

Aus dem  
Robert Koch-Institut  
Amtierender Leiter: Professor Dr. rer. nat. Reinhard Burger  
und dem  
CharitéCentrum für diagnostische und präventive Labormedizin (CC 5)  
Institut für Medizinische Virologie  
Direktor: Professor Dr. med. Detlev H. Krüger

## **Habilitationsschrift**

# **Untersuchung immunmodulatorischer Gene des Ratten-Cytomegalovirus**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Experimentelle Virologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Sebastian Voigt

Eingereicht: 15. März 2010  
Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich  
1. Gutachter: Prof. Dr. med. Ulrich H. Koszinowski (München)  
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Florian Kern (Brighton)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b>	<b>3</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>4</b>
1.1 Das Cytomegalovirus: Klassifikation und Ätiologie	4
1.2 Epidemiologie	4
1.3 Pathogenese	5
1.4 Modellsysteme der CMV-Infektion	7
1.5 Molekulargenetik und Mutagenese von Cytomegaloviren	8
1.6 Immunmodulatorische Gene bei Cytomegaloviren	10
1.6.1 Blockade der Antigenpräsentation	10
1.6.2 Zytokine und Chemokine	11
1.6.3 Interaktion mit Natürlichen Killer-Zellen	14
<b>2. Resultate</b>	<b>17</b>
2.1 Charakterisierung eines RCMV C-Typ Lektin-Homologs	17
2.2 Inhibition von Natürlichen Killer-Zellen durch ein C-Typ Lektin-Homolog	18
2.3 Charakterisierung potentiell immunmodulatorischer RCMV Gene	20
2.4 Identifizierung eines neuen Betaherpesvirus der Hausmaus	21
2.5 RCMV IE1 ist nicht essentiell für die Latenzentstehung oder Reaktivierung	22
<b>3. Diskussion</b>	<b>24</b>
<b>4. Zusammenfassung</b>	<b>34</b>
<b>5. Literaturangaben</b>	<b>35</b>
<b>Danksagung</b>	<b>47</b>
<b>Erklärung</b>	<b>48</b>

## Abkürzungen

ATAC	Activation-induced, T cell-derived and chemokine-related
BAC	Bakterielles artifizielles Chromosom
Clec	C-type lectin domain family
Clr	C-type lectin related
CMV	Cytomegalovirus
ERGIC	Endoplasmatic Reticulum - cis-Golgi intermediate compartment
GPCR	G Protein-gekoppelter Rezeptor
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HHV	Humanes Herpesvirus
IE	Immediate early
iNOS	inducible nitric oxide synthase
KIR	Killer cell Ig-like receptor
LIR	Leukocyte Ig-like receptor
MCMV	Murines Cytomegalovirus
MHC	Major histocompatibility complex
MIC	MHC class I-related chain
MIE	Major immediate early
MULT-1	Murine UL16-binding protein-like transcript 1
ND10	Nuclear domain 10
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
PML	Promyelocytic leukemia protein
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
Rae-1	Retinoic acid inducible-1
RCMV-E	Ratten Cytomegalovirus England-Isolat
RCMV-M	Ratten Cytomegalovirus Maastricht-Isolat
SD	Sprague Dawley
TAP	Transporter associated with Antigen Processing
TLR	Toll-like receptor
UL	Unique long
ULBP	UL-binding protein
US	Unique short
WAG	Wistar Albino Glaxo

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Cytomegalovirus: Klassifikation und Ätiologie

Das Cytomegalovirus (CMV) ist ein doppelsträngiges DNA-Virus, das den *Betaherpesvirinae* zugeordnet wird. Es werden drei Genera unterschieden: das Genus *Cytomegalovirus* beinhaltet das humane CMV (HCMV; humanes Herpesvirus 5) und Cytomegaloviren verschiedener Primaten. Das Genus *Muromegalovirus* umfasst das murine CMV (MCMV) und das Ratten-CMV (RCMV), während die humanen Herpesviren HHV-6 und HHV-7 zu den *Roseoloviren* gehören. Die Betaherpesvirus-Klassifikation basiert auf biologischen Eigenschaften der Wirtsspezifität, der Dauer des Replikationszyklus sowie den durch die Virusinfektion hervorgerufenen zytopathischen Effekten. Letztere äußern sich in einer Zellvergrößerung mit intranukleären Einschlüssen, die bereits 1904 in Geweben von Kindern mit lebensbedrohlichen Infektionen beschrieben und im Nachhinein mit dem Begriff zytomegale Einschlusskrankheit (engl.: „cytomegalic inclusion disease“) charakterisiert wurden [1, 2]. 1921 beobachteten Goodpasture und Talbot zytomegale Zellen in den Parotiden von Meerschweinchen [3], und wenige Jahre danach gelang Cole und Kuttner der Nachweis einer spezies-spezifischen viralen Ätiologie, die zur Prägung des Begriffes Speicheldrüsenvirus (engl.: „salivary gland virus“) führte [4]. Margaret Smith isolierte 1954 murines CMV aus Explantaten infizierter Mäuse, das sie in murinen Fibroblasten propagieren konnte [5]. Kurz darauf wurde ebenfalls durch Smith und zwei andere Gruppen das humane CMV isoliert [6-8]. Der weit verbreitete HCMV Laborstamm AD169 geht auf diese Untersuchungen zurück. Den Begriff „Cytomegalovirus“ führten T. H. Weller et al. ein, um die durch die Infektion verursachten zellulären Veränderungen zu kennzeichnen [9].

## 1.2 Epidemiologie

Das humane Cytomegalovirus ist ein weltweit verbreiteter opportunistischer Krankheitserreger, der wie alle Herpesviren die Fähigkeit besitzt, in ein Latenzstadium überzutreten, und deshalb lebenslang im Körper persistiert. Das Virus wird durch direkten und indirekten Personenkontakt übertragen. Eine CMV-Infektion verläuft in der Regel symptomarm und geht ohne charakteristische

Krankheitszeichen einher. Als Übertragungsquelle dienen Blut, Körpersekrete wie Speichel, Genitalflüssigkeit und Urin, sowie Muttermilch. Die Infektion ist nicht von saisonalen Gegebenheiten abhängig, hingegen scheinen sozioökonomische Faktoren sowohl die vertikale (intrauterine) als auch die horizontale Infektionsrate zu beeinflussen. Die Seroprävalenz weist in Industrienationen eine deutliche Altersabhängigkeit auf und liegt bei ca. 40-60%, während in sehr bevölkerungsreichen Gebieten die Infektionsrate über 90% betragen kann [10, 11].

Das Cytomegalovirus verursacht mit einer Inzidenz zwischen 0.2 und 2.4% (Mittel ca. 1%) die meisten konnatalen Infektionen weltweit [12-14]. Das Virus wird im Wesentlichen auf zwei Wegen von der Mutter auf das Kind übertragen: Zum einen postnatal über die Muttermilch, wobei die Infektion gesunder, reifgeborener Kinder in der Regel komplikationslos und ohne Langzeitschäden verläuft; zum anderen durch die intrauterine Virustransmission nach Primärinfektion der seronegativen Schwangeren. Die Transmissionsrate nach Primärinfektion einer Schwangeren beträgt etwa 40-50% [15]. Die Gefahr der Virusübertragung auf ungeschützte Schwangere ist besonders in Kindertagesstätten vergleichsweise hoch, da das Virus im Urin ausgeschieden wird und insbesondere konnatal Infizierte das Virus intermittierend über Jahre im Urin ausscheiden können. Das Institute of Medicine (Washington, USA) hat bereits 2001 die Entwicklung eines Impfstoffes zur Vermeidung einer konnatalen CMV-Infektion als hohe Priorität eingestuft [16]. Bisher durchgeführte experimentelle Impfungen haben zwar Antikörper induziert, jedoch nicht zur Verminderung der CMV-Infektionsrate beigetragen [17]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie mit einer CMV-Glykoprotein B-Vakzine wurde eine Vakzine-Effizienz von 50% berichtet [18].

### **1.3 Pathogenese**

Das CMV ist ein zytopathisches, zell-assoziiertes Virus, das zu einer Zelllyse führt und sich, wie bereits beschrieben, in Form zytomegaler Einschlusskörper manifestiert. Die Infektion mit dem humanen CMV *in vitro* ist protrahiert, der Replikationszyklus liegt bei 36-48 Stunden. Es sind eine Vielzahl von HCMV-Isolaten bekannt, die sich genetisch unterscheiden und unterschiedliche Virulenz besitzen [19-22]. Diese genetische Varianz wirkt sich nicht nur auf den Zelltyp aus, den das Virus infiziert, sondern nimmt auch auf die Pathogenität Einfluss.

Die HCMV-Infektion verläuft bei immunkompetenten Individuen zumeist symptomarm. Bei Personen mit eingeschränkter Immunfunktion (Neugeborene, Patienten nach Stammzell- oder Organtransplantation) manifestiert sich die Infektion hingegen häufig an Organen wie Lunge, Leber, Augen, Ohren und dem Gehirn und führt bei diesen Personengruppen zu einer erheblichen Morbidität und Mortalität [23]. Bei diesen Patienten ist eine Intervention mit Ganciclovir zur Hemmung der viralen Replikation prinzipiell möglich, scheitert jedoch zuweilen an Mutationen im viralen Genom, die die Wirkung des Medikaments aufheben oder abschwächen [24-26]. Alternativ können Foscavir oder Cidofovir eingesetzt werden, die zwar nicht wie Ganciclovir myelotoxisch, dafür aber nephrotoxisch sind. Ausgehend von den Arbeiten von Riddell und Greenberg wurde die adoptive Immuntherapie als neue Option zur Behandlung von CMV-Infektionen (aber auch anderer Erreger wie z. B. Adenoviren oder Aspergillen) nach Transplantation etabliert [27-32]. Hierbei werden dem Transplantatempfänger Virus-spezifische Lymphozyten verabreicht, um eine Immunität möglichst schnell wieder herzustellen.

Medizinisch bedeutsam ist auch die konnatale CMV-Infektion, die bei Neugeborenen und Kleinkindern eine häufige Ursache für Langzeitfolgen wie Hör- und Sehschäden sowie Entwicklungsstörungen darstellt [12]. Eine intrauterine Infektion tritt bei ca. 30% der Schwangeren auf, die sich erstmalig mit CMV infizieren [33]. Frauen, die bereits vor Beginn der Schwangerschaft seropositiv waren, übertragen das Virus in nur 0,2 – 2,5% der Fälle. Eine präkonzeptionelle Immunität gegen CMV schützt somit nur partiell gegen eine intrauterine Übertragung, und es handelt sich hierbei eher um Neuinfektionen als um Reaktivierungen, die zu einer pränatalen Infektion führen können [34, 35]. Bei etwa 10% der konnatal infizierten Kinder sind Symptome wie Ikterus, Hepatosplenomegalie, Petechien, Mikrozephalie und neurologische Defizite zu beobachten, die auf die CMV-Infektion zurückzuführen sind. Über 90% der überlebenden symptomatischen Kinder entwickeln Komplikationen wie Hör- oder Sehstörungen. Im Gegensatz zur konnatalen CMV-Infektion stellt die Infektion unter der Geburt und die postpartale Infektion durch Muttermilch bei Reifgeborenen im Allgemeinen kein erhöhtes Risiko für Langzeitschäden dar. Letztere treten jedoch gehäuft bei Frühgeborenen oder immunsupprimierten Kindern auf [26, 36, 37].

#### 1.4 Modellsysteme der CMV-Infektion

Von der Untersuchung des humanen CMV-Genoms erhofft man sich unter anderem, virale Faktoren zu identifizieren, die zur Pathogenität des Virus beitragen. Es wurden zahlreiche Gene beschrieben, die häufig zellulären Genen ähneln und immunmodulatorischen Charakter besitzen oder für den Tropismus eine Rolle spielen [19, 22, 38-40]. Diese viralen Gene sind jedoch meist für die Replikation des Virus nicht essentiell [41], so dass sich in Zellkulturversuchen mit Virusmutanten kein Unterschied zum Wildtypvirus feststellen lässt und Unterschiede im biologischen Verhalten der Viren gelegentlich nur *in vivo* erkennbar sind.

Da den Cytomegaloviren eine strikte Spezies-Spezifität eigen ist, lassen sich nur Zellen des natürlichen Wirts oder einer nahe verwandten Spezies effizient infizieren, während bei der Infektion der Zellen anderer Spezies keine Virusreplikation erfolgt [42, 43]. Beispielsweise lässt sich das murine CMV in Rattenfibroblasten propagieren, umgekehrt ist jedoch keine Replikation des Ratten-CMV in Mausfibroblasten möglich. Diese Spezies-Spezifität kann überwunden werden, wenn die durch die Infektion induzierte Apoptose blockiert wird. Das murine CMV kann sich in humanen Zellen vermehren, wenn es ein anti-apoptotisches (bcl-2-ähnliches) Gen, das dem humanen CMV eigen ist, besitzt [44]. Desgleichen ist das Ratten-CMV imstande, humane Zellen zu infizieren, die solch ein anti-apoptotisches Gen exprimieren.

Da die Spezies- und auch ausgeprägte Wirtsspezifität keine Untersuchung des humanen CMV in Versuchstieren zulässt, werden Muromegaloviren, insbesondere das murine Cytomegalovirus (murides Herpesvirus 1), zur Untersuchung des CMV-Infektionsprozesses und der daraus entstehenden Komplikationen wie auch zur Untersuchung der Latenzentstehung und der Reaktivierung eingesetzt [45-47]. Neben dem murinen CMV wird auch das Ratten-CMV verwendet, wovon im Wesentlichen zwei Laborisolate untersucht werden: das England-Isolat (RCMV-E) und das Maastricht-Isolat (RCMV-M) [48, 49]. Beide wurden unabhängig aus der Wanderratte *Rattus norvegicus* isoliert [50, 51]. Das Meerschweinchen-Modell nutzt das Meerschweinchen-CMV, das als einziges Virus zur Untersuchung der konnatalen CMV-Infektion geeignet ist, da das murine CMV nicht diaplazentar übertragen wird [52-54]. Es wurde zwar auch ein neues Ratten-CMV-Isolat

beschrieben, das imstande sein soll, Feten zu infizieren, doch konnte dies in eigenen Versuchen mit dem RCMV England-Isolat nicht bestätigt werden ([55] und S. Voigt, unveröffentlichte Ergebnisse). Darüber hinaus existiert das Rhesusaffenmodell, dem mit dem Rhesus-CMV zwar ein dem humanen CMV genetisch ähnlicheres Virus zugrunde liegt, dessen Analyse aber mit ungleich höheren Kosten verbunden ist [56].

## 1.5 Molekulargenetik und Mutagenese von Cytomegaloviren

Bei den Cytomegaloviren handelt es sich um doppelsträngige DNA Viren mit Genomen von ca. 230-240 kb [57]. Eine Ausnahme stellt hier das Genom des England-Isolates des Ratten-CMV mit ca. 206 kb dar ([58] und S. Voigt, unveröffentlichte Ergebnisse). RCMV-E ist kollinear zu den Genomen von MCMV und RCMV-Maastricht, unterscheidet sich aber vor allem im Bereich der Termini von den Letztgenannten. Eine Übersicht der Genome des MCMV, RCMV-M und RCMV-E gewährt die Abb. 1.

