFR2. Eine Interaktion mit dem TNFR1 kann hingegen direkt die Apoptose auslösen [149]. Weiterhin synthetisieren ZTLs verschiedene Chemokine (z.B. RANTES - *regulated upon activation normal T cell expressed and secreted* [10]), welche für die Anlockung weiterer Leukozyten zum Infektionsherd und die Einleitung von Entzündungsprozessen bedeutend sind.

ZTLs können durchschnittlich 2-16 virusinfizierte Zellen pro Tag abtöten. Entscheidend ist in diesem Zusammenhang ein kooperatives Verhalten mehrerer ZTLs sowie mehrfache ZTL-Zielzell-Kontakte [81]. Grundsätzlich wird dieser Richtwert jedoch von vielerlei limitierenden Faktoren, welche die ZTL-Dynamik und die Zielzelltötung betreffen, beeinflusst. Dazu zählen das Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen, die Ausstattung der ZTLs bzw. deren Heterogenität, Verteidigungs- und Immunevasionsmechanismen der Zielzellen sowie eine Inhibition durch negative Feedbackvorgänge [82]. Beispielhaft für eine Immunevasion ist die vermehrte Expression von PD-L1 (*programmed death-ligand 1*) auf virusinfizierten Zellen [3] oder Tumorzellen [8]. Dies ist der Ligand des auf den ZTLs präsenten PD1-Rezeptors (*programmed death-protein 1*), welcher bei dessen Bindung die ZTL-Funktionalität mindert [63]. Weitere supprimierende Effekte auf die ZTLs werden ebenfalls durch entsprechende Zytokine z.B. *transforming growth factor β* (TGF β), IL-10 und IL-35 sowie inhibitorische Zellen wie Tregs [50, 134] oder myeloide Suppressorzellen (*myeloid-derived suppressor cells* - MDSCs) [52] vermittelt. Prinzipiell ist die Effizienz der ZTLs von vielerlei Aspekten sowie dem zugrundeliegendem Pathogen und dessen Fähigkeit zur Modulation des Immunsystems abhängig. Beispielhaft hierfür sind chronische Infektionen (z.B. mit HIV (humanes Immundefizienzvirus) [106], Hepatitis-B-Virus (HBV) [62] oder Hepatitis-C-Virus (HCV) [27]), welche einen dysfunktionalen Phänotyp der ZTLs induzieren können und deren Effektormechanismen entgehen [119, 223].

1.1.2.2 Regulatorische T-Zellen

Tregs bilden eine suppressive Zellpopulation der CD4⁺ T-Zellen und sind von entscheidender Bedeutung für die Immunhomöostase [166]. Dies umfasst unter anderem die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz, die Verhinderung von Autoimmunreaktionen sowie die Begrenzung chronisch-entzündlicher Erkrankungen. Generell gewährleisten die Tregs eine kontrollierte Immunantwort nach Erregerkontakt, sodass Immunpathologien beispielsweise durch eine unkontrollierte ZTL-Antwort ausbleiben [19, 213]. Einige Tumoren und virale Infektionen begünstigen die supprimierenden Effekte der Tregs zusätzlich und nutzen diese aus. Dadurch können Tregs die Tumorentwicklung [206] bzw. die Ausbildung chronischer Infektionen fördern [19, 211]. Grundsätzlich ist eine ausgewogene Balance zwischen Effektorzellen und Tregs essentiell. Eine Abweichung vom Gleichgewicht hat hingegen eine erhöhte Selbstreaktivität (zu viele Effektorzellen) oder Immunevasion (zu viele Tregs) zur Folge [138, 170].

Charakteristisch ist die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 (*forkhead box protein 3*), welcher entscheidend für die Entwicklung und Funktion der Tregs ist [61, 92]. Folglich resultiert ein Defekt dieses essentiellen Regulators in einer schweren Autoimmunität sowie lymphoproliferativen Erkrankung [21]. Generell lassen sich Tregs in eine Thymus-entstammende (tTregs) und eine Peripherie-entstammende (pTregs) Hauptpopulation unterteilen, welche beide funktionell vergleichbare Effekte auslösen. Dem Namen entsprechend bilden sich die tTregs als Foxp3⁺ Tregs im Thymus. Diese benötigen eine kontinuierliche Antigenstimulation zum Überleben, sind spezifisch für Autoantigene und bewahren die Selbsttoleranz [88]. Ermöglicht wird deren Bildung durch eine spezielle Agonistenselektion im Thymus. Entgegen der üblichen T-Zellselektion [195, 205] werden dabei potentiell autoreaktive T-Zellen über eine hochaffine Bindung zwischen TCR und Selbst-Peptid:Selbst-MHC-Komplexen selektiert [100]. pTregs bilden sich hingegen außerhalb des Thymus aus konventionellen naiven CD4⁺ T-Zellen, bei Antigenstimulation unter tolerogenen Bedingungen. Insbesondere eine suboptimale Kostimulation, intensive TCR-Signalgebung und viel Retinsäure sowie TGFβ begünstigen die Aktivierung der Foxp3-Expression. Weiterhin typisch ist deren Spezifität für Fremdantigene. Basierend auf den Unterschieden beider Treg-Populationen beschränken pTregs primär Immunantworten gegenüber körperfremden Pathogenen (z.B. kommensale Microbiota, Allergene), wohingegen tTregs vorrangig für die Toleranz gegenüber Autoantigenen verantwortlich sind [166].

Tregs besitzen vielfältige immunsuppressive Mechanismen, welche prinzipiell in vier Gruppen eingeteilt werden können. Dies umfasst inhibitorische Zytokine, zytolytische Prozesse, metabolische Störungen sowie die Beeinflussung der Reifung und Funktion der DCs (Abb.1.2). Entsprechende Effekte werden in Abhängigkeit direkter Zellkontakte oder unabhängig davon vermittelt und bewirken eine direkte oder indirekte Inhibition der Effektorzellen. Dadurch kann deren zytotoxisches Potential, Proliferation und Zytokinproduktion vermindert oder deren Zelltod ausgelöst werden [184, 213].

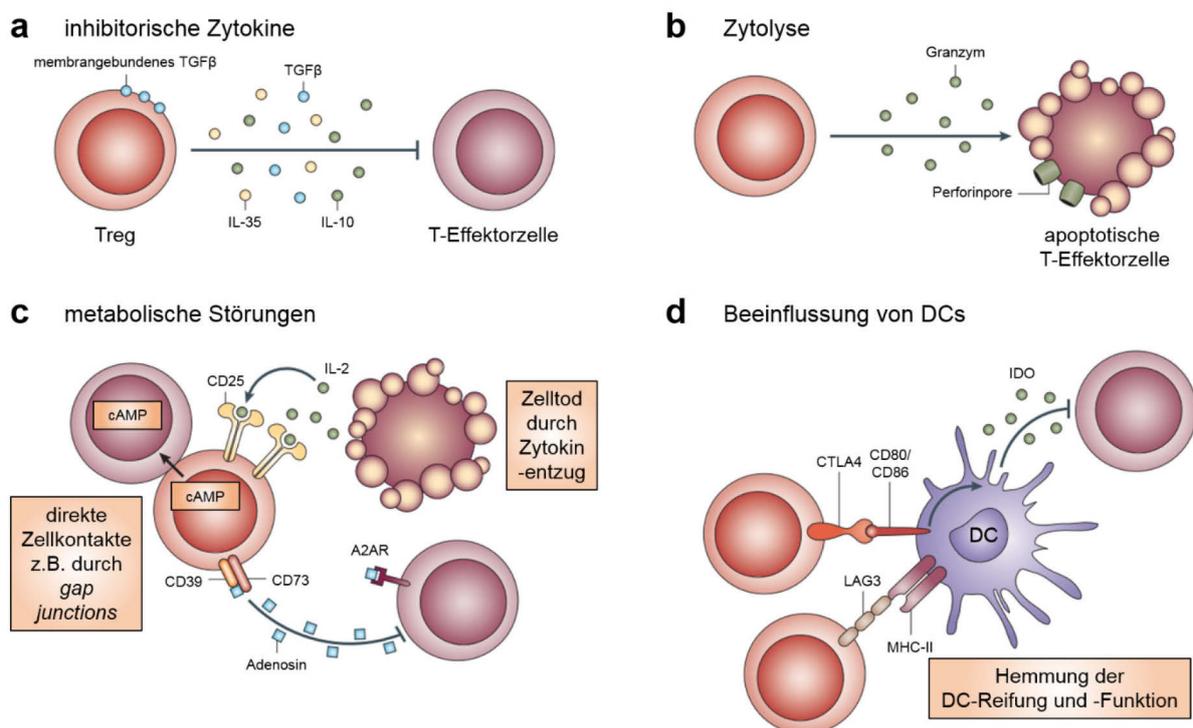


Abb.1.2: Immunsuppressive Mechanismen der Tregs

Tregs produzieren die inhibitorischen Zytokine IL-10, IL-35 und TGFβ (a). Eine Zytolyse der T-Effektorzellen wird durch zytotoxische Granzyme und Perforine vermittelt (b). Metabolische Störungen umfassen eine cAMP-vermittelte Inhibition, eine CD39/CD73-bedingte Hemmung durch Adenosinbildung sowie eine Apoptoseinduktion durch IL-2-Mangel (A2AR - Adenosinrezeptor A2A) (c). Eine Interaktion mit CTLA4 oder LAG3 beeinflusst die Reifung und Funktion der DCs, wodurch deren Aktivierungspotential gegenüber Effektorzellen herabgesetzt wird. Verstärkt werden die inhibitorischen Effekte durch die Freisetzung der suppressiven Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) (d) (modifiziert nach [213]).

Bedeutende immunmodulatorische Zytokine der Tregs sind IL-10 [12], IL-35 [39] und TGFβ [155], welche die proinflammatorischen Immunantworten von DCs, Makrophagen, B-Zellen, NK-Zellen sowie insbesondere T-Zellen supprimieren können (Abb.1.2a). Weiterhin sind Tregs fähig, die Apoptose von Effektorzellen aktiv

einzuweisen. Vermittelt werden kann dies durch die Produktion zytotoxischer Granzyme und Perforine (Abb.1.2b) [30, 77], den TRAIL-DR5 (*tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand-death receptor 5*) Signalweg [171] oder Galectin-1 [67]. Ähnliche Effekte können ebenfalls durch einen Treg-vermittelten IL-2-Entzug gegenüber naiven T-Zellen entstehen, ein Zytokin welches essentiell für deren Proliferation und Differenzierung ist. Ursächlich dafür ist der hochaffine IL-2-Rezeptor CD25 der Tregs, welcher konstitutiv exprimiert wird und einen Großteil des vorhandenen IL-2 bindet [35]. Ebenfalls präsent auf der Zelloberfläche der Tregs sind die Ektoenzyme CD39 und CD73, welche extrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP) in Adenosin umwandeln. Adenosin bewirkt nach Bindung an den Adenosinrezeptor A2A der T-Effektorzellen deren direkte Suppression [43]. Neben den beschriebenen metabolischen Störungen kann auch der direkte Transfer des inhibitorischen cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP) von den Tregs über *gap junctions* in die Effektorzellen hemmende Effekte vermitteln (Abb.1.2c) [28].

Zusätzlich zu der direkten Inhibition der T-Effektorzellen modulieren Tregs auch DCs und blockieren dadurch die Aktivierung der T-Zellen [204]. Insbesondere der konstitutiv exprimierte Rezeptor CTLA4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*) interagiert mit den kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 der DCs [220]. In Folge dieser Interaktion werden CD80 und CD86 herunterreguliert und die Produktion des immunsuppressiven Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) stimuliert, welches die essentielle Aminosäure Tryptophan abbaut. Dadurch wird die Proteinbiosynthese der Effektoren gestört, wobei die gebildeten IDO-Abbaustoffe die Tregs weiter fördern [33, 58]. Ein weiterer Modulator der DC-Reifung ist LAG3 (*lymphocyte-activation gene 3*), ein Homolog des CD4-Rezeptors, der MHC-II-Komplexe hochaffin bindet und ITAM-vermittelt (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) inhibitorische Signalwege aktiviert. Das immunstimulierende Potential der DCs sowie deren Reifung werden dadurch supprimiert (Abb.1.2d) [93, 120]. Die verminderte Übermittlung aktivierender Signale durch die DCs basiert neben den beschriebenen Mechanismen auch auf Effekten der inhibitorischen Zytokine. In diesem Zusammenhang kann durch die DC-Modulation indirekt ebenfalls eine gesteigerte Expression inhibitorischer Moleküle, wie PD1, auf den ZTLs induziert werden [17]. Zusammenfassend basiert die Treg-bedingte Suppression auf einer Kombination verschiedener immunsuppressiver Prozesse, welche sich in Abhängigkeit der jeweiligen Situation (Erhalt der Homöostase, Verhinderung von Autoimmunreaktionen, chronisch-virale Infektion, Tumorerkrankung, etc.) spezifisch gestalten.

1.2 Retroviren

Im Verlauf der Evolution haben Retroviren das Genom der Wirbeltiere entscheidend geprägt und somit deren heutige Erscheinungsform mitbestimmt. Beispielhaft hierfür ist das humane und murine Erbgut mit einem retroviralen Anteil von acht bis zehn Prozent. Dies ist zurückzuführen auf die Integrationsfähigkeit des viralen Genoms in die DNA sowie schätzungsweise 40.000 retrovirale Infektionen über Millionen von Jahren [76, 114, 145].

Grundlegend lassen sich die Retroviren in die zwei Unterfamilien der Orthoretroviren und Spumaretroviren, bestehend aus insgesamt sieben verschiedenen Genera, gliedern. Erstere umfassen die α -, β -, γ -, δ -, ϵ -Retroviren und Lentiviren. Letztere werden durch die Gattung der Spumaviren, bekannt als Foamyviren, vertreten [105]. Weiterhin wird zwischen exogenen und endogenen Retroviren unterschieden. Exogene Retroviren besitzen alle Informationen um neue infektiöse Viruspartikel zu generieren, wobei das Genom auch Onkogene enthalten kann. Das onkogene Potential und charakteristische Vorhandensein der reversen Transkriptase, eines Enzyms welches die virale RNA (Ribonukleinsäure) in DNA umwandelt [38], resultierte in der Namensgebung dieser Viren (**Reverse Transkriptase Onkoviren**). Endogene Retroviren sind Überreste von Infektionen vergangener Generationen. Dementsprechend sind sie in allen Körperzellen zu finden, durch genetische Defekte gekennzeichnet und werden vertikal über die Keimbahnzellen vererbt. Sie können nur selten infektiöse Partikel produzieren und liegen häufig in genetisch stark reduzierter Form, als Retrotransposons, vor [99]. Grundsätzlich können retrovirale Infektionen zu neurologischen Einschränkungen, Immundefizienzen oder der Ausbildung von Krebs führen. Es sind jedoch auch harmlose Infektionsverläufe möglich.

Der erstmalige Nachweis eines Retrovirus gelang Peyton Rous 1911. Mit Ultrafiltraten aus Geflügelsarkomen induzierte er Tumoren in gesunden Tieren und beschrieb somit das Rous-Sarkom-Virus [179]. In den 1980er Jahren folgten mit HTLV (humanes T-lymphotrophes Virus) [168] und HIV [15] die ersten relevanten humanpathogenen Retroviren. Insbesondere HIV hat sich durch seine hohe Letalität seitdem zu einer ernststen globalen Problematik entwickelt [18, 221].

1.2.1 Struktur und Aufbau der Retroviren

Retroviren sind von einer Lipidmembran mit eingelagerten Glykoproteinen umgeben und haben einen Durchmesser von 80 bis 100 nm. Im Inneren der Viren schließt sich eine Schicht aus Matrixproteinen gefolgt von den *core*-bildenden Kapsidproteinen an. Diese umgeben das 7 bis 12 kb große, aus einzelsträngiger (+)RNA bestehende diploide Genom sowie die Enzyme Integrase und Reverse Transkriptase. Die RNA ist wiederum mit Nukleokapsidproteinen umlagert und geschützt (Abb.1.3) [140].

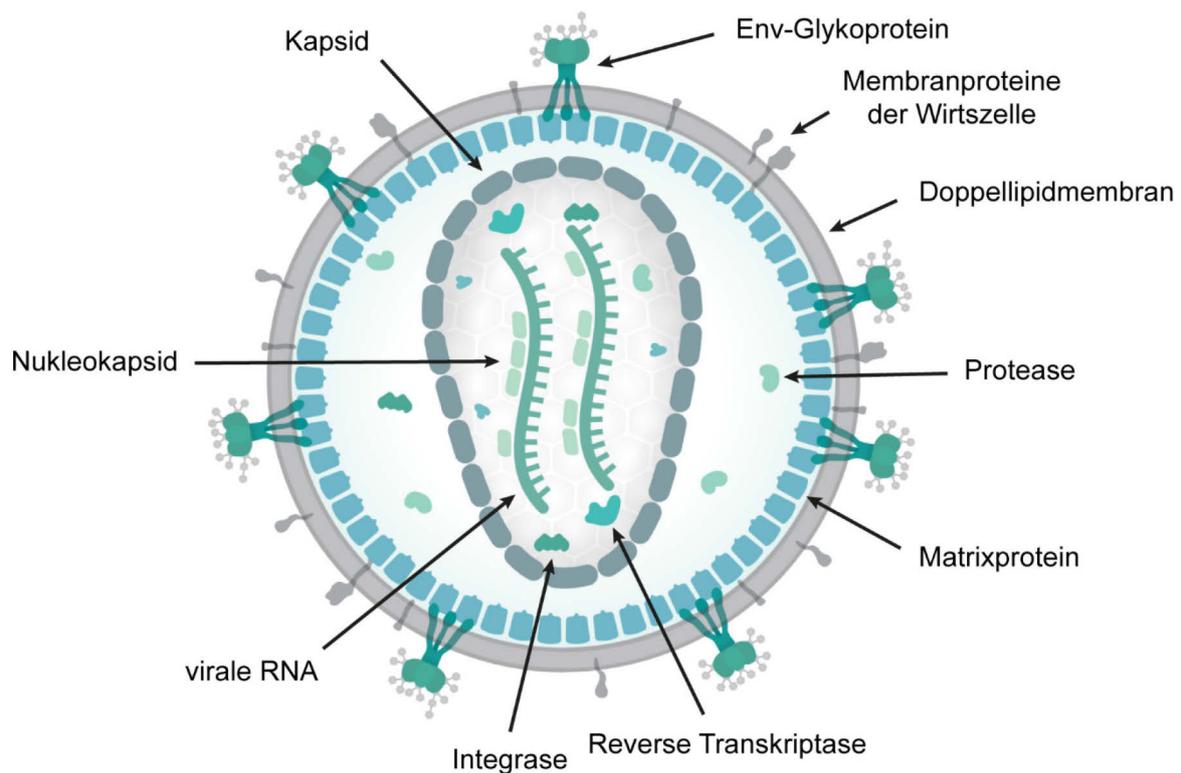


Abb.1.3: Struktureller Aufbau eines Retroviruspartikels

Retroviren sind membranumhüllte Viren, welche ein einzelsträngiges von Strukturproteinen geschütztes (+)RNA-Genom besitzen. Wichtige virale Enzyme sind die Reverse Transkriptase, Protease und Integrase (modifiziert nach [218]).

Das Erbgut aller infektiösen Retroviren enthält die drei essentiellen Gene *gag* (*group-specific antigen*), *pol* (Polymerase) und *env* (*envelope*). Spumaviren, Lentiviren und δ -Retroviren besitzen weitere Gene, welche für akzessorische und regulatorische Proteine kodieren, und werden daher als komplexe Retroviren bezeichnet (Abb.1.4) [217]. Die Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine zählen zu den Gag-Proteinen. *pol* kodiert die Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease, wobei die

virale Protease speziell durch das *pro*-Gen, einem Teilbereich des *pol*-Gens, kodiert wird. Die in der Hüllmembran eingelagerten Glykoproteine sind auf *env*-Gene zurückzuführen. Flankiert werden die Virusgene nach Einbau in das Wirts-Genom von *long terminal repeats* (LTRs). Diese DNA-Wiederholungseinheiten kontrollieren die retrovirale Genexpression durch Promotor- und *enhancer*-Elemente [140].

a einfaches Retrovirusgenom - MuLV - γ -Retrovirus



b komplexes Retrovirusgenom - HIV - Lentivirus

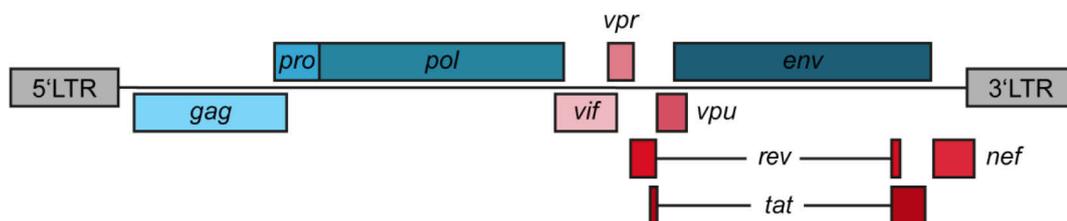


Abb.1.4: Zusammensetzung des proviralen Retrovirusgenoms

Dargestellt sind ein einfaches (a) und ein komplexes (b) provirales Retrovirusgenom. Essentielle retrovirale Gene (*gag*, *pol* + *pro*, *env*) sind in blau und akzessorische sowie regulatorische Gene (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nif*, *rev*, *tat*) in rot hinterlegt. Flankiert wird das Genom von LTRs, welche die Genexpression regulieren (MuLV - murines Leukämievirus).

1.2.2 Replikationszyklus der Retroviren

Retrovirale Partikel binden durch Glykoproteine an entsprechende Rezeptoren auf den Zielzellen und setzen somit den Replikationszyklus in Gang. Es folgt die Fusion der Viren mit der Zellmembran und die Auflösung des Kapsids. Dies aktiviert die Reverse Transkriptase und damit die Neusynthese von Doppelstrang-DNA, basierend auf der viralen RNA. Hierbei kann das Enzym zwischen beiden Kopien des diploiden RNA-Genoms wechseln und Mosaikstränge generieren. Speziell bei Mehrfachinfektionen einer Zelle mit verschiedenen Virussubtypen fördert diese Funktion die Bildung von Rekombinanten. Die DNA gelangt in den Zellkern und wird durch die Integrase als Provirus in das Genom der Zelle eingebaut. Im Anschluss erfolgt die Transkription der viralen Gene durch die zelluläre RNA-Polymerase II. Vergleichbar mit der Reverse Transkriptase hat auch dieses Enzym eine relativ hohe Fehlerrate und keine

Korrekturmechanismen, wodurch eine hohe Variabilität der Retroviren entsteht. Die gebildete mRNA (*messenger RNA*) gelangt in das Zytoplasma und wird in Proteine translatiert. Für die Prozessierung von Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteinen ist die virale Protease bedeutend. Abschließend assemblieren virale RNA und Proteine zu neuen Viruspartikeln an der Zellmembran und werden freigesetzt [31, 140].

Einen intrinsischen Schutz vor Retroviren bilden zelluläre Restriktionsfaktoren, welche den Replikationszyklus gezielt stören oder unterbinden können [73]. Beispielhaft sind hier APOBEC-Proteine (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like*), welche durch Desaminierung retrovirales Cytosin (C) zu Uracil (U) umwandeln und dadurch das virale Genom destabilisieren. Bedingt durch die Koevolution von Wirt und Virus sind einige Viren wiederum an die Restriktionsfaktoren angepasst. HIV besitzt dazu unter anderem das akzessorische Protein Vif (*viral infectivity factor*), welches den Abbau von APOBEC induziert (Abb.1.4b) [74].

1.2.3 Das humane Immundefizienzvirus - HIV

HIV wurde erstmalig 1983 von Montagnier und Barré-Sinoussi identifiziert [15] und hat sich seitdem zu einer globalen Pandemie mit derzeit etwa 37 Millionen infizierten Menschen ausgeweitet. Primär übertragen wird das Virus durch ungeschützten Geschlechtsverkehr, Mutter-Kind-Übertragungen, kontaminierte Bluttransfusionen oder Injektionsnadeln bei Mehrfachgebrauch. Charakteristisch ist die durch das Lentivirus ausgelöste Immunschwächekrankheit AIDS (*acquired immunodeficiency syndrom*). AIDS entwickelt sich nach einer symptomfreien Latenzphase und führt zu einer großen Anfälligkeit gegenüber opportunistischen Erregern sowie letztlich zum Tod. 2017 starben in diesem Zusammenhang ~940.000 Menschen [18, 221].

HIV ist das Resultat zoonotischer Übertragungen von Immundefizienzviren der Affen (simianes Immundefizienzvirus - SIV) auf den Menschen. Prinzipiell wird zwischen HIV-1 und HIV-2 unterschieden, welche auf verschiedene SI-Ursprungsviren zurückzuführen sind [79, 90]. Voraussetzung für den Eintritt des Virus in eine Zelle und deren Infektion ist der CD4-Rezeptor. Dieser findet sich vor allem auf der Zelloberfläche von T-Helferzellen sowie Monozyten, Makrophagen und DCs [41]. Zusätzlich sind auch die Korezeptoren CC-Motiv-Chemokinrezeptor 5 (CCR5) und CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) für einen effizienten Eintritt in eine Zielzelle notwendig. Die infizierten Zellen, insbesondere die CD4⁺ T-Zellen, werden in der

Endphase der Infektion durch die zytolytische Wirkung des HIV stark reduziert und bedingen dadurch die Ausbildung von AIDS [193].

Zur Behandlung der Infektion wird eine Kombinationstherapie eingesetzt. Diese sogenannte hoch aktive antiretrovirale Therapie (HAART) soll möglichst viele unabhängige und essentielle Funktionen des Virus gleichzeitig attackieren [125]. Beispielhaft sind Inhibitoren welche den Eintritt der Viren in die Zelle bzw. deren Fusion mit der Zellmembran verhindern, nukleosidische und nicht-nukleosidische Reverse Transkriptase-Hemmer, Integrase-Inhibitoren oder Protease-Hemmstoffe [16]. Dennoch ermöglicht eine HAART lediglich eine Verlängerung der asymptomatischen Phase der Infektion, also eine Hinauszögerung der AIDS-Entwicklung und keine Heilung. Problematisch sind resistente Viren, das mögliche Auftreten von Nebenwirkungen und die Kosten der Behandlung. 2017 erhielten aber bereits 59 % aller weltweit Infizierten eine antiretrovirale Therapie [221]. Alternativ wäre ein entsprechender Impfstoff sehr wertvoll. Bislang konnte jedoch noch keine wirksame therapeutische oder präventive Vakzinierung entwickelt werden. Ursächlich hierfür ist vor allem die hohe Variabilität und die damit verbundene Immunevasion der Viren [14].

1.2.4 Tiermodelle zur Erforschung von HIV

Essentiell für ein besseres Verständnis von HIV und die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien sind entsprechende Tiermodelle [199]. Bedingt durch den Wirtstropismus induziert HIV nur beim Menschen den bekannten Krankheitsverlauf. HIV kann auch Schimpansen infizieren, jedoch replizieren die Viren in den Menschenaffen nur unbeständig und folglich kommt es nur selten zur Ausbildung von AIDS [159]. Vielfältige Studien bezüglich der Pathogenese, viralen Übertragung, Latenz, allgemeinen Immunantwort sowie Impfstoff- und Mikrobizidtestung wurden deshalb mit vergleichbaren Viren und entsprechenden Versuchstieren durchgeführt. Beispielhaft ist die Infektion asiatischer Makaken mit SIV [194] oder von Hauskatzen mit dem feline Immundefizienzvirus (FIV) [137]. Analog zu HIV kommt es bei diesen Infektionen zu einer Abnahme der CD4⁺ T-Zellen und zur Entwicklung von AIDS [89]. Problematisch bei diesen Versuchstieren sind jedoch deren genetische Heterogenität, hohe Haltungskosten, limitierte Zahlen verfügbarer Tiere sowie die begrenzten Möglichkeiten, diese genetisch oder immunologisch zu manipulieren. Diese Aspekte sind im Mausmodell aufgehoben, weshalb es einen nützlichen und einfachen Ansatz

zur Untersuchung retroviraler Infektionen darstellt. Eine Option zur Untersuchung von HIV im Mausmodell ist die Nutzung humanisierter Mäuse, welche ein menschliches Immunsystem ausbilden. Verschiedene humanisierte Mausmodelle werden in diesem Zusammenhang derzeit genutzt [212], wie z.B. BLT-Mäuse (*bone marrow, liver, thymus*). Zur Generierung dieser Tiere werden humane fötale Leber- und Thymusgewebe unter die Nierenkapsel immundefizienter Mäuse transplantiert gefolgt von einer intravenösen Injektion humaner hämatopoetischer Stammzellen [45, 102, 116]. Verschiedenste Behandlungen lassen sich an diesen Mäusen testen, wobei die Modelle gewisse Anwendungsgrenzen aufweisen und die klassischen Vorteile eines Mausmodells durch einen hohen Kosten- und Zeitaufwand sowie spezielle Haltungsbedingungen eingeschränkt sind [212]. Andere Retroviren und insbesondere murine Leukämieviren, wie das gut charakterisierte Friend Virus (FV) bilden daher eine Alternative um elementare Einblicke in die Auseinandersetzung des Immunsystems mit den Retroviren zu gewinnen. Die Pathologien einer HIV- und einer FV-Infektion unterscheiden sich deutlich, jedoch sind viele Übereinstimmungen hinsichtlich der Immunantwort gegenüber beiden Viren dokumentiert [48, 80]. Grundlegendes Wissen über die humorale und zelluläre Immunität in verschiedenen Infektionsphasen sowie potentielle therapeutische Ansatzpunkte für retrovirale Infektionen konnten somit bereits durch das FV-Modell gewonnen werden [80, 88, 103, 107, 150, 153].

1.2.5 Friend Virus (FV) - ein retrovirales Modellsystem

Das FV wurde 1957 von Charlotte Friend beschrieben [65] und basiert auf einem Komplex bestehend aus zwei Viren. In diesem Zusammenhang fungiert das murine Friend-Leukämievirus (F-MuLV) als replikationskompetentes Helfervirus mit apathogenen Charakteristika. Ergänzt wird dieses durch das replikationsdefiziente aber pathogene *spleen focus forming virus* (SFFV). SFFV ist bedingt durch zahlreiche Defekte im Virusgenom auf die strukturellen Proteine des F-MuLV zur Ausbildung viraler Partikel angewiesen. Dementsprechend gewährleistet nur eine Koinfektion mit beiden Viren die Verbreitung des SFFV und die Ausbildung einer FV-Infektion. Das FV interagiert über die Env-Glykoproteine des F-MuLV mit dem ekotrophen Virusrezeptor mCAT-1 (*mouse cationic amino acid transporter 1*) auf den Zielzellen [7, 222]. Primäre Zielzellen des FV sind Erythroblasten, Lymphozyten (v.a. B-Zellen) und myeloide Zellen [49, 219]. Prinzipiell ist das FV ein onkogenes γ -Retrovirus, welches eine Erythroleukämie in Mäusen verursachen kann.

In suszeptiblen Mäusen entwickeln sich die pathologischen Merkmale der FV-Infektion in zwei Phasen [143]. Zunächst wird eine Splenomegalie bedingt durch polyklonale Proliferation der Erythroblasten induziert. Ursächlich ist die Bindung des SFFV Env-Glykoproteins gp55, welches als konstitutives Mitogen fungiert, an den Erythropoetin-Rezeptor der erythroiden Vorläuferzellen [118]. Dieser Stimulus führt zur Bildung vieler weiterer Zielzellen für die Viren. Die zweite Phase der Erkrankung ist durch die Entstehung vollständig transformierter Zellen und eine daraus resultierende Leukämie gekennzeichnet. Das SFFV-Genom integriert in bestimmte Loci des Wirtsgenoms und verursacht maligne Veränderungen [157]. Eine insertionale Mutagenese führt zur Überexpression des Protoonkogens *spi-1* (*SFFV proviral integration site-1*) [142] und zusätzlich zur Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *p53* [148] mit den Folgen einer Erythroleukämie. Resistente Mausstämme kontrollieren die Infektion durch potente Immunantworten und unterbinden eine Akkumulation der beschriebenen Transformationsereignisse [86, 87].

1.2.6 Immunität gegen eine FV-Infektion

Die Koevolution zwischen Wirt und Virus resultierte in der Ausprägung von Resistenzgenen gegenüber der FV-Infektion. An der immunologischen Resistenz sind mindestens vier *MHC*-Gene (*H-2* in der Maus) und das *Rfv-3*-Gen (*recovery from FV gene 3*) beteiligt. Der *H-2^b*-Haplotyp ist im Zusammenhang einer effektiven Antigenpräsentation gegenüber ZTLs (*H-2D*) und CD4⁺ T-Zellen (*H-2A*, *H-2E*) entscheidend [34, 83]. *Rfv-3* beeinflusst grundlegend die Produktion virusneutralisierender AK [51, 182]. Weiterhin existieren mindestens sechs Gene (*Fv-1* bis *Fv-6* - *friend virus susceptibility genes*), welche über nichtimmunologische Mechanismen eine Resistenz vermitteln können [34, 83]. Diese Resistenzgene blocken beispielsweise retrovirale Oberflächenrezeptoren (*Fv-4*), beeinträchtigen den Replikationszyklus (*Fv-1*) oder limitieren die Erythroblastenproliferation nach gp55-Stimulation (*Fv-2*) [157]. Sind letztere Gene nicht aktiv entwickeln die Mäuse nach der Infektion eine massive Splenomegalie. Bei Tieren mit entsprechender immunologischer Ausstattung wie den hochwirksamen *MHC*- und *Rfv-3*-Genotypen, *H-2^{b/b}* und *Rfv-3^{r/s}* oder *r/r*, normalisiert sich die Milzgröße und Lebenserwartung, wohingegen suszeptible Mäuse an der Infektion sterben.

C57BL/6-Mäuse kontrollieren die FV-Infektion durch den Resistenzgenotyp $H-2^{b/b}$, $Fv-2^{r/r}$, $Rfv-3^{r/r}$. Basierend darauf entwickeln die Tiere eine komplexe adaptive Immunantwort bestehend aus neutralisierenden AK, ZTLs sowie $CD4^+$ T-Zellen [150]. Die T-Zellantwort mit virusspezifischen $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen ist 10 Tage nach Beginn der Infektion am stärksten ausgeprägt [154, 229]. Charakteristisch sind FV-spezifische $CD8^+$ T-Zellen, gegen das immundominante FV-Epitop GagL85-93 [229]. Im Gegensatz dazu wird die $CD4^+$ T-Zellenantwort von neun verschiedenen $H-2^b$ -restringierten FV-Epitopen aus Env, Pol und Gag bestimmt [136]. Entsprechende Depletionsexperimente zeigten einen entscheidenden Anteil beider T-Zellpopulationen an der Kontrolle der Infektion [84, 85, 154, 173]. Während die ZTLs primär infizierte Zellen abtöten, fördern die T-Helferzellen die Bildung von AK durch B-Zellen und unterstützen die ZTL-Antwort [153, 201]. Weiterhin vermitteln die $CD4^+$ T-Zellen antivirale Effekte durch die Freisetzung von IFN γ [95]. In der späten akuten und chronischen Infektion werden Tregs aktiv und supprimieren ZTLs sowie T-Helferzellen [50, 88, 153]. Entscheidend für einen kontrollierten Infektionsverlauf sind ebenfalls B-Zellen und virusneutralisierende AK, deren Bedeutung mit Hilfe B-Zell-defizienter Mäuse sowie AK-Transferexperimenten nachgewiesen werden konnten [135]. Typisch für C57BL/6-Mäuse sind eine gering ausgeprägte temporäre Splenomegalie während der akuten Infektion, keine Erythroleukämie und eine lebenslange Persistenz des FV. Dieser Mausstamm ist damit für die Untersuchung immunologischer Voraussetzungen für den Schutz vor Retroviren besonders geeignet. Im Gegensatz dazu weisen BALB/c-Mäuse einen suszeptiblen Genotyp ($H-2^{d/d}$, $Fv-2^{s/s}$, $Rfv-3^{s/s}$) mit letalen Infektionsfolgen auf [34].

1.2.7 Regulatorische T-Zellen während der FV-Infektion

Resistente Mäuse entwickeln im Verlauf der akuten Infektion hohe Viruslasten im Knochenmark und der Milz, welche mit dem Einsetzen der adaptiven ZTL-Antwort reduziert werden. Zeitlich versetzt dazu werden nachfolgend Tregs in den betroffenen Geweben aktiviert und expandiert, sodass die virusspezifischen $CD8^+$ T-Zellen supprimiert werden [151, 229]. Dies bedingt die Dysfunktionalität der ZTLs und die Ausbildung einer chronischen Infektion, in welcher aktivierte Tregs fortwährend präsent sind und die Suppression aufrechterhalten [50, 151, 227, 229]. Nachgewiesen wurde dieser Effekt durch eine Depletion der Tregs in der chronischen FV-Infektion, welche in einer Reaktivierung der ZTLs und deutlich reduzierten Viruslasten resultierte

[46]. Vergleichbar dazu, führt die Abwesenheit der Tregs in der akuten Infektion zu einer numerisch sowie funktional gesteigerten ZTL-Antwort und dementsprechend verringerten Viruslasten [3, 228, 229]. Vergleichbar suppressive Effekte der Tregs auf die virusspezifischen CD8⁺ T-Zellen sind auch in chronischen humanen Infektionen mit HIV [106], HBV [62] und HCV [27] nachweisbar.

Zwei verschiedene tTreg-Subpopulationen expandieren virusinduziert während der akuten Infektion [88]. Diese sind FV-unspezifisch [9] und werden dementsprechend durch andere Mechanismen stimuliert als gewöhnliche T-Helferzellen. Zu unterscheiden ist eine IL-2-abhängige sowie IL-2-unabhängige Proliferation [152]. Ein Großteil der Tregs (90 %) expandiert nach Bindung von IL-2 an CD25, welches überwiegend von virusspezifischen CD4⁺ T-Helferzellen produziert wird. Weiterhin sind eine durch Autoantigene vermittelte TCR-Stimulation und eine GITR-basierende (*glucocorticoid-induced TNFR-related protein*) Interaktion mit B-Zellen in diesem Zusammenhang bedeutend [88, 141]. Die gebildeten Tregs weisen variable V β -Ketten innerhalb des TCRs auf, wodurch eine Vielzahl verschiedener, jedoch primär körpereigener Antigene erkannt werden können. Gegensätzlich dazu proliferiert eine spezifische Treg-Subpopulation, welche die V β 5-Kette des TCRs exprimiert, besonders stark IL-2-unabhängig und stellt den verbleibenden Anteil der Tregs (10 %) [88]. Die Spezifität dieser Population richtet sich gegen ein endogenes retrovirales Superantigen (SAG), welches auf das Maus-Mammatumovirus 9 (MMTV9), ein endogenes Retrovirus, zurückgeht. Durch Bindung von MMTV9 SAG an die V β 5-Kette des TCRs konventioneller CD4⁺ T-Zellen werden diese im Thymus zur Vermeidung autoreaktiver Prozesse deletiert, wobei tolerogene Tregs nicht betroffen sind [162, 207]. In der Peripherie exprimieren V β 5⁺ Tregs nach SAG-Stimulation vermehrt TNFR2, dessen Bindung durch membrangebundenes TNF α als zweites entscheidendes Proliferationssignal neben dem SAG dient. Die membranständige Form des TNF α ist vorübergehend auf allen aktivierten CD8⁺ T-Effektorzellen hochreguliert, welche dadurch die Treg-Proliferation fördern [98, 152]. Analoge Studien über die genauen Mechanismen der Treg-Expansion während einer HIV-Infektion sowie die Bedeutung endogener retroviraler SAGs stehen noch aus.

Die genauen immunsuppressiven Mechanismen der Tregs, welche die Ausbildung chronisch-retroviraler Infektionen begünstigen, sind größtenteils noch unbekannt [88]. Die inhibitorischen Zytokine IL-10 und TGF β sind während der FV-Infektion nicht an der Immunsuppression beteiligt [175]. *In vitro* Experimente deuten jedoch auf einen

APC-unabhängigen direkten Treg-ZTL-Zellkontakt, welcher die Suppression vermittelt [88, 175].

1.3 Zielsetzung

Im Zusammenhang mit der Chronifizierung viraler Infektionen sind supprimierende Effekte von Tregs auf ZTLs bereits für vielfältige Krankheiten beschrieben [19, 119]. Allerdings sind die genauen Mechanismen, welche die Immunsuppression insbesondere bei retroviralen Infektionen vermitteln, nur ansatzweise aufgeklärt. Deshalb sollten in dieser Arbeit beide Zellpopulationen im Knochenmark lebender FV-infizierter Mäuse mit Hilfe der intravitale Zwei-Photonenmikroskopie visualisiert und untersucht werden. Das Konzept der *in vitro* beschriebenen direkten Treg-ZTL-Kontakte [175], welche die Suppression bedingen, sollte *in vivo* überprüft und erweitert werden.

Zur Umsetzung dieses Vorhabens sollte ein vielfältig einsetzbarer Zelltransferansatz für die intravitale Mikroskopie virusspezifischer CD8⁺ T-Zellen etabliert werden. Dieser sollte auf einer geringen Anzahl zu transferierender Zellen basieren, welche in der infizierten Maus expandieren und an der FV-Immunantwort teilnehmen ohne diese grundlegend zu modifizieren. Essentiell sollte dabei die direkte Beobachtung der ZTLs während einer physiologischen Infektion bei gleichzeitig optimalen Bedingungen für die mikroskopische Analyse sein. Der Zelltransferansatz sollte mit dem transgenen DEREK-Mausmodell (*depletion of regulatory T cell*), welches die Darstellung sowie Depletion der Tregs erlaubt [112], kombiniert werden um beide Zellpopulationen simultan im Verlauf der FV-Infektion zu visualisieren. Mit Hilfe der Zwei-Photonenmikroskopie sollten die Motilität und Bewegungsmuster von Tregs und ZTLs sowie mögliche zelluläre Interaktionen aufgeklärt werden. Weiterhin sollten die Effekte einer Treg-Depletion auf die Bewegungsfähigkeit der ZTLs charakterisiert werden. Zur Erweiterung des bestehenden Systems sollten ferner infizierte Zellen dargestellt werden. Dazu sollte FV-mWasabi, welches infizierte Zellen grün fluoreszieren lässt, eingesetzt werden und Aufschluss über die Verteilung der Zellen im Knochenmark geben. Um eine separate mikroskopische Erfassung von ZTLs, Tregs und infizierten Zellen zu ermöglichen und deren wechselseitige Beeinflussung besser zu verstehen sollte ein mit dem Fluoreszenzprotein TurboFP650 modifiziertes FV hergestellt werden.

