

# **Häufig erkannte EBV-spezifische CD4+ T-Zellepitope für eine optimierte Immuntherapie bei EBV- assoziierten Erkrankungen**

**Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Christina Kyzirakos

aus Mutlangen

Tübingen

2013

Tag der mündlichen Qualifikation:

27.03.2013

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Stefan Stevanović

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

# Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Immunologische Grundlagen.....	1
1.1.1	T-Zellen.....	1
1.1.2	MHC-Moleküle und ihre Liganden.....	6
1.2	Das Epstein-Barr-Virus .....	13
1.2.1	Allgemeines.....	13
1.2.2	Virologie, Struktur, Genom.....	14
1.2.3	Lebenszyklus des EBV .....	15
1.2.4	EBV-assoziierte Erkrankungen.....	21
1.3	Die Immunantwort gegen EBV und EBV-assoziierte Erkrankungen .....	27
1.4	Immuntherapie bei EBV-assoziierten Lymphomen.....	29
1.4.1	LCL-stimulierte T-Zelllinien gegen PTLD .....	29
1.4.2	LCL-stimulierte T-Zelllinien gegen EBV-assoziierte Tumore der Latenzstufe II .....	30
1.4.3	Peptidselektionierte T-Zellen: schnelleres Protokoll und eine bessere Kontrolle über die Spezifität.....	30
1.5	Reverse Immunologie: Das Epitop-Vorhersageprogramm SYFPEITHI.....	32
1.6	Zielsetzung der Arbeit .....	32
2	MATERIAL & METHODEN .....	34
2.1	Puffer, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.....	34
2.1.1	Puffer und Medien.....	34
2.1.2	Reagenzien .....	35
2.1.3	Verbrauchsmaterialien .....	38
2.1.4	Geräte .....	39
2.1.5	Verwendete Software .....	40
2.2	Methoden.....	41
2.2.1	Peptidsynthese .....	41
2.2.2	Lösung und Aufbewahrung der Peptide .....	41
2.2.3	Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes aus <i>Buffy Coats</i> .....	41
2.2.4	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	42

2.2.5	Kryokonservierung von PBMCs.....	43
2.2.6	Auftauen von PBMCs.....	43
2.2.7	Kultivierung von PBMCs.....	43
2.2.8	Peptidstimulation von Gedächtnis-T-Zellen.....	44
2.2.9	ELISPOT.....	44
2.2.10	Durchflusszytometrische Methoden.....	46
2.2.11	Generierung von Einzelzellklonen durch FACS-basierte Zellsortierung IFN- $\gamma$ + CD4+ Zellen .....	48
2.2.12	Transformation von B-Zellen mit B95-8-Überständen.....	49
2.2.13	Zellkultur LCLs.....	50
2.2.14	CD19+ MACS für die Aufreinigung von B-Zellen als Kontrollzellen .....	50
2.2.15	Generierung von PHA-Blasten .....	51
2.2.16	Kultivierung der murinen Zelllinie t-CD40L-NIH-3T3 .....	51
2.2.17	Kultivierung CD40-aktivierter B-Zellen mithilfe von t-CD40L-NIH-3T3 .....	52
2.2.18	Isolierung von MHC-Liganden.....	53
3	ERGEBNISSE & DISKUSSION .....	55
3.1	Epitopscreening.....	55
3.1.1	Auswahl von Antigenen und Vorhersage von Epitopkandidaten.....	55
3.1.2	Eine spezifische Amplifikation erhöht die Detektierbarkeit von T- Zellreaktionen.....	59
3.1.3	Testen der vorhergesagten Epitopkandidaten auf Reaktionen bei gesunden Blutspendern.....	60
3.1.4	Charakterisierung der beobachteten Reaktionen auf CD4+ und CD8+T- Zellantworten.....	66
3.1.5	MHC-Klasse-II-restringierte Epitope von EBV aus Publikationen und ihre Eignung für einen EBV-Mix .....	70
3.2	Promiskuität der identifizierten Epitope & Effizienz der Vorhersage durch SYFPEITHI.....	72
3.3	EBV-spezifischer Peptidmix zur Stimulation von CD4+ T-Zellen.....	75
3.3.1	EBV-spezifischer Epitop-Mix aus fünf Peptiden .....	75
3.3.2	EBV-spezifischer Epitop-Mix aus sieben Peptiden: Mix P .....	80
3.3.3	Multifunktionelle Zellen nach Stimulation mit dem Peptidmix .....	81
3.4	Biologische Relevanz der Epitope .....	84
3.4.1	Indirektes Nachweisverfahren mit epitopspezifischen CD4+ T-Zellklonen .....	86

3.4.2	Direkter Nachweis mit massenspektrometrischer Ligandomanalyse von EBV-transformierten B-Zellen.....	102
4	ZUSAMMENFASSUNG.....	106
5	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	107
6	APPENDIX .....	110
6.1	Epitopvorhersagen.....	110
6.2	Für Transformationen verwendete Blutspenden .....	116
7	LITERATURVERZEICHNIS .....	119
8	DANKSAGUNGEN .....	143



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Immunologische Grundlagen

Über 400 Millionen Jahre Evolution haben unser Immunsystem zu dem hochdifferenzierten, hochkomplexen und hochanpassungsfähigen Abwehrapparat gemacht, der unseren Körper vor gefährlichen Fremdorganismen, aber auch vor entarteten Teilen unseres Selbst schützt.

Dieser Abwehrapparat besteht aus einer Vielzahl von verschiedenartigen Zelltypen, von einfachen Epithelzellen, die die erste Barriere des Menschen gegenüber der Umwelt darstellen bis zu hochspezifischen Killern, den zytotoxischen T-Zellen.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der CD4 T-Zellantwort gegen das Epstein-Barr Virus. Aus diesem Grund wird in der folgenden Einleitung hauptsächlich auf diesen Zelltyp eingegangen.

### 1.1.1 T-Zellen

#### 1.1.1.1 Charakteristika und Grundlegendes

T-Zellen werden gemeinsam mit B-Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) zu den Lymphozyten gezählt und bilden gemeinsam mit den B-Zellen den adaptiven Teil des Immunsystems. Im Gegensatz zu Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen sie keine konservierten Pathogen-assoziierten Strukturen wie z.B. Lipopolysaccharide, sondern ein für sie spezifisches Antigen durch Interaktion des T-Zellrezeptors (TZR) mit einem Komplex aus einem MHC-Protein und einem Peptid (Townsend et al. 1986). Findet eine Erkennung durch den TZR statt, wird durch diesen eine Kaskade von Signalen in die Zelle ausgelöst, und es kommt zu einer Aktivierung verschiedener Effektorfunktionen. Die Erkennung völlig unterschiedlicher Peptidsequenzen wird durch eine genetische Rekombination der Rezeptorgene während der Entwicklung der T-Zellen ermöglicht (Willerford et al. 1996). Während der T-Zellentwicklung werden die T-Zellen mit den unterschiedlichen Rezeptorkombinationen selektioniert; T-Zellen, deren Rezeptoren kein MHC-Peptidkomplex erkennen können, gehen in Apoptose (positive Selektion), T-Zellen, die körpereigene Peptide erkennen, werden ebenfalls zum Großteil eliminiert (negative Selektion) (Matzinger and Guerder 1989; Webb and Sprent 1990). Bei der positiven Selektion entscheidet sich auch, je nachdem ob MHC-Klasse-I oder MHC-Klasse-II Moleküle mit gebundenem Antigen erkannt werden, ob eine T-Zelle sich weiter zur CD4<sup>+</sup> oder zur CD8<sup>+</sup> T-Zelle differenziert. Der CD4-Corezeptor bindet an MHC-Klasse-II-Moleküle, der CD8-Corezeptor an MHC-Klasse-I-Moleküle. Nach der Reifung, die im Thymus

stattfindet, patrouillieren die T-Zellen durch Blut und Lymphe. Sie machen etwa 7-24% der Leukozyten im Blut aus, etwa 2/3 davon sind beim Gesunden CD4+ und 1/3 CD8+ T-Zellen.

### 1.1.1.2 Die verschiedenen Effektor-Stadien einer T-Zelle, und woran man sie erkennt

Nach der Reifung im Thymus werden T-Zellen als naiv bezeichnet. Sie benötigen eine Aktivierung durch eine professionelle antigenpräsentierende Zelle (APC), bevor sie ihre Effektorfunktionen ausführen können (*priming*). Zu den professionellen APCs gehören Dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen. Abgesehen von Epithelzellen des Thymus, welche für die Selektionsvorgänge bei der T-Zellreifung benötigt werden, besitzen in der Regel nur sie neben den auf allen Körperzellen exprimierten MHC-Klasse-I-Molekülen auch MHC-Klasse-II-Moleküle.

Phänotypisch lassen sich T-Effektorzellen von naiven T-Zellen z.B. an der geringeren Expression von CD62L (L-Selectin, Leukozyten-Adhäsionsmolekül, vermittelt das Entlangrollen am Endothel) (Chao et al. 1997), und der Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 unterscheiden (Zimmermann et al. 1999). T-Effektorzellen exprimieren außerdem mit zunehmender Lebensdauer steigende Mengen des Adhäsionsmoleküls CD44 an ihrer Oberfläche (Zimmerman et al. 1996). Im Vergleich zu naiven T-Zellen ist die Expression des TCR leicht erniedrigt (Liu et al. 2000).

Werden z.B. im Zuge einer Infektion T-Zellen aktiviert, kommt es zunächst zu einer klonalen Expansion der Effektorzellen, die beim Menschen etwa 14 Tage andauern kann und nach erfolgreicher Eliminierung der Pathogene wieder kontrahiert (Zehn et al. 2012). Etwa 5% der Zellen bleiben erhalten und bilden sogenannte Gedächtnis-T-Zellen. Sie benötigen im Gegensatz zu naiven T-Zellen keinen Kostimulus zur Aktivierung, und können bei erneuter Konfrontation mit dem spezifischen Antigen sofort oder nach kurzer Reaktivierungsphase ihre Effektorfunktionen ausüben (Rogers et al. 2000; Veiga-Fernandes et al. 2000). Naive, Effektor-, und Gedächtnis-CD8+Zellen wurden erstmalig von Hamann und van Lier et al. anhand der Expression von CD45RA und CD27 voneinander unterschieden (Hamann et al. 1997; Van Lier and Baars 1999). Nach diesem Modell exprimieren naive Zellen CD27 und CD45RA, Effektorzellen CD45RA, und Gedächtniszellen kein CD45RA, sondern die Spleißvariante RO (Hamann et al. 1997). T-Zellen, die die Isoform CD45RO exprimieren, können einfacher aktiviert werden (Dornan et al. 2002). Sallusto et al. erweiterten das Modell indem sie Gedächtnis-T-Zellen anhand der Expression von CCR7 in T-Zellen des zentralen Gedächtnisses (*Central Memory*, CM, CD45RO+, CCR7+) und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (*Effector Memory*, EM, CD45RO+, CCR7-) unterteilten (Sallusto et al. 1999).



### 1.1.1.3 Die verschiedenen Subpopulationen der CD4+ Helferzellen

CD4+ T-Zellen werden klassischerweise als Helferzellen (T helper cells, Th) bezeichnet und beeinflussen eine Vielzahl unterschiedlicher Immunreaktionen. Anhand dieser Funktionen und weiterer spezifischer Charakteristika wie Zytokinsekretionsmuster und/oder charakteristische Transkriptionsfaktoren werden sie in eine immer noch wachsende Anzahl an Subpopulationen unterteilt. Die erste Einteilung der Helferzellen anhand unterschiedlicher Zytokinsekretionsmuster in zwei große Subpopulationen, nämlich der Th1- und der Th2-Zellen, erfolgte dabei in den achtziger Jahren von Mosmann und Coffman (Coffman and Carty 1986; Mosmann et al. 1986). Mittlerweile wurde die Gruppe der Helferzellen um die regulatorischen T-Zellen (Treg), zu denen die sogenannten Th3- und Tr1-Zellen gehören sowie um die Th17-Zellen und die folliculären T-Helferzellen (Tfh) erweitert (Swain et al. 2012a). Zudem wird über Th9-Zellen, die IL-9 sezernieren, als Subpopulation diskutiert, allerdings könnte es sich aber auch um ein Differenzierungs- bzw. Aktivierungsstadium anderer Helferpopulationen, v.a. von Th2-Zellen, handeln (Zhu and Paul 2010; Stassen et al. 2012). Zu welchem Subtyp sich eine CD4+ T-Zelle differenziert, wird stark vom vorherrschenden Zytokinmilieu während ihrer Aktivierung beeinflusst (Mosmann and Coffman 1989; O'Garra and Arai 2000).

Noch nicht ausdifferenzierte Helferzellen werden auch als Th0-Zellen bezeichnet. Sie sezernieren unter anderem die Zytokine IL-2, IL-4 und IFN- $\gamma$  (Bendelac and Schwartz 1991).

Th1-Zellen unterstützen die zelluläre Immunantwort, d.h. zum Beispiel die Entstehung einer CD8+ T-Zellantwort und die Aktivierung von Makrophagen und spielen damit eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen wie Viren oder intrazellulären Bakterien (z.B. Mykobakterien). Th1-polarisierte Zellen stellen so den Großteil unter CD4+ T-Zellen, die im Zuge viraler Infektionen neugebildet werden (Swain et al. 2012b). Sie produzieren hauptsächlich proinflammatorische Zytokine; ihre Leitzytokine sind IFN- $\gamma$ , TNF, IL-2 und IL-3. Die Entstehung einer CD8+ T-Zellantwort wird von Th1-Zellen zum einen durch die Produktion von IL-2, dem T-Zellwachstumsfaktor, unterstützt. Th1-Zellen können aber auch indirekten Einfluss auf die CD8-Antwort nehmen, indem sie antigenpräsentierende Zellen z.B. durch Interaktion von CD40 mit CD154 (CD40 Ligand) konditionieren (Wagner et al. 1980; Bennett et al. 1998; Ridge et al. 1998; Andreasen et al. 2000). Makrophagen werden von Th1-Zellen z.B. durch die Produktion von IFN- $\gamma$  aktiviert, was ihnen bei der Abtötung aufgenommener intrazellulärer Pathogene hilft (Stout and Bottomly 1989; Munoz-Fernandez et al. 1992). Th1-Zellen können neben der Unterstützung der zellulären Immunabwehr aber auch Einfluss auf die Antikörperabwehr nehmen; so stimulieren sie B-Zellen zur Synthese von IgG-Antikörpern. Th1-Zellen wird auch eine Rolle in organspezifischen Autoimmunerkrankungen zugeschrieben (Zhu and Paul 2010). Die Differenzierung zu Th1-Zellen wird durch die Anwesenheit von IL-12 und IFN- $\gamma$  gefördert (O'Garra and Arai 2000).

Th2-Zellen produzieren hauptsächlich die Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 (Croft and Swain 1991). Sie lösen eine humorale Immunantwort aus, indem sie naive antigenspezifische B-Zellen dazu anregen, IgM-Antikörper zu bilden (Parker 1993). Außerdem fördern sie durch die Sekretion von IL-4 die Produktion von IgE-Antikörpern, welche wiederum an IgE-Rezeptoren auf Basophilen und Mastzellen binden, sie aktivieren und damit zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Histamin, Heparin und Serotonin führen (Pulendran and Artis 2012). Während ihre ursprüngliche Hauptfunktion wohl in der Beseitigung von Parasiten, wie Helminthen, und anderen extrazellulären Pathogenen liegt, sind sie auch von kritischer Bedeutung in der Entstehung von Asthma und anderen allergischen Reaktionen (Zhu and Paul 2010).

Tregs haben suppressive Funktionen und arbeiten somit der Entstehung von Autoimmunreaktionen entgegen (Gershon and Kondo 1971; Sakaguchi and Sakaguchi 1988). Die CD4<sup>+</sup> Tregs lassen sich in sogenannte natürliche und induzierte Tregs weiter unterteilen. Die natürlichen Tregs entstehen im Thymus, sind CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> und exprimieren den Transkriptionsfaktor FoxP3 (Itoh et al. 1999; Hori et al. 2003), während die induzierten Tregs in der Peripherie entstehen. Hier werden TGF- $\beta$  produzierende Th3-Zellen von IL-10 produzierenden Tr1-Zellen unterschieden (Cools et al. 2007).

Das Leitzytokin der relativ neuentdeckten Th17-Zellen ist IL-17 (Harrington et al. 2005; Langrish et al. 2005; Park et al. 2005; McKenzie et al. 2006). Sie tragen zur Bekämpfung von extrazellulären Bakterien und Pilzen bei, spielen aber auch eine Rolle bei einigen chronischen Entzündungsprozessen und Autoimmunerkrankungen (Pulendran and Artis 2012). Sie sezernieren außer IL-17 auch TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-6 und IL-22 (Kamradt 2007). IL-17 führt zur Expression von CXC-Chemokinen, die Neutrophile anlocken (Ye et al. 2001).

Tfh-Zellen wurden beim Menschen erstmals in den Jahren 2000 und 2001 als CXCR5<sup>+</sup>, in Keimzentren residierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen beschrieben (Breitfeld et al. 2000; Schaerli et al. 2000; Kim et al. 2001). Sie sind auf B-Zellhilfe spezialisiert und sorgen für die Generation langlebiger Gedächtnis-B-Zellen (Swain et al. 2012a). Sie können CD154 exprimieren und die Produktion von IgA und IgG unterstützen (Breitfeld et al. 2000). Das Leitzytokin der Tfh ist IL-21, was direkt auf B-Zellen und zu einem gewissen Maße auch autokrin wirkt (Nurieva et al. 2008; Linterman et al. 2010). Eine klare Definition von Tfh spezifischen Markern ist schwierig, meistens wird die Expression von CXCR5 und/oder ICOS und/oder PD1 zur Identifizierung der Zellen herangezogen. CXCR5 wird auch von B-Zellen exprimiert, beide Zelltypen können daher zu den Follikeln migrieren (Crotty 2011). Wahrscheinlich handelt es sich bei den Tfh einerseits um eine eigene Subpopulation, die sich direkt aus der undifferenzierten Th0 bildet, auf der anderen Seite können aber auch alle anderen genannten CD4<sup>+</sup> Helferpopulationen in die Keimzentren einwandern und unterschiedliche Einflüsse auf die B-Zellantwort nehmen (Toellner et al. 1998;

Lim et al. 2005; Hsu et al. 2008; Fazilleau et al. 2009). Ein gewisser Anteil der T<sub>fh</sub> entsteht also aus einer Weiterdifferenzierung aus anderen Subpopulationen, und wäre damit strenggenommen keine eigene Subpopulation (Fazilleau et al. 2009).

Ein Überblick über die genannten CD4<sup>+</sup> Helfer-Zell-Subpopulationen, ihre Leitzytokine und Funktionen ist in Abbildung 1 gegeben.

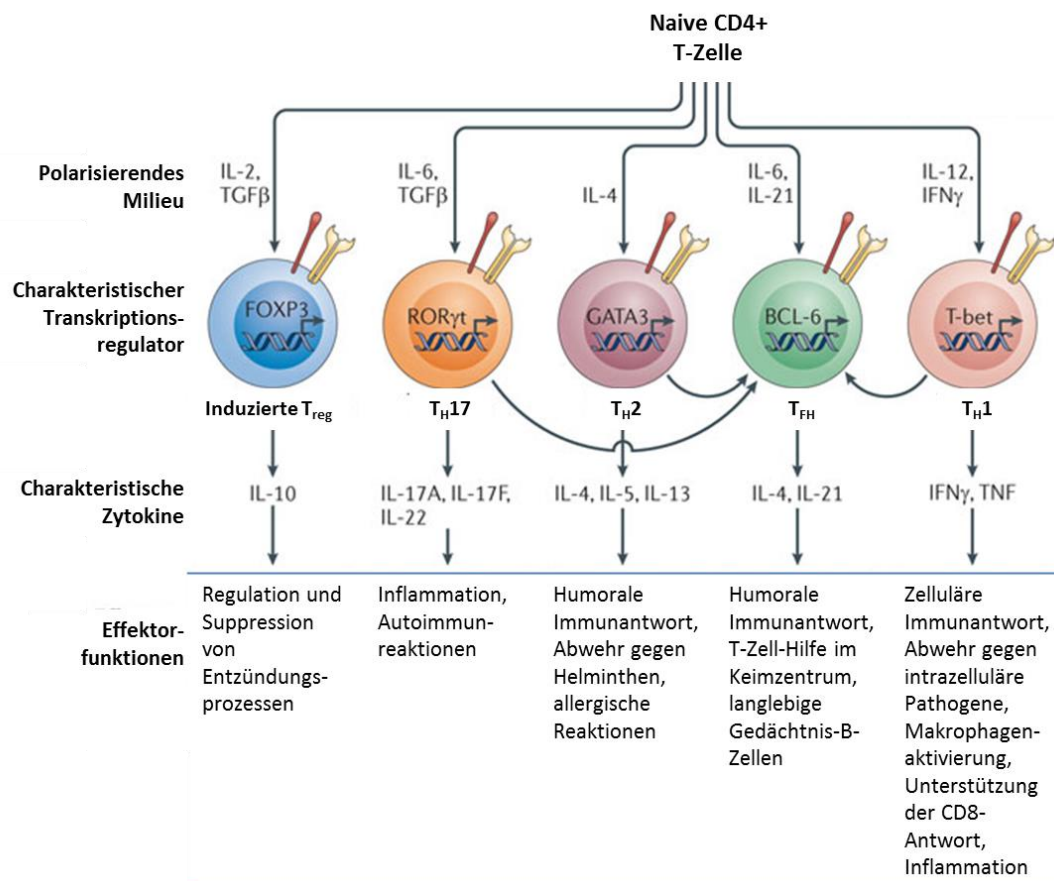


Abbildung 1: Übersicht über CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Subpopulationen. Dargestellt sind die polarisierenden Zytokinmilieus, die die Entwicklung zu den verschiedenen Subpopulationen fördern, charakteristische Master-Transkriptionsregulatoren, Zytokine und Effektorfunktionen. Die Möglichkeit der Differenzierung von anderen Subpopulationen zu T<sub>fh</sub> ist mit Pfeilen angedeutet. Abbildung adaptiert aus (Swain et al. 2012a)

#### 1.1.1.4 CD8<sup>+</sup> T-Zellen

CD8<sup>+</sup> T-Zellen differenzieren nach Aktivierung zu zytotoxischen T-Zellen (*Cytotoxic T-Lymphocytes*, CTLs) und können virusinfizierte und entartete körpereigene Zellen direkt angreifen und abtöten. Sie erkennen etwa 8-10 Aminosäuren lange Peptide, gebunden auf MHC-Klasse-I-Molekülen, die von allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert werden. Dies macht sie besonders interessant im Zusammenhang mit Immuntherapien bei Krebs, viele angestrebte

Behandlungsmethoden in diesem Gebiet konzentrieren sich auf eine Stärkung oder Fokussierung der CD8 T-Zellantwort gegen verschiedene Tumore.

Ihre zytotoxischen Eigenschaften erreichen sie zum einen durch die Ausschüttung lytischer Granula, welche zytotoxische Proteine wie Perforin, Granzyme und Granulysin beinhalten. CTLs exprimieren aber auch den Fas-Liganden und können ihre Zielzellen direkt über eine Interaktion mit dem Todesrezeptor Fas in Apoptose treiben. CTLs sezernieren unter anderem die Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF.

## 1.1.2 MHC-Moleküle und ihre Liganden

### 1.1.2.1 Major Histocompatibility Complex (MHC)

Der Haupthistokompatibilitätskomplex oder MHC (*Major Histocompatibility Complex*) kodiert für über 160 Proteine (Traherne 2008). Darunter sind die für die Antigenpräsentation verantwortlichen MHC-Moleküle aber auch viele andere für das Immunsystem wichtige Proteine. Der Name rührt von ihrer Entdeckung bei Transplantationsversuchen an Mäusen her. So wurde beobachtet, dass ein blutgruppenähnliches Antigen für Abstoßungsreaktionen von transplantierten Tumorgeweben unter verschiedenen Mausstämmen verantwortlich ist (Gorer 1948). Beim Menschen werden MHC-Moleküle auch als HLA (*Human Leukocyte Antigen*)-Moleküle bezeichnet. Der Gencluster befindet sich beim Menschen auf Chromosom 6.

Die sogenannten klassischen MHC-Moleküle der Klasse I und der Klasse II sind für die Präsentation von Peptiden, die von T-Zellen erkannt werden können, zuständig.

Diese MHC-Klasse-I oder -Klasse-II-Moleküle sind polygen, höchst polymorph und werden codominant vererbt, was bedeutet, dass jeder Mensch mehrere MHC-Gene gleicher Funktion besitzt, von denen es wiederum Hunderte verschiedener Varianten in der Gesamtbevölkerung gibt. Das führt zu einer Herdenimmunität, d.h. Pathogene die vom Immunsystem eines Individuums nicht erfolgreich bekämpft werden können führen nicht zwangsläufig zur Auslöschung der ganzen Spezies. Dieser Polymorphismus ist aber auch verantwortlich für die genannte Gewebeinkompatibilität bei Transplantationen. Menschen haben drei Gene für die  $\alpha$ -Ketten der Klasse-I-Moleküle (HLA-A, -B, und -C) sowie drei Paare von Genen für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten der Klasse-II-Moleküle (HLA-DR, -DP, und -DQ). Viele Menschen haben sogar noch ein zusätzliches  $\beta$ -Kettengen für das HLA-DR-Molekül.

Da unterschiedliche HLA-Moleküle unterschiedliche Spektren an Peptiden binden können, erhöht diese Polygenie die Anzahl verschiedener Peptidsequenzen, die von Zellen eines bestimmten Individuums präsentiert werden können.

Die Anzahl bekannter HLA-Typen wird ständig vervollständigt, die aktuellen Zahlen der klassischen MHC-Moleküle sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 1: Anzahl der klassischen MHC-Allele und exprimierten Proteine des Menschen

Anzahl gesamt	MHC-Klasse-I			MHC-Klasse-II					
	A	B	C	DRA	DRB	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1
<b>Anzahl Allele</b>	1884	2490	1384	7	1194	47	165	34	155
<b>Anzahl Proteine</b>	<b>1365</b>	<b>1898</b>	<b>1006</b>	<b>2</b>	<b>891</b>	<b>29</b>	<b>116</b>	<b>17</b>	<b>134</b>

Stand: April 2012 (Anthony Nolan Research Institute 2012)

### 1.1.2.2 Struktur der MHC-Moleküle

Das MHC-Klasse-I-Molekül ist ein Heterodimer aus einer 45 kDa schweren  $\alpha$ -Kette und einem  $\beta_2$ -Mikroglobulin (12 kDa). Das Mikroglobulin ist monomorph und wird nicht im MHC, sondern auf Chromosom 15 kodiert. MHC-Klasse-I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Die  $\alpha$ -Kette besteht aus drei extrazellulären Immunglobulindomänen ( $\alpha 1$  bis  $\alpha 3$ ) und verfügt über eine Transmembrandomäne. Die beiden membrandistalen Domänen  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  bilden eine peptidbindende Furche (Bjorkman et al. 1987).

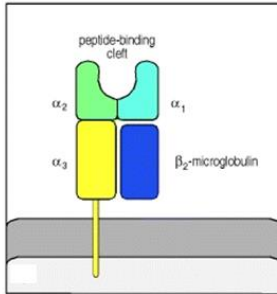
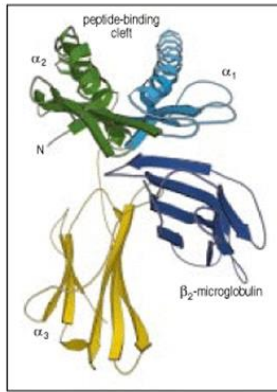
Die MHC-Klasse-II-Moleküle werden hauptsächlich auf antigenpräsentierenden Zellen (Dendritischen Zellen, B-Zellen und Makrophagen) exprimiert.

Sie bestehen aus zwei membrandurchspannenden Ketten, der 34 kDa großen  $\alpha$ - und der 29 kDa großen  $\beta$ -Kette. Beide tragen auf der Zellaußenseite zwei Immunglobulindomänen. Die beiden membrandistalen Domänen  $\alpha 1$  und  $\beta 1$  bilden die peptidbindende Furche. Während bei den MHC-Klasse-I-Molekülen diese Furche an den Enden geschlossen ist, ist sie bei den MHC-Klasse-II-Molekülen an den Enden offen.

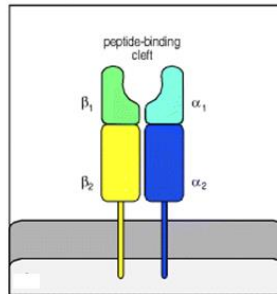
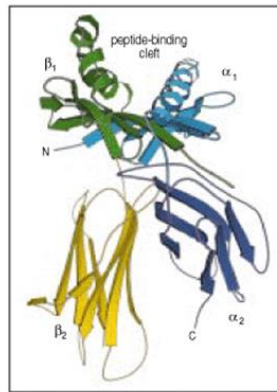
Die Struktur der MHC-Moleküle und der jeweiligen Bindungstasche ist in folgender Abbildung dargestellt.

## MHC-Moleküle

### MHC-Klasse-I

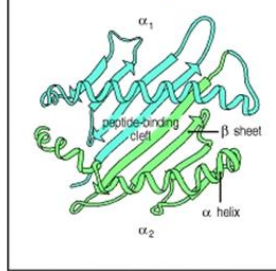
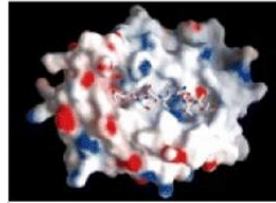
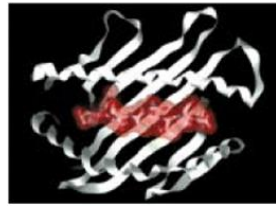


### MHC-Klasse-II



## Peptidbindungstaschen

### MHC-Klasse-I



### MHC-Klasse-II

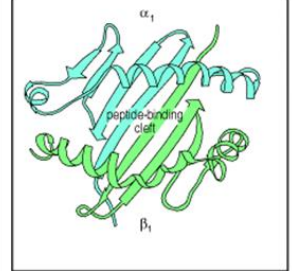
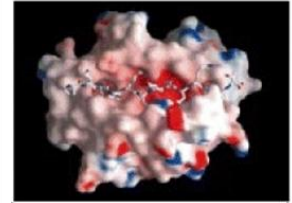
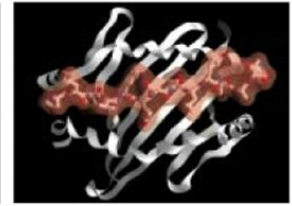


Abbildung 2: Struktur der MHC-Moleküle. Links: grafische Darstellung der MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle mit den verschiedenen Immunglobulindomänen,  $\beta_2$ -Mikroglobulin und der Peptidbindungstaschen (*peptide-binding cleft*). Rechts: Aufsicht auf die Bindungsfurchen der beiden MHC-Moleküle. (Janeway et al. 2001)

### 1.1.2.3 Subregion HLA-DR

Die drei verschiedenen Arten von MHC-Klasse-II-Antigenen HLA-DR, -DQ und -DP zeigen unterschiedlich hohe Expressionsniveaus. Bei antigenpräsentierenden Zellen in der Peripherie wie B-Zellen und Monozyten ist HLA-DR das am stärksten exprimierte Protein, gefolgt von HLA-DP und HLA-DQ (Gorga et al. 1987; Brooks and Moore 1988; Laupeze et al. 1999). Dasselbe gilt für *in vitro* aus peripheren Monozyten generierten DCs und Makrophagen (Laupeze et al. 1999), aber auch z.B. für chronische lymphatische Leukämie mit B-Zellhintergrund (Drexler et al. 1988), verschiedene myeloische Leukämiezelllinien (Lecchi et al. 1989) und EBV-transformierten B-Zellen (Gorga et al. 1987). Bei Monozyten aus dem peripheren Blut stehen etwa 20000 HLA-DR Moleküle ca. 5000 HLA-DP- und weniger als 4000 HLA-DQ-Molekülen gegenüber (Laupeze et al. 1999).

Die Länge der HLA-DR-Region variiert bei verschiedenen Individuen zwischen etwa 60 und 260 kb. Jede Region beinhaltet ein DRA- und mindestens ein DRB-Gen, die für die  $\alpha$ - bzw. die  $\beta$ -Kette des HLA-DR-Moleküls kodieren (Rammensee H.-G. 1997). Während es von der  $\alpha$ -Kette nur zwei unterschiedliche Varianten gibt, die sich auch nur um eine Aminosäure unterscheiden, ist die hauptsächliche, da in allen Individuen vorhandene  $\beta$ -Kette (DRB1) mit zur Zeit 821

verschiedenen bekannten Proteinen hochpolymorph. Zusätzlich zu dieser Diversität kodieren einige DR-Regionen für eine weitere funktionelle  $\beta$ -Kette: DRB3, DRB4 oder DRB5. Diese sekundären  $\beta$ -Ketten können wie DRB1 mit der DR- $\alpha$ -Kette ein funktionelles Molekül bilden, sind aber mit 46, 8 bzw. 16 verschiedenen Proteinen weniger polymorph (Anthony Nolan Research Institute 2012). Andere DR-Regionen kodieren neben DRB1 noch für ein oder mehrere Pseudogene. In jeder DR-Region kommt jedoch höchstens eine funktionelle sekundäre Kette vor, so dass jedes Individuum maximal vier verschiedene DR- $\beta$ -Ketten exprimieren kann.

Tabelle 2: Anzahl der verschiedenen DRB-Allele und exprimierten Proteine. DRB1, DRB3, DRB4 und DRB5 kodieren für funktionelle Proteine, DRB2, DRB6, DRB7, DRB8 und DRB9 sind Pseudogene

Gen	DRB1	DRB2	DRB3	DRB4	DRB5	DRB6	DRB7	DRB8	DRB9
<b>Allele</b>	1094	1	58	15	19	3	2	1	1
<b>Proteine</b>	821	0	46	8	16	0	0	0	0

Stand: April 2012 (Anthony Nolan Research Institute 2012)

Das in der deutschen Bevölkerung mit einer Phänotypfrequenz von etwa 26% am häufigsten vorkommenden DRB1-Allel ist DRB1\*15, dicht gefolgt von DRB1\*04, \*13, \*11 und \*07 (s. Abb. 3).

Die Kombination verschiedener DRB-Haplotypen mit verschiedenen sekundären DRB-Genen ist miteinander verknüpft. So ist zum Beispiel DRB3 verknüpft mit DRB1\*03, \*11, \*12, \*13 und \*14, DRB4 mit DRB1\*04, \*07 und \*09 und DRB5 mit DRB1\*15 und \*16. Diese Kombinationen werden in drei Haupt-DRB-Haplotypen unterteilt, und zwar DR51 (DRB1/DRB5), DR52 (DRB1/DRB3) und DR53 (DRB1/DRB4). Es wird angenommen, dass DRB3 und DRB4, im Gegensatz zu DRB5, generell schwächer auf der Zelloberfläche exprimiert werden als DRB1 (Faner et al. 2010).

Allel	Allel- frequenz (%)	Phänotyp- frequenz (%)
<b>DRB1*01</b>	11,1	<b>21,0</b>
<b>DRB1*03</b>	10,6	<b>20,0</b>
<b>DRB1*04</b>	13,2	<b>24,6</b>
<b>DRB1*07</b>	12,6	<b>23,6</b>
<b>DRB1*08</b>	3,3	<b>6,4</b>
<b>DRB1*09</b>	1,0	<b>1,9</b>
<b>DRB1*10</b>	0,9	<b>1,7</b>
<b>DRB1*11</b>	12,5	<b>23,5</b>
<b>DRB1*12</b>	1,9	<b>3,7</b>
<b>DRB1*13</b>	12,9	<b>24,1</b>
<b>DRB1*14</b>	3,1	<b>6,1</b>
<b>DRB1*15</b>	14,2	<b>26,4</b>
<b>DRB1*16</b>	2,4	<b>4,8</b>

Abbildung 3: HLA-DRB1-Allel- und -Phänotypfrequenzen in der deutschen Bevölkerung. Die angegebenen Allelfrequenzen wurden mit der Hardy-Weinberg-Regel aus den Phänotypfrequenzen gemessen bei 11407 Individuen errechnet. Von [www.allelefrequencies.net](http://www.allelefrequencies.net) (Gonzalez-Galarza et al. 2011).

#### 1.1.2.4 Peptidliganden für eine Präsentation durch MHC-Moleküle

Während die von MHC-Klasse-I-Molekülen gebundenen Peptide, die von CD8+ zytotoxischen T-Zellen erkannt werden, hauptsächlich aus dem Zytosol stammen und so z.B. intrazellulär persistierende Erreger oder eine Transformation der Zelle anzeigen, stammen die von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentierten Peptide vorwiegend aus dem extrazellulären Raum. Dies ist eine Folge der verschiedenen Prozessierungswege der MHC-Moleküle und der gebundenen Peptide. Diese Einteilung ist allerdings nicht strikt: exogene Antigene werden durch die sogenannte Kreuzpräsentation auch in MHC-Klasse-I-Molekülen gebunden und zytosolische Proteine können z.B. über Autophagie in die MHC-Klasse-II-Prozessierung geschleust werden (Kurts et al. 2010; Neefjes et al. 2011). Eine Übersicht über die MHC-Klasse-II-Prozessierung ist in Abbildung 4 gegeben.



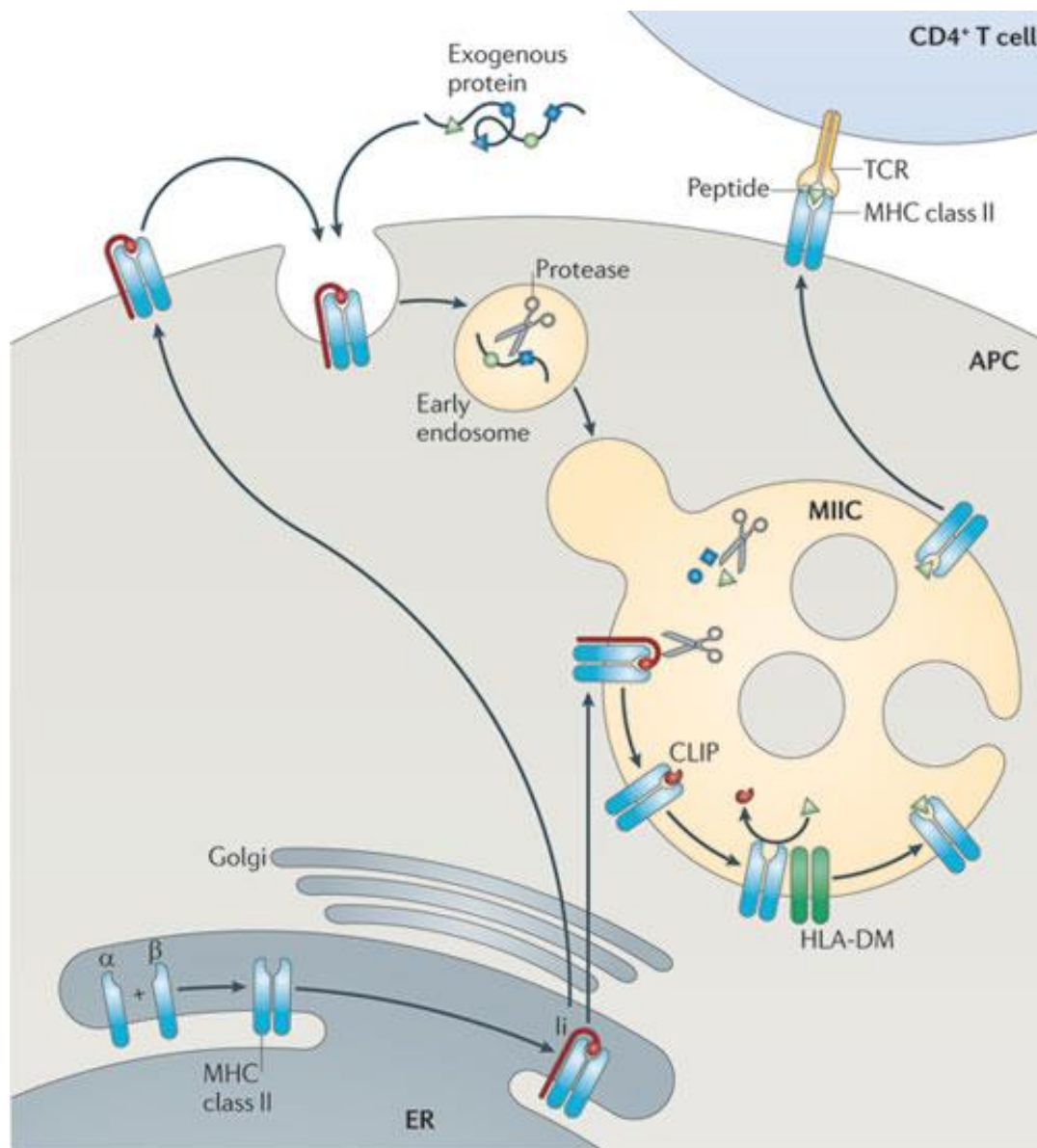


Abbildung 4: Übersicht über die MHC-Klasse-II-Prozessierung. Proteine, die über Endo- oder Phagozytose in die MHC-Klasse-II-Prozessierung gelangen, befinden sich in der Zelle zunächst in Vesikeln (hier: frühes Endosom, *early endosome*). Die Senkung des pH-Wertes führt zu einer Aktivierung von Aspartat- und Cystein-Proteasen, welche die Proteine zu Peptiden abbauen. MHC-II- $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten werden direkt in das Endoplasmatische Retikulum (ER) synthetisiert und zusammen mit der invarianten Kette (Ii, *invariant chain*) in das MHC-II-Beladungskompartiment (MIIC) transportiert (Kvist et al. 1982). Dieses fusioniert mit den Vesikeln, die die Peptide beinhalten. Die Peptide ersetzen das MHC-II-assoziierte invariante-Kettenpeptid (*class II-associated invariant chain peptide*, CLIP), ein Teil der invarianten Kette, welches die peptidbindende Furche besetzt. Der Austausch wird reguliert und katalysiert durch HLA-DM und HLA-DO (Denzin et al. 1996; Denzin et al. 1997). Die mit Peptid (*Peptide*) beladenen MHC-Klasse-II-Moleküle (*MHC class II*) werden zur Plasmamembran der antigenpräsentierenden Zelle (APC) transportiert und der CD4+ T-Zelle (*CD4+ T cell*) präsentiert. Autophagosomen können ebenfalls mit dem MIIC fusionieren und so intrazelluläre Peptide in den Beladungsweg schleusen (Münz 2012). Abbildung aus (Neefjes et al. 2011).

Die von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentierten Peptide haben eine Länge von 8-10 Aminosäuren (Falk et al. 1991). Sie sind an ihren Enden in der Bindungstasche des Moleküls fixiert. Die Bindungsfähigkeit der Peptide hängt von sogenannten Ankeraminosäuren ab, die die Bindung von Peptiden mit diesen Resten an einer bestimmten Position begünstigen (Rammensee 1995). Verschiedene HLA-Typen bevorzugen verschiedene Ankerreste an verschiedenen Positionen. HLA-A\*02:01 bevorzugt z.B. Peptide mit den Ankeraminosäuren Leucin oder Methionin an Position 2 und Valin oder Leucin an Position 9. HLA-A\*01 bevorzugt dagegen Asparaginsäure oder Glutaminsäure an Position 3 und Tyrosin an Position 9 (Rammensee et al. 1999). Am C-Terminus werden häufig hydrophobe oder seltener basische Aminosäuren bevorzugt.

Die an beiden Enden offene Bindungsfurche der MHC-Klasse-II-Moleküle erlaubt das Binden von Peptiden mit einer Länge von bis zu etwa 20 Aminosäuren. In der Regel sind die gebundenen Peptide allerdings zwischen 13 und 17 Aminosäuren lang; in der Furche selbst liegen etwa 9 Aminosäuren, welche sozusagen die Kernsequenz des Peptids bilden (Stern et al. 1994). Wie bei Peptiden, die auf MHC-Klasse-I-Molekülen binden, gibt es bei den MHC-Klasse-II-Peptiden Ankeraminosäuren, die die Bindung begünstigen. Sie liegen meistens an den Positionen 1, 4, 6 und 9 der Kernsequenz (Jones et al. 2006). Während die Peptide bei den Klasse-I-Molekülen stark auf einen HLA-Typ restringiert sind, sind MHC-Klasse-II-Liganden weit mehr promiskuitiv (Hammer et al. 1993; Consogno et al. 2003; Wang et al. 2008). Dies ist durch häufig identische bevorzugte Ankerreste, durch einen großen Beitrag von Wasserstoffbrückenbindungen des Peptid-Rückgrats zur Bindungstasche zum Bindungsvermögen und durch die Flexibilität der gebundenen Peptide in der Bindungstasche begründet.

## 1.2 Das Epstein-Barr-Virus

### 1.2.1 Allgemeines

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) oder humanes Herpesvirus 4 (HHV4) persistiert als latente Infektion in über 95% der adulten Weltbevölkerung, und ist damit einer der weitverbreitetsten menschlichen Viren überhaupt (Henle and Henle 1979; WHO 2012).

Die Entdeckung von EBV geht zurück auf den englischen Arzt Denis Burkitt, der in den fünfziger Jahren erstmals ein vor allem bei Kindern in Ost- und Zentralafrika auftretendes Lymphom beschrieb, das Burkitt-Lymphom (Burkitt 1958). Wegen der auffälligen Anhäufung der Fälle in bestimmten geographischen und klimatischen Gebieten vermutete er ein infektiöses Agens als Auslöser der Erkrankung. Tatsächlich gelang es im Jahre 1964 Tony Epstein, Budd Achong und Yvonne Barr virusähnliche Partikel in Ultradünnschnitten *in vitro* kultivierter Burkitt-Lymphom-Zellen elektronenmikroskopisch nachzuweisen und somit das Epstein-Barr Virus (EBV) zu identifizieren (Epstein et al. 1964) (siehe Abbildung 5).

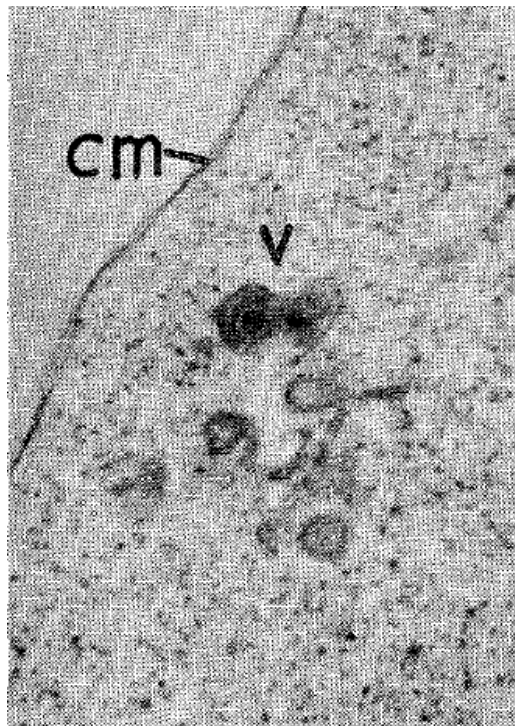


Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Abbildung aus der Originalpublikation von 1964 "Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma". Tony Epstein, Budd Achong und Yvonne Barr fanden virusähnliche Partikel (v) in kultivierten Burkitt-Lymphom-Zelllinien. (cm): Zellmembran.

Der nachfolgende Nachweis von EBV-DNA in Burkitt-Lymphomen und Nasopharynx-Karzinomen sowie die Bildung von Lymphomen in Lisztaffen und Nachtaffen, die experimentell mit EBV infiziert wurden, machten EBV zum ersten Virus, bei dem eindeutig ein Zusammenhang

mit der Entwicklung eines menschlichen Tumors festgestellt werden konnte (Miller et al. 1977; Thompson and Kurzrock 2004).

Obwohl bei einem Großteil der Infizierten ein Leben lang keinerlei Symptome auftreten, ist EBV mit einer Vielzahl sowohl benigner als auch an maligner Erkrankungen assoziiert (vgl. 1.2.4).

Es werden zwei Subtypen von EBV unterschieden, EBV-1 (oder auch Typ A) und EBV-2 (oder auch Typ B). Sie unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz ihrer Kernantigene (*EBV nuclear antigen*, EBNA) EBNA2, EBNA3A, EBNA3B und EBNA3C und ihrer geographischen Verteilung (Dambaugh et al. 1984; Rowe et al. 1989; Sample et al. 1990; Dolan et al. 2006). EBV-1 ist der generell häufiger vorkommende Subtyp und hat *in vitro* eine höhere Transformationseffizienz gegenüber EBV-2 (Rickinson et al. 1987; Takimoto et al. 1989). EBV-2 dagegen scheint einfacher von der latenten in die lytische Phase zu wechseln (Buck et al. 1999). Während EBV-1 in der westlichen Hemisphäre und Südostasien dominant ist, treten in Neu-Guinea und Äquatorial-Afrika die Typen 1 und 2 etwa in der gleichen Häufigkeit auf (Sixbey et al. 1989). Ein Referenzstamm für EBV-1 ist B95-8 und für EBV-2 z.B. AG876 (Dolan et al. 2006).

### 1.2.2 Virologie, Struktur, Genom

EBV gehört mit über hundert weiteren Mitgliedern zur Familie der *Herpesviridae*. Weitere Mitglieder der Familie sind z.B. Herpes simplex I und II, das Humane Cytomegalievirus, Varicella zoster und die humanen Herpesviren 6 und 7. Gemeinsam mit dem humanen Herpesvirus 8 wird EBV zur Unterfamilie *Gammaherpesvirinae* und zur Gattung der *Lymphocryptoviridae* gezählt. Herpesviren sind ubiquitär in der Natur verbreitet; EBV ist jedoch ein rein humanotropes Virus.

Der Aufbau von EBV ist typisch für ein Herpesvirus. Die lineare, doppelsträngige DNA ist um einen toroidförmigen Protein-Kern gewickelt, kodiert für über 85 Gene und hat eine Länge von 172 kbp (Kieff and Rickinson 2007). Das virale Genom hat an beiden Enden eine Reihe von etwa 500 bp langen Wiederholungen (*terminal repeats*, TR) sowie mehrere interne Wiederholungssequenzen (*internal repeats*, IR). Diese unterteilen das Genom in fünf singuläre Sequenzdomänen (*unique sequences*, UR) (Given et al. 1979; Cheung and Kieff 1982). Nach Infektion einer Zelle werden die Termini intrazellulär zusammengefügt und bilden ein zirkuläres DNA-Episom (Kaschka-Dierich et al. 1976; Lindahl et al. 1976). Das EBV-Genom kann aber auch in die Wirtszelle integriert werden (Henderson et al. 1983).

Die DNA ist von einem ikosahedrischen Nukleokapsid umgeben. Das Kapsid ist aus 162 Kapsomeren aufgebaut und hat einen Durchmesser von 100 bis 110 nm, während das gesamte Virion eine Größe von etwa 120-180 nm hat (Kieff et al. 1982).

Um das Nukleokapsid befindet sich eine Lipiddoppelmembran, wobei die äußere Membran von der Zellmembran des Wirtes stammt und mit externen Glykoproteinen besetzt ist, die innere von seiner Kernmembran. Zwischen Nukleokapsid und Hüllmembran befindet sich eine oftmals asymmetrisch verteilte, amorphe Schicht variabler Stärke aus globulären Proteinen, das Tegument. Im Nukleokapsid befindet sich ein toroidförmiger Protein-Kern, um den die doppelsträngige DNA gewickelt ist (Kieff and Rickinson 2007).

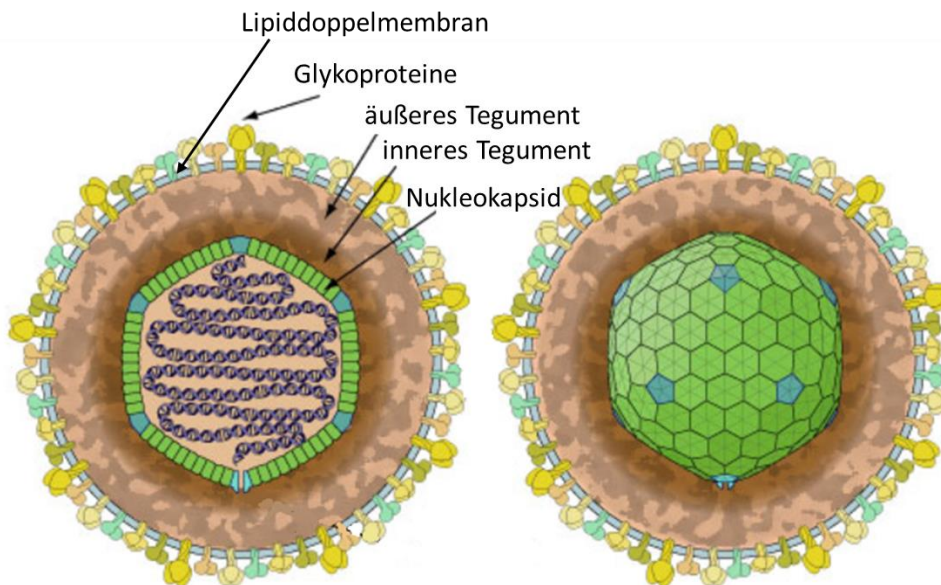


Abbildung 6: Schematischer Aufbau des Epstein-Barr-Virions (ViralZone 2011)

### 1.2.3 Lebenszyklus des EBV

Der Lebenszyklus des EBV verläuft wie bei anderen Herpesviren nach einem klassischen Schema: auf die Primärinfektion eines permissiven Zelltyps mit lytischer Replikation des Virus folgt die Infektion eines zweiten, nicht-permissiven Zelltyps, in dem eine lebenslange latente Infektion mit gelegentlichen Reaktivierungen in die lytische Phase etabliert wird.

Die Primärinfektion mit EBV erfolgt meist in früher Kindheit über Speichelkontakt. Zu diesem Zeitpunkt verläuft die Infektion in der Regel asymptomatisch. Vor allem in den westlichen Ländern verzögert sich die Primärinfektion jedoch häufiger ins junge Erwachsenenalter, was sich bei bis zu 25% der Betroffenen in einer Infektiösen Mononukleose (IM) oder „*kissing disease*“ manifestieren kann (Hislop et al. 2007). Die Zielzelle des EBV ist die B-Zelle. Die Infektion der B-Zelle ist essentiell für eine nachfolgende latente Infektion; bei Patienten mit Agammaglobulinämie, die an einer B-Zell-Reifungsstörung leiden, werden keine persistenten Infektionen beobachtet (Faulkner et al. 1999).

Welches die ersten infizierten Zellen bei der Primärinfektion sind ist dagegen noch nicht abschließend geklärt (Kutok and Wang 2006). Da EBV-spezifische DNA und RNA in Epithelzellen

detektiert wurden, z.B. in Epithelzellen des Oropharynx von IM-Patienten (Lemon et al. 1977; Sixbey et al. 1984) und auch in Epithelzellen bei oraler Haarleukoplakie und undifferenziertem Nasopharynxkarzinom (zur Hausen et al. 1970; Greenspan et al. 1985), wurde angenommen, dass die Epithelzellen des Oropharynx die erste Eintrittspforte darstellen und auch als Reservoir für die Weitergabe des Virus dienen. Bei späteren Untersuchungen mit sensitiveren Methoden wurde gezeigt, dass bei immunkompetenten IM-Patienten nur die im Oropharynx angesiedelten Lymphozyten (hauptsächlich B-Zellen), aber nicht die Epithelzellen infiziert sind (Niedobitek et al. 1989; Anagnostopoulos et al. 1995; Karajannis et al. 1997). Da Epithelzellen aber definitiv infiziert werden können, sind beide Szenarien denkbar.

Das Virus verschafft sich Eintritt in die B-Zelle, indem es mit seinem Hüllprotein gp350 an CD21 auf der Oberfläche der B-Zelle bindet (Fingerroth et al. 1984). CD21, der Rezeptor für C3d, einer Komponente des Komplementsystems, wird auch von folliculären Dendritischen Zellen und einigen T-Zellen exprimiert (Kutok and Wang 2006). Dann interagiert gp42 des Virus mit den MHC-Klasse-II-Molekülen der B-Zelle und bewirkt so eine Fusion mit der Zellmembran (Li et al. 1997; Speck et al. 2000). In Epithelzellen, die kein CD21 exprimieren, findet die Infektion über eine Interaktion von BMRF2 mit  $\beta$ 1-Integrinen und dem viralen gH/gL-Hüllprotein mit  $\alpha\beta$ 6/8-Integrinen statt (Xiao et al. 2008; Chesnokova et al. 2009; Xiao et al. 2009).