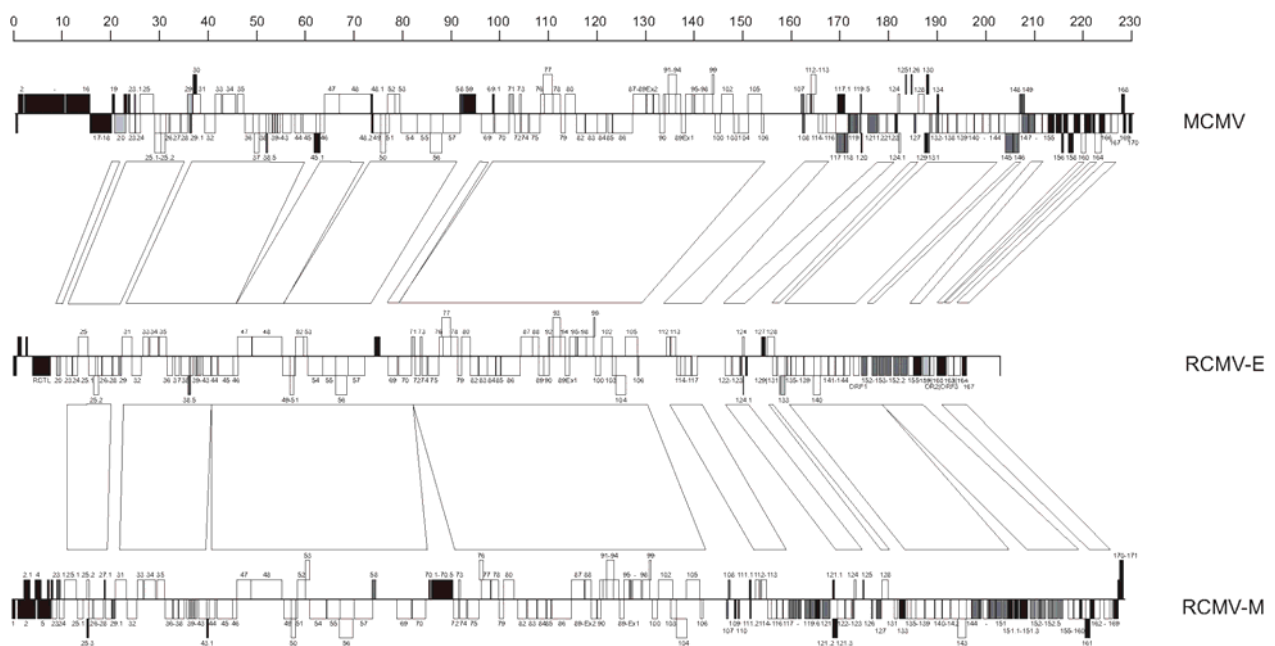


Abb. 1. Genomorganisation von MCMV, RCMV-E, und RCMV-M. Die obere Achse spiegelt die Größe der Genome wider. Zwischen drei bzw. zwei Viren konservierte offene Leserahmen werden als weiße bzw. graue Kästchen gezeigt, nicht konservierte Gene sind schwarz markiert. Größere konservierte Bereiche sind in Blöcken dargestellt.

Die erste komplett veröffentlichte CMV-Genomsequenz war die des Laborstamms AD169 [59]. In der Folge wurden verschiedene klinische humane CMV-Isolate und



auch die CMV-Genome der Maus, des Maastricht-Isolates der Ratte, des Meerschweinchens, des Rhesusaffen und des Schimpansen bestimmt [20, 21, 57, 60-63]. Die Genome von Cytomegaloviren beinhalten ca. 160-190 offene Leserahmen, die überwiegend für Proteine kodieren. Die Funktion dieser Proteine ist größtenteils unbekannt, da sie nicht homolog zu Genen mit bereits bekannter Funktion sind.

Die Manipulation von Cytomegalovirusgenomen dient dem Zweck, mehr über die Virus-Wirt-Interaktion auf molekularer Ebene zu erfahren. Hierzu ist die Herstellung von Virusmutanten erforderlich, in denen das zu untersuchende Gen gezielt verändert wird. Die erste homologe Rekombination in eukaryonten Zellen wurde mit dem Herpes simplex Virus um 1980 durchgeführt [64]. Damit eine homologe Rekombination stattfinden kann, wird Virion-DNA mit einem Plasmid, das das veränderte Zielgen mit homologen flankierenden Sequenzen sowie einen Marker enthält, in eukaryonte Zellen ko-transfiziert. Ein Marker wie z. B. die  $\beta$ -Galaktosidase ist notwendig, da es sich bei der Rekombination um ein seltenes Ereignis handelt und das Wildtypvirus in der Gesamtmenge der Nachkommenviren vorherrscht. Deshalb muss zur Isolation des Virus eine Verdünnungsreihe vorgenommen werden, bis in einer Vertiefung nur noch ein Plaque vorhanden ist, der anhand des Markers identifiziert wird. Die Virusmutante muss anschließend mittels Restriktionsverdau, Gelelektrophorese, Southern-Blot und Sequenzierung genau charakterisiert und mit dem Wildtypvirus verglichen werden.

Einige Jahre später gelang die Klonierung größerer viraler Genabschnitte in Cosmid-Vektoren [65], ehe Messerle et al. 1997 erstmalig ein Herpesvirus, das murine CMV, als bakterielles artifizielles Chromosom (BAC) klonierten [66]. Grundlage dieser Technik ist ebenfalls die homologe Rekombination, die jedoch in *E. coli* und nicht in eukaryonten Zellen stattfindet und somit deutlich schneller durchzuführen ist. Dieses Vorgehen stellt die Methode der Wahl zur Kartierung, Sequenzierung und Manipulation von Herpesviren dar; zahlreiche Herpesviren sind bereits als BAC kloniert worden [67]. Daraufhin ermöglichte die Einführung der Transposon-Mutagenese die Erstellung großer Bibliotheken mutanter viraler BAC Genome, die auf eine bestimmte Genmutation untersucht werden können [68, 69], und die markerlose Klonierung von viralen BAC-Genomen wurde etabliert [70].

## 1.6 Immunmodulatorische Gene bei Cytomegaloviren

Die Immunantwort auf eine CMV-Infektion basiert auf einem detaillierten Wechselspiel zwischen infizierten Zellen und den Abwehrzellen des Wirtes. Cytomegaloviren sind bekannt für ihre Fähigkeit, die Immunantwort zu umgehen, da sie im Lauf der Evolution zahlreiche Homo- oder Analoge vom Immunsystem des infizierten Wirtes in ihr Genom übernommen haben [71, 72]. Die Analyse der Interaktion dieser homologen Gene mit den Wirtsgenen gewährt einerseits Einblick in die virale Pathogenese, gibt andererseits aber auch Hinweise, wie die zellulären Gene des Wirtes funktionieren. Im Rahmen der frühen Immunantwort („innate immunity“) spielen die Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) eine wichtige Rolle, da sie zu den ersten Immunzellen gehören, die infizierte Zellen erkennen und bekämpfen, bevor die adaptive Immunantwort mit zytotoxischen T-Lymphozyten beginnt, die für die Kontrolle einer CMV Infektion von großer Bedeutung ist [73]. Neben der Auseinandersetzung mit NK-Zellen beeinflussen Viren die Apoptose, den Zellzyklus, die Antigenpräsentation von dendritischen Zellen, und modulieren Zytokine und Chemokine [38, 74].

### 1.6.1 Blockade der Antigenpräsentation

*In-vivo*-Untersuchungen mit dem murinen CMV zeigten, dass die zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten eine entscheidende Rolle spielen, da sie die Infektion kontrollieren [73, 75]. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass das murine CMV versucht, die Präsentation viraler Peptide durch „Major histocompatibility complex“ Klasse I (MHC Klasse I)-Moleküle auf der Oberfläche infizierter Zellen zu verhindern (Abb. 2). Hierzu nutzt MCMV im Wesentlichen die drei Proteine („Immunoevasine“) m04/gp34, m06/gp48 und m152/gp40, die sich gegenseitig ergänzen [76]. Das Protein m04/gp34 formt mit MHC Klasse I-Molekülen einen Komplex und wird gemeinsam mit ihnen an die Zelloberfläche transportiert, wo es die Erkennung durch zytotoxische T-Zellen beeinflusst [77]. Das m06/gp48 Protein bildet ebenfalls mit MHC Klasse I-Molekülen einen Komplex und leitet sie zum proteolytischen Abbau zu Lysosomen [78], während peptidbeladene MHC Klasse I-Moleküle durch m152/gp40 im Endoplasmatischen Retikulum/Golgi Komplex (endoplasmatic reticulum - cis-Golgi intermediate compartment, ERGIC) zurückgehalten werden [79]. Obschon MCMV diese Proteine einsetzt, gelingt es dem Virus jedoch nicht, die

Oberflächenpräsentation komplett zu verhindern, da dieser Vorgang durch die Effektivität der Antigenprozessierung entscheidend beeinflusst wird. Dabei garantiert auch die Überzahl an CD8<sup>+</sup> Epitop-spezifischen Lymphozyten allein keinen Schutz [80-82].

Auch das humane CMV behindert die Erkennung viraler Peptide: das Protein US6 interagiert mit dem „Transporter associated with Antigen Processing“ (TAP) in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums, wo es die Einschleusung der Peptide blockiert [83]. Das US3 Protein verhindert die Ausschleusung der MHC Klasse I-Moleküle aus dem ER [84, 85], und US2 wie auch US11 verlagern die schwere Kette des MHC Klasse I-Moleküls aus dem ER in das Zytosol, wo ein proteolytischer Abbau stattfindet [86, 87].

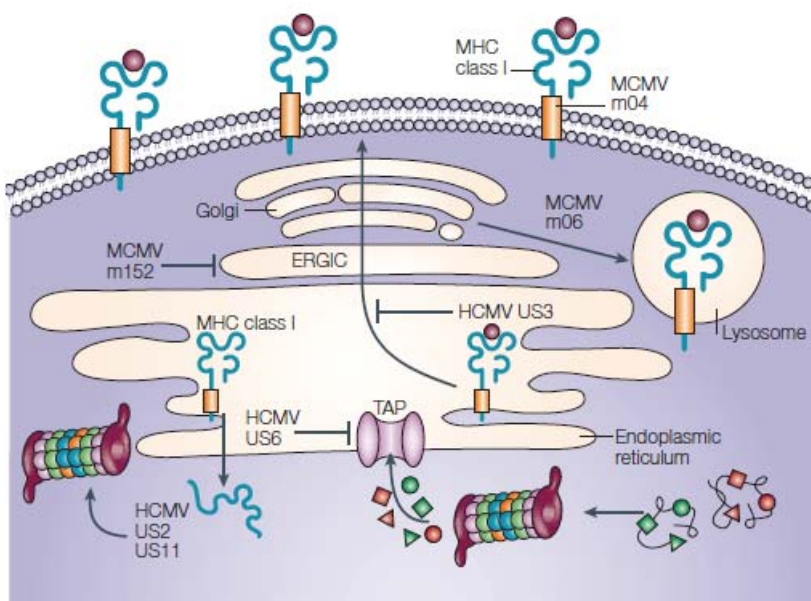


Abb. 2. Modulation der MHC Klasse I-Antigenpräsentation durch das murine und das humane Cytomegalovirus. Aus: MB Lodoen und LL Lanier: Viral modulation of NK cell immunity. Nat Rev Microbiol 3, 59-69, 2005. Erklärung und Abkürzung s. Text.

### 1.6.2 Zytokine und Chemokine

Die Entzündungsreaktion umfasst komplexe zelluläre Abläufe, die auf chemischen Botenstoffen beruhen. Zytokine sind kleine, lösliche Proteine, die wichtige Mediatoren zwischen Zellen bei Entzündungsreaktionen darstellen. Sie regulieren die Entstehung und die Aufrechterhaltung von Immunantworten und werden von vielen Zellen produziert. Damit sind sie eng an die frühe Immunantwort geknüpft, aber auch bei der adaptiven Antwort von Bedeutung. Wie die Interleukine und Lymphokine

bilden auch die Chemokine (chemo-attractant cytokines) eine Untergruppe der Zytokine. Chemokine senden Signale an benachbarte Leukozyten, die dadurch an den Entzündungsort gelockt werden. Sie steuern inflammatorische Prozesse, indem sie die Motilität der Zellen des Immunsystems koordinieren. Dabei handelt es sich um kleine Proteine mit verwandter Aminosäuresequenz, deren Rezeptoren zur Gruppe der G Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) gehören.

Chemokine werden derzeit auf Grund der Position ihrer zwei konservierten Cysteine nahe des N-Terminus in vier Gruppen eingeteilt [88]. Die alpha- (CXC) und beta- (CC) Gruppen beinhalten zahlreiche Chemokinliganden, wobei Liganden jeder Gruppe promiskuitiv an mehrere Rezeptoren binden können [89]. Es sind aktuell sieben Rezeptoren für alpha-Chemokine (CXCR1-7) und zehn für beta-Chemokine (CCR1-10) bekannt. Das bisher einzige bekannte gamma-Chemokin (XC) wird als Lymphotaktin, „Activation-induced, T cell-derived and chemokine-related“ (ATAC) Molekül, SCM-1, oder XCL1 bezeichnet [90-93]. ATAC bindet an den Rezeptor XCR1 auf humanen und murinen Zellen und in Geweben [94-96]. Die delta-Gruppe der Chemokine (CX3C) ist durch drei Aminosäuren zwischen den beiden Cysteinen charakterisiert. Wie die gamma-Gruppe besitzt die delta-Gruppe derzeit nur einen Liganden, das Fraktalkin; der dazugehörige Rezeptor ist CX3CR1.

Die Beobachtung, dass das Chemokinsystem eng mit infektiösen Geschehnissen verknüpft ist, hat die Aufmerksamkeit besonders bei Herpes- und Poxviren auf Virus-kodierte Chemokinanaloga gelenkt [97-101]. Die meisten Herpesviren der beta- und gamma-Subfamilien kodieren Analoge von Zytokinen (Chemokinproteinen), Chemokinrezeptor-verwandten G Protein-gekoppelten Rezeptoren und Chemokin-bindenden Proteinen [102-105]. Viral kodierte Chemokine können unterschiedliche pharmakologische Phänotypen besitzen, die von einem breiten Spektrum bis hochselektiv, oder von agonistisch bis antagonistisch variieren [106-110].

Alpha- oder beta-Chemokine und Chemokinrezeptoren wurden bislang im humanen, Maus-, Ratten- und Schimpansen-CMV sowie in den humanen Herpesviren 6 und 7 charakterisiert [110-115], und es gibt Hinweise, dass virale Chemokine wie vCXC-1 (UL146) des HCMV Toledo-Stammes als auch klinische HCMV-Isolate die Virulenz des Erregers erhöhen können [107, 116-118]. Darüber hinaus kodiert das

Gammaherpesvirus Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus (KSHV oder HHV-8) drei beta-Chemokine (vCCL-1, vCCL-2, und vCCL-3) sowie ein virales Interleukin-6- (vIL-6) Homolog [100]. Während vCCL-1 als CCR8-Agonist fungiert [119, 120], blockiert vCCL-2 XCR1, den ATAC-Rezeptor [106, 121]. Das virale Chemokin vCCL-3 wurde als CCR4-Agonist identifiziert [122]. Im Gegensatz hierzu aktiviert vCCL-3 selektiv den XC Rezeptor-1 (XCR1) [98]. KSHV kodiert somit zwei funktionell unterschiedliche Chemokine, die entweder XCR1 blockieren (vCCL-2) oder aktivieren (vCCL-3), jedoch keine ATAC-Homologe darstellen.

Das RCMV-E kodiert das beta-Chemokin-Homolog e131/129, das auch im murinen CMV vorkommt [49, 113, 123]. Zudem wurde von uns bei der RCMV-E-Sequenzanalyse ein Gen mit signifikanter Homologie zu dem gamma-Chemokin Lymphotaktin der Ratte sowie zum humanen und murinen ATAC identifiziert, das deshalb tentativ „vATAC“ genannt wurde. In der Literatur ist ein gamma-Chemokin-Homolog bei Viren bisher nicht beschrieben worden. Da ähnliche Gene bei Immunreaktionen in der Maus, der Ratte und beim Menschen von Bedeutung sind [124], wird vermutet, dass dieses virale Homolog bei der Auseinandersetzung von RCMV mit dem Immunsystem eine Rolle spielt. Am N-Terminus dieses viralen Gens ist ein putatives Signalpeptid lokalisiert, welches für die Sekretion des Proteins nach transienter Transfektion notwendig zu sein scheint. Das Gen wird in der frühen Phase der Replikation exprimiert und konnte mit Hilfe einer Flag-Signalsequenz im Western-Blot detektiert werden (S. Voigt, unveröffentlichte Ergebnisse). Es bleibt abzuwarten, ob vATAC eine agonistische oder antagonistische Funktion auf die noch zu ermittelnde Zielzelle ausübt.