2 Material

2.1 Geräte

Tab.2.1: Verwendete Geräte

Name	Hersteller
Automatischer Zellzähler „Cellometer“	Nexcelom, Lawrence, MA, USA
Beheizbares Wasserbad für intravitale Mikroskopie	Feinmechanik, Universität Duisburg-Essen, Essen, D Lauda, Lauda-Königshofen, D
DREMEL 300 (300-1/55)	Dremel, Racine, WI, USA
Durchflusszytometer	LSR II mit FACS Diva Software, BD Biosciences, San Jose, CA, USA MACSQuant® VYB, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Fluoreszenzmikroskop	Leica Microsystems, Mannheim, D
Fluovac Anästhesie- System mit Narkosebox	Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus, March- Hugstetten, D
Kleintier-Beatmungsgerät „MiniVent Type 845“	Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus, March- Hugstetten, D
MACS Zellseparator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
NanoDrop	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Thermoschüttler MHR11	HLC BioTech, Bovenden, D
Thermozykler C1000	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Ultrazentrifuge (UZ)	Optima L-80 XP mit Rotor NVT90 oder SW32, Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Univentor 400 Anästhesie-Einheit	Univentor, Zejtun, M
Zwei-Photonenmikroskop	TCS SP8, Leica Microsystems, Mannheim, D Chameleon Vision II Laser, Coherent, Santa Clara, CA, USA

Konventionell gebräuchliche Laborgeräte sind nicht aufgelistet.

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tab.2.2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer, Leverkusen, D
Discardit II Spritzen, 2 ml, 20 ml	Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Eclipse Kanülen, 27G, 0,4 x 19 mm 23G, 0,6 x 25 mm	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Ecoflo, Perfusionsbesteck, 23G, 0,6 x 20 mm, 30 cm Schlauch	Dispomed Witt, Gelnhausen, D
EDTA-Probengefäße (1,6 mg/ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Einwegskalpelle	Mediware Servoprax, Wesel, D
Einwegzählkammern „Cellometer“	Nexcelom, Lawrence, MA, USA
Introcan-W, Venenverweilkanüle, 22G, 0,9 x 25 mm	Braun, Melsungen, D
MACS - LS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Natrium-Heparin-Kapillaren	Hirschmann, Eberstadt, D
Omnican-F, Feindosierungsspritze, 0,01-1 ml, 30G, 0,3 x 12 mm	Braun, Melsungen, D
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman Coulter, Brea, CA, USA

Konventionell gebräuchliche Verbrauchsmaterialien sind nicht aufgelistet.

2.3 Antikörper und weitere Fluoreszenzfarbstoffe

Alle verwendeten AK wurden mit einer 1:200 Verdünnung eingesetzt und waren anti-Maus-AK.

Tab.2.3: Verwendete Antikörper

Epitop	Kopplung mit	Klon	Hersteller
CD3	APC	17A2	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD4	AF700	GK1.5	BioLegend, San Diego, CA, USA

CD8	AF 700	53-6.7	eBioscience, San Diego, CA, USA
CD8	BV421	53-6.7	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD8	FITC	53-6.7	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD43	FITC	1B11	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD62L	BV510	MEL-14	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD69	PE-Cy7	H1.2F3	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD107a	FITC	1D4B	BioLegend, San Diego, CA, USA
Foxp3	PE-eF610	FJK-16S	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
KLRG1	BV421	2F1/KLRG1	BioLegend, San Diego, CA, USA
PD1	APC	29F.1A12	BioLegend, San Diego, CA, USA
GzmB	APC	GB11	BioLegend, San Diego, CA, USA
Ki-67	PE-Cy7	SolA15	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
PE	Biotin	PE001	BioLegend, San Diego, CA, USA

Für den Ausschluss toter Zellen, am Durchflusszytometer, wurden lebend-tot-Farbstoffe (*fixable viability dye* - FVD) eingesetzt. Angewendet wurden FVD Zombie UV (BioLegend, San Diego, CA, USA; Verdünnung 1:500), FVD eFluor 780 (eBioscience, San Diego, CA, USA; Verdünnung 1:200) und FVD *near-IR* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; Verdünnung 1:1000). FV-spezifische CD8⁺ T-Zellen wurden mit Hilfe eines PE-gekoppelten MHC-I H-2D^b Tetramers (beinhaltet das immundominante F-MuLV-Epitop GagL85-93) detektiert (MBL, Woburn, MA, USA; Verdünnung 1:100). Weiterhin wurde ein Streptavidin-APC-Konjugat verwendet (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, Verdünnung 1:200).

Zur Visualisierung des Blutflusses während der intravitalen Mikroskopie wurden Qtracker 655 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; Verdünnung 1:5) genutzt.

Ein Env-spezifischer Primär-AK (AK720, eigene Herstellung, Hybridomazelllinie H720 [172], unverdünnter Hybridomazellüberstand genutzt) und ein HRP-gekoppelter (*horseradish peroxidase*) Sekundär-AK (Ziege-anti-Maus-IgG-AK (Ig - Immunglobulin); Dako, Hamburg, D; Verdünnung 1:400) wurden zur Detektion FV-infizierter Zellen im *infectious center assay* (IC-Assay) eingesetzt.

2.4 Fluorochrome und Fluoreszenzproteine

Tab.2.4: Verwendete Fluorochrome und Fluoreszenzproteine

Name	Abkürzung	Absorption	Emission
Alexa Fluor 700	AF700	696 nm	719 nm
Allophycocyanin	APC	650 nm	660 nm
Brilliant Violet 421	BV421	408 nm	422 nm
Brilliant Violet 510	BV510	405 nm	512 nm
eFluor 780	eF780	633 nm	780 nm
Ethidiumbromid	EtBr	300 nm	603 nm
Fluoresceinisothiocyanat	FITC	490 nm	525 nm
Phycoerythrin	PE	496 nm	578 nm
Phycoerythrin-eFluor 610	PE-eF610	496 nm	610 nm
Phycoerythrin-Cyanin 7	PE-Cy7	496 nm	785 nm
<i>enhanced green fluorescent protein</i>	EGFP	488 nm	507 nm
<i>monomeric Wasabi</i>	mWasabi	493 nm	509 nm
<i>tandem dimeric Tomato</i>	tdTomato	554 nm	581 nm
<i>Turbo fluorescent protein 650</i>	TurboFP650	592 nm	650 nm

2.5 Primer

Hergestellt von der Firma Biomers (Ulm, D).

Tab.2.5: Verwendete Primer

Name	Sequenz
TurboFP650 <i>sense</i>	5'-AGA TCT ATG GGA GAG GAT AGC GAG CTG-3'
TurboFP650 <i>antisense</i>	5'-TCT AGA TCA GCT GTG CCC CAG TTT GCT AG-3'

2.6 Plasmide

Tab.2.6: Verwendete Plasmide

Name	Funktion
pTurboFP650-C	Kodiert für das Fluoreszenzprotein TurboFP650. Diente als Vorlage für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) der Turbo-FP650 DNA-Sequenz. Evrogen, Moskau, RUS (erhalten von Prof. Dr. Mirko Trilling, Universitätsklinikum Essen, Essen, D)
pCR 2.1 TOPO	Diente als Zwischenvektor für die TA-Klonierung von PCR-Produkten. Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
pBLU.p15E-G4S-2A-U3	Kodiert für das 3' Ende des <i>env open reading frames</i> von F-MuLV und beinhaltet ein Teilstück von p15E, einen Glycin-Serin Linker (G4S), ein sich selbstteilendes Peptid (2A-Peptid) des porzinen Teschovirus [126] und U3 (LTR-Teilstück). Diente als Zwischenvektor. (erhalten von Dr. Wibke Bayer, Universitätsklinikum Essen, Essen, D)
pFB29	Beinhaltet das gesamte F-MuLV-Genom. (erhalten von Dr. Wibke Bayer, Universitätsklinikum Essen, Essen, D)

2.7 Enzyme

Sämtliche Enzyme und die zugehörigen Puffer wurden von der Firma New England BioLabs (NEB, Ipswich, MA, USA) bezogen. Verwendet wurden die Q5 *high-fidelity* DNA-Polymerase, die *OneTaq* DNA-Polymerase, die T4 DNA-Ligase, die *calf intestinal phosphatase* (CIP) und die Restriktionsenzyme *Apa*LI, *As*cl, *Bg*II, *Cla*I, *Eco*RI, *Hind*III sowie *Xba*I.

2.8 Chemikalien und Lösungen

Tab.2.7: Verwendete Chemikalien und Lösungen

Name	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	AppliChem, Darmstadt, D
3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO ,USA
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf, D
Ammoniumchlorid	AppliChem, Darmstadt, D
Bacto Peptone	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA Laboratories, Pasching, A
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO ,USA
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Dextrose-H ₂ O	AppliChem, Darmstadt, D
Dimethylformamid (DMFA)	Merck, Darmstadt, D
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, D
Diphtherietoxin (DT)	Merck Millipore, Burlington, MA, USA
DNA-Größenmarker 100 bp, 1000 bp	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Dulbecco's <i>modified eagle medium</i> (DMEM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Dulbecco's <i>phosphate-buffered saline</i> (PBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol 96 % (vergällt)	Alfried Quadflieg, Gelsenkirchen, D
Ethanol p.a.	AppliChem, Darmstadt, D
Ethidiumbromid (EtBr)	AppliChem, Darmstadt, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt, D
FACS (<i>fluorescence-activated cell scanning/sorting</i>) <i>clean</i>	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FACS <i>flow</i>	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FACS <i>rinse</i>	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, D

Forene [100 % V/V] Isofluran (1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyl Difluoromethyl Ether)	AbbVie, North Chicago, IL, USA
Formalin [37 %]	AppliChem, Darmstadt, D
Glukose	AppliChem, Darmstadt, D
Glycerin	AppliChem, Darmstadt, D
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe, D
Hexadimethrinbromid (Polybren)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO ,USA
Isotone Natriumchloridlösung [0,9 %]	Braun, Melsungen, D
Kaliumchlorid	AppliChem, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt, D
Ketamin [50 mg/ml]	Inresa, Freiburg, D
LB-Agar	Roth, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	AppliChem, Darmstadt, D
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	AppliChem, Darmstadt, D
N,N,N',N'-Tetrakis(2-Hydroxypropyl)ethylenediamine (Quadrol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO ,USA
Natriumacetat	AppliChem, Darmstadt, D
Natriumazid	AppliChem, Darmstadt, D
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO ,USA
Phenolrot	AppliChem, Darmstadt, D
Pikrinsäure	AppliChem, Darmstadt, D
RPMI 1640 Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
S.O.C. Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Saccharose	Roth, Karlsruhe, D
TRIS-Acetat-EDTA (50x) - TAE	AppliChem, Darmstadt, D
TRIS-EDTA (100x) - TE	Roth, Karlsruhe, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO ,USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO ,USA
Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Urea	Roth, Karlsruhe, D

Wasserstoffperoxid [30 %]	Roth, Karlsruhe, D
Xylazin [2 %]	Ceva, Düsseldorf, D

2.9 Puffer und Medien

Tab.2.8: Verwendete Puffer und Medien

Medium/Puffer	Zusammensetzung
80 wt% Quadrol	500 g Quadrol 125 g dH ₂ O
AEC-Gebrauchslösung	13 ml dH ₂ O 0,325 ml Natriumacetat [3 M] 0,624 ml AEC-Stammlösung 7 µl Wasserstoffperoxid [30 %]
AEC-Stammlösung	4 mg/ml AEC in DMFA
Bouin's Lösung	75 ml Pikrinsäure 25 ml Formalin [37 %] 5 ml Essigsäure
CUBIC-1 <i>Clearing</i> -Reagenz (<i>clear, unobstructed brain/body imaging cocktails and computational analysis</i>)	156 g 80 wt% Quadrol 125 g Urea 75 g Triton X-100 144 g dH ₂ O
DMEM ⁺⁺⁺ Medium	DMEM 0,1 % Gentamycin 1 % Ciprofloxacin 10 % FCS
DNA-Ladepuffer	50 ml TE-Puffer (1x) 1 Spatelspitze Bromphenolblau 30 % Glycerin
Erythrozytenlyse-Puffer	dH ₂ O 0,16 M Ammoniumchlorid pH 7,2
FACS-Puffer	PBS 0,1 % BSA

	0,02 % Natriumazid
Fixierungslösung	PBS
4 % PBS-PFA	40 g/l Paraformaldehyd pH 7,2
HEPES <i>buffered saline</i> (HBS) (2x)	dH ₂ O 10 mM Calciumchlorid 12 mM Dextrose-H ₂ O 1,5 mM Dinatriumhydrogenphosphat 50 mM HEPES 280 mM Natriumchlorid pH 7,05
Ketamin-Xylazin-Narkoselösung	Isotone Natriumchloridlösung [0,9 %] 2 mg/ml Xylazin 20 mg/ml Ketamin
LB-Medium	dH ₂ O 1 % Hefeextrakt 1 % Bacto Peptone 0,5 % Natriumchlorid (+ 2 % LB-Agar für Festmedium) Zusatz des benötigten Antibiotikums z.B. 100 mg/l Carbenicillin
MACS-Puffer	PBS 0,5 % BSA 2 mM EDTA
PBBS	dH ₂ O 0,14 g/l Calciumchlorid 1,0 g/l Glucose 0,32 g/l Kaliumchlorid 0,2 g/l Kaliumdihydrogenphosphat 1,15 g/l Dinatriumhydrogenphosphat 7,2 g/l Magnesiumchlorid-Hexahydrat 0,2 g/l Magnesiumsulfat-Heptahydrat 1 % Phenolrot
PBBS-EDTA	PBBS 2 mM EDTA

PBS-BSA	PBS 0,1 % BSA
Perfusionslösung	PBS
PBS-EDTA	5 mM EDTA
Qtracker-Lösung	20 µl Qtracker 655 „vascular label” [2 µM] 80 µl PBS
RPMI ⁺⁺ Medium	RPMI-1640 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin
Saccharoselösung [30 %] für UZ	PBS 0,3 g/ml Saccharose
TAE-Puffer (1x)	dH ₂ O 1 % TAE (50x)
TE-Puffer (1x)	dH ₂ O 1 % TE (100x)

2.10 Antibiotika

Tab.2.9: Verwendete Antibiotika

Name	Hersteller
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gentamycin	Roth, Karlsruhe, D
Ciprofloxacin	Fresenius Kabi, Bad Homburg, D
Carbenicillin	Roth, Karlsruhe, D

2.11 Kits

Tab.2.10: Verwendete Kits

Name	Hersteller
NucleoSpin Gel und PCR Aufreinigung	Macherey-Nagel, Düren, D
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren, D

CD8a (Ly-2) <i>MicroBeads</i> , Maus	MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Intrazellulärer Cytofix/Cytoperm-Kit + Permeabilisierungs/Wasch-Puffer (Perm/Wasch-Puffer)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Foxp3/Transkriptionsfaktor Fixierungs/Permeabilisierungs-Kit + Permeabilisierungs-Puffer (Perm-Puffer)	eBioscience, San Diego, CA, USA

2.12 Versuchstiere

Die Wildtyp-Mausstämme wurden von Harlan Laboratories (Borchen, D) bezogen und wiesen unterschiedliche genotypische Resistenzmerkmale gegenüber einer FV-Infektion auf [83, 157].

Tab.2.11: Verwendete Wildtyp-Mausstämme

Wildtyp-Mausstamm	Resistenzgenotyp	Verwendung
C57BL/6	<i>H-2^{b/b}</i> , <i>Fv-2^{r/r}</i> , <i>Rfv-3^{r/r}</i> resistent	Allgemeine Experimente
BALB/c	<i>H-2^{d/d}</i> , <i>Fv-2^{s/s}</i> , <i>Rfv-3^{s/s}</i> suszeptibel	Herstellung des FV-Stocks
CB6F1 (C57BL/6 x BALB/c)	<i>H-2^{b/d}</i> , <i>Fv-2^{r/s}</i> , <i>Rfv-3^{r/s}</i> suszeptibel	Titration des FV-Stocks

Alle verwendeten transgenen Tiere wiesen einen C57BL/6-Hintergrund auf. Deren Zucht erfolgte am Universitätsklinikum Essen. Nachfolgend sind alle transgenen Mausstämme und deren Merkmale aufgeführt.

DEREG - DEpletion of REGulatory T cell

Genetisch modifiziert wurde dieser Mausstamm mit Hilfe der *bacterial artificial chromosome* (BAC)-Technologie. DEREГ-Mäuse exprimieren ein Fusionsprotein, bestehend aus dem Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR) und dem grünen Fluoreszenz-

protein EGFP, welches von der endogenen Foxp3-Promotor/*enhancer*-Region des BAC-Transgens kontrolliert wird. Diese Expression ist in allen funktionalen Foxp3⁺ CD4⁺ T-Zellen, den Tregs, beobachtbar und ermöglicht deren spezifische Detektion via Fluoreszenz sowie Depletion durch die Gabe von Diphtherietoxin (DT) [112] (Jackson-Bestandsnummer: 011003, Bar Harbor, ME, USA). Diese Tiere dienten als Empfängertiere.

***dLck-hcre*³⁷⁷⁹**

Das *Cre-Rekombinase*-Gen ist in diesem Mausmodell dem distalen Promotor der Lymphozyten-Proteintyrosinkinase (*Lck*) nachgeschaltet. Dies resultiert in einer T-Zell-spezifischen *Cre-Rekombinase* Expression [232] (Jackson-Bestandsnummer: 012837, Bar Harbor, ME, USA). Diese Tiere dienten der Zucht der Spendertiere (Abb.2.1).

Ai9(RCL-tdT)

Cre-Rekombinase-Erkennungssequenzen (*loxP*) flankieren eine DNA-Stoppkassette, welche die Expression des nachgelagerten roten Fluoreszenzprotein tdTomato verhindert. In Anwesenheit der *Cre-Rekombinase* wird die Stoppkassette entfernt und das Fluoreszenzprotein, reguliert über einen CAG-Promotor, exprimiert. Veränderte DNA-Sequenzen wurden durch gezielte Mutation in den Gt(ROSA)26Sor-Lokus eingefügt [128] (Jackson-Bestandsnummer: 007909, Bar Harbor, ME, USA). Diese Tiere dienten der Zucht der Spendertiere (Abb.2.1).

***Lck-tdTom* (Verpaarung: *dLck-hcre*³⁷⁷⁹ x *Ai9(RCL-tdT)*)**

Bedingt durch das *Cre/loxP*-System [110] kommt es zu einer T-Zell-spezifischen Expression von tdTomato in den *Lck-tdTom*-Mäusen (Abb.2.1). Diese Tiere dienten als Kontroll-Spendertiere für den adoptiven Zelltransfers von CD8⁺ T-Zellen.

D^bGagL TCR^{tg}

Mehr als 90 % aller CD8⁺ T-Zellen exprimieren in diesen Tieren einen FV-spezifischen transgenen TCR (TCR^{tg}), gerichtet gegen das immundominante GagL85-93-Epitop des FV [161]. Diese Tiere dienten der Zucht der Spendertiere (Abb.2.1).

TCR^{tg}-Lck-tdTom (Verpaarung: *Lck-tdTom* x *D^bGagL TCR^{tg}*)

Typisch für diesen Mausstamm sind die T-Zell-spezifische tdTomato-Expression sowie das Vorhandensein eines FV-spezifischen TCR (gerichtet gegen das GagL85-93-Epitop) auf über 90 % aller CD8⁺ T-Zellen (Abb.2.1). Diese Tiere dienten als Spendertiere für den adoptiven Zelltransfers von CD8⁺ T-Zellen.

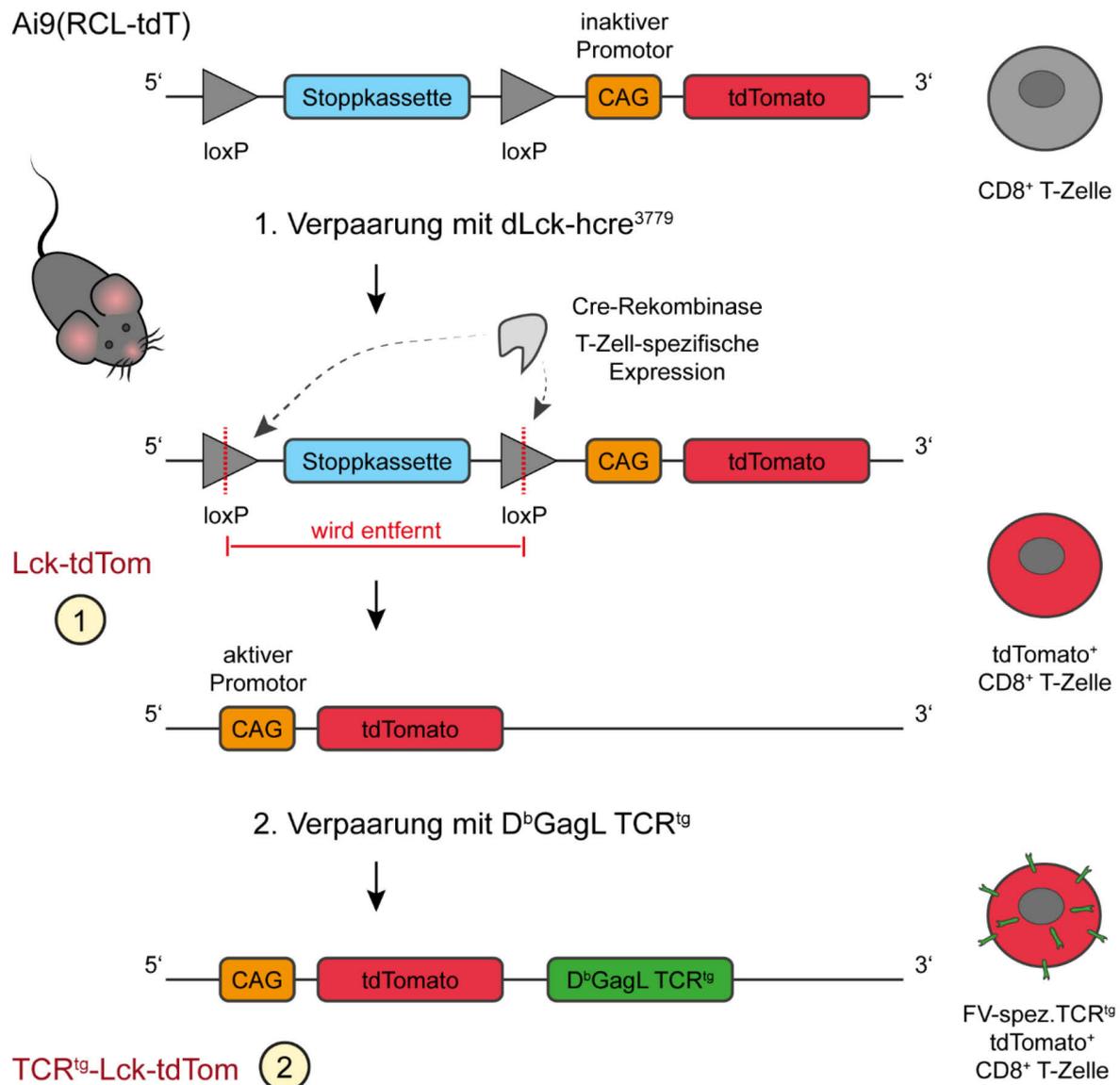


Abb.2.1: Verpaarungsschema und genetischer Hintergrund der Spendertiere

Die Verpaarung von Ai9(RCL-tdT) mit dLck-hcre³⁷⁷⁹ resultiert in Lck-tdTom-Mäusen (1), welche das rote Fluoreszenzprotein tdTomato in allen T-Zellen aufweisen. Voraussetzung ist das Cre/loxP-System. Die Cre-Rekombinase wird T-Zell-spezifisch exprimiert (dLck-hcre) und schneidet innerhalb der loxP-DNA-Sequenzen, sodass die DNA-Stoppkassette entfernt und die Expression von tdTomato freigegeben wird. Nachfolgend konnten Lck-tdTom- und D^bGagL TCR^{tg}-Mäuse verpaart werden um TCR^{tg}-Lck-tdTom-Mäuse (2) zu erhalten. Diese zeigen neben der beschriebenen Fluoreszenz das Vorhandensein eines FV-spezifischen TCR auf über 90 % aller CD8⁺ T-Zellen, gerichtet gegen das immundominante GagL-Epitop des FV (bedeutende Gene sind vereinfacht dargestellt).

Sämtliche Tiere wurden unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen gehalten und hatten uneingeschränkten Zugang zu Futter und Wasser. Die verwendeten Mäuse waren zum Versuchsstart mindestens acht Wochen alt. Zelltransfers erfolgten generell nur zwischen Tieren gleichen Geschlechts.

2.13 Viren und Bakterien

Tab.2.12: Verwendete Viren

Name	Information
FV	Komplex aus F-MuLV und SFFV in Milzzellhomogenisat (10 %) (Prof. Ulf Dittmer, Universitätsklinikum Essen, Essen, D)
FV-mWasabi	Komplex aus F-MuLV-mWasabi und SFFV in Milzzellhomogenisat (10 %) [219] (Dr. Wibke Bayer, Universitätsklinikum Essen, Essen, D)

Die zur Transformation eingesetzten chemisch kompetenten *Escherichia coli* stbl2 Bakterien wurden von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) bezogen.

2.14 Zelllinien

Tab.2.13: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Information
<i>Mus dunni</i> (ATCC CRL-2017)	Murine Fibroblastenzelllinie, welche eine permissive Replikation von MuLVs ermöglicht [115].
HEK 293 T (ATCC® CRL-3216TM)	Humane embryonale Nierenepithelzelllinie (<i>human embryonic kidney cells</i>), umfasst DNA-Teile des menschlichen Adenovirus 5 und exprimiert das SV40 <i>large</i> T-Antigen, dies ermöglicht die DNA-Replikation von episomalen Plasmiden mit dem SV40-Replikationsursprung [191].

2.15 Software

Tab.2.14: Verwendete Software

Name	Hersteller
End Note X8	Clarivate Analytics, Philadelphia, PA, USA
GraphPad Prism 6.0	GraphPad, San Diego, CA, USA
OriginPro 9.0	OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA
Adobe Illustrator CC 2017	Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA
Adobe Premiere Pro CC 2017	Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA
Imaris 9.2.1	Bitplane, Zürich, CH
FlowJo X	Tree Star, Ashland, OR, USA
Vector NTI Advance 11.5	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Primerdesign

Die Primer wurden mit Hilfe der Vector NTI-Software erstellt. Grundlage bildete die DNA-Sequenz des zu vervielfältigenden Gens, welche über die NCBI-Datenbank abrufbar war. Beim Design war zu beachten, dass der Anteil an Guanin- (G) und Cytosinbasen (C) 40-60 % betrug, die Primer 18-30 Basen umfassten und eine Schmelztemperatur von 55-80 °C aufwiesen. Weiterhin sollte die Sequenz möglichst spezifisch sein, sodass eine Bindung nur an der gewünschten Position erfolgte. Passende Restriktionsschnittstellen wurden an die 5' Enden der Primer angefügt. Diese entsprachen denen des Vektors, wodurch dieser mit dem Insert nach dem Restriktionsverdau kompatibel und ligierbar war.

3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Eine PCR ermöglicht die Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte [147]. Die Ausgangs-DNA wird zunächst erhitzt und in Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). Nachfolgend ermöglicht dies die Anlagerung spezifischer Primer (Primerhybridisierung), welche durch das Anfügen neuer dNTPs verlängert werden können (Elongation). Vermittelt wird der letzte Schritt durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Diese verwendet die freie 3'-Hydroxylgruppe der Primer als Startpunkt für die Verknüpfung weiterer dNTPs. Diese drei Phasen werden als Zyklus mehrfach durchlaufen und resultieren in der Vervielfältigung des entsprechenden Sequenzabschnittes (Tab.3.1). Der Reaktionsansatz wurde generell nach Tab.3.2 erstellt und mit Hilfe eines Thermozyklers durchgeführt.

Tab.3.1: Allgemeiner Ablauf der PCR mit empfohlenen Parametern

Vorgang	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	98 °C	30 sec	1
Denaturierung	98 °C	10 sec	25-35
Primerhybridisierung	50-72 °C	10-30 sec	
Elongation	72 °C	20 sec/kb	

Finale Elongation	72 °C	2 min	1
Pause	4 °C	∞	1

Tab.3.2: PCR-Reaktionsansatz

Volumen/Menge	Bestandteil
10 µl	Q5 Reaktions-Puffer (5x)
1 µl	dNTPs (10 mM)
10 µl	<i>sense</i> -Primer (1 pmol/µl)
10 µl	<i>antisense</i> -Primer (1 pmol/µl)
30 ng	Plasmid mit Ausgangs-DNA
0,5 µl	Q5 <i>high-fidelity</i> DNA-Polymerase
ad 50 µl	dH ₂ O

3.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Trennverfahren für Nukleinsäuren, bei dem ein elektrisches Feld die Bewegung der negativ geladenen DNA-Moleküle durch das Gel bewirkt. Basierend auf der Molekülgröße erfolgt die Auftrennung. Folglich bewegen sich DNA-Abschnitte verschiedener Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch die Kohlenhydratmatrix. Generell wandern kleinere Moleküle schneller Richtung Anode als Größere.

Gele mit 0,8 oder 1 % (w/v) Agaroseanteil und einem Zusatz von 0,5 µg/ml EtBr wurden verwendet. Hierbei diente TAE-Puffer der Herstellung des Gels und als Laufpuffer während der Auftrennung der Fragmente. Die Proben wurden im Verhältnis 1:6 mit DNA-Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zur Orientierung und dem Vergleich der Bandengrößen wurden DNA-Größenmarker eingesetzt. Die DNA-Teilstücke wurden bei 5 V/cm sowie Raumtemperatur (RT) aufgetrennt und anschließend unter UV-Licht, welches das in die DNA interkalierte EtBr zur Fluoreszenz anregte, analysiert. Spezifische DNA-Fragmente konnten an dieser Stelle dem Gel entnommen werden und mit Hilfe des NucleoSpin Gel und PCR Aufreinigungs-Kits nach Herstellerangaben aus dem Gel extrahiert werden.

3.1.4 TA-Klonierung

Die TA-Klonierung ist ein schnelles Klonierungsverfahren bei dem keine Restriktionsenzyme notwendig sind. Es basiert auf der Hybridisierung der komplementären Basen Adenin (A) und Thymin (T) verschiedener DNA-Fragmente. Eingesetzt wurde es, um die bei der PCR gewonnenen DNA-Sequenzen in ein Plasmid einzubauen. Daraus konnte ein definiertes Insert mit passenden Endungen durch Restriktionsendonukleasen gewonnen und für den nächsten Klonierungsschritt genutzt werden.

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe der *OneTaq* DNA-Polymerase mit einem 3'-A-Überhang (ein Desoxyadenosintriphosphat angehängen) versehen. Der Reaktionsansatz umfasste 50 µl (23,5 µl dH₂O, 20 µl PCR-Produkt, 1 µl dATPs, 0,5 µl *OneTaq* DNA-Polymerase und 5 µl *OneTaq* Puffer) und wurde für 15 min bei 72 °C inkubiert. Nachfolgend wurde der Ansatz mit dem NucleoSpin Gel und PCR Aufreinigungs-Kit nach Herstellerangaben umgepuffert und konnte für die TA-Klonierung eingesetzt werden. Es wurde der pCR 2.1 TOPO Vektor mit 3'-T-Überhang (ein Desoxythymidintriphosphat bereits angehängen) verwendet und entsprechend der Herstellerangaben mit dem vorbereiteten Insert für 5 min bei RT inkubiert. Insert und Vektor wurden durch die kovalent an den pCR 2.1 gebundene Topoisomerase (TOPO) ligiert, sodass keine Ligase erforderlich war. Das fertige Konstrukt konnte direkt für die Transformation kompetenter Bakterien eingesetzt werden.

3.1.5 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen ermöglichen die gezielte Aufspaltung von DNA-Sequenzen durch die hydrolytische Spaltung von Phosphodiesterbindungen innerhalb definierter Sequenzabschnitte. Vektor und amplifiziertes Insert wurden gleichermaßen mit den Restriktionsenzymen und einem passenden Puffer nach Herstellerangaben von NEB behandelt. Der Restriktionsverdau von 10 µg DNA erfolgte mit 10-20 *units* der Enzyme über Nacht (ü.N.) bei 37 °C. Die DNA-Fragmente konnten anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel aufgereinigt werden. Um eine Religation der linearen Vektor-DNA zu vermeiden, wurden dessen Enden mit Hilfe einer Phosphatase (CIP) dephosphoryliert (30 min, 37 °C). Neben der zielgerichteten Klonierung von DNA-Fragmenten wird der Restriktionsverdau auch zur Überprüfung durchgeführter Klonierungen eingesetzt. Für diesen analytischen Zweck wurde die

DNA mit 10 *units* der Restriktionsenzyme für 1-2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt.

3.1.6 Ligation

Die T4 DNA-Ligase induziert die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylenden der DNA. Dies bewirkte die Verbindung der, durch den Restriktionsverdau, kompatiblen Enden von Vektor und Insert sowie die Bildung eines neuen Plasmids. Die Reaktion wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt und die Menge einzusetzender Komponenten nach der Ligationsformel (Abb.3.1) berechnet. Der Ligationsansatz hatte ein Gesamtvolumen von 20 µl und wurde für 2 h bei RT oder ü.N. bei 4 °C inkubiert.

$$X \text{ ng Insert} = \frac{50 \text{ ng Vektor} \times 3 \times \text{Insertgröße in bp}}{\text{Vektorgöße in bp}}$$

Abb.3.1: Ligationsformel

3.1.7 Transformation und Plasmid-Isolation

Neu generierte Plasmide können über das Verfahren der Transformation in Bakterien eingebracht und dort vervielfältigt werden. Chemisch kompetente *Escherichia coli* stbl2 Bakterien wurden hierzu mit 3 µl des zuvor erstellten Ligationsansatzes vermengt. Es folgten 30 min Inkubation auf Eis, ein Hitzeschock (30 sec, 42 °C) sowie weitere 2 min auf Eis. Nach dem Zusatz von 250 µl S.O.C. Medium wurde die Suspension für 1 h im Thermoschüttler (250 rpm, 32 °C) inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden abschließend auf selektive Agarplatten ausgestrichen und ü.N. bei 32 °C gelagert. Am Folgetag konnten einzelne Bakterienkolonien (5-10 verschiedene) in 3 ml selektives LB-Medium überführt werden. Angezogen wurden diese ü.N. bei 32 °C und 200 rpm. Anschließend konnten 1,5 ml der Bakteriensuspension entnommen und die Plasmid-DNA mit dem NucleoSpin Plasmid-Kit (Mini-Prep - bis 25 µg) nach Herstellerangaben isoliert werden. Zur Herstellung größerer Mengen Plasmid-DNA wurden 250 ml Bakterien analog angezogen und mittels NucleoSpin Plasmid-Kit (Maxi-Prep - bis

0,5 mg) aufgereinigt. Die Konzentration der Plasmid-DNA konnte mittels NanoDrop bestimmt werden.

3.1.8 DNA-Sequenzierung

Neu generierte Plasmide wurden durch DNA-Sequenzierung, durchgeführt von der Firma LGC Genomics (Berlin, D), auf Richtigkeit überprüft.

3.1.9 DNA-Fällung

Die Fällung dient der Konzentration und Reinigung von DNA in wässriger Lösung. Hierzu wurde der Ligationsansatz mit dH₂O auf 50 µl aufgefüllt und anschließend mit 5 µl Natriumacetat (3 M) und 165 µl eiskaltem Ethanol (100 %) versetzt. Nach Zugabe der Präzipitationskomponenten folgte eine Zentrifugation des Ansatzes (11.000 x g, 1 h, 4 °C). Das Pellet wurde mit 200 µl eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen (11.000 x g, 5 min, 4 °C) und nach Lufttrocknung (10 min) in 20 µl dH₂O aufgenommen.

3.1.10 Transfektion

Vorbereitend für die Transfektion, der Einbringung von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen, wurden HEK 293 T-Zellen in 25 cm² Zellkulturflaschen mit 5 ml DMEM⁺⁺⁺ Medium ausgesät und ü.N. inkubiert. Am Folgetag sollten diese eine Konfluenz von 70 % erreicht haben. Die zuvor gefällte DNA wurde in 219 µl dH₂O aufgenommen und mit 31 µl Calciumchlorid (2 M) versetzt. Anschließend wurden diesem Gemisch 250 µl HBS (2x) tropfenweise und unter starkem Schütteln zugegeben. Das Transfektionsgemisch wurde nach 10 min Inkubation bei RT auf die Zellen gegeben, wobei das Medium zuvor auf 1,5 ml reduziert wurde. 4 h später wurde das Medium abermals verworfen und durch 3 ml frisches DMEM⁺⁺⁺ ersetzt. Nach drei Tagen Inkubation wurde der Überstand der Zellen abgenommen und bei 4 °C gelagert.

3.2 Tierversuche

Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden gemäß der Richtlinien der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) und der *Federation of Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) durchgeführt. Alle Experimente wurden von dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) genehmigt.

3.2.1 Herstellung eines FV-Stocks *in vivo*

Das FV ist ein Komplex bestehend aus zwei Viren, dem Leukämievirus F-MuLV und dem polyzythämie-induzierenden SFFV [143]. Zur Herstellung eines FV-Stocks wurden susceptible BALB/c-Mäuse mit 3000 *spleen focus forming units* (SFFU) infiziert. 14 Tage nach der Infektion wurde den Tieren die Milz entnommen und ein Milzzellhomogenisat (10 %) mit PBBS-EDTA (2 mM) erstellt. Anschließend konnte der Virusstock bei - 80 °C gelagert sowie titriert werden. Zur Bestimmung des Virustiters wurden CB6F1-Mäuse für 14 Tage infiziert und deren Milzen entnommen. Durch die FV-Infektion induzierte maligne Zellhaufen auf der Milz wurden mittels Bouin's Lösung angefärbt und ausgezählt [132]. Die Viruskonzentration ergab sich aus der Anzahl vorhandener Foki. Der Virusstock enthielt kein *lactate dehydrogenase-elevating virus* [176].

3.2.2 FV-Infektion

Die Infektion erfolgte durch intravenöse (i.v.) Injektion in die Schwanzvene der Maus. Der Virusstock wurde von Milzrückständen befreit (16.000 x g, 3 min) und in sterilem PBS verdünnt. Pro C57BL/6-Maus (Empfängermäuse) wurden 20.000 SFFU FV oder FV-mWasabi in 100 µl PBS appliziert. BALB/c-Mäuse wurden mit 500 SFFU FV-mWasabi in 100 µl PBS infiziert.

3.2.3 Narkose

Die Versuchstiere wurden entsprechend des vorzunehmenden Eingriffs narkotisiert. Eine Kurzzeitnarkose (bis zu 1 min), genutzt für Blutentnahmen, erfolgte durch eine Inhalationsnarkose. Dazu wurden die Tiere in einer Narkosebox mit einem Sauerstoff-Isoflurangemisch (1,2-1,4 %) betäubt. Für längere Eingriffe (bis zu 1 h) wurde den

Mäusen entsprechend ihrem Körpergewicht eine Ketamin-Xylazin-Narkoselösung intraperitoneal (i.p.) injiziert. Die Dosis lag bei 100 µg/g Körpergewicht Ketamin sowie 10 µg/g Körpergewicht Xylazin. Dies entsprach 5 µl Narkoselösung pro 1 g Mausgewicht. Um diese Narkose in eine Langzeitnarkose (mehrstündig, 4-5 h) zu überführen, wurden die Tiere mit einer Venenverweilkanüle intubiert und an ein Kleintier-Beatmungsgerät angeschlossen. Gekoppelt war dies an eine Anästhesie-Einheit, sodass die Beatmung mit einem Gemisch aus Sauerstoff und dem inhalativem Anästhetikum Isofluran (1,2 %) erfolgte. Beatmet wurde mit einer Frequenz von 250 Atemzügen/min und einem Hubvolumen von 250 µl. Eine kontrollierte und gleichbleibende Narkose über mehrere Stunden war dadurch möglich.

3.2.4 Retrobulbäre Blutentnahme

Der Venenplexus hinter dem Auge der Mäuse wurde zur Blutentnahme mit Hilfe von Natrium-Heparin-Kapillaren punktiert. Hierzu wurden die Tiere in eine Kurzzeitnarkose versetzt und ~100 µl Blut (2-5 Tropfen) entnommen. Aufgefangen wurde das Blut in 1,3 ml EDTA-Probengefäßen (1,6 mg/ml) für eine nachfolgende magnetische Zellseparation. Eine mehrmalige Nutzung der Spendertiere, ohne gesundheitliche Einschränkungen, war bei Einhaltung eines Zeitintervalls von mindestens 14 Tagen zwischen den Blutentnahmen möglich.

3.2.5 Typisierung der Versuchstiere

Basierend auf der retrobulären Entnahme von einem kleinen Blutvolumen (1-2 Tropfen) konnten DEREK-Mäuse (Empfängertiere) und Spendertiere typisiert werden. Das Blut wurde mit Erythrozytenlyse-Puffer behandelt (5 min, auf Eis, gelegentliches Schütteln), mit PBS gewaschen (7000 x g, 8 min) und am Durchflusszytometer auf Fluoreszenzsignale überprüft (EGFP bzw. tdTomato). Dies ermöglichte indirekte die Bestimmung des Genotyps.

3.2.6 Organentnahme und Herstellung von Einzelzellsuspensionen

Die Mäuse wurden zur Organentnahme durch CO₂ oder zervikale Dislokation getötet. Es folgte die Entnahme der Milz sowie der vier Knochen der Hintergliedmaßen (2x

Tibia, 2x Femur). Die Milz wurde gewogen und durch ein 70 µm Zellsieb in eine Einzelzellsuspension in 10 ml PBBS überführt. Das Knochenmark wurde mit Hilfe einer Spritze aus den Röhrenknochen gespült und in 5 ml PBBS aufgenommen. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (300 x g, 10 min) und mit PBBS auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Sämtliche Arbeiten erfolgten auf Eis.

3.2.7 Adoptiver Zelltransfer

Die aus dem Blut der Spendertiere mit der MACS-Technologie separierten CD8⁺ T-Zellen wurden den Empfängertieren (FV-Infektion 4 h zuvor) i.v. in die Schwanzvene injiziert. Es wurden 1000 Zellen in 100 µl sterilem PBS gespritzt.

3.2.8 Depletion regulatorischer T-Zellen in DEREK-Mäusen

DEREG-Mäuse exprimieren den Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR) Treg-spezifisch. Dementsprechend lässt sich diese Zellpopulation durch die Gabe von DT selektiv und effizient depletieren [112]. Für die Depletion der Tregs wurde den Tieren 0,5 µg DT in 500 µl sterilem PBS i.p. verabreicht. Zur Untersuchung der Effekte der Tregs in der frühen Phase der Infektion (8 Tage nach der Infektion (dpi)) erfolgten die Injektionen an Tag null, drei und sechs. Für die Betrachtung der Rolle der Tregs in der späten akuten Infektion (14 dpi) wurde DT an Tag sieben, zehn und dreizehn injiziert. Die Effizienz der Depletion konnte durchflusszytometrisch anhand des Verschwindens der EGFP⁺ Foxp3⁺ Zellpopulation validiert werden.

3.2.9 Intravitale Zwei-Photonenmikroskopie des tibialen Knochenmark

Die Zwei-Photonenmikroskopie gibt einen Einblick in die Morphologie und Funktion von Organen lebender Tiere. Auf zellulärer als auch subzellulärer Ebene können hierbei zeitabhängige Analysen durchgeführt werden. Vorteilhaft sind eine große Eindringtiefe, eine geringe Phototoxizität sowie eine verminderte Lichtstreuung. Möglich ist dies durch Anregung mit längeren niederenergetischen Wellenlängen [70, 165, 183].