Nach der Adsorption des Virus werden die CD21-Moleküle der B-Zelle kreuzvernetzt und das Virus wird in zytoplasmatische Vesikel internalisiert (Carel et al. 1990). In der Zelle wird das virale Genom entpackt und in den Nukleus transportiert, wo es zirkularisiert. Nachfolgend kommt es zu einer Eventkaskade, die zur Expression der EBNA-Proteine und der LMP-Proteine und letztendlich zu einem Eintritt der B-Zelle in die S-Phase des Zellzyklus führt (Rowe 1999). Die infizierten B-Zellen wandern in das nächstgelegene Lymphgewebe, wo sie stark proliferieren (Laichalk et al. 2002). Die stark proliferierenden EBV-transformierten B-Zellen sind hochimmunogen. Es bildet sich eine adaptive Immunantwort aus, die die infizierten B-Zellen zum Großteil eliminiert und somit eine gewisse Kontrolle über die Infektion gewinnt. Das Immunsystem schafft es allerdings nicht, die Infektion komplett zu beseitigen, wodurch sich eine lebenslängliche latente Infektion ausbildet. Sie zeichnet sich durch eine stabile Anzahl latent infizierter B-Zellen im Blut ( $0,5-50 / 10^6$ , individuell unterschiedlich (Khan et al. 1996)) und durch eine ständige Ausschüttung infektiöser Virions in den Speichel aus. Bei den B-Zellen im Blut handelt es sich um Gedächtnis-B-Zellen, in den Mandeln z.B. werden aber auch naive infizierte B-Zellen gefunden (Miyashita et al. 1997; Joseph et al. 2000).

Eine Übersicht über den Lebenszyklus von EBV ist in Abbildung 7 gegeben.

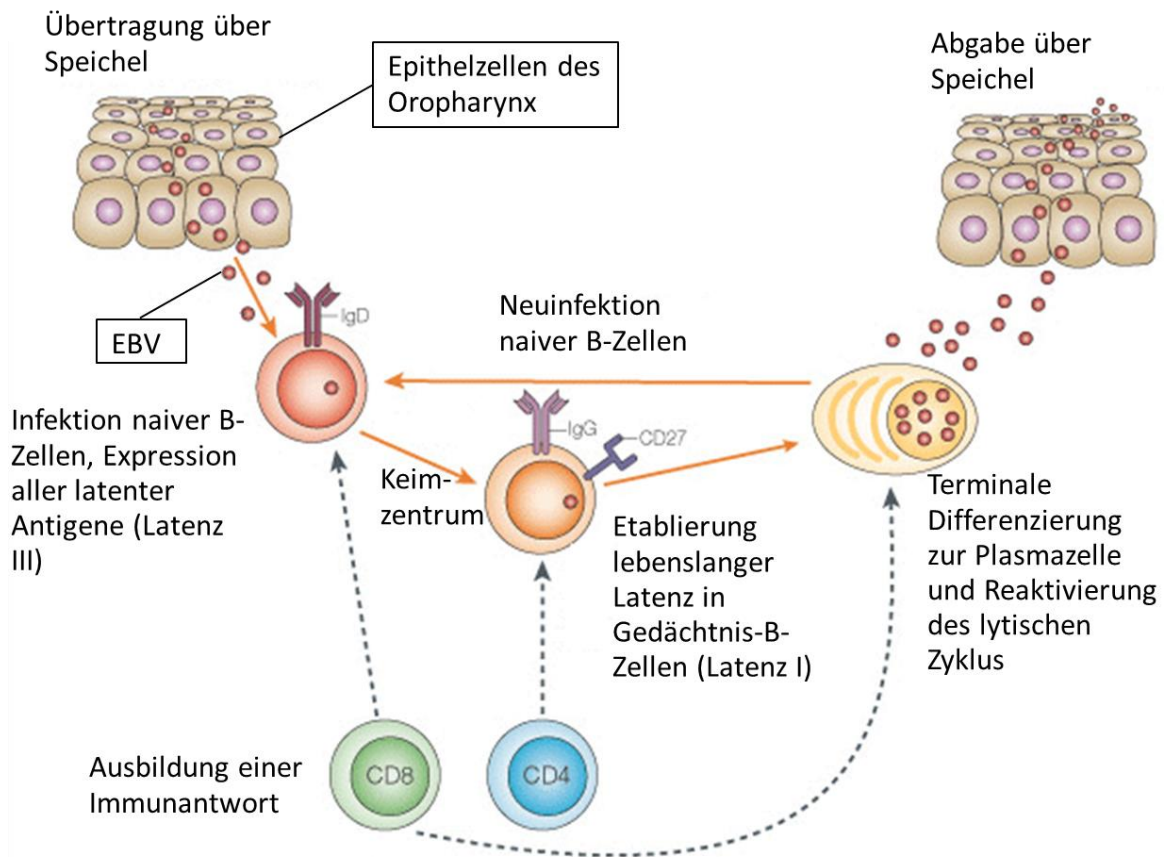


Abbildung 7: Übersicht über den Lebenszyklus von EBV. EBV wird über Speichel übertragen und infiziert B-Zellen im Oropharynx-Epithel entweder direkt oder nach Primärinfektion der Epithelzellen. Die B-Zellen exprimieren alle EBNA- und LMP-Proteine (Latenz III), proliferieren, und es kommt zu einer Keimzentrumsreaktion infolgederen die B-Zellen zu Gedächtnis-B-Zellen heranreifen. Sie exprimieren nur EBNA1 (Latenz I) und zirkulieren im peripheren Blut. Einzelne Zellen gehen in die lytische Phase. Das Virus kann entweder erneut naive B-Zellen infizieren oder über den Speichel ausgeschüttet werden. Adaptiert aus (Rochford et al. 2005). Für eine Übersicht über die Latenzstadien s. 1.2.3.1.

### 1.2.3.1 Latenzstadien und exprimierte Proteine

Die verschiedenen Ausprägungen von latenten Phasen werden in vier Stadien unterteilt. Sie unterscheiden sich durch ein unterschiedliches Expressionsmuster von Proteinen und RNAs, verschiedene assoziierte Erkrankungen sowie unterschiedliche Zelltypen, in denen die Latenzstadien beobachtet werden (s. Tabelle 3). Die kleinen, nichtkodierenden viralen RNAs EBER 1 und 2 sind vermutlich in allen Latenztypen vorhanden und werden deshalb auch als Marker einer latenten Infektion verwendet (Barletta et al. 1993). Die als *in vitro*-Modell für verschiedene Anwendungen verwendeten Lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs) entsprechen dem Latenztyp III (Kieff and Rickinson 2001). Im nachfolgenden werden die exprimierten Proteine und Gene beschrieben.

Tabelle 3: Übersicht über die exprimierten Gene bei verschiedenen EBV-Latenzstadien und assoziierte maligne Erkrankungen nach (Thorley-Lawson and Allday 2008).

Latenztyp	Exprimierte virale Gene	Gefunden in folgenden Malignitäten	Gefunden in Zelltyp
<b>III: Wachstum</b>	EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, EBNALP, LMP1, LMP2, EBER1, EBER2, BART	Posttransplantations-Lymphoproliferation, AIDS-assoziierte B-Zell-Lymphome	Neu infizierte B-Zellen
<b>II: Standard</b>	EBNA1, LMP1, LMP2, EBER1, EBER2, BART	Hodgkin-Lymphom, Nasopharynxkarzinom, Peripheres T/NK-Zell-Lymphom	B-Zellen des Keimzentrums
<b>I</b>	EBNA1, EBER1(?), EBER2 (?), BART(?)	Burkitt-Lymphom	Sich teilende B-Gedächtniszellen
<b>0: Latenz</b>	EBER1, EBER2, BART(?)	-	Ruhende B-Gedächtniszellen

**Die nachfolgende Beschreibung der während der Latenz exprimierten Gene und Proteine ist aus (Kyzirakos 2009) entnommen und ergänzt.**

**Alle EBNAs:** *Epstein-Barr Virus nuclear antigens*. Alle EBNA-Proteine beeinflussen die Transkriptionskontrolle. Weiter sind sie für die Expressionsaktivierung der viralen Membranproteingene (LMP1, LMP2) und einiger zelleigener Gene verantwortlich. EBNA2 und EBNALP werden während der Infektion primärer B-Lymphozyten als erste exprimiert und koaktivieren die Transkription von viralen und einigen zellulären Promotoren (Alfieri et al. 1991). EBNA2, EBNA3A, EBNA3B und EBNA3C unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz bei EBV-1 und EBV-2 (s. 1.2.1).

**EBNA1:** DNA-bindendes Protein, welches für eine Immortalisierung der B-Zelle essentiell ist. EBNA1 wird in allen sich teilenden EBV-infizierten Zellen exprimiert (Raab-Traub 2007). Es bindet das EBV-Genom an Chromosomen, führt damit zur Persistenz des Episoms in der Zelle und zu einer stabilen latenten Infektion (Yates et al. 1985; Lee et al. 1999). EBNA1 inhibiert eine Apoptose in Burkitt-Lymphom-Zellen (Kennedy et al. 2003). Es besitzt eine Gly-Ala-Wiederholung in seiner Sequenz, die die Prozessierung durch das Proteasom verhindert, was eine Präsentation von EBNA-1 Peptiden auf MHC-Klasse-I Molekülen und die damit verbundene Detektion durch CD8-Zellen hemmt (Levitskaya et al. 1997). Die Sequenz von EBNA1 kann sich zwischen EBV-Stämmen unterscheiden, die Unterschiede korrelieren jedoch nicht mit der Zuordnung zu EBV-1 und -2 (Wright et al. 1995; Bhatia et al. 1996; Habeshaw et al. 1999).

**EBNA2:** EBNA2 ist für eine Immortalisierung der B-Zelle essentiell (Cohen et al. 1989; Yalamanchili et al. 1994). EBNA2 aktiviert die Transkription von verschiedenen Promotoren und induziert die Expression der viralen Gene für LMP1 und LMP2A (Abbot et al. 1990; Wang et al.



1990; Zimmer-Strobl et al. 1993), der B-Zell-Antigene CD21 und CD23 und der zellulären Gene *c-fgr* und *c-myc* (Wang et al. 1987; Cordier et al. 1990; Kaiser et al. 1999).

**EBNA3A, 3B, 3C:** EBNA3A, 3B und 3C bzw. EBNA3, EBNA4 und EBNA6 sind Transkriptionsregulatoren; 3A und 3C sind essentiell für eine B-Zelltransformation *in vitro* (Tomkinson et al. 1993). Die EBNA3-Proteine besitzen eine konservierte N-terminale Domäne und werden von drei benachbarten Genen kodiert (Robertson et al. 1996). Alle drei EBNA3-Proteine interagieren mit RBPJ- $\kappa$ . Dieser ist im Notch-Signalweg involviert; Überexpression von Notch wurde in T-Zell Neoplasien beobachtet (Joutel and Tournier-Lasserre 1998). Es wurde gezeigt, dass EBNA-3C die Produktion von LMP1 erhöhen kann (Allday and Farrell 1994).

**EBNALP:** *EB nuclear antigen leader protein*, auch als EBNA5 bezeichnet. Es ist eines der ersten exprimierten Proteine nach der Infektion der Zelle (Wensing and Farrell 2000). EBNALP koaktiviert mit EBNA2 und erhöht die Aktivität des Cp-Promotors der EBNA-Proteine. Es ist ein nukleäres Phosphoprotein, dessen Phosphorylierungsstatus an einem Serinrest sich abhängig vom Zellzyklus verändert (Kitay and Rowe 1996). EBNALP beeinflusst zusammen mit den anderen EBNA-Proteinen das gesamte Transkriptionsverhalten der Wirtszelle (Harada and Kieff 1997).

**LMP1:** *Latent Membrane Protein*. LMP1 ist ein 386 Aminosäuren langes integrales Membranprotein mit sechs Transmembrandomänen. Es ist essentiell für eine Transformation der Zelle und wird auch als *das* EBV-Onkogen bezeichnet. Es greift an vielen Stellen in die zelluläre Genexpression oder Signalwege ein (Wang et al. 1988; Raab-Traub 2007). Es imitiert z.B. einen konstitutiv aktivierten CD40-Rezeptor (Zimmer-Strobl et al. 1996; Gires et al. 1997). Die Bindung von CD40-Ligand an CD40 ist ein Wachstumssignal für die B-Zelle. LMP1 konzentriert sich in Glycosphingolipid-reichen Membranregionen, in denen sich auch die G-Protein-gekoppelten Wachstumsfaktorrezeptoren zusammenlagern. Das Zusammenlagern von LMP1 ist jedoch Liganden-unabhängig. Die zytoplasmatische C-terminale Domäne interagiert mit TRAFs (Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factors) und TRADD (Tumor Necrosis Factor Receptor-associated death domain protein) (Mosialos et al. 1995), was zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B führt (Devergne et al. 1996).

**LMP2A, LMP2B:** Bei beiden handelt es sich um integrale Membranproteine, wobei die Spleißvariante LMP2B einen verkürzten N-Terminus hat. LMP2A und B sind nicht essentiell für eine Transformation der B-Zellen. LMP2A spielt eine Rolle in der Einhaltung der Latenz (Raab-Traub 2007). An der N-terminalen Domäne von LMP2A befindet sich ein ITAM-Motiv (Reth 1989). Ähnlich wie LMP1 ahmt auch LMP2A einen aktivierten Signalweg nach. LMP2 besitzt 12 Transmembrandomänen, welche eine Zusammenlagerung erleichtern. Sowohl der C- als auch der N-Terminus des Proteins liegen auf der zytoplasmatischen Membranseite. Das ITAM-Motiv

ermöglicht eine Interaktion mit dem zytoplasmatischen Signaltransducer *syk* (eine Tyrosinkinase) (Burkhardt et al. 1992).

**BARTs:** *BamHIA rightward transcripts*. Verschiedene RNAs die in bis zu 20 microRNAs prozessiert werden. Es wird vermutet, dass sie in allen latent infizierten Zellen exprimiert werden. Obwohl sie das Potential haben, als mRNAs zu fungieren, konnten die von ihnen potentiell exprimierten Proteine nicht in natürlichen EBV-Infektionen nachgewiesen werden (Thorley-Lawson and Allday 2008; Al-Mozaini et al. 2009)

**EBERs:** EBER 1 und 2 sind kleine unpolyadenylierte und somit nichtkodierende RNAs mit einer Länge von 166 bzw. 172 Nukleotiden. Sie sind in hoher Kopienzahl von  $10^5$ - $10^6$  pro Wirtszelle vorhanden (Lerner et al. 1981; Howe and Steitz 1986). Da sie vermutlich in allen Latenztypen vorhanden sind, werden sie auch als Marker latenter Infektionen verwendet (Barletta et al. 1993). Da sie allerdings nicht in jeder Zelle und zu jedem Zeitpunkt vorhanden sind, kann die Abwesenheit der EBERs nicht als Abwesenheit einer Infektion von EBV interpretiert werden (Raab-Traub 2007). Ihre Expression scheint nicht essentiell für eine Transformation zu sein.

### 1.2.3.2 Lytische Phase

Von Zeit zu Zeit findet eine Reaktivierung des Virus, d.h. einen Eintritt in die lytische Phase statt. *In vitro* kann diese Reaktivierung z.B. durch eine Stimulation des B-Zellrezeptors oder durch eine Reihe an chemischen Stoffen wie Phorboläster, Butyrat und Calcium-Ionophoren induziert werden (Kenney 2007). Auch eine Stressinduktion im Endoplasmatischen Retikulum der B-Zelle oder Zellstress durch Bestrahlung kann den lytischen Zyklus auslösen (Taylor et al. 2011). Des Weiteren wurde gezeigt, dass TGF-beta die lytische Phase in einer Burkitt-Lymphom-Zelllinie auslösen kann (Fahmi et al. 2000). Die dabei produzierten Virions können entweder erneut B-Zellen infizieren oder über eine Ausschüttung über den Speichel zur Verbreitung des Virus beitragen (Shu et al. 1992; Lucht et al. 1995; Kenney 2007).

Während der lytischen Phase werden etwa 80 virale Proteine synthetisiert, unter ihnen Transkriptionsfaktoren, Replikationsfaktoren und Kapsidproteine (Kutok and Wang 2006). Wie bei anderen Viren wird dabei anhand der zeitlichen Reihenfolge ihrer Induktion zwischen *immediate early* (IE), *early* (E) und *late* (L) Genen, d.h. sehr früh, früh, und spät transkribierten Genen unterschieden. IE-Gene kodieren vor allem für Transkriptionsfaktoren, E-Gene für Proteine des Replikationsapparates wie z.B. die virale DNA-Polymerase und L-Gene u.a. für die viralen Strukturproteine.

Der Eintritt in die lytische Phase wird von der Aktivierung der IE-Gene BZLF1 und BRLF1 angeführt (Chevallier-Greco et al. 1986). Beide kodieren für Transkriptionsfaktoren, die sowohl ihre eigenen als auch andere virale Promotoren aktivieren und somit die lytische Phase einleiten

und auch den Effekt der ursprünglichen Aktivierung verstärken (Flemington and Speck 1990b; Flemington and Speck 1990a; Ragoczy and Miller 1999; Ragoczy and Miller 2001). In manchen Zelllinien jedoch, z.B. Raji, kann nur die Expression von BZLF1, und nicht von BRLF1, die lytische Phase einleiten (Ragoczy and Miller 1999).

Die Expression von BZLF1 und BRLF1 führen z.B. zur Expression der E-Gene BMRF1, welches für einen DNA-Polymerase-Prozessierungs-Faktor und Transkriptionsfaktor kodiert, BMLF1, einem RNA-bindenden Protein, BALF5, der viralen DNA-Polymerase, BBLF4, der Helikase, und BSLF1, der für die Primase kodiert (Holley-Guthrie et al. 1990; Kenney 2007).

Zu den L-Genen gehören, wie schon erwähnt, Gene, die z.B. für Strukturproteine oder Rezeptorproteine für die Wirtszellenerkennung kodieren (z.B. BLLF1, welches für das virale Glykoprotein gp350/220 kodiert, oder BNRF1, welches für ein Tegumentprotein kodiert).

Unter den L-Genen ist aber auch BCLF1, welches für vIL-10, einem Homolog des Zytokins IL-10, welches die zytotoxische T-Zellantwort reprimiert, kodiert (Hsu et al. 1990; Salek-Ardakani et al. 2002).

Ursprünglich wurden die lytischen Antigene in viral capsid antigen (VCA), early antigen (EA), und membrane antigen (MA) eingeteilt. Diese Bezeichnungen haben sich zum Teil gehalten, heute weiß man jedoch, dass jede Untergruppe aus einer Vielzahl an Antigenen besteht (Young et al. 2007).

#### 1.2.4 EBV-assoziierte Erkrankungen

Fast alle erwachsenen Individuen weltweit sind mit EBV infiziert, entwickeln aber nie Symptome. Diese eingespielte Balance zwischen Immunabwehr des Wirts (vgl. 1.3) und Virusvermehrung geht auf wahrscheinlich etwa 90-100 Millionen Jahre Koevolution zurück (McGeoch et al. 1995).

Trotzdem wird eine Reihe an maligner und nicht-maligner Erkrankungen zu unterschiedlichen Graden mit EBV assoziiert. Die Entstehung und Ausprägung vieler Erkrankungen hängt hierbei stark mit dem Immunstatus zusammen: ein geschwächtes Immunsystem begünstigt das Auswachsen EBV-transformierter Zellen, eine überstarke Reaktion bei der Primärinfektion führt zu den starken Symptomen einer Infektiösen Mononukleose (s.u.).

Eine Assoziation von EBV mit Multipler Sklerose, einer Autoimmunerkrankung, die von chronischen Entzündungen des zentralen Nervensystems gekennzeichnet wird, wird ebenfalls diskutiert. Hier wäre ein möglicher Mechanismus der Krankheitsentstehung keine zu starke oder zu schwache Immunreaktion, sondern eine Kreuzreaktion, die die Entstehung

autoreaktiver T-Zellen und Antikörper begünstigt (Wekerle and Hohlfeld 2003; Salvetti et al. 2009).

Im Folgenden werden die wichtigsten EBV-assoziierten Erkrankungen abgehandelt, ein Überblick über eine Vielzahl weiterer wird in Tabelle 4 gegeben.

### **1.2.4.1 Nichtmaligne Erkrankungen**

#### **1.2.4.1.1 Akute Infektiöse Mononukleose**

Die häufigste klinische Manifestation ist die Infektiöse Mononukleose (IM), oder „Pfeiffersches Drüsenfieber“ (Henle et al. 1968). Sie ist Folge einer Primärinfektion mit EBV, tritt aber fast ausschließlich bei jungen Erwachsenen auf. Wie schon erwähnt findet die Primärinfektion in der Regel schon im frühen Kindesalter statt und verläuft asymptomatisch (Odumade et al. 2011). Pro Jahr erkranken etwa 60-100 von 100000 Personen in der kaukasischen Bevölkerung, die meisten im Alter von 13-25. Im fortgeschritteneren Lebensalter gibt es praktisch keine Fälle mehr, da zu diesem Zeitpunkt fast alle infiziert sind.

Klinische Symptome dieser selbstlimitierenden lymphoproliferativen Erkrankung sind Halsschmerzen, Fieber, Adenopathie, Splenomegalie, periphere Lymphozytose und Müdigkeit. Sie bilden sich erst einige Wochen nach der Epstein-Barr-Virus-Primärinfektion aus. Zu diesem Zeitpunkt sind hohe Titer an infektiösem Virus in Speichel und Rachenausstrich zu finden, die auf einen hohen Grad aktiver Virus-Replikation zurückzuführen sind (Gerber et al. 1972). Auf dem Höhepunkt der Infektion sind 0,1 – 1% der peripheren B-Zellen mit dem Virus infiziert, was etwa dem 1000-10000fachen gegenüber der Anzahl in latent infizierten darstellt (Khan et al. 1996; Kutok and Wang 2006). Diese exprimieren die Proteine der Latenzstufe III, was darauf hinweist, dass eine Virus-induzierte B-Zellproliferation maßgeblich an der Zunahme Virus-infizierter B-Zellen teilhat (Tierney et al. 1994).

Der Name Infektiöse Mononukleose geht auf die Beschreibung von Sprunt und Evans zurück, die bei dieser akuten ansteckenden Erkrankung ungewöhnlich große mononukleäre Zellen im Blut beobachteten (Sprunt and Evans 1920). Heute ist bekannt, dass es sich dabei um atypische, aktivierte CD8+ T-Zellen handelt, von denen die meisten wahrscheinlich auf das Virus reagieren und einen Großteil zum Krankheitsbild beitragen.

#### **1.2.4.1.2 Chronisch aktive EBV-Infektion**

Die Chronische aktive EBV-Infektion (CAEBV) ist eine seltene Erkrankung, bei der entweder chronisch oder immer wiederkehrend Symptome einer IM auftreten. Die Immunantwort der Patienten weicht von der eines gesunden latent Infizierten ab, so haben sie hohe Titer an IgG-VCA (*Viral Capsid Antigen*) und IgG-EA (*Early Antigen*), aber keine EBNA-spezifischen Antikörper (Hjalgrim et al. 2007). Des Weiteren haben die Patienten eine niedrigere Frequenz an EBV-

spezifischen CD8+ T-Zellen als Gesunde (Sugaya et al. 2004). Im Gegensatz zu einer IM handelt es sich bei der CAEBV um eine potentiell lebensbedrohliche Erkrankung mit hoher Morbidität; Komplikationen, die auftreten können, sind z.B. ein hämophagozytisches Syndrom, interstitielle Pneumonie, Lymphome, Aneurismen der Coronararterie und Beeinträchtigungen des Zentralen Nervensystems (Kimura et al. 2001).

#### 1.2.4.2 Maligne Erkrankungen

##### 1.2.4.2.1 Posttransplantations-Lymphoproliferation

Das lymphomogene Potential von EBV wird wohl am stärksten beim Krankheitsbild der Posttransplantations-Lymphoproliferation (*Post-Transplantation Lymphoproliferative Disorder*; PTL) deutlich. Hierbei handelt es sich um eine heterogene Gruppe von lymphoproliferativen Erkrankungen, meist B-Zell-Neoplasien, die in der Folge von Transplantationen und der damit verbundenen Immunsuppression auftreten können (Starzl et al. 1970; Penn 1978). Sie variieren in ihrer Schwere und ihrem Phänotyp von spontan regredierender polyklonaler B-Zellexpansion bis zu letaler klonaler B-Zellproliferation, die nicht von einem Non-Hodgkin-Lymphom unterscheidbar ist (Gottschalk et al. 2005b). 90% der PTLs sind EBV-positiv (EBV-PTL) (Paya et al. 1999). Bis zu 25% der Empfänger einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) entwickeln nach Transplantation eine PTL. Die Krankheit entwickelt sich meist im ersten Jahr nach Transplantation, die Inzidenz ist schwankend (Curtis et al. 1999; Gottschalk et al. 2005a).

Standardtherapien bei PTL sind der monoklonale anti-CD20 Antikörper Rituximab (Roche), Chemotherapeutika, Bestrahlungstherapie und eine Reduktion der Immunsuppression. Etwa 50% der PTL-Patienten reagieren nicht auf die Behandlung mit Rituximab und die kombinierte Behandlung mit Chemotherapeutika hat schwere, teilweise sogar tödliche Nebenwirkungen. Eine Reduktion der Immunsuppression bei PTL nach Organtransplantation (OT) erhöht die Gefahr einer Abstoßungsreaktion (Montserrat 2012).

T-Zell-abgereicherte Donorzellen, eine zugrundeliegende Immundefizienz des Empfängers, oder eine zur Vorsorge oder Behandlung einer *Graft versus Host Disease* (GvHD) durchgeführte intensive Immunsuppression mit anti-T-Zell-Antikörpern (ATG, *anti-thymocyte globulin*) erhöhen die Inzidenz von PTL signifikant (Gottschalk et al. 2005b). *Vice versa* ist der adoptive Transfer von EBV-spezifischen T-Zellen äußerst erfolgreich sowohl bei Prophylaxe als auch Therapie einer PTL (Rooney et al. 1998; Wilkie et al. 2004; Haque et al. 2007; Haque et al. 2010; Heslop et al. 2010; Moosmann et al. 2010; Icheva et al. 2012), siehe auch 1.4. Werden außer T-Zellen auch B-Zellen depletiert, wird die Inzidenz einer PTL verringert (Cavazzana-Calvo et al. 1998). Dadurch wird die Rolle der zellulären Immunität in der Verhinderung eines Auswachsens transformierter B-Zellen eindrücklich demonstriert.

Alle EBV-assoziierten malignen Erkrankungen sind mit der Latenzphase des Virus assoziiert, EBV-PTLD meist mit dem Latenz-Typ III (s. Tabelle 3), was heißt, dass sämtliche „Latenz-Gene“ von EBV, wie EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, EBNA3L, LMP1, LMP2, die BARTs und die nicht-polyadenylierten viralen RNAs, EBER1 und EBER2 exprimiert werden. Dieses Genexpressionsmuster ist auch in B-Zelllymphomen von Patienten mit congenitaler oder erworbener Immunschwäche zu finden.

Dem heterogenen Erscheinungsbild entsprechend kann EBV-PTLD aus EBV-infizierten B-Zellen verschiedenster Entwicklungsstadien, wie naiven B-Zellen, Gedächtnis-B-Zellen oder atypischen aktivierten B-Zellen nach Reifung im Keimzentrum entstehen (Timms et al. 2003).

#### 1.2.4.2.2 Burkitt-Lymphom

Das Burkitt-Lymphom (BL) ist ein sehr aggressiver Tumor, der sich oft als extranodales Lymphom oder Leukämie präsentiert (Hjalgrim et al. 2007). Es werden drei Typen des BLs unterschieden: das endemische, das sporadische und das HIV-assoziierte BL (WHO). Beim endemischen Typ handelt es sich um die erstmals von Denis Burkitt beschriebene, in Äquatorialafrika und Papua-Neuguinea verstärkt vorkommende Form. Hier sind pro Jahr 10-200 Fälle pro  $10^6$  Individuen betroffen, meist Kinder und junge Erwachsene. Bei dieser Form ist die Assoziation mit EBV sehr stark; nahezu 100% der Tumorzellen sind mit dem Virus infiziert (Kutok and Wang 2006). Die sporadische Form kommt unabhängig von geographischen Gegebenheiten auch hauptsächlich bei jungen Erwachsenen und Kindern vor. Sie ist weitaus seltener (2-3 Fälle pro  $10^6$  Individuen), und auch weit weniger mit EBV assoziiert. In Europa und den Vereinigten Staaten sind nur etwa 15-30% der Fälle EBV-assoziiert (Rickinson and Kieff 2001). Auch die HIV-assoziierte Form ist nicht so stark mit EBV assoziiert, die Prozentzahl schwankt zwischen 30 und 80 (Hecht and Aster 2000).

Das *sine qua non* des Burkitt-Lymphoms ist eine Chromosomentranslokation, die das Protoonkogen *c-myc* auf Chromosom 8 betrifft. Durch eine Translokation kommt es zu einem Austausch von genetischem Material mit einem Locus für ein Immunglobulin (Shiramizu et al. 1991).

Trotz der starken Assoziation von EBV mit Burkitt-Lymphom ist die Infektion weder ausreichend noch nötig für die Tumorbildung. Die Rolle von EBV in der Tumorgenese könnte hierbei eine Erhöhung der genomischen Instabilität in einer B-Zellpopulation und damit eine Unterstützung der *c-myc*-Translokation sein. Alternativ könnte eine EBV-Infektion das „lymphomogene“ Potential einer Zelle mit *c-myc*-Translokation erhöhen und somit einen biologischen Vorteil für die Tumorzelle darstellen (Kutok and Wang 2006). Bei EBV-positiven und EBV-negativen BLs könnte es sich auch um schlichtweg unterschiedliche Entitäten handeln (Bellan et al. 2005).

#### 1.2.4.2.3 Klassisches Hodgkin-Lymphom

Das klassische Hodgkin-Lymphom (HL, Morbus Hodgkin) wird charakterisiert durch die Anwesenheit klonaler, multinukleärer Reed-Sternberg Zellen, die in über 98% der Fälle ihren Ursprung in B-Zellen des Keimzentrums haben. Ein weiteres Merkmal sind reaktive inflammatorische Zellen wie Granulozyten, T-Lymphozyten, Plasmazellen und Gewebsmakrophagen, die diese rosettenartig umringen (Hjalgrim et al. 2007). Etwa 10-15% aller malignen Lymphome sind dem Morbus Hodgkin zuzuschreiben (Hjalgrim et al. 2007). Meist sind Lymphknoten, Milz, Knochenmark und Leber betroffen. Das Hodgkin-Lymphom wird nach historischen Kriterien in eine gemischtzellige, eine nodulär-sklerosierende, eine lymphozytenarme und eine lymphozytenreiche Form unterteilt. 40% der Fälle sind EBV-assoziiert und meist der gemischtzelligen Form zuzuordnen (Kutok and Wang 2006).

#### 1.2.4.2.4 Nasopharynx-Karzinom

Das Nasopharynx-Karzinom (NPC, *Nasopharyngeal Carcinoma*) ist ein epithelialer Tumor, der in zwei große Subtypen unterteilt wird; einen verhornenden und ein nicht-verhornenden. Der nicht-verhornende Typ ist bei weitem der Häufigste, und hier zeigen nahezu 100% der Tumore eine EBV-Infektion (Klein et al. 1974; Niedobitek et al. 1991). Nasopharynx-Karzinome sind global betrachtet relativ selten, eine höhere Inzidenz wird in Südostasien und in China erreicht mit etwa 20-30 Fällen pro 100000 Einwohner und Jahr (Yu and Yuan 2002).

Tabelle 4: Epstein-Barr-Virus assoziierte Erkrankungen. Modifiziert aus (Kutok and Wang 2006)

**Nichtmaligne Erkrankungen**

Akute Infektiöse Mononukleose  
 Chronisch Aktive Infektion  
 Orale Haarleukoplakie  
 Multiple Sklerose

**Maligne Erkrankungen****Maligne B-Zell-Tumore bei Immungeschwächten***Bei erworbener Immunschwäche*

AIDS-assoziierte B-Zell-Lymphome  
 Post-Transplantations-Lymphoproliferation (PTLD)  
 Lymphomatoide Granulomatosis  
 Methotrexat-assoziiertes B-Zell-Lymphom

*Bei erblich bedingter Immunschwäche*

B-Zell-Lymphome assoziiert mit einem schweren kombinierten Immundefekt (SCID; *severe combined immunodeficiency*)  
 B-Zell-Lymphome assoziiert mit dem Wiskott-Aldrich Syndrom  
 B-Zell-Lymphome assoziiert mit der X-chromosomalen lymphoproliferativen Erkrankung

**Maligne mesenchymale Tumore**

Leiomyosarkom

**Maligne B-Zell-Tumore bei Immunkompetenten**

Burkitt-Lymphom  
 Klassisches Hodgkin-Lymphom

**Maligne T-Zell-Tumore**

Extranodales NK-Zell/T-Zell-Lymphom, nasal  
 Virus-assoziiertes hämophagozytisches Syndrom T-Zell-Lymphome

**Maligne Epithelzelltumore**

Nichtglanduläres Nasopharynx-Karzinom  
 Mamma-Karzinom  
 Leberzellkarzinom



## 1.3 Die Immunantwort gegen EBV und EBV-assoziierte Erkrankungen

Obwohl über 90% der Weltbevölkerung latent mit EBV infiziert sind, bleibt die Infektion bei den meisten ihr Leben lang ohne Symptome. Dass hierfür die Immunantwort des Wirts gegen EBV von zentraler Bedeutung ist, spiegelt sich in der Reihe von potentiell lebensbedrohlichen Komplikationen wie PTLD oder AIDS-assoziiertem B-Zell-Lymphom wider, die auftreten können, wenn die Immunkontrolle des Wirts geschwächt ist (vgl. 1.2.4). Eine EBV-Infektion führt bei Gesunden zur Entwicklung einer humoralen wie auch einer zellulären Immunität gegen das Virus. Antikörper gegen virale Strukturproteine und die EBNA-Proteine werden zwar als Diagnostikum verwendet, trotzdem trägt die humorale Immunantwort weit weniger zur Kontrolle der Infektion bei als EBV-spezifische T-Zellen (Rickinson and Moss 1997; Landais et al. 2005).

Der Großteil der Kenntnisse über eine Immunantwort während der Primärinfektion stammt aus IM-Patienten, da bei den anderen die Primärinfektion asymptomatisch abläuft und daher nicht diagnostiziert wird. Da allerdings die Inkubationszeit von EBV bis zum Ausbruch der IM geschätzte 5-7 Wochen beträgt, ist auch über diesen Zeitraum wenig bekannt (Odumade et al. 2011).

Während der Primärinfektion kommt es zu einer äußerst starken T-Zellantwort, die zum Großteil aus CD8+ T-Zellen besteht. Die primäre CD8-Antwort ist relativ oligoklonal (Annels et al. 2000), einzelne epitopspezifische CD8+ T-Zellen können zu diesem Zeitpunkt bis zu 40% aller CD8+ T-Zellen ausmachen. Die meisten CD8+ Antworten richten sich dabei gegen IE- oder E-Antigene, nur 0,1-5% aller CD8+ T-Zellen erkennen zu diesem Zeitpunkt latente Antigene, darunter hauptsächlich EBNA3A, 3B und 3C (Hislop et al. 2007). Diese stark gegen lytische Antigene gerichtete CD8+ T-Zellantwort wird nach Abklingen der Primärantwort reduziert und ein Gedächtnis-T-Zellrepertoire etabliert. Bei gesunden latent Infizierten sind etwa noch 0,2-2% der CD8+ T-Zellen spezifisch für ein bestimmtes lytisches Epitop und 0,05-1% für ein spezifisches latentes (Benninger-Doring et al. 1999; Bihl et al. 2006; Hislop et al. 2007). Im Alter können EBV-spezifische CD8+ T-Zellen sowohl quantitativ als auch prozentual wieder ansteigen, bei augenscheinlich gesunden Individuen über 60 kann der Anteil epitopspezifischer T-Zellen bis zu 14% betragen (Ouyang et al. 2003). Dieser Effekt wird interessanterweise abgeschwächt, wenn eine Koinfektion mit dem humanen Cytomegalievirus (CMV) vorliegt. Hier findet stattdessen eine starke Expansion CMV-spezifischer T-Zellen statt, die die Expansion EBV-spezifischer T-Zellen zu behindern scheint (Khan et al. 2004). In Hislop et al 2007 sind die bis dato bekannten EBV-spezifischen Epitope aufgelistet (Hislop et al. 2007).

EBV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellantworten sind im Vergleich zu den starken CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten um einiges schwächer, weswegen sie lange Zeit weniger Beachtung fanden (Precopio et al. 2003). Die CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort während der Primärantwort ist im Gegensatz zur CD8-Antwort nicht oligoklonal (Maini et al. 2000). Trotzdem gibt es einen Anstieg EBV-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu diesem Zeitpunkt, die nach Abklingen der primären Antwort auf etwa ein Viertel schrumpfen, und ebenfalls ein Gedächtnis-T-Zellrepertoire bilden (Amyes et al. 2003). CD4<sup>+</sup> EBV-spezifische Gedächtnis-T-Zellen haben meist einen Th1-Phänotyp und exprimieren vor allem IFN- $\gamma$  und TNF, eine kleinere Anzahl auch IL-2 (Steigerwald-Mullen et al. 2000; Bickham et al. 2001; Amyes et al. 2003). Die Zellen sind CD45RO<sup>+</sup>, d.h. sie haben keinen TEMRA-Phänotyp, und exprimieren im Gegensatz zu CMV-spezifischen CD4<sup>+</sup> Gedächtniszellen CD27 und CD28 (Hislop et al. 2007).

CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkennen sowohl latente als auch lytische Antigene. Unter den latenten wurde vor allem EBNA1 als immundominant beschrieben, gefolgt von den anderen EBNA-Proteinen und den LMPs (Leen et al. 2001; Ning et al. 2011). Während der Fokus der EBV-spezifischen CD8<sup>+</sup> Antwort auf IE- und E-Antigene gerichtet ist, ist das Spektrum der Erkennung von lytischen Antigenen durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen sehr weit gefächert (Merlo et al. 2010; Long et al. 2011). Durch die große Anzahl an exprimierten Proteinen ist sie noch nicht ansatzweise vollständig erforscht.

Auch von EBV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit zytotoxischen Eigenschaften (CD4<sup>+</sup> CTLs) wurde schon mehrfach berichtet. CD4<sup>+</sup> CTLs treiben ihre Zielzellen z.B. über Fas-Ligand in Apoptose (Wilson et al. 1998). Zum Beispiel wurde von EBNA1-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen berichtet, die EBV-infizierte B-Zellen über den Fas/Fas-Ligand-Weg töten (Paludan et al. 2002; Nikiforow et al. 2003). Es wurde aber auch schon mehrfach über CD4<sup>+</sup> EBV-spezifische T-Zellen berichtet, die ihre Zielzellen über die Expression von Granzym B und Perforin direkt töten, z.B. LMP-spezifische CD4<sup>+</sup> CTLs (Haigh et al. 2008), oder CD4<sup>+</sup> CTLs spezifisch für lytische Antigene (Adhikary et al. 2006; Merlo et al. 2010; Long et al. 2011). Des Weiteren wurden Granulysin-positive CD4<sup>+</sup> Zellen in mit LCLs stimulierten T-Zellkulturen detektiert (Sun et al. 2002). All diese Experimente wurden zwar *in vitro* durchgeführt, CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die ohne vorherige *in vitro* Reaktivierung auf Peptid-Stimulation CD107a exprimieren, wurden jedoch auch beobachtet (Ning et al. 2011). CD107a ist ein Marker für Degranulation, der mit Zytotoxizität assoziiert wird (Betts and Koup 2004) und dessen Oberflächenexpression auch schon bei CD4<sup>+</sup> CTLs mit Zytotoxizität assoziiert wurde (Long et al. 2011).

Diese Fähigkeiten, die sie neben der klassischen Helferrolle zu echten Effektoren macht sowie die Tatsache, dass B-Zellen, aus denen die meisten EBV-assoziierten Läsionen erwachsen, MHC-Klasse-II-positive Zielzellen sind, ließ das Interesse an der EBV-spezifischen Immunantwort von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den letzten Jahren ansteigen (Omiya et al. 2002; Heller et al. 2006).

## 1.4 Immuntherapie bei EBV-assoziierten Lymphomen

### 1.4.1 LCL-stimulierte T-Zelllinien gegen PTLD

Der Erfolg, den T-Zellen beim gesunden Infizierten bei der Kontrolle über den Virus haben, inspirierte schon vor fast 20 Jahren zu der Idee, EBV-assoziierte Tumore mit einem adoptiven Transfer von EBV-spezifischen T-Zellen zu behandeln. Nach einigen präklinischen Versuchen wurde die erste Infusion EBV-spezifischer T-Zellen schon 1995 bei Patienten nach hämatopoietischer Stammzelltransplantation (HSZT) durchgeführt, entweder zur Prophylaxe oder nach ersten Zeichen einer EBV-Reaktivierung (Rooney et al. 1995). Da sich der Transfer als sicher und erfolgreich erwies und EBV-DNA-Reaktivierungen zurückgingen, wurde an den ersten Erfolg bald angeknüpft (Heslop et al. 1996a; Rooney et al. 1998). Bei den transferierten EBV-spezifischen Zellen handelte es sich um polyklonale Zellen, die durch eine Kokultivierung von Donor-Lymphozyten mit autologen EBV-infizierten B-Zellen (LCLs) generiert wurden. Die infundierten Zellen waren genetisch markiert, was ihren Nachweis im Körper des Behandelten ermöglichte. Die Zellen waren bis zu drei Jahre nachweisbar (Heslop et al. 1996b). Nach einer Langzeitfolgestudie in der Heslop et al. 114 Patienten durchschnittlich für 10 Jahre nach HSZT-Transplantation und adoptivem Transfer beobachtete, verzeichnete diese Strategie eine 80%ige Erfolgsquote bei einer Behandlung und eine 100%ige Erfolgsquote bei der Prophylaxe einer PTLD. Die Studien wurden in drei Zentren durchgeführt und erwiesen sich als sicher (Heslop et al. 2010). Ein Nachteil dieser Strategie ist die Zeit, die benötigt wird, um EBV-spezifische T-Zellen zu generieren. Diese beträgt mehrere Wochen bis zur Generierung autologer LCLs und zusätzlich mehrere Wochen bei der die eigentliche Kokultivierung von PBMCs mit LCLs stattfindet (Rooney et al. 1998). Daher ist die Strategie bei dringenden klinischen Fällen nicht anwendbar. Des Weiteren lässt sich das Konzept schwer bei Empfängern von Organtransplantaten einsetzen. Aus diesem Grund etablierte die Gruppe um T. Haque aus Edinburgh eine Bank mit cryokonservierten polyklonalen EBV-spezifischen T-Zellen, die über 95% der in Großbritannien verbreiteten HLA-Haplotypen abdecken (Wilkie et al. 2004). Diese waren ebenfalls über eine Kokultivierung mit autologen LCLs generiert worden. Nach einem erfolgreichen Einzelheilversuch, bei dem Zellen aus der Bank mit einem partiell passenden HLA-Typ zur Behandlung einer bestehenden PTLD nach OT verwendet wurden und eine komplette Remission erzielt wurde (Haque et al. 2001), wurde eine Multi-Center Studie der Phase II an 33 Patienten nach OT (31 Patienten) oder HSZT (2 Patienten) durchgeführt (Haque et al. 2007). Alle in der Studie behandelten Patienten hatten eine durch Biopsie bestätigte PTLD, bei der die konventionelle Therapie scheiterte. 21 der 33 Patienten (64%) hatten nach 5 Wochen, 17 (52%) nach 6 Monaten auf die Behandlung angesprochen. 12 bzw. 14 Patienten waren zu den gegebenen Zeitpunkten in kompletter Remission. Die Autoren verzeichneten eine Assoziation

zwischen einer höheren Anzahl an übereinstimmenden HLA-Loki (A, B oder DR) zwischen Zellprodukt und Patient und einem besseren Behandlungsergebnis. Das Gleiche galt für den prozentualen Anteil von CD4+ T-Zellen im Produkt: Ein höherer Anteil an CD4+ Zellen hatte einen positiven Einfluss auf das Behandlungsergebnis.

Insgesamt erwies sich der adoptive Transfer EBV-spezifischer T-Zellen als sicher und eine *Graft versus Host Disease* (GvHD) stellte kein Problem dar (Merlo et al. 2011).

### 1.4.2 LCL-stimulierte T-Zelllinien gegen EBV-assoziierte Tumore der Latenzstufe II

Der adoptive Transfer von LCL-stimulierten T-Zelllinien wurde danach ebenso als Behandlungsstrategie bei HL und NPC getestet, die erzielten Erfolge sind jedoch, verglichen mit der Behandlung bei PTLD, geringer (Bollard et al. 2004; Louis et al. 2010; Merlo et al. 2011). Eine mögliche Erklärung wäre dabei, dass mit LCLs stimulierte T-Zellen ungünstige Proportionen an Antigen-spezifischen Zellen beinhalten. LCLs exprimieren wie die Läsionen der PTLD alle latenten Antigene (vgl. 1.2.3.1, Latenzstufe III), wohingegen HL und NPC nur EBNA1, LMP1 und LMP2 (Latenzstufe II) exprimieren. Mit LCLs generierte CD8+ T-Zelllinien erkennen jedoch von den latenten Antigenen hauptsächlich EBNA3A, 3B und 3C, neben IE- und E-Genen (Landais et al. 2005; McAulay et al. 2009). Das CD4-Kompartiment in diesen Zellprodukten erkennt sogar vorrangig lytische Antigene (Adhikary et al. 2007). Die stimulierten Zellen erkennen also zu einem großen Teil Antigene, die von HL oder NPC nicht exprimiert werden. Tatsächlich konnte der Behandlungserfolg bei z.B. HL durch den Transfer von T-Zelllinien, die größere Anteile LMP2-spezifischer Zellen beinhalteten, verbessert werden (Bollard et al. 2007).

### 1.4.3 Peptidselektionierte T-Zellen: schnelleres Protokoll und eine bessere Kontrolle über die Spezifität

Die Probleme der Langwierigkeit des Protokolls zur Generierung von EBV-spezifischen T-Zellen mittels LCLs und der schwierig zu kontrollierenden Spezifitäten innerhalb des Produkts lassen sich umgehen, wenn man die Zellen aufgrund ihrer Spezifitäten selektioniert.

Moosmann et al. therapierten sechs Patienten mit diagnostizierter PTLD nach HSZT mit T-Zellen, die aufgrund ihrer Peptidspezifität selektioniert wurden (Moosmann et al. 2010). Bei diesem Protokoll wurden PBMCs des Spenders über Nacht mit 23 publizierten EBV-Epitopen, unter ihnen 19 Klasse-I-Epitope und vier Klasse-II-Epitope, stimuliert und am nächsten Tag anhand ihrer IFN- $\gamma$ -Sekretion magnetisch isoliert. Die Autoren konnten damit innerhalb von 36 Stunden EBV-spezifische T-Zellen selektionieren, die sofort verabreicht werden konnten. Pro Patient wurde eine einzelne Dosis von durchschnittlich  $4 \times 10^6$  Zellen verabreicht. Alle Patienten waren

zuvor konventionell (Reduktion der Immunsuppression, Rituximab, Cidofovir) behandelt worden. Drei der Patienten waren mit PTLD in einem frühen Stadium diagnostiziert worden. Bei allen dreien konnte eine Expansion EBV-spezifischer T-Zellen *in vivo* detektiert werden und alle drei gingen in komplette Remission. Zwei der drei Patienten waren HLA-A\*02-positiv und bei beiden waren sehr hohe Frequenzen an T-Zellen, die die Epitope GLCTLVAML (BMLF1) und YVLDHLIVV (BRLF1) erkennen, vorhanden. Diese Epitope aus IE/E-Genen werden auch von Zellen gesunder EBV-Infizierter häufig erkannt. Bei den beiden Patienten expandierten die Zellpopulationen in den ersten Tagen bis Wochen sehr stark, auf bis zu etwa 20% YVLDHLIVV-spezifische Zellen unter den gesamten Lymphozyten des peripheren Blutes, um nach etwa 200 Tagen auf normale Werte zusammenzuschrumpfen. Der dritte Patient in kompletter Remission war A\*02-negativ und hatte spezifische Zellen für das B\*44 restringierte Epitop VEITPYKPTW (EBNA3B) und das MHC-Klasse-II Epitop TDAWRFAMNYPRNPT (BNRF1). Die drei weiteren behandelten Patienten litten zum Zeitpunkt des Transfers an einer fortgeschrittenen PTLD mit Multiorgandysfunktion und starben 1-11 Tage später an Multiorganversagen. Eine geringe Anzahl spezifischer T-Zellen (0,05%) konnte nur bei einem Patienten detektiert werden. Es war jedoch keine IFN- $\gamma$ -Antwort messbar. Bei den Überlebenden trat keine GvHD auf.

Icheva et al. behandelten zehn Patienten mit diagnostizierter PTLD oder EBV-Virämie nach HSZT mit EBNA1-spezifischen T-Zellen, die ebenfalls anhand ihrer IFN- $\gamma$ -Produktion nach Stimulation mit einem überlappenden EBNA1-Peptid-Pool selektiert wurden (Icheva et al. 2012). Die Patienten erhielten höchstens 25000 Zellen/kg Körpergewicht. Bei acht der zehn Patienten konnte eine Expansion der Zellen *in vivo* beobachtet werden, mit einem Rückgang der Virämie und Remission der PTLD bei sieben von ihnen. Sechs dieser Patienten litten an einer refraktären PTLD. Es wurde keine GvHD über dem Grad 2 durch die Therapie ausgelöst.

Der Adoptive Transfer peptidspezifischer Zellen wurden auch schon zur Behandlung von Cytomegalovirusinfektionen bei Patienten nach HSZT durchgeführt, die Behandlung erwies sich als sicher und effektiv. Auch hier wurden die Zellen mit einem überlappenden Pool an Peptiden, hier von dem Antigen pp65, stimuliert und IFN- $\gamma$  sezernierende Zellen selektiert und infundiert (Feuchtinger et al. 2010).

Auch gegen Adenovirusinfektionen oder als multivirale Prophylaxe wird die Strategie der Selektion IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen nach Stimulation mit Peptidpools getestet (Feuchtinger et al. 2008; Lugthart et al. 2012).

## 1.5 Reverse Immunologie: Das Epitop-Vorhersageprogramm SYFPEITHI

Der „klassische“ Ansatz auf der Suche nach T-Zellepitopen bzw. denjenigen Peptiden innerhalb eines Proteins, welche von T-Zellen erkannt werden können, ist, peptidreaktive T-Zellen zu isolieren, und ihre Spezifität zu identifizieren. Da die erste Voraussetzung für eine Erkennung durch die T-Zelle die Präsentation des Peptids durch ein MHC-Molekül ist und verschiedene HLA-Moleküle unterschiedliche Peptidmotive bevorzugen (s. 1.1.2.4), lassen sich mit diesem Wissen mögliche Liganden, und damit Epitopkandidaten, *in silico* vorhersagen. Diese können hernach *in vitro* auf ihre Immunogenität getestet werden. Dieser reverse Ansatz kann gegenüber dem klassischen Zeit und Geld sparen.

Das *online* zugängliche Programm SYFPEITHI ([www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de)) bietet, neben einer auf Publikationen basierenden Datenbank mit mehr als 4500 Klasse-I- und Klasse-II-MHC-Liganden und T-Zellepitopen, die Möglichkeit, HLA-restringierte T-Zellepitope vorherzusagen („epitope prediction“).

Die Vorhersage basiert auf publizierten Peptidmotiven von T-Zellepitopen und massenspektrometrisch identifizierten natürlichen Liganden. SYFPEITHI betrachtet die beobachteten Anker- und Hilfsankeraminosäuren an den jeweiligen Positionen und auch weitere als häufig beobachtete Aminosäuren. Mithilfe dieser wird ein *Score* (Zahlenwert) zur Vorhersage der Bindungswahrscheinlichkeit an das jeweilige HLA-Molekül errechnet. Die Aminosäuren eines Peptids erhalten Punkte je nach ihrer Position als Anker, Hilfsanker oder als ein bevorzugter Rest an einer bevorzugten Position. Ideale Ankeraminosäuren erhalten 10 Punkte, unübliche Anker erhalten 6 bis 8 Punkte, Hilfsanker 4 bis 6 Punkte und bevorzugte Reste 1-4 Punkte (Rammensee et al. 1999). Da die Kenntnis um bevorzugte Anker und Motive aus tatsächlichen Liganden und/oder Epitopen stammen, fließt in das Vorhersageergebnis nicht nur die Bindungsaffinität eines Peptids zum HLA-Molekül, sondern auch die Wahrscheinlichkeit prozessiert zu werden, ein.

In der Regel enthalten die bestbewerteten 2% aller möglichen Peptide eines Proteins vielversprechende Kandidaten für T-Zellepitope.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Epstein-Barr-Virus (EBV) ist einer der erfolgreichsten humanotropen Viren überhaupt, nahezu jeder Erwachsene weltweit ist latent mit ihm infiziert. Das Fehlen einer funktionierenden EBV-spezifischen zellulären Immunabwehr kann jedoch zum Auswachsen transformierter B-Zellen führen. Dieser Zusammenhang wird zum Beispiel bei Transplantationsempfängern, die eine

Immunsuppression erhalten, sehr klar demonstriert; der Grad der Immunsuppression korreliert mit der Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Posttransplantationslymphoproliferation (PTLD). Die Gabe von EBV-spezifischen T-Lymphozyten erwies sich dabei sowohl in der Therapie als auch in der Prophylaxe als wirksam und komplikationsarm. Die meisten Erfahrungen wurden hierbei mit EBV-spezifischen T-Zellen, die mit autologen EBV-infizierten B-Zellen kokultiviert wurden, gemacht. Leider ist das mehrere Wochen dauernde Protokoll langwierig und aufwändig. Das Anlegen einer Bank kryokonservierter EBV-spezifischer T-Zellen als Alternative ist mit hohem logistischem Aufwand verbunden. Ein weiterer Nachteil ist die unter Umständen große Heterogenität verschiedener Zellprodukte und die fehlende Möglichkeit, aktiv Einfluss auf die genaue Spezifität der Zellen zu nehmen. Erste Therapieversuche mit peptidselektierten T-Zellen bei PTLD zeigten sich ebenfalls als erfolgreich. Mit einer Dauer von weniger als zwei Tagen vom Vollblut zu aufgereinigten EBV-spezifischen T-Zellen war diese Strategie auch um ein Vielfaches schneller. Hierfür müssen allerdings EBV-spezifische Epitope bekannt sein. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort gegen EBV ist weniger ausgeprägt als die CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort und fand daher lange Zeit weniger Beachtung. Haque et al. stellten jedoch fest, dass ein höherer Anteil an CD4<sup>+</sup> Zellen in EBV-spezifischen T-Zelllinien sogar mit einem besseren Behandlungsergebnis bei PTLD korreliert.

Ziel der Arbeit war es daher, CD4<sup>+</sup> T-Zellepitope von EBV zu identifizieren, die für die Selektion, Generierung oder Expansion EBV-spezifischer T-Zellen verwendet werden können. Hierfür sollten *in silico* vorhergesagte Epitopkandidaten aus bekannten Antigenen auf eine Erkennung von EBV-spezifischen T-Zellen gesunder Blutspender getestet werden. Da virusspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen hauptsächlich Th1-polarisiert sind (vgl. 1.1.1.3), sollte eine spezifische Erkennung durch den Nachweis einer spezifischen IFN- $\gamma$ -Produktion gezeigt werden. IFN- $\gamma$  ist ein Leitzytokin der Th1-Zellen.

Gesucht wurde nach Epitopen, die von CD4<sup>+</sup> Zellen eines Großteils der latent infizierten Erwachsenen erkannt werden. Es ist zu erwarten, dass häufig erkannte Epitope (FREPs, *frequently recognized epitopes*) eine wichtige Rolle bei der erfolgreichen Kontrolle Immunkompetenter über den Virus spielen. Des Weiteren haben häufig erkannte Epitope den Vorteil, dass sie vermutlich über verschiedene HLA-Typen hinweg promiskuitiv präsentiert werden und damit zur Selektion oder Amplifikation EBV-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen verschiedener Spender mit unterschiedlicher HLA-Typisierung verwendet werden können.

Außerdem sollten Epitope derartig kombiniert werden, dass sie in ihrer Kombination zur Stimulation EBV-spezifischer T-Zellen von praktisch jedem EBV-infizierten Spender verwendet werden können.