### 1.6.3 Interaktion mit Natürlichen Killer-Zellen

Natürliche Killer (NK)-Zellen sind in der Lage, infizierte, transformierte, und allogene Zellen zu erkennen und zu zerstören [125]. Die Aktivität von NK-Zellen wird durch inhibierende und stimulierende Rezeptoren geregelt. Die an die Zelle übermittelten Signale werden durch die Rezeptor-Ligand Interaktion bestimmt. Auf normalen, nicht infizierten oder nicht transformierten Zellen dominieren inhibitorische Liganden, die durch Attenuierung der NK-Zell-Aktivierung zu einer Toleranz führen [126]. Im Gegensatz hierzu ist die Expression inhibitorischer Liganden auf infizierten und transformierten Zellen häufig vermindert, und der Verlust dieser „Selbst“-Moleküle führt zu einer erhöhten Zytotoxizität durch NK-Zellen. Dieser Vorgang wird als „missing-self“-Erkennung bezeichnet (Abb. 3) [127].

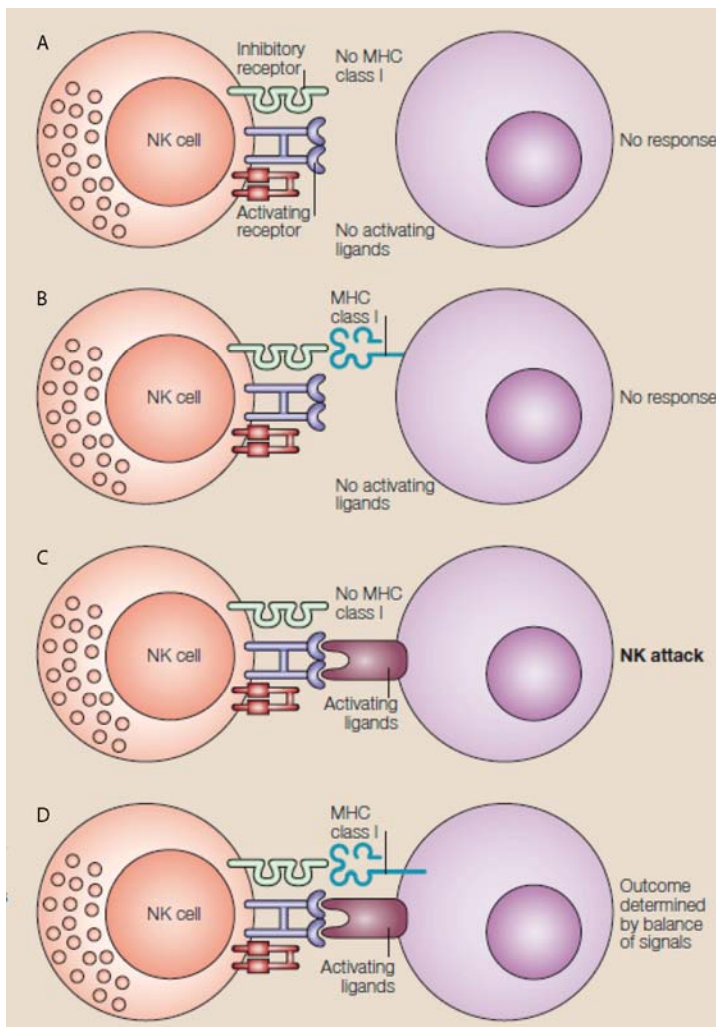


Abb. 3. Die „missing-self“-Hypothese besagt, dass NK-Zellen solche Zellen angreifen, die keine MHC Klasse I-Moleküle („self-Moleküle“) auf ihrer Oberfläche besitzen. Ob eine NK-Zelle aktiv wird, hängt von den Signalen ab, die sie über ihre inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren erhält. Fehlen Liganden für beide Rezeptoren bzw. fehlt nur der aktivierende Ligand, kommt es zu keiner Antwort (A, B). Um aktiviert zu werden und schließlich zu attackieren, benötigen NK-Zellen einen Liganden, der an ihren aktivierenden Rezeptor bindet (C). Werden sowohl der inhibierende als auch der aktivierende Ligand besetzt, hängt das Zustandekommen einer Antwort davon ab, welcher Stimulus überwiegt (D). Aus: MB Lodoen und LL Lanier: Viral modulation of NK cell immunity. *Nat Rev Microbiol* 3, 59-69, 2005.

Es sind verschiedene NK-Rezeptorfamilien bekannt. Zu den am besten charakterisierten Liganden gehören die MHC Klasse I-Moleküle, die an Rezeptoren der Ly49-Familie in Nagern und „Killer cell Ig-like receptor“ (KIR) Rezeptoren bei

Menschen binden [125]. Darüber hinaus existieren die „leukocyte Ig-like receptors“ (LIR) und die CD94/NKG2 Heterodimere, die unterschiedliche Liganden erkennen können [128]. Für den aktivierenden Rezeptor Natural Killer group 2, member D (NKG2D) wurde kürzlich eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von NK-Zellen gezeigt [129]. In den letzten Jahren sind jedoch auch Rezeptoren beschrieben worden, die Liganden ohne Homologie zu MHC Klasse I-Molekülen erkennen: dazu gehört die Rezeptoren Natural Killer receptor protein 1, member B (NKRP1B) und 2B4.

Viren verfügen über verschiedene Mechanismen, um einer Erkennung durch NK-Zellen zu entgehen. Im Sinne der „missing-self“-Hypothese wurde das HCMV MHC Klasse I-Homolog UL18 initial als ein Ligand beschrieben, der NK-Zellen in ihrer Aktivierung hemmt [130]. Als Rezeptor wurde LIR-1 identifiziert, der jedoch nur auf NK-Zell-Subtypen vorkommt [131]; darüber hinaus wurde berichtet, dass UL18 NK-Zellen sowohl aktivieren als auch inhibieren kann, womit die Rolle von UL18 nicht eindeutig definiert ist [132]. Während die inhibitorische Funktion des UL18 von LIR-1 abhängig ist, ist die Aktivierung der NK-Zelle unabhängig von der Bindung an LIR-1 [133, 134]. Auch das murine CMV besitzt mit m144 ein MHC Klasse I-Homolog, dessen Rezeptor jedoch noch unbekannt ist.

Darüber hinaus interferieren Cytomegaloviren mit dem aktivierenden NK-Rezeptor NKG2D, der auch bei vorhandener Expression von MHC Klasse I-Molekülen aktiviert werden kann. NKG2D-Liganden sind nicht konstitutiv auf normalen Zellen ausgeprägt, sondern können durch Infektion induziert werden [135]. Das HCMV Protein UL16 bindet an die NKG2D-Liganden „UL binding protein“ (ULBP) -1 und -2, wodurch die Liganden nicht an die Zelloberfläche gelangen [136]. Daneben werden auch die Liganden „MHC class I-related chain A/B“ (MICA bzw. MICB) vom Virus angegriffen. Das HCMV-Protein UL142 führt zu einer verminderten Expression von MICA, wofür jedoch nicht UL142 allein verantwortlich zu sein scheint, da dieser Effekt auch mit dem HCMV-Laborstamm AD169, dem UL142 fehlt, zu beobachten ist [22, 137, 138]. Ebenso interferieren die MCMV Proteine m138, m145, m152 und m155 mit den NKG2D-Liganden „murine UL16-binding protein-like transcript 1“ (MULT-1), „retinoic acid inducible-1“ (Rae-1) und H60 [139-144]. Ein besonderes MCMV-Protein stellt m157 dar. Dieses Protein ist einerseits Ligand für den

aktivierenden NK-Rezeptor Ly49H, zugleich aber auch Bindungspartner für den inhibitorischen Rezeptor Ly49I [145]. Ursache für diese Promiskuität ist eventuell ein von Ly49H-positiven NK-Zellen selektiver Druck auf m157, der zu Mutationen und damit einer veränderten Rezeptorspezifität führt [146].

Der NK-Genkomplex der Ratte ist auf Chromosom 4 lokalisiert und enthält zahlreiche verwandte, aber funktionell unterschiedliche C-Typ-Lektin-ähnliche Gene, die u.a. für stimulatorische und inhibitorische NK-Rezeptoren der NKRP1-Rezeptorfamilie kodieren. Die zugehörigen Liganden werden von der „C-type lectin domain family 2“ (Clec2)-Genfamilie kodiert, die sich ebenfalls in dem NK-Genkomplex befindet und dort vermischt mit den Rezeptorgenen vorliegt. Die zuerst identifizierten NKRP1-Liganden waren Clec2, Mitglied D11 (Clec2D11; auch „c-type lectin-related“-b, clr-b), das an den inhibitorischen NKRP1B-Rezeptor bindet, und Clec2D3 (clr-g), das als Ligand für den stimulierenden NKRP1F-Rezeptor fungiert. Ähnlich wie MHC Klasse I-Moleküle werden Liganden vom Clec2-Typ auf infizierten und transformierten Zellen vermindert exprimiert. Deshalb wurde vermutet, dass die Interaktion zwischen NKRP1B und Clec2D11 ein alternatives Erkennungssystem zur Unterscheidung von normalen und infizierten oder transformierten Zellen darstellt [147].

Die Aufgaben der in der vorliegenden Habilitationsschrift vorgestellten Forschungsarbeiten liegen in der Aufdeckung von Mechanismen, die es RCMV-E ermöglichen, sich einer Immunantwort zu entziehen. Dies ist einerseits durch virale Homologe zellulärer Liganden (Arbeiten Nr. 1-3), andererseits auch den Zustand der Latenz (Arbeit Nr. 5) möglich. Da es sich darüber hinaus bei RCMV-E um ein CMV mit ungewöhnlicher Genomgröße (ca. 204 kb) handelt und das Virus Gene zur Immunmodulation besitzt, die bei MCMV nicht vorhanden zu sein scheinen, wurde untersucht, ob ein MCMV-Isolat existiert, das eine vergleichbare Größe sowie ähnliche Homologe wie RCMV-E besitzt (Arbeiten Nr. 3 und 4).



## 2. Resultate

### 2.1 Charakterisierung eines RCMV C-Typ Lektin-Homologs

Voigt, S., Sandford, G.R., Ding, L., Burns, W.H.: Identification and characterization of a spliced C-type lectin-like gene encoded by rat cytomegalovirus. Journal of Virology, 2001; 75:603-611

Die beiden bekannten Ratten-CMV-Isolate Maastricht (RCMV-M) und England (RCMV-E) unterscheiden sich durch ihre Genomgröße und die jeweils im Genom enthaltenen Gene. Das Genom von RCMV-M wurde im Jahr 2000 publiziert. Bei der Sequenzierung des linken Terminus des RCMV-E Genoms wurde ein Gen identifiziert, das Ähnlichkeit zu C-Typ-Lektinen besitzt. Solche C-Typ-Lektin-ähnlichen Gene findet man als aktivierende oder auch inhibierende Rezeptoren auf Natürlichen Killer (NK)-Zellen und dem frühen T-Zell Aktivierungsmarker CD69. Darüber hinaus sind C-Typ-Lektin-ähnliche Gene bei Poxviren, zu diesem Zeitpunkt aber nicht bei Herpesviren beschrieben worden.

Das vom RCMV-E kodierte Gen besitzt mehrere Auffälligkeiten. Das Gen liegt gespleißt vor, was bei homologen Genen von Herpesviren nicht sehr häufig vorkommt und besteht aus fünf Exons, wovon nur vier translatiert werden. Zur Charakterisierung der cap site wurden verschiedene molekularbiologische Methoden wie z.B. ein RNase protection assay und rapid amplification of cDNA ends (RACE) angewendet, die belegten, dass der Promoter eine GATA statt einer TATA Box enthält. Im Northern blot konnte gezeigt werden, dass das Gen in der späten viralen Replikationsphase exprimiert wird. Darüber hinaus wurde zur Bestimmung des N-Terminus ein Edman-Verdau durchgeführt, da sich im Beginn des Leserahmens kein Methionin befindet. In diesem Verdau wurde Alanin als N-terminale Aminosäure nachgewiesen. Schließlich wurde untersucht, ob das Gen *in vitro* für die Replikation des Virus von Bedeutung ist, was wie erwartet nicht der Fall war.

Auf Grund der Sequenzähnlichkeit mit Genen von NK-Zellen entstand die Hypothese, dass das vom RCMV-E Genom kodierte C-Typ-Lektin-ähnliche Gen eine Rolle bei der Infektion *in vivo* spielt, in dem es die Immunantwort des Wirtes beeinflusst. Dieser Frage wurde in der folgenden Arbeit nachgegangen.

## 2.2 Inhibition von Natürlichen Killer-Zellen durch ein C-Typ Lektin-Homolog

Voigt, S., Mesci, A., Ettinger, J., Fine, J.H., Chen, P., Chou, W., Carlyle, J.R.: Cytomegalovirus evasion of innate immunity by subversion of the NKRP1B:Ocil/Clr-b missing-self axis. *Immunity*, 2007; 26:617-627

Das in RCMV-E identifizierte C-Typ-Lektin-Homolog (RCTL) wurde in dieser Arbeit funktionell untersucht. Nach der Veröffentlichung von RCTL wurde die Sequenz des Genoms der Ratte publiziert, wobei sich herausstellte, dass eine Vielzahl von C-Typ-Lektin-verwandten (c-type lectin related, clr) Genen existieren. Im weiteren Verlauf wurde gezeigt, dass zwei clr-Produkte an einen aktivierenden bzw. inhibierenden Rezeptor von NK-Zellen binden. RCTL weist die größte Identität mit dem Gen clr-b (auch clr11, CLEC2D11) auf, das mit dem inhibitorischen NK-Zell Rezeptor NKRP1B interagiert. Durch eine RT-PCR Analyse konnte nachgewiesen werden, dass die Infektion mit dem Wildtyp RCMV-E zu einer verminderten bzw. völlig fehlenden Expression des clr-b Gens auf Transkriptionsebene führt. Dies ist jedoch von der Expression des RCTL unabhängig, da eine Virusmutante, die kein RCTL exprimiert, den gleichen Effekt erzielt. Deshalb ist es möglich, dass es sich bei der verminderten bzw. fehlenden clr-b Expression um einen Schutzmechanismus der Zelle auf die Infektion handelt. Eine fehlende clr-b Expression könnte die Aktivierung der NK-Zelle zur Folge haben, da der Bindungspartner des inhibierenden Rezeptors NKRP1B fehlt. RCMV-E umgeht diesen Weg, in dem es RCTL exprimiert, das an NKRP1B bindet. Hierin liegt ein Novum, da es sich bei RCTL nicht um ein MHC Klasse I-ähnliches Molekül handelt, das an NK-Zell Rezeptoren bindet und dadurch die Funktion moduliert, wie es für einige MHC Klasse I-ähnliche MCMV Proteine beschrieben worden ist.

Um festzustellen, ob eine RCMV-E Infektion Einfluss auf die Immunmodulation *in vivo* hat, wurden verschiedene Rattenstämme infiziert und das Viruswachstum unter NK-depletierten bzw. nicht-depletierten Bedingungen untersucht. In den zwei untersuchten Rattenstämmen Wistar Albino Glaxo (WAG) und *Sprague Dawley* waren unter beiden Bedingungen sowohl das Wildtypvirus als auch die Revertante in Titrationen nachweisbar. Einen Unterschied zwischen den Stämmen gab es nur unter nicht-depletierten Bedingungen, also bei vorhandenen NK-Zellen: Hier

replizierte die Mutante bei dem Stamm *WAG* nicht, während das Wachstum beim Stamm *Sprague Dawley* dem des Wildtypvirus und der Revertante vergleichbar war. Dies bedeutet, dass a) RCMV-E mit RCTL einen Replikationsvorteil gegenüber NK-Zellen hat, der nicht mehr nachzuweisen ist, wenn RCTL fehlt, und dass b) dieser Effekt Stamm-spezifisch ist, da der NKRP1B-Rezeptor des Stammes *Sprague Dawley* RCTL nicht erkennt. Somit haben Cytomegaloviren einen weiteren Mechanismus entwickelt, der es ihnen erlaubt, in die NK Zell-vermittelte Wirtsabwehr einzugreifen, und es ist auf Grund des existierenden Polymorphismus des NKRP1B Gens zu vermuten, dass das Virus Einfluss auf die Evolution des Rezeptors genommen hat.