Zur Durchführung der intravitale Mikroskopie des tibialen Knochenmarks wurden die Tiere zunächst in eine Langzeitnarkose versetzt. Danach wurde die Haut entlang der

Tibia mit einer chirurgischen Schere geöffnet und die Muskulatur vom Schienbein durch ein Skalpell gelöst. Der kompakte Knochen wurde mit Hilfe eines feinmechanischen Schleifgerätes (Dremel) auf 30-50 μm Dicke reduziert um eine größere Eindringtiefe bei der Mikroskopie zu gewährleisten [108, 109]. 100 μl Qtracker-Lösung wurden zur Visualisierung des Blutflusses i.v. in den retroorbitalen Venenplexus injiziert. Zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur des narkotisierten Tieres wurde die Maus in ein auf 37 °C temperiertes Wasserbad (gefüllt mit PBS) überführt. Die präparierte Tibia wurde zuvor auf der Unterlage fixiert, sodass diese komplett von PBS bedeckt war. Anschließend konnte das Wasserbad samt Maus unter dem Wassertauchobjektiv (25 x HCX IRAPO L, NA = 0,95) des Zwei-Photonenmikroskops platziert und das Knochenmark mikroskopiert werden (Abb.3.2).

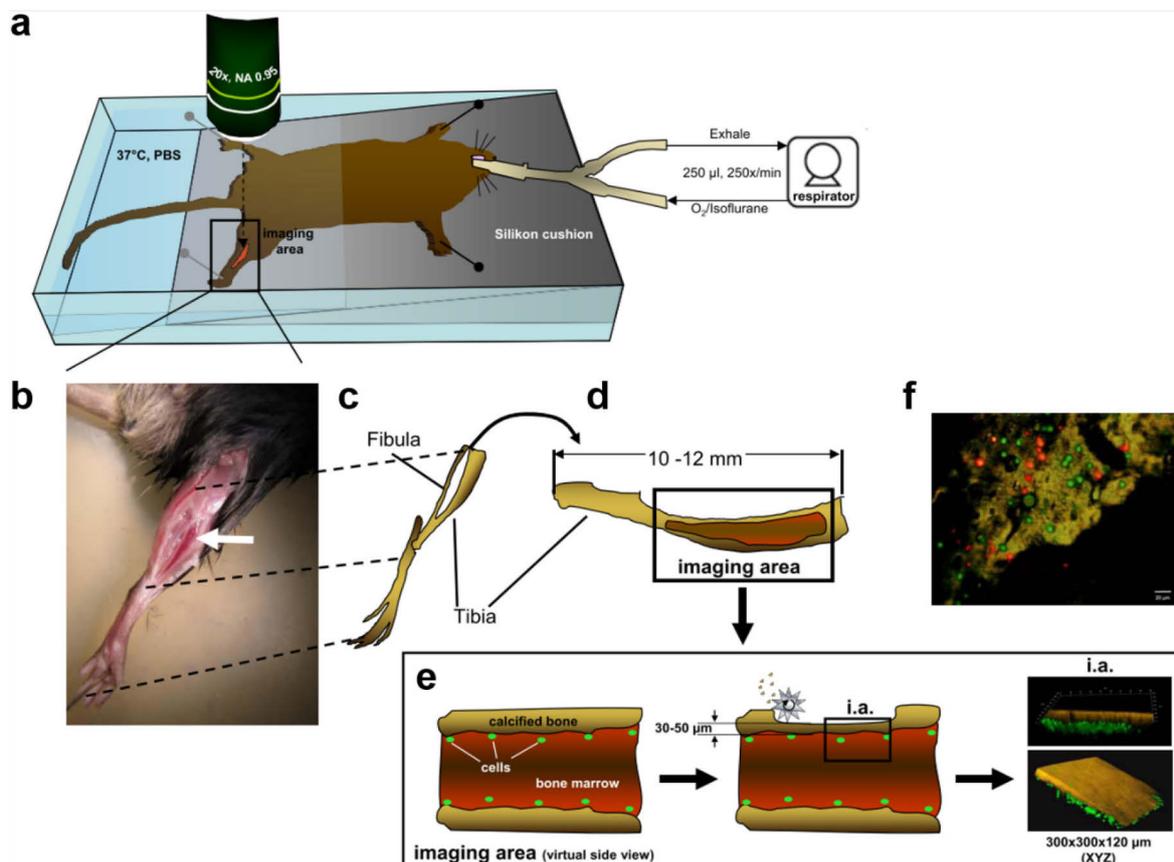


Abb.3.2: Aufbau der intravitralen Zwei-Photonenmikroskopie des tibialen Knochenmarks

Die mit Ketamin-Xylazin betäubte Maus wird intubiert und nachfolgend mit einem Isofluran-Sauerstoffgemisch zur Aufrechterhaltung der Narkose künstlich beatmet. Die Tibia wird operativ freigelegt und das fertig präparierte Tier in dem mit PBS gefüllten und auf 37 °C temperiertem Wasserbad positioniert (a). Ausgedünnt wird die *Substantia compacta* der Tibia mit Hilfe eines Schleifwerkzeugs, bis das Knochenmark rot durchscheint (weißer Pfeil, b-e). Der auf eine Dicke von 30-50 μm reduzierte kompakte Knochen ermöglicht die Zwei-Photonenmikroskopie einzelner Zellen (grün) im Knochenmark (e). Beispielhafte Darstellung von Zellen (rot und grün) unterhalb des kompakten Knochens (braun, f) (modifiziert nach [108]).

Die Augen der Tiere wurden mit Bepanthen Augen- und Nasensalbe behandelt um deren Austrocknung während der Mikroskopie zu vermeiden. Ein gepulster Titan-Saphir-Laser diente als Anregungsquelle (verstellbar von 680-1080 nm Wellenlänge) und ermöglichte eine individuelle Anregung bestimmter Fluorochrome. Emittierte Signale wurden mit Hilfe von verschiedenen Breitbandfiltern detektiert. Dazu wurden zwei externe Photoelektronenvervielfacher sowie zwei Hybrid-Detektoren genutzt. Für die zeitgleiche Anregung der Fluoreszenzproteine tdTomato und EGFP oder mWasabi wurde mit einer Wellenlänge von 950 nm gearbeitet. Das *second harmonic generation* (SHG)-Signal, eine Frequenzverdopplung, ermöglichte die Visualisierung definierter biologischer Strukturen z.B. den kompakten Knochen oder Kollagen [64]. Nach drei bis vier Stunden Mikroskopie wurden die Versuchstiere, noch unter Narkose, schmerzfrei durch zervikale Dislokation getötet.

3.2.10 Zwei-Photonenmikroskopie fixierter & CUBIC-behandelter Organe

Die Versuchstiere wurden mittels CO₂ getötet und direkt im Anschluss kardiovaskulär mit 15 ml kaltem PBS-EDTA (5 mM) perfundiert. Zur Perfusion wurde das rechte Atrium des Herzens aufgeschnitten und in den linken Ventrikel die Perfusionskanüle eingeführt. Dadurch konnte der Körperkreislauf durchgespült und ein Großteil des Blutes aus den Organen entfernt werden. Es folgte ein zweiter Perfusionsschritt mit 15 ml kaltem PBS-PFA (4 %) zur Vorfixierung des Gewebes. Milz, Tibiae und Lymphknoten wurden entnommen und für 3 h (Milz), 4 h (Tibiae) sowie 4,5 h (Lymphknoten) bei 4 °C mit PBS-PFA (4 %) fixiert. Anschließend konnten die Proben in PBS gelagert werden. Die *Substantia compacta* der Tibia wurde mit einem Dremel auf 30-50 µm ausgedünnt um einen tieferen Blick in das Knochenmark zu ermöglichen. Milz und Knochen wurden bei einer Wellenlänge von 960 nm mikroskopiert. Lymphknoten wurden nach der Fixierung zweifach mit PBS gewaschen (mindestens 2 h) und anschließend mit dem *Clearing*-Reagenz CUBIC-1 [202] inkubiert (5 Tage, 37 °C, leichtes Schwenken). Nach zwei sowie vier Tagen wurde CUBIC-1 erneuert. Die optisch transparenten Lymphknoten wurden am Zwei-Photonenmikroskop mit 950 nm Wellenlänge analysiert.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzahlbestimmung wurde die Zellsuspension mit Trypanblau in einem jeweils angepassten Verhältnis verdünnt. Anschließend konnten 10 µl in die Neubauer-Zählkammer gefüllt und die Zellzahl visuell am Mikroskop bestimmt werden. Trypanblau diente der Unterscheidung von lebenden und toten Zellen. Eine veränderte Membrandurchlässigkeit toter Zellen ermöglicht die Diffusion des Farbstoffs in das Zellinnere und resultiert in dessen Blaufärbung. Das Zählnetz einer Neubauerkammer besteht aus vier Großquadraten à 16 Kleinquadraten. Diese wurden ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel (Abb.3.3) berechnet. Neben der manuellen wurde auch die automatische Zellzählung unter Verwendung eines „Cellometers“ genutzt. Die Zellen wurden analog vorbereitet und in einem Volumen von 20 µl in die entsprechende Zählkammer eingebracht.

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\text{Zellen pro Großquadrat} \times \text{Kammerfaktor} \times 10^4}{\text{x Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumen der Zellsuspension [ml]}}$$

Abb.3.3: Formel zur Berechnung der Zellzahl einer Zellsuspension mittels Neubauerkammer

Der Kammerfaktor ergibt sich aus der Fläche (1,0 mm²), der Höhe (0,1 mm) sowie dem Volumen des Großquadrates (0,1 mm³ = 10⁻⁴ ml).

3.3.2 Magnetische Separation von Zellen

Die MACS-Technologie (*magnetic-activated cell sorting*) ermöglicht eine effiziente magnetische Separation definierter Zellpopulationen. Zellspezifische AK gekoppelt an superparamagnetische *MicroBeads* werden hierbei zur Markierung der Zellen eingesetzt. Diese durchlaufen eine ferromagnetische Säule, welche sich in einem starken Magnetfeld befindet. Nicht markierte Zellen passieren die Säule (Negativselektion), während die markierte Zellpopulation im Magnetfeld verbleibt und erst nach dessen Entfernung eluiert wird (Positivselektion). Hohe Anreicherungs- (> 100-fach) und Depletionsraten (> 1000-fach) für entsprechende Zellen sind dadurch möglich [139].

Die Isolation von CD8⁺ T-Zellen aus ~100 µl Blut der Spendertiere erfolgte durch eine Positivselektion. Das Blut wurde vorbereitend zunächst mit 5 ml Erythrozytenlyse-Puffer auf Eis unter gelegentlichem Schütteln inkubiert und anschließend mit 35 ml PBS gewaschen (300 x g, 10 min). Nachfolgend wurde die Zellsuspension mit 50 µl CD8a (Ly-2) *MicroBeads* vermengt und die weitere Zellseparation nach Herstellerangaben von Miltenyi Biotec durchgeführt. Abschließend konnte die Effizienz der Aufreinigung durchflusszytometrisch überprüft und die Zellen für adoptive Zelltransfers verwendet werden.

3.3.3 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische Messungen ermöglichen eine multiparametrische Analyse von Zellen bezüglich ihrer biologischen Eigenschaften. Alle Zellen werden mittels hydrodynamischer Fokussierung vereinzelt an einem Laserstrahl vorbeigeführt und die dabei emittierten Strahlen mit Informationen über die Zellen detektiert. Hierbei unterscheidet man zwischen Streulicht mit morphologischem und Fluoreszenzsignalen mit funktionalem Informationsgehalt. Die Zellgröße kann über das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter* - FSC) und die Granularität der Zellen über das Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter* - SSC) bestimmt werden. Fluorochrom-gekoppelte AK oder endogene Fluoreszenzproteine erlauben ein breites Analysespektrum von Proteinen und deren Expressionsmuster auf der Zelloberfläche oder im Zellinneren. Voraussetzung sind Laser mit entsprechender Anregungswellenlänge [1].

Färbung von Oberflächenproteinen

1 x 10⁶ Zellen wurden in eine 96-Loch-Rundbodenplatte überführt und mit FACS-Puffer gewaschen (300 x g, 3 min). Es folgte die AK-Färbung von Proteinen auf der Zelloberfläche (z.B. CD43) in 50 µl FACS-Puffer (15 min, RT, Dunkelheit). Farbstoffe zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen (FVD) wurden zeitgleich zu dem Ansatz gegeben. Nichtbindende AK wurden nach der Färbung durch einen Waschschrift entfernt (FACS-Puffer, 300 x g, 3 min). Abschließend konnten die Proben in FACS-Puffer resuspendiert und am Durchflusszytomer analysiert werden.

Färbung zytoplasmatischer Proteine

Für die Färbung intrazellulärer Proteine (z.B. GzmB) wurden die Zellen nach erfolgter Oberflächenfärbung fixiert und permeabilisiert. Verwendet wurde das intrazelluläre Cytofix/Cytoperm-Kit nach Herstellerangaben. Nach der Fixierung für 8 min bei RT und Dunkelheit folgte ein Waschschrift mit Perm/Wasch-Puffer (400 x g, 4 min) und die AK-Färbung in 50 µl Perm/Wasch-Puffer (30 min, RT, Dunkelheit). Abschließend wurden die Proben erneut gewaschen (Perm/Wasch-Puffer, 400 x g, 4 min) und zur Messung in FACS-Puffer überführt.

Färbung intranukleärer Proteine

Zur intranukleären AK-Färbung (z.B. Ki-67) erfolgte eine Vorfixierung der Proben mit dem Cytofix/Cytoperm-Kit für 3,5 min (RT), gefolgt von zwei Waschschriften (Perm/Wasch-Puffer, 400 x g, 4 min). Anschließend wurde ein weiterer Fixierungs- und Permeabilisierungsschritt nach Herstellerangaben des Foxp3/Transkriptionsfaktor Fixierungs/Permeabilisierungskits für mindestens 30 min (4 °C) durchgeführt. Die Vorfixierung gewährleistete den Erhalt des zytoplasmatischen tdTomato-Signals in den transferierten CD8⁺ T-Zellen [78] und war nur für die intranukleäre Färbung dieser Zellen notwendig. Nach einem weiteren Waschschrift (Perm-Puffer, 400 x g, 4 min) konnten die AK in 50 µl Perm-Puffer zu den Zellen gegeben werden (30 min, 4 °C, Dunkelheit). Zum Abschluss wurden die Zellen gewaschen (Perm-Puffer, 400 x g, 4 min) und in FACS-Puffer am Durchflusszytomer analysiert.

Tetramerfärbung

Die Tetramerfärbung ermöglicht die Detektion antigenspezifischer T-Zellen und erfolgte analog zur Oberflächenfärbung der Zellen. Tetramere bestehen aus vier MHC-Peptid-Komplexen, welche über eine Biotin-Streptavidin-Bindung kovalent miteinander verbunden sind. Diese Struktur erhöht die Avidität der MHC-Peptid-Komplexe in deren Bindung an den entsprechenden TCR. Zusätzlich beinhalten Tetramere ein Fluorochrom zur Detektion (Abb.3.4) [40].

Verwendet wurde ein PE-gekoppeltes MHC-I H-2D^b Tetramer mit dem F-MuLV GagL85-93-Peptid zur Analyse FV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen. Zur Unterscheidung des Tetramer- und tdTomato-Signals wurden tetramergefärbte Zellen nachfolgend mit einem biotinylierten anti-PE-AK und Streptavidin-APC-Konjugat behandelt. Somit

konnte gezeigt werden, dass die tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen FV-spezifisch sind. Als Kontrolle diente der gleiche Färbeansatz ohne anti-PE-AK.

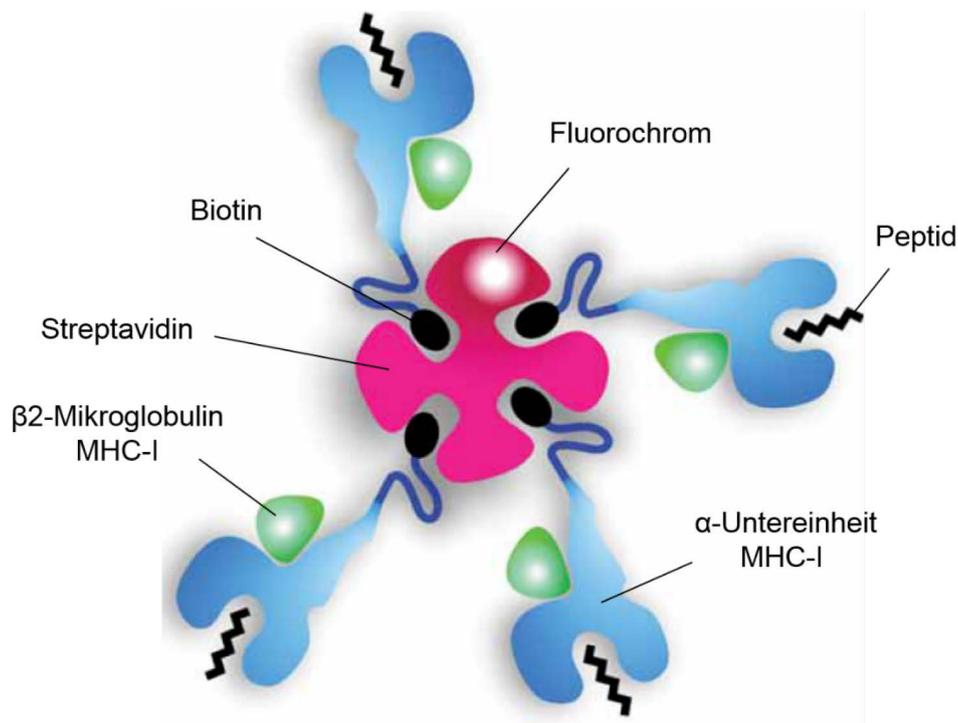


Abb.3.4: Aufbau eines MHC-I Tetramers

MHC-Tetramere binden über die MHC-Peptid-Komplexe stabil an mehrere TCRs und ermöglichen die Detektion antigenspezifischer T-Zellen (modifiziert nach [178]).

3.3.4 Kultivierung von Zellen

Standardisierte Zellkulturtechniken und -bedingungen wurden bei der Kultivierung der Zelllinien angewendet. Dies umfasste steriles Arbeiten, Nutzung zelltypspezifischer Nährmedien sowie die dauerhafte Inkubation der Zellen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit. Um optimale Bedingungen für die Zellen zu schaffen wurden diese alle zwei bis drei Tage passagiert. Dazu wurde das verbrauchte Medium entfernt, die adhären Zellen mit PBS gewaschen und mittels Trypsin-EDTA (2-3 min im Brutschrank) untereinander sowie von den Zellkulturflaschen gelöst. Zur Vermeidung trypsinbedingter Zellschäden wurde die Reaktion durch Zugabe des dreifachen Volumens an Komplettmedium abgestoppt (300 x g, 10 min) und die Zellen in frisches Medium aufgenommen. Abschließend konnte die Zellzahl bestimmt werden und eine entsprechende Anzahl an Zellen in neue Zellkulturflaschen überführt werden.

3.3.5 Nachweis FV-infizierter Zellen - *infectious center assay*

Der *infectious center assay* (IC-Assay) dient der Quantifizierung FV-infizierter Zellen in verschiedenen Organen. Durch Koinkubation von den Zellen der zu untersuchenden Organe mit *Mus dunni* Indikatorzellen werden diese ebenfalls infiziert, proliferieren und bilden Foki. Diese Foki werden zunächst mit FV-spezifischen AK (AK720) markiert, deren Zielstruktur das Env-Protein des F-MuLV ist. Anschließend wird ein peroxidasegekoppelter Zweit-AK eingesetzt, welcher an die Fc-Region des AK720 kovalent anhaftet. Nach Substratzugabe (AEC-Gebrauchslösung) induziert die Peroxidase eine Rotfärbung infizierter Foki und deren Auszählung ist möglich.

Vorbereitend für den IC-Assay wurden pro Vertiefung einer 6-Loch-Flachbodenplatte 2×10^4 *Mus dunni* Zellen in 2 ml RPMI⁺⁺ Medium ausgesät und ü.N. inkubiert. Am Folgetag wurde von den zu analysierenden Geweben eine Einzelzellsuspension mit 1×10^8 Zellen/ml erstellt. Aus dieser konnte eine logarithmische Verdünnungsreihe von 10^7 bis 10^2 Zellen/ml RPMI⁺⁺ Medium hergestellt und jeweils 1 ml jeder Verdünnung zu den Indikatorzellen gegeben werden. Als Kontrolle wurden Zellen naiver Tiere, ohne FV-Infektion, verwendet. Der Ansatz wurde für drei Tage inkubiert, sodass der Zellrasen eine Konfluenz von 100 % ausbilden konnte. Das Medium wurde dekantiert und die Zellen in 96 % Ethanol für 15 min fixiert. Es folgten zwei Waschschrte mit PBS-BSA und die Zugabe von 700 µl AK720 pro Vertiefung, welcher für 2 h bei RT inkubiert wurde. Nach zwei weiteren Waschschrten mit PBS-BSA wurde der HRP-gekoppelte Sekundär-AK in 700 µl/Vertiefung (Verdünnung 1:400 mit PBS-BSA) für mindestens 1 h (RT) zu den fixierten Zellen gegeben. Abschließend folgten zwei Waschschrte (PBS-BSA) und die Zugabe von 1 ml AEC-Gebrauchslösung (15-30 min, RT, Dunkelheit). Die Platten wurden mit Wasser gereinigt, getrocknet und die Foki ausgezählt. Aus dem Mittelwert der Fokianzahl pro Verdünnung und der Gesamtzellzahl pro Organ konnte die Anzahl FV-infizierter Zellen pro analysiertem Organ bestimmt werden.

3.3.6 Herstellung eines F-MuLV-Stocks *in vitro*

Der Virusüberstand, welcher nach erfolgreicher Transfektion von HEK 293 T-Zellen entstand wurde zunächst von Zellrückständen befreit (450 x g, 10 min), auf eine Saccharoselösung (30 %) geschichtet, ultrazentrifugiert (35.000 x g, 3 h) und in 50-500 µl sterilem PBS aufgenommen. Das somit gewonnen Viruskonzentrat diente

als Ausgangspunkte für die Herstellung eines F-MuLV-Stocks *in vitro*. Vorbereitend wurden pro Vertiefung einer 6-Loch-Gewebekulturplatte 2×10^4 *Mus dunni* Zellen in 2 ml RPMI⁺⁺ Medium ausgesät und ü.N. inkubiert. Die Zellen wurden mit 100 µl Polybren pro Vertiefung für 1 h inkubiert und anschließend mit dem Viruskonzentrat versetzt. Der Ansatz wurde spinokuliert (450 x g, 99 min, RT) und für drei Tage inkubiert. Die Bestimmung der Infektiösität des F-MuLV-Stocks erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie und IC-Assay.

Bei erfolgreicher Infektion wurden die *Mus dunni* Zellen aus der 6-Loch-Gewebekulturplatte in eine 25 cm² Zellkulturflasche überführt und mit 5 ml RPMI⁺⁺ Medium beschichtet. Nach drei Tagen Inkubation folgte die Splittung der Zellen auf drei 75 cm² Flaschen (je 15 ml) und letztlich nach weiteren drei Tagen auf neun 175 cm² Flaschen (je 20 ml). Bei guter Beschaffenheit der *Mus dunni* Zellen in den 175 cm² Flaschen konnten diese zweifach zur Gewinnung von Virusüberstand genutzt werden. Die Überstände wurde gesammelt (bei 4 °C gelagert) durch Zentrifugation von verbleibenden Zellen befreit (450 x g, 10 min) und mit Hilfe einer UZ (35.000 x g, 3 h) aufkonzentriert. Die Viren wurden in 50-500 µl sterilem PBS aufgenommen, zu je 20 µl aliquotiert und bei - 80 °C gelagert.

Zur Bestimmung der Viruskonzentration wurde der F-MuLV-Stock abschließend titriert. Dazu wurden $7,5 \times 10^3$ *Mus dunni* Zellen in eine 24-Loch-Gewebekulturplatte in 500 ml RPMI⁺⁺ Medium ausgesät und ü.N. inkubiert. Am Folgetag wurden 25 µl Polybren zu jeder Vertiefung hinzugegeben und der Ansatz für 1 h im Brutschrank inkubiert. Der Virusstock wurde in PBS 1:1000, 1:2500, 1:5000 und 1:7500 verdünnt und in einem Volumen von 10 µl zu den Zellen gegeben. Pro Verdünnung wurden jeweils sechs Ansätze vorbereitet und für drei Tage inkubiert. Analog zum IC-Assay wurden die infizierten Foki angefärbt, ausgezählt und die Viruskonzentration, in *focus forming units* pro µl, anhand des Mittelwertes aus den Verdünnungen berechnet.

3.4 Datenbearbeitung und Auswertung

3.4.1 Bildbearbeitung und Analyse der Zellbewegung

Die Datenanalyse der Zwei-Photonenmikroskopie erfolgte mit der Imaris-Software. Zur Verminderung des Hintergrunds wurde ein Median- oder Gauß-Filter angewendet. Dreidimensionale Oberflächendarstellungen wurden zu einer besseren Visualisierung

eingesetzt. Sofern nötig wurde eine Driftkorrektur bei den intravitalem Filmen vorgenommen. Das Tracking der CD8⁺ T-Zellen erfolgte automatisch und wurde manuell nachkorrigiert. Als Parameter wurden ein Zelldurchmesser von 6 µm (FV-spezifische CD8⁺ T-Zellen) bzw. 5 µm (Tregs), eine maximale Distanz (maximal zurückgelegte Strecke einer Zelle von Bild zu Bild) von 20 µm und eine maximale Lückengröße (Anzahl von Einzelbildern, in denen das Signal fehlen darf) von 3 verwendet. Nur Zellen die mindestens 5 min verfolgt werden konnten wurden in die Trackinganalyse einbezogen. Grundsätzlich wurde ein Bereich mit den Abmaßen von 590 x 590 x 100 µm im tibialen Knochenmark mit einer Messzeit pro Z-Stapel von 1 min und einem Abstand von 2,5 µm zwischen den einzelnen Z-Ebenen für 30 min gefilmt. Zur Berechnung der Anzahl an Zellen pro mm³ Knochenmark wurde die Zellzahl am Anfang, in der Mitte und am Ende der intravitalem Filme erfasst und der Mittelwert gebildet. Anschließend wurde basierend auf dem mikroskopiertem Volumen die Zellzahl pro mm³ ermittelt. Aus den erhaltenen Werten für Tregs und FV-spezifische CD8⁺ T-Zellen konnte das Zahlenverhältnis beider Zellpopulationen bestimmt werden.

3.4.2 Durchflusszytometrische Analysen

Die Daten der Durchflusszytometrie wurden mit Hilfe der FlowJo-Software analysiert. Generell wurden 300.000 bis 500.000 Lymphozyten (allgemeine Proben) oder 1000 bis 10.000 tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen (bei Betrachtung dieser Zellpopulation) pro Probe gemessen und ausgewertet. Beim Gating der Zellen wurden alle Lymphozyten erfasst, Dubletten und tote Zellen ausgeschlossen und die Zellpopulation von Interesse betrachtet. Abb.3.5 zeigt beispielhaft die Auswertungsstrategie, welche für die Generierung der Daten im Ergebnisteil 4.1 eingesetzt wurde.

3.4.3 Statistik und weitere Software

Statistische Analysen wurden mit GraphPad Prism durchgeführt. Die Daten wurden auf Normalverteilung überprüft und folgend auf signifikante Unterschiede untersucht. Unterschiede zwischen zwei verschiedenen Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test (nichtparametrische Daten) und dem *unpaired* t-Test (parametrische Daten) bestimmt. Mehr als zwei Gruppen wurden mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (*one-way analysis of variance* - ANOVA) und Dunnett's Mehrfachvergleichs-Test

(parametrische Daten) oder dem Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Mehrfachvergleichs-Test (nichtparametrische Daten) analysiert. Alle p -Werte $< 0,05$ wurden als signifikant definiert (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Radardiagramme wurden mit OriginPro erstellt. Adobe Illustrator und Premiere Pro wurden für das Design von Abbildungen und Filmen verwendet.

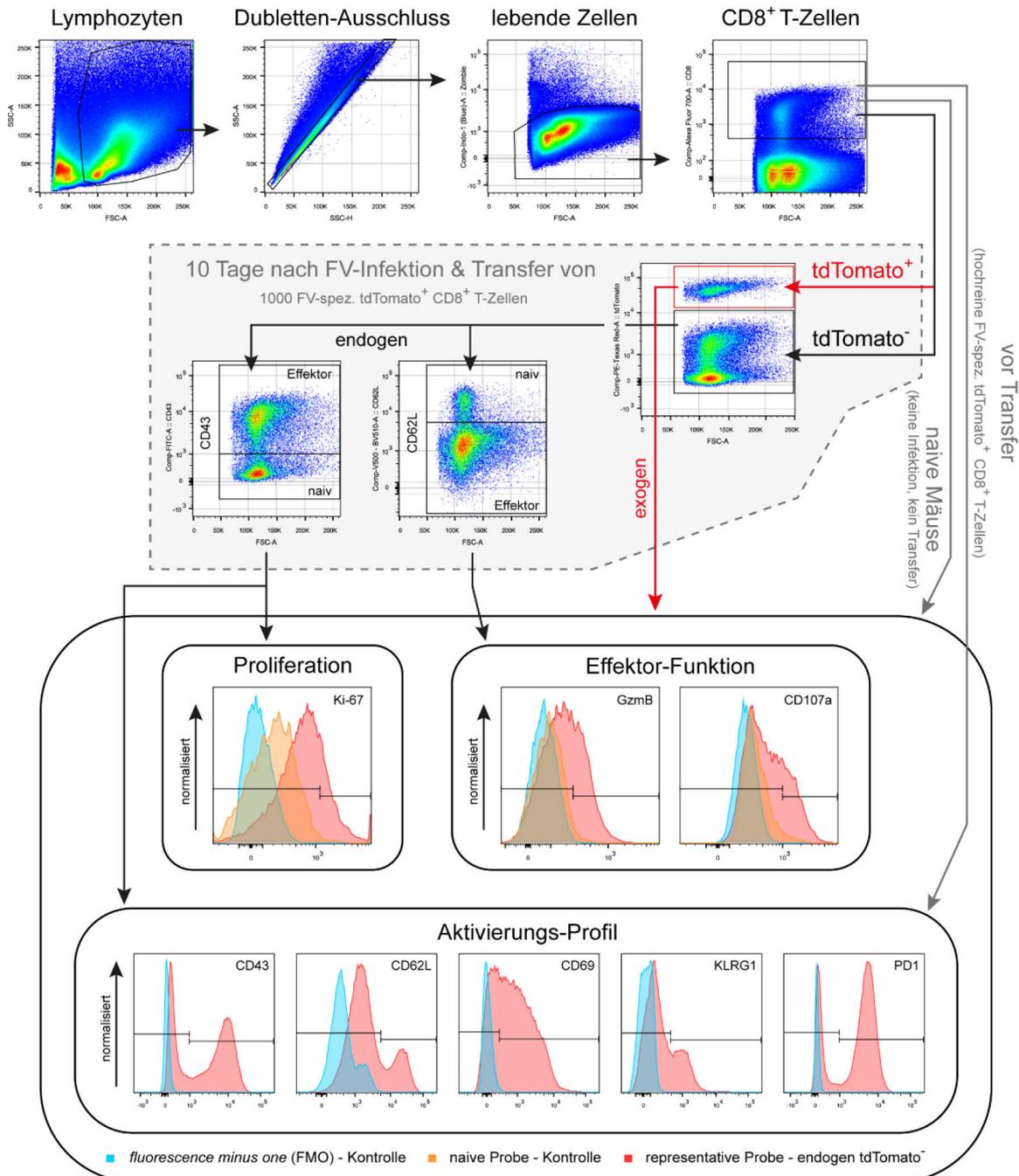


Abb.3.5: Auswertungsstrategie für durchflusszytometrische Daten

Beispielhaftes Gating zur Auswertung durchflusszytometrischer Daten. Dargestellt ist die Gatingstrategie zur Analyse der Proliferation, Funktionalität und Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen im Knochenmark. Gezeigt ist die Gatingstrategie, welche für die Erstellung des Ergebnisteils 4.1 eingesetzt wurde (Otto L. *et al.* 2018).

4 Ergebnisse

Virusspezifische CD8⁺ T-Zellen und Tregs wurden im Knochenmark, während einer akuten FV-Infektion, mit Hilfe der intravitale Zwei-Photonenmikroskopie unter physiologischen Bedingungen visualisiert und analysiert. Ergänzend wurden FV-infizierte Zellen *in vivo* dargestellt und deren Verteilung untersucht.

4.1 Ein reproduzierbarer Zelltransferansatz für virusspezifische CD8⁺ T-Zellen und deren Visualisierung unter physiologischen Bedingungen

Antigenspezifische naive CD8⁺ T-Zellen werden durch Antigenkontakt aktiviert und zur Proliferation angeregt. Dadurch entwickelt sich aus einer kleinen Vorläuferzellpopulation im Zuge der adaptiven Immunantwort eine große Anzahl spezifischer CD8⁺ T-Effektorzellen [13, 26, 196]. Dementsprechend wurde ein Zelltransferansatz für FV-spezifische fluoreszierende CD8⁺ T-Zellen gewählt, welcher auf der Übertragung einer geringen Zellzahl beruht, die adaptive Immunantwort des Empfängertieres nicht modifiziert und die intravitale Mikroskopie der Zellen ermöglicht.

In Abb.4.1 ist der allgemeine Ablauf des hier entwickelten Zelltransferverfahrens dargestellt. Als Grundlage dienten Spendertiere, welche das rot fluoreszierende Protein tdTomato in allen T-Zellen und einen FV-spezifischen TCR [161] auf den CD8⁺ T-Zellen exprimierten. Wenige Tropfen Blut (~100 µl) der Spendertiere genügten für die Aufreinigung von ~150.000 FV-spezifischen tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen. Nur 1000 dieser Zellen wurden anschließend durch einen adoptiven Zelltransfer in Empfängertiere übertragen, welche kurz zuvor mit FV infiziert wurden. Die Analyse von Milz und Knochenmark erfolgte nach 10 Tagen, ein Zeitpunkt an dem die höchste Anzahl FV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen sowie die stärkste ZTL-Antwort in diesen Organen zu erwarten waren [229]. Endogene und transferierte CD8⁺ T-Effektorzellen wurden vergleichend betrachtet und die FV-spezifische ZTL-Antwort analysiert. Das geringe Blutvolumen, welches für die Separation FV-spezifischer tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen genügte, ermöglichte eine mehrfache Nutzung der Spendertiere. Blutentnahmen erfolgten im Abstand von mindestens zwei Wochen bei alternierender retrobulbärer Punktion beider Augen. Gesundheitliche Einschränkungen der Tiere

wurden dadurch vermieden. Die Spendermäuse konnten bis zu 5x eingesetzt werden, wodurch eine substantielle Reduktion der benötigten Tiere nach dem 3R-Prinzip [181] erzielt wurde. In den nachfolgenden Ergebnissen zur Charakterisierung dieses Modells wurde daher das gleiche Spendertier für drei unabhängige Transferexperimente eingesetzt, um die Reproduzierbarkeit dieses Ansatzes zu beweisen.

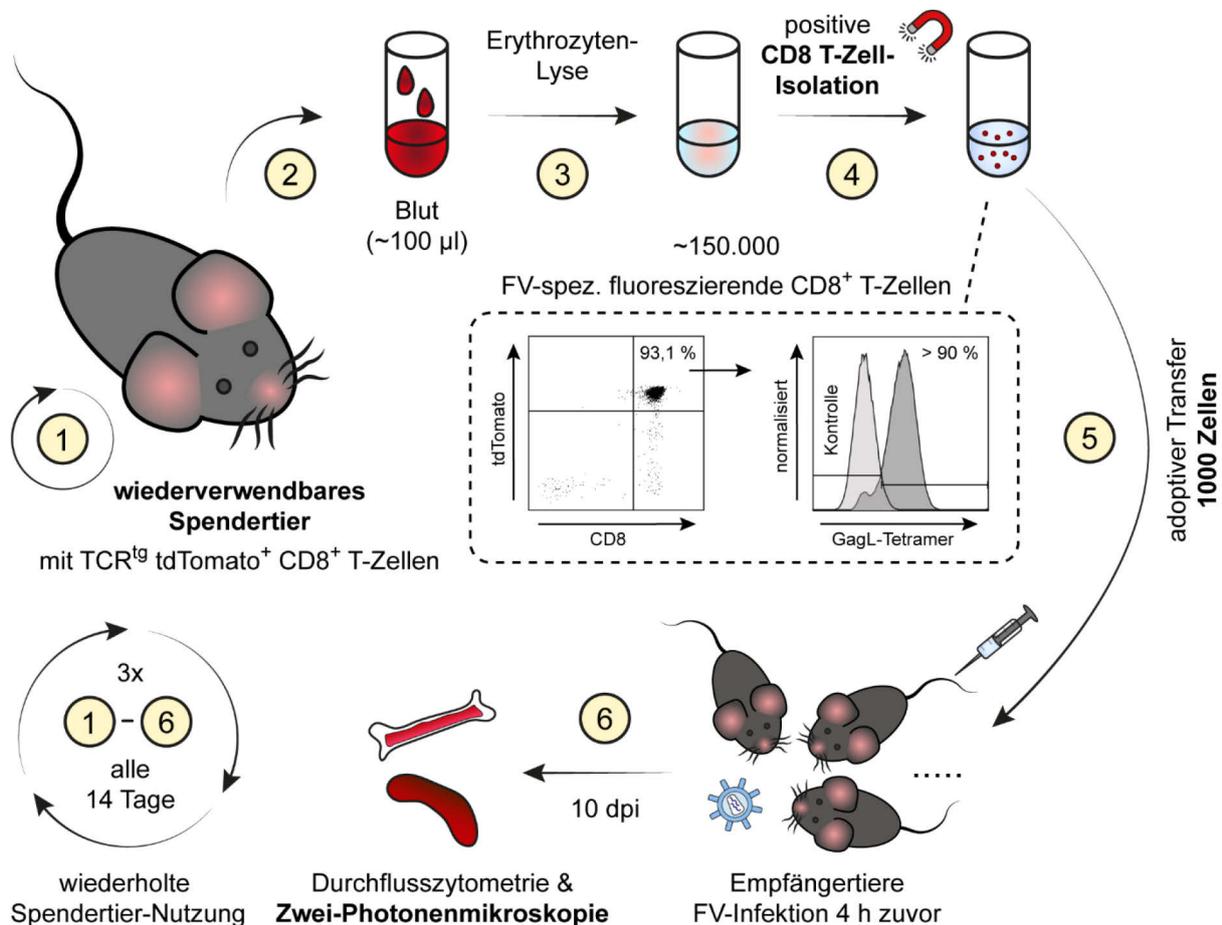


Abb.4.1: Isolation und adoptiver Transfer FV-spezifischer tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen

Einsatz wiederverwendbarer Spendertiere mit tdTomato-exprimierenden T-Zellen und FV-spezifischen CD8 TCR, gerichtet gegen das immundominante FV-Epitop GagL85-93 (1). Dem Spendertier wurden unter Kurzzeinnarkose retrobulbär ~100 µl (~5 Tropfen) Blut entnommen (2). Es folgten eine Erythrozytenlyse (3) und eine positive magnetische Separation der CD8⁺ T-Zellen (4). Die Zellisolation resultierte durchschnittlich in 150.000 Zellen mit einer Reinheit von 93,1 % (Mittelwert aus sechs unabhängigen Isolationen). Mehr als 90 % dieser CD8⁺ T-Zellen exprimierten den FV-spezifischen TCR (GagL-Tetramerfärbung). Dargestellt sind repräsentative durchflusszytometrische Analysen. Durch einen adoptiven Zelltransfer wurden jeweils 1000 CD8⁺ T-Zellen in fünf bis sechs FV-infizierte Empfängertiere (C57BL/6-Hintergrund, FV-Infektion mit 20.000 SFFU 4 h zuvor) übertragen (5). 10 Tage nach der FV-Infektion wurden das Knochenmark und die Milz auf FV-spezifische tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen via Durchflusszytometrie und Zwei-Photonenmikroskopie untersucht (6). Die Schritte (1) bis (6) wurden 3x mit dem gleichen Spendertier alle 14 Tage wiederholt (Otto L. *et al.* 2018).

4.1.1 Transferierte und endogene ZTLs zeigen ein vergleichbares Proliferationsverhalten

Grundlegend für die Ausbildung einer effektiven ZTL-Antwort der transferierten virusspezifischen CD8⁺ T-Zellen, während der viralen Infektion, ist deren Proliferation. Dies wurde mit Hilfe des Proliferationsmarkers Ki-67 [200] überprüft. Die exogenen (tdTomato⁺) und endogenen (tdTomato⁻ CD43⁺) CD8⁺ T-Effektorzellen [227, 230] zeigten ein prinzipiell vergleichbares Proliferationsprofil, welches erwartungsgemäß gegenüber den naiven CD8⁺ T-Zellen signifikant erhöht war. Zwischen den beiden ZTL-Populationen konnte im Knochenmark nur ein geringfügiger aber dennoch signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb.4.2a), während in der Milz keine signifikante Abweichung messbar war (Abb.4.2b). Bei Betrachtung der Gesamtzellzahl exogener CD8⁺ T-Zellen wurden in drei unabhängigen Transferexperimenten, basierend auf demselben Spendertier, nahezu identische ZTL-Level induziert. Dieser Wert lag stabil bei ~400.000 bzw. ~1,5 Millionen exogenen ZTLs im Knochenmark (Abb.4.2c) bzw. der Milz (Abb.4.2d). Das entsprach einem Anteil von 15-18 % aller CD8⁺ CD43⁺ T-Effektorzellen sowie 10,9 % (Knochenmark) und 3,2 % (Milz) sämtlicher CD8⁺ T-Zellen pro betrachtetem Organ. Demzufolge beteiligten sich die eingebrachten tdTomato⁺ ZTLs an der adaptiven Immunantwort, jedoch ohne diese zu dominieren. Weiterhin auffällig war eine um ~250 % gesteigerte Anzahl CD8⁺ T-Zellen im Knochenmark gegenüber naiven Kontrolltieren, ein Effekt der in der Milz nur leicht ausgeprägt war (~130 %) (Abb.4.2c,d).

4.1.2 Transferierte und endogene ZTLs werden gleichermaßen aktiviert

Zur Beurteilung des Aktivierungszustandes der CD8⁺ T-Zellen wurde die Expression der Zelloberflächenmoleküle CD43, PD1, CD62L, KLRG1 und CD69 [227, 230] nach Antikörperfärbung durchflusszytometrisch untersucht. Die exogenen ZTLs (tdTomato⁺) zeigten in drei unabhängigen Transferexperimenten mit demselben Spender ein einheitliches Aktivierungsmuster im Knochenmark (Abb.4.3a-c) und der Milz (Abb.4.4a-c). Dies war ebenfalls nahezu deckungsgleich mit dem Aktivierungsprofil der endogenen CD8⁺ T-Effektorzellen (tdTomato⁻ CD43⁺) (Abb.4.3d und Abb.4.4d). Fast 100 % aller Effektorzellen im Knochenmark und der Milz exprimierten PD1 und CD43, während das für die Adhäsion an Endothelien bedeutende CD62L auf durchschnittlich 80 % der Zellen nicht mehr vorhanden war. CD69 wurde hingegen von den ZTLs im

Knochenmark (60-75 %) und der Milz (30-50 %) unterschiedlich exprimiert und variierte leicht zwischen den einzelnen Transferexperimenten. KLRG1 wurde als Reifungsmarker in die Analyse einbezogen, war aber allgemein auf weniger als 20 % der untersuchten Zellen zu finden (Abb.4.3 und Abb.4.4).