## 2 MATERIAL & METHODEN

### 2.1 Puffer, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

#### 2.1.1 Puffer und Medien

##### 2.1.1.1 Puffer und Waschpuffer

PBS/BSA	PBS mit 0,5% BSA
PBS/Tween	PBS mit 0,05% Tween
Permwash	PBS mit 0,1% Saponin, 0,5% BSA, 0,02% Natriumazid
Standard-FACS-Puffer (PFEA)	PBS mit 2% hitzeinaktiviertem (30' bei 56°C) FCS, 2 mM EDTA, 0,01% Natriumazid
FACS-Fixierpuffer (FACS-Fix)	PFEA mit 1% PFA
PBSE	PBS mit 2 mM EDTA (Roth)
FACS-Fix	FACS Puffer PFEA mit 1% Formaldehyd
Capture-Puffer	PBS mit 0,5% BSA und 2 mM EDTA
Kopplungspuffer	0,5 M NaCl, 0.1 M NaHCO <sub>3</sub> , pH 8,3
Lysepuffer (2x)	33 ml PBS, 400 mg CHAPS, 1 Tablette Proteaseinhibitor "Complete", Roche
Trypanblau	PBS, 0,05% Trypanblau, 0,01% NaN <sub>3</sub>
MACS-Puffer	PBS, 0,5% BSA, 2 mM EDTA, sterilfiltrieren

##### 2.1.1.2 Kultiviermedien

Einfriermedium	FCS mit 10% DMSO
Auftaumedium	IMDM mit 3 µg/ml DNase, 1% PenStrep, 25 µg/ml Gentamycin
T-Zellmedium (TZM)	IMDM mit 1% PenStrep, 25 µg/ml Gentamycin und 5% humanes Plasma
B-Zellmedium (BZM)	IMDM, 10% humanes Plasma, 2 mM Glutamin, 5 µg/ml Human-Insulin, 15 µg/ml Gentamycin



LCL-Medium	RPMI mit Glutamax & Hepes + 10% hitzeinaktiviertes FCS, 1% PenStrep, 0,05 mM $\beta$ -ME
NIH-Medium mit/ohne G418	DMEM mit 10% FCS, 1% PenStrep, +/- 1 mg/ml G418

### 2.1.2 Reagenzien

AbC anti-mouse bead kit	Invitrogen
AbC anti-rat/hamster bead kit	Invitrogen
Anti-PE-Microbeads	Miltenyi
ArC bead kit	Invitrogen
Bovines Serumalbumin (BSA) A-3059	Sigma
Brefeldin A	Sigma
CHAPS	AppliChem
CNBr-aktivierte Sepharose	GE Healthcare
CompBead Set	Becton Dickinson
Cyclosporin A	Sandimmun, Sandoz
Cytofix/Cytoperm	Becton Dickinson
Descosept AF	Dr. Schuhmacher GMBH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
DNase I	Roche
EDTA	Roth
Ethanol vergällt	SAV Liquid Production
ExtrAvidin Alkalische Phosphatase	Sigma
FACS-Clean, FACS-Rinse, FACS-Flow	Becton Dickinson
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories
G418	Biochrom
Gentamycin	Cambrex Bioscience Verviers
Glutamin	Lonza

GolgiStop	Becton Dickinson
H <sub>2</sub> O doppelt destilliert (ddH <sub>2</sub> O)	mit Heraeus Destamat Bi 18 E
Humanes Plasma	gepooltes Plasma verschiedener Vollblutspenden, selbst hergestellt, hitzeinaktiviert
Human-Insulin	Sigma
IMDM + 25 mM Hepes + L-Glutamin	Lonza
Ionomycin	Sigma
Lymphozyten-Separationsmedium (Ficoll)	PAA Laboratories
Lysetol	Schülke
Natriumazid NaN <sub>3</sub>	Merck
Paraformaldehyd, min. 37% (PFA)	Fluka
PBS ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	BioWHITTAKER
Penicillin/Streptavidin (PenStrep, 100x)	PAA Laboratories
Leukagglutinin (PHA-L)	Sigma
Phytohämagglutinin (PHA-P)	Sigma
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma
Proleukin IL-2	Chiron
Proteaseinhibitor "Complete"	Roche
RPMI 1640 + 25 mM Hepes + L-Glutamax	Gibco
Saponin from quillaja bark	Sigma
Staphylococcal Enterotoxin B aus Staphylococcus aureus (SEB)	Sigma
Trifluoressigsäure (TFA)	Applied Biosystems
Trypanblau	Merck
Trypsin/EDTA	Lonza

## 2.1.2.1 Verwendete Antikörper und Farbstoffe

Tabelle 5: Für durchflusszytometrische Analysen verwendete Antikörper und Farbstoffe

<b>Antikörper gegen extrazelluläre Antigene, die ohne Permeabilisierung verwendet werden</b>					
<b>Antigen</b>	<b>Fluoreszenzfarbstoff</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Klon</b>	<b>Spezies</b>	<b>Eingesetzte Verdünnung</b>
<b>CD3</b>	Pacific Blue	Biologend	UCHT1	Maus	1:100
	FITC	BD	UCHT1	Maus	1:30
<b>CD4</b>	APCCy7	BD	RPA/T4	Maus	1:100
	APC	BD	SK3	Maus	1:50
<b>CD8</b>	PerCP	BD	SK1	Maus	1:25
	PerCP	Biologend	SK1	Maus	1:50
	PECy7	Beckman Coulter	SFC121Thy2D3	Maus	1:120
<b>CD19</b>	PE	BD	HIB19	Maus	1:5
<b>CD45RO</b>	FITC	BD	UCHL1	Maus	1:5
<b>CCR7</b>	Alexa647	BD	3D12	Ratte	1:20
<b>CD27</b>	FITC	BD	M-T271	Maus	1:5
<b>CD62L</b>	PECy7	BD	DREG-56	Maus	1:25
<b>CD28</b>	PerCPCy5.5	Biologend	CD28.2	Maus	1:10, nt
<b>CD107a*</b>	FITC	BD	H4A3	Maus	1:100
<b>Antikörper, die nach Permeabilisierung der Zellen verwendet werden (intrazelluläre Färbung)</b>					
<b>Antigen</b>	<b>Fluoreszenzfarbstoff</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Klon</b>	<b>Spezies</b>	<b>Eingesetzte Verdünnung</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	PECy7	BD	4S.B3	Maus	1:400
	PE	BD	B27	Maus	1:200
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Pacific Blue	Biologend	Mab11	Maus	1:120
<b>CD154</b>	FITC	BD	Trap1	Maus	1:5
<b>IL-5</b>	APC	BD	TRFK5	Ratte	1:20
<b>IL-2</b>	PE	BD	MQ1-17H12	Ratte	1:100
<b>Granzym B</b>	Alexa Fluor 647	BD	GB11	Maus	1:250
<b>Unkonjugierte Antikörper</b>					
<b>Antigen</b>	<b>Fluoreszenzfarbstoff</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Klon</b>	<b>Spezies</b>	<b>Eingesetzte Verdünnung</b>
<b>HLA-DR</b>		Im Haus**	L243	Maus	diverse
<b>HLA-A, B, C</b>		Im Haus**	W6/32	Maus	diverse
<b>HLA-DQ</b>		Im Haus**	SPVL3	Maus	diverse
<b>Sekundärantikörper</b>					
<b>Antigen</b>	<b>Fluoreszenzfarbstoff</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Klon</b>	<b>Spezies</b>	<b>Eingesetzte Verdünnung</b>
<b>Anti-Maus IgG F(ab')<sub>2</sub></b>	FITC	Jackson Immuno Research	polyklonal	Ziege	1:200
<b>Farbstoffe</b>					
<b>Reaktionsspezifität</b>	<b>Fluoreszenzfarbstoff</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Klon</b>	<b>Spezies</b>	<b>Eingesetzte Verdünnung</b>
<b>Amine</b>	Aqua	Invitrogen	-	-	1:400

\* Wird zur Stimulation zugegeben

\*\* Herstellung im Haus von C. Falkenburger

Nt: nicht titriert

Tabelle 6: Für ELISPOTs verwendete Antikörper und Farbstoffe

$\alpha$ IFN- $\gamma$ Erstantikörper 1-D1K [1 mg/ml]	Mabtech
$\alpha$ IFN- $\gamma$ Sekundärantikörper 7-B6-1 Biotin [1 mg/ml]	Mabtech
BCIP/NBT SIGMAFAST	Sigma

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

12-Well-Platten	Corning
24-Well-Platten	Corning
5 ml-FACS-Röhrchen	Becton Dickinson
6-Well-Platten	Falcon
96-Well-Platten 3799	Corning
Amicon Ultra-4, MWCO 10.000 Da	Millipore
Cryoröhrchen, 2 ml	Greiner
ELISPOT-Platten MSHAN4B	Millipore
Falcon-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one
Glasflaschen	Schott
MACS-Säulchen (LS/MS)	Miltenyi
Parafilm	Bemis
Pipettenspitzen (1000 $\mu$ l, 200 $\mu$ l, 20 $\mu$ l, 2 $\mu$ l)	Starlab
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Reservoirs (50 ml, 100 ml)	Corning Incorporated
Sterile Spritzen, 20 ml, 50 ml	Becton Dickinson
Sterilfilter, 0,22 $\mu$ m	Corning Incorporated
Zellkulturflaschen (50 ml, 250 ml, 550 ml)	Greiner bio-one

## 2.1.4 Geräte

Analysenwaage (1 mg- 210 g)	Sartorius
Autoklav	Fedegari Autoclavi Spa
Biologische Sicherheitswerkbank	Holten Lamin Air
Dampfsterilisator 11-6-9 HS1-FD	Sauter
Einfrierbehälter	Nalgene
Einkanalpipetten (1000 µl, 200 µl, 20 µl, 2 µl)	Eppendorf
ELISPOT-Reader CTL	Cellular Technologies
FACS-Canto II	Becton Dickinson
Feinwaage (10 mg - 210 g)	Sartorius
Flachschüttler	IKA-Vibrax-VXR
Gefrierschrank, auf -20°C eingestellt	Liebherr
Gefrierschrank, auf -80°C eingestellt	Sanyo
Inkubator (37°C, 5% CO <sub>2</sub> )	Heraeus Instruments
Kühlschrank, auf 4°C eingestellt	Liebherr
Laborfuge 400	Heraeus
Lichtmikroskop DMIL	Leica
LTQ Orbitrap XL	Thermo Scientific
MACS-Magnet	Miltenyi Biotec
Megafuge	Heraeus
Mehrkanalpipette 200 µl	Abimed
MidiMACS Separator	Miltenyi
Mini-Tischzentrifuge	Qualitron
Nano-HPLC NanoLC 2D (altes System)	Eksigent
Nano-UHPLC UltiMate 3000 RSLCnano	Dionex
Neubauer Zählkammer, Tiefe 0,1 mm	LO-Laboroptik
Peptide Synthesizer ABI 433A	Applied Biosystems
Peptide Synthesizer EPS 221	Abimed

Pipettierhilfe Pipet Boy	Integra Biosciences
Spektrometer Ultrospec 3000	Pharmacia (GE Healthcare)
Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf
Ultraschallbad Sonorex Super	Bandelin
Ultraschall-Mikrospitze	Branson Ultrasonic
Ultrazentrifuge L-80 Ultracentrifuge Ti45	Beckman Coulter
Vortexer MS 1	IKA-Works, Inc.
Wasserbad Thermomix BM-S	Braun Biotech

### 2.1.5 Verwendete Software

BDDiva	Becton Dickinson
FlowJo 9.1(Mac) und 7.6 (PC)	Treestar
ImmunoCapture 6.1	Cellular Technologies LTD
ImmunoSpot 4.0 Academic	Cellular Technologies LTD
MASCOT Server 2.2.04	Matrix Science
Pestle	Freie Software von Mario Roederer am National Institute of Allergy and Infectious Disease
SigmaPlot 12	Systat Software
Spice	Freie Software von Mario Roederer am National Institute of Allergy and Infectious Disease ( <a href="http://exon.niaid.nih.gov/spice/">http://exon.niaid.nih.gov/spice/</a> )
Thermo Proteome Discoverer 1.1	Thermo Fisher Scientific
Xcalibur 2.0.7	Thermo Fisher Scientific

## 2.2 Methoden

Alle Zellkulturen wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C kultiviert.

### 2.2.1 Peptidsynthese

Alle Peptide wurden in unserem Labor mittels Fmoc-Chemie von Patricia Hrستیć, Nicole Zuschke und Stefan Stevanović synthetisiert. Zum Einsatz kamen zwei Synthesysteme: der ABIMED *Economy Peptide Synthesizer* EPS 221 und der ABI 433A *Peptide Synthesizer*. Nach organisch-chemischer Aufarbeitung der Syntheseprodukte wurden die Proben im Massenspektrometer und HPLC qualitativ überprüft. Die Peptide wurden lyophilisiert und bis zur Lösung bei 4°C aufbewahrt.

### 2.2.2 Lösung und Aufbewahrung der Peptide

Die lyophilisierten Peptide wurden mit einer Analysenwaage abgewogen (0,4 – 1,4 mg) und in DMSO gelöst, so dass eine Konzentration von 10 mg/ml erreicht wurde. Nachfolgend wurden die Peptide in sterilfiltriertem Wasser auf eine Endkonzentration von 1 mg/ml verdünnt, aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Das Lösen und Verdünnen der Peptide erfolgte steril. Es war darauf zu achten, die Zeit der gelösten Peptide im ungefrorenem Zustand möglichst kurz zu halten, da eventuell vorhandenes Cystein oder Methionin in DMSO und Wasser oxidiert werden kann. Durch eine solche chemische Veränderung könnte die biologische Wirkung des Peptids verloren gehen.

### 2.2.3 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes aus *Buffy Coats*

Bei sogenannten *Buffy Coats* handelt es sich um ein an Leukozyten reiches Blutprodukt. Es wird durch Zentrifugation von heparinisiertem Vollblut gewonnen, wobei Plasma und Erythrozyten zu großen Teilen abgetrennt werden. Der „buffy coat“ stellt die Mittelschicht zwischen Erythrozyten und Plasma dar.

Es wurden routinemäßig wöchentlich mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) aus *Buffy Coats* isoliert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Die *Buffy Coats* wurden uns freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Wernet (Zentrum für klinische Transfusionsmedizin GmbH, HLA-Labor Universitätsklinikum Tübingen) zur Verfügung gestellt.

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei Zimmertemperatur. Das verwendete PBS wurde zuvor auf Raumtemperatur erwärmt.

Pro Beutel *Buffy Coat* wurden 4 sterile 50 ml-Reaktionsgefäße mit jeweils 15 ml Leukozytenseparationsmedium („Ficoll“) vorbereitet. Die *Buffy Coats* wurden aus den Beuteln in mittlere, sterile Zellkulturflaschen überführt, wobei alle Berührungspunkte des Blutprodukts (Schläuche des Beutels, Schere) zuvor mit 70% Ethanol desinfiziert wurden, und mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 125 ml verdünnt. Daraufhin wurde das verdünnte Blutprodukt vorsichtig über das vorbereitete Ficoll geschichtet (30 ml Blutprodukt / Reaktionsgefäß mit 15 ml Ficoll), und für 20 min bei 2000 rpm und ausgeschalteter Bremsfunktion zentrifugiert (715xg, Megafuge). Im Anschluss wurde die Leukozytenschicht vorsichtig abgesaugt und in frische 50 ml-Reaktionsgefäße überführt, wobei die Fraktionen von zwei Reaktionsgefäßen in einem vereinigt wurden. Es erfolgte der erste Waschschrift: die Reaktionsgefäße wurden mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 50 ml aufgefüllt und bei 1500 rpm (400xg) für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgeschüttet und das Zellpellet gebrochen. Auf diese Art und Weise wurde ein weiteres Mal gewaschen, wobei die Zentrifugationsgeschwindigkeit auf 1300 rpm (300xg) verringert wurde. Durch das sukzessive Herabsetzen der Zentrifugationsgeschwindigkeit sollen weniger erwünschte Zellen, wie Thrombozyten, abgereichert werden. Daraufhin wurden die Zellen eines *Buffy Coats* in einem 50 ml-Reaktionsgefäß vereinigt, mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 50 ml aufgefüllt, und eine Probe zur Zellzahlbestimmung (s. 2.2.4) entnommen. Es wurde ein weiteres Mal abzentrifugiert (1100 rpm, 10 min, 215xg), die Pellets in 4°C kaltem Einfriermedium aufgenommen und bei -80°C eingefroren.

#### 2.2.4 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mithilfe einer Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurden die Proben in Trypanblau verdünnt.

Trypanblau färbt tote Zellen tief blau, da es defekte Zellmembranen durchdringt und Zellproteine anfärbt. Lebende Zellen erscheinen leuchtend hell. Trypanblau ist bei längerer Einwirkzeit toxisch für die Zellen, weswegen die Zellsuspensionen jeweils kurz vor dem Zählvorgang in Trypanblau verdünnt wurden.

Gezählt wurden die lebenden Zellen in 2 – 4 Großquadraten und die mittlere Zellzahl pro Großquadrat wurde bestimmt. Jedes Großquadrat besitzt mit einer Seitenlänge von 1 mm und einer Tiefe von 0,1 mm ein Volumen von  $10^{-4}$  ml.

Damit lässt sich die Gesamtzellzahl wie folgt berechnen:



Gesamtzellzahl = mittlere Zellzahl pro Großquadrat /  $10^{-4}$  [ml]  
x Verdünnungsfaktor x Gesamtvolumen [ml]

### 2.2.5 Kryokonservierung von PBMCs

Der größte Anteil der aufgearbeiteten PBMCs wurde in unserer PBMC-Bank eingefroren. Hierzu wurden die Zellen in 4°C kaltem Einfriermedium aufgenommen. Es wurden zwei Einfriergrößen verwendet, entweder  $1 \cdot 10^8$  Zellen in 2 ml oder  $2 \cdot 10^7$  Zellen in 1 ml. Die Aliquots wurden zügig in vorgekühlte Einfrierboxen (Kühlschrank) überführt und bei -80°C eingefroren. Die Einfrierboxen besitzen ein mit Isopropanol befülltes Reservoir, was ein langsames und schonendes Herunterkühlen des Inhalts um 1°C / min bewirkt.

### 2.2.6 Auftauen von PBMCs

$2 \cdot 10^7$  –  $2 \cdot 10^8$  bei -80°C cryokonservierte Zellen (entspricht bis zu 2 Aliquots à  $2 \cdot 10^7$  oder  $1 \cdot 10^8$  Zellen) wurden in 10 ml DNase-haltigem Auftaumedium aufgetaut. Hierzu wurde ein Reaktionsgefäß mit 10 ml 4°C kaltem Auftaumedium vorbereitet, stetig Auftaumedium zu den gefrorenen Aliquots pipettiert, diese langsam durch Handwärme aufgetaut, und gelöste Zellen rasch in das vorbereitete Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1400 rpm, 8 min, Raumtemperatur, 350xg in der Megafuge) und erneut in 10 ml Auftaumedium resuspendiert. Es wurde eine Probe zur Zellzahlbestimmung (2.2.4) entnommen. Die Zellen wurden wiederum abzentrifugiert und in dem gewünschten Volumen 37°C warmen Kultiviermedium aufgenommen.

### 2.2.7 Kultivierung von PBMCs

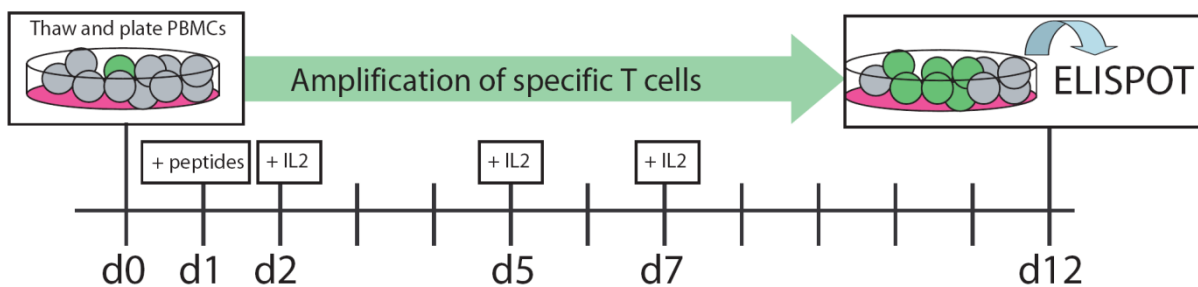
PBMCs wurden nach dem Auftauen in TZM im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) gehalten. Die geeignete Anzahl Zellen in verschiedenen Zellkulturplattengrößen und die benötigte Menge Medium sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: Geeignete Anzahl Zellen in verschiedenen Plattengrößen

Plattengröße (in Wells)	Geeignete Anzahl Zellen / Well (*10 <sup>6</sup> )	Geeignetes Volumen Kultiviermedium (ml)
6	20 – 30	3 - 5
12	10 – 12	2 - 4
24	5 – 6	1 – 2
48	2,5 – 3	0,5 – 1
96	0,3 – 1,3	0,15 – 0,2

## 2.2.8 Peptidstimulation von Gedächtnis-T-Zellen

Das Protokoll wurde adaptiert von (Weinzierl et al. 2008). Zellen aus der PBMC-Bank wurden aufgetaut und in 6-Well-Platten ausplattiert. Pro Well wurden 20-30\*10<sup>6</sup> Zellen in 2 ml Kultiviermedium ausgesät. Am nächsten Tag (Tag 1) wurden die Zellen resuspendiert und mit maximal 10 Epitopkandidaten + Negativkontrollpeptid in 500 µl TZM verdünnt, stimuliert. Pro Peptid wurde mit einer Endkonzentration von 2 µg/ml stimuliert. An Tag 2, 5 und 7 wurden zu den Wells 500 µl TZM + IL-2 pipettiert, so dass sich eine Endkonzentration pro Well von 20 U/ml ergab. Bis zu Tag 12 wurde zu den Zellen nach Bedarf Medium zugegeben (s. Übersicht Abbildung 8).

Abbildung 8: Amplifikation peptidspezifischer T-Zellen *in vitro*

## 2.2.9 ELISPOT

### 2.2.9.1 Vorbereitung der ELISPOT-Platten

Die ELISPOT-Platten wurden steril vorbereitet. Der  $\alpha$ -IFN- $\gamma$  Erstantikörper 1-D1K wurde in PBS auf 4 µg/ml verdünnt und 100 µl pro Well ausplattiert. Die Beschichtung erfolgte entweder über Nacht im Kühlschrank oder für 2 Stunden bei 37°C. Vor der Benutzung wurden die Platten 2x mit PBS gewaschen (200 µl/Well) und dann die Membranen mit 50 µl Kultiviermedium pro Well für eine Stunde im Brutschrank inkubiert.

### **2.2.9.2 Vorbereitung der Zellen nach Poolstimulation**

An Tag 12 wurden die Zellen resuspendiert und gezählt. Die ELISPOT-Platten waren mit 50 µl Kultiviermedium blockiert (s. 2.2.9.1) worden. Die zu testenden Peptide, das Kontrollpeptid und die PHA-Kontrollen wurden einzeln in Kultiviermedium verdünnt und auf die ELISPOT-Platten pipettiert (50 µl/Well). Pro Peptid und Spender wurden Duplikate angesetzt, pro Spender und Platte wurde eine Mediumkontrolle und eine PHA-Kontrolle eingesetzt. Das Endvolumen pro Well betrug 200 µl. Die Endkonzentration pro Peptid bzw. PHA-Kontrolle betrug 10 µg/ml. Pro Well wurden  $0,3 - 0,5 \cdot 10^6$  Zellen in 100 µl Kultiviermedium zugegeben. Die beladenen ELISPOT-Platten wurden für 24 – 26 Stunden im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag entwickelt.

### **2.2.9.3 Färbeprozedur und Entwickeln des ELISPOTS**

Generell wurde immer darauf geachtet, dass die Membranen der ELISPOT-Platten nicht eintrocknen.

Nach der 24-26 stündigen Inkubationszeit wurden die Zellen von der ELISPOT-Platte abgeklopft. Daraufhin wurden die Platten zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen, um verbleibende Zellen zu lysieren. Ein Waschvorgang bedeutet im nachfolgenden immer die Zugabe von 200 µl Puffer oder Wasser pro Well, kurze, ca. einminütige Inkubation, Entfernen der Waschsubstanz sowie kurzes Abklopfen auf Zellstoffpapier. Im Anschluss wurden die Platten viermal mit Tween-haltigem Waschwasser (PBS/Tween) gewaschen. Der Sekundärantikörper (7-B6-1 Biotin, 1 mg/ml) wurde in PBS/BSA auf eine Konzentration von 0,35 µg/ml verdünnt, und 100 µl pro Well zugegeben. Die Platten wurden für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Platten 4mal mit PBS/Tween gewaschen. ExtrAvidin Alkalische Phosphatase wurde 1:1000 in PBS/BSA verdünnt. Pro Well wurden 100 µl der Enzymlösung zugegeben und die Platten für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Vor Ablauf der Inkubationszeit wurde der Farbstoff vorbereitet. Für eine Platte wurde eine Tablette BCIP/NBT in 10 ml destilliertem Wasser gelöst und bis zur Verwendung dunkel aufbewahrt. Die Platten wurden 3mal mit PBS/Tween sowie 3mal mit PBS gewaschen, gut ausgeklopft und pro Well 100 µl der Färbelösung zugegeben. Nach 7 min Inkubation im Dunklen wurden die Platten gründlich mit vollentionisiertem Wasser abgespült, der Plastikschutz der Platten entfernt und die Platten zum Trocknen über Nacht auf Zellstoff dunkel aufbewahrt.

Am folgenden Tag wurden die Wells der Platten mit einem ELISPOT-Reader fotografiert (ELISPOT-Reader CTL mit Software Immuno Capture 6.1) und mittels eines Ausleseprogramms (ImmunoSpot 4.0 Academic) gezählt.

## 2.2.10 Durchflusszytometrische Methoden

### 2.2.10.1 Intrazelluläre Zytokinfärbung

#### 2.2.10.1.1 Ausplattieren der Zellen

PBMCs oder T-Zellklone wurden in Rundboden 96-Well-Platten (Corning 3799) ausplattiert. Bei jeder Färbung wurden „ungefärbte Zellen“ zum späteren Einstellen der PMT- Spannungen am FACS-Gerät mitgeführt. Diese wurden immer exakt wie die anderen Proben behandelt, mit der Ausnahme, dass sie nicht mit Farbstoffen bzw. mit Farbstoff-konjugierten Antikörpern, sondern immer nur mit dem jeweiligen Verdünnungspuffer inkubiert wurden. Es wurden wenn möglich  $0,5-1 \cdot 10^6$  PBMCs/Well verwendet, bei T-Zellklonen wurden mindestens  $1,8 \cdot 10^4$  Zellen/Well eingesetzt.

#### 2.2.10.1.2 Stimulation der Zellen

PBMCs oder T-Zellklone wurden in einem Endvolumen von 150-200  $\mu$ l Kultiviermedium mit Peptiden bzw. Zelllinien etc. in TZM über Nacht oder für mindestens 6 h inkubiert. Eine Ausschüttung von neuexprimierten Proteinen wurde bei allen Proben, durch 10  $\mu$ g/ml Brefeldin A inhibiert (Misumi et al. 1986). Als unspezifischer Stimulus und Positivkontrolle wurden PMA und Ionomycin in Endkonzentrationen von 150 ng/ml bzw. 1  $\mu$ M verwendet.

#### 2.2.10.1.3 Extrazelluläre Färbung

Alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4°C und 1800 rpm (580xg, Megafuge) für 2 Minuten. Ein Waschvorgang bedeutet im Folgenden immer Abzentrifugieren der Zellen, Abklopfen der Flüssigkeit und Auffüllen der Wells mit Puffer oder Antikörper- bzw. Farblösung. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen 2x mit 200  $\mu$ l PBSE pro Well gewaschen. LIFE/DEAD Aqua wurde 1:400 in PBSE verdünnt und je 50  $\mu$ l der Lösung zu den Wells gegeben. War LIFE/DEAD Aqua seit über 2 Wochen gelöst, wurde es 1:200 verdünnt. Die Zellen wurden gut resuspendiert und für 20 Minuten im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden Antikörper gegen extrazelluläre Oberflächenmerkmale wie CD4 oder CD8 in PFEA verdünnt. Die verwendeten Verdünnungen für die jeweiligen Antikörper sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

#### 2.2.10.1.4 Permeabilisierung

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Wells mit PBSE auf ein Volumen pro Well von 200  $\mu$ l aufgefüllt und noch 2x mit 200  $\mu$ l PFEA pro Well gewaschen. Danach wurden pro Well 100  $\mu$ l der Permeabilisierungslösung Cytofix/Cytoperm auf die Zellen gegeben, resuspendiert und weitere 20 Minuten inkubiert.

#### 2.2.10.1.5 Intrazelluläre Färbung

Die Antikörper gegen intrazellulär anzufärbende Antigene wurden in Permash verdünnt. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Wells mit 100 µl Permash aufgefüllt und zweimal mit 200 µl Permash pro Well gewaschen (1800 rpm, 2 min, 4°C, 580xg, Megafuge). Danach wurden 50 µl der Antikörperverdünnung pro Well auf die zu färbenden Zellen pipettiert und 20 Minuten inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Wells mit Permash auf 200 µl aufgefüllt und weitere 3mal mit 200 µl Permash pro Well gewaschen.

#### 2.2.10.1.6 Aufnehmen der Zellen in PFEA bzw. Fixierung

Sollten die Zellen sofort durchflusszytometrisch analysiert werden, wurden sie in 200 µl PFEA pro Well aufgenommen und gut resuspendiert. Bei späterer Analyse wurden die Zellen mit 200 µl FACS-Fix pro Well fixiert.

### **2.2.10.2 Reine Oberflächenfärbungen mit konjugierten Antikörpern, z.B. Gedächtnisphänotypisierung**

Bei einer reinen Oberflächenfärbung wurde nach 2.2.10.1.1, 2.2.10.1.3 und 2.2.10.1.6 verfahren.

#### **2.2.10.3 Färbung einer CD107a-Exposition**

CD107a wird bei der Ausschüttung zytotoxischer Granula nur temporär auf der Oberfläche exponiert und relativ schnell über Endozytose wieder internalisiert (Fukuda 1991; Betts et al. 2003). Um die CD107a Exposition trotzdem messen zu können, musste der anti-CD107a Antikörper direkt zur Stimulation (2.2.10.1.2) zugegeben werden (eingesetzte Konzentration s. Tabelle 5). Die Färbung erfolgte nach 2.2.10.1.1, 2.2.10.1.2, 2.2.10.1.3 und 2.2.10.1.6. Eine intrazelluläre Färbung konnte zusätzlich durchgeführt werden.

#### **2.2.10.4 Oberflächenfärbung mit unkonjugierten Antikörpern**

Alle Arbeiten fanden auf Eis bzw. bei 4°C statt. Es wurden  $2 \cdot 10^5$  LCLs/K562 oder min.  $2 \cdot 10^4$  T-Zellklone in eine 96-Well-Rundboden-Platte (Corning 3799) pipettiert (200 µl/Well). Die Zellen wurden 4x mit PFEA gewaschen (1800 rpm, 2 min, 4°C, 580xg, Megafuge).

Die Primärantikörper wurden auf 5 µg/ml (1:200) in FACS-Puffer verdünnt. 100 µl der verdünnten Primärantikörper wurden zu den Zellpellets pipettiert und gut resuspendiert.

Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut 3x in FACS-Puffer gewaschen (1800 rpm, 2 min, 4°C, 580xg, Megafuge). Der Sekundärantikörper anti-Maus IgG F(ab')<sub>2</sub>-FITC wurde 1:200 in FACS-Puffer verdünnt, zu allen Wells 100 µl pipettiert und gut resuspendiert.

Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut 3x in FACS-Puffer gewaschen (1800 rpm, 2 min, 4°C, 580xg, Megafuge). Im Anschluss wurden die Zellen in FACS Puffer aufgenommen oder fixiert (s. 2.2.10.1.6).

### 2.2.11 Generierung von Einzelzellklonen durch FACS-basierte Zellsortierung IFN- $\gamma$ + CD4+ Zellen

CD4+ IFN- $\gamma$ + Zellen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern extrazellulär gefärbt und anschließend mithilfe eines BD FACSAria Geräts (FACS Core Facility Tübingen) sortiert.

Die Markierung IFN- $\gamma$  produzierender Zellen erfolgte mit dem *IFN- $\gamma$  Secretion Assay* von Miltenyi nach Herstellerprotokoll. Die Arbeitsschritte werden im Folgenden zusammengefasst.

Dazu wurden PBMCs zunächst mit den gewünschten Peptiden wie in 2.2.8 beschrieben 12 Tage *in vitro* vorstimuliert. Danach wurden die Zellen aus der Platte genommen, gewaschen, gezählt, und auf eine Konzentration von  $10^7$  Zellen/ml in TZM eingestellt. Die Zellen wurden in ein 15 ml -Röhrchen transferiert und für 6 h bei leicht angeschraubtem Deckel mit 10  $\mu$ g/ml pro Peptid von Interesse im Brutschrank inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 10 ml 4°C kaltem MACS-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Pellet in 80  $\mu$ l 4°C kaltem TZM resuspendiert. 20  $\mu$ l *IFN- $\gamma$  Catch Reagent* wurden zugegeben, gut gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Beim *IFN- $\gamma$  Catch Reagent* handelt es sich um ein Konjugat aus einem anti-CD45-Antikörper und einem anti-IFN- $\gamma$ -Antikörper. Der anti-CD45-Antikörper bindet an alle Leukozyten im Röhrchen. Nachfolgend wurde die Zellkonzentration in 37°C warmem TZM auf  $10^6$  Zellen/ml eingestellt und das verschlossene Röhrchen für 45 min in den Brutschrank gelegt. Alle 5-10 min wurde das Röhrchen gedreht. In dieser Zeit soll die IFN- $\gamma$ -Sekretion stattfinden. Sezerniertes IFN- $\gamma$  bindet an dem anti-IFN- $\gamma$ -Antikörper des an der Oberfläche der Zellen gebundenen *IFN- $\gamma$  Catch Reagent*. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen erneut in kaltem MACS Puffer gewaschen (1300 rpm 10 min, 4°C, 300xg, Megafuge), der Überstand vollständig entfernt, und das Pellet in 80  $\mu$ l kaltem MACS Puffer resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 20  $\mu$ l *IFN- $\gamma$  Detection* Antikörper (PE-markiert), anti-CD4 Antikörper (APC-Cy 7- oder FITC-markiert, in den entsprechenden Verdünnungen) und anti-CD8 Antikörper (PerCP- oder FITC-markiert, in den entsprechenden Verdünnungen), und eine 10- bis 20-minütige Inkubation auf Eis. Bei dem *IFN- $\gamma$  Detection* Antikörper handelt es sich um einen zweiten, Farbstoff-gekoppelten anti-IFN- $\gamma$ -Antikörper. Er bindet an das am *IFN- $\gamma$  Catch Reagent* gebundene IFN- $\gamma$  an einer alternativen Bindungsstelle. Im Anschluss wurden die Zellen erneut mit 10 ml kaltem MACS-Puffer gewaschen (1300 rpm, 10 min, 4°C, 300xg, Megafuge), der Überstand wurde entfernt, und das Pellet in 300-600  $\mu$ l MACS-Puffer aufgenommen, durch ein steriles Zellsieb gegeben, und auf Eis zum Sortieren gebracht.

Gleichzeitig zum *IFN- $\gamma$  Secretion Assay* wurden 96-Well-Platten (Rundboden) mit Feeder-Zellen vorbereitet. Pro Well wurden insgesamt  $1,5 \cdot 10^5$  frische PBMCs von 3-4 verschiedenen Spendern (aus Frischblut oder *Buffy Coats*), und  $1,5 \cdot 10^4$  LG2-Zellen (EBV transformierte Zelllinie) in 150  $\mu$ l TZM mit 150 U/ml IL-2 und 1  $\mu$ g/ml PHA-L pro Well vorgelegt. Die Feeder-Zellen waren zuvor mit 60 (PBMCs) bzw 200 (LG2) Gray gamma-bestrahlt worden, um ein Überwachsen der Klone zu verhindern.

Nach der Einzelzellsortierung wurden die Klone alle 3-4 Tage mit frischem Medium und 150 U/ml IL-2 versorgt. Alle zwei Wochen wurden erneut Feeder-Zellen mit IL-2 und PHA-L wie oben beschrieben zugegeben. Auswachsene Klone wurden mittels Intrazellulärfärbung auf ihre Spezifität untersucht. Ein Aufteilen eines Klons in zwei Wells erfolgte erst, wenn das Medium nach 2-3 Tagen eine Gelbfärbung zeigte und bevorzugt beim Zugeben neuer Feeder-Zellen.

### 2.2.12 Transformation von B-Zellen mit B95-8-Überständen

Die Arbeiten erfolgten im S2-Bereich bis die LCLs erfolgreich etabliert waren. Dies beinhaltete, dass der Spitzenabfall unter der Sterilbank in ein mit Desinfektionsmittel gefülltes 50 ml-Röhrchen gegeben wurde, jeglicher Abfall unter der Sterilbank in einen Autoklaviersack gegeben wurde, der Abfall im S2-Bereich separat vorautoklaviert wurde, bevor er zum restlichen Autoklaviermüll gegeben wurde, die Sterilbank mit UV-Licht bestrahlt und der Kittel im S2-Labor abgegeben wurde.

$5 \cdot 10^6$  PBMCs wurden in 1 ml LCL-Medium mit 1  $\mu$ g/ml Cyclosporin A (auf Gesamtvolumen gerechnet) aufgenommen, mit 1 ml B95-8-Überstand in ein 15 ml-Röhrchen gegeben und gut verschlossen (Deckel und Parafilm) für 2 h im 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen in ein Well einer 12-Well-Platte überführt und kultiviert.

Erst nach starker Gelbfärbung des Mediums wurden die Zellen gefüttert bzw. in zwei Wells subkultiviert. Dabei wurde weiterhin 1  $\mu$ g/ml Cyclosporin A zugegeben. Nach etwa einer Woche war zumeist ein Auswachsen der LCLs (Clusterbildung) zu beobachten. Cyclosporin A wurde zugegeben, bis keine untransformierten PBMCs mehr zu beobachten waren. Nach etwa 2 Wochen konnten die Zellen in kleine Zellkulturflaschen transferiert und weiter expandiert werden.

## 2.2.13 Zellkultur LCLs

### 2.2.13.1 Kultivierung

LCLs wurden in Suspension in LCL-Medium kultiviert und 2-3 mal pro Woche 1:2 aufgeteilt und subkultiviert. Beim Füttern wurden die Cluster nicht resuspendiert. Die Zelldichte betrug normalerweise  $2\text{-}3 \cdot 10^5$  Zellen/ml.

### 2.2.13.2 Unsterile Ernte für MHC-Präzipitation

Die Zellen wurden in 500 ml-Zentrifugenbechern in einer Super Speed Zentrifuge (Sorvall, Rotor: GS-3) bei 1600 rpm (430xg), 4°C, 10 min abzentrifugiert. Die Pellets wurden in ca. 50 ml eiskaltem PBS resuspendiert, vereinigt, in ein 50 ml-Röhrchen überführt und bei 1800 rpm (580xg, Megafuge), 4°C, 15 min erneut abzentrifugiert.

Das erhaltene Pellet wurde bei -80°C eingefroren.

## 2.2.14 CD19+ MACS für die Aufreinigung von B-Zellen als Kontrollzellen

Am Tag vor der Aufreinigung wurden Zellen aufgetaut und über Nacht in TZM ruhen gelassen. Es wurde mit einem Anteil von etwa 5-10% B-Zellen unter den PBMCs gerechnet.

Am Tag der MACS-Aufreinigung wurde kalter, steriler, blasenfreier MACS-Puffer vorbereitet. Die Zellen wurden zweimal in 10 ml kaltem MACS-Puffer gewaschen (1300 rpm, 10 min, 4°C, 300xg, Megafuge). Sämtlicher Überstand wurde abgekippt und mit Zellstoff abgesaugt. Pro  $10^7$  Zellen wurden 20 µl anti-CD19-PE-Antikörper (wenn gewünscht auch andere) auf das Pellet pipettiert und die Zellen gründlich gemischt. Die Zellen wurden für 10 min auf Eis im Dunkeln oder im Kühlschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit 10 ml kaltem Puffer (1300 rpm, 10 min, 4°C, 300xg, Megafuge) gewaschen. Sämtlicher Überstand wurde abgekippt und mit Zellstoff abgesaugt. Pro  $10^7$  Zellen wurde das Pellet in 80 µl MACS-Puffer gelöst, 20 µl  $\alpha$ -PE-Microbeads zugegeben und gut gemischt. Die Zellen wurden für 15 min im Kühlschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen in 10 ml kaltem Puffer gewaschen (1300 rpm, 10 min, 4°C, 300xg, Megafuge), und in  $10^8$  Zellen/ml oder mindestens 500 µl aufgenommen. An diesem Punkt konnten Zellen zur durchflusszytometrischen Kontrolle entnommen werden.

Bis  $2 \cdot 10^8$  Zellen (= höchstens  $10^7$  markierte Zellen) wurden MS-Säulchen verwendet. Für höhere Zellzahlen bis  $2 \cdot 10^9$  Zellen (= höchstens  $10^8$  markierte Zellen) wurden LS-Säulchen verwendet.

Die magnetische Aufreinigung ist bei MS- und LS-Säulchen bis auf das verwendete Puffervolumen gleich. Folgende Angaben beziehen sich auf MS-Säulchen, Angaben für LS-Säulchen in Klammern.



Das Säulchen wurde in einen MidiMACS™ Separator eingehängt, und mit 500 µl (3 ml) kaltem Puffer gewaschen. Das Säulchen wurde über einem 15 ml Röhrchen positioniert und die Zellsuspension wurde in das Säulchen gegeben. Der Durchlauf (Negativfraktion) wurde aufgefangen. Das Säulchen wurde 3x mit 500 µl (3 ml) kaltem Puffer gewaschen. Der Durchlauf wurde im Röhrchen aufgefangen. Das Säulchen wurde aus dem Magnetfeld genommen und sofort über einem neuen 15 ml Röhrchen positioniert. 1 ml (5 ml) kalter Puffer wurde auf das Säulchen gegeben. Mit dem Stempel wurde die Positivfraktion aus dem Säulchen gedrückt. Der Vorgang wurde noch 3x mit 1 ml (3 ml) Puffer wiederholt.

Die Zellen wurden gezählt, abzentrifugiert, in Medium aufgenommen und höchstens über Nacht in Kultur genommen, bevor sie als Negativkontrollen in Stimulationen mit LCLs verwendet wurden.

### 2.2.15 Generierung von PHA-Blasten

PBMCs wurden 72 h in TZM mit 3 µg/ml PHA inkubiert, gewaschen, in TZM mit 25 U/ml IL-2 kultiviert und innerhalb von sieben Tagen als Kontrollen verwendet.

### 2.2.16 Kultivierung der murinen Zelllinie t-CD40L-NIH-3T3

Das Protokoll wurde adaptiert von H. Hörzer (Hörzer 2010).

Die Zelllinie NIH-3T3 ist eine adhärent wachsende, Fibroblastenzelllinie der Maus. Sie wurde mit dem CD40-Liganden (CD40L) stabil transfiziert. Um die Transfektion aufrecht zu erhalten mussten die Zellen in G418-haltigem Medium in Kultur gehalten werden.

Die t-CD40L-NIH-3T3 Zellen wurden zweimal pro Woche aufgeteilt und subkultiviert, wobei ein Teil der Zellen für die Kokultivierung mit B-Zellen ausgesät wurde. Dazu wurde das Medium von den Zellen abgenommen, der Zellrasen mit PBS gewaschen und die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA pro Zellkulturflasche für 2 min im Brutschrank inkubiert und dadurch abgelöst.

Durch Zugabe von 5 ml NIH-Medium ohne G418 wurde der Trypsin-Verdau gestoppt. Die Zellen wurden in ein 50 ml-Röhrchen transferiert und bei 1300 rpm für 4 min (300xg, Megafuge) abzentrifugiert. In die Zellkulturflasche wurde 10 ml NIH-Medium mit G418 vorgelegt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgekippt, die Zellen in 12 ml NIH-Medium ohne G418 resuspendiert und 1 ml zurück in die Flasche transferiert. Die Flasche wurde weiter kultiviert. Die restlichen Zellen wurden in der Gammazelle bei 96 Gray (Gy) bestrahlt. Die Zellen wurden gezählt, abzentrifugiert und die Zellzahl auf  $2 \cdot 10^5$  Zellen/ml in NIH-Medium ohne G418 eingestellt. Je 2 ml ( $4 \cdot 10^5$  Zellen) wurden in ein Well einer 6-Well-Platte pipettiert und über

Nacht inkubiert. Der über Nacht anwachsende NIH-Rasen kann bis zu 72 h für eine B-Zell-Kokultur verwendet werden.

### 2.2.17 Kultivierung CD40-aktivierter B-Zellen mithilfe von t-CD40L-NIH-3T3

Das Protokoll folgt den Ausführungen von H. Hörzer (Hörzer 2010).

Die PBMCs wurden in B-Zell-Medium (BZM) auf  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml eingestellt und 2 ng/ml IL-4 und 550 nM Cyclosporin A zugesetzt.

Cyclosporin A soll die T-Zellen in der PBMC-Kultur eliminieren. Cyclosporin A bindet in der Zelle an Calcineurin und verhindert somit die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors NF-AT (nuclear factor of activated T cells). Dadurch können zahlreiche Zytokine wie z.B. IL-2 nicht mehr transkribiert werden, wodurch es zu einer Proliferationshemmung kommt. Die Menge an exprimiertem Calcineurin ist in T-Zellen besonders niedrig, weswegen T-Zellen von niedrigeren Konzentrationen (10 nM) an Cyclosporin in ihrer Proliferation gehemmt werden, während andere Zellen wenig beeinträchtigt werden (Crabtree 1999; Hörzer 2010).

Anschließend wurde das Medium von den ausplattierten t-CD40L-NIH-3T3-Zellen abgenommen und pro Well 4 ml der PBMC-Suspension zugegeben. Die B-Zellen wurden zweimal die Woche auf neuausplattierten t-CD40L-NIH 3T3-Zellen rekultiviert.

Durch die Eliminierung der T-Zellen nahm die Menge an Zellen/Well zunächst ab. Dadurch verringerte sich die Zellzahl für die Rekultivierung schrittweise. Das befolgte Schema ist in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Zeit-Tafel für Expansion von B-Zellen

Tag	Aktion	Eingesetzte Zellzahl für die Rekultivierung (Zellen/ml)
-1	Vorbereitung der t-CD40L-NIH 3T3-Platten	
0	Start der Kokultur	$2 \cdot 10^6$
4	Vorbereitung der t-CD40L-NIH 3T3-Platten	
5	Rekultivierung der B-Zellen	$2 \cdot 10^6$
7	Vorbereitung der t-CD40L-NIH 3T3-Platten	
8	Rekultivierung der B-Zellen	$1,5 \cdot 10^6$
11	Vorbereitung der t-CD40L-NIH 3T3-Platten	
12	Rekultivierung der B-Zellen	$1 \cdot 10^6$
14	Vorbereitung der t-CD40L-NIH 3T3-Platten	
15	Rekultivierung der B-Zellen	$0,75 \cdot 10^6$
18	Vorbereitung der t-CD40L-NIH 3T3-Platten	
19	Rekultivierung der B-Zellen	$1 \cdot 10^6$
21	Vorbereitung der t-CD40L-NIH 3T3-Platten	
22	Rekultivierung der B-Zellen	$0,75 \cdot 10^6$
Etc.		

## 2.2.18 Isolierung von MHC-Liganden

Das Protokoll wurde adaptiert von M. Miller (Miller 2009).

### 2.2.18.1 Vorbereitung der Affinitäts-Säulen

40 mg trockene CNBr-aktivierte Sepharose 4B wurden je mg verwendeten Antikörpers in einem 50 ml-Reaktionsgefäß in 50 ml 1 mM HCl zum Quellen und zur Aktivierung der reaktiven Gruppe für 30 min bei RT rotiert (Bachhofer). Es wurden 3 mg Antikörper (L243 bzw. W6/32) pro ml Zellpellet verwendet. Der Überstand aus 1 mM HCl wurde nach Abzentrifugieren des Säulenmaterials (300 rpm, 4 min, keine Brems-Funktion; 8xg, 5415R, Eppendorf) abgesaugt. Danach wurde der saure pH des sedimentierten Gels mit 30 ml Kopplungspuffer neutralisiert und die jeweiligen Antikörper hinzu pipettiert. Die Kopplungseffizienz wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde die Absorption des Überstands des bei 13000 rpm (15115xg, 5415R, Eppendorf) abzentrifugierten Antikörper-Sepahrosegemischs vor ( $t_0$ ) und nach 2-stündiger Rotation bei RT ( $t_{\text{end}}$ ) bei 280 nm bestimmt. Die Effizienz berechnete sich mit  $100 - (t_{\text{end}}/t_0)$ . Danach wurde das Gel wie oben beschrieben zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Verbleibende Bindungsstellen an der Sepharose wurden durch die Zugabe von 40 ml 0,2 M Glycinlösung und eine 60-minütige Rotation blockiert. Der Überstand wurde nach einer erneuten Zentrifugation erneut verworfen und das Gelbett abschließend noch 2x mit PBS gewaschen. Das resultierende gewaschene sedimentierte Gel wurde abschließend mit Lysepuffer gewaschen und in mit 1 N NaOH vorbehandelte und mit  $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$  gewaschene Säulen gegeben. Abschließend wurde 30 Minuten lang PBS über die Säule gepumpt.

### 2.2.18.2 Herstellung des Zelllysates

Die gefrorenen Zellpellets wurden in einen Erlenmeyerkolben überführt, und nach Zugabe von einem Volumenteil 2x Lysepuffer unter langsamem Rühren bei 4°C aufgetaut. Nach dem Auftauen wurde der Zellsuspension ein weiteres Volumenteil 1x Lysepuffer zugegeben und für 60 min bei 4°C gerührt. Danach wurde das Lysat mit einer Ultraschall-Mikrospitze homogenisiert (drei mal 20 s bei 50% output, zwischen den Homogenisierungen 20 s Pause, auf Eis). Das erhaltene Homogenisat wurde 20 min bei 4°C mit 4000 rpm zentrifugiert (2860xg, Megafuge). Der Überstand wurde in Ultrazentrifugenbecher überführt, und für 1 h bei 4°C und 40000 rpm (100000xg, Ultrazentrifuge Ti45) abzentrifugiert. Der Überstand des Ultrazentrifugats wurde durch einen 0,2 µm-Sterilfilter filtriert, um letzte Partikelreste aus dem Zentrifugat zu entfernen.

### 2.2.18.3 Präzipitation der MHC-Peptid-Komplexe, Elution von der Säule und Extraktion der Liganden

Die filtrierten Lysate wurden zyklisch für etwa 12 h über Nacht bei 4°C über die Affinitätssäulen geleitet (1-2 ml/min). Danach wurde das Lysat linear über die Affinitätssäulen geleitet, aufgefangen und eingefroren (-20°C). Die Affinitätssäulen wurden mindestens für 30 min mit PBS und danach für mindestens 30 min mit  $d_4H_2O$  equilibriert. Man ließ die Säule trockenlaufen. Die Sepharose wurde mit 0,2% TFA + 10  $\mu$ l 10% TFA/10 mg Antikörper bedeckt und 15-30 min auf dem Schüttler inkubiert. Das Eluat wurde in eine vorher mit TFA gewaschene Amicon-Filtrationseinheit transferiert. Danach wurde der Schritt 7-9x mit 0,2% TFA wiederholt. Durch die Ansäuerung eluieren die HLA-Liganden. Das Eluat wurde durch die Amicon-Filtrationseinheit zentrifugiert (4°C, 4000 rpm, 2860xg, Megafuge), um eventuelle höhermolekulare Verunreinigungen abzutrennen. Das erhaltene Filtrat wurde zur Volumenreduktion bei -80°C tiefgefroren und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

### 2.2.18.4 Automatische Auswertung von LC-MS/MS Spektren

Die Rohdaten der LC-MS/MS Spektren wurden gegen eine Datenbank mit humanen und eine mit Epstein-Barr Virus-spezifischen Proteinen mithilfe des Proteome Discoverers (Thermo Scientific) prozessiert. Die humanen Sequenzen stammten aus NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>; "Homo sapiens"[Organism] oder SwissProt oder *IPI human* (International Protein Index) <http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhelp.html>), die viralen aus SwissProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>; eingegebene Parameter: organism-"epstein-barr virus" AND reviewed:yes; Stand: 10.09.2010).

## 3 ERGEBNISSE & DISKUSSION

### 3.1 Epitopscreening

#### 3.1.1 Auswahl von Antigenen und Vorhersage von Epitopkandidaten

Mit dem Ziel promiskuitive MHC-Klasse-II restringierte Epitope aus relevanten EBV-spezifischen Antigenen zu identifizieren, wurden insgesamt 107 Epitopkandidaten mithilfe von SYFPEITHI (Rammensee et al. 1999) (siehe auch 1.5) vorhergesagt. Eine schematische Übersicht über die Vorhersage ist in Abbildung 9 dargestellt.

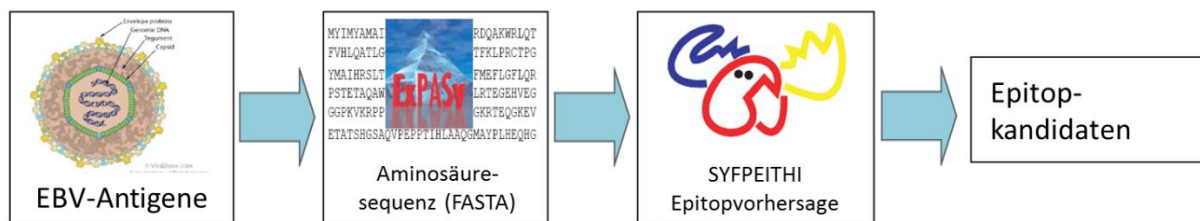


Abbildung 9: Schematische Übersicht über die Vorhersage von Epitopkandidaten. Aus der Literatur wurden Antigene ausgewählt. Die Aminosäuresequenzen der Proteine wurden im FASTA Format über ExpASY (<http://expasy.org/>) aus der Proteindatenbank UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>) entnommen und mittels des Vorhersageprogramms SYFPEITHI Epitopkandidaten vorhergesagt.

Insgesamt wurden neun Antigene zur Vorhersage herangezogen: LMP1, LMP2, EBNA3A, BMLF1, BMRF1, BZLF1, BRLF1, BNRF1 und BLLF1. Die Vorhersage und ein großer Teil des Screenings von LMP1, LMP2, EBNA3A, BMLF1, BMRF1, BZLF1 und BRLF1 wurde bereits während meiner Diplomarbeit (Kyzirakos 2009) durchgeführt.

Die latenten Antigene LMP1, LMP2 und EBNA3A wurden ausgewählt, da sie typischerweise in PTLDs exprimiert werden (Gottschalk et al. 2005b) (siehe auch 1.2.4). Das immundominante latente Antigen EBNA1 wurde nicht berücksichtigt, da EBNA1-spezifische Epitope schon von mehreren anderen Autoren gründlich untersucht worden waren (Khanna et al. 1995; Long et al. 2005; Hislop et al. 2007; Demachi-Okamura et al. 2008).

Die lytischen Antigene BMLF1, BMRF1, BZLF1 und BRLF1 wurden ausgewählt, da sie als immundominante Antigene bei CD8+ T-Zellantworten gegen EBV beschrieben worden waren (Hislop et al. 2007). Lytische Antigene werden zwar von den meisten EBV-assozierten Tumoren nicht konstitutiv exprimiert, weswegen sie im Zusammenhang mit Immuntherapie oftmals

weniger Beachtung fanden, spielen aber trotzdem eine wichtige Rolle in der Kontrolle über den Virus. Dies wird sowohl an der starken CD4+ als auch humoralen Immunantwort Gesunder gegen lytische Antigene deutlich (Long et al. 2011). Nachdem schon während der Diplomarbeit einige häufig erkannte Epitope (FREPs) aus BMLF1, BMRF1, BZLF1 und BRLF1 identifiziert werden konnten, wurden nun zusätzlich Epitopkandidaten für BNRF1 und BLLF1 vorhergesagt. Beide wurden als immundominante Antigene in T-Zellpräparaten, die mit LCLs stimuliert worden waren, beschrieben (Adhikary et al. 2007). Alle verwendeten Antigene sind mit zugehörigen Swiss-Prot Nummern in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Verwendete Antigene

Gen-Name	ORF-Name	Protein-Name	Synonyme	UniProtKB /Swiss-Prot Nummer	Länge	Entwicklungsstufe
Antigene der Latenz						
EBNA3	BERF1	Epstein-Barr nuclear antigen 3	EBV nuclear antigen 3 EBNA-3 EBNA-3A	P12977	944 (812)	latent
LMP1	BNLF1	Latent membrane protein 1	LMP-1 Protein p63	P03230	386	latent
LMP2	LMP2 <i>Isoform LMP2A</i>	Latent membrane protein 2	Terminal protein	P13285	497	latent
Antigene der lytischen Phase						
BZLF1	BZLF1	Trans-activator protein BZLF1	EB1 Zebra	P03206	245	immediate early
BRLF1	BRLF1	Transcription activator BRLF1	None	P03209	605	immediate early
BMLF1	BMLF1 <i>und</i> BSLF1	<i>mRNA export factor EB2</i> (Transcriptional regulator IE63 homolog)	Protein SM, Mta (Diffuse early antigen)	Q04360	479 (438)	early
BMRF1	BMRF1	Early antigen protein	EA-D	P03191	404	early
BNRF1	BNRF1	Major tegument protein (MTP)	Protein p140	P03179	1318	late
BLLF1	BLLF1	Envelope glycoprotein gp350	Membrane antigen	P03200 (Q777F0)	907	late

Angaben in Klammern: Zum Zeitpunkt der Vorhersage gültige UniProtKB /Swiss-Prot Nummer oder Länge des Proteins.