### 2.3 Charakterisierung potentiell immunmodulatorischer RCMV Gene

Voigt, S., Sandford, G.R., Hayward, G.S., Burns, W.H.: The English strain of rat cytomegalovirus (CMV) contains a novel captured CD200 (vOX2) gene and a spliced CC chemokine upstream from the major immediate-early region: further evidence for a separate evolutionary lineage from that of rat CMV Maastricht.

Journal of General Virology, 2005; 86:263-274

Wie bereits in Arbeit Nr. 1 beschrieben bestehen wesentliche Unterschiede zwischen den RCMV-Isolaten Maastricht und England, woraus sich ergibt, dass es sich um unterschiedliche Viren und nicht um Stämme eines Virus handelt. In dieser Arbeit wurden weitere Fragmente des RCMV-Genoms sequenziert, die Sequenz mit der von RCMV-M und MCMV verglichen und die darin enthaltenen Gene charakterisiert. Während die Major Immediate Early (MIE)-Region erwartungsgemäß bei allen drei Viren ähnlich strukturiert ist, ist der Bereich rechts vom MIE-Lokus sehr heterogen. So kodiert RCMV-E für ein CD200-Homolog (e127), das bei den anderen beiden Viren nicht vorhanden ist; allerdings kodiert RCMV-M an dieser Stelle für ein dem Adeno-associated Virus ähnlichen REP-Homolog. CD200 ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, das zur Immunglobulin-Superfamilie gehört. CD200 bindet an den ihm verwandten CD200 Rezeptor, der auf myeloiden und T-Zellen exprimiert wird. Die Interaktion hat eine hemmende Wirkung auf die Zielzelle, weshalb CD200 immunologisch von Interesse und deshalb eine immunmodulatorische Wirkung für e127 zu vermuten ist. Solch eine Wirkung wurde für das CD200-Homolog des Myxoma Virus, M141R, beschrieben.

Ein weiterer Unterschied zwischen RCMV-E und RCMV-M besteht in der Genstruktur des beta-Chemokins 131/129. Dieses Gen ist bei RCMV-E und MCMV gespleißt und besteht aus zwei Exons, während bei RCMV-M zwei unabhängige Transkripte existieren. Im Gegensatz zu dem Gen m128 (immediate early 2, von dem nur Exon 3 translatiert wird) bei MCMV sind die Gene e128 und r128 bei den Ratten-CMV nicht gespleißt. Die Gene 133 bis 139 sind bei den drei Viren konserviert. Insgesamt handelt es sich bei RCMV-E trotz des verkürzten Genoms um einen Vertreter der Betaherpesviren und um ein Cytomegalovirus, doch spricht der Nachweis einzelner Gene wie die des C-Typ-Lektin-Homologs und des viralen CD200-Homologs für das Vorliegen eines eigenständigen Isolates.

## 2.4 Identifizierung eines neuen Betaherpesvirus der Hausmaus

Teterina, A., Richter, D., Matuschka, F.-R., Ehlers, B., Voigt, S.: Identification of a novel betaherpesvirus in *Mus musculus*.  
*Virology Journal*, 2009; 6:225

Während zu vermuten ist, dass sich zumindest zwei sehr unterschiedliche Ratten-CMV's entwickelt haben, ist dies für MCMV's bisher nicht bekannt. Die beiden am häufigsten verwendeten MCMV-Laborstämme Smith und K181 sind in ihrer Genomstruktur und -größe weitestgehend ähnlich.

Um festzustellen, welchen Einfluss veränderte oder unterschiedliche Gene auf die Biologie des Virus nehmen können, wurde versucht, neue Betaherpesviren aus der Hausmaus (*Mus musculus*) zu isolieren. Hierzu wurden verschiedene Organe von vier ehemals frei lebenden, in der Folge in Zucht gehaltenen Hausmausstämmen entnommen. Diese sind zum einen mittels PCR unter Einsatz degenerierter Primer auf das Vorhandensein von Betaherpesviren untersucht worden, zum anderen wurden Organteile auf Zellen kultiviert, um das Virus zu isolieren. Ein unbekanntes Betaherpesvirus konnte durch eine PCR, in der die direkt aus dem Organ extrahierte DNA eingesetzt wurde, zwar nicht amplifiziert werden, jedoch wurde im Zellkulturüberstand mit Hilfe derselben Methode ein neues Betaherpesvirus entdeckt. Zur phylogenetischen Analyse und zum Sequenzvergleich dieses Betaherpesvirus mit bekannten Viren dieser Spezies wurde ein Amplifikat erzeugt, das sich über die Gene Glykoprotein B und die DNA Polymerase erstreckt. Dieser Vergleich, zusammen mit einer phylogenetischen Analyse, zeigte eine hohe Sequenzähnlichkeit mit dem RCMV England-Isolat. Dies deutet darauf hin, dass sich eventuell auch zwei unterschiedliche MCMV's entwickelt haben.

## 2.5 RCMV IE1 ist nicht essentiell für die Latenzentstehung oder Reaktivierung

Sandford, G.R., Schumacher, U., Ettinger, J., Brune, W., Hayward, G.S., Burns, W.H., Voigt, S.: Deletion of the rat cytomegalovirus immediate early 1 gene results in a virus capable of establishing latency, but with lower levels of acute virus replication and latency that compromise reactivation efficiency.

Journal of General Virology, 2010; 91:616-621

Wie in Arbeit Nr. 3 angedeutet, ist die strukturelle Organisation der MIE-Regionen in HCMV, MCMV und den Ratten-CMV's sehr ähnlich. Durch alternatives Spleißen der beiden immediate-early (ie) Gene werden zwei Proteine gebildet, IE1 und IE2 bei HCMV und RCMV und IE1 und IE3 bei MCMV. Während IE2/IE3 absolut essentiell für die Virusreplikation ist, stellt IE1 ein nicht essentielles Protein, zumindest *in vitro*, dar. Beiden Proteinen wird bei dem Wechsel zwischen dem Zustand der Latenz und der lytischen Phase große Bedeutung zugeschrieben, und die Verhinderung einer Virusreaktivierung durch Blockierung eines IE-vermittelten Mechanismus könnte therapeutisch von Interesse sein.

Um zu untersuchen, welchen Einfluss das IE1-Gen auf die virale Replikation *in vitro* und *in vivo* nimmt, wurde zunächst eine RCMV-IE1-Deletionsmutante konstruiert. Die Wachstumskurve war mit derjenigen des Wildtypvirus vergleichbar; somit ist RCMV IE1 nicht essentiell für die Replikation *in vitro*.

Für HCMV und MCMV IE1 wurde beschrieben, dass die Zerstörung der sich im Zellkern befindlichen Promyelocytic leukaemia (PML)-Körperchen die virale Transkriptionseffektivität möglicherweise erhöht. Das RCMV Wildtypvirus zerstört die PML Strukturen, nach Infektion mit RCMV  $\Delta$ IE1 bleibt sie bestehen. Da jedoch RCMV  $\Delta$ IE1 wie das Wildtypvirus in Zellkultur wächst, ist die Zerstörung dieser Strukturen keine Bedingung für die Replikation *in vitro*.

Anschließend wurden Ratten mit dem Wildtypvirus, der Deletionsmutante und der Revertante infiziert. RCMV  $\Delta$ IE1 erreicht zwar in der akuten Phase der Infektion die Speicheldrüse, erzielt dort jedoch eine schwächere persistente Infektion als das Wildtypvirus oder die Revertante. In der Milz infizierter Tiere wurde nach 120 Tagen eine deutlich schwächere Reaktivierungsrate des RCMV  $\Delta$ IE1 festgestellt. Auch in der akuten Infektionsphase befanden sich in der Milz weniger RCMV  $\Delta$ IE1 Genome. Diese Befunde deuten darauf, dass es sich bei RCMV IE1 um einen Regulator handeln könnte, der bei der Entstehung einer persistenten oder chronischen Infektion

von Bedeutung ist, aber nicht direkt in den Prozess der Latenzbildung oder Reaktivierung eingreift.

### 3. Diskussion

Während der Auseinandersetzung mit dem Immunsystem des infizierten Organismus haben Viren im Lauf der Evolution verschiedene Wirtsgene in ihr Genom integriert, die ihnen helfen sollen, ihr Überleben und ihre Replikation zu sichern. Diese viralen Proteine sind häufig bei immunmodulatorischen Prozessen von Bedeutung, da sie einerseits zelluläre Proteine, die auf Grund einer Virusinfektion nicht mehr exprimiert werden, ersetzen und dadurch die infizierte Zelle vor einem Angriff durch immunkompetente Zellen schützen können. Andererseits sind einige virale Proteine imstande, das Zusammenspiel von Komponenten des Immunsystems zu stören, indem sie chemotaktisch aktiv werden. Die Identifizierung der kodierenden Gene mit solch einer potentiellen Funktion ist durch die Sequenzierung verschiedener Genome von Cytomegaloviren möglich. Dadurch gelingt die Erfassung neuer, bisher unbekannter Gene, die in manchen CMV-Stämmen nicht mehr enthalten sind; es können aber auch Genpolymorphismen aufgedeckt werden [20, 22, 40]. Dabei stehen die Gene mit immunmodulatorischem Charakter im Blickpunkt, weil sie eventuell einen Ansatz zur therapeutischen Intervention bieten.

Darüber hinaus nutzen Cytomegaloviren weitere Strategien, um sich der Immunkontrolle zu entziehen. Eine Strategie ist die der Latenzbildung. In diesem Zustand wird nur eine geringe Anzahl viraler Gene exprimiert, so dass die Exposition gegenüber dem Immunsystem vermindert wird. Des Weiteren infizieren CMV sogenannte „privilegierte“ Gewebe, (z.B. Speicheldrüsengewebe), in denen die virale Replikation erleichtert ist [148].

Zur Untersuchung biologischer Funktionen viraler Proteine *in vivo* werden im Rattenmodell die RCMV-Isolate England und Maastricht benutzt, die unabhängig voneinander aus der Wanderratte *Rattus norvegicus* isoliert wurden. Das erste veröffentlichte Ratten-CMV-Genom war das des RCMV Maastricht-Isolates [61]. Im Gegensatz hierzu sind bisher nur Sequenzabschnitte des England-Isolates veröffentlicht worden. Die Genome der Cytomegaloviren sind kollinear und stimmen relativ gut im zentralen Genombereich überein (Abb. 1). In diesem Abschnitt liegt die „Major Immediate Early“ (MIE)-Region, die bei den CMVs eine charakteristische



Architektur besitzt. Die MIE-Region von RCMV-E ist mit der Region anderer CMVs vergleichbar [49]. Die immediate early Proteine (IE1 und IE2/IE3) der CMVs werden seit geraumer Zeit untersucht, weil sie die Expression vieler nachgeschalteter Gene regulieren und in dem Verdacht stehen, wichtig für den Prozess der Reaktivierung zu sein [149]. Da die Viren kein eigenes Replikationsprogramm besitzen, sind sie von zellulären Mechanismen abhängig. Die Regulation verschiedener zellulärer Prozesse wird neben Daxx und anderen Proteinen von einer makromolekularen Struktur, die als „nuclear domain 10“ (ND10; auch „promyelocytic leukemia protein oncogenic domain“ bzw. „POD“) bezeichnet wird, gesteuert und spielt bei der Apoptose, der Regulation der Genexpression sowie der Onkogenese eine Rolle [150]. Das in den ND10 enthaltene PML Protein wirkt als zellulärer Repressionsfaktor, der nach einer Infektion die IE-Genexpression hemmt. Diese Wirkung wird – im Fall von HCMV – zunächst durch das pp71 Protein antagonisiert, so dass IE1 in den ND10-Strukturen akkumulieren kann und eine Auflösung der PML Proteine hervorruft. Diese Störung der ND10-Integrität geht mit einer erhöhten Effizienz der Virusinfektion einher. Sowohl IE1 als auch IE2 assoziieren mit ND10, wobei die IE1-Proteine von HCMV und MCMV für die Auflösung der ND10-Struktur verantwortlich sind [151-154]. Wir fanden heraus, dass das RCMV-E IE1-Protein ebenfalls mit einer Auflösung der ND10-Struktur einhergeht und mit diesem intrinsischen zellulären Abwehrmechanismus interferiert. Dennoch ist die Auflösung dieser Struktur nicht für die Virusreplikation *in vitro* notwendig, da eine IE1-Deletionsmutante wie das Wildtypvirus repliziert [155]. *In vivo*-Untersuchungen mit IE1-Deletionsmutanten von MCMV und RCMV-E zeigten, dass IE1 wichtig für die Replikation in der akuten Infektionsphase zu sein scheint. Sowohl RCMV-E als auch MCMV zeigten eine Attenuierung der IE1-Deletionsmutanten *in vivo*, können aber im „privilegierten“ Speicheldrüsengewebe, wenn auch vermindert, replizieren. MCMV-Infektionsexperimente in Balb/c- und SCID-Mäusen ergaben, dass in beiden Mausstämmen die Titer von Wildtypvirus und IE1-Deletionsmutante in den verschiedenen Organen vergleichbar waren und somit die adaptive Immunantwort nicht für eine erhöhte Sensitivität der IE1-Deletionsmutante verantwortlich zu sein scheint [155-157]. Es ist jedoch möglich, dass die IE1-Deletionsmutante solch eine erhöhte Sensitivität gegenüber NK-Zellen aufweist. Dies könnte auch für die RCMV-E IE1-Deletionsmutante gelten. Die Deletion von IE1 führt sowohl bei MCMV als auch bei RCMV-E zu einer verminderten Latenzbildung und Reaktivierung in der

Milz; allerdings sind IE1-Deletionsmutanten wie die Wildtypviren gleichfalls imstande, die Latenz aufrechtzuerhalten bzw. aus der Latenz zu reaktivieren.

Unklar ist bislang, warum RCMV-E im Gegensatz zu MCMV und RCMV-M ein Genom mit einer Größe von nur 206 kb besitzt [58]. Es ist denkbar, dass durch häufige Passagierung des Virus in Zellkultur Gene oder Genabschnitte auf ähnliche Weise verlorengegangen sind, wie es für HCMV-Laborstämme beschrieben wurde [22]. Ein partieller Genverlust ließe sich untersuchen, indem ein neues Virus aus einer Wildratte isoliert und mit RCMV-E und -M verglichen wird. Eigene, bisher nicht publizierte PCR-Experimente zeigen, dass RCMV-E sehr viel häufiger in Organen von Wildratten vorkommt als RCMV-M. Da es sich bei dem Untersuchungsmaterial ausnahmslos um gefrorene Organe handelte und eine Virusisolierung daraus häufig schwierig ist, blieben diese Versuche ohne Erfolg. Da RCMV-E jedoch über zahlreiche Gene (z. B. DNA Polymerase und Glykoprotein B) verfügt, die ebenso bei HCMV, MCMV und RCMV-M vorkommen und hohe Sequenzähnlichkeit aufweisen [49, 155], lässt sich RCMV-E anhand unserer Daten mit einiger Sicherheit als Cytomegalovirus klassifizieren.

Die sehr lange Co-Evolution der Cytomegaloviren mit ihren spezifischen Wirten hat zu einer genetischen Adaptation der CMVs an den jeweils spezifischen Wirt geführt. Im Lauf der Zeit sind „private“ Genfamilien entstanden, die nur bei einem CMV, aber nicht bei anderen Vertretern dieser Virusgruppe vorkommen [46]. Das Vorliegen verschiedener Gene in RCMV-E und RCMV-M suggeriert, dass die Viren eine getrennte Entwicklung genommen haben. Um herauszufinden, ob dies nur bei den genannten RCMV-Isolaten der Fall ist oder ob auch innerhalb der MCMV-Gruppe ähnliche Unterschiede existieren, wie sie bei RCMV-E und RCMV-M beobachtet wurden, haben wir ehemals frei lebende Mäuse auf das Vorliegen von MCMV getestet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen erbrachten, dass auch unter den MCMV mindestens eine Variante existiert, deren Sequenz zumindest im DNA Polymerase/Glykoprotein B-Bereich von der MCMV Smith-Sequenz abweicht und der entsprechenden Sequenz des RCMV-E ähnelt [158]. Es sind zweifellos weitere Abschnitte dieses bisher unbekanntes MCMV zu sequenzieren, um es als neues Isolat zu klassifizieren. Es wäre interessant, zu untersuchen, ob dieses neue MCMV-Isolat eine ähnliche Größe wie RCMV-E besitzt, ob es im Vergleich zu den

bekannten MCMV-Isolaten Smith und K181 Genpolymorphismen aufweist oder es sogar „private“ Gene gibt, die bei MCMV Smith und K181 nicht vorkommen. Die bisherigen Ergebnisse schließen nicht aus, dass sich ähnlich wie bei den RCMVs auch zwei MCMVs entwickelt haben, die sich deutlicher voneinander unterscheiden als die Isolate Smith und K181.