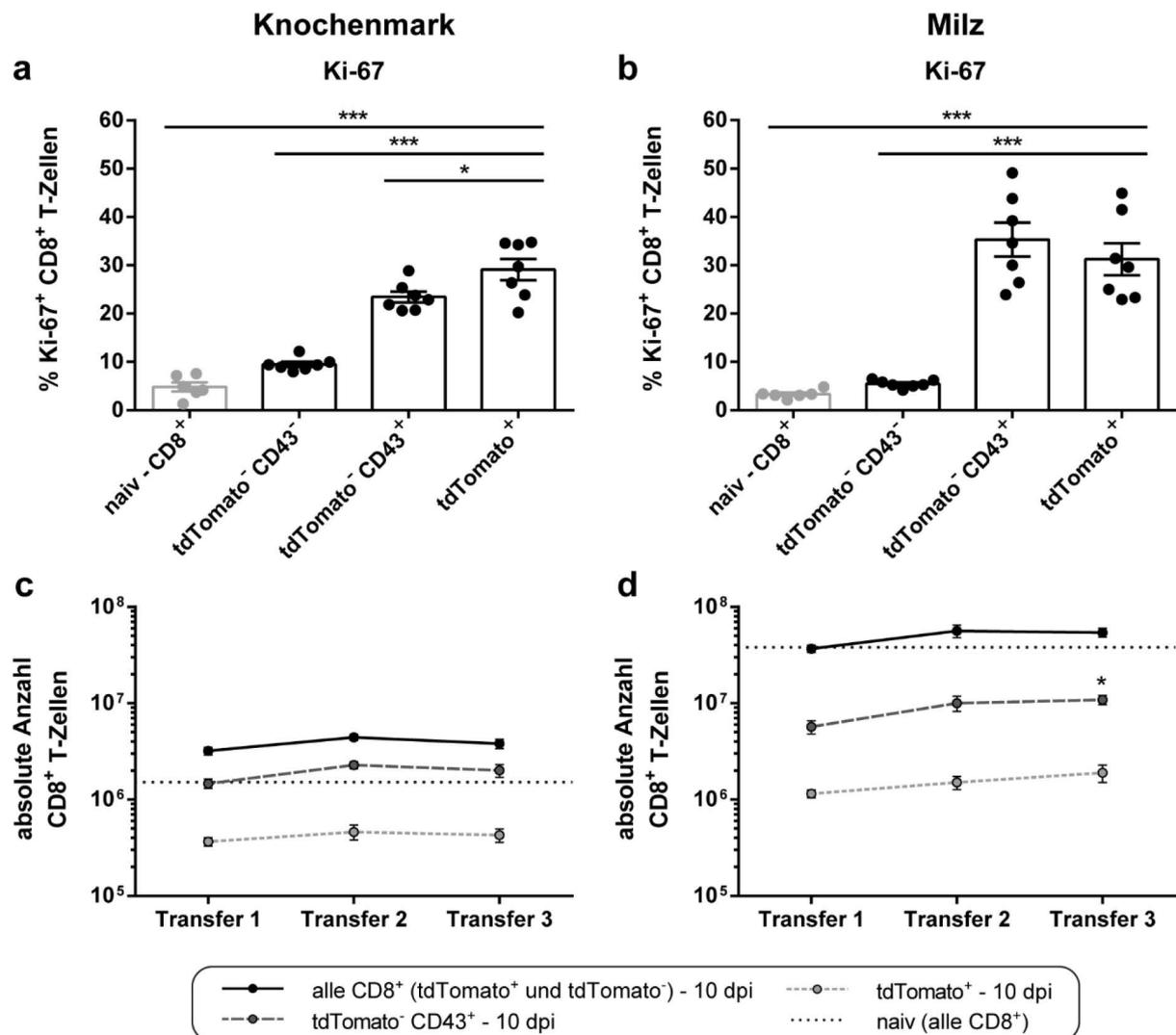


Abb.4.2: Proliferation CD8⁺ T-Zellen

Zur Charakterisierung von CD8⁺ T-Zellen im Knochenmark und der Milz von Empfängertieren 10 Tage nach FV-Infektion (20.000 SFFU) und adoptivem Zelltransfer von 1000 FV-spezifischen tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen wurde eine durchflusszytometrische Analyse angewendet. Die Zellpopulation wurde in exogene (tdTomato⁺) und endogene (tdTomato⁻) CD8⁺ T-Zellen unterteilt. Endogene CD8⁺ T-Zellen wurden weiter untergliedert in CD43⁺ Effektorzellen und CD43⁻ naive Zellen. Diese Subpopulationen wurden im Knochenmark (a) und der Milz (b) auf Proliferation (Ki-67-Expression) untersucht und mit CD8⁺ T-Zellen von naiven Mäusen (grau, keine Infektion und kein Transfer) verglichen. Jeder Punkt repräsentiert ein analysiertes Tier. Die absolute Zellzahl der betrachteten CD8⁺ T-Zellpopulationen im Knochenmark (c) und der Milz (d) wurden für drei unabhängige Zelltransferexperimente, bei Nutzung desselben Spendertieres, bestimmt. Gezeigt ist der Mittelwert ± SEM (Standardfehler des Mittelwerts) von zwei unabhängigen Experimenten (a, b) und sechs Mäusen pro Transfer (c, d). Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber tdTomato⁺ (a, b) oder Transfer 1 (c, d) sind angegeben mit * $p < 0,05$ und *** $p < 0,001$ (one-way ANOVA/Dunnett's Test (a-c), Kruskal-Wallis-Test/Dunn's Test (d)) (Otto L. et al. 2018).

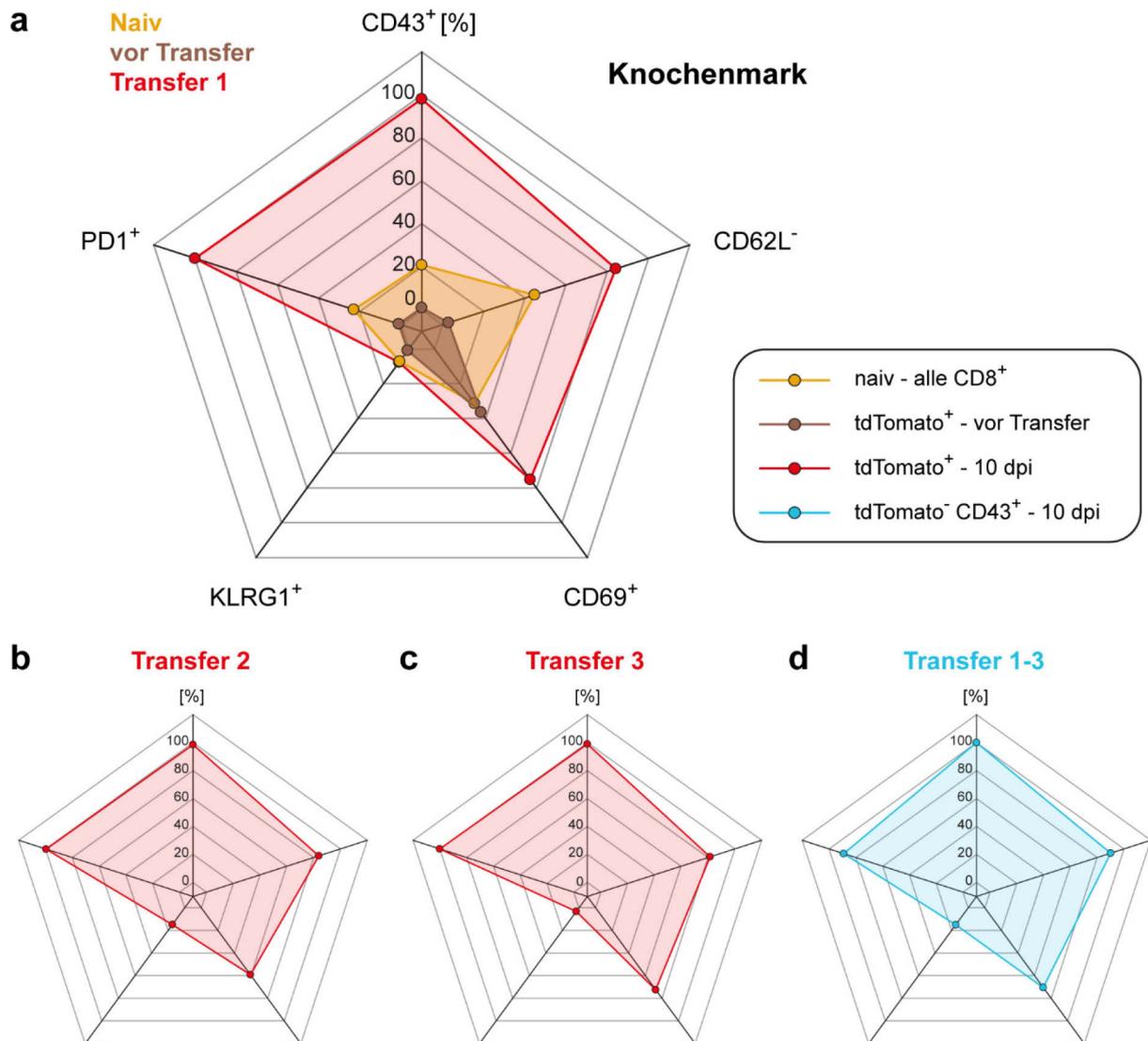


Abb.4.3: Reproduzierbares Aktivierungsprofil CD8⁺ T-Zellen im Knochenmark

Zur Charakterisierung von CD8⁺ T-Zellen im Knochenmark von Empfängertieren 10 Tage nach FV-Infektion (20.000 SFFU) und adoptivem Zelltransfer von 1000 FV-spezifischen tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen wurde eine durchflusszytometrische Analyse angewendet. Es wurden drei unabhängige Zelltransferexperimente mit dem gleichen Spendertier durchgeführt (Transfer 1-3). Die Zellpopulation wurde in exogene (tdTomato⁺) und endogene (tdTomato⁻ CD43⁺) CD8⁺ T-Effektorzellen unterteilt. Der Aktivierungsstatus wurde mit den Zelloberflächenmarkern CD43, PD1, CD69, KLRG1 und CD62L für tdTomato⁺ (a-c, rot) und tdTomato⁻ CD43⁺ CD8⁺ T-Zellen (d, türkis) in allen drei Zelltransfers bestimmt. Die Phänotypen FV-spezifischer tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen nach Aufreinigung aus dem Blut der Spendertiere (a, braun) sowie von CD8⁺ T-Zellen naiver Tiere (a, gelb, keine Infektion und kein Transfer) wurden als Kontrolle ermittelt. Die Daten repräsentieren mindestens sechs Tiere pro Transfer und Kontrolle (naiv, vor Transfer). Alle Achsen der Radardiagramme entsprechen der Skala der senkrechten Achse und zeigen den prozentualen Mittelwert der jeweiligen CD8⁺ T-Zellpopulation der die Aktivierungsmarker exprimiert. Radardiagramm a zeigt die Anordnung der Daten in allen Diagrammen (Otto L. *et al.* 2018).

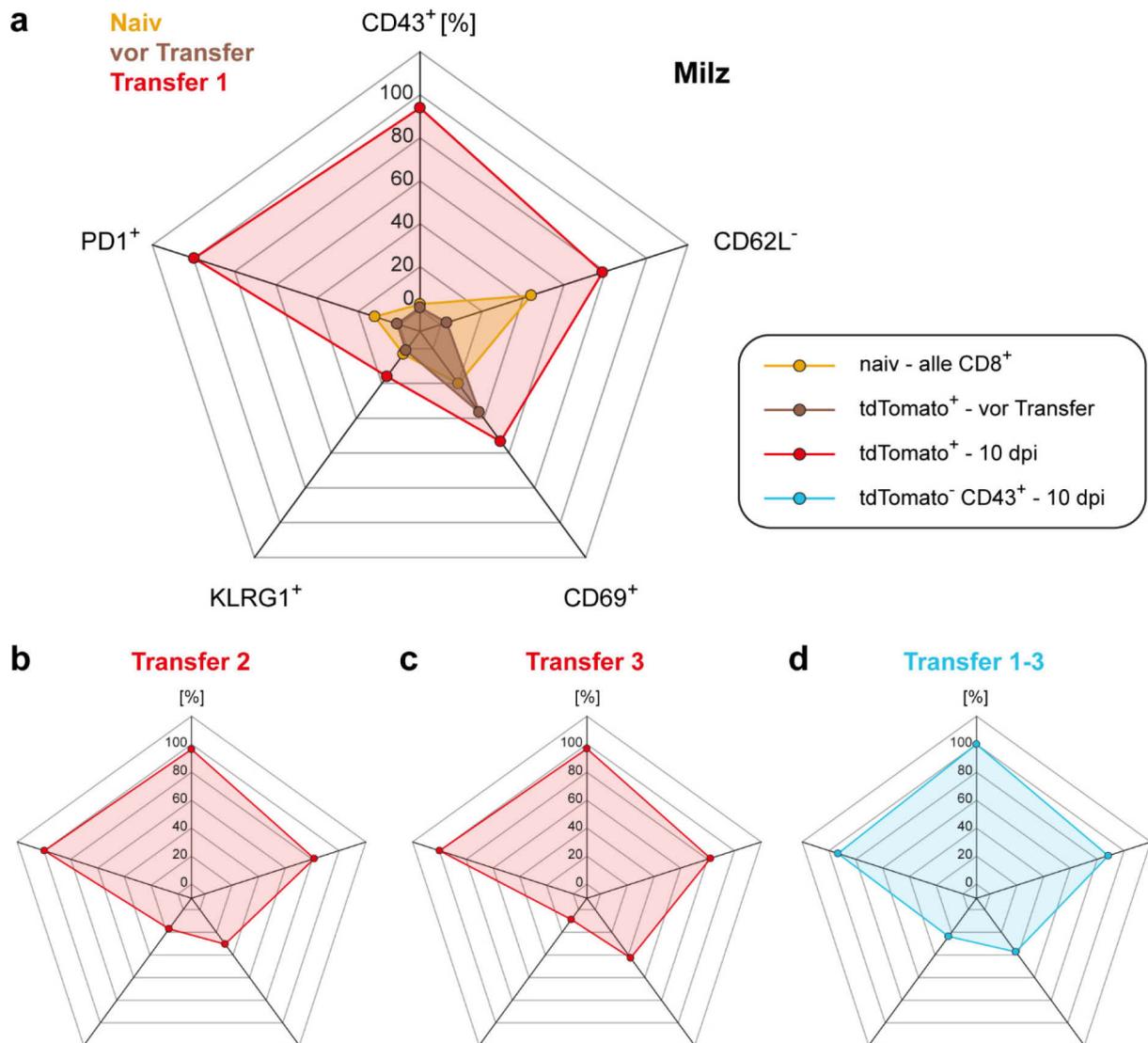


Abb.4.4: Reproduzierbares Aktivierungsprofil CD8⁺ T-Zellen in der Milz

Zur Charakterisierung von CD8⁺ T-Zellen in der Milz von Empfängertieren 10 Tage nach FV-Infektion (20.000 SFFU) und adoptivem Zelltransfer von 1000 FV-spezifischen tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen wurde eine durchflusszytometrische Analyse angewendet. Es wurden drei unabhängige Zelltransferexperimente mit dem gleichen Spendertier durchgeführt (Transfer 1-3). Die Zellpopulation wurde in exogene (tdTomato⁺) und endogene (tdTomato⁻ CD43⁺) CD8⁺ T-Effektorzellen unterteilt. Der Aktivierungsstatus wurde mit den Zelloberflächenmarkern CD43, PD1, CD69, KLRG1 und CD62L für tdTomato⁺ (a-c, rot) und tdTomato⁻ CD43⁺ CD8⁺ T-Zellen (d, türkis) in allen drei Zelltransfers bestimmt. Die Phänotypen FV-spezifischer tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen nach Aufreinigung aus dem Blut der Spendertiere (a, braun) sowie von CD8⁺ T-Zellen naiver Tiere (a, gelb, keine Infektion und kein Transfer) wurden als Kontrolle ermittelt. Die Daten repräsentieren mindestens sechs Tiere pro Transfer und Kontrolle (naiv, vor Transfer). Alle Achsen der Radardiagramme entsprechen der Skala der senkrechten Achse und zeigen den prozentualen Mittelwert der jeweiligen CD8⁺ T-Zellpopulation der die Aktivierungsmarker exprimiert. Radardiagramm a zeigt die Anordnung der Daten in allen Diagrammen (Otto L. *et al.* 2018).

Als Kontrolle fungierten naive tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen, welche unmittelbar nach deren Isolation aus dem Blut der Spendertiere bzw. direkt vor dem Transfer in die Empfängertiere untersucht wurden. Diese wiesen eine erhöhte Expression von CD69 (~40 %) und CD62L (~97 %) auf, wohingegen alle anderen betrachteten Zelloberflächenmarker kaum detektiert werden konnten. Weiterhin wurden auch die CD8⁺ T-Zellen naiver Tiere, ohne FV-Infektion und Zelltransfer, analysiert. Generell zeigten diese eine leichte Aktivierung, welche jedoch verglichen mit den Effektorzellen nur gering ausfiel (Abb.4.3a und Abb.4.4a).

4.1.3 Transferierte CD8⁺ T-Zellen entwickeln zytotoxische Effektorfunktionen

Entscheidend für die Funktionalität von ZTLs ist deren Fähigkeit zytotoxische Effektormoleküle wie Granzyme zu produzieren und diese zielgerichtet freizusetzen [226]. Die transferierten und endogenen CD8⁺ T-Zellen wurden daher auf die intrazelluläre Expression des zytotoxischen Moleküls Granzym B (GzmB) und das Vorhandensein des Degranulationsmarkers CD107a auf der Zelloberfläche überprüft [6, 214]. Die exogenen (tdTomato⁺) und endogenen (tdTomato⁻ CD62L⁻) Effektorzellen [227] des Knochenmarks zeigten eine einheitlich hohe Expression von GzmB (30 %) (Abb.4.5a), wobei die transferierten Zellen signifikant besser degranulierten (Abb.4.5c). Demgegenüber konnten in der Milz allgemein deutlich niedrigere Level der betrachteten Marker gemessen werden. Die tdTomato⁺ Effektoren produzierten gegenüber den endogenen ZTLs der Milz signifikant mehr GzmB (Abb.4.5b) und präsentierten mehr CD107a auf der Zelloberfläche (Abb.4.5d). Verglichen mit den gut ausgeprägten zytotoxischen Effektorfunktionen der endo- als auch exogenen ZTL-Populationen wurde in naiven CD8⁺ T-Zellen (tdTomato⁻ CD62L⁺) sowie den CD8⁺ T-Zellen naiver Tiere, ohne Infektion und Zelltransfer, ein sehr geringes zytotoxisches Potential festgestellt (Abb.4.5).

4.1.4 Der Transfer von nur 1000 FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen resultiert in einem unveränderten Infektionsverlauf

Ein grundlegendes Ziel des gewählten Ansatzes war die intravitale Mikroskopie virusspezifischer CD8⁺ T-Zellen während eines normalen Infektionsverlaufs, welcher nicht durch den Zelltransfer modifiziert wurde. Eine *in vivo* Beobachtung der ZTLs

unter physiologischen Bedingungen sollte dadurch gewährleistet werden. Kontrolliert wurde dies mit Hilfe eines IC-Assays. Die Anzahl FV-infizierter Zellen, bei verschiedenen Zelltransferbedingungen, konnte dadurch in der Milz und dem Knochenmark überprüft werden und gab Aufschluss über den antiviralen Effekt der transferierten Zellen.

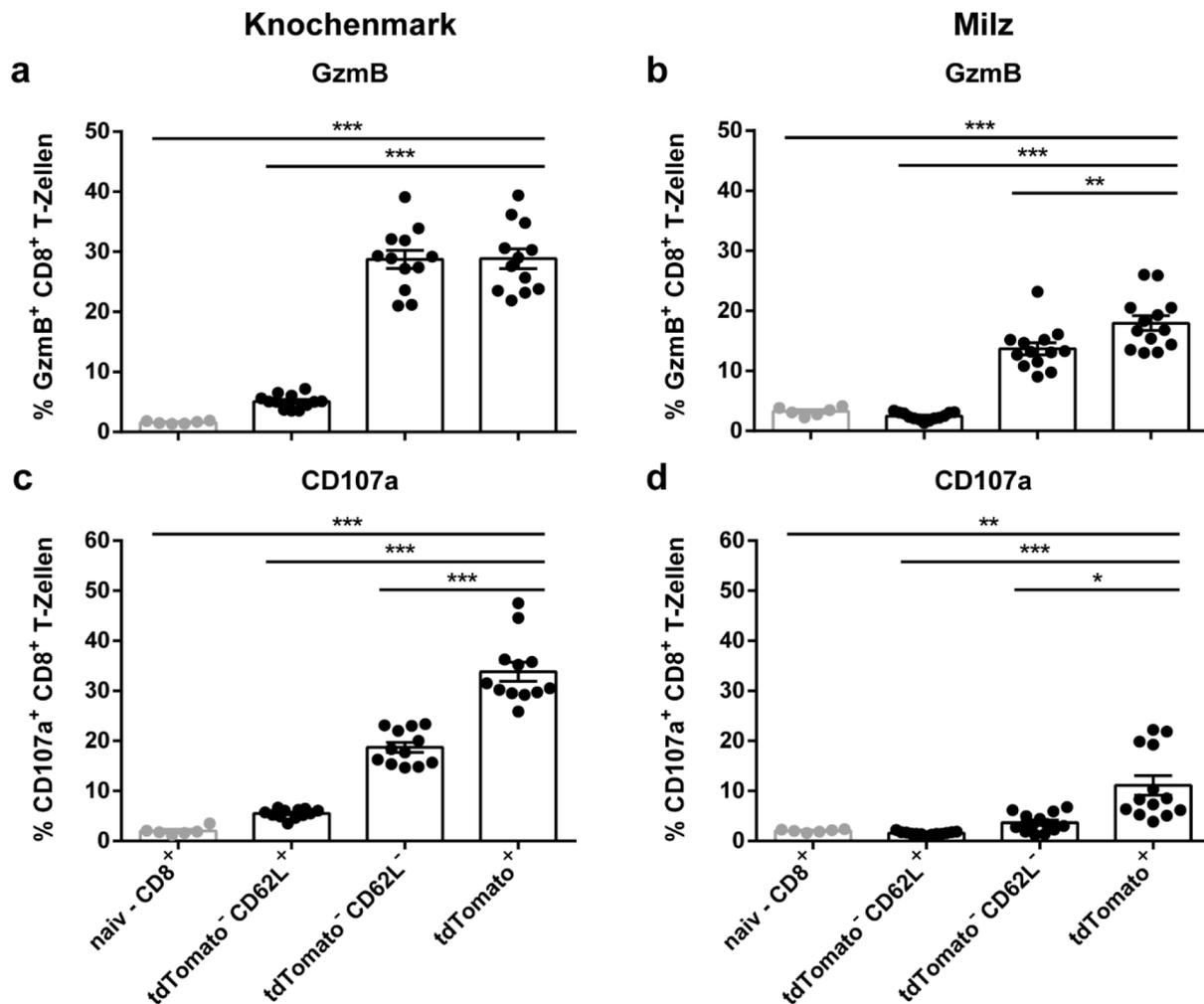


Abb.4.5: Effektorfunktionen CD8⁺ T-Zellen

Zur Charakterisierung von CD8⁺ T-Zellen im Knochenmark und der Milz von Empfängertieren 10 Tage nach FV-Infektion (20.000 SFFU) und adoptivem Zelltransfer von 1000 FV-spezifischen tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen wurde eine durchflusszytometrische Analyse angewendet. Die Zellpopulation wurde in exogene (tdTomato⁺) und endogene (tdTomato⁻) CD8⁺ T-Zellen unterteilt. Endogene CD8⁺ T-Zellen wurden weiter untergliedert in CD62L⁻ Effektorzellen und CD62L⁺ naive Zellen. Diese Subpopulationen wurden im Knochenmark (a, c) und der Milz (b, d) auf die Expression des intrazellulären zytotoxischen Moleküls GzmB und des zelloberflächenständigen Degranulationsmarker CD107a untersucht und mit CD8⁺ T-Zellen von naiven Mäusen (grau, keine Infektion und kein Transfer) verglichen. Jeder Punkt repräsentiert ein analysiertes Tier. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SEM von zwei unabhängigen Experimenten mit je mindestens sechs Tieren. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber tdTomato⁺ sind angegeben mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ (one-way ANOVA/Dunnett's Test (a-c), Kruskal-Wallis-Test/Dunn's Test (d)) (Otto L. *et al.* 2018).

Der Transfer von 1000 FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen resultierte in einer Anzahl FV-infizierter Zellen, welche dem Kontroll-Transfer von 1000 FV-unspezifischen CD8⁺ T-Zellen entsprach. Dieses Ergebnis zeigte sich sowohl nach 6 als auch 10 Tagen Infektion und Zelltransfer (Abb.4.6). Eine schneller einsetzende adaptive Immunantwort der exogenen ZTLs konnte durch einen IC-Assay nach 6 Tagen FV-Infektion ausgeschlossen werden. Prinzipiell konnten die beschriebenen Resultate in der Milz und dem Knochenmark gleichermaßen festgestellt werden, wobei das Knochenmark eine um den Faktor 10 bis 100 erhöhte Anzahl infizierter Zellen aufwies. Erfolgte jedoch ein Transfer von 20.000 FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (20.000 Transfer), direkt nach der Infektion, kam es nach 10 Tagen zu einer signifikanten Reduktion der FV-infizierten Zellen verglichen mit dem Standardtransfer von nur 1000 virusspezifischen Zellen (Abb.4.6). Dementsprechend erlaubte das gewählte Zelltransfersystem die Analyse von ZTLs während einer natürlich verlaufenden retroviralen Infektion. Die transferierten Zellen beteiligen sich reproduzierbar an der antiviralen Immunantwort, jedoch ohne diese signifikant zu verstärken.

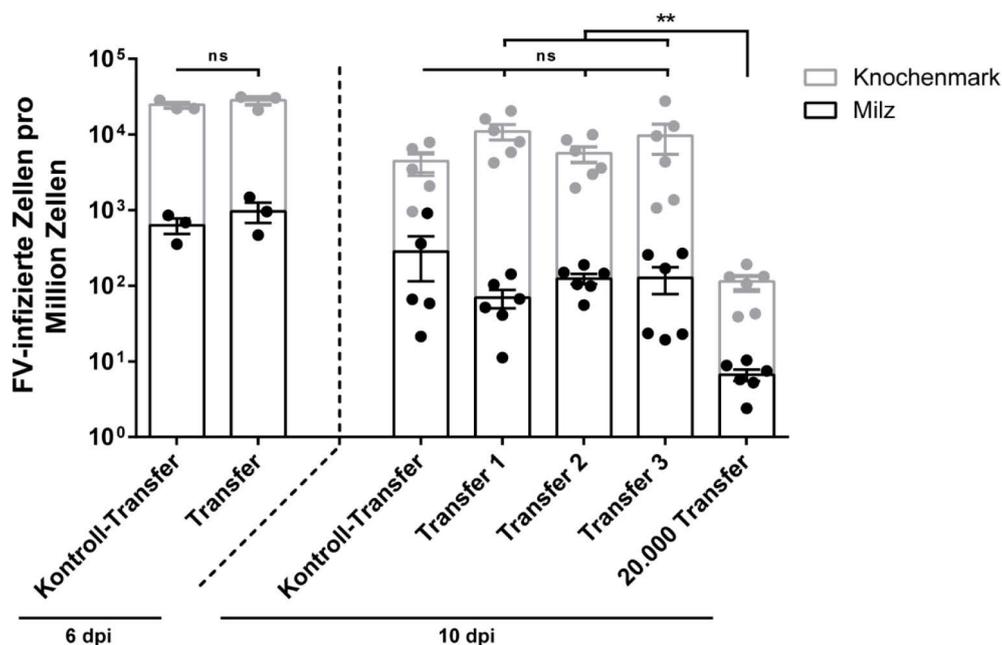


Abb.4.6: Effekt des Zelltransfers auf die FV-Infektion

Mit 20.000 SFFU FV-infizierte Empfängertiere erhielten einen adoptiven Zelltransfer mit 1000 FV-unspezifischen (Kontroll-Transfer) oder 1000 (Transfer)/ 20.000 (20.000 Transfer) FV-spezifischen tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen. Die Anzahl FV-infizierter Zellen im Knochenmark und der Milz wurde 6 und 10 Tage nach Infektion und Zelltransfer mit Hilfe eines IC-Assays bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert ein analysiertes Tier. Gezeigt ist der Mittelwert ± SEM. Keine statistisch signifikanten Unterschiede (ns) konnten zwischen Kontroll-Transfer und Transfer ermittelt werden (Mann-Whitney-U-Test (6 dpi) und *one-way* ANOVA/Dunnett's Test (10 dpi)). Ein statistisch signifikanter Unterschied beim Vergleich zwischen Transfer 1-3 und 20.000 Transfer ist angegeben mit ** $p < 0,01$ (*unpaired* t-Test). Angegebene Statistiken sind repräsentativ für Knochenmark und Milz (Otto L. *et al.* 2018).

4.1.5 Transferierte fluoreszierende CD8⁺ T-Zellen können in der Milz und dem Knochenmark dargestellt werden

Mit Hilfe der Zwei-Photonenmikroskopie wurden zunächst fixierte Proben der Milz und des tibialen Knochenmarks auf tdTomato⁺ ZTLs überprüft. Der adoptive Transfer von 1000 FV-spezifischen tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen resultierte 10 Tage nach Infektion und Zelltransfer in einer homogenen Verteilung der ZTLs in den betrachteten Organen. Die generierte ZTL-Zellzahl pro Sichtfeld lag in einem optimalen Bereich. Einerseits konnte eine Vielzahl an Zellen betrachtet werden und andererseits waren diese ausreichend voneinander separiert (Abb.4.7c,d und Abb.4.8c,d). Eine dreidimensionale Nachverfolgung einzelner Zellen (Zelltracking), bei Anwendung der intravitralen Mikroskopie, war dadurch möglich. Milz und tibiales Knochenmark wurden ebenfalls von naiven Mäusen sowie Kontroll-Transfertiern, welche 1000 FV-unspezifische tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen erhalten hatten, überprüft. In diesen Kontrollen konnten weder mikroskopisch noch durchflusszytometrisch tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen detektiert werden (Abb.4.7a,b und Abb.4.8a,b).

Während der akuten FV-Infektion ist das Knochenmark ein primärer Infektionsherd [229]. Demensprechend werden besonders viele ZTLs zur Kontrolle und Abtötung infizierter Zellen rekrutiert [229]. Erkenntlich wurde dies da 10,9 % aller CD8⁺ T-Zellen im Knochenmark FV-infizierter Tiere ein tdTomato-Signal aufwiesen und auf die ursprünglich transferierten virusspezifischen CD8⁺ T-Zellen zurückgingen (Abb.4.8c). In der Milz belief sich dieser Wert auf nur 3,2 % (Abb.4.7c). Aus diesem Grund wurden die ZTLs im intakten Knochenmark lebender Tiere mit Hilfe der intravitralen Zwei-Photonenmikroskopie [108] untersucht (Abb.4.8e). Die tdTomato⁺ CD8⁺ T-Effektorzellen zeigten eine ausgeprägte Motilität (Film 1), welche weiterführende Analysen der Zellbewegung ermöglichte.

Zusammenfassend erlaubte das etablierte Zelltransfersystem die reproduzierbare Nutzung eines einzelnen Spendertieres für den Transfer von 1000 virusspezifischen fluoreszierenden CD8⁺ T-Zellen. Die transferierten Zellen integrierten sich in die adaptive Immunantwort der Empfängertiere, entwickeln einen aktivierten sowie funktionalen Phänotyp und ermöglichten die Beobachtung einer natürlichen antiretroviralen ZTL-Antwort *in vivo*.

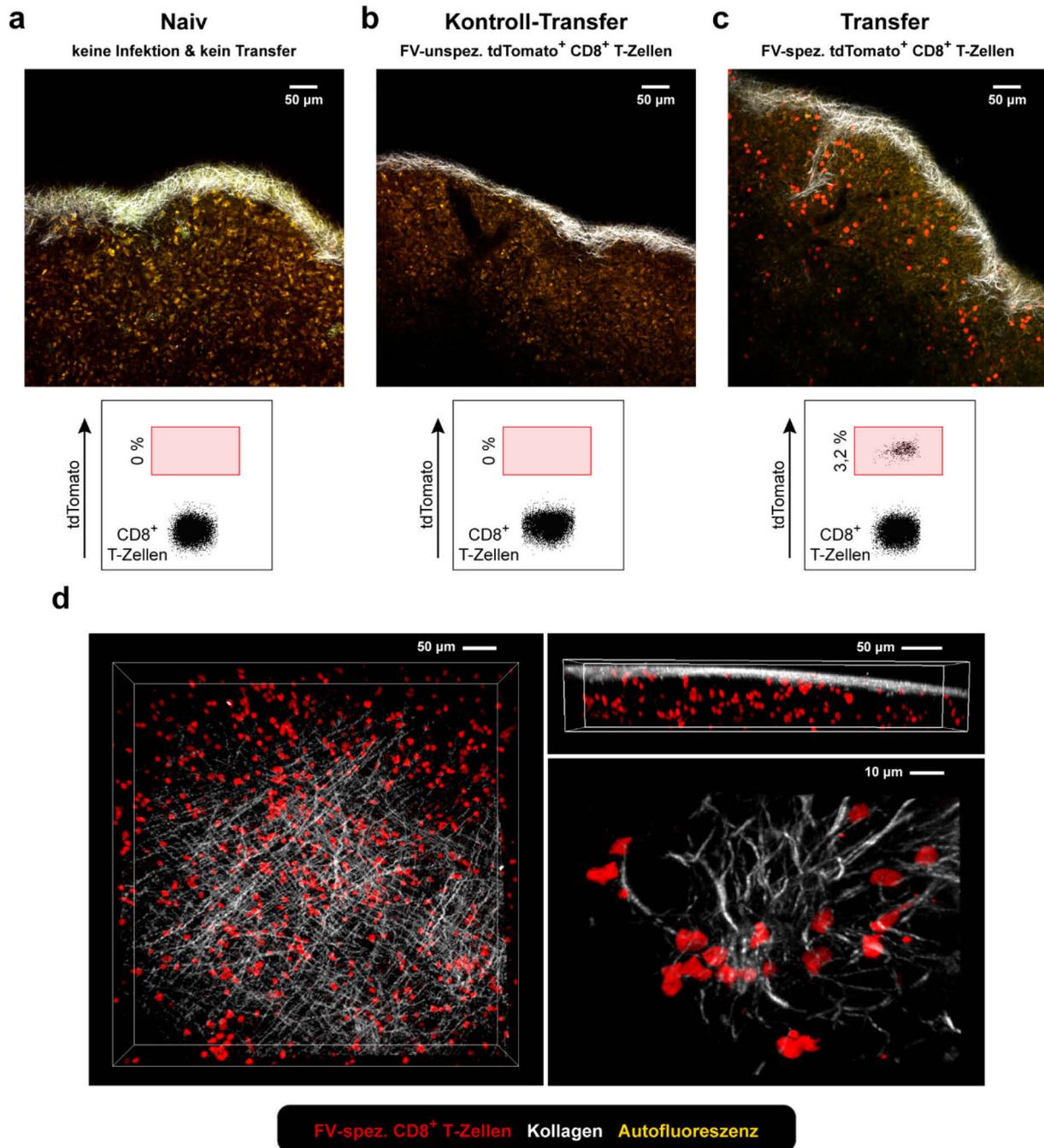


Abb.4.7: Expansion FV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in der Milz

Die Milz von naiven Tieren (a, keine Infektion und kein Transfer), Kontroll-Transfer- (b, 1000 FV-unspezifische tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen) und Transfer-Mäusen (c, d 1000 FV-spezifische tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen) wurde 10 Tage nach FV-Infektion (20.000 SFFU) und Zelltransfer mittels Zwei-Photonenmikroskopie und Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt sind repräsentative durchflusszytometrische Analysen, welche den prozentualen Anteil CD8⁺ T-Zellen mit tdTomato-Signal (Mittelwert) von zwei unabhängigen Experimenten mit mindestens drei Mäusen pro Gruppe zeigen. Die fixierten Proben wurden bis zu einer Tiefe von 100 μm mikroskopiert und dreidimensional von verschiedenen Perspektiven und auf Einzelzellebene analysiert (d). Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für acht Mäuse (Transfer) bzw. zwei Mäuse (naiv, Kontroll-Transfer), von zwei unabhängigen Experimenten. Das Kollagen wurde über das SHG-Signal visualisiert (Otto L. *et al.* 2018).

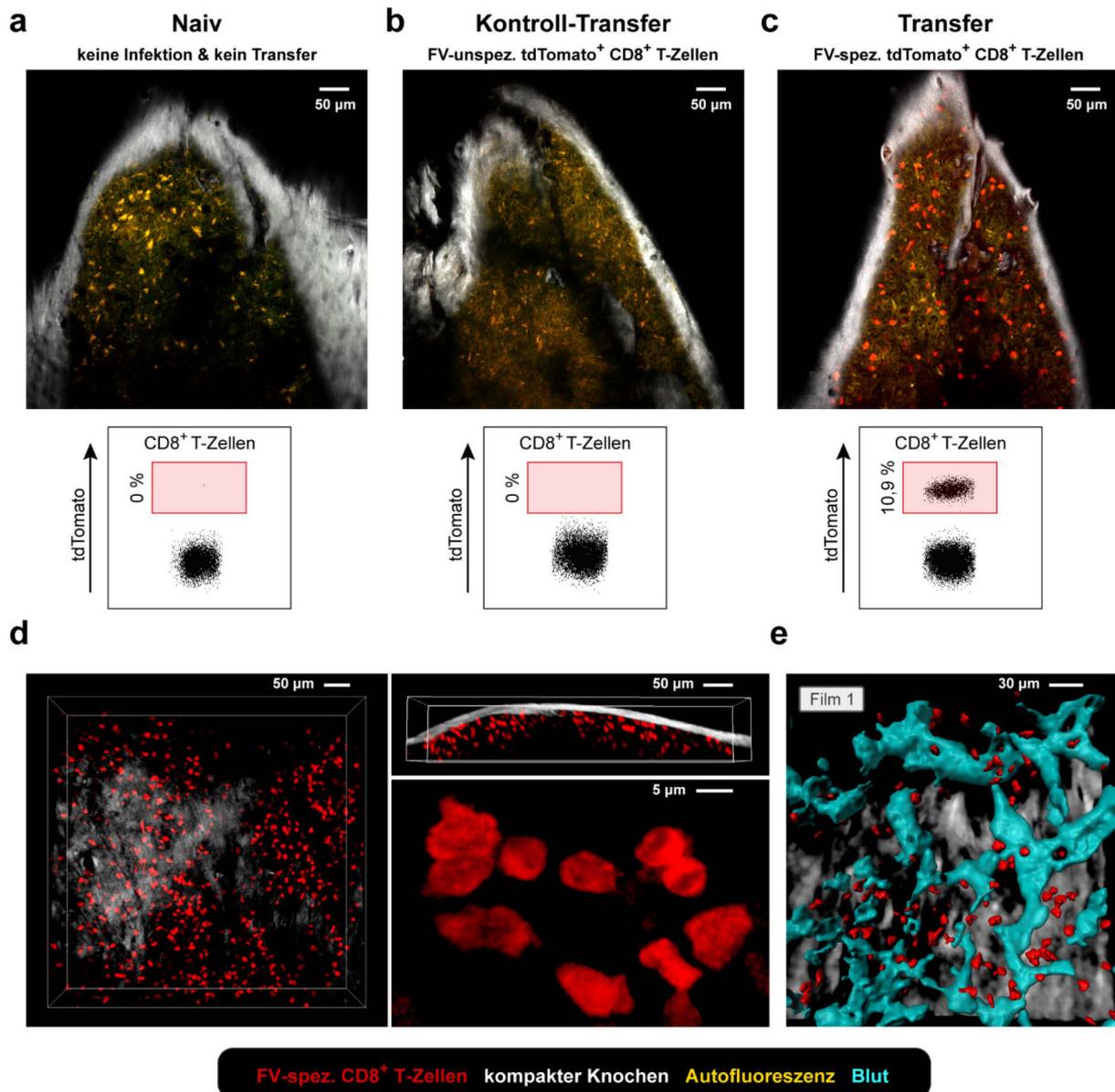


Abb.4.8: Mikroskopie FV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen im tibialen Knochenmark

Das Knochenmark von naiven Tieren (a, keine Infektion und kein Transfer), Kontroll-Transfer- (b, 1000 FV-unspezifische tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen) und Transfer-Mäusen (c, d 1000 FV-spezifische tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen) wurde 10 Tage nach FV-Infektion (20.000 SFFU) und Zelltransfer mittels Zwei-Photonenmikroskopie und Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt sind repräsentative durchflusszytometrische Analysen, welche den prozentualen Anteil CD8⁺ T-Zellen mit tdTomato-Signal (Mittelwert) von zwei unabhängigen Experimenten mit mindestens drei Mäusen pro Gruppe zeigen. Die fixierten Proben wurden bis zu einer Tiefe von 100 μ m mikroskopiert und dreidimensional von verschiedenen Perspektiven und auf Einzelzellebene analysiert (d). Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für acht Mäuse (Transfer) bzw. zwei Mäuse (naiv, Kontroll-Transfer), von zwei unabhängigen Experimenten. Das tibiale Knochenmark von lebenden Transfer-Mäusen wurde mit Hilfe der Zwei-Photonenmikroskopie untersucht (Film 1) (e). Dargestellt sind die dreidimensionale Struktur der Blutgefäße und der FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen während der intravitralen Mikroskopie (e). Der kompakte Knochen wurde über das SHG-Signal und das Blut über eine i.v. injizierte Qtracker-Lösung visualisiert (Otto L. *et al.* 2018).

4.2 Intravitale Analyse virusspezifischer CD8⁺ T-Zellen und regulatorischer T-Zellen im tibialen Knochenmark

Der zuvor beschriebene Zelltransferansatz wurde nachfolgend in transgenen DEREK-Mäusen, welche als Empfängertiere dienten, angewendet. Diese Mäuse haben EGFP-fluoreszierende Tregs, die durch die Gabe von Diphtherietoxin (DT) eliminiert werden können. Dies ermöglichte die simultane intravitale Visualisierung von ZTLs und Tregs zu verschiedenen Zeitpunkten der akuten FV-Infektion. Weiterhin konnte dadurch eine eingehende dreidimensionale Analyse von deren Motilität und Interaktion im Knochenmark lebender Tiere durchgeführt werden. Neben der gemeinsamen Betrachtung beider Zellpopulationen erlaubten die DEREK-Mäuse ebenfalls eine Charakterisierung der ZTL-Antwort bei systemischer Treg-Depletion.