15 Aminosäuren lange Epitopkandidaten wurden für die MHC-Klasse-II Allele DRB1\*01, DRB1\*03, DRB1\*04, DRB1\*07, DRB1\*11 und DRB1\*15 vorhergesagt. Es handelt sich hierbei um sechs der in der kaukasischen Bevölkerung am häufigsten vorkommenden HLA-DRB1-Allele, die zusammengenommen über 90% der deutschen Bevölkerung abdecken (Schipper et al. 1996; Gonzalez-Galarza et al. 2011).

Von jedem Antigen wurden ~2% der Anzahl der möglichen Peptide ausgewählt, synthetisiert und getestet. Das Auswahlverfahren wird in Detail in Abbildung 10 beschrieben. Die Vorhersagen für die ausgewählten Peptide der Antigene BLLF1 und BNRF1 finden sich im Anhang (Tabelle 27 und Tabelle 28).

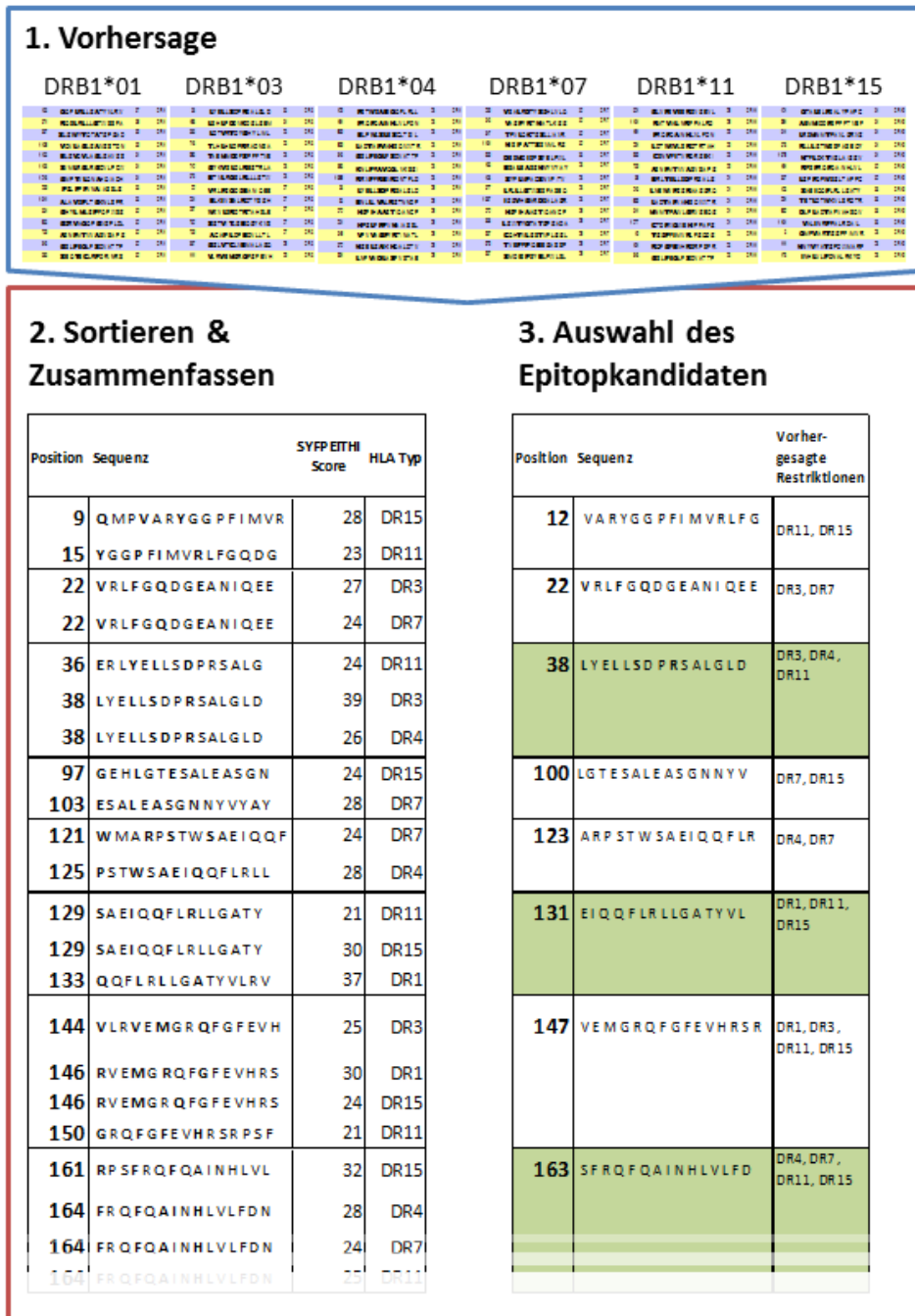


Abbildung 10: Übersicht über das Auswahlverfahren von Epitopkandidaten am Beispiel BNR1. 1. Vorhersage: Aus der gegebenen Aminosäuresequenz wurden für jedes angegebene Allel Epitope mit SYFPEITHI vorhergesagt. Für jedes Allel wurden die 2% mit dem höchsten Score vorläufig ausgewählt. 2. Sortieren & Zusammenfassen: Alle vorläufig ausgewählten Peptide wurden nach ihrer Position im Protein geordnet. Wegen der offenen Bindungstasche der MHC-Klasse-II Moleküle werden Peptide mit einer Position von +/- 3 Aminosäuren als derselbe Epitopkandidat gewertet. Peptide mit einer abweichenden Position von höchstens sechs wurden zu einer Kandidatengruppe zusammengefasst. 3. Auswahl des Epitopkandidaten: Für jede Kandidatengruppe wurde ein Peptid bestimmt, welches alle beteiligten Peptide am besten abdeckt. Zum Screening ausgewählt wurden Peptide, die für mehrere Allele vorhergesagt wurden und/oder die bei einem Allel den höchsten Score erreicht haben. Die ausgewählten Peptide sind grün hervorgehoben.



### 3.1.2 Eine spezifische Amplifikation erhöht die Detektierbarkeit von T-Zellreaktionen

Im Gegensatz zur stark ausgeprägten CD4-spezifischen Immunantwort gegen CMV (Sester et al. 2002) ist die Häufigkeit von CD4+ T-Zellen, die spezifisch für ein einzelnes EBV-restringiertes Epitop sind, mit weniger als einer unter 10000 im Blut latenter Infizierter relativ gering (Amyes et al. 2003; Precopio et al. 2003) (vergleiche auch 1.3).

Um sie nachweisen zu können wurden sie vor dem Epitop-Screening durch eine peptidspezifische Amplifikation über 12 Tage *in vitro* vermehrt. Wie in Abbildung 11A zu sehen ist, konnte nach Peptid-spezifischer Amplifikation eine IFN- $\gamma$  Produktion nach Stimulation mit Peptiden bei PBMCs von acht Spendern nachgewiesen werden. In keinem der Spender wurde diese Antwort *ex vivo* detektiert. In Abbildung 11B wird die Vermehrung peptidspezifischer CD4+ T Zellen über den Zeitraum der *in vitro*-Kultur dargestellt. Gemessen wurde die Anzahl von IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen unter den CD4+ T-Zellen bei vier verschiedenen Stimulationen mit unterschiedlichen Spendern und Epitopen. Bei allen vier ist frühestens am Tag 10 nach erster Peptidstimulation eine Reaktion messbar. Bei zwei Spendern (d1359 u. d1300) geht die Frequenz IFN- $\gamma$  produzierender Zellen zwar wieder zurück, bleibt jedoch in beiden Fällen über der Nachweisgrenze. Der Rückgang IFN- $\gamma$  produzierender Zellen kann jedoch nicht mit einem Rückgang spezifischer Zellen gleichgesetzt werden, da keine weiteren Marker und Zytokine gemessen wurden.

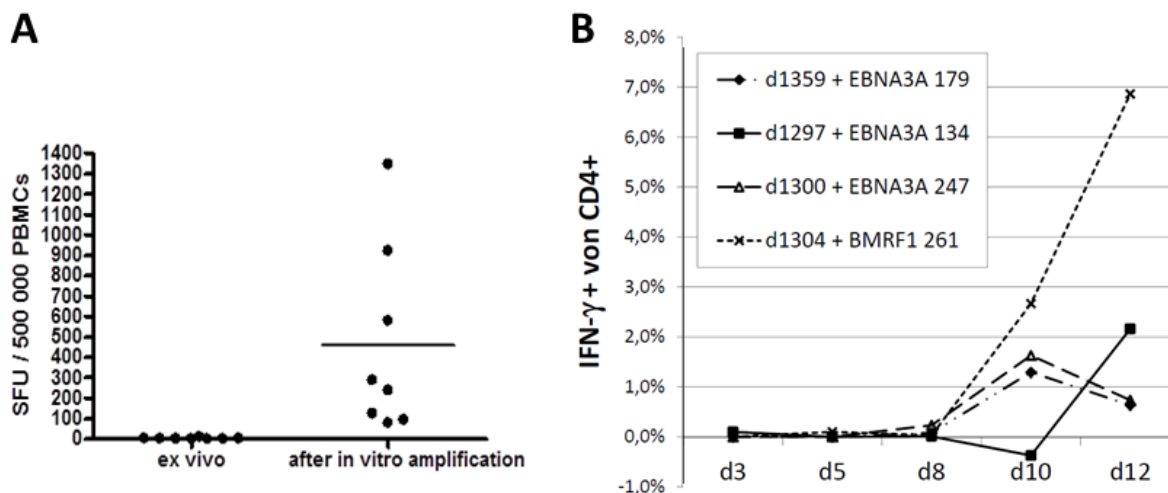


Abbildung 11: Peptidspezifische Amplifikation durch 12 Tage *in vitro*-Kultur. A: Anzahl BLF1 167 spezifischer Zellen von acht Blutspendern gemessen durch IFN- $\gamma$  ELISPOT vor („*ex vivo*“) und nach *in vitro*-Amplifikation („*after in vitro amplification*“). Die mittlere Anzahl der *Spot forming units* (SFU) wird durch den Balken indiziert. Der Hintergrund wurde subtrahiert. B: Vermehrung peptidspezifischer CD4+ T-Zellen über den Verlauf der 12-Tage Amplifikation am Beispiel von vier Blutspendern (d1359, d12297, d1300 und d1304) und vier verschiedenen Peptiden (s. Legende) gemessen durch ICS. Der jeweilige Hintergrund wurde subtrahiert.

### 3.1.3 Testen der vorhergesagten Epitopkandidaten auf Reaktionen bei gesunden Blutspendern

Da über 90% der erwachsenen Bevölkerung weltweit latent EBV infiziert sind (Henle and Henle 1979), wurden PBMCs gesunder Blutspender ohne vorherige Bestimmung des EBV-Serostatus auf spezifische Gedächtnis-T-Zellen untersucht. Des Weiteren waren die Spender nicht MHC-Klasse-II typisiert, da ein Hauptaugenmerk auf der Identifikation promiskuitiv bindender Epitope lag. Diese sollten von einem Großteil der Bevölkerung unabhängig von ihrer HLA-Typisierung erkannt werden. Die PBMCs wurden zunächst mit den zu testenden Epitopkandidaten und einem Kontrollpeptid *in vitro* kultiviert (vgl. 3.1.2), um spezifische T-Zellen zu amplifizieren. Nach der Stimulation wurden alle Epitopkandidaten mittels IFN- $\gamma$  ELISPOT auf spezifische Zellen bei acht verschiedenen Blutspendern getestet. Dabei diente ein Peptid aus HIV oder dem humanen Filamin A als Negativkontrolle und PHA, ein Mitogen und Agglutinin, welches T-Zellen unter anderem unspezifisch zur IFN- $\gamma$  Produktion anregt, als Positivkontrolle. Wurden mindestens 10 Spots als Reaktion auf ein Peptid detektiert und lag die Anzahl der Spots mindestens dreifach über der Negativkontrolle, wurde das als spezifische Antwort gewertet. Peptide mit mindestens einer Antwort bei den ersten acht getesteten Spendern wurden an mindestens acht weiteren getestet. War die Positivkontrolle negativ, wurde ein Spender aus der Wertung ausgeschlossen. Jedes Epitop wurde auf diese Weise bei mindestens 15 gesunden Spendern getestet. Ein Beispiel für ein ELISPOT-Ergebnis aus dem Screening der BLLF1- Epitopkandidaten wird in Abbildung 12 gezeigt.

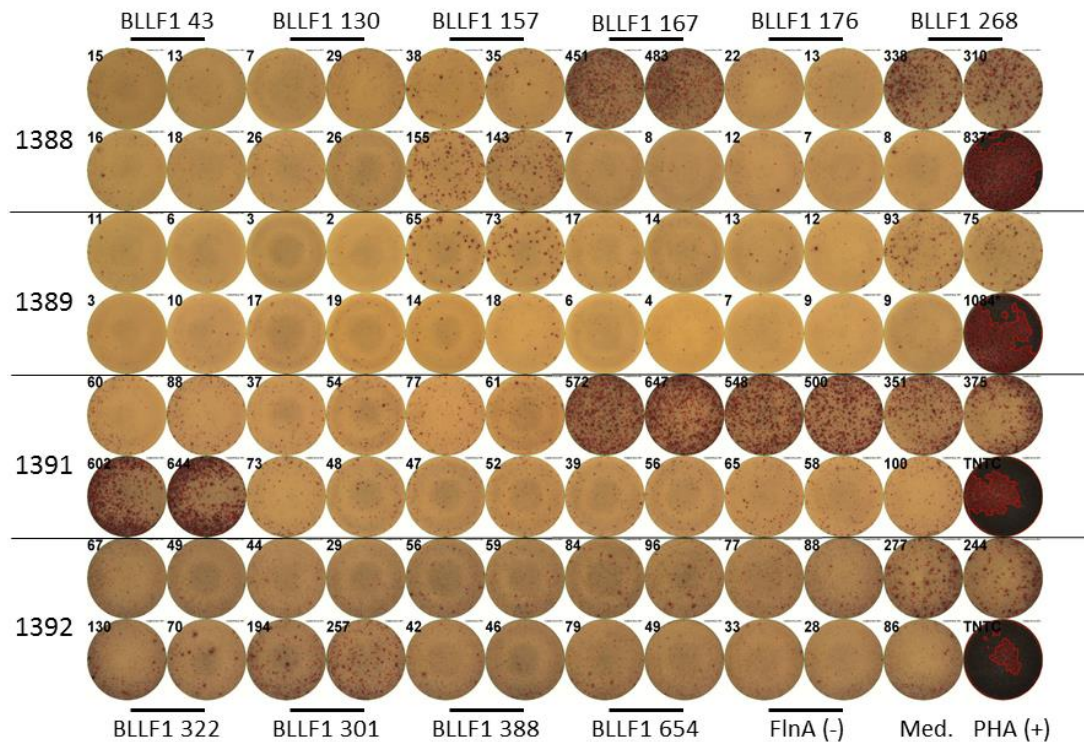


Abbildung 12: Beispiel eines ELISPOT-Ergebnisses: Vier Spender (1388-1392, jeweils zwei Reihen) wurden auf IFN- $\gamma$ -Antworten gegen 10 Epitopkandidaten (BLLF1 43 – BLLF1 654, jeweils Duplikate) getestet. Die Beschriftungen oben und unten beziehen sich jeweils auf die obere und untere Reihe der jeweiligen Spender. FlnA: Negativkontrollpeptid, Med.: Mediumkontrolle, PHA: Positivkontrolle

In den folgenden Tabellen werden die Screening-Ergebnisse aller getesteten Antigene zusammengefasst.

Tabelle 10: Screening-Ergebnis der Epitopkandidaten aus EBNA3A, getestet an PBMCs gesunder Blutspender durch IFN- $\gamma$  ELISPOT

Antigen	Sequenz	Position	Reag. (n)	Getest. (n)	EF (%)	Referenz
EBNA3A	PIFIRRLHRLLLMRA	381-395	19	40	47,5	
EBNA3A	YIMYAMAIRQAIRDR	134-148	8	24	33,3	
EBNA3A	DLSYIKSFVSDALGT	287-301	8	24	33,3	
EBNA3A	TPTFVHLQATLGCTG	190-204	7	25	28,0	
EBNA3A	RVVVS AVVHMCQDDE	919-933	4	16	25,0	
EBNA3A	YSIFFDYMAIHRSLT	247-261	4	16	25,0	
EBNA3A	RQWLYVQSSVGNIVQ	227-241	3	16	18,8	
EBNA3A	SWMYSYTDHQTTPTF	179-193	4	24	16,7	
EBNA3A	EEVLTPDQRVSFMEF	265-279	2	16	12,5	
EBNA3A	AYPLHEQHGMAPCPV	457-471	2	16	12,5	
EBNA3A	LPGVFS DGRVACAPV	488-502	2	16	12,5	
EBNA3A	DQRVSFMEFLGFLQR	271-285	1	16	6,3	
EBNA3A	PQYFDIPLTEPINQG	699-713	1	16	6,3	
EBNA3A	FSQVADVVRAPGVPA	647-661	1	16	6,3	
EBNA3A	FDYMAIHRSLTKIWE	251-265	1	16	6,3	
EBNA3A	PEQWMFQGAPPSQGT	784-798	0	8	0,0	

Reag.: Reagierende Spender; Getest.: Getestete Spender; EF: Erkennungsfrequenz

Tabelle 11: Screening-Ergebnis der Epitopkandidaten aus LMP1, getestet an PBMCs gesunder Blutspender durch IFN- $\gamma$  ELISPOT

Antigen	Sequenz	Position	Reag. (n)	Getest. (n)	EF (%)	Referenz
LMP1	WLYIVMSDWTGGALL	39-63	1	19	5,3	
LMP1	LALLLLLLLALLFWLY	27-41	0	11	0,0	
LMP1	LCILLMLITLLLIALL	83-97	0	11	0,0	
LMP1	WQLLAFFLAFFLDLI	138-152	0	13	0,0	
LMP1	ALLVLYSFALMLIII	51-65	0	12	0,0	
LMP1	LIIFIFRRDLLCPLG	67-81	0	11	0,0	(Depil et al. 2007)

Reag.: Reagierende Spender; Getest.: Getestete Spender; EF: Erkennungsfrequenz

Tabelle 12: Screening-Ergebnis der Epitopkandidaten aus LMP2, getestet an PBMCs gesunder Blutspender durch IFN- $\gamma$  ELISPOT

Antigen	Sequenz	Position	Reag. (n)	Getest. (n)	EF (%)	Referenz
LMP2	APYLFWLAIAAASCF	130-144	9	23	39,1	
LMP2	QTNFKSLSTEFIPN	377-391	3	16	18,8	
LMP2	GAVWLTVMSTLLSA	436-450	2	23	8,7	
LMP2	VLVLIVDAVLQLSPL	254-268	1	16	6,3	
LMP2	LIGFALFGVIRCCRY	461-475	1	16	6,3	
LMP2	ASCFTASVSTVVTAT	141-155	0	8	0,0	
LMP2	TVLTAVVTFFAICLT	183-197	0	8	0,0	
LMP2	LYLGLQHDGNDGLPP	84-98	0	8	0,0	

Reag.: Reagierende Spender; Getest.: Getestete Spender; EF: Erkennungsfrequenz

Tabelle 13: Screening-Ergebnis der Epitopkandidaten aus BZLF1, getestet an PBMCs gesunder Blutspender durch IFN- $\gamma$  ELISPOT

Antigen	Sequenz	Position	Reag. (n)	Getest. (n)	EF (%)	Referenz
BZLF1	QLLQHYREVAAAKSS	195-209	7	20	35,0	
BZLF1	PCVLWPVLPEPLPQG	45-59	5	22	22,7	
BZLF1	LQHYREVAAAKSSEN	197-211	3	16	18,8	
BZLF1	CVLWPVLPEPLPQGQ	46-60	1	16	6,3	
BZLF1	RVYQDLGGPSQAPLP	31-45	0	11	0,0	
BZLF1	PFVQAFDQATRVYQD	21-35	0	11	0,0	
BZLF1	AYHVSTAPTGSWFSA	63-77	0	15	0,0	(Long et al. 2011)

Reag.: Reagierende Spender; Getest.: Getestete Spender; EF: Erkennungsfrequenz

Tabelle 14: Screening-Ergebnis der Epitopkandidaten aus BRLF1, getestet an PBMCs gesunder Blutspender durch IFN- $\gamma$  ELISPOT

Antigen	Sequenz	Position	Reag. (n)	Getest. (n)	EF (%)	Referenz
<b>BRLF1</b>	TPEIKKQLGSLVSDY	15-29	8	20	40,0	
<b>BRLF1</b>	DRFFIQAPSNRVMIP	119-133	8	24	33,3	
<b>BRLF1</b>	NICNFWAILRNNRVR	74-88	5	16	31,3	
<b>BRLF1</b>	DVRALIKTLPRASYS	223-237	7	24	29,2	
<b>BRLF1</b>	TAMYKLLKHSRVRAY	138-152	6	24	25,0	
<b>BRLF1</b>	RLTPEIKKQLGSLVS	13-27	4	20	20,0	
<b>BRLF1</b>	LGSLVSDYCNVLNKE	22-36	1	16	6,3	
<b>BRLF1</b>	EQPWIAAVHQESDER	380-395	1	16	6,3	
<b>BRLF1</b>	PTFLPPVKRKKGLRD	403-417	1	16	6,3	(Long et al. 2011)
<b>BRLF1</b>	PACLLSTKSKAVETP	251-265	1	16	6,3	
<b>BRLF1</b>	PASLAPTPTGVPVHEP	464-478	0	14	0,0	
<b>BRLF1</b>	TDELESLSPTMPLK	302-316	0	14	0,0	
<b>BRLF1</b>	KKGLRDSREGMFLPK	412-426	0	8	0,0	

Reag.: Reagierende Spender; Getest.: Getestete Spender; EF: Erkennungsfrequenz

Tabelle 15: Screening-Ergebnis der Epitopkandidaten aus BMLF1, getestet an PBMCs gesunder Blutspender durch IFN- $\gamma$  ELISPOT

Antigen	Sequenz	Position	Reag. (n)	Getest. (n)	EF (%)	Referenz
<b>BMLF1</b>	DPFLQSM LAVA AHPE	241-255	6	26	23,1	
<b>BMLF1</b>	LCLLAAYA AVAPAYI	394-408	4	18	22,2	
<b>BMLF1</b>	CTLVAMLEETIFWLQ	302-316	3	16	18,8	
<b>BMLF1</b>	DARMQAIQNAGLCTL	290-304	3	20	15,0	
<b>BMLF1</b>	FDMSLVKPVSKITFV	211-225	2	16	12,5	
<b>BMLF1</b>	KQPLCLLAAYA AVAP	391-405	2	18	11,1	
<b>BMLF1</b>	ASFVIPRKKWDLQDK	84-98	2	18	11,1	(Long et al. 2011)
<b>BMLF1</b>	QNKVVETLSSSYVKQ	378-392	2	18	11,1	
<b>BMLF1</b>	SKITFVTLPSPLASL	220-234	2	18	11,1	
<b>BMLF1</b>	DESYGKRRHLPPGAR	138-152	0	10	0,0	
<b>BMLF1</b>	SLTLEPIQDPFLQSM	233-247	0	12	0,0	
<b>BMLF1</b>	NKVVETLSSSYVKQP	379-393	0	12	0,0	
<b>BMLF1</b>	KITFVTLPSPLASLT	221-235	0	10	0,0	

Reag.: Reagierende Spender; Getest.: Getestete Spender; EF: Erkennungsfrequenz

Tabelle 16: Screening-Ergebnis der Epitopkandidaten aus BMRF1, getestet an PBMCs gesunder Blutspender durch IFN- $\gamma$  ELISPOT

Antigen	Sequenz	Position	Reag. (n)	Getest. (n)	EF (%)	Referenz
<b>BMRF1</b>	EACLTLDYKPLSVGP	204-218	7	16	43,8	
<b>BMRF1</b>	SVPIILRFYRSGIIAV	261-275	18	42	42,9	
<b>BMRF1</b>	AGDLPLDLSVILFNH	283-297	3	24	12,5	
<b>BMRF1</b>	AQDVGAVEAHVVCSV	229-243	2	20	10,0	
<b>BMRF1</b>	PLSVGPPYEFTGPVA	213-227	2	23	8,7	
<b>BMRF1</b>	SKCYDHAQTHLKGGV	18-32	0	14	0,0	
<b>BMRF1</b>	LAAVANAGTAGLISF	47-61	0	8	0,0	
<b>BMRF1</b>	SGGVKVTLPDLYVT	184-197	0	8	0,0	
<b>BMRF1</b>	IGQVLLMPKTASSLQ	162-176	0	8	0,0	

Reag.: Reagierende Spender; Getest.: Getestete Spender; EF: Erkennungsfrequenz

Tabelle 17: Screening-Ergebnis der Epitopkandidaten aus BNRF1, getestet an PBMCs gesunder Blutspender durch IFN- $\gamma$  ELISPOT

Antigen	Sequenz	Position	Reag. (n)	Getest. (n)	EF (%)	Referenz
<b>BNRF1</b>	SFRQFQAINHLVLF	163 - 177	5	16	31,3	
<b>BNRF1</b>	ITPVLQKTGSLIIAV	816 - 830	6	21	28,6	
<b>BNRF1</b>	PGLFPFVNAIASSLG	295 - 309	6	21	28,6	
<b>BNRF1</b>	EIQQFLRLLGATYVL	131 - 145	4	16	25,0	
<b>BNRF1</b>	SLKNLFRVQQLVKS	861 - 875	3	14	21,4	
<b>BNRF1</b>	ATVALINRFPALRDA	1102 - 1116	4	21	19,0	
<b>BNRF1</b>	VPVVAGFYRTINATL	346 - 360	4	21	19,0	
<b>BNRF1</b>	VEMGRQFGFEVHRSR	147 - 161	3	16	18,8	
<b>BNRF1</b>	LRSMNMPAVLGRVG	941 - 955	2	14	14,3	
<b>BNRF1</b>	ASNFMTVVASVSAPG	795 - 809	3	21	14,3	
<b>BNRF1</b>	LYELLSDPRSALGLD	38 - 52	2	16	12,5	
<b>BNRF1</b>	EMMDDFSPFFTVEFP	565 - 579	2	21	9,5	
<b>BNRF1</b>	LPLADYAFVAHSQVW	653 - 667	2	21	9,5	
<b>BNRF1</b>	RRVFFREVRDNTFLD	1066 - 1080	1	14	7,1	
<b>BNRF1</b>	ELPWLSLESCLTSIL	605 - 619	1	21	4,8	
<b>BNRF1</b>	GEVLQTLRSMNMYPA	935 - 949	0	14	0,0	
<b>BNRF1</b>	RLLLGTSWSSFASEQY	978 - 992	0	14	0,0	
<b>BNRF1</b>	LAGLGAVGSTDNPPA	1139 - 1153	0	21	0,0	
<b>BNRF1</b>	GSLFEQLFSDVATTP	840 - 854	0	21	0,0	

Reag.: Reagierende Spender; Getest.: Getestete Spender; EF: Erkennungsfrequenz

Tabelle 18: Screening-Ergebnis der Epitopkandidaten aus BLLF1, getestet an PBMCs gesunder Blutspender durch IFN- $\gamma$  ELISPOT

Antigen	Sequenz	Position	Reag. (n)	Getest. (n)	EF (%)	Referenz
<b>BLLF1</b>	PRPVSRLFNGNSILY	268 - 282	12	16	75,0	
<b>BLLF1</b>	VPYIKWDNCNSTNIT	157 - 171	8	16	50,0	
<b>BLLF1</b>	STNITAVVRAQGLDV	167 - 181	13	32	40,6	(Wallace et al. 1991)
<b>BLLF1</b>	SNIVFSDEIPASQDM	301 - 315	5	16	31,3	
<b>BLLF1</b>	ITYVGDNATYSVPMV	322 - 336	4	16	25,0	
<b>BLLF1</b>	TFDITVSGLTAPKT	388 - 402	3	16	18,8	
<b>BLLF1</b>	LFLLELLGAGELALT	91 - 105	2	16	12,5	
<b>BLLF1</b>	TYSVPMVTSEDANSP	330 - 344	2	16	12,5	
<b>BLLF1</b>	YTIQSLIHLLTGEDPG	10 - 24	1	16	6,3	
<b>BLLF1</b>	PEFPFYPTCNVCTAD	31 - 45	1	16	6,3	
<b>BLLF1</b>	AQGLDVTLPLSLPTS	176 - 190	1	16	6,3	
<b>BLLF1</b>	TTYLPPSTSSKLRPR	817 - 831	1	16	6,3	
<b>BLLF1</b>	LLLLLVMADCAFRRN	874 - 888	1	16	6,3	
<b>BLLF1</b>	TADVNTINFDVGGK	43 - 57	0	16	0,0	
<b>BLLF1</b>	VYFQDVFGTMWCHHA	130 - 144	0	16	0,0	(Adhikary et al. 2006)
<b>BLLF1</b>	QHNTSSSTSSMSLR	654 - 668	0	16	0,0	

Reag.: Reagierende Spender; Getest.: Getestete Spender; EF: Erkennungsfrequenz

Insgesamt konnte für 77 Peptide von insgesamt 107 getesteten Epitopkandidaten gezeigt werden, dass gegen sie eine T-Zellantwort in der gesunden Bevölkerung existiert. Bei 74 der Epitope handelte es sich um bis dato unpublizierte. Zwei der von uns vorhergesagten Epitope, BRLF1 403 (Long et al. 2011) und BLLF1 167 (Wallace et al. 1991) waren schon bekannt, wenn auch nicht exakt die gleiche Position (BRLF1 407 bzw. BLLF1 163). Auf der anderen Seite befanden sich auch unter den in unseren Experimenten nicht erkannten Peptiden publizierte Epitope wie z.B. LMP1 67 (Depil et al. 2007). In Abbildung 13 sind die getestete Anzahl von Epitopkandidaten pro Antigen sowie ihre Erkennungsfrequenzen dargestellt. Insgesamt sieben Epitopkandidaten wurden von über 40% der gesunden Blutspender erkannt. Eines davon stammt aus dem latenten Antigen EBNA3A, alle weiteren aus den lytischen Antigenen BRLF1, BMRF1 und BLLF1. Da diese Epitope eine Rolle in der EBV-spezifischen Immunabwehr fast der Hälfte aller Individuen zu spielen scheinen, sind sie von besonderem Interesse für einen EBV-spezifischen Epitopmix.

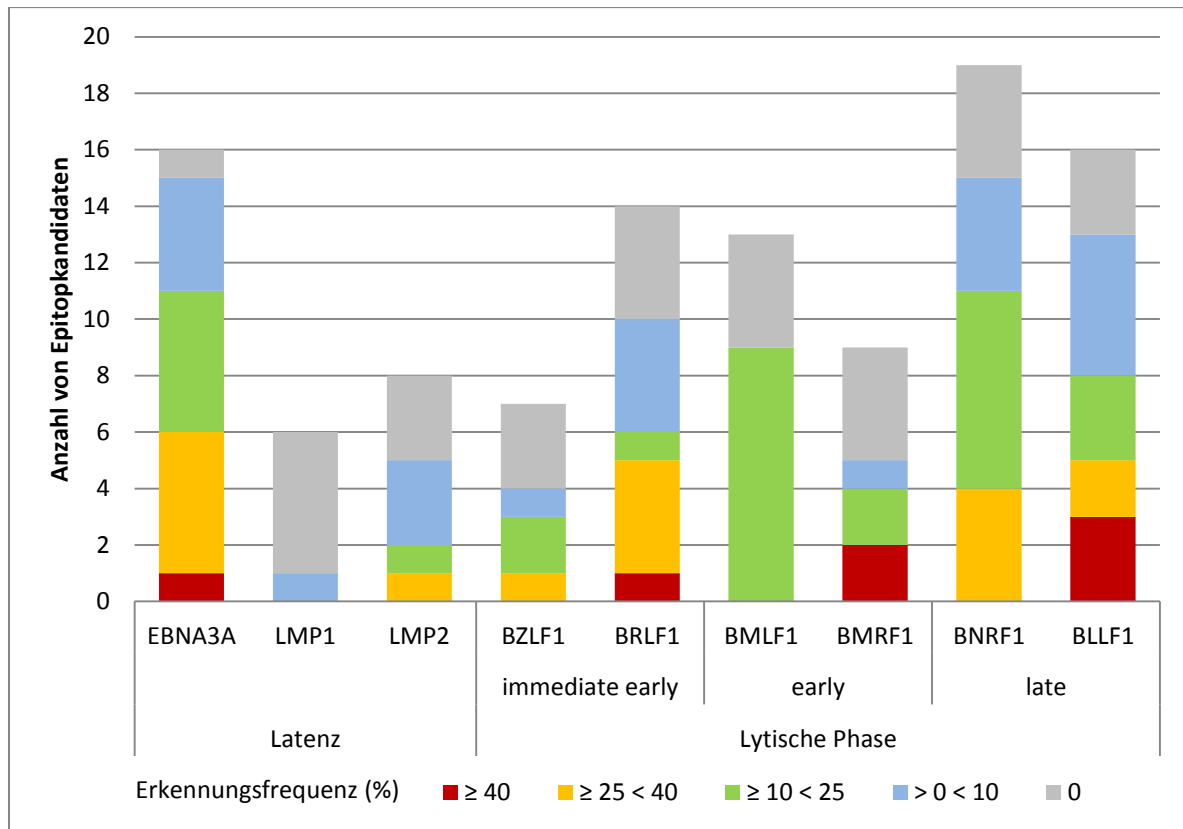


Abbildung 13: Erkennungsfrequenzen der getesteten Epitopkandidaten pro Antigen.

### 3.1.4 Charakterisierung der beobachteten Reaktionen auf CD4+ und CD8+T-Zellantworten

Beim ELISPOT-Screening konnten antigeninduzierte IFN- $\gamma$ -Antworten auf mehrere vorhergesagte Epitopkandidaten bei gesunden Blutspendern detektiert werden. IFN- $\gamma$  kann aber außer von Th1-Zellen auch von CD8+ T-Zellen und NK-Zellen exprimiert werden. Da deshalb bei den gemessenen Reaktionen nicht *per se* von einer CD4+ T-Zellantwort ausgegangen werden kann, wurden *in vitro*-Amplifikationen der häufiger erkannten und somit vielversprechenden Epitope mit reagierenden Spendern wiederholt, die IFN- $\gamma$  Expression intrazellulär angefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Das kleinste dabei verwendete Färbepanel beinhaltete eine Lebend/Totfärbung, CD4, CD8 und IFN- $\gamma$ . Optional wurde auch TNF angefärbt. Auf die Färbung von CD3 als T-Zellmarker wurde verzichtet, da NK-Zellen, die man damit ausschließen könnte, kein CD4 exprimieren und der T-Zellrezeptor, und damit CD3, bei aktivierten Zellen herunterreguliert wird (Reinherz et al. 1982). Die verwendete *Gating*-Strategie wird in Abbildung 14 dargestellt.



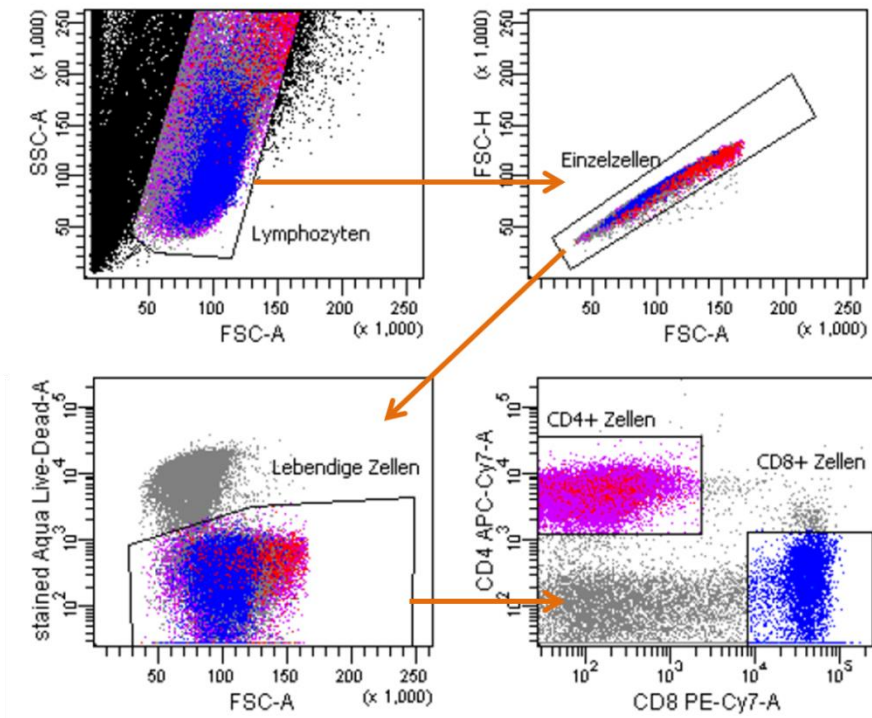


Abbildung 14: *Gating*-Strategie bei der Charakterisierung von Epitopen. Aus den Lymphozyten wurden Einzelzellen ausgewählt. Danach wurden lebende von toten Zellen und CD4+ von CD8+ T-Zellen unterschieden

Ein Beispiel für ein CD4+ Epitop wird in Abbildung 15 gezeigt. Nur CD4+ T-Zellen produzieren spezifisch IFN- $\gamma$  nach Stimulation mit BMLF1 261.

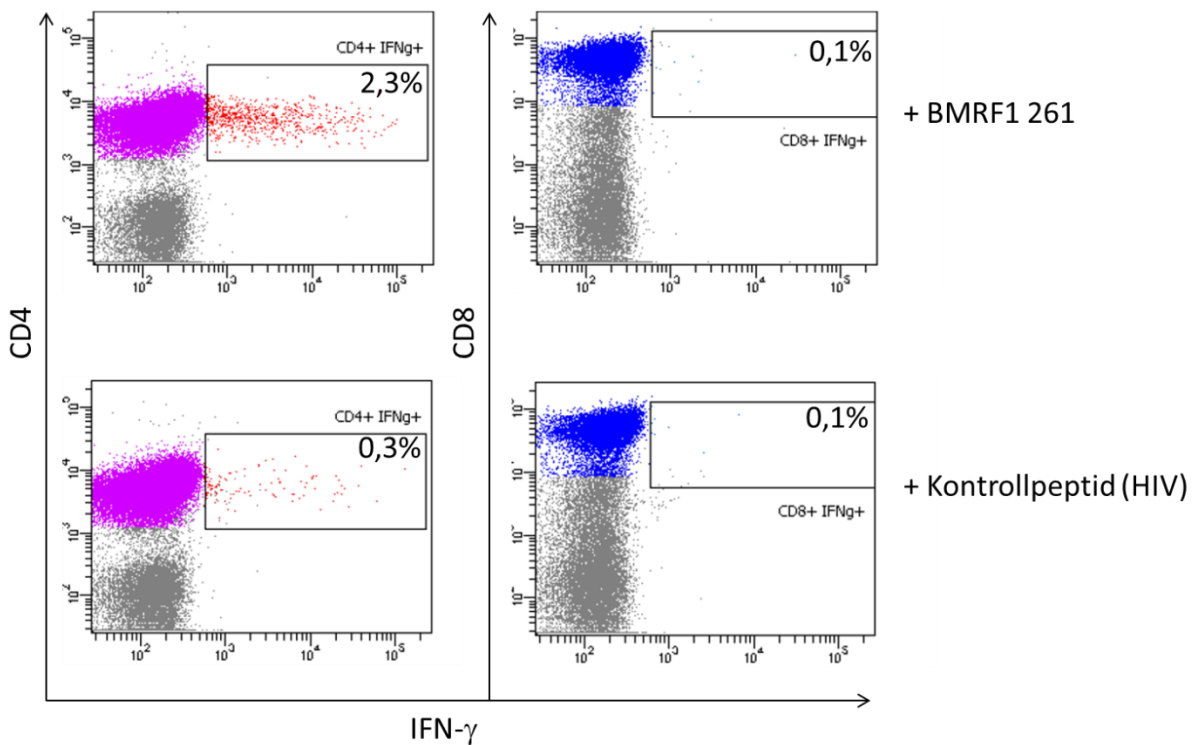


Abbildung 15: Beispiel für eine CD4-Antwort nach Stimulation mit BMLF1 261 gemessen mit ICS. Angegebene Prozentzahlen sind IFN- $\gamma$ + von CD4+ oder CD8+.

Alle 24 bestätigten CD4+ Epitope sind Tabelle 19 zusammengefasst. Das Epitop BLLF1 167 liegt innerhalb einer schon bekannten Sequenz (BLLF1 163-183).

Tabelle 19: CD4+ T-Zellepitope

Antigen	Position	Sequenz	EF % (getestete Spender)	Referenz
<b>BLLF1</b>	268-282	PRPVSRFLGNNSILY	75,0 (16)	
<b>BLLF1</b>	157-171	VPYIKWDNCNSTNIT	50,0 (16)	
<b>EBNA3A</b>	381-395	PIFIRRLHRLLLMRA	47,5 (40)	
<b>BMRF1</b>	261-275	SVPIILRFYRSGIIAV	42,8 (42)	
<b>BLLF1</b>	167-181	STNITAVVRAQGLDV	40,6 (32)	(Wallace et al. 1991) 163-183
<b>BRLF1</b>	119-133	DRFFIQAPSNRVMIP	33,3 (24)	
<b>EBNA3A</b>	134-148	YIMYAMAIRQAIRDR	33,3 (24)	
<b>EBNA3A</b>	287-301	DLSYIKSFVSDALGT	33,3 (24)	
<b>BRLF1</b>	223-237	DVRALIKTLPRASYS	29,2 (24)	
<b>BNRF1</b>	816-830	ITPVLQKTGSLLIIV	28,6 (21)	
<b>EBNA3A</b>	190-204	TPTFVHLQATLGCTG	28,0 (25)	
<b>EBNA3A</b>	919-933	RVVVS AVVHMCQDDE	25,0 (16)	
<b>EBNA3A</b>	247-261	YSIFFDYMAIHRSLT	25,0 (16)	
<b>BLLF1</b>	322-316	ITYVGDNATYSVPMV	25,0 (16)	
<b>BMLF1</b>	241-255	DPFLQSM LAVA AHPE	23,1(26)	
<b>BZLF1</b>	45-59	PCVLWPVLP EPLPQG	22,7 (22)	
<b>BMLF1</b>	302-316	LCLLAAYA AVAPAYI	22,2 (18)	
<b>BRLF1</b>	13-27	RLTPEIKKQLGSLVS	20,0 (20)	
<b>BNRF1</b>	1102-1116	ATVALINRFPALRDA	19,0 (21)	
<b>BNRF1</b>	346-360	VPVVAGFYRTINATL	19,0 (21)	
<b>EBNA3A</b>	227-241	RQWLYVQSSVGNIVQ	18,8 (16)	
<b>BMLF1</b>	261-275	CTLVAMLEETIFWLQ	18,8 (16)	
<b>BLLF1</b>	388-402	TFDITVSGLG TAPKT	18,8 (16)	
<b>EBNA3A</b>	179-193	SWMYSYTDHQTTPTF	16,7 (24)	

EF: Erkennungsfrequenz

Bei sieben Peptiden wurde eine CD8-Antwort beobachtet. In Abbildung 16 wird beispielhaft die Färbung einer CD8-Antwort, hier nach Stimulation mit dem Peptid BMRF1 204, gezeigt. Im Peptid EACLTLDYKPLSVGP liegt das von Hislop et al 2002 publizierte A\*02 restringierte Epitop TLDYKPLSV. Tatsächlich stammen die für die Stimulation verwendeten PBMCs von einem A\*02-positiven Spender. Da jedoch nicht alle im Elispot reagierenden Spender A\*02+ waren, könnte das Peptid entweder promiskuitiv präsentiert werden, oder von einem anderen Allotyp wie z.B. C\*07, welches auch relativ häufig vorkommt. Auch eine MHC-Klasse-II-Präsentation bei den anderen Spendern kann nicht ausgeschlossen werden.

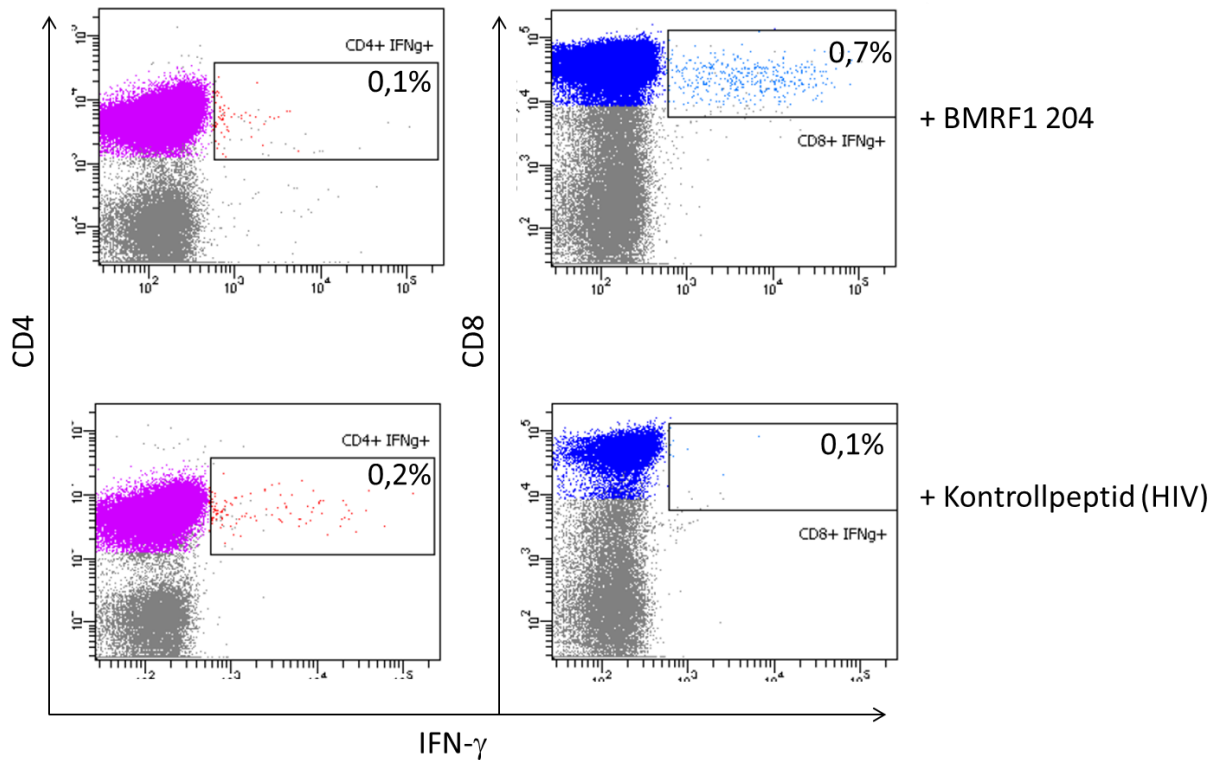


Abbildung 16: Beispiel für eine CD8-Antwort nach Stimulation mit BMLF1 204 gemessen mit ICS. Angegebene Prozentzahlen sind IFN-γ+ von CD4+ oder CD8+.

Alle identifizierten CD8+ Epitope sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Tabelle 20: CD8+ T-Zellepitope

Antigen	Position	Sequenz	EF % (getestete Spender)	Referenz
<b>BMLF1</b>	204-218	EACLTLDYKPLSVGP	43,8 (16)	(Hislop et al. 2002) 208-216
<b>BRLF1</b>	15-29	TPEIKKQLGSLVSDY	40,0 (20)	
<b>BNRF1</b>	163-177	SFRQFQAINHLVLF	31,3 (16)	
<b>BZLF1</b>	195-209	QLLQHYREVAAAKSS	35,0 (20)	(Pudney et al. 2005) 197-205
<b>BRLF1</b>	74-88	NICNFWAILRNNRVR	31,3 (16)	
<b>BNRF1</b>	147-161	VEMGRQFGFEVHRSR	18,8 (16)	
<b>BMLF1</b>	84-98	ASFVIPRKKWDLQDK	11,1(18)	

EF: Erkennungsfrequenz

### 3.1.5 MHC-Klasse-II-restringierte Epitope von EBV aus Publikationen und ihre Eignung für einen EBV-Mix

Nach einer Literaturrecherche wurden einige publizierte MHC-Klasse-II-restringierte Epitope, die vielversprechend erschienen, synthetisiert und auf ihre Erkennungsrate in der gesunden Bevölkerung getestet. Dies geschah analog zum Epitop-Screening der vorhergesagten Epitope. In Abbildung 17 wird die Reaktion von acht gesunden Blutspendern auf sieben EBNA1-Epitope, gemessen durch ELISPOT, dargestellt. Zwischen Position 400 und 600 des C-terminalen Teils von EBNA1 wurde schon von Long et al. eine hohe Dichte an häufig erkannten MHC-Klasse-II restringierten Epitopen entdeckt (Long et al. 2005). Diese Ergebnisse finden sich in unserem Experiment bestätigt.

Eine Auflistung aller durch Literaturrecherche ausgewählter und getesteter Epitope sind in Tabelle 21 zusammengefasst. Einige der Epitope erwiesen sich als sehr häufig erkannte, und daher vielversprechende Kandidaten für einen Epitopmix.

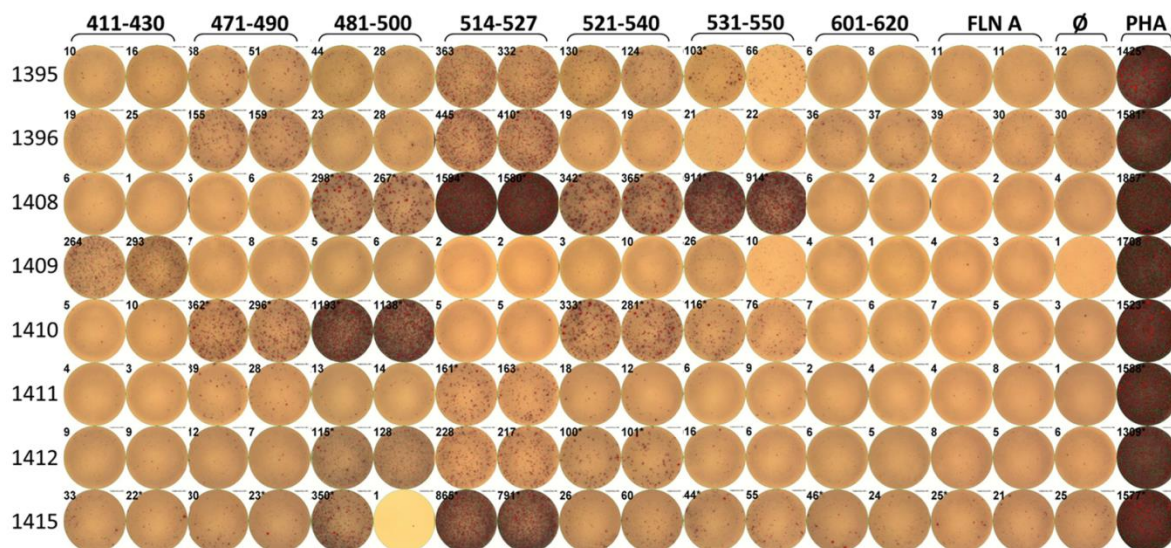


Abbildung 17: IFN- $\gamma$ -Reaktionen von acht Blutspendern auf sieben bekannte EBNA1-Epitope. Die Abbildung ist ein Zusammenschnitt von zwei ELISPOT-Platten gemessen in einem Experiment.

Tabelle 21: Publizierte MHC-Klasse-II-restringierte Epitope geordnet nach ihren Erkennungsfrequenzen

Antigen	Position	Sequenz	Länge	Referenz	publizierte Restriktion	getestete Spender	EF %
<b>EBNA2</b>	276-295	PRSPTVFYNIIPMPLPPSQL	20	(Khanna et al. 1997; Omiya et al. 2002; Long et al. 2005)	DR52, DQ2, DQ7, DR1, DR16, DR7	16	75
<b>BXLF2</b>	126-140	LEKQLFYIIGTMLPNTRPHS	20	(Long et al. 2011)	DRB5*01	16	69
<b>EBNA1</b>	481-500	IAEGLRALLARSHVERTTDE	20	(Kruger et al. 2003)(482-496)	DR4, DR7, DR11, DR15	16	69
<b>EBNA1</b>	521-540	RRGTALAI PQRLTPLSRLP	20	(Demachi-Okamura et al. 2008)(522-534)		16	63
<b>EBNA1</b>	471-490	QGGSNPKFENIAEGLRALLA	20	(Demachi-Okamura et al. 2008)(474-487)		16	44
<b>EBNA1</b>	514-527	KTSLYNLRRGTALA	14	(Khanna et al. 1995)(515-527)	DR1	31	42
<b>EBNA1</b>	531-550	CRLTPLSRLPFGMAPGPGPQ	20	(Long et al. 2005)(529-543)		16	38
<b>BZLF1</b>	174-188	ELEIKRYKNRVASRK	15	(Adhikary et al. 2006)	DRB1*1301	16	32
<b>BNRF1</b>	1238-1252	TDARWFAMNYPRNPT	15	(Milosevic et al. 2006)		16	25
<b>BKRF2</b>	116-135	GSFSVEDLFGANLNRYAWHR	20	(Long et al. 2011)	DPB1*04	16	25
<b>EBNA3A</b>	780-794	GPWVPEQWMFQGAPP	15	(Long et al. 2005)	Dr1	16	25
<b>EBNA3A</b>	649-663	QVADVVRAPGVPAHQ	15	(Long et al. 2005)		16	19
<b>BZLF1</b>	207-201	KSENDRLRLLLKQM	15	(Adhikary et al. 2006)	DQB1*0402	16	19
<b>EBNA1</b>	411-430	EADYFEYHQEGPDGEPDVP	20	(Demachi-Okamura et al. 2008)(415-427)		14	14
<b>BZLF1</b>	11-25	LTAYHVSTAPTGSWF	15	(Long et al. 2011)	DRB3*01	8	13
<b>EBNA2</b>	11-30	GQTYHLIVDTLALHGGQTYH	20	(Long et al. 2005)	DR4	8	13
<b>EBNA3C</b>	66-80	NRGWMQIRRRRRRR	15	(Long et al. 2005), (Leen et al. 2001)		16	13
<b>BLLF1</b>	61-75	LDLDFGQLTPHTKAV	15	(Wallace et al. 1991)	HLA-DRw15	8	0
<b>BMRF1</b>	136-150	VKLTMEYDDKVSKSH	15	(Long et al. 2011)	DRB1*0301	8	0
<b>BRLF1</b>	475-487	VHEPVGSLTPAPV	13	(Milosevic et al. 2006)		8	0
<b>EBNA3A</b>	364-378	EDLPCIVSRGGPKVK	15	(Long et al. 2005)	DR15	8	0
<b>EBNA3C</b>	386-400	SDDELPYIDPNMEPV	15	(Long et al. 2005), (Leen et al. 2001)	DQ5	8	0
<b>EBNA1</b>	601-620	DDGVLDLPPWFPPMVEGAAAE	20	(Voo et al. 2005) (601-620)		14	0

EF: Erkennungsfrequenz

## 3.2 Promiskuität der identifizierten Epitope & Effizienz der Vorhersage durch SYFPEITHI

Ein promiskuitives Bindungsverhalten der Epitope erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass ein großer Anteil der Bevölkerung für dieses Epitop spezifische Gedächtnis-T-Zellen besitzt. Daher wurde bei der Auswahl der Epitopkandidaten großen Wert darauf gelegt, Peptide, die für mehrere Allele als Epitopkandidaten vorhergesagt wurden, bevorzugt zu berücksichtigen.

Das potentiell promiskuitive Bindungsverhalten der identifizierten Epitope wurde mithilfe eines MHC-Klasse-II-Bindungsassays näher untersucht. Ein Assay, bei dem Peptide in titrierten Konzentrationen mit verschiedenen HLA-DR-Ketten zurückgefaltet werden und die Menge an rückgefalteten MHC-Molekülen über Bindung an den HLA-DR-spezifischen Antikörper L243 lumineszenzbasiert nachgewiesen wird, wurde von Sune Justesen in Kopenhagen entwickelt (Justesen et al. 2009). Er testete freundlicherweise 23 der 24 als CD4+ Epitope charakterisierten Peptide (vgl. Tabelle 19), sowie neun der publizierten Epitope (vgl. Tabelle 21) auf ihre Bindungsfähigkeit an verschiedene HLA-DR-Moleküle. Der Assay wurde bei pH 6 und bei pH 7 durchgeführt. Ein leicht saurer pH-Wert ähnelt den Bedingungen in den MHC-Klasse-II-Kompartimenten (Peters et al. 1991; Landsverk et al. 2009), während ein neutraler pH den *in vitro*-Bedingungen nahe kommt.