Neben der Größe des RCMV-E Genoms liegt eine Besonderheit dieses Virus in dem Vorkommen der o.g. „privaten“ Gene mit nachgewiesener oder potentiell immunmodulatorischer Funktion, die nicht oder deutlich verändert in den Genomen von HCMV, MCMV und RCMV-M enthalten sind. Damit ist RCMV-E nicht unbedingt als Modell zum Studium der HCMV-Pathogenese geeignet, jedoch lassen sich durch die Untersuchung dieser „privaten“ Gene im Zweifel Erkenntnisse über diejenigen Virus-Wirt-Interaktionen gewinnen, an denen Viren beteiligt sind, die ähnliche immunmodulatorische Gene besitzen.

Zu den „privaten“ RCMV-E-Genen gehört neben einem C-Typ Lektin-ähnlichen Gen ein CD200-Homolog, dessen Vorkommen bei Cytomegaloviren erstmalig von uns beschrieben wurde und somit eine Neuheit bei CMVs darstellt [49]. Das CD200 (früher auch als OX-2 bezeichnete) Protein der Ratte wurde ursprünglich als Zielantigen eines monoklonalen Antikörpers gegen Rattenthymozyten identifiziert [159]. Danach erfolgte die Charakterisierung des CD200-Proteins als ein auf der Zelloberfläche lokalisiertes Glykoprotein mit Zugehörigkeit zur Immunglobulin-Superfamilie, und es gelang der Nachweis auf B-Zellen, aktivierten T-Zellen, Dendritischen Zellen, Endothelzellen und Neuronen. CD200 interagiert mit dem ihm verwandten CD200-Rezeptor (CD200R), der vorwiegend auf myeloiden Zellen vorhanden ist [160]. CD200R hemmt die inflammatorische Makrophagenaktivierung, was durch Studien illustriert wurde, in denen das Fehlen des Liganden CD200 zu einer schnelleren und massiveren Entzündungsreaktion führte. Das belegten auch Untersuchungen zur experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis, der Uveoretinitis und der Kollagen-induzierten Arthritis [161, 162]. Zahlreiche Untersuchungsergebnisse sprechen dafür, dass CD200 eine immunregulatorische Rolle zukommt. Eine wesentliche Funktion des CD200 besteht in der Unterdrückung einer proinflammatorischen Immunreaktion durch eine gezielte Regulierung myeloider Zellfunktionen [163]. Die Vermutung liegt nahe, dass CD200 in bestimmten

Gewebe eine inhibitorische Kontrolle übernimmt, die eine potentiell schädigende proinflammatorische Aktivität myeloider Zellen verhindert. Da bisher keine aktivierenden Rezeptoren bekannt sind, an die CD200 bindet, ist vorstellbar, dass evolutionäre Prozesse einen Druck aufrechterhalten, der insbesondere immunprivilegierte Nischen schützt. Diese Nischen könnten sich Viren zunutze machen, die virale CD200-Homologe kodieren. Hierzu gehören Herpesviren wie HHV-6, HHV-7 und HHV-8, aber auch einige Poxviren, wodurch die Bedeutung des CD200-Gens hervorgehoben wird. Das HHV-8 CD200-Homolog (K14) wird nach Infektion auf der Zelloberfläche exprimiert und bindet ebenfalls an CD200R, was zu einer Hemmung der Makrophagenaktivierung führt [164]. Die Bindungskinetik des RCMV-E CD200-Homologs entspricht der des endogenen CD200, jedoch konnte bisher nicht bewiesen werden, dass das RCMV-E CD200-Homolog nach Bindung an CD200R auf Rattenmakrophagen jenen inhibitorischen Effekt hat, wie er für das Myxoma Virus Protein M141 beschrieben wurde [164-166]. Nach Infektion von Mausmakrophagen mit einer M141-Deletionsmutante sind morphologische Veränderungen wie vermehrte Granularität und Zellgröße im Sinne einer Aktivierung beobachtet worden. Die fehlende Expression des M141 Proteins führte dabei zu einer deutlich erhöhten iNOS-Produktion im Griess-Assay als Ausdruck einer vermehrten Makrophagenaktivierung. Darüber hinaus wurde eine erhöhte Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF-alpha nach Infektion mit der M141-Deletionsmutante festgestellt, die durch eine Aktivierung des NF-kappaB-Signalweges ausgelöst wird. Dies lässt vermuten, dass M141 versucht, den NF-kappaB-Signalweg zu stören. Dazu passt der Umstand, dass M141 im Virion lokalisiert ist und somit das virale Protein zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion aktiv zu werden scheint. Der Rezeptor für M141 ist jedoch noch unbekannt. Vergleichbare Experimente zur Morphologie und iNOS-Produktion mit RCMV-E in Rattenmakrophagen zeigten keinen Unterschied zwischen Wildtypvirus und einer CD200-Deletionsmutante (Voigt et al., unveröffentlichte Daten). Ähnliche Versuche zur Zytokinproduktion nach RCMV-E-Infektion stehen noch aus.

In Anbetracht der Bedeutung der Chemokine und Chemokin-Rezeptoren für physiologische Abläufe in Organismen ist anzunehmen, dass diese Gene in gekappter Form für Viren ebenfalls eine große Rolle spielen und in die Abläufe des Immunsystems eingreifen. Sowohl für HCMV, MCMV als auch für RCMV-Isolate sind

Chemokin-Homologe der alpha- und beta-Klasse sowie Homologe von G Protein-gekoppelten Rezeptoren beschrieben worden. Für die von HCMV kodierten alpha-Chemokine UL146 und UL147 existieren keine vergleichbaren Gene bei MCMV und RCMV, jedoch für das beta-Chemokin UL128 [102]. RCMV-E und MCMV kodieren ein nahezu identisch gespleisstes Gen 131/129 [49]. Im Gegensatz dazu kodiert RCMV-M zwei getrennte Gene, die möglicherweise auf Duplikation eines gemeinsamen Vorläufer-Gens zurückzuführen sind. Die von MCMV m131/129 und RCMV-M r131 kodierten Chemokine induzieren die Chemotaxis von Makrophagen und sind für die Anlockung von Leukozyten verantwortlich, die daraufhin infiziert werden und anschließend als Vehikel für die weitere Ausbreitung der Viren dienen [123, 167, 168]. Es ist anzunehmen, dass das RCMV-E kodierte beta-Chemokin, das ein positionelles Homolog darstellt, ähnliche Wirkung ausübt. Eine Besonderheit stellt allerdings ein gamma-Chemokin-Homolog dar, das wir im RCMV-E-Genom fanden und das in der Literatur als virales Gen bislang nicht beschrieben wurde. Dieses Gen ist dem XCL-1 (auch Lymphotaktin oder ATAC)-Gen der Ratte und Maus ähnlich. Das murine XCL-1 bindet an den nur auf CD8<sup>+</sup> dendritischen Zellen exprimierten XCR-1-Rezeptor [124]. Diese Interaktion führt zu einer Antigenpräsentation von CD8<sup>+</sup> dendritischen Zellen an CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Es ist zu vermuten, dass das RCMV gamma-Chemokin-Homolog als Agonist oder Antagonist in diesen Prozess eingreift.

In der Literatur wurde bisher im Wesentlichen bei MCMV und HCMV über eine Vielzahl von viralen Strategien zur Umgehung einer effektiven NK-Zell-Antwort berichtet [169, 170]. Diese Strategien sind für das Virus wichtig, weil NK-Zellen infizierte Zellen erkennen und sie in der frühen Phase der Infektion zerstören. Das Erkennen erfolgt auf Grund balancierter Signale, die durch inhibitorische und aktivierende NK-Rezeptoren vermittelt werden. Die inhibitorischen Rezeptoren halten NK-Zellen davon ab, Zellen zu attackieren, die an endogene, inhibitorische Liganden binden. Hingegen aktivieren stimulierende NK-Rezeptoren den Angriff auf diejenigen Zellen, die nicht mehr über eigene Liganden auf der Oberfläche verfügen. Da eine CMV-Infektion mit einem Verlust von MHC Klasse I-Molekülen auf der Zelloberfläche einhergeht, wäre die infizierte Zelle einer direkten NK-Zell-Attacke ausgesetzt. Die Cytomegaloviren umgehen dies, indem sie MHC Klasse I-ähnliche Proteine bilden, die an inhibitorische NK-Rezeptoren binden. In diesem Zusammenhang konnten wir eine neue Strategie zur Umgehung der NK-Zell-Antwort zeigen. RCMV-E setzt mit

RCTL zu diesem Zweck ein Protein ein, bei dem es sich um kein MHC Klasse I-ähnliches Protein handelt und das wie das endogene Clec2D11 an NKRP1B bindet [171, 172]. Das zelluläre Clec2D11 wird bei einer RCMV-E-Infektion sowohl auf transkriptionaler als auch Proteinebene ab einem bestimmten Zeitpunkt nicht mehr exprimiert, was die infizierte Zelle für einen Angriff von NK-Zellen empfänglich macht, da das Protein nicht mehr gebildet wird und somit der inhibitorische Rezeptor keinen Bindungspartner mehr hat. Um dies zu umgehen, exprimiert RCMV-E das C-Typ-Lektin- (und Clec2D11-) Homolog RCTL, welches Clec2D11 ersetzt. Die fehlende Clec2D11-Expression ist jedoch nicht auf das Vorhandensein von RCTL zurückzuführen, da die fehlende Clec2D11-Expression auch bei einer Virusmutante, der RCTL fehlt, auftritt.

Es ist bisher nicht bekannt, warum die RCMV-E-Infektion zum Verlust der Expression des inhibitorischen Liganden Clec2D11 führt. Da kein aktivierender NK- oder T-Zell-Rezeptor bekannt ist, an den Clec2D11 bindet, ist nicht davon auszugehen, dass das Virus gezwungen ist, die Clec2D11-Expression zu modulieren. Allerdings scheint das Virus evolutionären Druck auf die Gene der Rezeptoren auszuüben. RCTL bindet nur an den inhibitorischen NK-Zell-Rezeptor NKRP1B bei dem untersuchten Rattenstamm *WAG*, hingegen findet bei dem Stamm *Sprague Dawley* keine Bindung statt [172]. Somit besteht die Möglichkeit, dass sich der Rezeptor bei *Sprague Dawley* Ratten im Lauf der Evolution verändert und dem Virus dadurch einen Manipulationsweg genommen hat. Es wird interessant sein sowohl bei Rezeptorgenen als auch bei immunmodulatorischen Genen in neu gewonnenen Virusisolaten Polymorphismen zu ermitteln, die die virale Pathogenese beeinflussen.

Bei dem Verlust des Clec2D11 könnte es sich um einen Zell-autonomen Stimulus handeln, der zu einem raschen Abbau des Proteins führt, aber gleichzeitig die Bildung neuer Clec2D11 mRNA unterbindet. Auf Grund dieser schwächer werdenden und letztlich ausbleibenden Transkription ist nicht anzunehmen, dass ein virales Protein existiert bzw. nötig ist, um Clec2D11 zu internalisieren. Sowohl die Hemmung der Transkription als auch die fehlende Expression des Proteins sind RCTL-unabhängig, da sie auch mit einer RCTL-Deletionsmutante erzielt werden. Experimente mit UV-inaktiviertem Virus könnten Auskunft darüber geben, ob das Vorhandensein nicht replizierender viraler DNA oder fehlender Tegumentproteine als

Stimulus für den Verlust der Clec2D11-Expression ausreicht. Möglicherweise handelt es sich um einen autonomen Schutzmechanismus vor einer Infektion, indem die Zelle die Gefahr erkennt und die Expression bestimmter Gene verändert. Diese Beobachtungen der veränderten Clec2D11-Expression passen in das „danger model“-Konzept, welches besagt, dass das Immunsystem beim Aufbau einer Abwehrreaktion nicht zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ unterscheidet, sondern endogene Signale von geschädigten oder infizierten Zellen erkennt [173]. Es ist vorstellbar, dass eine RCMV-Infektion Signale erzeugt, die mit einem Kontrollmechanismus zur Regulation von Clec2D11 und damit einem „pattern recognition pathway“ interferieren und auf diese Weise die Transkription von Clec2D11 unterbinden. Versuche, eine verminderte Clec2D11-Expression durch Typ I-Interferone oder TLR-Agonisten zu induzieren, blieben bislang erfolglos. Es wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, herauszufinden, welcher Mechanismus den Verlust von Clec2D11 bewirkt. Einen Ansatz zur intrazellulären Verfolgung von Clec2D11 bietet eventuell eine Markierung, etwa mit EGFP, oder die Kennzeichnung mit Hilfe eines chemoenzymatischen Systems [174].

Sowohl bei den NK-Zell-Rezeptoren wie auch bei CD200R handelt es sich um Mitglieder der „paired receptors“-Familie. Zu ihr gehören Membranproteine, die ähnliche extrazelluläre, jedoch unterschiedliche intrazelluläre Regionen aufweisen, so dass nach Bindung eines Liganden gegensätzliche Signale entstehen können, die über ein „tyrosine-based inhibitory motif“ bzw. ein „tyrosine-based activation motif“ vermittelt werden [125, 175]. Viele Zellen exprimieren sowohl inhibitorische als auch aktivierende Rezeptoren, und somit würde ein Ligand, der an beide Rezeptoren bindet, gegensätzliche Signale erzeugen. Dies findet jedoch kaum statt, da die inhibitorischen Liganden schwach bzw. gar nicht mit aktivierenden Rezeptoren interagieren. Im Allgemeinen stellen die Liganden für die inhibitorischen Rezeptoren ubiquitär vorkommende „Selbst“-Proteine wie CD200 (für CD200R) und MHC (für Ly49, KIR und NKG2) dar, jedoch existieren auch non-MHC-Moleküle, was am Beispiel des RCTL deutlich wird [172]. Das RCTL-Protein bindet an den inhibitorischen NKRP1B-Rezeptor, um einer Attacke durch die NK-Zelle zu entgehen. Während die aktivierenden NK-Rezeptoren insbesondere an der Kontrolle der NK-Zell-Aktivität beteiligt sind, ist die Rolle der aktivierenden myeloiden Moleküle wie CD200R nicht geklärt. Möglicherweise haben sich aktivierende Rezeptoren

entwickelt, um Erregern, die an inhibitorische Moleküle binden, entgegenzuwirken. Bei diesem als „Counterbalance theory“ bezeichneten Mechanismus liefe ein virales Protein, das zur Reduzierung einer Immunantwort mit einem inhibitorischen Rezeptor interagiert, somit Gefahr, fälschlicherweise an einen aktivierenden Rezeptor zu koppeln und dementsprechend ein gegensätzliches Signal auszulösen [176]. Für RCTL konnte jedoch bisher kein aktivierender Rezeptor identifiziert werden. Aktivierende CD200R wurden bei Ratten bisher nicht beschrieben, da jedoch einige Varianten in Mäusen gefunden wurden, ist es wahrscheinlich, dass auch in der anderen Spezies solche existieren. Wenn auch die „Counterbalance theory“ zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht unbedingt mit CD200R in Einklang zu bringen ist, passt sie gleichwohl zu dem in der Einleitung beschriebenen m157-Protein des MCMV und dessen Interaktion mit inhibierenden und aktivierenden Vertretern der Ly49-Familie [145, 177].

Die Reduzierung einer Immunzellaktivität wird zum einen durch einen hohen Grad an Polymorphismen bei den inhibitorischen Rezeptoren erzielt, zum anderen durch die Entwicklung aktivierender Rezeptoren. Ersteres wird durch die Existenz verschiedener NKRP1-Varianten deutlich, die verhindern sollen, dass ein virales Protein den Rezeptor erkennt. Die Diversität unter den Rezeptoren könnte durch Pathogene verursacht worden sein, jedoch ist sie bei CD200R nicht so stark ausgeprägt wie bei den NK-Rezeptoren. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass myeloide „paired receptors“ wie CD200R eher Immunantworten gegen Erreger regulieren als an der direkten Abwehr und damit der Tötung infizierter Zellen beteiligt zu sein, und damit einem schwächeren evolutionären Druck unterliegen.