4.2.1 Die Motilität virusspezifischer CD8⁺ T-Zellen verändert sich im Verlauf der akuten FV-Infektion

Viruspezifische CD8⁺ T-Zellen sind essentiell für die Kontrolle akuter retroviraler Infektionen. Beim Übergang zur chronischen Infektion verlieren sie jedoch ihre Funktionalität, ein Effekt der bereits in der späten akuten Infektionsphase langsam einsetzt [229]. Aus diesem Grund wurden ZTLs in der initialen Phase der adaptiven Immunantwort (8 dpi), zum Zeitpunkt ihrer stärksten Aktivität (10 dpi) und der späten akuten Phase der FV-Infektion (14 dpi) untersucht. Mit Hilfe einer Trackinganalyse der ZTLs über die Zeit (Abb.4.9a und Film 2) sollte die Motilität im Zusammenhang mit der Funktionalität bestimmt werden.

Basierend auf der Zwei-Photonenmikroskopie des infizierten Knochenmarks, direkt unterhalb des Endosts der Tibia, wurde zunächst die Anzahl an ZTLs pro mm³ Knochenmark berechnet. Diese lag bei ca. 1000 ZTLs an Tag 8 und verfünffachte sich bis Tag 10, wobei die höchste Anzahl an ZTLs (~7700) nach 14 Tagen detektiert wurde (Abb.4.9b). Bei der Messung der durchschnittlichen Track-Geschwindigkeit (DTG) zeigte sich hingegen eine signifikant erhöhte ZTL-Geschwindigkeit an Tag 10, mit 7,6 µm/min. An Tag 8 betrug diese 5,4 µm/min und an Tag 14 nach der Infektion 7,1 µm/min (Abb.4.9.c). Analog zu den DTGs lieferte auch die Untersuchung der maximalen Track-Geschwindigkeiten vergleichbare Ergebnisse. Wiederum wiesen die CD8⁺ T-Effektorzellen nach 10 Tagen Infektion die signifikant höchsten maximalen

Geschwindigkeitswerte auf (14,6 $\mu\text{m}/\text{min}$) (Abb.4.9d). Zellen die sich kaum bewegten wurden anhand der DTGs die geringer als 2,5 $\mu\text{m}/\text{min}$ waren bestimmt. Der Anteil langsamer ZTLs wurde pro analysierter Maus berechnet und zeigte eine klare Tendenz. 8 Tage nach FV-Infektion entsprachen fast ein Fünftel (19 %) aller ZTLs diesem Kriterium, wohingegen nach 10 Tagen nur 4 % der transferierten CD8⁺ T-Zellen den Schwellenwert unterschritten. In der folgenden späten akuten Infektionsphase (14 dpi) stieg der Anteil langsamer ZTLs wieder auf 8 % (Abb.4.9e). Prinzipiell gibt dieser Wert einen Hinweis auf mögliche zelluläre Interaktionen oder eine vermehrte Inaktivierung der betrachteten Zellen.

Neben der Geschwindigkeitsanalyse wurden ebenfalls die zurückgelegten Strecken der ZTLs näher untersucht. Der Fokus lag auf der Tracklänge sowie der direkten Trackdistanz, der geradlinigen Entfernung zwischen Start- und Endposition der nachverfolgten Zellen (Abb.4.10a). Passend zu den Geschwindigkeitsprofilen legten die ZTLs an Tag 10, während einer 30-minütigen intravitalem Aufnahme, die signifikant weitesten Strecken, mit einer Tracklänge von 78 μm , zurück. Danach folgten 14 dpi mit 68 μm und 8 dpi mit nur 41 μm (Abb.4.10b). Interessanterweise waren die Unterschiede bezüglich der direkten Trackdistanz an den analysierten Zeitpunkten weniger unterschiedlich und lediglich an Tag 8 signifikant geringer als an den anderen beiden Zeitpunkten (Abb.4.10c). Die Track-Geradlinigkeit kombiniert die bereits betrachteten Parameter durch Bildung des Quotienten aus direkter Trackdistanz und Tracklänge (Abb.4.10a). Dies ist ein gutes Maß dafür wie effektiv die ZTLs ihre Umgebung nach potentiellen Zielzellen oder weiteren Interaktionspartnern absuchen können. Tendiert der Wert gegen null impliziert dies eine sehr intensive Umgebungserkundung der Zellen. Die geringste Track-Geradlinigkeit wurde an Tag 10 beobachtet, welche sich signifikant von Tag 8 und 14 unterschied (Abb.4.10d). Entscheidenden Einfluss auf diese Werte haben mögliche Interaktionen mit anderen Zellen, weshalb diese Daten in Kombination mit der Geschwindigkeitsanalyse (Abb.4.9d) betrachtet werden müssen.

Prinzipiell wiesen die ZTLs 10 Tage nach der Infektion die höchste Motilität auf, während an Tag 8 und 14 bewegungsmindernde Effekte auftraten. Weiterhin scheint es einen Zusammenhang zwischen ZTL-Motilität und -Funktionalität [229] an den betrachteten Zeitpunkten zu geben.

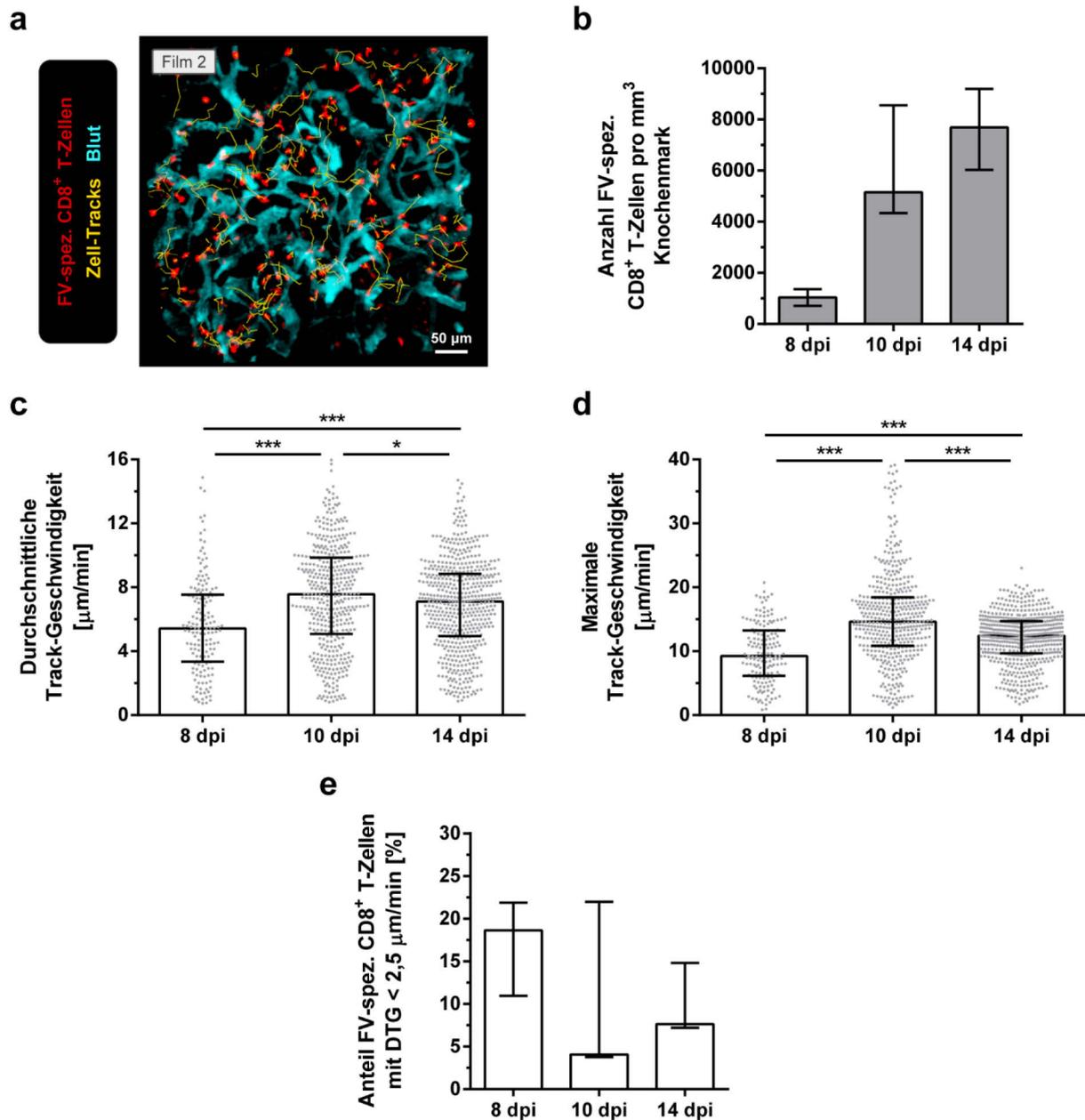


Abb.4.9: Geschwindigkeitsanalyse FV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen nach FV-Infektion

Zum Tracking der ZTLs wurde das tibiale Knochenmark von DEREK-Mäusen 8, 10 und 14 Tage nach FV-Infektion (20.000 SFFU) und adoptivem Zelltransfer (1000 FV-spezifische tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen) mittels intravitraler Zwei-Photonenmikroskopie untersucht. Gezeigt ist eine beispielhafte Darstellung des dreidimensionalen Zelltrackings im Knochenmark, 14 dpi. Das Blut wurde über eine i.v. injizierte Qtracker-Lösung visualisiert (a, Film 2) (a). Die Anzahl FV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen pro mm³ Knochenmark (b), die durchschnittliche Track-Geschwindigkeit (DTG) (c), die maximale Track-Geschwindigkeit (d) und der prozentuale Anteil an ZTLs mit einer DTG unterhalb von 2,5 $\mu\text{m}/\text{min}$ pro Maus (e) wurden bestimmt. Pro Zeitpunkt wurden drei Tiere analysiert. Dargestellt ist der Median \pm IQR (Interquartilsabstand). Jeder Punkt repräsentiert eine nachverfolgte Zelle (c, e). Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ (Kruskal-Wallis-Test/Dunn's Test (c, e)).

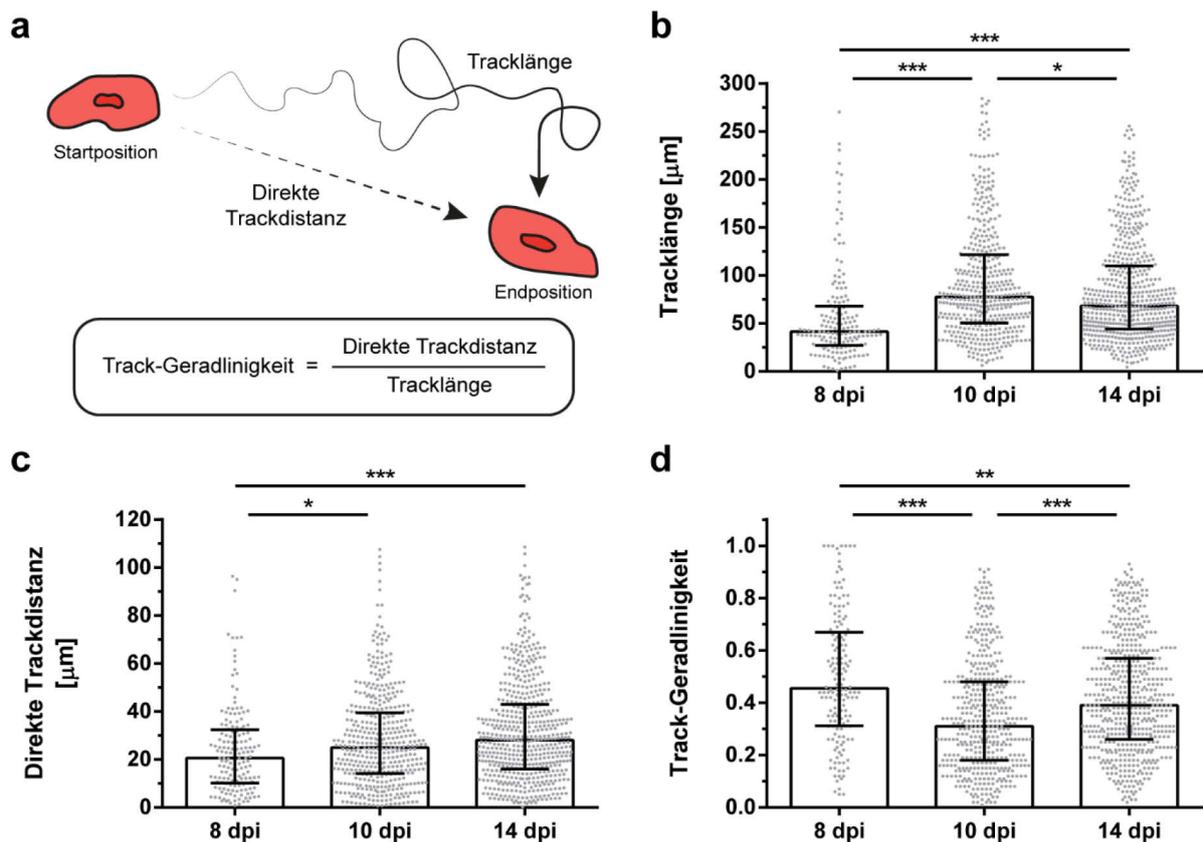


Abb.4.10: Bewegungsanalyse FV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen nach FV-Infektion

Zum Tracking der ZTLs wurde das tibiale Knochenmark von DEREK-Mäusen 8, 10 und 14 Tage nach FV-Infektion (20.000 SFFU) und adoptivem Zelltransfer (1000 FV-spezifische tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen) mittels intravitraler Zwei-Photonenmikroskopie untersucht. Gezeigt ist eine schematische Darstellung der betrachteten Parameter zur Analyse der Zellbewegungsmuster (a). Die Tracklänge (b), die direkte Trackdistanz (c) und die Track-Geradlinigkeit (Quotient c/b) (d) FV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen wurden bestimmt. Pro Zeitpunkt wurden drei Tiere analysiert. Dargestellt ist der Median \pm IQR. Jeder Punkt repräsentiert eine nachverfolgte Zelle. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ (Kruskal-Wallis-Test/Dunn's Test).

4.2.2 Regulatorische T-Zellen zeigen eine unveränderte Motilität im Verlauf der akuten FV-Infektion

Tregs vermitteln immunsuppressive Effekte und wirken als ein zentraler Regulator von CD8⁺ T-Effektorzellen [229]. Dadurch werden ZTL-bedingte Immunpathologien vermieden und die Homöostase bewahrt. Während retroviraler Infektionen tragen sie jedoch, durch ZTL-Inhibition, zur Ausbildung einer chronischen Infektion bei [50, 174, 228, 229]. Für ein besseres Verständnis der Treg-Wirkmechanismen wurde daher deren Motilität im Verlauf der akuten FV-Infektion *in vivo* analysiert. Gemessen wurde wie zuvor in der initialen Phase der adaptiven Immunantwort (8 dpi), zum Zeitpunkt ihrer stärksten Aktivität (10 dpi) und der späten akuten Phase der Infektion (14 dpi), in welcher die Tregs ihre supprimierenden Eigenschaften voll entfalten.

Die Nutzung von DEREK-Mäusen ermöglichte die intravitale Visualisierung der Tregs. Diese konnten als grüne ringförmige Strukturen im Knochenmark detektiert werden (Abb.4.11a,b). Ursächlich dafür war die Fusion des EGFP an den membranständigen Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR). Das gesamte DTR-EGFP-Fusionsprotein unterlag der Kontrolle des Treg-spezifischen Foxp3-Promotors. Nahezu alle EGFP⁺ Zellen waren daher auch Foxp3⁺ (96,4 %) und konnten als Tregs mikroskopisch erfasst werden. Ein geringer Anteil an Foxp3⁺ EGFP⁻ Tregs war in diesem Mausmodell, wie beschrieben [37], ebenfalls präsent aber mikroskopisch nicht erfassbar (Abb.4.11c).

Ausgehend von den Mikroskopiedaten wurde die Anzahl an Tregs pro mm³ tibialen Knochenmarks berechnet. 8 Tage nach der Infektion lag der Wert bei 550 Zellen und erhöhte sich bis Tag 10 auf 850 Tregs pro mm³. In der späten akuten Infektionsphase (14 dpi) kam es zu einem sprunghaften Anstieg auf 2800 Tregs pro mm³ (Abb.4.11d). Die DTG an Tag 10 und 14 war trotz des quantitativen Unterschieds der vorhandenen Tregs an beiden Zeitpunkten mit 5,5 bzw. 5,4 µm/min nahezu identisch. Nur gegenüber der frühen akuten Infektionsphase (8 dpi) war eine signifikante Geschwindigkeits-erhöhung messbar (Abb.4.11e). Vergleichbar zu der DTG war auch die maximale Track-Geschwindigkeit nur geringfügig unterschiedlich zwischen den Infektionszeitpunkten. Lediglich der Spitzenwert von 10,2 µm/min an Tag 10 war verglichen mit Tag 8 signifikant erhöht (Abb.4.11f). Es folgte eine genauere Auswertung der DTG hinsichtlich des Anteils aller Tregs pro Tier, welche sich langsamer als 2,5 µm/min fortbewegten. Der Anteil war am höchsten nach 8 Tagen, wobei die Werte großen Schwankungen unterlagen. An Tag 10 unterschritten in zwei von drei analysierten Tieren 0 % der Tregs den definierten Schwellenwert, an Tag 14 belief sich der Anteil langsamer Tregs auf 12 % (Abb.4.11g).

Passend zu den Geschwindigkeitsprofilen der Tregs ergab sich deren Bewegungsmuster. Sowohl die Tracklänge als auch die direkte Trackdistanz waren im Verlauf der akuten FV-Infektion annähernd identisch und zeigten bis auf wenige Ausnahmen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zeitpunkten. Die größten Tracklängen wurden mit 60 µm an Tag 14 beobachtet, wobei die direkte Trackdistanz mit 22 µm an Tag 10 den Höchstwert erreichte (Abb.4.12a,b). Eine Berechnung der Kombination beider Parameter, in Form der Track-Geradlinigkeit, resultierte ebenfalls in vergleichbaren Werten für alle betrachteten Zeitpunkte. Die Fähigkeit der Tregs ihre Umgebung zu erkunden scheint sich daher im Verlauf der akuten FV-Infektion kaum zu verändern (Abb.4.12c).

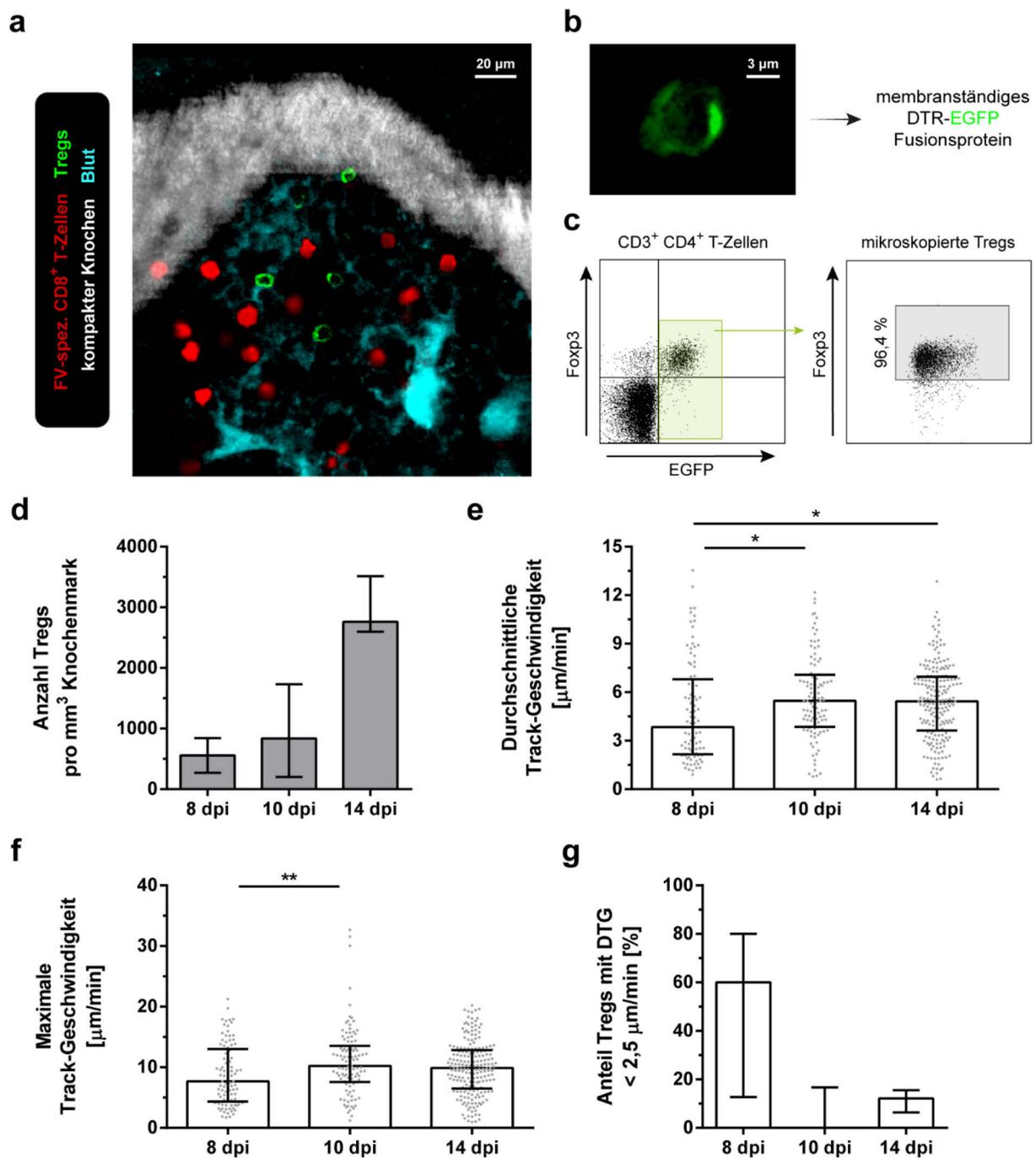


Abb.4.11: Mikroskopie und Geschwindigkeitsprofil von Tregs nach FV-Infektion

Zum Tracking der Tregs wurde das tibiale Knochenmark von DEREK-Mäusen 8, 10 und 14 Tage nach FV-Infektion (20.000 SFFU) und adoptivem Zelltransfer (1000 FV-spezifische tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen) mittels intravitraler Zwei-Photonenmikroskopie untersucht. Gezeigt ist eine Übersichtsabbildung von FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen und Tregs im Knochenmark. Der kompakte Knochen wurde über das SHG-Signal und das Blut über eine i.v. injizierte Qtracker-Lösung visualisiert (a). Tregs erscheinen als ringförmige Strukturen bedingt durch das membranständige DTR-EGFP-Fusionsprotein (a, b). DEREK-Mäuse wurden mittels Durchflusszytometrie auf den prozentualen Anteil an EGFP⁺ Tregs mit Fcpx3-Signal überprüft. Dargestellt sind repräsentative Plots (c). Die Anzahl an Tregs pro mm³ Knochenmark (d), die durchschnittliche Track-Geschwindigkeit (DTG) (e), die maximale Track-Geschwindigkeit (f) und der prozentuale Anteil an Tregs mit einer DTG unterhalb von 2,5 µm/min pro Maus (g) wurden bestimmt. Pro Zeitpunkt wurden drei Tiere analysiert. Dargestellt ist der Median ± IQR. Jeder Punkt repräsentiert eine nachverfolgte Zelle (e, g). Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ (Kruskal-Wallis-Test/Dunn's Test (e, g)).

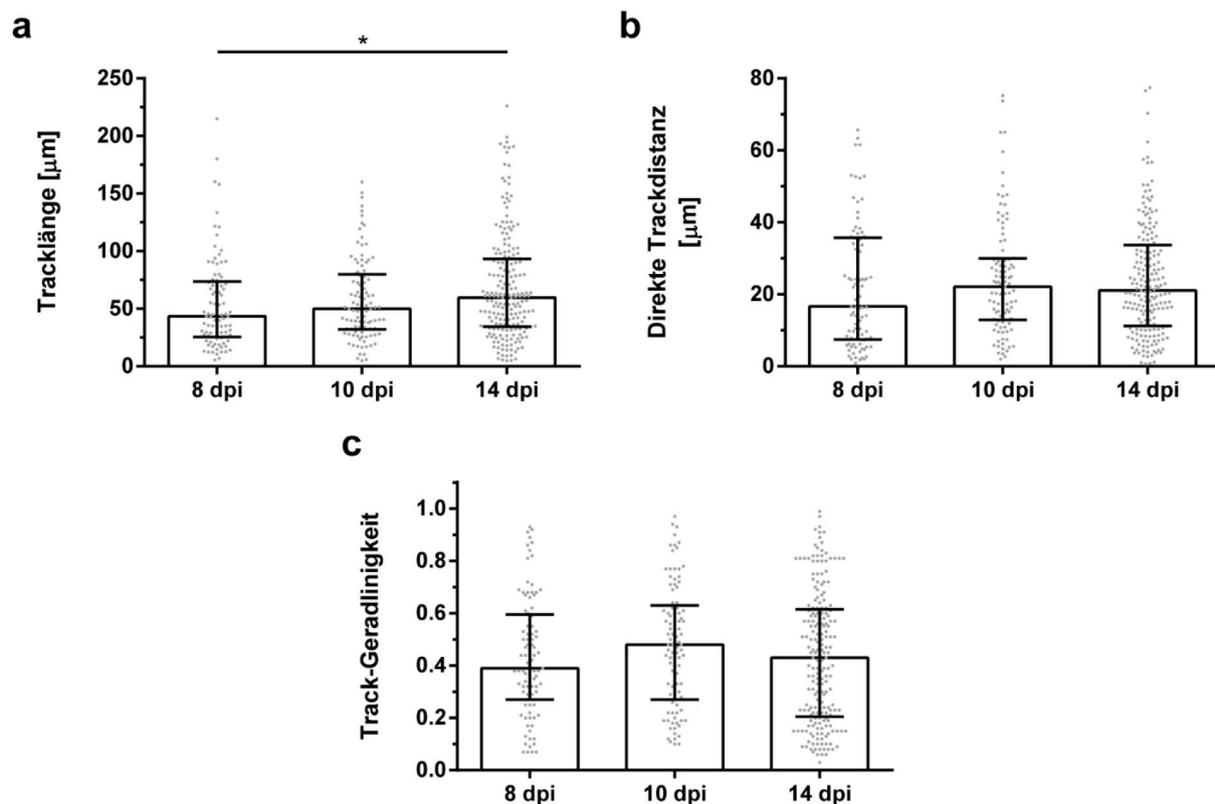


Abb.4.12: Bewegungsanalyse von Tregs nach FV-Infektion

Zum Tracking der Tregs wurde das tibiale Knochenmark von DEREK-Mäusen 8, 10 und 14 Tage nach FV-Infektion (20.000 SFFU) und adoptivem Zelltransfer (1000 FV-spezifische tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen) mittels intravitraler Zwei-Photonenmikroskopie untersucht. Die Tracklänge (a), die direkte Trackdistanz (b) und die Track-Geradlinigkeit (Quotient b/a) (c) der Tregs wurden bestimmt. Pro Zeitpunkt wurden drei Tiere analysiert. Dargestellt ist der Median \pm IQR. Jeder Punkt repräsentiert eine nachverfolgte Zelle. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben mit * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis-Test/Dunn's Test).

Zusammenfassend änderte sich die Motilität der Tregs nur leicht von Tag 8 zu Tag 10 und blieb anschließend bis Tag 14, trotz drastisch gesteigener Treg-Zellzahlen, nahezu identisch. Treg-spezifische Effekte basieren daher vermutlich primär auf der Quantität und nur nachgeordnet auf Änderungen in der Motilität der Zellen.

4.2.3 Virusspezifische CD8⁺ T-Zellen und regulatorische T-Zellen interagieren miteinander und bilden direkte Zell-Zellkontakte aus

Tregs und ZTLs unterliegen einer komplexen wechselseitigen Interaktion im Verlauf retroviraler Infektionen [88]. *In vitro* konnten bereits inhibitorische Effekte der Tregs auf direkte Zellkontakte zwischen ZTLs und Tregs zurückgeführt werden [175]. Um diese Interaktion während einer Infektion im lebenden Organismus zu analysieren wurden

beide Zelltypen gleichzeitig mit Hilfe der intravitalem Zwei-Photonenmikroskopie im Knochenmark FV-infizierter Mäuse beobachtet.

Ausgehend von der Anzahl an Tregs und ZTLs pro definiertem mikroskopiertem Volumen wurde das Verhältnis beider Zellpopulationen zueinander ermittelt. Während der frühen Infektionsphase (8 dpi) waren pro Treg im Schnitt 1,6 ZTLs vorhanden, wodurch ein nahezu ausgeglichenes Verhältnis vorlag. Diese Balance verschob sich bis Tag 10 zu einem Verhältnis von 1:10,2 zugunsten der ZTLs, bedingt durch deren starke Proliferation. In der späten akuten Infektion (14 dpi) expandierten die Tregs ebenfalls und reduzierten dadurch das Verhältnis zwischen Tregs und CD8⁺ T-Effektorzellen auf 1:2,6 (Abb.4.13a).

Bei gemeinsamer Betrachtung von Tregs und ZTLs zeigten sich viele gegenseitige zelluläre Kontakte. Insbesondere während der späten akuten Infektion (14 dpi) waren diese, bedingt durch die gesteigerte Anzahl beider Zelltypen, vermehrt zu beobachten (Abb.4.13b). Die direkten Treg-ZTL-Kontakte waren dynamisch und nur von kurzer Dauer, sodass keine gemeinsame Migration beider Zellen zu sehen war (Film 3). Dessen ungeachtet lieferte eine vergrößerte dreidimensionale Untersuchung einer statischen Interaktion den Hinweis auf eine stabile Verbindung zwischen einer Treg und einer ZTL (Abb.4.13c und Film 4). Bedingt durch die schnelle dreidimensionale Aufnahme der Tregs, welche notwendig war für intravitale Filme zur Nachverfolgung der Zellen, war deren Ringstruktur nicht mehr erkennbar und die Zellen erschienen kleiner (Abb.4.13b und Film 3). Nur Membranbereiche in denen sich das DTR-EGFP-Fusionsprotein vermehrt anreichert sind unter diesen Einstellungen gut sichtbar. Langsamere Aufnahmen gestatteten hingegen ebenfalls die Detektion schwächerer Fluoreszenzsignale und ermöglichten die Darstellung der Tregs in voller Größe, welche den ZTLs entspricht (Abb.4.11a und Abb.4.13c).

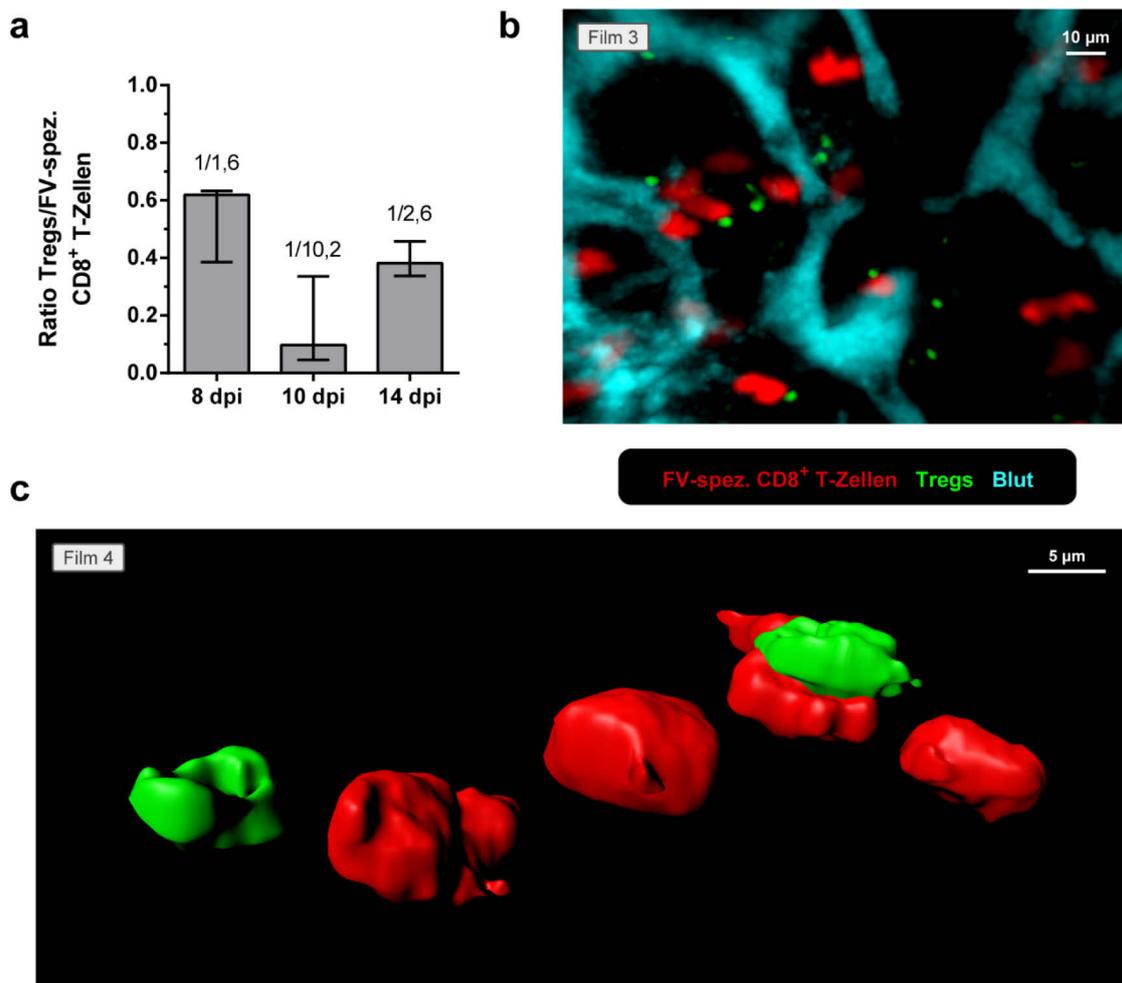


Abb.4.13: Zelluläre Interaktionen zwischen FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen und Tregs

Zur Analyse der Interaktionen von viruspezifischen CD8⁺ T-Zellen und Tregs wurde das tibiale Knochenmark von DREG-Mäusen 8, 10 und 14 Tage nach FV-Infektion (20.000 SFFU) und adoptivem Zelltransfer (1000 FV-spezifische tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen) mittels intravitale Zwei-Photonenmikroskopie untersucht. Das Zellzahlverhältnis von Tregs zu FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen *in vivo* wurde aus den Mikroskopiedaten ermittelt (Abb.4.9b und Abb.4.11d). Pro Zeitpunkt wurden drei Tiere analysiert. Dargestellt ist der Median \pm IQR (a). Viruspezifische CD8⁺ T-Zellen und Tregs interagierten häufig miteinander (b, Film 3) und bildeten kurzzeitig Zellkontakte (b, Film 3 und c, Film 4). Gezeigt sind repräsentative Bilder für 14 dpi. Zur Visualisierung eines direkten Zellkontaktes zwischen FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen und Tregs wurde eine dreidimensionale Oberflächendarstellung angewendet (c). Das Blut wurde über eine i.v. injizierte Qtracker-Lösung visualisiert.

Für eine detailliertere Analyse der Interaktionszeit zwischen Treg und ZTL wurde eine exemplarische Interaktion eingehend untersucht (Abb.4.14 und Film 5). In diesem Fall näherte sich die Treg zunächst der ZTL (Abb.4.14a,b). Anschließend bildete sich eine zelluläre Verbindung für 2-3 min aus, welche leichte morphologische Veränderungen beider Interaktionspartner induzierte (Abb.4.14c-e). Diese gaben auch einen Hinweis darauf, dass beide Zellen nach Initiierung des Kontaktes durch die Treg vermutlich aktiv zu der Interaktion beitragen (Abb.4.14d). Nach Abschluss der Interaktion entfernt sich die Treg wieder von dem ZTL (Abb.4.14f).

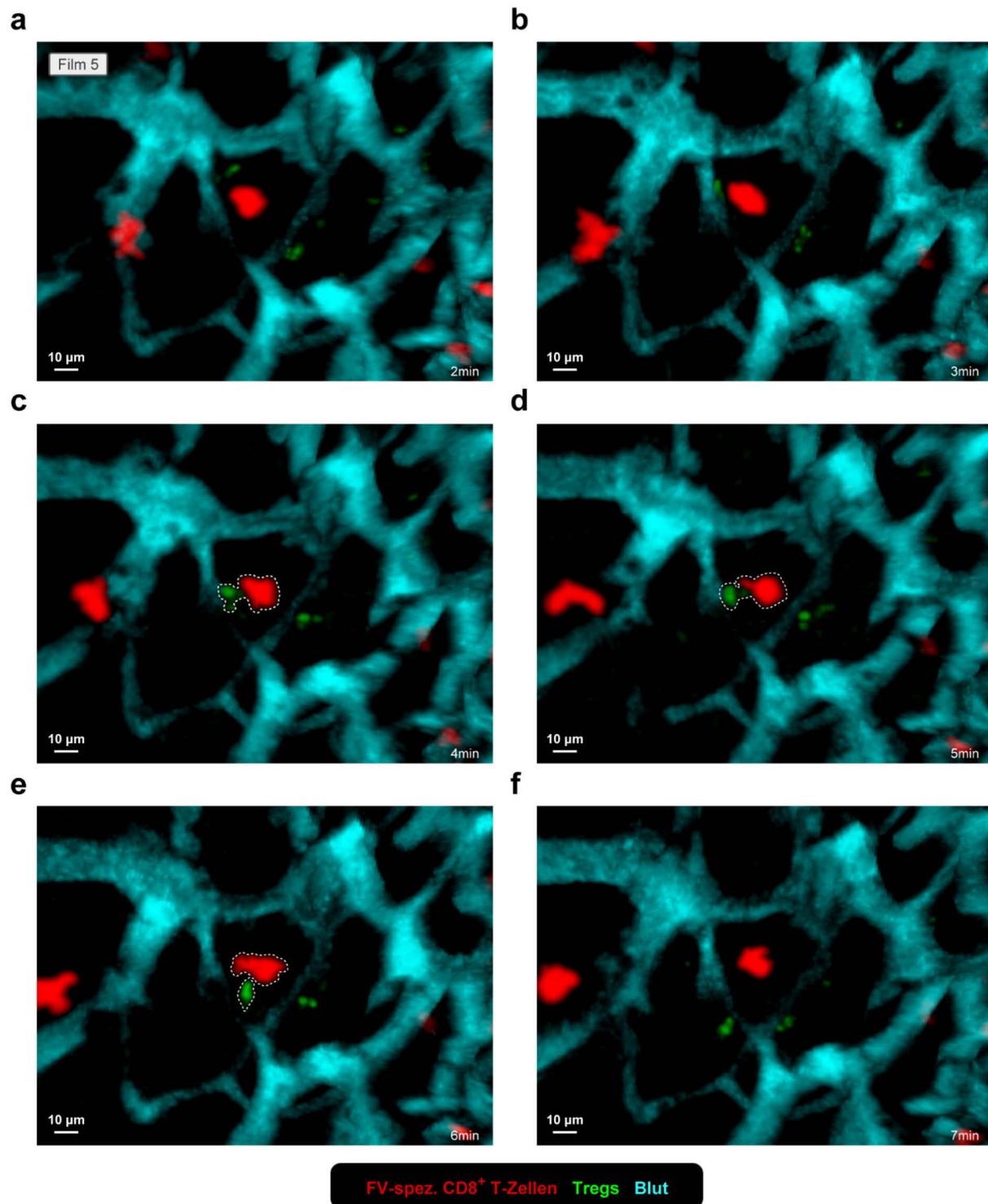


Abb.4.14: Interaktionszeit von FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen und Tregs

Zur Analyse der Interaktionszeit von virusspezifischen CD8⁺ T-Zellen und Tregs wurde das tibiale Knochenmark von DEREK-Mäusen 8 Tage nach FV-Infektion (20.000 SFFU) und adoptivem Zelltransfer (1000 FV-spezifische tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen) mittels intravitraler Zwei-Photonenmikroskopie untersucht. Dargestellt ist eine repräsentative Beobachtung der Interaktion beider Zelltypen über 6 min (a-f, Film 5). Eine direkte zelluläre Interaktion und eine damit verbundene veränderte Zellmorphologie beider Interaktionspartner sind gezeigt (weiß gestrichelte Linie, c-e). Das Blut wurde über eine i.v. injizierte Qtracker-Lösung visualisiert.

4.2.4 Regulatorische T-Zellen hemmen die Motilität virusspezifischer CD8⁺ T-Zellen während der akuten FV-Infektion

Tregs vermitteln supprimierende Effekte auf die ZTLs, weshalb eine Treg-Depletion, bereits während der akuten FV-Infektion, in einer deutlich gesteigerten ZTL-Aktivität resultiert [228]. Um die Wirkung von Tregs auf die ZTL-Motilität *in vivo* zu untersuchen, wurde diese in Abwesenheit von Tregs in der frühen (8 dpi) sowie späten akuten (14 dpi) FV-Infektion untersucht. Damit wurden Zeitpunkte betrachtet, in welchen die Tregs kaum (8 dpi) oder starke (14 dpi) supprimierende Effekte vermitteln [229]. Eingesetzt wurde hierzu das DEREK-Mausmodell, welches eine systemische Treg-Depletion durch Gabe von DT ermöglichte.

Die Depletion durch DT war sowohl für Tag 8 als auch Tag 14 hocheffizient und führte dazu, dass weder durchflusszytometrisch (Abb.4.15a) noch mikroskopisch (Abb.4.15.b) ein EGFP-Signal der Tregs detektierbar war. Numerische Auswirkungen bezüglich der Anzahl an ZTLs pro mm³ Knochenmark zeigten sich nur an Tag 14 mit einer Steigerung um ~2000 Zellen verglichen mit der Normalsituation (14 dpi ohne DT-Behandlung) (Abb.4.15c). Ähnliche Ergebnisse konnten bei der Geschwindigkeitsanalyse festgestellt werden. Die DTG (8 µm/min) sowie die maximale Track-Geschwindigkeit (15,1 µm/min) erhöhten sich jeweils signifikant unter DT-Behandlung in der späten akuten Infektionsphase, während an Tag 8 keine Veränderungen auftraten (Abb.4.15d,e). Bei Betrachtung des Anteils der ZTLs, welche eine langsamere DTG als 2,5 µm/min aufwiesen und sich kaum bewegten, kam es zu einem Anstieg in der frühen und einem Abfall in der späten akuten Infektion gegenüber unbehandelten Mäusen (Abb.4.15f). Valide Änderungen der ZTL-Bewegungsmuster konnten wiederum an Tag 14 gefunden werden. Die Tracklänge steigerte sich ohne Tregs auf 86 µm (normal 68 µm), wobei die direkte Trackdistanz nur leicht auf 32 µm (normal 28 µm) anstieg. Dies resultierte in einer effektiveren Umgebungskontrolle der ZTLs durch eine Absenkung der Track-Geradlinigkeit (Abb.4.15g-i). In der frühen akuten Infektionsphase kam es zu einer Vergrößerung der Tracklänge nach Treg-Depletion bei unveränderter direkter Trackdistanz. Demzufolge war auch an Tag 8 mit DT die Track-Geradlinigkeit verglichen mit der Kontrollgruppe verringert, wobei diese größeren Schwankungen unterlag.

Generell bewirkte die Treg-Depletion eine signifikant gesteigerte ZTL-Motilität in der späten jedoch nicht in der frühen Phase der akuten FV-Infektion.