Die ermittelten Bindungsaffinitäten sind in Tabelle 22 zusammengefasst. Je niedriger die mittlere Effektivdosis (EC50), d.h. je niedriger die mittlere Peptidkonzentration, die benötigt wird, um eine halbmaximale Rückfaltung der MHC-Moleküle zu erreichen, desto höher die Bindungsaffinität. Die verschiedenen Bindungsaffinitäten werden in der Tabelle farblich dargestellt. Gelb, orange und rosa stehen für hohe Affinitäten mit einem EC50 bis zu 100 nM, hell- und mittelblau stehen für schwächere Bindungsaffinitäten und grau für nicht-bindend. Die Peptide sind in der Tabelle absteigend nach ihren Erkennungsfrequenzen geordnet. Auf den ersten Blick lässt sich erkennen, dass fast ausnahmslos alle Peptide promiskuitive Bindungseigenschaften aufweisen und an mehrere der getesteten Allotypen binden, auch wenn man nur die getesteten DRB1-Moleküle in Betracht zieht. Der Beitrag der „sekundären“ DR-β Ketten DRB3, DRB4 und DRB5, die nicht jedes Individuum exprimiert, wird im Vergleich zur Gesamtheit der HLA-DR Expression auf den Zelloberflächen als geringer eingeschätzt. Ihre Transkription liegt um ein Mehrfaches unter der Expression der „primären“ HLA-DRB1-Moleküle (Berdoz et al. 1987; Stunz et al. 1989).

Für welche HLA-DR-Allele die Peptide vorhergesagt wurden, ist in Tabelle 22 rechts angegeben. Ein Vergleich mit den im Bindungsassay determinierten Bindungsaffinitäten bestätigte 40 dieser

Vorhersagen (in der Tabelle grün markiert), während nur 5 Vorhersagen nicht bestätigt werden konnten (in der Tabelle rot markiert). Vorhergesagte Allele, die nicht farbig markiert wurden, waren nicht im Bindungsassay inbegriffen. Diese Ergebnisse unterstreichen die hohe Zuverlässigkeit der SYFPEITHI-Vorhersage.

Des Weiteren schienen die vorhergesagten Epitope in Bezug auf die getesteten Allotypen tatsächlich stärker promiskuitiv zu sein als die durch Literaturrecherche entdeckten und nachgetesteten. Diese Tendenz ist in Abbildung 18 ersichtlich. Sowohl bei pH 6 als auch bei pH 7 bindet die Mehrzahl der von SYFPEITHI vorhergesagten Peptide an mindestens 4 der getesteten DRB1-Moleküle, während die Mehrzahl der publizierten Epitope nur an 2-3 der getesteten DRB1-Moleküle bindet. Und das, obwohl die durchschnittliche Erkennungsrate bei beiden Gruppen ähnlich hoch ist, mit 31,3% bei den vorhergesagten und 37,7% bei den publizierten. Daraus kann abgeleitet werden, dass der verwendete Selektionsansatz zur Auswahl potentiell promiskuitiver Epitopkandidaten (vgl. 3.1.1) erfolgreich war.

Tabelle 22: Ergebnisse des MHC-Klasse-II-Bindungsassays. Angegeben sind die von Sune Justesen ermittelten EC50-Konzentration in nM. Je niedriger der Wert, desto höher die Affinität. NB: Nicht bindend. Farbcode Vorhersage: grün= Vorhersage trifft bei min. einem pH-Wert zu, rot=Vorhersage trifft nicht zu, schwarz= vorhergesagter Allotyp nicht im Bindungsassay getestet

Legende (nM)	Peptid Nummer Sequenz	Antigen	Position	Erkennungsfrequenz (%)	pH 6								pH 7								Vorhersage (SYFPEITHI)
					DRB1*03:01	DRB1*04:01	DRB1*07:01	DRB1*12:01	DRB1*15:01	DRB3*01:01	DRB3*03:01	DRB4*01:01	DRB5*01:01	DRB1*03:01	DRB1*04:01	DRB1*07:01	DRB1*12:01	DRB3*01:01	DRB4*01:01		
0-10	90344	PRPVSRLFNGNSILY	BLLF1	268 - 282	75,0	380	208	93	12	9	9	9	15	120	447	37	2	2	10	8	DR7, DR11, DR15
10-50	90337	VPYIKWDNCNSTNIT	BLLF1	157 - 171	50,0	36	109	113	171	32	183	183	281	32	35	41	15	14	59	45	DR3, DR4, DR7
50-100	80235	PIFIRRLHRLLLMRA	EBNA3A	381 - 395	47,5	5	103	127	12	4	NB	NB	NB	5	0	155	NB	0	NB	NB	DR3, DR4
100-200	80207	SVPIILRFYRSGIIAV	BMRF1	261 - 275	42,9	45	NB	18	11	1	41	41	48	40	22	160	0	0	103	60	DR1, DR4, DR15
>200	90338	STNITAVVRAQGLDV	BLLF1	167 - 181	40,6	66	NB	349	229	373	NB	NB	NB	NB	113	NB	18	61	NB	NB	DR11, DR15
NB	80126	DRFFIQAPSNRVMIP	BRLF1	119 - 133	33,3	11	27	27	37	3	2	2	4	6	8	1	0	6	2	3	DR4, DR7
	80237	YIMYAMAIRQAIRDR	EBNA3A	134 - 148	33,3	26	163	92	86	13	244	244	NB	13	6	27	1	5	337	149	DR4, DR7
	80266	DLSYIKSFVSDALGT	EBNA3A	287 - 301	33,3	NB	178	186	66	10	50	50	68	89	396	32	7	5	114	66	DR1
	80134	DVRALIKTLPRASYS	BRLF1	223 - 237	29,2	50	274	277	34	50	NB	NB	NB	30	11	220	10	2	NB	116	DR1, DR3, DR11
	90271	ITPVLQKTGSLLIIV	BNRF1	816 - 830	28,6	124	137	28	15	5	NB	236	NB	21	47	12	0	1	NB	NB	DR7, DR11, DR15
	90088	TPTFVHLQATLGCTG	EBNA3A	190 - 204	28,0	NB	72	85	4	19	NB	NB	NB	18	314	3	7	3	NB	NB	DR1, DR11, DR15
	80253	RVVVSADVHMCQDDE	EBNA3A	919 - 933	25,0	NB	NB	NB	NB	286	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	DR4, DR7, DR15
	80260	YSIFFDYMAIHRSLT	EBNA3A	247 - 261	25,0	4	128	NB	NB	12	NB	NB	NB	5	4	4	11	NB	NB	NB	DR7, DR11, DR15
	90346	ITYVGDNATYSVPMV	BLLF1	322 - 316	25,0	203	229	281	NB	NB	10	10	19	NB	229	9	31	184	7	7	DR1, DR4, DR7
	80165	DPFLQSMVAVAHP	BMLF1	200 - 214	23,1	NB	18	422	50	8	NB	NB	NB	8	NB	1	15	5	NB	NB	DR1, DR15
	90133	PCVLWVLPPEPLPQG	BZLF1	45 - 59	22,7	NB	60	105	NB	37	NB	NB	NB	NB	NB	NB	11	NB	NB	NB	DR1, DR3, DR4, DR11
	80120	RLTPEIKKQLGSLVS	BRLF1	13 - 27	20,0	410	NB	338	65	62	114	114	172	NB	369	NB	37	2	179	177	DR1, DR3, DR11
	90277	ATVALINRFPALRDA	BNRF1	1102 - 1116	19,0	14	291	347	12	3	NB	NB	NB	15	8	NB	12	1	NB	NB	DR4, DR7, DR15
	91135	VPVAGFYRTINATL	BNRF1	346 - 360	19,0	NB	180	9	9	2	NB	NB	NB	59	NB	12	0	2	NB	NB	DR3, DR4, DR7, DR15
	80229	CTLVAMLEETIFWLQ	BMLF1	261 - 275	18,8	NB	NB	NB	NB	308	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	33	NB	NB	DR1, DR3
	80262	QWLYVQSSVGNIVQ	EBNA3A	227 - 241	18,8	NB	117	48	NB	48	15	15	17	41	404	5	1	63	19	17	DR4, DR7, DR15
	90348	TFDITVSGLGTAPKT	BLLF1	388 - 402	18,8	NB	325	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	221	135	NB	NB	NB	NB	DR4, DR7, DR11
	80255	SWMYSYTDHQTTPTF	EBNA3A	179 - 193	16,7	NB	225	NB	NB	14	59	59	94	NB	NB	62	36	NB	123	112	DR1, DR7, DR11
Publizierte Epitope:																					
111232	LEKQLFYYIGTMLPNTRPHS	BXLF2	126-140	68,8	NB	49	169	NB	3	NB	NB	NB	4	234	2	4	64	NB	NB	NB	
60220	KTSLYNLRGTALA	EBNA1	514-527	41,9	NB	NB	NB	174	8	NB	NB	NB	85	NB	NB	10	1	NB	NB	NB	
1640	CRLTPLSRLPFGMAPGPGPQ	EBNA1	531-550	37,5	190	NB	NB	30	103	NB	NB	NB	73	78	NB	106	1	NB	NB	NB	
110284	ELEIKRYKNRVASRK	BZLF1	174-188	31,3	287	204	NB	290	9	NB	NB	NB	24	234	9	191	4	NB	NB	NB	
110273	TDARFAMNYPRNPT	BNRF1	1238-1252	25,0	21	432	NB	NB	100	374	374	374	7	9	30	12	NB	NB	NB	NB	
111244	GSFVSEDLFGANLNRYAWHR	BKRF2	116-135	25,0	NB	158	NB	NB	14	NB	NB	NB	68	NB	109	NB	162	NB	NB	NB	
111249	GPWVPEQWFMQGAPP	EBNA3A	780-794	25,0	NB	315	NB	NB	NB	NB	NB	NB	40	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	
110288	QVADVVRAPGVPAMQ	EBNA3A	649-663	18,8	349	226	NB	NB	48	NB	NB	NB	203	NB	NB	190	NB	NB	NB	NB	
111211	KSENDRRLRLLLKQM	BZLF1	207-201	18,8	97	NB	NB	159	83	NB	NB	NB	45	151	NB	457	5	NB	NB	NB	



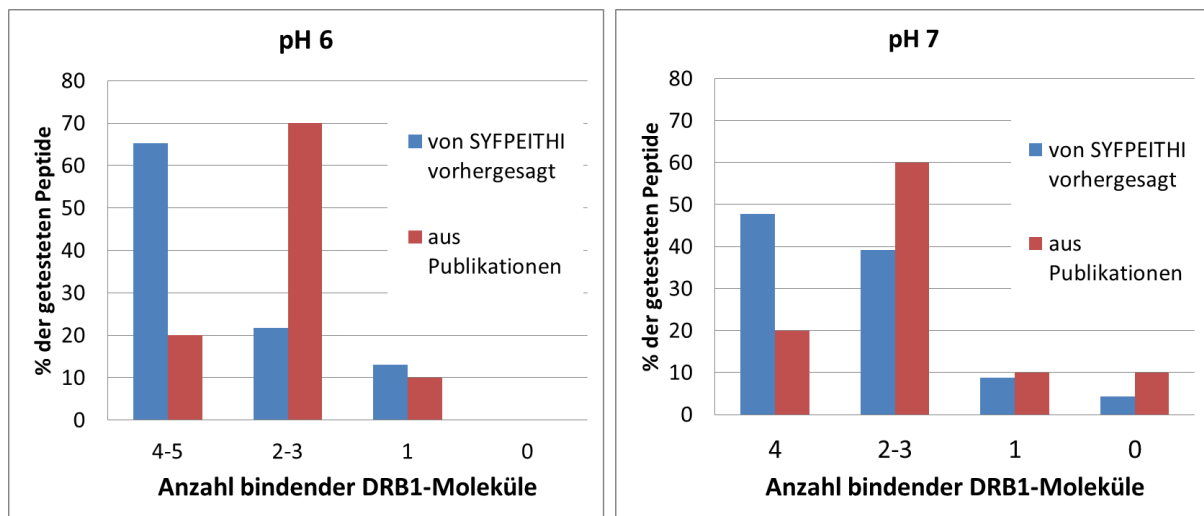


Abbildung 18: Gegenüberstellung von durch SYFPEITHI vorhergesagten (blau) und publizierten (rot) Epitopen bezüglich ihrer Promiskuität. Sowohl bei pH 6 als auch bei pH 7 bindet die Mehrzahl der von SYFPEITHI vorhergesagten Peptide an mindestens 4 der getesteten DRB1-Moleküle, während die Mehrzahl der publizierten Epitope an 2-3 der getesteten DRB1-Moleküle bindet.

### 3.3 EBV-spezifischer Peptidmix zur Stimulation von CD4+ T-Zellen

Zu verschiedenen Zeitpunkten des Projekts wurden verschiedene Peptidmixe zusammengestellt. Ziel war immer die Kombination weniger, promiskuitiver Peptide, die zusammengenommen eine IFN- $\gamma$ -Antwort bei möglichst vielen latent EBV-Infizierten hervorrufen kann.

#### 3.3.1 EBV-spezifischer Epitop-Mix aus fünf Peptiden

##### 3.3.1.1 Verschiedene Blutspender erkennen unterschiedliche Peptide - Vergleich der Erkennungsmuster für eine optimale Kombination

Um die optimale Kombination eines EBV-spezifischen Peptidmixes zusammenzustellen, wurden sechzehn gesunde Blutspender in einem ELISPOT-Experiment auf die Erkennung von 10 verschiedenen, häufig erkannten Epitopen getestet. Ziel war die Zusammenstellung einer Kombination von fünf Peptiden. Fünf dieser Epitope stammten aus den latenten Antigenen EBNA3A und EBNA1, fünf von den lytischen Antigenen BMRF1, BRLF1 und BLLF1. Alle, bis auf die beiden EBNA1-Epitope, waren durch SYFPEITHI-Vorhersage und Screening identifiziert worden. Die beiden publizierten EBNA1-Epitope (Khanna et al. 1995; Demachi-Okamura et al. 2008) wurden ausgewählt, da sie in einem ELISPOT-Assay mit acht Spendern von unterschiedlichen Spendern erkannt worden waren (vgl. Abbildung 17). EBNA1 514 ist zudem

ein häufig erkanntes Epitop. Das Ergebnis des Direktvergleichs ist in Tabelle 23 zusammengefasst.

Tabelle 23: Direktvergleich der Erkennung von 10 Epitopen durch 16 Blutspender. Orange markiert sind IFN- $\gamma$ -Antworten über dem Positivminimalwert der 3fachen Spitzzahl der Negativkontrolle (FluA). Angegeben ist die mittlere Spitzzahl zweier Messungen. Für den EBV-Mix ausgewählte Epitope sind hervorgehoben. Spender, die auf gar keine Peptide reagieren, sind grau hinterlegt.

Spender	Positiv-minimalwert: FluA*3	Latent					Lytisch				
		EBNA3A 381	EBNA3A 190	EBNA3A 287	EBNA1 411	EBNA1 514	BMRF1 261	BRLF1 119	BLLF1 268	BLLF1 167	BLLF1 157
1391	3	19	1	2	1	0	0	1	2	10	0
1392	18	17	17	299	11	7	110	27	56	71	12
1393	3	2	3	3	2	111	1	2	2	1	1
1394	5	2	2	1	3	4	106	5	0	23	1
1396	0	1	5	1	0	6	0	0	0	0	0
1504	344	328	138	93	97	477	154	162	460	187	144
1505	15	15	6	11	638	9	164	12	14	42	11
1506	3	4	0	0	1	2	14	1	0	1	1
1507	3	8	2	2	3	2	40	44	89	8	7
1508	0	2	2	1	0	8	2	1	3	1	3
1509	33	121	14	14	8	675	70	30	147	20	14
1510	2	6	1	2	0	1	1	1	1	2	1
1511	15	29	9	15	12	267	15	19	20	390	6
1512	6	3	10	4	3	5	33	4	6	3	4
1513	21	5	40	13	5	24	45	15	24	9	6
1499	0	1	0	5	1	1	0	0	0	0	0

Anhand der „Erkennungsmuster“ wurden die fünf Epitope EBNA3A 381, EBNA1 514, BMRF1 261, BLLF1 268 und BLLF1 167 (in der Tabelle blau hervorgehoben) ausgewählt. Bei einigen Spendern (1391, 1393, 1394, 1506 und 1512) konnten in diesem Experiment nur Reaktionen gegen ein Epitop gemessen werden. Dieses eine Peptid war jeweils entweder EBNA3A 381, EBNA1 514 oder BMRF1 261. Da es sich bei diesen auch generell um häufig erkannte Epitope handelt, wurden sie in den Mix aufgenommen. Zusammen mit den Peptiden BLLF1 268 und 167 erreichen diese Peptide alle 12 reagierenden von 16 getesteten Spendern mit einer mittleren Erkennung von zwei Epitopen pro Spender. Der zusammengestellte Epitopmix ist noch einmal in Tabelle 24 zusammengefasst.

Tabelle 24: EBV-spezifischer Epitop-Mix aus fünf Peptiden

Antigen	Position	Sequenz	EF % (getestet. Spender)	Referenz	Publiz. Position
<b>BLLF1</b>	268-282	PRPVSFRFLGNNSILY	75,0 (16)		
<b>EBNA3A</b>	381-395	PIFIRRLHRLLLMRA	47,5 (40)		
<b>BMRF1</b>	261-275	SVPIILRFYRSGIIAV	42,8 (42)		
<b>EBNA1</b>	514-527	KTSLYNLRRGTALA	41,9 (31)	(Khanna et al. 1995)	515-527
<b>BLLF1</b>	167-181	STNITAVVRAQGLDV	40,6 (32)	(Wallace et al. 1991)	163-183

EF: Erkennungsfrequenz;

### 3.3.1.2 Eine Kombination aus fünf Peptiden erreicht eine Erkennungsfrequenz von über 90%

Der zusammengestellte Mix sollte auf seine Fähigkeit, von EBV-spezifischen T-Zellen vieler verschiedener gesunder Blutspender erkannt zu werden, getestet werden. Dazu wurden erneut *in vitro*-Stimulationen angesetzt. Die Reaktionen von 16 Blutspendern, die in einem Experiment gemessen wurden, sind in Abbildung 19 zu sehen. Alle gemessenen Spotzahlen liegen über dem definierten Positivminimalwert, d.h. alle in diesem Experiment gemessenen Spender reagieren auf den Mix.

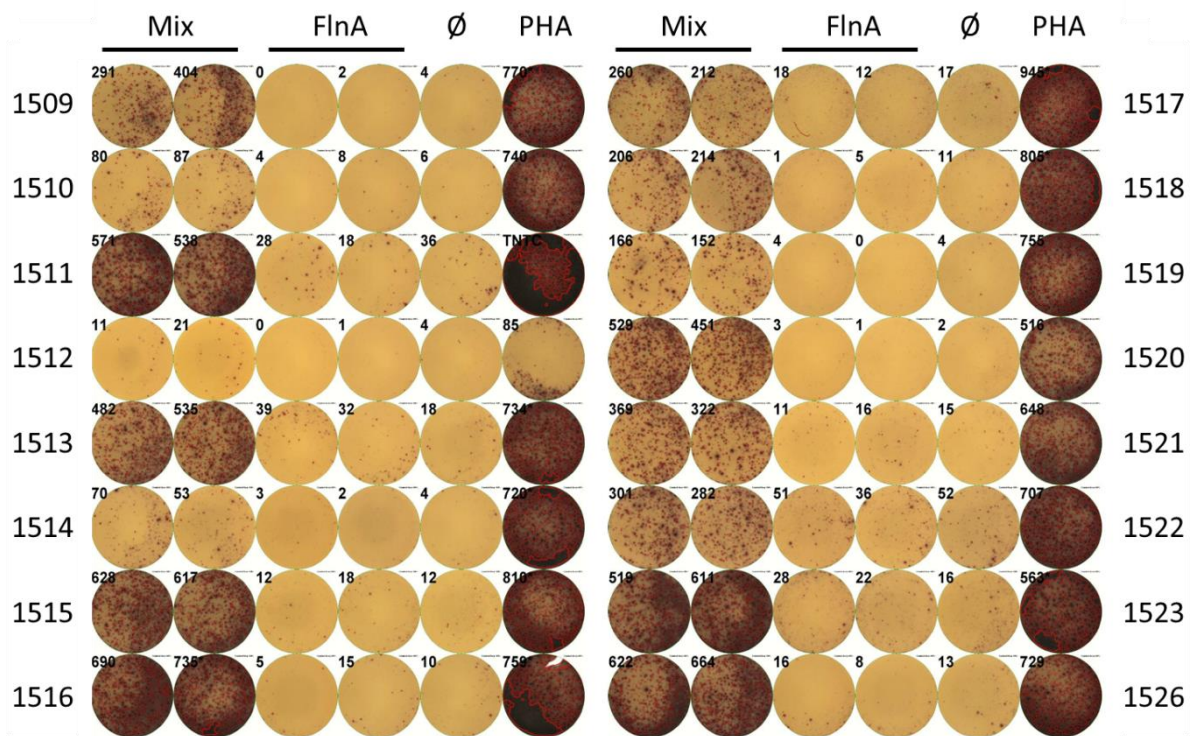


Abbildung 19: Reaktion von 16 Blutspendern auf 10 µg/ml des EBV-Mix bestehend aus fünf Peptiden (vgl. Tabelle 24). Alle Spotzahlen liegen über dem jeweiligen Positivminimalwert.

Insgesamt reagierten 23 von 24 getesteten Spendern. Dies entspricht etwa 96%. Im direkten Vergleich im gleichen Experiment mit einem Vorläufermix aus fünf Peptiden erwies sich der Peptidmix als zuverlässiger in der Stimulation EBV-spezifischer Zellen (s. Abbildung 20). Der Vorläufermix führte bei einigen Spendern (z.B. 1524 und 1513) zwar zu einer stärkeren Reaktion gemessen an den Spotszahlen, erreichte dafür einige andere Spender, wie 1521, 1520 und 1519 kaum oder gar nicht. Für den Vorläufermix waren weder BLLF1- noch EBNA1-Epitope verwendet worden, da sie zum gegebenen Zeitpunkt noch nicht bekannt bzw. getestet waren. Die wichtigste Voraussetzung des Peptidmix ist die Stimulation EBV-spezifischer Zellen vieler EBV-Infizierter. Daher ist der neue Mix oder eine Kombination aus altem und neuem der alleinigen Verwendung des alten vorzuziehen.

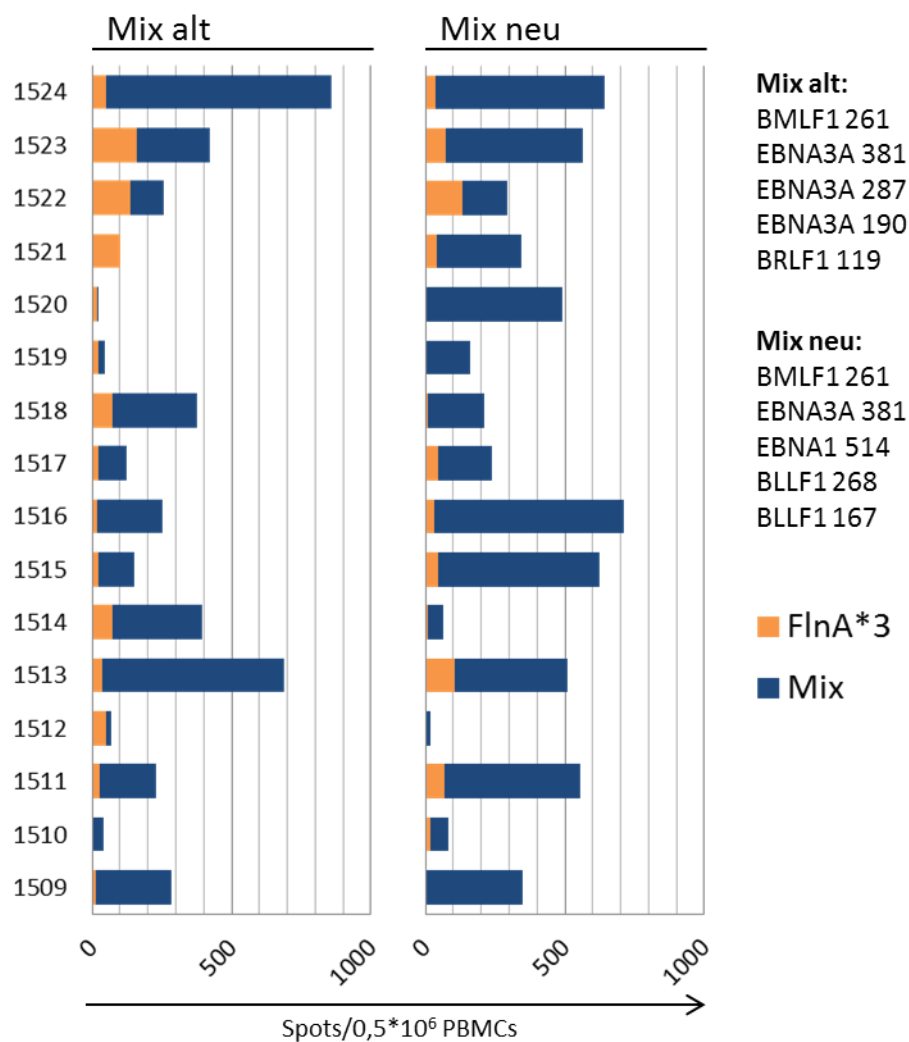


Abbildung 20: Vergleich des Stimulationspotentials von zwei Peptidmischen, die jeweils aus fünf Peptiden bestehen (Vorläufermix: „Mix alt“ und neu zusammengestellter Mix: „Mix neu“). Angegeben ist die mittlere Spotszahl pro Duplikat, die nach Stimulation mit einem der Peptidmische erreicht wurde. Es wurden 16 Spender getestet (1524-1509, Nummerierung links). In orange ist der jeweilige Positivminimalwert (Negativpeptid\*3) dargestellt.

### 3.3.1.3 Einzusetzende Konzentration

Bei einer Stimulation mit einzelnen MHC-Klasse-II-Epitopen wurde standardmäßig eine Peptidkonzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  verwendet. Der Peptidmix, bestehend aus fünf Peptiden, wurde ebenso eingesetzt. Um die Minimal-Konzentration zu bestimmen, die bei vielen Blutspendern zuverlässig EBV-spezifische Zellen stimuliert, wurden PBMCs von acht Spendern nach vorheriger *in vitro*-Amplifikation mit 10  $\mu\text{g/ml}$  mit verschiedenen Konzentrationen von 0,3  $\mu\text{g/ml}$  bis 10  $\mu\text{g/ml}$  getestet. Dies geschah mithilfe eines ELISPOT-Experiments.

In Abbildung 21 ist die konzentrationsabhängige IFN- $\gamma$ -Antwort von sieben Blutspendern dargestellt. Einer der getesteten Spender reagierte nicht (nicht abgebildet). Bei Spender 1388 scheint die maximale Anzahl IFN- $\gamma$ -produzierender Zellen schon bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{g/ml}$  erreicht zu sein; das Ergebnis ist allerdings nicht eindeutig, da ab einer bestimmten Anzahl Spots keine verlässliche Auszählung der Spots mehr möglich ist.

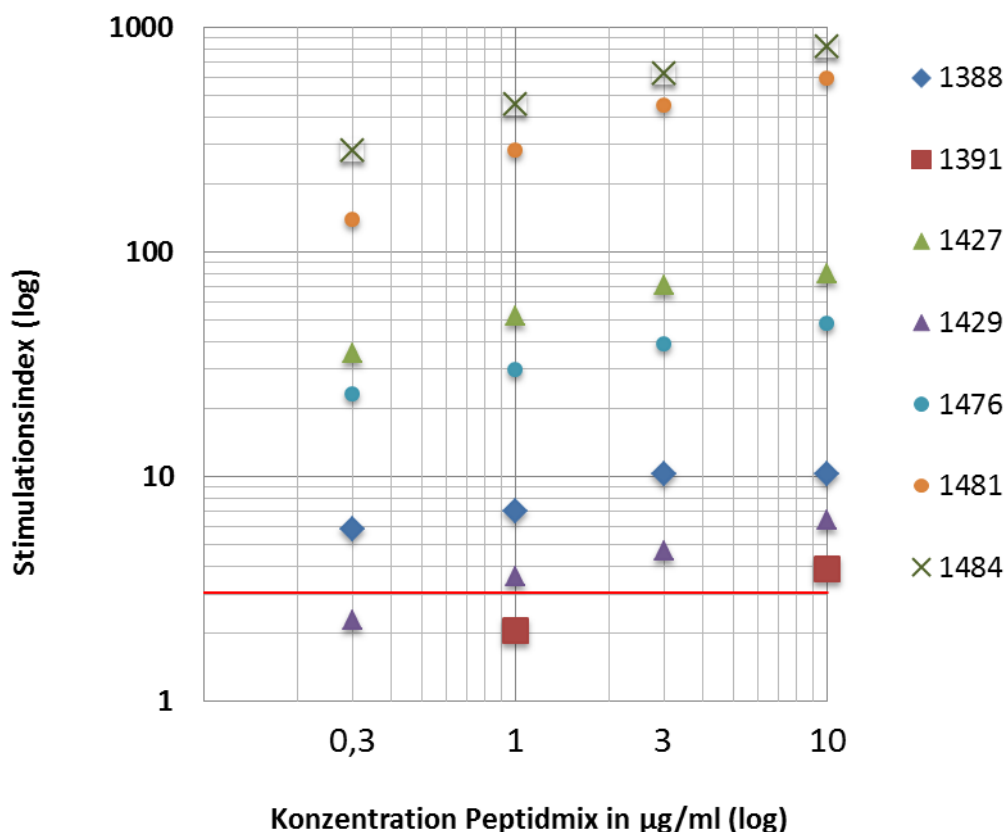


Abbildung 21: Konzentrationsabhängige Stimulation von PBMCs mit dem EBV-Peptidmix gemessen durch ELISPOT. Angegeben ist der Stimationsindex, d.h. das Vielfache der Spotzahl der Negativkontrolle (FlNA) von sieben gesunden Blutspendern (Spender 1388-1484) bei verschiedenen Konzentrationen. Rot eingezeichnet ist der Positivminimalwert (Spotzahl der FlNA-Kontrolle  $\times 3$ )

Bei einer Konzentration von 1 µg/ml ist nur noch bei sechs der acht Spender eine positive Reaktion messbar, bei 0,3 µg/ml immerhin noch bei fünf. Obwohl bei der in diesem und allen anderen Experimenten eingesetzten Konzentration von 10 µg/ml eventuell die maximal zu erreichenden Reaktionen noch nicht erreicht werden, waren bei allen dieser sieben Spender die Spotzahlen über dem dreifachen FlnA-Positivminimalwert und somit positiv.

### 3.3.2 EBV-spezifischer Epitop-Mix aus sieben Peptiden: Mix P

Ein weiterer Peptidmix, bestehend aus sieben Peptiden, wurde nach folgenden Kriterien zusammengestellt:

- Häufig erkannte Epitope
- Epitope aus verschiedenen Antigenen, aus der Latenz sowie aus dem lytischen Zyklus
- Epitope, die natürlich prozessiert und präsentiert werden (vgl. 3.4)

Hierbei wurden von anderen Autoren publizierte Epitope stärker in Betracht gezogen. Es ergab sich folgende Zusammensetzung:

Tabelle 25: Zusammensetzung Mix P

	Gen- Name	Position	Sequenz	Referenz
<b>Latenz</b>	EBNA1	514-527	KTSLYNLRRGTALA	(Khanna et al. 1995)
	EBNA2	276-295	PRSPTVFYNIPMPLPPSQL	(Khanna et al. 1997; Long et al. 2005)
	EBNA3A	381-395	PIFIRRLHRLLLMRA	
<b>Lytische</b>	BRLF1	119- 133	DRFFIQAPSNRVMIP	
<b>Phase</b>	BMRF1	261-275	SVPILRFYRSGIIAV	
	BXLF2	126-140	LEKQLFYIGTMLPNTRPHS	(Long et al. 2011)
	BLLF1	167-181	STNITAVVRAQGLDV	(Wallace et al. 1991)

Mit dieser Kombination an Peptiden konnten IFN-γ produzierende Zellen bei sechzehn von sechzehn getesteten Blutspendern stimuliert werden (siehe Abbildung 22). PBMCs von fünfzehn der verwendeten Spender waren auch für den Test der anderen beiden Peptidmixe verwendet worden. Ein direkter Vergleich der Effizienz der Peptidmixe z.B. anhand der Spotzahlen ist nicht möglich, da es sich um zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführte Experimente handelt. Der aus sieben Peptiden bestehende Mix P ist jedoch mindestens so gut wie der aus fünf Peptiden bestehende Mix dafür geeignet, unabhängig von einer HLA-Typisierung Zellen zu stimulieren.

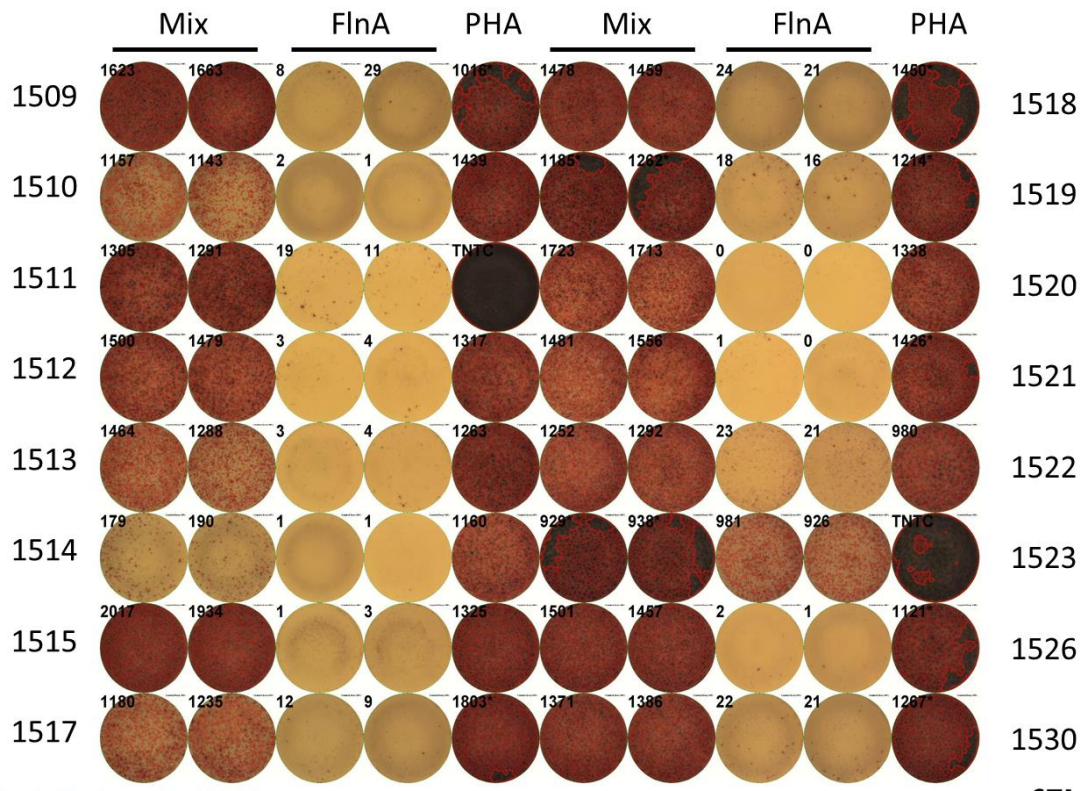


Abbildung 22: Reaktion von 16 Blutspendern auf 10 µg/ml des EBV-Mixes bestehend aus sieben Peptiden (vgl. Tabelle 25). Alle Spitzahlen sind über dem Positivminimalwert.

### 3.3.3 Multifunktionelle Zellen nach Stimulation mit dem Peptidmix

Multifunktionale T-Zellen, d.h. T-Zellen, die auf Aktivierung hin mehrere Funktionen (meist Zytokine) simultan exprimieren, haben sich in verschiedenen Systemen als potenter als monofunktionale Zellen erwiesen. So produzieren multifunktionelle CD4+ Zellen im Mittel auch größere Mengen IFN- $\gamma$  als monofunktionale IFN- $\gamma$ -Produzenten (Kannanganat et al. 2007a). Des Weiteren wurde für verschiedene Erreger gezeigt, dass der Anteil multifunktionaler T-Zellen mit einem Nicht-Fortschreiten einer Infektion korreliert (Betts et al. 2006; Darrah et al. 2007; Kannanganat et al. 2007b; Forbes et al. 2008; Seder et al. 2008; Ferre et al. 2009).

Nach *in vitro*-Amplifikation mit dem EBV-Peptidmix bestehend aus fünf Peptiden (3.3.1) konnten bei allen fünf getesteten EBV-seropositiven Individuen multifunktionelle Mix-spezifische CD4+ Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 23).

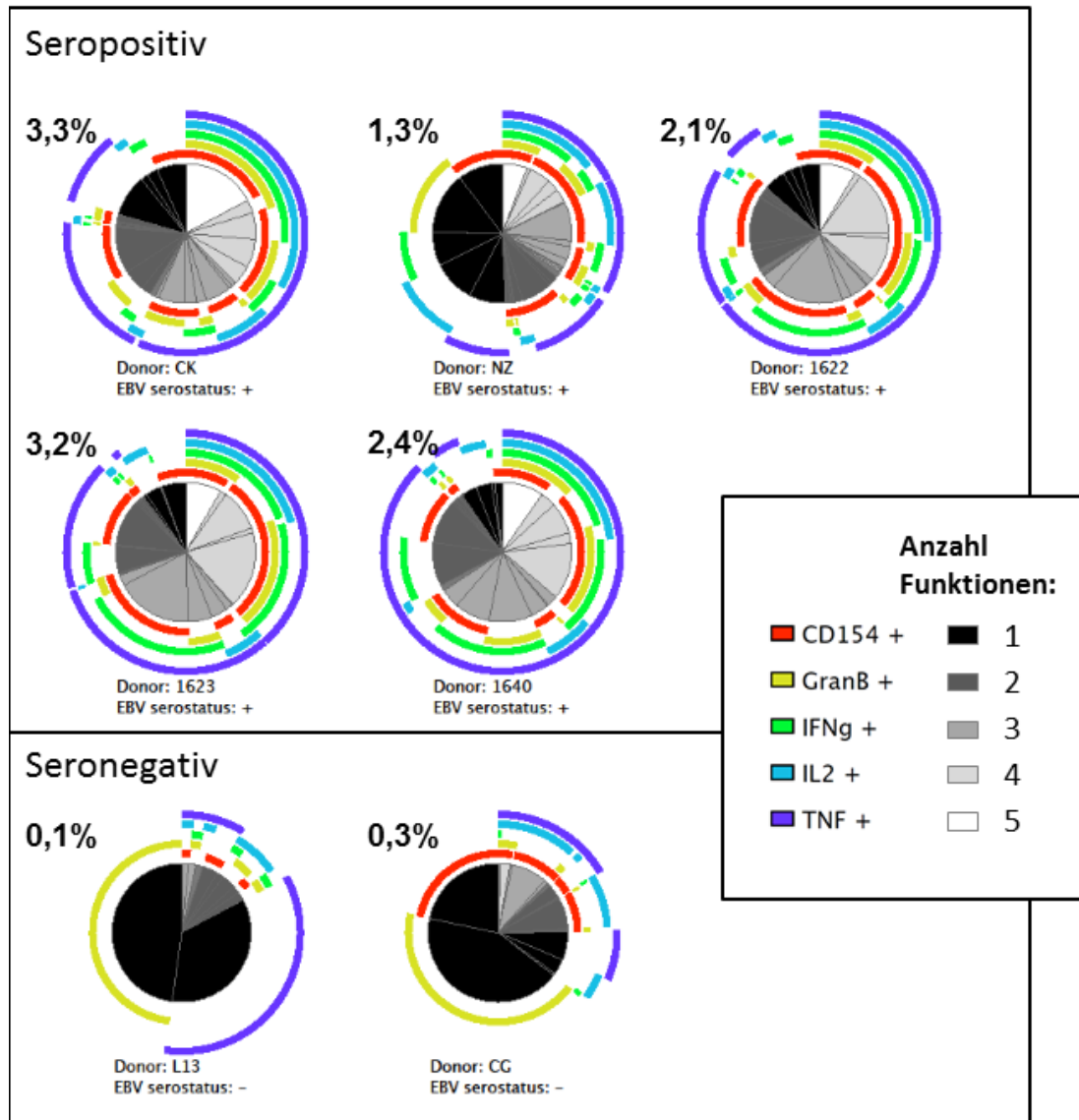


Abbildung 23: EBV-spezifischer 5-Peptid-Mix induziert multifunktionelle CD4+ T-Zellen bei EBV-seropositiven (oben), aber nicht EBV-seronegativen Individuen (unten). Angegebene Prozentzahlen beziehen sich auf den Anteil reagierender Zellen der CD4+ CD8-, lebendigen Einzelzellen. Messung durch ICS. Dargestellt sind Mittelwerte einer Doppelbestimmung abzüglich der Negativ-Peptidkontrolle.

Der Nachweis erfolgte durch ICS. Pro Spender waren 1,3% bis 3,3% der CD4+ T-Zellen positiv für CD154, Granzym B, IFN- $\gamma$ , IL-2 und/oder TNF. Bei allen EBV+ Spendern konnte ein signifikanter Anteil an CD4+ Zellen, die alle fünf Zytokine exprimieren, nachgewiesen werden (weiße Tortenstücke). Bei allen Spendern, außer Spender NZ, exprimierten über 75% der reagierenden CD4+ Zellen mindestens zwei Zytokine. Das Funktionsspektrum der reagierenden Zellen war bei diesen Spendern sehr ähnlich. Fast alle reagierenden Zellen exprimierten TNF (lila Bögen) und/oder CD154 (rote Bögen). Alle Zellen dieser Spender, die vier Marker exprimierten, exprimierten auch TNF. IFN- $\gamma$  (grüne Bögen) war das dritthäufigst exprimierte



Zytokin, gefolgt von IL-2 (blaue Bögen) und Granzym B (gelbe Bögen). Bei Spender NZ war das Funktionsspektrum im Prinzip gleich, nur war der Anteil monofunktionaler Zellen (schwarze Tortenstücke), v.a. der Anteil monofunktional IFN- $\gamma$ , Granzym B oder IL-2 produzierender Zellen größer als bei den anderen Spendern. Im Vergleich dazu produzierten die Zellen der EBV-seronegativen Spender L13 und CG nicht nur weniger Zytokin nach Stimulation mit dem Mix (0,1 bzw. 0,3% über Hintergrund), sondern exprimierten zum größten Teil nur ein Zytokin. Dies lässt darauf schließen, dass der Mix nur bei EBV+ Individuen eine deutliche Antwort, die zudem deutlich multifunktionaler ist, generiert und die detektierte Antwort vermutlich eine EBV-spezifische ist. Ein ähnliches Experiment wurde mit Zellen von acht untypisierten Spendern, deren EBV-Status nicht bekannt war, durchgeführt. Zur Stimulation wurde der aus sieben Peptiden bestehende Mix P (3.3.2) verwendet, gemessen wurde die Mix-spezifische Expression von CD154, TNF, IFN- $\gamma$ , IL-2 und dem von Th2-Zellen exprimierten Zytokin IL-5 nach Amplifikation *in vitro* (Abbildung 24). Der Gesamtanteil reagierender Zellen von CD4+ T-Zellen reichte hier von 0,3% bis zu 25,7% (jeweils über der Negativkontrolle). Insgesamt erschienen die Multifunktionalitätsspektren heterogener als beim Experiment davor. Fast alle reagierenden Zellen des Großteils der Spender exprimierten entweder TNF oder CD154 oder beides (lila bzw. rote Bögen). Eine Ausnahme von dieser Regel bildeten IL-5 exprimierende Zellen (Spender d1765, d1763 und d1543, blaue Bögen) und manche IL-2 exprimierenden Zellen (d1765 und d1763, grüne Bögen). Bei IL-5 handelt es sich um ein typisches Th2-Zytokin, während die anderen einer Typ 1-Antwort und damit Th1-Zellen zuzuordnen sind. Daher entspricht es den Erwartungen, dass IL-5 exprimierende Zellen keines der anderen Zytokine exprimieren und umgekehrt, obwohl Zellen mit gemischtem Th1/Th2-Phänotyp in Mensch und Maus schon beobachtet wurden (Paliard et al. 1988; Hegazy et al. 2010). Pro Spender exprimierten einige, allerdings unterschiedlich viele der reagierenden Zellen alle Th1-assoziierten Zytokine (vier Funktionen, hellgrau). 40% bis zu über 90%, (z.B. bei Spender d1466) der reagierenden Zellen exprimierten mindestens zwei Funktionen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide Mixe dazu geeignet sind, innerhalb kurzer Zeit multifunktionelle EBV-spezifische T-Zellen *in vitro* zu vermehren. Die vermehrten Zellen exprimieren zum Großteil Th1-typische Zytokine und Funktionen.

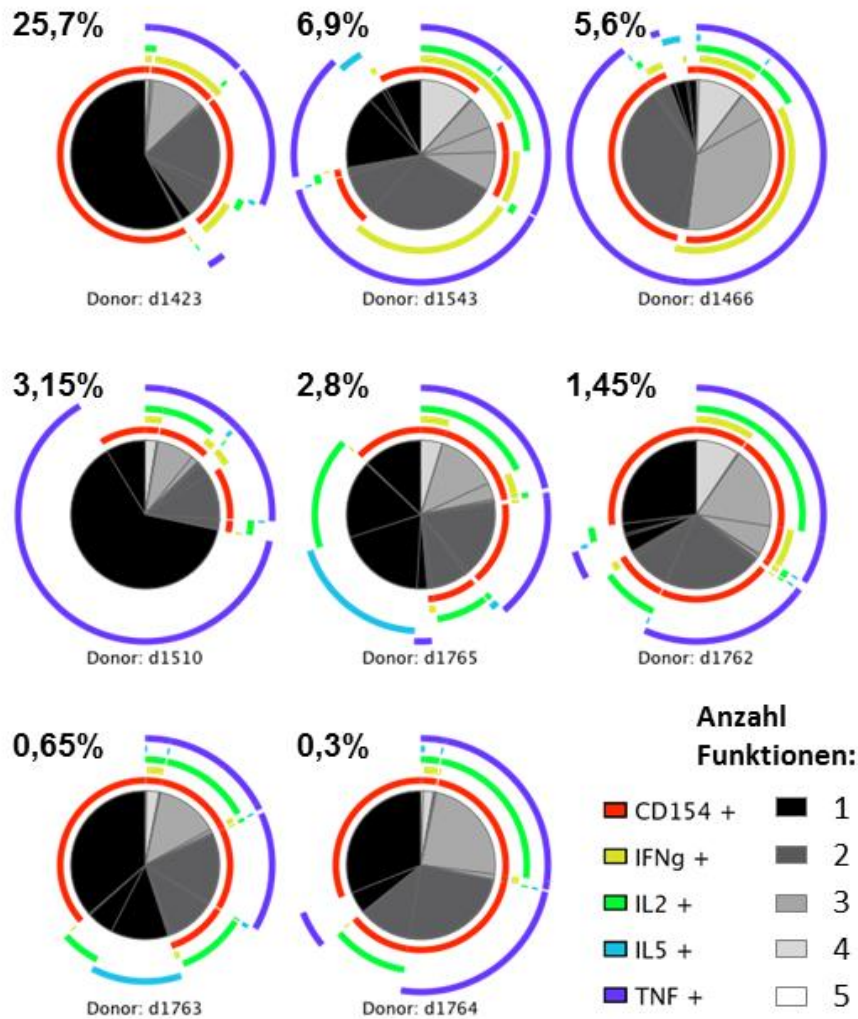


Abbildung 24: Funktionspektren von CD4+ PBMCs acht verschiedener Blutspender nach Stimulation mit Mix P. Messung mittels ICS. Angegebene Prozentzahlen beziehen sich auf den Anteil reagierender Zellen der CD4+ CD8-, lebendigen Einzelzellen. Dargestellt sind Mittelwerte einer Doppelbestimmung abzüglich der Negativ-Peptidkontrolle.

### 3.4 Biologische Relevanz der Epitope

Bei den identifizierten CD4+ Epitopen handelte es sich um synthetisch hergestellte Peptide, die *in silico* aus verschiedenen EBV-Antigenen vorhergesagt wurden. Um nachzuweisen, dass diese Epitope tatsächlich auf EBV-transformierten Zellen präsentiert werden, wurden zwei verschiedene Strategien angewandt. Für beide Strategien wurden EBV-transformierte B-Zellen (*lymphoblastoid cell lines*, LCLs) verwendet. Diese wurden aus Leukapherese-Spenden mit dem EBV-Laborstamm B95-8 generiert. Übrige PBMCs wurden für die Generierung autologer T-Zellklone verwendet. Die HLA-Typisierungen der erfolgreich etablierten Lymphoblastoiden Zelllinien sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst. Detaillierte Informationen wie Batch-

Nummern verwendeter B95-8-Überstände und Spendernummern der Leukapheresespender aller Transformationsversuche sind im Anhang (siehe 6.2, Tabelle 29) zu finden.

Tabelle 26: HLA-Typisierungen der etablierten Lymphoblastoiden Zelllinien bzw. der zugehörigen Leukapheresespender. Sowohl die MHC-Klasse-I-, als auch die MHC-Klasse-II-Typisierungen wurden von der Transfusionsmedizin Tübingen (Frau Dr. Wernet) durchgeführt.

Leuka./ LCL-Nr	HLA Klasse I			HLA Klasse II					
	A	B	Cw	DQ		DR			
<b>1</b>	3 31	7 55	3 7	B1*05		B1*14	B1*16	B3	B5
<b>2<sup>⊗</sup></b>	1 2	7 62	3 7	B1*03	B1*06	B1*04	B1*15	B4	B5
<b>3</b>	1 2	62 63	3 7	nb					
<b>5</b>	24 29	44	5	B1*03		B1*04	B1*07	B4	
<b>6</b>	2 26	7 18	7	B1*03	B1*06	B1*11	B1*15	B3	B5
<b>7<sup>⊗</sup></b>	1 2	7 62	3 7	B1*03	B1*06	B1*04	B1*15	B4	B5
<b>8</b>	24	18 27	2 7	B1*03		B1*04	B1*11	B3	B4
<b>9</b>	1 2	8	7	nb					
<b>10</b>	1 26	7 62	1 7	B1*05	B1*06	B1*01	B1*15	B5	
<b>11</b>	1 2	8 18	7	B1*02	B1*03	B1*03	B1*11	B3	

⊗ Leukapheresespender höchstwahrscheinlich dieselbe Person oder eineiiges Zwillingsspaar (vgl. auch Blutgruppe und CMV-Status in Tabelle 29), nb: nicht bekannt

LCLs exprimieren, wie auch untransformierte B-Zellen, sowohl MHC-Klasse-I- als auch MHC-Klasse-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Dies wurde auch bei den selbst-generierten LCLs gezeigt (nicht abgebildet).

### 3.4.1 Indirektes Nachweisverfahren mit epitopspezifischen CD4+ T-Zellklonen

CD4+ T-Zellen, die spezifisch für die identifizierten Epitope sind, sollten spezifisch autologe EBV-infizierte B-Zellen (LCLs) erkennen, wenn diese die Epitope in ausreichender Menge präsentieren. So kann indirekt gezeigt werden, dass die Epitope endogen exprimiert, prozessiert und präsentiert werden. Um dies zu zeigen, wurden mittels durchflusszytometrischer Sortierung nach IFN- $\gamma$ -Capture Einzelzellklone generiert. Eine Übersicht über die Strategie findet sich in Abbildung 25.

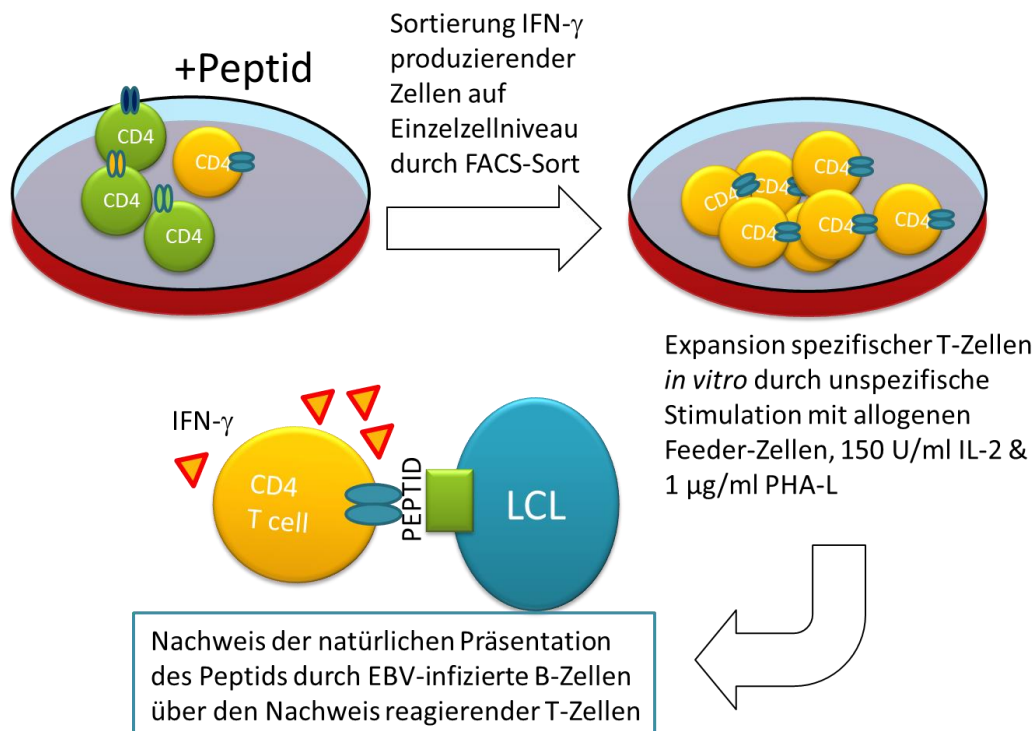


Abbildung 25: Schematische Übersicht über den Nachweis von Epitopen auf der Oberfläche von EBV-infizierten B-Zellen (LCLs).

Anwachsende T-Zellklone wurden mit Peptid stimuliert und mittels ICS auf ihre Peptidspezifität getestet. Bei der Stimulation wurden keine antigenpräsentierenden Zellen zugegeben, da aktivierte CD4+ T-Zellen selbst MHC-Klasse-II auf ihrer Oberfläche exprimieren und damit präsentieren können (Ko et al. 1979; Pawelec and Bühring 1990; Barnaba et al. 1994). Die getesteten CD4+ Klone zeigten eine ähnlich hohe HLA-DR-Expression wie eine als Kontrolle mitgeführte LCL-Linie, während die Expressionsstärke von HLA-DQ zwar von Klon zu Klon variierte, aber bei allen deutlich über der Isotypkontrolle lag (Abbildung 26).