Da die Signalerkennung durch NKRP1B auch im humanen System konserviert ist und Lektin-ähnliche Gene wie RCTL bei zahlreichen Poxviren vorkommen, kann man mutmaßen, dass die Interaktion dieser beiden Moleküle klinische Relevanz hat und „Proteinattrappen“ wie RCTL vielversprechende Ansatzpunkte für antivirale Therapien bieten. Die Analyse viraler Gene, die Homologe zellulärer Gene der Wirtsabwehr darstellen, kann somit nicht nur zum Verständnis der Viruspathogenese beitragen, sondern eventuell auch über die Biologie des Wirtsproteins Auskunft geben. Die Untersuchungen zu RCTL zeigen, dass unter dem durch die CMV-Infektion aufrechterhaltenen, andauernden Selektionsdruck sowohl der Wirt als auch



das Virus Taktiken entwickelt haben, um sich im evolutionären Wettstreit Vorteile zu verschaffen.

## 4. Zusammenfassung

Die Cytomegaloviren haben sich im Lauf der Evolution eine Vielzahl von zellulären Genen angeeignet, die ihnen die Replikation und Ausbreitung erleichtern und sichern sollen. Da die CMVs spezies-spezifisch sind, haben sie sich unterschiedlich entwickelt und sehr gut an ihren jeweiligen Wirt angepasst. Dabei nahmen sie wahrscheinlich diejenigen Gene in ihr Genom auf, die ihnen die besten Möglichkeiten bieten, einer Immunantwort standzuhalten. Damit läßt sich erklären, dass in den Genomen der CMVs von Mensch, Maus und Ratte sehr unterschiedliche immunmodulatorische Gene vorhanden sind. Die CMVs nutzen diese Gene, um in verschiedene zelluläre Prozesse wie die frühe Immunabwehr, die Antigenpräsentation und die adaptive Immunantwort einzugreifen. Zu diesem Zweck bedienen sie sich u. a. homologer Gene von Zyto- oder Chemokinen und Oberflächenmolekülen, die durch Bindung an Rezeptoren die Aktivität der Zielzelle regulieren. Um einen möglichst umfassenden Einfluss während der Infektion auszuüben, attackieren die Viren gezielt Immunzellen in verschiedenen Stadien der Infektion.

Auch das „England“-Isolat des RCMV enthält zahlreiche immunmodulierende Gene. RCMV-E kodiert ein CD200-Homolog, dessen zelluläres Pendant myeloide Zellen in ihrer Aktivierung hemmt, und ein C-Typ-Lektin-Homolog („RCTL“), das mit einem inhibitorischen Rezeptor auf Natürlichen Killer-Zellen interagiert. Während der Infektion kommt es zu einem Verlust des zellulären Liganden des NK-Zell-Rezeptors und der Entstehung eines „missing self“-Zustandes. Das Virus entgeht einer effektiven NK-Zell-Antwort, indem es RCTL exprimiert. Hierbei ist hervorzuheben, dass dieser Umgehungsprozeß nicht bei allen Rattenstämmen funktioniert, da NK-Rezeptoren über Polymorphismen verfügen. Außerdem enthält RCMV-E zwei Chemokin-Homologe. Die Bedeutung dieser Gene wird dadurch unterstrichen, dass andere Herpesviren wie HCMV, MCMV, HHV-6, HHV-7, HHV-8 sowie zahlreiche Poxviren ebenfalls im Besitz ähnlicher Gene sind und sie gegen das Immunsystem des Wirtes einsetzen. Durch die Untersuchung dieser Virus-kodierten, homologen Gene kann man nicht nur über die Viruspathogenese, sondern auch über die Biologie von Wirtsproteinen Erkenntnisse erhalten, die wesentlich zum besseren Verständnis des Infektionsgeschehens beitragen können.

## 5. Literaturangaben

1. Jesionek, A., Kiolemenoglou, B. Über einen befund von protozoenartigen gebilden in den organen eines heriditarluetischen fetus. Munch Med Wochenschr, 1904; 51: 1905-1907.
2. Ribbert, H. Über protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Neugeborenen und in der Parotis von Kindern. Zbl. Allg. Pathol., 1904; 15: 945-948.
3. Goodpasture, E.W., Talbot, F.B. Concerning the nature of "proteozoan-like" cells in certain lesions of infancy. Am J Dis Child, 1921; 21: 415-421.
4. Cole, R., Kuttner, A.G. A filtrable virus present in the submaxillary glands of guinea pigs. J Exp Med, 1926; 44: 855-873.
5. Smith, M.G. Propagation of salivary gland virus of the mouse in tissue cultures. Proc Soc Exp Biol Med, 1954; 86(3): 435-440.
6. Smith, M.G. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. Proc Soc Exp Biol Med, 1956; 92(2): 424-430.
7. Weller, T.H., Macauley, J.C., Craig, J.M., Wirth, P. Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. Proc Soc Exp Biol Med, 1957; 94(1): 4-12.
8. Rowe, W.P., Hartley, J.W., Waterman, S., Turner, H.C., Huebner, R.J. Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. Proc Soc Exp Biol Med, 1956; 92(2): 418-424.
9. Weller, T.H., Hanshaw, J.B., Scott, D.E. Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. Virology, 1960; 12: 130-132.
10. Staras, S.A., Dollard, S.C., Radford, K.W., Flanders, W.D., Pass, R.F., Cannon, M.J. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. Clin Infect Dis, 2006; 43(9): 1143-1151.
11. Staras, S.A., Flanders, W.D., Dollard, S.C., Pass, R.F., McGowan, J.E., Jr., Cannon, M.J. Cytomegalovirus seroprevalence and childhood sources of infection: A population-based study among pre-adolescents in the United States. J Clin Virol, 2008; 43(3): 266-271.
12. Hamprecht, K., Jahn, G. Human cytomegalovirus and congenital virus infection. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2007; 50(11): 1379-1392.
13. Hamprecht, K., Maschmann, J., Vochem, M., Dietz, K., Speer, C.P., Jahn, G. Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. Lancet, 2001; 357(9255): 513-518.
14. Mussi-Pinhata, M.M., Yamamoto, A.Y., Moura Brito, R.M., de Lima Isaac, M., de Carvalho e Oliveira, P.F., Boppana, S., Britt, W.J. Birth prevalence and natural history of congenital cytomegalovirus infection in a highly seroimmune population. Clin Infect Dis, 2009; 49(4): 522-528.
15. Nigro, G., Adler, S.P., La Torre, R., Best, A.M. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. N Engl J Med, 2005; 353(13): 1350-1362.
16. Stratton, K.R., Durch, J.S., Lawrence, R.S. Vaccines for the 21<sup>st</sup> century: a tool for decisionmaking. 2001, Washington DC: National Academy Press.

17. Zhong, J., Khanna, R. Vaccine strategies against human cytomegalovirus infection. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2007; 5: 449-459.
18. Pass, R.F., Zhang, C., Evans, A., Simpson, T., Andrews, W., Huang, M.L., Corey, L., Hill, J., Davis, E., Flanigan, C., Cloud, G. Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *N Engl J Med*, 2009; 360(12): 1191-1199.
19. Dolan, A., Cunningham, C., Hector, R.D., Hassan-Walker, A.F., Lee, L., Addison, C., Dargan, D.J., McGeoch, D.J., Gatherer, D., Emery, V.C., Griffiths, P.D., Sinzger, C., McSharry, B.P., Wilkinson, G.W., Davison, A.J. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J Gen Virol*, 2004; 85(Pt 5): 1301-1312.
20. Murphy, E., Rigoutsos, I., Shibuya, T., Shenk, T.E. Reevaluation of human cytomegalovirus coding potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003; 100(23): 13585-13590.
21. Murphy, E., Yu, D., Grimwood, J., Schmutz, J., Dickson, M., Jarvis, M.A., Hahn, G., Nelson, J.A., Myers, R.M., Shenk, T.E. Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003; 100(25): 14976-14981.
22. Cha, T.A., Tom, E., Kemble, G.W., Duke, G.M., Mocarski, E.S., Spaete, R.R. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol*, 1996; 70(1): 78-83.
23. Britt, W. Human Cytomegalovirus Infections and Mechanisms of Disease, in *Cytomegaloviruses. Molecular Biology and Immunology*, M.J. Reddehase, Editor. 2006, Caister Academic Press: Wymondham, Norfolk, United Kingdom. 483-500.
24. Hamprecht, K., Eckle, T., Prix, L., Faul, C., Einsele, H., Jahn, G. Ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation: pitfalls of phenotypic diagnosis by in vitro selection of an UL97 mutant strain. *J Infect Dis*, 2003; 187(1): 139-143.
25. Gohring, K., Feuchtinger, T., Mikeler, E., Lang, P., Jahn, G., Handgretinger, R., Hamprecht, K. Dynamics of the emergence of a human cytomegalovirus UL97 mutant strain conferring ganciclovir resistance in a pediatric stem-cell transplant recipient. *J Mol Diagn*, 2009; 11(4): 364-368.
26. Voigt, S., Michel, D., Kershaw, O., Kuhl, J.S., Mertens, T., Ebell, W., Meisel, H. Fatal reactivation of postnatal cytomegalovirus infection with rapid emergence of ganciclovir resistance in an infant after allogeneic stem cell transplantation. *J Clin Microbiol*, 2005; 43(7): 3551-3554.
27. Einsele, H., Hamprecht, K. Immunotherapy of cytomegalovirus infection after stem-cell transplantation: a new option? *Lancet*, 2003. 362(9393): 1343-4.
28. Einsele, H., Immunotherapy for CMV infection. *Cytherapy*, 2002; 4(5): 435-436.
29. Li Pira, G., Kapp, M., Manca, F., Einsele, H. Pathogen specific T-lymphocytes for the reconstitution of the immunocompromised host. *Curr Opin Immunol*, 2009; 21(5): 549-556.
30. Peggs, K.S. Adoptive T cell immunotherapy for cytomegalovirus. *Expert Opin Biol Ther*, 2009; 9(6): 725-736.
31. Riddell, S.R., Watanabe, K.S., Goodrich, J.M., Li, C.R., Agha, M.E., Greenberg, P.D. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science*, 1992; 257(5067): 238-241.
32. Walter, E.A., Greenberg, P.D., Gilbert, M.J., Finch, R.J., Watanabe, K.S., Thomas, E.D., Riddell, S.R. Reconstitution of cellular immunity against

- cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med*, 1995; 333(16): 1038-1044.
33. Pass, R.F., Boppana, A.S. Cytomegalovirus, in *Infections in Obstetrics and Gynaecology*, D.J. Jeffries, Hudson, C.N., Editors. 1999, Arnold: New York. 35-56.
  34. Ross, S.A., Arora, N., Novak, Z., Fowler, K.B., Britt, W.J., Boppana, S.B. Cytomegalovirus Reinfections in Healthy Seroimmune Women. *J Infect Dis*, 2009; 201(3): 386-389.
  35. Yamamoto, A.Y., Mussi-Pinhata, M.M., Boppana, S.B., Novak, Z., Wagatsuma, V.M., Oliveira, P.D., Duarte, G., Britt, W.J. Human cytomegalovirus reinfection is associated with intrauterine transmission in a highly cytomegalovirus-immune maternal population. *Am J Obstet Gynecol*, 2010; Epub ahead of print.
  36. Maschmann, J., Hamprecht, K., Dietz, K., Jahn, G., Speer, C.P. Cytomegalovirus infection of extremely low-birth weight infants via breast milk. *Clin Infect Dis*, 2001; 33(12): 1998-2003.
  37. Hamprecht, K., Maschmann, J., Jahn, G., Poets, C.F., Goelz, R. Cytomegalovirus transmission to preterm infants during lactation. *J Clin Virol*, 2008; 41(3): 198-205.
  38. Powers, C., DeFilippis, V., Malouli, D., Fruh, K. Cytomegalovirus immune evasion. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2008; 325: 333-359.
  39. Sinzger, C., Hahn, G., Digel, M., Katona, R., Sampaio, K.L., Messerle, M., Hengel, H., Koszinowski, U., Brune, W., Adler, B. Cloning and sequencing of a highly productive, endotheliotropic virus strain derived from human cytomegalovirus TB40/E. *J Gen Virol*, 2008; 89(Pt 2): 359-368.
  40. Cunningham, C., Gatherer, D., Hilfrich, B., Baluchova, K., Dargan, D.J., Thomson, M., Griffiths, P.D., Wilkinson, G.W., Schulz, T.F., Davison, A.J. Sequences of complete human cytomegalovirus genomes from infected cell cultures and clinical specimens. *J Gen Virol*, 2010; 91: 605-615.
  41. Yu, D., Silva, M.C., Shenk, T. Functional map of human cytomegalovirus AD169 defined by global mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003; 100(21): 12396-12401.
  42. Lafemina, R.L., Hayward, G.S. Differences in cell-type-specific blocks to immediate early gene expression and DNA replication of human, simian and murine cytomegalovirus. *J Gen Virol*, 1988; 69 ( Pt 2): 355-374.
  43. LaFemina, R.L., Hayward, G.S. Replicative forms of human cytomegalovirus DNA with joined termini are found in permissively infected human cells but not in non-permissive Balb/c-3T3 mouse cells. *J Gen Virol*, 1983; 64 (Pt 2): 373-389.
  44. Jurak, I., Brune, W. Induction of apoptosis limits cytomegalovirus cross-species infection. *EMBO J*, 2006; 25(11): 2634-2642.
  45. Simon, C.O., Seckert, C., Grzimek, N.K., Reddehase, M.J. Murine Model of Cytomegalovirus Latency and Reactivation: the Silencing/Desilencing and Immune Sensing Hypothesis, in *Cytomegaloviruses. Molecular Biology and Immunology*, M.J. Reddehase, Editor. 2006, Caister Academic Press: Wymondham, Norfolk, United Kingdom. 483-500.
  46. Reddehase, M.J., Simon, C.O., Seckert, C.K., Lemmermann, N., Grzimek, N.K. Murine model of cytomegalovirus latency and reactivation. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2008; 325: 315-331.

47. Krmpotic, A., Bubic, I., Polic, B., Lucin, P., Jonjic, S. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. *Microbes Infect*, 2003; 5(13): 1263-1277.
48. Beisser, P.S., S. J. Kaptein, E. Beuken, C. A. Bruggeman, and C. Vink The Maastricht strain and England strain of rat cytomegalovirus represent different betaherpesvirus species rather than strains. *Virology*, 1998; 246: 341-351.
49. Voigt, S., Sandford, G.R., Hayward, G.S., Burns, W.H. The English strain of rat cytomegalovirus (CMV) contains a novel captured CD200 (vOX2) gene and a spliced CC chemokine upstream from the major immediate-early region: further evidence for a separate evolutionary lineage from that of rat CMV Maastricht. *J Gen Virol*, 2005; 86(Pt 2): 263-274.
50. Bruggeman, C.A., Meijer, H., Dormans, P.H., Debie, W.M., Grauls, G.E., van Boven, C.P. Isolation of a cytomegalovirus-like agent from wild rats. *Arch Virol*, 1982; 73(3-4): 231-241.
51. Priscott, P.K., Tyrrell, D.A. The isolation and partial characterisation of a cytomegalovirus from the brown rat, *Rattus norvegicus*. *Arch Virol*, 1982; 73(2): 145-160.
52. Schleiss, M.R., Lacayo, J.C. The Guinea-pig Model of Congenital Cytomegalovirus Infection, in *Cytomegaloviruses. Molecular Biology and Immunology*, M.J. Reddehase, Editor. 2006, Caister Academic Press: Wymondham, Norfolk, United Kingdom. 525-550.
53. Medearis, D.N., Jr. Mouse Cytomegalovirus Infection. 3. Attempts to Produce Intrauterine Infections. *Am J Hyg*, 1964; 80: 113-120.
54. Johnson, K.P. Mouse cytomegalovirus: placental infection. *J Infect Dis*, 1969; 120(4): 445-450.
55. Loh, H.S., Mohd-Lila, M.A., Abdul-Rahman, S.O., Kiew, L.J. Pathogenesis and vertical transmission of a transplacental rat cytomegalovirus. *Virol J*, 2006; 3: 42.
56. Powers, C., Fruh, K. Rhesus CMV: an emerging animal model for human CMV. *Med Microbiol Immunol*, 2008; 197(2): 109-115.
57. Davison, A.J., Dolan, A., Akter, P., Addison, C., Dargan, D.J., Alcendor, D.J., McGeoch, D.J., Hayward, G.S. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J Gen Virol*, 2003; 84(Pt 1): 17-28.
58. Burns, W.H., Barbour G.M., Sandford, G.R. Molecular cloning and mapping of rat cytomegalovirus DNA. *Virology*, 1988; 166: 140-148.
59. Chee, M.S., Bankier, A.T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C.M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison, C.A., 3rd, Kouzarides, T., Martignetti, J.A., et al., Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1990; 154: 125-169.
60. Rawlinson, W.D., Farrell H. E., Barrell B. G. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J Virol*, 1996; 70: 8833-8849.
61. Vink, C., Beuken E., Bruggeman C. A. Complete DNA Sequence of the Rat Cytomegalovirus Genome. *J Virol*, 2000; 74: 7656-7665.
62. Schleiss, M.R., McGregor, A., Choi, K.Y., Date, S.V., Cui, X., McVoy, M.A. Analysis of the nucleotide sequence of the guinea pig cytomegalovirus (GPCMV) genome. *Virol J*, 2008; 5: 139.
63. Hansen, S.G., Strelow, L.I., Franchi, D.C., Anders, D.G., Wong, S.W. Complete sequence and genomic analysis of rhesus cytomegalovirus. *J Virol*, 2003; 77(12): 6620-6636.

