





**Untersuchungen zur Rolle von zytotoxischen  
Molekülen bei der Immunabwehr gegen  
Retroviren**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen  
Doktorgrades der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität  
Würzburg

vorgelegt von  
Gennadiy Zelinskyy

Essen, 2004



eingereicht am: .....

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Ulrich Scheer .....

Gutachter: Prof. Dr. Ulf Dittmer .....

Gutachter: PD. Dr. Michael Kuhn .....

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	
1.1	Die Entdeckung der Retroviren	1
1.2	Weltweite Verbreitung von HIV	1
1.3	Tiermodelle für Retroviren	2
1.4	Virologische Grundlagen	3
1.4.1	Struktur von Retroviren	3
1.4.2	Klassifizierung muriner Leukämie Viren	5
1.4.3	Aufbau und Besonderheiten der murinen Leukämie Viren	6
1.5	Replikationszyklus von F-MuLV	7
1.6	Pathogenese des Friend Virus Komplex	7
1.7	Die Immunantwort gegen ein Pathogen	8
1.8	Die zelluläre Immunantwort	10
1.8.1	T-Helferzellen	10
1.8.2	Zytotoxische T-Zellen	11
1.9	Mechanismen der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität	12
1.9.1	Der Exozytoseweg	13
1.9.1.1	Perforin	13
1.9.1.2	Granzyme	14
1.9.2	Der Apoptoseweg	18
1.10	Immunität gegen eine FV-Infektion	20
1.11	Krankheitsverläufe verschiedener Mausstämmen nach FV-Infektion	21
1.11.1	C57Bl/6; (H-2 <sup>b/b</sup> )	22
1.11.2	Y.10-Mäuse; (H-2 <sup>b/b</sup> )	23
1.12	Aufgabenstellung	24
<b>2</b>	<b>Material</b>	
2.1	Versuchstiere	25
2.2	Chemikalien und Medien	26
2.3	Antibiotika	26
2.4	Häufig verwendete Puffer und Medien	26
2.5	Antikörper	28

## Inhaltsverzeichnis

2.6	Tetramere	30
2.7	Viren und Zell-Linien	30
2.7	Oligonukleotid-Primer (BIG Biotech – Freiburg)	31
2.8	Plasmide	31
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	
3.1	Tierexperimente	32
3.1.1	Infektion	32
3.1.2	Depletion von CD8 <sup>+</sup> T- bzw. CD4 <sup>+</sup> T- und NK1.1 <sup>+</sup> -Zellen in Mäusen	32
3.1.3	Betäubung der Mäuse mit Ether oder Isofluran	33
3.1.4	Palpieren von Milzgrößen	33
3.1.5	Blutentnahme	33
3.1.6	Organentnahme	33
3.1.7	Herstellung einer Milzzellsuspension	33
3.1.8	Das MACS-System zum Sortieren von Zellen aus der Milz	33
3.1.9	Percoll-Gradient zur Isolation von Lymphozyten	34
3.1.10	Adoptiver Transfer von Milzzellen	34
3.2	<i>In vivo</i> Herstellung eines Friend Virus Stocks	35
3.3	Herstellung eines Friend Murine Leukemia Virus-Stocks <i>in vitro</i>	36
3.4	Zellzahlbestimmung	36
3.5	Zellkultur	37
3.5.1	Kultivierung von Zellen	37
3.5.2	Herstellung des monoklonalen $\alpha$ CD8 Antikörpers	37
3.6	<sup>51</sup> Cr-Freisetzungstest (indirekte und direkte Zytotoxizität)	37
3.7	<sup>3</sup> H-Tymidin-DNA Freisetzung Test (Test auf zytotoxische Aktivität von T-Zellen)	39
3.8	Nachweis von infizierten Zellen in der Milz ("Infectious Center Assay")	39
3.9	Durchflußzytometrie	41
3.9.1	Färbung von Oberflächenproteinen (CD)	41
3.9.2	Intrazelluläre Färbung von Granzym B	41
3.9.3	Bestimmung der Prozentzahl von FV-infizierten Zellen im Blut	42
3.9.4	Bestimmung von FV-spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen mittels	

## Inhaltsverzeichnis

	Tetramertechnik	42
3.10	Molekularbiologische Methode	42
3.10.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	42
3.10.2	Elektrophorese von RNA im Agarosegel	43
3.10.3	Reverse Transkription	43
3.10.4	DNA Gelelektrophorese	43
3.10.5	Bestimmung der mRNA für zytotoxische Moleküle aus CD8 <sup>+</sup> T-Zellen mittels Echtzeit-PCR (Light Cycler/Roche)	44
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	
4.1	Depletierung von NK, CD4 <sup>+</sup> T- und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in der akuten FV Infektion	46
4.2	Untersuchungen zur Proliferation und Aktivierung von FV spezifischen T-Zellen	48
4.3	Phänotypische Charakterisierung der CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in akut infizierten Mäusen	49
4.4	Nachweis von Granzym B in CD8 <sup>+</sup> Effektorzellen	51
4.5	Untersuchung der zytotoxischen Funktion von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus FV infizierten Mäusen	51
4.6	Nachweis virusspezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in der akuten FV Infektion	53
4.7	Verlauf der akuten Infektion in knockout Mäusen mit Defekten in zytotoxischen Funktionen	54
4.8	Parameter einer F-MuLV Infektion	59
4.9	Depletion von NK, CD4 <sup>+</sup> T- und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in F-MuLV-infizierten Mäusen	59
4.10	Phänotypische Charakterisierung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen aus F-MuLV infizierten und uninfizierten Mäusen	60
4.11	Phänotypische Charakterisierung von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus F-MuLV infizierten Mäusen	61
4.12	Nachweis von Virus-spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in F-MuLV infizierten Mäusen	62
4.13	Verlauf der F-MuLV Infektion in knockout Mäusen, die Defekte in zytotoxischen Funktionen aufweisen	63



## *Inhaltsverzeichnis*

4.14	Nachweis von Granzyme B in CD8 <sup>+</sup> Effektorzellen	64
4.15	Vergleich des Krankheitsverlaufs und der Viruslast in der akuten und persistierenden FV Infektion	65
4.16	Bestimmung der aktivierten, Virus-spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in akut und persistierend infizierten Mäusen	66
4.17	Quantifizierung von mRNA für zytotoxische Moleküle in CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	67
4.18	Granularität von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus akut und persistierend infizierten Mäusen	68
4.19	Nachweis von Granzym B und Degranulierung in aktivierten CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus akut und persistierend infizierten Mäusen	70
4.20	Produktion von Perforin und Granzym B in aktivierten CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus akuten und persistierend infizierten Mäusen	71
4.21	Degranulierung von Virus-spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus akut und persistierend infizierten Mäusen	72
4.22	Zytotoxische Funktion der CD8 <sup>+</sup> T-Zellen von akut und persistierend infizierten Mäusen	73
4.23	Verlauf der persistierenden FV Infektion in Mäusen mit Defekten in zytotoxischen Funktionen	74
4.24	Reinfektion persistierend infizierter Mäuse	75
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	
5.1	CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in der Abwehr von retroviralen Infektionen	77
5.2	Zytotoxische Mechanismen von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in der akuten FV Infektion	78
5.3	Mechanismen der zytotoxischen Kontrolle der apathogenen F-MuLV Infektion	79
5.4	Die zytotoxische T-Zellantwort in der chronischen FV-Infektion	80
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	83
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	
7.1	Zusammenfassung	98
7.2	Summary	100

## *Inhaltsverzeichnis*

7.3	Abkürzungsverzeichnis	102
7.4	Abbildungsverzeichnis	105
7.5	Tabellenverzeichnis	107
7.6	Erklärungen	108
7.7	Lebenslauf	109
7.8	Publikationsliste	111

## 1 Einleitung

### 1.1 Die Entdeckung der Retroviren

Die ersten Retroviren wurden am Anfang des letzten Jahrhunderts beschrieben. Im Jahr 1911 fanden Rous *et al.* (1911) das erste onkogene Retrovirus, das "Rous sarcoma virus" (RSV), das in Hühnern Sarkome induziert. In den darauffolgenden Jahren wurden eine Vielzahl an Retroviren entdeckt, darunter z.B. das "Simian foamy virus" (SFV) (Enders and Peebles, 1954), das "Friend murine leukemia virus" (F-MuLV) 1957 (Friend *et al.*, 1957) und das "Feline leukemia virus" (FeLV) (Jarrett *et al.*, 1964).

Als erstes mit einer Erkrankung assoziiertes Retrovirus des Menschen wurde 1980 das "Human T-cell leukemia virus-1" (HTLV-1) isoliert (Gallo *et al.*, 1980). Etwa 2% der mit HTLV-1 infizierten Menschen entwickeln eine adulte T-Zell-Leukämie. Im Jahr 1983 wurde am Pasteur Institut in Paris ein bisher unbekanntes Retrovirus entdeckt (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983), welches 1984 von Brun-Vezinet *et al.* (1984) mit der 1981 beschriebenen "acquired immunodeficiency syndrom" (AIDS) Erkrankung in Verbindung gebracht wurde. Bei einer AIDS-Erkrankung wiesen die betroffenen Patienten einen schlechten Allgemeinzustand und verschiedene opportunistische Infektionen auf. Das Isolat von Barre-Sinoussi *et al.* (1983), sowie Isolate von Popvic *et al.* (1984) und Levy *et al.* (1984) wurden später unter der Bezeichnung "Human immunodeficiency virus typ 1" (HIV-1) zusammengefaßt. Inzwischen ist HIV-1 weltweit verbreitet.

### 1.2 Weltweite Verbreitung von HIV

Seit den frühen achtziger Jahren haben sich nach Angaben des AIDS Programms der Vereinten Nationen (UNAIDS) weltweit schätzungsweise 38 Millionen Menschen mit dem humanen Immundefizienzvirus (HIV) infiziert. An AIDS sind bis Ende 2003 ungefähr 20 Millionen Menschen verstorben, allein im Jahr 2003 sind 3 Millionen Menschen verstorben, d.h. zur Zeit sind etwa 38 Millionen Menschen infiziert und die Neuinfektion mit HIV betrug 2003 5 Millionen Menschen. Das humane Immundefizienzvirus ist in jedem Land der Welt verbreitet, wobei 95% aller Infizierten in den Entwicklungsländern leben. (Quelle: UNAIDS 2004 Report on the global AIDS epidemic, URL: <http://www.unaids.org/bangkok2004/report>.)

Als 1983 das HIV zum ersten Mal beschrieben wurde, begannen die ersten Vakzine- und Therapiestudien zur Bekämpfung von HIV. Dennoch vermittelt keine der bis jetzt entwickelten Prototyp-Vakzinen einen Schutz vor der HIV-Infektion. Die HAART-Therapie ("highly active antiretrovirale therapy"), welche zur Zeit die einzige wirksame antiretrovirale Therapie darstellt, ist außerdem nur einem geringen Teil der Weltbevölkerung (ca. 5% der HIV-Infizierten) zugänglich. Bei dieser Therapie handelt es sich um eine Kombinationstherapie, die aus mindestens drei verschiedenen Präparaten besteht. Nachteile dieser Therapie sind die hohen Kosten, die große Belastung der Patienten aufgrund der Nebenwirkungen der Präparate und die trotz Kombinationstherapie immer noch mögliche Resistenzbildung von HIV.

### 1.3 Tiermodelle für Retroviren

Ein Problem, welches bei der Forschung mit HIV-1 auftaucht, ist die begrenzte Anzahl an möglichen Tiermodellen. Nur Schimpansen lassen sich reproduzierbar mit HIV-1 infizieren. Jedoch replizieren die meisten HIV-1 Virusisolate in Schimpansen sehr schlecht und die Tiere entwickeln innerhalb einer Dekade nach Infektion keine AIDS ähnliche Erkrankung. Hinzukommt, dass ethische und finanzielle Gründe gegen Experimente mit Schimpansen sprechen. Viele Studien zur Untersuchung der Immunantwort gegen Immundefizienzvirus wurden daher in Rhesusmakaken mit dem verwandten "Simian immunodeficiency virus" (SIV) durchgeführt. Die Probleme dieses Tiermodells sind die limitierte Anzahl an Affen, ihr heterologer genetischer Hintergrund, das geringe Wissen über die molekulare Immunologie von Affen und die limitierten Möglichkeiten deren Immunsystem zu manipulieren. Daher sind Erkenntnisse über fundamentale Grundlagen der Retrovirusimmunologie im Mausmodell einfacher zu erlangen. Ein Vorteil des Mausmodells ist der genetisch definierte immunologische Hintergrund der Tiere, wobei kongene, transgene und knockout Tiere von besonderer Bedeutung für aussagekräftige Experimente sind.

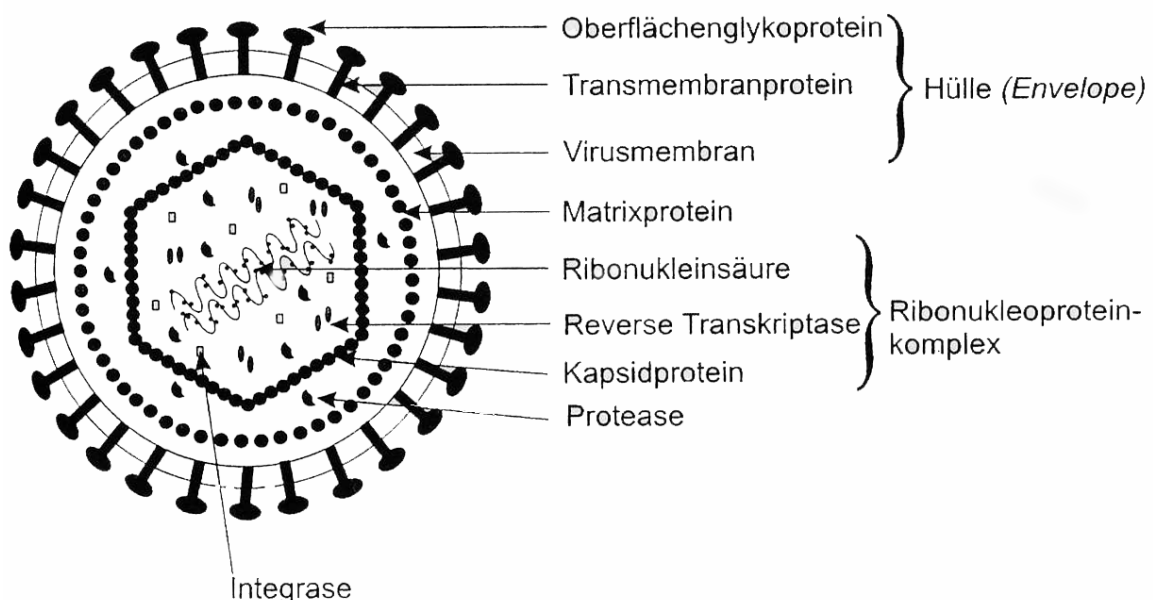
Weil Mäuse nicht mit HIV oder SIV infizierbar sind, muss ein anderes Retrovirus verwendet werden. Es gibt eine große Anzahl von onkogenen Retroviren in der Maus, jedoch induzieren sehr viele dieser Retroviren nur bei neugeborenen Mäusen eine Erkrankung, während sie bei erwachsenen Tieren apathogen sind. Das Friend Virus (FV) ist ein Retrovirus-Komplex, welches in erwachsenen Mäusen eine lethale Erkrankung (Erythroleukämie) verursacht. Die genetischen und immunologischen Merkmale von FV sind intensiv in den letzten zwanzig Jahren untersucht worden

(Hasenkrug and Chesebro, 1997). Aufgrund der unterschiedlichen Pathogenese von FV im Gegensatz zu HIV oder SIV im Menschen oder Affen ist die FV-Infektion als Modell für pathologische Aspekte nicht geeignet. In der akuten Phase einer FV-Infektion bzw. HIV- oder SIV-Infektion sind jedoch große Ähnlichkeiten in der Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem jeweiligen Virus zu beobachten (Dittmer and Hasenkrug, 2001). Daher lassen sich die immunologischen Merkmale einer retroviralen Infektion gut am FV-Modell untersuchen. Das Friend Virus Mausmodell wurde in dieser Arbeit als Grundlagenmodell verwendet, um die zytotoxische Immunantwort gegen Retroviren zu untersuchen.

## 1.4 Virologische Grundlagen

### 1.4.1 Struktur von Retroviren

Die Familie der Retroviridae ist eine große und divergente Familie von umhüllten RNA-Viren, die einen Durchmesser von 80-100nm haben. Das Genom dieser Viren besteht aus einer linearen, einzelsträngigen, nicht segmentierten RNA positiver Polarität mit einer Größe von 7-12kb. Zwei positive einzelsträngige RNA-Moleküle bilden zusammen mit dem Nukleokapsidprotein und dem Reverse-Transkriptase-Molekül einen Ribonukleoproteinkomplex (Core), der von einer Matrix und einer Hülle (Envelope) umgeben ist.



**Abbildung 1.1** Aufbau von Typ-C Retroviren bei Säugetieren am Beispiel von F-MuLV (Modrow and Falke, 1998)

Die Familie der *Retroviridae* lässt sich in zwei Gruppen einteilen; den einfachen und den komplexen Retroviren.

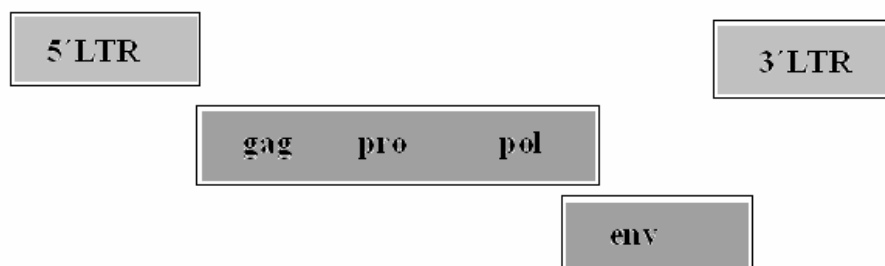
Alle Retroviren haben folgende Hauptgene gemeinsam:

- *gag*-Gen: synthetisiert interne Strukturproteine (Matrix, Kapsid, Nukleoproteinstruktur)
- *pol*-Gen: enthält die Informationen für die Enzyme Reverse-Transkriptase und Integrase
- *env*-Gen: synthetisiert die Oberflächen- und Transmembran-Komponenten des viralen Hüllproteins

Außerdem besitzen alle Retroviren eine kleine Domäne, das *pro*-Gen, welches die Virusprotease synthetisiert.

Einfache Retroviren tragen nur die oben aufgeführten elementaren Gene, während komplexe Retroviren (z.B. HIV) zusätzlich noch eine Reihe an regulatorischen nicht-viralen Strukturproteinen besitzen.

### MuLV



### Abbildung 1.2 Genomorganisation von Retroviren

Aufbau von Retroviren am Beispiel von MuLV (Coffin *et al.*, 1997). Die Gene *gag*, *pol* und *env* kodieren für die Strukturproteine. Diese sind essentiell und in allen Retroviren vorhanden.

Vor allem bei Wirbeltieren sind Retroviren zu finden, wo sie für verschiedene Erkrankungen verantwortlich sind, dazu gehören Tumorerkrankungen (z.B. HTLV-I), Immundefizienz (z.B. HIV), neurologische Defekte bis hin zu inapparenten Infektionsverläufen.

Die Familie der *Retroviridae* lässt sich in 7 Gattungen einteilen:

**Tabelle 1.1 Taxonomie der *Retroviridae*** (Modrow and Falke, 1998)

Unterfamilie	Gattung	Beispiel	Genom
Onkoviren	Alpharetrovirus	ALV ( <i>Avian leukosis virus</i> )	simpel
	Betaretrovirus	MMTV ( <i>Mouse mammary tumor virus</i> )	simpel
	Gammaretrovirus	MuLV ( <i>Murine leukemia virus</i> )	simpel
	Deltaretrovirus	HTLV-I ( <i>Humane T-cell leukemia virus</i> )	komplex
	Epsilonretrovirus	WDSV ( <i>Walleye dermal sarcoma virus</i> )	simpel
Lentiviren	Lentivirus	HIV-1 ( <i>Humane immunodeficiency virus</i> )	komplex
Spumaviren	Spumavirus	SFV ( <i>Simian foamy virus</i> )	komplex

Außerdem muss zwischen exogenen und endogenen Retroviren unterschieden werden. Die exogenen Retroviren besitzen alle Informationen auf dem Genom, die für einen kompletten Infektionszyklus mit anschließender Partikelfreisetzung notwendig sind. So kann das Virus „aktiv“ verbreitet werden. Dieses steht im Gegensatz zu den endogenen Retroviren. Diese sind im Wirtsgenom integriert und können aufgrund von Gendefekten nur noch vertikal übertragen werden.

Bei Retroviren kann es zu Defekten im Genom kommen, die zum Verlust des produktiven Infektionszyklus führen können. Helferviren können diese Defekte komplementieren, so dass das defekte Retrovirus mit Hilfe des Helfervirus einen kompletten Infektionszyklus durchlaufen kann.

#### 1.4.2 Klassifizierung muriner Leukämie Viren

Die murinen Leukämieviren (MuLV) gehören zu den Gammaretroviren und sind daher einfache Retroviren. Ursprünglich wurden murine Leukämieviren aus Mausstämmen isoliert, welche eine hohe Anzahl von Leukämieerkrankungen aufwiesen. Es wurden mehrere Virusisolate hergestellt. Das Isolat von Gross und Moloney (1960) führte in infizierten Mäusen zu einer T-Zell Leukämie, während Isolate von Rauscher (1962) und Friend (1957) zu einer Erythroleukämie führten. Weitere Syndrome, die durch MuLV verursacht werden, sind MAIDS ("murine acquired immunodeficiency syndrom"), Sarkome und Thymome (Liang *et al.*, 1996; Ruscetti, 1995; Hoatlin and Kabat, 1995; Sourvinos *et al.*, 2000).

Die Viren, die ein solches Krankheitsbild verursachen, sind zum überwiegenden Teil eine Mischung aus defekten und kompletten Viren. Bei den kompletten Viren handelt

es sich um nicht-pathogene aber replikationskompetente Viren, auch Helferviren genannt. Die defekten Viren sind pathogen aber nicht replikationskompetent. Bei einer Koinfektion einer Zelle mit beiden Viren können von dem defekten Virus mit Hilfe der Helferviren neue infektiöse Partikel gebildet werden.

Je nach Art des Virus-Rezeptors werden die murinen Leukämieviren in folgende Subklassen eingeteilt:

- ekotrophe Viren, die auf die Infektion von Maus- und Rattenzellen beschränkt sind
- xenotrophe Viren, die Zellen verschiedener Arten außer Mauszellen infizieren
- amphotrophe und polytrophe Viren, welche Rezeptoren nutzen, die sowohl auf Zellen von Nagern als auch auf anderen Säugerzellen vorkommen

### 1.4.3 Aufbau und Besonderheiten der murinen Leukämie Viren

Die virale Hülle der murinen Leukämieviren enthält ein ikosaedrisches Kapsid, in dem sich die ssRNA befindet. In dem Kapsid sind neben den drei virus-kodierten Enzymen (Reverse Transkriptase, Integrase und Protease) zelluläre t-RNA als Primer für die virale DNA-Synthese enthalten. Das virale Genom ist ein Dimer aus zwei identischen unsegmentierten RNA-Strängen von einer Länge von ca. 8,2kb.

Das *gag*-Gen, welches für die internen Strukturproteine des Virions kodiert, wird als Vorläuferprotein (Pr65Gag) gebildet und in vier Untereinheiten gespalten (p30Gag, p15Gag, pp12Gag und p10Gag). Das *pol*-Gen liefert die Informationen für die Reverse Transkriptase und Integrase und ist durch ein Stop-Codon vom *gag*-Gen getrennt. Durch das Überlesen des Stop-Codons wird die mRNA in ein Gag-Pol-Polyprotein translatiert. Eine Besonderheit von MuLV ist, dass das glykosylierte Gag-Pol-Polyprotein an die Zelloberfläche transportiert wird. Im Leseraster von *pol* befindet sich ein weiterer Genabschnitt *pro*, der für die Virionprotease kodiert.

Die äußeren Hüll- und Transmembranproteine des Virus leiten sich vom *env*-Gen ab. Das *env*-Gen kodiert für die viralen Hüllproteine gp70 und p15E, welche von einem gemeinsamen Vorläuferprotein (85kDa) gebildet werden. Dieses Vorläuferprotein (85kDa) wird am rauhen endoplasmatischen Retikulum (ER) translatiert und im ER glykosyliert. Im Golgi-Apparat wird das Vorläuferprotein nach einer weiteren Glykosylierung in zwei Einheiten gespalten, dem glykosylierten oberflächlichen Hüllprotein gp70 und dem nicht glykosylierten transmembranen Teil p15E. Das gp70 bildet die sogenannten "knobs" auf der Oberfläche der Virushülle. Mit dem



oberflächlichen Proteinanteil (SU) des gp70 ist der transmembranöse Teil (TM) p15E über Disulfidbrücken verbunden. Durch die exponierte Stellung des gp70 auf dem Viruspartikel ist dieses Protein für viele biologische Eigenschaften von MuLV wie Rezeptorerkennung, Wirtsspezifität, Rezeptor-Interferenz und Antigenität verantwortlich (Hunter and Swanstrom, 1990; Cunningham, 1992).

### 1.5 Replikationszyklus von F-MuLV

Die Replikation von murinen Leukämieviren ist typisch für Retroviren und lässt sich in folgende Abschnitte einteilen:

1. Bindung des Virions an seinen Rezeptor an der Wirtszelloberfläche
2. Internalisierung der Core-Struktur in das Zytoplasma
3. Aktivierung der reversen Transkription mit Synthese der doppelsträngigen viralen DNA
4. Transport der DNA in den Zellkern
5. Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom
6. Transkription des Provirus durch die zelluläre Polymerase II
7. Transport gespleißter und ungespleißter mRNA in das Zytoplasma und dortige Translation
8. Verpackung der viralen RNA und der viralen Proteine zu kompletten Viren an der Plasmamembran und anschließende Freisetzung neuer viraler Partikel

Die Replikation von Murinen Leukämieviren ist nicht lytisch und findet in stabilen Virus-produzierenden Wirtszellen statt.

### 1.6 Pathogenese des Friend Virus Komplex

Friend Virus-Komplex (FV) besteht aus dem nicht-replikationsfähigen SFFV ("spleen focus-forming virus") und dem replikationskompetenten aber apathogenen F-MuLV ("Friend-murine leukemia virus"). Das SFFV besitzt größere Deletionen im *gag*-Gen, so dass keine viralen Partikel gebildet werden können. Erst eine Koinfektion der Wirtszellen durch beide Viren (F-MuLV und SFFV) führt zur Verpackung des SFFV in F-MuLV kodierte Viruspartikel und damit zur Verbreitung des SFFV. Durch diese Verbreitung des SFFV wird in den Mäusen eine Erythroleukämie verursacht. F-MuLV alleine ist in erwachsenen Mäusen apathogen, kann aber in neugeborenen Mäusen,

welche kein voll ausgebildetes Immunsystem haben, eine Splenomegalie, Anämie und Erythroleukämie verursachen.

Der Rezeptor für F-MuLV und andere ekotrophe murine Leukämieviren ist Pit-1/2 ("inorganic phosphate transporter"). Die Zielzellen sind daher Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Erythrozytenvorläuferzellen (Dittmer *et al.*, 2002).

Der Rezeptor für das SFFV ist unbekannt. Nachdem das SFFV einen Erythroblasten infiziert hat, wird das *env* kodierte Glykoprotein gp55 an der Zelloberfläche exprimiert. Das Glykoprotein bindet an den Erythropoetin-Rezeptor (EPO-R) von kernhaltigen Erythrozytenvorläuferzellen, wodurch es ein konstitutives Mitogen für diese Zellen ist und eine polyklonale Proliferation induziert (Kabat, 1989, d'Andrea *et al.*, 1992). Diese Proliferation der Erythrozytenvorläuferzellen (Zielzellen für das FV) führt zu einer massiven Splenomegalie, bei der das Milzgewicht von FV suszeptiblen Mäusen auf das 10 bis 20fache des Normalgewichts innerhalb der ersten zwei Wochen nach Infektion ansteigt. Das Immunsystem dieser Mäuse ist nicht in der Lage eine schützende Immunantwort gegen das FV auszubilden, so dass die Tiere 3-4 Wochen nach Infektion eine maligne Erythroleukämie entwickeln. Die entstandenen malignen Zellen besitzen zwei charakteristische Merkmale: Zum einen aktiviert das Provirus durch seine Integration ein zelluläres Onkogen der *ets*-Familie, zum anderen besitzen viele FV transformierte Zellen ein inaktiviertes p53 Tumorsuppressor-Gen (Kabat, 1989).

## 1.7 Die Immunantwort gegen ein Pathogen

Um die Immunantwort von Mäusen auf eine Friend Virus Infektion zu verstehen, wird ein kurzer Überblick über die Funktion der Immunantwort bei einer Virusinfektion gegeben.

Bei Säugetieren gibt es zwei unterschiedliche Abwehrsysteme, die "natürliche oder angeborene" und die "erworbene" Immunantwort. Die "angeborene" Immunantwort vermittelt in den Tieren einen unspezifischen Schutz gegen eine Infektion. Bei dieser Immunantwort sind unter anderem phagozytierende Zellen (z.B. Makrophagen) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) beteiligt. NK-Zellen werden im Knochenmark aus noch nicht bekannten Vorläuferzellen gebildet. NK-Zellen werden auch als "large granular lymphocytes" bezeichnet und können ohne vorherige Aktivierung Zielzellen spontan ohne Erkennung körperfremder Peptidantigene töten (Timonen *et al.*, 1981). Da NK-Zellen keine Aktivierung benötigen, stellen diese eine erste, sehr rasche, aber

unspezifische Abwehr gegen extra- und intrazellulär lokalisierte Infektionserreger dar (Scott and Trinchieri, 1995). Eine weitere Aufgabe der NK-Zellen liegt in der frühen Produktion großer Mengen Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). Es konnte gezeigt werden, dass die frühe Freisetzung von IFN $\gamma$  aus NK-Zellen, entscheidend für die erfolgreiche Abwehr verschiedener, intrazellulärer Infektionserreger wie z.B. *Listeria monocytogenes* und *Mycobacterium avium* ist (Tripp *et al.*, 1993; Appelberg *et al.*, 1994).

Die "erwerbende" Immunität ist spezifisch und wird durch die Zellpopulation der Lymphozyten vermittelt. Diese antigenspezifischen Zellen sind in der Lage verschiedene Effektorfunktionen im Kampf gegen eine Infektion, sowie ein immunologisches Gedächtnis auszubilden. Die Lymphozyten befinden sich in großer Anzahl im Blut, in der Lymphe und in den lymphoiden Geweben. Sie entwickeln sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen, der fötalen Leber bzw. des Knochenmarks. Es werden zwei Gruppen unterschieden, die T-Zellen und die B-Zellen. Die B-Zellen entwickeln sich direkt aus den hämatopoetischen Stammzellen während die T-Zellen vom Knochenmark bzw. der fötalen Leber in den Thymus wandern und dort ausreifen.

Mit den zwei Typen der Lymphozyten lassen sich zwei Hauptmechanismen der erworbenen Immunantwort assoziieren, die humorale und zelluläre Immunantwort. B-Zellen produzieren antigenspezifische Antikörper (Immunglobuline, Ig). Diese Antikörperantwort wird als humorale Immunantwort bezeichnet. Je nach Beschaffenheit des Antigens produzieren B-Zellen unabhängig oder abhängig von T-Zellen Antikörper. Greaves *et al.* (1973) beobachtete, dass Menschen, die keine T-Zellen besaßen, eine geringere Antikörperantwort aufwiesen. Chesnut und Grey (1986) zeigten, dass dieses Phänomen auf der Funktion von bestimmten T-Zellen beruhte. Die Funktion dieser T-Zellen besteht darin, die Aktivität von Effektorzellen zu regulieren. Daher heißen diese Zellen T-Helferzellen (Th-Zellen). Auf ihrer Oberfläche exprimieren T-Zellen bestimmte Oberflächenmoleküle. Mit der Abkürzung CD („clusters of differentiation“) und einer entsprechenden Zahl werden zelluläre Proteine bezeichnet, welche charakteristischerweise auf der Oberfläche einer oder mehrerer definierter Populationen von Immunzellen exprimiert sind. CD4 und CD8 Moleküle sind Glykoproteine, die zur Immunglobulin-Superfamilie gehören und als Ko-Rezeptoren fungieren. CD4 findet sich üblicherweise auf T-Helferzellen, während zytotoxische T-Lymphozyten durch die Expression des CD8-Proteins charakterisiert sind.

Alle Viren sowie einige Bakterien und Parasiten vermehren sich im Cytoplasma infizierter Zellen. Die intrazellulär lokalisierte Infektionserreger können dann nur noch dadurch eliminiert werden, dass die infizierten Zellen, von denen sie abhängig sind, zerstört oder verändert werden (Nickell and Sharma, 2000; Zinkernagel *et al.*, 1986). Diese Rolle bei der Erregerabwehr übernehmen die zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) und NK-Zellen. Im Cytoplasma der CTL und NK Zellen befinden sich lytische Granula, modifizierte Lysosomen. Die Granula enthalten verschiedene Effektorproteine, bei deren Freisetzung die Proteine aktiviert werden und anfangen ihre lytische Funktion auszuüben.

## 1.8 Die zelluläre Immunantwort

### 1.8.1 T-Helferzellen

Die antiviralen Aktivitäten der T-Lymphozyten besteht in der Überwachung und Eliminierung infizierter Zellen. Aktivierte T-Lymphozyten erkennen mit Hilfe des T-Zellrezeptors (TCR) sowie verschiedener Ko-Rezeptoren infizierte Zellen durch deren Präsentationprozessierter Peptidantigene in Verbindung mit bestimmten zellulären Oberflächenproteinen, dem sogenannten Haupthistokompatibilitätskomplex Proteinen (MHC) weshalb die T-Zellantwort als MHC-restringiert bezeichnet wird (Zinkernagel and Doherty, 1974).  $CD4^+$  T-Zellen vom Helfertyp erkennen virale Peptide in Assoziation mit MHC Klasse II Molekülen (Konig *et al.*, 1992). MHC Klasse II Moleküle werden ausschließlich von sogenannten "professionellen" Antigen-präsentierenden Zellen (APC) exprimiert. Dazu gehören in erster Linie dendritische Zellen (DC), Makrophagen und B-Lymphozyten.

Die antigenspezifische T-Helferzell-Antwort wird in zwei Typen, Typ 1 (Th1) und Typ 2 (Th2), eingeteilt. Die Th-Zell-Typen unterscheiden sich in ihrer Effektorfunktion und ihrer Sekretion von Zytokinen (Mosmann and Coffman, 1989; Seder and Paul, 1994). Zytokine sind Effektormoleküle, diese werden von Zellen des Immunsystems sekretiert und beeinflussen das Verhalten anderer Zellen.

Th1-Zellen sekretieren Zytokine wie  $IFN\gamma$ , Interleukin (IL-) 2 und Lymphotoxin. Das sekretierte  $IFN\gamma$  aktiviert Makrophagen und verstärkt den Immunglobulin-Klassenwechsel (Immunglobulin-Switch) von IgM zu IgG2a, ein Kennzeichen einer Th1-Immunität (Finkelman *et al.*, 1990).

Th2-Zellen produzieren IL-4, -5, -10 und IL-13 und hemmen die Makrophagenaktivität. Kennzeichen einer Th2-assoziierten Immunantwort ist die hohe Konzentration an IL-4 und der Immunglobulin-Switch zu IgG1 (Stevens *et al.*, 1988).

Eine Th1-dominierte Immunantwort wird vor allem bei einer Infektion mit Viren oder intrazellulären Bakterien beobachtet. Bei einer parasitären oder extrazellulären bakteriellen Infektion ist eine Th2-Immunantwort dominant.

### 1.8.2 Zytotoxische T-Zellen

Zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkennen virale Peptide in Verbindung mit MHC Klasse I Molekülen (Zinkernagel and Doherty, 1974). MHC Klasse I Moleküle können prinzipiell von jeder Zelle, die einen Zellkern besitzt, exprimiert werden. Eine wichtige Aufgabe aktivierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen besteht in der Erkennung und Eliminierung virusinfizierter Zellen, welche MHC Klasse I in Verbindung mit viralen Peptiden an ihrer Oberfläche präsentieren. Neben ihrer zytotoxischen Funktion haben CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch die Freisetzung verschiedener Zytokine und Chemokine auch einen regulativen Charakter. Zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind in der Lage IFN $\gamma$ , in geringerem Umfang auch den Tumor Nekrose Faktor (TNF)  $\alpha$ , sowie eine Reihe sogenannter Chemokine z.B. MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  oder RANTES (Wagner *et al.*, 1998; Price *et al.*, 1999) zu synthetisieren. Chemokine spielen eine entscheidende Rolle bei der Migration von den Leukozyten zum Infektionsbereich und der Induktion von Entzündungsprozessen in infizierten Organen (Mahalingam and Kareupiah, 1999).

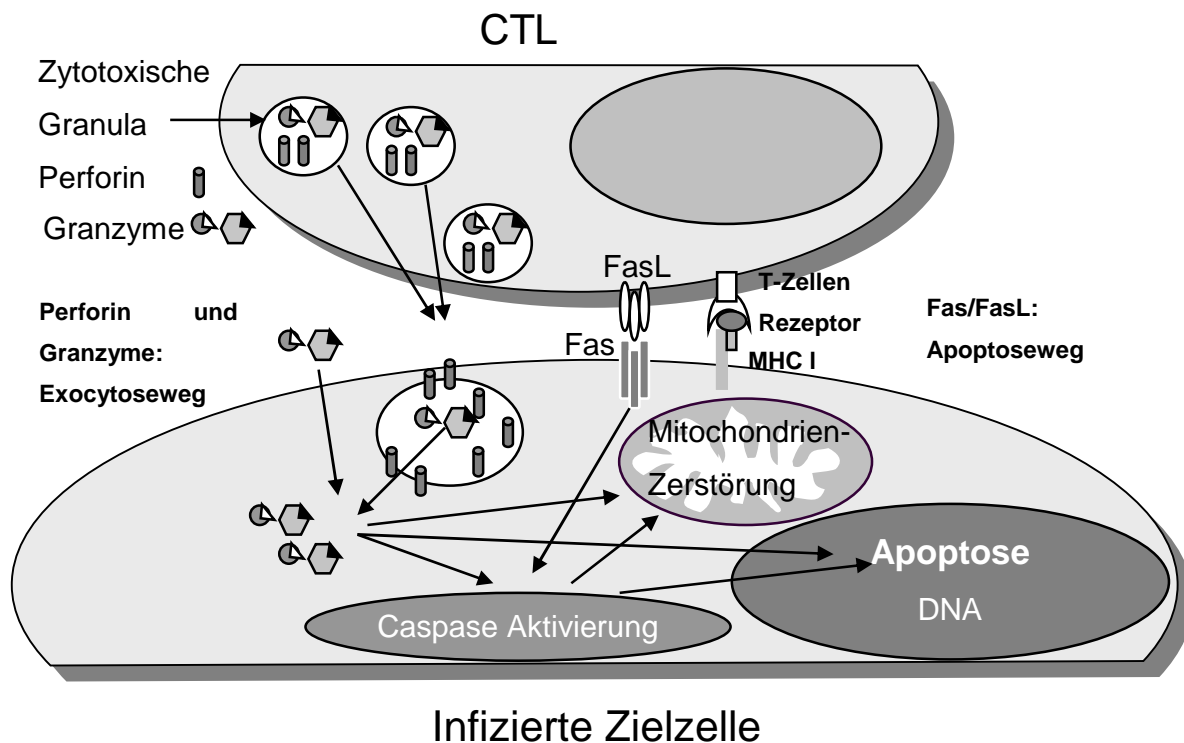
Über einen indirekten Mechanismus kann IFN $\gamma$  die Vermehrung von Pathogen, indem es die MHC I Expression stimuliert (Fruh and Yang, 1999), Makrophagen aktiviert (Portnoy *et al.*, 1989) oder die Pathogenreplikation inhibiert (Gregory and Wing, 1993). Außerdem wurde gezeigt, dass IFN $\gamma$  die Fas-Expression erhöht und dadurch indirekt auf die Apoptoseinduktion einwirkt (Dai and Krantz, 1999; Müllbacher, 2002). TNF $\alpha$  besitzt eine starke proentzündliche Wirkung und ein direktes lytisches Potential. Durch TNF $\alpha$  Bindung an den TNF -Rezeptor 1 wird der Zelltod der infizierten Zelle induziert (Wallach *et al.*, 1999). Außerdem verfügen CTL über zwei unabhängige zytolytische Mechanismen: die Granula-Exozytose und die FasL/Fas vermittelte Zytotoxizität. Beide unabhängigen zytotoxischen Wege führen zur Apoptose der Zielzelle. Charakteristisch für die Apoptose ist die Fragmentierung der chromosomalen DNA in 180 bp lange Mono- und Multimere. Mit diesem Mechanismus werden in einem immunkompetenten Organismus infizierte Zellen eliminiert (Hahn *et al.*, 1995).

Der Granula-Exozytoseweg ist durch die Sekretion zytotoxischer Granula (Millard *et al.*, 1984; Podack and Konigsberg, 1984) aus CTL oder NK-Zellen (Young *et al.*, 1986) gekennzeichnet. Nach TCR-MHC/Ag Interaktion wandern die zytotoxischen Granula zielgerichtet zu der Kontaktstelle zwischen CTL und Zielzelle (Griffiths, 1995; Henkart, 1994) (s. Abb. 1.2). Dort fusionieren die Granula mit der Zellmembran der CTL, der Inhalt der Granula wird in den interzellulären Spalt entleert und induziert Apoptose in der Zielzelle (s. Abb. 1.2). Der zweite zytotoxische Rezeptor-vermittelte Weg wird durch die direkte Interaktion des FasL mit seinem Rezeptor (Fas) induziert und führt ebenfalls zum programmierten Zelltod (Abb. 1.3 und Abb. 1.4) (Krammer, 1999; Nagata and Golstein, 1995).

### **1.9 Mechanismen der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität**

Im Zytoplasma von aktivierten zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen befinden sich lytische Granula. Die Granula enthalten verschiedene zytotoxische Effektorproteine, die durch die Freisetzung Zielzellen töten. Dazu gehören lytische Moleküle (Perforin), Proteasen (Granzyme), verschiedene Rezeptoren (Mannose-6- Phosphat Rezeptor) und Zytokine (TNF $\alpha$ ), sowie verschiedene Moleküle, die an der Aktivierung (oder Inaktivierung) und Stabilisierung von Perforin und den Granzymen (Gzm) beteiligt sind. Für die durch Granula-Exozytose induzierte Apoptose sind im wesentlichen Perforin sowie GzmA und GzmB verantwortlich (Abb. 1.3) (Hayes *et al.*, 1989; Shi *et al.*, 1992a).

Ein weiterer Mechanismus der T-Zell vermittelten Zytotoxizität wurde kürzlich in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, und ebenfalls in NK Zellen, gefunden. Es konnte gezeigt werden, dass die T-Zellen zytotoxische Aktivitäten auch über den Fas/Fas-Ligand-Mechanismus vermitteln (Stalder *et al.*, 1994).



**Abbildung 1.3 Zytotoxische Mechanismen der T-Zellen**

Granzyme und Perforin werden in zytotoxischen Granula gespeichert, Der FasL wird auf der Zelloberfläche exprimiert. Beim Antigenkontakt der CTL mit der infizierten Zelle bindet der FasL an das Fas und die zytotoxische Granula wird exozytiert. Beide zytotoxischen Wege (Perforin und Granzyme Exozytoseweg und Fas/FasL Apoptoseweg) induzieren Apoptose.

## 1.9.1 Exozytoseweg

### 1.9.1.1 Perforin

Bei Perforin handelt es sich um ein 70 kD Protein, welches ausschließlich von Lymphozyten mit zytotoxischem Charakter exprimiert und in zytoplasmatischen Granula gespeichert wird (Podack *et al.*, 1984).

Das ursprüngliche Model vom Exozytose Weg und der Funktion der Perforins wurde in den letzten drei Jahren grundsätzlich überarbeitet. Seitdem das Perforin entdeckt wurde (Podack and Dennert. 1983), wurde folgende Hypothese vertreten: nach der Calciumabhängigen Ausschüttung der Granula ist Perforin in der Lage, in der Zellmembran der Zielzelle, Poren mit einem durchschnittlichen Durchmesser von circa 16 nm zu formen. Die Granzyme, welche durch die Perforin-Poren in die Zielzelle gelangen, lösen die Apoptose in der Zielzelle aus (Young *et al.*, 1986; Jene and Tschopp, 1988). Nachdem Browne gezeigt hat, dass der Durchmesser der Perforinporen zu klein für die passive Diffusion der Granzyme in das Zytoplasma der

Zielzelle ist und der Mannose 6-phosphate Rezeptor (MPR) als spezifischer Membranrezeptor für Granzym B von Motyka entdeckt wurde, wurde die Theorie vom Mechanismus der Exozytose-Zytotoxizität revidiert (Browne *et al.*, 1999; Motyka *et al.*, 2000). Die aktuelle Hypothese besagt, dass die Effektorproteine durch Endozytose das Zytoplasma der Zielzelle erreichen. Das Perforin ist essentiell für die Freisetzung von Granzyme ins Zytoplasma zuständig, wodurch die Caspasen und andere proapoptische Mechanismen aktiviert werden.

Mit Hilfe von Perforin-knockout ( $\text{Perf}^{-/-}$ ) Mäusen konnte in Infektionsversuchen gezeigt werden, dass die Perforin-abhängige Zytotoxizität entscheidend zur Eliminierung des lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) (Kägi *et al.*, 1994), Ectromelia Virus (EV) der Maus (Smith *et al.*, 1998) und Teiler's Picornavirus (Rossi *et al.*, 1998) beiträgt. Dagegen hat eine Perforin-Defizienz keinen Einfluss auf die Eliminierung des Vesikular Stomatitis Virus (VSV), Semliki Forest Virus (SFV) oder des Kuhpocken Virus (Kägi *et al.*, 1995b; Müllbacher, *et al.*, 1999a) in der Maus.

Es wurde gezeigt, dass bei HIV-infizierten Patienten spezifische  $\text{CD8}^+$  T-Zellen nur sehr geringe Menge Perforin produzieren und diese Zellen kaum zytotoxische Funktionen ausüben können (Trimble and Lieberman, 1998; Appay *et al.*, 2000). Die  $\text{CD8}^+$  T-Zell-Dysfunktion war assoziiert mit der Krankheitsprogression, so dass Perforin eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Retroviren zu spielen scheint.

#### 1.9.1.2 Granzyme

Bei den Granzymen handelt es sich um Serinproteasen, die unter anderem in T-Zellen von Mensch, Maus und Ratte gefunden wurden. In der Maus sind bis heute neun verschiedene Granzyme bekannt (GzmA-G, GzmK und GzmM) (Sayers *et al.*, 2001; Shresta *et al.*, 1999; Trapani, 2001), die *in vitro* von aktivierten T-Zellen und NK Zellen exprimiert werden (Ebnet *et al.*, 1991; Garcia-Sanz *et al.*, 1990). In *in vivo* sensitivierten T-Zellen werden hingegen hauptsächlich GzmA und GzmB exprimiert (Ebnet *et al.*, 1991; Garcia-Sanz *et al.*, 1990). Die Substratspezifität und die Rolle von Granzymen beim Zelltod von Zielzellen sind in der Tabelle 1.2 zusammengestellt. Beide Enzyme weisen eine eingeschränkte proteolytische Aktivität mit unterschiedlicher Substratspezifität auf: GzmA ist eine Tryptase, die Proteine nach Arginin oder Lysin spaltet (Beresford *et al.*, 1997; Simon *et al.*, 1986; Simon and Kramer, 1994), GzmB ist eine Aspartase, die Proteine nach Asparaginsäuren spaltet (Poe *et al.*, 1991; Tschopp, 1994). Zusätzlich unterscheiden sich die Enzyme in ihrer



Struktur: GzmA ist ein Homodimer und GzmB eine Monomer. Dies lässt vermuten, dass GzmA und GzmB unterschiedliche biologische Funktionen ausüben und damit nicht redundant sind. GzmA und GzmB gelangen nach der Freisetzung aus den zytotoxischen Granula durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zielzelle (Froelich *et al.*, 1996; Jans *et al.*, 1996; Jans *et al.*, 1998; Podack *et al.*, 1988; Shi *et al.*, 1997). Die Endozytose von GzmB wird durch den kationenunabhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor vermittelt (Motyka *et al.*, 2000), der Rezeptor für GzmA ist unbekannt. GzmA gelangt nach der Freisetzung aus Endosomen durch Perforin in den Nukleus (Jans *et al.*, 1998) und induziert dort Apoptose (Abb. 1.3) (Shi *et al.*, 1992b; Shresta *et al.*, 1999). Zu den GzmA spezifischen Substraten gehört unter anderem PHAP II („putative HLA associated protein II“), das an der Faltung von Chromatin beteiligt ist und dessen Spaltung die Zugänglichkeit exogener Nukleasen an das Chromatin erhöht (Beresford *et al.*, 1997; Beresford *et al.*, 1999). Ein weiteres Substrat von GzmA ist das Histon 1 (H1), dessen Spaltung zur Entfaltung der Nukleosomen führt, so dass DNAsen besseren Zugang zur DNA erhalten (Zhang *et al.*, 2001). Wie genau die Induktion der Apoptose über GzmA verläuft ist trotz allem nicht bekannt, es ist aber sicher, dass dieser Prozess GzmB- und Caspase-unabhängig verläuft (Beresford *et al.*, 1999; Shresta *et al.*, 1999). GzmA induziert die Polarisation der mitochondrialen Membran. Der molekulare Mechanismus dieses Prozesses ist aber noch nicht bekannt. Es ist gezeigt worden, dass GzmA die Reverse Transkriptase des Moloney Murine Leukemia Virus degradiert (Simon *et al.*, 1987a), wodurch das GzmA direkt auf die retroviral Infektion Einfluss nehmen kann. Ein typisches Merkmal der GzmB-vermittelten Apoptose ist die Aktivierung unterschiedlicher Caspasen (Caspase 2, -3, -7, -8, -9 und -10) (Chinnaiyan *et al.*, 1996; Darmon *et al.*, 1995; Medema *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 1996). Caspasen sind Cysteinproteasen, die ihre Substrate nach Asparaginsäureresten spalten. Man unterscheidet zwei Caspase-Gruppen: Initiator-Caspasen (Caspase 8, -9, -10), die weitere Caspasen spalten (Caspase-Kaskade), und die Effektor-Caspasen (Caspase 3, -6, -7), die meist von den Initiator-Caspasen gespalten werden und selber viele intrazelluläre Proteine (z.B. den Inhibitor der Caspase aktivierten DNase, ICAD) spalten können (s. Abb. 1.3). Die Effektor-Caspasen sind für die Induktion der Apoptose über GzmB und dem FasL/Fas- Weg von entscheidender Bedeutung (s. Abb. 1.3 und 1.4) (Henkart *et al.*, 1997; Krammer, 1999; Nagata, 1997). Zusätzlich spaltet GzmB direkt ICAD, wodurch CAD freigesetzt wird (s. Abb. 1.3) (Blink *et al.*,

1999; Thomas *et al.*, 2000) und im Kern die Spaltung der DNA zwischen den Nukleosomen in für Apoptose typische 180 bp Fragmente induziert (Nagata, 2000; Wyllie, 1980). Ein weiteres GzmB Substrat ist Bid. Bid ist ein Mitglied der proapoptischen Bcl-2 Familie, und seine Spaltung führt zur Cytochrom C Freisetzung aus Mitochondrien und zur Bildung eines Komplexes (Apoptosom), bestehend aus Cytochrom C, Caspase 9 und dem apoptotischen Protease-aktivierenden Faktor-1 (Apaf-1). Dieser Komplex aktiviert weitere Effektor-Caspasen und führt zur Apoptose (Abb. 1.3) (Gross *et al.*, 1998; Heibin *et al.*, 2000; Pinkoski *et al.*, 2001; Sutton *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu GzmA sind für GzmB nur Substrate bekannt, die an der Apoptoseinduktion beteiligt sind.

**Tabelle 1.2: Eigenschaften der Granzyme**

Granzyme	Enzymes-aktivität	Molekulargewicht	Substrat	Funktion
<b>Granzym A</b>	Triptase	65 kDa Homodimer	SET Komplex ("Nukleosom assembly Protein")	Einzelstrang DNA Schaden
			Histone H1	Degradierung
			Laminins	Destrukturierung Nukleusmembran
<b>Granzym B</b>	Aspartase	32 kDa Monomer	DNA Fragmentierungsfaktor	DNA Fragmentierung
			Bid	Depolarisierung der Mitochondrien
			Caspase-3, -8	Apoptoseinduktion

Die Perforin-Granzym vermittelte Zytotoxizität der zytotoxischen Effektorzellen spielt eine wichtige Rolle bei der Abwehr viraler Infektionserreger. Infektionsexperimente mit Granzym knockout ( $Gzm^{-/-}$ ) Mäusen haben gezeigt, dass GzmA an der Abwehr von Maus Poxvirus Ektromelia beteiligt ist (Mullbacher *et al.*, 1996). Mit dem Herpes Simplex Virus infizierten  $GzmA^{-/-}$  Mäuse entwickeln schwere neuronale Erkrankungen im Vergleich zum Wildtypmäusen (Pereira *et al.*, 2000). Obwohl  $GzmB^{-/-}$  Mäuse das LCMV *in vivo* kontrollieren können, läuft die Eliminierung des Virus aus den Geweben der Tiere nicht so effizient wie bei Wildtypmäusen ab (Zajac, 2003). CTL von den  $GzmB^{-/-}$  Mäusen induzieren in *in vitro* cytotoxischen Assays eine langsamere DNA-Fragmentierung in den Zielzellen, als CTL von Wildtypmäusen (Heusel *et al.*, 1994).

**Tabelle 1.3 Charakteristik der Mausstämme mit Defekten in der Produktion von zytotoxischen Molekülen (Waterhouse and Trapani, 2002)**

Knockout Mutanten	Phänotyp/ Krankheit	Apoptoseinduktion	Physiologische Relevanz	Referenz
<b>Gld (FasL Mutant)</b>	Autoimmunkrankheiten, Lymphadenopathie, Lymphoproliferation, Hypergammaglobulinemia	CTL töten nicht über FasL Weg Normalen Apoptose als Antwort auf FasL, Perf, Gzm	Kritisch für Lymphozyten-homeostase	Takahaschi <i>et al.</i> , 1994
<b>Fas<sup>-/-</sup></b>	Hochreguliert FasL, Lymphadenopathie, Lymphoproliferation, Hypergammaglobulinemia, Hyperplasie der Leber	Zielzellen resistent zu FasL, Apoptose als Antwort auf Perf und Gzm	Kritisch für Lymphozyten-homeostase	Adachi <i>et al.</i> , 1995; Adachi, 1996
<b>GzmA<sup>-/-</sup></b>	Gesund, fertile, suszeptibel zu Ectromelia	Apoptose nicht geändert	GzmA induzierte langsame Apoptose in den Zielzellen	Ebnet <i>et al.</i> , 1995; Müllbacher <i>et al.</i> , 1996
<b>GzmB<sup>-/-</sup></b>	Gesund, fertile, suszeptibel zu Ectromelia	CTL induziert langsamere Apoptose	GzmB induziert Apoptose in den Zielzellen	Heusel <i>et al.</i> , 1994 Shresta <i>et al.</i> , 1999
<b>GzmAxB<sup>-/-</sup></b>	Hoch suszeptibel bei viralen Infektionen	Defizit im Exozytose Weg	GzmA und GzmB induziert Apoptose in den Zielzellen	Müllbacher <i>et al.</i> , 1999; Shresta <i>et al.</i> , 1999
<b>Perforin<sup>-/-</sup></b>	Hoch suszeptibel bei viralen Infektionen	Defizit im Exozytose Weg	Perforin induziert den Zelltod über den Exozytoseweg	Kagi <i>et al.</i> , 1994; Walsh <i>et al.</i> , 1994

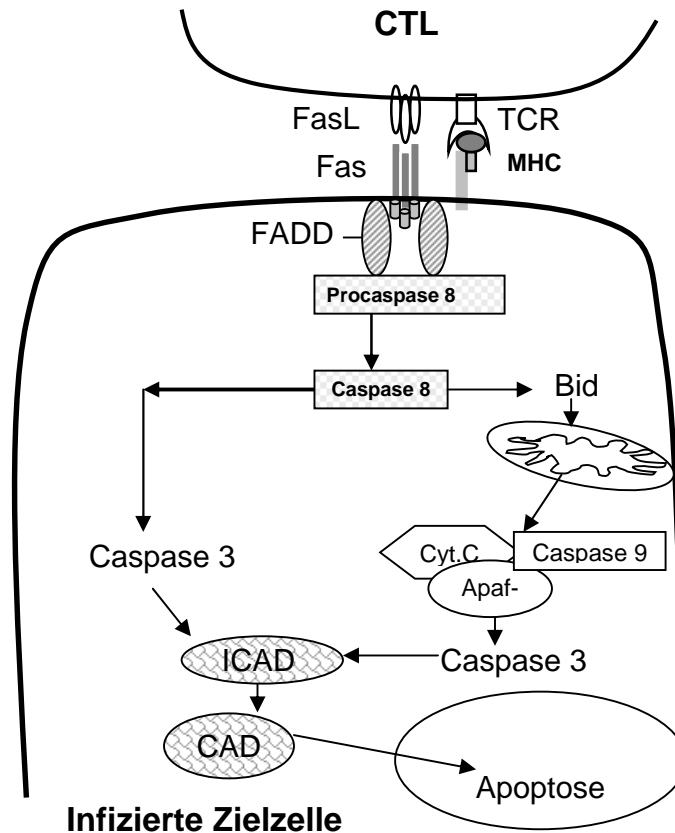
Es wurde gezeigt, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen von HIV-infizierten Patienten GzmA (Trimble and Liebermann, 1998) und GzmB (Koopman *et al.*, 1997) exprimieren. Eine Abnahme von GzmB positiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den Lymphknoten HIV infizierter Personen ist mit einer schlechten Prognose verbunden (Espersen *et al.*, 2001). Dennoch wurde die Rolle von Granzymen bei der Kontrolle von Retroviren bisher

kaum untersucht. Wir wollten mit Hilfe von „knockout“ Mäusen die Bedeutung einzelner zytotoxischen Moleküle bei der Abwehr von Retroviren genau untersuchen.

### 1.9.2 Der Apoptoseweg

Fas ist ein Oberflächenprotein, welches von verschiedenen Zellpopulationen exprimiert werden kann. Hierzu gehören vor allem regenerative Zellpopulationen wie Immunzellen, Leberzellen, Fibroblasten und Epithelzellen. Die Fas-vermittelte Apoptose ist ein dominierender Mechanismus für die Realisierung der Immunantwort sowie für die Regulation von Entwicklung und Reifung der Immunzellen (Krammer, 2000) und wird durch den Fas-Liganden (FasL), ein TNF-verwandtes Transmembranprotein, ausgelöst. Die Bindung des FasL führt zur Kombination von Fas Monomeren zu Fas-Trimeren und Ausbildung des sogenannten "death inducing signaling complex" (DISC), der auch Procaspase-8 enthält. Procaspase-8 wird proteolytisch aktiviert. Die Aktivierte Caspase-8 startet die Aktivierung der Caspasekaskade. Bei diesem Prozess sind die Caspasen-1, -4, -6, -7 beteiligt (Nunez *et al.*, 1998). Die Aktivierung von Caspasen führt zur Aktivierung von Caspase 3, die verantwortlich für zelluläre und nukleare Veränderungen bei der Apoptose ist (Typ I-Signalweg). Beim Typ II-Signalweg wird das Signal an der Mitochondrienmembran amplifiziert. Hierfür spaltet und aktiviert Caspase-8 das Bcl-2-verwandte Protein Bid, das an die Mitochondrienmembran transferiert wird und schließlich zur Freisetzung proapoptotischer Moleküle wie Cytochrom C, AIF und Smac/Diablo führt (Luo *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998). Zytosolisches Cytochrom C ist essentieller Bestandteil des "Apoptosoms", das die Aktivierung der Caspase-9 vermittelt, die ihrerseits Procaspase-3 spaltet, durch welche schließlich die sogenannte Exekutionsphase der Apoptose eingeleitet wird (Li *et al.*, 1998; Krammer 1999; Daniel *et al.*, 2001; Abb. 2). Die Apoptose reguliert das Überlebensvermögen von Zellen in einem Vielzeller-Organismus (Hetts, 1998). Die Fas/FasL regulierte Apoptose ist in vielen Prozessen eines Organismus, wie z.B. Lymphozytengeneration, Organogenese oder Vaskularisation, involviert. Auch Virus-infizierte Zellen könnten über Fas/FasL getötet werden. Zum Beispiel, eliminieren Virus-spezifische Lymphozyten über diesen Weg mit Hepatitis C Virus infizierte Hepatozyten (Hiramatsu *et al.*, 1994). Auch bei Coxsackievirus infizierten Mäusen läuft die Viruskontrolle über den gleichen Mechanismus (Seko *et al.*, 2002). LCMV-spezifische T-Lymphozyten töten *in vitro*

Experimenten die Zielzellen über Fas/FasL, wenn der Exozytoseweg blockiert wird (Balkow *et al.*, 2001). Andererseits exprimieren auch Virus-infizierten Zellen (z.B. HIV-1 (Kaplan *et al.*, 1998; Tateyama *et al.*, 2000), Hepatitis B Virus (Nakamura. 1996), Epstein-Barr Virus (Ohshima *et al.*, 1999) und Cytomegalovirus (Rafferty *et al.*, 2001) FasL, um Virus-spezifische Lymphozyten zu töten. Hierbei handelt es sich um einen immunescape Mechanismus, der von verschiedenen Viren ausgenutzt wird, um die CTL Abwehr auszuschalten.



**Abbildung 1.4 Zwei Signalwege der Fas/FasL-vermittelten Apoptose (Sharma *et al.*, 2000)**

**Typ I:** Der erste Signalweg erfolgt durch die FADD-vermittelte Rekrutierung von Procaspase-8 an den CD95-Rezeptorkomplex und die direkte Aktivierung der Caspase-Kaskade.

**Typ II:** Der zweite Signalweg kann durch Caspase-8-vermittelte Spaltung von Bid eingeschlagen werden. Die Bindung von Cytochrom C und dATP an Apaf-1 hat die Exponierung der Interaktionsdomäne CARD zur Folge, wodurch es Apaf-1 ermöglicht wird, an die CARD von Procaspase 9 zu binden. Caspase 9 wird durch Autoproteolyse aktiviert. Caspase 8 und 9 sind in der Lage, eine proteolytische Caspase-Kaskade auszulösen, die zum programmierten Zelltod führt. Die Freisetzung der Endonuklease CAD durch Caspase ,3 verursacht die charakteristische DNA-Fragmentierung.

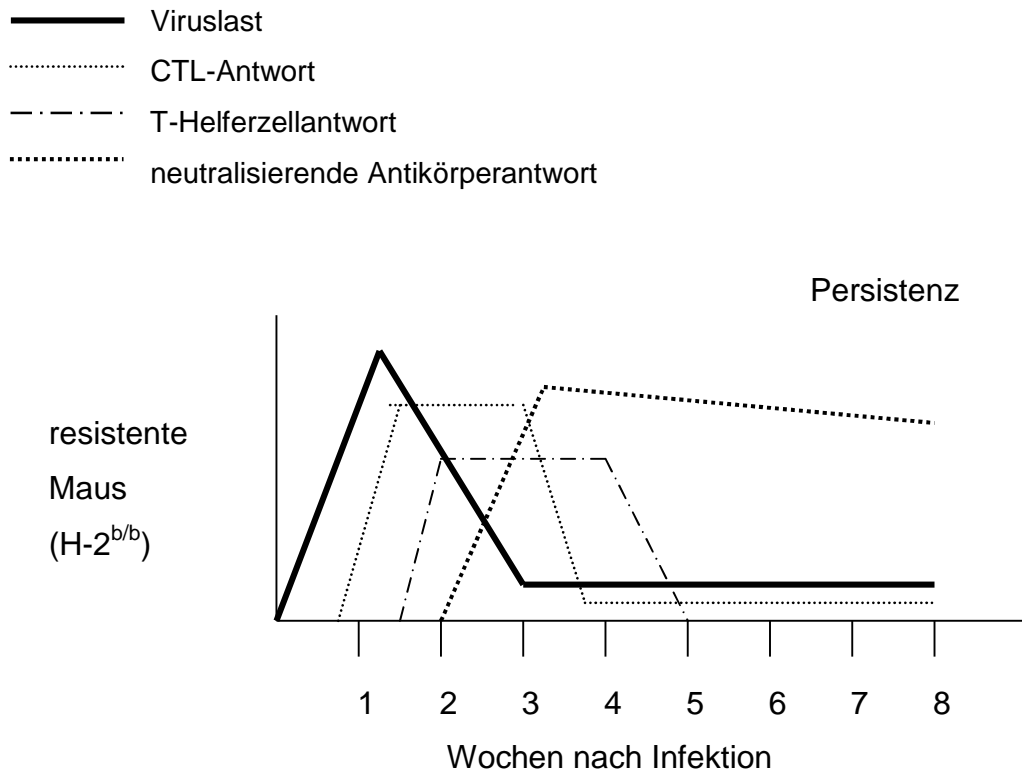
### 1.10 Immunität gegen eine FV-Infektion

Ob ein Mausstamm, nach der Infektion mit dem Friend Virus, eine maligne Erythroleukämie entwickelt (FV-suszeptibler Mausstamm) oder das Virus nach einer vorübergehenden Splenomegalie vom Immunsystem kontrolliert werden kann (FV-resistenter Mausstamm), ist abhängig von der Virusdosis und dem genetischen Hintergrund der infizierten Maus.

Die Resistenz gegen FV wird durch eine Reihe von Genen vermittelt. Es gibt mindestens sechs Gene (Fv 1-6), die eine Resistenz auf nicht-immunologischer Grundlage induzieren (Stoye *et al.*, 1998) und mindestens vier Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC, in der Maus als H-2 bezeichnet), die die zelluläre und humorale Immunantwort gegen das FV beeinflussen.

B6 Mäuse, die den H-2<sup>b</sup> Haplotyp tragen, sind resistent gegen eine FV-induzierte Erythroleukämie, während z.B. A.BY Mäuse mit einem H-2<sup>a</sup> Haplotyp suszeptibel sind. Daraus folgt, dass H-2 Gen wichtig ist für die Präsentation von viralen T-Zell-Epitopen. Hinzukommt, dass C57BL/6 (B6) Mäuse noch das nicht-immunologische Resistenzgen Fv-2 tragen, welches die polyklonale Zellaktivierung von Erythrozytenvorläuferzellen und die damit verbundene Splenomegalie limitiert (Hoatind Kabat, 1995).

Der immunologische Schutz vor einer FV-induzierten Erythroleukämie in FV-resistenten Mäusen wird durch die Kombination von FV-spezifischen CTLs, T-Helferzellen und neutralisierenden Antikörpern vermittelt. Nur ein Bestandteil der Immunantwort (z.B. CTLs) reicht nicht aus, um einen Schutz zu erzeugen. Entscheidend für den Schutz vor einer Erythroleukämie ist neben der Anzahl an spezifischen T-Zellen und B-Zellen auch die Kinetik der spezifischen Immunantwort (Abbildung 1.5).

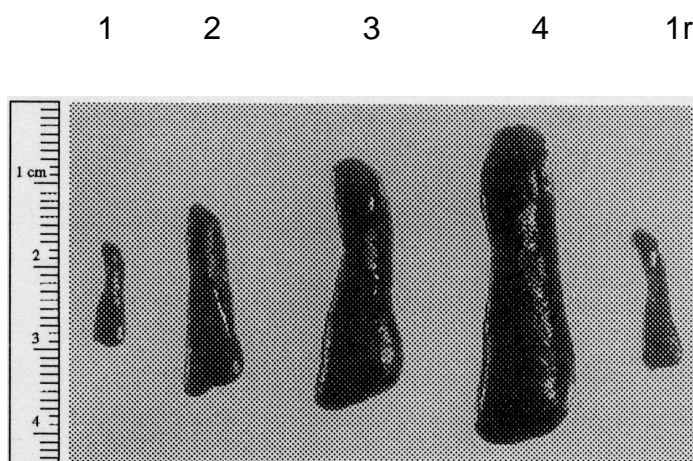


**Abbildung 1.5 Zeitlicher Verlauf der Viruslast und der Immunantwort nach einer FV-Infektion** (Olbrich, 2003)

Schematische Darstellung der Kinetik der Viruslast und der Virus-spezifischen Immunantwort (neutralisierende Antikörper, T-Helferzellen und CTLs) nach Infektion von Mäusen mit dem Friend Virus. Das Immunsystem der Y10-Mäuse (Genlocus H-2<sup>b/b</sup>) ist in der Lage das Virus zu kontrollieren. Die Mäuse sind zeitlebens persistierend infiziert, haben aber eine normale Lebenserwartung.

### 1.11 Krankheitsverläufe verschiedener Mausstämme nach FV-Infektion

Der Krankheitsverlauf einer FV-infizierten Maus lässt sich anhand der Veränderung der Milzgröße (Splénomegalie) verfolgen. Die Milzgrößen werden durch Palpation dokumentiert. Die Viruslast in der Milz korreliert mit der Milzgröße, so dass zum Zeitpunkt vier Wochen nach Infektion anhand der Milzgröße Rückschlüsse über die Schwere der FV-induzierten Erkrankung gezogen werden können. Die Schwere der Splénomegalie wird in verschiedene Stufen eingeteilt, die mit dem Krankheitsverlauf korrelieren (Abbildung So spiegelt die Milzgröße 1 (Milzgewicht von 0,1-0,2g) die Milz einer uninfizierten Maus wieder. Die Einteilung Milzgrößen 2-4 stellt die verschiedenen Stadien der Splénomegalie nach FV Infektion dar.



**Abbildung 1.6 Einteilung der unterschiedlichen Stadien einer Splenomegalie nach FV-Infektion** (Hasenkrug *et al.*, 1998b)

Die Milz einer uninfizierten Maus ist etwa 0,1-0,2g schwer. Die Einteilung der Milzgrößen 2-4 stellt die verschiedenen Stadien der Splenomegalie nach FV-Infektion dar. Folgende Milzgrößeneinteilungen entsprechen folgenden Gewichten: 1 < 0,5g, 1-2 = 0,5-0,6g, 2 = 0,6-0,8g, 2-3 = 0,8-1,2g, 3 = 1,2-1,7g und 4 > 1,7g. Die Milzgröße 1r bezeichnet die Milzgröße einer persistierend infizierten Maus.

Im folgenden sind die Krankheitsverläufe der in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme nach FV Infektion kurz umrissen (Hasenkrug and Chesebro, 1997).

- **1.11.1 C57BL/6 (B6); (H-2<sup>b/b</sup>)**

Die Infektion von B6-Mäusen mit einer hohen Dosis von FV (3000-12500 SFFU; "spleen focus forming units") induziert in den ersten zwei Wochen eine leichte Splenomegalie (mindestens Verdopplung des Milzgewichtes), die sich danach zurückbildet. Die B6 Mäuse sind in der Lage, das Virus über das nicht-immunologische Fv-2 Gen und ihre effiziente FV-spezifische Immunantwort (MHC H-2<sup>b/b</sup>) zu kontrollieren. Die Tiere erkranken nicht an einer Erythroleukämie, bleiben aber lebenslang persistierend infiziert und haben eine normale Lebenserwartung.

- **1.11.2 Y.10-Mäuse; (H-2<sup>b/b</sup>)**

Die F1-Mausgeneration der Verpaarung von B10-Mäusen mit A.BY-Mäusen wird als Y.10-Mäuse bezeichnet. Diese Y.10-Mäuse besitzen den MHC H-2<sup>b/b</sup> Genlokus und sind FV-resistent. Anders als die B6 Mäuse kontrollieren diese Mäuse das FV nur über ihre effiziente Virus-spezifische Immunantwort. Y.10 Mäuse besitzen keine vom Fv-2 Gen vermittelte genetische Resistenz gegen die FV induzierte Leukämie.



Nach einer FV-Infektion entwickeln sich in Y.10 Mäusen in den ersten zwei Wochen eine massive Splenomegalie (bis zum 25fachen des normalen Milzgewichtes). Ab der zweiten bis dritten Woche nach Infektion bildet sich die Milzvergrößerung zurück. Die Milz bleibt dennoch zeitlebens leicht vergrößert (bis 0,5g). Die Tiere sind persistent mit FV infiziert, haben aber eine normale Lebenserwartung.

**Tabelle 1.4 Zusammenfassung der verwendeten Mausstämme**

Mausstamm	H-2	Fv-2	Splenomegalie	Leukämie / Lebenserwartung	FV-spezifische T-Zell- und Antikörper- Antwort
<b>C57Bl/6</b>	b/b	r/r	schwach Rückgang nach ca. 2 Wochen	keine Leukämie, normale Lebenserwartung Persistenz von FV	stark
<b>(B10xA.BY) F1.(Y10)</b>	b/b	r/s	stark bis Milzgröße 4 Rückgang nach ca. 2-3 Wochen	keine Leukämie, normale Lebenserwartung Persistenz von FV	stark

In dieser Tabelle sind alle wichtigen Informationen über die in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme in Bezug auf FV-induzierte Splenomegalie, Leukämie und FV-spezifischen T-Zell- und Antikörperantworten aufgelistet. Das Fv-2 Gen vermittelt eine genetische Resistenz gegen das FV; r= resistent, s= suszeptibel; Mäuse mit einem r/s Fv-2 Genotyp sind FV-suszeptibel.

### 1.12 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es molekulare Mechanismen der zytotoxischen Immunabwehr gegen Retroviren aufzuklären. Es ist zwar bekannt, dass zytotoxische T-Zellen ( $CD8^+$ ) eine wichtige Rolle bei retroviralen Infektionen von Menschen mit HIV und HTLV spielen, ihre molekulare Wirkweise war aber nicht untersucht. Die Infektion von Mäusen mit dem retroviralen Friend Virus Komplex (FV) sollte daher als Modell dienen, um die antiviralen Mechanismen gegen Retroviren aufzuklären. Als erstes sollte die Rolle von  $CD8^+$  T-Zellen bei der Abwehr einer FV Infektion bestimmt werden. Anschließend sollte mit Hilfe von „knockout“ Mäusen, die für verschiedene zytotoxische Moleküle defizient waren, analysiert werden, welche zytotoxischen Moleküle gegen Retrovirus-infizierte Zellen wirksam sind. Die Untersuchungen sollte sowohl für eine Infektion mit dem pathogenen FV Komplex als auch mit den apathogenen F-MuLV durchgeführt werden. Abschließend sollten die gewonnen Erkenntnisse verwendet werden, um den Funktionsverlust von  $CD8^+$  T-Zellen, der für die chronische FV Infektion und für viele andere chronische Virusinfektionen beschrieben worden ist, molekular zu charakterisieren. Die Untersuchungen sollten neue Ansatzpunkte für die Therapie von akuten und chronischen Retrovirusinfektionen aufzeigen.

## 2 Material

### 2.1 Versuchstiere

#### Wildtyp Mäuse

C57BL/6; (B6); Resistenzgene: H-2D<sup>b/b</sup>, Fv1<sup>b/b</sup>, Fv2<sup>r/r</sup>; Tierzuchtanlage, Institut für Virologie Würzburg, Charles River Wiga (Deutschland) GmbH  
(C57BL/10×A.BY) F1 (Y10) Resistenzgene: H-2D<sup>b/b</sup>, Fv1<sup>b/b</sup>, Fv2<sup>r/s</sup>; eigene Zucht, Zentrales Tierlabor, Essen.

#### Mutante Mausstämme

Gld (FasL Mutation); vom Basler Institut für Immunologie zur Verfügung gestellt.

Thy1.1; vom Charles River Wiga (Deutschland) GmbH

#### Knockout (-/-) Mausstämme

Fas<sup>-/-</sup>; vom Basler Institut für Immunologie zur Verfügung gestellt.

Granzym AxB<sup>-/-</sup>; (GzmAxB<sup>-/-</sup>) (Simon *et al.*, 2000b) Tierzuchtanlage, MPI für Immunbiologie, Freiburg.

Perforin<sup>-/-</sup>; (Perf<sup>-/-</sup>); (Kägi *et al.*, 1994b) Tierzuchtanlage, MPI für Immunbiologie, Freiburg.

Perforin×Granzym A<sup>-/-</sup>; (Perf×GzmA<sup>-/-</sup>); (Simon *et al.*, 2000b) Tierzuchtanlage, MPI für Immunbiologie, Freiburg.

Perforin×Granzym B<sup>-/-</sup>; (Perf×GzmB<sup>-/-</sup>); (Simon *et al.*, 2000b) Tierzuchtanlage, MPI für Immunbiologie, Freiburg.

Perforin×Granzym AxB<sup>-/-</sup>; (Perf×GzmAxB<sup>-/-</sup>) (Simon *et al.*, 2000b) Tierzuchtanlage, MPI für Immunbiologie, Freiburg.

Alle mutierten und „knockout“ Mausstämme sind mindestens sechs Mal mit C57BL/6 Mäusen zurückgekreuzt worden.

Alle Tiere waren zum Versuchsbeginn mindestens 8 Wochen alt. Die verwendeten C57BL/6 (Wildtyp) Mäuse und deren Charakteristika wurden in Tabelle 1.4 zusammengefasst.

Alle Mäuse stammen aus einer speziell pathogenfreien (SPF) Tierzuchtanlage. Die Würfe der Mutanten- und ko-Mauslinien wurden innerhalb der ersten sechs Lebenswochen genotypisiert. Die Tiere wurden für die Dauer der Versuche unter SPF Bedingungen gehalten und hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter. Tierexperimente wurden gemäß den Richtlinien der „Federation of European Laboratory Animal Science Association“ durchgeführt.

## 2.2 Chemikalien und Medien

Wenn nicht anders vermerkt wurden alle Chemikalien von den Firmen *Applichem*, *Merck*, *Roth* und *Sigma* bezogen.

Agarose (*Biozyme*), Agar (*Gibco*), 3-Amino 4-Ethylencarbazole (AEC), Ammoniumchlorid, Ammoniumpersulfat, Äther, Bisacrylamid, BSA (Rinderserum Eiweiß), Chloroform, N-N-Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid (DMSO), DEPC, EDTA, Ethanol, Ethidiumbromid, Essigsäure, Formalin (40%), Fötale Kälberserum (*Biochrom KG*), Glukose, Harnstoff, Heparin, Hexadimethrine bromide (Polybren), Ionomycin, Isopropanol, LB Broth Base (*USB*), Ketamine,  $\beta$ -Mercaptoethanol, Methyl-<sup>3</sup>H Thymidine, Natriumacetat, Natriumazid, o-Phenylenediamine (OPD), Phenol, Phorbol-12-Myristate 13-Acetate (PMA), Pikrinsäure, RPMI-Medium (*Gibco*), Salzsäure, Schwefelsäure, Streptavidin-AP (Pharmingen), Streptavidine-CyChr (Pharmingen), Streptavidine-FITC, Streptavidine-PE (Pharmingen), Streptavidine-PerCP. Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane, TRIzol (*GIBCOBRL*), Triton-X-100, To-PRO, Trypanblau, Tween 20, Wasserstoffperoxid.

## 2.3 Antibiotika

1. Ampicillin (*Sigma*)
2. Penicillin (*Grünenthal*)
3. Streptomycin (*Fatol* Arzneimittel)

## 2.4 Häufig verwendete Puffer und Medien

Alle Lösungen und Puffer wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit zweifach destilliertem H<sub>2</sub>O angesetzt.

Tabelle 2.1 Puffer und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>AEC Gebrauchslösung</b>	AEC-Stock-Lösung (4mg/ml) wird 1:20 in 0,05 M Natriumacetat angesetzt und die Reaktion mit 0,5 µl 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / ml Lösung gestartet
<b>AEC-Stocklösung (4mg/ml)</b>	AEC-Tabletten in N-N-Dimethylformamid gelöst
<b>Einfriermedium</b>	80% FCS 20% DMSO
<b>Medium für zytotoxische Experimente</b>	RPMI 2mg/ml BSA
<b>PBBS</b>	0,2g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,15g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,14g CaCl <sub>2</sub> 0,32g KCl 7,2g NaCl 0,2g MgCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O 0,2g MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O 1ml Phenol Rot (1%) 1,0g Glukose Σ 1Liter H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
<b>PBS</b>	137mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7xH <sub>2</sub> O 1,4mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,5mM CaCl <sub>2</sub> 1mM MgCl <sub>2</sub> Σ 1Liter H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
<b>MACS Puffer</b>	0,5% BSA 2mM EDTA Σ 1Liter PBS

Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>PBS ohne Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup></b>	137mM NaCl 2,7mM KCl 4,3mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7xH <sub>2</sub> O 1,4mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Σ 1Liter H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
<b>Probenpuffer (6x)</b>	Bromphenolblau (0,25%) Xylencyanol (0,25%) Glycerol (30%)
<b>TBE (5x)</b>	54g Tris Base 27,5g Borsäure 20ml 0,5M EDTA (pH 8)
<b>TTE-Puffer</b>	10ml Triton-X-100 4ml Tris/HCl pH 8,0 0,8ml 0,5M EDTA pH 8,0 Σ 50ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>

## 2.5 Antikörper

Die Antikörper (AK) wurden, wenn nicht anders aufgeführt, von BD Pharmingen (Heidelberg) bezogen.

**Tabelle 2.2 Antikörper für die Durchflußzytometrie**

Antikörper	Klon	Hersteller
CD107a-FITC (LAMP-1) monoklonaler Ratte anti Maus AK	1D4B	
CD4-APC (L3T4); monoklonaler Ratte anti Maus AK	RM4-5	
CD4-FITC (L3T4); monoklonaler Ratte anti Maus AK	H129.19	
CD4-PerCP (L3T4); monoklonaler Ratte anti Maus AK	RM4-5	
CD4-PE; monoklonaler Ratte anti Maus AK	H129.19	
CD43-FITC monoklonaler Ratte anti Maus AK	1B11	
CD43-PE monoklonaler Ratte anti Maus AK	1B11	
CD69-PE; monoklonaler Hamster anti Maus AK	H1.2F3	Caltag
CD8a-CyChr (Ly-2); monoklonaler Ratte anti Maus AK	53-6.7	

Antikörper	Klon	Hersteller
CD8a-FITC (Ly-2); monoklonaler Ratte anti Maus AK	5H10	Caltag
CD8a-PerCP (Ly-2); monoklonaler Ratte anti Maus AK	53-6.7	
CD8b-FITC (Ly-3.2); monoklonaler Ratte anti Maus AK	53-5.8	
Thy-1.2-PE; monoklonaler Ratte anti Maus AK CD90.2	30-H12	
Ter119-PE (Ly-76); monoklonaler Ratte anti Maus AK	Ter-119	
Pan-NK-PE; monoklonaler Ratte anti Maus AK	DX5	
NK1.1-FITC; monoklonaler Maus anti Maus AK	PK136	
GzmB-APC ; monoklonaler Maus anti Human	GB12	Caltag

Tabelle 2.3 Charakterisierung der Fluorochrome

Bezeichnung	Absorption (nm)	Emission (nm)
<b>FITC</b>	488	525
<b>PE</b>	488	575
<b>CyChrome</b>	488	670
<b>PerCP</b>	488	670
<b>CFSE</b>	488	525
<b>TO-PRO-3</b>	633	661
<b>APC</b>	633	660

Tabelle 2.4 Sonstige Antikörper

<ul style="list-style-type: none"> <li>• „Horse Radish Peroxidase" (HRP) gekoppelter Ratte anti Maus IgG<sub>1</sub> monoklonaler AK (Klon: X56)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• HRP gekoppelter Ziege anti Maus IgG2a (NatuTec Nr. E90-107)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• HRP gekoppelter Ziege Anti Maus Immunoglobulin (bindet bevorzugt IgG, IgA und IgM; <i>Dako</i>)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Monoklonaler AK 720: Maus Anti-MuLV env (Isotyp Ig2b), (<i>Robertson et al.</i>, 1991)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Monoklonaler Antikörper 34: Anti-MuLV p15 (Isotyp IgG2b), (<i>Chesebro et al.</i>, 1981)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Monoklonaler Antikörper 34-Biotin: Anti-MuLV p15 (Isotyp IgG2b),</li> </ul>

(Chesebro <i>et al.</i> , 1981)
• Monoklonaler IgG2b PE-gekoppelter Antikörper Ziege-anti-Maus (Caltag)
• Monoklonaler NK1.1 Maus-anti-Maus Antikörper Klon LY-55
• Monoklonaler CD4 Raten-anti-Maus Antikörper Klon 145-2C11
• Monoklonaler CD8a MicroBeads Raten-anti-Maus Antikörper Klon 53-6.7 Miltenyi Biotech.
• Monoklonaler CD90 MicroBeads Raten-anti-Maus Antikörper Klon 30-H12 Miltenyi Biotech

## 2.6 Tetramere

Tetramere sind rekombinant hergestellte MHC-I-Moleküle, die mit Peptiden komplexiert, biotiniliert und anschließend an fluoreszenz-markierte Streptavidin-Moleküle gebunden wurden. Da am Streptavidin vier Bindungsstellen für Biotin existieren, entstehen tetramere Komplexe. Diese können sich dann mit ausreichender Avidität direkt an die T-Zellen mit der entsprechenden Spezifität binden und sie so mit einem Fluorochrom markieren. Der Prozentanteil der tetramerpositiven Zellen von den CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde durchflußzytometrisch bestimmt (Altman, 1996).

PE markierte MHC Klasse I H2-D<sup>b</sup> Tetramere spezifisch für FV GagL Peptid (D<sup>b</sup>-GagL, FV *gag* CD8<sup>+</sup> Epitop gPr80<sup>gag</sup>85-93 (Chen *et al.*, 1996) wurden von K.Schepers und T.N.M. Schumacher zur Verfügung gestellt (Stromnes *et al.*, 2002). Der TO-PRO-3 Farbstoff wurde verwendet, um tote Zellen für die Durchflußzytometrie auszuschließen (Molecluar Probes, USA).

## 2.7 Viren und Zell-Linien

### Viren

- Friend Virus Komplex

Der verwendeten FV Stock wird aus infizierten Mäusen gewonnen (s. „Methoden“ 3.2) (Dittmer *et al* 1999).

- Friend Murine Leukemie Virus (Helfer Virus) (Dittmer *et al.*, 1999).

Der verwendeten Helfer Virus Stock wird von infizierten *Mus. Dumni* Zellen produziert (s. „Methoden“ 3.3).



**Tabelle 2.5 Zell-Linien**

<b>Hybridomazelllinie</b> <b>169.4</b>	<b>YTS</b>	produziert den monoklonalen Raten IgG2b anti Maus $\alpha$ -CD8 Antikörper (Cobbold <i>et al.</i> , 1990)
<b>Hybridomazelllinie</b> <b>191.1</b>	<b>YTS</b>	produziert den monoklonalen Raten IgG2b anti Maus $\alpha$ -CD4 Antikörper (Cobbold <i>et al.</i> , 1990)
<i>Mus Dunni</i>		Maus Fibroblasten Zell-Linie (Lander and Chattopadhyay, 1984)
FBL-3		Friend Virus induzierte Tumorzell-Linie (Kern <i>et al.</i> , 1986)
P815		Mastozytoma (Plaut <i>et al.</i> , 1973)

**2.7 Oligonukleotid-Primer (BIG Biotech – Freiburg)**

18sRNA (Fragmentlänge 99bp)

5' GCC CGA GCC GCC TGG ATA C 3' (sense)

5' CCG GCG GGT CAT GGG AAT AAC 3' (antisense)

Perforin (Fragmentlänge 380 bp)

5' GAG CCC CTG CAC ACA TTA CTG GAA 3' (AM21)

5' ACA TTC TCA AAG TCC ATC T 3' (PerAS)

GzmA (Fragmentlänge 563bp)

5' GGG GAT CTA CAA CTT GTA CGG 3'(sense)

5' ATT GCA GGA GTC CTT TCC ACC AC 3'(antisense)

GzmB (Fragmentlänge 135 bp)

5' TCA GGC TGC TGA TCC TTG ATC G 3' (F1 sense)

5' ATG AAG ATC CTC CTG CTA CTG C 3' (R1 antisense)

**2.8 Plasmide**

PTz18R HF6 1/11 18sRNA (Lamers R. Freiburg)

pGEM mPerf #2 Perforin (Wallich R. Heidelberg)

pGEM mgzmA #62 Granzym A (Wallich R. Heidelberg)

pGEM mgzmB #69 Granzym B (Wallich R. Heidelberg)

### 3 Methoden

#### 3.1 Tierexperimente

##### 3.1.1 Infektion

Die Infektion der Mäuse mit Friend Virus wurde mit einer 0,6 x 25mm Kanüle intravenös (i.v.) in die laterale Schwanzvene durchgeführt. Dazu wurde der Virusstock mit sterilem PBS verdünnt. Es wurde mit 1500 SFFU (Y10) oder 12500 SFFU (B6) pro Maus infiziert. Das Injektionsvolumen betrug 0,5ml.

##### 3.1.2 Depletion von CD8<sup>+</sup> T- bzw. CD4<sup>+</sup> T- und NK1.1<sup>+</sup>-Zellen in Mäusen

Um funktionelle Aussagen über bestimmte Zellpopulationen machen zu können, wurden diese *in vivo* depletiert. Für die Depletion von Zellpopulationen in der Mäuse wurden spezifische Antikörper in die Bauchhöhle (intraperitoneal; i.p.) der Maus injiziert. Die Injektionen wurden mit einer 0,6 x 25mm Kanüle durchgeführt. Bei der Injektion lag die Maus überspannt auf dem Rücken. Das Injektionsvolumen betrug 0,5ml.

Zur Depletion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Mäusen wurde der Überstand der Hybridomazelllinie 169.4 verwendet. Diese Hybridomazelllinie produziert monoklonale anti-CD8 ( $\alpha$ CD8) Antikörper. Den Tieren wurde 0,5ml zellfreier Hybridoma-überstand i.p. injiziert. Für die Depletion in der akuten Phase der FV-Infektion wurde den Mäusen 4x der Hybridomaüberstand im Abstand von 2 Tagen inokuliert. Die erste Depletion wurde am Tag der FV-Infektion durchgeführt.

NK-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten wurden in Mäusen mit dem NK-Zellspezifischen Antikörper NK1.1 (Pharmingen) oder dem anti-CD4 ( $\alpha$ CD4) Antikörper (L3T4) (Pharmingen) depletiert. Dazu wurden den Mäusen 3x im Abstand von drei Tagen, NK1.1 oder  $\alpha$ CD4 Antikörper injiziert. Die erste Depletion wurde am Tag der FV-Infektion durchgeführt. Für die Depletion wurden pro Injektion 50 $\mu$ g NK1.1 oder 50 $\mu$ g  $\alpha$ CD4, welchen auf 500 $\mu$ l mit sterilem PBS verdünnt wurden, i.p. inokuliert.

Die Depletion von CD8<sup>+</sup> T-, CD4<sup>+</sup> T- oder NK1.1<sup>+</sup> Zellen wurde im Durchflußzytometer mit dem  $\alpha$ CD8b monoklonalen Antikörper Ly-3.2 (Pharmingen),  $\alpha$ CD4<sup>+</sup> monoklonalen Antikörper L3T4 (Pharmingen) und dem NK-Zellmarker DX5 (Pharmingen) überprüft.

### **3.1.3 Betäubung der Mäuse mit Ether oder Isofluran**

Für die Palpation der Milzen und die retroorbitalen Blutentnahme wurden die Mäuse mit Ether oder Isofluran betäubt. Dazu wurden die Tiere in einen Glastopf gesetzt, in dem sich ein mit Ether oder Isofluran getränktes Tuch befand.

### **3.1.4 Palpieren von Milzgrößen**

Mit Hilfe der Palpation der Milz wurde der FV-induzierte Krankheitsverlauf verfolgt. Für die Palpation wurden die Mäuse betäubt und den Milzgrößen ein Wert von 1-4 zugeteilt (Abbildung 1.6).

### **3.1.5 Blutentnahme**

Die Blutentnahme erfolgte retroorbital mit einer 3mm Glaskapillare, welche mit Heparin beschichtet war. Das Blut wurde in ein 1,5ml Reaktionsgefäß, in dem 2,5 Units Heparin vorgelegt waren, aufgefangen und auf Eis gestellt.

Zur Plasmagewinnung wurde das gewonnene Blut für 2min bei 8000rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Das Plasma wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **3.1.6 Organentnahme**

Zur Organentnahme wurden die Tiere entweder mit  $\text{CO}_2$  getötet oder zuerst mit Ether betäubt und dann durch Genickbruch getötet. Die Milz wurde entnommen und in ein Gefäß mit 5ml PBBS auf Eis gelegt.

### **3.1.7 Herstellung einer Milzzellsuspension**

Zur Erstellung einer Milzzellsuspension wurde die entnommene Milz in 5ml PBBS liegend durch ein Sieb zerrieben, die groben Bestandteile entfernt und die Einzelzellsuspension in ein Röhrchen überführt. Die Suspension wurde auf 10ml mit PBBS aufgefüllt, eine Zählprobe entnommen und die Zellen mit 1200rpm bei  $4^{\circ}\text{C}$  10min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde auf die jeweilige gewünschte Zellzahl pro ml mit RPMI-Medium eingestellt.

### **3.1.8 Das MACS-System zum Sortieren von Zellen aus der Milz**

Um Zellpopulationen, die bestimmte Proteine auf ihrer Oberfläche exprimieren, zu isolieren, wurde die Magnetseparation verwendet. Das „Magnetic Activated Cell

Sorting“ (MACS; Miltenyi Biotech GmbH, Deutschland) arbeitet mit submikroskopisch kleinen, super-paramagnetischen, antikörpergekoppelten Kügelchen (MicroBeads), die keinen Einfluss auf die Funktionalität der Zellen haben (Schumm *et al.*, 1999).

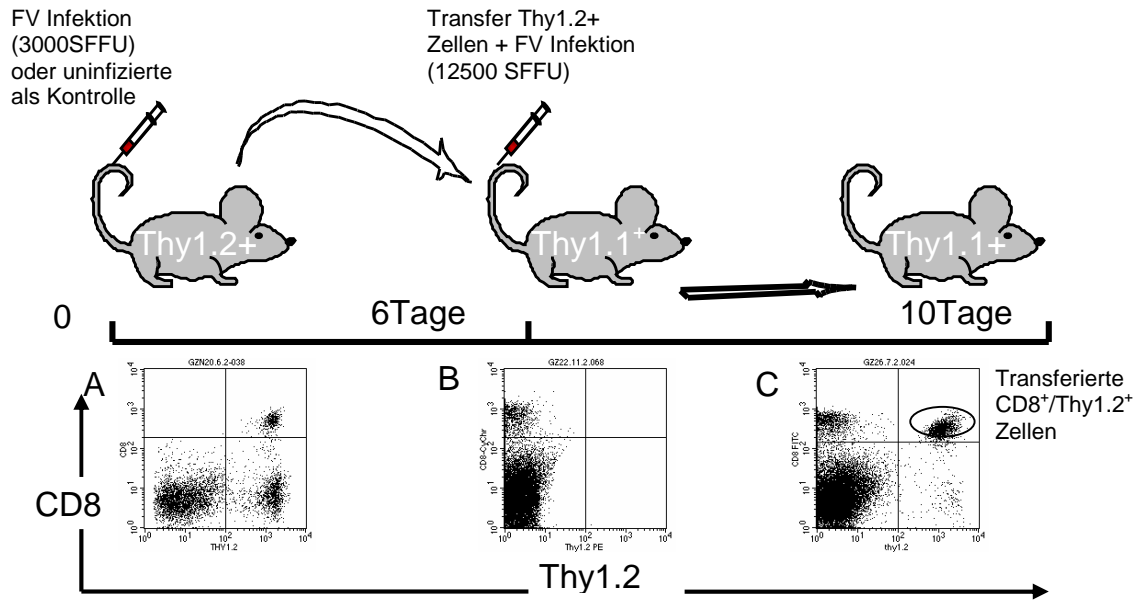
Die Milzzellen wurden in einer Konzentration von  $10^8$  Zellen/ml in MACS-Puffer resuspendiert und 15 Minuten mit MicroBeads markierten Antikörpern bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden dann Zweimal gewaschen und über eine auf einen Magneten gesetzte und mit 3 ml MACS-Puffer gewaschene Säule gegeben. Nachdem die Zellsuspension durchgelaufen war, wurde die Säule dreimal gewaschen. Zellen, die mit den Antikörpern markiert waren, wurden von dem Magneten in der Säule zurückgehalten, alle anderen Zellen flossen durch die Säule durch. Bei einer Positivselektion musste die Säule aus dem Magnetfeld entfernt werden. Die markierten Zellen wurden mit einem Stempel und ca. 5 ml MACS-Puffer aus der Säule gewonnen.

### **3.1.9 Percoll-Gradient zur Isolation von Lymphozyten**

Für das Transferexperiment wurden die kernhaltigen Milzzellen von den kernlosen Milzzellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichten über ein Percollkissen voneinander getrennt. Dazu wurde das Percoll (Sigma) 9:1 mit 10xPBS verdünnt (100%ige Lösung). Für die Separation wurden 10ml einer 70%ige Percoll-Lösung in ein 50ml Zentrifugenröhrchen gegeben und die Milzzellsuspension aufgeschichtet. Die Zellseparation wurde bei 8°C für 30min bei 1200rpm in der Zentrifuge durchgeführt. Aufgrund der Dichte befanden sich die kernlosen Zellen nach der Zentrifugation unter dem Percoll. Die kernhaltigen Zellen lagen auf dem Percollkissen. Die kernhaltigen Zellen wurden, nach der Abnahme vom Percollkissen 2x mit PBS gewaschen (8°C, 10min bei 1200rpm) und auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^8$ /ml eingestellt.

### **3.1.10 Adoptiver Transfer von Milzzellen**

Für den Transfer von Milzzellen aus uninfizierten oder infizierten B6-Mäusen mit dem T-Lymphozytenoberflächenmolekül Thy1.2 in B6 Mäuse mit dem T-Lymphozytenoberflächenmolekül Thy1.1 wurde eine Einzelzellsuspension von Milzen aus B6 Thy1.2 Mäusen hergestellt (s. „Methoden“ 3.1.7). Die Thy1.2<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit immunomagnetischen Beads isoliert (s. „Methoden“ 3.1.8) und in die B6 Thy1.1 Empfängermäuse transferiert. Pro Maus wurden  $5 \times 10^6$  Zellen übertragen.



### Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des adoptiven Transfers von Milzzellen

**A.** Repräsentatives durchflußzytometrisches Bild von Milzzellen aus einer Thy1.2<sup>+</sup> Maus

**B.** Repräsentatives durchflußzytometrisches Bild von Milzzellen aus einer Thy1.1<sup>+</sup> Maus vor dem Transfer

**C.** Repräsentatives durchflußzytometrisches Bild von Milzzellen aus einer FV infizierten Thy1.1<sup>+</sup> Maus 10 Tage nach dem Transfer von Milzzellen aus einer FV infizierten Thy1.2<sup>+</sup> Maus

Die Empfängertiere wurden direkt nach dem Transfer mit 12500 SFFU FV-B infiziert. Die transferierten T-Zellen können im Durchflußzytometer aufgrund ihres Oberflächenmoleküles Thy1.2 von den endogenen T-Zellen der Empfängermäuse (Thy1.1<sup>+</sup>) unterschieden werden. 10 Tage nach dem Transfer und der Infektion wurde die Anzahl der transferierten Thy1.2<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T- oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz der B6 (Thy1.1<sup>+</sup>) Mäuse durchflußzytometrisch bestimmt. Als T-Zellaktivierungsmarker wurde zusätzlich CD43 auf den Spenderzellen bestimmt.

### 3.2 In vivo Herstellung eines Friend Virus Stocks

Das Friend Virus (FV) besteht aus zwei Viren, dem „Spleen Focus Forming Virus“ und dem „Friend Murine Leukemia Virus“. Der FV-Stock wurde aus infizierten Mäusen gewonnen. Dazu wurden Balb/c-Mäuse mit 1000-1500 SFFU infiziert, nach 9 Tagen getötet und aus den Milzen ein Milzzell-Homogenat (10-20%) in PBBS mit 2mM EDTA hergestellt. Der Virusstock wurde bei -80°C gelagert.

Zur Titration dieses Stocks wurden Y10.A-Mäuse infiziert und den Tieren nach 14 Tagen die Milzen entnommen. Mit Hilfe der sogenannten Bouin's Lösung (Sigma) lassen sich maligne Zellhaufen, die durch die FV Infektion entstehen, auf der Milz

anfärben. Die Anzahl dieser ausgezählten Foci ergab die Viruskonzentration („Spleen Focus Forming Units“, SFFU).

### 3.3 Herstellung eines Friend Murine Leukemia Virus-Stocks in vitro

*Mus Dunningi* Zellen wurden in 25cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in 10ml RPMI Medium (10% FCS, Penicillin/Streptomycin) ausplattiert und anschließend 50µl Polybrene 0,8µg/ml zugegeben. Danach wurden die Zellen mit F-MuLV (MOI 1) Stock infiziert. Die Zellen wurden anschließend bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst (s. „Methoden“ 3.5.1) und in RPMI Medium aufgenommen. Zur Überprüfung der Prozentzahl an infizierten *Mus. Dunningi* Zellen, wurden diese mit AK720 und PE-gekoppelten Ziege-anti-Maus anti-IgG2b Antikörper für jeweils 30 min inkubiert. Die Prozentzahl infizierter Zellen wurde anschließend im Durchflußzytometer bestimmt. Wenn die Zellen zu 50-100% infiziert waren, wurden diese in 175cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in 50 ml RPMI Medium ausplattiert. Die Zellen wurden bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C im Brutschrank inkubiert bis diese ca. 50-75% konfluent waren. Dann wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Überstand geerntet, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Für die weitere Verwendung wurde die Aktivität des F-MuLV bestimmt. Der Test zur Bestimmung der Aktivität des F-MuLV-Stocks beruht auf dem Prinzip des IC-Tests (s. „Methoden“ 3.8). Es wird eine Verdünnungsreihe des Überstands hergestellt und dieser dann auf die *Mus Dunningi*-Zellen gegeben. Nach 3 Tagen Inkubation im Brutschrank, wurde der Test wie unter 0 ausgewertet.

### 3.4 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung von Zellzahlen wurden Einzelzellsuspensionen 1:2 oder 1:10 verdünnt, mit 0,4% Trypanblau (in PBS gelöst) versetzt und in einer Neubauerkammer gezählt. Trypanblau färbt tote Zellen an. Für die Zellzahlbestimmung wurden nur lebende Zellen gezählt.

### 3.5 Zellkultur

#### 3.5.1 Kultivierung von Zellen

Alle Zellen wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Je nach benötigter Anzahl der Zellen wurden diese in unterschiedlichen Zellkulturgefäßen (Greiner, Frickenhausen, Germany) in dem Zellkulturmedium RPMI mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) gehalten.

Die verwendeten Indikatorzellen (*Mus Dunn*) sind adhärenente Zellen und wurden in RPMI-Medium kultiviert. Zweimal die Woche wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurden die Zellen mit ATV von der Kulturflasche abgelöst und  $1 \times 10^5$  Indikatorzellen mit 10ml neuem Medium in eine neue Kulturflasche ausgesät.

Die verwendeten Hybridomazellen 169.4 sind Suspensionszellen. Sie produzieren  $\alpha$ CD8 monoklonale Antikörper. Zur Haltung der Zellen wurden diese 2x die Woche 1:2 gesplittet und mit neuem Medium versorgt.

#### 3.5.2 Herstellung des monoklonalen CD8 Antikörpers

Zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern wurden die Hybridomazellen in 175cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen überführt und in 100ml RPMI-Medium kultiviert. Sobald etwa 50% der Zellen tot waren, wurde der  $\alpha$ CD8 Antikörper-haltige Überstand gepoolt und von den Zellen durch Zentrifugation getrennt. Der Hybridomaüberstand wurde aliquotiert und die Aliquots bei -20°C aufbewahrt. Der Überstand wurde ohne weitere Aufreinigung oder Aufkonzentrierung der Antikörper verwendet.

### 3.6 <sup>51</sup>Cr-Freisetzungstest (indirekte und direkte Zytotoxizität)

Mittels des <sup>51</sup>Cr -Freisetzungstest kann die Zerstörung der Membranintegrität, verursacht z.B. durch das zytotoxische Potential von virusspezifischen CTL (Effektorzellen), ermittelt werden. Zielzellen wurden dazu mit Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> inkubiert, das durch Diffusion in die Zelle gelangt und dort an Proteine bindet, wodurch die Freisetzung des gebundenen <sup>51</sup>Cr aus den Zellen verhindert wird (Zychlinsky *et al.*, 1991). Erst durch Zell-Lyse kommt es zur Freisetzung von <sup>51</sup>Cr in den Überstand. Die Menge des im Überstand gemessenen <sup>51</sup>Cr dient als Berechnungsgrundlage für das zytotoxische Potential der eingesetzten Effektorzellen. Für die Untersuchung des gesamten zytotoxischen Potential von CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde die P815 Zelllinie

verwendet. Die P815 Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche Fc-Rezeptoren, diese Rezeptoren binden den konstanten Teil von Immunglobulinen (Ig). Die variablen Teile der Ig-Molekülen sind in diesem Fall frei, und können spezifisches Antigen binden. Die P815 Zellen wurden mit anti-Maus-CD3 Antikörper beladen und mit  $^{51}\text{Cr}$  markiert. Alle T-Zellen exprimieren CD3 Moleküle auf ihrer Oberfläche. Im Laufe der Inkubation von Effektorzellen mit P815 markierten Zielzellen, wurden die T-Lymphozyten mit Hilfe der anti-Maus CD3 Antikörper an P815 gebunden. Die Lymphozyten, die zytotoxischer Potenzial haben, werden von anti-Maus CD3 Antikörpern stimuliert und töten die Zielzellen.

Für die Bestimmung der spezifischen Zytotoxizität der  $\text{CD8}^+$  T-Zellen *ex vivo*, wurden mit  $^{51}\text{Cr}$  markierte FBL-3 Tumorzellen als Zielzellen verwendet. Diese Zellen wurden aus einer FV-infizierten B6 Maus gewonnen und exprimieren die FV-spezifischen Antigene (Kern 1986).

Für den  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungstest wurden Zielzellen (P815 oder FBL-3) in der logarithmischen Wachstumsphase mit  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  radioaktiv markiert. Zur Markierung wurde die benötigte Zellzahl der Zielzellen (max.  $2 \times 10^6$  Zellen) in  $900 \mu\text{l}$  Medium mit  $100 \mu\text{l}$   $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  (3,7MBq oder 0,1mCi) für eine Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Gleichzeitig wurden die P815 Zellen mit anti-Maus-CD3 Antikörper beladen. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal mit Medium gewaschen und auf eine Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Die zytotoxische Aktivität der CTL-Effektorzellen wird in diesem Test anhand der  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung von Zielzellen bestimmt. Bei den Effektorzellen handelte es sich um Milzzellen von uninfizierten B6 Mäusen oder um Milzzellen von B6 Mäusen die 3, 7, 14, 16, 18, 22, oder 30 Tage infiziert waren (Herstellung einer Milzzellsuspension s. 3.1.7). Die Effektorzellen wurden in verschiedenen Verhältnissen zu den Zielzellen zugegeben und bei  $37^\circ\text{C}$  5 Stunden inkubiert. Danach wurden die Platten für 10min bei 1200rpm zentrifugiert,  $30 \mu\text{l}$  des Überstandes in eine 96Well Luma Platte (96 Well Mikrotiterplatten, speziell für die Scintillations-Messung beschichtet) überführt und getrocknet. Die Messung erfolgte im Microplate Scintillation Counter (Canberra-Packard GmbH, Dreieich). Für die Negativkontrolle wurden Zielzellen nur mit Medium ohne Effektorzellen inkubiert. Die Negativkontrolle war immer  $<20\%$  der Positivkontrolle, welche gemessen wurde, indem Zielzellen mit 2% Triton-X-100 lysiert wurden. Der Prozentsatz spezifischer Zytotoxizität wurde wie folgt berechnet:



Prozent spezifischer Zytotoxizität = ((Messwert-Negativkontrolle)/(Positivkontrolle - Negativkontrolle))x100

### 3.7 <sup>3</sup>H-Tymin-DNA Freisetzung Test (Test auf zytotoxische Aktivität von T-Zellen)

Dieser Test misst das Potential der CTL zur Apoptoseinduktion in Zielzellen. Die Apoptoseinduktion in FBL-3 oder P815 Zielzellen wird anhand der freigesetzten fragmentierten DNA detektiert. Zielzellen bauen <sup>3</sup>H-Tymin in die DNA ein, und bei Induktion von Apoptose durch CTL wird die DNA zu ca. 200 bp langen Fragmenten degradiert. Anschließend werden alle Zellen lysiert. Die DNA aus den lysierten Zellen wird mit dem Harvester geerntet. Die nicht fragmentierte DNA bleibt auf dem Glassfieberfilter hängen, während kleine DNA-Fragmente abgewaschen werden. Die daraus resultierende geerntete Radioaktivität dient als Maß für lebendige Zellen.

Die Zielzellen wurden auf eine Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Zu je  $2 \times 10^5$  Zielzellen wurden 5  $\mu$ l <sup>3</sup>H-Thymin (5  $\mu$ Ci) hinzugegeben und über Nacht bei 37°C / 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, in dieser Zeit wird das <sup>3</sup>H Thymin eingebaut. Anschließend wurden die Zellen dreimal gewaschen, gezählt und in Medium erneut auf  $2 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Die Effektorzellen (CTL) wurden 1:3 in einer 96-Well Rundbodenplatte in Triplikaten titriert. Zum Schluss wurden 100  $\mu$ l Zielzellen zu den Effektorzellen pipettiert und bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurden 3 Wells mit 100  $\mu$ l Zielzellen plus 100  $\mu$ l Medium eingesetzt. Die Platten wurden für 6h bei 37°C / 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Im Anschluß wurde 25  $\mu$ l TTE -Puffer/Well zur Zell-Lyse dazu pipettiert. Es folgten 15 min Inkubation bei 37°C / 5% CO<sub>2</sub>. Die Platten wurden erneut zentrifugiert (10min/1.200rpm) und geerntet. Nach dem Trocknen wurden die Platten im Microplate Scintillation Counter (Canberra-Packard GmbH, Dreieich) gemessen. Die Berechnung der prozentualen Zelllyse erfolgte durch die folgende Formel:

Prozent spezifische Lyse =  $100 - (\text{Messwert} / (\text{Negativkontrolle} / 100))$

### 3.8 Nachweis von infizierten Zellen in der Milz ("Infectious Center Assay")

Die Anzahl FV-infizierter Zellen in der Milz wird mit diesem Test bestimmt. Dazu wird eine Milzzellsuspension von FV-infizierten Mäusen hergestellt (s. „Methoden“ 3.1.7). Von der Suspension wird eine Verdünnungsreihe mit Indikatorzellen (*Mus Dunningi*) koinkubiert. Infektiöse Milzzellen infizieren durch Zell-Zellkontakt die *Mus Dunningi*.

Zellen. Diese teilen sich und geben das Friend Virus an ihre Tochterzellen weiter. Es entsteht ein Virus-Focus. Diese Foci können mittels Antikörperreaktion und Substratreaktion angefärbt werden. Als FV-spezifischer Antikörper wird AK720 verwendet, dieser bindet an das MuLV-*env*. Der zweite, „Horse Radish Peroxidase“ (HRP) gekoppelte Antikörper (Ziege anti-Maus IgG2b-HRP) bindet an die Fc-Region des ersten Antikörpers. Das lösliche Substrat (3-Amino-9-Ethylcarbazole; AEC) wird von der HRP umgesetzt und in ein unlösliches rotes Produkt umgewandelt. Die entstandenen roten Punkte markieren auf dem Zellrasen die Virus-Foci. Anhand der Verdünnungsreihe und der Gesamtmilzzellzahl kann die Anzahl der infektiösen Zellen in der Milz bestimmt werden.

Dazu wurde am ersten Tag in eine 6 Well Gewebekulturschale eine definierte Anzahl Indikatorzellen ( $6,6 \times 10^3$  Zellen/ml) ausgesät. Es wurden 3ml Indikatorzellsuspension pro Well ausplattiert. Am zweiten Tag wurde die hergestellte Milzzellsuspension von FV-infizierten Mäusen auf  $1 \times 10^8$  Zellen/ml eingestellt und eine Verdünnungsreihe von  $10^7$  bis  $10^2$  hergestellt. Jeweils  $1 \times 10^7$  bis  $1 \times 10^2$  Zellen wurden auf die Indikatorzellen gegeben und drei Tage kokubiert. Die Inkubation fand bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\% \text{CO}_2$  statt. Als Kontrolle des Tests wurden jeweils 3 Näpfe mit F-MuLV und 3 Näpfe ohne Virus bzw. infektiöse Zellen mitgeführt. Bei der Kontrolle mit freiem Virus mußte Polybrene A ( $4 \mu\text{g/ml}$ ) hinzugegeben werden. Das Polybrene A diente dazu, dass das freie Virus besser an die Rezeptoren der Zelloberfläche binden konnte (Toyoshima and Vogt., 1969).

Nach drei Tagen wurde der Test ausgewertet. Dazu wurde das Medium abgekippt und die Zellen mit 95% Ethanol fixiert. Die fixierten Zellen wurden 1x mit PBS und 1x mit PBS/0,1% BSA gewaschen. Der erste Antikörper (AK720) wurde 30min bei RT inkubiert. Dazu wurden pro Napf 600 $\mu\text{l}$  Hybridomaüberstand (AK720) verwendet. Die Platten wurden 2x mit PBS/0,1% BSA gewaschen. Der zweite Antikörper (Ziege anti Maus IgG2b-HRP; 0,05mol/L) wurde 1:500 in PBS/0,1% BSA verdünnt und jeweils 600 $\mu\text{l}$  pro Well gegeben. Die Inkubation betrug 20min bei RT. Nach dem Waschen mit PBS (2x) wurden 2ml frisch angesetzte Substratlösung (AEC) pro Well zugegeben und 20min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach dem Abkippen, Waschen und Trocknen der Platten, wurden die Foci gezählt. Die Anzahl an infektiösen Milzzellen wurde wie folgt berechnet: Mittelwert der Anzahl an Foci pro Verdünnung und Well x Anzahl der Milzzellen pro Maus = Anzahl infizierter Milzzellen pro Maus

### 3.9 Durchflußzytometrie

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie lassen sich einzelne Zellen oder Zellpopulationen aus einer heterogenen Zellpopulation analysieren. Dabei können spezielle Eigenschaften der Zellen identifiziert, charakterisiert und quantifiziert werden. Dazu wurden spezifische Fluorochrom-markierte Antikörper verwendet, die an Oberflächenproteine binden (Tabelle 2.2).

#### 3.9.1 Färbung von Oberflächenproteinen (CD)

$5 \times 10^5$  –  $1 \times 10^6$  Zellen aus dem Blut oder der Milz wurden mit PBS gewaschen, in 100  $\mu$ l PBS und 0,5-2  $\mu$ l konjugierten Antikörper aufgenommen und 15min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach einmaligem Waschen in FACS-Puffer wurden die Zellen im Durchflußzytometer (FACScan, BD, Heidelberg, Germany) analysiert. Falls nicht anders angegeben, wurden alle Antikörper von Pharmingen (Heidelberg, Germany) bezogen. Ausgenommen der in Tabelle 3.1 aufgeführten Antikörper (0,2mg/ml) wurden alle Antikörper 1:200 für die durchflußzytometrische Färbung eingesetzt.

#### 3.9.2 Intrazelluläre Färbung von Granzym B

Für den Nachweis des intrazellulären Proteins GzmB in verschiedenen Zellpopulationen wurden die Zellen entsprechend gefärbt. Zuerst wurden die Oberflächenproteine (CD8, CD43) der Zellen markiert. (s. „Methoden“ 3.9.1) Nach einmaligem Waschen in FACS-Puffer, wurde GzmB in den Zellen dann nach dem Protokoll des Herstellers des Kits Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) intrazellulär gefärbt.

**Tabelle 3.1 Verwendung von Antikörpern für die Durchflußzytometrie**

Antikörper mit jeweiligem Konjugat	Zur Färbung eingesetzte Verdünnung
AK34	150 $\mu$ l Hybridomaüberstand
AK34-Biotin	1:6000
CD19-FITC	1:50
CD43-PE	1:800
Thy1.2-FITC	1:10000
Thy1.2-PE	1:800

### 3.9.3 Bestimmung der Prozentzahl von FV-infizierten Zellen im Blut

Für die Bestimmung der Anzahl an FV-infizierten Zellen im Blut, wurden  $1 \times 10^6$  Zellen aus dem Blut mit dem Antikörper 34 (AK34) inkubiert. FV-infizierte Zellen exprimieren an der Oberfläche das glykolyierte FV Gag-Protein, an welches der AK34 bindet. Der AK34 ist nicht mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert, so dass für die durchflußzytometrische Analyse ein zweiter Antikörper eingesetzt werden mußte. Dieser 2te AK (IgG2b-PE; monoklonaler Ziege anti Maus AK) bindet an den AK34. Nach der Inkubation der Zellen aus dem Blut mit AK34 wurden die Zellen 2x mit FACS-Puffer gewaschen. Es folgte eine Inkubation der Zellen mit IgG2b-PE für 30min bei 4°C im Dunkeln. Nach erneuten Waschen der Zellen mit FACS-Puffer wurden die Zellen im Durchflußzytometer analysiert.

### 3.9.4 Bestimmung von FV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen mittels Tetramertechnik

Virus-spezifische CD8<sup>+</sup>-Zellen wurden *ex vivo* mittels Tetramertechnik quantitativ bestimmt. Tetramere bestehen aus 4 MHC I-Moleküle, welche ein Virus-spezifisches Peptid tragen. Die MHC-Moleküle sind über Biotin miteinander verbunden und mit PE konjugiert.

Für die Tetramerfärbung wurde eine Milzzellsuspension hergestellt (s. „Methoden“ 3.1.7). Die Milzzellen wurden mit 10ml PBS gewaschen und jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen pro Färbung eingesetzt. Die Zellen wurden erneut gewaschen und in einem Volumen von 25µl für 15min bei RT gefärbt. Für die Dreifach-Färbung wurden 2,5µl Tetramere mit den Antikörpern  $\alpha$ -CD8<sup>+</sup>-PerCP und  $\alpha$ -CD43-FITC eingesetzt. Nach 2maligem Waschen der Zellen mit FACS-Puffer wurden die Zellen in 500µl FACS-Puffer aufgenommen und innerhalb einer Stunde im Durchflußzytometer gemessen.

## 3.10 Molekularbiologische Methode

Alle Arbeiten mit RNA wurden mit Handschuhen ausgeführt. Es wurden spezielle RNase freie Lösungen und gestopfte Pipettenspitzen verwendet.

### 3.10.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus magnetseparierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen und die DNase Behandlung wurde mit „Absolutely RNA Microprep Kit“ nach dem Standardprotokoll der Firma Stratagene (Amsterdam, Niederlanden) durchgeführt.

### 3.10.2 Elektrophorese von RNA im Agarosegel

Um Kontaminationen mit DNA und die Qualität der RNA nachweisen zu können, wurde vor der reversen Transkription der RNA in cDNA die DNase gereinigte RNA im einem Agarosegel aufgetrennt. Dazu wurde ein 1%iges Agarosegel in TBE DEPC-H<sub>2</sub>O hergestellt. Das Gel wurde in eine eigens für diese Zwecke vorhandene DEPC behandelte Gelkammer gegossen und ca. 1h ausgehärtet. Jede Geltasche wurde mit einem Mix aus 2µl RNA Probe, 2µl Ladepuffer und 10µl DEPC-H<sub>2</sub>O bzw. einem Basenpaarmarker beladen. Das ethidiumbromidhaltige Gel lief bei 100V für 30min. Ethidiumbromid interkaliert mit Nukleinsäuren und fluoresziert bei Anregung mit UV-Licht. Die Dokumentation der Fluoreszenz erfolgt auf einem UV-Transluminator und mit Thermopapier. Reine, nicht degradierte RNA ist nach dem DNA Verdau an zwei scharfen Banden (18S und 28S rRNA) auf dem Gel zu erkennen. Verunreinigungen durch genomische DNA wurden aufgrund ihrer Größe oberhalb der rRNA gefunden, während degradierte RNA unterhalb der rRNA-Banden detektiert wurden. Bei DNA Verunreinigungen wurde die DNase-Behandlung wiederholt (s. „Methoden“ 3.10.1), war die RNA degradiert, wurden die Proben nicht weiterverarbeitet.

### 3.10.3 Reverse Transkription

Zur reversen Transkription von RNA zu cDNA wurden 2µg RNA eingesetzt. Dazu wurden 2µg RNA auf 10µl Volumen mit DEPC-H<sub>2</sub>O aufgefüllt und für 5min bei 65°C im Thermoblock inkubiert, zentrifugiert und auf Eis gestellt, bevor 10µl Master Mix zu jeder Probe pipettiert wurden: 2µl 10x RT Puffer (von Qiagen, enthält u.a. unbekannte Mengen an MgCl<sub>2</sub>); 2µl 5 mM dNTPs; 1µl Oligo (dT)<sub>12-18</sub> Primer (500µg/ml); 0,5µl (= 20U) RNasin Inhibitor; 1µl (= 4U) Omniskript und 3,5µl DEPC-H<sub>2</sub>O. Dieser Ansatz inkubiert 60min bei 37°C und 10min bei 70°C im Thermoblock. Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurden die Proben auf 50ng RNA/µl (cDNA) eingestellt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C aufbewahrt. Als Kontrolle wurden von jeder RNA Probe ein Ansatz mit 4,5µl DEPC-H<sub>2</sub>O ohne reverse Transkriptase angesetzt.

### 3.10.4 DNA Gelelektrophorese

Die amplifizierten DNA Fragmente und ein Längenstandard wurden elektrophoretisch in horizontalen ethidiumbromidhaltige Agarosegelen (1.5%ig) bei 8V/cm<sup>2</sup> in TAE aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel zur Dokumentation photographiert.

### 3.10.5 Bestimmung der mRNA für zytotoxische Moleküle aus CD8<sup>+</sup> T-Zellen mittels Echtzeit-PCR (Light Cycler/Roche)

Im Gegensatz zu konventionellen PCR Systemen konnten PCR Produkte mit der Echtzeit-PCR während der Amplifikation erfaßt werden. Zur Quantifizierung der PCR Produkte wurde der fluoreszierende Farbstoff SYBR Green I in doppelsträngige (ds) DNA eingebaut.

SYBR Green I bindet sich ausschließlich an doppelsträngige DNA, also an hybridisierte Primer und durch die Taq Polymerase synthetisierte dsDNA. Die emittierte Fluoreszenz der PCR Produkte wird durch eine Photozelle aufgezeichnet und konnte so von Zyklus zu Zyklus verfolgt werden. Die Quantifizierung unbekannter Mengen an PCR Produkten erfolgt über die Korrelation der Fluoreszenz mit der Fluoreszenz eines Standards, dessen Kopienzahl bekannt war. Nach der Amplifikationsphase fand eine Schmelzpunktanalyse durch Erhitzen der Proben von 60°C auf 95°C statt. Jedes Fragment besaß einen spezifischen Schmelzpunkt, bei dem die dsDNA in ssDNA denaturiert. Dieser Vorgang wurde photoelektrisch dokumentiert und liefert Aufschluß über amplifizierte Nebenprodukte, wie Kontaminationen oder Primer Dimere. Der Mastermix wurde wie in Tab. 3.2 beschrieben hergestellt (9µl pro Probe) und in gekühlte Glaskapillaren vorgelegt, im Anschluß wurden 1µl cDNA Matrize zu dem Mix pipettiert. Als Negativkontrolle werden 1µl H<sub>2</sub>O anstatt cDNA eingesetzt. Die Glaskapillaren wurden bei 3000rpm (15sec) zentrifugiert und im Rotor des Light Cycler platziert.

**Tabelle 3.2 Master Mix für die Echtzeit-PCR**

<b>I. 9 µl Master Mix</b>	
5,8µl	H <sub>2</sub> O (PCR Reinheit)
1,2µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
0,5µl	3' Primer (10µM)
0,5µl	5' Primer (10 µM)
1,0µl	SYBR Green Mix (1a+1b)
<b>II. 1µl cDNA</b>	<b>(Stammlsg. 10 ng/µl)</b>

Als Standard für die Quantifizierung der jeweiligen Echtzeit-PCR Produkte wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe der 18S-RNA Matrize mit definierter Kopienzahl verwendet.

Der Standard wurde aus L1210.3 Zellen hergestellt und hat eine cDNA-Konzentration von 85000 18sRNA Kopien/ $\mu$ l (15ng/ $\mu$ l). Die Echtzeit-PCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt (Tab.3.3).

**Tabelle 3.3 Einstellungen der Echtzeit-PCR Programme**

<b>1) Initialphase;</b>	<b>Denaturierung der doppelsträngigen DNA:</b>	95°C; 10min
<b>2) Hauptphase;</b>	Amplifikation der PCR Produkte (35 Zyklen)	
	Denaturierung der DNA	95°C; 15s
	Annealing der Primer Perforin, GzmB, GzmA,	55°C; 8s
	Synthese durch Taq Polymerase	
	Perforin,	72°C; 20s
	GzmB	72°C; 12s
	GzmA,	72°C; 15s
<b>3) Schmelzphase;</b>		95°C; 0s 60°C; 15s 95°C; 0s
<b>4) Kühlung;</b>		40°C; 30s

Die Temperaturänderungsrate liegt bei 20°C/s. Nur während des Schmelzprozesses wurde eine Änderungsrate von 0,1°C/s verwendet.

## 4 Ergebnisse

Im ersten Teil der Arbeit sollte die Rolle von zytotoxischen Lymphozyten in der akuten Infektion mit FV Komplex bestimmt werden. Darüber hinaus wurde mit Hilfe von „knockout“ Mäusen die molekulare Grundlage für die anti-retrovirale Aktivität von zytotoxischen T-Zellen analysiert.

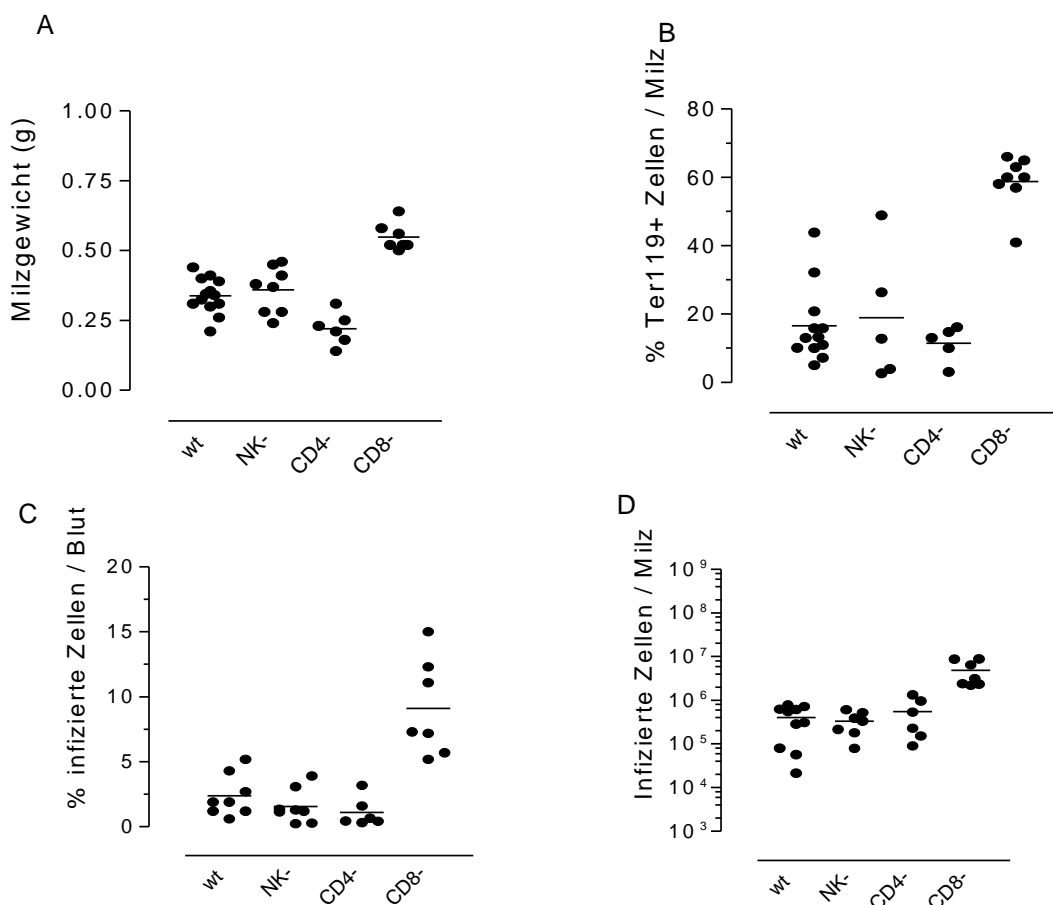
### 4.1 Depletierung von NK, CD4<sup>+</sup> T- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der akuten FV Infektion

C57BL/6 (B6) Mäuse sind gegen eine Friend Virus induzierte Leukämie resistent (Persons *et al.*, 1999), aber das Virus persistiert lebenslang. In der akuten Infektion entwickeln die Mäuse eine leichte Splenomegalie, die eine Folge der Proliferation von den Ter119<sup>+</sup> Erythroblastvorläuferzellen ist. Der Peak der Virusreplikation ist zwischen dem siebten und dem vierzehnten Tag nach Infektion. In dieser Zeit sind 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> infizierte Zellen in der Milz nachweisbar. Auch im Blut exprimieren ca.1-3% aller Zellen virale Antigene. Die Anzahl an FV-infizierten Zellen in der Milz von B6 Mäusen sinkt am Ende der akuten Infektion ab und stabilisiert sich ab der fünften Woche nach Infektion. Ab diesem Zeitpunkt bleibt die Zahl der infizierten Zellen in der Milz konstant (10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> infizierte Zellen (IC) pro Milz). Gleichzeitig reduziert sich das Milzgewicht von 0,3-0,45g (akute Phase der Infektion) auf 0,15-0,2g (persistierende Phase der Infektion). Infizierte Zellen im Blut sind in der persistierenden Phase der Infektion in B6 Mäusen nicht mehr nachweisbar.

Es ist gezeigt worden, dass Lymphozyten eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der akuten FV Infektion von B6 Mäuse spielen (Hasenkrug and Dittmer, 2000). Die molekularen Mechanismen und Zellpopulationen, die dabei von Bedeutung sind, waren aber bisher unbekannt. Um die Rolle von verschiedenen Zellpopulationen, die zytotoxische Funktionen ausüben können (NK<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> T- oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen), zu untersuchen, wurden diese Zellen mit Antikörpern depletiert. Die Depletion wurde zum Zeitpunkt der Infektion begonnen (s. „Methoden“ 3.1.2). Als erstes wurde das Milzgewicht als ein Symptom von FV induzierter Erkrankung untersucht. Eine Depletion von NK (Mittelwert = 0,35g) und CD4<sup>+</sup> T Zellen (Mittelwert = 0,22g) in FV infizierten B6 Mäusen induzierte keine Milzvergrößerung in den Tieren im Vergleich zu undepletierten, infizierten Mäusen (Mittelwert = 0,33g) (Abb. 4.1.A). Im Gegensatz dazu hatten die Mäuse, die während der akuten Infektion mit anti-CD8 Antikörpern behandelt wurden, eine signifikant vergrößerte Milz (Mittelwert = 0,55g). Darüber



hinaus war der prozentuelle Anteil an Ter119<sup>+</sup> Erythroblasten (Mittelwert = 58,7%) in der Milz von infizierten Mäusen nach CD8<sup>+</sup> T- Zell-Depletion signifikant höher, als bei undepletierten, infizierten Mäusen (Mittelwert = 19,9%) (Abb 4.1.B). Der Verlust der NK1.1<sup>+</sup> oder CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulationen in der akuten Phase der FV-Infektion hatte dagegen keine Auswirkung auf die Proliferation der Erythroblastvorläuferzellen (NK1.1<sup>+</sup> Zell-Depletion: Mittelwert = 18,7%; CD4<sup>+</sup> T-Zell-Depletion: Mittelwert = 12,4%). Bei der Bestimmung der Viruslast zeigte sich ein ähnliches Bild (Abb. 4.1.C, D). Nur die Depletion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen führte zu einer signifikanten Erhöhung der Viruslast im Blut (Mittelwert = 9,11%) und in der Milz (Mittelwert =  $4,8 \times 10^6$  IC/Milz), während die Depletion von NK oder CD4<sup>+</sup> T-Zellen keinen Einfluss auf den Infektionsverlauf hatte (Mittelwerte Prozentanzahl infizierter Zellen im Blut: wt = 2,3%, NK Zell-Depletion = 1,5%, CD4<sup>+</sup> T-Zell-Depletion = 1,1%; Viruslast in der Milz: wt =  $4,0 \times 10^5$  IC/Milz, NK Zell-Depletion =  $3,4 \times 10^5$  IC/Milz, CD4<sup>+</sup> T-Zell-Depletion =  $5,4 \times 10^5$  IC/Milz).



**Abbildung 4.1 Infektionsverlauf in FV-infizierten Mäusen nach NK, CD4<sup>+</sup> T-Zell-, oder CD8<sup>+</sup> T-Zell-Depletion**

B6 Mäuse wurden mit 12500 SFFU FV infiziert und mit Antikörpern gegen NK1.1<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>T- oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen depletiert bzw. zur Kontrolle keine Depletion durchgeführt. Der

Depletionserfolg wurde mittels Durchflußzytometrie bestätigt. 81,7% der NK1.1<sup>+</sup> Zellen, 84% der CD4<sup>+</sup> T-Zellen bzw. 88,4% der CD8<sup>+</sup>T-Zellen waren 10 Tage nach der Infektion in der Milz depletiert. Dargestellt sind 10 Tage nach Infektion (A) das Milzgewicht, (B) Prozent der Ter119<sup>+</sup> Zellen (Erythroblastvorläuferzellen), (C) Prozent infizierter Zellen im Blut und (D) infizierte Zellen in der Milz. Jeder Punkt symbolisiert ein individuelles Tier. Die Querstriche geben Mittelwerte der Gruppen an. Die Unterschiede zwischen den wt und den CD8- Mäusen war nach dem Dunnett Test für alle gemessenen Parameter statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ). Legende wt = undepletiert Kontrolle, NK- = NK1.1<sup>+</sup> Zell-Depletion, CD4- = CD4<sup>+</sup> T-Zell-Depletion, CD8- = CD8<sup>+</sup> T-Zell-Depletion.

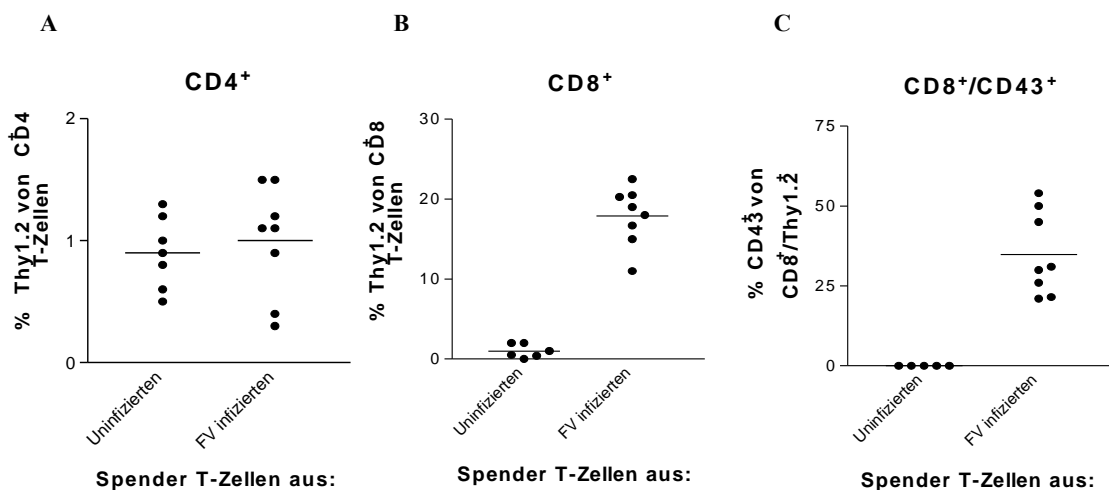
Alle Parameter der akuten FV Infektion (Milzgewicht, Prozentzahl Ter119<sup>+</sup> Zellen und Viruslast), waren bei Mäusen mit depletierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen signifikant höher als bei unbehandelten, infizierten Mäusen. Nach NK1.1<sup>+</sup> oder CD4<sup>+</sup> T-Zell- Depletion waren diese Parameter jedoch unverändert. Diese Ergebnisse beweisen, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen wichtig sind für die Kontrolle der FV Replikation in der akuten Phase der Infektion in B6 Mäusen.

#### **4.2 Untersuchungen zur Proliferation und Aktivierung von FV spezifischen T-Zellen**

Um die Proliferation von spezifischen T-Zellen in der akuten FV Infektion zu untersuchen, wurde ein Lymphozytentransfer-Model verwendet. Ein besonderer Vorteil dieses Tests ist es, dass gleichzeitig Virus-spezifische CD8<sup>+</sup> T- und CD4<sup>+</sup> T-Zellen gemessen werden konnten. B6 Mäuse mit dem T-Zelloberflächenmolekül Thy1.2, werden im Folgenden als Thy1.2 bezeichnet. Diese T-Zellen wurden aus FV infizierten Mäusen in B6 Mäuse mit dem T-Zelloberflächenmolekül Thy1.1 (Thy1.1), transferiert. Die transferierten T-Zellen können im Durchflußzytometer aufgrund ihres Oberflächenmarkers Thy1.2 von den endogenen T-Zellen der Empfängermäuse (Thy1.1<sup>+</sup>) unterschieden werden. Sofort nach dem Zell-Transfer wurden die Mäuse mit FV infiziert. 10 Tage später wurde mittels Durchflußzytometrie die Prozentzahl von CD4<sup>+</sup>/Thy1.2<sup>+</sup> T-Zellen von der gesamten CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation in den Empfängertieren gemessen. Dasselbe wurde auch für die Prozentzahl von CD8<sup>+</sup>/Thy1.2<sup>+</sup> T-Zellen durchgeführt. So konnte die Expansion von FV-spezifischen T-Zellen in der akuten FV Infektion verfolgt werden (Abb. 4.2). Der Transfer von T-Zellen aus uninfizierten Thy1.2 Mäusen wurde als Kontrolle verwendet.

Der prozentual Anteil an CD4<sup>+</sup>/Thy1.2<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz von Thy1.1 Empfänger-Mäusen war nach dem Transfer dieser Zellen aus infizierten und uninfizierten Mäusen identisch. Das Transferexperiment zeigte also, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen während der akuten FV Infektion nicht proliferierten. Gleichzeitig waren aber ca. 18% der CD8<sup>+</sup> T-

Zellen in Thy1.1 Empfänger-Mäusen Thy1.2 positiv, wenn die Zellen aus infizierten Tieren stammten, während nur 1% CD8<sup>+</sup> Thy1.2<sup>+</sup> T-Zellen gefunden wurden, wenn die transferierten Zellen aus uninfizierten Kontrollmäusen stammten. 35% der proliferierenden CD8<sup>+</sup>/Thy1.2<sup>+</sup> T-Zellen exprimieren den Effektormarker CD43. Die Transferexperimente beweisen, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der Infektion der Mäuse mit FV proliferieren und einen Effektorphänotyp haben. Die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen war dagegen in diesem Experiment nicht nachweisbar.



#### Abbildung 4.2 Nachweis der Proliferation von T-Zellen in der akuten FV Infektion

Die B6 Mäuse mit dem T-Lymphozytenoberflächenmolekül (Thy1.2) wurden mit FV (3000 SFFU) infiziert, 6 Tage nach der Infektion wurden die T-Lymphozyten separiert und in Thy1.1-Mäuse transferiert (Abschnitt 3.1.10). Die Empfängertiere wurden direkt nach dem Transfer, mit 12500 SFFU FV infiziert. Thy1.2<sup>+</sup> Zellen von uninfizierten Mäusen wurden zur Kontrolle in Thy1.1-Mäuse transferiert und die Empfängermäuse direkt nach dem Transfer infiziert. 10 Tage nach dem Transfer und der Infektion wurden die Anzahl der transferierten CD4<sup>+</sup>/Thy1.2<sup>+</sup> T-Zellen (A), CD8<sup>+</sup>/Thy1.2<sup>+</sup> T-Zellen (B) und der Anteil CD43<sup>+</sup> Zellen von CD8<sup>+</sup>/Thy1.2<sup>+</sup> T-Zellen (C) in der Milz der (Thy1.1) Empfänger-Mäuse durchflußzytometrisch bestimmt. Jeder Punkt symbolisiert eine individuelle Maus. Die Querstriche geben Mittelwerte der Gruppen an.

#### 4.3 Phänotypische Charakterisierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in akut infizierten Mäusen

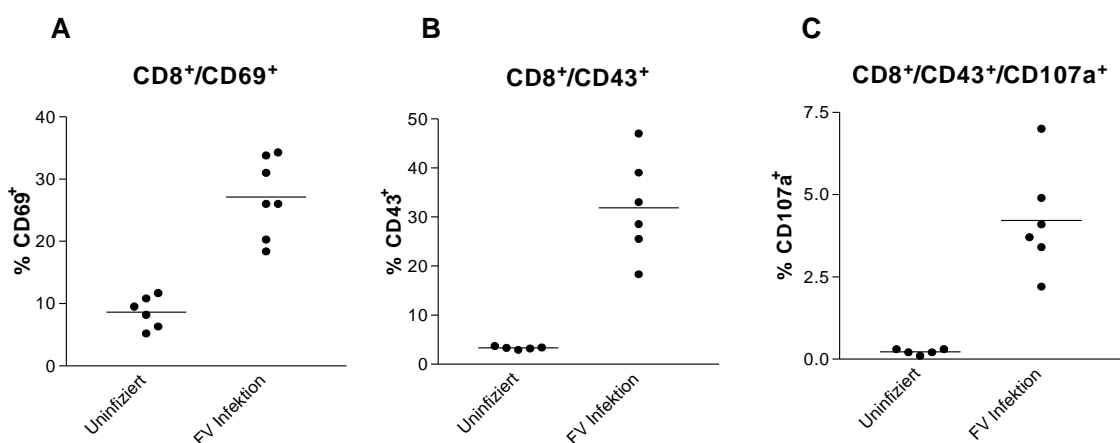
Die vorher gezeigte Ergebnisse beweisen, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der akuten FV Infektion in B6 Mäusen spielten. Daher sollten diese Zellen phänotypisch charakterisiert werden.

Aktivierte Lymphozyten exprimieren auf der Zelloberfläche CD69. Dieser Aktivierungsmarker erscheint innerhalb von Stunden auf der Zellmembran aktivierter T-Zellen. Der prozentuale Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die auf der Oberfläche CD69

exprimieren, nimmt durch die FV Infektion zu (Abb 4.3.A). Die Prozentzahl aktivierter  $CD8^+$  T-Zellen war bei 10 Tage infizierten Mäusen signifikant höher (Mittelwert 27,8%) als bei uninfizierten Mäusen (Mittelwert 8,7%).

CD43 (leukosialin, sialophorin), ein transmembranes Glykoprotein, reguliert die Adhäsion und die Migration von Zellen durch das Endothelium (Carlow *et al.*, 1999). Die Population der  $CD8^+$  Effektor-T-Zellen exprimiert CD43 auf ihrer Oberfläche. Nur 3,3% von  $CD8^+$  T-Zellen aus uninfizierten Mäusen waren  $CD43^+$ . Die Prozentzahl von  $CD8^+$  T-Zellen, die diesen Marker exprimieren, nahm 10 Tage nach der FV Infektion um fast das 10fache zu (Mittelwert = 32%) (Abb 4.3.B).

Wenn Virus-spezifische  $CD8^+$  T-Zellen ihre zytotoxische Funktion ausüben, sekretieren sie zytolytische Granula. Die Granula exprimieren intrazellulär CD107a Moleküle, die nach der Degranulierung auf der Oberfläche erscheinen. Der Prozentanteil der  $CD107a^+$  T-Zellen wurde mittels Durchflußzytometrie bestimmt (s. „Methoden“ 3.9.1). Naive  $CD8^+$  T-Zellen haben kein CD107a auf der Zelloberfläche. Dagegen exprimierten ca. 4% der  $CD8^+$  T-Zellen aus akut FV-infizierten Mäusen dieses Molekül (Abb 4.3.C). Die Sekretion der Granula zeigte, dass die  $CD8^+$  T-Zellen in der akuten Phase der Infektion ihre zytotoxischer Funktion ausübten. Die akute FV Infektion aktivierte also  $CD8^+$  T-Zellen und lässt sie zu Effektorzellen ausreifen.

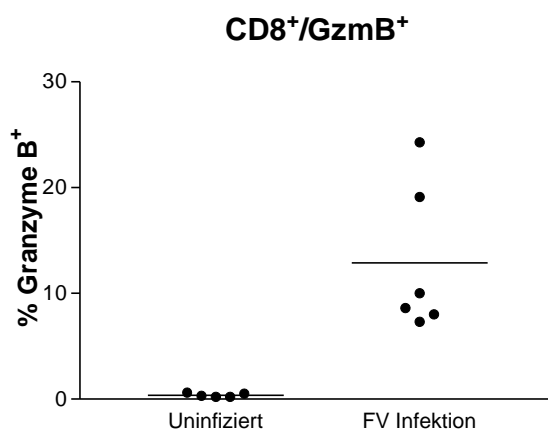


**Abbildung 4.3 Die phänotypische Charakterisierung der  $CD8^+$  T-Zellen aus uninfizierten und akut infizierten Mäusen**

B6 Mäuse wurden mit 12500 SFFU FV infiziert und Milzzellen 10 Tage nach der Infektion gewonnen. Milzzellen von uninfizierten Mäusen wurden als Kontrolle verwendet. Der Prozentanteil an  $CD8^+$  T-Zellen, die  $CD69^+$  (A),  $CD43^+$  (B) und  $CD107a^+$  (C) waren, wurde durchflußzytometrisch bestimmt. Jeder Punkt symbolisiert eine individuelle Maus. Die Querstriche geben Mittelwerte der Gruppen an. Die Unterschiede zwischen den uninfizierten und den infizierten Mäusen war nach dem Mann-Whitney Test für alle gemessenen Parameter statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ).

#### 4.4 Nachweis von Granzym B in CD8<sup>+</sup> Effektorzellen

T-Zellen, die zytotoxische Funktionen ausüben können, haben verschiedene in den Granula gelagerte Effektormoleküle. Granzym B ist dabei das wichtigste Enzym, das mehrere apoptotische Mechanismen in der Zielzelle auslösen kann. Um die Anwesenheit von Granzym B in CD8<sup>+</sup> T-Zellen von FV infizierten Mäusen nachzuweisen, wurde eine intrazelluläre durchflußzytometrische Bestimmung durchgeführt. Ca. 11% der CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz von infizierten Mäusen waren Granzym B positiv (Abb. 4.4). Nur 0,5% der CD8<sup>+</sup> T-Zellen von naiven Mäusen exprimieren dagegen dieses Enzym. Die Untersuchung zeigte, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus FV infizierten Mäusen zytotoxische Moleküle des Exozytosewegs produzierten.



#### Abbildung 4.4 Nachweis von Granzym B in CD8<sup>+</sup> T-Zellen von FV infizierten Mäusen

B6 Mäuse wurden mit 12500 SFFU FV infiziert. Die Milzzellen wurden von uninfizierten und 10 Tage infizierten Mäusen gewonnen. Granzym B wurde mittels intrazellulärer Durchflußzytometrie gemessen (s. „Methoden“ 3.9.2). Jeder Punkt symbolisiert eine individuelle Maus, die Querstriche geben Mittelwerte an. Der Unterschied zwischen den uninfizierten und den infizierten Mäusen war nach dem Mann-Whitney Test statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ).

#### 4.5 Untersuchung der zytotoxischen Funktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus FV-infizierten Mäusen

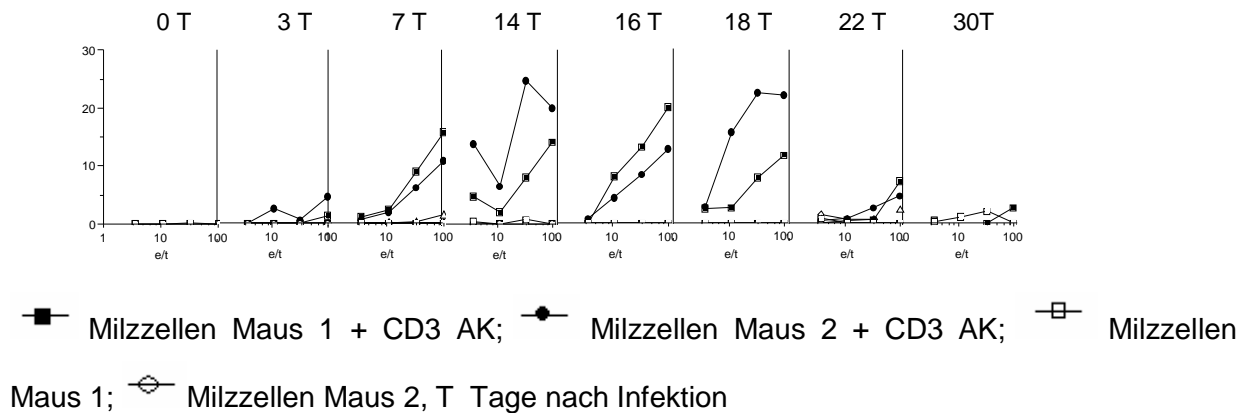
Um die zytotoxische Funktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus infizierten Mäusen *in vitro* zu untersuchen, wurden zytotoxische Tests durchgeführt (Abbildung 4.5). Zuerst wurde das zytotoxische Potential von gesamten T-Lymphozyten untersucht (indirekte Zytotoxizität). Dafür wurde die Zelllinie P815 als Zielzellen verwendet (A). Die P815 Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche Fc-Rezeptoren, die den konstanten Teil von Immunoglobulinen binden. Die P815 Zellen wurden mit anti-Maus-CD3 Antikörper

beladen und mit  $\text{Cr}^{51}$  markiert (s. „Methoden“ 3.6). Im Laufe der Inkubation von Effektorzellen mit den P815 Zielzellen, wurden die T-Lymphozyten mit Hilfe der anti-Maus CD3 Antikörper an P815 Zellen gebunden. Die Lymphozyten, die zytotoxisches Potenzial haben, wurden von den anti-Maus CD3 Antikörpern stimuliert, und töteten die Zielzellen. Die getöteten P815-Zielzellen setzen nun das  $\text{C}^{51}$  frei, wodurch der Prozentanteil an Zelllyse bestimmt werden kann.

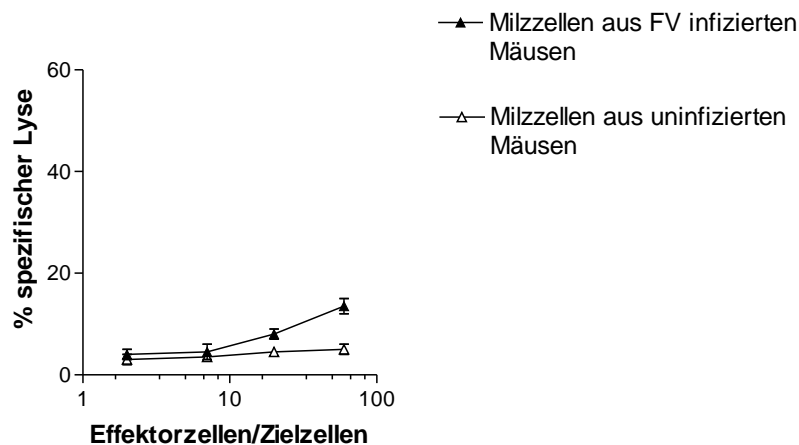
Abbildung 4.5.A zeigt das gesamte zytotoxische Potential von T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Infektion mit FV. Die stärkste indirekte zytotoxische Aktivität konnte zwischen dem siebten und achtzehnten Tag nach Infektion gemessen werden. Diese Experimente haben den Beweis geliefert, dass Lymphozyten aus akut FV-infizierten Mäusen zytotoxisches Potential haben.

Im folgenden Experiment wurde die Virus-spezifische Zytotoxizität von  $\text{CD8}^+$  T-Zellen *in vitro* untersucht (Abb. 4.5.B). Als Zielzellen wurden mit  $\text{Cr}^{51}$  markierte FBL-3 Tumorzellen verwendet. Diese Zellen sind aus einer FV-infizierten B6 Maus gewonnen worden und exprimieren FV-spezifische Antigene (Kern 1986). Die spezifische zytotoxische Aktivität der  $\text{CD8}^+$  T-Zellen *in vitro* war aber nur sehr schwach. Entweder die FBL-3 Zellen exprimierten nicht genügend virales Antigen für die zytotoxische Experimente oder der Anteil an Virus-spezifischen  $\text{CD8}^+$  T-Zellen war zu gering, um sie in einem *in vitro* Test nachzuweisen.

A



B



**Abbildung 4.5 Analyse des zytotoxischen Potentials (A) und der spezifischen Zytotoxizität (B) von T-Zellen aus FV infizierten Mäusen**

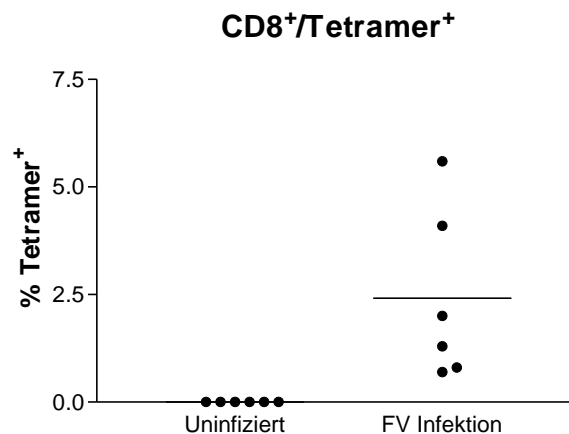
**A. Indirekte Lyse** Die Milzzellen wurden aus Mäusen, die mit 12500 SFFU FV infiziert waren, gewonnen. Die Milzzellen von uninfizierten Mäusen (0 Tage) oder Mäusen die 3, 7, 14, 16, 18, 22 oder 30 Tage infiziert waren, wurden in verschiedenen Verhältnissen mit Zielzellen (90:1; 30:1; 10:1; 3:1) gemischt. Als Zielzellen wurden  $\text{Cr}^{51}$  markierte P815 Zellen, mit anti-Maus-CD3 Antikörpern beladen (gefüllten Punkte) oder unbeladen (offenen Punkte), verwendet. Indirekte Zytotoxizität der Milzzellen wurde nach Inkubation mit den Zielzellen gemessen.

**B. Spezifische Lyse.** Die Milzzellen 14 Tage infizierter Mäuse wurden zusammen mit  $\text{Cr}^{51}$  markierten FBL-3 Zellen in verschiedenen Verhältnissen 5 Stunden inkubiert. Die Freisetzung von radioaktivem  $\text{Cr}^{51}$  wurde gemessen und dadurch die Prozentzahl getöteter Zielzellen berechnet.

#### 4.6 Nachweis Virus-spezifischer $\text{CD8}^+$ T-Zellen in der akuten FV Infektion

Die  $\text{CD8}^+$  T-Zellen, die nach der FV-Infektion Antigen-spezifisch stimuliert wurden, proliferierten. Diese Population spezifischer Zellen exprimiert den Effektormarker CD43 (Onami *et al.*, 2002). Die Virus-spezifischen CTL erkannten das H-2D<sup>b</sup> Peptid

aus dem leader-Segment vom glykosylierten gag Protein des F-MuLV ( $D^b$ -GagL) (Chen *at al.*, 1996). MHC Klasse I H-2D Tetramere binden an dieses Peptid (Chen *at al.*, 1996). Die Tetramere wurden für die Quantifizierung der FV-spezifischen  $CD8^+$  T-Zellen verwendet. Die  $D^b$ -GagL Tetramere sind vier MHC I Moleküle, die das immundominante FV spezifische gag  $CD8^+$  T-Zell Epitop gPr80<sup>gag</sup>85-93 tragen. Die Untersuchung zeigte, dass spezifische  $CD8^+$  T-Zellen in der Milz von akut infizierten Mäusen nachweisbar waren. Im Mittel waren ca. 2,5% aller  $CD8^+$  T-Zellen dieser Mäuse spezifisch für das FV Epitop (Abb. 4.6).



**Abbildung 4.6** Prozentzahl  $D^b$ -GagL-Tetramer<sup>+</sup>/ $CD8^+$  T-Zellen in uninfizierten und FV infizierten Mäusen

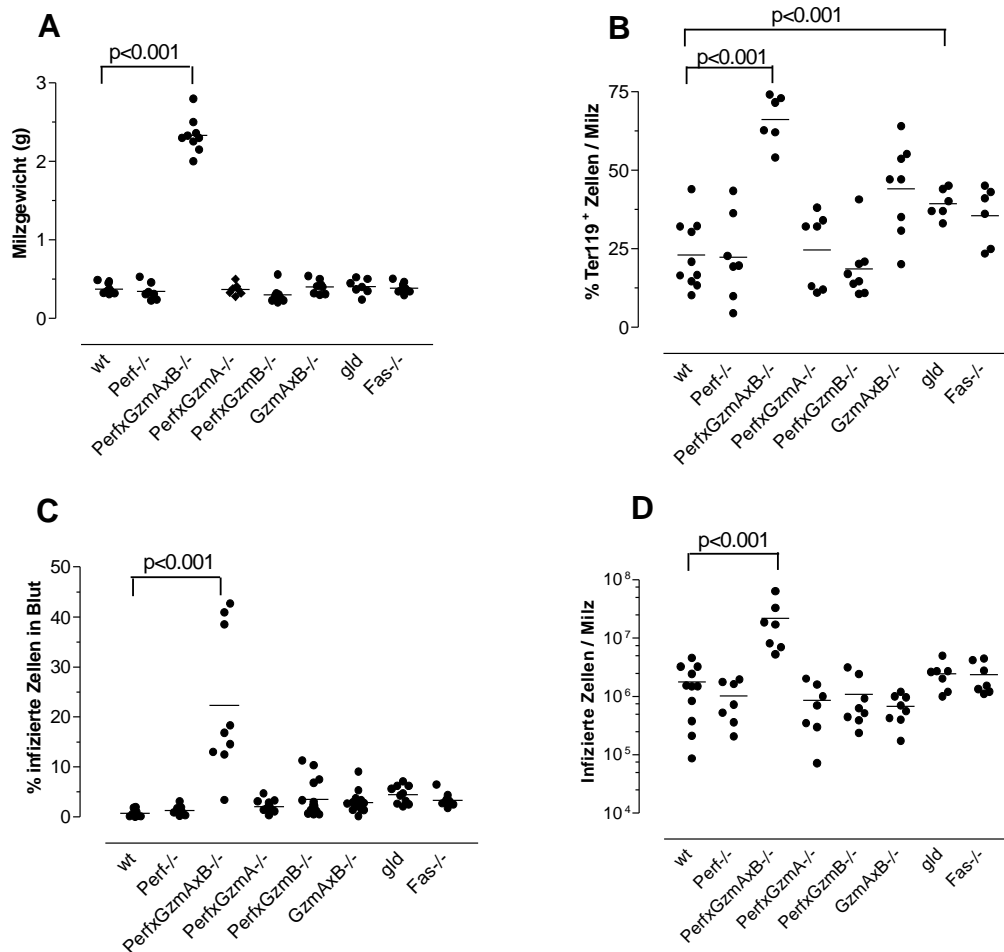
B6 Mäuse wurden mit 12500 SFFU FV infiziert und Milzzellen 10 Tage nach der Infektion gewonnen. Die Prozentzahl an  $D^b$ -GagL-Tetramer<sup>+</sup>/ $CD8^+$  T-Zellen wurde durchflußzytometrisch bestimmt. Im Mittel waren 2,5 % von  $CD8^+$  T-Zellen aus infizierten Mäusen  $D^b$ -GagL-Tetramer<sup>+</sup>. Keine Tetramer<sup>+</sup> Zellen wurden in uninfizierten Mäusen nachgewiesen. Jeder Punkt symbolisiert eine individuelle Maus und die Querstriche präsentieren die Mittelwerte. Der Unterschied zwischen den uninfizierten und den infizierten Mäusen war nach dem Mann-Whitney Test statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ).

#### 4.7 Verlauf der akuten Infektion in knockout Mäusen mit Defekten in zytotoxischen Funktionen

Um die Rolle von einzelnen zytotoxischen Molekülen bei der Kontrolle der FV Replikation zu untersuchen, wurden verschiedene Mausstämme mit Perforin ( $Perf^{-/-}$ ), Perforin-Granzym A ( $Perf \times GzmA^{-/-}$ ), Perforin-Granzym B ( $Perf \times GzmB^{-/-}$ ), Granzym A-Granzym B ( $GzmA \times B^{-/-}$ ), Perforin-Granzym A-Granzym B ( $Perf \times GzmA \times B^{-/-}$ ), Fas ( $Fas^{-/-}$ ) oder FasL (gld) Gen-Defekt verwendet. Wildtyp B6 Mäuse (wt) wurden als Kontrolle verwendet. Diese Tiere sind resistent gegen eine FV-induzierte Leukämie (Hasenkrug and Chesebro, 1997). 10 Tage nach einer FV Infektion wurden Milzen entnommen,



und die Milzgewichte bestimmt (Abbildung 4.7.A). Die 10 Tage infizierten wt und fast alle knockout Mäuse ( $\text{Perf}^{-/-}$ ,  $\text{Perf}\times\text{GzmA}^{-/-}$ ,  $\text{Perf}\times\text{GzmB}^{-/-}$ ,  $\text{GzmA}\times\text{B}^{-/-}$ ,  $\text{Fas}^{-/-}$ , und  $\text{gld}$ ) hatten eine leichte Splenomegalie, mit Milzgewichten zwischen 0,2 und 0,5g. Dagegen war das Milzgewicht in infizierten  $\text{Perf}\times\text{GzmA}\times\text{B}^{-/-}$  Mäusen mehr als sechsmal höher (Mittelwert 2,33g) als bei der infizierten Kontrollgruppe (Mittelwert 0,37g). Nur der Verlust aller zytotoxischer Moleküle ( $\text{Perf}\times\text{GzmA}\times\text{B}^{-/-}$ ), welche beim Exozytoseweg beteiligt sind, führten zu einer nicht kontrollierbaren Infektion. Als zweiter Parameter einer FV Infektion wurde der Prozentanteil der  $\text{Ter119}^+$  Erythroblastvorläuferzellen in der Milz untersucht. Die Prozentzahl an  $\text{Ter119}^+$  Zellen war bei den  $\text{Perf}\times\text{GzmA}\times\text{B}^{-/-}$  Mäusen signifikant höher als bei den Kontrollmäusen oder den anderen knockout Mäusen. Ein signifikanter Unterschied in der  $\text{Ter119}^+$  Zellzahl bestand auch zwischen infizierten Wildtyp und  $\text{gld}$  ( $\text{FasL}^{-/-}$ ) Mäusen. Die Anzahl der infizierten Zellen im Blut (Abb. 4.7.C) und in der Milz (Abb. 4.7.D) wurden als Beweise für die Virusvermehrung gemessen. Nur durchschnittlich 0,7% der Zellen im Blut waren bei den wt Mäusen infiziert. Dagegen wurden im Mittel 22,2% infizierte Blutzellen in den  $\text{Perf}\times\text{GzmA}\times\text{B}^{-/-}$  Mäusen gefunden. Einige andere „knockout“ Mäuse zeigten auch eine leicht erhöhte Viruslast im Blut, aber der Unterschied zu den wt Tieren war nicht signifikant. Ähnlich wie die Anzahl infizierter Zellen im Blut, war die Anzahl infizierter Zellen in der Milz 12,3-mal höher in den  $\text{Perf}\times\text{GzmA}\times\text{B}^{-/-}$  Mäusen als in den Kontrollen (Abb. 4.7.D). Dagegen hatten Mäuse mit einem Defekt in zwei der drei Moleküle des Exozytosewegs ( $\text{Perf}\times\text{GzmA}^{-/-}$ ,  $\text{Perf}\times\text{GzmB}^{-/-}$ ,  $\text{GzmA}\times\text{B}^{-/-}$ ), die gleiche Anzahl infizierter Zellen in der Milz, wie die infizierten wt Mäuse. Die Anzahl infizierter Milzzellen bei Mäusen mit einem Defekt in dem Fas/FasL-Weg war leicht erhöht, der Unterschied zu wt Tieren war aber nicht signifikant. Diese Ergebnisse zeigen, dass  $\text{CD8}^+$  T-Zellen in akut FV-infizierten Mäusen Virus-infizierte Zellen über den Exozytoseweg getötet haben. Bereits die Anwesenheit eines der Moleküle Perforin, Granzym A oder Granzym B reichte für die zytotoxische Kontrolle der retroviralen Infektion aus.



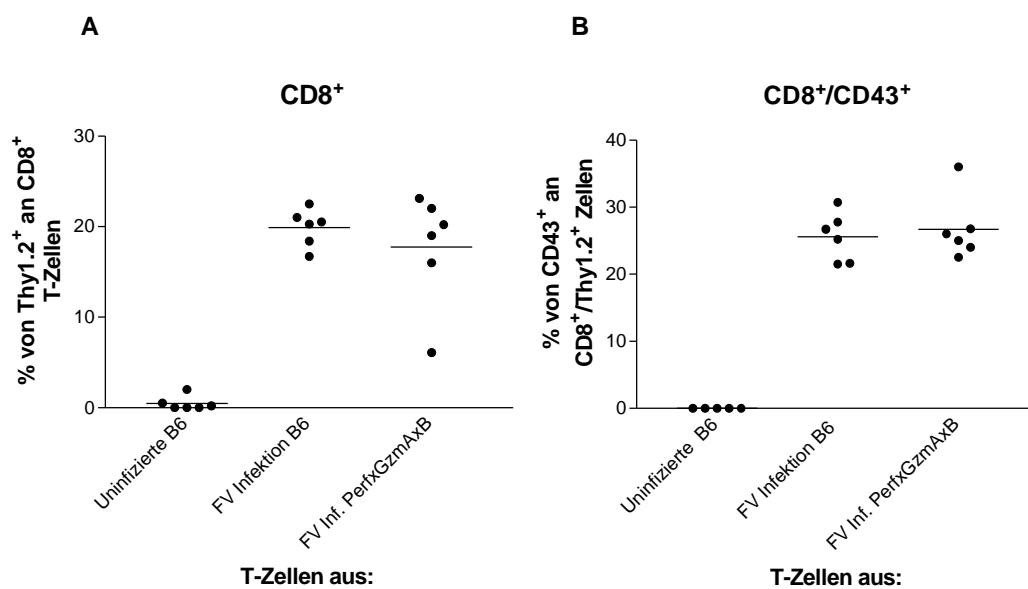
#### Abbildung 4.7 Vergleich der akuten FV Infektion in Perforin, Granzym A, Granzym B, Fas oder FasL defizienten Mäusen

B6 Mäuse und B6 knockout Mäuse, mit einem Defekt in verschiedenen zytotoxischen Molekülen (Perf<sup>-/-</sup>, Perf<sup>+/-</sup>GzmAxB<sup>-/-</sup>, Perf<sup>+/-</sup>GzmA<sup>-/-</sup>, Perf<sup>+/-</sup>GzmB<sup>-/-</sup>, GzmAxB<sup>-/-</sup>, Fas<sup>-/-</sup>, und gld), wurden mit 12500 SFFU FV infiziert. Die Mäuse wurden zehn Tage nach der Infektion getötet und Krankheitssymptome bzw. die Zahl infizierten Zellen analysiert. Die Ergebnisse von infizierten knockout Mäusen wurden mit den Ergebnissen von infizierten Wildtyp (wt) Mäusen verglichen. Als Beweise für die virusinduzierte Erkrankung wurden das Milzgewicht (A) und der Prozentanteil an Ter119<sup>+</sup> Erythroblastvorläuferzellen (B) gemessen. Die Zahlen der infizierten Zellen im Blut (C) und in der Milz (D) wurden bestimmt, um die Virusreplikation zu messen. Jeder Punkt symbolisiert eine individuelle Maus, die Querstriche geben Mittelwerte an.

Legende wt = Wildtyp B6 Mäuse, Perf<sup>-/-</sup> = Perforin knockout Maus, Perf<sup>+/-</sup>GzmAxB<sup>-/-</sup> = Perforin<sup>+</sup> Granzym A<sup>+</sup>Granzym B knockout Maus, Perf<sup>+/-</sup>GzmA<sup>-/-</sup> = Perforin<sup>+</sup> Granzym A knockout Maus, Perf<sup>+/-</sup>GzmB<sup>-/-</sup> = Perforin<sup>+</sup> Granzym B knockout Maus, GzmAxB<sup>-/-</sup> = Granzym A<sup>+</sup>Granzym B knockout Maus, Fas<sup>-/-</sup> = Fas-Rezeptor knockout Maus und gld = FasL knockout Maus.

Die nur leicht erhöhte Anzahl an FV infizierten Zellen in gld und Fas<sup>-/-</sup> Mäusen zeigt, dass der Fas/FasL-Weg in der akuten Infektion dagegen keine bedeutende Rolle bei der Kontrolle der Virusreplikation spielt.

Um zu zeigen, dass die Suszeptibilität der  $\text{Perf} \times \text{GzmA} \times \text{B}^{-/-}$  Mäusen an der fehlenden Funktion ihrer  $\text{CD8}^+$  T-Zellen liegt und nicht daran, dass solche Zellen nicht durch den Gendefekt generiert werden können, wurde die Population von Virus-spezifischen  $\text{CD8}^+$  T-Zellen aus  $\text{Perf} \times \text{GzmA} \times \text{B}^{-/-}$  Mäusen untersucht. Die Untersuchung wurde mit dem bereits beschriebenen Zelltransfer-Modell (s. „Methoden“ 3.1.10) durchgeführt. Transferierte  $\text{CD8}^+$  T-Zellen aus infizierten  $\text{Perf} \times \text{GzmA} \times \text{B}^{-/-}$  Mäusen proliferierten nach der FV Infektion genau so gut, wie  $\text{CD8}^+$  T-Zellen aus infizierten wt Mäusen (Abb. 4.8). Das Fehlen von Perforin, Granzym A und B hatte also keine Auswirkung auf die Proliferation oder Aktivierung der  $\text{CD8}^+$  T-Zellen.

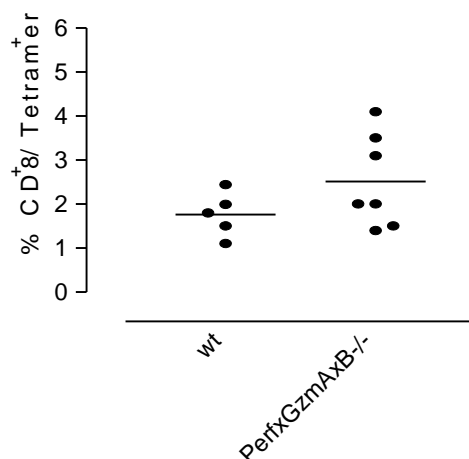


**Abbildung 4.8 Transfer von  $\text{CD8}^+$  T-Zellen aus Wildtyp-Mäusen und  $\text{Perf} \times \text{GzmA} \times \text{B}^{-/-}$  Mäusen**

$\text{B6}$ -Mäuse und  $\text{Perf} \times \text{GzmA} \times \text{B}^{-/-}$  Mäuse, die das T-Lymphozytenoberflächenmolekül Thy1.2 tragen, wurden mit FV (3000 SFFU) infiziert. 6 Tage nach der Infektion wurden die T-Lymphozyten isoliert und in Thy1.1-Mäuse transferiert (s. „Methoden“ 3.1.10). Die Empfängertiere wurden direkt nach dem Transfer mit 12500 SFFU FV infiziert. Thy1.2<sup>+</sup> Zellen von uninfizierten Mäusen dienten als Kontrolle. 10 Tage nach dem Transfer und der Infektion wurde die Anzahl der Spender  $\text{CD8}^+$ /Thy1.2<sup>+</sup> T-Zellen (A), und der Anteil  $\text{CD43}^+$  Zellen von den  $\text{CD8}^+$ /Thy1.2<sup>+</sup> T-Zellen (B) in der Milz der Empfänger-Mäuse durchflußzytometrisch bestimmt. Jeder Punkt symbolisiert eine individuelle Maus, die Querstriche geben die Mittelwerte an.

Ebenso wurden Virus-spezifische  $\text{CD8}^+$  T-Zellen in  $\text{Perf} \times \text{GzmA} \times \text{B}^{-/-}$  Mäusen mit Hilfe der Tetramer-Technik nachgewiesen (Abb. 4.9). Bei einigen infizierten  $\text{Perf} \times \text{GzmA} \times \text{B}^{-/-}$  Mäusen wurde im Vergleich zu infizierten wt Tieren sogar eine höhere Prozentzahl an  $\text{CD8}^+$ /Tetramer<sup>+</sup> T-Zellen entdeckt. Der Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant. Die Untersuchungen der  $\text{CD8}^+$  T-Zellen aus  $\text{Perf} \times \text{GzmA} \times \text{B}^{-/-}$  Mäusen

beweisen, dass diese Zellen keinen Defekt in der Antigen-spezifischen Aktivierung oder Proliferation, sondern nur in ihrer Funktion aufwiesen.



**Abbildung 4.9 Prozentzahl CD8<sup>+</sup>/Tetramer<sup>+</sup> T-Zellen in B6 und Perf<sup>x</sup>GzmA<sup>x</sup>B<sup>-/-</sup> Mäusen nach FV Infektion**

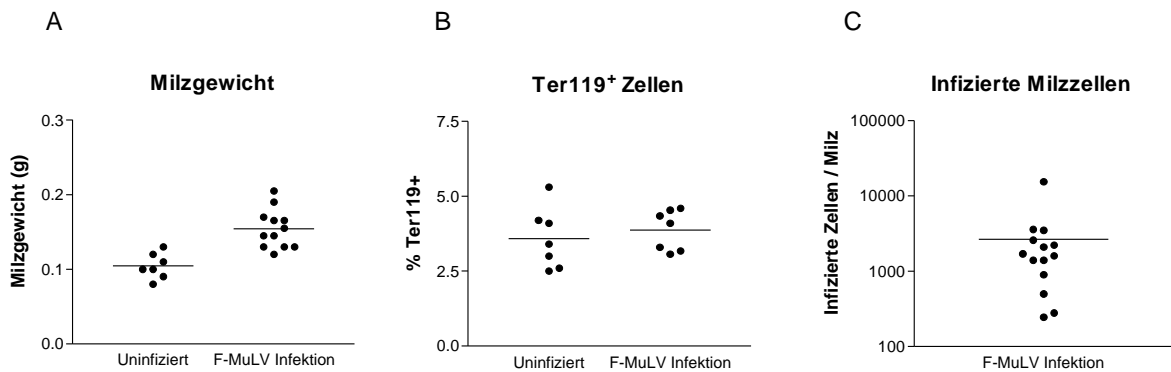
B6 Mäuse und Perf<sup>x</sup>GzmA<sup>x</sup>B<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mit FV (12500 SFFU) infiziert und die Milzzellen wurden 10 Tage nach der Infektion gewonnen. Der Prozentanteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die Tetramer<sup>+</sup> waren, wurde durchflußzytometrisch bestimmt. Jeder Punkt symbolisiert eine individuelle Maus, die Querstriche geben Mittelwerte der Gruppe an. 1,7% der CD8<sup>+</sup> T-Zellen von infizierten B6 und 2,5% von den infizierten Perf<sup>x</sup>GzmA<sup>x</sup>B<sup>-/-</sup> Mäusen waren Tetramer<sup>+</sup>. Der Unterschied zwischen den Gruppen war nicht signifikant.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die akute Infektion von B6 Mäusen mit FV Komplex über CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen kontrolliert wird. Dabei benutzten die Zellen hauptsächlich den Exozytoseweg um infizierte Zellen zu töten. Überraschender Weise war schon einer der drei am Exozytoseweg beteiligten zytotoxischen Moleküle Perforin, Granzym A oder Granzym B ausreichend, um die antivirale Funktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegen Retroviren zu gewährleisten.

Nachdem bestimmt werden konnte, welche Zellen und zytotoxischen Moleküle für die Kontrolle einer potentiell Tumor-induzierenden Retrovirusinfektion (FV Komplex) essentiell sind, sollte untersucht werden, ob auch eine apathogene Retrovirusinfektion über ähnliche Mechanismen kontrolliert wird. Die Infektion von adulten Mäusen mit dem F-MuLV Helfervirus führt zu keinen klinischen Symptomen und die Virusreplikation wird in allen Mausstämmen effizient supprimiert. Die zytotoxischen Mechanismen dieser Suppression sollten im Folgenden untersucht werden.

#### 4.8 Parameter einer F-MuLV Infektion

B6 Mäuse wurden mit F-MuLV infiziert und der Infektionsverlauf untersucht. 10 Tage nach der Infektion wiesen die Mäuse eine leichte Milzvergrößerung auf (Abb. 4.10.A), eine Proliferation von Ter119<sup>+</sup> Erythroblastvorläuferzellen konnte jedoch nicht gemessen werden (Abb. 4.10.B). In der Milz waren 10 Tage nach der Infektion 500-8000 infizierte Zellen nachweisbar.



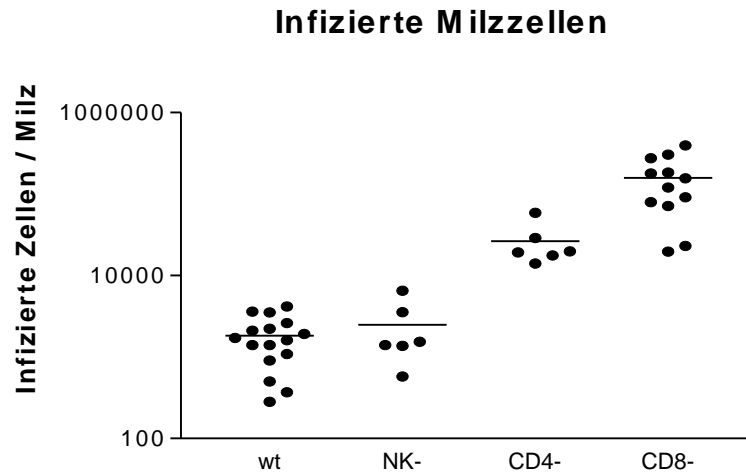
#### Abbildung 4.10 Milzgewicht, Prozentzahl von Erythroblastvorläuferzellen und Zahl der infizierten Milzzellen in F-MuLV-infizierten Mäusen

B6 Mäuse wurden mit 12500 FFU F-MuLV infiziert und Milzzellen 10 Tage nach der Infektion gewonnen. Das Milzgewicht (A), der Prozentanteil Ter119<sup>+</sup> Zellen (B) und die Zahl der infizierten Milzzellen (C) in der Milz wurden bestimmt. Als Kontrolle sind die Daten von naiven Mäusen dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert ein individuelles Tier. Die Querstriche geben jeweils die Mittelwerte der Gruppen an.

#### 4.9 Depletion von NK, CD4<sup>+</sup> T- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in F-MuLV-infizierten Mäusen

B6 Mäuse sind in der Lage die Replikation von F-MuLV effektiv zu kontrollieren. Um die Beteiligung von verschiedenen Populationen von Immunzellen (NK, CD4<sup>+</sup> T- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen) an der Kontrolle der akuten F-MuLV Infektion zu untersuchen, wurden diese Zellen mit Antikörpern depletiert (Abb. 4.11). Anschließend wurde die Viruslast in der Milz der infizierten depletierten Tiere mit den infizierten, nicht depletierten Tieren verglichen. Die Depletion von NK Zellen hatte keinen Einfluss auf die Virusreplikation in B6 Mäusen. Die Anzahl an infizierten Zellen in der Milz beim Wildtyp (Mittelwert = 1800 IC/Milz) und NK1.1-depletierten Mäusen (Mittelwert = 2400 IC/Milz) war statistisch nicht signifikant unterschiedlich. Der Verlust von CD4<sup>+</sup> T-Zellen führte dagegen zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl infizierter Zellen in der Milz (Mittelwert = 26300 IC/Milz). Noch mehr infizierte Zellen wurden nach der Depletion

von CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Mittelwert = 157700 IC/Milz) in der Milz nachgewiesen. Diese Ergebnisse zeigen, dass CD4<sup>+</sup> T- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Kontrolle der F-MuLV Replikation beteiligt waren. NK Zellen scheinen dagegen keine Rolle bei der Abwehr des Virus zu spielen.



**Abbildung 4.11 Die Zahl infizierter Milzzellen in F-MuLV infizierten Mäusen nach NK, CD4<sup>+</sup> T- oder CD8<sup>+</sup> T-Zell-Depletion**

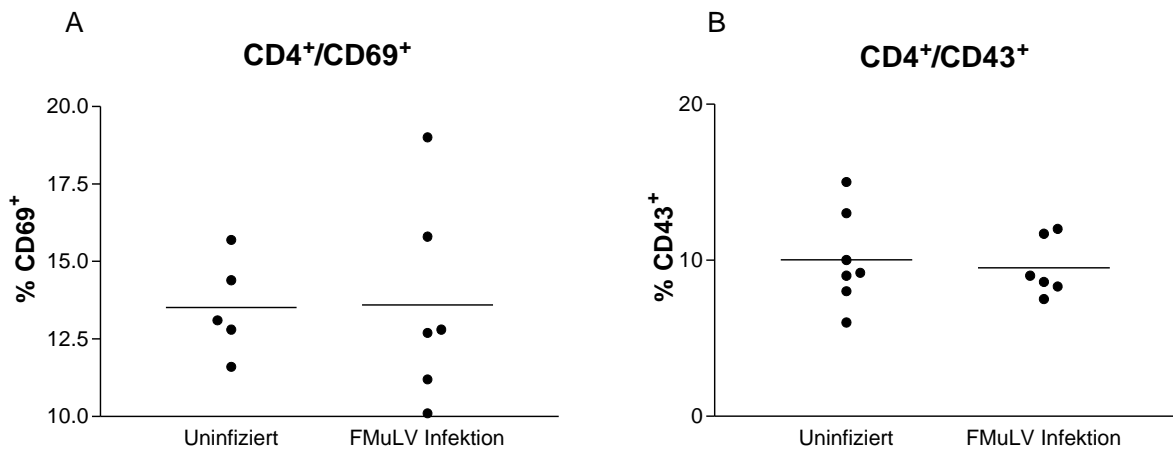
B6 Mäuse wurden mit 12500 FFU F-MuLV infiziert und mit Antikörpern gegen NK1.1<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> T- oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen behandelt. In der Kontrollgruppe wurde keine Depletion durchgeführt. Der Depletionserfolg wurde mittels Durchflußzytometrie bestätigt. 83% der NK1.1<sup>+</sup> Zellen, 89% der CD4<sup>+</sup> T-Zellen und 87% der CD8<sup>+</sup>T-Zellen waren 10 Tage nach der Infektion in der Milz depletiert. Dargestellt ist die Zahl der infizierten Zellen in der Milz 10 Tage nach der Infektion. Jeder Punkt symbolisiert ein individuelles Tier. Die Querstriche geben jeweils die Mittelwerte der Gruppen an. Die Unterschiede zwischen den wt und den CD4- sowie den wt und den CD8- Mäusen war nach dem Dunnett Test statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ).

Legende wt = undepletiert Kontrolle, NK- = NK1.1<sup>+</sup> Zell-Depletion, CD4- = CD4<sup>+</sup> T-Zell-Depletion, CD8- = CD8<sup>+</sup> T-Zell-Depletion.

#### 4.10 Phänotypische Charakterisierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus F-MuLV infizierten und uninfizierten Mäusen

Die Zellpopulationen, die an der Kontrolle der F-MuLV Replikation beteiligt waren, wurden durchflußzytometrisch untersucht. Aktivierte T-Zellen exprimieren auf der Zelloberfläche CD69. Der Prozentanteil von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, welche den Aktivierungsmarker CD69 exprimierten (Abb. 4.12.A), waren 10 Tage nach der Infektion mit F-MuLV genau so hoch (Mittelwert = 13.6%), wie bei uninfizierten Tieren (Mittelwert = 13.5%). Als Effektor-T-Zellmarker wurde außerdem CD43 Expression auf CD4 T-Zellen durchflußzytometrisch untersucht. Auch hier gab es keinen Unterschied zwischen uninfizierten (Mittelwert = 9,5%) und infizierten (Mittelwert = 10,1%) Mäusen (Abb. 4.12.B). Obwohl die Depletion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu einer höheren Viruslast in

den Mäusen führte, konnten keine Hinweise auf eine Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach F-MuLV Infektion gefunden werden. Die Rolle dieser Zellen bei der Virusabwehr gegen F-MuLV war daher nicht eindeutig aufzuklären.



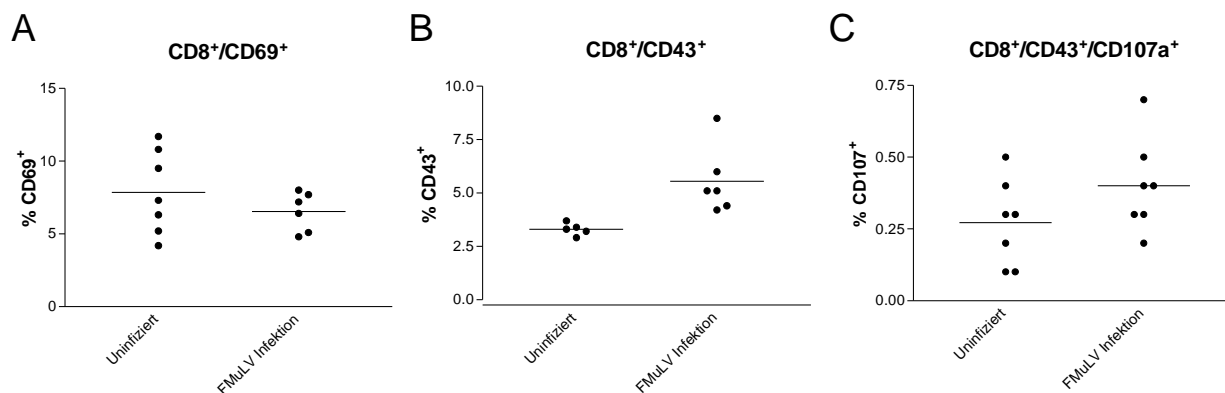
**Abbildung 4.12 Die phänotypische Charakterisierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus uninfizierten und F-MuLV infizierten B6 Mäusen**

B6 Mäuse wurden mit 12500 FFU F-MuLV infiziert und Milzzellen 10 Tage nach der Infektion gewonnen. Milzzellen von uninfizierten Mäusen wurden als Kontrolle verwendet. Der Prozentanteil an CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die den Aktivierungsmarker CD69 (A) und CD43 (B) exprimieren, wurde durchflußzytometrisch bestimmt (s. „Methoden“ 3.10.1). Jeder Punkt symbolisiert eine individuelle Maus. Die Querstriche geben jeweils die Mittelwerte der Gruppen an.

#### 4.11 Phänotypische Charakterisierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus F-MuLV infizierten Mäusen

Um zu beweisen, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der akuten F-MuLV Infektion aktiviert werden, wurde der Phänotyp von dieser Zellen durchflußzytometrisch analysiert. Der prozentuelle Anteil von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die den früheren Aktivierungsmarker CD69 exprimierten, war bei infizierten Mäusen genau so hoch (Mittelwert = 7,8%) wie bei uninfizierten (Mittelwert = 6,5%) (Abb. 4.13.A). Dagegen wiesen F-MuLV infizierte Mäuse signifikant mehr CD8<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup> Effektor T-Zellen (Mittelwert = 5,5%) in der Milz auf als uninfizierte Tiere (Mittelwert = 3,2%) (Abb. 4.13.B). CD107a Moleküle erscheinen auf der Zelloberfläche von Effektor T-Zellen nach der Degranulierung. Um die zytotoxische Funktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu analysieren, wurde untersucht, ob Effektor CD8<sup>+</sup> T-Zellen CD107a exprimierten. Die F-MuLV infizierten Mäuse hatten den gleichen prozentualen Anteil an CD107a<sup>+</sup> von CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Mittelwert = 0,4%) wie die Kontrolltiere (Mittelwert = 0,3%) (Abb. 4.13.C). Das apathogene F-MuLV infiziert weniger Milzzellen, deswegen aktiviert es weniger CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zum pathogenen FV-Komplex. Aufgrund der fehlenden CD107a Expression kann

vermutet werden, dass die Funktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei der Kontrolle der F-MuLV Replikation nicht vom Exozytoseweg abhängig war.



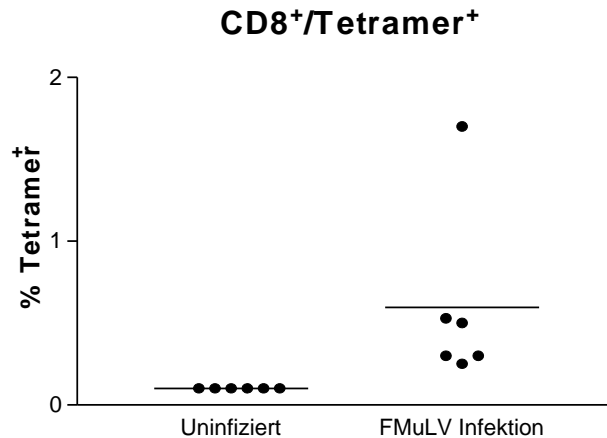
#### Abbildung 4.13 Die phänotypische Charakterisierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus F-MuLV infizierten B6 Mäusen

B6 Mäuse wurden mit 12500 FFU F-MuLV infiziert und die Milzzellen 10 Tage nach der Infektion gewonnen. Milzzellen von uninfizierten Mäusen wurden als Kontrolle verwendet. Der Prozentanteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die die Aktivierungsmarker CD69 (A), CD43 (B) oder CD107a (C) exprimierten, wurde durchflußzytometrisch bestimmt. Außerdem wurde die Prozentzahl an Effektor CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt die zytotoxische Moleküle sezernierten. Jeder Punkt symbolisiert eine individuelle Maus. Die Querstriche geben jeweils die Mittelwerte der Gruppen an.

#### 4.12 Nachweis von Virus-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in F-MuLV infizierten Mäusen

Als nächster Schritt wurde durchflußzytometrisch untersucht, ob die F-MuLV Infektion Virus-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen induzierte. Dafür wurden Milzzellen aus infizierten und uninfizierten Mäusen mit CD8 Antikörpern und D<sup>b</sup>-GagL-MHC I Tetrameren markiert, und im Durchflußzytometer analysiert (Abb. 4.14). Es konnte reproduzierbar ein geringer Prozentsatz Virus-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in infizierten Tieren nachgewiesen werden (Mittelwert = 0,59% der CD8<sup>+</sup> T-Zellen). Der Nachweis von Tetramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigte zusätzlich, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Kontrolle des F-MuLV beteiligt sind.



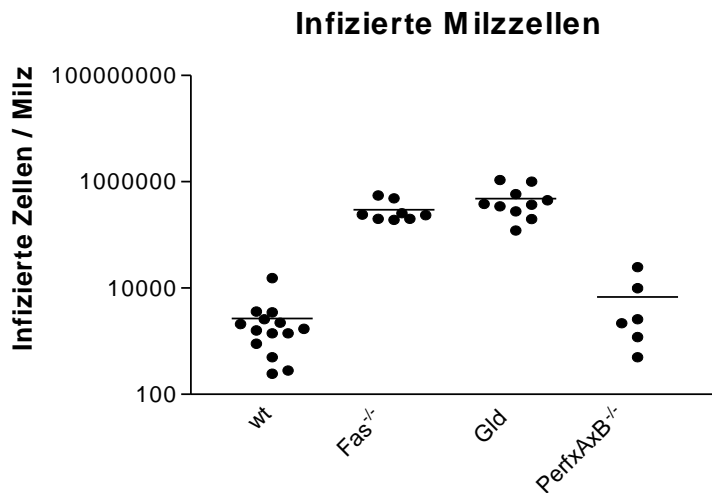


**Abbildung 4.14 Nachweis F-MuLV-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in F-MuLV infizierten Mäusen**

Die B6 Mäuse wurden mit 12500 FFU F-MuLV infiziert, die Milzzellen wurden 10 Tage nach Infektion gewonnen und mit CD8 Antikörpern und Klasse I Tetrameren markiert. Um tote Zellen auszuschließen, wurde der Farbstoff ToPro verwendet. Der Prozentanteil der lebenden Tetramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist dargestellt. Jeder Punkt symbolisiert eine individuelle Maus. Die Querstriche geben jeweils die Mittelwerte der Gruppen an. Der Unterschied zwischen den uninfizierten und den infizierten Mäusen war nach dem Mann-Whitney Test statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ).

**4.13 Verlauf der F-MuLV Infektion in knockout Mäusen, die Defekte in zytotoxischen Funktionen aufweisen**

Da CD8<sup>+</sup> T-Zellen als wichtige Effektorzellen in der F-MuLV Infektion identifiziert werden konnten, stellte sich die Frage, welche zytotoxischen Mechanismen diese Zellen für die Kontrolle der F-MuLV Replikation verwenden. Die Verwendung von „knockout“ Mausstämmen ist für die Beantwortung dieser Fragen optimal geeignet. Die Mausstämme mit einem Defekt in Fas, FasL (gld), oder mit einem Defekt der drei Moleküle (Perf $\times$ GzmA $\times$ B<sup>-/-</sup>) des Exozytosewegs, wurden mit F-MuLV infiziert. Die Zahl infizierter Zellen in der Milz wurde 10 Tage nach der Infektion untersucht (Abb. 4.15). Die Fas<sup>-/-</sup> (Mittelwert = 296000 IC/Milz) und die gld (Mittelwert = 480000 IC) Mäuse hatten eine mehr als 100-mal höhere Viruslast als die Wildtypmäuse (Mittelwert = 2675 IC/Milz). Dagegen kontrollierten die Mäuse mit den fehlenden Molekülen des Exozytoseweg das Virus genau so gut wie die B6 Mäuse (Mittelwert = 6828 IC/Milz). Diese Ergebnisse zeigen, dass die immunologische Kontrolle der apathogenen F-MuLV Infektion nicht wie die Infektion mit den pathogenen FV Komplex über den Exozytoseweg, sondern über die FasL/Fas-vermittelte Apoptose läuft.

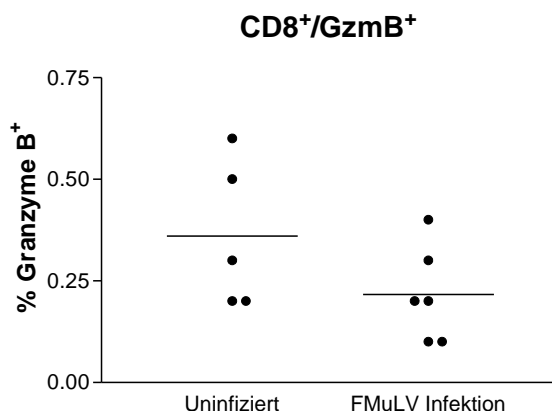


**Abbildung 4.15 Die Anzahl der F-MuLV infizierten Zellen in der Milz**

B6, Fas<sup>-/-</sup>, gld (FasL Mutation) und PerfxGzmAxB<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mit F-MuLV infiziert und Milzzellen 10 Tage nach der Infektion gewonnen. Die Zahl der infizierten Zellen wurde untersucht. Jeder Punkt repräsentiert das Ergebnis einer individuellen Maus. Die Querstriche geben die Mittelwerte der Gruppen an. Die Unterschiede zwischen den wt und den Fas<sup>-/-</sup> sowie den wt und den gld Mäusen war nach dem Dunnett Test statistisch signifikant (p<0,01). Legende wt = Wildtyp B6 Mäuse, Fas<sup>-/-</sup> = Fas-Rezeptor knockout Maus, gld = Fas Ligand knockout Maus, PerfxGzmAxB<sup>-/-</sup> = Perforin<sup>+</sup> Granzyme A<sup>+</sup>Granzyme B knockout Maus.

#### 4.14 Nachweis von Granzym B in CD8<sup>+</sup> Effektorzellen

Die Ergebnisse der F-MuLV Infektion von knockout Mäusen legten nahe, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen in diesen Mäusen keine zytotoxischen Moleküle produzierten oder sezernierten. Um dies experimentell zu zeigen, wurde eine intrazelluläre Granzym B Färbung in CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Mäusen nach F-MuLV Infektion durchgeführt. Wie erwartet (Abb. 4.16), exprimierten die CD8<sup>+</sup> T-Zellen von F-MuLV infizierten B6 Mäusen kein Granzym B. Diese Ergebnisse beweisen zusätzlich, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen für die Kontrolle der F-MuLV Infektion keine zytotoxischen Moleküle des Exozytosewegs benötigen.



**Abbildung 4.16 Nachweis von Granzym B in CD8<sup>+</sup> T-Zellen von F-MuLV infizierten Mäusen**

B6 Mäuse wurden mit 12500FFU F-MuLV infiziert und Milzzellen 10 Tage nach der Infektion gewonnen. Granzym B wurde mittels intrazellulärer Durchflußzytometrie gemessen (s „Methoden“ 3.9.2). Gezeigt ist der prozentuale Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in denen Granzym B nachgewiesen werden konnte. Jeder Punkt repräsentiert das Ergebnis einer individuellen Maus. Die Querstriche geben jeweils die Mittelwerte der Gruppen an.

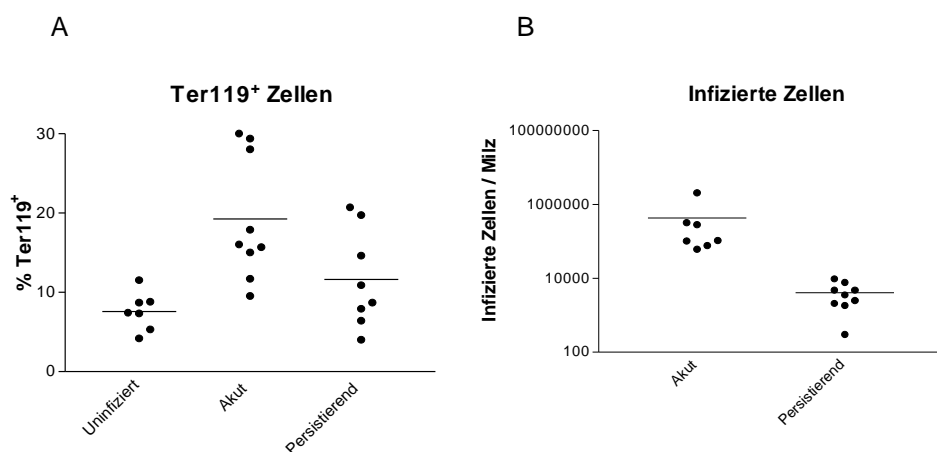
Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus akut F-MuLV infizierten Mäusen, dass diese Zellpopulation eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle einer apathogenen Retrovirusinfektion spielt. Im Gegensatz zu einer Infektion mit dem pathogenen FV vermittelten CD8<sup>+</sup> T-Zellen ihre antivirale Funktion aber nicht über den Exozytoseweg sondern über den Fas/FasL-Weg.

Es wurde gezeigt, dass der Exozytoseweg von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der akuten Phase der FV Infektion für die Kontrolle der Virusreplikation notwendig war. Frühere Arbeiten haben aber gezeigt, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen ihre antivirale Aktivität während einer chronischen FV Infektion verlieren (Hasenkrug *et al.*, 1998). In diesem Teil der Arbeit sollte der Funktionsverlust von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, besonders in Hinblick auf zytotoxische Funktion, detailliert charakterisiert werden.

**4.15 Vergleich des Krankheitsverlaufs und der Viruslast in der akuten und persistierenden FV Infektion**

Um die CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort in der akuten und persistierenden FV Infektion vergleichen zu können, musste zuerst der Infektionsverlauf untersucht werden. Die Y10 Mäuse wiesen in der akuten Infektion eine signifikant höhere Prozentzahl an Ter119<sup>+</sup>

Erythroblastenvorläuferzellen (Abb. 4.17.A), den Zielzellen des FV, auf als in der persistierenden Infektion. Auch die Viruslast in der Milz (Abb. 4.17.B) war in der akuten Phase signifikant erhöht. Allerdings konnte in allen Tieren 6 Wochen nach FV Infektion replizierendes Virus nachgewiesen werden, so dass von einer ständigen Stimulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch virales Antigen in der chronischen Infektion ausgegangen werden kann.



#### Abbildung 4.17 Infektionsverlauf in akut und persistierend FV-infizierten Y10 Mäusen

Die Y10 Mäuse wurden mit 1500 SFFU FV infiziert. Die Milzzellen wurden 14 Tage (akut) oder 6 Wochen nach der Infektion (persistierend) gewonnen, die Prozentzahl der Ter119<sup>+</sup> Zellen und die Anzahl der infektiösen Zellen in der Milz bestimmt. Milzzellen von uninfizierten Y10 Mäusen wurden als Kontrolle verwendet. Jeder Punkt repräsentiert ein individuelles Tier. Die Querstriche geben jeweils die Mittelwerte der Gruppen an.

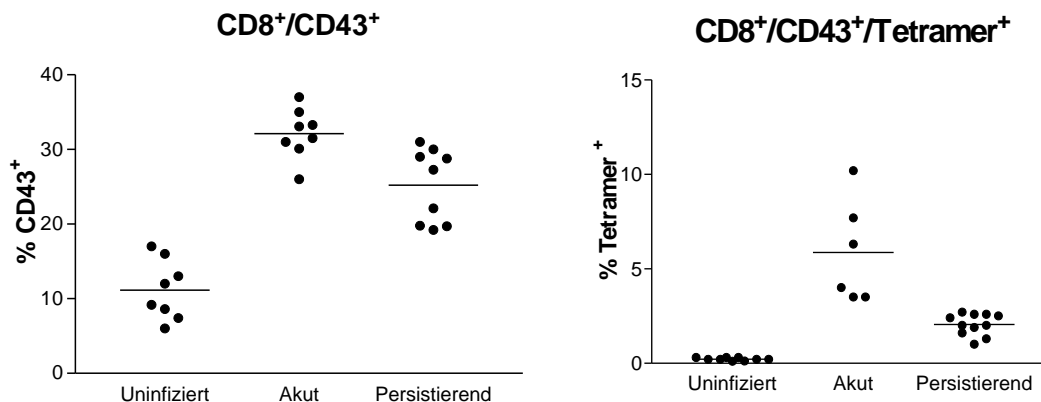
A. Die Prozentzahl der lebenden kernhaltigen Zellen in der Milz, die Ter119 auf der Zelloberfläche exprimierten, wurde mittels Durchflußzytometer bestimmt. Der Unterschied zwischen den Gruppen der akut und persistierend infizierten Tieren war nach dem Mann-Whitney Test statistisch signifikant ( $p=0,046$ ).

B. Die Anzahl an infektiösen Zellen pro Milz wurde im IC-Test bestimmt. Der Unterschied zwischen den Gruppen war nach dem Mann-Whitney-Test statistisch signifikant ( $p<0,001$ ).

#### 4.16 Bestimmung der aktivierten, Virus-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in akut und persistierend infizierten Mäusen

Um die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort in der akuten und persistierenden Phase einer FV Infektion zu analysieren, wurde zuerst der Anteil an aktivierten Effektorzellen in den beiden Phasen der Infektion untersucht (Abb. 4.18.A). CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Effektorfunktion exprimieren CD43 Moleküle. Die Prozentzahl an CD8<sup>+</sup> T-Zellen, welche einen Effektorphenotyp in der akuten (Mittelwert = 32,1% von CD8<sup>+</sup> T-Zellen) und persistierenden (Mittelwert = 25,1% von CD8<sup>+</sup> T-Zellen) Phase der FV Infektion hatten, war signifikant höher als bei uninfizierten Tieren (Mittelwert = 11,2% von CD8<sup>+</sup> T-Zellen). Die akut und persistierend infizierten Mäuse hatten eine vergleichbare Anzahl

Effektor  $CD8^+$  T-Zellen in der Milz. Um zu zeigen, welcher Anteil der  $CD8^+$  T-Zellen Virus-spezifisch war, wurde die Prozentzahl Tetramer $^+$ / $CD8^+$  T-Zellen in beiden Phasen der Infektion bestimmt (Abb. 4.18.B). Der Mittelwert an Tetramer $^+$ / $CD8^+$  T-Zellen war in der Gruppe der akut infizierten Mäuse 5,8% und 2% in der Gruppe der persistierend infizierten Tiere. Die statistische Analyse zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die höhere Anzahl an Virus-spezifischen  $CD8^+$  T-Zellen in der akuten Infektion war vermutlich mit der höheren Viruslast und der damit verbundenen stärkeren Stimulation durch virale Antigene assoziiert. Die Daten beweisen jedoch, dass Virus-Antigene in der persistierenden Infektion die Proliferation von spezifischen  $CD8^+$  T-Zellen stimulierten. Trotz dieser Virus-spezifischen  $CD8^+$ /Tetramer $^+$  T-Zellen, könnten die Mäuse das persistierende Virus aber nicht eliminieren.



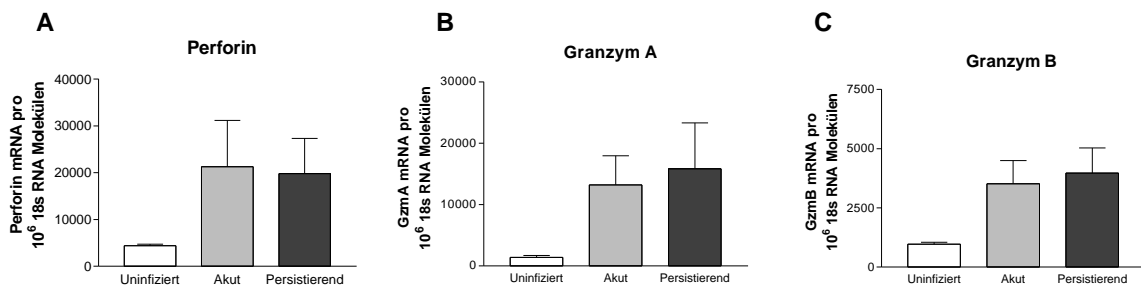
**Abbildung 4.18 Aktivierte, Virus-spezifische  $CD8^+$  Zellen in akut und persistierend infizierten Mäusen**

Y10 Mäuse wurden mit 1500 SFFU FV infiziert und Milzzellen wurden 14 Tage (akut) oder 6 Wochen (persistierend) nach der Infektion gewonnen. Die Milzzellen von uninfizierten Y10 Mäusen wurden zur Kontrolle verwendet. Die Prozentanzahl an  $CD43^+$  (A) oder  $D^b$ -GagL-Tetramer $^+$  (B) der  $CD8^+$  T-Zellen wurde durchflußzytometrisch bestimmt. Jeder Punkt symbolisiert eine individuelle Maus. Die Querstriche geben die Mittelwerte in der Gruppe an. Der Unterschied zwischen akuten und persistierend infizierten Tieren war für aktivierte und virus-spezifische  $CD8^+$  T-Zellen nach dem Mann-Whitney Test statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ).

#### 4.17 Quantifizierung von mRNA für zytotoxische Moleküle in $CD8^+$ T-Zellen

Um die Funktion von  $CD8^+$  T-Zellen in akuter und persistierender FV Infektion zu untersuchen, wurde zuerst der Level an mRNA für zytotoxische Moleküle in  $CD8^+$  T-Zellen bestimmt. In erster Linie interessierten uns die zytotoxischen Moleküle Perforin, Granzym A und B. Es wurden  $CD8^+$  T-Zellen aus der Milz von uninfizierten und

infizierten Mäusen separiert, die mRNA aus den Zellen isoliert und eine reverse Transkription durchgeführt (3.10.5). Die Menge an cDNA für Perforin (Abb. 3.19.A), Granzym A (Abb. 3.19.B) und Granzym B (Abb. 4.19.C) wurden relativ zum „housekeeping gene“ 18sRNA in der Echt-Zeit PCR quantifiziert. CD8<sup>+</sup> T-Zellen von infizierten Mäusen produzierten mehr mRNA für die Effektormoleküle, als CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus uninfizierten Mäusen. Die Menge an mRNA, die für zytotoxische Moleküle kodierten, unterschied sich aber nicht in CD8<sup>+</sup> T-Zellen von akut und persistierend infizierten Mäusen. Die Ergebnisse zeigten, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen von Mäusen nach FV Infektion die Gene für Perforin, Granzym A und Granzym B transkribierten. Dies wurde sowohl für die akute als auch persistierende Infektion nachgewiesen. Allerdings wurde für alle drei untersuchten Moleküle kein signifikanter Unterschied in dem mRNA-Leveln zwischen akut und persistierend FV-infizierten Tieren gefunden. Die Transkription von Genen des Exozytosewegs korrelierte also nicht mit dem Funktionsverlust von CD8<sup>+</sup> T-Zellen während der persistierenden FV Infektion.



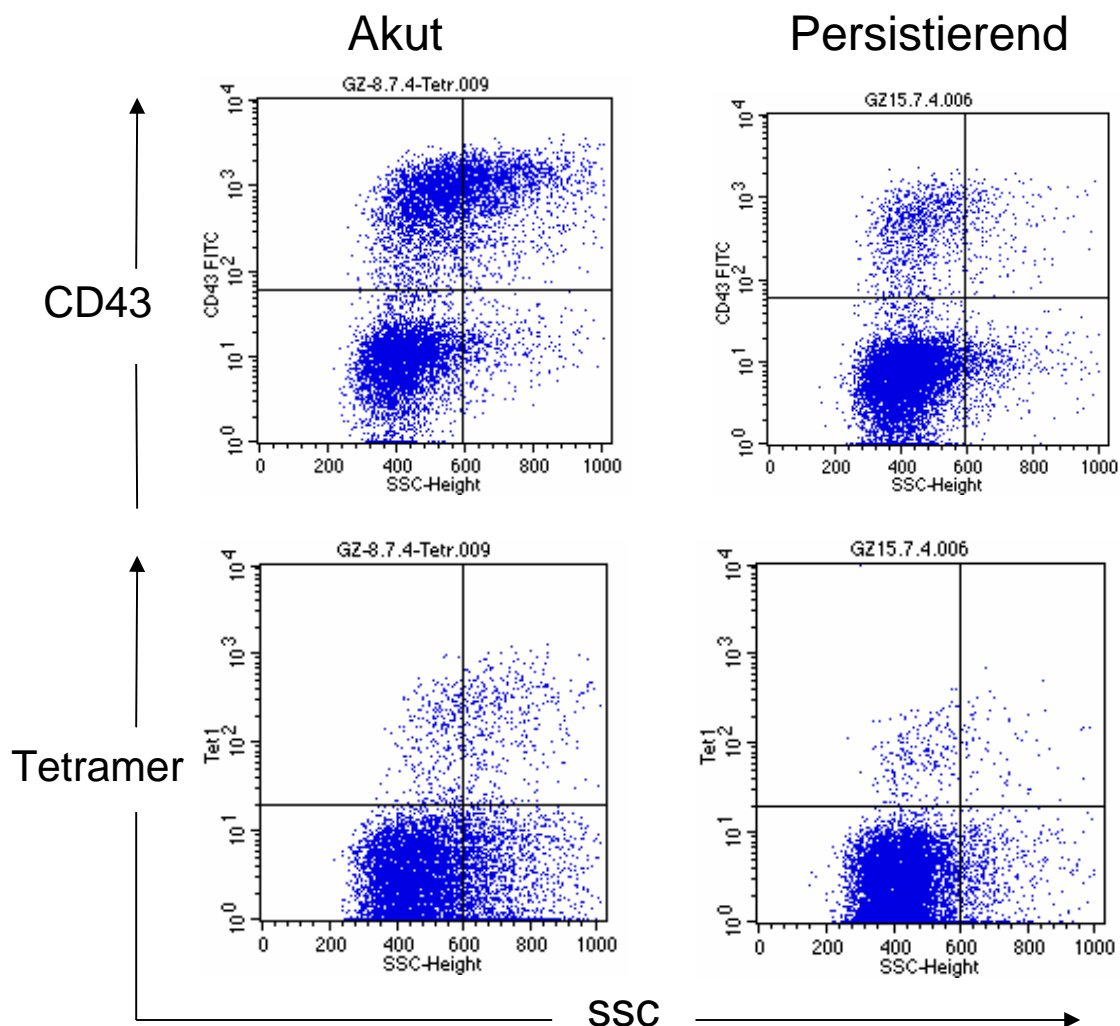
#### Abbildung 4.19 Quantifizierung von mRNA für Perforin, Granzym A und Granzym B in CD8<sup>+</sup> T-Zellen von akut und persistierend infizierten Mäusen

Y10 Mäuse wurden mit 1500 SFFU FV infiziert und Milzzellen 14 Tage (akut) oder 6 Wochen (persistierend) nach der Infektion gewonnen. Milzzellen von uninfizierten Y10 Mäusen wurden zur Kontrolle verwendet. CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit Magnet-Beads isoliert. Die separierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen hatten eine Reinheit von mehr als 95%. mRNA wurde aus 5x10<sup>5</sup> separierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen isoliert und eine RT-Reaktion durchgeführt. Die cDNA wurde in einer Echt-Zeit PCR-Reaktion mit Primern für Perforin (A), Granzym A (B) und Granzym B (C) amplifiziert und die Quantität der Moleküle relativ zum „housekeeping gene“ 18s RNA berechnet. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte mit Standardabweichungen von fünf Tieren pro Gruppe.

#### 4.18 Granularität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus akut und persistierend infizierten Mäusen

Die Reifung von CD8<sup>+</sup> Effektorzellen ist assoziiert mit dem Auftreten von Granula mit zytotoxischen Molekülen im Zytoplasma. Die Anwesenheit der Granula ist ein Beweis dafür, dass die CD8<sup>+</sup> T-Zellen zytotoxische Funktionen ausüben können. Daher wurde die Granularität von CD8<sup>+</sup> T-Effektor-Zellen (CD43<sup>+</sup>) und Virus-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-

Zellen während der akuten und persistierenden FV Infektion im Durchflußzytometer verglichen. Granuläre Zellen haben einen höheren Fluoreszenzwert in der „side light scatter“ (SSC) Skala als agranuläre. Abbildung 4.20 zeigt repräsentative durchflußzytometrische Bilder von  $CD8^+$  T-Zellen aus akut- und persistierend infizierten Y10 Mäusen.  $CD8^+/CD43^+$  T-Effektorzellen (Mittelwert der Fluoreszenzintensität (MFI) = 589) ebenso wie Virus-spezifische  $CD8^+/Tetramer^+$  T-Zellen (MFI = 699) haben in der akuten Infektion Granula in ihrem Zytoplasma. Dagegen sind diese Zellpopulationen in der persistierenden Infektion agranulär (MFI  $CD8^+CD43^+$  T-Zellen = 507, MFI  $CD8^+/Tetramer^+$  T-Zellen = 576). Die Daten deuten auf eine fehlende Produktion von zytotoxischen Molekülen in  $CD8^+$  T-Zellen in der persistierenden FV Infektion hin.



**Abbildung 4.20 Granularität von  $CD8^+/CD43^+$  und  $CD8^+/Tetramer^+$  T-Zellen aus akut und persistierend FV-infizierten Mäusen**

Y10 Mäuse wurden mit 1500 SFFU FV infiziert und Milzzellen 14 Tage (akut) oder 6 Wochen (persistierend) nach der Infektion gewonnen. Die Markierung der Milzzellen wurde mit CD8, CD43 Antikörpern und D<sup>b</sup>-GagL-Tetrameren durchgeführt und „gegatete“  $CD8^+$  T-Zellen wurden analysiert. Die Granularität der  $CD8^+/CD43^+$  und  $CD8^+/Tetramer^+$  T-Zellen wurde in

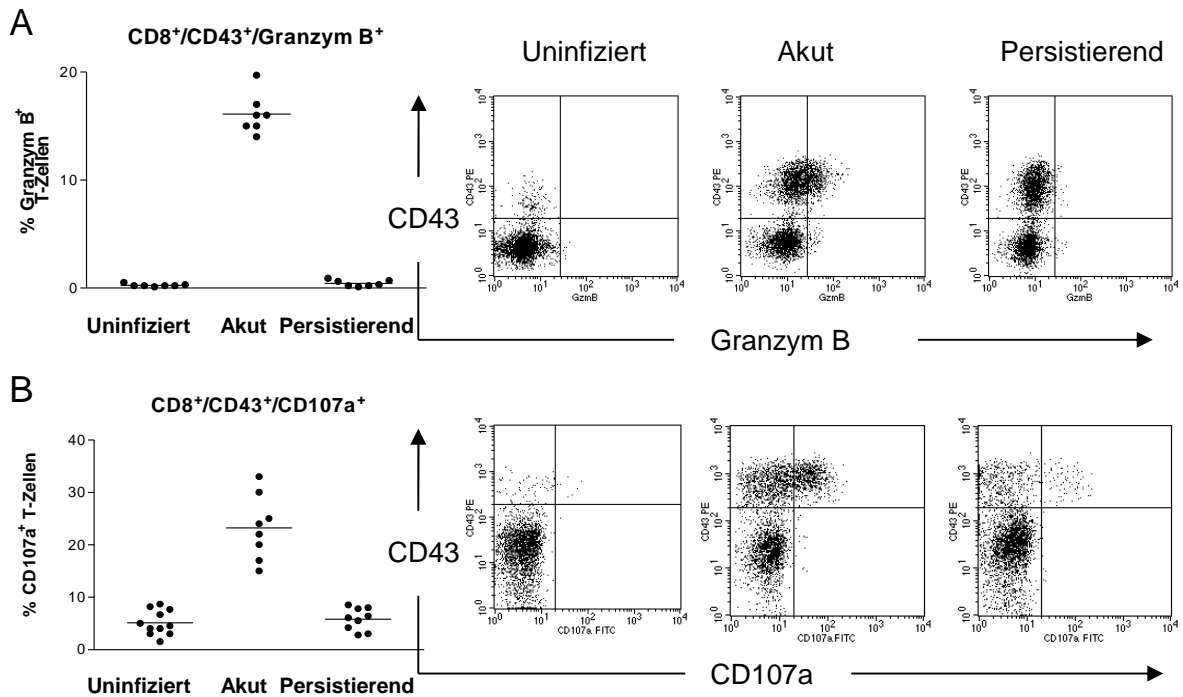
der „side light scatter“ (SSC) Skala durchflußzytometrisch bestimmt. Repräsentative durchflußzytometrische Bilder von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus akut und persistierend infizierten Mäusen sind dargestellt.

#### **4.19 Nachweis von Granzym B und Degranulierung in aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus akut und persistierend infizierten Mäusen**

Obwohl CD8<sup>+</sup> T-Zellen von akut und persistierend infizierten Mäusen gleiche Mengen an mRNA für die zytotoxischen Moleküle Perforin, Granzym A und Granzym B transkribierten, hatten nur die CD8<sup>+</sup> T-Zellen von akut infizierten Mäusen Granula im Zytoplasma. Daher wurde untersucht, ob zytotoxische Proteine in den CD8<sup>+</sup> T-Zellen produziert und sekretiert wurden. Da es nur für Granzym B spezifische Antikörper gibt, konnte nur dieses Protein untersucht werden (Abb. 4.21.A). Es wurde eine intrazelluläre Markierung für Granzym B in CD8<sup>+</sup> T-Zellen durchgeführt. Abbildung 4.21.A (linke Seite) zeigt den Prozentanteil an CD8<sup>+</sup> T Zellen, welche Granzym B produzieren. Nur CD8<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup> Effektorzellen aus akut infizierten Mäusen produzieren Granzym B. Obwohl CD8<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup> Effektorzellen in persistierend infizierten Mäusen nachweisbar waren, produzierten diese Zellen kein Granzym B. In der rechten Abbildung ist dieses Ergebnis für eine repräsentative Maus aus allen drei Gruppen in der durchflußzytometrischen Abbildung dargestellt. Dieser Befund korrelierte mit der fehlenden Granula in CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus persistierend infizierten Mäusen.

Des Weiteren wurde der Prozentanteil an sekretierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Hilfe des Degranulierungsmarkers CD107a mittels Durchflußzytometrie bestimmt (s. „Methoden“ 3.9.1). CD8<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup> Effektorzellen (Abb. 4.21.B) von akut infizierten Mäusen exprimierten CD107a Moleküle auf ihrer Oberfläche (Mittelwert = 23,3%). CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus persistierend infizierten Mäusen exprimierten auch den Effektormarker CD43, waren jedoch fast negativ für CD107a (Mittelwert = 5,8%). Das Vorhandensein von CD107a auf der Zelloberfläche von CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigt, dass diese Zellen zytotoxische Moleküle sezerniert haben. Die Ergebnisse beweisen, dass die aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus persistierend infizierten Mäusen ihre zytotoxische Funktion über den Exozytoseweg nicht ausüben konnten.





#### Abbildung 4.21 Produktion und Sekretion von zytotoxischen Molekülen in CD8<sup>+</sup> T Zellen aus akut und persistierend infizierten Mäusen

Y10 Mäuse wurden mit 1500 SFFU FV infiziert und Milzzellen 14 Tage (akut) oder 6 Wochen (persistierend) nach der Infektion gewonnen. Milzzellen von uninfizierten Y10 Mäusen wurden als Kontrolle verwendet. Der Prozentanteil von CD8<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup> T-Zellen, die Granzym B und CD107a exprimierten, wurde durchflußzytometrisch bestimmt (s. „Methoden“ 3.9.1, 3.9.2).

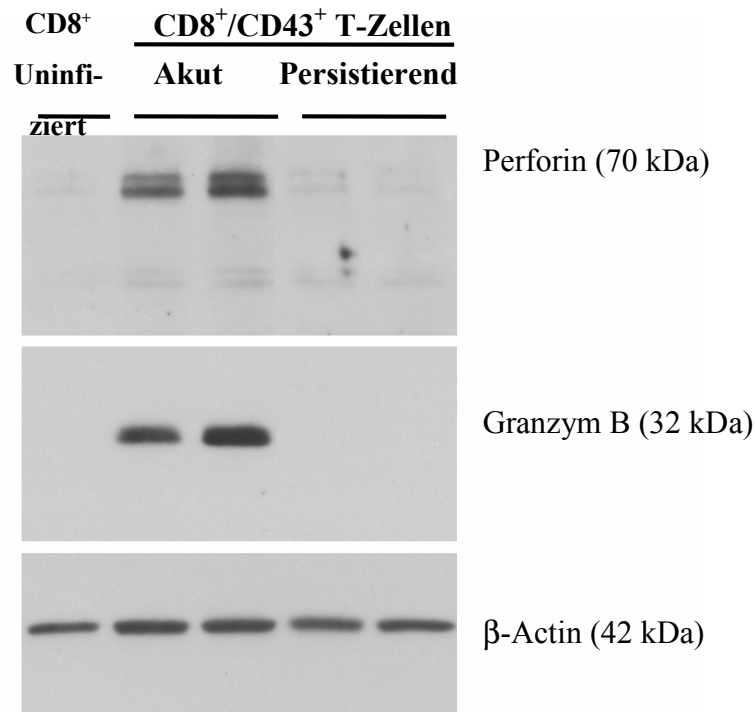
**A. Prozentanteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die Granzym B produzierten (links)** Der Unterschied zwischen den akut und persistierend infizierten Mäusen war statistisch signifikant ( $p < 0.0001$ , ungepaarter T-Test). Auf der rechten Seite sind repräsentative Tiere für die Gruppen der uninfizierten Mäuse (Mittelwert der Fluoreszenzintensität (MFI) = 7,45), der akut infizierten Mäuse (MFI = 21,78) und der persistierend infizierten Mäuse (MFI = 9,08) dargestellt.

**B. Prozentanteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die CD107a exprimierten (links)** Der Unterschied zwischen den Gruppen der akut und persistierend infizierten Mäuse war statistisch signifikant ( $p < 0.0001$ , ungepaarter T-Test). Die rechte Abbildung zeigt repräsentative Tiere für die Gruppen der naiven, akut und persistierend infizierten Mäuse.

#### 4.20 Produktion von Perforin und Granzym B in aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus akuten und persistierend infizierten Mäusen

Die Produktion der zytotoxischen Moleküle Perforin und Granzym B wurde auch im „Westernblot“ bestimmt. Aktivierte CD8<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup> T-Zellen von akut und persistierend infizierten Mäusen wurden mit Hilfe eines „Cellsorters“ isoliert und die zellulären Proteine in der Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurden Perforin und Granzym B mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. CD8<sup>+</sup> T-Zellen von uninfizierten Mäusen wurden als Kontrolle verwendet. CD8<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup> T-Zellen von akut infizierten Mäusen produzierten Perforin und Granzym B (Abb. 4.22). Dagegen konnten diese beiden zytotoxischen Proteine in aktivierten (CD43<sup>+</sup>) CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus

persistierend infizierten Tieren nicht nachgewiesen werden. Diese Daten bestätigen zusätzlich, dass die CD8<sup>+</sup> T-Zellen von persistierend infizierten Mäusen keine zytotoxische Funktion über den Exozytoseweg ausüben konnten.



#### Abbildung 4.22 Produktion von Perforin und Granzym B in CD8<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup> T-Zellen

Y10 Mäuse wurden mit 1500 SFFU FV infiziert und die Milzzellen 14 Tage (akut) oder 6 Wochen (persistierend) nach der Infektion gewonnen. Die Markierung der Zellen wurde mit CD8 und CD43 Antikörpern (s „Methoden“ 3.9.1) durchgeführt. Die Population der CD8<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup> T-Zellen wurde im Durchflußzytometer mit einer Sorting-Funktion isoliert. Perforin und Granzym B wurden in den CD8<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup> T-Zellen (Reinheit der Zellpopulation mehr als 95%) mittels der „Westernblot“ Technik nachgewiesen. Das Protein β -Aktin wurde als Kontrolle nachgewiesen.

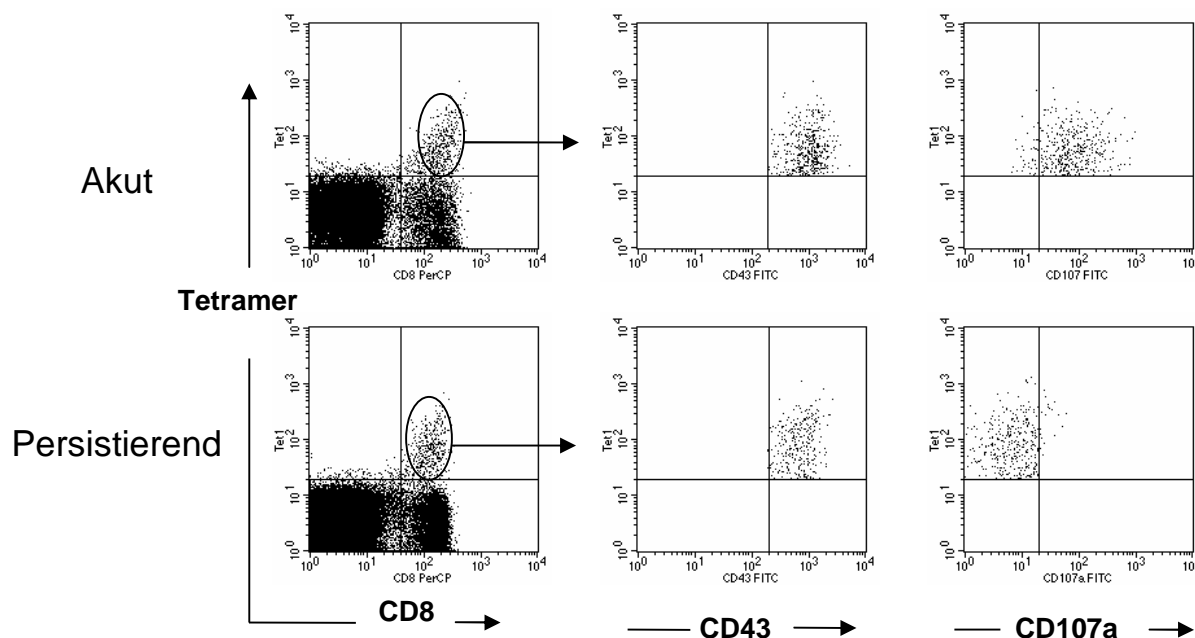
Diese Ergebnisse wurden uns freundlicherweise von unserem Kooperationspartner Kim Hasenkrug (Hamilton, USA) überlassen.

#### 4.21 Degranulierung von Virus-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus akut und persistierend infizierten Mäusen

Um die zytotoxische Aktivität von Virus-spezifischen Zellen zu untersuchen, wurde die Population der CD8<sup>+</sup>/Tetramer<sup>+</sup> Zellen aus akut und persistierend infizierten Mäusen verglichen. Abbildung 4.23 zeigt, dass aktivierte Virus-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen von akut infizierten Mäusen den Degranulierungsmarker CD107a exprimierten. Spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus persistierend infizierten Mäusen exprimierten auch

CD43 Moleküle, aber CD107a konnte auf der Oberfläche der aktivierten Zellen kaum nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die zytotoxische Funktion von Virus-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen über den Exozytoseweg in der persistierenden FV Infektion gestört war.

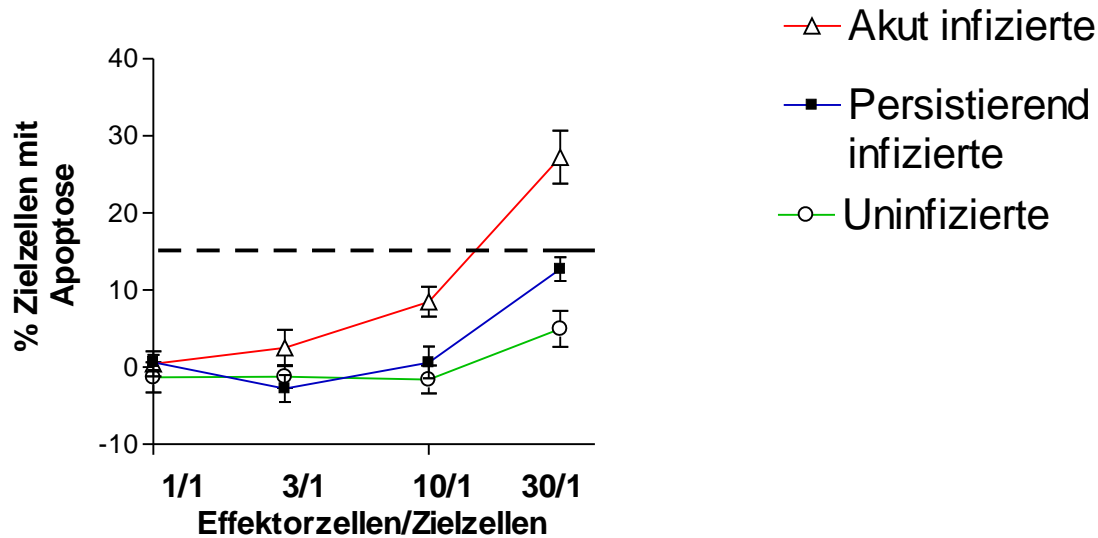


**Abbildung 4.23 Degranulierungsmarker CD107a auf der Oberfläche von Virus-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus akut und persistierend infizierten Mäusen**

Y10 Mäuse wurden mit 1500 SFFU FV infiziert und Milzzellen wurden 14 Tage (akut) oder 6 Wochen (persistierend) nach der Infektion gewonnen. Die Markierung der Zellen wurde mit CD8, CD43, CD107a Antikörpern (s. „Methoden“ 3.9.1) und D<sup>b</sup>-GagL-Tetrameren durchgeführt (s. „Methoden“ 3.9.4). Der CD43 Marker zeigte, dass alle Virus-spezifischen (Tetramer<sup>+</sup>) CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der akuten und persistierenden Infektion einen Effektorphenotyp hatten. In den durchflußzytometrischen Abbildungen sind jeweils eine repräsentative Maus aus beiden Gruppen dargestellt.

#### 4.22 Zytotoxische Funktion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen von akut und persistierend infizierten Mäusen

Der Verlust der zytotoxischen Funktion von CD8<sup>+</sup> T Zellen in persistierend infizierten Mäusen wurde auch im zytotoxischen Test *in vitro* bestätigt. Die Untersuchung der DNA-Fragmentierung in FBL-3 Zielzellen nach Inkubation mit Magnet-separierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus persistierend infizierten Mäusen zeigte, dass die Zellen unfähig waren, Apoptose in FV-transformierten Zielzellen auszulösen (Abb. 4.24). CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus akut infizierten Mäusen hatten dagegen zytotoxisches Potenzial und induzierten DNA-Fragmentierung in den Zielzellen.



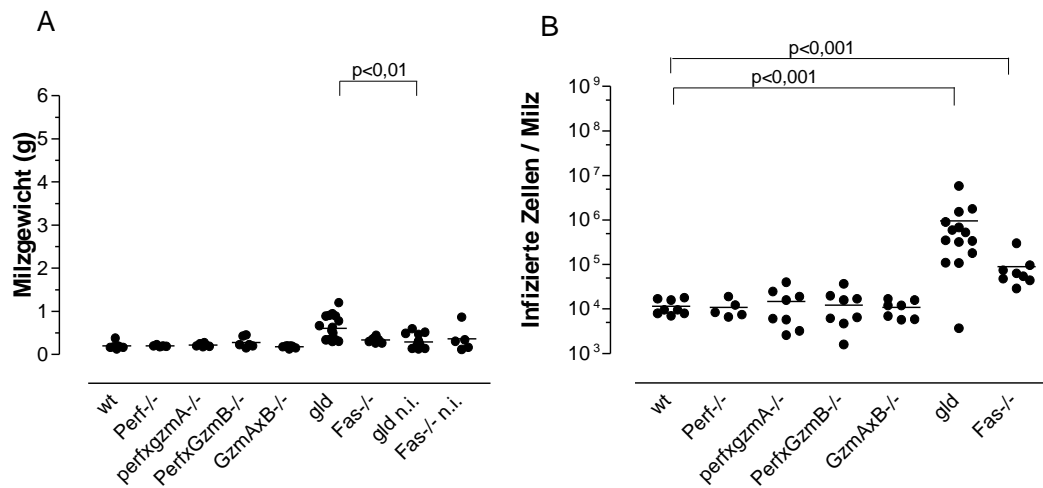
**Abbildung 4.24 Zytotoxische Aktivität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus akut und persistierend infizierten Mäusen**

Y10 Mäuse wurden mit 1500 SFFU FV infiziert und Milzzellen wurden 14 Tage (akut) oder 6 Wochen (persistierend) nach der Infektion gewonnen. Milzzellen von uninfizierten Y10 Mäusen wurden zur Kontrolle verwendet. CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit Magnet-Beads separiert. Die separierten Zellen bestanden zu mehr als 95% aus CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Für die Untersuchung ihrer zytotoxischen Funktion wurden die CD8<sup>+</sup> T-Zellen in verschiedenen Verhältnissen, mit <sup>3</sup>H Tymidin-markierten Zielzellen inkubiert. Als Zielzellen wurde die Friend-Virus transformierte FBL-3 Tumorzelllinie verwendet. Die <sup>3</sup>H-Tymidin-DNA Freisetzung wurde, wie in „Methoden“ beschrieben, gemessen und berechnet. Nur Werte über 15% spezifische Lyse wurden als positiv gewertet.

#### 4.23 Verlauf der persistierenden FV Infektion in Mäusen mit Defekten in zytotoxischen Funktionen

Nachdem der Funktionsverlust der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der chronischen FV Infektion experimentell gezeigt werden konnte, sollte auch die Rolle der einzelnen zytotoxischen Moleküle während der persistierenden Infektion mit Hilfe von „knockout“ Mäusen untersucht werden. Mausstämme mit verschiedenen Defekten in zytotoxischen Funktionen (Perf<sup>-/-</sup>, Perf×GzmA<sup>-/-</sup>, Perf×GzmB<sup>-/-</sup>, GzmA×B<sup>-/-</sup>, Fas<sup>-/-</sup>, und gld) wurden chronisch mit FV infiziert. Perf×GzmA×B<sup>-/-</sup> Mäuse konnten dabei nicht untersucht werden, da diese Tiere an einer akuten Leukämie verstarben (Ergebnisse 4.7). Mäuse mit Defekten im Exozytoseweg (Perf<sup>-/-</sup>, Perf×GzmA<sup>-/-</sup>, Perf×GzmB<sup>-/-</sup> und GzmA×B<sup>-/-</sup>) kontrollierten erwartungsgemäß das Virus genau so gut wie Wildtypmäuse (Abb. 4.25.A, Abb. 4.25.B). Dagegen wiesen Mäuse mit einem Defekt in Fas oder FasL signifikant größere Milzen und deutlich mehr infizierte Zellen als Wildtypmäuse auf. Obwohl der Fas/FasL-Weg für die Kontrolle der akuten Infektion unwichtig war,

spielte er aber eine entscheidende Rolle in der Kontrolle der persistierenden FV Infektion. Vermutlich musste der Fas/FasL-Weg die Kontrolle über die chronische Infektion übernehmen, da der Exozytoseweg nicht mehr funktionell war.



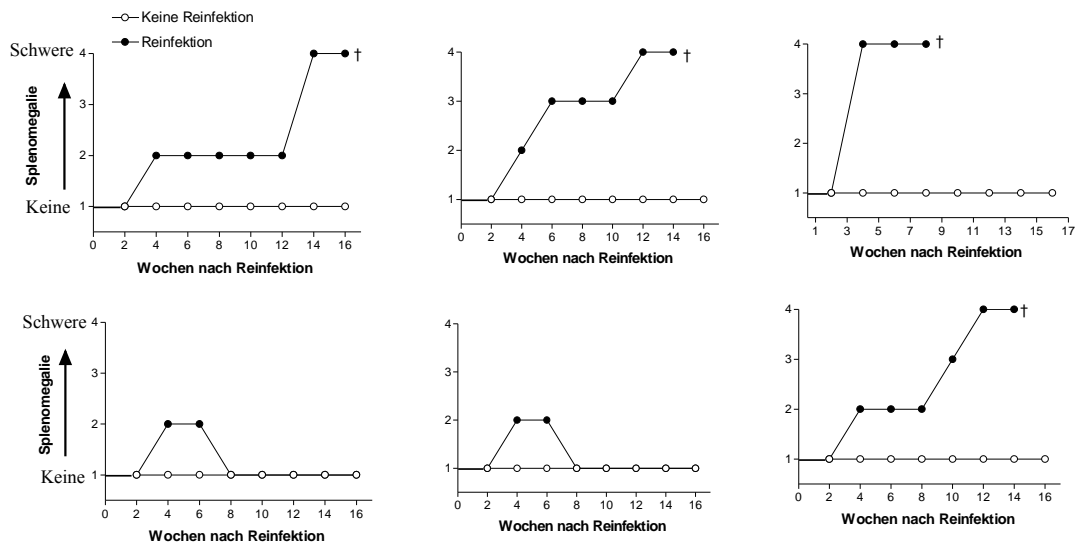
#### Abbildung 4.25 Verlauf der persistierenden FV Infektion in Mäusen mit Defekten in zytotoxischen Funktionen

Die B6 Wildtypmäuse und unterschiedliche „knockout“ Mauslinien wurden mit 12500 SFFU FV infiziert, und zwei Infektionsparameter wurden 6 Wochen nach der Infektion untersucht. Milzen wurden entnommen und gewogen, um eine Splenomegalie untersuchen zu können (A). Außerdem erfolgte die Bestimmung der Zahl an infizierten Zellen in der Milz (B).

Legende wt = Wildtyp B6 Mäuse, Perf<sup>-/-</sup> = Perforin knockout Maus, Perf×GzmA<sup>-/-</sup> = Perforin<sup>+</sup> Granzym A knockout Maus, Perf×GzmB<sup>-/-</sup> = Perforin<sup>+</sup> Granzym B knockout Maus, GzmA×B<sup>-/-</sup> = Granzym A<sup>+</sup> Granzym B knockout Maus, Fas<sup>-/-</sup> = Fas-Rezeptor knockout Maus, gld = FasL knockout Maus, n.i. = nicht infiziert.

#### 4.24 Reinfektion persistierend infizierter Mäuse

Als *in vivo* Untersuchung für die Funktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden persistierend infizierte Mäuse ein zweites Mal mit FV belastet. Ein Großteil der Tiere (10 von 16) entwickelte eine Splenomegalie und 4 der Tiere verstarben sogar an einer Leukämie (Abb. 4.27). Dieses Experiment beweist, dass die CD8<sup>+</sup> T-Zellen von persistierend infizierten Mäusen nicht mehr in der Lage waren Virus-infizierte Zellen effizient zu eliminieren und die Tiere so vor einer FV-induzierten Erkrankung zu schützen. Mäuse, die chronisch mit FV infiziert waren, weisen also einen kompletten Funktionsverlust des Exozytosewegs von CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf, der offensichtlich eine wichtige Voraussetzung für die Persistenz des Virus darstellt.



**Abbildung 4.26 Krankheitsverlauf nach Reinfektion persistierend infizierter Mäuse**

Y10 Mäuse wurden mit 1500 SFFU FV infiziert. 8 Wochen nach der ersten Infektion wurden die Tiere erneut mit 1500 SFFU belastet. Anschließend wurde die Milzgröße durch Palpation bestimmt. Die Bilder zeigen den Infektionsverlauf von repräsentativen Mäusen nach der Reinfektion. Dargestellt ist die Schwere der Splenomegalie mit 1 = normale Milzgröße und 4 = mind. 10fach vergrößerte Milz. † symbolisiert den Tod von Mäusen.

## 5 Diskussion

### 5.1 CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Abwehr von retroviralen Infektionen

CD8<sup>+</sup> T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von retroviralen Infektionen. So ist die Funktion dieser Zellen bei Infektionen mit den humanpathogenen Retroviren, HIV und HTLV, direkt korreliert mit deren Krankheitsverlauf (Lieberman *et al.*, 2001, Sakai *et al.*, 2001). Die molekularen Mechanismen der Abwehr von Retroviren durch T-Zellen waren aber bisher weitgehend unbekannt. Das Friend Virus Modell ermöglicht es, diese Mechanismen detailliert in einem Mausmodell zu charakterisieren.

Es wurde bereits gezeigt, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Kontrolle einer Friend Virusreplikation entscheidend beteiligt sind. So ist die Resistenz von bestimmten Mausstämmen gegen eine FV-induzierte Leukämie abhängig von einer funktionellen CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort (Van der Gaag *et al.*, 1990, Kitagawa *et al.*, 1986, Hasenkrug 1999). Unsere Ergebnisse bestätigen die wichtige Rolle von CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei der Resistenz von B6 Mäusen gegen FV. Dagegen spielen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nur eine untergeordnete Rolle in der Kontrolle der FV Replikation in B6 Mäusen. Obwohl die Funktion von NK Zellen in der Abwehr von FV beschrieben wurde (Iwanami *et al.*, 2001), hatte die Depletierung dieser Zellen keinen Einfluss auf den Verlauf der Infektion in B6 Mäusen (Abb. 4.1). Die dargestellten Ergebnisse wurden zum Zeitpunkt 10 Tage nach der Infektion untersucht, aber auch zum früheren Zeitpunkt (4 Tage nach Infektion) spielten NK-Zellen keine Rolle bei der Kontrolle der Virusreplikation (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Daten von den Depletierungsexperimenten haben gezeigt, dass nur die zytotoxische Funktion von CD8<sup>+</sup> Zellen in der akuten Phase der FV Infektion notwendig war (Abb. 4.1). Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen waren die Zellen des Immunsystems, die in der Akuten FV Infektion am stärksten proliferierten und aktiviert waren (Abb. 4.3). Die Expression von CD107a als Degranulierungsmarker auf aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen spricht für die zytotoxische Funktion dieser Zellen bei der Abwehr von FV (Abb. 4.3). Damit nehmen CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der FV Replikation ein. Trotzdem konnte *in vitro* keine spezifische zytotoxische Funktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegen FBL3 Zellen (FV-Induzierte Tumorzellen) nachgewiesen werden (Abb. 4.5.B). Eine Erklärung dafür könnte die geringe Anzahl an Virus-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-

Zellen in B6 Mäusen sein, die positiv für das immundominante CTL-Epitop gag gPr80<sup>gag</sup>85-93 waren. Der prozentuelle Anteil an CD8<sup>+</sup>/Tetramer<sup>+</sup> Zellen lag bei B6 Mäusen in der akuten Infektion bei ca. 2,5% (Abb. 4.6). Bei Y10 Mäusen dagegen sind bis zu 6% der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der akuten Infektion Tetramer<sup>+</sup> (Abb. 4.18). Bei diesen Tieren ließ sich auch *in vitro* eine spezifische Lyse von FBL-3 Zielzellen durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachweisen (Dittmer *et al.*, 1999, Abb. 4.24). Vermutlich ist die Viruslast in B6 Mäusen durch die Fv-2 Resistenz verringert, wodurch nicht ausreichend spezifische CTL induziert werden, um diese in einen zytotoxischen Test nachgewiesen zu können.

## 5.2 Zytotoxische Mechanismen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der akuten FV Infektion

Als nächstes stellte sich die Frage, welche zytotoxischen molekularen Mechanismen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen für die Abwehr von Retroviren benutzt werden. In einem Retrovirus-Maus-Modell wurde bereits gezeigt, dass Perf<sup>-/-</sup> Mäuse suszeptibel für Maus-AIDS sind (Tang *et al.*, 1997). Diese Untersuchungen lassen vermuten, dass die Replikation des LP-BM5 Retrovirus Komplexes über den Exozytoseweg kontrolliert wird. Die Ergebnisse aus dem Maus-AIDS-Modell konnten wir im Friend Modell bestätigen und erweitern. Das Erscheinen des Degranulierungsmarkers CD107a auf CD8<sup>+</sup> Effektor T-Zellen (CD43<sup>+</sup>) von FV infizierten Mäusen deutete daraufhin, dass diese Zellen zytotoxische Moleküle sezernieren (Abb.4.3.C). Arbeiten mit „knockout“ Mäusen haben dann ergeben, dass die drei Moleküle (Perforin, Granzym A und Granzym B) des Exozytosewegs die FV Vermehrung *in vivo* kontrollierten (Abb.4.7). Wir haben gezeigt, dass außer Perforin auch Granzym A, und B die Retrovirusreplikation kontrollieren konnte. Bei vielen viralen Infektionen ist Perforin allein, in Kombination mit Fas/FasL (Kagi *et al.*, 1994; Balkow *et al.*, 2001) oder Granzym (Mullbacher *et al.*, 1996; Mullbacher *et al.*, 1999; Riera *et al.*, 2000) notwendig für die Kontrolle der Virusreplikation. Die Anwesenheit von Granzymen in Perf<sup>-/-</sup> Mäusen war dagegen bei verschiedenen viralen Infektionen (LCMV (Kägi *et al.*, 1994), Ectromelia Virus der Maus (Smith, 1998) und Teiler`s Picornavirus (Rossi, 1998)) nicht ausreichend, um die Virusreplikation *in vivo* zu kontrollieren. Deswegen waren die Ergebnisse überraschend, dass Granzym A oder B in den Mäusen mit defektem Perforin ausreichend für die Abwehr von FV waren (Abb.4.7). Unsere Ergebnisse beweisen, dass Mäuse mit funktionierenden Fas/FasL Molekülen, in Anwesenheit eines der drei zytotoxischen Effektormoleküle aus dem Exozytoseweg (Perforin, Granzym A oder B), die Friend Virusreplikation kontrollieren konnten. Nur



wenn den Mäusen keins drei Moleküle aus dem Exozytoseweg produzierten, sind die Tiere nicht mehr resistent gegen eine FV-induzierte Leukämie. Dies impliziert, dass Granzyme A und B allein einen antiviralen Effekt haben. Es stellt sich daher die Frage: Wie funktionieren die Enzyme ohne Perforin? In neuen Studien wurde gezeigt, dass Granzym B an einen Rezeptor bindet und unabhängig vom Perforin ins Zytoplasma transportiert wird. In den Zielzellen befindet sich das Granzyme im Granula, und Perforin ist notwendig für die Aktivierung und Freisetzung der Granzym im Zytoplasma (Pinkoski *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 1997; Jans *et al.*, 1996; Jans *et al.*, 1998; Metkar *et al.*, 2002; Froelich *et al.*, 1998). Diesem Modell entsprechend wären Granzyme ohne Perforin nicht aktiv. Die *in vivo* Experimente mit FV infizierten "knockout" Mäusen haben dieses Modell nicht bestätigt. Folgende Befunde von anderen Virusmodellen können die widersprüchlichen Daten vielleicht erklären. Es besteht die Möglichkeit, dass Granzyme einen direkten Effekt auf die Virusreplikation haben. Es wurde gezeigt, dass Granzym B allein die Produktion des Vesikularis Stomatitis Viruses, durch die Aktivierung der Enzyme für RNA Degradierung in *in vitro* infizierten Zellen hemmt (Hommel-Berrey *et al.*, 1997). In *in vitro* Experimenten mit dem Maus-Retrovirus „Moloney murine Leukemia Virus“ (M-MuLV) wurde gefunden, dass Granzym A die retrovirale "Reverse Transcriptase" inaktivieren kann (Simon *et al.*, 1987). Da M-MuLV und FV genetisch sehr ähnlich sind, ergänzen sich unsere *in vivo* Ergebnisse zur antiviralen Aktivität von Granzym A mit den *in vitro* Untersuchungen von Simon *et al.* (1987). Entsprechend dieser Ergebnisse können wir vermuten, dass die verschiedenen Effektormoleküle aus dem Exozytoseweg von CD8<sup>+</sup> T-Zellen für die Kontrolle von retroviralen Infektionen mehrere Mechanismen verwenden. Dagegen spielen Fas und FasL in akut infizierten Mäusen keine Rolle bei der Kontrolle der Friend-Komplex Virusreplikation (Abb. 4.7).

### **5.3 Mechanismen der zytotoxischen Kontrolle der apathogenen F-MuLV Infektion**

Der FV Komplex besteht aus zwei Viren, von denen eines das apathogene, replikationskompetente F-MuLV ist. Wir wollten untersuchen, ob unterschiedliche zytotoxische Mechanismen für die Kontrolle einer pathogenen bzw. apathogenen Retrovirusinfektion verwendet werden. Um zu bestimmen welche Zellen die F-MuLV Replikation kontrollieren und welche Mechanismen sie dafür verwenden, wurden F-MuLV infizierte Mäuse untersucht. Depletierungsexperimente belegten die wichtige

Rolle von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei der Abwehr von F-MuLV (Abb. 4.11). Allerdings konnten nur für CD8<sup>+</sup> T-Zellen Virus-spezifische, aktivierte Zellen während der F-MuLV nachgewiesen werden (Abb. 4.11, Abb. 4.12). Die Infektion von „knockout“ Mäusen zeigte dann, dass der Fas/FasL-Weg für Kontrolle der F-MuLV Replikation notwendig war (Abb. 4.14). Ein Defekt von zytotoxischen Molekülen des Exozytosewegs hatte dagegen keinen Einfluss auf den Infektionsverlauf. Im Gegensatz zur pathogenen FV Infektion induzierte F-MuLV auch keine Granzym B Produktion in CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Daher vermitteln diese Zellen ihre antivirale Funktion auch nicht über den Exozytoseweg, sondern über den Fas/FasL-Weg. Als Grund warum CD8<sup>+</sup> T-Zellen für die Kontrolle von FV-B und F-MuLV unterschiedliche zytotoxische Wege verwendeten, können wir folgende zwei Hypothesen aufstellen. Eine FV Infektion induziert die Proliferation und Transformation von Erythroblastvorläuferzellen. Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen müssen also in der Lage sein Tumorzellen zu eliminieren. Außerdem ist die Viruslast in FV infizierten Mäusen 100mal höher als in F-MuLV infizierten Tieren. Diese beiden Faktoren könnten den Exozytoseweg in CD8<sup>+</sup> T-Zellen auslösen. Dagegen ist der Fas/FasL-Weg für die Eliminierung des apathogenen F-MuLV offensichtlich ausreichend.

#### 5.4 Die zytotoxische T-Zellantwort in der chronischen FV-Infektion

CD8<sup>+</sup> T-Zellen kontrollieren effizient die FV Replikation in der akuten FV-Infektion, verlieren aber ihre antivirale Aktivität während der chronischen Infektion (Hasenkrug *et al.*, 1998). Obwohl spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der persistierenden Infektion gefunden wurden (Abb. 4.18) und diese Zellen einen Effektorphänotyp aufweisen, waren sie funktionell inaktiv.

Die Daten zeigten, dass virale Antigene in der persistierenden Infektion die Proliferation von spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen stimulierten (Abb. 4.18). Diese Virus-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen besaßen aber keine Granula in ihrem Zytoplasma (Abb. 4.20) und produzieren kein Perforin und Granzym (Abb. 4.21, Abb. 4.22). Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen von persistierend FV infizierten Mäusen degranulieren auch nicht (Abb.4.21, Abb. 4.23) und waren unfähig Apoptose in Zielzellen auszulösen (Abb. 4.24). Andere Studie haben gezeigt, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der persistierenden Infektion auch konnten kein IFN $\gamma$  produzieren (Dittmer *et al.*, 2004). Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind daher unfähig FV infizierte Zellen *in vivo* zu eliminieren. Es wurde gezeigt, dass

regulatorische CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Funktion von FV spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der chronischen Infektion hemmen (Dittmer *et al.*, 2004). Diese Hemmung ist ähnlich wie die Suppression von alloreaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei der Induktion einer Toleranz (Lin *et al.*, 2002). Der Verlust der zytotoxischen Funktion könnte eine Form von Toleranz sein, um die immunpathologische Wirkung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach einer akuten viralen Infektion zu vermeiden. Allerdings, trägt dieser Mechanismus offensichtlich dazu bei, dass chronische Infektionen entstehen können.

Ein funktionaler Verlust der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde auch bei chronisch HIV oder HCV infizierten Patienten beschrieben (Appay *et al.*, 2000; Minguales *et al.*, 2002, Hess *et al.*, 2004; Gruener *et al.*, 2001; Urbani *et al.*, 2002; Par *et al.*, 2002; Lucas *et al.*, 2004). Beide Viren sind genetisch sehr variabel, sie umgehen die CD8<sup>+</sup> T-Zell Antwort durch Mutationen in T-Zell spezifischen Epitopen. Dieser Mechanismus wurde lange als Hauptgrund für den Verlust der antiviralen Aktivität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen angenommen (O'Connor *et al.*, 2001; Peyerl *et al.*, 2004; Koziel *et al.*, 1997; Moormann *et al.*, 2001). Neue Ergebnisse zeigen jedoch, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen in einer chronischen Phase der HIV oder HCV Infektion viele virale Epitopen erkennen (Draenert *et al.*, 2004; Koziel *et al.*, 1992; Wong *et al.*, 2001). Die Progression der chronischen Infektionen ist daher mehr vom funktionalen Zustand der CD8<sup>+</sup> T-Zellen abhängig, als von viralen „escape“ Mechanismen (Draenert *et al.*, 2004; Hess *et al.*, 2004; Lucas *et al.*, 2004; Minguales *et al.*, 2002). Dabei scheint es, dass die regulatorische CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei HIV oder HCV Infektionen beteiligt sind, welche die CD8<sup>+</sup> T-Zell Antwort hemmen (Kinter *et al.*, 2004; Aandahl *et al.*, 2004; Weiss *et al.*, 2004; MacDonald *et al.* 2002; Accapezzato *et al.*, 2004). So wurde der Verlust der Perforin-Produktion in T-Zellen von chronisch HIV (Appay *et al.*, 2000; Minguales *et al.*, 2002; Hess *et al.*, 2004) oder HCV (Par *et al.*, 2002; Lucas *et al.*, 2004) infizierten Patienten gezeigt. Der Verlust der zytotoxischen Funktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, vermittelt durch regulatorische CD4<sup>+</sup> T-Zellen, könnte also ein wichtiger Mechanismus für die Etablierung chronischer viraler Infektionen sein. Die Klärung der Mechanismen, welche zur funktionellen Hemmung Virus-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen führen, könnte ein wichtiger Schritt zur Entwicklung neuer Therapien gegen chronische virale Infektionen bei Menschen sein.

Trotz des Funktionsverlusts von FV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkrankten die chronisch infizierten Tiere nicht an einer Erythroleukämie. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass bei der Kontrolle der akuten und persistierenden FV Infektion

verschiedene Zellpopulationen beteiligt sind. Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind essentiell bei der akuten Infektion, verlieren aber ihre Funktion in der persistierenden Phase der FV Infektion (Hasenkrug *et al.*, 1998, Dittmer *et al.*, 2004). Die Depletion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der persistierenden Phase der FV Infektion, hat keinen Einfluss auf die Viruslast (Hasenkrug *et al.*, 1998), während die Depletion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen persistierendes FV reaktiviert und zu einer Leukämie führt (Hasenkrug *et al.*, 1998). Für andere Infektionsmodelle wurde gezeigt, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen infizierte Zielzellen über den Fas/FasL-Weg töten können (Zajac *et al.*, 1996). Eine zytotoxische Funktion von Virus-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist auch im Friend Modell bestätigt worden (Iwaschiro *et al.*, 2001). Im Gegensatz zum Exozytoseweg, spielte die Fas/FasL vermittelte Zytotoxizität bei der akuten FV Infektion keine wichtige Rolle. Allerdings führt der Verlust von Fas oder FasL in der persistierenden Infektion zur Verstärkung der Virusreplikation (Abb. 4.25). Es lässt sich daher vermuten, dass spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen persistierendes FV über den Fas/FasL-Weg kontrollieren. Diese Zellen sind aber offenbar nicht in der Lage das Virus komplett zu eliminieren, da sie keine Hilfe von CD8<sup>+</sup> T-Zellen erhalten. Grund ist der gestörte Exozytoseweg in den CD8<sup>+</sup> T-Zellen, der vermutlich durch regulatorische Zellen ausgelöst wird. In der Zukunft werden wir im Friend Modell versuchen in die Interaktion von persistierendem Virus und dem Immunsystem experimentell einzugreifen, um neue Strategien der Therapie von chronischen Infektionen entwickeln zu können.

## 6 Literaturverzeichnis

**Aandahl EM, Michaelsson J, Moretto WJ, Hecht FM, and Nixon DF.** (2004). Human CD4+ CD25+ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J Virol.* 78: 2454-2459.

**Accapezzato D, Francavilla V, Paroli M, Casciaro M, Chircu LV, Cividini A, Abrignani S, Mondelli MU, and Barnaba V.** (2004). Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest.* 113:963-972.

**Adachi M, Suematsu S, Kondo T, Ogasawara J, Tanaka T, Yoshida N, and Nagata S.** (1995). Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. *Nat Genet.* 11:294-300.

**Adachi M, Suematsu S, Suda T, Watanabe D, Fukuyama H, Ogasawara J, and Tanaka T, Yoshida N, Nagata S.** (1996). Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:2131-2136.

**Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, Gillespie GM, Dong T, King A, Ogg GS, Spiegel HM, Conlon C, Spina CA, Havli DV, Richman DD, Waters A, Easterbrook P, McMichael AJ, and Rowland-Jones SL.** (2000). HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med.* 192:63-75.

**Appelberg R, Castro AG, Pedrosa J, Silva RA, Orme IM, and Minoprio P.** (1995). Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha during T-cell-independent and -dependent phases of *Mycobacterium avium* infection. *Infect Immun.* 62:3962-3971.

**Ashkenazi A and Dixit VM.** (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 281:1305-1308.

**Balkow S, Kersten A, Tran TT, Stehle T, Grosse P, Museteanu C, Utermohlen O, Pircher H, von Weizsacker F, Wallich R, Mullbacher A, and Simon MM,** (2001). Concerted action of the FasL/Fas and perforin/granzyme A and B pathways is mandatory for the development of early viral hepatitis but not for recovery from viral infection. *J Virol.* 75:8781-8791.

**Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, and Montagnier L.** (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 220:868-871.

**Beresford PJ, Kam JC, and Lieberman J.** (1997). Recombinant human granzyme A binds to two putative HLA-associated proteins and cleaves one of them. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:9285-9290.

**Beresford PJ, Xia Z, Greenberg AH, and Lieberman J.** (1999). Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation. *Immunity.* 10:585-594.

**Blink EJ, Trapani JA, and Jans DA.** (1999). Perforin-dependent nuclear targeting of granzymes: A central role in the nuclear events of granule-exocytosis-mediated apoptosis. *Immunol. Cell. Biol.* 77:206-215.

- Browne KA, Blink E, Sutton VR, Froelich CJ, Jans DA, and Trapani JA.** (1999). Cytosolic delivery of granzyme B by bacterial toxins: evidence that endosomal disruption, in addition to transmembrane pore formation, is an important function of Perforin. *Mol Cell Biol.* 19:8604-8615.
- Brun-Vezinet F, Rouzioux C, Montagnier L, Chamaret S, Gruet J, Barre-Sinoussi F, Geroldi D, Chermann JC, McCormick J, Mitchell S, et al.** (1984). Prevalence of antibodies to lymphadenopathy-associated retrovirus in African patients with AIDS. *Science.* 226:453-456.
- Buseyne F and Riviere Y,** (1993). HIV-specific CD8+ T-cell immune responses and viral replication. *AIDS.* Suppl 2:81-85.
- Carlow DA, Ardman B, and Ziltener HJ.** (1999). A novel CD8 T cell-restricted CD45RB epitope shared by CD43 is differentially affected by glycosylation *J Immunol.* 163:1441-8
- Chen W, Qin H, Chesebro B, and Cheever MA.** (1996). Identification of a gag-encoded cytotoxic T-lymphocyte epitope from FBL-3 leukemia shared by Friend, Moloney, and Rauscher murine leukemia virus-induced tumors. *J Virol.* 70:7773-7782.
- Chesebro B, Britt W, Evans L, Wehrly K, Nishio J, and Cloyd M.** (1983). Characterization of monoclonal antibodies reactive with murine leukemia viruses: use in analysis of strains of Friend MCF and Friend ecotropic murine leukemia virus. *Virology.* 127:134-148.
- Chesebro B, Miyazawa M, and Britt WJ.** (1990). Host genetic control of spontaneous and induced immunity to Friend murine retrovirus infection. *Annu Rev Immunol.* 8:477-499.
- Chesnut RW and Grey HM.** (1986). Antigen presentation by B cells and its significance in T-B interactions. *Adv Immunol.* 39:51-94.
- Chiang CF, Tenenbaum SA, Verret CR, Leissinger CA, and Garry RF.** (1996). Activity of granzyme A, a serine protease in the killing granules of cytotoxic T lymphocytes, is reduced in cells from HIV-infected hemophiliacs. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 12:235-239.
- Chinnaiyan AM, Hanna WL, Orth K, Duan H, Poirier GG, Froelich CJ, and Dixit VM.** (1996). Cytotoxic T-cell-derived granzyme B activates the apoptotic protease ICE-LAP3. *Current Biology.* 6:897-899.
- Chu JL, Drappa J, Parnassa A, and Elkon KB.** (1993). The defect in Fas mRNA expression in MRL/lpr mice is associated with insertion of the retrotransposon, ETn. *J Exp Med.* 178:723-30.
- Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent G, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C, et al.** (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science.* 233:343-346.
- Cobbold SP, Martin G, and Waldmann H.** (1990). The induction of skin graft tolerance in MHC-mismatched or primed recipients: primed T cells can be tolerized in the periphery with CD4 and CD8 antibodies. *Eur. J. Immunol.* 20:2747-2754.
- Coffin JM, Hughes S, and Varmus H.** (1997). *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Cohen JJ.** (1999). Apoptosis: mechanisms of life and death in the immune system. *J Allergy Clin Immunol.* 103:548-554.

**Cohen PL and Eisenberg RA.** (1991). Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu Rev Immunol.* 9:243-269.

**Cunningham JM.** (1992). Cellular Entry by murine Retroviruses. *Semin. Virol.* 3:85-89.

**Dai C and Krantz SB.** (1999). Interferon gamma induces upregulation and activation of caspases 1, 3, and 8 to produce apoptosis in human erythroid progenitor cells. *Blood.* 93:3309-3316.

**D'Andrea AD, Moreau JF, and Showers MO.** (1992). Molecular mimicry of erythropoietin by the spleen focus-forming virus gp55 glycoprotein: the first stage of Friend virus-induced erythroleukemia. *Biochim Biophys Acta.* 1114:31-41.

**Daniel PT, Wieder T, Sturm I, and Schulze-Osthoff K.** (2001). The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy, *Leukemia* 15:1022-1029.

**Dittmer U, Brooks DM, and Hasenkrug KJ.** (1999a). Requirement for multiple lymphocyte subsets in protection by a live attenuated vaccine against retroviral infection. *Nat Med.* 5:189-193.

**Dittmer U, He H, Messer RJ, Schimmer S, Olbrich AR, Ohlen C, Greenberg PD, Stromnes IM, Iwashiro M, Sakaguchi S, Evans LH, Peterson KE, Yang G, and Hasenkrug KJ.** (2004) Functional impairment of CD8(+) T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection. *Immunity.* 20:653-661.

**Dittmer U, Race B, and Hasenkrug KJ.** (1999b). Kinetics of the development of protective immunity in mice vaccinated with a live attenuated retrovirus. *J Virol.* 73:8435-8440.

**Dittmer U, Race B, Peterson KE, Stromnes IM, Messer RJ, and Hasenkrug KJ.** (2002). Essential roles for CD8+ T cells and gamma interferon in protection of mice against retrovirus-induced immunosuppression. *J Virol.* 76:450-454.

**Dittmer U and Hasenkrug KJ.** (2001). Cellular and molecular mechanisms of vaccine-induced protection against retroviral infections. *Curr Mol Med.* 1:431-436.

**Draenert R, Verrill CL, Tang Y, Allen TM, Wurcel AG, Boczanowski M, Lechner A, Kim AY, Suscovich T, Brown NV, Addo MM, and Walker BD.** (2004). Persistent recognition of autologous virus by high-avidity CD8 T cells in chronic, progressive human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 78:630-641.

**Ebnet K, Chluba-de Tapia J, Hurtenbach U, Kramer MD, and Simon MM.** (1991). In Vivo Primed Mouse T Cells Selectively Express T Cell-Specific Serine Proteinase-1 and the Proteinase-Like Molecules Granzyme B and C. *Int.Immunol.* 3:9-19.

**Ebnet K, Hausmann M, Lehmann-Grube F, Mullbacher A, Kopf M, Lamers M, and Simon MM.** (1995). Granzyme A-deficient mice retain potent cell-mediated cytotoxicity. *EMBO J.* 14:4230-4239.

**Enders JF and Peebles TC.** (1954). Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc Soc Exp Biol Med.* 86:277-286.

- Espersen C, Pakkenberg B, Harder E, Pallesen G, Gerstoft J, Pedersen BK, and Ullum H.** (2001). High levels of CD8-positive lymphocytes expressing CD45RO, granzyme B, and Ki-67 in lymph nodes of HIV-infected individuals are not associated with increased mortality. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 17:287-293.
- Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, Urban JF Jr, Beckmann, MP, Park LS, Schooley KA, Coffman RL, Mosmann TR, and Paul WE.** (1990). Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol*. 8:303-333.
- Friend C.** (1957). Cell-free transmission in adult Swiss mice of a disease having the character of a leukemia. *J Exp Med*. 105:307-313.
- Froelich CJ, Dixit VM, and Yang X.** (1998). Lymphocyte granule-mediated apoptosis: matters of viral mimicry and deadly proteases. *Immunol Today*. 19:30-36.
- Froelich CJ, Orth K, Turbov J, Seth P, Gottlieb R, Babior B, Shah GM, Bleackley RC, Dixit VM, and Hanna W.** (1996). New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. *J Biol Chem*. 271:29073-29079.
- Fruh K and Yang Y.** (1999). Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma. *Curr Opin Immunol*. 11:76-81.
- Gallo RC.** (1986). HTLV: the family of human T-lymphotropic retroviruses and their role in leukemia and AIDS. *Med Oncol Tumor Pharmacother*. 3:265-267.
- Garcia-Sanz JA, MacDonald HR, Jenne DE, Tschopp J, and Nabholz M.** (1990). Cell Specificity of Granzyme Gene Expression. *J Immunol*. 145:3111-3118.
- Greaves MF, Owe JJT, and Raff MC.** (1973). T and B Lymphocytes: Origins, properties and Poles in Immune Response. *Experpta Medica*, Amsterdam.
- Greenberg PD.** (1991). Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. *Adv. Immuno*. 49:281-355.
- Gregory SH and Wing EJ.** (1993). IFN-gamma inhibits the replication of *Listeria monocytogenes* in hepatocytes. *J Immunol*. 151:1401-1409.
- Griffiths GM.** (1995). The cell biology of CTL killing. *Curr Opin Immunol*. 7:343-348.
- Griffiths, GM, and Isaaz S.** (1993). Granzymes A and B are targeted to the lytic granules of lymphocytes by the mannose-6-phosphate receptor. *J Cell Biol*. 120:885-896.
- Gross A, Jockel J, Wei MC, and Korsmeyer SJ.** (1998). Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J*. 17:3878-3885.
- Gruener NH, Lechner F, Jung MC, Diepolder H, Gerlach T, Lauer G, Walker B, Sullivan J, Phillips R, Pape GR, and Klenerman P.** (2001). Sustained dysfunction of antiviral CD8+ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *J Virol*. 75:5550-5558.
- Hahn S, Gehri R, and Erb P.** (1995). Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity. *Immunol Rev*. 146:57-79.
- Hasenkrug KJ and Dittmer U.** (2000). The role of CD4 and CD8 T cells in recovery and



protection from retroviral infection: lessons from the Friend virus model. *Virology*. 272:244-249.

**Hasenkrug KJ, Brooks DM, and Chesebro B.** (1995). Passive immunotherapy for retroviral disease: influence of major histocompatibility complex type and T-cell responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:10492-10495.

**Hasenkrug KJ, Brooks DM, and Dittmer U.** (1998). Critical role for CD4(+) T cells in controlling retrovirus replication and spread in persistently infected mice. *J. Virol.* 72, 6559-5564.

**Hasenkrug KJ, Brooks DM, and Dittmer U.** (1998a). Critical role for CD4(+) T cells in controlling retrovirus replication and spread in persistently infected mice. *J Virol.* 72:6559-6564.

**Hasenkrug KJ, Brooks DM, Robertson MN, Srinivas RV, and Chesebro B.** (1998b). Immunoprotective determinants in friend murine leukemia virus envelope protein. *Virology*. 248:66-73.

**Hasenkrug KJ.** (1999). Lymphocyte deficiencies increase susceptibility to friend virus-induced erythroleukemia in Fv-2 genetically resistant mice. *J Virol.* 73:6468-6473.

**Hasenkrug KJ and Chesebro B.** (1997). Immunity to retroviral infection: the Friend virus model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:7811-7816.

**Hayes MP, Berrebi GA, Henkart PA.** (1989). Induction of target cell DNA release by the cytotoxic T lymphocyte granule protease granzyme A *J Exp Med.* 170:933-946.

**Henkart PA, Williams MS, Zacharchuk CM, and Sarin A.** (1997). Do CTL kill target cells by inducing apoptosis? *Semin Immunol.* 9:135-144.

**Henkart PA.** (1994). Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways and multiple effector molecules. *Immunity.* 1:343-346.

**Hess C, Altfeld M, Thomas SY, Addo MM, Rosenberg ES, Allen TM, Draenert R, Eldrige, RL, van Lunzen J, Stellbrink HJ, Walker BD, and Luster AD.** (2004). HIV-1 specific CD8+ T cells with an effector phenotype and control of viral replication. *Lancet.* 363:863-866.

**Hetts SW,** (1998) To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 279:300-317.

**Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S, Russell JH, and Ley TJ.** (1994). Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell.* 76:977-987.

**Hiramatsu N, Hayashi N, Katayama K, Mochizuki K, Kawanishi Y, Kasahara A, Fusamoto H, Kamada T.** (1994). Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 19:1354-1359.

**Hoatlin ME and Kabat D.** (1995). Host-range control of a retroviral disease: Friend erythroleukemia. *Trends Microbiol.* 3:51-57.

**Hoatlin ME, Ferro FE Jr, Kozak SL, and Kabat D.** (1994). Friend virus mutant encodes a small glycoprotein that causes erythroleukemia. *J Virol.* 68:4053-4056.

**Hommel-Berrey GA, Bochan MR, Montel AH, Goebel WS, Froelich CJ, and Brahmi Z.** (1997). Granzyme B independently of perforin mediates noncytolytic intracellular inactivation of vesicular stomatitis virus. *Cell Immunol.* 180:1-9.

**Hunter E and Swanstrom R.** (1990). Retrovirus envelope glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol.* 157:187-253.

**Iwanami N, Niwa A, Yasutomi Y, Tabata N, and Miyazawa M.** (2001). Role of natural killer cells in resistance against friend retrovirus-induced leukemia *J Virol.* 75:3152-3163.

**Iwashiro M, Messer RJ, Peterson KE, Stromnes, IM, Sugie T, and Hasenkrug KJ.** (2001). Immunosuppression by CD4+ regulatory T cells induced by chronic retroviral infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:9226-9230.

**Iwashiro M, Peterson K, Messer RJ, Stromnes IM, and Hasenkrug KJ.** (2001). CD4(+) T cells and gamma interferon in the long-term control of persistent friend retrovirus infection. *J Virol.* 75:52-60.

**Jans DA, Briggs LJ, Jans P, Froelich CJ, Parasivam G, Kumar S, Sutton VR, and Trapani JA.** (1998). Nuclear targeting of the serine protease granzyme A (fragmentin-1). *J Cell Sci.* 111:2645-2654.

**Jans DA, Jans P, Briggs LJ, Sutton V, and Trapani JA.** (1996). Nuclear transport of granzyme B (fragmentin-2). Dependence of perforin in vivo and cytosolic factors in vitro. *J Biol Chem.* 271:30781-30789.

**Jarrett WF, Martin WB, Crighton GW, Dalton RG, and Stewart MF.** (1964). Transmission Experiments with Leukemia (Lymphosarkoma). *Nature.* 202:566-567.

**Jenne DE and Tschopp J.** (1988). Granzymes, a family of serine proteases released from granules of cytolytic T lymphocytes upon T cell receptor stimulation. *Immunol Rev.* 103:53-71.

**Kabat D.** (1989). Molecular biology of Friend viral erythroleukemia. *Curr Top Microbiol Immunol.* 148:1-42.

**Kägi D, Ledermann B, Burki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, Podack ER, Zinkernagel RM, and Hengartner H,** (1994b). Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature.* 369:31-37.

**Kägi D, Ledermann B, Bürki K, Zinkernagel RM, and Hengartner H.** (1995a). Lymphocyte-mediated cytotoxicity in vitro and in vivo: Mechanisms and significance. *Immunol Rev.* 146:95-115.

**Kägi D, Ledermann B, Bürki K, Zinkernagel RM, and Hengartner H.** (1996). Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu Rev Immunol.* 14:207-232.

**Kägi D, Seiler P, Pavlovic P, Ledermann B, Bürki K, Zinkernagel RM, and Hengartner H.** (1995b). The roles of perforin- and fas-dependent cytotoxicity in protection against cytopathic and non cytopathic viruses. *Euro J Immunol.* 25:3256-3262.

**Kägi D, Vignaux F, Ledermann B, Burki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, and Golstein PI.** (1994a). Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science.* 265:528-530.

- Kaplan D and Sieg S.** (1998). Role of the Fas/Fas ligand apoptotic pathway in human immunodeficiency virus type 1 disease. *J Virol.* 72:6279-6282.
- Kern DE, Klarnet JP, Jensen MC, and Greenberg PD.** (1986). Requirement for recognition of class II molecules and processed tumor antigens for optimal generation of syngeneic tumor-specific class I-restricted CTL. *J Immunol.* 136:4303-4311.
- Kinter A.L, Hennessey M, Bell A, Kern S, Lin Y, Daucher M, Planta M, McGlaughlin M, Jackson R, Ziegler SF, and Fauci AS.** (2004). CD25+CD4+ Regulatory T Cells from the Peripheral Blood of Asymptomatic HIV-infected Individuals Regulate CD4+ and CD8+ HIV-specific T Cell Immune Responses In Vitro and Are Associated with Favorable Clinical Markers of Disease Status. *J Exp Med.* 2003-2009.
- Kitagawa M, Matsubara O, and Kasuga T.** (1986). Dynamics of lymphocytic subpopulations in Friend leukemia virus-induced leukemia. *Cancer Res.* 46:3034-3039.
- Kong LI, Lee SW, Kappes JC, Parkin JS, Decker D, Hoxie JA, Hahn BH, and Shaw GM.** (1988). West African HIV-2-related human retrovirus with attenuated cytopathicity. *Science.* 240:1525-1529.
- Konig R, Huang LY, and Germain RN.** (1992). MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature.* 356:796-798.
- Koopman G, Wever PC, Ramkema MD, Bellot F, Reiss P, Keehnen RM, Ten Berge IJ, and Pals ST.** (1997). Expression of granzyme B by cytotoxic T lymphocytes in the lymph nodes of HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 13:227-233.
- Kost TA, Koury MJ, and Krantz SB.** (1981). Mature erythroid burst-forming units are target cells for Friend virus-induced erythroid bursts. *Virology.* 108:309-317.
- Koziel MJ, Dudley D, Wong JT, Diensta, J, Houghton M, Ralston R, and Walker BD.** (1992). Intrahepatic cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus in persons with chronic hepatitis. *J Immunol.* 149:3339-3344.
- Krammer PH.** (1999). CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol.* 71:163-210.
- Lander R, and Chattopadhyay SK.** (1984). A Mus dunni cell line that lacks sequences closely related to endogenous murine leukemia viruses and can be infected by ectropic, amphotropic, xenotropic, and mink cell focus-forming viruses. *J Virol.* 52:695-698.
- Letvin NL, Schmitz JE, Jordan HL, Seth A, Hirsch VM, Reimann KA, and Kuroda MJ,** (1999). Cytotoxic T lymphocytes specific for the simian immunodeficiency virus. *Immunol Rev.* 170:127-134.
- Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM. and Oshiro LS.** (1984). Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science.* 225:840-842.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, and Yuan J,** (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 94:491-502.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, and Wang X.** (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 91:479-486.

- Liang B, Wang JY, and Watson RR.** (1996). Murine AIDS, a key to understanding retrovirus-induced immunodeficiency. *Viral Immunol.* 9:225-239.
- Lieberman J, Shankar P, Manjunath N, and Andersson J.** (2001). Dressed to kill? A review of why antiviral CD8 T lymphocytes fail to prevent progressive immunodeficiency in HIV-1 infection. *Blood.* 98:1667-1677.
- Lin CY, Graca L, Cobbold SP, and Waldmann H.** (2002). Dominant transplantation tolerance impairs CD8+ T cell function but not expansion. *Nat Immunol.* 3:1208-1213.
- Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J.** (1994). Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature.* 370:650-652.
- Lucas M, Karrer U, Lucas A, and Klenerman P.** (2001). Viral escape mechanisms--escapology taught by viruses. *Int J Exp Pathol.* 82:269-286.
- Lucas M, Vargas-Cuero AL, Lauer GM, Barnes E, Willberg CB, Semmo N, Walker BD, Phillips R, and Klenerman P.** (2004). Pervasive influence of hepatitis C virus on the phenotype of antiviral CD8+ T cells. *J Immunol.* 172:744-753.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, and Wang X.** (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 94:481-486.
- MacDonald AJ, Duffy M, Brady MT, McKiernan S, Hall W, Hegarty J, Curry M, and Mills KH.** (2002). CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons. *J Infect Dis.* 185:720-727.
- Mahalingam S and Karupiah G.** (1999). Chemokines and chemokine receptors in infectious diseases. *Immunol Cell Biol.* 77:469-475.
- Mahalingam S and Karupiah G.** (2000). Chemokine modulation by poxvirus infection. *Curr Opin Immunol.* 12:409-412.
- McMichael AJ and Rowland-Jones SL.** Cellular immune responses to HIV. (2001). *Nature.* 410:980-987.
- Medema JP, Toes RE, Scaffidi C, Zheng TS, Flavell RA, Melief CJ, Peter ME, Offringa R, and Krammer PH.** (1997). Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis. *Eur J Immunol.* 27:3492-3498.
- Metkar SS, Wang B, Aguilar-Santelises M, Raja SM, Uhlin-Hansen L, Podack E, Trapani JA, and Froelich CJ.** (2002). Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity.* 164:417-428.
- Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, Sabbaghian MS, Rabin R, Hallahan CW, Van Baarle D, Kostense S, Miedema F, McLaughlin M, Ehler L, Metcalf J, Liu S, and Connors M.** (2002). HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat Immunol.* 3:1061-1068.
- Millard PJ, Henkart MP, Reynolds CW, and Henkart PA.** (1984). Purification and properties of cytoplasmic granules from cytotoxic rat LGL tumors. *J Immunol.* 132:3197-204.

- Miyazawa M, Fujisawa R, Ishihara C, Takei YA, Shimizu T, Uenishi H, Yamagishi H, and Kuribayashi K.** (1995). Immunization with a single T helper cell epitope abrogates Friend virus-induced early erythroid proliferation and prevents late leukemia development. *J Immunol.* 155:748-758.
- Miyazawa M, Nishio J, and Chesebro B.** (1988). Genetic control of T cell responsiveness to the Friend murine leukemia virus envelope antigen. Identification of class II loci of the H-2 as immune response genes. *J Exp Med.* 168:1587-1605.
- Modrow S and Falke D.** (1998). Molekulare Virologie, Spektrum Verlag.
- Moloney, J.B.** (1960). Biological studies on a lymphoid leukemia virus extracted from sacroma 537 I. Origin and introductory investigations. *J Natl Cancer Inst.* 24:933-940.
- Moskophidis D, Assmann-Wischer U, Simon MM, and Lehmann-Grube F.** (1987). The immune response of the mouse to lymphocytic choriomeningitis virus. V. High numbers of cytolytic T lymphocytes are generated in the spleen during acute infection. *Eur J Immunol.* 17:937-942
- Mosmann TR and Coffman RL.** (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 7:145-173.
- Motyka B, Korbitt G, Pinkoski MJ, Heibin JA, Caputo A, Hobman M, Barry M, Shostak I, Sawchuk T, Holmes CF, Gaudie J, and Bleackley RC.** (2000). Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell.* 103:491-500.
- Müllbacher A, Ebnet K, Blanden RV, Hla RT, Stehle T, Museteanu C, and Simon MM.** (1996). Granzyme A is critical for recovery of mice from infection with the natural cytopathic viral pathogen, ectromelia. *Proc Natl Acad Sc. U S A.* 93:5783-5687.
- Müllbacher A, Hla RT, Museteanu C, and Simon MM.** (1999a). Perforin is essential for control of ectromelia virus but not related poxviruses in mice. *J Virol.* 73:1665-1667.
- Müllbacher A, Lobigs M, Hla RT, Tran T, Stehle T, and Simon MM.** (2002). Antigen-dependent release of IFN-gamma by cytotoxic T cells up-regulates Fas on target cells and facilitates exocytosis-independent specific target cell lysis. *J Immunol.* 169:145-150.
- Müllbacher A, Tha Hla R, Museteanu C, and Simon MM.** (1999b). Perforin is essential for the control of ectromelia virus but not related poxviruses in mice. *J. Virol.* 73:1665-1667.
- Murray LJ, Lee R, and Martens C.** (1990). In vivo cytokine gene expression in T cell subsets of the autoimmune MRL/Mp-lpr/lpr mouse. *Eur J Immunol.* 20:163-170.
- Nagata S.** (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res.* 256:12-18.
- Nagata S and P. Golstein.** (1995). The Fas Death Factor. *Science.* 267:1449-1456.
- Nagata S.** Apoptosis by death factor. (1997). *Cell.* 88:355-365.
- Nakamura K, Yuh K, Sugyo S, Shijo H, Kimura N, and Okumura M.** (1996). Apoptosis observed in peripheral T lymphocytes from patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology.* 111:156-164.
- Nickell SP and Sharma D.** (2000). Trypanosoma cruzi: roles for perforin-dependent and perforin-independent immune mechanisms in acute resistance. *Exp Parasitol.* 94:207-216.

- Nunez G, Benedict MA, Hu Y, and Inohara N.** (1998). Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*. 17: 3237-3245
- O'Connor D, Friedrich T, Hughes A, Allen TM, and Watkins D.** (2001). Understanding cytotoxic T-lymphocyte escape during simian immunodeficiency virus infection. *Immunol Rev*. 18:115-126.
- Ohshima K, Suzumiya J, Sugihara M, Nagafuchi S, Ohga S, and Kikuchi M.** (1999). CD95 (Fas) ligand expression of Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocytes: a possible mechanism of immune evasion in chronic active EBV infection. *Pathol Int*. 49:9-13
- Olbrich A.** (2003) Die Rolle von bakteriellen DNA-Sequenzen (CpG) bei der Immuntherapie von retroviralen Infektionen. *Dissertation*
- Oldstone MB.** (1997) How viruses escape from cytotoxic T lymphocytes: molecular parameters and players. *Virology*. 237:166-178.
- Par G, Rukavina D, Podack E. R, Horanyi M, Szekeres-Bartho J, Hegedus G, Paal M, Szereday L, Mozsik G, and Par A.** (2002). Decrease in CD3-negative-CD8dim(+) and Vdelta2/Vgamma9 TcR+ peripheral blood lymphocyte counts, low perforin expression and the impairment of natural killer cell activity is associated with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 37:514-522.
- Pereira RA, Simon MM, and Simmons A.** (2000) Granzyme A, a noncytolytic component of CD8(+) cell granules, restricts the spread of herpes simplex virus in the peripheral nervous systems of experimentally infected mice. *J Virol*. 74:1029-1032
- Persons DA, Paulson RF, Loyd MR, Herley MT, Bodner SM, Bernstein A, Correll PH, and Ney PA.** (1999). Fv2 encodes a truncated form of the Stk receptor tyrosine kinase. *Nature Genetics*. 23:159-165.
- Peterson KE, Iwashiro M, Hasenkrug KJ, and Chesebro B.** (2000). Major histocompatibility complex class I gene controls the generation of gamma interferon-producing CD4(+) and CD8(+) T cells important for recovery from friend retrovirus-induced leukemia. *J Virol*. 74:5363-5367.
- Peyerl FW, Barouch DH, and Letvin NL.** (2004). Structural constraints on viral escape from HIV- and SIV-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Viral Immunol*. 17:144-151.
- Pinkoski MJ, Hobman M, Heibein JA, Tomaselli K, Li F, Seth P, Froelich CJ, and Bleackley RC.** (1998). Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B- perforin-mediated apoptosis. *Blood*. 92:1044-1054.
- Pinkoski MJ, Waterhouse NJ, Heibein JA, Wolf BB, Kuwana T, Goldstein JC, Newmeyer DD, Bleackley RC, and Green DR.** (2001). Granzyme B-mediated apoptosis proceeds predominantly through a Bcl-2- inhibitable mitochondrial pathway. *J Biol Chem*. 276:12060-12067.
- Podack ER and Dennert G.** (1983). Assembly of two types of tubules with putative cytolytic function by cloned natural killer cells. *Nature*. 302:442-445.
- Podack ER, Hengartner H, and Lichtenheld MG.** (1991). A central role of perforin in cytotoxicity? *Annu. Rev. Immunol*. 9:129-157.

**Podack ER, Lowrey DM, Lichtenheld M, Olsen KJ, Aebischer T, Binder D, Rupp F, and Hengartner H.** (1988). Structure, function and expression of murine and human perforin 1 (P1). *Immunol Rev.* 103:203-211.

**Poe M, Blake JT, Boulton DA, Gammon M, Sigal NH, Wu JK, and Zweerink HJ.** (1991). Human cytotoxic lymphocyte granzyme B. Its purification from granules and the characterization of substrate and inhibitor specificity. *J Biol Chem.* 266:98-103.

**Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, and Gallo, RC.** (1984). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science.* 224:497-500.

**Portnoy DA, Schreiber RD, Connelly P, and Tilney LG.** (1989). Gamma interferon limits access of *Listeria monocytogenes* to the macrophage cytoplasm. *J Exp Med.* 170:2141-146.

**Price DA, Klenerman P, Booth BL, Phillips RE, and Sewell AK.** (1999). Cytotoxic T lymphocytes, chemokines and antiviral immunity. *Immunol Today.* 20:212-126.

**Quan LT, Tewari M, O'Rourke K, Dixit V, Snipas SJ, Poirier GG, Ray C, Pickup DJ, and Salvesen GS.** (1996). Proteolytic activation of the cell death protease Yama/CPP32 by granzyme B. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:1972-1976.

**Raftery MJ, Schwab M, Eibert SM, Samstag Y, Walczak H, and Schonrich G.** (2001). Targeting the function of mature dendritic cells by human cytomegalovirus: a multilayered viral defense strategy. *Immunity.* 15:997-1009

**Ramshaw IA, Ramsay AJ, Karupiah G, Rolph MS, Mahalingam S, and Ruby JC.** (1997). Cytokines and immunity to viral infections. *Immunol Rev.* 159:119-135.

**Rauscher F.** (1962). A virus-induced disease of mice characterized by erythropoiesis and lymphoid leukemia. *J Natl Cancer Inst.* 192:515-543.

**Riera L, Gariglio M, Valente G, Mullbacher A, Museteanu C, Landolfo S, and Simon MM.** (2000). Murine cytomegalovirus replication in salivary glands is controlled by both perforin and granzymes during acute infection. *Eur. J. Immunol.* 30:1350-1355.

**Robertson M, Miyazawa M, Mori S, Caughey B, Evans LH, Hayes SF, and Chesebro B.** (1991). 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. Methodes.* 34:255-271.

**Rossi CP, McAllister A, Tanguy M, Kagi D, and Brahic M.** (1998). Theiler's virus infection of perforin-deficient mice. *J Virol.* 72:4515-4519.

**Roths JB, Murphy ED, and Eicher EM.** (1984). A new mutation, *gld*, that produces lymphoproliferation and autoimmunity in C3H/HeJ mice. *J Exp Med.* 159:1-20.

**Rous P.** (1911). A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J Exp Med.* 13:397-399.

**Rouvier E, Luciani MF, and Golstein P.** (1993). Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J Exp Med.* 177:195-200.

**Rowland-Jones SL, Pinheiro S, Kaul R, Hansasuta P, Gillespie G, Dong T, Plummer FA, Bwayo JB, Fidler S, Weber J, McMichael A, and Appay V.** (2001). How important is the 'quality' of the cytotoxic T lymphocyte (CTL) response in protection against HIV infection? *Immunol Lett.* 79:15-20.

**Ruscetti SK.** (1995). Erythroleukaemia induction by the Friend spleen focus-forming virus. *Baillieres Clin. Haematol.* 8:225-247.

**Sakai JA, Nagai M, Brennan MB, Mora CA, and Jacobson S.** (2001). In vitro spontaneous lymphoproliferation in patients with human T-cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease: predominant expansion of CD8<sup>+</sup> T cells. *Blood.* 98:1506-1511.

**Sayers TJ, Brooks AD, Ward JM, Hoshino T, Bere WE, Wiegand GW, Kelley JM, and Smyth MJ.** (2001). The restricted expression of granzyme M in human lymphocytes. *J Immunol.* 166:765-771.

**Schepers K, Toebes M, Sotthwes G, Vyth-Dreese FA, DelleMijn TAM, Melief CJM, Ossendrop F, and Schumacher TNM.** (2002). Differential kinetics of antigen-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses in the regression of retrovirus-induced sarcomas. *J Immunol.* 169:3191-3199.

**Schumm M, Lang P, Taylor G, Kuci S, Klingebiel T, Buhning HJ, Geiselhart A, Niethammer D, Handgretinger R.** (1999). Isolation of highly purified autologous and allogeneic peripheral CD34<sup>+</sup> cells using the CliniMACS device. *J Hematother.* 8:209-218.

**Scott P and Trinchieri G.** (1995). The role of natural killer cells in host-parasite interactions. *Curr Opin Immunol.* 7:34-40.

**Seder RA, and Paul WE.** (1994). Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4<sup>+</sup> T cells. *Annu Rev Immunol.* 12:635-673.

**Seko Y, Kayagaki N, Seino K, Yagita H, Okumura K, and Nagai R.** (2002). Role of Fas/FasL pathway in the activation of infiltrating cells in murine acute myocarditis caused by Coxsackievirus B3. *J Am Coll Cardiol.* 39:1399-1403.

**Sharma K, Wang RX, Zhang LY, Yin DL, Luo XY, Solomon JC, Jiang RF, Markos K, Davidson W, Scott DW, and Shi YF.** (2000). Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand *Pharmacol Ther.* 88:333-347.

**Shi L, Chen G, MacDonald G, Bergeron L, Li H, Miura M, Rotello RJ, Miller DK, Li P, Seshadri T, Yuan J, and Greenberg AH.** (1996). Activation of an interleukin 1 converting enzyme-dependent apoptosis pathway by granzyme B. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:11002-11007.

**Shi L, Kam C-M, Powers JC, Aebersold R, and Greenberg AH.** (1992a). Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions. *J Exp Med.* 176:1521-1529.

**Shi L, Kraut RP, Aebersold R, and Greenberg AH.** (1992b). A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis. *J Exp Med.* 175:553-566.

**Shi L, Mai S, Israels S, Browne K, Trapani JA, and Greenberg AH.** (1997). Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear localization. *J Exp Med.* 185:855-866.



**Shresta S, Graubert TA, Thomas DA, Raptis SZ, and Ley TJ.** (1999). Granzyme A initiates an alternative pathway for granule-mediated apoptosis. *Immunity*. 10:595-605.

**Shresta S, Heusel JW, Macivor DM, Wesselschmidt RL, Russell JH, and Ley TJ.** (1995). Granzyme B plays a critical role in cytotoxic lymphocyte-induced apoptosis. *Immunol Rev*. 146:211-221.

**Simon HG, Fruth U, Kramer MD, and Simon MM.** (1987). A secretable serine proteinase with highly restricted specificity from cytolytic T lymphocytes inactivates retrovirus-associated reverse transcriptase. *FEBS Lett*. 223:352-360.

**Simon MM and Kramer MD.** (1994). Granzyme A. *Methods Enzymol*. 244:68-79.

**Simon MM, Hausmann M, Tran T, Ebnet K, Tschopp J, ThaHla R, and Mullbacher A.** (1997). In vitro- and ex vivo-derived cytolytic leukocytes from granzyme A x B double knockout mice are defective in granule-mediated apoptosis but not lysis of target cells. *J Exp Med*. 186:1781-1786.

**Simon MM, Hoschützky H, Fruth U, Simon H-G, and Kramer MD.** 1986. Purification and characterization of a T cell specific serine proteinase (TSP-1) from cloned cytolytic T lymphocytes. *EMBO J*. 5:3267-3274.

**Simon MM, Waring P, Lobigs M, Nil A, Tran T, Hla RT, Chin S, and Mullbacher A.** (2000). Cytotoxic T cells specifically induce Fas on target cells, thereby facilitating exocytosis-independent induction of apoptosis. *J Immunol*. 165:3663-3672.

**Sourvinos G, Tsatsanis C, and Spandidos DA.** (2000). Mechanisms of retrovirus-induced oncogenesis. *Folia. Biol. (Praha)* 46:226-232.

**Stalder T, Hahn S, and Erb P.** (1994). Fas antigen is the major target molecule for CD4+ T cell-mediated cytotoxicity *J Immunol*. 152:1127-1133

**Stevens TL, Bossie A, Sanders VM, Fernandez-Botran R, Coffman RL, Mosmann TR, and Vitetta ES.** (1988). Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature*. 334:255-8.

**Stoye JP.** (1998). Fv1, the mouse retrovirus resistance gene. *Rev Sci Tech*. 17:269-277.

**Stromnes IM, Dittmer U, Schumacher TN, Schepers K, Messer RJ, Evans LH, Peterson, KE, Race B. and Hasenkrug KJ.** (2002). Temporal effects of gamma interferon deficiency on the course of Friend retrovirus infection in mice. *J Virol*. 76:2225-2232.

**Sutton VR, Davis JE, Cancilla M, Johnstone RW, Ruefli AA, Sedelies K, Browne KA, and Trapani JA.** (2000). Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *J Exp. Med*. 192:1403-14.

**Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland N.G, Suda T, and Nagata S.** (1994). Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell*. 76:969-976.

**Tang Y, Hugin AW, Giese NA, Gabriele L, Chattopadhyay SK, Fredrickson TN, Kagi D, Hartley JW, and Morse HC.** 3rd. (1997). Control of immunodeficiency and lymphoproliferation in mouse AIDS: studies of mice deficient in CD8+ T cells or perforin. *J Virol*. 71:1808-1813.

- Tateyama M, Oyaizu N, McCloskey TW, Than S, and Pahwa S.** (2000). CD4 T lymphocytes are primed to express Fas ligand by CD4 cross-linking and to contribute to CD8 T-cell apoptosis via Fas/FasL death signaling pathway. *Blood*. 96:195-202.
- Thomas DA, Du C, Xu M, Wang X, and Ley T.J.** (2000). DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis. *Immunity*. 12:621-632.
- Timonen T, Ortaldo JR, and Herberman RB.** (1981). Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells. *J Exp Med*. 1;153:569-82.
- Toyoshima K and Vogt PK.** (1969). Enhancement and inhibition of avian sarcoma viruses by polycations and polyanions. *Virology*. 38:414-26.
- Trapani JA.** (2001). Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biol*. 2:3014-3022.
- Trimble LA, and Lieberman J.** (1998). Circulating CD8 T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals have impaired function and downmodulate CD3 zeta, the signaling chain of the T-cell receptor complex. *Blood*. 91:585-594.
- Tripp CS, Wolf SF, and Unanue ER.** (1993). Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist *Proc Natl Acad Sci USA*. 90:3725-3729.
- Tschopp J.** (1994). Granzyme B. *Methods Enzymol*. 244:80-87.
- Tschopp, J, S. Schafer, D. Masson, M.C. Peitsch, and C. Heusser.** (1989). Phosphorylcholine acts as a Ca<sup>2+</sup>-dependent receptor molecule for lymphocyte perforin. *Nature*. 337:272-274.
- Urbani S, Boni C, Missale G, Elia G, Cavallo C, Massari M, Raimondo G, and Ferrari C.** (2002). Virus-specific CD8+ lymphocytes share the same effector-memory phenotype but exhibit functional differences in acute hepatitis B and C. *J Virol*. 76:12423-12434.
- Van der Gaag HC, and Axelrad AA.** (1990). Friend virus replication in normal and immunosuppressed C57BL/6 mice. *Virology*. 177:837-839.
- Wagner L, Yang OO, Garcia-Zepeda EA, Ge Y, Kalams SA, Walker BD, Pasternack MS, and Luster AD.** (1998). Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. *Nature*. 391:908-911.
- Wallach EE, Varfolomeev NL, Malinin YV, Goltsev AV, Kovalenko M, and Boldin P.** (1999). Tumor Necrosis Factor Receptor and Fas Signaling Mechanisms. *Annual Review of Immunology*. 17:331-367.
- Walsh CM, Matloubian M, Liu CC, Ueda R, Kurahara CG, Christensen JL, Huang MT, Young JD, Ahmed R, and Clark WR.** Immune function in mice lacking the perforin gene. (1994). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:10854-10858.
- Waterhouse NJ and Trapani JA.** (2002) CTL: Caspases Terminate Life, but that's not the whole story. *Tissue Antigens*. 59:175-178.
- Weiss L, Donkova-Petrini V, Caccavelli L, Balbo M, Carbonneil C, and Levy Y.** (2004). Human immunodeficiency virus-driven expansion of CD4+CD25+ Regulatory T cells Which

Suppress HIV-specific CD4 T-cell Responses in HIV-infected Patients. *Blood*. 104:3249-3256

**Wong DK, Dudley DD, Dohrenwend PB, Lauer GM, Chung RT, Thomas DL, and Walker BD.** (2001). Detection of diverse hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T lymphocytes in peripheral blood of infected persons by screening for responses to all translated proteins of HCV. *J Virol*. 75:1229-1235.

**Wyllie AH.** (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 284:555-556.

**Young, JD-E, Leong LG, Liu C-C, Damiano A, Wall DA, and Cohn ZA.** (1986). Isolation and Characterization of a Serine Esterase from Cytolytic T Cell Granules. *Cell*. 47:183-194.

**Zajac AJ, Dye JM, and Quinn DG.** (2003). Control of lymphocytic choriomeningitis virus infection in granzyme B deficient mice. *Virology*. 305:1-9.

**Zajac AJ, Quinn DG, Cohen PL, and Frelinger JA.** (1996). Fas-dependent CD4+ cytotoxic T-cell-mediated pathogenesis during virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:14730-14735.

**Zhang, D, Beresford P.J, Greenberg A.H, and Lieberman J.** (2001). Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granule-mediated cytolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:5746-5751.

**Zinkernagel RM and Doherty PC.** (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*. 248:701-702.

**Zinkernagel RM, Haenseler E, Leist T, Cerny A, Hengartner H, and Althage A.** (1986). T cell-mediated hepatitis in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus. Liver cell destruction by H-2 class I-restricted virus-specific cytotoxic T cells as a physiological correlate of the 51-Cr-release assay? *J Exp Med*. 164:1075-1092.

**Zinkernagel RM.** (1974). Restriction by H-2 gene complex of transfer of cell-mediated immunity to *Listeria monocytogenes*. *Nature*. 251:230-233.

## 7 Anhang

### 7.1 Zusammenfassung

Zytotoxische T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) spielen eine wichtige Rolle bei retroviralen Infektionen des Menschen, wie HIV und HTLV. Ihre molekulare Wirkweise war bisher aber nicht bekannt. Die Infektion von Mäusen mit dem retroviralen Friend Virus Komplex (FV) wurde daher als Modell verwendet, um die antiviralen Mechanismen gegen Retroviren aufzuklären. Als erstens wurde die Beteiligung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei der Kontrolle der FV Infektion in Depletion-Experimenten gezeigt. In akut FV infizierten Tieren konnten außerdem aktivierte Virus-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen nachgewiesen werden, welche zytotoxische Moleküle produzierten. Die Infektion von „knockout“ Mäusen ergab, dass die CD8<sup>+</sup> T-Zellen hauptsächlich den Exozytoseweg benutzten, um FV-infizierte Zellen zu eliminieren. Die Anwesenheit eines der drei am Exozytoseweg beteiligten zytotoxischen Moleküle Perforin, Granzym A oder Granzym B war in der akuten Phase der Infektion ausreichend, um die Virusreplikation zu kontrollieren. Diese Ergebnisse weisen auf neue molekulare Mechanismen von Granzymen bei der Virusabwehr hin.

In Gegensatz zur Abwehr des pathogenen FV Komplex benutzten CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht den Exozytoseweg zur Abwehr von apathogenen Retroviren. Eine Infektion von Mäusen mit dem nicht-pathogenen F-MuLV induzierte keine Produktion von zytotoxischen Molekülen in CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die Infektion von „knockout“ Mäusen zeigte, dass F-MuLV von CD8<sup>+</sup> T-Zellen über den Fas/FasL Weg kontrolliert wurde. Das pathogene Potential von Retroviren scheint also einen Einfluß auf den jeweils verwendeten Abwehrmechanismus von zytotoxischen T-Zellen zu haben.

Trotz der wichtigen Funktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei der Kontrolle der akuten FV Infektion, spielten diese Zellen bei der persistierenden Infektion keine Rolle mehr. Die Untersuchungen von aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus persistierend infizierten Mäusen zeigte, dass die Zellen agranulär waren und keine zytotoxischen Moleküle produzierten. Folglich hatten sie auch keine zytotoxische Aktivität *in vitro*. Der Exozytoseweg von Virus-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen war also in der persistierenden FV Infektion gestört. So entwickelten viele persistierend infizierte Tiere nach einer Reinfektion eine Splenomegalie, was zusätzlich beweist, dass die Funktion von Virus-

spezifischen T-Zellen auch *in vivo* gestört war. Mäuse, die chronisch mit FV infiziert waren, wiesen also einen kompletten Funktionsverlust von CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf, der offensichtlich eine wichtige Voraussetzung für die Persistenz des Virus darstellt. Da die CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht mehr funktionell waren, mussten vermutlich CD4<sup>+</sup> T-Zellen über den Fas/FasL-Weg die Kontrolle über die chronische Infektion übernehmen. Das Verständnis der molekularen Mechanismen der CD8<sup>+</sup> T-Zell Abwehr gegen Retroviren ermöglicht es neue Strategien der Immuntherapie gegen retrovirale Infektionen zu entwickeln.

## 7.2 Summary

Cytotoxic T-cells play an important role in the control of retroviral infections such as HIV and HTLV; however the molecular mechanisms used by these cells is not known. We used the infection of mice with the retroviral Friend Virus complex as model to investigate the antiviral mechanisms of CD8<sup>+</sup> T-cells. The participation of CD8<sup>+</sup> T-cells in the control FV infection was shown in depletion experiments. Activated virus-specific CD8<sup>+</sup> T-cells were found in acutely FV infected animals and these cells produced cytotoxic molecules. The infection of knockout mice indicated that CD8<sup>+</sup> T-cells eliminated infected cells via the exocytosis pathway. The presence of one of these three molecules involved in the exocytosis pathway (perforin, granzyme A or granzyme B) was sufficient to control virus-replication. These results suggest new molecular mechanisms of granzyme in the defence against retroviral infection.

In contrast to the control of pathogenic FV complex, CD8<sup>+</sup> T-cells do not need the exocytosis pathway to respond to non-pathogenic retroviruses. The infection of mice with non-pathogenic F-MuLV did not induce the production of cytotoxic molecules in CD8<sup>+</sup> T-cells and knockout mice with defects in perforin, granzyme A and granzyme B were not susceptible to F-MuLV infection. In contrast, knockout mice with defect in the Fas/FasL pathway were unable to control virus-replication. These data indicate that CD8<sup>+</sup> T-cells used the Fas/FasL pathway to control non-pathogenic retroviruses whereas the exocytosis pathway was crucial to keep pathogenic retroviruses in check. The establishment of chronic Friend virus infections is enabled by the induction of CD4<sup>+</sup> regulatory T cells that impair CD8<sup>+</sup> T-cell functions and allow the virus to escape (Dittmer *et al.*, 2004). The current study characterizes this CD8<sup>+</sup> T-cell dysfunction by analyzing the production and release of cytolytic molecules by virus-specific CD8<sup>+</sup> T-cells. During acute infection, FV-specific CD8<sup>+</sup> T cells produced the cytotoxic molecules perforin and granzyme B, and actively degranulated cytotoxic granules. In contrast, CD8<sup>+</sup> T cells of the same specificity from chronically infected mice neither produced any of these cytotoxic molecules nor showed evidence of degranulation. The defect in cytotoxine production in T cells from persistently infected mice did not occur at the level of transcription as both CD8<sup>+</sup> T-cells from acutely and persistently infected animals had equal levels of mRNA for perforin and granzyme. CD8<sup>+</sup> T-cells from persistently infected mice were unable to induce apoptosis in target cells. These

results demonstrate a broad impairment of cytolytic CD8<sup>+</sup> T-cell effector functions associated with chronic retroviral infection.

### 7.3 Abkürzungen

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
μ	Mikro
α	anti
°C	Grad Celsius
3H	Tritium
Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol
AIDS	"acquired immunodeficiency syndrom"
AK	Antikörper
Apaf-1	„apoptotic protease activating factor 1“
APC	antigenpräsentierende Zellen
APC-konjugiert	Allophycocyanin-konjugiert
APS	Ammoniumpersulfat
B6	C57BL/6
Bcl-2	B Cell Lymphoma/Leukemia-2
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
CAD	„CaspaseActivated Domain“
CARD	“Caspase Recruitment Domain”
CD	Lymphozytendifferenzierungsgruppe
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CpG-ODN	Oligodesoxynukleotide mit CpG-Motiv
cpm	2´-Desoxyadenosin-5´-triphosphat
CTL	zytotoxische T-Zellen
CyChr	Cy-Chrome
dATP	2´-Desoxyadenosin-5´-triphosphat
dest.	destilliert
DISC	Death Inducing Signaling complex (Todes Signal Komplex)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure



<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
Env	Hüllprotein
EV	Ectromelia Virus
FACS	"fluorescence activated cell scanner" (Durchflußzytometer)
FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
Fas	APO-1, CD95
FasL	CD95/L
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
F-MuLV	"Friend murine leukemia virus"
FV	Friend Virus
g	Gramm
Gag	Gruppenspezifisches Antigen
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gld	„generalized lymphoproliferative disease“
Gzm	Granzyme
HAART	"highly active antiretrovirale therapy"
HIV-1	"Human immunodeficiency virus typ 1"
HIV-2	"Human immunodeficiency virus typ 2"
HRP	Horse Radish Peroxidase
HTLV-1	"Human T-cell leukemia virus-1"
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICAD	„Inhibitor of Caspase-activated domain“
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kD	Kilo Dalton
LCMV	lymphozytären Choriomeningitis Virus
LPS	Lipopolysaccharide
LTR	"long terminal repeat "
MFI	Mittelwert der Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
MIP	„Macrophage Inflammatory Protein“
MuLV	„Murines Leukämievirus“
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OD	optische Dichte
ODN	Oligodeoxynukleotid
OPD	o-Phenylenediamine
PBS	„Phosphate Buffered Saline“
PE	Phycoerythrin
Perf	Perforin
pH	$-\log [H^+]$
PMA	Phorbol-12-Myristate 13-Acetate
Pol	Polymerase
RANTES	(acronym for Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and presumably Secreted
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SFFU	"Spleen focus forming units"
SFV	, Semliki Forest Virus
SIV	"Simian immunodeficiency virus"
TAE	Tris/Acetat/EDTA Puffer
Th	T-Helferzellen
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	tumor necrosis factor- $\alpha$
T <sub>R</sub>	regulatorische T-Zellen
U	Units
VSV	Vesikular Stomatitis Virus
Y.10-Mäuse	(B10xA.BY)F1-Generation

## 7.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Aufbau von Typ-C Retroviren bei Säugetieren am Beispiel von F-MuLV	3
Abbildung 1.2	Genomorganisation von Retroviren	4
Abbildung 1.3	Zytotoxische Mechanismen der T-Zellen	13
Abbildung 1.4	Zwei Signalwege der Fas/FasL-vermittelten Apoptose	19
Abbildung 1.5	Zeitlicher Verlauf der Viruslast und der Immunantwort nach einer FV-Infektion	21
Abbildung 1.6	Einteilung der unterschiedlichen Stadien einer Splenomegalie nach FV-Infektion	22
Abbildung 3.1	Schematische Darstellung des adoptiven Transfers von Milzzellen	35
Abbildung 4.1	Infektionsverlauf in FV-infizierten Mäusen nach NK, CD4 <sup>+</sup> T-Zell-, oder CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Depletion	47
Abbildung 4.2	Nachweis der Proliferation von T-Zellen in der akuten FV Infektion	49
Abbildung 4.3	Die phänotypische Charakterisierung der CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus uninfizierten und akut infizierten Mäusen	50
Abbildung 4.4	Nachweis von Granzym B in CD8 <sup>+</sup> T-Zellen von FV infizierten Mäusen	51
Abbildung 4.5	Analyse des zytotoxischen Potentials und der spezifischen Zytotoxizität von T-Zellen aus FV infizierten Mäusen	53
Abbildung 4.6	Prozentzahl D <sup>b</sup> -GagL-Tetramer <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in uninfizierten und 10 Tage FV-B infizierten Mäusen	54
Abbildung 4.7	Vergleich der akuten FV Infektion in Perforin, Granzym A, Granzym B, Fas oder FasL defizienten Mäusen	56
Abbildung 4.8	Transfer von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus Wildtyp-Mäusen und Perf $\times$ GzmA $\times$ B <sup>-/-</sup> Mäusen	57
Abbildung 4.9	Prozentzahl CD8 <sup>+</sup> /Tetramer <sup>+</sup> T-Zellen in B6 und Perf $\times$ GzmA $\times$ B <sup>-/-</sup> Mäusen nach FV Infektion	58
Abbildung 4.10	Milzgewicht, Prozentzahl von Erythroblastvorläuferzellen und Zahl der infizierten Milzzellen in F-MuLV-infizierten Mäusen	59

Abbildung 4.11	Die Zahl infizierter Milzzellen in F-MuLV infizierten Mäusen nach NK, CD4 <sup>+</sup> , oder CD8 <sup>+</sup> Zell-Depletion	60
Abbildung 4.12	Die phänotypische Charakterisierung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen aus uninfizierten und F-MuLV infizierten B6 Mäusen	61
Abbildung 4.13	Die phänotypische Charakterisierung von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus F-MuLV infizierten B6	62
Abbildung 4.14	Nachweis F-MuLV-spezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in F-MuLV infizierten Mäuse	63
Abbildung 4.15	Die Anzahl der F-MuLV infizierten Zellen in der Milz	64
Abbildung 4.16	Nachweis von Granzym B in CD8 <sup>+</sup> T-Zellen von F-MuLV infizierten Mäusen	65
Abbildung 4.17	Infektionsverlauf in akut und persistierend FV-infizierten Y10 Mäusen	66
Abbildung 4.18	Aktivierte, Virus-spezifische CD8 <sup>+</sup> Zellen in akut und persistierend infizierten Mäusen	67
Abbildung 4.19	Quantifizierung von mRNA für Perforin, Granzym A und Granzym B in CD8 <sup>+</sup> T-Zellen von akut und persistierend infizierten Mäusen	68
Abbildung 4.20	Granularität von CD8 <sup>+</sup> /CD43 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> /Teramer <sup>+</sup> T-Zellen aus akut und persistierend FV-infizierten Mäusen	69
Abbildung 4.21	Produktion und Sekretion von zytotoxischen Molekülen in CD8 <sup>+</sup> T Zellen aus akut und persistierend infizierten Mäusen	71
Abbildung 4.22	Produktion von Perforin und Granzym B in CD8 <sup>+</sup> /CD43 <sup>+</sup> T-Zellen	72
Abbildung 4.23	Degranulierungsmarker CD107a auf der Oberfläche von Virus-spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus akut und persistierend infizierten Mäusen	73
Abbildung 4.24	Zytolytische Aktivität der CD8 <sup>+</sup> T-Zellen von akut und persistierend infizierten Mäusen	74
Abbildung 4.25	Verlauf der persistierenden FV Infektion in Mäusen mit Defekten in zytotoxischen Funktionen	75
Abbildung 4.26	Krankheitsverlauf nach Reinfektion persistierend infizierter Mäuse	76

## 7.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Taxonomie der <i>Retroviridae</i>	5
Tabelle 1.2	Eigenschaften der Granzyme	16
Tabelle 1.3	Charakteristik der Mausstämme mit Defekten in der Produktion von zytotoxischen Molekülen	17
Tabelle 1.4	Zusammenfassung der verwendeten Mausstämme	23
Tabelle 2.1	Puffer und Medien	27
Tabelle 2.2	Antikörper für die Durchflußzytometrie	28
Tabelle 2.3	Charakterisierung der Fluorochrome	29
Tabelle 2.4	Sonstige Antikörper	29
Tabelle 2.5	Zell-Linien	31
Tabelle 3.1	Verwendung von Antikörpern für die Durchflußzytometrie	41
Tabelle 3.2	Master Mix für die Echtzeit-PCR	44
Tabelle 3.3	Einstellungen der Echtzeit-PCR Programme	45

## 7.6 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlichen Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben gesucht.

Essen, den

Gennadiy Zelinskyy

## 7.7 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Geboren am: 19.04.1970  
Geburtsort: Smotrisch, Ukraine  
Familienstand: getrennt lebend

### Schulbildung:

1977-1987 Mittelschule Nr.16, Kamenets-Podolski, Ukraine  
Abschluss Hochschulreife

### Studium:

09/1987-07/1994 Medizinisch-biologische Fakultät, Sibirische Medizinische Universität, Tomsk, Russland. Fach Biochemie. Schwerpunkt: Biochemie, Immunologie, Hämatologie. Abschluss 1994 mit Diplom als Biochemiker

10/1993-06/1994 Diplomarbeit an der Sibirischen Medizinischen Universität, Tomsk, Russland, Abteilung Klinische Allergologie und Immunologie  
Thema: Charakterisierung des Zustands von polymorphkernigen Leukozyten bei Kindern mit juveniler Arthritis

07/1994 Diplomprüfung  
07/1994 Abschluß: Diplom

### Berufspraxis:

12/1994–01/1996 Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei „Kammed“ Kamenets-Podolski. Ukraine

01/1996-06/2000 Wissenschaftlicher Assistent im Labor für Immunologie, Institut für Pädiatrie, Geburtshilfe und Gynäkologie, Akademie der medizinischen Wissenschaften der Ukraine

**Promotion:**

11/2001-10/2002            Promotionsstudium an der Bayrischen Julius-Maximilians  
Universität Würzburg, Institut für Virologie und  
Immunbiologie (Prof. Dr. Ulf Dittmer)

ab 11/2002                Promotionsstudium an der Universität Duisburg-Essen,  
Institut für Virologie (Prof. Dr. Ulf Dittmer)

Thema: Untersuchungen zur Rolle von zytotoxischen  
Molekülen bei der Immunabwehr gegen Retroviren

Essen, den

Gennadiy Zelinskyy



## 7.8 Publikationsliste

**Zelinskyy G, Schimmer S, Messer RJ, Hasenkrug KJ and Dittmer U.** Impairment of the exocytosis pathway in CD8+ T cells from mice persistently infected with Friend retrovirus. *Manuskript eingereicht.*

**Zelinskyy G, Balkow S, Schimmer S, Schepers K, Simon MM and Dittmer U.** (2004). Independent roles of perforin, granzymes, and Fas in the control of Friend retrovirus infection. *Virology.* 330:365-74.

**Chernyshov VP, Omelchenko LI, Treusch G, Vodyanik MA, Pochinok TV, Gumenyuk ME and Zelinsky GM** (2002) Up-regulation of interferon-gamma production by reduced glutathione, anthocyanine and L-cysteine treatment in children with allergic asthma and recurrent respiratory diseases. *Russ J Immunol.* 7:48-56

**Chernyshov V, Omelchenko L, Treusch G, Vodyanik M, Pochinok T, Gumenyuk M and Zelinsky G.** (2001). Disorders in mononuclear phagocytes and reduced glutathione and their correction in Chernobyl children with recurrent respiratory infections and chronic inflammatory focal lesions. *Adv Exp Med Biol.* 495:265-8.

**Chernyshov VP, Heusser P, Omelchenko LI, Chernyshova LI, Vodyanik MA, Vykhovanets EV, Galazyuk LV, Pochinok TV, Gaiday NV, Gumenyuk ME, Zelinsky GM, Schaefermeyer H and Schaefermeyer G.** (2000). Immunomodulatory and clinical effects of *Viscum album* (Iscador M and Iscador P) in children with recurrent respiratory infections as a result of the Chernobyl nuclear accident. *Am J Ther.* 7:195-203.

**Chernyshov V, Omelchenko L, Treusch G, Vodyanik M, Pochinok T, Gumenyuk M and Zelinsky G.** (2000). Immunological analysis of reduced glutathione, L-cysteine and anthocyanine effects in Chernobyl children with recurrent respiratory infections and chronic inflammatory focal lesions. *Centr Eur J Immunol.* 25: 137-145.

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Ulf Dittmer für die Betreuung meiner Promotion bedanken, besonders, für die Hilfestellungen, Anregungen und die Unterstützung bei dieser Arbeit.

Für die Bereitschaft, die Zweitkorrektur zu übernehmen, danke ich PD. Dr. Michael Kuhn, und für sein Interesse an diesem Projekt.

Bei Herrn Prof. Dr. Volker ter Meulen und Prof. Dr. Roggendorf bedanke ich mich für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes.

Bei unseren Kooperationspartnern Dr. Sandra Balkow, Prof. Dr. Markus Simon, Ronald Messer und Prof. Dr. Kim Hasenkrug, möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Bei allen Mitarbeitern unserer Gruppe für die gute und angenehme Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft, möchte ich mich bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Anke Kraft für ihr Interesse an der Entwicklung des Projektes, ihre Hilfestellung bei der Korrektur der Dissertation.

Mein Dank gilt Simone Schimmer für ihre praktische und technische Unterstützung im Labor.

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert. Dafür möchte ich mich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder, die mir mein Studium ermöglicht haben und auf deren Hilfe und Unterstützung ich mich immer verlassen konnte.

Von ganzen Herzen möchte ich Marina Mirau danken für Deine ständige Unterstützung und dass Du so viel Mut und Geduld hattest, die Arbeit zu lesen und zu korrigieren - Danke!