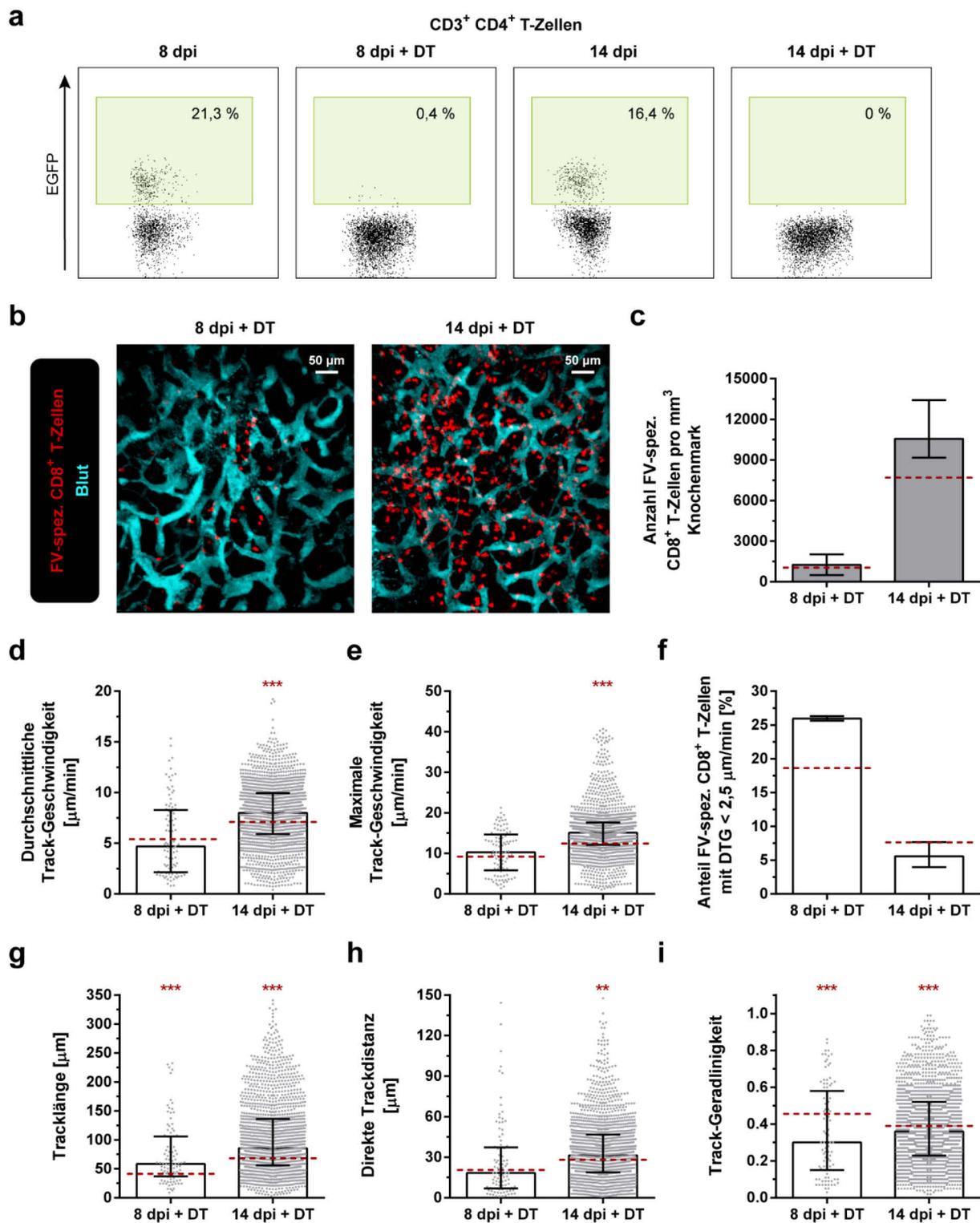


Abb.4.15: Effekte einer Treg-Depletion auf die FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen

Zur Analyse der Effekte einer Treg-Depletion auf die ZTL-Motilität wurde das tibiale Knochenmark von Treg-depletierten DEREK-Mäusen 8 und 14 Tage nach FV-Infektion (20.000 SFFU) und adoptivem Zelltransfer (1000 FV-spezifische tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen) mittels intravitraler Zwei-Photonenmikroskopie untersucht. DEREK-Mäuse wurden zur Kontrolle der Treg-Depletion nach DT-Behandlung mittels Durchflusszytometrie auf den prozentualen Anteil an EGFP⁺ CD3⁺ CD4⁺ T-Zellen untersucht. Dargestellt sind repräsentative Plots (a). Nach DT-Gabe konnten keine Tregs im Knochenmark visualisiert werden. Das Blut wurde über eine i.v. injizierte Qtracker-Lösung visualisiert (b). Die Anzahl FV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen pro mm³ Knochenmark (c), die durchschnittliche Track-Geschwindigkeit (DTG) (d), die maximale Track-Geschwindigkeit (e) und der prozentuale Anteil an ZTLs mit einer DTG

unterhalb von 2,5 $\mu\text{m}/\text{min}$ pro Maus (f) wurden bestimmt. Zur Bewegungsanalyse wurden die Tracklänge (g), die direkte Trackdistanz (h) und die Track-Geradlinigkeit (Quotient h/g) (i) ermittelt. Die DT-Gaben erfolgten an Tag null, drei und sechs für 8 dpi + DT und an Tag sieben, zehn und dreizehn für 14 dpi + DT behandelte Tiere. Pro Zeitpunkt wurden zwei (8 dpi + DT) bzw. drei (14 dpi + DT) Tiere analysiert. Dargestellt ist der Median \pm IQR. Jeder Punkt repräsentiert eine nachverfolgte Zelle (d, e, g-i). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen 8 dpi + DT und 8 dpi bzw. zwischen 14 dpi + DT und 14 dpi (rot gestrichelte Linie, Median unbehandelter Tiere, aus Abb.4.9 und Abb.4.10) sind angegeben mit ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ (Mann-Whitney-U-Test (d, e, g-i)).

4.3 Intravitale Visualisierung FV-infizierter Zellen im tibialen Knochenmark

Zur Darstellung FV-infizierter Zellen wurden modifizierte Viren genutzt, welche für ein Fluoreszenzprotein kodierten. Nach Integration des retroviralen Genoms in die Wirts-DNA wurde dieses transkribiert und gemeinsam mit den anderen viralen Proteinen translatiert. Folglich akkumulierte das fluoreszierende Protein im Zytosol, wodurch die infizierten Zellen fluoreszenzmikroskopisch sichtbar wurden. Diese Viren konnten in DEREK-Mäusen eingesetzt und mit dem beschriebenen adoptiven CD8^+ T-Zell-transfer kombiniert werden, um letztlich infizierte Zellen und ZTLs oder auch Tregs gemeinsam zu beobachten.

4.3.1 FV-mWasabi-infizierte Zellen bilden Cluster im tibialen Knochenmark während der frühen Phase der akuten FV-Infektion

Die FV-Infektion ist durch einen starken Anstieg der Viruslast während der frühen Phase gekennzeichnet, bis die ZTL-Antwort einsetzt [229]. Für ein besseres Verständnis der Verteilung FV-infizierter Zellen im Knochenmark wurden FV-mWasabi infizierte Mäuse in der frühen (8 dpi) und späten (14 dpi) Phase der akuten Infektion intravital untersucht. Kombiniert wurde dieses System zusätzlich mit dem beschriebenen Zelltransferansatz zur Darstellung der virusspezifischen ZTLs.

FV-mWasabi, welches die Bildung des grün fluoreszierenden Proteins mWasabi in infizierten Zellen induziert, wurde zunächst auf dessen Detektierbarkeit und Eignung für die Zwei-Photonenmikroskopie überprüft. Dazu wurden suszeptible BALB/c-Mäuse, welche die Infektion nicht kontrollieren können und enorm hohe Viruslasten aufweisen, genutzt. Lymphknoten dieser Mäuse wurden entnommen und entsprechend dem CUBIC-Protokoll [202] behandelt, wodurch die Organe transparent wurden, um eine größere Eindringtiefe des Lasers zu ermöglichen. Es konnten sehr

viele FV-mWasabi infizierte Zellen detektiert werden. Diese befanden sich sowohl innerhalb (Abb.4.16b,c) als auch außerhalb (Abb.4.16a,d) eines durch die Kollagenstrukturen erkennbaren B-Zell-Follikels (Film 6). Damit eignete sich FV-mWasabi für eine weiterführende Zwei-Photonenmikroskopie-Anwendung zur Abbildung FV-infizierter Zellen.

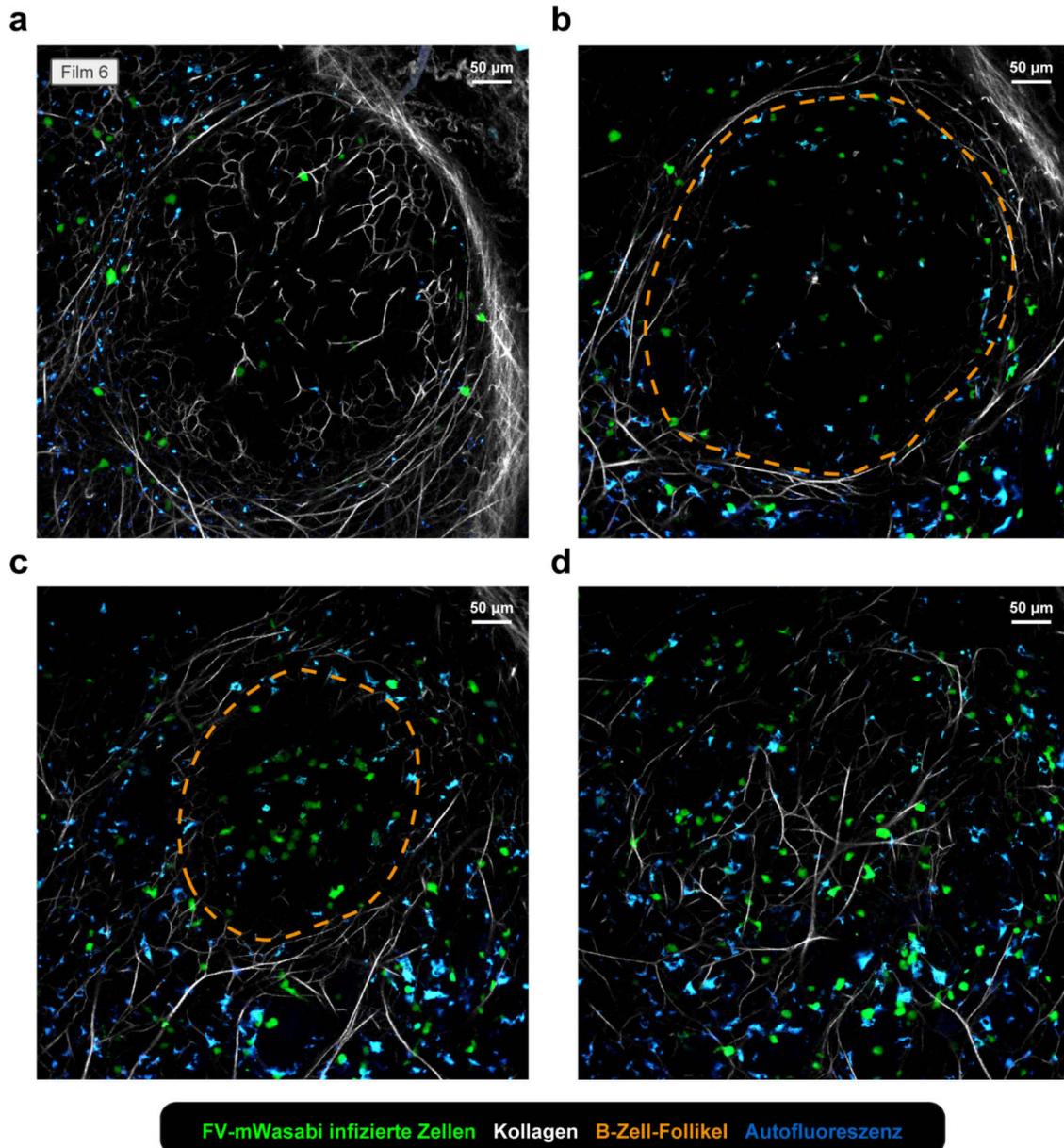


Abb.4.16: Nutzung von FV-mWasabi zur Visualisierung FV-infizierter Zellen

Die Nutzbarkeit von FV-mWasabi für Zwei-Photonenmikroskopie-Anwendungen wurde anhand CUBIC-behandelter Lymphknoten susceptibler BALB/c-Mäuse 21 Tage nach der Infektion (500 SFFU) überprüft. FV-mWasabi-infizierte Zellen wurden innerhalb (b, c) und außerhalb (a, d) eines B-Zell-Follikels deutlich detektiert (Film 6). Die transparenten Proben wurden bis zu einer Tiefe von 150 µm mikroskopiert und analysiert. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für fünf analysierte Lymphknoten. Die Kollagenstrukturen wurden über das SHG-Signal visualisiert und ermöglichten eine Abgrenzung des B-Zell-Follikels (Windmann S. *et al.* 2019).

Nachfolgend wurde FV-mWasabi für die intravitale Betrachtung infizierter Zellen im Knochenmark eingesetzt. Virusspezifische CD8⁺ T-Zellen wurden adoptiv transferiert und in der gleichen Maus visualisiert. Die FV-mWasabi-infizierten Zellen bildeten im Verlauf der frühen akuten Infektion (8 dpi) mehrere Cluster entlang der Oberfläche des tibialen Knochenmarks. Diese Foki bestanden aus 100 bis 170 FV-infizierten Zellen, erreichten einen Durchmesser von bis zu 300 µm und wurden von ZTLs infiltriert (Abb.4.17a). Dagegen konnten nach 14 Tagen Infektion nur vereinzelte infizierte Zellen, umgeben von vielen ZTLs, detektiert werden (Abb.4.17b).

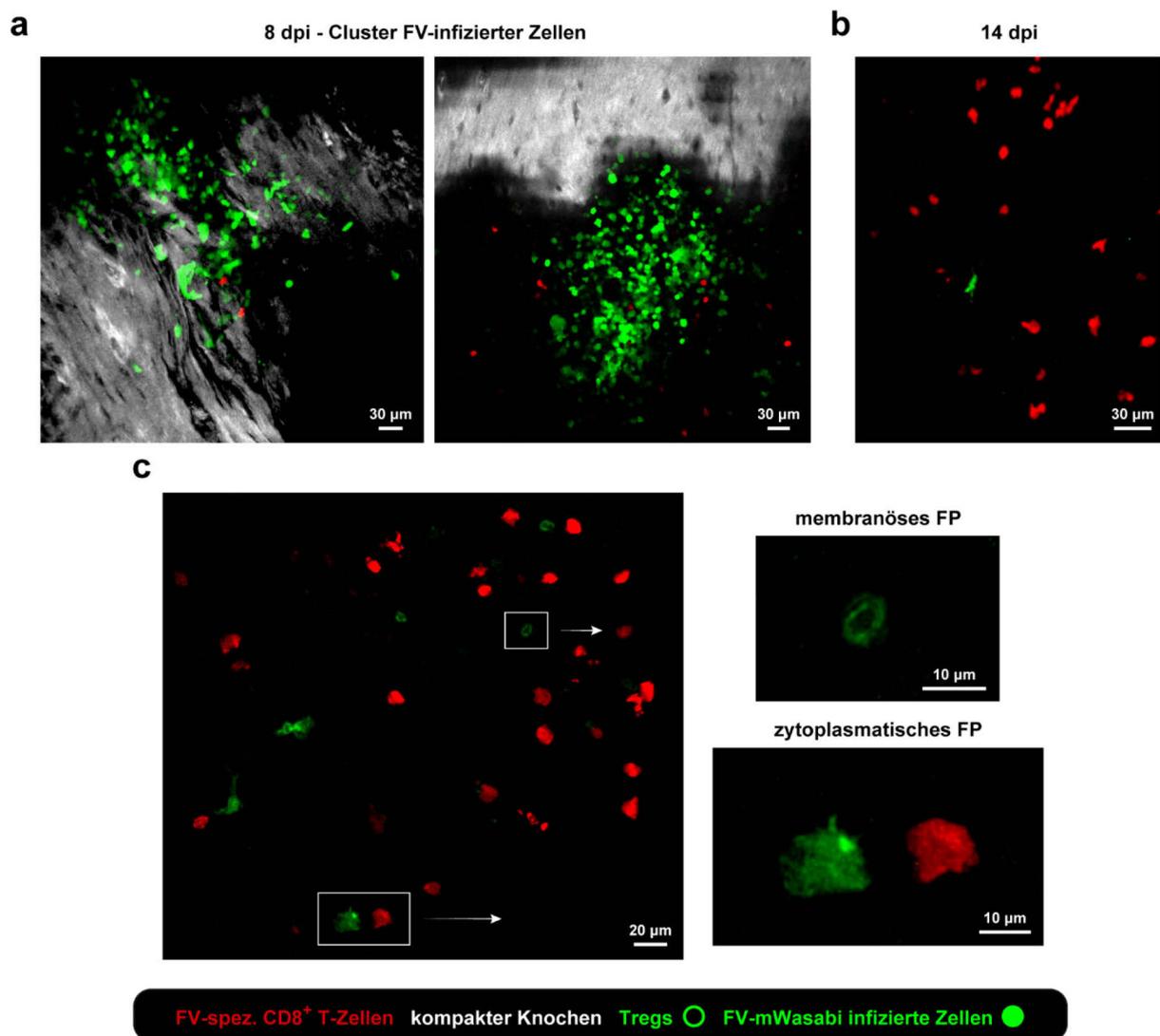


Abb.4.17: Visualisierung FV-infizierter Zellen im tibialen Knochenmark

Zur Untersuchung FV-infizierter Zellen und virusspezifischer CD8⁺ T-Zellen wurde das tibiale Knochenmark von C57BL/6-Mäusen 8 und 14 Tage nach FV-mWasabi-Infektion (20.000 SFFU) und adoptivem Zelltransfer (1000 FV-spezifische tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen) mittels intravitraler Zwei-Photonenmikroskopie untersucht. Cluster infizierter Zellen, welche von virusspezifischen CD8⁺ T-Zellen infiltriert wurden, waren 8 Tage nach Infektion und Zelltransfer zu beobachten (a). Nach 14 Tagen waren nur noch wenige vereinzelte infizierte Zellen vorhanden (b). Der Einsatz von DEREK-Mäusen erlaubte

die zeitgleiche Darstellung FV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen, FV-mWasabi-infizierter Zellen und Tregs 10 dpi (c). Die Emissionsspektren von EGFP (Tregs) und mWasabi (infizierte Zellen) sind vergleichbar, daher konnten beide Zelltypen nur anhand der unterschiedlichen Lokalisation der fluoreszierenden Proteine unterschieden werden (c). Der kompakte Knochen wurde über das SHG-Signal visualisiert. Gezeigt sind repräsentative Bilder von zwei Tieren pro Zeitpunkt (FP - Fluoreszenzprotein).

Kombiniert mit dem DEREK-Mausmodell war es möglich FV-infizierte Zellen, ZTLs und Tregs zeitgleich im Knochenmark darzustellen (Abb.4.17c). Das EGFP-Signal der Tregs und das mWasabi-Signal infizierter Zellen waren bedingt durch deren unterschiedliche zelluläre Lokalisation, membranös versus zytoplasmatisch, trotz des vergleichbaren Emissionsspektrums, optisch unterscheidbar. Problematisch erwies sich dies jedoch bei der Anwendung computergestützter automatischer Analysen, beispielsweise zum Tracking der Zellen, da die beschriebene Unterscheidung nur manuell durchführbar war.

Grundlegend eignete sich FV-mWasabi für die Zwei-Photonenmikroskopie FV-infizierter Zellen in fixierten und lebenden Organen. Es zeigte sich, dass nur in der frühen akuten Infektionsphase große Cluster infizierter Zelle im Knochenmark vorlagen, welche von ZTLs infiltriert wurden.

4.3.2 TurboFP650 - eine mit EGFP und tdTomato kombinierbare Fluoreszenz für ein modifiziertes FV

Entscheidend für die simultane intravitale Mikroskopie von FV-infizierten Zellen, ZTLs (tdTomato) und Tregs (EGFP) ist eine klare Abgrenzung bzw. separate Detektion der verschiedenen Fluoreszenzen jeder Zellpopulation. Dies garantiert eine adäquate Datenauswertung, weshalb ein neues FV hergestellt werden sollte. Ausgewählt für die Virusmodifikation wurde TurboFP650, ein Fluoreszenzprotein im nahen Infrarotbereich. Dieses ist sowohl mit EGFP als auch tdTomato kombinierbar und durch sein Fluoreszenzspektrum prädestiniert für die Zwei-Photonenmikroskopie.

Basierend auf dem Design des F-MuLV-mWasabi von Dr. Wibke Bayer, dem Grundbaustein des bereits genutzten FV-mWasabi-Komplexes [219], wurde auch F-MuLV-TurboFP650 entwickelt. Die angewendete Klonierungsstrategie ist in Abb.4.18 dargestellt.

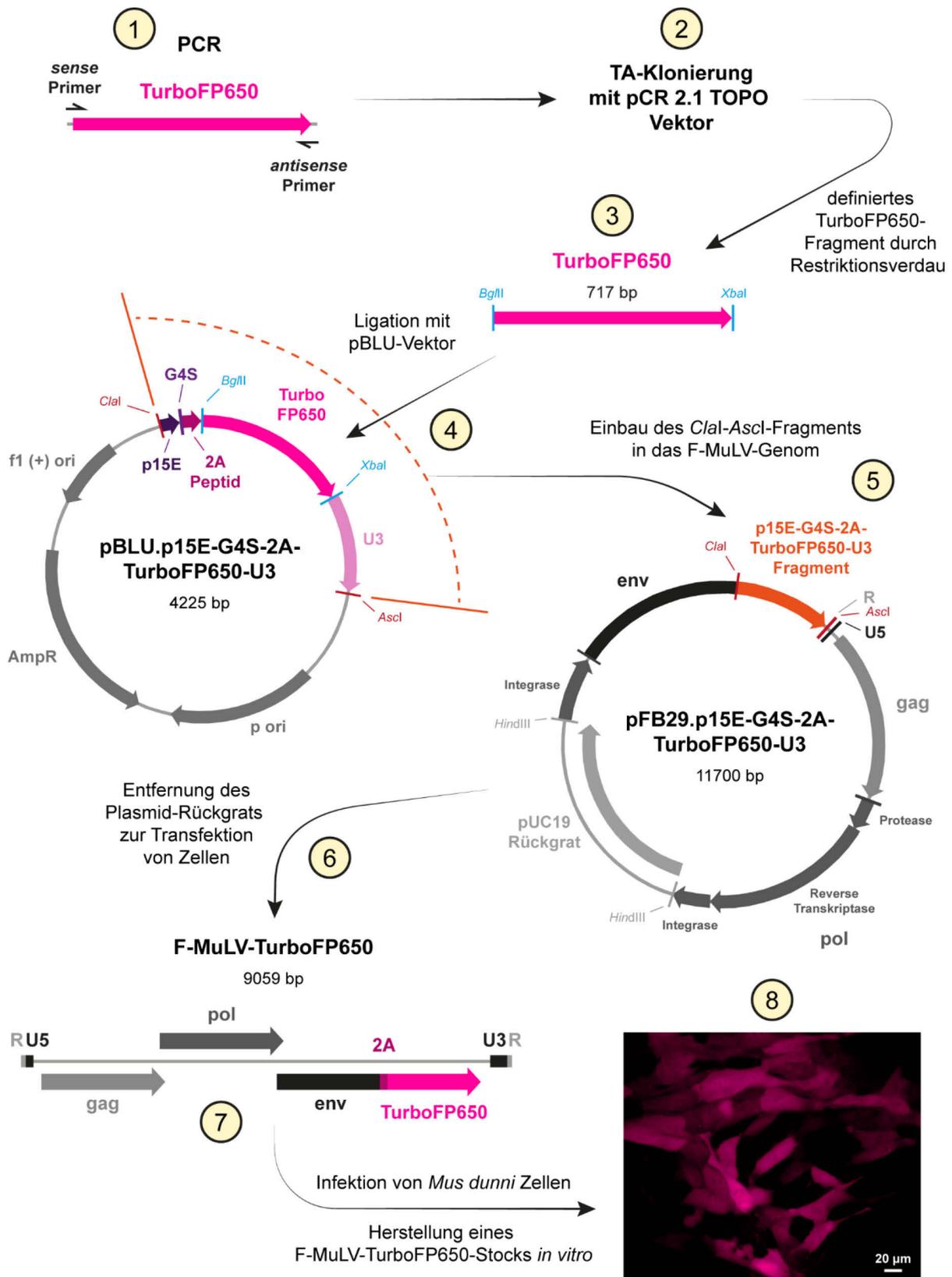


Abb.4.18: Klonierung eines mit tdTomato und EGFP kombinierbaren Virus

Zur gleichzeitigen Visualisierung viruspezifischer CD8⁺ T-Zellen (tdTomato), Tregs (EGFP) und infizierter Zellen in einem System wurde ein neues modifiziertes Virus generiert. Dieses kodiert für das im langwelligen Rotbereich emittierende Fluoreszenzprotein TurboFP650 (Emission bei 650 nm). Zu Beginn der Klonierung wurde die TurboFP650-DNA-Sequenz mittels PCR amplifiziert (1) und in den pCR 2.1 TOPO Vektor eingebaut (2). Mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bgl*II und *Xba*I wurde ein

TurboFP650-Fragment mit definierten Endungen gewonnen (3) und in das *Clal*-*Ascl*-Fragment des pBLU.p15E-G4S-2A-U3-Plasmids eingefügt (4). Anschließend konnte das p15E-G4S-2A-TurboFP650-U3-Fragment unter Verwendung der Restriktionsenzyme *Clal* und *Ascl* aus dem pBLU-Vektor entnommen und mit dem F-MuLV-Genom des pFB29-Plasmids ligiert werden (5). Nach Entfernung des pUC19-Rückgrats durch einen *HindIII*-Verdau erfolgte eine Transfektion von HEK 293 T-Zellen (6) und die Produktion erster F-MuLV-TurboFP650-Viren (7). Diese wurden zur Infektion von *Mus dunni* Zellen eingesetzt womit ein F-MuLV-TurboFP650-Stock *in vitro* hergestellt werden konnte. Gezeigt ist ein repräsentatives fluoreszenzmikroskopisches Bild F-MuLV-TurboFP650-infizierter *Mus dunni* Zellen (8).

Die TurboFP650-DNA-Sequenz wurde zunächst amplifiziert und in das *Clal*-*Ascl*-Fragment des pBLU-Plasmids eingefügt. Dieses Fragment stammte aus dem pFB29-Plasmid und war ergänzend modifiziert durch G4S, 2A-Peptid und entsprechende Schnittstellen für Restriktionsenzyme, sodass dessen Klonierung an das 3' Ende des *env-open reading frames* von pFB29 möglich war. Durch einen Restriktionsverdau wurde der Sequenzabschnitt aus dem pBLU-Plasmid herausgelöst und in das pFB29-Plasmid, welches das gesamte F-MuLV-Genom beinhaltet, eingefügt. Nach Entfernung des pFB29-Rückgrats konnten HEK 293 T-Zellen transfiziert werden und die ersten F-MuLV-TurboFP650-Viren aus dem Überstand gewonnen werden. Eine Infektion von *Mus dunni* Zellen resultierte in einer ausgeprägten TurboFP650-Fluoreszenz der infizierten Zellen und diente damit als Nachweis für die prinzipielle Funktionalität des neuen Virus (Abb.4.18). Die Rekonstitution als Komplex mit SFFV, zur Generierung des finalen FV-TurboFP650, bildet den letzten noch ausstehenden Arbeitsschritt.

F-MuLV-TurboFP650 ist ein vielversprechendes neues Tool zur Visualisierung infizierter Zellen. Nach dessen Komplexierung mit SFFV zu FV-TurboFP650 wird es eine verbesserte gemeinsame Darstellung FV-infizierter Zellen, tdTomato⁺ ZTLs und EGFP⁺ Tregs im Verlauf der FV-Infektion ermöglichen.

5 Diskussion

Chronische virale Infektionen betreffen weltweit mehrere hundert Millionen Menschen und sind damit ein ernsthaftes gesundheitliches Problem. Sehr prävalent sind in diesem Kontext HIV-, HBV- und HCV-Infektionen [18, 208, 215]. Nur bei einem Teil der HBV- und HCV-infizierten Menschen kann eine Therapie, welche auf der Wirkung von IFN α und Nukleosidanaloga beruht, bis zur Heilung durchgeführt werden [91, 208, 215]. Dies ist jedoch bei HIV-Patienten trotz des Einsatzes der HAART immer noch nicht möglich, wodurch ein chronischer Krankheitsverlauf unausweichlich ist [18, 125]. Vergleichbar ist bei diesen grundsätzlich verschiedenen Viren die Rolle von Tregs, welche durch die Suppression des Immunsystems die Ausbildung einer chronischen Infektion entscheidend begünstigen. Deren immunsuppressives Potential inhibiert CD8⁺ T-Effektorzellen, sodass infizierte Zellen nicht mehr effizient beseitigt werden und sich folglich eine chronische Infektion ausbilden kann [27, 62, 106, 119]. Einzelne Treg-vermittelte Hemmmechanismen wurden bereits beschrieben [213], dennoch sind die Effekte von Tregs bei der Chronifizierung viraler Infektionen im lebenden Organismus nur unzureichend aufgeklärt. Ein besseres Verständnis der Wechselwirkung von Tregs und ZTLs im Verlauf einer Infektion ist daher essentiell für die Entwicklung neuartiger Behandlungsansätze.

Ein gut charakterisiertes retrovirales Modell, um diese Aspekte zu untersuchen, ist die Infektion von Mäusen mit dem FV [150], in welchem erstmalig die Bedeutung von Tregs während einer viralen Infektion gezeigt werden konnte [94]. Grundlegendes Wissen über Tregs in retroviralen Infektionen konnte nachfolgend ebenfalls im FV-Modell generiert werden und hat im Kontext der HIV-Forschung sowie anderer chronischer Infektionen Anwendung gefunden [88]. Aus diesem Grund wurde ein auf dem FV-Modell basierender experimenteller Ansatz entwickelt, welcher die Visualisierung von Tregs und virusspezifischen CD8⁺ T-Zellen in lebenden Mäusen während einer physiologischen Immunantwort ermöglichte. Einerseits wurde dazu ein adoptiver Zelltransfer, zur Darstellung virusspezifischer CD8⁺ T-Zellen, entwickelt und andererseits DEREK-Mäuse, mit grün fluoreszierenden Tregs, als Empfängertiere eingesetzt. Beide Zellpopulationen waren dadurch mittels intravitale Zwei-Photonenmikroskopie im Knochenmark FV-infizierter Tiere sichtbar. Deren Motilität und Interaktion konnte zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert und charakterisiert werden. Für ein besseres Verständnis der ZTL-Antwort wurden zusätzlich infizierte

Zellen, durch ein Fluoreszenz induzierendes FV-mWasabi, sichtbar gemacht. Dadurch konnte ein umfassendes Bild der Bewegung und Interaktion von Tregs und ZTLs vor der Ausbildung einer chronischen Retrovirusinfektion gewonnen werden.

Zelltransferansatz zur Visualisierung virusspezifischer CD8⁺ T-Zellen

Nach Antigenkontakt expandieren antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen stark und ermöglichen eine robuste adaptive Immunantwort durch das Abtöten infizierter oder entarteter Zellen [233]. Zur Untersuchung prinzipieller Mechanismen der ZTL-Antwort haben sich daher adoptive Zelltransfers von antigenspezifischen TCR^{tg} CD8⁺ T-Zellen in Versuchstieren bewährt. Häufig werden dabei jedoch sehr hohe Zellzahlen (10⁵-10⁶) transferiert, wodurch die antigenspezifische CD8⁺ T-Zellantwort modifiziert wird und eine artifizielle Situation entsteht [13, 130]. Zur Betrachtung einer unveränderten Immunantwort wurden daher Titrations- und Schätzungsmethoden [26] entwickelt und optimierte Zelltransferzahlen in verschiedenen Infektionsmodellen mit VSV (*vesicular stomatitis virus*) [130], LCMV (lymphozytäres Choriomeningitis-Virus) [13, 26, 130], HSV (Herpes-simplex-Virus) [197] und *Listeria monocytogenes* [13, 196] bestimmt. Dazu wurden nur geringe Zellzahlen transferiert, welche der endogenen CD8⁺ T-Zellpopulation gleicher Spezifität entsprachen oder deren Anzahl unterschritten [13]. Das Repertoire an naiven CD8⁺ T-Zellen, welches fähig ist, gegenüber einem beliebigen spezifischen Antigen eine entsprechende adaptive Immunantwort zu induzieren, wird in diesem Zusammenhang auf 10-1000 Zellen pro Maus geschätzt [26, 29, 32, 104, 160, 164]. Die transferierten Zellen proliferierten in den Tieren und beteiligten sich an der endogenen T-Zellantwort, jedoch ohne diese messbar zu verändern [13]. Analog zu diesen Arbeiten wurde ein optimierter adoptiver Zelltransfer mit TCR^{tg} virusspezifischen CD8⁺ T-Zellen für die FV-Infektion entwickelt und den Anforderungen der intravitralen Zwei-Photonenmikroskopie angepasst. Entscheidend war dabei, dass die Anzahl transgener ZTLs zum Zeitpunkt der stärksten ZTL-Antwort (10 dpi) für die Mikroskopie angemessen war, d.h. dass ausreichend, jedoch nicht zu viele fluoreszierende ZTLs sichtbar, nachverfolgbar und damit analysierbar waren. Erreicht wurde dies durch den Transfer von nur 1000 FV-spezifischen fluoreszierenden CD8⁺ T-Zellen zu Beginn der Infektion. Die geringe Anzahl benötigter CD8⁺ T-Zellen ermöglichte zusätzlich die Nutzung eines kleinen Blutvolumens der Spendertiere als Quelle zur Zellisolation. Dies ist verglichen mit herkömmlichen Zellisolationen aus der

Milz, den Lymphknoten oder dem Knochenmark [22, 44, 56, 123, 133, 185] enorm vorteilhaft, da Spendertiere nicht getötet werden müssen, sondern mehrfach verwendet werden können. Im Sinne des 3R-Prinzips [181] ließ sich somit die Anzahl benötigter Tiere deutlich senken und der Zucht- und Haltungsaufwand minimieren, sodass ein ethisch zeitgemäßer experimenteller Ansatz gegeben war.

Nach dem adoptiven Zelltransfer müssen die naiven TCR^{tg} CD8⁺ T-Zellen in die lymphatischen Gewebe eindringen und APC-vermittelt durch einen spezifischen Antigenkontakt aktiviert werden [133]. Als Reaktion auf den Antigenkontakt expandieren die antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen und können bis zu 19 Zellteilungen binnen einer Woche nach Stimulation vollziehen, wodurch eine bis zu 400.000-fache Expansion möglich ist [13]. 10 Tage nach der FV-Infektion konnten 1-2 Millionen tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen, welche aus den ursprünglich transferierten 1000 Zellen hervorgegangen waren, detektiert werden. Basierend auf der Annahme, dass zwischen 900 und 950 FV-spezifische CD8⁺ T-Zellen aktiv proliferierten (Abb.4.1) entspricht das 10-11 Zellteilungen und einer 1000 bis 2000-fachen Expansionsrate. Erklären lässt sich dies durch relativ kurze Zellteilungszeiten bei T-Zellen, welche initial nur 2 h betragen können und sich erst nach der fünften Zellverdopplung verlangsamen [224]. Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang das Pathogen bzw. Antigen. So wurden im LCMV-Modell sogar ~14 Zellverdopplungen innerhalb einer Woche nachgewiesen [26]. Verglichen dazu induziert eine FV-Infektion eine verlangsamte Teilungsrate der CD8⁺ T-Zellen. Vermutlich liegt daher auch die optimale Zelltransferzahl bei LCMV mit 200 Zellen deutlich niedriger [26]. Übertragen lassen sich diese Aspekte auch auf phänotypische und funktionale Charakteristika virusspezifischer CD8⁺ T-Zellen, welche sich für verschiedene Viren jeweils spezifisch gestalten [156].

Die endogenen und exogenen CD8⁺ T-Effektorzellen zeigen ein vergleichbares Proliferations- als auch Aktivierungsprofil und erfüllen damit die Grundkriterien eines adoptiven Zelltransfers mit möglichst physiologischem Verlauf [13]. Diese Ergebnisse ließen sich unter Verwendung des gleichen Spendertieres in drei unabhängigen Zelltransferexperimenten nahezu identisch reproduzieren, wodurch die Vorteile des Blutes als Quelle der TCR^{tg} CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen wurden. Nur eine angepasste Zellzahl ermöglicht vergleichbare zelluläre Phänotypen, wohingegen zu viel transferierte Zellen in einer Verschiebung der Expressionsmuster definierter Zelloberflächenmarker (z.B. CD62L) resultieren [13] und die Ausbildung verschiedener

Gedächtnis-T-Zellsubpopulationen beeinflussen [130]. Die transferierten TCR^{tg} CD8⁺ T-Zellen zeigen nur dann ein der endogenen T-Zellantwort vergleichbares Verhalten, wenn deren Anzahl gleich oder kleiner der Anzahl an naiven T-Zellen mit entsprechender Spezifität ist [13]. Diese Voraussetzungen waren für das FV-Modell demzufolge mit dem Transfer von 1000 FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen ebenso erfüllt wie die mikroskopischen Anforderungen. Bereits publizierte Daten der endogenen ZTL-Antwort, 10 Tage nach der FV-Infektion, zeigten 18.000 CD8⁺ T-Zellen pro 10⁶ kernhaltigen Knochenmarkszellen sowie 6000 CD8⁺ T-Zellen pro 10⁶ Milzzellen mit einer TCR-Spezifität für das immundominate FV-Epitop GagL85-93 [229]. Dies entspricht ~3 Millionen FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in der Milz sowie ~1 Million im gesamten Knochenmark. Durch den adoptiven Zelltransfer werden hingegen lediglich ~1,5 Millionen (Milz) bzw. 400.000 (Knochenmark) FV-spezifische tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen induziert. Basierend auf der vergleichbaren Proliferationsfähigkeit der endogenen und transferierten T-Effektorzellen (Abb.4.2a,b), bei natürlich verlaufender T-Zellantwort, ist anzunehmen dass auch die endogenen FV-spezifischen ZTLs 10-11 Zellteilungszyklen durchlaufen haben. Demzufolge müsste die Ausgangszahl naiver FV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen bei ~2000 Zellen liegen, sodass 10 Tage nach der Infektion ~4 Millionen virusspezifische ZTLs nachweisbar sind [229]. Diese Ausgangszahl wäre folglich auch der Schwellenwert für einen allgemein optimierten Zelltransfer [13] im FV-Modell, welcher jedoch für eine optimale Umsetzung der Mikroskopie weiter spezifiziert und deshalb auf 1000 Zellen herabgesetzt wurde. Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass gegenüber Retrovirusantigenen ein durchaus größeres Repertoire antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen, als die allgemein geschätzten 10-1000 Zellen [26, 29, 32, 104, 160, 164], initial vorhanden sein könnte. Ursächlich dafür kann der hohe Anteil an retroviralen Elementen im Genom [145] bzw. der Einfluss endogener Retroviren [99] sein, welche die retrovirale Immunität vorprägen.

Die transferierten Zellen entwickelten sich in infizierten Mäusen zu hochfunktionalen ZTLs und waren insbesondere im Knochenmark, dem primären Infektionsherd während der akuten Infektion [229], aktiv. Dies hatte jedoch durch den optimierten Zelltransferansatz keinerlei Einfluss auf die natürliche Kinetik der CD8⁺ T-Zellantwort, welche durch den adoptiven Transfer zu vieler Zellen frühzeitig einsetzen kann [13, 197]. Die Funktion der ZTLs konnte indirekt anhand der Anzahl FV-infizierter Zellen nach 6 sowie 10 Tagen nachgewiesen werden, da dieser Wert grundlegend durch ZTLs kontrolliert wird. Hier zeigte sich keine Änderung im Vergleich zwischen Tieren

denen 1000 TCR^{tg} oder 1000 polyklonale CD8⁺ T-Zellen transferiert wurden. Prinzipiell sind die TCR^{tg} Zellen jedoch fähig die Viruslast zu beeinflussen, was sich durch den Transfer von 20.000 FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (entspricht dem 10-fachen der vermuteten endogenen Frequenz) zeigte. Der Transfer von nur 1000 Zellen beeinflusst somit nicht die Viruskontrolle durch das Immunsystem und erlaubt gleichzeitig die intravitale Zwei-Photonenmikroskopie des Knochenmarks unter optimierten Bedingungen. Neue Einblicke in die retrovirale ZTL-Immunität unter physiologischen Infektionsbedingungen sind dadurch möglich.

Motilität virusspezifischer CD8⁺ T-Zellen

Akute retrovirale Infektionen werden durch die zytotoxische Aktivität virusspezifischer CD8⁺ T-Zellen kontrolliert [229]. Im FV-Modell ist die adaptive CD8⁺ T-Zellantwort an Tag 7-8 erstmals messbar und erreicht ihren Höhepunkt an Tag 10, sodass sich die Viruslast nachfolgend deutlich reduziert [230]. Diese Effekte werden einerseits durch die Freisetzung von IFN γ und TNF α , welche die virale Replikation direkt hemmen [198], und andererseits durch die Expression der zytotoxischen Moleküle Granzym A, Granzym B und Perforin in ZTLs vermittelt, welche FV-infizierte Zellen abtöten [225]. Mit dem Beginn der späten akuten Infektionsphase (14 dpi) wird die Funktionalität der ZTLs durch immunsuppressive Mechanismen von Tregs zunehmend eingeschränkt und der Übergang zu einer chronischen Infektion, mit vollständig dysfunktionalen ZTLs, eingeleitet [50, 226, 229].

Für ein besseres Verständnis der ZTL-Funktionalität in den verschiedenen Phasen der akuten Infektion wurde deren Motilität im Knochenmark lebender FV-infizierter Tiere genauer untersucht. Genutzt wurde dazu der etablierte adoptive Zelltransferansatz für TCR^{tg} fluoreszierende CD8⁺ T-Zellen. Zu den betrachteten Zeitpunkten (8, 10 und 14 dpi) änderten sich die Funktionalität der ZTLs [227, 229] ebenso wie deren Motilität (Abb.4.9 und Abb.4.10) erheblich. 10 Tage nach der FV-Infektion konnten die höchsten Bewegungsgeschwindigkeiten und der geringste Anteil unbeweglicher ZTLs gemessen werden. Die Zellen legten zudem die weitesten Strecken zurück und erkundeten ihre Umgebung am intensivsten. Passend dazu exprimieren die CD8⁺ T-Effektorzellen zu diesem Zeitpunkt besonders viel Granzym A und B und eliminieren ihre Zielzellen sehr effizient [227, 229]. In der Frühphase der adaptiven Immunantwort (8 dpi) sowie der späten akuten Infektionsphase (14 dpi), waren dagegen die

Bewegungsgeschwindigkeit, Tracklänge und Umgebungserkundung der ZTLs deutlich reduziert. Dies war mit einer verminderten zytotoxischen Aktivität der CD8⁺ T-Zellen zu diesen Zeitpunkten assoziiert [227, 229]. Diese Ergebnisse, welche eine positive Korrelation zwischen der Bewegungsfähigkeit und der Zytotoxizität der ZTLs *in vivo* zeigen, werden durch *in vitro* Daten einer anderen Studie bestätigt [23]. Weiterhin waren die detektierten Zellgeschwindigkeiten grundsätzlich mit publizierten Daten zum Zelltracking von CD8⁺ T-Zellen im Knochenmark der Calvaria vergleichbar [131].

Die Anzahl an ZTLs, welche langsamer als 2,5 µm/min waren, und sich damit kaum bewegten, war sowohl an Tag 8 als auch Tag 14 erhöht. Einerseits kann dies auf zelluläre Interaktionen hindeuten z.B. mit infizierten Zielzellen oder anderen Zellen, was die CD8⁺ T-Zellen ausbremsen bzw. lange an einem Ort halten würde [81, 134]. Andererseits kann es auch ein Indiz für eine zelluläre Inaktivität sein, z.B. durch Inhibition oder unvollständige Differenzierung. Der Anteil dieser beiden Möglichkeiten lässt sich nicht genau definieren, kann jedoch in Abhängigkeit der Infektionsphase vermutet werden. In der initialen Phase der CD8⁺ T-Zellantwort (8 dpi), in welcher nur wenige ZTLs im Knochenmark aktiv sind, kann die hohe Anzahl infizierter Zellen in Kombination mit einer noch unvollständigen ZTL-Differenzierung ursächlich sein [229]. Die ZTLs bilden zytotoxische Synapsen [42, 54] oder Kinapsen [81, 82, 169] bei noch eingeschränkten Effektorfunktionen, wodurch die Zielzellbeseitigung ineffizient und langsam verläuft [227, 229]. Dadurch können sich viele CD8⁺ T-Zellen vermutlich nur langsam bewegen. Erst mit fortlaufender Differenzierung, nach 6-8 Zellteilungszyklen, entfalten die ZTLs ihr volles zytotoxisches Potential zur Zielzellabtötung [96, 229]. Damit verbunden steigert sich folglich die Motilität der Zellen und der Anteil langsamer ZTLs sinkt, wie an Tag 10 gezeigt werden konnte. An Tag 14 nach der FV-Infektion sind hingegen suppressive Effekte durch Tregs, vermutlich basierend auf direkten zellulären Interaktionen, wahrscheinlich die Ursachen für mehr unbewegliche ZTLs [134, 175, 229]. Rein quantitativ konnten in der späten akuten Infektionsphase mehr ZTLs visualisiert werden als an Tag 10, jedoch war deren Bewegungsfähigkeit sowie Zytotoxizität herabgesetzt, weshalb die Fähigkeit zur Zielzellabtötung vergleichbar zu Tag 10 blieb [229]. Zusammenfassend lässt sich eine positive Korrelation zwischen Motilität und Effektorfunktion bzw. Funktionalität [229] von ZTLs *in vivo* aus den gewonnenen Erkenntnissen ableiten.

Motilität regulatorischer T-Zellen

Die Kontrolle viraler Infektionen wird entscheidend durch die Qualität der ZTL-Antwort bestimmt [167], jedoch können einige Viren diesen Mechanismus umgehen und eine chronische Infektion verursachen [119]. Retroviren induzieren dazu unter anderem die Expansion von immunsuppressiven Tregs, wodurch die antiviralen Effekte von ZTLs inhibiert werden [50, 57, 94, 111, 209]. Im Knochenmark FV-infizierter DREG-Mäuse, welche grün fluoreszierende Tregs besitzen, ließen sich die Bewegungsmuster von Tregs mit Hilfe der intravitalen Zwei-Photonenmikroskopie charakterisieren. Es zeigte sich eine ausgeprägte virusinduzierte Expansion von Tregs ab Tag 14, vermutlich als Reaktion auf die bereits zuvor (10 dpi) stattfindende ZTL-Expansion. In der FV-Infektion exprimieren aktivierte CD8⁺ T-Effektorzellen vermehrt TNF α in der membrangebundenen Form und fördern durch die Bindung dieses Zytokins an den TNFR2 der V β 5⁺ Treg-Population verstärkt deren Proliferation [98, 152]. Weiterhin existiert ein IL-2-abhängiger Proliferationsmechanismus für polyklonale V β 5⁻ Tregs, wobei das IL-2 durch virusspezifische CD4⁺ T-Zellen gebildet wird [88, 97, 152]. Demzufolge sind auch Unterschiede in den Wirkmechanismen der verschiedenen Treg-Subpopulationen denkbar, welche bisher aber nicht beschrieben worden. Die Motilität der Tregs war im Verlauf der akuten Infektion nur initial (8 dpi) geringer, dann aber an Tag 10 und 14 unverändert erhöht, obwohl sich die Anzahl detektierter Tregs von Tag 10 zu Tag 14 fast verdreifachte. Die bekannt starke Suppression von ZTLs durch Tregs an Tag 14 [229] scheint also hauptsächlich mit der Zellzahl zu korrelieren. Die geringe Motilität der Tregs nach 8 Tagen FV-Infektion könnte auf deren unvollständiger Differenzierung beruhen, die bereits in durchflusszytometrischen Studien gezeigt wurde [227]. Ein hoher Anteil von fast unbeweglichen Tregs mit einer Geschwindigkeit langsamer als 2,5 $\mu\text{m}/\text{min}$ (~60 %) unterstützt diese Vermutung. Prinzipiell entsprachen die festgestellten Zellgeschwindigkeiten von Tregs vergleichbaren Analysen im Knochenmark der Calvaria [72]. Die Tracklänge, direkte Trackdistanz und die Track-Geradlinigkeit waren zu allen betrachteten Zeitpunkten ähnlich. Dementsprechend war auch die Umgebungserkundung der Tregs, im Verlauf der akuten FV-Infektion, unverändert. Die Daten lassen, anders als bei den ZTLs, vor allem numerisch bedingte Effekte von Tregs vermuten, wobei deren Motilität nur eine nachgeordnete Rolle einzunehmen scheint. Eine positive Korrelation zwischen der Anzahl an Tregs und der gesamten Suppressionsstärke *in vivo* ist daher anzunehmen. Bestätigen lässt sich dies durch bereits publizierte Daten [227, 229].

Interaktion virusspezifischer CD8⁺ T-Zellen und regulatorischer T-Zellen

ZTLs und Tregs beeinflussen sich gegenseitig im Verlauf der akuten FV-Infektion [88]. Zunächst fördern die aktivierten CD8⁺ T-Effektorzellen die Treg-Expansion und anschließend supprimieren die Tregs wiederum die ZTL-Funktion, wobei die genauen Mechanismen dieses komplexen Wechselspiels nicht vollends verstanden sind [88]. Beide Zellpopulationen wurden daher im Knochenmark lebender FV-infizierter Mäuse visualisiert und deren Interaktion studiert. Insbesondere in der späten akuten Infektionsphase (14 dpi), in welcher eine Vielzahl an ZTLs und Tregs beobachtet werden konnten, zeigten sich viele zelluläre Interaktionen. Diese Beobachtung entsprach *in vitro* Experimenten, welche eine direkte APC-unabhängige Interaktion zwischen Tregs und ZTLs, als Grundlage der Treg-vermittelten ZTL-Suppression, im FV-Modell beschrieben haben [175]. *In vivo* zeigten sich dynamische zelluläre Kontakte von nur 2-3 min Dauer, sodass keine gemeinsame Migration beider Zellen beobachtbar war. Passend dazu zeigten Untersuchungen in Tumor-drainierenden Lymphknoten, dass kurzzeitige Treg-ZTL-Kontakte von wenigen Minuten Dauer ausreichen, um eine Treg-vermittelte Suppression zu vermitteln [134]. Der direkte Zellkontakt scheint im FV-Modell anteilig zur Suppression der ZTLs beizutragen, jedoch ist noch unklar ob nur einer oder mehrere Treg-ZTL-Kontakte dafür notwendig sind. Denkbar ist ein direkter Zellkontakt über membrangebundenes TGFβ auf der Zelloberfläche von Tregs [155], die Ausbildung von *gap junctions* zur Übertragung von cAMP [28, 210] oder eine Interaktion über einen noch nicht beschriebenen Mechanismus zur Suppression der ZTLs. Auch ein Abtöten von ZTLs durch Granzym-produzierende Tregs ist beschrieben worden [213], welches ebenfalls auf einem direkten Zellkontakt zu beruhen schien [75, 77]. Dieser Mechanismus konnte jedoch in vielen Tumor- und Infektionsmodellen nicht bestätigt werden. Nach der bisher rein visuellen Beobachtung von Zellkontakten ließen sich im nächsten Schritt funktionelle Treg-ZTL-Kontakt mit Hilfe genetisch kodierter Calcium-Indikatoren nachweisen [59, 146].

Bedeutend könnten beispielsweise auch indirekte Effekte der Tregs auf die CD8⁺ T-Effektorzellen durch Treg-vermittelte Konditionierungsprozesse von APCs sein. Eine ZTL-Aktivierung durch solche APCs induzierte in einem Tumormodell die vermehrte Expression der inhibitorischen Rezeptoren TIM3 (*T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*) und PD1 auf den Effektorzellen [17]. Insbesondere PD1, aber auch TIM3, ist auf ZTLs während einer akuten FV-Infektion vermehrt zu finden [230]

(Abb.4.3 und Abb.4.4), wobei nicht bekannt ist, ob dies auch durch APCs induziert wird. Passend dazu ist im FV-Modell eine vermehrte Expression von PD-L1, dem Liganden von PD1, auf infizierten Zellen festzustellen [3]. Eine virale Evasionsstrategie, welche den Wirkmechanismus der Tregs ergänzt und verstärkt. Die hemmenden Rezeptoren TIM3 und LAG3 werden ebenfalls von PD1⁺ ZTLs verstärkt exprimiert, sodass davon auszugehen ist, dass die ZTL-Antwort während der FV-Infektion stark von inhibitorischen Rezeptoren moduliert wird [230].

Es ist möglich, dass die suppressive Wirkung von Tregs auf einer Beteiligung verschiedener Mechanismen basiert. Einerseits umfasst dies vermutlich direkte Zellkontakte und andererseits die Etablierung eines immunsuppressiven Milieus, welches von Tregs induziert wird [213]. Ein hemmender Effekt durch die inhibitorischen Zytokine IL-10 und TGF β konnte allerdings in der FV-Infektion ausgeschlossen werden [97, 175]. Suppressierende Effekte von Adenosin, welches durch die Ektoenzyme CD39 und CD73 auf Tregs produziert wird, konnten bei HIV-Infektionen beschrieben werden [158] und sind daher auch im FV-Modell möglich. Gleiches gilt für das immunsuppressive cAMP [180, 210, 216], dessen Übertragung durch *gap junctions* erfolgt [144] und eines direkten Zellkontakts zwischen Treg und ZTL bedarf, wie er in dieser Arbeit gezeigt wird.

Motilität virusspezifischer CD8⁺ T-Zellen nach Depletion regulatorischer T-Zellen

Um die supprimierenden Effekte von Tregs auf die Motilität von ZTLs zu verstehen, wurden ZTLs nach Treg-Depletion *in vivo* analysiert. Eingesetzt wurden dazu DEREK-Mäuse, welche eine vorübergehende Depletion von Tregs erlauben, ohne eine Immunpathologie zu verursachen [37, 113]. Hierbei handelt es sich um ein bereits vielfach genutztes Modell zur Treg-Erforschung während einer FV-Infektion [2, 46, 47, 122, 129, 228, 229, 231]. Beobachtet wurden ZTLs ohne Tregs in der frühen (8 dpi) und späten akuten Phase (14 dpi) der FV-Infektion, d.h. in einer Phase mit kaum messbarer bzw. sehr starker Treg-vermittelter Suppression [229]. Erwartungsgemäß zeigte sich an Tag 14 eine Steigerung der ZTL-Motilität bei Treg-Abwesenheit, wohingegen an Tag 8 kaum Veränderungen im Knochenmark messbar waren. Passend dazu verbessert eine Treg-Depletion während der späten akuten Infektionsphase die Zytotoxizität und Effizienz der Zielzellabtötung [229]. Die Treg-Depletion 14 Tage nach Infektion resultiert in einer erhöhten Anzahl, Geschwindigkeit

und Umgebungserkundung der ZTLs verglichen mit der Normalsituation. Das beweist, dass die Tregs das Bewegungspotential der ZTLs signifikant beeinflussen, was wiederum mit der gesteigerten Funktionalität der Zellen im FV-Modell korreliert. Unterstützt wird diese Aussage durch einen reduzierten Anteil unbeweglicher ZTLs nach Treg-Entfernung. Vergleichbare Ergebnisse lieferte auch eine andere Studie, welche zeigte, dass ZTLs ohne Treg-Regulation 6,6-fach schneller ihre Zielzellen abtöten können [134].

An Tag 8 stieg der Anteil kaum beweglicher ZTLs um ~7 % nach DT-Gabe, was vermuten lässt, dass Tregs bereits in der frühen Infektionsphase die Differenzierung von ZTLs beeinflussen. Grundsätzlich entsprach das Bewegungsprofil der CD8⁺ T-Effektorzellen an Tag 14 nach Treg-Depletion tendenziell eher 10 dpi, dem Zeitpunkt der stärksten ZTL-Aktivität während der Infektion. Zu diesem Zeitpunkt kommen 10 ZTLs auf nur 1 Treg, was vermutlich ein wichtiger numerischer Faktor für die ZTL-Aktivität ist. Allerdings haben auch hier Tregs schon eine supprimierende Wirkung, denn vergleichbare Treg-Depletionsexperimente führen bereits an Tag 10 zu einer gesteigerten Aktivierung und Funktionalität der ZTLs sowie reduzierten Viruslasten [228, 229, 231].

Ein Problem des DEREK-Mausmodells ist die Entwicklung einer Foxp3⁺ EGFP⁻ Treg-Population, welche sich nach vier Tagen DT-Behandlung ausbildet [37]. Dementsprechend wird nach DT-Gabe eine Situation mit verminderter Treg-Anzahl und nicht mit vollständiger Treg-Eliminierung erzeugt [37], was jedoch in unserem Modell ausreichte, um biologische Effekte auszulösen. Kompensatorische Mechanismen durch andere immunsuppressive Zellpopulationen wie z.B. MDSCs könnten allerdings ebenfalls die ZTL-Antwort nach Treg-Depletion beeinflussen [52].

Treg-Depletionsversuche während der chronischen FV-Infektion führten zu einer Reaktivierung der virusspezifischen CD8⁺ T-Zellen und einer verminderten Anzahl infizierter Zellen [46, 47], was zeigt dass dieser Ansatz auch therapeutisch verwendet werden kann. Ein besseres Verständnis der Interaktion von Tregs und ZTLs während einer Infektion ist daher von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung neuer Immuntherapien in chronischen Virusinfektionen.

FV-infizierte Zellen

Der Einsatz modifizierter visualisierbarer Retroviren in Kombination mit der intravitalem Zwei-Photonenmikroskopie hat sich bewährt und ermöglichte Einblicke in Mechanismen, wie die Ausbreitung und zelluläre Übertragung der Viren [188-190]. Bezogen auf das FV-Modell wurden FV-infizierte Zellen für ein besseres Verständnis der ZTL-Antwort in einer lebenden Maus dargestellt. Genutzt wurde dazu FV-mWasabi, ein modifiziertes FV, welches die infizierten Zellen grün fluoreszieren lässt [219]. Eine FV-Infektion induziert in der akuten Infektionsphase vor allem im Knochenmark erhöhte Viruslasten und folglich eine ausgeprägte ZTL-Antwort [229], was mikroskopisch untersucht wurde. FV-mWasabi erwies sich als geeignet für die Zwei-Photonenmikroskopie-Anwendungen und zeigte die Bildung großer Cluster aus infizierten Zellen in der frühen akuten Infektion (8 dpi), welche dann von ZTLs infiltriert wurden. Durch die initial starke Erythroblasten-Proliferation nach einer FV-Infektion ist anzunehmen, dass die Foki primär aus infizierten erythroiden Vorläuferzellen bestehen [3, 49, 219]. Die kompakten Cluster könnten anfänglich die ZTL-Infiltration erschweren und neben der unvollständigen ZTL-Differenzierung, zu der verminderten ZTL-Motilität an Tag 8 beitragen. In der späten akuten Infektionsphase (14 dpi) waren nur noch vereinzelte infizierte Zellen umgeben von vielen ZTLs detektierbar. Ein Großteil der infizierten Erythroblasten wurde zu diesem Zeitpunkt bereits durch ZTLs abgetötet, sodass das Virus jetzt vor allem in infizierten myeloiden Zellen und B-Zellen vorliegt [219], die sich durch die Expression von inhibitorischen Liganden der Abtötung durch ZTL entziehen [3].

Der Einsatz von DEREK-Mäusen erlaubte die simultane Visualisierung von Tregs, ZTLs und FV-infizierten Zellen, jedoch wies dieses System bedingt durch die ähnlichen Fluoreszenzproteine mWasabi und EGFP Nachteile für die Datenanalyse auf. Zur Lösung dieses Problems wurde die Herstellung eines neuen mit TurboFP650 modifizierten FV begonnen, welches eine gemeinsame und unterscheidbare Analyse aller drei Zellpopulationen ermöglichen soll.

Ausblick

Der gewählte Ansatz zur Visualisierung von Tregs und ZTLs im Verlauf einer retroviralen Infektion ermöglicht ein grundlegendes Verständnis über die Interaktion und Motilität beider Zellpopulationen *in vivo*. Weiterhin gestattet das flexible physiologische System vielfältige immunologische Modulationen, dessen Effekte direkt *in vivo* beobachtet werden können. Dies ist enorm vorteilhaft, da neben der bereits gezeigten Treg-Depletion gezielte Behandlungen zur Hemmung der Tregs oder Stimulation der ZTLs eingesetzt und charakterisiert werden können. Insbesondere die Modulation von Immuncheckpoints, welche grundlegend die Aktivität von T-Zellen regulieren [55], ist dabei von großem Interesse.

Potentielle Zielstrukturen zur Inhibition der Tregs sind beispielsweise GITR [50, 192] oder MIF (*macrophage migration inhibitory factor*) [36]. Weitere Ansatzpunkte bilden die Blockierung des TNFR2, ein bedeutender Rezeptor für die Treg-Proliferation [98], oder von CD39 sowie CD73, welche als Ektoenzyme das inhibitorisch wirkende Adenosin produzieren [43]. Zur Stimulation der ZTLs können agonistisch wirkende AK gegenüber kostimulatorischen Molekülen z.B. CD137 [177] oder blockende AK für inhibierende Rezeptoren wie PD1, TIM3, LAG3 oder CTLA4 angewendet werden um deren Aktivität zu verbessern [163]. Alternativ können auch Liganden der Immuncheckpoint-Inhibitoren geblockt werden z.B. PD-L1 [8]. Diese Behandlungen könnten weiterführend in verschiedenen Kombinationen getestet werden, um gesteigerte biologische Effekte zu erzielen [25] und die beste Behandlungsstrategie bestimmen zu können. Aufschluss darüber geben Änderungen der Motilität und Interaktion von ZTLs und Tregs, welche *in vivo* mit Hilfe der Zwei-Photonenmikroskopie gemessen werden können. Neben der Modulation des Immunsystems können mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Methode (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) [127] die TCR^{tg} CD8⁺ T-Zellen vor dem adoptiven Zelltransfer genetisch modifiziert werden [187]. Proteine, welche im Zusammenhang mit einer Funktionalitätseinschränkung der ZTLs stehen, könnten dadurch gezielt verändert oder entfernt werden. Denkbar wären beispielsweise eine Modifikation des Adenosinrezeptors A2A [60], der cAMP-Sensibilität z.B. durch Veränderung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A [144, 180, 216] oder der inhibitorischen Rezeptoren z.B. PD1 und TIM3 [163]. Für ein besseres Verständnis der Immunmodulationen werden auch FV-infizierte Zellen neben den Tregs und ZTLs, durch den Einsatz von FV-TurboFP650, gleichzeitig darstellbar sein. Grundlegende

Einblicke in die ZTL-vermittelte Abtötung Retrovirus-infizierter Zellen *in vivo* und direkte Aussagen über die Effizienz der eingesetzten Immuntherapie werden dadurch möglich. Parameter wie die Geschwindigkeiten der ZTLs mit und ohne Kontakt zu infizierten Zellen, die Zeit für die Zellyse, die Anzahl dafür notwendiger ZTL-Kontakte sowie die Anzahl infizierter Zellen, welche durch eine ZTL in einem definierten Zeitraum abgetötet werden, können sowohl mit als auch ohne immunologische Modifikationen ermittelt werden.

Grundsätzlich ist der gezeigte Ansatz nicht auf das FV-Modell limitiert, sondern flexibel auf andere Infektions- oder Tumormodelle übertragbar. Nach Anpassungen ließen sich vergleichbare Studien unter physiologischen Bedingungen auch in anderen Organen intravital untersuchen [20]. Notwendig sind lediglich TCR^{tg} fluoreszierende CD8⁺ T-Zellen für den Zelltransfer. Ein großer Vorteil ist die reproduzierbare Wiederverwendbarkeit der CD8⁺ T-Zellspendertiere, was auf Dauer speziell bei komplexen transgenen Mausmodellen zu einer deutlichen Reduktion der benötigten Tierzahlen beitragen kann. Weiterhin eröffnet der Zelltransferansatz für TCR^{tg} CD8⁺ T-Zellen zusätzlich viele neue Möglichkeiten für ein besseres Verständnis der grundlegenden CD8⁺ T-Zellimmunologie. Vorstellbar ist beispielsweise die Testung von Zellen eines Spendertieres vor und nach immunmodulatorischem Stress [71], die vergleichende Nutzung eines jungen und alten Spendertieres oder die Verwendung von Spendermäusen mit definierten genetischen Mutationen.

Die gewonnenen Erkenntnisse bestätigen die Bedeutung von Tregs für die Ausbildung chronischer Infektionen [119]. Tregs und ZTLs interagieren über direkte Zellkontakte miteinander, wodurch die ZTLs vermutlich supprimiert werden. Weitere inhibierende Effekte, beispielsweise durch sekretierte Faktoren oder indirekt durch DCs, sind bedingt durch die Vielfalt von Treg-Funktionen [213] ebenfalls möglich. Die Tregs vermindern die ZTL-Motilität, was wiederum mit der ZTL-Funktionalität korreliert und fördern somit die Ausbildung dysfunktionaler, für eine chronische Infektion typischer, ZTLs [101]. Basierend auf diesem Wissen und dem Potential des etablierten Modells sind vielversprechende Möglichkeiten für innovative Behandlungsstrategien zu erwarten. Neue Treg- oder ZTL-basierte Immuntherapien für retrovirale Infektionen sowie andere chronische virale Infektionen könnten daraus hervorgehen.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y. and Nalbant, A., Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol* 2017. 37: 163-176.
- 2 Akhmetzyanova, I., Zelinsky, G., Schimmer, S., Brandau, S., Altenhoff, P., Sparwasser, T. and Dittmer, U., Tumor-specific CD4+ T cells develop cytotoxic activity and eliminate virus-induced tumor cells in the absence of regulatory T cells. *Cancer Immunol Immunother* 2013. 62: 257-271.
- 3 Akhmetzyanova, I., Drabczyk, M., Neff, C. P., Gibbert, K., Dietze, K. K., Werner, T., Liu, J., Chen, L., Lang, K. S., Palmer, B. E. *et al.*, PD-L1 Expression on Retrovirus-Infected Cells Mediates Immune Escape from CD8+ T Cell Killing. *PLoS Pathog* 2015. 11: e1005224.
- 4 Akhmetzyanova, I., Zelinsky, G., Littwitz-Salomon, E., Malyshkina, A., Dietze, K. K., Streeck, H., Brandau, S. and Dittmer, U., CD137 Agonist Therapy Can Reprogram Regulatory T Cells into Cytotoxic CD4+ T Cells with Antitumor Activity. *J Immunol* 2016. 196: 484-492.
- 5 Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O., Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006. 124: 783-801.
- 6 Aktas, E., Kucuksezer, U. C., Bilgic, S., Erten, G. and Deniz, G., Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cellular Immunology* 2009. 254: 149-154.
- 7 Albritton, L. M., Tseng, L., Scadden, D. and Cunningham, J. M., A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *Cell* 1989. 57: 659-666.
- 8 Alsaab, H. O., Sau, S., Alzhrani, R., Tatiparti, K., Bhise, K., Kashaw, S. K. and Iyer, A. K., PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front Pharmacol* 2017. 8: 561.
- 9 Antunes, I., Tolaini, M., Kissenpfennig, A., Iwashiro, M., Kuribayashi, K., Malissen, B., Hasenkrug, K. and Kassiotis, G., Retrovirus-specificity of regulatory T cells is neither present nor required in preventing retrovirus-induced bone marrow immune pathology. *Immunity* 2008. 29: 782-794.
- 10 Appay, V. and Rowland-Jones, S. L., RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol* 2001. 22: 83-87.
- 11 Artis, D. and Spits, H., The biology of innate lymphoid cells. *Nature* 2015. 517: 293-301.
- 12 Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L. and Powrie, F., An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 1999. 190: 995-1004.

- 13 Badovinac, V. P., Haring, J. S. and Harty, J. T., Initial T cell receptor transgenic cell precursor frequency dictates critical aspects of the CD8(+) T cell response to infection. *Immunity* 2007. 26: 827-841.
- 14 Barouch, D. H., Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature* 2008. 455: 613-619.
- 15 Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C. *et al.*, Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983. 220: 868-871.
- 16 Barre-Sinoussi, F., Ross, A. L. and Delfraissy, J. F., Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat Rev Microbiol* 2013. 11: 877-883.
- 17 Bauer, C. A., Kim, E. Y., Marangoni, F., Carrizosa, E., Claudio, N. M. and Mempel, T. R., Dynamic Treg interactions with intratumoral APCs promote local CTL dysfunction. *J Clin Invest* 2014. 124: 2425-2440.
- 18 Becerra, J. C., Bildstein, L. S. and Gach, J. S., Recent Insights into the HIV/AIDS Pandemic. *Microb Cell* 2016. 3: 451-475.
- 19 Belkaid, Y., Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 2007. 7: 875-888.
- 20 Benechet, A. P., Menon, M. and Khanna, K. M., Visualizing T Cell Migration in situ. *Front Immunol* 2014. 5: 363.
- 21 Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., Kelly, T. E., Saulsbury, F. T., Chance, P. F. and Ochs, H. D., The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001. 27: 20-21.
- 22 Beuneu, H., Lemaitre, F., Deguine, J., Moreau, H. D., Bouvier, I., Garcia, Z., Albert, M. L. and Bousso, P., Visualizing the functional diversification of CD8(+) T cell responses in lymph nodes. *Immunity* 2010. 33: 412-423.
- 23 Bhat, P., Leggatt, G., Matthaei, K. I. and Frazer, I. H., The Kinematics of Cytotoxic Lymphocytes Influence Their Ability to Kill Target Cells. *PLoS One* 2014. 9.
- 24 Bishop, G. A., B cell-T cell interaction: antigen bridge to antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 2016. 16: 467.
- 25 Blackburn, S. D., Shin, H., Haining, W. N., Zou, T., Workman, C. J., Polley, A., Betts, M. R., Freeman, G. J., Vignali, D. A. and Wherry, E. J., Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* 2009. 10: 29-37.
- 26 Blattman, J. N., Antia, R., Sourdive, D. J., Wang, X., Kaech, S. M., Murali-Krishna, K., Altman, J. D. and Ahmed, R., Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J Exp Med* 2002. 195: 657-664.

- 27 Boettler, T., Spangenberg, H. C., Neumann-Haefelin, C., Panther, E., Urbani, S., Ferrari, C., Blum, H. E., von Weizsacker, F. and Thimme, R., T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005. 79: 7860-7867.
- 28 Bopp, T., Becker, C., Klein, M., Klein-Hessling, S., Palmetshofer, A., Serfling, E., Heib, V., Becker, M., Kubach, J., Schmitt, S. *et al.*, Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 2007. 204: 1303-1310.
- 29 Bousoo, P., Casrouge, A., Altman, J. D., Haury, M., Kanellopoulos, J., Abastado, J. P. and Kourilsky, P., Individual variations in the murine T cell response to a specific peptide reflect variability in naive repertoires. *Immunity* 1998. 9: 169-178.
- 30 Cao, X., Cai, S. F., Fehniger, T. A., Song, J., Collins, L. I., Pivnicka-Worms, D. R. and Ley, T. J., Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 2007. 27: 635-646.
- 31 Carter, J. B. and Saunders, V. A., *Virology - Principles and Applications*. Wiley, West Sussex: 2007.
- 32 Casrouge, A., Beaudoin, E., Dalle, S., Pannetier, C., Kanellopoulos, J. and Kourilsky, P., Size estimate of the alpha beta TCR repertoire of naive mouse splenocytes. *J Immunol* 2000. 164: 5782-5787.
- 33 Chen, W., Liang, X., Peterson, A. J., Munn, D. H. and Blazar, B. R., The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J Immunol* 2008. 181: 5396-5404.
- 34 Chesebro, B., Miyazawa, M. and Britt, W. J., Host genetic control of spontaneous and induced immunity to Friend murine retrovirus infection. *Annu Rev Immunol* 1990. 8: 477-499.
- 35 Chinen, T., Kannan, A. K., Levine, A. G., Fan, X., Klein, U., Zheng, Y., Gasteiger, G., Feng, Y., Fontenot, J. D. and Rudensky, A. Y., An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nat Immunol* 2016. 17: 1322-1333.
- 36 Choi, S., Kim, H. R., Leng, L., Kang, I., Jorgensen, W. L., Cho, C. S., Bucala, R. and Kim, W. U., Role of macrophage migration inhibitory factor in the regulatory T cell response of tumor-bearing mice. *J Immunol* 2012. 189: 3905-3913.
- 37 Christiaansen, A. F., Boggiatto, P. M. and Varga, S. M., Limitations of Foxp3(+) Treg depletion following viral infection in DREG mice. *J Immunol Methods* 2014. 406: 58-65.
- 38 Coffin, J. M. and Fan, H., The Discovery of Reverse Transcriptase. *Annu Rev Virol* 2016. 3: 29-51.

- 39 Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R. S. and Vignali, D. A., The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007. 450: 566-569.
- 40 Constantin, C. M., Bonney, E. E., Altman, J. D. and Strickland, O. L., Major histocompatibility complex (MHC) tetramer technology: an evaluation. *Biol Res Nurs* 2002. 4: 115-127.
- 41 Dalgleish, A. G., Beverley, P. C. L., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F. and Weiss, R. A., The Cd4 (T4) Antigen Is an Essential Component of the Receptor for the Aids Retrovirus. *Nature* 1984. 312: 763-767.
- 42 de la Roche, M., Asano, Y. and Griffiths, G. M., Origins of the cytolytic synapse. *Nat Rev Immunol* 2016. 16: 421-432.
- 43 Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J. F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M. *et al.*, Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 2007. 204: 1257-1265.
- 44 Deguine, J., Breart, B., Lemaitre, F., Di Santo, J. P. and Bousso, P., Intravital imaging reveals distinct dynamics for natural killer and CD8(+) T cells during tumor regression. *Immunity* 2010. 33: 632-644.
- 45 Denton, P. W. and Garcia, J. V., Mucosal HIV-1 transmission and prevention strategies in BLT humanized mice. *Trends Microbiol* 2012. 20: 268-274.
- 46 Dietze, K. K., Zelinsky, G., Gibbert, K., Schimmer, S., Francois, S., Myers, L., Sparwasser, T., Hasenkrug, K. J. and Dittmer, U., Transient depletion of regulatory T cells in transgenic mice reactivates virus-specific CD8+ T cells and reduces chronic retroviral set points. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011. 108: 2420-2425.
- 47 Dietze, K. K., Zelinsky, G., Liu, J., Kretzmer, F., Schimmer, S. and Dittmer, U., Combining regulatory T cell depletion and inhibitory receptor blockade improves reactivation of exhausted virus-specific CD8+ T cells and efficiently reduces chronic retroviral loads. *PLoS Pathog* 2013. 9: e1003798.
- 48 Dittmer, U. and Hasenkrug, K. J., Cellular and molecular mechanisms of vaccine-induced protection against retroviral infections. *Curr Mol Med* 2001. 1: 431-436.
- 49 Dittmer, U., Race, B., Peterson, K. E., Stromnes, I. M., Messer, R. J. and Hasenkrug, K. J., Essential roles for CD8(+) T cells and gamma interferon in protection of mice against retrovirus-induced immunosuppression. *J Virol* 2002. 76: 450-454.
- 50 Dittmer, U., He, H., Messer, R. J., Schimmer, S., Olbrich, A. R., Ohlen, C., Greenberg, P. D., Stromnes, I. M., Iwashiro, M., Sakaguchi, S. *et al.*, Functional impairment of CD8(+) T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection. *Immunity* 2004. 20: 293-303.

- 51 Doig, D. and Chesebro, B., Anti-Friend virus antibody is associated with recovery from viremia and loss of viral leukemia cell-surface antigens in leukemic mice. Identification of Rfv-3 as a gene locus influencing antibody production. *J Exp Med* 1979. 150: 10-19.
- 52 Drabczyk-Pluta, M., Werner, T., Hoffmann, D., Leng, Q., Chen, L., Dittmer, U. and Zelinsky, G., Granulocytic myeloid-derived suppressor cells suppress virus-specific CD8(+) T cell responses during acute Friend retrovirus infection. *Retrovirology* 2017. 14: 42.
- 53 DuPage, M. and Bluestone, J. A., Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease. *Nat Rev Immunol* 2016. 16: 149-163.
- 54 Dustin, M. L. and Long, E. O., Cytotoxic immunological synapses. *Immunol Rev* 2010. 235: 24-34.
- 55 Dyck, L. and Mills, K. H. G., Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *Eur J Immunol* 2017. 47: 765-779.
- 56 Eickhoff, S., Brewitz, A., Gerner, M. Y., Klauschen, F., Komander, K., Hemmi, H., Garbi, N., Kaisho, T., Germain, R. N. and Kastenmuller, W., Robust Anti-viral Immunity Requires Multiple Distinct T Cell-Dendritic Cell Interactions. *Cell* 2015. 162: 1322-1337.
- 57 Estes, J. D., Li, Q. S., Reynolds, M. R., Wietgreffe, S., Duan, L. J., Schacker, T., Picker, L. J., Watkins, D. I., Lifson, J. D., Reilly, C. *et al.*, Premature induction of an immunosuppressive regulatory T cell response during acute simian immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 2006. 193: 703-712.
- 58 Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K. W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Fioretti, M. C., Alegre, M. L. and Puccetti, P., Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003. 4: 1206-1212.
- 59 Feske, S., Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol* 2007. 7: 690-702.
- 60 Fishman, P., Bar-Yehuda, S., Synowitz, M., Powell, J. D., Klotz, K. N., Gessi, S. and Borea, P. A., Adenosine receptors and cancer. *Handb Exp Pharmacol* 2009: 399-441.
- 61 Fontenot, J. D., Gavin, M. A. and Rudensky, A. Y., Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003. 4: 330-336.
- 62 Franzese, O., Kennedy, P. T., Gehring, A. J., Gotto, J., Williams, R., Maini, M. K. and Bertoletti, A., Modulation of the CD8+-T-cell response by CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection. *J Virol* 2005. 79: 3322-3328.
- 63 Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C. *et al.*, Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000. 192: 1027-1034.

- 64 Friedl, P., Wolf, K., von Andrian, U. H. and Harms, G., Biological second and third harmonic generation microscopy. *Curr Protoc Cell Biol* 2007. Chapter 4: Unit 4 15.
- 65 Friend, C., Cell-free transmission in adult Swiss mice of a disease having the character of a leukemia. *J Exp Med* 1957. 105: 307-318.
- 66 Gadjeva, M., The complement system. Overview. *Methods Mol Biol* 2014. 1100: 1-9.
- 67 Garin, M. I., Chu, C. C., Golshayan, D., Cernuda-Morollon, E., Wait, R. and Lechler, R. I., Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 2007. 109: 2058-2065.
- 68 Gasteiger, G., Ataide, M. and Kastenmuller, W., Lymph node - an organ for T-cell activation and pathogen defense. *Immunol Rev* 2016. 271: 200-220.
- 69 Germain, R. N., MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 1994. 76: 287-299.
- 70 Germain, R. N., Robey, E. A. and Cahalan, M. D., A decade of imaging cellular motility and interaction dynamics in the immune system. *Science* 2012. 336: 1676-1681.
- 71 Giovanoli, S., Engler, H., Engler, A., Richetto, J., Voget, M., Willi, R., Winter, C., Riva, M. A., Mortensen, P. B., Feldon, J. *et al.*, Stress in puberty unmasks latent neuropathological consequences of prenatal immune activation in mice. *Science* 2013. 339: 1095-1099.
- 72 Glatman Zaretsky, A., Konradt, C., Depis, F., Wing, J. B., Goenka, R., Atria, D. G., Silver, J. S., Cho, S., Wolf, A. I., Quinn, W. J. *et al.*, T Regulatory Cells Support Plasma Cell Populations in the Bone Marrow. *Cell Rep* 2017. 18: 1906-1916.
- 73 Goff, S. P., Retrovirus restriction factors. *Mol Cell* 2004. 16: 849-859.
- 74 Goila-Gaur, R. and Strebel, K., HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. *Retrovirology* 2008. 5: 51.
- 75 Gondek, D. C., Lu, L. F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S. and Noelle, R. J., Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 2005. 174: 1783-1786.
- 76 Griffiths, D. J., Endogenous retroviruses in the human genome sequence. *Genome Biol* 2001. 2: REVIEWS1017.
- 77 Grossman, W. J., Verbsky, J. W., Tollefsen, B. L., Kemper, C., Atkinson, J. P. and Ley, T. J., Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* 2004. 104: 2840-2848.

- 78 Grupillo, M., Lakomy, R., Geng, X., Styche, A., Rudert, W. A., Trucco, M. and Fan, Y., An improved intracellular staining protocol for efficient detection of nuclear proteins in YFP-expressing cells. *Biotechniques* 2011. 51: 417-420.
- 79 Hahn, B. H., Shaw, G. M., De Cock, K. M. and Sharp, P. M., AIDS - AIDS as a zoonosis: Scientific and public health implications. *Science* 2000. 287: 607-614.
- 80 Halemano, K., Harper, M. S., Guo, K. J., Li, S. X., Heilman, K. J., Barrett, B. S. and Santiago, M. L., Humoral immunity in the Friend retrovirus infection model. *Immunol Res* 2013. 55: 249-260.
- 81 Halle, S., Keyser, K. A., Stahl, F. R., Busche, A., Marquardt, A., Zheng, X., Galla, M., Heissmeyer, V., Heller, K., Boelter, J. *et al.*, In Vivo Killing Capacity of Cytotoxic T Cells Is Limited and Involves Dynamic Interactions and T Cell Cooperativity. *Immunity* 2016. 44: 233-245.
- 82 Halle, S., Halle, O. and Forster, R., Mechanisms and Dynamics of T Cell-Mediated Cytotoxicity In Vivo. *Trends Immunol* 2017. 38: 432-443.
- 83 Hasenkrug, K. J. and Chesebro, B., Immunity to retroviral infection: the Friend virus model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997. 94: 7811-7816.
- 84 Hasenkrug, K. J., Brooks, D. M. and Dittmer, U., Critical role for CD4(+) T cells in controlling retrovirus replication and spread in persistently infected mice. *J Virol* 1998. 72: 6559-6564.
- 85 Hasenkrug, K. J., Lymphocyte deficiencies increase susceptibility to friend virus-induced erythroleukemia in Fv-2 genetically resistant mice. *J Virol* 1999. 73: 6468-6473.
- 86 Hasenkrug, K. J. and Dittmer, U., The role of CD4 and CD8 T cells in recovery and protection from retroviral infection: lessons from the Friend virus model. *Virology* 2000. 272: 244-249.
- 87 Hasenkrug, K. J. and Dittmer, U., Immune control and prevention of chronic Friend retrovirus infection. *Front Biosci* 2007. 12: 1544-1551.
- 88 Hasenkrug, K. J., Chougnet, C. A. and Dittmer, U., Regulatory T cells in retroviral infections. *PLoS Pathog* 2018. 14: e1006776.
- 89 Hatzioannou, T. and Evans, D. T., Animal models for HIV/AIDS research. *Nat Rev Microbiol* 2012. 10: 852-867.
- 90 Hemelaar, J., The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med* 2012. 18: 182-192.
- 91 Hoofnagle, J. H. and Seeff, L. B., Peginterferon and ribavirin for chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 2006. 355: 2444-2451.
- 92 Hori, S., Nomura, T. and Sakaguchi, S., Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003. 299: 1057-1061.

- 93 Huang, C. T., Workman, C. J., Flies, D., Pan, X., Marson, A. L., Zhou, G., Hipkiss, E. L., Ravi, S., Kowalski, J., Levitsky, H. I. *et al.*, Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 2004. 21: 503-513.
- 94 Iwashiro, M., Messer, R. J., Peterson, K. E., Stromnes, I. M., Sugie, T. and Hasenkrug, K. J., Immunosuppression by CD4+ regulatory T cells induced by chronic retroviral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001. 98: 9226-9230.
- 95 Iwashiro, M., Peterson, K., Messer, R. J., Stromnes, I. M. and Hasenkrug, K. J., CD4(+) T cells and gamma interferon in the long-term control of persistent friend retrovirus infection. *J Virol* 2001. 75: 52-60.
- 96 Jenkins, M. R., Mintern, J., La Gruta, N. L., Kedzierska, K., Doherty, P. C. and Turner, S. J., Cell cycle-related acquisition of cytotoxic mediators defines the progressive differentiation to effector status for virus-specific CD8(+) T cells. *J Immunol* 2008. 181: 3818-3822.
- 97 Joedicke, J. J., Dietze, K. K., Zelinskyy, G. and Dittmer, U., The phenotype and activation status of regulatory T cells during Friend retrovirus infection. *Virology* 2014. 29: 48-60.
- 98 Joedicke, J. J., Myers, L., Carmody, A. B., Messer, R. J., Wajant, H., Lang, K. S., Lang, P. A., Mak, T. W., Hasenkrug, K. J. and Dittmer, U., Activated CD8+ T cells induce expansion of Vbeta5+ regulatory T cells via TNFR2 signaling. *J Immunol* 2014. 193: 2952-2960.
- 99 Johnson, W. E., Endogenous Retroviruses in the Genomics Era. *Annu Rev Virol* 2015. 2: 135-159.
- 100 Jordan, M. S., Boesteanu, A., Reed, A. J., Petrone, A. L., Hohenbeck, A. E., Lerman, M. A., Najj, A. and Caton, A. J., Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2001. 2: 301-306.
- 101 Kahan, S. M., Wherry, E. J. and Zajac, A. J., T cell exhaustion during persistent viral infections. *Virology* 2015. 479-480: 180-193.
- 102 Karpel, M. E., Boutwell, C. L. and Allen, T. M., BLT humanized mice as a small animal model of HIV infection. *Curr Opin Virol* 2015. 13: 75-80.
- 103 Kaulfuss, M., Wensing, I., Windmann, S., Hrycak, C. P. and Bayer, W., Induction of complex immune responses and strong protection against retrovirus challenge by adenovirus-based immunization depends on the order of vaccine delivery. *Retrovirology* 2017. 14: 8.
- 104 Kedzierska, K., Day, E. B., Pi, J., Heard, S. B., Doherty, P. C., Turner, S. J. and Perlman, S., Quantification of repertoire diversity of influenza-specific epitopes with predominant public or private TCR usage. *J Immunol* 2006. 177: 6705-6712.
- 105 King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B. and Lefkowitz, E. J., *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, London: 2012.

- 106 Kinter, A. L., Horak, R., Sion, M., Riggin, L., McNally, J., Lin, Y., Jackson, R., O'Shea, A., Roby, G., Kovacs, C. *et al.*, CD25+ regulatory T cells isolated from HIV-infected individuals suppress the cytolytic and nonlytic antiviral activity of HIV-specific CD8+ T cells in vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007. 23: 438-450.
- 107 Knuschke, T., Bayer, W., Rotan, O., Sokolova, V., Wadwa, M., Kirschning, C. J., Hansen, W., Dittmer, U., Epple, M., Buer, J. *et al.*, Prophylactic and therapeutic vaccination with a nanoparticle-based peptide vaccine induces efficient protective immunity during acute and chronic retroviral infection. *Nanomedicine* 2014. 10: 1787-1798.
- 108 Kohler, A., Schmithorst, V., Filippi, M. D., Ryan, M. A., Daria, D., Gunzer, M. and Geiger, H., Altered cellular dynamics and endosteal location of aged early hematopoietic progenitor cells revealed by time-lapse intravital imaging in long bones. *Blood* 2009. 114: 290-298.
- 109 Köhler, A., De Filippo, K., Hasenberg, M., van den Brandt, C., Nye, E., Hosking, M. P., Lane, T. E., Männ, L., Ransohoff, R. M., Hauser, A. E. *et al.*, G-CSF mediated Thrombopoietin release triggers neutrophil motility and mobilization from bone marrow via induction of Cxcr2 ligands. *Blood* 2011. 117: 4349-4357.
- 110 Kos, C. H., Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models. *Nutr Rev* 2004. 62: 243-246.
- 111 Krathwohl, M. D., Schacker, T. W. and Anderson, J. L., Abnormal presence of semimature dendritic cells that induce regulatory T cells in HIV-infected subjects. *J Infect Dis* 2006. 193: 494-504.
- 112 Lahl, K., Loddenkemper, C., Drouin, C., Freyer, J., Arnason, J., Eberl, G., Hamann, A., Wagner, H., Huehn, J. and Sparwasser, T., Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med* 2007. 204: 57-63.
- 113 Lahl, K. and Sparwasser, T., In vivo depletion of FoxP3+ Tregs using the DEREK mouse model. *Methods Mol Biol* 2011. 707: 157-172.
- 114 Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W. *et al.*, Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001. 409: 860-921.
- 115 Lander, M. R. and Chattopadhyay, S. K., 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. *J Virol* 1984. 52: 695-698.
- 116 Lavender, K. J., Pace, C., Sutter, K., Messer, R. J., Pouncey, D. L., Cummins, N. W., Natesampillai, S., Zheng, J., Goldsmith, J., Widera, M. *et al.*, An advanced BLT-humanized mouse model for extended HIV-1 cure studies. *AIDS* 2018. 32: 1-10.
- 117 Lee, H. K. and Iwasaki, A., Innate control of adaptive immunity: dendritic cells and beyond. *Semin Immunol* 2007. 19: 48-55.

- 118 Li, J. P., D'Andrea, A. D., Lodish, H. F. and Baltimore, D., Activation of cell growth by binding of Friend spleen focus-forming virus gp55 glycoprotein to the erythropoietin receptor. *Nature* 1990. 343: 762-764.
- 119 Li, S., Gowans, E. J., Chougnnet, C., Plebanski, M. and Dittmer, U., Natural regulatory T cells and persistent viral infection. *J Virol* 2008. 82: 21-30.
- 120 Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, B. M., Colonna, L., Flores, M., Li, N., Schweighoffer, E., Greenberg, S. *et al.*, Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol* 2008. 180: 5916-5926.
- 121 Lin, F. C. and Young, H. A., Interferons: Success in anti-viral immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014. 25: 369-376.
- 122 Littwitz-Salomon, E., Malyshkina, A., Schimmer, S. and Dittmer, U., The Cytotoxic Activity of Natural Killer Cells Is Suppressed by IL-10(+) Regulatory T Cells During Acute Retroviral Infection. *Front Immunol* 2018. 9: 1947.
- 123 Liu, Z., Gerner, M. Y., Van Panhuys, N., Levine, A. G., Rudensky, A. Y. and Germain, R. N., Immune homeostasis enforced by co-localized effector and regulatory T cells. *Nature* 2015. 528: 225-230.
- 124 Lopez, J. A., Susanto, O., Jenkins, M. R., Lukoyanova, N., Sutton, V. R., Law, R. H., Johnston, A., Bird, C. H., Bird, P. I., Whisstock, J. C. *et al.*, Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack. *Blood* 2013. 121: 2659-2668.
- 125 Lu, D. Y., Wu, H. Y., Yarla, N. S., Xu, B., Ding, J. and Lu, T. R., HAART in HIV/AIDS Treatments: Future Trends. *Infect Disord Drug Targets* 2018. 18: 15-22.
- 126 Luke, G. A., de Felipe, P., Lukashev, A., Kallioinen, S. E., Bruno, E. A. and Ryan, M. D., Occurrence, function and evolutionary origins of '2A-like' sequences in virus genomes. *J Gen Virol* 2008. 89: 1036-1042.
- 127 Ma, Y., Zhang, L. and Huang, X., Genome modification by CRISPR/Cas9. *FEBS J* 2014. 281: 5186-5193.
- 128 Madisen, L., Zwingman, T. A., Sunkin, S. M., Oh, S. W., Zariwala, H. A., Gu, H., Ng, L. L., Palmiter, R. D., Hawrylycz, M. J., Jones, A. R. *et al.*, A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci* 2010. 13: 133-140.
- 129 Manzke, N., Akhmetzyanova, I., Hasenkrug, K. J., Trilling, M., Zelinskyy, G. and Dittmer, U., CD4+ T cells develop antiretroviral cytotoxic activity in the absence of regulatory T cells and CD8+ T cells. *J Virol* 2013. 87: 6306-6313.
- 130 Marzo, A. L., Klonowski, K. D., Le Bon, A., Borrow, P., Tough, D. F. and Lefrancois, L., Initial T cell frequency dictates memory CD8+ T cell lineage commitment. *Nat Immunol* 2005. 6: 793-799.

- 131 Mazo, I. B., Honczarenko, M., Leung, H., Cavanagh, L. L., Bonasio, R., Weninger, W., Engelke, K., Xia, L., McEver, R. P., Koni, P. A. *et al.*, Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8⁺ T cells. *Immunity* 2005. 22: 259-270.
- 132 McCool, D., Mak, T. W. and Bernstein, A., Cellular regulation in Friend virus induced erythroleukemia. Studies with anemic mice of genotype SI/SId. *J Exp Med* 1979. 149: 837-846.
- 133 Mempel, T. R., Henrickson, S. E. and von Andrian, U. H., T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 2004. 427: 154-159.
- 134 Mempel, T. R., Pittet, M. J., Khazaie, K., Weninger, W., Weissleder, R., von Boehmer, H. and von Andrian, U. H., Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation. *Immunity* 2006. 25: 129-141.
- 135 Messer, R. J., Dittmer, U., Peterson, K. E. and Hasenkrug, K. J., Essential role for virus-neutralizing antibodies in sterilizing immunity against Friend retrovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004. 101: 12260-12265.
- 136 Messer, R. J., Lavender, K. J. and Hasenkrug, K. J., Mice of the resistant H-2(b) haplotype mount broad CD4(+) T cell responses against 9 distinct Friend virus epitopes. *Virology* 2014. 456-457: 139-144.
- 137 Miller, C., Abdo, Z., Ericsson, A., Elder, J. and VandeWoude, S., Applications of the FIV Model to Study HIV Pathogenesis. *Viruses* 2018. 10.
- 138 Mills, K. H., Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* 2004. 4: 841-855.
- 139 Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W. and Radbruch, A., High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990. 11: 231-238.
- 140 Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. and Schätzl, H., Molecular Virology. *Springer*, Berlin: 2013.
- 141 Moore, T. C., Gonzaga, L. M., Mather, J. M., Messer, R. J. and Hasenkrug, K. J., B Cell Requirement for Robust Regulatory T Cell Responses to Friend Retrovirus Infection. *mBio* 2017. 8.
- 142 Moreau-Gachelin, F., Tavitian, A. and Tambourin, P., Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. *Nature* 1988. 331: 277-280.
- 143 Moreau-Gachelin, F., Multi-stage Friend murine erythroleukemia: molecular insights into oncogenic cooperation. *Retrovirology* 2008. 5: 99.
- 144 Moreno-Fernandez, M. E., Rueda, C. M., Rusie, L. K. and Chougnet, C. A., Regulatory T cells control HIV replication in activated T cells through a cAMP-dependent mechanism. *Blood* 2011. 117: 5372-5380.

- 145 Mouse Genome Sequencing Consortium, Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M. *et al.*, Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 2002. 420: 520-562.
- 146 Mues, M., Bartholomäus, I., Thestrup, T., Griesbeck, O., Wekerle, H., Kawakami, N. and Krishnamoorthy, G., Real-time in vivo analysis of T cell activation in the central nervous system using a genetically encoded calcium indicator. *Nature Medicine* 2013. 19: 778-+.
- 147 Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H., Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986. 51 Pt 1: 263-273.
- 148 Munroe, D. G., Peacock, J. W. and Benchimol, S., Inactivation of the cellular p53 gene is a common feature of Friend virus-induced erythroleukemia: relationship of inactivation to dominant transforming alleles. *Mol Cell Biol* 1990. 10: 3307-3313.
- 149 Murphy, K. M. and Weaver, C., Janeway's Immunobiology., 9th Edn. *Garland Science*, New York: 2016.
- 150 Myers, L. and Hasenkrug, K. J., Retroviral immunology: lessons from a mouse model. *Immunol Res* 2009. 43: 160-166.
- 151 Myers, L., Messer, R. J., Carmody, A. B. and Hasenkrug, K. J., Tissue-specific abundance of regulatory T cells correlates with CD8+ T cell dysfunction and chronic retrovirus loads. *J Immunol* 2009. 183: 1636-1643.
- 152 Myers, L., Joedicke, J. J., Carmody, A. B., Messer, R. J., Kassiotis, G., Dudley, J. P., Dittmer, U. and Hasenkrug, K. J., IL-2-independent and TNF-alpha-dependent expansion of Vbeta5+ natural regulatory T cells during retrovirus infection. *J Immunol* 2013. 190: 5485-5495.
- 153 Nair, S., Bayer, W., Ploquin, M. J., Kassiotis, G., Hasenkrug, K. J. and Dittmer, U., Distinct roles of CD4+ T cell subpopulations in retroviral immunity: lessons from the Friend virus mouse model. *Retrovirology* 2011. 8: 76.
- 154 Nair, S. R., Zelinsky, G., Schimmer, S., Gerlach, N., Kassiotis, G. and Dittmer, U., Mechanisms of control of acute Friend virus infection by CD4+ T helper cells and their functional impairment by regulatory T cells. *J Gen Virol* 2010. 91: 440-451.
- 155 Nakamura, K., Kitani, A. and Strober, W., Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 2001. 194: 629-644.
- 156 Newell, E. W., Sigal, N., Bendall, S. C., Nolan, G. P. and Davis, M. M., Cytometry by time-of-flight shows combinatorial cytokine expression and virus-specific cell niches within a continuum of CD8+ T cell phenotypes. *Immunity* 2012. 36: 142-152.
- 157 Ney, P. A. and D'Andrea, A. D., Friend erythroleukemia revisited. *Blood* 2000. 96: 3675-3680.

- 158 Nikolova, M., Carriere, M., Jenabian, M. A., Limou, S., Younas, M., Kok, A., Hue, S., Seddiki, N., Hulin, A., Delaneau, O. *et al.*, CD39/adenosine pathway is involved in AIDS progression. *PLoS Pathog* 2011. 7: e1002110.
- 159 O'Neil, S. P., Novembre, F. J., Hill, A. B., Suwyn, C., Hart, C. E., Evans-Strickfaden, T., Anderson, D. C., deRosayro, J., Herndon, J. G., Saucier, M. *et al.*, Progressive infection in a subset of HIV-1-positive chimpanzees. *J Infect Dis* 2000. 182: 1051-1062.
- 160 Obar, J. J., Khanna, K. M. and Lefrancois, L., Endogenous naive CD8+ T cell precursor frequency regulates primary and memory responses to infection. *Immunity* 2008. 28: 859-869.
- 161 Ohlen, C., Kalos, M., Cheng, L. E., Shur, A. C., Hong, D. J., Carson, B. D., Kokot, N. C., Lerner, C. G., Sather, B. D., Huseby, E. S. *et al.*, CD8(+) T cell tolerance to a tumor-associated antigen is maintained at the level of expansion rather than effector function. *J Exp Med* 2002. 195: 1407-1418.
- 162 Papiernik, M., de Moraes, M. L., Pontoux, C., Vasseur, F. and Penit, C., Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int Immunol* 1998. 10: 371-378.
- 163 Pardoll, D. M., The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012. 12: 252-264.
- 164 Pewe, L. L., Netland, J. M., Heard, S. B. and Perlman, S., Very diverse CD8 T cell clonotypic responses after virus infections. *J Immunol* 2004. 172: 3151-3156.
- 165 Phan, T. G. and Bullen, A., Practical intravital two-photon microscopy for immunological research: faster, brighter, deeper. *Immunol Cell Biol* 2010. 88: 438-444.
- 166 Plitas, G. and Rudensky, A. Y., Regulatory T Cells: Differentiation and Function. *Cancer Immunol Res* 2016. 4: 721-725.
- 167 Plotkin, S. A., Complex Correlates of Protection After Vaccination. *Clinical Infectious Diseases* 2013. 56: 1458-1465.
- 168 Poiesz, B. J., Ruscetti, F. W., Gazdar, A. F., Bunn, P. A., Minna, J. D. and Gallo, R. C., Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980. 77: 7415-7419.
- 169 Purbhoo, M. A., Irvine, D. J., Huppa, J. B. and Davis, M. M., T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat Immunol* 2004. 5: 524-530.
- 170 Rakebrandt, N., Littringer, K. and Joller, N., Regulatory T cells: balancing protection versus pathology. *Swiss Med Wkly* 2016. 146: w14343.

- 171 Ren, X., Ye, F., Jiang, Z., Chu, Y., Xiong, S. and Wang, Y., Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Cell Death Differ* 2007. 14: 2076-2084.
- 172 Robertson, M. N., Miyazawa, M., Mori, S., Caughey, B., Evans, L. H., Hayes, S. F. and Chesebro, B., Production of monoclonal antibodies reactive with a denatured form of the Friend murine leukemia virus gp70 envelope protein: use in a focal infectivity assay, immunohistochemical studies, electron microscopy and western blotting. *J Virol Methods* 1991. 34: 255-271.
- 173 Robertson, M. N., Spangrude, G. J., Hasenkrug, K., Perry, L., Nishio, J., Wehrly, K. and Chesebro, B., Role and specificity of T-cell subsets in spontaneous recovery from Friend virus-induced leukemia in mice. *J Virol* 1992. 66: 3271-3277.
- 174 Robertson, S. J. and Hasenkrug, K. J., The role of virus-induced regulatory T cells in immunopathology. *Springer Seminars in Immunopathology* 2006. 28: 51-62.
- 175 Robertson, S. J., Messer, R. J., Carmody, A. B. and Hasenkrug, K. J., In vitro suppression of CD8+ T cell function by Friend virus-induced regulatory T cells. *J Immunol* 2006. 176: 3342-3349.
- 176 Robertson, S. J., Ammann, C. G., Messer, R. J., Carmody, A. B., Myers, L., Dittmer, U., Nair, S., Gerlach, N., Evans, L. H., Cafruny, W. A. *et al.*, Suppression of acute anti-friend virus CD8+ T-cell responses by coinfection with lactate dehydrogenase-elevating virus. *J Virol* 2008. 82: 408-418.
- 177 Robertson, S. J., Messer, R. J., Carmody, A. B., Mittler, R. S., Burlak, C. and Hasenkrug, K. J., CD137 costimulation of CD8+ T cells confers resistance to suppression by virus-induced regulatory T cells. *J Immunol* 2008. 180: 5267-5274.
- 178 Rodenko, B., Toebes, M., Hadrup, S. R., van Esch, W. J., Molenaar, A. M., Schumacher, T. N. and Ovaa, H., Generation of peptide-MHC class I complexes through UV-mediated ligand exchange. *Nat Protoc* 2006. 1: 1120-1132.
- 179 Rous, P., A Transmissible Avian Neoplasm. (Sarcoma of the Common Fowl.). *J Exp Med* 1910. 12: 696-705.
- 180 Rueda, C. M., Jackson, C. M. and Chougnet, C. A., Regulatory T-Cell-Mediated Suppression of Conventional T-Cells and Dendritic Cells by Different cAMP Intracellular Pathways. *Front Immunol* 2016. 7: 216.
- 181 Russell, W. M. S. and Burch, R. L., The principles of humane experimental technique. *Methuen*, London: 1959.
- 182 Santiago, M. L., Montano, M., Benitez, R., Messer, R. J., Yonemoto, W., Chesebro, B., Hasenkrug, K. J. and Greene, W. C., Apobec3 encodes Rfv3, a gene influencing neutralizing antibody control of retrovirus infection. *Science* 2008. 321: 1343-1346.
- 183 Schiessl, I. M. and Castrop, H., Deep insights: intravital imaging with two-photon microscopy. *Pflugers Arch* 2016. 468: 1505-1516.

- 184 Schmitt, E. G. and Williams, C. B., Generation and function of induced regulatory T cells. *Front Immunol* 2013. 4: 152.
- 185 Scholer, A., Hugues, S., Boissonnas, A., Fetler, L. and Amigorena, S., Intercellular adhesion molecule-1-dependent stable interactions between T cells and dendritic cells determine CD8⁺ T cell memory. *Immunity* 2008. 28: 258-270.
- 186 Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T. and Hume, D. A., Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004. 75: 163-189.
- 187 Seki, A. and Rutz, S., Optimized RNP transfection for highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in primary T cells. *J Exp Med* 2018. 215: 985-997.
- 188 Sewald, X., Gonzalez, D. G., Haberman, A. M. and Mothes, W., In vivo imaging of virological synapses. *Nat Commun* 2012. 3: 1320.
- 189 Sewald, X., Ladinsky, M. S., Uchil, P. D., Beloor, J., Pi, R., Herrmann, C., Motamedi, N., Murooka, T. T., Brehm, M. A., Greiner, D. L. *et al.*, Retroviruses use CD169-mediated trans-infection of permissive lymphocytes to establish infection. *Science* 2015. 350: 563-567.
- 190 Sewald, X., Visualizing Viral Infection In Vivo by Multi-Photon Intravital Microscopy. *Viruses* 2018. 10.
- 191 Shein, H. M. and Enders, J. F., Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1962. 48: 1164-1172.
- 192 Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y. and Sakaguchi, S., Stimulation of CD25⁺CD4⁺regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002. 3: 135-142.
- 193 Sierra, S., Kupfer, B. and Kaiser, R., Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J Clin Virol* 2005. 34: 233-244.
- 194 Simon, M. A., Brodie, S. J., Sasseville, V. G., Chalifoux, L. V., Desrosiers, R. C. and Ringler, D. J., Immunopathogenesis of SIVmac. *Virus Res* 1994. 32: 227-251.
- 195 Starr, T. K., Jameson, S. C. and Hogquist, K. A., Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 2003. 21: 139-176.
- 196 Stemberger, C., Huster, K. M., Koffler, M., Anderl, F., Schiemann, M., Wagner, H. and Busch, D. H., A single naive CD8⁺ T cell precursor can develop into diverse effector and memory subsets. *Immunity* 2007. 27: 985-997.
- 197 Stock, A. T., Mueller, S. N., Kleinert, L. M., Heath, W. R., Carbone, F. R. and Jones, C. M., Optimization of TCR transgenic T cells for in vivo tracking of immune responses. *Immunol Cell Biol* 2007. 85: 394-396.

- 198 Stromnes, I. M., Dittmer, U., Schumacher, T. N. M., Schepers, K., Messer, R. J., Evans, L. H., Peterson, K. E., Race, B. and Hasenkrug, K. J., Temporal effects of gamma interferon deficiency on the course of friend retrovirus infection in mice. *J Virol* 2002. 76: 2225-2232.
- 199 Stump, D. S. and VandeWoude, S., Animal models for HIV AIDS: a comparative review. *Comp Med* 2007. 57: 33-43.
- 200 Sun, X. M. and Kaufman, P. D., Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma* 2018. 127: 175-186.
- 201 Super, H. J., Brooks, D., Hasenkrug, K. and Chesebro, B., Requirement for CD4(+) T cells in the Friend murine retrovirus neutralizing antibody response: evidence for functional T cells in genetic low-recovery mice. *J Virol* 1998. 72: 9400-9403.
- 202 Susaki, E. A., Tainaka, K., Perrin, D., Yukinaga, H., Kuno, A. and Ueda, H. R., Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging. *Nat Protoc* 2015. 10: 1709-1727.
- 203 Swain, S. L., McKinstry, K. K. and Strutt, T. M., Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol* 2012. 12: 136-148.
- 204 Tadokoro, C. E., Shakhar, G., Shen, S., Ding, Y., Lino, A. C., Maraver, A., Lafaille, J. J. and Dustin, M. L., Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 2006. 203: 505-511.
- 205 Takaba, H. and Takayanagi, H., The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. *Trends Immunol* 2017. 38: 805-816.
- 206 Tanaka, A. and Sakaguchi, S., Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Res* 2017. 27: 109-118.
- 207 Tomonari, K., Fairchild, S. and Rosenwasser, O. A., Influence of viral superantigens on V beta- and V alpha-specific positive and negative selection. *Immunol Rev* 1993. 131: 131-168.
- 208 Trepo, C., Chan, H. L. and Lok, A., Hepatitis B virus infection. *Lancet* 2014. 384: 2053-2063.
- 209 Vahlenkamp, T. W., Tompkins, M. B. and Tompkins, W. A. F., Feline immunodeficiency virus infection phenotypically and functionally activates immunosuppressive CD4(+)CD25(+) T regulatory cells. *J Immunol* 2004. 172: 4752-4761.
- 210 Valitutti, S., Dessing, M. and Lanzavecchia, A., Role of cAMP in regulating cytotoxic T lymphocyte adhesion and motility. *Eur J Immunol* 1993. 23: 790-795.
- 211 Veiga-Parga, T., Sehrawat, S. and Rouse, B. T., Role of regulatory T cells during virus infection. *Immunol Rev* 2013. 255: 182-196.

- 212 Victor Garcia, J., Humanized mice for HIV and AIDS research. *Curr Opin Virol* 2016. 19: 56-64.
- 213 Vignali, D. A. A., Collison, L. W. and Workman, C. J., How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008. 8: 523-532.
- 214 Voskoboinik, I., Whisstock, J. C. and Trapani, J. A., Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol* 2015. 15: 388-400.
- 215 Webster, D. P., Klenerman, P. and Dusheiko, G. M., Hepatitis C. *Lancet* 2015. 385: 1124-1135.
- 216 Wehbi, V. L. and Tasken, K., Molecular Mechanisms for cAMP-Mediated Immunoregulation in T cells - Role of Anchored Protein Kinase A Signaling Units. *Front Immunol* 2016. 7: 222.
- 217 Weiss, R. A., The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology* 2006. 3: 67.
- 218 Wikipedia, <https://de.wikipedia.org/wiki/HIV>. Dezember 2018.
- 219 Windmann, S., Otto, L., Hrycak, C. P., Malyskina, A., Bongard, N., David, P., Gunzer, M., Dittmer, U. and Bayer, W., Infection of B cell follicle-resident cells by Friend retrovirus occurs during acute infection and is maintained during viral persistence. *mBio* 2019.
- 220 Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T. and Sakaguchi, S., CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 2008. 322: 271-275.
- 221 World Health Organization, <http://www.who.int/hiv/data/en/>. Dezember 2018.
- 222 Yamaguchi, S., Hasegawa, M., Suzuki, T., Ikeda, H., Aizawa, S., Hirokawa, K. and Kitagawa, M., In vivo distribution of receptor for ecotropic murine leukemia virus and binding of envelope protein of Friend Murine leukemia virus. *Arch Virol* 2003. 148: 1175-1184.
- 223 Yi, J. S., Cox, M. A. and Zajac, A. J., T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology* 2010. 129: 474-481.
- 224 Yoon, H., Kim, T. S. and Braciale, T. J., The cell cycle time of CD8+ T cells responding in vivo is controlled by the type of antigenic stimulus. *PLoS One* 2010. 5: e15423.
- 225 Zelinskyy, G., Balkow, S., Schimmer, S., Schepers, K., Simon, M. M. and Dittmer, U., Independent roles of perforin, granzymes, and Fas in the control of Friend retrovirus infection. *Virology* 2004. 330: 365-374.
- 226 Zelinskyy, G., Robertson, S. J., Schimmer, S., Messer, R. J., Hasenkrug, K. J. and Dittmer, U., CD8+ T-cell dysfunction due to cytolytic granule deficiency in persistent Friend retrovirus infection. *J Virol* 2005. 79: 10619-10626.

- 227 Zelinskyy, G., Kraft, A. R., Schimmer, S., Arndt, T. and Dittmer, U., Kinetics of CD8+ effector T cell responses and induced CD4+ regulatory T cell responses during Friend retrovirus infection. *Eur J Immunol* 2006. 36: 2658-2670.
- 228 Zelinskyy, G., Dietze, K., Sparwasser, T. and Dittmer, U., Regulatory T cells suppress antiviral immune responses and increase viral loads during acute infection with a lymphotropic retrovirus. *PLoS Pathog* 2009. 5: e1000406.
- 229 Zelinskyy, G., Dietze, K. K., Husecken, Y. P., Schimmer, S., Nair, S., Werner, T., Gibbert, K., Kershaw, O., Gruber, A. D., Sparwasser, T. *et al.*, 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* 2009. 114: 3199-3207.
- 230 Zelinskyy, G., Myers, L., Dietze, K. K., Gibbert, K., Roggendorf, M., Liu, J., Lu, M., Kraft, A. R., Teichgraber, V., Hasenkrug, K. J. *et al.*, Virus-specific CD8+ T cells upregulate programmed death-1 expression during acute friend retrovirus infection but are highly cytotoxic and control virus replication. *J Immunol* 2011. 187: 3730-3737.
- 231 Zelinskyy, G., Werner, T. and Dittmer, U., Natural regulatory T cells inhibit production of cytotoxic molecules in CD8(+) T cells during low-level Friend retrovirus infection. *Retrovirology* 2013. 10: 109.
- 232 Zhang, D. J., Wang, Q., Wei, J., Baimukanova, G., Buchholz, F., Stewart, A. F., Mao, X. and Killeen, N., Selective expression of the Cre recombinase in late-stage thymocytes using the distal promoter of the Lck gene. *J Immunol* 2005. 174: 6725-6731.
- 233 Zhang, N. and Bevan, M. J., CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* 2011. 35: 161-168.
- 234 Zhu, J., Yamane, H. and Paul, W. E., Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 2010. 28: 445-489.

7 Anhang

7.1 Filmbeschreibungen

Film 1

Intravitale Mikroskopie FV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen im tibialen Knochenmark

Die ZTLs im tibialen Knochenmark von Empfängertieren wurden 10 Tage nach FV-Infektion (20.000 SFFU) und adoptivem Zelltransfer (1000 FV-spezifische tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen) mittels intravitale Zwei-Photonenmikroskopie untersucht. Der kompakte Knochen wurde über das SHG-Signal und der Blutfluss über eine i.v. injizierte Qtracker-Lösung visualisiert (Otto L. *et al.* 2018).

Film 2

Dreidimensionales Tracking FV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen

Zum Tracking der ZTLs wurde das tibiale Knochenmark von Empfängertieren 14 Tage nach FV-Infektion (20.000 SFFU) und adoptivem Zelltransfer (1000 FV-spezifische tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen) mittels intravitale Zwei-Photonenmikroskopie untersucht. Gezeigt ist eine beispielhafte Darstellung des dreidimensionalen Zelltrackings virus-spezifischer CD8⁺ T-Zellen im Knochenmark. Der Blutfluss wurde über eine i.v. injizierte Qtracker-Lösung visualisiert.

Film 3

Zelluläre Interaktionen zwischen FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen und Tregs

Zur Analyse der Interaktionen von ZTLs und Tregs wurde das tibiale Knochenmark von DEREK-Mäusen 14 Tage nach FV-Infektion (20.000 SFFU) und adoptivem Zelltransfer (1000 FV-spezifische tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen) mittels intravitale Zwei-Photonenmikroskopie untersucht. Virusspezifische CD8⁺ T-Zellen und Tregs interagieren häufig miteinander und bilden kurzzeitige Zellkontakte. Die Tregs erscheinen kleiner als die virusspezifischen CD8⁺ T-Zellen bedingt durch die membranöse Lokalisation des EGFP und die schnelle dreidimensionale Aufnahme. Der Blutfluss wurde über eine i.v. injizierte Qtracker-Lösung visualisiert.

Film 4

Direkter Zellkontakt zwischen FV-spezifischer CD8⁺ T-Zelle und Treg

Zur Analyse der Interaktionen von ZTLs und Tregs wurde das tibiale Knochenmark von DEREK-Mäusen 14 Tage nach FV-Infektion (20.000 SFFU) und adoptivem Zelltransfer (1000 FV-spezifische tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen) mittels intravitale Zwei-Photonenmikroskopie untersucht. Gezeigt ist die dreidimensionale Ansicht eines direkten Zellkontakts zwischen virus-spezifischer CD8⁺ T-Zelle und Treg.

Film 5

Interaktionszeit von FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen und Tregs

Zur Analyse der Interaktionszeit von virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen und Tregs wurde das tibiale Knochenmark von DEREK-Mäusen 8 Tage nach FV-Infektion (20.000 SFFU) und adoptivem Zelltransfer (1000 FV-spezifische tdTomato⁺ CD8⁺ T-Zellen) mittels intravitale Zwei-Photonenmikroskopie untersucht. Eine direkte zelluläre Interaktion zwischen virus-spezifischer CD8⁺ T-Zelle und Treg und eine damit verbundene veränderte Zellmorphologie beider Interaktionspartner sind gezeigt (4 min bis 6 min). Der Blutfluss wurde über eine i.v. injizierte Qtracker-Lösung visualisiert.

Film 6

Nutzung von FV-mWasabi zur Visualisierung infizierter Zellen

Die Nutzbarkeit von FV-mWasabi für Zwei-Photonenmikroskopie-Anwendungen wurde anhand CUBIC-behandelter Lymphknoten susceptibler BALB/c-Mäuse 21 Tage nach der Infektion (500 SFFU) überprüft. Gezeigt sind FV-mWasabi infizierte Zellen, welche innerhalb und außerhalb eines B-Zell-Follikels deutlich detektierbar waren. Die Kollagenstrukturen wurden über das SHG-Signal visualisiert und ermöglichten die Abgrenzung des B-Zell-Follikels, welches zusätzlich mit Hilfe einer dreidimensionalen Oberflächendarstellung hervorgehoben wurde (Windmann S. *et al.* 2019).

7.2 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A2AR	Adenosinrezeptor A2A
Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
AF700	Alexa Fluor 700
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrom</i>
AK	Antikörper
ANOVA	Varianzanalyse - <i>analysis of variance</i>
APC	Allophycocyanin
APC	antigenpräsentierende Zellen - <i>antigen presenting cell</i>
APOBEC	<i>apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BALB/c	Mausstamm
BLT-Maus	<i>bone marrow, liver, thymus</i> - humanisiertes Mausmodell
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BV	Brilliant Violet
C	Cytosin
C57BL/6	Mausstamm - <i>black 6</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CB6F1	Mausstamm (C57BL/6 x BALB/c)
CCR5	CC-Motiv-Chemokinrezeptor 5
CD	Unterscheidungsgruppen - <i>cluster of differentiation</i>
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i>
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CTL	<i>cytotoxic T lymphocyte</i> bzw. <i>cytotoxic CD8⁺ T cell</i>
CTLA4	<i>cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4</i>
CUBIC	<i>clear, unobstructed brain/body imaging cocktails and computational analysis</i>
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DC	Dendritische Zelle - <i>dendritic cell</i>
DEREG	Mausstamm - <i>depletion of regulatory T cell</i>

DMEM	Dulbecco's <i>modified eagle medium</i>
DMFA	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure - <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dpi	Tage nach der Infektion - <i>days post infection</i>
DT	Diphtherietoxin
DTG	durchschnittliche Track-Geschwindigkeit
DTR	Diphtherietoxin-Rezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eF	eFluor
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
<i>env</i>	<i>envelope</i>
<i>et al.</i>	und andere - <i>et alia</i>
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	<i>fluorescence-activated cell scanning/sorting</i>
FasL	Fas-Ligand
FCS	fetales Kälberserum
FELASA	<i>Federation of Laboratory Animal Science Associations</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FIV	felines Immundefizienzvirus
FMO	<i>fluorescence minus one</i>
F-MuLV	murines Friend-Leukämievirus
Foxp3	<i>forkhead box protein 3</i>
FP	Fluoreszenzprotein
FSC	Vorwärtsstreulicht - <i>forward scatter</i>
FV	Friend Virus
<i>Fv-1 - Fv-6</i>	<i>friend virus susceptibility genes</i>
FVD	lebend-tot Farbstoff - <i>fixable viability dye</i>
G	Guanin
G4S	Glycin-Serin Linker
GA	Golgi-Apparat
<i>gag</i>	<i>group-specific antigen</i>
GagL85-93	Peptid des Gag-Proteins bestehend aus neun Aminosäuren, immundominantes F-MuLV-Epitop FV-spez. CD8 ⁺ T-Zellen
GITR	<i>glucocorticoid-induced TNFR-related protein</i>

GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde
GzmB	Granzym B
H-2	Haupthistokompatibilitätskomplex der Maus
HAART	hoch aktive antiretrovirale Therapie
HBS	HEPES <i>buffered saline</i>
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	humanes Immundefizienzvirus - <i>human immunodeficiency virus</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSV	Herpes-simplex-Virus
HTLV	humanes T-lymphotrophes Virus
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IC-Assay	<i>infectious center assay</i>
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILCs	<i>innate lymphoid cells</i>
IQR	Interquartilsabstand - <i>interquartile range</i>
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
kb	Kilobasen
LAG3	<i>lymphocyte-activation gene 3</i>
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen
Lck	Lymphozyten-Proteintyrosinkinase
LCMV	lymphozytäres Choriomeningitis-Virus
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
<i>loxP</i>	Cre-Rekombinase-Erkennungssequenzen der DNA
LTRs	<i>long terminal repeats</i>
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i>
mCAT-1	<i>mouse cationic amino acid transporter 1</i>
MDA5	<i>melanoma differentiation-associated gene 5</i>

MDSCs	<i>myeloid-derived suppressor cells</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex - <i>major histocompatibility complex</i>
MIF	<i>macrophage migration inhibitory factor</i>
MMTV9	Maus-Mammatumovirus 9
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MTOC	Mikrotubuliorganisationszentrum
MuLV	murines Leukämievirus
mWasabi	<i>monomeric Wasabi</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NLR	NOD-ähnlicher Rezeptor - <i>NOD-like receptor</i>
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
ns	nicht signifikant
p.a.	analysenrein - <i>pro analysi</i>
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster - <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBBS	PBS mit weiteren Zusätzen
PBS	Dulbecco's <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD1	<i>programmed death-protein 1</i>
PD-L1	<i>programmed death-ligand 1</i>
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin 7
PFA	Paraformaldehyd
<i>pol</i>	Polymerase
<i>pro</i>	Protease - Teilbereich des <i>pol</i> -Gens
PRRs	Mustererkennungsrezeptoren - <i>pattern recognition receptors</i>
pTreg	Peripherie-entstammende regulatorische T-Zelle
RANTES	<i>regulated upon activation normal T cell expressed and secreted</i>
Retroviren	Reverse Transkriptase Onkoviren
<i>Rfv-3</i>	<i>recovery from FV gene 3</i>
RIG-I	<i>retinoic acid inducible gene 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure - <i>ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur

SAG	Superantigen
SEM	Standardfehler des Mittelwerts - <i>standard error of the mean</i>
SFFU	<i>spleen focus forming units</i>
SFFV	<i>spleen focus forming virus</i>
SHG	Frequenzverdopplung - <i>second harmonic generation</i>
SIV	simianes Immundefizienzvirus
SPF	spezifisch pathogenfrei
<i>spi-1</i>	<i>SFFV proviral integration site-1</i>
SSC	Seitwärtsstreulicht - <i>sideward scatter</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TCR	T-Zell-Rezeptor - <i>T cell receptor</i>
TCR ^{tg}	transgener T-Zell-Rezeptor
tdTomato	<i>tandem dimeric Tomato</i>
TE	TRIS-EDTA
Tfh	CD4 ⁺ folliculäre T-Helferzelle
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Th	CD4 ⁺ T-Helferzelle
TIM3	<i>T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3</i>
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor - <i>toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TOPO	Topoisomerase
TRAIL-DR5	<i>tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand-death receptor 5</i>
Treg	regulatorische T-Zelle
tTreg	Thymus-entstammende regulatorische T-Zelle
TurboFP650	<i>Turbo fluorescent protein 650</i>
U	Uracil
ü.N.	über Nacht
UZ	Ultrazentrifuge
Vif	<i>viral infectivity factor</i>
VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i>
ZTL	zytotoxische CD8 ⁺ T-Zelle bzw. CD8 ⁺ T-Effektorzelle

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1:	Zielzellerkennung und Apoptoseinduktion durch ZTLs.....	16
Abb.1.2:	Immunsuppressive Mechanismen der Tregs.....	19
Abb.1.3:	Struktureller Aufbau eines Retroviruspartikels	22
Abb.1.4:	Zusammensetzung des proviralen Retrovirusgenoms	23
Abb.2.1:	Verpaarungsschema und genetischer Hintergrund der Spendertiere.....	43
Abb.3.1:	Ligationsformel.....	49
Abb.3.2:	Aufbau der intravitralen Zwei-Photonenmikroskopie des tibialen Knochenmarks.....	54
Abb.3.3:	Formel zur Berechnung der Zellzahl einer Zellsuspension mittels Neubauerkammer	56
Abb.3.4:	Aufbau eines MHC-I Tetramers.....	59
Abb.3.5:	Auswertungsstrategie für durchflusszytometrische Daten.....	63
Abb.4.1:	Isolation und adoptiver Transfer FV-spezifischer tdTomato ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen.....	65
Abb.4.2:	Proliferation CD8 ⁺ T-Zellen	67
Abb.4.3:	Reproduzierbares Aktivierungsprofil CD8 ⁺ T-Zellen im Knochenmark ...	68
Abb.4.4:	Reproduzierbares Aktivierungsprofil CD8 ⁺ T-Zellen in der Milz.....	69
Abb.4.5:	Effektorfunktionen CD8 ⁺ T-Zellen.....	71
Abb.4.6:	Effekt des Zelltransfers auf die FV-Infektion.....	72
Abb.4.7:	Expansion FV-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen in der Milz	74
Abb.4.8:	Mikroskopie FV-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen im tibialen Knochenmark...	75
Abb.4.9:	Geschwindigkeitsanalyse FV-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen nach FV-Infektion	78
Abb.4.10:	Bewegungsanalyse FV-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen nach FV-Infektion..	79
Abb.4.11:	Mikroskopie und Geschwindigkeitsprofil von Tregs nach FV-Infektion...	81
Abb.4.12:	Bewegungsanalyse von Tregs nach FV-Infektion	82
Abb.4.13:	Zelluläre Interaktionen zwischen FV-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen und Tregs	84
Abb.4.14:	Interaktionszeit von FV-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen und Tregs	85
Abb.4.15:	Effekte einer Treg-Depletion auf die FV-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen.....	87
Abb.4.16:	Nutzung von FV-mWasabi zur Visualisierung FV-infizierter Zellen	89
Abb.4.17:	Visualisierung FV-infizierter Zellen im tibialen Knochenmark.....	90
Abb.4.18:	Klonierung eines mit tdTomato und EGFP kombinierbaren Virus	92

7.4 Tabellenverzeichnis

Tab.2.1:	Verwendete Geräte	31
Tab.2.2:	Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	32
Tab.2.3:	Verwendete Antikörper	32
Tab.2.4:	Verwendete Fluorochrome und Fluoreszenzproteine	34
Tab.2.5:	Verwendete Primer.....	34
Tab.2.6:	Verwendete Plasmide.....	35
Tab.2.7:	Verwendete Chemikalien und Lösungen.....	36
Tab.2.8:	Verwendete Puffer und Medien	38
Tab.2.9:	Verwendete Antibiotika	40
Tab.2.10:	Verwendete Kits	40
Tab.2.11:	Verwendete Wildtyp-Mausstämme	41
Tab.2.12:	Verwendete Viren	44
Tab.2.13:	Verwendete Zelllinien	44
Tab.2.14:	Verwendete Software	45
Tab.3.1:	Allgemeiner Ablauf der PCR mit empfohlenen Parametern.....	46
Tab.3.2:	PCR-Reaktionsansatz	47

7.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Matthias Gunzer und Prof. Ulf Dittmer bedanken, welche mir die Durchführung dieser Arbeit in ihren Arbeitsgruppen ermöglicht haben. Beide haben mich während meiner gesamten Promotion mit großem Engagement betreut, unterstützt und gefördert. Hierbei standen sie mir jederzeit sowohl fachlich als auch beratend zur Seite und ermöglichten die Etablierung einer hervorragenden Kooperation zwischen beiden Instituten.

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. Gennadiy Zelinskyy und Dr. Wibke Bayer für die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen und Ratschläge, welche entscheidend zur Entwicklung meines Projekts beigetragen haben.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Immunologie und Bildgebung, des Imaging Center Essen (IMCES) sowie des Instituts für Virologie für den ausgezeichneten fachlichen Austausch. Insbesondere den Mitarbeitern der AG Gunzer und AG Dittmer gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung im Laboralltag.

Entscheid für meine persönliche und fachliche Entwicklung war die Teilnahme an dem vielfältigen Programm des DFG-Graduiertenkolleg (RTG 1949) „*Immune Response in Infectious Diseases*“ und des Deutsch-Chinesischen Transregio (SFB) TRR60 „*Mutual interaction of chronic viruses with cells of the immune system: from fundamental research to immunotherapy and vaccination*“, denen ich sehr dankbar bin.

Ein ganz besonderer Dank gebührt auch meinen Eltern und meiner Schwester, die mich jederzeit unterstützt haben und an mich geglaubt haben, sodass ich alle Probleme meistern konnte.

7.6 Lebenslauf

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

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

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

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

7.7 Eidesstattliche Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient, bei der Abfassung der Dissertation nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den 19.02.2019

Lucas Otto

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) e) + g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den 19.02.2019

Lucas Otto

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Das Verhalten virusspezifischer CD8⁺ T-Zellen und regulatorischer T-Zellen während einer akuten Friend Retrovirus-Infektion *in vivo*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Lucas Otto befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den 19.02.2019

Prof. Dr. Matthias Gunzer