64. Mocarski, E.S., Post, L.E., Roizman, B. Molecular engineering of the herpes simplex virus genome: insertion of a second L-S junction into the genome causes additional genome inversions. *Cell*, 1980; 22(1 Pt 1): 243-255.
65. van Zijl, M., Quint, W., Briaire, J., de Rover, T., Gielkens, A., Berns, A. Regeneration of herpesviruses from molecularly cloned subgenomic fragments. *J Virol*, 1988; 62(6): 2191-2195.
66. Messerle, M., Crnkovic, I., Hammerschmidt, W., Ziegler, H., Koszinowski, U.H. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997; 94(26): 14759-14763.
67. Ruzsics, Z., Koszinowski, U.H. Mutagenesis of the cytomegalovirus genome. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2008; 325: 41-61.
68. Brune, W., Menard, C., Hobom, U., Odenbreit, S., Messerle, M., Koszinowski, U.H. Rapid identification of essential and nonessential herpesvirus genes by direct transposon mutagenesis. *Nat Biotechnol*, 1999; 17(4): 360-364.
69. Brune, W., Messerle, M., Koszinowski, U.H. Forward with BACs: new tools for herpesvirus genomics. *Trends Genet*, 2000; 16(6): 254-259.
70. Tischer, B.K., von Einem, J., Kaufer, B., Osterrieder, N. Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *Biotechniques*, 2006; 40(2): 191-197.
71. Alcami, A., Koszinowski, U.H. Viral mechanisms of immune evasion. *Trends Microbiol*, 2000; 8(9): 410-418.
72. Reddehase, M.J., Simon, C.O., Podlech, J., Holtappels, R. Stalemating a clever opportunist: lessons from murine cytomegalovirus. *Hum Immunol*, 2004; 65(5): 446-455.
73. Reddehase, M.J. Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat Rev Immunol*, 2002; 2(11): 831-844.
74. Wiebusch, L., Neuwirth, A., Grabenhenrich, L., Voigt, S., Hagemeyer, C. Cell cycle-independent expression of immediate-early gene 3 results in G1 and G2 arrest in murine cytomegalovirus-infected cells. *J Virol*, 2008; 82(20): 10188-10198.
75. Reddehase, M.J., Koszinowski, U.H. Significance of herpesvirus immediate early gene expression in cellular immunity to cytomegalovirus infection. *Nature*, 1984; 312(5992): 369-371.
76. Wagner, M., Gutermann, A., Podlech, J., Reddehase, M.J., Koszinowski, U.H. Major histocompatibility complex class I allele-specific cooperative and competitive interactions between immune evasion proteins of cytomegalovirus. *J Exp Med*, 2002; 196(6): 805-816.
77. Kleijnen, M.F., Huppa, J.B., Lucin, P., Mukherjee, S., Farrell, H., Campbell, A.E., Koszinowski, U.H., Hill, A.B., Ploegh, H.L. A mouse cytomegalovirus glycoprotein, gp34, forms a complex with folded class I MHC molecules in the ER which is not retained but is transported to the cell surface. *EMBO J*, 1997; 16(4): 685-694.
78. Reusch, U., Muranyi, W., Lucin, P., Burgert, H.G., Hengel, H., Koszinowski, U.H. A cytomegalovirus glycoprotein re-routes MHC class I complexes to lysosomes for degradation. *EMBO J*, 1999; 18(4): 1081-1091.
79. Ziegler, H., Thale, R., Lucin, P., Muranyi, W., Flohr, T., Hengel, H., Farrell, H., Rawlinson, W., Koszinowski, U.H. A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/cis-Golgi compartments. *Immunity*, 1997; 6(1): 57-66.

80. Holtappels, R., Podlech, J., Pahl-Seibert, M.F., Julch, M., Thomas, D., Simon, C.O., Wagner, M., Reddehase, M.J. Cytomegalovirus misleads its host by priming of CD8 T cells specific for an epitope not presented in infected tissues. *J Exp Med*, 2004; 199(1): 131-136.
81. Holtappels, R., Simon, C.O., Munks, M.W., Thomas, D., Deegen, P., Kuhnappel, B., Daubner, T., Emde, S.F., Podlech, J., Grzimek, N.K., Oehrlein-Karpi, S.A., Hill, A.B., Reddehase, M.J. Subdominant CD8 T-cell epitopes account for protection against cytomegalovirus independent of immunodomination. *J Virol*, 2008; 82(12): 5781-5796.
82. Holtappels, R., Thomas, D., Reddehase, M.J. The efficacy of antigen processing is critical for protection against cytomegalovirus disease in the presence of viral immune evasion proteins. *J Virol*, 2009; 83(18): 9611-9615.
83. Hengel, H., Koopmann, J.O., Flohr, T., Muranyi, W., Goulmy, E., Hammerling, G.J., Koszinowski, U.H., Momburg, F. A viral ER-resident glycoprotein inactivates the MHC-encoded peptide transporter. *Immunity*, 1997; 6(5): 623-632.
84. Ahn, K., Angulo, A., Ghazal, P., Peterson, P.A., Yang, Y., Fruh, K. Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996; 93(20): 10990-10995.
85. Jones, T.R., Wiertz, E.J., Sun, L., Fish, K.N., Nelson, J.A., Ploegh, H.L. Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996; 93(21): 11327-11333.
86. Wiertz, E.J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T.R., Rapoport, T.A., Ploegh, H.L. Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature*, 1996; 384(6608): 432-438.
87. Wiertz, E.J., Jones, T.R., Sun, L., Bogyo, M., Geuze, H.J., Ploegh, H.L. The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell*, 1996; 84(5): 769-779.
88. Zlotnik, A., Yoshie, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 2000; 12(2): 121-127.
89. Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hebert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., Power, C.A. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*, 2000; 52(1): 145-176.
90. Kelner, G.S., Kennedy, J., Bacon, K.B., Kleyensteuber, S., Largaespada, D.A., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Bazan, J.F., Moore, K.W., Schall, T.J., et al., Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science*, 1994. 266(5189): 1395-1399.
91. Kennedy, J., Kelner, G.S., Kleyensteuber, S., Schall, T.J., Weiss, M.C., Yssel, H., Schneider, P.V., Cocks, B.G., Bacon, K.B., Zlotnik, A. Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. *J Immunol*, 1995; 155(1): 203-209.
92. Muller, S., Dorner, B., Korthauer, U., Mages, H.W., D'Apuzzo, M., Senger, G., Kroczek, R.A. Cloning of ATAC, an activation-induced, chemokine-related molecule exclusively expressed in CD8+ T lymphocytes. *Eur J Immunol*, 1995; 25(6): 1744-1748.



93. Yoshida, T., Imai, T., Kakizaki, M., Nishimura, M., Yoshie, O. Molecular cloning of a novel C or gamma type chemokine, SCM-1. *FEBS Lett*, 1995; 360(2): 155-159.
94. Huang, H., Li, F., Cairns, C.M., Gordon, J.R., Xiang, J. Neutrophils and B cells express XCR1 receptor and chemotactically respond to lymphotactin. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001; 281(2): 378-382.
95. Yoshida, T., Imai, T., Kakizaki, M., Nishimura, M., Takagi, S., Yoshie, O. Identification of single C motif-1/lymphotactin receptor XCR1. *J Biol Chem*, 1998; 273(26): 16551-16554.
96. Yoshida, T., Izawa, D., Nakayama, T., Nakahara, K., Kakizaki, M., Imai, T., Suzuki, R., Miyasaka, M., Yoshie, O. Molecular cloning of mXCR1, the murine SCM-1/lymphotactin receptor. *FEBS Lett*, 1999; 458(1): 37-40.
97. Lindow, M., Nansen, A., Bartholdy, C., Stryhn, A., Hansen, N.J., Boesen, T.P., Wells, T.N., Schwartz, T.W., Thomsen, A.R. The virus-encoded chemokine vMIP-II inhibits virus-induced Tc1-driven inflammation. *J Virol*, 2003; 77(13): 7393-7400.
98. Lutichau, H.R., Johnsen, A.H., Jurlander, J., Rosenkilde, M.M., Schwartz, T.W., Kaposi Sarcoma-associated herpesvirus targets the lymphotactin receptor with both a broadspectrum antagonist vCCL2 and a highly selective and potent agonist vCCL3. *J Biol Chem*, 2007; 282: 17794-17805.
99. Alcami, A. New insights into the subversion of the chemokine system by poxviruses. *Eur J Immunol*, 2007; 37(4): 880-883.
100. Nicholas, J. Human herpesvirus 8-encoded proteins with potential roles in virus-associated neoplasia. *Front Biosci*, 2007; 12: 265-281.
101. Rosenkilde, M.M., Kledal, T.N. Targeting herpesvirus reliance of the chemokine system. *Curr Drug Targets*, 2006; 7(1): 103-118.
102. Saederup, N., Mocarski, E.S., Jr. Fatal attraction: cytomegalovirus-encoded chemokine homologs. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2002; 269: 235-256.
103. Seet, B.T., Johnston, J.B., Brunetti, C.R., Barrett, J.W., Everett, H., Cameron, C., Sypula, J., Nazarian, S.H., Lucas, A., McFadden, G. Poxviruses and immune evasion. *Annu Rev Immunol*, 2003; 21: 377-423.
104. Alcami, A. Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors. *Nat Rev Immunol*, 2003; 3(1): 36-50.
105. Coscoy, L. Immune evasion by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Nat Rev Immunol*, 2007; 7(5): 391-401.
106. Kledal, T.N., Rosenkilde, M.M., Coulin, F., Simmons, G., Johnsen, A.H., Alouani, S., Power, C.A., Lutichau, H.R., Gerstoft, J., Clapham, P.R., Clark-Lewis, I., Wells, T.N., Schwartz, T.W. A broad-spectrum chemokine antagonist encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Science*, 1997; 277(5332): 1656-1659.
107. Penfold, M.E., Dairaghi, D.J., Duke, G.M., Saederup, N., Mocarski, E.S., Kemble, G.W., Schall, T.J. Cytomegalovirus encodes a potent alpha chemokine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999; 96(17): 9839-9844.
108. McFadden, G., Lalani, A., Everett, H., Nash, P., Xu, X. Virus-encoded receptors for cytokines and chemokines. *Semin Cell Dev Biol*, 1998. 9(3): 359-368.
109. Lutichau, H.R., Clark-Lewis, I., Jensen, P.O., Moser, C., Gerstoft, J., Schwartz, T.W. A highly selective CCR2 chemokine agonist encoded by human herpesvirus 6. *J Biol Chem*, 2003; 278(13): 10928-10933.

110. Dewin, D.R., Catusse, J., Gompels, U.A. Identification and characterization of U83A viral chemokine, a broad and potent beta-chemokine agonist for human CCRs with unique selectivity and inhibition by spliced isoform. *J Immunol*, 2006; 176(1): 544-556.
111. Beisser, P.S., Vink, C., Van Dam, J.G., Grauls, G., Vanherle, S.J., Bruggeman, C.A. The R33 G protein-coupled receptor gene of rat cytomegalovirus plays an essential role in the pathogenesis of viral infection. *J Virol*, 1998; 72(3): 2352-2363.
112. Streblow, D.N., Soderberg-Naucler, C., Vieira, J., Smith, P., Wakabayashi, E., Ruchti, F., Mattison, K., Altschuler, Y., Nelson, J.A. The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. *Cell*, 1999; 99(5): 511-520.
113. MacDonald, M.R., Burney, M.W., Resnick, S.B., Virgin, H.I. Spliced mRNA encoding the murine cytomegalovirus chemokine homolog predicts a beta chemokine of novel structure. *J Virol*, 1999; 73(5): 3682-3691.
114. Tadagaki, K., Nakano, K., Yamanishi, K. Human herpesvirus 7 open reading frames U12 and U51 encode functional beta-chemokine receptors. *J Virol*, 2005; 79(11): 7068-7076.
115. Miller-Kittrell, M., Sai, J., Penfold, M., Richmond, A., Sparer, T.E. Functional characterization of chimpanzee cytomegalovirus chemokine, vCXCL-1(CCMV). *Virology*, 2007; 364(2): 454-465.
116. Arav-Boger, R., Willoughby, R.E., Pass, R.F., Zong, J.C., Jang, W.J., Alcendor, D., Hayward, G.S. Polymorphisms of the cytomegalovirus (CMV)-encoded tumor necrosis factor-alpha and beta-chemokine receptors in congenital CMV disease. *J Infect Dis*, 2002; 186(8): 1057-1064.
117. Arav-Boger, R., Battaglia, C.A., Lazzarotto, T., Gabrielli, L., Zong, J.C., Hayward, G.S., Diener-West, M., Landini, M.P. Cytomegalovirus (CMV)-encoded UL144 (truncated tumor necrosis factor receptor) and outcome of congenital CMV infection. *J Infect Dis*, 2006; 194(4): 464-473.
118. Arav-Boger, R., Foster, C.B., Zong, J.C., Pass, R.F. Human cytomegalovirus-encoded alpha -chemokines exhibit high sequence variability in congenitally infected newborns. *J Infect Dis*, 2006; 193(6): 788-791.
119. Dairaghi, D.J., Fan, R.A., McMaster, B.E., Hanley, M.R., Schall, T.J. HHV8-encoded vMIP-I selectively engages chemokine receptor CCR8. Agonist and antagonist profiles of viral chemokines. *J Biol Chem*, 1999; 274(31): 21569-21574.
120. Endres, M.J., Garlisi, C.G., Xiao, H., Shan, L., Hedrick, J.A. The Kaposi's sarcoma-related herpesvirus (KSHV)-encoded chemokine vMIP-I is a specific agonist for the CC chemokine receptor (CCR)8. *J Exp Med*, 1999; 189(12): 1993-1998.
121. Luttichau, H.R., Stine, J., Boesen, T.P., Johnsen, A.H., Chantry, D., Gerstoff, J., Schwartz, T.W. A highly selective CC chemokine receptor (CCR)8 antagonist encoded by the poxvirus molluscum contagiosum. *J Exp Med*, 2000; 191(1): 171-180.
122. Stine, J.T., Wood, C., Hill, M., Epp, A., Raport, C.J., Schweickart, V.L., Endo, Y., Sasaki, T., Simmons, G., Boshoff, C., Clapham, P., Chang, Y., Moore, P., Gray, P.W., Chantry, D. KSHV-encoded CC chemokine vMIP-III is a CCR4 agonist, stimulates angiogenesis, and selectively chemoattracts TH2 cells. *Blood*, 2000; 95(4): 1151-1157.