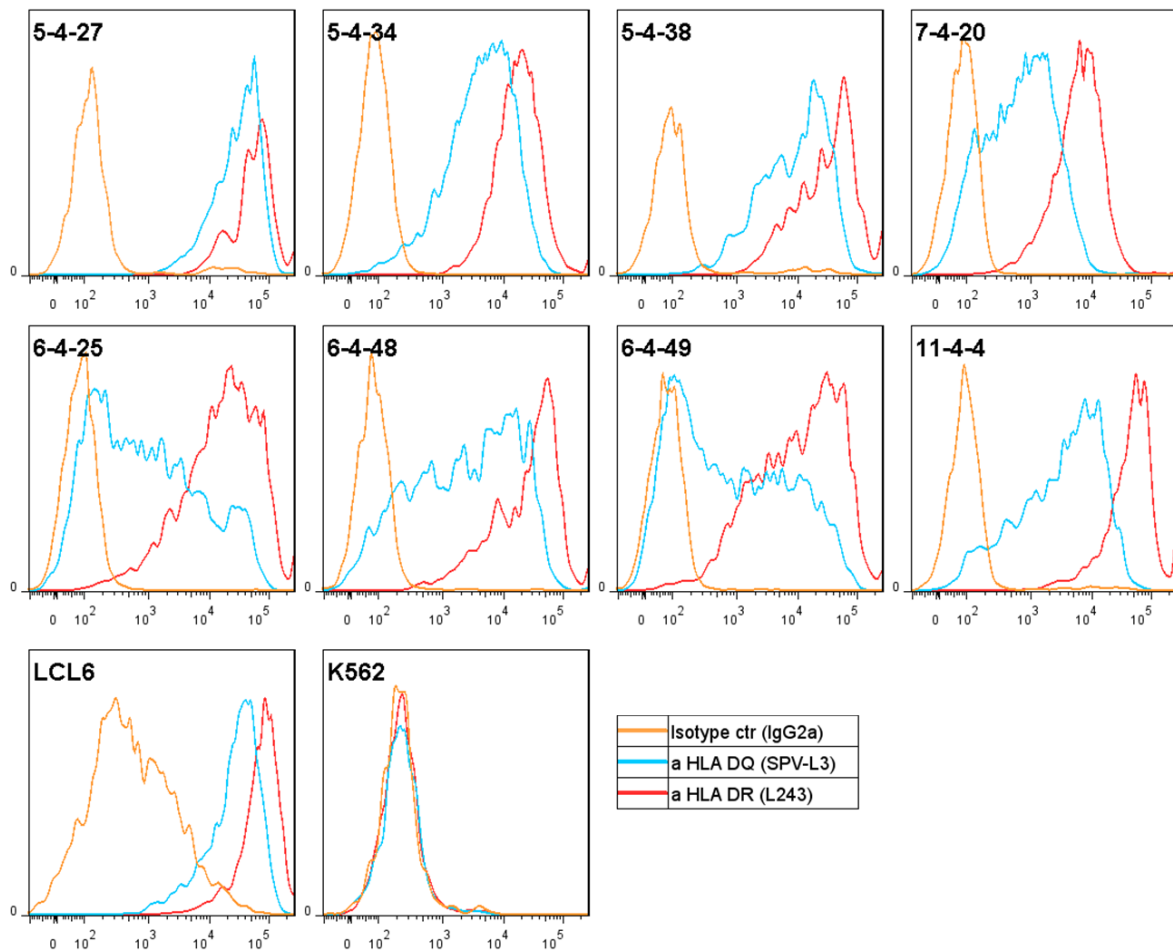


Abbildung 26: CD4<sup>+</sup> T-Zellklone spezifisch für verschiedene EBV-Epitope (5-4-27 bis 11-4-4) exprimieren HLA-DR (rote Linie) in ähnlicher Stärke wie die lymphoblastoide Zelllinie LCL6. Die HLA-DQ-Expression (blau) variiert von Klon zu Klon. Isotype ctr: Isotypkontrolle, orange. K562: Negativkontrolle, da HLA-negativ (Koeffler and Golde 1980).

Insgesamt konnten CD4<sup>+</sup> T-Zell-Klone spezifisch für sieben verschiedene Peptide generiert werden. Alle Klone erhielten eine Bezeichnung nach dem Schema „Leukapheresespenders-Sort-Klon“. Als Standardauswertung wurde die intrazelluläre IFN- $\gamma$ - und TNF-Färbung gewählt. Die Ergebnisse werden im Nachfolgenden nach Peptiden abgehandelt, und in 3.4.1.5 zusammengefasst.

### 3.4.1.1 BMRF1 261-spezifische Klone

Es konnten BMRF1 261-spezifische Klone von drei verschiedenen Spendern (Spender 1, 5 und 7) generiert werden. Die Klone von Spender 1 und 7, 1-1-8 und 7-1-1 produzierten sowohl IFN- $\gamma$  als auch TNF nach Stimulation mit 10  $\mu$ g/ml BMRF1 261, Klon 5-4-27 produzierte hauptsächlich TNF (siehe Abbildung 27, links). Titrierte man die Klone mit verschiedenen Konzentrationen an Peptid wurde deutlich, dass die Klone unterschiedliche Aviditäten aufweisen (Abbildung 27, rechts). CD4<sup>+</sup> Th1-Zellklone können, je nach Stärke der Aktivierung ihres T-Zellrezeptors, verschiedene Zytokine exprimieren, wie Itoh *et al.* 1997 anhand der IL-2- und IFN- $\gamma$ -Expression

von Th1-Zellklonen nach Peptidtitration zeigte (Itoh and Germain 1997). Die Autoren beobachteten dabei, dass eine stärkere Aktivierung der Zellen nötig war, um eine IL-2-Expression zu initiieren als eine IFN- $\gamma$ -Expression. Analog dazu sieht man hier die unterschiedliche Expression von TNF und IFN- $\gamma$ . Bei schwächerer Aktivierung durch geringere Peptidkonzentration produzieren die Klone hauptsächlich TNF. Wird die Peptidkonzentration und damit die Aktivierung der Zellen erhöht, steigt bei allen drei Klonen der Anteil IFN- $\gamma$ - und TNF-doppelpositiver Zellen. Bei einer Überaktivierung dagegen, hier nur beim hochspezifischen Klon 7-1-1, nimmt dieser Anteil wieder ab.

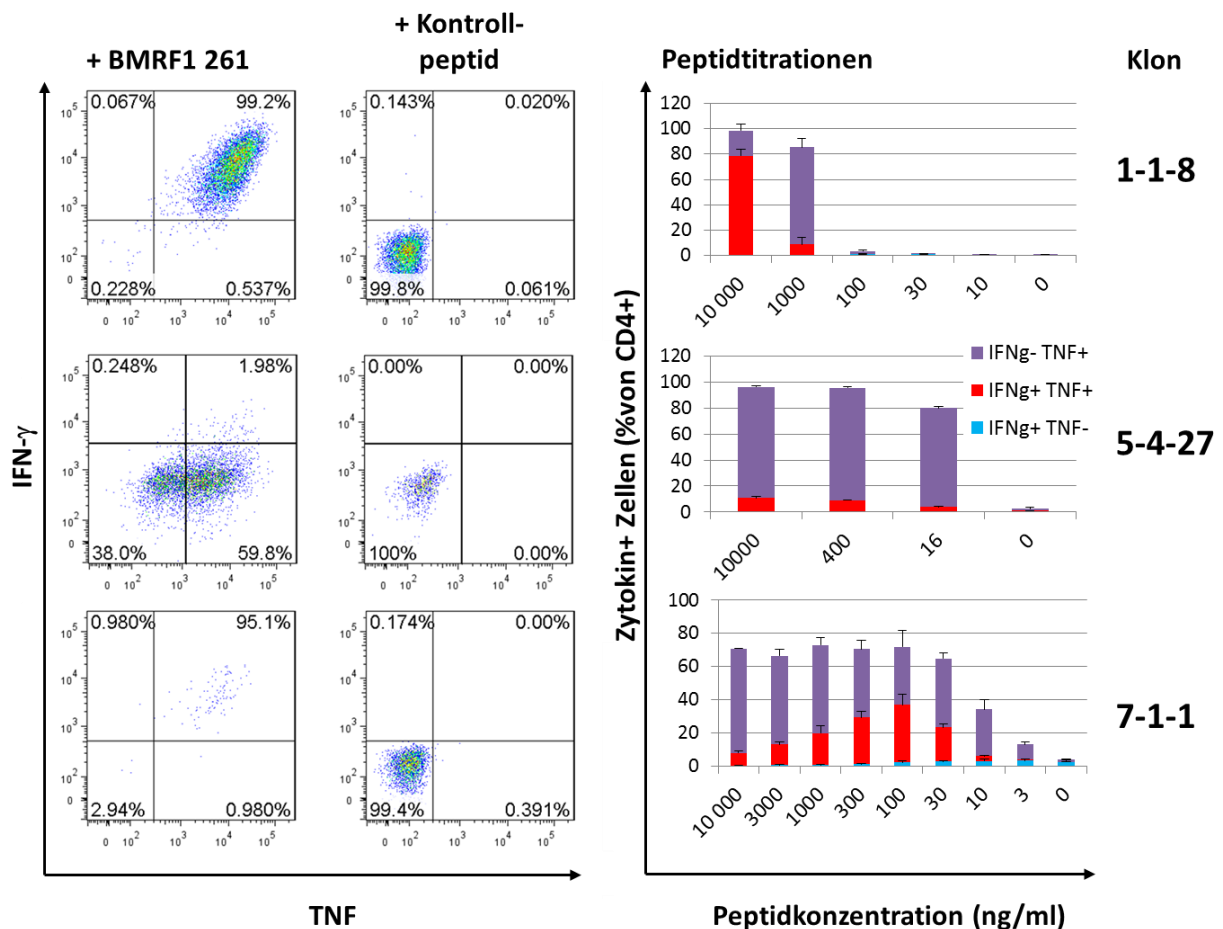


Abbildung 27: CD4+ T-Zellklone von drei verschiedenen gesunden Blutspendern, Spender 1, 5 und 7, sind spezifisch für BMRF1 261. T-Zellklone wurden mit 10  $\mu$ g/ml BMRF1 261 bzw. Kontrollpeptid (links) oder verschiedenen Peptidkonzentrationen (rechts) über Nacht stimuliert und intrazellulär auf IFN- $\gamma$ - und TNF-Expression gefärbt. Abgebildet sind CD4+ T-Zellen.

Eine Bestimmung der Peptidkonzentration, bei der eine halbmaximale Antwort (R50) in Form von TNF- und/oder IFN- $\gamma$ -Expression erreicht wurde, ergab R50-Werte von 8 ng/ml für Klon 7-1-1 und 340 ng/ml für Klon 1-8-8 (s. Abbildung 28). Für Klon 5-4-27 ließ sich der Wert wegen zu wenigen Messpunkten nicht gut bestimmen, musste aber unter 16 ng/ml liegen.

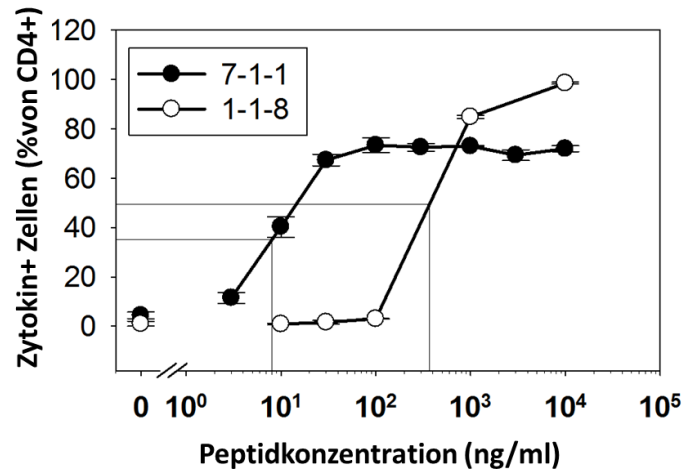


Abbildung 28: Bestimmung der R50-Werte (Peptidkonzentration, bei der eine halbmaximale Antwort in Form von TNF- und/oder IFN- $\gamma$ -Expression erreicht wird) von den BMRF1 261-spezifischen Klonen 1-8-8 und 7-1-1.

Wie in Abbildung 29 zu sehen, erkannten sowohl die Klone 1-1-8 und 7-1-1 spezifisch autologe LCLs ohne vorherige Peptidbeladung. Daraus folgt, dass das Epitop BMRF1 261 durch EBV-infizierte B-Zellen präsentiert werden kann. Klon 5-4-27 exprimierte keines der beiden gemessenen Zytokine nach Koinkubation mit autologen LCLs. Das könnte darauf zurück zu führen sein, dass der Klon die LCLs aufgrund zu niedriger Avidität nicht erkannte, oder dass er sie erkannte, aber Aktivierungsmarker exprimierte, welche in diesem Experiment nicht gemessen wurden (z.B. CD154). Dass die LCLs das frühe lytische Antigen BMRF1 nicht exprimierten bzw. aufgenommen haben ist unwahrscheinlich, da Klone spezifisch für das späte lytische Antigen BLLF1 167 dieselben LCLs verlässlich erkannt haben.

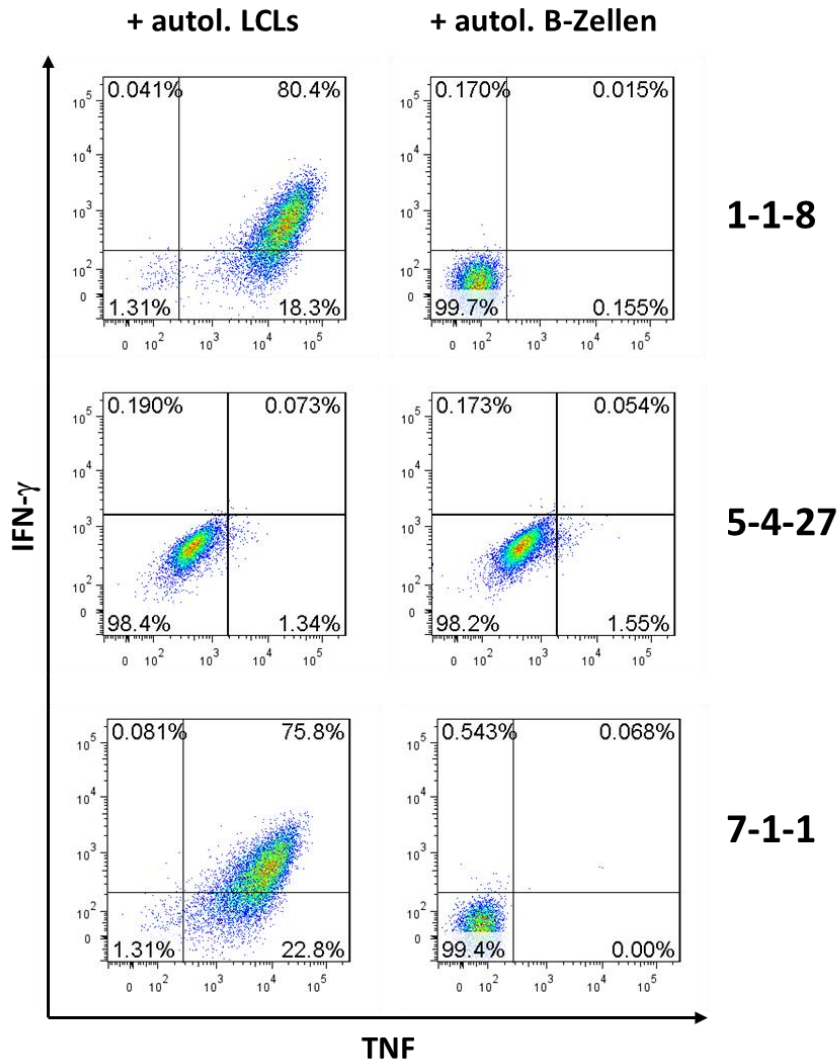


Abbildung 29: Erkennung autologer lymphoblastoider Zelllinien durch CD4<sup>+</sup> BMRF1 261-spezifische T-Zellklone. Die Klone wurden über Nacht im Verhältnis 1:1 mit autologen EBV-infizierten Zellen oder autologen B-Zellen kokultiviert und eine intrazelluläre Zytokinfärbung durchgeführt. Abgebildet sind nur CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Die Konfrontation von Klon 7-1-1 mit verschiedenen allogenen LCLs ergab eine HLA-DRB1\*15:01-vermittelte Präsentation des Peptids. Der Klon erkannte die HLA-DRB1\*15:01-homozygote Zelllinie MGAR ohne vorherige Peptidbeladung (s. Abbildung 30). Die LCL-Linie des DRB1\*14 und DRB1\*16-typisierten Spender 1 wird von Klon 7-1-1 nicht erkannt, was eine DRB5-vermittelte Präsentation ausschließt. Eine Präsentation durch DRB1\*1501 ist konsistent mit der hohen Bindungsaffinität des Peptids zum Molekül (vgl. Tabelle 22). Da Spender 1 nicht Träger dieses Allels ist, muss BMRF1 261 in der Tat promiskuitiv präsentiert werden.



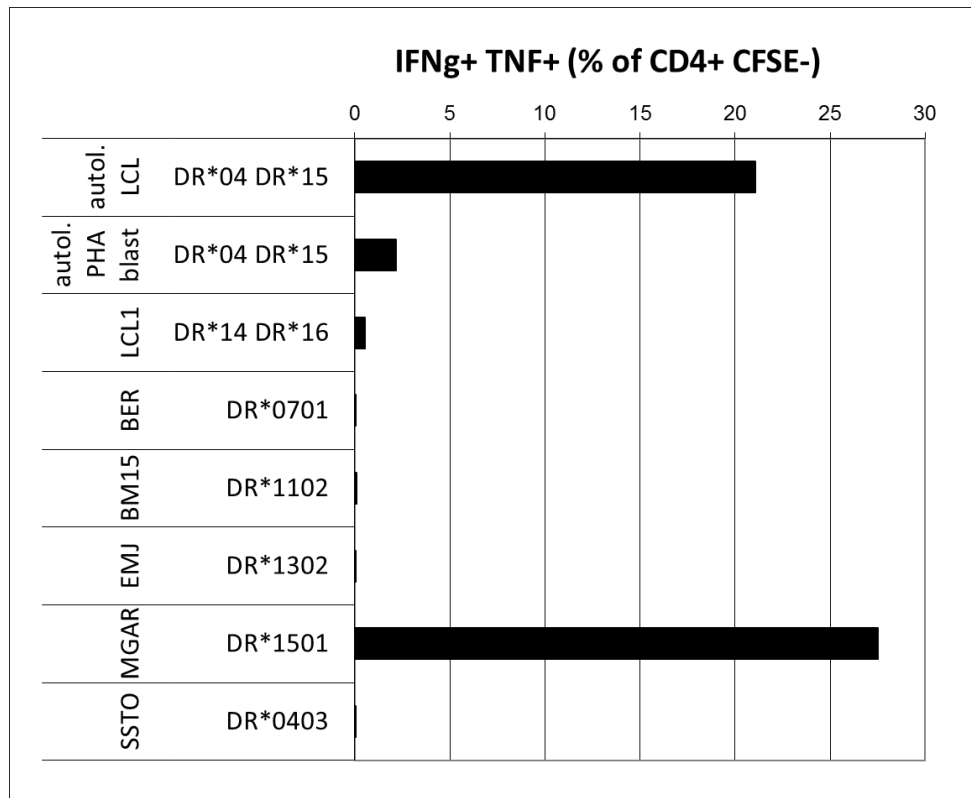


Abbildung 30: Stimulation von Klon 7-1-1 mit verschiedenen allogenen LCLs ohne vorherige Peptidbeladung (Typisierung angegeben). Messung Zytokin+ Zellen per ICS. Als Kontrollen dienten autologe LCLs und PHA-Blasten. Zielzellen wurden mit CFSE markiert um eine Differenzierung der CD4+ PHA-Blasten und der CD4+ T-Zellklone zu ermöglichen.

#### 3.4.1.1.1 Multifunktionalität der Klone

Die Klone 1-8-8 und 7-1-1 zeigten nach etwa zehn Wochen in Kultur immer noch eine relativ stark ausgeprägte Multifunktionalität (s. Abbildung 31). Bei Klon 1-1-8 exprimierten über 90% mehr als zwei Marker, über 30% sowohl CD154, Granzym B, IFN- $\gamma$ , IL-2 als auch TNF nach Stimulation mit 10  $\mu$ g/ml Peptid. Bei Klon 7-1-1, der bei dieser Peptidkonzentration schon überaktiviert ist (vgl. Abbildung 27), exprimierten etwa 5% alle Marker, während ein großer Teil der Zellen nur Granzym B exprimierte.

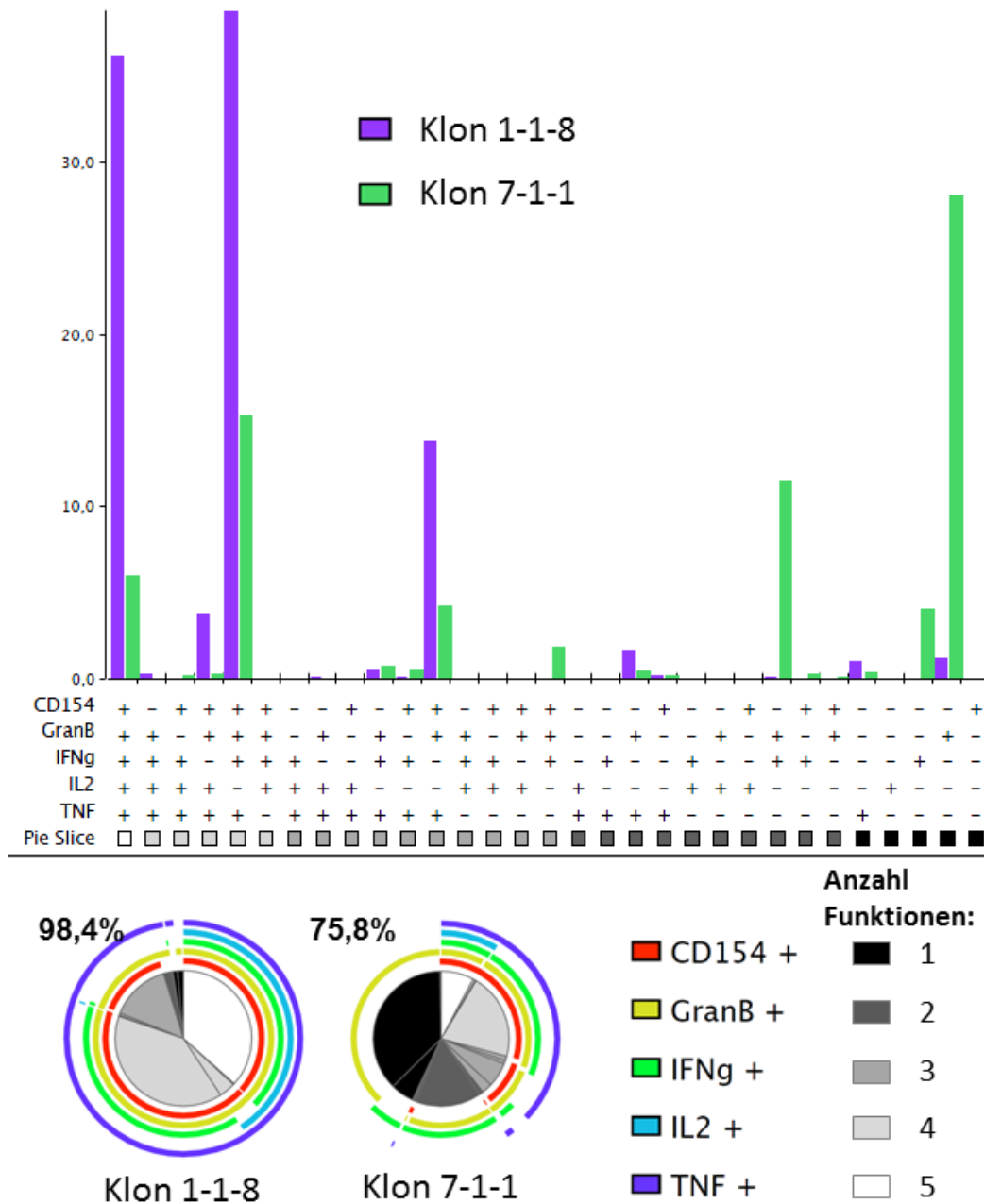


Abbildung 31: Multifunktionalität der BMRF1 261-spezifischen Klone 1-1-8 und 7-1-1 nach Stimulation mit 10 µg/ml Peptid nach 10 Wochen in Kultur.

### 3.4.1.2 BLLF1-spezifische Klone

Insgesamt wurden 22 BLLF1 167-spezifische Klone von drei verschiedenen Spendern (Spender 5, 6 und 7) und 4 BLLF1 268-spezifische Klone von zwei verschiedenen Spendern (Spender 5 und 11) generiert. Bei den BLLF1 167-spezifischen Klonen gab es wieder hochavide Klone mit sehr niedrigen R50-Werten und Klone geringerer Avidität. In Abbildung 32 sind Peptidtitrationen von vier Klonen von Spender 6 dargestellt. Während Klon 6-3-47 schon bei

etwa 5 ng/ml eine halbmaximale Zytokinexpression zeigt und Klon 6-4-49 sogar bei weniger als 3 ng/ml, liegen die R50-Werte von 6-4-25 und 6-3-63 bei 25 bzw. 190 ng/ml.

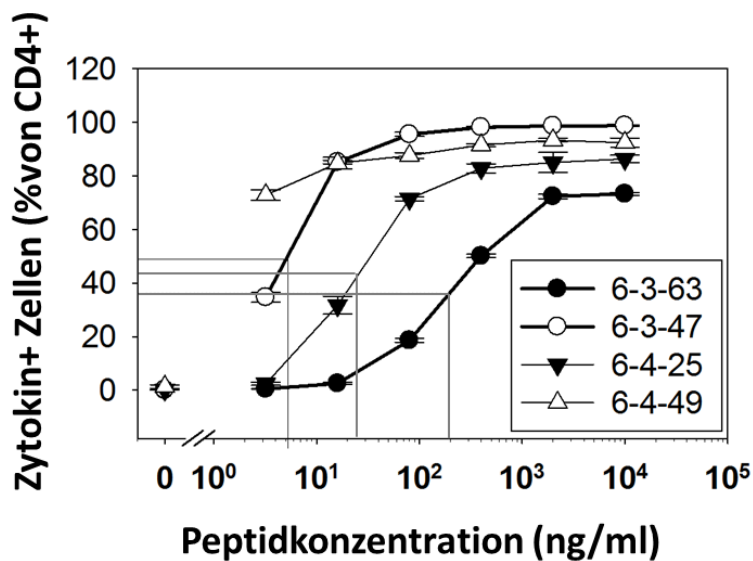


Abbildung 32: Peptidtitrationen von BLLF1 167-spezifischen Klonen. Alle stammen von Spender 6 und unterscheiden sich stark in ihren R50-Werten. Gemessen wurden TNF und/oder IFN- $\gamma$  produzierende Zellen durch ICS.

Auch hier trifft zu, dass hochavide Klone autologe LCLs erkennen und schwächer avide nicht. Alle drei höher aviden Klone aus obigem Beispiel erkennen autologe LCLs in ähnlicher Stärke wie mit 10  $\mu$ g/ml Peptid beladene Zellen, nur Klon 6-3-63, der schwach avide Klon, nicht (s. Abbildung 33). Hier ist die Erkennung autologer LCLs gemessen an der Expression von IFN- $\gamma$  und TNF schwach.

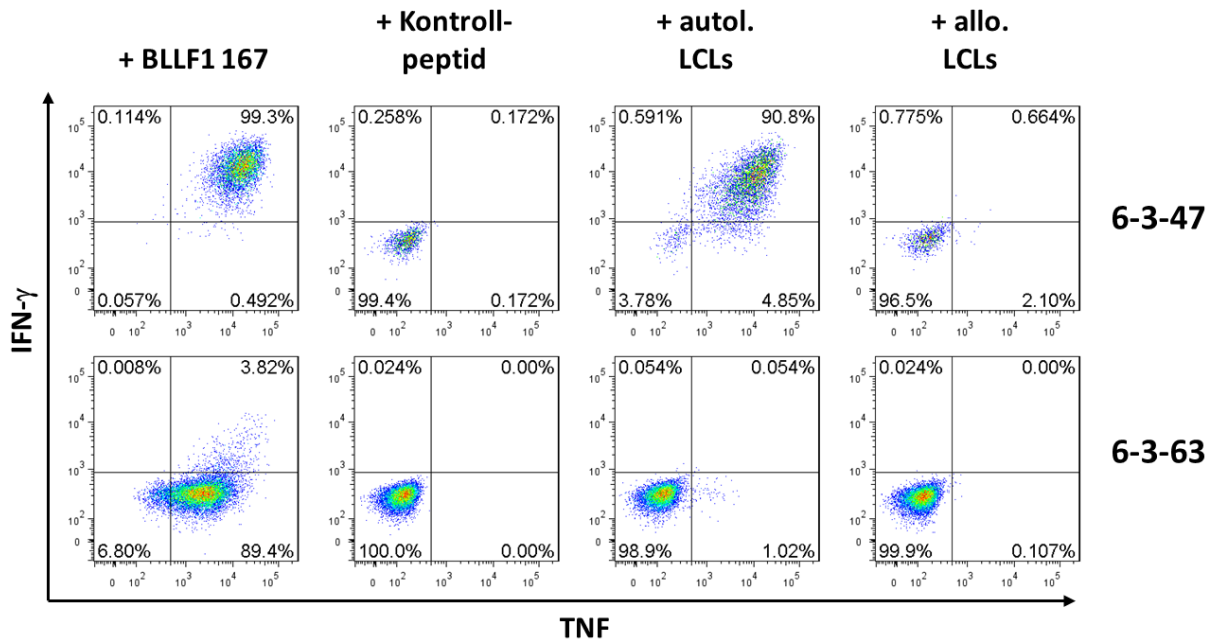


Abbildung 33: Erkennung von LCLs durch BLLF1 167-spezifische Klone von Donor 6 mit verschiedenen Aviditäten. Klone wurden mit 10  $\mu$ g/ml BLLF1 167, Kontrollpeptid, autologen oder allogenen LCLs 1:1 über Nacht konfrontiert und die IFN- $\gamma$  und TNF Produktion intrazellulär gemessen. Allogene LCLs: EMJ (DQA1\*01:02, DQB1\*06:04, DRB1\*13:02, DRB3\*03:01)

Insgesamt stammten 17 der insgesamt 22 BLLF1 167-spezifischen Klone von Donor 6. Sechs davon reagierten kaum oder gar nicht auf autologe LCLs und produzierten hauptsächlich TNF auf Stimulation mit 10  $\mu$ g/ml Peptid. Die anderen reagierten stark auf Peptid und LCLs. Des Weiteren stammte ein Klon von Spender 7 und vier von Spender 5. Alle erkannten autologe LCLs HLA-DR-vermittelt, wie in Abbildung 34 gezeigt. Da die Spender mit DRB1\*04, DRB1\*07 und DRB4 (Spender 5), DRB1\*11, DRB1\*15, DRB3 und DRB5 (Spender 6) und DRB1\*04, DRB1\*15, DRB4 und DRB5 (Spender 7) unterschiedlichen HLA-Typisierungen aufweisen (s. Tabelle 26), muss BLLF1 von mindestens zwei verschiedenen Allotypen präsentiert werden. Unter Einbeziehung des MHC-Klasse-II Bindungsassays (vgl. Tabelle 22), der DRB1\*04 und die getesteten DRB3, DRB4 und DRB5 Allele ausschließt, ergäbe sich eine DRB1\*07- und DRB1\*15-vermittelte Präsentation. Eine zusätzliche DRB1\*11-vermittelte Präsentation ist nicht auszuschließen.

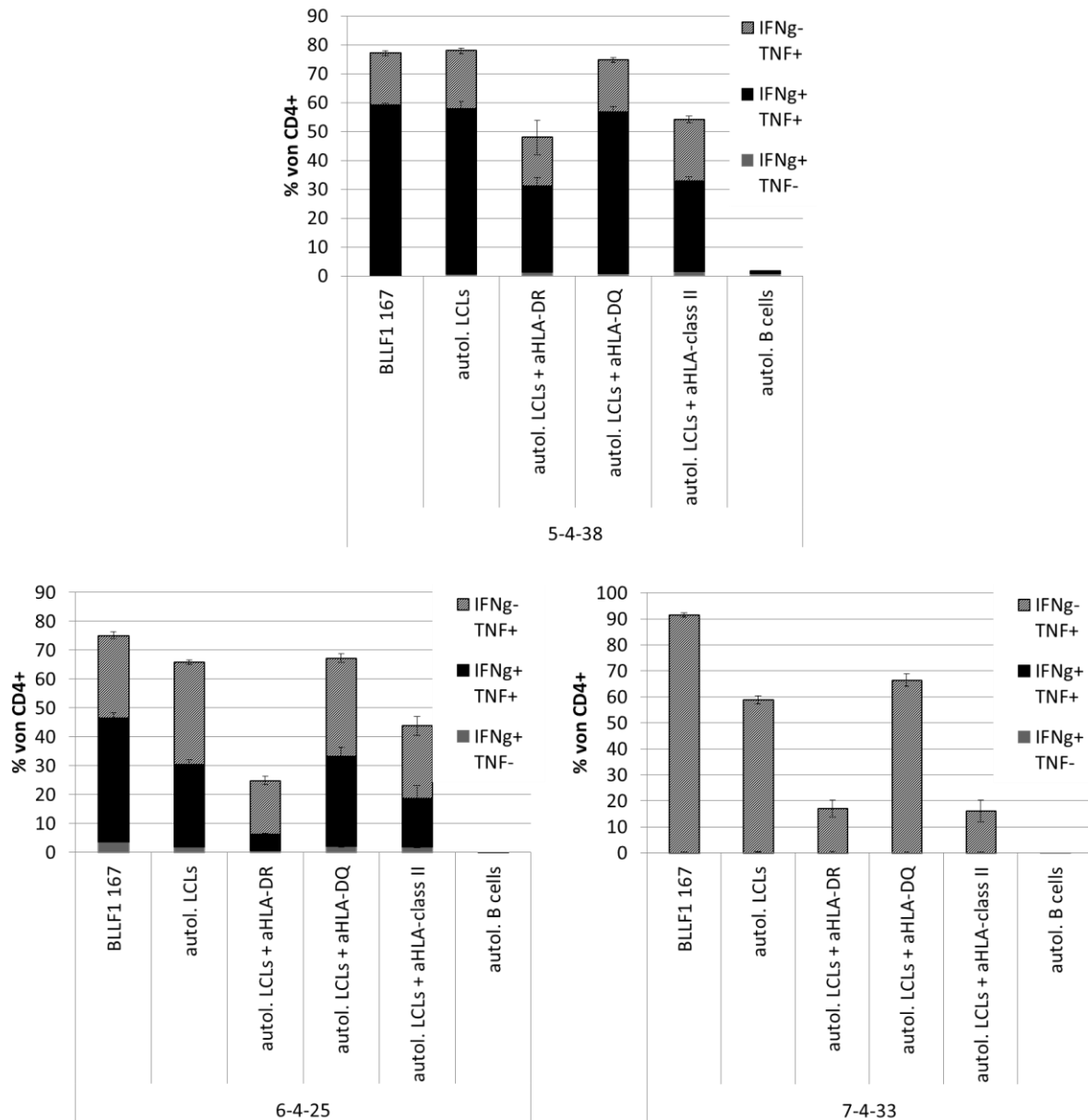


Abbildung 34: HLA-DR-vermittelte Erkennung von BLLF1 167-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellklonen dreier Spender (5, 6 und 7). Die Klone wurden über Nacht mit 10 µg/ml BLLF1 167, autologen LCLs oder autologen B-Zellen im Verhältnis 1:1 kokultiviert. LCLs waren entweder unbehandelt oder mit 10 µg/ml anti-HLA-DR, -DQ oder anti-HLA-Klasse-II für eine Stunde vorinkubiert, also blockiert worden.

Eine CD107a-Expression wird mit zytotoxischer Aktivität assoziiert (Betts and Koup 2004). Bei allen drei Klonen konnte bei einem Teil der Zellen eine leicht erhöhte Expression von CD107a nach Stimulation mit autologen LCLs im Vergleich zur Stimulation mit allogenen Kontroll-LCLs detektiert werden (s. Abbildung 35). Der Anteil an Zellen mit einer erhöhten CD107a-Expression war bei den Klonen 6-4-25 und 7-4-33 vergleichbar mit dem Anteil an Zellen der nach Stimulation mit 10 µg/ml BLLF 167 eine erhöhte CD107a-Expression zeigte. Bei Klon 5-4-38 ließ die Zellzahl leider keine Peptidkontrolle zu.

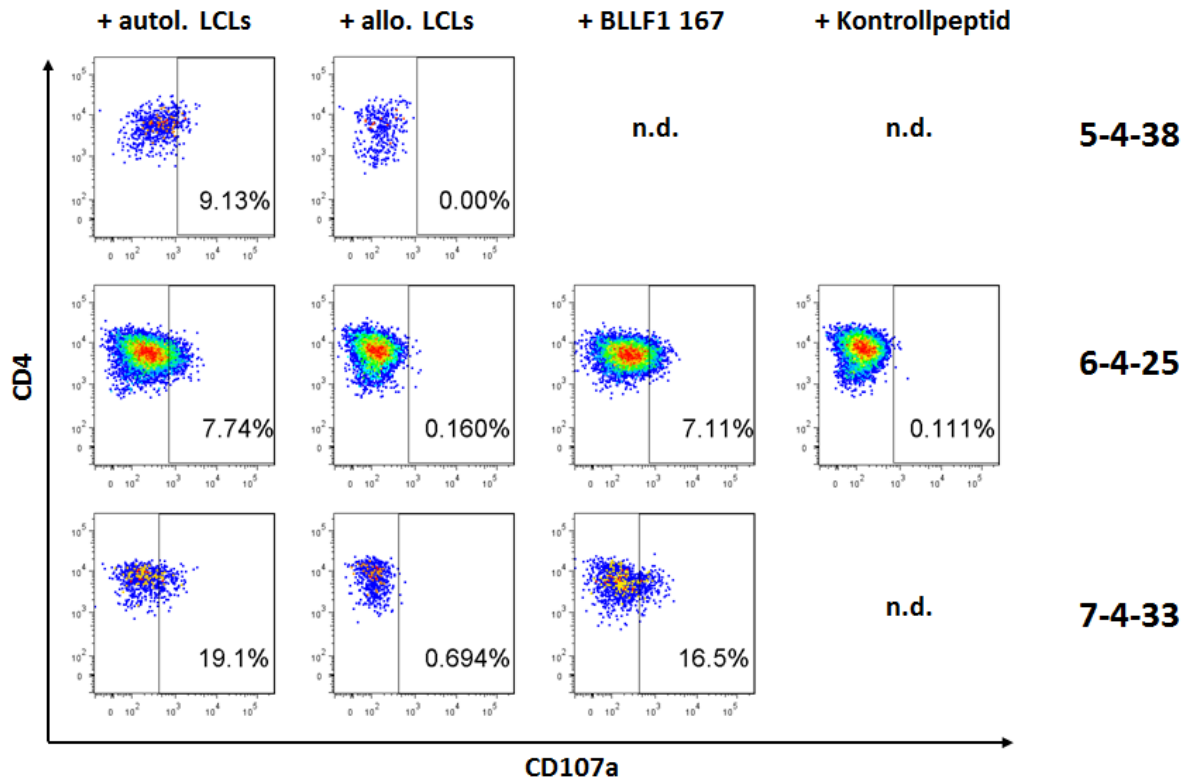


Abbildung 35: CD107a-Expression von BLLF1 167-spezifischen Klonen nach Stimulation mit autologen LCLs.

Drei BLLF1 268-spezifische Klone stammten von Spender 11 (DQB1\*02, DQB1\*03, DRB1\*03, DRB1\*11, DRB3), einer stammte von Spender 5 (DQB1\*03, DQB1\*03, DRB1\*04, DRBI\*07, DRB4). Gemessen an der IFN- $\gamma$ - und TNF-Expression reagierten alle vier stark auf 10  $\mu$ g/ml Peptid. Nichts desto trotz erkannte keiner der Klone autologe LCLs (s. Abbildung 36). Da im selben Experiment die Erkennung von LCL5 von autologen BLLF1 167-spezifischen Klonen nachgewiesen wurde, musste das Antigen exprimiert werden. Alle drei Klone von Spender 11 reagieren stärker auf die allogene LCL-Linie EMJ (DQA1\*01:02, DQB1\*06:04, DRB1\*13:02, DRB3\*03:01), welche mit dem Spender wahrscheinlich in der DRB3\*03:01-Typisierung übereinstimmt. Man könnte vermuten, dass BLLF1 268 über die sekundären DRB-Moleküle präsentiert wird und diese aus irgendeinem Grund nur ungenügend auf den autologen LCLs präsentiert wurden. Sowohl DRB\*03:01 als auch DRB\*04:01 wurden durch den MHC-Klasse-II-Bindungsassay als sehr gut bindend eingestuft (vgl. Tabelle 22).

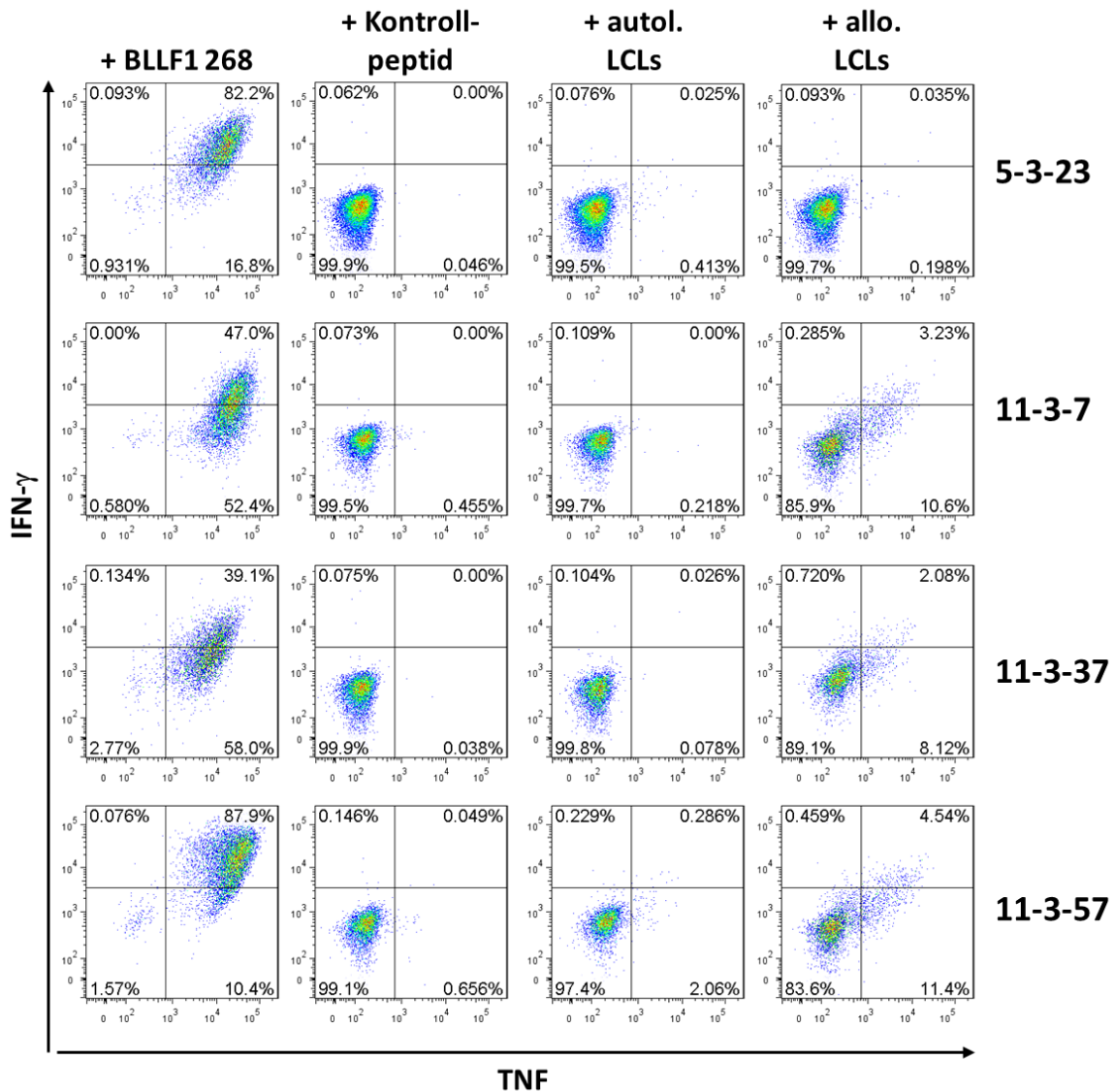


Abbildung 36: Erkennung von LCLs durch BLLF1 268-spezifische Klone von zwei verschiedenen Spendern (5 und 11). Klone wurden mit 10 µg/ml BLLF1 268, Kontrollpeptid, autologen oder allogenen LCLs 1:1 über Nacht konfrontiert und die IFN-γ- und TNF-Produktion intrazellulär gemessen. Allogene LCLs: EMJ (DQA1\*0102, DQB1\*0604, DRB1\*1302, DRB3\*0301).

Eine naheliegende Erklärung für die fehlende Erkennung der autologen LCLs ist natürlich, dass das erkannte Peptid nicht EBV-spezifisch ist. Daher wurde nach homologen Sequenzen in Proteinen anderer Organismen mithilfe der Blast-Funktion in NCBI gesucht. Tatsächlich sind die ersten neun Aminosäuren des Peptids BLLF1 268, PRPVSRFLGNN S ILY, zu 100% homolog zu einer Sequenz aus einem Protein aus dem fakultativ pathogenen Pilz *Aspergillus clavatus*, dem HPP family protein. Um diese Hypothese zu testen, wurde die homologe Sequenz mit den angrenzenden Aminosäuren aus dem HPP family protein nachsynthetisiert, und die Klone auf eine Erkennung getestet. Es konnte weder eine IFN-γ- noch eine TNF-Produktion beobachtet

werden. Als dritte Möglichkeit bliebe noch, dass das Peptid in zu geringer Menge präsentiert wurde und die Klone zu wenig aviden waren.

### 3.4.1.3 Klone spezifisch für EBNA3A 381 und EBNA1 514

Drei CD4+ T-Zellklone waren spezifisch für das latente Antigen EBNA3A. Alle drei EBNA3A 381-spezifischen Klone stammten von Spender 8 (DQB1\*03, DRB1\*04, DRB1\*11, DRB3, DRB4) und produzierten in hohem Maße sowohl IFN- $\gamma$  als auch TNF nach Stimulation mit 10  $\mu$ g/ml Peptid. Alle drei Klone reagieren auf eine Stimulation mit autologen LCLs, wenn auch in schwächerem Ausmaß als auf die Stimulation mit Peptid (vgl. Abbildung 37).

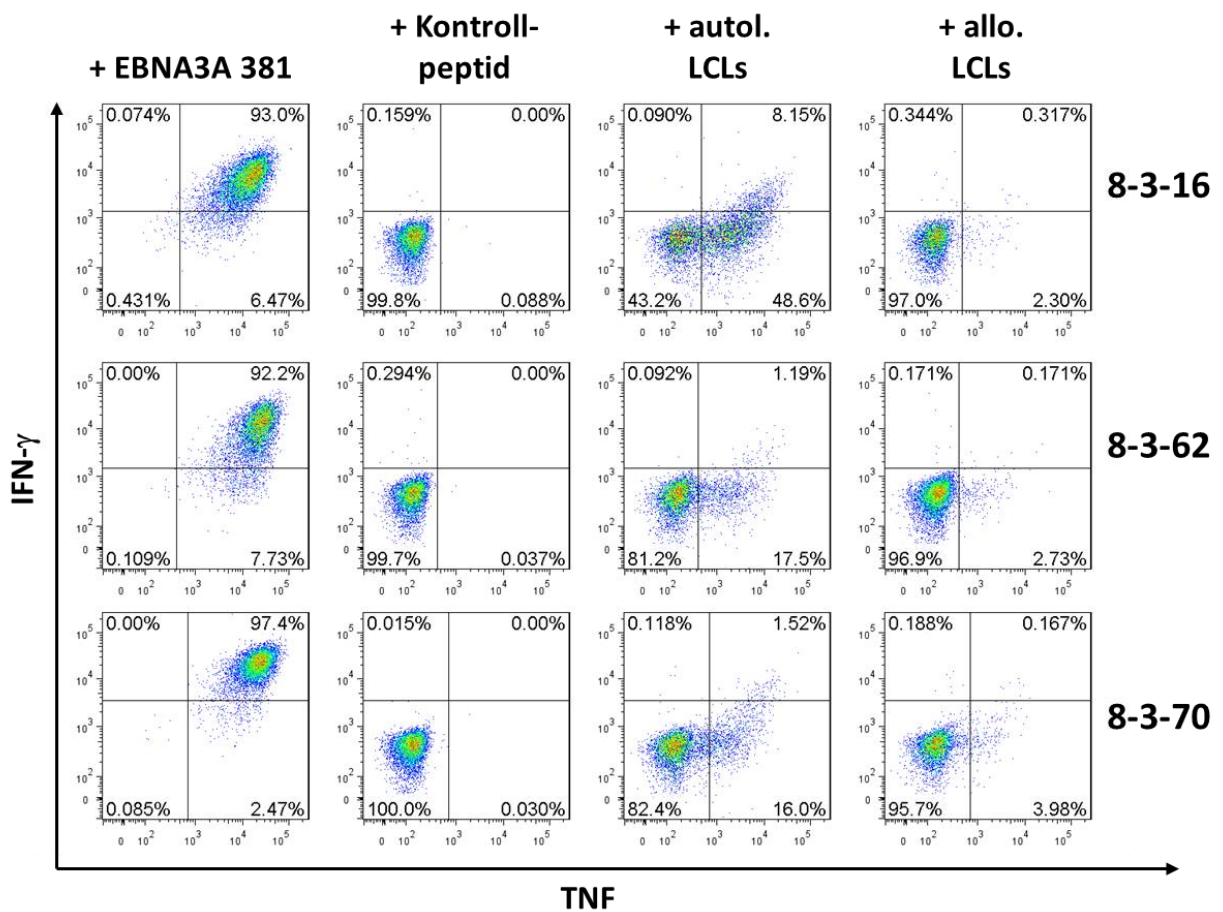


Abbildung 37: Erkennung von LCLs durch EBNA3A 381-spezifische Klone von Donor 8. Klone wurden mit 10  $\mu$ g/ml EBNA3A 381, Kontrollpeptid, autologen oder allogenen LCLs 1:1 über Nacht konfrontiert und die IFN- $\gamma$ - und TNF-Produktion intrazellulär gemessen. Allogene LCLs: EMJ (DQA1\*01:02, DQB1\*06:04, DRB1\*13:02, DRB3\*03:01)



Durch Zugabe eines anti-MHC-Klasse-II-Antikörpers konnte die Reaktion geblockt werden (s. Abbildung 38).

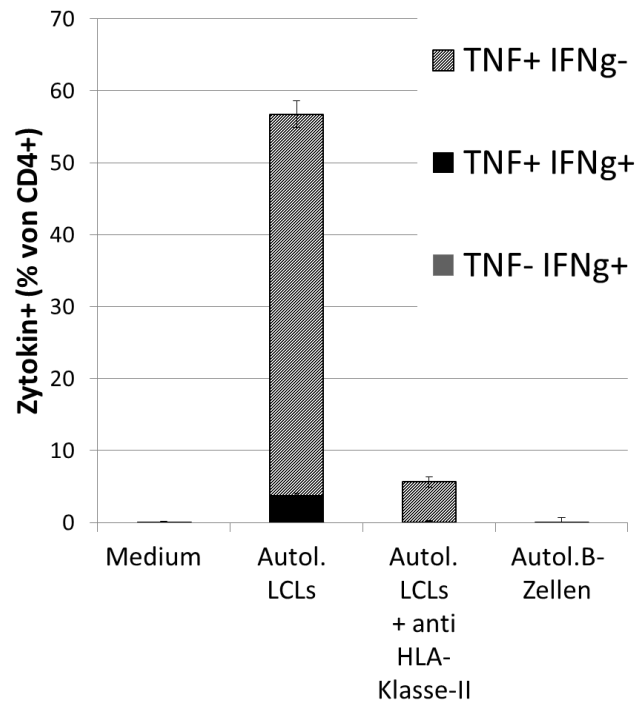


Abbildung 38: Klon 8-3-16 erkennt autologe LCLs MHC-Klasse-II-restringiert. Die Erkennung von autologen LCLs mittels ICS wurde durch den anti-MHC-Klasse-II-Antikörper Tü39 blockiert.

Ähnlich war die Erkennung von autologen LCLs durch einen EBNA1 514-spezifischen Klon von Spender 11 (DQB1\*02, DQB1\*03, DRB1\*03, DRB1\*11, DRB3). Klon 11-2-1 reagierte stark auf 10 µg/ml Peptid, aber schwach auf autologe LCLs. Die Reaktion wurde durch MHC-Klasse-II vermittelt (s. Abbildung 39). EBNA1 514 wurde von mehreren Autoren als von DR1 präsentiert beschrieben (Khanna et al. 1995; Leen et al. 2001; Taylor et al. 2004; Ye et al. 2004; Long et al. 2005). Da Spender 11 DR1-negativ ist, muss das Peptid promiskuitiv präsentiert werden.

Die beobachtete Tendenz, dass Peptide aus lytischen Antigenen sehr stark, Peptide aus latenten Antigenen eher schwächer erkannt werden, könnte dadurch erklärt werden, dass die Antigene nicht aus der Zelle selbst stammen, sondern von umgebenden lytischen Zellen aufgenommen und prozessiert wurden. Dass dies *in vitro* der Fall ist, wurde von Adhikary et al. anhand von BZLF1-negativen LCLs, die selbst nicht in die lytische Phase gehen können, demonstriert (Adhikary et al. 2007).

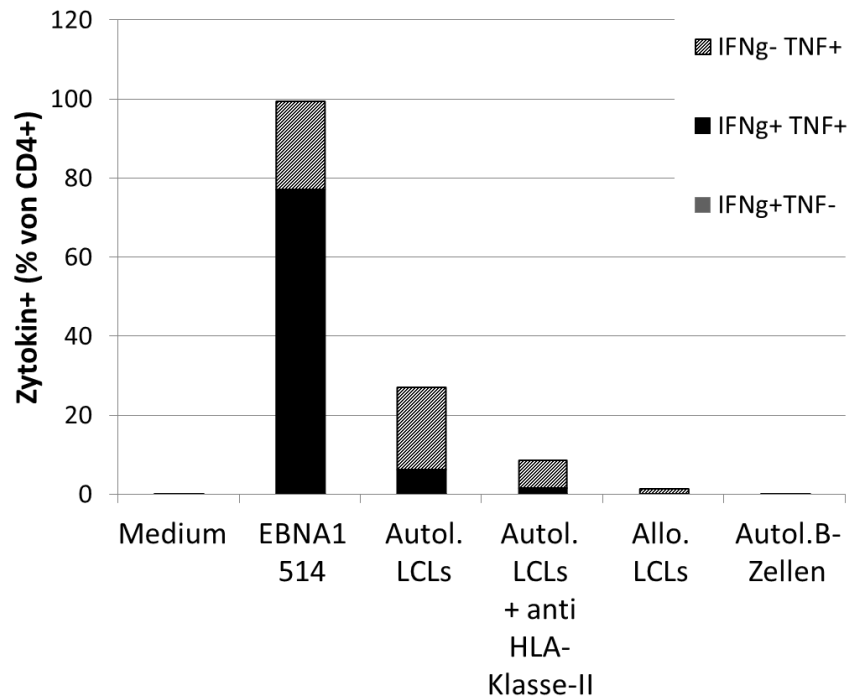


Abbildung 39: Klon 11-2-1 erkennt autologe LCLs MHC-Klasse-II-restringiert. Die Erkennung von autologen LCLs mittels ICS wurde durch den anti-MHC-Klasse-II-Antikörper Tü39 blockiert. Allo LCLs: MGAR.

#### 3.4.1.4 Die generierten T-Zellklone haben einen Effektor-Gedächtnisphänotyp

Insgesamt wurden 19 von insgesamt 26 LCL-erkennenden Klonen auf ihren Effektor-Gedächtnisphänotyp untersucht. Dazu wurde eine Oberflächenfärbung spezifisch für den Chemokinrezeptor CCR7 und die Protein-Tyrosin-Phosphatase CD45RO durchgeführt. Anhand eines von Sallusto et al. entworfenen Modells kann man an der unterschiedlichen Expression dieser beiden Moleküle Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (Effector Memory, EM, CCR7- CD45RO+), Zentrale-Gedächtnis-T-Zellen (Central Memory, CM, CCR7+ CD45RO+), naive (CCR7- CD45RO-) sowie terminal ausdifferenzierte Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (TEMRA, CCR7+ CD45RO-) voneinander unterscheiden (Sallusto et al. 1999). Alle Klone zeigten einen CCR7- CD45RO+ Effektor-Gedächtnisphänotyp, nur der BLLF1 167-spezifische Klon 6-4-49 war teils CCR7+ und damit teils vom Zentralen-Gedächtnisphänotyp (s. Abbildung 40). Dass EBV-spezifische T-Zellklone einem EM-Typ entsprechen, wurde auch schon von anderen Autoren berichtet (Moosmann et al. 2010; Long et al. 2011).

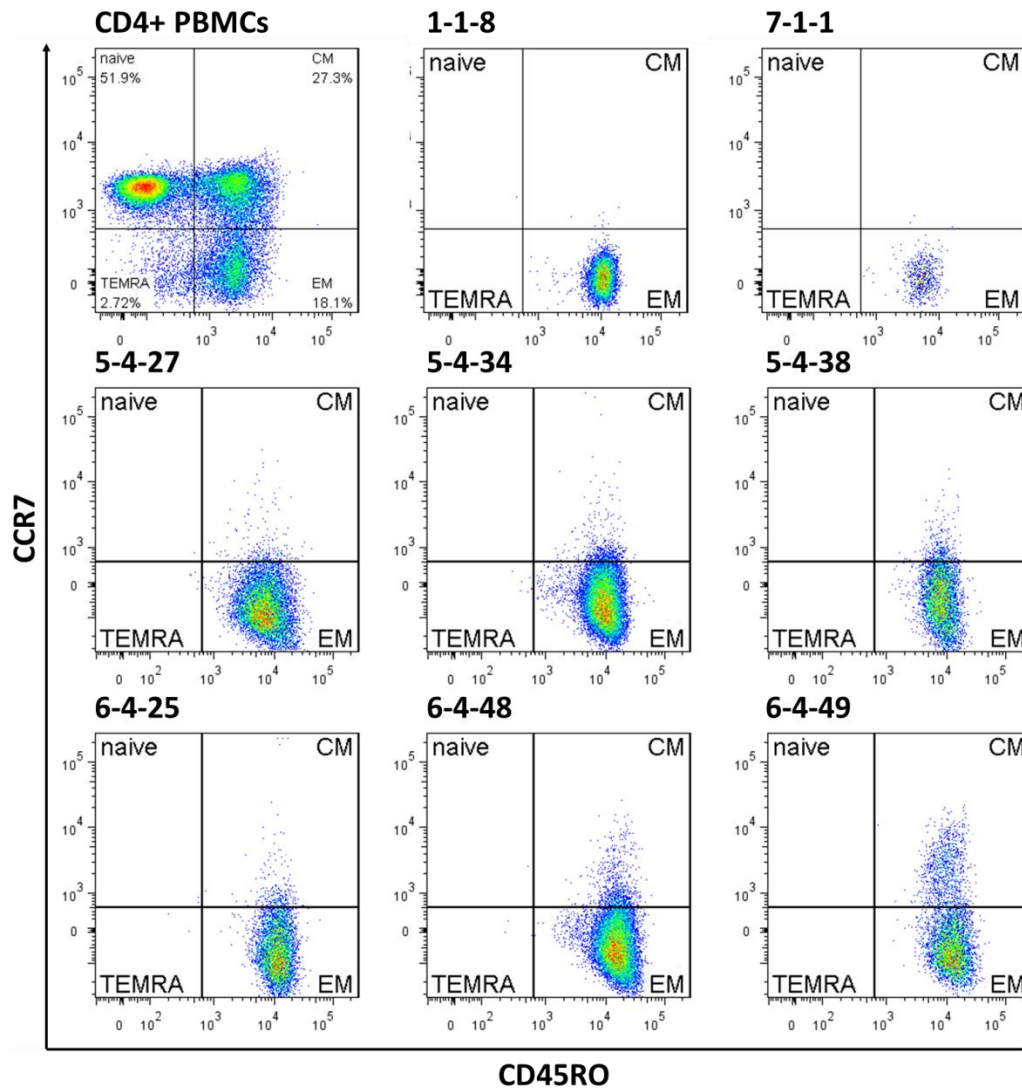


Abbildung 40: Gedächtnisphänotypisierung der CD4+ T-Zellklone mittels Oberflächenfärbung von CCR7 und CD45RO. Gates wurden mithilfe von CD4+ PBMCs gesetzt. Die exemplarisch gezeigten Klone stammen von zwei verschiedenen FACS-Sortierungen und sind spezifisch für BMRF1 268, BRLF1 119 bzw. BLLF1 167.

### 3.4.1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mithilfe der Einzelzellsortierung und Expansion *in vitro* konnten CD4+ T-Zellklone generiert werden, die eindeutig spezifisch für ein Peptid waren. Damit konnte sowohl für Peptide aus latenten als auch aus lytischen Antigenen eine natürliche, MHC-Klasse-II-vermittelte Präsentation durch autologe EBV-transformierte B-Zellen demonstriert werden. Eine große Rolle für eine erfolgreiche Erkennung schien dabei die Avidität der T-Zellklone zu spielen. Um so avider die Klone im Falle von BLLF1 167- und BMRF1 261-spezifischen Klonen, um so stärker die Erkennung, zumindest gemessen anhand der IFN- $\gamma$  und TNF-Expression. Eine stärkere IFN- $\gamma$  Produktion, zumindest bis zu einem Maximalwert, spiegelt dabei eine stärkere Aktivierung wider. Außer den bisher beschriebenen Klonen wurden auch Klone gegen BRLF1 119 und BLLF1

157 generiert. Diese Klone waren allerdings alle schwächer averse, sie produzierten hauptsächlich TNF bei Stimulation mit 10 µg/ml Peptid. Keiner von ihnen erkannte autologe LCLs. Die mit den T-Zellklonen erzielten Ergebnisse sind auch in Tabelle 30 im Anhang zusammengefasst.

### 3.4.2 Direkter Nachweis mit massenspektrometrischer Ligandomanalyse von EBV-transformierten B-Zellen

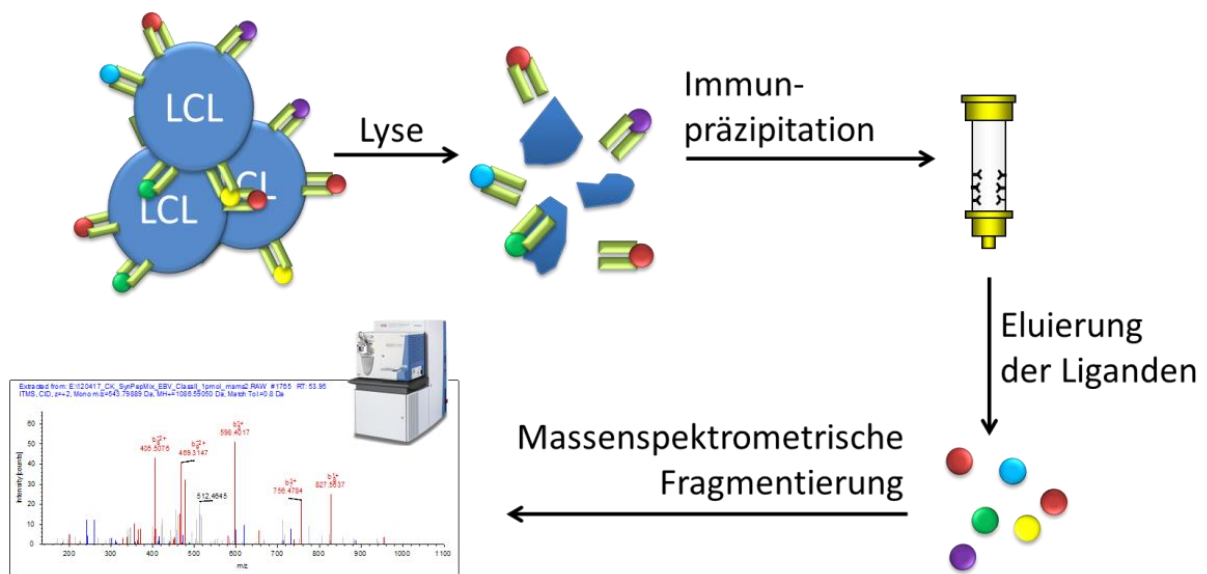


Abbildung 41: Übersicht über die Strategie der HLA-Ligandomanalyse mittels Massenspektrometrie. Zellen oder Gewebe (hier: LCLs) werden lysiert und die solubilisierten HLA-Moleküle (gelb) über eine mit anti-HLA-Antikörpern bestückte Säule geleitet. Dabei werden die HLA-Moleküle mit gebundenem Peptid präzipitiert (Immunpräzipitation). Die Peptidliganden werden durch Ansäuerung aus den Bindungstaschen eluiert, durch HPLC getrennt und massenspektrometrisch fragmentiert. Über die Fragmentspektren werden mögliche Peptidsequenzen errechnet.

Eine T-Zell-unabhängige Alternative zur Identifizierung von MHC-Liganden auf der Oberfläche von Zellen stellt die Ligandomanalyse mittels Massenspektrometrie dar (Schirle et al. 2000). Hierbei werden die Zellen von Interesse lysiert und die MHC:Peptid-Komplexe durch das Leiten über eine mit spezifischen Antikörpern beladene Säule aus dem Lysat extrahiert. Die MHC-Liganden können dann durch Ansäuerung aus den Bindungstaschen der präzipitierten MHC-Moleküle eluiert und massenspektrometrisch analysiert werden (s. auch Übersicht in Abbildung 41).

Dieser Ansatz der Ligandomanalyse sollte ausgetestet werden, um Virus-spezifische Liganden, die auf der Oberfläche von EBV-transformierten Zelllinien präsentiert wurden, zu identifizieren oder nachzuweisen.

Hierzu wurde eine LTQ-Orbitrap (Thermo Scientific), *online* gekoppelt an ein  $\mu$ Kapillar-HPLC-System, verwendet.

Es wurden im Verlauf der Arbeit mehrere Versuche, von mir, mithilfe und/oder von verschiedenen anderen Personen unternommen, EBV-spezifische Peptide unter den Liganden verschiedener lymphoblastoider Zelllinien zu identifizieren. Dazu wurden die Rohdaten der fragmentierten Spektren mithilfe des Programms *Proteome Discoverer* (Thermo) gegen eine humane Proteindatenbank (SwissProt/NCBI/IPI human) und gegen eine Datenbank mit EBV-Proteinen prozessiert (SwissProt, Stand September 2010, reviewed). Die Datenbank mit EBV-Proteinen beinhaltete 169 Einträge, alle derzeit bekannten Sequenzen der Proteine vom Stamm B95-8 (79) und jeweils 45 von den Stämmen GD-1 und AG879.

Die ermittelten möglichen EBV-spezifischen Peptide wurden mithilfe des *Ion Scores* und anhand einer Sichtkontrolle der automatisch erfolgten Annotation der Fragmentspektren zunächst sortiert. Bei dem *Ion Score* handelt es sich um ein vom Programm ausgegebenes wahrscheinlichkeitsbasiertes Qualitätskriterium zur Genauigkeit der Annotation. Der Zahlenwert berechnet sich aus der absoluten Wahrscheinlichkeit, dass die angegebene Annotation zufällig ist, mit  $\text{Ion Score} = -10 \cdot \log(P)$ . P entspricht der absoluten Wahrscheinlichkeit. Ein *Ion Score* von 20 bedeutet also, dass die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Annotation bei 1% liegt (Perkins et al. 1999). Valide erscheinende Annotationen wurden mit Annotationen derselben Retentionszeit aus der gegen humane Proteine prozessierten Liste verglichen.

Zusammengenommen konnten keine EBV-spezifischen Liganden, weder von MHC-Klasse-I, noch von MHC-Klasse-II eluiert, nachgewiesen werden. Die unternommenen Versuche werden nachfolgend kurz zusammengefasst.

Von den Zelllinien LCL1 und LCL2 wurden 2010 jeweils 5 ml Zellpellet von mir präpariert. Es wurden sowohl MHC-Klasse-I- als auch HLA-DR-Moleküle mit den Antikörpern W6/32 und L243 präpariert und die Liganden eluiert. Die massenspektrometrischen Messungen der Liganden wurden von Oliver Drews und Marc Günder durchgeführt. Es konnten keine EBV-spezifischen Liganden identifiziert werden. Annotationen mit einem *Ion Score* von  $\geq 40$  waren in der gegen EBV prozessierten Liste nicht vorhanden und Sequenzen mit niedrigeren *Ion Scores* erwiesen sich als schlecht annotiert. Allerdings war auch die generelle Ausbeute nicht besonders hoch, bei der Prozessierung des LCL2\_W6/32-Eluats gegen humane Proteine wurden ca. 70 Peptide mit einem *Ion Score* über 40 gelistet, beim LCL1\_W6/32-Eluat weniger als 10. 498 bzw. 100 Peptide hatten einen *Ion Score* von  $\geq 20$ . Bei der Prozessierung der L243-Eluate erreichten nur 22 bzw. einen *Ion score* von  $\geq 40$  und 102 bzw. 47 einen *Ion Score* von  $\geq 20$ .

Zwei weitere Zelllinien, LCL5 und LCL11, wurden von Heike Friedrich und Florian Heubach im Rahmen ihrer Bachelor-Arbeiten präpariert (Friedrich 2011; Heubach 2011). Pro Präparation wurden etwa 10 ml Zellpellet verwendet. Es wurden Liganden gefunden, die als EBV-spezifisch prozessiert wurden, allerdings mit wenig überzeugenden Fragmentspektren und niedrigen *Ion Scores* unter 20. Die Kandidaten wurden synthetisiert und gesunde Blutspender auf existierende Gedächtnis-T-Zellantworten untersucht. Es konnten keine Antworten detektiert werden.

Die Zelllinien LCL7 und LCL8 wurden von Armin Rabsteyn und Nico Trautwein präpariert und die eluierten Liganden von Armin Rabsteyn gemessen. Dies geschah mit einem neuen HPLC-System (Nano-UHPLC UltiMate 3000 RSLCnano, Dionex), welches eine bessere Auftrennung der Probe und dadurch eine höhere Sensitivität gegenüber Peptiden mit geringeren Intensitäten ermöglicht. Sechs Fragmentspektren aus der Prozessierung gegen die EBV-Datenbank sahen glaubwürdig aus. Vier davon stammten aus einer MHC-Klasse-I-Präzipitation (W6/32 oder B1.23.2), zwei aus der L243-Präzipitation von LCL8. Die vier Klasse-I Peptide und ein Klasse-II Peptid wurden synthetisiert. Die synthetisierten Peptide wurden massenspektrometrisch analysiert und die erhaltenen Fragmentspektren mit den Annotationen verglichen. Die gemessenen Spektren stimmten nicht mit den Spektren aus den Eluatun überein.

Da auf beiden Zelllinien schon indirekt jeweils ein EBV-spezifisches Epitop, nämlich BMRF1 261 auf LCL7 und EBNA3 381 auf LCL8 nachgewiesen werden konnte (vgl. 3.4.1.1 und 3.4.1.3), wurde zusätzlich versucht, speziell diese Epitope mithilfe einer *Include List* zu fragmentieren. Bei der normalen Messung im Orbitrap-Massenanalysator wird sekundlich ein Übersichtsspektrum aufgezeichnet, woraus die fünf Peaks mit der höchsten Intensität fragmentiert werden. In geringen Mengen vorhandene Peptide werden dementsprechend unter Umständen gar nicht fragmentiert. Um dies zu umgehen kann eine Liste mit Massen, die vorrangig fragmentiert werden sollen, angelegt werden (*Include list*). Da die Länge von MHC-Klasse-II-Peptiden variabel ist und somit auch die Liste der zu detektierenden Massen, wurden die zweifach und dreifach geladenen Massen aller möglichen linearen Peptide einer Länge von 11 bis 20 Aminosäuren aus jeder gesuchten 15 Aminosäuren langen Sequenz plus 3 Aminosäuren am N- und C-Terminus (=21 Aminosäuren) berechnet. Leider konnte auch unter Anwendung der *Include List* keines der Peptidfragmente detektiert werden.

Die Nachweisgrenze des Systems liegt im einstelligen fmol-Bereich (Dingler 2011), was bei 5 fmol also etwa  $3 \cdot 10^9$  Molekülen entspricht. Ein ml Zellpellet entspricht in etwa  $10^9$  Zellen. Bei 5 ml Zellpellet müssten eigentlich also auch Liganden, die weniger als einmal pro Zelle präsentiert werden, detektierbar sein. Trotzdem ist die beschriebene Nachweismethode offensichtlich (noch) nicht sensitiv genug. Die Schwierigkeit, virale Liganden massenspektrometrisch zu detektieren, ist hinreichend bekannt, andere Gruppen verwenden zum Beispiel eine auf einer Poisson-Verteilung basierende Methode, um Liganden z.B. vom humanen Papillomavirus oder

Influenza massenspektrometrisch nachzuweisen (Zhong et al. 2003; Riemer et al. 2010). Hierzu muss die gesuchte Sequenz allerdings im Vorhinein bekannt sein.

## 4 ZUSAMMENFASSUNG

Beinahe jeder erwachsene Mensch ist dauerhaft latent mit Epstein-Barr-Virus (EBV), einem lymphomagenen Herpesvirus, infiziert. Eine Beeinträchtigung der zellulären Immunabwehr des Trägers kann zur Ausbildung schwerster EBV-assoziiierter Erkrankungen führen. Der adoptive Transfer EBV-spezifischer T-Zellen hat sich vor allem bei Behandlung der Posttransplantationslymphoproliferation (PTLD) als wirksam und sicher erwiesen, die dabei verwendeten Protokolle benötigen jedoch mehrere Wochen zur Generierung einer EBV-spezifischen T-Zelllinie. Um eine schnelle Generierung EBV-spezifischer T-Zellen aus verschiedenen Blutspendern zu ermöglichen sollten häufig erkannte EBV-spezifische CD4+ T-Zellepitope (FREPS, *Frequently recognized epitopes*) identifiziert und zu einem Peptidcocktail kombiniert werden.

Durch *in silico*-Vorhersage mittels SYFPEITHI und systematischen Testens der Epitopkandidaten auf spezifische Gedächtniszellen bei immunkompetenten Blutspendern konnten insgesamt 77 Epitope aus drei EBV-Antigenen der Latenz (EBNA3A, LMP1 und LMP2) und sechs Antigenen der lytischen Phase des Virus (BMLF1, BMRF1, BZLF1, BRLF1, BNRF1 und BLLF1) identifiziert werden. Dies entspricht etwa 70% aller 107 getesteten Epitopkandidaten. Die Sensitivität der Detektion spezifischer Gedächtnis-T-Zellen wurde dabei durch eine vorherige Amplifikation *in vitro* erheblich erhöht. Interessante, da häufig erkannte Epitope wurden durchflusszytometrisch auf den reagierenden T-Zelltyp untersucht. Dabei wurden 24 CD4+ T-Zellepitope verifiziert, fünf davon wurden von über 40% der getesteten Blutspender erkannt. Bei der Auswahl der Epitopkandidaten waren Peptide, die für mehrere Allele als potentielle Epitope vorhergesagt worden waren, bevorzugt ausgewählt worden. Ein MHC-Klasse-II Bindungsassay bestätigte die hohe Promiskuität der identifizierten CD4+ Epitope, sowie eine hohe Zuverlässigkeit der SYFPEITHI-Vorhersagen. An einzelnen Beispielen konnte gezeigt werden, dass die *in silico* vorhergesagten und durch *in vitro* Amplifizierung identifizierbar gemachten Epitope tatsächlich auf EBV-infizierten B-Zellen präsentiert werden und zu einer spezifischen Erkennung durch CD4+ T-Zellen führen. Es wurden mehrere EBV-Epitop-Mixe, auch unter Berücksichtigung von Epitopen anderer Autoren zusammengestellt; sowohl eine Kombination aus fünf als auch aus sieben Peptiden wurde von über 90% der getesteten Blutspender erkannt.

Beide in dieser Arbeit entwickelten EBV-Epitop-Mixe sind somit geeignet, EBV-spezifische CD4+ T-Zellen von praktisch jedem latent Infizierten ohne vorherige HLA-Typisierung nachzuweisen, zu selektionieren, zu amplifizieren oder zu generieren. Sie ermöglichen die Herstellung definiert epitopspezifischer Zellprodukte für Therapie oder Prophylaxe EBV-assoziiierter Erkrankungen von praktisch jedem Spender innerhalb kürzester Zeit.



## 5 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APC	Antigenpräsentierende Zelle ( <i>Antigen Presenting Cell</i> )
AS	Aminosäure
BL	Burkitt-Lymphom
BZM	B-Zellmedium
CAEBV	Chronisch aktive EBV-Infektion
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-Propan-Sulfonat
CM	Zentrales Gedächtnis ( <i>Central Memory</i> )
CMV	Cytomegalievirus
CTL	Zytotoxische T-Zelle ( <i>Cytotoxic T Lymphocyte</i> )
ddH <sub>2</sub> O	Bidestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	<i>Early</i>
EA	<i>Early Antigens</i>
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISPOT	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Spot</i>
EM	Effektor-Gedächtnis ( <i>Effector Memory</i> )
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>Fetal Calf Serum</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FlnA	Filamin A
FREPs	Häufig erkannte Epitope ( <i>Frequently recognized epitopes</i> )
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HL	Hodgkin-Lymphom

---

HLA	Humanes Leukozyten-Antigen ( <i>Human Leukocyte Antigen</i> )
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSZT	Hämatopoietische Stammzelltransplantation
ICS	Intrazelluläre Zytokinfärbung ( <i>Intracellular Cytokine Staining</i> )
IE	<i>Immediate Early</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IM	Infektiöse Mononukleose
kb	Kilobasen
L	<i>Late</i>
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie ( <i>Lymphoblastoid Cell Line</i> )
MA	<i>Membrane Antigens</i>
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NPC	Nasopharynxkarzinom
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
OT	Organtransplantation
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes ( <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> )
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PenStrep	Penicillin und Streptomycin
pH	potentia Hydrogenii
PHA	Phytohämagglutinin
RPMI	RosWell Park Memorial Institut
s	Sekunde
s.	siehe
SFU	<i>Spot Forming Units</i>

---

TEMRA	CD45RA+, terminal ausdifferenzierte Effektor-Gedächtniszellen
TFA	Trifluoressigsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
TZM	T-Zellmedium
usw.	und so weiter
VCA	<i>Viral Capsid Antigens</i>
vgl.	vergleiche
β-ME	β-Mercaptoethanol

## 6 APPENDIX

### 6.1 Epitopvorhersagen

Tabelle 27: Vorhersage von Epitopkandidaten aus dem lytischen Antigen B NRF1 (UniProtKB P03179). Die Vorhersage wurde am 28.07.2009 durchgeführt.

Vorhersagen				Ausgewählte Epitopkandidaten			
Position	Sequenz	SYFPEITHI Score	HLA Typ	Position	Sequenz	Vorher Restriktionen	gesagte Hausinterne Synthesennummer
36	ERLYELLSDPRSALG	24	DR11	38-52	LYELLSDPRSALGLD	DR3, DR4, DR11	90256
38	LYELLSDPRSALGLD	39	DR3				
38	LYELLSDPRSALGLD	26	DR4				
129	SAEIQQFLRLLGATY	21	DR11	131-145	EIQQFLRLLGATYVL	DR1, DR11, DR15	90259
129	SAEIQQFLRLLGATY	30	DR15				
133	QQFLRLLGATYVLRV	37	DR1				
144	VLRVEMGRQFGFEVH	25	DR3	147-161	VEMGRQFGFEVHRSR	DR1, DR3, DR11, DR15	91133
146	RVEMGRQFGFEVHRS	30	DR1				
146	RVEMGRQFGFEVHRS	24	DR15				
150	GRQFGFEVHRSRPSF	21	DR11				
161	RPSFRQFQAINHLVL	32	DR15	163-177	SFRQFQAINHLVLF D	DR4, DR7, DR11, DR15	91193
164	FRQFQAINHLVLF D	28	DR4				
164	FRQFQAINHLVLF D	24	DR7				
164	FRQFQAINHLVLF D	25	DR11				

294	<b>HPGLFPFVNAIASSL</b>	26	DR4	295-309	<b>PGLFPFVNAIASSLG</b>	DR1, DR4, DR7, DR11, DR15	91147
294	<b>HPGLFPFVNAIASSL</b>	28	DR15				
295	<b>PGLFPFVNAIASSLG</b>	33	DR1				
295	<b>PGLFPFVNAIASSLG</b>	22	DR11				
297	<b>LFPFVNAIASSLGWY</b>	24	DR7				
343	<b>KSGVPVVAGFYRTIN</b>	24	DR15	346-360	<b>VPVVAGFYRTINATL</b>	DR3, DR4, DR7, DR15	91135
346	<b>VPVVAGFYRTINATL</b>	26	DR4				
346	<b>VPVVAGFYRTINATL</b>	24	DR15				
347	<b>PVVAGFYRTINATLK</b>	24	DR15				
349	<b>VAGFYRTINATLKGG</b>	23	DR3				
349	<b>VAGFYRTINATLKGG</b>	32	DR7				
563	<b>TAEMMDDFSPFFTVE</b>	28	DR3	565-579	<b>EMMDDFSPFFTVEFP</b>	DR3, DR7, DR15	90280
564	<b>AEMMDDFSPFFTVEF</b>	34	DR15				
567	<b>MDDFSPFFTVEFPPI</b>	24	DR7				
567	<b>MDDFSPFFTVEFPPI</b>	28	DR15				
602	<b>PSYELPWLSLESCLT</b>	24	DR15	605-619	<b>ELPWLSLESCLTSIL</b>	DR4, DR7, DR15	90291
605	<b>ELPWLSLESCLTSIL</b>	28	DR4				
608	<b>WLSLESCLTSILSHP</b>	24	DR7				
652	<b>DLPLADYAFVAHSQV</b>	30	DR15	653-667	<b>LPLADYAFVAHSQVW</b>	DR4, DR11, DR15	91146
655	<b>LADYAFVAHSQVWTR</b>	28	DR4				
655	<b>LADYAFVAHSQVWTR</b>	24	DR11				
795	<b>ASNFMTVVASVSAPG</b>	32	DR1	795-809	<b>ASNFMTVVASVSAPG</b>	DR1, DR4, DR11, DR15	91149
795	<b>ASNFMTVVASVSAPG</b>	25	DR11				
796	<b>SNFMTVVASVSAPGE</b>	29	DR1				
796	<b>SNFMTVVASVSAPGE</b>	26	DR4				
796	<b>SNFMTVVASVSAPGE</b>	21	DR11				
796	<b>SNFMTVVASVSAPGE</b>	24	DR15				

814	<b>PLITPVLQKTGSLLI</b>	21	DR11	816-830	<b>ITPVLQKTGSLLIAV</b>	DR7, DR11, DR15	90271
817	<b>TPVLQKTGSLLIAVR</b>	32	DR7				
817	<b>TPVLQKTGSLLIAVR</b>	24	DR15				
840	<b>GSLFEQLFSDVATTP</b>	32	DR1	840-854	<b>GSLFEQLFSDVATTP</b>	DR1, DR4, DR11	90279
840	<b>GSLFEQLFSDVATTP</b>	28	DR4				
840	<b>GSLFEQLFSDVATTP</b>	23	DR11				
859	<b>ALSLKNLFRAVQQLV</b>	26	DR4	861-875	<b>SLKNLFRAVQQLVKS</b>	DR4, DR11, DR15	90272
859	<b>ALSLKNLFRAVQQLV</b>	21	DR11				
860	<b>LSLKNLFRAVQQLVK</b>	24	DR15				
862	<b>LKNLFRAVQQLVKS</b>	26	DR4				
863	<b>KNLFRAVQQLVKSGI</b>	28	DR4				
935	<b>GEVLQTLRSMNMYPA</b>	30	DR1	935-949	<b>GEVLQTLRSMNMYPA</b>	DR1, DR4, DR7, DR15	90273
935	<b>GEVLQTLRSMNMYPA</b>	26	DR4				
935	<b>GEVLQTLRSMNMYPA</b>	24	DR7				
935	<b>GEVLQTLRSMNMYPA</b>	24	DR15				
941	<b>LRSMNMYPAVLGRVG</b>	34	DR15	941-955	<b>LRSMNMYPAVLGRVG</b>	DR11, DR15	90274
944	<b>MNMYP AVLGRVGEQG</b>	24	DR11				
977	<b>LRLLLGTWSSFASEQ</b>	28	DR7	978-992	<b>RLLLLGTWSSFASEQY</b>	DR7, DR15	90275
978	<b>RLLLLGTWSSFASEQY</b>	34	DR15				
981	<b>LGTWSSFASEQYECL</b>	24	DR7				
1066	<b>RRVFFREVRDNTFLD</b>	28	DR4	1066-1080	<b>RRVFFREVRDNTFLD</b>	DR4, DR11	90276
1066	<b>RRVFFREVRDNTFLD</b>	21	DR11				
1101	<b>RATVALINRFPALRD</b>	26	DR4	1102-1116	<b>ATVALINRFPALRDA</b>	DR4, DR11, DR15	90277
1101	<b>RATVALINRFPALRD</b>	26	DR11				
1104	<b>VALINRFPALRDAIL</b>	30	DR15				

1136	VQVL <b>A</b> GLGAVGSTDN	35	DR1	1139-1153	LAGL <b>A</b> VGSTDNPPA	DR1, DR4, DR7, DR15	90278
1136	VQVL <b>A</b> GLGAVGSTDN	24	DR15				
1139	LAGL <b>A</b> VGSTDNPPA	26	DR4				
1142	LGAV <b>G</b> STDNPPAPGV	26	DR7				

Tabelle 28: Vorhersage von Epitopkandidaten aus dem lytischen Antigen BLLF1 (UniProtKB Q777F0). \* Peptid war unbrauchbar. Die Vorhersage wurde am 28.07.2009 durchgeführt.

Vorhersagen				Ausgewählte Epitopkandidaten			
Position	Sequenz	SYFPEITHI Score	HLA Typ	Position	Sequenz	Vorher gesagte Restriktionen	Hausinterne Synthesennummer
7	V <b>C</b> QYTIQSLIHLTGE	28	DR1	10-24	Y <b>T</b> IQSLIHLTGEDPG	DR1, DR11	90355
9	Q <b>Y</b> TIQSLIHLTGEDP	26	DR11				
12	I <b>Q</b> SLIHLTGEDPGFF	32	DR1				
12	I <b>Q</b> SLIHLTGEDPGFF	18	DR11				
30	I <b>P</b> EFPPYPTCNVCTA	22	DR4	31-45	P <b>E</b> FPFYPTCNVCTAD	DR4, DR7, DR15	90357
30	I <b>P</b> EFPPYPTCNVCTA	26	DR7				
30	I <b>P</b> EFPPYPTCNVCTA	26	DR15				
32	E <b>F</b> FPFYPTCNVCTADV	22	DR4				
32	E <b>F</b> FPFYPTCNVCTADV	24	DR7				
43	T <b>A</b> DVNVTINFDVGGK	30	DR7	43-57	T <b>A</b> DVNVTINFDVGGK	DR7, DR15	90335
43	T <b>A</b> DVNVTINFDVGGK	24	DR15				
88	A <b>T</b> NLFLELLGAGEL	28	DR1	91-105	L <b>F</b> LLELLGAGELALT	DR1, DR3, DR7, DR11	90358
88	A <b>T</b> NLFLELLGAGEL	19	DR11				
90	N <b>L</b> FLELLGAGELAL	26	DR1				
91	L <b>F</b> LLELLGAGELALT	20	DR3				
91	L <b>F</b> LLELLGAGELALT	34	DR1				
93	L <b>L</b> ELLGAGELALTMR	29	DR3				
93	L <b>L</b> ELLGAGELALTMR	28	DR7				

128	<b>V</b> DVYF <b>Q</b> DVFGTMWCH	22	DR4	130-144	<b>V</b> YF <b>Q</b> DVFGTMWCHHA	DR4, DR11, DR15	90336
130	<b>V</b> YF <b>Q</b> DVFGTMWCHHA	24	DR15				
133	<b>Q</b> DVFGTMWCHHAEMQ	22	DR11				
156	<b>T</b> VPYIK <b>W</b> DNCNSTNI	22	DR4	157-171	<b>V</b> PYIK <b>W</b> DNCNSTNIT	DR3, DR4, DR7	90337
157	<b>V</b> PYIK <b>W</b> DNCNSTNIT	22	DR3				
159	<b>Y</b> IK <b>W</b> DNCNSTNITAV	22	DR4				
159	<b>Y</b> IK <b>W</b> DNCNSTNITAV	26	DR7				
167	<b>S</b> TNITAVVRAQGLDV	30	DR11	167-181	<b>S</b> TNITAVVRAQGLDV	DR11, DR15	90338
170	<b>I</b> TAVVRAQGLDVTLPL	24	DR15				
174	<b>V</b> RA <b>Q</b> GLDVTLPLSLP	20	DR3	176-190	<b>A</b> QGLDVTLPLSLPTS	DR3, DR7, DR15	90342
176	<b>A</b> QGLDVTLPLSLPTS	20	DR3				
176	<b>A</b> QGLDVTLPLSLPTS	24	DR7				
176	<b>A</b> QGLDVTLPLSLPTS	24	DR15				
178	<b>G</b> LDVTLPLSLPTS <b>A</b> Q	24	DR15				
265	<b>R</b> LTPRPVSRFLGNNS	21	DR11	268-282	<b>P</b> RPVSRFLGNNSILY	DR7, DR11, DR15	90344
268	<b>P</b> RPVSRFLGNNSILY	28	DR15				
271	<b>V</b> SRFLGNNSILYVVFY	24	DR7				
300	<b>Q</b> SNIVFSDEIPASQD	24	DR7	301-315	<b>S</b> NIVFSDEIPASQDM	DR3, DR4, DR7	90347
301	<b>S</b> NIVFSDEIPASQDM	23	DR3				
302	<b>N</b> IVFSDEIPASQDMP	22	DR4				
321	<b>D</b> ITYVGDNATYSVPM	28	DR1	322-336	<b>I</b> TYVGDNATYSVPMV	DR1, DR4, DR7	90346
321	<b>D</b> ITYVGDNATYSVPM	22	DR4				
322	<b>I</b> TYVGDNATYSVPMV	24	DR7				
324	<b>Y</b> VGDNATYSVPMVTS	24	DR7				
330	<b>T</b> YSVPMVTS <b>E</b> DANSP	29	DR1	330-344	<b>T</b> YSVPMVTS <b>E</b> DANSP	DR1, DR4, DR11	90351
330	<b>T</b> YSVPMVTS <b>E</b> DANSP	26	DR4				
330	<b>T</b> YSVPMVTS <b>E</b> DANSP	18	DR11				



386	<b>NRTFDITVSGLG</b> TAP	26	DR7	388-402	TFDITVSGLG <b>TAP</b> KT	DR4, DR7, DR11	90348
386	<b>NRTFDITVSGLG</b> TAP	19	DR11				
390	<b>DITVSGLG</b> TAPKTLI	26	DR4				
654	<b>QH</b> NITSSSTSSMSLR	30	DR7	654-668	<b>QH</b> NITSSSTSSMSLR	DR7	90349
656	<b>NITSSSTSS</b> MSLRPS	24	DR7				
816	<b>ATTYLP</b> STSSKLRP	22	DR4	817-831	<b>TTYLP</b> STSSKLRPR	DR3, DR4, DR7	90354
817	<b>TTYLP</b> STSSKLRPR	20	DR3				
817	<b>TTYLP</b> STSSKLRPR	30	DR7				
853	<b>QPRF</b> NLSMLVLQWA	26	DR1	856-870	<b>F</b> SNLSMLVLQWASLA	DR1, DR3, DR4, DR11	90352*
853	<b>QPRF</b> NLSMLVLQWA	22	DR4				
856	<b>F</b> SNLSMLVLQWASLA	20	DR11				
858	<b>N</b> LSMLVLQWASLAVL	21	DR3				
859	<b>L</b> SMLVLQWASLAVLT	32	DR1				
860	<b>S</b> MLVLQWASLAVLTL	24	DR7	863-877	<b>V</b> LQWASLAVLTLLLL	DR1, DR3, DR4, DR7, DR15	90353*
860	<b>S</b> MLVLQWASLAVLTL	34	DR15				
861	<b>M</b> LVVLQWASLAVLTLL	20	DR3				
863	<b>V</b> LQWASLAVLTLLLL	26	DR1				
863	<b>V</b> LQWASLAVLTLLLL	22	DR4				
866	<b>W</b> ASLAVLTLLLLLVM	20	DR3				
873	<b>T</b> LLLLLVMADCAFRR	31	DR1	874-888	<b>L</b> LLLLLVMADCAFRRN	DR1, DR3, DR11, DR15	90356
873	<b>T</b> LLLLLVMADCAFRR	18	DR11				
874	<b>L</b> LLLLLVMADCAFRRN	21	DR3				
876	<b>L</b> LLVMADCAFRRNLS	20	DR3				
876	<b>L</b> LLVMADCAFRRNLS	24	DR15				

## 6.2 Für Transformationen verwendete Blutspenden

Tabelle 29: Informationen zu verwendeten Spendern und verwendeten EBV-Batches für die EBV-Transformationen. Bei den ersten drei Transformationen wurden parallel zwei Batches verwendet, aber nur der stabil auswachsende Ansatz weiterkultiviert.

Leukapherese/ LCL-Nr	Spende- u. Transformations- datum	Spenden- Nr.	CMV- Status	Blutgruppe	Verwendeter B95- 8 Überstand (Batch)	erfolgreich?
<b>1</b>	06.07.2009	09701164	pos	0	10.12.1996	ja
					21.05.1996	mittel
<b>2</b>	31.08.2009	09701527	pos	0	29.11.1996	ja
					21.05.1996	nein
<b>3</b>	03.09.2009	09701554	neg	0	10.12.1996	ja
					21.05.1996	mittel
<b>4</b>	07.09.2009	09701575	neg	A1	21.05.1996	nein
<b>5</b>	28.09.2009	09701700	pos	A1	17.09.2009	ja
<b>6</b>	01.10.2009	09701735	neg	A1	17.09.2009	ja
<b>7</b>	05.10.2009	09701754	pos	0	17.09.2009	ja
<b>8</b>	15.10.2009	09701845	neg	0	17.09.2009	ja
<b>9</b>	26.10.2009	09701911	pos	0	17.09.2009	ja
<b>10</b>	29.10.2009	09701937	neg	0	17.09.2009	ja
<b>11</b>	17.11.2009	09702045	neg	A1	17.09.2009	ja

Tabelle 30: Peptidspezifische CD4+ T-Zellklone: Zusammenfassung (Fortsetzung nächste Seite)

Klon ID (Donor-Sort- Nummer)	HLA Typisierung d. Spenders		Erkanntes Peptid	R50 (ng/ml)	Spezifität (generell)*	Erkennung autologe LCLs	Restriktion/ Blockiert durch	Gedächtnis- phänotyp	
	DQB1	DRB1							
8-3-16	*03	*04 *11	DRB3,4	EBNA3A 381	hoch	ja		EM	
8-3-62	*03	*04 *11	DRB3,4	EBNA3A 381	hoch	ja		EM	
8-3-70	*03	*04 *11	DRB3,4	EBNA3A 381	hoch	ja		EM	
5-3-5	*03	*04 *07	DRB4	BLLF1 167	hoch	ja		EM	
5-3-9	*03	*04 *07	DRB4	BLLF1 167	mittel	ja	MHC-Klasse-II/ Tü39	EM	
5-4-38	*03	*04 *07	DRB4	BLLF1 167	nbb	hoch	ja	HLA-DR/ L243	EM
5-4-57	*03	*04 *07	DRB4	BLLF1 167	nbb	hoch	ja	HLA-DR/ Leichte Reduktion in MFI, L243	EM
6-3-19	*03 *06	*11 *15	DRB3	BLLF1 167		mittel, TNF	schwach		
6-3-22	*03 *06	*11 *15	DRB3	BLLF1 167		hoch	ja		
6-3-28	*03 *06	*11 *15	DRB3	BLLF1 167		mittel, TNF	nein		
6-3-46	*03 *06	*11 *15	DRB3	BLLF1 167		mittel, TNF	schwach		
6-3-47	*03 *06	*11 *15	DRB3	BLLF1 167	5,6	hoch	ja	EM	
6-3-48	*03 *06	*11 *15	DRB3	BLLF1 167		hoch	ja		
6-3-56	*03 *06	*11 *15	DRB3	BLLF1 167		hoch	ja		
6-3-58	*03 *06	*11 *15	DRB3	BLLF1 167		mittel, TNF	schwach		
6-3-6	*03 *06	*11 *15	DRB3	BLLF1 167		mittel, TNF	nein	EM	
6-3-63	*03 *06	*11 *15	DRB3	BLLF1 167	190	mittel, TNF	schwach	EM	
6-3-65	*03 *06	*11 *15	DRB3	BLLF1 167		hoch	ja		
6-3-73	*03 *06	*11 *15	DRB3	BLLF1 167		hoch	ja		
6-3-81	*03 *06	*11 *15	DRB3	BLLF1 167		hoch	ja		
6-3-9	*03 *06	*11 *15	DRB3	BLLF1 167		hoch	ja	EM	

Klon ID (Donor-Sort- Nummer)	HLA Typisierung d. Spenders			Erkanntes Peptid	R50 (ng/ml)	Spezifität (generell)*	Erkennung autologe LCLs	Restriktion/ Blockiert durch	Gedächtnis- phänotyp
	DQB1			DRB1					
6-4-25	*03 *06	*11 *15	DRB3	BLLF1 167	26,5	schwach	ja	HLA-DR/ L243	EM
6-4-48	*03 *06	*11 *15	DRB3	BLLF1 167		hoch	ja	HLA-DR/ L243	EM
6-4-49	*03 *06	*11 *15	DRB3	BLLF1 167	1	hoch	ja	HLA-DR/ L243	EM/CM
7-4-33	*03 *06	*04 *15	DRB4	BLLF1 167		mittel, TNF	ja	HLA-DR/ L243	EM
5-3-23	*03	*04 *07	DRB4	BLLF1 268		hoch	nein		EM
11-3-7	*02 *03	*03 *11	DRB3	BLLF1 268		mittel	nein		EM
11-3-37	*02 *03	*03 *11	DRB3	BLLF1 268		mittel	nein		
11-3-57	*02 *03	*03 *11	DRB3	BLLF1 268		hoch	nein		
7-1-1	*03 *06	*04 *15	DRB4	BMRF1 261	8,2	hoch	ja		
1-1-8	*05	*14 *16	DRB3	BMRF1 261	341,05	hoch	ja		
5-4-27	*03	*04 *07	DRB4	BMRF1 261	nbb	mittel, TNF	nein	nein	
11-2-1	*02 *03	*03 *11	DRB3	EBNA1 514		hoch	ja	MHC-Klasse-II/ Tü39	
5-4-22	*03	*04 *07	DRB4	BRLF1 119		mittel	nein	nein	EM
5-4-34	*03	*04 *07	DRB4	BRLF1 119	135,8	mittel, TNF	nein	nein	EM
11-4-4	*02 *03	*03 *11	DRB3	BLLF1 157		mittel	nein	nein	EM

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abbot, S. D., M. Rowe, K. Cadwallader, A. Ricksten, J. Gordon, F. Wang, L. Rymo and A. B. Rickinson (1990). "Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces expression of the virus-encoded latent membrane protein." *J Virol* **64**(5): 2126-2134.
- Adhikary, D., U. Behrends, H. Boerschmann, A. Pfunder, S. Burdach, A. Moosmann, K. Witter, G. W. Bornkamm and J. Mautner (2007). "Immunodominance of lytic cycle antigens in Epstein-Barr virus-specific CD4+ T cell preparations for therapy." *PLoS One* **2**(7): e583.
- Adhikary, D., U. Behrends, A. Moosmann, K. Witter, G. W. Bornkamm and J. Mautner (2006). "Control of Epstein-Barr virus infection in vitro by T helper cells specific for virion glycoproteins." *J Exp Med* **203**(4): 995-1006.
- Al-Mozaini, M., G. Bodelon, C. E. Karstegl, B. Jin, M. Al-Ahdal and P. J. Farrell (2009). "Epstein-Barr virus BART gene expression." *J Gen Virol* **90**(Pt 2): 307-316.
- Alfieri, C., M. Birkenbach and E. Kieff (1991). "Early events in Epstein-Barr virus infection of human B lymphocytes." *Virology* **181**(2): 595-608.
- Allday, M. J. and P. J. Farrell (1994). "Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA3C/6 expression maintains the level of latent membrane protein 1 in G1-arrested cells." *J Virol* **68**(6): 3491-3498.
- Amyes, E., C. Hatton, D. Montamat-Sicotte, N. Gudgeon, A. B. Rickinson, A. J. McMichael and M. F. Callan (2003). "Characterization of the CD4+ T cell response to Epstein-Barr virus during primary and persistent infection." *J Exp Med* **198**(6): 903-911.
- Anagnostopoulos, I., M. Hummel, C. Kreschel and H. Stein (1995). "Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus." *Blood* **85**(3): 744-750.
- Andreasen, S. O., J. E. Christensen, O. Marker and A. R. Thomsen (2000). "Role of CD40 ligand and CD28 in induction and maintenance of antiviral CD8+ effector T cell responses." *J Immunol* **164**(7): 3689-3697.
- Annels, N. E., M. F. Callan, L. Tan and A. B. Rickinson (2000). "Changing patterns of dominant TCR usage with maturation of an EBV-specific cytotoxic T cell response." *J Immunol* **165**(9): 4831-4841.
- Anthony Nolan Research Institute. (2012, 5-04-2012). "HLA Alleles Numbers." from <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>.
- Barletta, J. M., D. W. Kingma, Y. Ling, P. Charache, R. B. Mann and R. F. Ambinder (1993). "Rapid in situ hybridization for the diagnosis of latent Epstein-Barr virus infection." *Mol Cell Probes* **7**(2): 105-109.

- Barnaba, V., C. Watts, M. de Boer, P. Lane and A. Lanzavecchia (1994). "Professional presentation of antigen by activated human T cells." Eur J Immunol **24**(1): 71-75.
- Bellan, C., S. Lazzi, M. Hummel, N. Palumbo, M. de Santi, T. Amato, J. Nyagol, E. Sabattini, T. Lazure, S. A. Pileri, M. Raphael, H. Stein, P. Tosi and L. Leoncini (2005). "Immunoglobulin gene analysis reveals 2 distinct cells of origin for EBV-positive and EBV-negative Burkitt lymphomas." Blood **106**(3): 1031-1036.
- Bendelac, A. and R. H. Schwartz (1991). "Th0 cells in the thymus: the question of T-helper lineages." Immunol Rev **123**: 169-188.
- Bennett, S. R., F. R. Carbone, F. Karamalis, R. A. Flavell, J. F. Miller and W. R. Heath (1998). "Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling." Nature **393**(6684): 478-480.
- Benninger-Doring, G., S. Pepperl, L. Deml, S. Modrow, H. Wolf and W. Jilg (1999). "Frequency of CD8(+) T lymphocytes specific for lytic and latent antigens of Epstein-Barr virus in healthy virus carriers." Virology **264**(2): 289-297.
- Berdoz, J., J. Gorski, A. M. Termijtelen, J. M. Dayer, C. Irle, D. Schendel and B. Mach (1987). "Constitutive and induced expression of the individual HLA-DR beta and alpha chain loci in different cell types." J Immunol **139**(4): 1336-1341.
- Betts, M. R., J. M. Brenchley, D. A. Price, S. C. De Rosa, D. C. Douek, M. Roederer and R. A. Koup (2003). "Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation." J Immunol Methods **281**(1-2): 65-78.
- Betts, M. R. and R. A. Koup (2004). "Detection of T-cell degranulation: CD107a and b." Methods in cell biology **75**: 497-512.
- Betts, M. R., M. C. Nason, S. M. West, S. C. De Rosa, S. A. Migueles, J. Abraham, M. M. Lederman, J. M. Benito, P. A. Goepfert, M. Connors, M. Roederer and R. A. Koup (2006). "HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells." Blood **107**(12): 4781-4789.
- Bhatia, K., A. Raj, M. I. Guitierrez, J. G. Judde, G. Spangler, H. Venkatesh and I. T. Magrath (1996). "Variation in the sequence of Epstein Barr virus nuclear antigen 1 in normal peripheral blood lymphocytes and in Burkitt's lymphomas." Oncogene **13**(1): 177-181.
- Bickham, K., C. Münz, M. L. Tsang, M. Larsson, J. F. Fonteneau, N. Bhardwaj and R. Steinman (2001). "EBNA1-specific CD4+ T cells in healthy carriers of Epstein-Barr virus are primarily Th1 in function." J Clin Invest **107**(1): 121-130.
- Bihl, F., N. Frahm, L. Di Giammarino, J. Sidney, M. John, K. Yusim, T. Woodberry, K. Sango, H. S. Hewitt, L. Henry, C. H. Linde, J. V. Chisholm, 3rd, T. M. Zaman, E. Pae, S. Mallal, B. D. Walker, A. Sette, B. T. Korber, D. Heckerman and C. Brander (2006). "Impact of HLA-B alleles, epitope binding affinity, functional avidity, and viral coinfection on the immunodominance of virus-specific CTL responses." J Immunol **176**(7): 4094-4101.

- Bjorkman, P. J., M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger and D. C. Wiley (1987). "The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens." Nature **329**(6139): 512-518.
- Bollard, C. M., L. Aguilar, K. C. Straathof, B. Gahn, M. H. Huls, A. Rousseau, J. Sixbey, M. V. Gresik, G. Carrum, M. Hudson, D. Dilloo, A. Gee, M. K. Brenner, C. M. Rooney and H. E. Heslop (2004). "Cytotoxic T lymphocyte therapy for Epstein-Barr virus+ Hodgkin's disease." J Exp Med **200**(12): 1623-1633.
- Bollard, C. M., S. Gottschalk, A. M. Leen, H. Weiss, K. C. Straathof, G. Carrum, M. Khalil, M. F. Wu, M. H. Huls, C. C. Chang, M. V. Gresik, A. P. Gee, M. K. Brenner, C. M. Rooney and H. E. Heslop (2007). "Complete responses of relapsed lymphoma following genetic modification of tumor-antigen presenting cells and T-lymphocyte transfer." Blood **110**(8): 2838-2845.
- Breitfeld, D., L. Ohl, E. Kremmer, J. Ellwart, F. Sallusto, M. Lipp and R. Förster (2000). "Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production." J Exp Med **192**(11): 1545-1552.
- Brooks, C. F. and M. Moore (1988). "Differential MHC class II expression on human peripheral blood monocytes and dendritic cells." Immunology **63**(2): 303-311.
- Buck, M., S. Cross, K. Krauer, N. Kienzle and T. B. Sculley (1999). "A-type and B-type Epstein-Barr virus differ in their ability to spontaneously enter the lytic cycle." J Gen Virol **80** (Pt 2): 441-445.
- Burkhardt, A. L., J. B. Bolen, E. Kieff and R. Longnecker (1992). "An Epstein-Barr virus transformation-associated membrane protein interacts with src family tyrosine kinases." J Virol **66**(8): 5161-5167.
- Burkitt, D. (1958). "A sarcoma involving the jaws in African children." Br J Surg **46**(197): 218-223.
- Carel, J. C., B. L. Myones, B. Frazier and V. M. Holers (1990). "Structural requirements for C3d.g/Epstein-Barr virus receptor (CR2/CD21) ligand binding, internalization, and viral infection." J Biol Chem **265**(21): 12293-12299.
- Cavazzana-Calvo, M., D. Bensoussan, N. Jabado, E. Haddad, E. Yvon, M. Moskwa, A. Tachet des Combes, M. Buisson, P. Morand, J. M. Virion, F. Le Deist and A. Fischer (1998). "Prevention of EBV-induced B-lymphoproliferative disorder by ex vivo marrow B-cell depletion in HLA-phenotypical or non-identical T-depleted bone marrow transplantation." Br J Haematol **103**(2): 543-551.
- Chao, C. C., R. Jensen and M. O. Dailey (1997). "Mechanisms of L-selectin regulation by activated T cells." J Immunol **159**(4): 1686-1694.
- Chesnokova, L. S., S. L. Nishimura and L. M. Hutt-Fletcher (2009). "Fusion of epithelial cells by Epstein-Barr virus proteins is triggered by binding of viral glycoproteins gHgL to integrins alpha5beta1 or alpha5beta2." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(48): 20464-20469.

- Cheung, A. and E. Kieff (1982). "Long internal direct repeat in Epstein-Barr virus DNA." J Virol **44**(1): 286-294.
- Chevallier-Greco, A., E. Manet, P. Chavrier, C. Mosnier, J. Daillie and A. Sergeant (1986). "Both Epstein-Barr virus (EBV)-encoded trans-acting factors, EB1 and EB2, are required to activate transcription from an EBV early promoter." EMBO J **5**(12): 3243-3249.
- Coffman, R. L. and J. Carty (1986). "A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma." J Immunol **136**(3): 949-954.
- Cohen, J. I., F. Wang, J. Mannick and E. Kieff (1989). "Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(23): 9558-9562.
- Consogno, G., S. Manici, V. Facchinetti, A. Bachi, J. Hammer, B. M. Conti-Fine, C. Rugarli, C. Traversari and M. P. Protti (2003). "Identification of immunodominant regions among promiscuous HLA-DR-restricted CD4+ T-cell epitopes on the tumor antigen MAGE-3." Blood **101**(3): 1038-1044.
- Cools, N., P. Ponsaerts, V. F. Van Tendeloo and Z. N. Berneman (2007). "Regulatory T cells and human disease." Clin Dev Immunol **2007**: 89195.
- Cordier, M., A. Calender, M. Billaud, U. Zimmer, G. Rousselet, O. Pavlish, J. Banchereau, T. Tursz, G. Bornkamm and G. M. Lenoir (1990). "Stable transfection of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 in lymphoma cells containing the EBV P3HR1 genome induces expression of B-cell activation molecules CD21 and CD23." J Virol **64**(3): 1002-1013.
- Crabtree, G. R. (1999). "Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca<sup>2+</sup>, calcineurin, and NF-AT." Cell **96**(5): 611-614.
- Croft, M. and S. L. Swain (1991). "B cell response to T helper cell subsets. II. Both the stage of T cell differentiation and the cytokines secreted determine the extent and nature of helper activity." J Immunol **147**(11): 3679-3689.
- Crotty, S. (2011). "Follicular helper CD4 T cells (TFH)." Annu Rev Immunol **29**: 621-663.
- Curtis, R. E., L. B. Travis, P. A. Rowlings, G. Socie, D. W. Kingma, P. M. Banks, E. S. Jaffe, G. E. Sale, M. M. Horowitz, R. P. Witherspoon, D. A. Shriner, D. J. Weisdorf, H. J. Kolb, K. M. Sullivan, K. A. Sobocinski, R. P. Gale, R. N. Hoover, J. F. Fraumeni, Jr. and H. J. Deeg (1999). "Risk of lymphoproliferative disorders after bone marrow transplantation: a multi-institutional study." Blood **94**(7): 2208-2216.
- Dambaugh, T., K. Hennessy, L. Chamnankit and E. Kieff (1984). "U2 region of Epstein-Barr virus DNA may encode Epstein-Barr nuclear antigen 2." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(23): 7632-7636.
- Darrah, P. A., D. T. Patel, P. M. De Luca, R. W. Lindsay, D. F. Davey, B. J. Flynn, S. T. Hoff, P. Andersen, S. G. Reed, S. L. Morris, M. Roederer and R. A. Seder (2007). "Multifunctional



- TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*." Nat Med **13**(7): 843-850.
- Demachi-Okamura, A., Y. Ito, Y. Akatsuka, K. Tsujimura, Y. Morishima, T. Takahashi and K. Kuzushima (2008). "Epstein-Barr virus nuclear antigen 1-specific CD4+ T cells directly kill Epstein-Barr virus-carrying natural killer and T cells." Cancer Sci **99**(8): 1633-1642.
- Denzin, L. K., C. Hammond and P. Cresswell (1996). "HLA-DM interactions with intermediates in HLA-DR maturation and a role for HLA-DM in stabilizing empty HLA-DR molecules." J Exp Med **184**(6): 2153-2165.
- Denzin, L. K., D. B. Sant'Angelo, C. Hammond, M. J. Surman and P. Cresswell (1997). "Negative regulation by HLA-DO of MHC class II-restricted antigen processing." Science **278**(5335): 106-109.
- Depil, S., O. Morales, F. A. Castelli, N. Delhem, V. Francois, B. Georges, F. Dufosse, F. Morschhauser, J. Hammer, B. Maillere, C. Auriault and V. Pancre (2007). "Determination of a HLA II promiscuous peptide cocktail as potential vaccine against EBV latency II malignancies." J Immunother **30**(2): 215-226.
- Devergne, O., E. Hatzivassiliou, K. M. Izumi, K. M. Kaye, M. F. Kleijnen, E. Kieff and G. Mosialos (1996). "Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation." Mol Cell Biol **16**(12): 7098-7108.
- Dingler, F. (2011). "Identifikation und Charakterisierung prostataspezifischer Liganden auf MHC I." Diplomarbeit, Eberhard Karls Universität Tübingen.
- Dolan, A., C. Addison, D. Gatherer, A. J. Davison and D. J. McGeoch (2006). "The genome of Epstein-Barr virus type 2 strain AG876." Virology **350**(1): 164-170.
- Dornan, S., Z. Sebestyen, J. Gamble, P. Nagy, A. Bodnar, L. Alldridge, S. Doe, N. Holmes, L. K. Goff, P. Beverley, J. Szollosi and D. R. Alexander (2002). "Differential association of CD45 isoforms with CD4 and CD8 regulates the actions of specific pools of p56lck tyrosine kinase in T cell antigen receptor signal transduction." J Biol Chem **277**(3): 1912-1918.
- Drexler, H. G., S. M. Gignac, M. K. Brenner, E. Coustan-Smith, G. Janossy and A. V. Hoffbrand (1988). "Differential expression of MHC class II antigens in chronic B-cell disorders." Clin Exp Immunol **71**(2): 217-223.
- Epstein, M. A., B. G. Achong and Y. M. Barr (1964). "Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma." Lancet **1**(7335): 702-703.
- Fahmi, H., C. Cochet, Z. Hmama, P. Opolon and I. Joab (2000). "Transforming growth factor beta 1 stimulates expression of the Epstein-Barr virus BZLF1 immediate-early gene product ZEBRA by an indirect mechanism which requires the MAPK kinase pathway." J Virol **74**(13): 5810-5818.

- Falk, K., O. Rötzschke, S. Stevanovic, G. Jung and H. G. Rammensee (1991). "Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules." *Nature* **351**(6324): 290-296.
- Faner, R., E. James, L. Huston, R. Pujol-Borrel, W. W. Kwok and M. Juan (2010). "Reassessing the role of HLA-DRB3 T-cell responses: evidence for significant expression and complementary antigen presentation." *Eur J Immunol* **40**(1): 91-102.
- Faulkner, G. C., S. R. Burrows, R. Khanna, D. J. Moss, A. G. Bird and D. H. Crawford (1999). "X-Linked agammaglobulinemia patients are not infected with Epstein-Barr virus: implications for the biology of the virus." *J Virol* **73**(2): 1555-1564.
- Fazilleau, N., L. Mark, L. J. McHeyzer-Williams and M. G. McHeyzer-Williams (2009). "Follicular helper T cells: lineage and location." *Immunity* **30**(3): 324-335.
- Ferre, A. L., P. W. Hunt, J. W. Critchfield, D. H. Young, M. M. Morris, J. C. Garcia, R. B. Pollard, H. F. Yee, Jr., J. N. Martin, S. G. Deeks and B. L. Shacklett (2009). "Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers: a potential correlate of immune control." *Blood* **113**(17): 3978-3989.
- Feuchtinger, T., K. Opherk, W. A. Bethge, M. S. Topp, F. R. Schuster, E. M. Weissinger, M. Mohty, R. Or, M. Maschan, M. Schumm, K. Hamprecht, R. Handgretinger, P. Lang and H. Einsele (2010). "Adoptive transfer of pp65-specific T cells for the treatment of chemorefractory cytomegalovirus disease or reactivation after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation." *Blood* **116**(20): 4360-4367.
- Feuchtinger, T., C. Richard, S. Joachim, M. H. Scheible, M. Schumm, K. Hamprecht, D. Martin, G. Jahn, R. Handgretinger and P. Lang (2008). "Clinical grade generation of hexon-specific T cells for adoptive T-cell transfer as a treatment of adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation." *J Immunother* **31**(2): 199-206.
- Fingerroth, J. D., J. J. Weis, T. F. Tedder, J. L. Strominger, P. A. Biro and D. T. Fearon (1984). "Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(14): 4510-4514.
- Flemington, E. and S. H. Speck (1990a). "Autoregulation of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1." *J Virol* **64**(3): 1227-1232.
- Flemington, E. and S. H. Speck (1990b). "Epstein-Barr virus BZLF1 trans activator induces the promoter of a cellular cognate gene, c-fos." *J Virol* **64**(9): 4549-4552.
- Forbes, E. K., C. Sander, E. O. Ronan, H. McShane, A. V. Hill, P. C. Beverley and E. Z. Tchilian (2008). "Multifunctional, high-level cytokine-producing Th1 cells in the lung, but not spleen, correlate with protection against Mycobacterium tuberculosis aerosol challenge in mice." *J Immunol* **181**(7): 4955-4964.
- Friedrich, H. (2011). "Charakterisierung der HLA-Liganden einer Epstein-Barr-Virus-transformierten lymphoblastoiden B-Zelllinie." Bachelorarbeit, Eberhard Karls Universität Tübingen.

- Fukuda, M. (1991). "Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking." J Biol Chem **266**(32): 21327-21330.
- Gerber, P., S. Lucas, M. Nonoyama, E. Perlin and L. I. Goldstein (1972). "Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis." Lancet **2**(7785): 988-989.
- Gershon, R. K. and K. Kondo (1971). "Infectious immunological tolerance." Immunology **21**(6): 903-914.
- Gires, O., U. Zimmer-Strobl, R. Gonnella, M. Ueffing, G. Marschall, R. Zeidler, D. Pich and W. Hammerschmidt (1997). "Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule." EMBO J **16**(20): 6131-6140.
- Given, D., D. Yee, K. Griem and E. Kieff (1979). "DNA of Epstein-Barr virus. V. Direct repeats of the ends of Epstein-Barr virus DNA." J Virol **30**(3): 852-862.
- Gonzalez-Galarza, F. F., S. Christmas, D. Middleton and A. R. Jones (2011). "Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations." Nucleic Acids Res **39**(Database issue): D913-919.
- Gorer, P. A. (1948). "The significance of studies with transplanted tumours." Br J Cancer **2**(2): 103-107.
- Gorga, J. C., V. Horejsi, D. R. Johnson, R. Raghupathy and J. L. Strominger (1987). "Purification and characterization of class II histocompatibility antigens from a homozygous human B cell line." J Biol Chem **262**(33): 16087-16094.
- Gottschalk, S., H. E. Heslop and C. M. Rooney (2005a). "Adoptive immunotherapy for EBV-associated malignancies." Leuk Lymphoma **46**(1): 1-10.
- Gottschalk, S., C. M. Rooney and H. E. Heslop (2005b). "Post-transplant lymphoproliferative disorders." Annu Rev Med **56**: 29-44.
- Greenspan, J. S., D. Greenspan, E. T. Lennette, D. I. Abrams, M. A. Conant, V. Petersen and U. K. Freese (1985). "Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "hairy" leukoplakia, an AIDS-associated lesion." N Engl J Med **313**(25): 1564-1571.
- Habeshaw, G., Q. Y. Yao, A. I. Bell, D. Morton and A. B. Rickinson (1999). "Epstein-barr virus nuclear antigen 1 sequences in endemic and sporadic Burkitt's lymphoma reflect virus strains prevalent in different geographic areas." J Virol **73**(2): 965-975.
- Haigh, T. A., X. Lin, H. Jia, E. P. Hui, A. T. Chan, A. B. Rickinson and G. S. Taylor (2008). "EBV latent membrane proteins (LMPs) 1 and 2 as immunotherapeutic targets: LMP-specific CD4+ cytotoxic T cell recognition of EBV-transformed B cell lines." J Immunol **180**(3): 1643-1654.

- Hamann, D., P. A. Baars, M. H. Rep, B. Hooibrink, S. R. Kerkhof-Garde, M. R. Klein and R. A. van Lier (1997). "Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells." J Exp Med **186**(9): 1407-1418.
- Hammer, J., P. Valsasini, K. Tolba, D. Bolin, J. Higelin, B. Takacs and F. Sinigaglia (1993). "Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides." Cell **74**(1): 197-203.
- Haque, T., K. A. McAulay, D. Kelly and D. H. Crawford (2010). "Allogeneic T-cell therapy for Epstein-Barr virus-positive posttransplant lymphoproliferative disease: long-term follow-up." Transplantation **90**(1): 93-94.
- Haque, T., C. Taylor, G. M. Wilkie, P. Murad, P. L. Amlot, S. Beath, P. J. McKiernan and D. H. Crawford (2001). "Complete regression of posttransplant lymphoproliferative disease using partially HLA-matched Epstein Barr virus-specific cytotoxic T cells." Transplantation **72**(8): 1399-1402.
- Haque, T., G. M. Wilkie, M. M. Jones, C. D. Higgins, G. Urquhart, P. Wingate, D. Burns, K. McAulay, M. Turner, C. Bellamy, P. L. Amlot, D. Kelly, A. MacGilchrist, M. K. Gandhi, A. J. Swerdlow and D. H. Crawford (2007). "Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial." Blood **110**(4): 1123-1131.
- Harada, S. and E. Kieff (1997). "Epstein-Barr virus nuclear protein LP stimulates EBNA-2 acidic domain-mediated transcriptional activation." J Virol **71**(9): 6611-6618.
- Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy and C. T. Weaver (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." Nat Immunol **6**(11): 1123-1132.
- Hecht, J. L. and J. C. Aster (2000). "Molecular biology of Burkitt's lymphoma." J Clin Oncol **18**(21): 3707-3721.
- Hegazy, A. N., M. Peine, C. Helmstetter, I. Panse, A. Frohlich, A. Bergthaler, L. Flatz, D. D. Pinschewer, A. Radbruch and M. Lohning (2010). "Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions." Immunity **32**(1): 116-128.
- Heller, K. N., C. Gurer and C. Münz (2006). "Virus-specific CD4+ T cells: ready for direct attack." J Exp Med **203**(4): 805-808.
- Henderson, A., S. Ripley, M. Heller and E. Kieff (1983). "Chromosome site for Epstein-Barr virus DNA in a Burkitt tumor cell line and in lymphocytes growth-transformed in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(7): 1987-1991.
- Henle, G. and W. Henle (1979). Seroepidemiology of the virus. The Epstein-Barr Virus. M. A. Epstein and B. G. Achong. Berlin, Springer Verlag: 297-320.

- Henle, G., W. Henle and V. Diehl (1968). "Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-ypre virus to infectious mononucleosis." Proc Natl Acad Sci U S A **59**(1): 94-101.
- Heslop, H. E., C. Y. Ng, C. Li, C. A. Smith, S. K. Loftin, R. A. Krance, M. K. Brenner and C. M. Rooney (1996a). "Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes." Nature medicine **2**(5): 551-555.
- Heslop, H. E., C. Y. Ng, C. Li, C. A. Smith, S. K. Loftin, R. A. Krance, M. K. Brenner and C. M. Rooney (1996b). "Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes." Nat Med **2**(5): 551-555.
- Heslop, H. E., K. S. Slobod, M. A. Pule, G. A. Hale, A. Rousseau, C. A. Smith, C. M. Bollard, H. Liu, M. F. Wu, R. J. Rochester, P. J. Amrolia, J. L. Hurwitz, M. K. Brenner and C. M. Rooney (2010). "Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients." Blood **115**(5): 925-935.
- Heubach, F. (2011). "Charakterisierung der HLA-Liganden der Epstein-Barr-Virus-transformierten lymphoblastoiden B-Zelllinie LCL11." Bachelorarbeit, Eberhard Karls Universität Tübingen.
- Hislop, A. D., N. E. Annels, N. H. Gudgeon, A. M. Leese and A. B. Rickinson (2002). "Epitope-specific evolution of human CD8(+) T cell responses from primary to persistent phases of Epstein-Barr virus infection." J Exp Med **195**(7): 893-905.
- Hislop, A. D., G. S. Taylor, D. Sauce and A. B. Rickinson (2007). "Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus." Annu Rev Immunol **25**: 587-617.
- Hjalgrim, H., J. Friborg and M. Melbye (2007). The epidemiology of EBV and its association with malignant disease. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski et al. Cambridge.
- Holley-Guthrie, E. A., E. B. Quinlivan, E. C. Mar and S. Kenney (1990). "The Epstein-Barr virus (EBV) BMRF1 promoter for early antigen (EA-D) is regulated by the EBV transactivators, BRLF1 and BZLF1, in a cell-specific manner." J Virol **64**(8): 3753-3759.
- Hori, S., T. Nomura and S. Sakaguchi (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science **299**(5609): 1057-1061.
- Hörzer, H. (2010). "Identifizierung neuer T-Zellepitope als Grundlage einer Peptid-basierten Immuntherapie für Ovarialkarzinom-Patientinnen." Dissertation, Eberhard Karls Universität Tübingen.
- Howe, J. G. and J. A. Steitz (1986). "Localization of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs by in situ hybridization." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(23): 9006-9010.

- Hsu, D. H., R. de Waal Malefyt, D. F. Fiorentino, M. N. Dang, P. Vieira, J. de Vries, H. Spits, T. R. Mosmann and K. W. Moore (1990). "Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1." Science **250**(4982): 830-832.
- Hsu, H. C., P. Yang, J. Wang, Q. Wu, R. Myers, J. Chen, J. Yi, T. Guentert, A. Tousson, A. L. Stanus, T. V. Le, R. G. Lorenz, H. Xu, J. K. Kolls, R. H. Carter, D. D. Chaplin, R. W. Williams and J. D. Mountz (2008). "Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice." Nat Immunol **9**(2): 166-175.
- Icheva, V., S. Kayser, D. Wolff, S. Tuve, C. Kyzirakos, W. Bethge, J. Greil, M. H. Albert, W. Schwinger, M. Nathrath, M. Schumm, S. Stevanovic, R. Handgretinger, P. Lang and T. Feuchtinger (2012). "Adoptive Transfer of Epstein-Barr Virus (EBV) Nuclear Antigen 1-Specific T Cells As Treatment for EBV Reactivation and Lymphoproliferative Disorders After Allogeneic Stem-Cell Transplantation." J Clin Oncol.
- Itoh, M., T. Takahashi, N. Sakaguchi, Y. Kuniyasu, J. Shimizu, F. Otsuka and S. Sakaguchi (1999). "Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance." J Immunol **162**(9): 5317-5326.
- Itoh, Y. and R. N. Germain (1997). "Single cell analysis reveals regulated hierarchical T cell antigen receptor signaling thresholds and intracлонаl heterogeneity for individual cytokine responses of CD4+ T cells." J Exp Med **186**(5): 757-766.
- Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport and M. Shlomchik (2001). Immunobiology. New York and London, Garland Science.
- Jones, E. Y., L. Fugger, J. L. Strominger and C. Siebold (2006). "MHC class II proteins and disease: a structural perspective." Nat Rev Immunol **6**(4): 271-282.
- Joseph, A. M., G. J. Babcock and D. A. Thorley-Lawson (2000). "Cells expressing the Epstein-Barr virus growth program are present in and restricted to the naive B-cell subset of healthy tonsils." J Virol **74**(21): 9964-9971.
- Joutel, A. and E. Tournier-Lasserre (1998). "Notch signalling pathway and human diseases." Semin Cell Dev Biol **9**(6): 619-625.
- Justesen, S., M. Harndahl, K. Lamberth, L. L. Nielsen and S. Buus (2009). "Functional recombinant MHC class II molecules and high-throughput peptide-binding assays." Immunome Res **5**: 2.
- Kaiser, C., G. Laux, D. Eick, N. Jochner, G. W. Bornkamm and B. Kempkes (1999). "The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2." J Virol **73**(5): 4481-4484.
- Kamradt, T. (2007). "[Th17 cells]." Z Rheumatol **66**(1): 54-55.

- Kannanganat, S., C. Ibegbu, L. Chennareddi, H. L. Robinson and R. R. Amara (2007a). "Multiple-cytokine-producing antiviral CD4 T cells are functionally superior to single-cytokine-producing cells." J Virol **81**(16): 8468-8476.
- Kannanganat, S., B. G. Kapogiannis, C. Ibegbu, L. Chennareddi, P. Goepfert, H. L. Robinson, J. Lennox and R. R. Amara (2007b). "Human immunodeficiency virus type 1 controllers but not noncontrollers maintain CD4 T cells coexpressing three cytokines." J Virol **81**(21): 12071-12076.
- Karajannis, M. A., M. Hummel, I. Anagnostopoulos and H. Stein (1997). "Strict lymphotropism of Epstein-Barr virus during acute infectious mononucleosis in nonimmunocompromised individuals." Blood **89**(8): 2856-2862.
- Kaschka-Dierich, C., A. Adams, T. Lindahl, G. W. Bornkamm, G. Bjursell, G. Klein, B. C. Giovanella and S. Singh (1976). "Intracellular forms of Epstein-Barr virus DNA in human tumour cells in vivo." Nature **260**(5549): 302-306.
- Kennedy, G., J. Komano and B. Sugden (2003). "Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 14269-14274.
- Kenney, S. C. (2007). Reactivation and lytic replication of EBV. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarskiet al. Cambridge.
- Khan, G., E. Miyashita, B. Yang, G. J. Babcock and A. D. Thorley-Lawson (1996). "Is EBV persistence *in vivo* a model for B cell homeostasis?" Immunity **5**: 173-179.
- Khan, N., A. Hislop, N. Gudgeon, M. Cobbold, R. Khanna, L. Nayak, A. B. Rickinson and P. A. Moss (2004). "Herpesvirus-specific CD8 T cell immunity in old age: cytomegalovirus impairs the response to a coresident EBV infection." J Immunol **173**(12): 7481-7489.
- Khanna, R., S. R. Burrows, P. M. Steigerwald-Mullen, S. A. Thomson, M. G. Kurilla and D. J. Moss (1995). "Isolation of cytotoxic T lymphocytes from healthy seropositive individuals specific for peptide epitopes from Epstein-Barr virus nuclear antigen 1: implications for viral persistence and tumor surveillance." Virology **214**(2): 633-637.
- Khanna, R., S. R. Burrows, S. A. Thomson, D. J. Moss, P. Cresswell, L. M. Poulsen and L. Cooper (1997). "Class I processing-defective Burkitt's lymphoma cells are recognized efficiently by CD4+ EBV-specific CTLs." J Immunol **158**(8): 3619-3625.
- Kieff, E., T. Dambaugh, M. Heller, W. King, A. Cheung, V. van Santen, M. Hummel, C. Beisel, S. Fennewald, K. Hennessy and T. Heineman (1982). "The biology and chemistry of Epstein-Barr virus." J Infect Dis **146**(4): 506-517.
- Kieff, E. and A. Rickinson (2001). Epstein-Barr Virus and its replication. Fields Virology. B. N. Fields, Knipe, D. M., Howley, P. M. Philadelphia, Lippincott-Raven. **2**: 2511-2575.

- Kieff, E. and A. B. Rickinson (2007). Epstein-Barr virus and its replication. Fields Virology. P. M. H. D. M. Knipe, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. M. Martin, B. Roizman, S. E. Straus. Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins. **II**: 2603-2654.
- Kim, C. H., L. S. Rott, I. Clark-Lewis, D. J. Campbell, L. Wu and E. C. Butcher (2001). "Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells." J Exp Med **193**(12): 1373-1381.
- Kimura, H., Y. Hoshino, H. Kanegane, I. Tsuge, T. Okamura, K. Kawa and T. Morishima (2001). "Clinical and virologic characteristics of chronic active Epstein-Barr virus infection." Blood **98**(2): 280-286.
- Kitay, M. K. and D. T. Rowe (1996). "Cell cycle stage-specific phosphorylation of the Epstein-Barr virus immortalization protein EBNA-LP." J Virol **70**(11): 7885-7893.
- Klein, G., B. C. Giovanella, T. Lindahl, P. J. Fialkow, S. Singh and J. S. Stehlin (1974). "Direct evidence for the presence of Epstein-Barr virus DNA and nuclear antigen in malignant epithelial cells from patients with poorly differentiated carcinoma of the nasopharynx." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(12): 4737-4741.
- Ko, H. S., S. M. Fu, R. J. Winchester, D. T. Yu and H. G. Kunkel (1979). "Ia determinants on stimulated human T lymphocytes. Occurrence on mitogen- and antigen-activated T cells." J Exp Med **150**(2): 246-255.
- Koeffler, H. P. and D. W. Golde (1980). "Human myeloid leukemia cell lines: a review." Blood **56**(3): 344-350.
- Kruger, S., R. Schroers, C. M. Rooney, B. Gahn and S. Y. Chen (2003). "Identification of a naturally processed HLA-DR-restricted T-helper epitope in Epstein-Barr virus nuclear antigen type 1." J Immunother **26**(3): 212-221.
- Kurts, C., B. W. Robinson and P. A. Knolle (2010). "Cross-priming in health and disease." Nat Rev Immunol **10**(6): 403-414.
- Kutok, J. L. and F. Wang (2006). "Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases." Annu Rev Pathol **1**: 375-404.
- Kvist, S., K. Wiman, L. Claesson, P. A. Peterson and B. Dobberstein (1982). "Membrane insertion and oligomeric assembly of HLA-DR histocompatibility antigens." Cell **29**(1): 61-69.
- Kyzirakos, C. (2009). "Charakterisierung der CD4 T-Zellantwort gegen EBV-Antigene." Diplomarbeit, Eberhard Karls Universität Tübingen.
- Laichalk, L. L., D. Hochberg, G. J. Babcock, R. B. Freeman and D. A. Thorley-Lawson (2002). "The dispersal of mucosal memory B cells: evidence from persistent EBV infection." Immunity **16**(5): 745-754.
- Landais, E., X. Saulquin and E. Houssaint (2005). "The human T cell immune response to Epstein-Barr virus." Int J Dev Biol **49**(2-3): 285-292.



- Landsverk, O. J., O. Bakke and T. F. Gregers (2009). "MHC II and the endocytic pathway: regulation by invariant chain." Scand J Immunol **70**(3): 184-193.
- Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein and D. J. Cua (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." J Exp Med **201**(2): 233-240.
- Laupeze, B., O. Fardel, M. Onno, N. Bertho, B. Drenou, R. Fauchet and L. Amiot (1999). "Differential expression of major histocompatibility complex class Ia, Ib, and II molecules on monocytes-derived dendritic and macrophagic cells." Hum Immunol **60**(7): 591-597.
- Lecchi, M., E. Lovisone, C. Genetta, D. Peruccio, L. Resegotti and P. Richiardi (1989). "Gamma-IFN induces a differential expression of HLA-DR, DQ and DP antigens on peripheral blood myeloid leukemic blasts at various stages of differentiation." Leuk Res **13**(3): 221-226.
- Lee, M. A., M. E. Diamond and J. L. Yates (1999). "Genetic evidence that EBNA-1 is needed for efficient, stable latent infection by Epstein-Barr virus." J Virol **73**(4): 2974-2982.
- Leen, A., P. Meij, I. Redchenko, J. Middeldorp, E. Bloemena, A. Rickinson and N. Blake (2001). "Differential immunogenicity of Epstein-Barr virus latent-cycle proteins for human CD4(+) T-helper 1 responses." J Virol **75**(18): 8649-8659.
- Lemon, S. M., L. M. Hutt, J. E. Shaw, J. L. Li and J. S. Pagano (1977). "Replication of EBV in epithelial cells during infectious mononucleosis." Nature **268**(5617): 268-270.
- Lerner, M. R., N. C. Andrews, G. Miller and J. A. Steitz (1981). "Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(2): 805-809.
- Levitskaya, J., A. Sharipo, A. Leonchiks, A. Ciechanover and M. G. Masucci (1997). "Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12616-12621.
- Li, Q., M. K. Spriggs, S. Kovats, S. M. Turk, M. R. Comeau, B. Nepom and L. M. Hutt-Fletcher (1997). "Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes." J Virol **71**(6): 4657-4662.
- Lim, H. W., P. Hillsamer, A. H. Banham and C. H. Kim (2005). "Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells." Journal of immunology **175**(7): 4180-4183.
- Lindahl, T., A. Adams, G. Bjursell, G. W. Bornkamm, C. Kaschka-Dierich and U. Jehn (1976). "Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr virus in a human lymphoid cell line." J Mol Biol **102**(3): 511-530.
- Linterman, M. A., L. Beaton, D. Yu, R. R. Ramiscal, M. Srivastava, J. J. Hogan, N. K. Verma, M. J. Smyth, R. J. Rigby and C. G. Vinuesa (2010). "IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses." The Journal of experimental medicine **207**(2): 353-363.

- Liu, H., M. Rhodes, D. L. Wiest and D. A. Vignali (2000). "On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation." *Immunity* **13**(5): 665-675.
- Long, H. M., T. A. Haigh, N. H. Gudgeon, A. M. Leen, C. W. Tsang, J. Brooks, E. Landais, E. Houssaint, S. P. Lee, A. B. Rickinson and G. S. Taylor (2005). "CD4+ T-cell responses to Epstein-Barr virus (EBV) latent-cycle antigens and the recognition of EBV-transformed lymphoblastoid cell lines." *J Virol* **79**(8): 4896-4907.
- Long, H. M., A. M. Leese, O. L. Chagoury, S. R. Connerty, J. Quarcoopome, L. L. Quinn, C. Shannon-Lowe and A. B. Rickinson (2011). "Cytotoxic CD4+ T Cell Responses to EBV Contrast with CD8 Responses in Breadth of Lytic Cycle Antigen Choice and in Lytic Cycle Recognition." *J Immunol* **187**(1): 92-101.
- Louis, C. U., K. Straathof, C. M. Bollard, S. Ennamuri, C. Gerken, T. T. Lopez, M. H. Huls, A. Sheehan, M. F. Wu, H. Liu, A. Gee, M. K. Brenner, C. M. Rooney, H. E. Heslop and S. Gottschalk (2010). "Adoptive transfer of EBV-specific T cells results in sustained clinical responses in patients with locoregional nasopharyngeal carcinoma." *J Immunother* **33**(9): 983-990.
- Lucht, E., P. Biberfeld and A. Linde (1995). "Epstein-Barr virus (EBV) DNA in saliva and EBV serology of HIV-1-infected persons with and without hairy leukoplakia." *J Infect* **31**(3): 189-194.
- Lugthart, G., S. J. Albon, I. Ricciardelli, M. G. Kester, P. Meij, A. C. Lankester and P. J. Amrolia (2012). "Simultaneous generation of multivirus-specific and regulatory T cells for adoptive immunotherapy." *J Immunother* **35**(1): 42-53.
- Maini, M. K., N. Gudgeon, L. R. Wedderburn, A. B. Rickinson and P. C. Beverley (2000). "Clonal expansions in acute EBV infection are detectable in the CD8 and not the CD4 subset and persist with a variable CD45 phenotype." *J Immunol* **165**(10): 5729-5737.
- Matzinger, P. and S. Guerder (1989). "Does T-cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell?" *Nature* **338**(6210): 74-76.
- McAulay, K. A., T. Haque, G. Urquhart, C. Bellamy, D. Guiretti and D. H. Crawford (2009). "Epitope specificity and clonality of EBV-specific CTLs used to treat posttransplant lymphoproliferative disease." *J Immunol* **182**(6): 3892-3901.
- McGeoch, D. J., S. Cook, A. Dolan, F. E. Jamieson and E. A. Telford (1995). "Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses." *J Mol Biol* **247**(3): 443-458.
- McKenzie, B. S., R. A. Kastelein and D. J. Cua (2006). "Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway." *Trends Immunol* **27**(1): 17-23.
- Merlo, A., R. Turrini, S. Bobisse, R. Zamarchi, R. Alaggio, R. Dolcetti, J. Mautner, P. Zanovello, A. Amadori and A. Rosato (2010). "Virus-specific cytotoxic CD4+ T cells for the treatment of EBV-related tumors." *Journal of immunology* **184**(10): 5895-5902.

- Merlo, A., R. Turrini, R. Dolcetti, P. Zanovello and A. Rosato (2011). "Immunotherapy for EBV-associated malignancies." Int J Hematol **93**(3): 281-293.
- Miller, G., T. Shope, D. Coope, L. Waters, J. Pagano, G. Bornkamm and W. Henle (1977). "Lymphoma in cotton-top marmosets after inoculation with Epstein-Barr virus: tumor incidence, histologic spectrum antibody responses, demonstration of viral DNA, and characterization of viruses." J Exp Med **145**(4): 948-967.
- Miller, M. (2009). "Einfluss des Chemotherapeutikums LY294002 auf das HLA Klasse I-Ligandom der Melanomzelllinie 451LU." Diplomarbeit, Eberhard Karls Universität Tübingen.
- Milosevic, S., U. Behrends, D. Adhikary and J. Mautner (2006). "Identification of major histocompatibility complex class II-restricted antigens and epitopes of the Epstein-Barr virus by a novel bacterial expression cloning approach." J Virol **80**(21): 10357-10364.
- Misumi, Y., K. Miki, A. Takatsuki, G. Tamura and Y. Ikehara (1986). "Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes." J Biol Chem **261**(24): 11398-11403.
- Miyashita, E. M., B. Yang, G. J. Babcock and D. A. Thorley-Lawson (1997). "Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a resting B cell." J Virol **71**(7): 4882-4891.
- Montserrat, E. (2012). "PTLD treatment: a step forward, a long way to go." Lancet Oncol **13**(2): 120-121.
- Moosmann, A., I. Bigalke, J. Tischer, L. Schirrmann, J. Kasten, S. Tippmer, M. Leeping, D. Prevalsek, G. Jaeger, G. Ledderose, J. Mautner, W. Hammerschmidt, D. J. Schendel and H. J. Kolb (2010). "Effective and long-term control of EBV PTLN after transfer of peptide-selected T cells." Blood **115**(14): 2960-2970.
- Mosialos, G., M. Birkenbach, R. Yalamanchili, T. VanArsdale, C. Ware and E. Kieff (1995). "The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family." Cell **80**(3): 389-399.
- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin and R. L. Coffman (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." J Immunol **136**(7): 2348-2357.
- Mosmann, T. R. and R. L. Coffman (1989). "Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells." Adv Immunol **46**: 111-147.
- Munoz-Fernandez, M. A., M. A. Fernandez and M. Fresno (1992). "Activation of human macrophages for the killing of intracellular Trypanosoma cruzi by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism." Immunol Lett **33**(1): 35-40.
- Münz, C. (2012). "Antigen Processing for MHC Class II Presentation via Autophagy." Front Immunol **3**: 9.

- Neefjes, J., M. L. Jongsma, P. Paul and O. Bakke (2011). "Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation." Nat Rev Immunol **11**(12): 823-836.
- Niedobitek, G., S. Hamilton-Dutoit, H. Herbst, T. Finn, M. Vetner, G. Pallesen and H. Stein (1989). "Identification of Epstein-Barr virus-infected cells in tonsils of acute infectious mononucleosis by in situ hybridization." Hum Pathol **20**(8): 796-799.
- Niedobitek, G., M. L. Hansmann, H. Herbst, L. S. Young, D. Dienemann, C. A. Hartmann, T. Finn, S. Pitteroff, A. Welt, I. Anagnostopoulos and et al. (1991). "Epstein-Barr virus and carcinomas: undifferentiated carcinomas but not squamous cell carcinomas of the nasopharynx are regularly associated with the virus." J Pathol **165**(1): 17-24.
- Nikiforow, S., K. Bottomly, G. Miller and C. Münz (2003). "Cytolytic CD4(+)-T-cell clones reactive to EBNA1 inhibit Epstein-Barr virus-induced B-cell proliferation." J Virol **77**(22): 12088-12104.
- Ning, R. J., X. Q. Xu, K. H. Chan and A. K. Chiang (2011). "Long-term carriers generate Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD4(+) and CD8(+) polyfunctional T-cell responses which show immunodominance hierarchies of EBV proteins." Immunology **134**(2): 161-171.
- Nurieva, R. I., Y. Chung, D. Hwang, X. O. Yang, H. S. Kang, L. Ma, Y. H. Wang, S. S. Watowich, A. M. Jetten, Q. Tian and C. Dong (2008). "Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages." Immunity **29**(1): 138-149.
- O'Garra, A. and N. Arai (2000). "The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation." Trends Cell Biol **10**(12): 542-550.
- Odumade, O. A., K. A. Hogquist and H. H. Balfour, Jr. (2011). "Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections." Clin Microbiol Rev **24**(1): 193-209.
- Omiya, R., C. Buteau, H. Kobayashi, C. V. Paya and E. Celis (2002). "Inhibition of EBV-induced lymphoproliferation by CD4(+) T cells specific for an MHC class II promiscuous epitope." J Immunol **169**(4): 2172-2179.
- Ouyang, Q., W. M. Wagner, S. Walter, C. A. Muller, A. Wikby, G. Aubert, T. Klatt, S. Stevanovic, T. Dodi and G. Pawelec (2003). "An age-related increase in the number of CD8+ T cells carrying receptors for an immunodominant Epstein-Barr virus (EBV) epitope is counteracted by a decreased frequency of their antigen-specific responsiveness." Mech Ageing Dev **124**(4): 477-485.
- Paliard, X., R. de Waal Malefijt, H. Yssel, D. Blanchard, I. Chretien, J. Abrams, J. de Vries and H. Spits (1988). "Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones." J Immunol **141**(3): 849-855.
- Paludan, C., K. Bickham, S. Nikiforow, M. L. Tsang, K. Goodman, W. A. Hanekom, J. F. Fonteneau, S. Stevanovic and C. Munz (2002). "Epstein-Barr nuclear antigen 1-specific CD4(+) Th1 cells kill Burkitt's lymphoma cells." J Immunol **169**(3): 1593-1603.

- Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian and C. Dong (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." Nat Immunol **6**(11): 1133-1141.
- Parker, D. C. (1993). "The functions of antigen recognition in T cell-dependent B cell activation." Semin Immunol **5**(6): 413-420.
- Pawelec, G. and H. J. Bühring (1990). "Expression of MHC class II epitopes on human T lymphocyte clones." Cell Immunol **127**(2): 520-526.
- Paya, C. V., J. J. Fung, M. A. Nalesnik, E. Kieff, M. Green, G. Gores, T. M. Habermann, P. H. Wiesner, J. L. Swinnen, E. S. Woodle and J. S. Bromberg (1999). "Epstein-Barr virus-induced posttransplant lymphoproliferative disorders. ASTS/ASTP EBV-PTLD Task Force and The Mayo Clinic Organized International Consensus Development Meeting." Transplantation **68**(10): 1517-1525.
- Penn, I. (1978). "Tumors arising in organ transplant recipients." Adv Cancer Res **28**: 31-61.
- Perkins, D. N., D. J. Pappin, D. M. Creasy and J. S. Cottrell (1999). "Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data." Electrophoresis **20**(18): 3551-3567.
- Peters, P. J., J. J. Neefjes, V. Oorschot, H. L. Ploegh and H. J. Geuze (1991). "Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments." Nature **349**(6311): 669-676.
- Precopio, M. L., J. L. Sullivan, C. Willard, M. Somasundaran and K. Luzuriaga (2003). "Differential kinetics and specificity of EBV-specific CD4+ and CD8+ T cells during primary infection." J Immunol **170**(5): 2590-2598.
- Pudney, V. A., A. M. Leese, A. B. Rickinson and A. D. Hislop (2005). "CD8+ immunodominance among Epstein-Barr virus lytic cycle antigens directly reflects the efficiency of antigen presentation in lytically infected cells." J Exp Med **201**(3): 349-360.
- Pulendran, B. and D. Artis (2012). "New paradigms in type 2 immunity." Science **337**(6093): 431-435.
- Raab-Traub, N. (2007). EBV-induced oncogenesis. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski et al. Cambridge.
- Ragoczy, T. and G. Miller (1999). "Role of the Epstein-Barr virus RTA protein in activation of distinct classes of viral lytic cycle genes." J Virol **73**(12): 9858-9866.
- Ragoczy, T. and G. Miller (2001). "Autostimulation of the Epstein-Barr virus BRLF1 promoter is mediated through consensus Sp1 and Sp3 binding sites." J Virol **75**(11): 5240-5251.

- Rammensee, H., J. Bachmann, N. P. Emmerich, O. A. Bachor and S. Stevanovic (1999). "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs." *Immunogenetics* **50**(3-4): 213-219.
- Rammensee H.-G., B. J., Stevanović S. (1997). *MHC ligands and peptide motifs* Austin, Tex, New York, Landes Bioscience, Springer.
- Rammensee, H. G. (1995). "Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules." *Curr Opin Immunol* **7**(1): 85-96.
- Reinherz, E. L., S. Meuer, K. A. Fitzgerald, R. E. Hussey, H. Levine and S. F. Schlossman (1982). "Antigen recognition by human T lymphocytes is linked to surface expression of the T3 molecular complex." *Cell* **30**(3): 735-743.
- Reth, M. (1989). "Antigen receptor tail clue." *Nature* **338**(6214): 383-384.
- Rickinson, A. and E. Kieff (2001). Epstein-Barr Virus. *Fields Virology*. B. N. Fields, Knipe, D. M., Howley, P. M. Philadelphia, Lippincott-Raven. **2**: 2575-2629.
- Rickinson, A. B. and D. J. Moss (1997). "Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection." *Annu Rev Immunol* **15**: 405-431.
- Rickinson, A. B., L. S. Young and M. Rowe (1987). "Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells." *J Virol* **61**(5): 1310-1317.
- Ridge, J. P., F. Di Rosa and P. Matzinger (1998). "A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell." *Nature* **393**(6684): 474-478.
- Riemer, A. B., D. B. Keskin, G. Zhang, M. Handley, K. S. Anderson, V. Brusic, B. Reinhold and E. L. Reinherz (2010). "A conserved E7-derived cytotoxic T lymphocyte epitope expressed on human papillomavirus 16-transformed HLA-A2+ epithelial cancers." *J Biol Chem* **285**(38): 29608-29622.
- Robertson, E. S., J. Lin and E. Kieff (1996). "The amino-terminal domains of Epstein-Barr virus nuclear proteins 3A, 3B, and 3C interact with RBPJ(kappa)." *J Virol* **70**(5): 3068-3074.
- Rochford, R., M. J. Cannon and A. M. Moormann (2005). "Endemic Burkitt's lymphoma: a polymicrobial disease?" *Nat Rev Microbiol* **3**(2): 182-187.
- Rogers, P. R., C. Dubey and S. L. Swain (2000). "Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen." *J Immunol* **164**(5): 2338-2346.
- Rooney, C. M., C. A. Smith, C. Y. Ng, S. Loftin, C. Li, R. A. Krance, M. K. Brenner and H. E. Heslop (1995). "Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation." *Lancet* **345**(8941): 9-13.

- Rooney, C. M., C. A. Smith, C. Y. Ng, S. K. Loftin, J. W. Sixbey, Y. Gan, D. K. Srivastava, L. C. Bowman, R. A. Krance, M. K. Brenner and H. E. Heslop (1998). "Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients." Blood **92**(5): 1549-1555.
- Rowe, D. T. (1999). "Epstein-Barr virus immortalization and latency." Front Biosci **4**: D346-371.
- Rowe, M., L. S. Young, K. Cadwallader, L. Petti, E. Kieff and A. B. Rickinson (1989). "Distinction between Epstein-Barr virus type A (EBNA 2A) and type B (EBNA 2B) isolates extends to the EBNA 3 family of nuclear proteins." J Virol **63**(3): 1031-1039.
- Sakaguchi, S. and N. Sakaguchi (1988). "Thymus and autoimmunity. Transplantation of the thymus from cyclosporin A-treated mice causes organ-specific autoimmune disease in athymic nude mice." J Exp Med **167**(4): 1479-1485.
- Salek-Ardakani, S., J. R. Arrand and M. Mackett (2002). "Epstein-Barr virus encoded interleukin-10 inhibits HLA-class I, ICAM-1, and B7 expression on human monocytes: implications for immune evasion by EBV." Virology **304**(2): 342-351.
- Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp and A. Lanzavecchia (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." Nature **401**(6754): 708-712.
- Salveti, M., G. Giovannoni and F. Aloisi (2009). "Epstein-Barr virus and multiple sclerosis." Curr Opin Neurol **22**(3): 201-206.
- Sample, J., L. Young, B. Martin, T. Chatman, E. Kieff and A. Rickinson (1990). "Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes." J Virol **64**(9): 4084-4092.
- Schaerli, P., K. Willmann, A. B. Lang, M. Lipp, P. Loetscher and B. Moser (2000). "CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function." J Exp Med **192**(11): 1553-1562.
- Schipper, R. F., C. A. van Els, J. D'Amato and M. Oudshoorn (1996). "Minimal phenotype panels. A method for achieving maximum population coverage with a minimum of HLA antigens." Hum Immunol **51**(2): 95-98.
- Schirle, M., W. Keilholz, B. Weber, C. Gouttefangeas, T. Dumrese, H. D. Becker, S. Stevanovic and H. G. Rammensee (2000). "Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach." Eur J Immunol **30**(8): 2216-2225.
- Seder, R. A., P. A. Darrah and M. Roederer (2008). "T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design." Nat Rev Immunol **8**(4): 247-258.
- Sester, M., U. Sester, B. Gartner, B. Kubuschok, M. Girndt, A. Meyerhans and H. Kohler (2002). "Sustained high frequencies of specific CD4 T cells restricted to a single persistent virus." J Virol **76**(8): 3748-3755.

- Shiramizu, B., F. Barriga, J. Neequaye, A. Jafri, R. Dalla-Favera, A. Neri, M. Gutierrez, P. Levine and I. Magrath (1991). "Patterns of chromosomal breakpoint locations in Burkitt's lymphoma: relevance to geography and Epstein-Barr virus association." *Blood* **77**(7): 1516-1526.
- Shu, C. H., Y. S. Chang, C. L. Liang, S. T. Liu, C. Z. Lin and P. Chang (1992). "Distribution of type A and type B EBV in normal individuals and patients with head and neck carcinomas in Taiwan." *J Virol Methods* **38**(1): 123-130.
- Sixbey, J. W., J. G. Nedrud, N. Raab-Traub, R. A. Hanes and J. S. Pagano (1984). "Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells." *N Engl J Med* **310**(19): 1225-1230.
- Sixbey, J. W., P. Shirley, P. J. Chesney, D. M. Buntin and L. Resnick (1989). "Detection of a second widespread strain of Epstein-Barr virus." *Lancet* **2**(8666): 761-765.
- Speck, P., K. M. Haan and R. Longnecker (2000). "Epstein-Barr virus entry into cells." *Virology* **277**(1): 1-5.
- Sprunt, T. P. and F. A. Evans (1920). "Mononuclear leucocytosis in reaction to acute infections ("infectious mononucleosis")." *Johns Hopkins Hosp. Bull.* **31**: 410-417.
- Starzl, T. E., I. Penn and C. G. Halgrimson (1970). "Immunosuppression and malignant neoplasms." *N Engl J Med* **283**(17): 934.
- Stassen, M., E. Schmitt and T. Bopp (2012). "From interleukin-9 to T helper 9 cells." *Ann N Y Acad Sci* **1247**: 56-68.
- Steigerwald-Mullen, P., M. G. Kurilla and T. J. Braciale (2000). "Type 2 cytokines predominate in the human CD4(+) T-lymphocyte response to Epstein-Barr virus nuclear antigen 1." *J Virol* **74**(15): 6748-6759.
- Stern, L. J., J. H. Brown, T. S. Jardetzky, J. C. Gorga, R. G. Urban, J. L. Strominger and D. C. Wiley (1994). "Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide." *Nature* **368**(6468): 215-221.
- Stout, R. D. and K. Bottomly (1989). "Antigen-specific activation of effector macrophages by IFN-gamma producing (TH1) T cell clones. Failure of IL-4-producing (TH2) T cell clones to activate effector function in macrophages." *J Immunol* **142**(3): 760-765.
- Stunz, L. L., R. W. Karr and R. A. Anderson (1989). "HLA-DRB1 and -DRB4 genes are differentially regulated at the transcriptional level." *J Immunol* **143**(9): 3081-3086.
- Sugaya, N., H. Kimura, S. Hara, Y. Hoshino, S. Kojima, T. Morishima, T. Tsurumi and K. Kuzushima (2004). "Quantitative analysis of Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD8+ T cells in patients with chronic active EBV infection." *J Infect Dis* **190**(5): 985-988.
- Sun, Q., R. L. Burton and K. G. Lucas (2002). "Cytokine production and cytolytic mechanism of CD4(+) cytotoxic T lymphocytes in ex vivo expanded therapeutic Epstein-Barr virus-specific T-cell cultures." *Blood* **99**(9): 3302-3309.



- Swain, S. L., K. K. McKinstry and T. M. Strutt (2012a). "Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses." Nature reviews. Immunology **12**(2): 136-148.
- Swain, S. L., K. K. McKinstry and T. M. Strutt (2012b). "Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses." Nat Rev Immunol **12**(2): 136-148.
- Takimoto, T., H. Sato, H. Ogura, S. Tanaka, K. Masuda, S. Ishikawa and R. Umeda (1989). "Differences in the ability of cells to fuse are mediated by strains of Epstein-Barr virus." Laryngoscope **99**(10 Pt 1): 1075-1080.
- Taylor, G. M., S. K. Raghuwanshi, D. T. Rowe, R. M. Wadowsky and A. Rosendorff (2011). "Endoplasmic reticulum stress causes EBV lytic replication." Blood **118**(20): 5528-5539.
- Taylor, G. S., T. A. Haigh, N. H. Gudgeon, R. J. Phelps, S. P. Lee, N. M. Steven and A. B. Rickinson (2004). "Dual stimulation of Epstein-Barr Virus (EBV)-specific CD4+- and CD8+-T-cell responses by a chimeric antigen construct: potential therapeutic vaccine for EBV-positive nasopharyngeal carcinoma." J Virol **78**(2): 768-778.
- Thompson, M. P. and R. Kurzrock (2004). "Epstein-Barr virus and cancer." Clin Cancer Res **10**(3): 803-821.
- Thorley-Lawson, D. A. and M. J. Allday (2008). "The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma." Nat Rev Microbiol **6**(12): 913-924.
- Tierney, R. J., N. Steven, L. S. Young and A. B. Rickinson (1994). "Epstein-Barr virus latency in blood mononuclear cells: analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state." J Virol **68**(11): 7374-7385.
- Timms, J. M., A. Bell, J. R. Flavell, P. G. Murray, A. B. Rickinson, A. Traverse-Glehen, F. Berger and H. J. Delecluse (2003). "Target cells of Epstein-Barr-virus (EBV)-positive post-transplant lymphoproliferative disease: similarities to EBV-positive Hodgkin's lymphoma." Lancet **361**(9353): 217-223.
- Toellner, K. M., S. A. Luther, D. M. Sze, R. K. Choy, D. R. Taylor, I. C. MacLennan and H. Acha-Orbea (1998). "T helper 1 (Th1) and Th2 characteristics start to develop during T cell priming and are associated with an immediate ability to induce immunoglobulin class switching." J Exp Med **187**(8): 1193-1204.
- Tomkinson, B., E. Robertson and E. Kieff (1993). "Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation." J Virol **67**(4): 2014-2025.
- Townsend, A. R., J. Rothbard, F. M. Gotch, G. Bahadur, D. Wraith and A. J. McMichael (1986). "The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides." Cell **44**(6): 959-968.
- Traherne, J. A. (2008). "Human MHC architecture and evolution: implications for disease association studies." Int J Immunogenet **35**(3): 179-192.

- Van Lier, R. A. and P. A. Baars (1999). "Assessing the replicative history of human T cells." Mutation research **431**(2): 177-180.
- Veiga-Fernandes, H., U. Walter, C. Bourgeois, A. McLean and B. Rocha (2000). "Response of naive and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo." Nat Immunol **1**(1): 47-53.
- ViralZone. (2011). "Lymphocryptovirus." from [http://viralzone.expasy.org/complete\\_by\\_species/185.html#tab6](http://viralzone.expasy.org/complete_by_species/185.html#tab6).
- Voo, K. S., G. Peng, Z. Guo, T. Fu, Y. Li, L. Frappier and R. F. Wang (2005). "Functional characterization of EBV-encoded nuclear antigen 1-specific CD4+ helper and regulatory T cells elicited by in vitro peptide stimulation." Cancer Res **65**(4): 1577-1586.
- Wagner, H., C. Hardt, K. Heeg, K. Pfizenmaier, W. Solbach, R. Bartlett, H. Stockinger and M. Rollinghoff (1980). "T-T cell interactions during cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses: T cell derived helper factor (Interleukin 2) as a probe to analyze CTL responsiveness and thymic maturation of CTL progenitors." Immunol Rev **51**: 215-255.
- Wallace, L. E., J. Wright, D. O. Ulaeto, A. J. Morgan and A. B. Rickinson (1991). "Identification of two T-cell epitopes on the candidate Epstein-Barr virus vaccine glycoprotein gp340 recognized by CD4+ T-cell clones." J Virol **65**(7): 3821-3828.
- Wang, D., D. Liebowitz, F. Wang, C. Gregory, A. Rickinson, R. Larson, T. Springer and E. Kieff (1988). "Epstein-Barr virus latent infection membrane protein alters the human B-lymphocyte phenotype: deletion of the amino terminus abolishes activity." J Virol **62**(11): 4173-4184.
- Wang, F., C. D. Gregory, M. Rowe, A. B. Rickinson, D. Wang, M. Birkenbach, H. Kikutani, T. Kishimoto and E. Kieff (1987). "Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 specifically induces expression of the B-cell activation antigen CD23." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(10): 3452-3456.
- Wang, F., S. F. Tsang, M. G. Kurilla, J. I. Cohen and E. Kieff (1990). "Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivates latent membrane protein LMP1." J Virol **64**(7): 3407-3416.
- Wang, P., J. Sidney, C. Dow, B. Mothe, A. Sette and B. Peters (2008). "A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach." PLoS Comput Biol **4**(4): e1000048.
- Webb, S. R. and J. Sprent (1990). "Tolerogenicity of thymic epithelium." Eur J Immunol **20**(11): 2525-2528.
- Weinzierl, A. O., D. Rudolf, D. Maurer, D. Wernet, H. G. Rammensee, S. Stevanovic and K. Klingel (2008). "Identification of HLA-A\*01- and HLA-A\*02-restricted CD8+ T-cell epitopes shared among group B enteroviruses." J Gen Virol **89**(Pt 9): 2090-2097.
- Wekerle, H. and R. Hohlfeld (2003). "Molecular mimicry in multiple sclerosis." N Engl J Med **349**(2): 185-186.

- Wensing, B. and P. J. Farrell (2000). "Regulation of cell growth and death by Epstein-Barr virus." Microbes Infect **2**(1): 77-84.
- WHO. (2012). "Epstein-Barr virus." Viral Cancers, from [http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/viral\\_cancers/en/index1.html](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/viral_cancers/en/index1.html).
- Wilkie, G. M., C. Taylor, M. M. Jones, D. M. Burns, M. Turner, D. Kilpatrick, P. L. Amlot, D. H. Crawford and T. Haque (2004). "Establishment and characterization of a bank of cytotoxic T lymphocytes for immunotherapy of Epstein-Barr virus-associated diseases." J Immunother **27**(4): 309-316.
- Willerford, D. M., W. Swat and F. W. Alt (1996). "Developmental regulation of V(D)J recombination and lymphocyte differentiation." Curr Opin Genet Dev **6**(5): 603-609.
- Wilson, A. D., I. Redchenko, N. A. Williams and A. J. Morgan (1998). "CD4+ T cells inhibit growth of Epstein-Barr virus-transformed B cells through CD95-CD95 ligand-mediated apoptosis." Int Immunol **10**(8): 1149-1157.
- Wright, M. N., J. P. Stewart, N. J. Janjua, S. D. Pepper, C. Sample, C. M. Rooney and J. R. Arrand (1995). "Antigenic and sequence variation in the C-terminal unique domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1." Virology **208**(2): 521-530.
- Xiao, J., J. M. Palefsky, R. Herrera, J. Berline and S. M. Tugizov (2008). "The Epstein-Barr virus BMRF-2 protein facilitates virus attachment to oral epithelial cells." Virology **370**(2): 430-442.
- Xiao, J., J. M. Palefsky, R. Herrera, J. Berline and S. M. Tugizov (2009). "EBV BMRF-2 facilitates cell-to-cell spread of virus within polarized oral epithelial cells." Virology **388**(2): 335-343.
- Yalamanchili, R., X. Tong, S. Grossman, E. Johannsen, G. Mosialos and E. Kieff (1994). "Genetic and biochemical evidence that EBNA 2 interaction with a 63-kDa cellular GTG-binding protein is essential for B lymphocyte growth transformation by EBV." Virology **204**(2): 634-641.
- Yates, J. L., N. Warren and B. Sugden (1985). "Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells." Nature **313**(6005): 812-815.
- Ye, M., S. Kasey, S. Khurana, N. T. Nguyen, S. Schubert, C. T. Nugent, K. Kuus-Reichel and J. Hampl (2004). "MHC class II tetramers containing influenza hemagglutinin and EBV EBNA1 epitopes detect reliably specific CD4(+) T cells in healthy volunteers." Hum Immunol **65**(5): 507-513.
- Ye, P., F. H. Rodriguez, S. Kanaly, K. L. Stocking, J. Schurr, P. Schwarzenberger, P. Oliver, W. Huang, P. Zhang, J. Zhang, J. E. Shellito, G. J. Bagby, S. Nelson, K. Charrier, J. J. Peschon and J. K. Kolls (2001). "Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense." J Exp Med **194**(4): 519-527.

- Young, L. S., J. R. Arrand and P. G. Murray (2007). EBV gene expression and regulation. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski et al. Cambridge.
- Yu, M. C. and J. M. Yuan (2002). "Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma." Semin Cancer Biol **12**(6): 421-429.
- Zehn, D., C. King, M. J. Bevan and E. Palmer (2012). "TCR signaling requirements for activating T cells and for generating memory." Cell Mol Life Sci **69**(10): 1565-1575.
- Zhong, W., P. A. Reche, C. C. Lai, B. Reinhold and E. L. Reinherz (2003). "Genome-wide characterization of a viral cytotoxic T lymphocyte epitope repertoire." J Biol Chem **278**(46): 45135-45144.
- Zhu, J. and W. E. Paul (2010). "Heterogeneity and plasticity of T helper cells." Cell Res **20**(1): 4-12.
- Zimber-Strobl, U., B. Kempkes, G. Marschall, R. Zeidler, C. Van Kooten, J. Banchereau, G. W. Bornkamm and W. Hammerschmidt (1996). "Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) is not sufficient to maintain proliferation of B cells but both it and activated CD40 can prolong their survival." EMBO J **15**(24): 7070-7078.
- Zimber-Strobl, U., E. Kremmer, F. Grasser, G. Marschall, G. Laux and G. W. Bornkamm (1993). "The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 interacts with an EBNA2 responsive cis-element of the terminal protein 1 gene promoter." EMBO J **12**(1): 167-175.
- Zimmerman, C., K. Brduscha-Riem, C. Blaser, R. M. Zinkernagel and H. Pircher (1996). "Visualization, characterization, and turnover of CD8+ memory T cells in virus-infected hosts." J Exp Med **183**(4): 1367-1375.
- Zimmermann, C., A. Prevost-Blondel, C. Blaser and H. Pircher (1999). "Kinetics of the response of naive and memory CD8 T cells to antigen: similarities and differences." Eur J Immunol **29**(1): 284-290.
- zur Hausen, H., H. Schulte-Holthausen, G. Klein, W. Henle, G. Henle, P. Clifford and L. Santesson (1970). "EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx." Nature **228**(5276): 1056-1058.

## 8 DANKSAGUNGEN

Ich danke...

Stefan Stevanovic für die Aufnahme in seine Gruppe, das in mich gesetzte Vertrauen, für die großartige Arbeitsatmosphäre, Betreuung und immer gewährleistete Finanzierung, die schöne Zeit und so manchen Song am Lagerfeuer

Hans-Georg Rammensee für die Zeit, die er sich für alle Nachwuchs-Immunologen nimmt und für den Elch-Spirit, der unter seiner Führung entstand und lebt und der das Arbeiten am Institut zu einer fachlich als auch persönlich wertvollen Zeit macht

Cecile Gouttefangeas für immer hilfreiche und wertvolle Kritik und Ratschläge rund um T-Zellen, Experimentplanungen, LCLs, Protokolle, Reagenzien, FACS, und, und, und. Danke!

...Patricia Hrstic und Nicole Zuschke für die vielen Peptide, ohne die die ganze Arbeit nicht möglich gewesen wäre, und vieles mehr...Franziska Löwenstein, Beate Pömmerl, Claudia Falkenburger, Lynne Yakes, Jürgen Frank und Gerhard Hörr für die viele Arbeit die sie allen abnehmen, sei es laboralltägliches, organisatorisches oder finanzielles...Karoline Laske und Janet Peper für die super Feeder-Zell-Kooperation. Karo, danke auch für immer wieder Aushelfen mit Reagenzien und Austausch von Erfahrungen und Wissen!...der alten MS-Crew Marc Günder und Oli Drews sowie dem alten T-Zeller Gabor Mester für viel Spaß im ersten Teil meines Doktorandendaseins im tagtäglichen Laboralltag, bei Kongressen, bei leckeren Frühstücks sowie fachliche Unterstützung bei den ersten Versuchen...Christina Christ, Christian Hotz und Ivonne Bettinger für die fröhliche Gesellschaft im Büro, CC dafür, dass sie es geschafft hat mich immerhin einige Male zum Sport zu motivieren...Corina Heller für ELISPOTs, gute Laune, und das Übernehmen eines großen Teils von Betreuung von Praktikanten und Medizindoktoranden im späteren Teil meines Doktorandendaseins...den neueren und älteren Stevanovics: Armin Rabsteyn, Nico Trautwein und Daniel Kowalewski für Hilfe bei den letzten MS-Experimenten, Heiko Schuster für seine immer vorhandene Hilfsbereitschaft und Rat bei egal welcher Fragestellung, Lea Prokop und Steffi Souczek für das Verbreiten von guter Laune und die Organisation des ursprünglich relativ chaotischen Zellkulturlabors vorne...den ganz alten Stevanovics Dominik Maurer und Stefan Löb fürs Beibringen der Grundlagen...und natürlich allen anderen Elchen des Stockwerks für die viele Hilfe und die gute Zeit!

... meinen Eltern, meinen Freunden und meiner Patentante für die mentale Unterstützung über die ganze Zeit

...Thomas Feger für Teamwork, Hilfe und Rat bei so vielem im Labor, ums Labor und ganz weit weg davon und für Lesen und Korrigieren des kompletten Werks