123. Noda, S., Aguirre, S.A., Bitmansour, A., Brown, J.M., Sparer, T.E., Huang, J., Mocarski, E.S. Cytomegalovirus MCK-2 controls mobilization and recruitment of myeloid progenitor cells to facilitate dissemination. *Blood*, 2006; 107(1): 30-38.
124. Dorner, B.G., Dorner, M.B., Zhou, X., Opitz, C., Mora, A., Guttler, S., Hutloff, A., Mages, H.W., Ranke, K., Schaefer, M., Jack, R.S., Henn, V., Kroczeck, R.A. Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8+ T cells. *Immunity*, 2009; 31(5): 823-833.
125. Lanier, L.L. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*, 2005. 23: 225-74.
126. Kumar, V., McNerney, M.E., A new self: MHC-class-I-independent natural-killer-cell self-tolerance. *Nat Rev Immunol*, 2005; 5(5): 363-374.
127. Karre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G., Kiessling, R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*, 1986; 319(6055): 675-678.
128. Yokoyama, W.M., Plougastel, B.F. Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat Rev Immunol*, 2003; 3(4): 304-316.
129. Zafirova, B., Mandaric, S., Antulov, R., Krmpotic, A., Jonsson, H., Yokoyama, W.M., Jonjic, S., Polic, B. Altered NK cell development and enhanced NK cell-mediated resistance to mouse cytomegalovirus in NKG2D-deficient mice. *Immunity*, 2009; 31(2): 270-282.
130. Reyburn, H.T., Mandelboim, O., Vales-Gomez, M., Davis, D.M., Pazmany, L., Strominger, J.L. The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature*, 1997; 386(6624): 514-517.
131. Cosman, D., Fanger, N., Borges, L., Kubin, M., Chin, W., Peterson, L., Hsu, M.L. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity*, 1997; 7(2): 273-282.
132. Leong, C.C., Chapman, T.L., Bjorkman, P.J., Formankova, D., Mocarski, E.S., Phillips, J.H., Lanier, L.L. Modulation of natural killer cell cytotoxicity in human cytomegalovirus infection: the role of endogenous class I major histocompatibility complex and a viral class I homolog. *J Exp Med*, 1998; 187(10): 1681-1687.
133. Prod'homme, V., Griffin, C., Aicheler, R.J., Wang, E.C., McSharry, B.P., Rickards, C.R., Stanton, R.J., Borysiewicz, L.K., Lopez-Botet, M., Wilkinson, G.W., Tomasec, P. The human cytomegalovirus MHC class I homolog UL18 inhibits LIR-1+ but activates LIR-1- NK cells. *J Immunol*, 2007; 178(7): 4473-4481.
134. Wagner, C.S., Riise, G.C., Bergstrom, T., Karre, K., Carbone, E., Berg, L. Increased expression of leukocyte Ig-like receptor-1 and activating role of UL18 in the response to cytomegalovirus infection. *J Immunol*, 2007; 178(6): 3536-3543.
135. Raulet, D.H. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol*, 2003; 3(10): 781-790.
136. Welte, S.A., Sinzger, C., Lutz, S.Z., Singh-Jasuja, H., Sampaio, K.L., Eknigg, U., Rammensee, H.G., Steinle, A. Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. *Eur J Immunol*, 2003; 33(1): 194-203.
137. Chalupny, N.J., Rein-Weston, A., Dosch, S., Cosman, D. Down-regulation of the NKG2D ligand MICA by the human cytomegalovirus glycoprotein UL142. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006; 346(1): 175-181.

138. Ashiru, O., Bennett, N.J., Boyle, L.H., Thomas, M., Trowsdale, J., Wills, M.R. NKG2D ligand MICA is retained in the cis-Golgi apparatus by human cytomegalovirus protein UL142. *J Virol*, 2009; 83(23): 12345-12354.
139. Krmpotic, A., Busch, D.H., Bubic, I., Gebhardt, F., Hengel, H., Hasan, M., Scalzo, A.A., Koszinowski, U.H., Jonjic, S. MCMV glycoprotein gp40 confers virus resistance to CD8+ T cells and NK cells in vivo. *Nat Immunol*, 2002; 3(6): 529-535.
140. Krmpotic, A., Hasan, M., Loewendorf, A., Saulig, T., Halenius, A., Lenac, T., Polic, B., Bubic, I., Kriegeskorte, A., Pernjak-Pugel, E., Messerle, M., Hengel, H., Busch, D.H., Koszinowski, U.H., Jonjic, S. NK cell activation through the NKG2D ligand MULT-1 is selectively prevented by the glycoprotein encoded by mouse cytomegalovirus gene m145. *J Exp Med*, 2005; 201(2): 211-220.
141. Hasan, M., Krmpotic, A., Ruzsics, Z., Bubic, I., Lenac, T., Halenius, A., Loewendorf, A., Messerle, M., Hengel, H., Jonjic, S., Koszinowski, U.H. Selective down-regulation of the NKG2D ligand H60 by mouse cytomegalovirus m155 glycoprotein. *J Virol*, 2005; 79(5): 2920-2930.
142. Lenac, T., Budt, M., Arapovic, J., Hasan, M., Zimmermann, A., Simic, H., Krmpotic, A., Messerle, M., Ruzsics, Z., Koszinowski, U.H., Hengel, H., Jonjic, S. The herpesviral Fc receptor fcr-1 down-regulates the NKG2D ligands MULT-1 and H60. *J Exp Med*, 2006; 203(8): 1843-1850.
143. Lodoen, M., Ogasawara, K., Hamerman, J.A., Arase, H., Houchins, J.P., Mocarski, E.S., Lanier, L.L. NKG2D-mediated natural killer cell protection against cytomegalovirus is impaired by viral gp40 modulation of retinoic acid early inducible 1 gene molecules. *J Exp Med*, 2003. 197(10): 1245-1253.
144. Lenac, T., Arapovic, J., Traven, L., Krmpotic, A., Jonjic, S. Murine cytomegalovirus regulation of NKG2D ligands. *Med Microbiol Immunol*, 2008; 197(2): 159-166.
145. Arase, H., Mocarski, E.S., Campbell, A.E., Hill, A.B., Lanier, L.L. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science*, 2002; 296(5571): 1323-1326.
146. French, A.R., Pingel, J.T., Wagner, M., Bubic, I., Yang, L., Kim, S., Koszinowski, U., Jonjic, S., Yokoyama, W.M. Escape of mutant double-stranded DNA virus from innate immune control. *Immunity*, 2004; 20(6): 747-756.
147. Carlyle, J.R., Jamieson, A.M., Gasser, S., Clingan, C.S., Arase, H., Raulet, D.H. Missing self-recognition of Ocl/Clr-b by inhibitory NKR-P1 natural killer cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004; 101(10): 3527-3532.
148. Hengel, H., Brune, W., Koszinowski, U.H. Immune evasion by cytomegalovirus--survival strategies of a highly adapted opportunist. *Trends Microbiol*, 1998; 6(5): 190-197.
149. Stinski, M.F., Isomura, H. Role of the cytomegalovirus major immediate early enhancer in acute infection and reactivation from latency. *Med Microbiol Immunol*, 2008; 197(2): 223-231.
150. Tavalai, N., Stamminger, T. New insights into the role of the subnuclear structure ND10 for viral infection. *Biochim Biophys Acta*, 2008; 1783(11): 2207-2221.
151. Ahn, J.H., Hayward, G.S. Disruption of PML-associated nuclear bodies by IE1 correlates with efficient early stages of viral gene expression and DNA replication in human cytomegalovirus infection. *Virology*, 2000; 274(1): 39-55.

152. Ahn, J.H., Hayward, G.S. The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells. *J Virol*, 1997; 71(6): 4599-4613.
153. Tang, Q., Maul, G.G. Mouse cytomegalovirus immediate-early protein 1 binds with host cell repressors to relieve suppressive effects on viral transcription and replication during lytic infection. *J Virol*, 2003; 77(2): 1357-1367.
154. Tavalai, N., Papior, P., Rechter, S., Leis, M., Stamminger, T. Evidence for a role of the cellular ND10 protein PML in mediating intrinsic immunity against human cytomegalovirus infections. *J Virol*, 2006; 80(16): 8006-8018.
155. Sandford, G.R., Schumacher, U., Ettinger, J., Brune, W., Hayward, G.S., Burns, W.H., Voigt, S. Deletion of the rat cytomegalovirus immediate early 1 gene results in a virus capable of establishing latency, but with lower levels of acute virus replication and latency that compromise reactivation efficiency. *J Gen Virol*, 2010; 91: 616-621.
156. Busche, A., Angulo, A., Kay-Jackson, P., Ghazal, P., Messerle, M. Phenotypes of major immediate-early gene mutants of mouse cytomegalovirus. *Med Microbiol Immunol*, 2008; 197(2): 233-240.
157. Ghazal, P., Visser, A.E., Gustems, M., Garcia, R., Borst, E.M., Sullivan, K., Messerle, M., Angulo, A. Elimination of ie1 significantly attenuates murine cytomegalovirus virulence but does not alter replicative capacity in cell culture. *J Virol*, 2005; 79(11): 7182-7194.
158. Teterina, A., Richter, D., Matuschka, F.R., Ehlers, B., Voigt, S. Identification of a novel betaherpesvirus in *Mus musculus*. *Virol J*, 2009; 6(1): 225.
159. Barclay, A.N., Ward, H.A. Purification and chemical characterisation of membrane glycoproteins from rat thymocytes and brain, recognised by monoclonal antibody MRC OX 2. *Eur J Biochem*, 1982; 129(2): 447-458.
160. Wright, G.J., Puklavec, M.J., Willis, A.C., Hoek, R.M., Sedgwick, J.D., Brown, M.H., Barclay, A.N. Lymphoid/neuronal cell surface OX2 glycoprotein recognizes a novel receptor on macrophages implicated in the control of their function. *Immunity*, 2000; 13(2): 233-242.
161. Hoek, R.M., Ruuls, S.R., Murphy, C.A., Wright, G.J., Goddard, R., Zurawski, S.M., Blom, B., Homola, M.E., Streit, W.J., Brown, M.H., Barclay, A.N., Sedgwick, J.D. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science*, 2000; 290(5497): 1768-1771.
162. Broderick, C., Hoek, R.M., Forrester, J.V., Liversidge, J., Sedgwick, J.D., Dick, A.D. Constitutive retinal CD200 expression regulates resident microglia and activation state of inflammatory cells during experimental autoimmune uveoretinitis. *Am J Pathol*, 2002; 161(5): 1669-1677.
163. Barclay, A.N., Wright, G.J., Brooke, G., Brown, M.H. CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends Immunol*, 2002; 23(6): 285-290.
164. Foster-Cuevas, M., Wright, G.J., Puklavec, M.J., Brown, M.H., Barclay, A.N. Human herpesvirus 8 K14 protein mimics CD200 in down-regulating macrophage activation through CD200 receptor. *J Virol*, 2004; 78(14): 7667-7676.
165. Cameron, C.M., Barrett, J.W., Liu, L., Lucas, A.R., McFadden, G. Myxoma virus M141R expresses a viral CD200 (vOX-2) that is responsible for down-regulation of macrophage and T-cell activation in vivo. *J Virol*, 2005; 79(10): 6052-6067.

166. Zhang, L., Stanford, M., Liu, J., Barrett, C., Jiang, L., Barclay, A.N., McFadden, G. Inhibition of macrophage activation by the myxoma virus M141 protein (vCD200). *J Virol*, 2009; 83(18): 9602-9607.
167. Saederup, N., Lin, Y.C., Dairaghi, D.J., Schall, T.J., Mocarski, E.S. Cytomegalovirus-encoded beta chemokine promotes monocyte-associated viremia in the host. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999; 96(19): 10881-10886.
168. Kaptein, S.J., van Cleef, K.W., Gruijthuisen, Y.K., Beuken, E.V., van Buggenhout, L., Beisser, P.S., Stassen, F.R., Bruggeman, C.A., Vink, C. The r131 gene of rat cytomegalovirus encodes a proinflammatory CC chemokine homolog which is essential for the production of infectious virus in the salivary glands. *Virus Genes*, 2004; 29(1): 43-61.
169. Lodoen, M.B., Lanier, L.L. Viral modulation of NK cell immunity. *Nat Rev Microbiol*, 2005; 3(1): 59-69.
170. Jonjic, S., Babic, M., Polic, B., Krmpotic, A. Immune evasion of natural killer cells by viruses. *Curr Opin Immunol*, 2008; 20(1): 30-38.
171. Voigt, S., Sandford, G.R., Ding, L., Burns, W.H. Identification and characterization of a spliced C-type lectin-like gene encoded by rat cytomegalovirus. *J Virol*, 2001; 75(2): 603-611.
172. Voigt, S., Mesci, A., Ettinger, J., Fine, J.H., Chen, P., Chou, W., Carlyle, J.R. Cytomegalovirus evasion of innate immunity by subversion of the NKR-P1B:Clr-b missing-self axis. *Immunity*, 2007; 26(5): 617-627.
173. Matzinger, P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*, 2002; 296(5566): 301-305.
174. Popp, M.W., Antos, J.M., Grotenbreg, G.M., Spooner, E., Ploegh, H.L. Sortagging: a versatile method for protein labeling. *Nat Chem Biol*, 2007; 3(11): 707-708.
175. Arase, H., Lanier, L.L. Specific recognition of virus-infected cells by paired NK receptors. *Rev Med Virol*, 2004; 14(2): 83-93.
176. Barclay, A.N., Hatherley, D. The counterbalance theory for evolution and function of paired receptors. *Immunity*, 2008; 29(5): 675-678.
177. Smith, H.R., Heusel, J.W., Mehta, I.K., Kim, S., Dorner, B.G., Naidenko, O.V., Iizuka, K., Furukawa, H., Beckman, D.L., Pingel, J.T., Scalzo, A.A., Fremont, D.H., Yokoyama, W.M. Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002; 99(13): 8826-8831.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Detlev H. Krüger, Direktor des Instituts für Medizinische Virologie, Charité Campus Mitte – Universitätsmedizin Berlin, für seine großzügige und wohlwollende Unterstützung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Wolfram Brune für die sehr kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit sowie die Möglichkeit, am Robert Koch-Institut eine eigenständige Arbeitsgruppe aufzubauen. Hervorheben möchte ich ebenfalls die gesamte CMV-Arbeitsgruppe, ohne die eine erfolgreiche wissenschaftliche Arbeit nicht möglich gewesen wäre, aber auch den sehr angenehmen Umgang mit anderen Arbeitsgruppen innerhalb des RKI. Dank geht auch an die Leitung des Institutes, an den ehemaligen Präsidenten Prof. Dr. Jörg Hacker und den Vizepräsidenten Prof. Dr. Reinhard Burger.

Dr. William H. Burns nahm mich schon während des Studiums in sein Labor in Baltimore, später in Milwaukee auf; durch ihn wurde ich auf die hämatopoetische Stammzelltransplantation, die damit verbundenen virologischen Komplikationen und schließlich das Ratten-Cytomegalovirus, das er im Rattenmodell studierte, aufmerksam. Auch Dr. Gordon Sandford und Dr. Gary S. Hayward sei für die weiterhin sehr gute Zusammenarbeit gedankt.

Großer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Gerhard Gaedicke, Dr. med. Wolfram Ebell, Dr. med. Jörn-Sven Kühl, Prof. Dr. med. Burkhard Schneeweiß, Dr. med. Klaus Motsch sowie den Pflegerinnen und Pflegern der Station 39, die mir wesentliche Dinge in meiner Ausbildung zum Kinderarzt beibrachten. Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. Christian Hagemeyer und Dr. rer. nat. Lüder Wiebusch, die mich sehr herzlich in ihrem Labor aufnahmen.

Herrn Prof. Dr. med. Werner Reutter sowie seinen ehemaligen Mitarbeitern Dr. Oliver Baum, Dr. Klemens Löster und Werner Hofmann danke ich für die Einführung in die wissenschaftliche Arbeit.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Frau Nina und unseren beiden Kindern für ihre Geduld bedanken und mich entschuldigen, wenn es mal wieder etwas später wurde.

## Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

\_\_\_\_\_  
Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift