

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. S. Burdach)

Untersuchung der CD4+ Immunantwort gesunder Virussträger gegen Proteine des lytischen Zyklus des Epstein-Barr-Virus

Heike Ulrike Boerschmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. U. A. D. Behrends
2. Univ.-Prof. Dr. J. Ruland

Die Dissertation wurde am 12.04.2012 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 30.01.2013 angenommen.

1	Einleitung	1
1.1	Das Epstein-Barr-Virus und seine klinische Bedeutung.....	1
1.1.1	Entdeckung des Virus	1
1.1.2	Klassifikation des Virus und seiner Abkömmlinge	1
1.1.3	Virusaufbau und Virusgenom	2
1.1.4	Epidemiologie	4
1.1.5	Latente und lytische Infektion.....	5
1.1.6	Infektion in vitro.....	9
1.1.7	Klinische Manifestationen bei immunkompetenten und immunkompromittierten Individuen	10
1.1.8	Lymphoproliferative Erkrankungen.....	13
1.2	Die Immunerkennung des Epstein-Barr-Virus	15
1.2.1	Die humorale Immunantwort	15
1.2.2	Immunantwort der CD8+ T-Zellen	16
1.2.3	Die Immunantwort der CD4+ T-Zellen.....	18
2	Material	22
2.1	Verwendete Geräte.....	23
2.2	Verbrauchsmaterialien	24
2.3	Allgemeine Chemikalien und biologische Reagenzien	25
2.4	Lösungsmittel, Puffer und Medien.....	27
2.5	Antibiotika und Antimykotika	30
2.6	Kommerzielle Komplettsysteme	30
2.7	Größenmarker.....	31
2.8	Antikörper	31
2.9	Enzyme.....	31
2.10	Vektoren	32
2.11	Bakterienstamm	32
2.12	Zellen.....	32
2.12.1	HEK 293-Zellen.....	32
2.12.2	Fibroblasten-Zelllinie Wi38	33
2.13	MHCII-Genotypen der verwendeten Zelllinien	33
3	Methoden.....	34
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	34
3.1.1	Vermehrung und Aufbewahrung von E. coli-Bakterienkulturen.....	34
3.1.2	Bereitstellung transformativkompetenter Bakterien	34
3.1.3	Transformation von Bakterien	35
3.1.4	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	35
3.1.5	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	37
3.1.6	Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese	37

3.1.7	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten.....	38
3.1.8	Herstellung stumpfer Enden durch enzymatisches Auffüllen überhängender Enden	39
3.1.9	Ligation von DNA-Fragmenten.....	39
3.1.10	Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation von DNA.....	39
3.1.11	Transfektion von HEK 293-Zellen mit Plasmid-DNA.....	40
3.1.12	Präparation rekombinanter EBV-Proteine aus HEK 293-Zellen.....	40
3.1.13	Präparation von sezernierten Proteinen aus der HEK 293-Zellkultur.....	41
3.1.14	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	42
3.1.15	Coomassie-Färbung gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine	42
3.2	Eukaryotische Zellkultur	43
3.2.1	Allgemeine Kulturbedingungen	43
3.2.2	HEK 293-Zellkultur	44
3.2.3	T-Zellkultur	45
3.2.4	Kultur von lymphoblastischen Zelllinien.....	47
3.3	Immunologische Assays	48
3.3.1	Western-Blot-Analyse von Proteinen nach SDS-PAGE.....	48
3.3.2	Messung der Zytokinsekretion von T-Zellen mittels ELISA.....	49
4	Ergebnisse	51
4.1	Klonierung von lytischen EBV-Genen in Expressionsvektoren.....	51
4.1.1	BALF5.....	54
4.1.2	BGLF5	54
4.1.3	BBLF4.....	55
4.1.4	BORF2.....	55
4.1.5	BFLF2.....	56
4.1.6	BILF2.....	56
4.1.7	BXLF1.....	57
4.1.8	BMLF1	57
4.1.9	BCRF1.....	58
4.2	Rekombinante Expression von lytischen EBV-Proteinen.....	59
4.3	Generierung von EBV-Protein-spezifischen T-Zelllinien	69
4.3.1	T-Zell-Assays mittels GM-CSF ELISA	70
4.3.2	T-Zell-Assays mittels Interferon- γ -ELISA.....	74
4.4	Einzelzellklonierung und funktionelle Analyse	79
4.4.1	Klone aus den mit BXLF1- oder BALF5 stimulierten CD4+ T-Zelllinien	80
4.4.2	Klone aus den mit BMLF1- oder BORF2 stimulierten CD4+ T-Zelllinien.....	81
5	Diskussion.....	84
5.1	Breite CD4+ T-Zellantwort gegen Proteine des lytischen Zyklus	84

5.2	CD4+ T-Zelllinien mit Spezifität für frühe lytische Antigene erkennen autologe LCL	85
5.3	Mechanismen der LCL-Erkennung durch CD4+ T-Zelllinien mit Spezifität für lytische Antigene.....	86
5.3.1	CD21-vermittelte Aufnahme von Virionen aus umgebenden virusproduzierenden Zellen (<i>bystander</i> Effekt)	86
5.3.2	Aufnahme von exogenem Antigen mittels unspezifischer Phagozytose von Zellfragmenten lytisch infizierter Zellen	87
5.3.3	Aufnahme von exogenem Antigen über einen antigenspezifischen Rezeptor	87
5.3.4	MHCII-assoziierte Präsentation nach Ko-Migration von endogenem Antigen mit MHCII-Molekülen im MHCII-Beladungskompartiment.....	88
5.3.5	MHCII-assoziierte Präsentation von endogenem Antigen über Autophagie.....	88
5.4	Mechanismen, die die LCL-Erkennung durch CD4+ T-Zelllinien mit Spezifität für lytische Antigene verhindern können	88
5.4.1	Fehlender oder nur spurenweiser Einbau des Antigens in Virionen.....	88
5.4.2	Ungenügendes Antigenexpressionsniveau	89
5.4.3	Abortiver lytischer Zyklus	90
5.4.4	Gestörte endosomale Antigenprozessierung.....	90
5.4.5	Ungenügendes Expressionsniveau oder ungenügende Bindungsaffinität der restringierenden MHC-Moleküle	90
5.4.6	Intra- und interindividuelle Schwankungen der Virusproduktion durch LCL	91
5.5	Expansion von BORF2- und BMLF1-spezifischen CD4+ T-Zellklonen	91
5.5.1	Erstmaliger Nachweis von BORF2-spezifischen CD4+ T-Zellen bei gesunden Virusträgern	91
5.5.2	Alle BORF2-spezifischen CD4+ T-Zellpopulationen erkennen LCL.....	92
5.5.3	Erstmaliger Nachweis und Klonierung von BMLF1-spezifischen CD4+ T-Zellen im peripheren Blut.....	93
5.5.4	Der BMLF1-spezifische CD4+ T-Zellklon reagiert nicht besser mit LCL als mini-LCL, obwohl dies bei der BMLF1-spezifische T-Zelllinie der Fall war	94
5.6	Immundominanz von autoantigenspezifischen über virusspezifische CD4+ T-Zellklone	94
5.7	Immunmodulierende Wirkung des rekombinanten BCRF1	95
5.8	Ausblick	96
6	Zusammenfassung	98
7	Literaturverzeichnis	99
8	Abbildungsverzeichnis	119
9	Tabellenverzeichnis	121
10	Abkürzungsverzeichnis	122
11	Danksagung	126
12	Lebenslauf.....	127

1 Einleitung

1.1 Das Epstein-Barr-Virus und seine klinische Bedeutung

1.1.1 Entdeckung des Virus

In den 50er Jahren beobachtete der irische Chirurg Dennis Burkitt erstmalig das gehäufte Auftreten von Lymphomen bei Kindern in Äquatorialafrika, die heute als Burkitt-Lymphome bezeichnet werden (Burkitt et al., 1958). Die regional erhöhte Inzidenz dieser Erkrankung veranlasste ihn zu der Vermutung einer infektiösen Ätiologie. Dies führte zu Untersuchungen von Tony Epstein, der gemeinsam mit Yvonne Barr im Jahre 1964 erfolgreich die Zelllinie EB1 aus einem Burkitt-Lymphom etablieren konnte. Bei genaueren Analysen dieser Zelllinie, konnten Partikel mit herpesviraler Morphologie beschrieben werden (Epstein et al., 1965). Weitere Untersuchungen des gefundenen Virus bestätigten, dass dieses sich in wichtigen Aspekten von den anderen Mitgliedern der Herpesfamilie unterschied. Damit war ein neues Virus gefunden, das die beiden Forscher als Epstein-Barr-Virus (EBV) bezeichneten.

1.1.2 Klassifikation des Virus und seiner Abkömmlinge

EBV ist ein ubiquitär vorkommendes, onkogenes doppelsträngiges DNA-Herpes-Virus aus der Gruppe der Lymphocryptoviren. Diese Viren sind eng verwandte Mitglieder der Familie der Gamma-Herpesviridae. EBV wird dementsprechend auch als Humanes Herpes-Virus Typ 4 (HHV4) bezeichnet (Kieff et al., 2007; Murray et al., 2001).

Es existieren zwei humanpathogene Typen von EBV. EBV-Typ 1 (B95-8), das ehemals als Typ A bezeichnet wurde, hat bezogen auf die Gesamtpopulation eine höhere Prävalenz als EBV-Typ 2, ehemals Typ B, das weniger weit verbreitet zu sein scheint. EBV-Typ 2 wurde ausnahmslos aus Zelllinien von Menschen aus Zentralafrika und angrenzenden Regionen isoliert und ist zudem häufig in HIV-positiven Individuen anzutreffen (Zimber et al., 1986). Die beiden verschiedenen Typen unterscheiden sich in der Substitution von einem 1.8 Kilobasen (kb)-Abschnitt am 3'-Terminus des *Epstein-Barr virus nuclear antigen 2*, (EBNA2)-Gens, sowie in den Genen für das EBNA-leading protein (EBNA-LP = EBNA5) und den 3 Proteinen der EBNA3-Familie (EBNA3A = EBNA3, EBNA3B = EBNA4, EBNA3C = EBNA6). Individuelle Isolierungen vom EBV-Typ 1 oder EBV-Typ 2 aus weit entfernten Regionen

unterscheiden sich manchmal auch an einzelnen Basen oder zeigen quantitative Differenzen in den repetitiven Sequenzen. Eine persistierende Infektion mit mehr als einem EBV-Typus ist nicht ungewöhnlich, wenn dies auch hauptsächlich bei promiskuitiven oder immunsupprimierten Individuen zu beobachten ist.

1.1.3 Virusaufbau und Virusgenom

Das Epstein-Barr-Virion ist ein kugelförmiger Partikel von 110 nm Durchmesser. Von außen nach innen zeigen die infektiösen EBV-Partikel jeweils eine glykoproteinreiche Virushülle (*envelope*), eine proteinhaltige Zwischenschicht (*tegument*) und eine icosahedrale Kernhülle (*nucleocapsid*) (**Abb. 1**). Dieses Nukleokapsid wird von 162 Kapsomeren gebildet, die den DNA-haltigen Viruskern (*core*) umgeben (Yamaguchi et al., 1967).

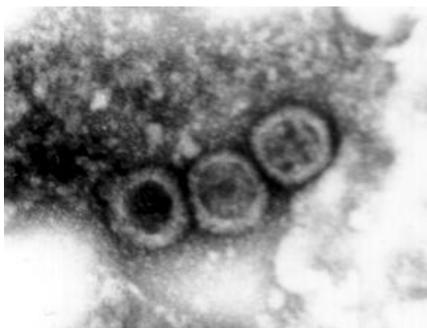


Abbildung 1: Struktur des EBV-Virions

Diese elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt drei extrazelluläre Virionen. Von außen nach innen zeigen die infektiösen EBV-Partikel jeweils eine glykoproteinreiche Virushülle (*envelope*), eine proteinhaltige Zwischenschicht (*tegument*) und eine Kernhülle (*nucleocapsid*) um den Bereich des DNA-haltigen Viruskerns (*core*). (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. Regina Feederle, Heidelberg).

Das EBV-Genom entspricht einer doppelsträngigen DNA von etwa 172 kb Länge, die sich aus DNA-Wiederholungseinheiten und nicht-repetitiven Sequenzen zusammensetzt (Murray et al., 2001; Baer et al., 1984). Im Viruspartikel liegt diese DNA linear vor (Pritchett et al., 1975), in der infizierten Zelle ist sie als zirkuläres Episom im Zellkern zu finden (Lindahl et al., 1976). 500 bp lange DNA-Wiederholungseinheiten befinden sich in unterschiedlicher Häufigkeit an den beiden Genomenden (*terminal repeats*, TR). Die Anzahl dieser TRs variiert unter den verschiedenen EBV-Stämmen beträchtlich. In latent infizierten Zellen bleibt die Anzahl der TRs des viralen Genoms in der Regel jedoch konstant. Um herauszufinden ob eine Gruppe von latent infizierten Zellen von einer einzigen Vorläuferzelle abstammt, werden daher Analysen der TRs durchgeführt. Zwischen diesen TRs liegen zwei nicht-repetitive Sequenzen, die nahezu das gesamte kodierende EBV-Genom enthalten und nur durch einen Abschnitt von 3 kb-langen Repeats unterschiedlicher Anzahl voneinander getrennt werden (*internal repeats*). Die nicht-repetitiven Sequenzen beinhalten auch *perfect* und *imperfect*

tandem repeats, die zumeist innerhalb der etwa 100 im EBV-Genom identifizierten *open reading frames (ORFs)* liegen (Kieff et al., 2007).

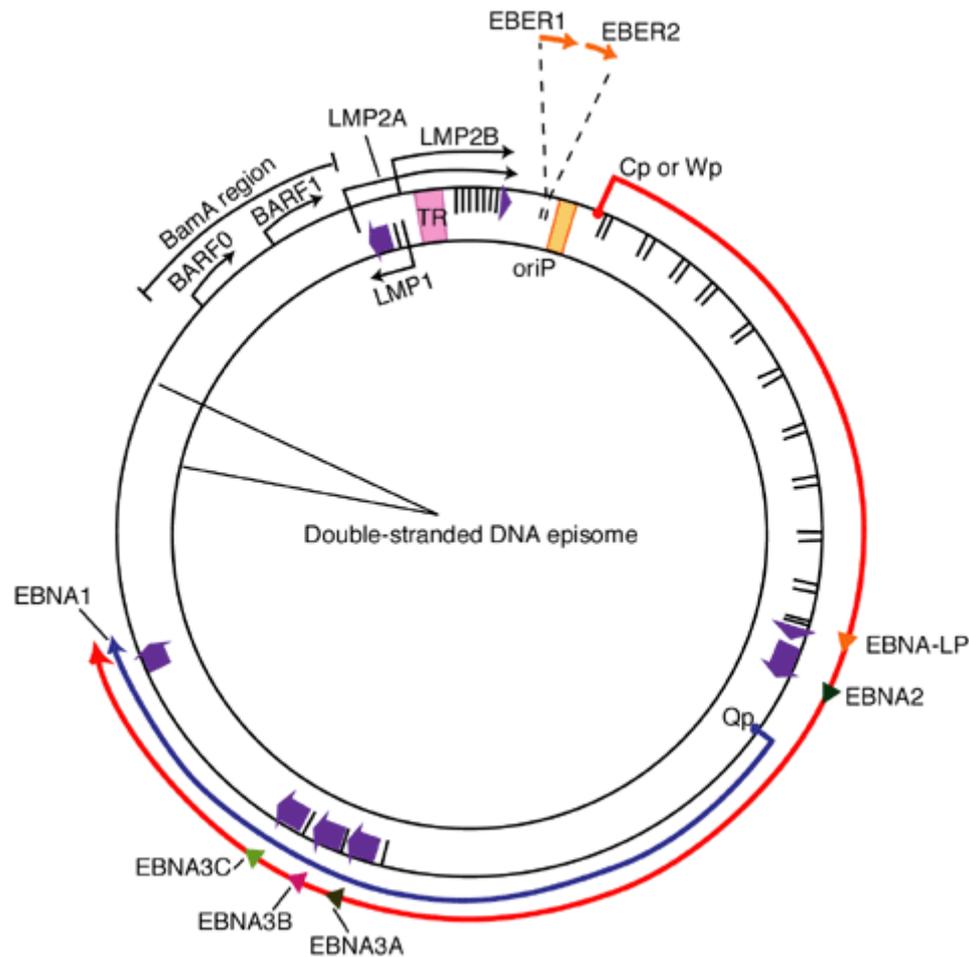


Abbildung 2: Lokalisation der Latenzgene im EBV-Genom

Die Abbildung zeigt die Lokalisation und Transkription der EBV-Latenzgene auf dem doppelsträngigen viralen DNA-Episom. Der *origin of plasmid replication (oriP)* ist orangefarbig dargestellt. Die dicken violetten Pfeile stellen die Exons für jedes der Latenzproteine dar, und die Pfeilrichtung markiert die Richtung, in die sie transkribiert werden. Die Latenzproteine bestehen aus sechs *nuclear antigens* (EBNAs 1, 2, 3A, 3B, 3C, EBNA-LP) und aus drei *latent membrane proteins* (LMPs 1, 2A, 2B). EBNA-LP wird von einer variablen Anzahl von repetitiven Exons transkribiert. LMP2A und LMP2B werden aus verschiedenen Exons zusammengesetzt, die sich auf beiden Seiten der *terminal repeat (TR)* Region befinden, die während der Zirkularisierung der linearen DNA gebildet wird, um ein virales Episom zu konstruieren. Die orangen Pfeile ganz oben in der Abbildung zeigen die häufig transkribierten nicht-polyadenylierten RNAs EBER1 und EBER2. Ihre Transkription ist ein beständiges Merkmal der latenten EBV-Infektion. Die äußere rote Linie repräsentiert die EBV-Transkription während der Latenzphase III, während der alle EBNAs entweder vom Cp- oder Wp-Promotor transkribiert werden. Während der Latenzphase I und II wird vom Qp-Promotor aus transkribiert, was durch die innere blaue Linie repräsentiert wird. Während der latenten EBV-Infektion werden Transkriptionsprodukte der *BamA*-Region gefunden, allerdings konnte bislang kein Protein identifiziert werden, das von dieser Region stammt. Hier wird die Lokalisation des *BARF0*- und *BARF1*-Gens angezeigt (Graphik entnommen aus Murray et al., 2001).

Das EBV-Genom wurde mit Hilfe eines *Bam*HI-Fragment-Archivs sequenziert. Dementsprechend wurden genetische Elemente von EBV wie Gene und Promotoren entsprechend ihrer Größe (wobei A am größten ist), ihrer Lokalisation und ihrer Orientierung in Bezug auf den ORF des *Bam*HI-Fragments bezeichnet. Folglich ergibt sich beispielsweise für das Hauptglykoprotein der EBV-Virushülle gp350 die Bezeichnung BLLF1 (**Bam**HI **L** (**Größe**) *fragment*, **L** *Leftward ORF number* 1). Die ersten, besonders gut charakterisierten Genprodukte sind noch unter anderen Namen bekannt geworden. So werden beispielsweise die EBV-Proteine, die während der viralen Latenzphase exprimiert werden als EBNA und *latent membrane proteins* (LMPs) bezeichnet. Die Lokalisation dieser Latenzgene im EBV-Genom sowie die Entstehung des *Bam*HI-Fragment-Archivs wird in der vorangehenden und der nachfolgenden Abbildungen gezeigt (**Abb. 2 und Abb. 3**).

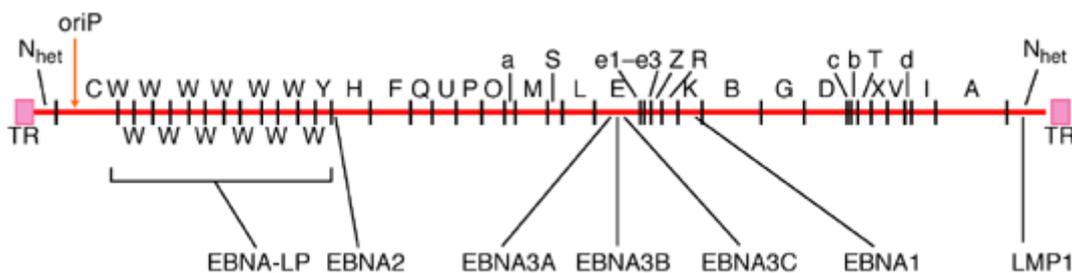


Abbildung 3: Linearisierte Darstellung der ORFs

Die Abbildung zeigt die Lokalisation der ORFs der Latenzproteine von EBV auf einer *Bam*HI-Schnittstellen-Karte des B95.8 EBV-Genoms. Die *Bam*HI-Fragmente werden entsprechend ihrer Größe bezeichnet, wobei A am größten ist. Die Kleinbuchstaben kennzeichnen die kleinsten Fragmente (Graphik entnommen aus Murray et al., 2001).

1.1.4 Epidemiologie

Mehr als 90 % der Weltbevölkerung sind mit dem hochkontagiösen EBV-Virus infiziert, ab dem 40. Lebensjahr sind sogar 98 % seropositiv für dieses Virus (Rickinson et al., 2007). Die Übertragung erfolgt in der Regel über Tröpfcheninfektion, in seltenen Fällen aber auch durch Transplantationen oder Bluttransfusionen (Alfieri et al., 1996; Cen et al., 1991). Auch eine Übertragung durch sexuelle Kontakte ist möglich, da EBV in Sekreten der Genitalien festgestellt werden konnte (Thomas et al., 2006) und sich im zervikalen Epithel replizieren kann (Naher et al., 1992; Portnoy et al., 1984). Des Weiteren wird das Virus vermutlich bei stillenden Frauen über die Muttermilch ausgeschieden, weshalb dieser Übertragungsweg als zusätzliche Ursache für die frühe Durchseuchung der Bevölkerung postuliert wird (Raslova et al., 2001).

Grundsätzlich werden zwei verschiedene epidemiologische Muster von EBV-Primärinfektionen bei gesunden, immunkompetenten Patienten beobachtet. Diese scheinen eng mit dem sozioökonomischen Status verknüpft zu sein (Crawford et al., 2001). In Industrienationen mit hohem Lebens- und Hygienestandard wird einerseits ein Infektionsgipfel bei Kindern bis zum sechsten Lebensjahr gesehen, andererseits bei Jugendlichen zwischen 14 und 20 Lebensjahren. In Entwicklungs- und Schwellenländern findet die Primärinfektion oftmals deutlich früher statt. Serologische Untersuchungen in diesen Ländern haben ergeben, dass die meisten Kinder bis zum dritten Lebensjahr mit EBV infiziert waren und Immunglobulin G (IgG)-Antikörper gegen das virale Kapsid-Antigen (*viral capsid antigen*, VCA) aufwiesen. Beinahe 100 % der Kinder in diesen Gegenden waren nach Abschluss der ersten Lebensdekade EBV-seropositiv (Evans et al., 1989). Ursache dafür scheint die Gewohnheit zu sein, Speisen für Babys und Kleinkinder vorzukauen, wodurch es zu einem sehr frühen Speichelkontakt zwischen Eltern und Kind kommt, und das Virus direkt auf das Kind übertragen werden kann.

1.1.5 Latente und lytische Infektion

Grob zusammenfassend kann man von zwei verschiedenen Phasen der EBV-Infektion sprechen, der lytischen Infektion, die in der Wirtszelle zur Produktion und Freisetzung von infektiösen Virionen (*Lyse*) führt, und der latenten Infektion, bei der das virale Genom nach Eintritt in den Zellkern, als zirkuläres Episom in der Wirtszelle persistiert (*Latenz*) und bei Zellteilung an die Nachkommen weitergegeben wird (Adams et al., 1975; Hurley et al., 1988).

In der Latenzphase werden, wie zuvor bereits erläutert, maximal neun Genprodukte exprimiert, die als Latenzantigene bezeichnet und von zwei nicht-translatierten mRNAs (Epstein-Barr *encoded* RNAs, *EBERs*) begleitet werden (Kieff et al., 2007). Zu den Latenzantigenen gehören die sechs nukleären EBNA-Proteine (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C und -LP) und drei Membranproteine (*latent membrane protein*, LMP-1, -2A und -2B). Der Startpunkt der DNA-Replikation (*origin of replication*) während der Latenzphase heißt ori-P und initiiert dann die DNA-Replikation, wenn das EBV-Genom in seiner latenten, episomalen Form vorliegt. Zur Aktivierung von ori-P bedarf es ausschließlich der Anwesenheit eines einzigen EBV-kodierten Proteins, des EBNA-1. Latent infizierte B-Zellen können genauso wie latent infizierte Tumorzellen unterschiedlich viele Latenzantigene exprimieren. Man unterscheidet dementsprechend verschiedene Latenztypen (Küppers et al., 2003; Kieff et al., 2007). Ursprünglich hatte man drei Latenztypen I-III unterschieden. Mittlerweile sind komplexere Expressionmuster beschrieben worden. Tumorzellen exprimieren immer EBNA1,

da dieses für die virale DNA-Replikation notwendig ist, und diese für die extrachromosomale Persistenz des viralen Episoms verantwortlich ist. In der folgenden Abbildung (**Abb. 4**) sind diese Latenztypen mit ihren jeweiligen Analogien mit EBV-assoziierten Erkrankungen dargestellt.

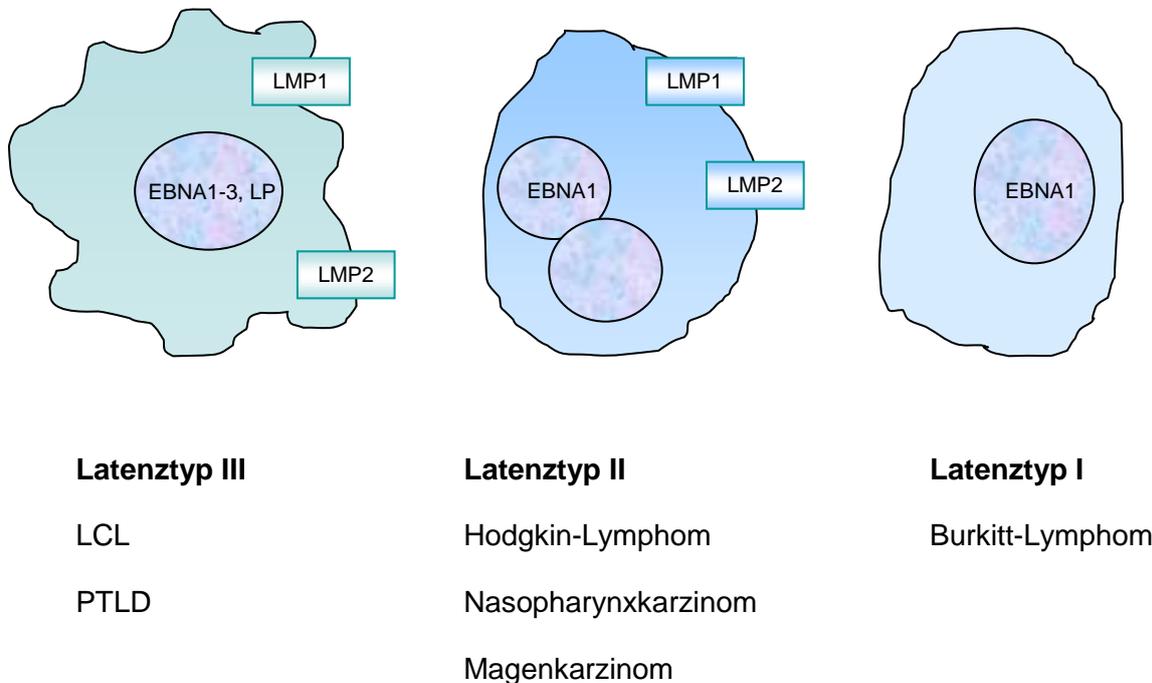


Abbildung 4: Latenztyp I-III des Epstein-Barr-Virus

Beim Latenztyp I wird nur EBNA1 exprimiert. Dies ist charakteristisch für das Burkitt-Lymphom. Der Latenztyp II wird bei Hodgkin-Lymphomen, Nasopharynx- und Magenkarzinomen gesehen. Der Latenztyp III wird in EBV-transformierten lymphoblastoiden B-Zelllinien (LCL) und in B-lymphoproliferativen Erkrankungen von immunsupprimierten, transplantierten Patienten (*post-transplant lymphoproliferative disease*, PTLD) gefunden (Graphik mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Behrends in Anlehnung an Heslop et al., 2005).

Während der lytischen Replikation werden mehr als 80 verschiedene ORF des EBV-Genoms exprimiert. Es wird ein anderer Startpunkt der DNA-Replikation verwendet, nämlich ori-Lyt. Sechs EBV-Gene kodieren für Proteine, die in den lytischen DNA-Replikationsprozess involviert sind. Diese Gene und ihre Funktionen sind BALF5 (DNA-Polymerase), BALF2 (DNA-Einzelstrang bindendes Protein), BMRF1 (akzessorische Untereinheit der EBV-DNA-Polymerase), BSLF1 (Primase), BBLF4 (Helicase) und BBLF2/3 (Primase-assoziiertes Faktor) (Fixman et al., 1992). In zeitlicher Abhängigkeit von der Transkription der lytischen Gene, werden sehr frühe, frühe und späte Gene (*immediate early*, *early* und *late genes*) unterschieden (Rickinson et al., 2007). BZLF1 und BRLF1 sind virale Transaktivatoren und

derzeit die einzigen bekannten *immediate early genes*. Ihre Genprodukte initiieren die lytische EBV-Replikation (Chevallier-Greco et al., 1986). Mindestens 30 Gene gehören zu der Gruppe der *early genes* und dienen als Transaktivatoren für die Expression anderer Gene oder sind in die virale DNA-Replikation involviert. Weitere 30 Gene rechnet man zu den *late genes*, die hauptsächlich für Strukturproteine wie beispielsweise die Glykoproteine der Virushülle kodieren (z.B. gp350/BLLF1).

Von Thorley-Lawson und Kollegen wurde 2004 ein Modell für die Primärinfektion und die Etablierung der EBV-Persistenz entworfen, das im Folgenden kurz zusammenfassend dargestellt werden soll (Thorley-Lawson et al., 2004). Da die Virusübertragung zumeist über Tröpfcheninfektion erfolgt, gelangt das Virus im Rahmen der Primärinfektion zunächst in den Nasopharynx. Ob das Virus initial B-Lymphozyten oder doch Epithelzellen infiziert, ist immer noch unklar und wird heftig diskutiert (Bornkamm et al., 2006; Shannon-Lowe et al., 2006; Bornkamm et al., 2001; Sixbey et al., 1989). Am Beispiel der akuten infektiösen Mononukleose (AIM; Pfeiffersches Drüsenfieber) konnten allerdings EBV-infizierte B-Lymphoblasten in den interfollikulären Regionen der Tonsillen nachgewiesen werden (Anagnostopoulos et al., 1995). Detaillierte Untersuchungen der viralen Genexpression in diesen infizierten, tonsillären B-Lymphozyten führten zu der Definition eines Modells für die Primärinfektion und die Etablierung der EBV-Persistenz (Thorley-Lawson et al., 2004). Virionen können über die Bindung ihres EBV-Hüllproteins gp350/BLLF1 an den zellmembranständigen CD21-Rezeptor in naive B-Lymphozyten des tonsillären Lymphoepitheliums (Waldeyerscher lymphatischer Rachenring) eindringen (Fingeroth et al., 1984; Tanner et al., 1987; Janz et al., 2000). Daraufhin beginnt in den infizierten naiven B-Lymphozyten ein viral induziertes Wachstumsprogramm (*growth program*), das diese Zellen aktiviert und in proliferierende B-Lymphoblasten umwandelt. Ergebnis davon ist eine unregulierte, polyklonale Expansion von latent infizierten B-Lymphoblasten (Diehl et al., 1968; Pope et al., 1968). Ursache dieses Effekts ist die Expression von neun viralen Latenzproteinen, die unter der Kontrolle des Master-Transkriptionsfaktors EBNA-2 stehen (Kieff et al., 2007). In einem zweiten Schritt durchlaufen diese proliferierenden B-Lymphoblasten in Keimzentren des Waldeyerschen Rachenrings ein *default*-Programm, durch das die Zellen der Apoptose entgehen und in den Pool der Memory-B-Zellen eintreten (Liu et al., 1997; MacLennan et al., 1988). In diesem *default*-Programm werden nur drei Latenzantigene (EBNA-1, LMP-1, LMP-2) exprimiert, wovon zwei Antigene (LMP-1 und LMP-2) Signale des Keimzentrums imitieren können, durch welche die latent infizierten B-Lymphoblasten in das Memory-Kompartiment übertreten können (Kilger et al., 1998; Caldwell et al., 1998). Memory-B-Zellen verlassen die Keimzentren und treten in die periphere Blutzirkulation über, wobei alle proteinkodierenden Gene ausgeschaltet werden, und die Zellen in die sogenannte Latenzphase 0 eintreten (Hochberg et al., 2004).

Ausnahme ist die Zellteilung der latent infizierten Memory-B-Zellen, während der EBNA1 exprimiert wird, damit die virale DNA repliziert werden kann (Yates et al., 1985). Memory-B-Zellen sterben selten und sind vor einem viruspezifischen Angriff des Immunsystems sicher, da keine viralen Proteine exprimiert werden. Schließlich kann das Virus aus der Latenzphase in Memory-B-Zellen im Waldeyerschen Rachenring reaktiviert werden und in die lytische Replikationsphase eintreten. Dabei differenziert sich die Memory-B-Zelle zur Plasmazelle, die nun Virionen produziert, welche nach Lyse der Plasmazellen in den Speichel abgegeben werden und neue Wirtsorganismen infizieren können (lytische Replikationsphase). Mit diesem Schritt schließt sich der Zyklus der persistierenden EBV-Infektion (**Abb. 5**).

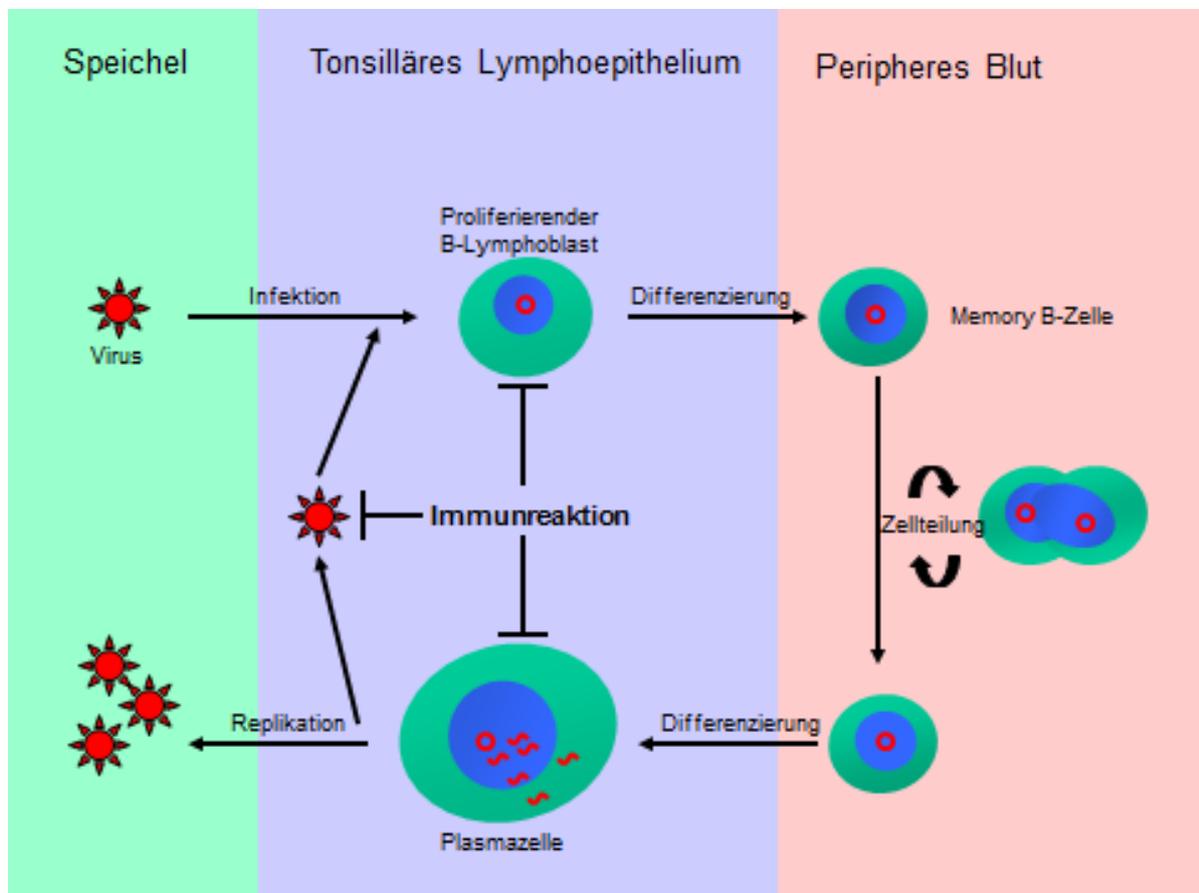


Abbildung 5: Zyklus der persistierenden EBV-Infektion

Jede Station des viralen Infektionszyklus kann vom viruspezifischen Immunsystem des infizierten Individuums angegriffen werden, mit Ausnahme der Memory-B-Zellen, in denen das Virus ruht. Zytotoxische T-Zellen erkennen alle anderen infizierten Zelltypen, und viele viruspezifische Antikörper neutralisieren das Virus (Graphik in Anlehnung an Thorley-Lawson et al., 2004).

1.1.6 Infektion *in vitro*

In vitro führt die Infektion von primären humanen B-Lymphozyten zu einer Wachstumstransformation der infizierten Zelle und einer unbegrenzten Proliferation der sogenannten lymphoblastoiden Zelllinie (*lymphoblastoid cell line*, LCL). LCL werden aus B-Lymphozyten generiert, die durch Infektion mit einem EBV-Laborstamm und unter Suppression der protektiven T-Zellen durch Ciclosporin A zu immortalen Zellen transformiert werden. LCL verfügen über ein hervorragendes Wachstumspotential und sind gut in Kultur zu halten. Außerdem repräsentieren sie als B-Lymphozyten professionelle antigenpräsentierende Zellen (pAPC), die Antigene sowohl über Major-Histokompatibilitätsantigen-Komplex Klasse I (MHC I) als auch über MHC II präsentieren, und somit zur Generierung von CD4+ und CD8+ T-Zelllinien eingesetzt werden können. Die Stimulation mit autologen LCL wurde bereits vielfach erfolgreich zur Generierung von EBV-spezifischen Spender-T-Zelllinien eingesetzt (Heslop et al., 1996; vgl. 1.1.9).

Besonders geeignet für die Infektion mit EBV *in vitro*, also zur Generierung von LCL, sind B-Lymphozyten aus dem peripheren Blut, den Tonsillen und der Nabelschnur. Zellen aus früheren Entwicklungsstadien der B-Lymphozyten, wie sie beispielsweise im Knochenmark oder im fetalen Blut auftreten, können ebenfalls *in vitro* mit EBV infiziert werden, jedoch beträgt die Infektionsrate nur 10 % im Vergleich zu B-Lymphozyten aus dem peripheren Blut. Dies gilt auch für leukämische B-Lymphozyten und EBV-negative Burkitt-Lymphom-Zellen (Tatsumi et al., 1986; Calender et al., 1987; Doyle et al., 1993; Avila-Carino et al., 1994). Mit weiter abnehmender Infektionsrate können auch T-Zellen, NK-Zellen, einige epitheliale Zelllinien und einige Karzinomzelllinien *in vitro* mit EBV infiziert werden (Kanegane et al., 1996; Yoshiyama et al., 1997; Imai et al., 1998). Etwa 10 % der primären B-Lymphozyten sind nach der *in vitro* Infektion mit EBV latent infiziert und vermehren sich als wachstumstransformierte LCL (Nilsson et al., 1971). LCL exprimieren, wie bereits erwähnt (vgl. 1.1.5), typischerweise alle neun Latenzantigene. Dennoch ist das virale Genom in LCL nicht inaktiv, wie bei latent infizierten B-Lymphozyten gesunder Virusträger, auch wenn es ebenfalls nur selten zur lytischen Replikation kommt. Die Genprodukte der viralen Latenz erhalten die latente Infektion und bewirken eine kontinuierliche Proliferation der infizierten B-Lymphozyten. Diese wachstumstransformierten LCL verhalten sich in vieler Hinsicht wie primäre B-Lymphozyten, die durch Antigen, Mitogen, Interleukin-4 (IL-4), oder CD40-Ligation stimuliert wurden. Sie exprimieren gleichartige Zelloberflächenmarker und Adhäsionsmoleküle, sezernieren Ig und wachsen in Haufen (Vyth-Dreese et al., 1995). EBV-immortalisierte B-Lymphozyten sezernieren auch noch nach vielen Jahren in der Zellkultur

Ig, und einige können sogar ihre Ig-Klasse wechseln, wenn sie durch IL-4 stimuliert werden (Steel et al., 1974; Litwin et al., 1974).

Wildtyp-EBV für die Infektion *in vitro* kann entweder von Virusträgern gewonnen werden, da diese intermittierend Virus über den Speichel ausscheiden, oder von EBV-positiven Zellkulturen. Auch wenn die *in vitro* Infektion von primären B-Lymphozyten mit EBV zu immortalisierten und kontinuierlich proliferierenden LCLs führt, die in der Regel nicht in die lytische Replikationsphase übertreten, so geschieht es doch, dass etwa 1 % der Zellen in LCL-Linien in die spontane Lyse eintreten (Kieff et al., 2007). Dieses Phänomen wird fast noch häufiger bei EBV-positiven Burkitt-Lymphom-Zelllinien beobachtet. Eine B-Zelllinie des Seidenäffchens, B95.8, die mit Wildtyp-EBV infiziert wurde, wird gewöhnlich als EBV-Quelle für *in vitro* Untersuchungen verwendet (Miller et al., 1974).

Der Eintritt einer Zelllinie in die lytische Replikationsphase kann durch verschiedene Verfahrensweisen induziert werden. Chemikalien wie Stimulatoren der Proteinkinase C und DNA-Methylierungsinhibitoren sowie Mangel an Nährstoffen oder *crosslinking* der Oberflächen-Ig können eine derartige Induktion auslösen (Khanna et al., 1995). Aber auch die Expression des viralen lytischen Transaktivators BZLF1 kann den Beginn der lytischen Replikation induzieren, auch wenn dies nicht in allen Zellen gelingt (Gradoville et al., 1990). Eine weitere Möglichkeit, bei latent infizierten Zellen die lytische Replikation auszulösen, ist die ionisierende Bestrahlung. Die Virusproduktion steigt bis zu einem Gipfel am 4. – 5. Tag nach Induktion der lytischen Replikation an (Kieff et al., 2007).

1.1.7 Klinische Manifestationen bei immunkompetenten und immunkompromittierten Individuen

Erfolgt die Primärinfektion im Säuglings- oder Kleinkindalter (Henle et al., 1979), bleibt sie in der Regel inapparent (Joncas et al., 1974) oder erfolgt unter Ausbildung von leichten grippalen Beschwerden. In seltenen Fällen kommt es zum klinischen Bild der AIM (Papesch et al., 2001; Khanna et al., 1995). 30-50 % der Primärinfektionen im Jugend- oder Erwachsenenalter verlaufen als AIM. Ursachen dieses Infektionsgipfels im Jugend- oder Erwachsenenalter bei der westlichen Bevölkerung sind wohl erste Kontakte mit Sekreten von Geschlechtspartnern, woher auch die alternative Bezeichnung dieser Erkrankung als *kissing disease* stammt. Die AIM ist eine hochakute Erkrankung, die durch die führenden Symptome Pharyngitis, Lymphadenopathie, Fieber und Hepatosplenomegalie charakterisiert ist (Steven, 1996; Vetsika et al., 2004). Im peripheren Blut zeigt sich eine Lymphozytose mit mehr als 10 % atypischen Lymphozyten. Serologische Charakteristika sind der Nachweis von

heterophilen Antikörpern, beispielsweise in der Paul-Bunnell-Reaktion, und das Auftreten von Antikörpern, die gegen verschiedene Bestandteile von EBV gerichtet sind, nämlich gegen die Gruppe der *early antigens* (Eas), der VCAs und der EBNAs (Niederman et al., 1968).

In der Regel heilt die AIM folgenlos aus und führt ähnlich der inapparenten, frühkindlichen Infektion zu einer lebenslangen Viruspersistenz (Rickinson et al., 2007; Crawford et al., 2001). Zu dieser Viruspersistenz im menschlichen Körper kommt es sowohl nach symptomatischen als auch nach asymptomatischen EBV-Infektionen. Gesunde Virusträger haben pro einer Million zirkulierender B-Zellen etwa eine bis fünfzig latent EBV-infizierte B-Zellen.

Wie alle Herpesviren kann auch EBV jederzeit reaktiviert werden. Bei der Reaktivierung einer EBV-Infektion tritt das Virus in die lytische Replikationsphase ein, und es kommt zu erneuter Virusproduktion, Virusstreuung und B-Zellproliferation. Dabei werden zusätzlich zu den Latenzantigenen auch lytische Antigene exprimiert. Dies wird von den Betroffenen jedoch meist nicht bemerkt, da die Virusvermehrung vom Immunsystem schnell eingedämmt wird. Ursache dafür ist das feine Gleichgewicht zwischen dem Immunsystem des Virusträgers und dem Virus. Dieses persistiert latent im Virusträger und kann trotz antiviraler Immunreaktionen durch eine kontinuierliche Virusproduktion auf niedrigem Niveau und periodische Reaktivierungen weiterhin erfolgreich auf andere Individuen übertragen werden. Eine Störung dieses Gleichgewichts durch primäre oder erworbene, bekannte (z.B. HIV-Infektion und medikamentöse Immunsuppression nach Organ- oder Stammzelltransplantation) oder noch unbekannte Immundefekte, kann zur Entwicklung von schweren chronisch-aktiven EBV-Infektionen (CAEBV) oder anderen schweren bis lebensbedrohlichen EBV-assoziierten Erkrankungen führen (z.B. Posttransplantations-lymphoproliferative Erkrankungen, PTL; Burkitt-Lymphom; hämophagozytische Lymphohistiozytose, HLH) (Kawa et al., 2000; Young et al., 2004). Bei einigen EBV-assoziierten Erkrankungen handelt es sich um Malignome. Da EBV ein ubiquitäres Virus ist, kann es manchmal schwierig sein, einen kausalen Zusammenhang zwischen EBV-Infektion und EBV-assoziierten Erkrankungen nachzuweisen.

Bei EBV-assoziierten, lymphoblastischen Lymphomen immunsupprimierter Patienten gilt ein ursächlicher Zusammenhang als weitgehend gesichert. Bei Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen sowie Nasopharynx- und Magenkarzinomen von immunkompetenten Patienten konnte diese Kausalität jedoch bis jetzt nicht endgültig geklärt werden, auch wenn beispielsweise bei 96 % aller endemischen Burkitt-Lymphome und 100% aller Nasopharynxkarzinome (*Nasopharyngeal Carcinoma*, NPC) EBV nachweisbar ist (Magrath et al., 1990): Hodgkin-Lymphome, Non-Hodgkin-Lymphome einschließlich der Burkitt-

Lymphome, Nasopharynx- und Magenkarzinome. Bei LCL und Burkitt-Lymphomzelllinien finden sich gewöhnlich nur wenige lytisch infizierte, Virus-produzierende Zellen (Kieff et al., 2007). Auch bei anderen EBV-assoziierten Malignomen wie Nasopharynx- und Magenkarzinomen, PTLD und Hodgkin-Lymphomen finden sich nur wenige Zellen, die lytische Antigene exprimieren (Feng et al., 2000; Takasaka et al., 1998; Montone et al., 1996; Brousset et al., 1993; Labrecque et al., 1999). Aus diesen Angaben und der folgenden Tabelle geht hervor, dass es sich bei EBV-assoziierten Tumoren nicht nur um Neoplasien der B-Zellen handelt (Burkitt-Lymphom, Hodgkin-Lymphom, PTLD), sondern auch um bestimmte Formen von T-Zell-Lymphomen und Tumoren epithelialen Ursprungs (Nasopharynx-, Magenkarzinom). Einige EBV-assoziierte Erkrankungen lymphoiden Ursprungs sind tabellarisch dargestellt (**Tab. 1**).

Erkrankung	Gefährdete Personen	Assoziation mit EBV
Infektiöse Mononukleose	Junge Erwachsene aus westlichen Ländern	Mehrheit
<i>X-linked lymphoproliferative disease</i> (XLP)	Männer/Jungen mit Mutation im XLP-Gen	Mehrheit
B lymphoproliferative Erkrankung (BLPD)	Immunsupprimierte Patienten nach Organ- oder hämatopoetischer Stammzelltransplantation, HIV-Infizierte	90% 100%
Burkitt-Lymphom	Afrikanische Kinder (endemisch), HIV-Infizierte, sporadisches Auftreten	97-100% 25%
Hodgkin-Lymphom	Kinder in Entwicklungsländern Jugendliche/Erwachsene in Industrienationen nach AIM	40-80% (je nach EBV-Typ)
Nasales T-Zell-Lymphom	Asiatische Bevölkerung	100%
NK-Zell-Lymphom	Patienten mit chronisch-aktiver EBV-Infektion (CAEBV) HIV-Infizierte	10-100% (je nach EBV-Typ)
<i>Primary effusion</i> -Lymphome	HIV-Infizierte	70-80%

Tabelle 1: EBV-assoziierte Erkrankungen lymphatischen Ursprungs

Tabelle in Anlehnung an Williams et al., 2006.

1.1.8 Lymphoproliferative Erkrankungen

Bei intakter antigenspezifischer Kontrolle durch T-Zellen kann eine initiale, oder auch sekundäre B-Zell-Proliferation gut in Grenzen gehalten werden (Bornkamm et al., 2006). Bei gestörter T-Zell-Immunität kann es dagegen zu ungehinderter Proliferation der B-Zellen kommen, und sogenannte lymphoproliferative Erkrankungen (*lymphoproliferative diseases*, LPDs) können sich manifestieren. Besonders gefährdet, eine LPD zu entwickeln, sind Patienten im Rahmen einer medikamentösen Immunsuppression nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (*hematopoietic stem cell transplantation*, HSCT) oder nach Organtransplantation (*solid organ transplantation*, SOT), die dann als Post-Transplantations-LPD (PTLD) bezeichnet wird. Die Inzidenz beträgt insgesamt 1-2 % nach HSCT und 1-30 % nach SOT in Abhängigkeit von der Art des Transplantats, der Intensität der Immunsuppression, sowie vom EBV-Status und vom Alter des Patienten. Das Risiko für eine PTLD ist im ersten Jahr nach Transplantation am höchsten. Je nach Malignitätsgrad des proliferierenden Gewebes hat die PTLD eine ausgesprochen hohe Mortalität von 80 % nach HSCT und 60 % nach SOT. Auch Patienten mit angeborenen Immundefekten oder an AIDS erkrankte Patienten haben ein hohes Risiko an schweren LPDs zu erkranken (Elenitoba-Johnson et al., 1997; Little et al., 2003).

Bei immunsupprimierten Patienten kann die Diagnose einer EBV-assoziierten LPD nicht wie die einer EBV-Infektion bei Immungesunden serologisch gestellt werden, sondern man ist auf den Nachweis von Virus-DNA angewiesen (Tsuchiya et al., 2002). EBV-DNA wird mittels PCR aus Rachensekret und Blut nachgewiesen, so dass es möglich ist, die aktuelle Viruslast bei Risikopatienten zu bestimmen. Besteht ein hohes Niveau der Konzentration von Virusgenom-Äquivalenten (EBV-Geq.), oder kommt es zu einem Anstieg dieser Konzentration, geht man von einer signifikanten Virusreaktivierung aus, die womöglich auf eine bedrohliche Proliferation von wachstumstransformierten B-Zellen hinweisen kann. Üblicherweise treten solche Titeranstiege einige Wochen vor der klinischen Manifestation einer LPD auf. Allerdings treten auch LPD's ohne vorherige Titeranstiege auf, und umgekehrt kommt es zu Titeranstiegen ohne anschließende Manifestation einer LPD. Es besteht ein dringender Bedarf an zusätzlichen klinischen Markern zur Bestimmung des LPD-Risikos immunsupprimierter Patienten, um rechtzeitig prophylaktische bzw. therapeutische Maßnahmen ergreifen zu können (Gottschalk et al., 2005; Stevens et al., 2002).

Es bestehen verschiedene therapeutische Optionen bei immunsupprimierten Patienten mit gesicherter LPD, die jedoch alle spezifische Probleme aufweisen und daher genau abzuwägen sind. Die Anwendung von Virustatika bewirkt eine Eindämmung der Streuung des Virus. Dies hat jedoch keinen Einfluss auf die Proliferation der latent infizierten

Zellpopulation. Bei Patienten nach Transplantation käme eine sukzessive Lockerung der Immunsuppression als therapeutische Option in Frage. Durch das Risiko der Organabstoßung bzw. der Spender-gegen-Empfänger-Krankheit (*graft-versus-host disease*, GvHD) nach HSCT sind dieser Therapiestrategie jedoch enge Grenzen gesetzt. Die Langzeitfolgen einer B-Zelldepletion durch den monoklonalen anti-CD20-Antikörper Rituximab sind noch nicht abzusehen, auch wenn kurzfristig gesehen mit einem Erfolg zu rechnen ist. Eine lokalisierte LPD kann versuchsweise durch chirurgische Behandlung oder *radiatio* behandelt werden, was jedoch häufig nicht zum durchschlagenden Therapieerfolg führt. Bei einer disseminierten LPD bietet sich eine Chemotherapie an, die jedoch mit einer hohen Mortalität assoziiert ist. Die Anwendung von Interferon-alpha (IFN- α) oder anti-Interleukin-6 (IL-6)-Antikörper befindet sich noch im experimentellen Stadium. Insgesamt gesehen sind alle diese therapeutischen Optionen problematisch (Taylor et al., 2005; Gottschalk et al., 2005).

Die adoptive Immuntherapie wird seit einigen Jahren als eine vielversprechende Option bei der Behandlung von viralen Infektionen und Tumoren verfolgt. Anfang der 90-er Jahre zeigten erste klinische Studien beim Menschen, dass transferierte T-Zellen bei immunsupprimierten Patienten die spezifische Immunität wiederherstellen und die Patienten erfolgreich vor bestimmten Erkrankungen schützen können (Riddell et al., 1992). Durch den Transfer EBV-spezifischer Spender-T-Zelllinien gelang kurz darauf die Prophylaxe und Therapie der PTLD nach allogener HSCT (Rooney et al., 1998; Heslop et al., 1997; Rooney et al., 1995). Da die Herstellung von EBV-spezifischen Spender-T-Zelllinien sehr aufwendig und zeitintensiv ist, ist diese Therapieoption bislang nur für ausgewählte Hochrisikopatienten eine Option und auch nur an wenigen Spezialeinrichtungen durchführbar. Im Vergleich zu anderen adoptiven Immuntherapien wird die effiziente Herstellung dieser T-Zelllinien durch die gute Verfügbarkeit von autologen LCL, die als APC dienen, erleichtert. Die Generierung der LCL aus Spender-B-Zellen dauert allerdings etwa sechs Wochen. Mit Hilfe dieser LCL werden dann periphere Spender-T-Zellen repetitiv *ex vivo* stimuliert und EBV-spezifische Spender-T-Zelllinien generiert, was wiederum mehrere Wochen in Anspruch nimmt. Diese EBV-spezifischen Spender-T-Zelllinien werden dann durch eine periphere Injektion auf den Patienten übertragen (Gottschalk et al., 2005; Heslop et al., 2005; Davis et al., 2004). Sowohl CD8+ als auch CD4+ Komponenten sind in diesen Spender-T-Zelllinien enthalten. Bei PTLDs nach SOT wurden erste autologe T-Zellimpfstoffe eingesetzt, allerdings ist die Herstellung aufgrund der Immunsuppression des Patienten deutlich schwieriger und die Wirkung weniger zuverlässig (Savoldo et al., 2006; Gottschalk et al., 2005; Bollard et al 2004; Comoli et al., 2005). Als Alternative waren partiell HLA-identische (*human leukocyte antigen*), EBV-spezifische T-Zelllinien aus einer vorgehaltenen T-Zellbibliothek vorgeschlagen worden. Allerdings ist dieser Ansatz mit einem höheren Risiko für

unerwünschte Nebenwirkungen verbunden und hat in der Klinik bislang kaum Anwendung gefunden (Haque et al., 2002).

Im Folgenden soll der aktuelle Stand der Forschung zur Immunerkennung von EBV dargelegt werden, um zu verdeutlichen, welche Punkte in der Vergangenheit bereits gut untersucht wurden, und welche noch intensiver Untersuchungen bedürfen, um optimale Therapieoptionen für EBV-assoziierte Erkrankungen zu etablieren.

1.2 Die Immunerkennung des Epstein-Barr-Virus

1.2.1 Die humorale Immunantwort

Die EBV-Infektion eines immunkompetenten Menschen führt zur Produktion von Antikörpern, die gegen verschiedene virale Bestandteile gerichtet sind. Grundsätzlich kann bei der humoralen Immunantwort gegen EBV zwischen vier verschiedene Gruppen von Zielantigenen unterscheiden werden (Evans et al., 1989). Die Reaktivität gegen EBNA wird meist von Antikörpern gegen EBNA1 dominiert. Die Reaktivität gegen Eas umfasst die humorale Antwort gegen frühe Proteine des lytischen Replikationszyklus wie beispielsweise BZLF1, den Transaktivator der lytischen Replikation. Die humorale Immunreaktion gegen VCAs schließt die Reaktionen gegen Antigene der Kernhülle ein, und die Reaktivität gegen Mas (*membrane antigens*) wird von Antikörpern gegen gp350 dominiert, die eine Virus-neutralisierende Aktivität besitzen.

Informationen zur humoralen Immunantwort wurden überwiegend aus Untersuchungen von Patienten mit AIM gewonnen. Man geht davon aus, dass der Ablauf der humoralen Immunantwort bei asymptomatischen Infektionen abgeschwächt, aber ansonsten ähnlich abläuft. Zu dem Zeitpunkt, an dem Patienten mit AIM symptomatisch werden, weist ihr Blut bereits beträchtliche anti-VCA-IgM-Spiegel und ansteigende Titer für anti-VCA-IgG und anti-EA-IgG auf. In den folgenden Monaten nimmt der anti-VCA-IgM-Titer wieder kontinuierlich ab. Auch der anti-VCA-IgG-Titer fällt nach einem initialen Peak wieder auf ein dauerhaft stabiles Niveau ab, während der anti-EA-IgG-Titer schneller und weiter absinkt als der anti-VCA-IgG-Titer, um entweder nicht nachweisbar zu werden oder sich auf einem sehr niedrigen Niveau einzupendeln. Anti-MA-Titer sind während der AIM oftmals sehr niedrig und steigen erst im späten Krankheitsverlauf langsam an, persistieren dann jedoch lebenslang. Während der AIM ist eine transiente IgA-Reaktion gegen gp350 zu beobachten (Sixbey et al., 1992) und an Antikörpern gegen nukleäre Antigene nur anti-EBNA2-IgG nachweisbar. Anti-

EBNA1-IgG wird gewöhnlich erst nach der Gesundung nachweisbar (Henle et al., 1987). Es wurden bislang keine Antikörperreaktionen gegen LMPs bei Patienten mit AIM nachgewiesen.

Die Rolle der humoralen Immunantwort bei der Kontrolle der EBV-Infektion ist weiterhin unklar. Möglicherweise könnte die virusneutralisierende Antikörperantwort an der Eindämmung der Virusverbreitung beteiligt sein. Allerdings liegen auch Beobachtungen vor, die beschreiben, dass anti-gp350-IgA bei der Ausdehnung der Infektion auf epitheliale Zellen maßgeblich beteiligt sind (Sixbey et al., 1992). Die zeitliche Diskrepanz zwischen dem Auftreten von Antikörpern gegen EBNA1 und EBNA2 könnte ein Hinweis darauf sein, dass zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Verlauf der AIM verschiedene Typen an latent infizierten Zellen dominant sind (Rickinson et al., 2007). Des Weiteren wird die frühe Phase der AIM von signifikant erhöhten Serumspiegeln an IgM, IgG und IgA begleitet, was vermutlich auf die Virus-aktivierte polyklonale Aktivierung des B-Zell-Systems zurückzuführen ist (Henle et al., 1979). Gemeinsam mit diesem generellen Antikörperanstieg wird ein transientes Auftreten von heterophilen Antikörpern und Autoantikörpern beobachtet, zumeist IgM-Antikörper, die unter Umständen ebenfalls Produkte der EBV-infizierten B-Zellen sind (Garzelli et al., 1984). Diese heterophilen Antikörper besitzen die Fähigkeit, Schafs- und Pferdeerythrozyten zu agglutinieren, was als Paul-Bunnell-Reaktion bezeichnet und bei der serologischen Diagnostik als Hinweis auf eine AIM genutzt wird (Henle et al., 1979).

Obwohl gesunde Virusträger beständig anti-VCA-IgG aufweisen, können die Antikörperspiegel von anti-gp350-IgG und anti-EBNA1-IgG zwischen verschiedenen Personen signifikant variieren. Manche gesunden Virusträger weisen zudem noch weitere Antikörper gegen EA oder andere EBNA's auf (Evans et al., 1989). Auch bei der persistierenden Infektion ist die Rolle der humoralen Immunantwort unklar, allerdings wird vermutet, dass die virusneutralisierenden Antikörper zur Kontrolle der Virusinfektion beitragen und das Ausbrechen einer Virämie verhindern.

1.2.2 Immunantwort der CD8+ T-Zellen

Mit der Erkenntnis, dass die humorale Immunantwort nicht alleine für die Kontrolle der EBV-Infektion verantwortlich sein kann, hat sich der Fokus hin zu den T-Zell-vermittelten Immunantworten verschoben.

Die AIM ist gekennzeichnet von einer großen Anzahl von atypischen, vornehmlich CD8+ T-Lymphozyten im peripheren Blut (Yata et al., 1973). Die Ursache der stark ausgeprägten CD8+ T-Zell-Antwort wurde bereits vielfach diskutiert. Die Tatsache, dass bei Patienten mit

AIM ausgesprochen verzerrte Verteilungen des T-Zell-Rezeptors $V\beta$ nachweisbar sind, wurden als Aktivierung von *bystander*-T-Zellen oder Superantigen-induzierte Expansion interpretiert (Sutkowski et al., 1996).

Bei gesunden Virusträgern konnten CD8⁺ T-Zellen mit Spezifität für Latenzantigene nachgewiesen werden, die überwiegend zur EBNA3-Proteinfamilie gehören. Auch CD8⁺ T-Zellen aus dem peripheren Blut von Patienten mit AIM zeigten vorzugsweise eine Spezifität für Latenzantigene der EBNA3-Proteinfamilie. Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Fokussierung der CD8⁺ T-Lymphozyten auf die Proteine der EBNA3-Familie nicht nur eine Folge der langjährigen Konfrontation mit EBV ist, sondern bereits im Anfangsstadium der Infektion eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Steven et al., 1996). Untersuchungen der CD8⁺ T-Zell-Antwort bei kleinen Kindern wenige Monate nach Primärinfektion mit EBV zeigten ähnliche Ergebnisse (Tamaki et al., 1995). Analysen der Häufigkeiten von T-Zellen mit Spezifität für ein bestimmtes Latenzantigen mittels der MHC-Tetramer-Technik zeigten jedoch, dass diese T-Zellen nur einen geringen Prozentsatz der gesamten CD8⁺ T-Zell-Population *in vivo* ausmachen. Als damit begonnen wurde, auch lytische Zielantigene in diese Untersuchungen mit einzubeziehen, wurde deutlich, dass viele T-Zellen mit Spezifität für verschiedene lytische Antigene während der AIM expandieren, und dass diese sogar mit wesentlich höherer Häufigkeit auftreten als T-Zellen mit Spezifität für Latenzantigene (Callan et al., 1998). Die am häufigsten auftretenden T-Zellantworten gegen lytischen Antigene sind gegen die sehr frühen lytischen Antigene BZLF1 und BRLF1 sowie die frühen Antigene BMLF1, BMRF1 und BALF2 gerichtet (Bogedain et al., 1995; Callan et al., 1998). In Abhängigkeit von der Expression der MHC-I-Moleküle können bis zu 50 % aller CD8⁺ T-Zellen bei Patienten mit AIM gegen ein einziges Epitop eines lytischen Antigens gerichtet sein (Steven et al., 1997). Die meisten CD8⁺ T-Zellen von Patienten mit AIM zeigen einen aktivierten Phänotyp. Während der Gesundung gehen die meisten T-Zellen zugrunde, vermutlich weil die Stimulation durch die entsprechenden Antigene ausbleibt. Durch Einsatz der MHC-Tetramer-Technik konnte festgestellt werden, dass sowohl T-Zellen mit Spezifität für latente als auch solche mit Spezifität für lytische Antigene nach der Genesung von einer AIM deutlich in ihrer Anzahl zurückgehen, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß (Silins et al., 1996). Die meisten verbleibenden Zellen kehren zurück in einen ruhenden Phänotyp, aber auch Gedächtnis- und Effektor-Phänotypen können nachgewiesen werden.

Das LCL-stimulierte CD8⁺ T-Zell-Gedächtnis gegen EBV wird an erster Stelle von Reaktivitäten gegen Proteine der EBNA3-Familie dominiert. Es folgen der Häufigkeit nach Reaktivitäten gegen Epitope von LMP2 und seltener gegen EBNA2, EBNA-LP, LMP1 und EBNA1 sowie nur sehr schwach gegen die Polypeptide von BARF0 (Rickinson et al., 1997). Diese Hierarchie der Immundominanz bei den Latenzantigenen ist bislang nur teilweise aufgeklärt. Beispielsweise ist bekannt, dass bei EBNA1 einen interner Glycin-Alanin-repeat

die proteasomale Degradation und damit die Generierung von Peptiden verhindert, die über MHC I an CD8+ T-Zellen präsentiert werden können (Levitskaya et al., 1995).

Ganz ähnlich, aber in geringerer Anzahl verhält es sich mit den T-Zell-Reaktivitäten bei gesunden Virusträgern. Etwa 1 % der peripheren CD8+ T-Zell-Population ist spezifisch für ein bestimmtes Latenzantigen, während T-Zellen mit Spezifität für ein bestimmtes lytisches Antigen etwa fünf mal häufiger auftreten (Tan et al., 1999).

Das fortgeschrittene Wissen um Spezifität, Ausmaß und Funktion der virusspezifischen CD8+ Immunantwort gesunder Virus-Träger resultierte inzwischen in ersten antigenspezifischen Ansätzen für den CMV- (Einsele et al., 2004; Peggs et al., 2003), Adenovirus- (Leen et al., 2005; Feuchtinger et al., 2006) und EBV-spezifischen Zelltransfer (Landais et al., 2005). Auf der Basis MHC I-restringierter Epitope können antigenspezifische T-Zellen gezielt isoliert und expandiert werden, was die Generation virusspezifischer T-Zellimpfstoff entscheidend erleichtert.

1.2.3 Die Immunantwort der CD4+ T-Zellen

CD4+ T-Zellen erkennen MHC II-gebundene Peptide, die auf der Zelloberfläche von pAPC (B-Zellen, dendritische Zellen, Makrophagen) präsentiert werden. MHC II-Moleküle sind Heterodimere, die Peptide mit unterschiedlicher Länge binden können (Engelhard et al., 1994). Sie werden im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) synthetisiert, wo sie auch mit der invarianten Kette assoziieren. Die invariante Kette blockiert die Bindungsstelle der MHC II-Moleküle im ER und verhindert auf diese Weise die Bindung von Peptiden während die neu synthetisierten MHC II-Moleküle in das endosomale/lysosomale Kompartiment geschleust werden (Cresswell et al., 1996). Da der pH-Wert in diesem Kompartiment zunehmend niedriger wird, löst sich die invariante Kette, degradiert und macht die Peptidbindungsstelle frei zugänglich für Peptide (Hsing et al., 2005). Peptidbeladene MHC II-Moleküle werden schließlich in Vesikeln an die Zellmembran transportiert, wo sie von den CD 4+ T-Zellen erkannt werden.

Nach dem klassischen Modell der Antigenpräsentation stammen MHC II-assoziierte Peptide hauptsächlich von Proteinen der Zellmembran und von extrazellulären Proteinen, die über Endozytose in die Zelle aufgenommen und im lytischen Kompartiment degradiert wurden, während MHC I-Moleküle hauptsächlich Peptide präsentieren, die von intrazellulären Proteinen stammen (Watts et al., 2004). Jüngere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass auch Peptide von extrazellulären Proteinen auf MHC I-Molekülen präsentiert werden können, und dass dieses sogenannte *cross-priming* essentiell für die Abwehr von Virus- und

Tumorerkrankungen ist (Chen et al., 2004; Otahal et al., 2005). Die Präsentation von intrazellulären Proteinen auf MHCII-Molekülen wird bei der Induktion von Toleranz und antiviraler Immunität diskutiert (Rudensky et al., 1991; Dongre et al., 2001). Autophagie wurde als ein Mechanismus der endogenen Präsentation von zytosolischen und nukleären Antigenen auf MHCII-Molekülen identifiziert (Nimmerjahn et al., 2003; Paludan et al., 2005; Tewari et al., 2005; Zhou et al., 2005, Riedel et al., 2008). Autophagie geschieht durch die Abschnürung von Zytoplasma unter der Ausbildung von membranösen Vesikeln (Autophagosomen), die mit dem endosomal/lysosomalen Kompartiment verschmelzen und somit Zugang zu dem Kompartiment zur Prozessierung und Beladung von MHCII-Molekülen gewinnen (Yorimitsu et al., 2005). So können CD4+ T-Zellen mit Spezifität für ein intrazelluläres Antigen dieses direkt auf der antigenexprimierenden MHCII-positiven Zielzelle erkennen (**Abb. 6**).

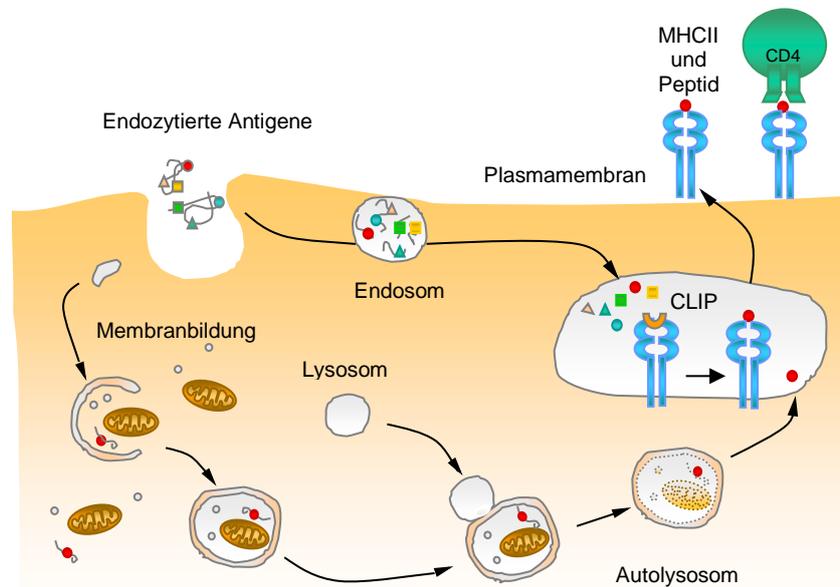


Abbildung 6: Endogene Antigenpräsentation auf MHC Klasse II-Molekülen

Endozytierte Antigene folgen dem klassischen Präsentationsweg der MHC Klasse II-Moleküle. Zytosolische Antigene werden spontan unter Ausbildung von membranösen Vesikeln abgeschnürt und verschmelzen mit Lysosomen zu Autolysosomen. Durch die Fusion mit den Lysosomen erfolgt eine Absenkung des pH-Wertes, wodurch die Beladung der Peptidbindungstasche ermöglicht wird. Diese wird zunächst vom CLIP (*class II-associated invariant chain peptide*) blockiert, damit kein Peptid binden kann. Damit ein Peptid aus dem Endosom binden kann, muss CLIP dissoziieren (Graphik mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Uta Behrends).

CD4⁺ Zellen können anhand ihres Zytokinsekretionsmusters in verschiedene Subtypen unterschieden werden, zu denen unter anderen Th1-, Th2-, Th3- und Th17-Zellen gehören. Den Th1- und Th2-Zellen ist gemeinsam, dass sie Interleukin-2 (IL-2), *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) und Interleukin-10 (IL-10) produzieren. CD4⁺ T-Zellen können als Helferzellen, als Effektorzellen oder negativ regulatorisch wirken.

Th1-Zellen sind essentielle Promotoren der Aktivierung von CD8⁺ Zellen und fördern die Immunantwort durch Makrophagen und NK-Zellen, fördern aber auch die Produktion opsonierender Antikörper durch B-Zellen (Janeway et al., 2008). Charakteristisch für Th1-Zellen ist die Produktion und Sekretion von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interferon- γ (IFN- γ) nach Erkennung der jeweiligen Zielzelle. IFN- γ dient unter anderem der Aktivierung von Makrophagen, die für die effiziente Zerstörung von intrazellulären Mikroorganismen zuständig sind. IFN- γ vermag aber auch die Antigenpräsentation der CD4⁺ Zellen zu verbessern, indem es die Expression von MHCII-Molekülen induziert (Christensen et al., 1999; Robertson et al., 2001; Paludan et al., 2002).

Th2-Zellen sind primär für die Aktivierung und Differenzierung von antikörperproduzierenden B-Zellen und damit für eine komplexe und hochaffine Antikörperantwort entscheidend (McHeyzer-Williams et al., 2005). Damit entsprechen sie den herkömmlichen Vorstellungen der klassischen T-Helfer-Zellen. Zum typischen Zytokinmuster der Th2-Zellen gehört die Sekretion von IL-4, Interleukin-5 (IL-5) und Interleukin-13 (IL-13) (Janeway et al., 2008).

Th3-Zellen zählen zu den regulatorischen T-Zellen (Treg). Nach Kontakt mit ihrem Antigen sezernieren sie z.B. *transforming growth factor* β (TGF- β), der immunsuppressive Eigenschaften aufweist und so zu einer Immuntoleranz beiträgt. Diese Eigenschaft ist besonders an der Stelle gefragt, wo harmlose Fremdstoffe beispielsweise über die Nahrung in den Magen-Darm-Trakt aufgenommen werden und notwendigerweise keine Abwehrreaktion des Körpers gewünscht wird. Th3-Zellen sind an der Kontrolle der T-Zell-vermittelten Autoimmunität beteiligt, da sie die Proliferation und Zytokinsekretion anderer Zellen unterdrücken (Lan et al., 2005).

Darüber hinaus konnten Treg nachgewiesen werden, die unabhängig von TGF- β T-Zell-Antworten unterdrücken können. Diese Subpopulation zeichnet sich durch die Expression der Oberflächenmarker CD4 und CD25 aus und erreicht ihre Wirkung durch Zell-Interaktion. Diese Zellen scheinen nicht nur bei der Prävention von Autoimmunerkrankungen eine Rolle zu spielen, sondern auch bei anderen klinischen Immunphänomenen wie der GvHD. Möglicherweise können diese Zellen sogar das normale Immunsystem inhibieren und somit Ausdauer und Ausmaß einer Immunreaktion beeinflussen (O'Garra et al., 2004). Es wurden auch Treg mit Spezifität für EBNA1 beschrieben, was vermuten lässt, dass derartige Zellen eine Rolle bei der Viruspersistenz von EBV spielen könnten (Voo et al., 2005).

Der Wissenstand über die Rolle von CD4+ Zellen in der Immunantwort gegen EBV ist immer noch gering. Bei Patienten mit AIM expandieren CD4+ Zellen nicht in demselben Ausmaß wie CD8+ Zellen, und bis zum Beginn der eigenen Arbeiten wurden erst wenige EBV-spezifische CD4+ Zellklone charakterisiert. Über das EBV-spezifische CD4+ T-Zell-Gedächtnis bei gesunden Virusträgern gab es nur spärliche Informationen. Es war allerdings bekannt, dass EBV-spezifische CD4+ Zellen EBV-infizierte Zielzellen direkt erkennen können und des Weiteren essentiell für die Entstehung eines zellulären Langzeitgedächtnisses sind (Callan et al., 2004). Im Fokus der älteren Arbeiten stand zunächst das CD4+ Gedächtnis für Latenzantigene (Münz et al., 2000; Mautner et al., 2004; Long et al., 2005), bei dem Immunantworten gegen EBNA1 und EBNA3C dominieren (Leen et al., 2001). In der eigenen Arbeitsgruppe war darüberhinaus gezeigt worden, dass CD4+ T-Zellen mit Spezifität gegen die lytischen Antigene BLLF1, BALF4 und BZLF1 in gesunden Virusträgern zirkulieren, und dass CD4+ T-Zellklone mit Spezifität für die Virushüllproteine BLLF1 und BALF4 in der Lage sind, latent EBV-infizierte Zielzellen über einen *bystander* Effekt innerhalb weniger Stunden zu lysieren (Adhikary et al., 2006).

In der eigenen Arbeit sollte die therapeutisch hochinteressante CD4+ Immunantwort gesunder Virusträger gegen Proteine des lytischen Zyklus näher untersucht werden.

2 Material

Alle in der Arbeit genannten und hier nicht aufgeführten Materialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Amersham Biosciences (Freiburg)
- Becton Dickinson (Heidelberg)
- Bio-Rad (München)
- Corning (Corning, USA)
- Dianova (Hamburg)
- Eppendorf (Hamburg)
- Fisher Scientific (Schwerte)
- GLW (Würzburg)
- Greiner Bio-One (Frickenhausen)
- INTEGRA Biosciences (Fernwald)
- Invitrogen (Karlsruhe)
- MBI-Fermentas (St. Leon-Rot)
- Merck, mit Calbiochem/Novabiochem (Darmstadt)
- Millipore (Schwalbach)
- NEB (Frankfurt)
- Neolab (Heidelberg)
- Nunc (Wiesbaden)
- PAA (Pasching, Österreich)
- PerkinElmerLAS (ehem. Packard Instruments) (Rodgau-Jügesheim)
- Perkin Elmer/Applied Biosystems (Weiterstadt)
- Promega (Mannheim)
- Qiagen (Hilden)
- Roche (Mannheim)
- Sarstedt (Nürnberg)
- Sartorius (Göttingen)

- Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
- Stratagene (Amsterdam)

2.1 Verwendete Geräte

Inventar	Hersteller, Ort
Bakterienschüttler C 25	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Bakterieninkubator Typ B 6030	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode
CO ₂ -Zellkultur-Inkubator, Heraeus 6000	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode
Gene Pulser II (Elektroporation)	Bio-Rad, München
ELISA-Ablesegerät	Tecan Deutschland GmbH, Creilsheim
Feinwaage CP 2245	Sartorius, Göttingen
Flow-Hood-Laborbank	Bio-Flow Technik, Meckenheim
Gefriertruhe –20°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefriertruhe –80°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Elektrophoresekammer Horizon [®] 20.25	Invitrogen, Karlsruhe
Filmkassette	Kodak, Stuttgart
Kühlschrank +4°C, KT 1730	Liebherr, Bulle, Schweiz
Laborwaage, PJ 6000	Mettler-Toledo, Giessen
Lichtmikroskop, Axiovert 135	Carl Zeiss, Stuttgart
Magnetrührer IKAMAG [®] RCT	IKA [®] Werke, Staufen
Mikrowelle	Panasonic, Hamburg
Milli-Q-Wasseraufbereitungssystem	Millipore, Essen
PCR Thermocycler	PerkinElmerLAS, Rodgau-Jügesheim
PH-Meter, Multi-Calimatic 763	Knick, Berlin
Photoentwickler	Kodak, Stuttgart
Photometer, BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (20, 200, 1000 µl)	Gilson, Bad Camberg

Pipettierhilfe, Pipette Boy	INTEGRA Biosciences, Fernwald
Power Supply, Power-Pac300	Bio-Rad, München
Proteingelelektrophorese SE 250 Mighty Small II	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA
Thermomixer comfort (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator	UVP, Upland, USA
Vortexer, Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Ismaning
Zellzählkammer	GLW, Würzburg
Zentrifuge, 5415 Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, High Speed Roto Super 40	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge, Rotanta 460 R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge, Variofuge 3.0 RS	Thermo, Waltham, USA

2.2 Verbrauchsmaterialien

3 MM Whatman-Papier	Whatman, Maidstone, USA
Bakterien- und Zellkulturschalen	Greiner, Frickenhausen
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad, München
Fotofilme	Kodak, Stuttgart
Gel drying film	Promega, Mannheim
Hybond-P Blotting Membran	Amersham Biosciences, Freiburg
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe
Parafilm M	Alcan Packaging, Neenah, USA
Pipetten	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen, gestopfte, ART	MBP, San Diego, USA
Pipettenspitzen, ungestopfte, Diamond	Gilson, Bad Camberg
Polypropylen-Röhrchen (5 ml, 14 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
PP-Röhrchen-Falcon (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg

Saran Plastic	Dow, Edegern, Belgien
Spectra/Por® MWCO 6.-8.000	Spectrum, Karlsruhe
Sterile Filter (0,22 µM, 0,45 µM)	Millipore, Eschborn
Tiefkühlgefäße/Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturflaschen	Nunc, Greiner Bio-One, Costar
Zellkultur-Multiwell-Platten, Falcon	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugengefäße (1,5 ml/2 ml)	Eppendorf, Hamburg

2.3 Allgemeine Chemikalien und biologische Reagenzien

Agar	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
AIM-V	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Bromphenol Blue	IBI, New Haven, USA
BSA	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
Butanol	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Chloroquin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Coomassie-Blau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
dH ₂ O, OptilabPlus	MembraPure, Bodenheim
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt

Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ficoll-Paque	Amersham Biosciences, Freiburg
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Karlsruhe; Biochrom, Berlin; Bioser, Buenos Aires, Argentinien
Glucose	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
HEPES	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Imidazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylphosphat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Hilden
Phenol	Merck, Darmstadt
Phytohämagglutinin (PHA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polyacrylamid (PAA), Rotiphorese Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe
Propidiumjodid	Merck, Darmstadt

RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
TEMED	Merck, Darmstadt
Tris	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe
Trypton	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Zellfärbeblau Trypan Blue 0,4 %	Invitrogen (Gibco), Karlsruhe

2.4 Lösungsmittel, Puffer und Medien

1 x TE	10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA
2 x HBS pH 7,05	11,9 g HEPES, 16,4 g NaCl, 0,21 g Na ₂ HPO ₄ , auffüllen mit dH ₂ O auf 1000 ml, den pH auf 7,05 adjustieren, steril filtrieren
2 x Tris/SDS pH 8,8	90,72 g Tris, 10 ml 20 % SDS, auffüllen mit dH ₂ O auf 1000 ml, den pH mit NaCl bzw. NaOH adjustieren
2 x Tris/SDS pH 6,8	30,24 g Tris, 10 ml 20 % SDS, auffüllen mit H ₂ O auf 1000 ml, den pH mit NaCl bzw. NaOH adjustieren
3,3 x SDS PAGE Proteinladepuffer	1,5 ml 1M Tris pH 6,8, 3 ml Glycerol, 3 ml 10 % SDS, 0,3 ml β-Mercaptoethanol, 0,04 ml 1 % Bromophenolblue, 2,2 ml ddH ₂ O
50 x TAE	2 M Tris Base; 50 mM EDTA pH 8,5 in H ₂ O
Blockierpuffer	3 g Magermilchpulver in 60 ml Hybridisierungspuffer
Coomassie Entfärbepuffer	100 ml MeOH, 200 ml Essigsäure, 700 ml dH ₂ O
Coomassie-Färbung	Coomassie-Brillant Blau R-250

Coomassie Glycerolentfärbepuffer	400 ml MeOH, 100 ml Glycerol, 75 ml Essigsäure, 425 ml dH ₂ O
DNA-Ladepuffer	50 % Glycerol, 50 mM Tris HCl pH 7,5, 50 mM EDTA, 0,25 % Bromophenol Blue
ELISA-Blockpuffer	1 % BSA, 5 % Sucrose in PBS mit 0,05 % NaN ₃
ELISA-Waschpuffer	0,05 % Tween 20 in PBS-ohne, pH 7.2 – 7.4
Elutionspuffer pH 7,5	100 ml Lysierungspuffer pH 8,0; 0,5 M Imidazol
Ethidiumbromidlösung	10 mg/ml in ddH ₂ O
HEK 293-Zellmedium	500 ml DMEM (Dulbecco's Modifiziertem Eagle's Medium), 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 50 µg/ml Gentamycin
Hybridisierungspuffer	20 ml 1 x TBS, auffüllen mit ddH ₂ O auf 1000 ml, 3 % Magermilchpulver (MMP)
Klonierungsmedium	500 ml T-Zell-Medium, 10 U/ml IL-2, 250 ng/ml Phytohämagglutinin (PHA), 2,5 x 10 ⁵ /ml bestrahlte Buffy Coats (gepoolte PBMCs von mehr als drei Spendern)
Laufpuffer	3 g Tris, 14 g Glycin, 10 ml 10 % SDS, auffüllen mit H ₂ O auf 1000 ml
LB Agarplatten	10 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 20 g Agar. Deionisiertes H ₂ O wurde bis zum endgültigen Volumen von 1 l zugegeben und der pH mittels 5 M NaOH auf 7,0 adjustiert. Das Medium wurde autoklaviert und in Petrischalen gegossen (~25 ml/100 mm-Schale).

LB Flüssigmedium	10 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt. Deionisiertes H ₂ O wurde bis zum endgültigen Volumen von 1 l zugegeben und der pH mittels 5 M NaOH auf 7,0 adjustiert. Die Flaschen wurden autoklaviert und mit den entsprechenden Antibiotika verwendet.
LCL-Medium	500 ml RPMI 1640, 10 % FCS, 1 % Nicht-essentielle Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 50 µg/ml Gentamycin
Lysierungspuffer pH 8,0	8 M Harnstoff, 0,1 M Na ₂ HPO ₄ , 0,01 M Tris, 0,05 % Tween 20, 20 mM Imidazol
Medium zur Zell-Kryokonservierung	90 % Fötale Kälberserum, 10 % DMSO
PBS ohne	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7.2 – 7.4; 0,2 µm filtriert.
Reagent Diluent	1 % BSA , in PBS-ohne pH 7.2 – 7.4
RPMI-Medium ohne Serum	500 ml RPMI 1640, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 50 µg/ml Gentamycin
Sammelgel	2 ml PAA; 7,5 ml 2 x Tris/SDS pH 6,8; 5,4 ml ddH ₂ O; 90 µl APS, 10 µl TEMED
SOB Medium	0,5 g NaCl, 20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , und 10 mM MgSO ₄ pro Liter d H ₂ O, autoklaviert.
SOC Medium	SOB Medium mit 0,2 % Glucose
Stop-Lösung	2 N H ₂ SO ₄
Substratlösung	1:1-Mischung von Farbreagenz A (H ₂ O ₂) und Farbreagenz B (Tetramethylbenzidine)
Transferpuffer	4,5 g Tris, 21,0 g Glycin, auffüllen mit ddH ₂ O auf 1200 ml, 300 ml Methanol
Trenngel 10,5%	7 ml PAA; 10 ml 2 x Tris/SDS pH 8,8; 2,8 ml ddH ₂ O; 167 µl APS; 17 µl TEMED

T-Zell-Medium	500 ml AIM-V, 10 % hitzeinaktiviertes, gepooltes Humanserum, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 50 µg/ml Gentamycin.
T-Zell-Medium + IL-2	T-Zell-Medium, 10 U Interleukin-2/ml T-Zell-Medium

2.5 Antibiotika und Antimykotika

Amphotericin	Invitrogen (Gibco), Karlsruhe
Ampicillin	Merck, Darmstadt
	500 mg Ampicillin-Pulver wurde in 15 ml H ₂ O suspendiert, mit 35 ml 100 % Ethanol angereichert und in einer Konzentration von 10 mg/ml verwendet.
Gentamycin	Invitrogen (Gibco), Karlsruhe
Mycoplasma Removal Agent	AbD Serotec, Düsseldorf
Tetracyclin	Invitrogen (Gibco), Karlsruhe

2.6 Kommerzielle Komplettsysteme

BD OptEIA™ Substrat A + B ELISA Reagent	BD Biosciences, Heidelberg
DuoSet® ELISA Development System Human GM-CSF	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
DuoSet® ELISA Development System Human IFN-gamma	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
ECL Plus™ Western Blotting Detection Systems	Amersham Biosciences, Freiburg
JetStar® Plasmid-Miniprep-Kit	GENOMED, Löhne
JetStar® Plasmid-Maxiprep-Kit	GENOMED, Löhne

2.10 Vektoren

pCMVcyto/myc Vektor

Invitrogen, Karlsruhe

pCMV-BALF5-His

pCMV-BGLF5-His

pCMV-BBLF4-His

pCMV-BORF2-His

pCMV-BILF2-His

pCMV-BFLF2-His

pCMV-BXLF1-His

pCMV-BMLF1-His

pCMV-BC-RF1-His

Alle anderen Vektoren wurden von unserer Arbeitsgruppe von diesem Ursprungsvektor ausgehend modifiziert.

2.11 Bakterienstamm

Der elektrokompetente Bakterienstamm XL1 – Blue MRF´ wurde von der Firma Stratagene erworben. Der Genotyp ist folgender: $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ endA1 sup E44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F´proAB lacIq Δ M15 Tn10 (TetR)]. XL1 – Blue MRF´-Zellen sind Tetrazyklin-resistent.

2.12 Zellen

2.12.1 HEK 293-Zellen

Die HEK 293-Zelllinie ist eine seit 1977 bestehende humane Zelllinie, die als Transformationsprodukt einer menschlichen embryonalen Nierenzelle (*Human Embryonic Kidney*) mit DNA-Teilen des menschlichen Adenovirus 5 geschaffen wurde (Graham et al., 1977). 293T-Zellen sind eine bestimmte Variante der HEK 293-Zellen, die zusätzlich das „SV40 large T-Antigen“ exprimieren, welches die DNA-Replikation von episomalen Plasmiden mit dem „SV40 origin of replication“ ermöglicht. Beide Zelllinien lassen sich mittels eines $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Transfektionsprotokolls sehr effizient transfizieren.

2.12.2 Fibroblasten-Zelllinie Wi38

Die Humane Fibroblasten-Zelllinie Wi38 wurde 1962 aus humanem fetalen Lungengewebe gewonnen. In dieser Arbeit werden Zellen dieser Zelllinie als *feeder*-Zellen eingesetzt.

2.13 MHCII-Genotypen der verwendeten Zelllinien

Zur genaueren Identifizierung der HLA-Restriktion der verschiedenen Proteine wurden die generierten T-Zelllinien mit allogenen APC inkubiert, die über unterschiedliche MHCII-Genotypen verfügten.

Die MHCII-Genotypen der verwendeten Zelllinien finden sich in **Tab. 2**.

Bezeichnung	HLA-DRB1	HLA-DQB1	HLA-DPB1	HLA-DRB3/4/5
JM	0801, 1301	0402, 0603	0401, 1301	DRB3*01011
DG75	0404, 1301	0402, 0603	0401	DRB3*0101, DRB4*0103
BL70	1301, 1501	0602, 0603	0401, 0402	DRB3*0101, DRB5*0101
GB	1101, 1301	0301, 0603	0401, 0402	DRB3*0202
IM5 (LCL5)	1301, 1501	0602, 0603	0402	DRB3*0202, DRB5*0101

Tabelle 2: MHCII-Genotypen der verwendeten Zelllinien

Die Zelllinie LCL5 wurde aus IM5 generiert und entspricht somit deren MHCII-Genotyp.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

Einige Standardmethoden wurden in diesem Teil nicht gesondert aufgeführt und gemäß den im Standardwerk von Sambrook und Kollegen (Sambrook et al., 1989) nachzulesenden Protokollen oder nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

3.1.1 Vermehrung und Aufbewahrung von E. coli-Bakterienkulturen

Die Vermehrung von Bakterien erfolgte immer über die Isolierung einer Einzelkolonie von einer LB-Agarplatte. Die Vereinzelnung der Bakterien wurde durch fraktionierte Ausstriche erreicht. Entsprechend den Resistenzgenen wurden angemessene Konzentrationen von Antibiotika verwendet (Ampicillin 100 µg/ml, Tetracyclin 12,5 µg/ml). Die Vermehrung der Bakterien erfolgte in LB-Flüssigmedium in Gegenwart desselben Antibiotikums. Zur längeren Aufbewahrung wurden einer dichten Bakteriensuspensionskultur 10 % Glycerol zugesetzt, und die Suspension bei –80 °C eingefroren.

3.1.2 Bereitstellung transformationskompetenter Bakterien

Zur Anzucht dieses Stammes wurden 20 -100 µl einer Bakteriensuspension auf einer LB-Agarplatte mit Tetracyclin (Stammlösung 10 µg/ml) gleichmäßig verteilt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. 400 ml LB-Flüssigmedium wurde am nächsten Tag mit einer Einzelzellkolonie dieser Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,8 geschüttelt. Die Bakterien wurden bei 4 °C mit 2800 x g (Erdbeschleunigung) für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, und das Pellet in 400 ml eiskaltem 10 %igem Glycerol resuspendiert. Diese Resuspension wurde bei gleicher Temperatur und Geschwindigkeit für 10 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt, und das Bakterienpellet in 2-4 ml eiskaltem 10 %-igem Glycerol resuspendiert. Diese letzte Resuspension wurde aliquotiert und bei –80 °C eingefroren.

3.1.3 Transformation von Bakterien

Die Bakterien wurden durch Elektroporation mit der Plasmid-DNA transformiert. 20 μl transformationskompetenter XL1-Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 μl DNA-Ligationsansatz vermischt und in trockene, gekühlte Küvetten eingebracht. Diese wurde in den Küvettenhalter des Elektroporators gestellt, und der Stromschlag wurde ausgelöst (1500 V, 25 μF , 100 Ω). Unmittelbar nach dem Stromschlag wurde die Küvette entnommen, der Inhalt so schnell wie möglich in 1 ml SOC-Medium überführt und bei 37 °C für 30 min im Heizblock inkubiert. Danach wurden die Bakterien pelletiert, und das Sediment im restlichen Medium vorsichtig resuspendiert. Ein Aliquot der Bakterienlösung wurde auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

3.1.4 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Grundprinzip der Isolierung von Plasmiden aus Bakterien ist das der Alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979; Birnboim, 1983), welches hier in den Grundzügen noch einmal kurz skizziert wird:

Die Bakterien wurden durch eine NaOH und SDS enthaltenden Lösung lysiert. Dabei denaturierte das SDS die Bakterienzellproteine, und die NaOH denaturierte chromosomale und Plasmid-DNA. Neutralisiert wurde durch die Zugabe von Kaliumacetat, was rasch zur Renaturierung der Plasmid-DNA führte. Danach konnte der größte Teil der chromosomalen DNA und der Proteine präzipitiert werden. Ebenso das SDS, das mit Kalium einen Komplex bildete. Nach dem Zentrifugieren konnte die im Überstand vorhandene Plasmid-DNA durch Alkoholfällung präzipitiert werden.

3.1.4.1 Mini-Prep von Plasmid-DNA

Eine Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab wurde durchgeführt, um die Transformation der Bakterien in Einzelzellkolonien zu überprüfen. Dazu kam der JetStar®-Kit (Genomed) zum Einsatz, der auf dem oben skizzierten Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterienzellen beruht.

Es wurden 4 ml LB-Flüssigmedium mit einer Einzelzellkolonie angeimpft und über Nacht in einem Bakterienerschüttler inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die präparative

Plasmidaufarbeitung nach den Angaben des Herstellers (Jetstar Miniprep Kit, Genomed). 1 ml dieser Übernachtskultur wurde in einem 1,5 ml Laborröhrchen pelletiert (5000 Umdrehungen pro Minute (UpM), 5 min, bei Raumtemperatur (RT)), der Überstand verworfen, und das Pellet in 100 µl E1-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 100 µl E2-Puffer (Zellyse) durch vorsichtiges Schwenken untergemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden der klaren Lösung 100 µl E3-Puffer (Neutralisation) zugegeben, was zum Ausfällen von Proteinen und chromosomaler DNA führte. Nach weiterem Schwenken wurden die gefällten Bestandteile abzentrifugiert (15 000 UpM, 10 min, RT), und der plasmidhaltige Überstand mit 70 % Ethanol präzipitiert. Die Plasmid-DNA wurde pelletiert (15 000 UpM, 20 min, 4 °C), der Überstand verworfen, und das Pellet nach Trocknung in 100 µl sterilem H₂O oder 1 x TE aufgenommen. Es folgte die Testung im Restriktionsverdau.

3.1.4.2 Maxi-Prep von Plasmid-DNA

Nach korrektem Restriktionsverdau der Mini-Prep-Plasmid-DNA, wurden große Mengen der getesteten Bakterien-Einzelzellkolonie in 400 ml LB-Flüssigmedium-Übernachtskulturen hergestellt, und die Plasmid-DNA entsprechend den Angaben des Herstellers (JetStar Maxiprep Kit, Genomed) aufbereitet.

Die Bakterien einer 400 ml-Übernachtskultur wurden bei einer OD₆₀₀ von 0,8 bis 1,0 pelletiert (5000 UpM, 10 min, RT), der Überstand verworfen, und das Pellet in 10 ml E1-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 10 ml E2-Puffer (Zellyse) durch vorsichtiges Schwenken untergemischt und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden der klaren Lösung 10 ml E3-Puffer (Neutralisation) zugegeben, was zum Ausfällen von Proteinen und chromosomaler DNA führte. Nach weiterem Schwenken wurden die gefällten Bestandteile abzentrifugiert (7000 UpM, 10 min, RT), und der plasmidhaltige Überstand auf eine einmalig mit 15 ml E4-Puffer äquilibrierte Maxiprep-Säule aufgetragen. Der Durchfluß durch die Säulenmatrix, mit Bindung der DNA an dieselbe (Anionenaustausch) erfolgte ausschließlich durch die Gravitation. Die Matrix wurde dreimal mit 20 ml E5-Puffer gewaschen, bevor die Plasmid-DNA mit 15 ml E6-Puffer von der Säule eluiert wurde. Die DNA wurde mit 40 % Isopropanol bei RT gefällt (5 min) und abzentrifugiert (7000 UpM, 20 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 70 %-igem Ethanol gewaschen und nach Trocknung in einem geeignetem Volumen sterilen H₂O oder 1 x TE aufgenommen. Anschließend erfolgte die photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes durch Messung der Absorption bei 260 nm. Die Überprüfung der Richtigkeit der Plasmid-DNA wurde durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen oder,

im Falle von neu synthetisierten Plasmiden, durch eine Sequenzierung durchgeführt. Die Sequenzierungen wurden von der Firma Sequiserve vorgenommen.

3.1.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Überprüfung der Identität und Charakterisierung präparierter Plasmid-DNA sowie zu weiteren molekularbiologischen Zwecken wie z.B. der Ligation mit spezifischen DNA-Fragmenten wurden Restriktionsspaltungen durchgeführt. Restriktionsendonukleasen schneiden innerhalb einer DNA-Erkennungssequenz an einer bestimmten Stelle und lassen so definierte DNA-Fragmente entstehen, die von vorhersagbarer Anfangs- und Endsequenz und, bei bekannter Gensequenz, von vorhersagbarer Größe sind. Dabei unterscheidet man zwischen drei verschiedenen Endprodukten. Stumpfe Enden (*blunt ends*) entstehen, wenn Restriktionsendonukleasen die DNA in der Mitte einer symmetrischen Sequenz schneiden und dabei gleichlange Enden entstehen. 5'-überhängende Enden (*sticky ends*) entstehen, wenn die DNA versetzt geschnitten wird und am 5'-Ende überhängt; durch eine Behandlung mit DNA-Polymerase 1 gelingt ein Auffüllen zu stumpfen Enden. 3'-überhängende Enden entstehen, wenn die DNA versetzt geschnitten wird und am 3'-Ende überhängt. Durch eine Behandlung mit Exonukleasen kann das überhängende Ende bis zum ersten Basenpaar abverdaut werden. Die Zugabe von Ligase erleichtert die rasche Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen überhängenden Enden. Stumpfe Enden werden hingegen nur sehr langsam von speziellen Ligasen erkannt und verbunden.

Für alle DNA-Spaltungen wurden 2 – 4 U der gewünschten Restriktionsenzyme zu 1 µg DNA in dem entsprechenden Restriktionspuffer gegeben. Alle Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen in den dazugehörigen, zehnfach konzentrierten Puffern wurden gemäß den Empfehlungen der jeweiligen Hersteller (Fermentas) durchgeführt. Der Ansatz wurde 1 – 2 h bei optimaler Arbeitstemperatur der Enzyme inkubiert.

3.1.6 Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese

In einem Gleichspannungsfeld wanderten DNA-Fragmente in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Daraus ergaben sich zu jedem Zeitpunkt unterschiedliche Wanderstrecken im Gel. Benutzte man Fragmente mit bekanntem Molekulargewicht (Marker), so konnte man an deren Positionen im Gel die unbekannte Molekulargröße des zu untersuchenden Fragments abschätzen bzw. mit der erwarteten

Molekulargröße eines Fragments vergleichen und dadurch die Richtigkeit der Spaltung überprüfen. Die DNA wurde mit Hilfe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht, da dieses mit der DNA interkalierte und bei UV-Bestrahlung fluoreszierte. Durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen entstandene DNA-Fragmente wurden je nach Größe in unterschiedlich konzentrierten Agarosegelen aufgetrennt, je größer das DNA-Fragment desto geringer der Agarosegehalt. Da die Ursprungsplasmide in dieser Arbeit alle im Größenbereich von 5 – 7 kb lagen, wurden ausschließlich 0,9 %-ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht. Sobald das flüssige Gel auf etwa 50 °C abgekühlt war, wurden 0,4 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben, und das Gel in eine Gelkammer gegossen, in der ein Gelkamm zur Taschenausformung steckte. Das Gel erhärtete bei Raumtemperatur, der Gelkamm wurde entfernt. Nach Zugabe von 1/5 Vol. DNA-Ladepuffer zur DNA wurden die entstandenen Taschen mit der Probe befüllt, und die horizontale Elektrophorese im 1 x TAE-Puffer gestartet. Dazu wurde eine Spannung angelegt (200 ml Gel ~120V), wobei die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung Anode lief. Nach dem Lauf wurde die DNA mit einer UV-Lichtquelle sichtbar gemacht und durch einen Rotfilter fotografiert.

3.1.7 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente konnten einzelne DNA-Banden unter Sicht mittels einer UV-Lichtquelle mit einem Skalpell ausgeschnitten und somit isoliert werden. Das entsprechende Agarosegelstück wurde durch eine natriumjodidhaltige Lösung zersetzt, und die freiwerdende DNA wurde an Silicapartikel gebunden, um von diesen durch Waschprozeduren wieder eluiert zu werden.

In dieser Arbeit wurde der „Qiaex II Gel Extraction Kit“ des Herstellers Qiagen verwendet, und die Anwendung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers.

Das ausgeschnittene Gelstück wurde gewogen und in einem Ansatz von einer Volumeneinheit Gel mit drei Volumeneinheiten Puffer QX 1 (Solubilisationspuffer) gemischt. Die DNA-bindende QIAEX II-Lösung wurde 30 s mit einem Vortex-Mischer gemischt, um sie wieder in Suspension zu bringen. Bei einer DNA-Menge von 2 – 10 µg wurde das Gel-Puffer-Gemisch mit 30 µl QIAEX II-Lösung versetzt und bei 50 °C 10 min inkubiert, damit sich einerseits die Agarose löste, und andererseits die DNA an die Silicapartikel binden konnte. Die Reinigung der an die Silicapartikel gebundenen DNA erfolgte durch drei Waschprozeduren, wobei die erste mit 500 µl QX 1 Puffer und die beiden weiteren mit 500 µl PE Puffer (ethanolhaltiger Waschpuffer) durchgeführt wurden. Vor jeder Waschprozedur

wurde mittels Vortex-Mixer durchmischt, um die Silicapartikel in Suspension zu bringen. Nach jeder Suspension im Puffer wurde zentrifugiert (13 000 UpM, 30 sec, RT). Nach dem Trocknen (10 – 15 min) wurde das Pellet in 30 µl sterilem H₂O resuspendiert, 5 min bei RT inkubiert und zentrifugiert (13 000 UpM, 30 sec, RT). Der Überstand mit der extrahierten DNA wurde abpipettiert.

3.1.8 Herstellung stumpfer Enden durch enzymatisches Auffüllen überhängender Enden

Wenn bei der Spaltung mit Restriktionsendonukleasen überhängende Enden entstanden waren, zur weiteren Verarbeitung (z.B. Ligation) jedoch stumpfe Enden benötigt wurden, wurden die überhängenden Enden enzymatisch aufgefüllt. Dies geschah durch Zugabe von 10 U T4-DNA-Polymerase und 1 µl einer 10 mM dNTP-Mischung direkt zum Restriktionsansatz und nachfolgender Inkubation für 15 min bei RT.

3.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente können unter Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zu einem Strang ligiert werden. Die Ligation geschah enzymatisch mit Hilfe von Ligasen. Um mittels Restriktionsverdau erhaltene Vektor- und Insert-Fragmente mit kompatiblen Enden zu ligieren, wurde ein Verhältnis von Vektor (1. DNA-Fragment) zu Insert (2. DNA-Fragment) im Ansatz von 1:3 gewählt. Dieses Verhältnis wurde aufgrund des Fluoreszenzunterschieds der mit Ethidiumbromid-interkalierten DNA-Banden im Agarosegel unter UV-Licht abgeschätzt. Von dieser Mischung wurden 8 µl mit 1 µl T4-DNA-Ligase und 1 µl T4 Ligase-Puffer über Nacht bei 16 °C inkubiert. Nach einer Aufreinigung durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation wurde der Erfolg der Reaktion an einem Aliquot durch DNA-Gelelektrophorese kontrolliert.

3.1.10 Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation von DNA

Um Verunreinigungen der DNA zu entfernen, wurde das gleiche Volumen einer Mischung aus Phenol, Chloroform und Isoamyl-Alkohol (25:24:1) der DNA-Lösung zugesetzt.

Daraufhin wurde diese Mischung zentrifugiert (13000 x g, 10 min, RT), um die verschiedenen Phasen aufzutrennen. Die DNA-haltige, wässrige Phase wurde gewonnen und mit 2 Volumenanteilen 100 %-igem Ethanol sowie 0,1 Volumenanteilen 3 M Natriumacetat präzipitiert. Nach der folgenden Zentrifugation bei 13000 x g und 4 °C, deren Dauer von der Größe und Konzentration der DNA abhängig war (30 – 120 min), wurde das Pellet in 70 %-igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in sterilem ddH₂O aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde mittels einem UV-Spectrophotometer gemessen.

3.1.11 Transfektion von HEK 293-Zellen mit Plasmid-DNA

Die Transfektion der HEK 293-Zellen mit Plasmid-DNA wurde nach der Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode durchgeführt. Hierzu wurden 140 mm-Zellkulturschalen verwendet die zu 60 – 70 % mit konfluierenden HEK 293-Zellen bewachsen waren. Das alte Medium wurde verworfen, und 32 ml frisches HEK 293-Zellmedium zugegeben, bevor 8 ml der Transfektionsmischung tropfenweise über der gesamten Schale verteilt wurden. Die Transfektionsmischung pro 140 mm-Zellkulturschale bestand aus 4 ml 2 x HBS sowie einer vorab gemischten Lösung aus 4 ml ddH₂O, 80 µg Plasmid-DNA, CaCl₂ (400 µl einer sterilfiltrierten 2,5 M Lösung) und Chloroquin (40 µl einer 0,5 M Lösung). Die Transfektionslösung wurde vorbereitet, indem man die DNA-enthaltende Lösung langsam in die 2 x HBS-Lösung tropfen lies. Währenddessen produzierte man mit einer Pipette kontinuierlich Luftblasen in der 2 x HBS-Lösung. Nach Fertigstellung der Transfektionslösung wurde diese innerhalb von 5 min wie oben beschrieben auf die HEK 293-Zellen gegeben. 6 – 12 h nach der Transfektion wurde das alte Medium entfernt und durch frisches Medium ersetzt. 48 – 60 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet.

3.1.12 Präparation rekombinanter EBV-Proteine aus HEK 293-Zellen

Die proteinexprimierenden HEK 293-Zellen wurden geerntet, abzentrifugiert (5200 UpM, 10 min, RT), und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 50 ml Lysierungspuffer pH 8,0 pro 10⁸ Zellen resuspendiert und 5 min inkubiert. Das Lysat wurde zentrifugiert (7000 UpM, 30 min, RT), damit der Zellabfall und DNA-Komplexe ein Pellet formten, und der erwünschte klare Überstand gewonnen werden konnte. Diesem wurde 300 µl Ni-NTA-Agarose zugegeben, und das Gemisch über Nacht bei 4 °C in einem Überkopfschüttler inkubiert.

Die carboxyterminalen sechs Histidine des exprimierten Proteins ermöglichten eine schnelle und effiziente Aufreinigung über die spezifische Immobilisierung an Ni-NTA-Agarose. Die Nitrilotriacetsäure (NTA), die an die Agarose geknüpft war, bildete mit den Imidazolringen des 6xHis-Endes einen Chelatkomplex, in dem Nickel als Zentralion über sechs koordinative Bindungen gebunden vorlag. Imidazol alleine konnte diese Bindungen ebenfalls einnehmen. Durch Zugabe einer geringen Konzentration von Imidazolringen nach der Immobilisierung an der Ni-NTA-Agarose wurden unspezifische Bindungen anderer Proteine gelöst, ohne jedoch die spezifischen Bindungen der 6xHis-markierten Proteine zu unterbinden. Erst durch weitere Erhöhung der Imidazolkonzentration verdrängten die Imidazolringe die spezifischen Bindestellen, so dass die 6xHis-markierten Proteine von der Ni-NTA Agarose eluiert werden konnten.

Am nächsten Tag wurden die an Ni-NTA-Agarose gebundenen Proteine abzentrifugiert (2500 UpM, 10 min, RT), der Überstand verworfen und in Lysierungspuffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (2500 UpM, 10 min, RT) wurde der Überstand verworfen, und das Pellet in 300 µl Elutionspuffer gelöst. Die Ni-NTA-Agarose wurde abzentrifugiert (2500 UpM, 5 min, RT), und der Überstand gewonnen. Der letzte Vorgang wurde insgesamt 3 x durchgeführt, wobei der Überstand gesammelt wurde. Nun wurde der Überstand drei Tage lang gegen täglich frisches PBS-ohne durch eine „Spectra/Por molecular porous membrane“ auf einem Schüttler dialysiert. Das fertige Protein wurde im Anschluss durch Coomassie-Gelelektrophorese und Western-Blot-Analyse dargestellt.

3.1.13 Präparation von sezernierten Proteinen aus der HEK 293-Zellkultur

Von den neun untersuchten Proteinen war lediglich BCRF1 ein sezerniertes Protein. Für die Präparation von sezernierten Proteinen aus HEK 293-Zellen wurden 2 ml des Überstandes der mit dem Plasmid pCMV-BC-RF1-His transfizierten Zellkultur abgenommen und bei 1500 UpM 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in PBS-ohne gewaschen und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Es erfolgte die Resuspension des Pellets in 5 ml PBS-ohne und der Transfer von 1 ml Resuspensionslösung in ein Eppendorfröhrchen. Nun wurde erneut zentrifugiert (3000 UpM, 5 min, 4 °C) und der RIPA-Puffer vorbereitet, indem 1000 µl RIPA mit 1 µl PMSF (Proteaseinhibitor) vermischt wurden. Das entstandene Pellet wurde in 100 µl RIPA-Puffer mit PMSF gelöst und für 20 min auf Eis gestellt. Im Anschluss wurde abzentrifugiert (15000 UpM, 15 min, 4 °C), und der Überstand in Röhrchen gesammelt und bei – 80 °C gelagert. Für den Proteinnachweis wurde eine 10 µl-Probe mit 17 µl SDS Ladepuffer versetzt und durch SDS-PAGE aufgetrennt.

3.1.14 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die diskontinuierliche Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) diente der Analyse komplexer Proteinmischungen und ermöglichte den schnellen Nachweis zu identifizierender Proteine und deren Molekulargewichtsbestimmung. Zur elektrophoretischen Auftrennung von gereinigten Proteinen wurden diskontinuierliche, eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen unter denaturierenden, reduzierenden Bedingungen durchgeführt (Laemmli, 1970). Die Gelelektrophorese ist ein Trennverfahren, bei dem die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld genutzt wird. Das Wanderungsverhalten hängt von der Porengröße des Gels, der angelegten Spannung, sowie der Größe und Ladung des sich bewegenden Makromoleküls ab.

Die vertikalen Gele wurden zwischen zwei abgedichteten, speziell angefertigten Glasplatten (durch „Spacer“ getrennt) gegossen. Vor Gießen des Sammelgels wurde ein Kamm eingeführt. Dies führte dazu, daß sich oben mehrere Taschen bildeten, worin die Proteinlösungen aufgetragen werden konnten. Die Proben wurden in die Geltaschen gegeben, nachdem sie vorher mit der gleichen Menge Proteinladepuffer versetzt, 5 min bei 95 °C inkubiert und damit denaturiert wurden. Danach wurde an die Elektroden eine Gleichspannung von 120 V angelegt bis die Lauffront gerade das untere Ende des Gels erreicht hatte.

3.1.15 Coomassie-Färbung gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine

Die Coomassie-Färbung diente einer unspezifischen Färbung aller Proteine, die sich im Gel befanden. Dazu wurde das zu färbende Gel direkt nach dem Ende der Elektrophorese in die Coomassie-Färbelösung überführt und für 30 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde das Gel mehrfach unter Schütteln mit Coomassie Entfärbepuffer inkubiert (~1h). Anschließend wurde das Gel für weitere 10 min mit Coomassie Glycerolentfärbepuffer auf dem Schüttler inkubiert. Das Gel wurde daraufhin zwischen zwei Lagen Zellulosefolien („Gel Drying film“) eingespannt und über Nacht in einer Haltevorrichtung getrocknet. Am nächsten Tag konnte die getrocknete Folie auf Vorhandensein und Ausprägung der erwarteten Proteinbanden untersucht werden.

3.2 Eukaryotische Zellkultur

3.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Alle im folgenden beschriebenen Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten oder heißluftsterilisierten Materialien und Geräten oder sterilfiltrierten Lösungen. Alle mit humanem oder transfiziertem Zellmaterial in Kontakt getretenen Materialien oder Geräte wurden anschließend mit 90 %-igem Alkohol desinfiziert oder durch Autoklavieren sterilisiert.

Die Zellen wurden in einem CO₂-Zellkultur-Inkubator mit 5 % CO₂ bei 37 °C inkubiert. Die verwendeten Medien wurden bei 4 °C nicht länger als drei Monate aufbewahrt und innerhalb von zwei Wochen nach Zugabe des Serums verwendet. Das Fötale Kälberserum (FKS) wurde bei –20 °C für maximal 6 Monate gelagert. Andere Mediumzusätze wurden entsprechend den Angaben der Hersteller gelagert. Die Zellen wurden je nach Wachstum oder Verbrauch des Mediums mit frischem Medium gefüttert. Die regelmäßige mikroskopische Untersuchung der Zellkulturen erfolgte am Lichtmikroskop.

3.2.1.1 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurde ein Aliquot einer Zellsuspension gezählt, und die restliche Zellsuspension abzentrifugiert (1500 UpM, 5 min, RT). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit Medium zur Zell-Kryokonservierung resuspendiert und in max. 1,8 ml Aliquots in Kryoröhrchen überführt (~1 x 10⁷ Zellen/Kryoröhrchen). Es wurden Etiketten mit Informationen über die eingefrorenen Zellen angefertigt und aufgeklebt. Die Kryoröhrchen wurden zunächst mit Papiertüchern umwickelt langsam auf –80 °C heruntergekühlt, um Schäden durch Kristallisationsprozesse beim Einfrieren zu vermeiden. Nach 24 – 48 h wurden die Kryoröhrchen zur Langzeitaufbewahrung in Flüssigstickstoff (-196 °C) endgelagert.

3.2.1.2 Auftauen von Zellen

Die Kryoröhrchen wurden aus dem -80 °C Gefrierschrank direkt in ein 37 °C Wasserbad gegeben und darin vollständig aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen sofort in 10 ml RPMI 1640 transferiert, durchmischt und abzentrifugiert ($1000 \times g$, 5 min, RT). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet erneut in 10 ml RPMI 1640 gewaschen und daraufhin abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Schließlich wurden die Zellen in dem entsprechenden Zellkulturmedium in der gewünschten Verdünnung resuspendiert. Aufgetaute Zellen wurden zwei Wochen lang mit Mycoplasma Removal Agent (MRA) behandelt um eine Mycoplasmen-Kontamination zu vermeiden.

3.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzahlbestimmung wurden $10\text{ }\mu\text{l}$ der interessierenden Zellsuspension mit $10\text{ }\mu\text{l}$ 0,5 % Trypanblau vermischt. Davon wurden wiederum $10\text{ }\mu\text{l}$ unter ein Deckglass auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Für jede Bestimmung wurden die Zellzahlen von jeweils 16 Kleinquadraten summiert, um die Zellzahl über einem Großquadrat zu erhalten. Aus der Zellzahl und dem Verdünnungsverhältnis wurde dann die Zellzahl pro ml Suspension wie folgt ermittelt:

Zellzahl/ml = Anzahl aus einem Großquadrat $\times 2 \times 10^4 \times$ Verdünnungsfaktor

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde die Zellsuspension 1:2 mit Trypanblau (0,5 %) versetzt und 5 – 10 min bei RT inkubiert. Tote Zellen erschienen unter dem Lichtmikroskop blau gefärbt, lebende Zellen blieben ungefärbt.

3.2.2 HEK 293-Zellkultur

3.2.2.1 Kulturbedingungen für HEK 293-Zellen

HEK 293-Zellen wurden bei 37 °C unter 5 % CO_2 in HEK 293-Zellmedium in Zellkulturschalen kultiviert. Alle zwei bis drei Tage, wenn nahezu 100 % des Schalenbodens

mit Zellen bedeckt war, wurden sie 1:4 geteilt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen zunächst mit 1 x Trypsin-EDTA für 5 min bei 37 °C im CO₂-Zellkultur-Inkubator inkubiert. Dadurch lösten sich die Zellen vom Boden der Zellkulturschale und konnten gemeinsam mit dem Medium transferiert und abzentrifugiert werden. Das Pellet wurde in frischem HEK 293-Zellmedium resuspendiert, die Zellen wurden gezählt und in der gewünschten Zelldichte auf frischen Zellkulturschalen ausgebracht.

Die Methoden, die im Zusammenhang mit den HEK 293-Zellen angewandt wurden, sind in Kapitel 3.1.12 unter Molekularbiologische Methoden näher beschrieben.

3.2.3 T-Zellkultur

3.2.3.1 Isolation von peripheren mononukleären Blutzellen aus Blut

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) wurden durch Dichtegradientenzentrifugation des Vollbluts vom Spender JM gewonnen. Dazu wurde das Blut mit 0,5 mM EDTA versetzt, um die Koagulation des Blutes zu vermeiden und 1:1 mit RPMI 1640 verdünnt. Vorsichtig wurde diese Mischung mit 20 – 25 % Ficoll-Paque unterlagert. Im Anschluss wurde dieses Gemisch 30 min bei 2000 x g und RT ohne Bremse zentrifugiert. Dies führte zu einer Ansammlung der Erythrozyten am Boden des Gefäßes, darüber das Ficoll-Paque und oben auf fanden sich Leukozyten und Thrombozyten. Die lymphozytenhaltige Bande wurde mit einer Pipette vorsichtig abgezogen, erneut mit RPMI 1640 verdünnt, gut vermischt und zentrifugiert (1000 x g, 10 min, RT). Der Überstand wurde verworfen, und die im Pellet sedimentierten Lymphozyten wurden 2 x in RPMI 1640 gewaschen. Im Anschluss daran wurde das Pellet in 2 ml T-Zell-Medium resuspendiert, und die Zellzahl bestimmt. Entsprechend der gewünschten Konzentration an PBMC wurden diese mit frischem T-Zell-Medium verdünnt und verwendet.

3.2.3.2 Gewinnung und Aufbereitung von gepooltem Humanserum

Für die Zubereitung von T-Zell-Medium wurde Serum von freiwilligen Spendern verwendet. Das Vollblut der Spender wurde aus peripheren Venen gewonnen und in sterile 50 ml-Gefäße ausgebracht. Dort verweilte es unter gelegentlichem Umrühren etwa 3 – 4 h, bis es vollständig koaguliert war. Daraufhin wurde das koagulierte Blut zentrifugiert (20 min, 3000 x

g, RT), der Überstand gewonnen und 2:1 mit RPMI 1640 verdünnt. Diese Mischung wurde erneut zentrifugiert (20 min, 3000 x g, RT), um noch verbliebene Zellen abzutrennen. Das nun klare Serum wurde gewonnen und im Wasserbad bei 56 °C 30 min hitzeinaktiviert. Anschließend wurde das Serum von mindestens drei Spendern gepoolt, und das gepoolte Serum für die Zubereitung des T-Zell-Mediums verwendet.

3.2.3.3 Generierung von EBV- Protein-spezifischen T-Zelllinien

Um EBV-Protein-spezifische T-Zelllinien zu generieren, wurden durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnene 2×10^6 PBMCs in 2 ml T-Zell-Medium suspendiert und mit 500 ng/ml rekombinantem EBV-Protein in einem Loch einer 24-Loch-Platte inkubiert (die Expression, Aufreinigung und Quantifizierung rekombinanter EBV-Proteine wurde oben beschrieben). Nach 24 h wurden 20 U pro Loch Interleukin-2 (IL-2) zugegeben. Unter regelmäßiger Beobachtung wurden die T-Zelllinien bei Bedarf geteilt, indem die Zellsuspension aufgewirbelt, 1 ml der Zellsuspension in ein neues Loch transferiert, und die Löcher mit T-Zell-Medium + IL-2 wieder auf 2 ml aufgefüllt wurden.

3.2.3.4 Restimulation von EBV-Protein-spezifischen T-Zelllinien

In dieser Arbeit wurden die T-Zelllinien mit der Bezeichnung Passage (P) versehen, um die Häufigkeit der Restimulierungen anzuzeigen, die diese T-Zelllinien bereits durchlaufen hatten. Eine Passage dauerte 14 Tage. Nach diesen 14 Tagen wurden die T-Zelllinien folgendermaßen restimuliert: In einem neuen Ansatz wurden 2×10^6 PBMCs in 2 ml RPMI-Medium ohne Serum mit 500 ng/ml entsprechendem EBV-Protein inkubiert. Nach 24 h wurde dieser Ansatz mit 40 Gy bestrahlt. Anschließend wurde der bestrahlte Zell-Ansatz mit den Zellen der vorangegangenen Passage vermischt und abzentrifugiert (1500 UpM, 5 min, RT). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in T-Zell-Medium resuspendiert und mit je 2 ml in 24-Loch-Platten kokultiviert. Das weitere Procedere gleicht dem der Generierung von spezifischen T-Zelllinien (s. 3.2.3.3).

3.2.3.5 Generierung von EBV-Protein-spezifischen T-Zell-Klonen

Von T-Zelllinien die sich über mehrere Passagen in den enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*) als spezifisch für das entsprechende EBV-Protein gezeigt hatten, wurden nach der Methode des *limiting dilution cloning* Klone generiert. Dies erfolgte in 96-Loch-Platten mit rundem Boden. Jedes Loch erhielt bestrahlte, proteinbeladene PBMC (diese wurden nach dem gleichen Schema, wie bei der Stimulation der T-Zelllinien, hergestellt), 1×10^4 bestrahlte LCL JM (80 Gy), 1×10^5 bestrahlte Buffy Coats (40 Gy), 200 μ l Klonierungsmedium, sowie T-Zellen von den zuvor generierten EBV-Protein-spezifischen T-Zelllinien. Es wurden zwei unabhängige Verdünnungen gemacht, die ein oder drei T-Zellen der EBV-Protein-spezifischen T-Zelllinien pro Loch enthielten. 72 h später wurde das Klonierungsmedium durch IL-2 angereichertes T-Zell-Medium (20 U IL-2/ml Medium) ersetzt. Nach 14 Tagen wurden die Kulturen restimuliert. Löcher der 96-Loch-Platte, die Klonwachstum aufwiesen, wurden mittels Mikroskopie identifiziert und in 48- oder 24-Loch-Platten transferiert. Alle weiteren Stimulationen wurden nach dem gleichen Vorgehen vorgenommen.

3.2.4 Kultur von lymphoblastischen Zelllinien

3.2.4.1 Herstellung EBV-transformierter B-Zelllinien

In dieser Arbeit wurden LCL des Spenders JM (LCL JM) verwendet. Um diese herzustellen, wurden PBMC benötigt, die durch Dichtegradientenzentrifugation (siehe 3.2.3.1) gewonnen und auf $1 - 2 \times 10^6/100 \mu$ l LCL-Medium verdünnt wurden. Diese Zellsuspension wurde mit 100 μ l pro Loch einer 96-Loch-Platte ausgebracht. Die Infektion mit EBV erfolgte, indem in Gegenwart von Ciclosporin A (0,5mg/ml) pro Loch 100 μ l der Virussuspension zugegeben wurden.

Es wurden durch die Verwendung zweier verschiedener Virusstämme zwei Typen von LCL generiert. Der B95.8 Wildtyp-Virusstamm wurde durch Filtration des zellfreien Überstands einer B95.8-Zellkultur durch einen 0,45 μ l-Filter gewonnen. Der zweite EBV-Stamm war ein Laborabkömmling des B95.8 Wildtyp-Virusstamms, genannt mini-EBV. Dieser Laborstamm unterschied sich im Wesentlichen dadurch vom Wildtyp, dass er keine lytische Replikation durchlaufen konnte. Dieser mini-EBV-Stamm wurde uns freundlicherweise von Dr. Andreas Moosmann (Klinische Kooperationsgruppe „Molekulare Onkologie“, Helmholtz Zentrum

München) zur Verfügung gestellt. Die in dieser Arbeit verwendeten und durch mini-EBV immortalisierten Zelllinien wurden mini-LCL genannt.

Nach 24 h Inkubationszeit wurde die Hälfte des Mediums verworfen und durch frisches, Ciclosporin-A-haltiges LCL-Medium ersetzt. Die mit EBV infizierten PBMC wurden regelmäßig nach Mediumverbrauch überprüft und bei Bedarf mit frischem Ciclosporin-A-haltigem LCL-Medium versorgt. Den Zellkulturen, die nach zwei Wochen noch keine B-Zell-Kolonien zeigten, wurden 10^4 Zellen pro Loch der humanen Fibroblasten-Zelllinie Wi38 als Feederzellen zugesetzt. Zellkulturen, die anfangen zu proliferieren, wurden zunächst in 48-Loch-Platten und anschließend in 24-Loch-Platten transferiert. Schließlich wurden expandierende Zelllinien in Plastikflaschen transferiert, in denen die B-Zelllinien solange kultiviert wurden, wie sie benötigt wurden.

Die EBV-immortalisierten Zellen wurden entsprechend ihrer Proliferation geteilt. Dies geschah, indem die Hälfte der Resuspension in eine neue Zellkulturflasche gegeben und mit frischem LCL-Medium aufgefüllt wurde.

Sowohl die LCL, als auch die mini-LCL, die in dieser Arbeit verwendet wurden, waren MHC I und MHC II positiv, wie vom Labor für Immungenetik (Ludwig-Maximilians-Universität, München) festgestellt wurde.

3.3 Immunologische Assays

3.3.1 Western-Blot-Analyse von Proteinen nach SDS-PAGE

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Nitrozellulose-Membran (Hybond-P Blotting Membran) transferiert. An der Membranoberfläche blieben diese aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Dadurch entstand eine exakte Kopie des Gels auf der Transfermembran. Dazu wurde das mit den Proteinen beladene Gel auf eine mit Transferpuffer getränkte Nitrozellulose-Membran gelegt, die oben und unten mit je einem in Transferpuffer getränktem Filterpapier (3 MM Whatman-Papier) bedeckt wurde. Dieses Sandwich wurde derart in einer Plastikkammer in das Tank-Blot-System eingesetzt, das die Nitrozellulose-Membran auf der Seite der Anode war. Das Tank-Blot-System wurde mit Transferpuffer aufgefüllt und für 45-60 min eine Spannung von 120 V angelegt.

Die Proteinbanden konnten daraufhin auf der Nitrozellulose-Membran mit Hilfe von spezifischen Antikörpern identifiziert werden. Dafür wurde die Membran zunächst unter

Luftabschluss für 1 h in Blockierpuffer auf dem Schüttler inkubiert, um unspezifische Bindungen mit späteren Reagenzien zu vermeiden. Zwischen dem Wechsel der Nachweisreagenzien sowie vor der Inkubation mit ECL-Reagenz wurde der Blot je dreimal für jeweils 10 min mit Hybridisierungspuffer gewaschen. Der erste Antikörper, ein anti-His-tag-Antikörper (Anti-His₆) wurde für 2 h auf dem Schüttler inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschen wurde als sekundärer Antikörper ein von der Ziege stammender Peroxidasegekoppelter anti-Maus-Antikörper (Anti-mouse-Ig-HRP) eingesetzt und für weitere 1-2 h inkubiert. Nach erneutem, dreimaligem Waschen wurde die Membran auf einem Filterpapier getrocknet und auf eine Frischhaltefolie (Saran Plastic) gelegt. Die Mischung aus Lösung A und B wurde entsprechend den Angaben des Herstellers des ECL PlusTM Western Blotting Detection Systems zugegeben und für 5 min inkubiert. Die Peroxidase katalysierte eine quantitativ fluoreszenzgebende Reaktion des ECL-Reagenz, das dadurch mittels eines Röntgenfilms detektiert werden konnte.

3.3.2 Messung der Zytokinsekretion von T-Zellen mittels ELISA

Stimulierte T-Zellen sezernieren Zytokine, die aus dem Kulturüberstand mittels ELISA mit hoher Empfindlichkeit und Genauigkeit nachgewiesen werden können. Da das Zytokin durch die Bindung zweier Antikörper an unterschiedliche Epitope nachgewiesen wird, spricht man vom sogenannten Sandwich-ELISA. Er ist aufgrund von dualen Bindungsstellen hochspezifisch. In dieser Arbeit wurde die Sekretion von GM-CSF und IFN- γ untersucht. Es wurde das DuoSet[®]ELISA Development System der Firma R&D Systems verwendet, und die Durchführung erfolgte gemäß den Hinweisen des Herstellers.

Die ELISA-Platten wurden folgendermaßen vorbereitet: Zunächst erfolgte das Beschicken der ELISA-Platten mit 100 μ l pro Loch Fang-Antikörper (*mouse anti-human* GM-CSF; *mouse anti-human* IFN- γ). Die Arbeitskonzentration des Fang-Antikörpers betrug 2 μ g/ml in PBS-ohne. Die ELISA-Platten wurde mit Parafilm verschlossen und bei RT über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Antikörpergemisch verworfen, und die ELISA-Platten 3 x intensiv mit ELISA-Waschpuffer gewaschen. Nach dem dritten Waschgang wurde der letzte Rest des Waschpuffers durch kräftiges Ausklopfen der ELISA-Platten auf Papiertücher entfernt. Nun wurden freie Bindungsstellen auf dem Kunststoffträger mit ELISA-Blockpuffer abgesättigt, indem 300 μ l Blockpuffer pro Loch zugegeben und 1 h bei RT inkubiert wurden. Anschließend folgten abermals drei Waschschrte nach dem oben beschriebenen Muster. Nun waren die ELISA-Platten fertig präpariert für die Zytokintestung.

Die T-Zellassays wurden folgendermaßen vorbereitet: T-Zellen, die auf die Erkennung der Zielstrukturen hin untersucht werden sollten, wurden mit den entsprechenden APC in 200 µl LCL-Medium pro Loch einer 96-Loch-Platte kokultiviert. Als APC dienten entweder PBMC vom Spender JM (PBMC JM) oder mini-LCL vom Spender JM (mini-LCL JM), wobei letztere hier ausschließlich als APC verwendet wurden. Die APC wurden vorab für 24 h in den Testlöchern inkubiert. Meist wurde folgendes Schema angewandt:

LCL JM [1×10^5 in 200 µl]

LCL W3 JM (= mini-LCL JM) [1×10^5 in 200 µl]

PBMC [2×10^5 in 200 µl]

PBMC + 50 ng/ml Protein [2×10^5 in 200 µl]

PBMC + irrelevantes Protein z.B. GFP [2×10^5 in 200 µl]

Die Inkubation der T-Zellen mit mini-LCL JM, PBMC JM alleine, sowie PBMC JM plus irrelevantem Protein diente in diesem Ansatz der Negativkontrolle. Nach 24 h wurden den Löchern dieser 96-Loch-Platte 100 µl Überstand entnommen und mit 1×10^5 spezifischen T-Zellen in 100 µl LCL-Medium pro Loch ersetzt. Dieser Ansatz wurde weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Der Überstand der Stimulationsversuche wurde mit je 100 µl pro Loch in die vorbereiteten Löcher der ELISA-Platte gegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Nach Inkubation wurden ungebundene Zytokine durch einen dreimaligem Waschschrift von der Platte gewaschen. Spezifisch gebundene Zytokine wurden durch die Zugabe von 100 µl pro Loch anti-Zytokin-Antikörper (biotinylierter Detektionsantikörper) und eine zweistündige Inkubation nachgewiesen. Die Arbeitskonzentration des Detektionsantikörpers betrug 0,5 µg/ml in Reagent Diluent. Dieser Antikörper war gegen ein anderes Epitop gerichtet als der Fang-Antikörper. Nach dem Verwerfen überschüssigen Detektionsantikörpers wurde dreimal gewaschen, um dann 100 µl der Arbeitskonzentration von Streptavidin-HRP zuzugeben. Das Streptavidin war mit Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) konjugiert, welches in der Substratlösung enthaltenes Ortho-Phenyldiamin (OPD) oxidierte. Dies wurde 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Bei Farbumschlag von gelb zu blau wurden 50 µl/Loch Stop-Lösung zugegeben. Nun wurde der gebildete Farbstoff photometrisch bei 450 nm gemessen, und die Zytokinkonzentration über eine Standardkurve bestimmt. Für die Auswertung des ELISA wurde die Xread Plus Software verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung von lytischen EBV-Genen in Expressionsvektoren

Das EBV-Genom enthält etwa 100 potentielle ORF (**Abb. 7**). Obwohl noch nicht alle der davon kodierten Proteine nachgewiesen werden konnten, sind bislang mehr als 80 EBV-Proteine bekannt, die während der lytischen Replikation exprimiert werden (Kieff et al., 2007). In der eigenen Arbeit sollten Gene, die für lytische Proteine kodieren, in den Expressionsvektor pCMV-CHis einkloniert (**Abb. 8**), rekombinant exprimiert und zur Stimulation von peripheren CD4⁺ T-Zellen eingesetzt werden.

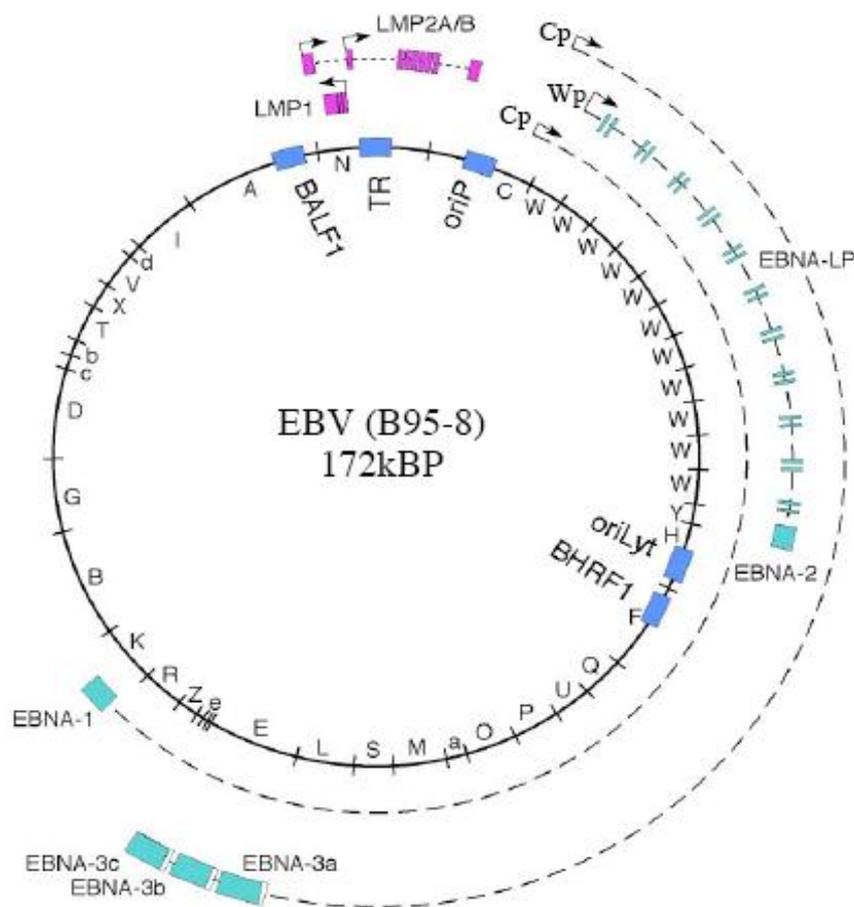


Abbildung 7: Schematische Darstellung des EBV-Genoms

Das Genom des B95-8 EBV-Stamms umfasst 172.282 Basenpaare und wird in verschiedene, mit Buchstaben gekennzeichnete Abschnitte unterteilt. Die offenen Leserahmen der während der latenten Infektion exprimierten Gene sind eingezeichnet, ebenso wie der lytische (oriLyt) und plasmidale (oriP) Replikationsursprung sowie die *terminal repeats* (TR), die für die Verpackung des Virusgenoms in Viruspartikel verantwortlich sind.

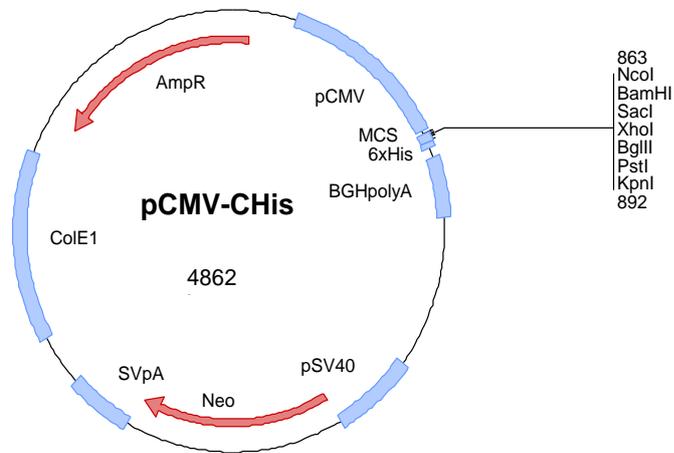


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Vektors pCMV-CHis

Der pCMV-CHis-Vektor besteht aus 4862 Basenpaaren. Er wurde ausgehend von dem pCMVcyto/myc-Vektor der Firma Stratagene von unserer Arbeitsgruppe derart modifiziert, dass das einklonierte Gen mit einem His-Tag am C-Terminus versehen wurde. Dadurch trugen die EBV-Proteine am C-Terminus einen His-Tag (6xHis), über den sie mittels Nickel-Agarose-Kügelchen aufgereinigt werden konnten. Die Expression der einklonierten offenen Leserahmen wurde über einen Promotor des Cytomegalievirus (pCMV) gesteuert, der eine Expression der inserierten Gene in eukaryotischen Zellen auf hohem Niveau bewirkte. Die *multiple cloning site* (MCS) in diesem Vektor enthielt mehrere direkt aufeinanderfolgende Schnittstellen für verschiedene Restriktionsendonukleasen und erlaubte nach Restriktionsverdau des Vektors eine Insertion der verschiedenen EBV-Gene. BGHpolyA ist das Polyadenylierungssignal des *bovine growth hormone*-Gens. Bei Transkription dieses Polyadenylierungssignals wird die RNA-Polymerase durch das Poly-A-Signal gestoppt, wodurch es zur Ablösung der RNA-Polymerase und zum Ende der Transkription kommt. pSV40 ist der Promotor des Simianvirus 40 und fungiert als solcher für die Expression des *Neomycinresistenz*-Gens (Neo). SvpA wiederum ist das Polyadenylierungssignal des SV40 was zur Beendigung der Transkription des *Neomycinresistenz*-Gens führt. ColE1 ist der Replikationsursprung für das Plasmid in Bakterien und AmpR entspricht dem *Ampicillinresistenz*-Gen.

Die ORFs der EBV-Gene wurden mittels Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) amplifiziert. Die Primer für die PCR wurden entsprechend den veröffentlichten EBV-Sequenzen des B95.8 Wildtyps konstruiert. Beim *sense*-Primer wurde das Startcodon weggelassen, da durch die Restriktion des pCMV-CHis-Vektors mit *NcoI* und

anschließendes Auffüllen zu glatten Enden mittels T4-DNA-Polymerase eine ATG-Sequenz entstand, die als Startcodon für die inserierten Gene verwendet werden konnte. Der *antisense*-Primer enthielt am 3'-Ende eine Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease, die ansonsten nur einmal in der MCS des pCMV-CHis-Vektors vorkam. Nach Durchführung der PCR wurden die entstandenen Produkte mit genau dieser Restriktionsendonuklease geschnitten und mittels DNA-Gelelektrophorese aufgetrennt.

PCR-Produkte mit der erwarteten Größe wurden aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und in die multiple Klonierstelle des pCMV-CHis-Expressionsvektors ligiert, nachdem dieser zuvor mit *NcoI* verdaut, mit T4-DNA-Polymerase behandelt und mit demselben Enzym wie das PCR-Produkt geschnitten worden war.

Die Bezeichnung und Länge der ORFs von EBV, die in dieser Arbeit in den Expressionsvektor pCMV-CHis kloniert und von diesem exprimiert wurden, sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt (**Tab. 3**). Die Proteine BALF5, BGLF5, BBLF4, BORF2, BFLF2, BXLF1 und BMLF1 gehören zu den *early lytic cycle proteins*, also denjenigen Proteinen, die bereits kurz nach Beginn des lytischen Zyklus exprimiert werden. Die Proteine BILF2 und BCRF1 gehören zu den *late lytic cycle proteins* und werden erst später während des lytischen Zyklus exprimiert.

Im Folgenden werden die untersuchten ORFs kurz in Hinblick auf bereits vorhandene Daten zu Funktion und Struktur skizziert, sowie deren Lage innerhalb des EBV-Genoms, die Leserichtung und die jeweilige Nukleotidsequenz dargestellt.

Bezeichnung	Länge des ORF (bp)
BALF5	3048
BGLF5	1413
BBLF4	2430
BORF2	2481
BFLF2	957
BILF2	747
BXLF1	1824
BMLF1	1317
BC-RF1	513

Tabelle 3: Offener Leserahmen der Gene für lytische EBV-Antigene, die in dieser Arbeit kloniert und exprimiert wurden

4.1.1 BALF5

Das BALF5-Protein wird von einem frühen (*early*) Gen kodiert und ist seiner Funktion nach die katalytische Untereinheit der EBV-DNA-Polymerase (Tsurumi et al., 1993). 1977 konnte diese durch ihre funktionelle Ähnlichkeit in experimenteller Inhibition und Stimulation mit anderen Herpesvirus-DNA-Polymerasen erstmals in einer Burkitt-Hybridzelllinie beschrieben werden (Miller et al., 1977). Ein Jahr später konnte sie aus einem Burkitt-Lymphom teilweise gereinigt und von zellulären DNA-Polymerasen getrennt werden (Allaudeen et al., 1978). 1984 wurde aus einer Burkitt-Lymphomzelllinie (P3HR-1) das gesamte Enzym mit einem Molekulargewicht von 185,000 aufgereinigt. Daraus wurde ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 110,000 isoliert, welches die katalytische Funktion der DNA-Polymerase besaß (Kallin et al., 1985). Das BALF5-Protein hat außer der DNA-Polymerase-Aktivität verschiedene weitere Funktionen. So verfügt es über eine DNA-Bindungsstelle, eine Nukleotid-Bindungsstelle und eine Bindungsstelle für Kalziumionen, die sämtlich für den Prozess der DNA-Replikation unabdingbar sind. Des Weiteren besitzt es eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität zum sofortigen Korrekturlesen der synthetisierten DNA. Die katalytische Untereinheit der EBV-DNA-Polymerase gehört zu einer Gruppe von sechs EBV-Proteinen, die gemeinsam die lytische Replikation von oriLyt aus initiieren können. Zu dieser Gruppe gehört neben dem BALF5-Protein auch das BMRF1-Protein, die akzessorische Untereinheit der EBV-DNA-Polymerase, die gemeinsam das EBV-DNA-Polymerase-Holoenzym bilden, sowie das BALF2-Protein (DNA-Einzelstrang-bindendes Protein) und die Bestandteile des Helikase-Primase-Komplexes, der aus BBLF4 (Helikase), BSLF1 (Primase) und BBLF2/3 (Primase-assoziiertes Faktor) besteht. Jeder der drei Komponenten des Helikase-Primase-Komplexes interagiert direkt mit der katalytischen Untereinheit der EBV-DNA-Polymerase (Fujii et al., 2000).

4.1.2 BGLF5

Das BGLF5-Protein ist eine alkalische Exonuklease, welche eine bedeutende Rolle in der viralen Replikation spielt. Es ist das Produkt eines *early* Gens des lytischen Replikationszyklus. Durch die Expression dieses Proteins kommt es durch BGLF5-induzierten mRNA-Abbau zu einer Beeinträchtigung der zellulären Proteinbiosynthese. Prinzip dieses sogenannten *host shutoff* ist die Sicherstellung der viralen Replikation unter Abschaltung sämtlicher Prozesse, die für die Abwehr der infizierten Zelle gegenüber dem infizierenden Agens notwendig sind. Konsequenz dieses Mechanismus ist eine Syntheseblockade von MHC-I- und MHC-II-Molekülen, die zu verminderten Spiegeln dieser

antigenpräsentierenden Komplexe auf der Oberfläche von lytisch EBV-infizierten Zellen führt. Dieser Effekt könnte dazu führen, dass EBV-infizierte Zellen im lytischen Zyklus der T-Zellerkennung und damit der Elimination entgehen, und es zu einer Ausbreitung der Infektion kommt (Rowe et al., 2007).

4.1.3 BBLF4

Das BBLF4-Protein ist eine DNA-Helikase. Helikasen haben die Aufgabe, bei der Verdopplung der DNA das Entwinden der DNA-Einzelstränge zu initiieren. Damit sind sie essentiell für die Replikation und die Vollendung des viralen Lebenszyklus. BBLF4 ist eines der drei Helikase-Primase-Replikationsproteine, das mit BSLF1 (DNA-Primase) und BBLF2/3 (Primase-assoziiertes Faktor) einen Komplex bildet und als solches zu den Proteinen gehört, die unabdingbar für die virale DNA-Replikation von oriLyt in der lytischen Replikationsphase sind (Fixman et al., 1992; Gao et al., 1998). BBLF4 interagiert direkt mit der katalytischen Untereinheit der EBV-DNA-Polymerase, dem BALF5-Protein (Fujii et al., 2000).

4.1.4 BORF2

Das BORF2-Protein ist die große alpha-Untereinheit der viralen Ribonukleotidreduktase (RNR), welche besonders für den Nukleotid-Transport und den Nukleotid-Metabolismus zuständig ist. Das korrespondierende Gen gehört zu den frühen (*early*) Genen des EBV. Generell gesehen hat die RNR die Aufgabe, Nukleotide in ihre jeweiligen Desoxynukleotide zu reduzieren. Damit katalysiert sie den letzten Schritt in der Synthese der DNA-Bausteine und stellt diese damit für die DNA-Synthese zur Verfügung. Anfang der 90er Jahre konnte gezeigt werden, dass Patienten mit NPC in etwa 2/3 der Fälle Antikörper gegen das BORF2-Protein aufwiesen (Ginsburg et al., 1990). Ergebnisse einer weiteren Studie ergaben, dass Antikörper nur bei Patienten mit NPC, nicht jedoch bei gesunden Individuen nachgewiesen werden konnten, was die Überlegung förderte, den Nachweis dieser Antikörper in die NPC-Diagnostik mit einzubeziehen (Gan et al., 1994).

4.1.5 BFLF2

Das BFLF2-Protein wurde als Homolog des HSV-Proteins UL31 (Herpes simplex Virus, HSV) identifiziert und wird von einem *early* Gen des EBV kodiert. Beim HSV ist UL31 gemeinsam mit UL34 in die ersten Schritte der Virusreifung an der Kernhülle der infizierten Zelle involviert. Dies ist wichtig für die Umhüllung des Viruspartikels an der inneren Kernmembran und für den Austritt des Viruspartikels aus dem Zellkern (Gonella et al., 2005). 2005 konnte gezeigt werden, dass BFRF1, das EBV-Homolog von UL34, tatsächlich wichtig für eine effiziente primäre Virusumhüllung ist. In 293T-Zellen, die mit einem BFRF1-defizienten EBV-Stamm infiziert worden waren, sammelten sich EBV-Nukleokapside im Zellkern entlang der Kernmembran. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass BFRF1 lediglich in reifenden intrazellulären Virionen nachweisbar ist, nicht jedoch in extrazellulären Virionen (Farina et al., 2005). Das BFLF2-Protein kann in Assoziation mit dem BFRF1-Protein an der Innenseite der Kernmembran einen Komplex mit einem Bestandteil der Kernmembran, dem Lamin B, bilden. Zudem erhöht die Koexpression von BFRF1 und BFLF2 die Effizienz der Virusreifung an der Kernmembran. Ebenso wie das BFRF1-Protein ist das BFLF2-Protein lediglich in intrazellulären Viruspartikeln vorhanden, in extrazellulären Viruspartikeln kann es nicht nachgewiesen werden (Gonella et al., 2005).

4.1.6 BILF2

Das *BILF2*-Gen gehört zu den späten (*late*) Genen (Chua et al., 2007). Es kodiert für gp78/54, ein Membranglykoprotein, das in der Hülle von EBV-Virionen nachgewiesen werden kann (Johannsen et al., 2004). Dieses Polypeptid hat ein Molekulargewicht von 28 kDa, und in der Mehrzahl der EBV-seropositiven Individuen lassen sich Antikörper gegen gp78/55 nachweisen (Mackett et al., 1990). Rta, das von einem *immediate early* Gen des EBV kodiert wird, reguliert die Reaktivierung der lytischen Replikation, indem es eine Kaskade der Transaktivierung von BILF2 und anderen lytischen Genen in Gang setzt (Chua et al., 2007).

4.1.7 BXLF1

Das BXLF1-Protein ist eine Thymidinkinase und gehört damit zur Gruppe der Desoxyribonukleosid-Kinasen (Phosphotransferasen), die die Phosphorylierung von Desoxyribonukleosiden zu den entsprechenden Monophosphaten (dNMPs) katalysieren. Die Thymidinkinase katalysiert die Reaktion von Desoxythymidin mit ATP zu dTMP, also die Umwandlung eines Nukleosids in ein Nukleotid. Diese Enzymgruppe ist nicht nur essentiell für die Wiederverwertung von Nukleosiden aus intrazellulär abgebauter DNA und zugeführter Nahrung, sondern ist auch von herausragender Wichtigkeit bei der Phosphorylierung von Nukleosid-Analogen, die zu therapeutischen Zwecken von Tumorerkrankungen und Virusinfektionen angewandt werden. Die Beobachtung, dass Nukleosid-Analoga einen antiviralen Effekt auf die EBV-Replikation ausübten, lies schon früh die Gegenwart einer viralen Thymidinkinase (TK)-Aktivität in EBV-positiven, TK-negativen Zellen vermuten (Ooka et al., 1983). Baer und Kollegen stellten eine begrenzte Homologie auf Aminosäurenniveau zwischen dem Thymidinkinase-Protein des Herpes simplex Virus-2 (HSV-2) und dem Genprodukt des *BXLF1*-Gens fest (Baer et al., 1984). Innerhalb des ORF des *BXLF1*-Gens existiert ein weiterer interner ORF, der an einem internen AUG-Startkodon beginnt und für eine Desoxythymidinkinase kodiert (Holton et al., 1996). Littler und Kollegen konnten auf genetischer, biochemischer und immunologischer Ebene beweisen, dass das Genprodukt BXLF1 einem Protein mit Thymidinkinaseaktivität entspricht und dem Analog von HSV-1 sehr ähnlich ist. Dieses Ergebnis rationalisiert den klinischen Einsatz zytotoxischer Nukleosidanaloga wie Acyclovir bei der Behandlung von EBV-Infektionen (Littler et al., 1986).

4.1.8 BMLF1

Die Transkription des ORF vom *BMLF1*-Gen führt zur Produktion verschiedener Proteine unterschiedlicher molekularer Größe (Marschall et al., 1989). Ein BMLF1/BSLF2-Fusionsprotein wird durch Spleißen generiert und auch EB2, Mta oder SM genannt. Es bewirkt den nukleären Export einer Reihe von frühen und späten viralen mRNAs und ist essentiell für die Produktion von infektiösen Virionen (Cook et al., 1994). Letztere wird mittels Phosphorylierung durch die Proteinkinase CK2 an einem oder mehreren Serinresten reguliert (Medina-Palazon et al., 2007). Darüber hinaus spielt es als transkriptioneller Transaktivator eine zentrale Rolle in der lytischen Replikationsphase. In Abwesenheit des BMLF1/BSLF2-Fusionsproteins können keine Viruspartikel produziert werden, da über 50%

der EBV-Gene nicht exprimiert werden. Unter anderen werden auch zwei essentielle Gene der frühen lytischen EBV DNA-Replikation, BSLF1 und BALF5, nicht exprimiert, die für die EBV DNA-Primase und die EBV DNA-Polymerase kodieren. Durch ektopen Ersatz der EBV-Primase und EBV-Polymerase konnte experimentell zwar die DNA-Replikation wieder hergestellt werden, die Produktion von Viruspartikeln vermochte dies jedoch nicht beeinflussen. Das BMLF1/BSFL2-Protein beeinflusst nicht nur die Expression der frühen EBV-Gene, sondern auch die Expression der späten EBV-Gene, wie z.B. VCA oder gp350, die für die Einhüllung der Virus-DNA in ein Kapsid und für die Infektion der Wirtszelle essentiell sind. Damit erfüllt das BMLF1/BSLF2-Fusionsprotein multiple Aufgaben in der lytischen Replikationsphase von EBV (Han et al., 2007).

4.1.9 BCRF1

Das *BCRF1*-Gen ist zu 84% homolog mit dem humanen *(h)IL-10*-Gen. IL-10 ist ein anti-inflammatorisches Zytokin, welches von T_H2-Zellen sowie Treg gebildet wird, die Makrophagenfunktion hemmt und somit überschießende Entzündungsreaktionen verhindert. Damit bewirkt dieses virale IL-10 (vIL-10) unter Umständen das Überleben des Virus in der Wirtszelle (Moore et al., 1990). vIL-10 wird erst spät im lytischen Replikationszyklus exprimiert und besitzt einige Eigenschaften des hIL-10 (Moore et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass BCRF1 die IFN- γ -Synthese von PBMC blockiert. IFN- γ wiederum ist bei Patienten mit AIM deutlich erhöht und spielt eine entscheidende Rolle beim Verlauf der EBV-Infektion (Swaminathan et al., 1993). Da rekombinantes BCRF1-Protein die Aktivität von IL-10 imitiert, wäre es möglich, dass das BCRF1-Protein eine Rolle bei der Interaktion des Virus mit dem Immunsystem des infizierten Organismus spielt (Hsu et al., 1990). vIL-10 kann die konstitutive und die IFN- γ -induzierte Expression von MHCII-Molekülen auf PBMC herunter regulieren. Ebenso vermag es die Expression von MHCI-Molekülen auf PBMC zu supprimieren. Da Makrophagen eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen spielen, erscheint es denkbar, dass Defekte ihrer APC-Funktion nach Infektion mit EBV einen bedeutenden Vorteil für die Vermehrung und die Persistenz des Virus im infizierten Individuum darstellt (Salek-Ardakani et al., 2002). vIL-10 hat zahlreiche weitere inhibitorische Effekte, z.B. auf proinflammatorische Zytokine Interleukin-12 (IL-12), Interleukin-18 (IL-18) und TNF- α sowie Chemokine (Moore et al., 2001).

4.2 Rekombinante Expression von lytischen EBV-Proteinen

Nach Transfektion der rekombinanten Expressionsvektoren in HEK 293-Zellen wurde eine Expression der inserierten Gene über den pCMV-Promotor induziert (**Abb. 10a – 18a**). Die rekombinanten Proteine wurden über den oben beschriebenen His-Tag (**Abb. 8**) mittels Nickel-Agarose-Kügelchen aufgereinigt und mit einer Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE unspezifisch sichtbar gemacht (**Abb. 9**). Mit einem Antikörper, der spezifisch gegen den His-Tag gerichtet war (Anti-His₆), wurden die rekombinanten Proteine anschließend im Western-Blot spezifisch nachgewiesen (**Abb. 10b – 18b**). Des Weiteren werden die Aminosäuresequenzen der beschriebenen Proteine gezeigt (**Abb. 10c – 18c**).

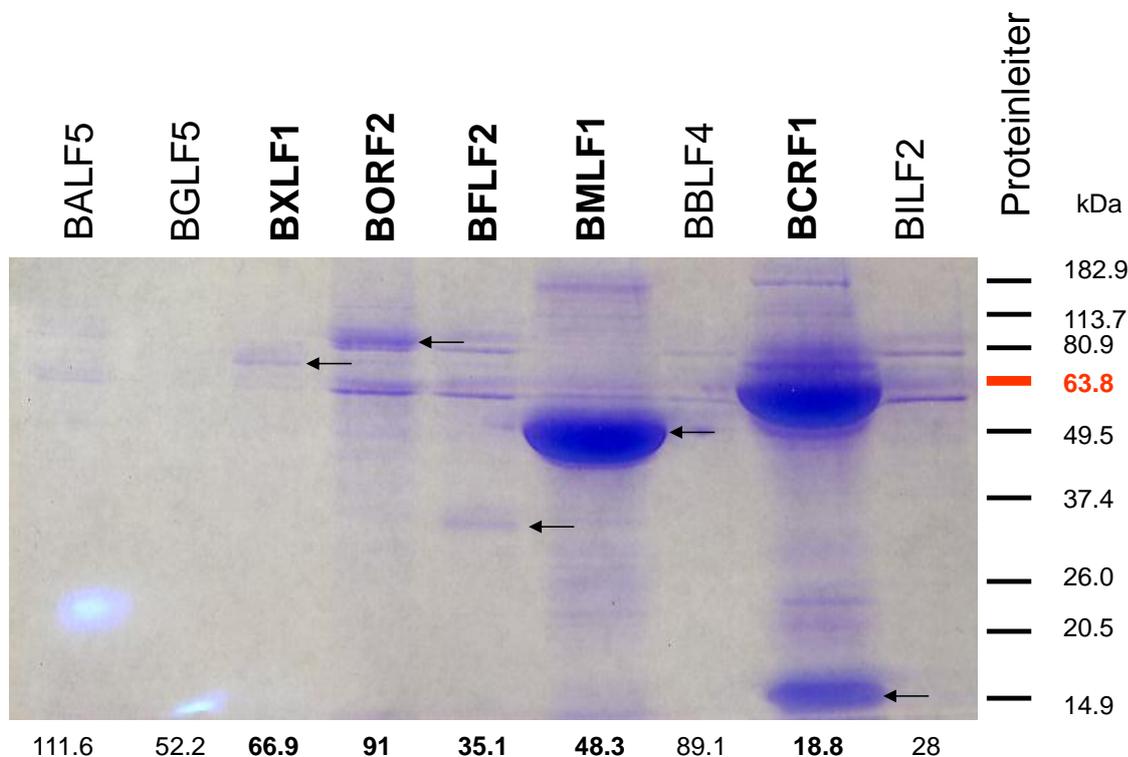


Abbildung 9: Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE der in dieser Arbeit untersuchten Proteine

Insgesamt sind fünf der neun Proteine bereits durch Coomassie-Färbung nachweisbar (BXLF1, BORF2, BFLF2, BMLF1, BCRF1; **fett gedruckt**). Die Signalstärke der Proteinbanden macht eine Aussage über die Proteinmenge. Die Proteinleiter läuft im Gel mit und ist der Richtwert für das Molekulargewicht der dargestellten Proteine.

Bei allen folgenden Western-Blots sind zusätzliche Banden zu sehen, die nicht erklärt werden. Es handelt sich vermutlich um Degradationsprodukte (wenn kleiner als erwartet) oder (wenn größer als erwartet) Dimere bzw. Multimere der Proteine, die durch Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken während der Aufreinigung entstanden sind.

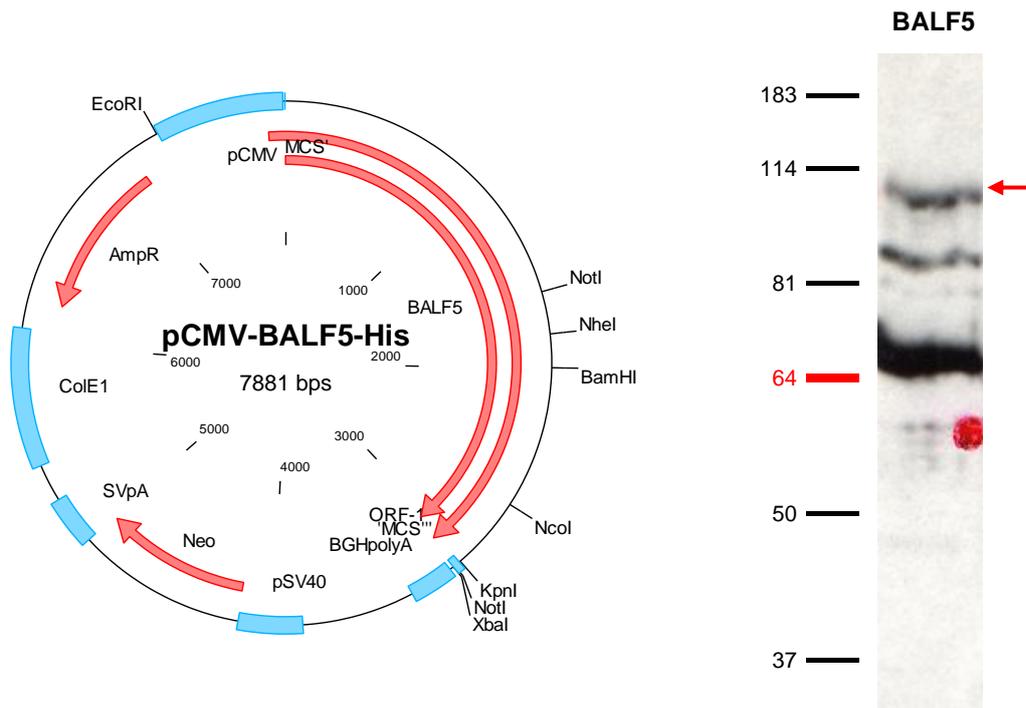


Abbildung 10a: Vektorkarte pCMV-BALF5-His

Abbildung 10b: BALF5 im Western-Blot

Das BALF5-Protein wird von 3044 Nukleotiden kodiert, besteht aus 1014 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von etwa 110 kDa. Der rote Punkt repräsentiert ein Artefakt.

```

MALQTD TQAWRVEIGTRGLMFSNCVPLHLPEGQYHKLRLPVSAYEALAVARYGLVGSLSWEVPAVNS
ALQCLAAAAPCKDVKIYPSCIFQVHAPMFVTIKTSLRCLNPHDLCLCLICVGAAILDIPLLCAPRDGAGA
RAAEGQAAAAQGGKLRVWGR LSPSSPTSLSLAFPYAGPPPVAWYRHSINLTRSEGVGIGKDCAQDH
ACPVPPQGHASSAADQAGVPERGRKRAHEGPGAGEAASAGRGDVALSQSRALLWRGLGWD TGRG
RLAPGLAMSRDAASGSVHLDIQVDRAEEGWVCDV LLEPGPPTAREGCSLSMDPGLVTLKDAWTLFPL
HPEHDAVVPKKEIHVMAQGH LQGGTPSLWGF TFEAACDQWVLRPRVWTAHSP IKMTVYNCGHK
PLHIGPSTR LGLALFWPAERSDNL DAGRIFYQLTSGELYWGR TVARPPTLTLPVDEL RPWPKL TPEEP
MQH

```

Abbildung 10c: BALF5 – Aminosäuresequenz

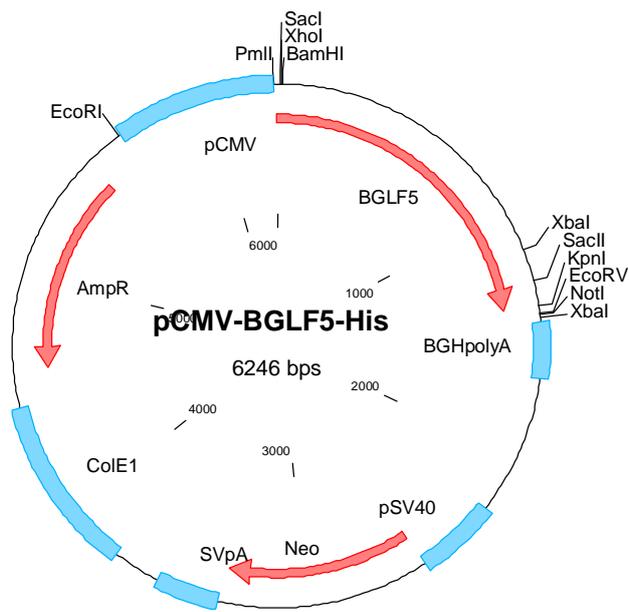


Abbildung 11a: Vektorkarte pCMV-BGLF5-His

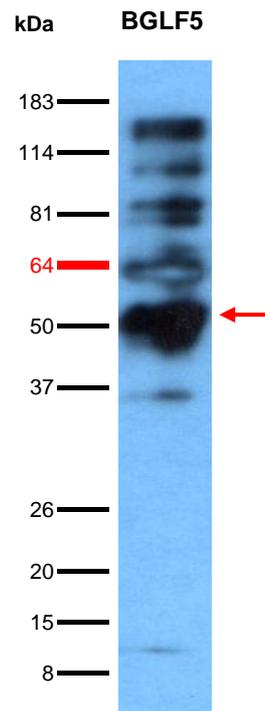


Abbildung 11b: BGLF5 im Western-Blot

Das BGLF5-Protein wird von 1423 Nukleotiden kodiert, besteht aus 474 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 52 kDa.

```

MADVDELEDPMEE MTSYTFARFLRSPETEAFVRNLD RPPQMPAMRFVYLYCLCKQIQEFSGETGFCD
FVSSLVQENDSKD GPSLKSIIYWGLQEATDEQRTVLC SYVESMTRGQSENLMWDILRNGIISSSKLLSTI
KNGPTKVFEPAPI STNHYFGGPVAFGLRCEDTVKDIVCK LICGDASANRQFGFMISPTDGIFGVSLDLC
VNVESQGDFILFT DRSCIYEIKCRFKYLFSKSEFDPI YPSYALYKRPCRSFIRFINSIARPTVEYVPDG
RLPSEG DYLLTQDEAWN LKDVRKRKLGPGHDLVADSLA ANRGVESMLYVMTDPSENAGRIGIKDRVP
VNIFINPRHNYFY QVLLQYKIVGDYVRHSGGGKPGRDCSP RVNIVTAFFRKRSP LDPATCTLGSDLLLD
ASVEIPVAVLVTP VVLPDSVIRKTLSTAAGSWKAYADNTFD TAPWVPSGLFADDESTP

```

Abbildung 11c: BGLF5 – Aminosäuresequenz

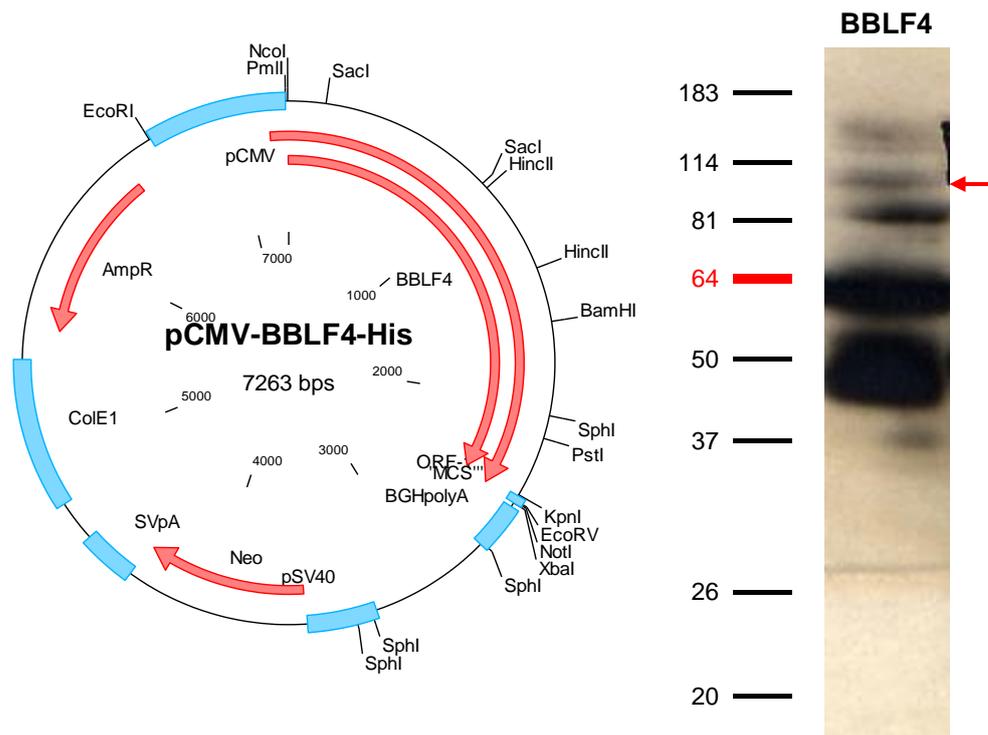


Abbildung 12a: Vektorkarte pCMV-BBLF4-His

Abbildung 12b: BBLF4 im Western-Blot

Das BBLF4-Protein wird von 2430 Nukleotiden kodiert, besteht aus 810 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von etwa 90 kDa.

MAEEPRAPEALSSTFMLNMTSDASVRRIVRRIGTLARRRVQQLPDMETFSPEFDPELSEPPFLPFSA
 YVITGTAGAGKSTSVSCLHHTMDCLVTGATTVAAQNLSQTLRAYCPTVYSAFGFKSRHINMTQRVSSH
 GRSTDAALEELQRRDLAKYWPVLSDIAAEFRRTKPRGLYSGVSGPAFEVLRDMHQGQLWTTNVIVVD
 EAGTLSVHILTAVVFCYWFFNAWLRTPLYRRGRIPCIVCVGSPTQTDAFQSSFSHETQVKNKIRECDNIL
 TFLVGNPRAATYVDVARNWALFINNKRCTDVQFGHLMKTLEYGLELSPDILAYVDRFVVPRAAIMDPA
 QYVGWTRLFLSHAEVKFTLTTLHATLKTAGQGAAARGTGGDGGGVMTFTCPVECEVFLDPLAQYKTL
 VGLPGLTAHTWLQKNYARLGNYSQFADQDMVPVGTQDEERVKVTYNVTYVKHSSVSVNCKTKKSI
 CGYTGTFGDFMDTLEADSFVEAHGHEQPEYVYSFLARLIYGGIYAFSHGGHSLCENGEYVAELGAVP
 LPGRTWDPEVTAGMELGELPLEVAWDGERSPAAVFYARVLAPPAANSAPLCSLLNIYNDLRAYFRQC
 LDVAVRYGGREFRDLPFCTFTNMLIRDNIEFTSDEPLLHGLLDYASTTENYTLLGYTHLNVFFGIRGK
 QPQDAGSSRMPRLMVKDEAGFVCCLEHNTNKLYETIEDKSLNLCISIRDYGISSKLAMTIKAQGLSL
 NKVAICFGSHRNIKPGHVYVALSRARHSNCVVMDRNPLSEMITGEGNPASGYVDALKNSRALLVY

Abbildung 12c: BBLF4 – Aminosäuresequenz

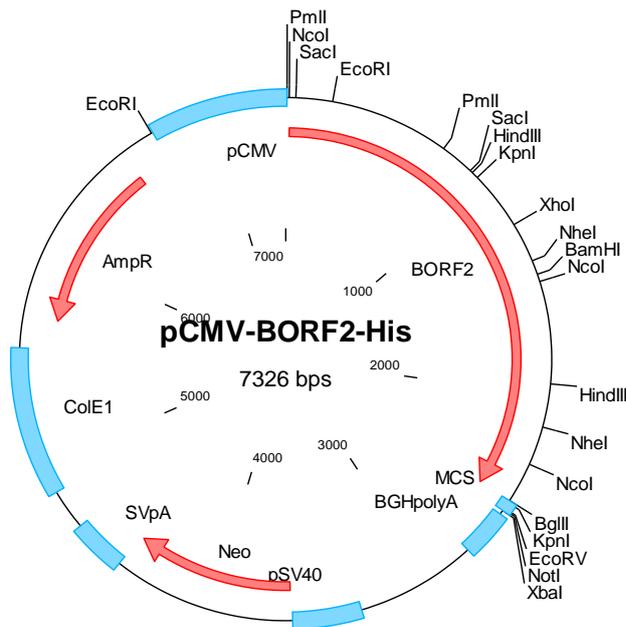


Abbildung 13a: Vektorkarte pCMV-BORF2-His

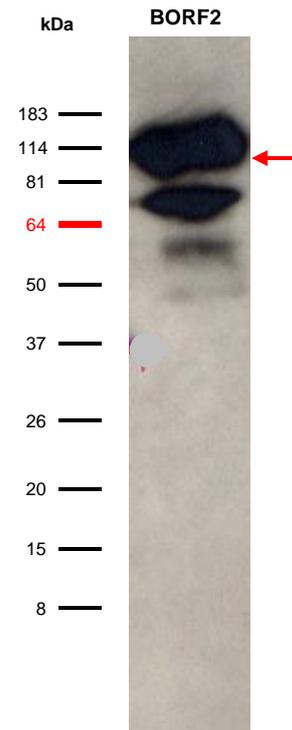


Abbildung 13b: BORF2 im Western-Blot

Das BORF2-Protein wird von 2481 Nukleotiden kodiert, besteht aus 827 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 91 kDa.

MATTSHVEHELLSKLIDELKVKANS DPEADVLAGRLLHRLKAESVTHHTVAEYLEVFSDFYDEEFFQM
 HRDELETRVSAFAQSPAYERIVSSGYLSALRYDYTYLYVGRSGKQESVQHFYMRLAGFCSTTCLYA
 GLRAALQRRARPEIESDMEVFDYYFEHLTSQTVCCSTPFMRFAGVENSTLASCILTPDLSSEWDVDTQA
 LYRHLGRYLFQRAGVGVGTGAGQDGKHISLLMRMINSHVEYHNYGCKRPVSVAAYMEPWHSQIFK
 FLETKL PENHERCPGIFTGLFVPELFFKLF RDTPWSDWYLFDPKDAGDLERLYGEEFEREYRLVTAG
 KFCGRVSIKSLMFSIVNCAVKAGSPFILLKEACNAHFWRDLQGEAMNAANLCAEVLQPSRKS VATCNL
 ANICLPRCLVNAPLAVRAQRADTQGDELLALPRLSVTLPGEGAVGDGFLARLRDATQCATFVVACS
 ILQGSPTYDSRDMASMG LGVQGLADV FADLGWQYTDPPSRSLNKEIFEHMYFTALCTSSLIGLHTRKI
 FPGFKQSKYAGGWFWHWDWAGTDL SIPREIWSRLSERIVRDGLFNSQFIALMPTSGCAQVTGCSDAF
 YPFYANASTKVTNKEEALRPNRSFWRHVRLDDREALNLVGGRRVSLPEALRQRYLRFQTAFDYNQE
 DLIQMSRDRAPFVDQSQSHSLFLREEDAARASTLANLLVRSYELGLKTIMYYCRIEKAADLGVMECKA
 SAALSVPREEQNERSPAEQMPPRPMEPAQVAGPVDIMSKGPGEGPGGWCVPGGLEVCYKYRQLFS
 EDDLLETGDFTERACESCQ

Abbildung 13c: BORF2 – Aminosäuresequenz

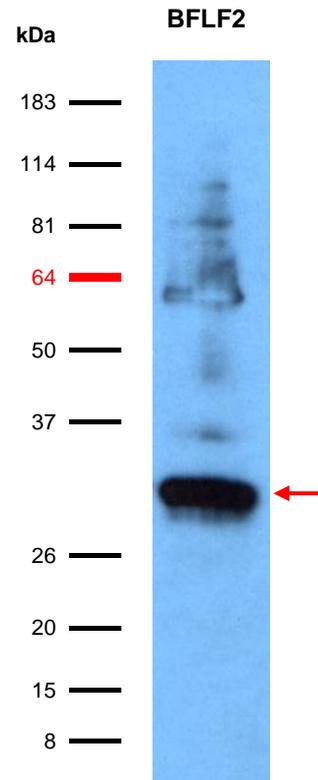
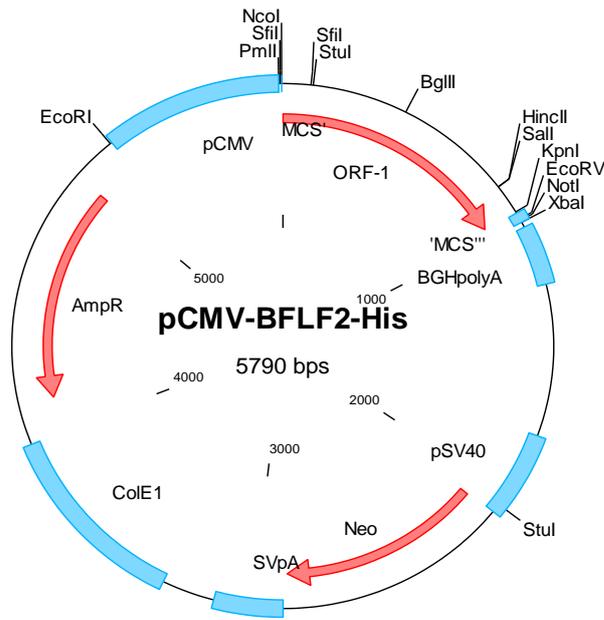


Abbildung 14a: Vektorkarte pCMV-BFLF2-His

Abbildung 14b: BFLF2 im Western-Blot

Das BFLF2-Protein wird von 957 Nukleotiden kodiert, besteht aus 319 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 35 kDa.

MAPVTPDAVNARQQRPADPALRRLMHPHHRNYTASKASAHSVKSVSRGKSRSELGRMERVGSVA
 RSICSRHTRHGVD RSHFSLRDFFRGISANFELGKDFLREMNTPIHVSEAVFLPLSLCTLSPGRCLRLSP
 FGHSLTLGSHCEICINRSQVHVPQEFSSSTQLSFFNNVHKIIPNKTFYVLLSSSPSAVKAGLSQP SLLYA
 YLVTGHFCGTICPIFSTNGKGRLLIMHLLLQGTSLHIPETCLKLLCENIGPTYELAVDLVGD AFCIKVSPRD
 TVYEKAVNVDEDAIYEAIKDLECGDELRLQIINYTQLILENKQ

Abbildung 14c: BFLF2 – Aminosäuresequenz

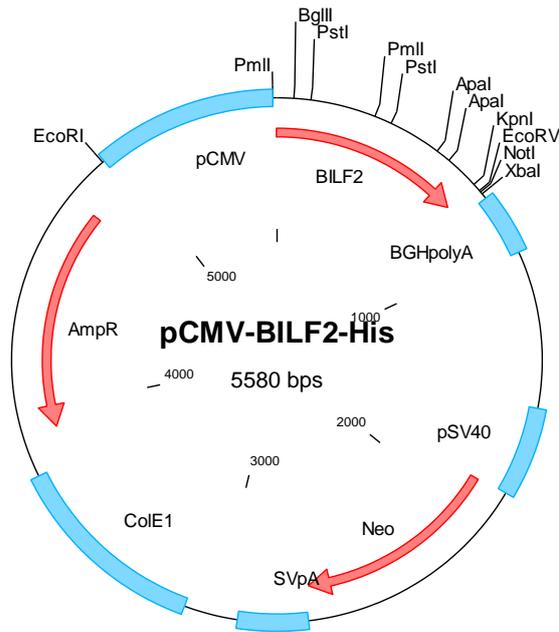


Abbildung 15a: Vektorkarte pCMV-BILF2-His

MTHLVLLLCCCVGVSVCFAFFSDLVKFENVTAHAGARVNLTCVSPSNESVSRIELGRGYTPGDGQLPLAV
 ATSNNGTHITNGGYNYSLTLEWVNSNTSVSLIIPNVTLAHAGYYTCNVTLRNCSVASGVHCNYSAGE
 EDDQYHANRRTLQRMHLTVIPATTIAPTTLVSHTTSTSHRPHRRPVSKRPVTHKPVTLGPFPIPWPKT
 TWVHWALLLITCAVVAPVLLIIISCLGWLAWGRRRKGWIPL

Abbildung 15b: BILF2 – Aminosäuresequenz

Das BILF2-Protein konnte im Western Blot nicht nachgewiesen werden. Es wird von einem 756 bp-langen ORF kodiert, besteht aus 248 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 28 kDa.

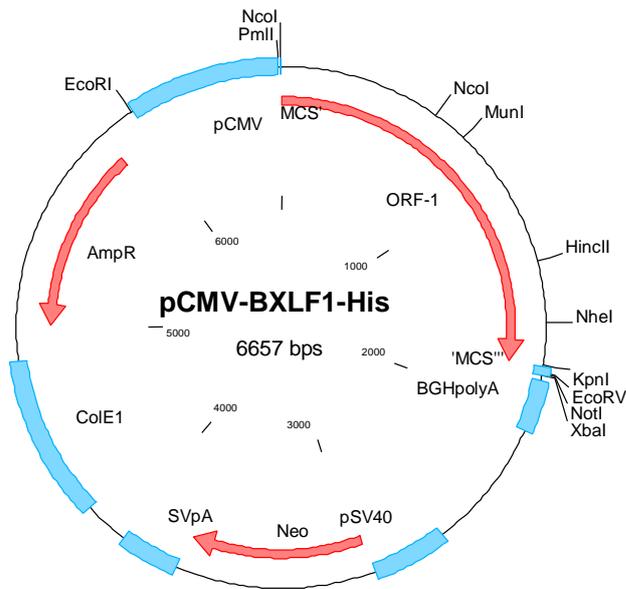


Abbildung 16a: Vektorkarte pCMV-BXLF1-His

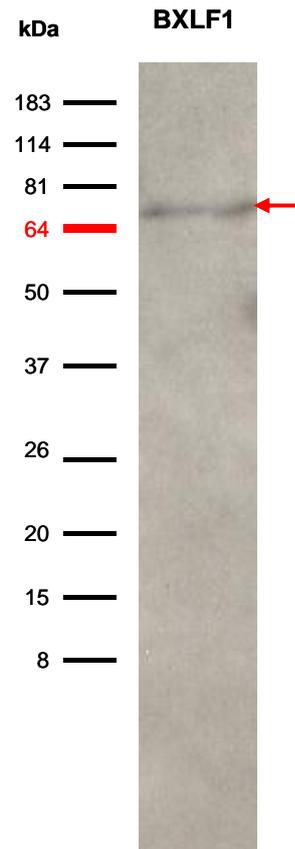


Abbildung 16b: BXLF1 im Western-Blot

Das BXLF1-Protein wird von 1824 Nukleotiden kodiert, besteht aus 608 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von etwa 67 kDa.

```

MAGFPGKEAGPPGGWRKCQEDESPENERHENFYAEIDDFAPSVLTPTGSDSGAGEEDDDGLYQVP
THWPPLMAPTGLSGERVPCRTQAAVTSNTGNSPGSRHTSCPFTLPRGAQPPAPAHQKPTAPTQKPR
SRECGPSKTPDPFSWFRKTCTEGGADSTSRFSMYQKGFEEGLAGLGLDDKSDCESEDESNFRRPS
SHSALKQKNGGKKGKPSGLFEHLAAHGREFSKLSKHAAQLKRLSGSVMNVLNLDDAQDTRQAKAQRK
ESMRVPIVTHLTNHVPVIKPA CSLFLEGAPGVGKTTMLNHLKAVFGDLTIVVPEPMRYWTHVYENAIKA
MHKNVTRARHGREDTSAEVLACQMKFTTTPFRVLASRKRSLLVTESGARSVAPLDCWILHDRHLLSAS
VVFPLMLLSQLLSYSDFIQVLATFTADPGDTIVWMKLNVEENMRRLKKRGRKHESGLDAGYLKSVND
AYHAVYCAWLLTQYFAPEDIVKVCAGLTTITTVCHQSHTPIIRSGVAEKLYKNSIFSVLKEVIQPFRA
VLLVCLAFTRTLAYLQFVLVDLSEFQDDLPGCWTEIYMQALKNPAIRSQFFDWAGLSKVISDFERN
RD

```

Abbildung 16c: BXLF1 – Aminosäuresequenz

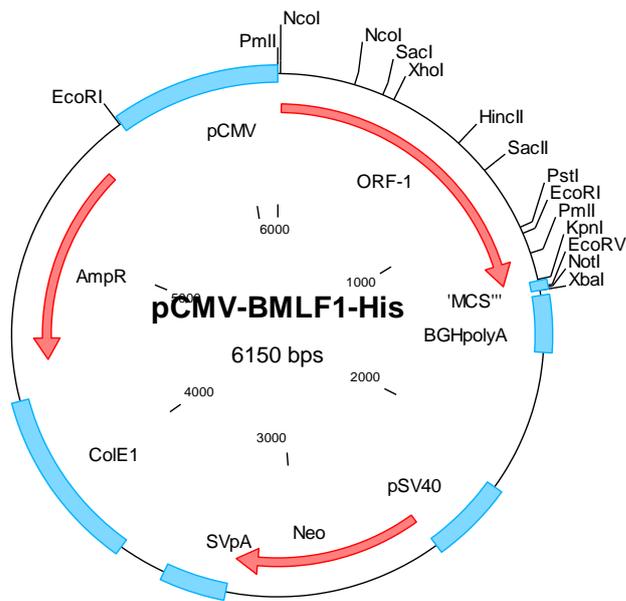


Abbildung 17a: Vektorkarte pCMV-BMLF1-His

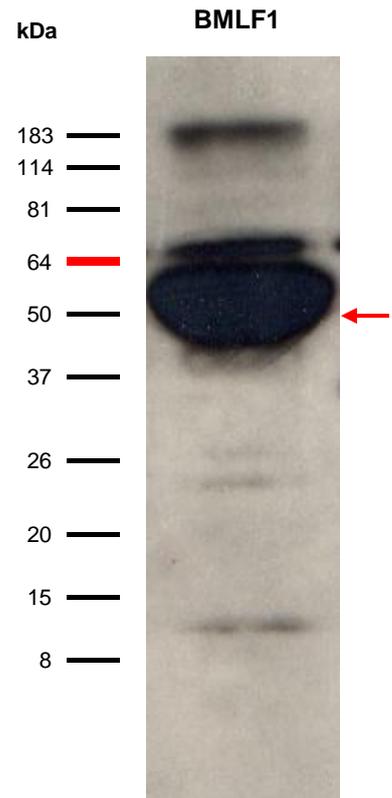


Abbildung 17b: BMLF1 im Western-Blot

Das BMLF1-Protein wird von 1317 Nukleotiden kodiert, besteht aus 439 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von etwa 50 kDa.

```

MEGSEEHSTDGEISSSEEEDEDPTPAHAIPARPSSVVITPTSASFVIPRKKWDLQDKTVTLHRSPLCRD
EDEKEETGNSSYTRGHKRRRGEVHGCTDESYGK
RRHLPPGARAPRAPRPRVPRAPRSPRAPRSNRATRGRPRSESRGAGRSTRKQARQERSQRPLPNK
PWFDMSLVKPVSKITFVTLPSPLASLTLEPIQDPFLQSM LAVA AHPEIGAW
QKVQPRHELRRSYKTLREFFTKSTNKDTWLDARMQAIQNAGLCTLVAMLEETIFWLQE
ITYHGDLPLAPAEDILLACAMSLSKVILTCLKELAPCF LPNTRDYNFVKQLFYITCAT
ARQNKVVETLSSSYVKQPLCLLAAYA AVAPAYINANCRRRHDEVEFLGHYIKNYNPGT

```

Abbildung 17c: BMLF1 – Aminosäuresequenz

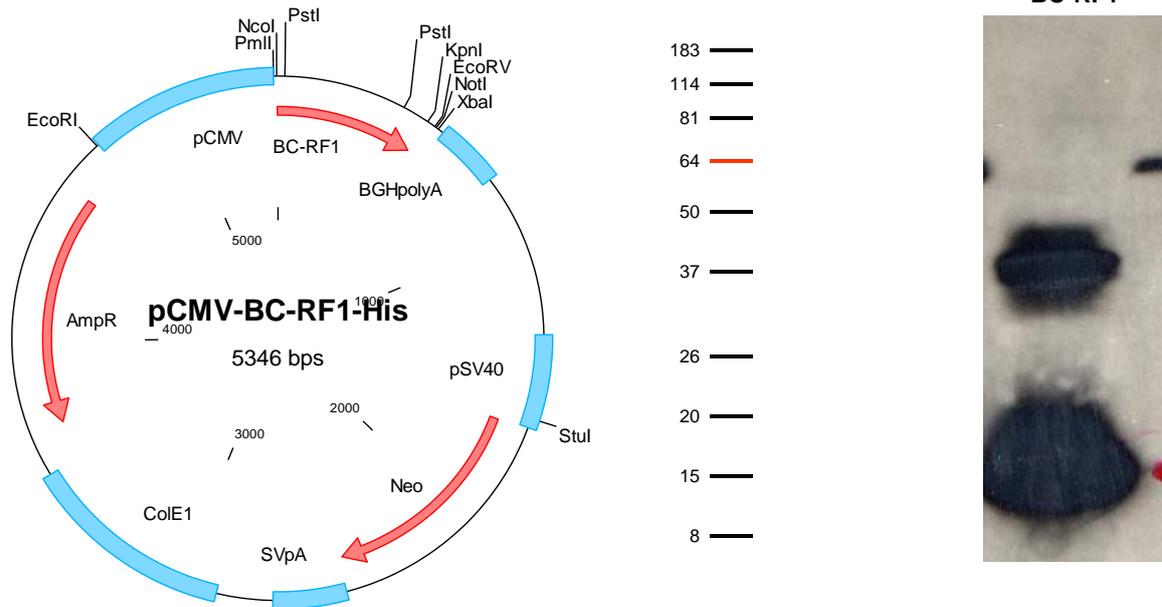


Abbildung 18a: Vektorkarte pCMV-BC-RF1-His

Abbildung 18b: BCRF1 im Western-Blot

Das BCRF1-Protein wird von 513 Nukleotiden kodiert, besteht aus 171 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 19 kDa.

MERRLVVTLQCLVLLYLAPECGGTDQCDNFPQMLRDLRDAFSRVKTFQTKDEVDNLLLKESLLEDFK
 GYLGCQALSEMIQFYLEEVPQAENQDPEAKDHVNSLGENLKTLLRRLRRCHRFLPCENKSKAVEQI
 KNAFNKLQEKGIIYKAMSEFDIFINYIEAYMTIKAR

Abbildung 18c: BCRF1 – Aminosäuresequenz

4.3 Generierung von EBV-Protein-spezifischen T-Zelllinien

Mit T-Zell-Assays sollte untersucht werden, ob im peripheren Blut eines seropositiven, gesunden Spenders CD4+ Gedächtnis-T-Zellen mit Spezifität für die untersuchten EBV-Antigene zirkulieren und durch gezielte Stimulation expandiert werden können. Zu diesem Zweck wurden CD4+ T-Zellen des gesunden Virusträgers JM zunächst durch regelmäßige Exposition gegenüber EBV-Antigen-beladenen, bestrahlten, autologen PBMC expandiert, und somit EBV-Antigen-spezifische T-Zelllinien generiert. Eine Stimulationspassage dauerte 14 Tage. In dieser Arbeit wurden jeweils zehn Stimulationspassagen durchgeführt. Nach etwa vier Stimulationspassagen war zu erwarten, dass die Hintergrundaktivität von unspezifisch stimulierten T-Zellen soweit abgenommen hatte, dass der antigenspezifische Anteil der T-Zelllinie erkennbar in den Vordergrund trat. Deshalb wurde nach vier Stimulationspassagen zum ersten Mal mittels eines ELISA die Zytokinsekretion der T-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen autologen Zielzellen analysiert (**Abb. 19**). Zu diesen Zielzellen zählten als Negativkontrolle autologe PBMC ohne Zusatz von Protein, autologe PBMC mit Zusatz von irrelevantem Protein und autologe mini-LCL, d.h. autologe B-Zellen, die mit dem replikationsdefizienten mini-EBV generiert worden waren und deshalb keine lytischen Antigene exprimierten. Außerdem wurden autologe LCL getestet, die potentiell das gesamte Spektrum an lytischen EBV-Proteinen exprimieren können.

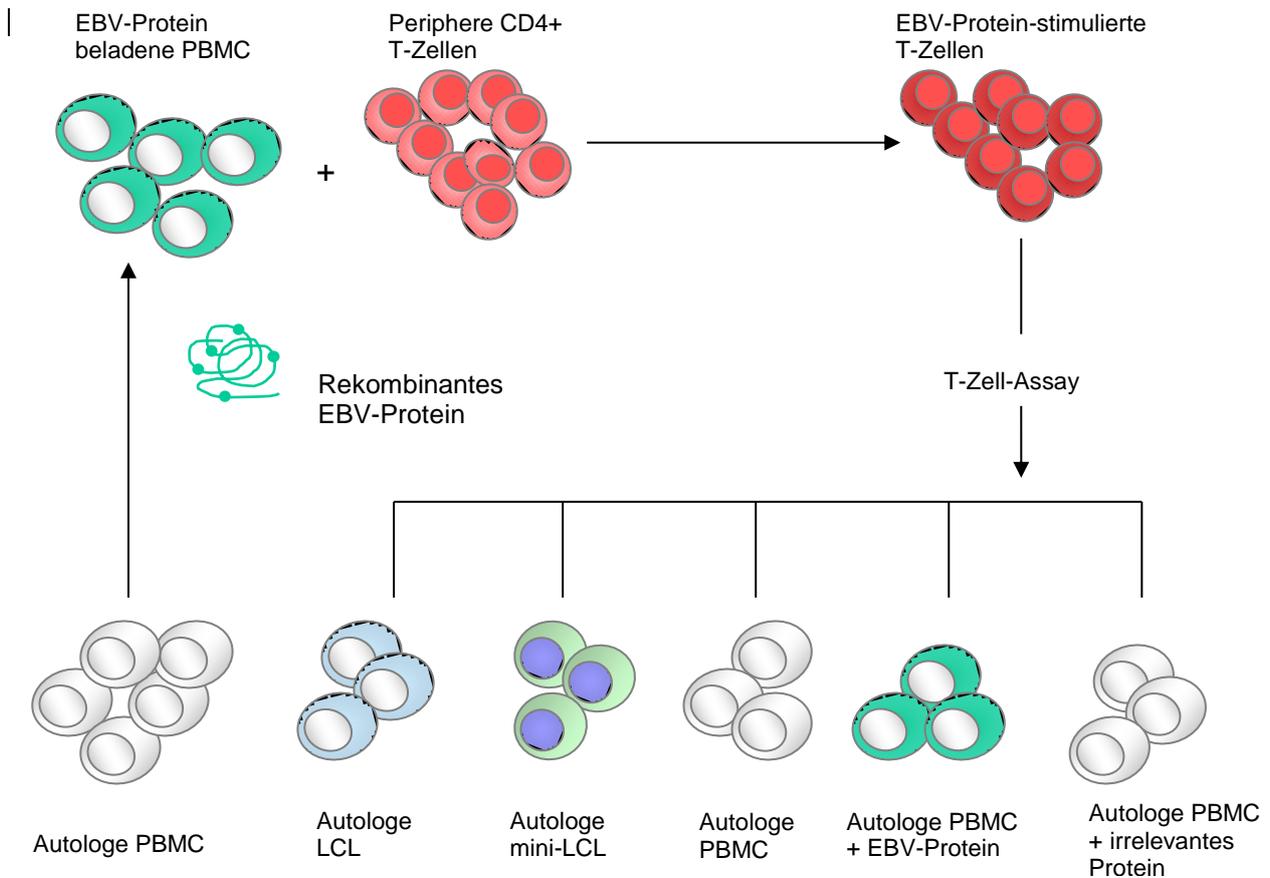


Abbildung 19: Experimentelle Strategie zur Generierung von T-Zelllinien mit Spezifität für lytische EBV-Proteine

Neun EBV-Kandidatenantigene des lytischen Zyklus wurden rekombinant in eukaryonten Zellen exprimiert, aufgereinigt und einzeln auf autologe PBMC geladen. Durch repetitive Stimulation mit den antigenbeladenen, autologen und bestrahlten PBMC wurden aus peripheren CD4+ T-Zellen eines gesunden Virusträgers potentiell antigenspezifische CD4+ T-Zelllinien expandiert. Ihre tatsächliche Spezifität wurde durch Zytokin-Sekretionsassays (GM-CSF- und $\text{IFN}\gamma$ -ELISA) mit verschiedenen Zielzellpopulationen dokumentiert. Zu diesen zählten antigenbeladene, autologe PBMC und LCL sowie als Negativkontrolle unbeladene bzw. Mit irrelevantem Protein (z.B. GFP) beladene, autologe PBMC und autologe mini-LCL, die keine lytischen EBV-Proteine exprimieren können.

Entsprechend dem Zytokinausschüttungsmuster bei Th1-Zellen wurden die T-Zelllinien in dieser Arbeit auf eine Ausschüttung von GM-CSF und $\text{IFN}\gamma$ überprüft. Bei der Analyse nach vier Passagen zeigte sich noch in keinem Falle ein Stimulatorantigen-spezifisches Reaktionsmuster, d.h. die getesteten T-Zellen reagierten auch auf unbeladene oder irrelevant beladenen PBMC sowie auf die streng latent infizierten autologen mini-LCL.

4.3.1 T-Zell-Assays mittels GM-CSF ELISA

Während der ersten sieben Stimulationspassagen wurden autologe PBMC als APC eingesetzt, und die Aktivierung der T-Zellen über ihre GM-CSF-Ausschüttung gemessen. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die GM-CSF-ELISAs chronologisch im Laufe der T-Zell-Stimulationen.

Nach vier *Stimulationspassagen* war noch bei keiner T-Zelllinie eine Spezifität für das relevante EBV-Protein zu erkennen. Die mit BALF5, BGLF5 und BBLF4 stimulierten Linien zeigten die höchste Reaktivität mit LCL, die übrigen Linien mit mini-LCL (**Abb. 20**).

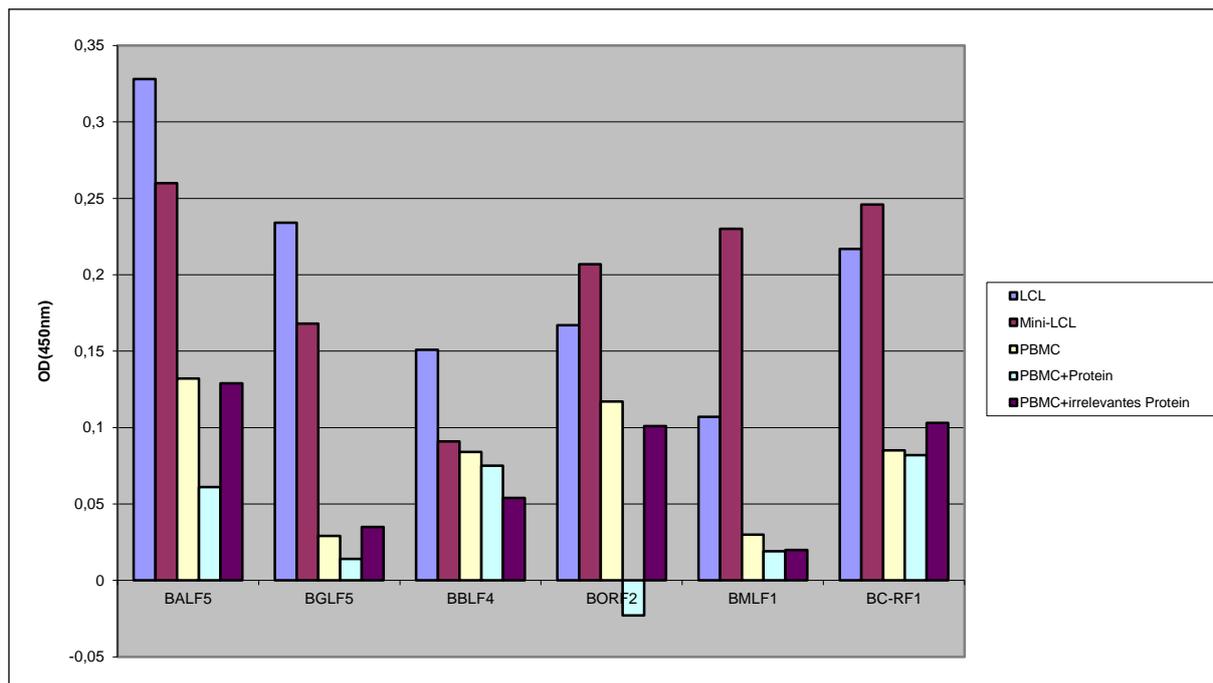


Abbildung 20: Passage 4 – GM-CSF-ELISA von EBV-Protein-spezifisch stimulierten CD4+ T-Zelllinien

Gezeigt ist das Ergebnis für sechs der neun angelegten T-Zelllinien nach vier Passagen. Eine Spezifität für die zur Stimulation eingesetzten Proteine (BALF4, BGLF5, BBLF4, BORF2, BMLF1 und BCRF1) war noch nicht zu erkennen.

Nach der *fünften Stimulationspassage* zeigten alle T-Zelllinien eine ungenügende Proliferation, was auf einen hohen Erythrozytengehalt der PBMC-Präparate zurückgeführt wurde, der sich toxisch auf die Lymphozyten auswirken kann. Es wurden deshalb exemplarisch nur die T-Zelllinien mit Spezifität für BXLF1, BORF2 und BFLF2 getestet (**Abb. 21**). Die mit BXLF1 stimulierte T-Zelllinie zeigte bereits eine deutliche, die mit BORF2 stimulierte T-Zelllinie eine angedeutete Spezifität für das Testantigen. Da die BXLF1 stimulierte Linie LCL etwas besser erkannte als mini-LCL, hatte BXLF1 eventuell zur LCL-Erkennung beigetragen. Dagegen war die mit BFLF2 stimulierte Linie nicht spezifisch für das

Testantigen und mit den EBV-positiven Zielzellen deutlich stärker reaktiv als mit allen PBMC. Letzteres ließ darauf schließen dass virale und/oder EBV-abhängige Autoantigene eine immundominante Rolle spielten.

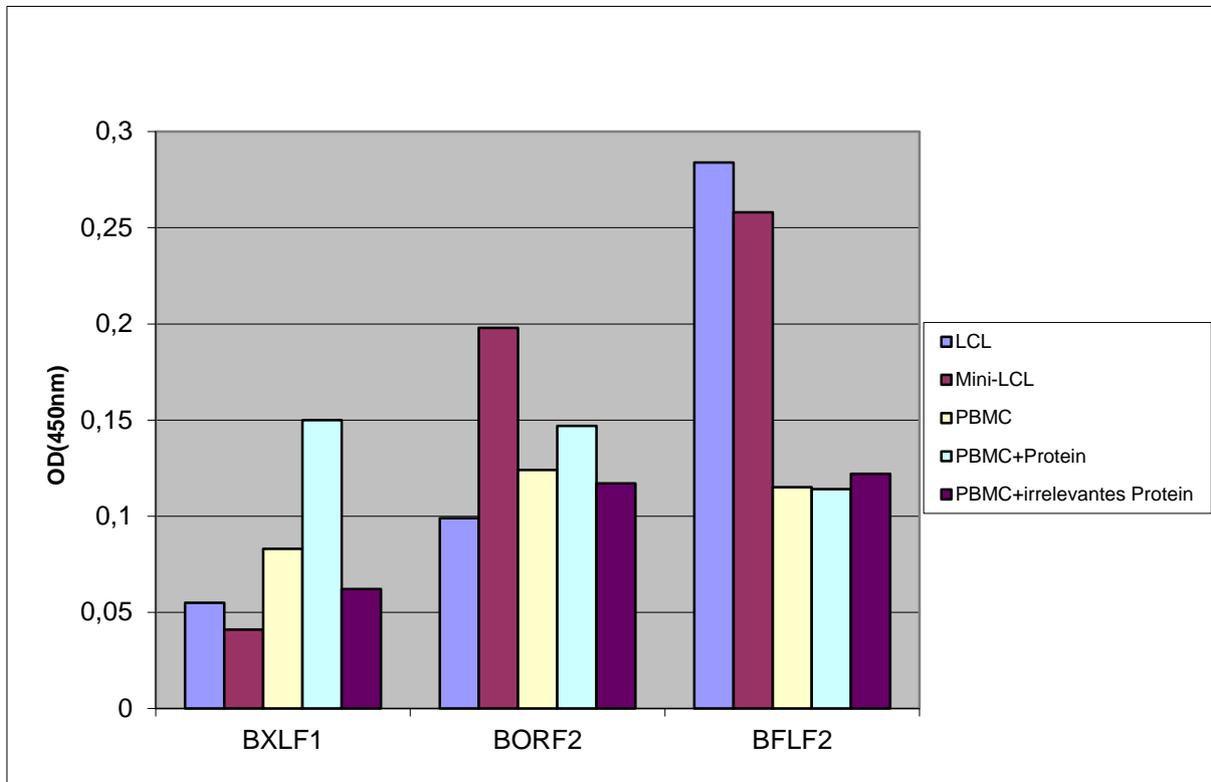


Abbildung 21: Passage 5 – GM-CSF-ELISA von EBV-Protein-spezifisch stimulierten CD4+ T-Zelllinien

Die mit BXLF1 stimulierte T-Zelllinie zeigte eine deutliche, die mit BORF2 stimulierte eine ange deutete Spezifität für das entsprechende Stimulatorprotein. Die mit BFLF2 stimulierte T-Zelllinie war nicht spezifisch für das Stimulatorantigen und reagierte mit den EBV-positiven Zielzellen deutlich stärker als mit allen PBMC.

Nach *sechs Stimulationspassagen* wurde die BXLF1-stimulierte T-Zelllinie zunehmend spezifischer für das Stimulatorantigen. Darüber hinaus ließen auch die mit BORF2, BFLF2 und BALF5 stimulierten T-Zelllinien eine beginnende Spezifität für das relevante Protein erkennen. Bemerkenswerterweise reagierten alle Linien, besonders ausgeprägt die BFLF2-stimulierte Linie, stärker mit LCL als mit mini-LCL, was nahelegte, dass das jeweils zur Stimulation eingesetzte lytische Antigen von LCL im Gegensatz zu mini-LCL präsentiert wurde (**Abb. 22**).

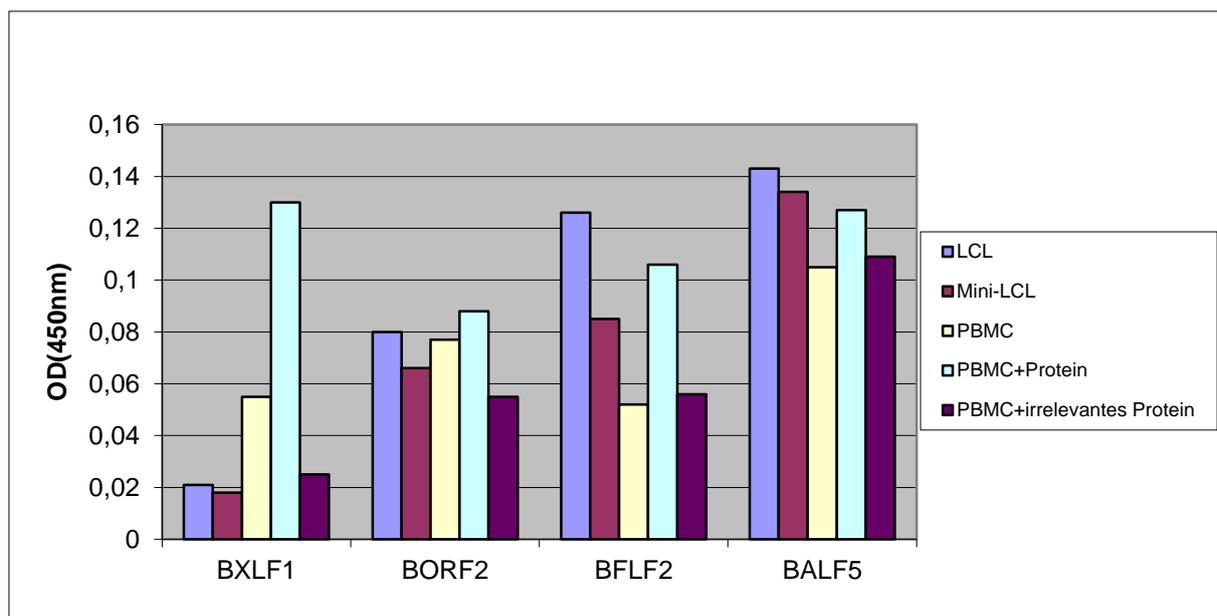


Abbildung 22: Passage 6 – GM-CSF-ELISA von EBV-Protein-spezifisch stimulierten CD4+ T-Zelllinien

Alle T-Zelllinien zeigten in den Analysen mit PBMC eine Spezifität für das entsprechende Stimulatorprotein. Bei den mit BORF2, BFLF2 und BALF5 stimulierten T-Zelllinien war jedoch immer noch eine ausgeprägte Hintergrundaktivität zu verzeichnen. Alle Linien reagierten stärker mit LCL als mit mini-LCL, was möglicherweise auf eine Erkennung des Testantigens auf den LCL zurückzuführen war.

Nach *sieben Stimulationspassagen* zeichneten sich unterschiedliche Reaktionsmuster ab, die man grob in vier Gruppen einteilen konnte. (i) Die mit BXLF1 oder BFLF2 stimulierten T-Zelllinien erkannten das Stimulatorantigen auf PBMC und reagierten mit LCL besser als mit mini-LCL, (ii) die mit BORF2 oder BMLF1 stimulierten T-Zelllinien zeigten zwar eine Antigenspezifität bei den PBMC-Analysen, erkannten aber LCL nicht besser als mini-LCL, (iii) die mit BGLF5 oder BBLF4 stimulierten T-Zelllinien boten nach sieben Passagen keine Spezifität für das relevante Protein, reagierten aber mit EBV-positiven besser als mit EBV-negativen Zielzellen, und (iv) die mit BALF5 stimulierte Linie zeigte keine eindeutige

Spezifität (**Abb. 23**). Somit hatten die BORF2 stimulierte Linie ihre vorzugweise LCL-Erkennung und die BALF5 stimulierte Linie ihre gesamte Antigen-spezifität verloren.

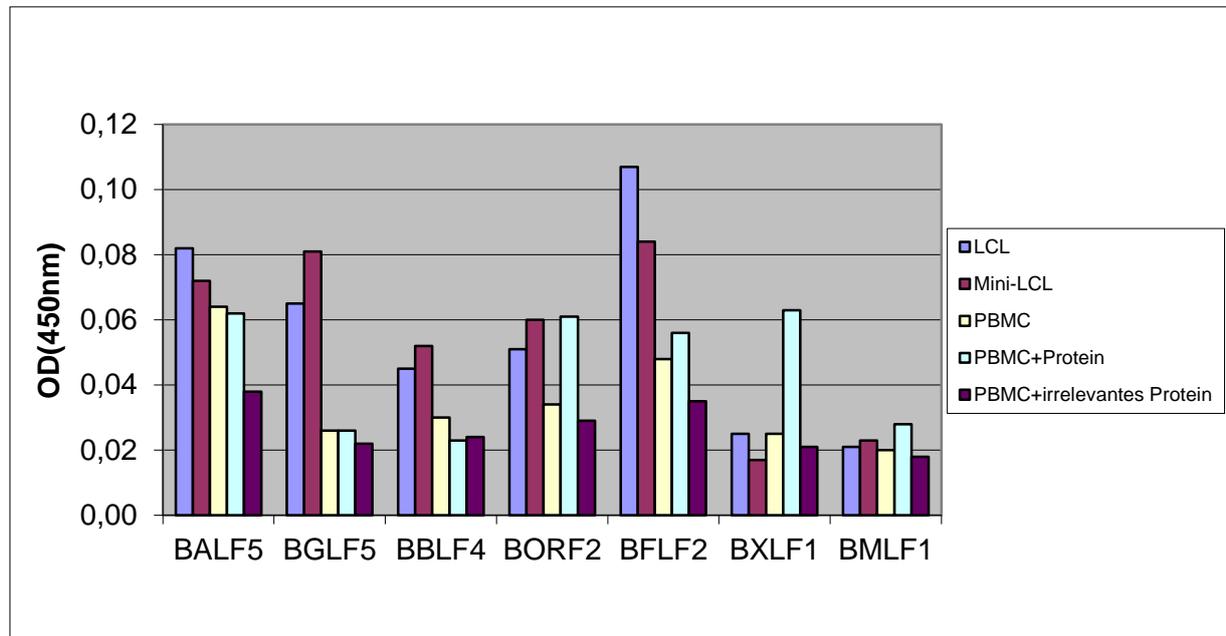


Abbildung 23: Passage 7 – GM-CSF-ELISA von EBV-Protein-spezifisch stimulierten CD4+ T-Zelllinien

Die T-Zelllinien zeigten unterschiedliche Reaktionsmuster, die man grob in vier Gruppen einteilen konnte. Die mit BXLF1 oder BFLF2 stimulierten T-Zelllinien wurden für die jeweiligen Stimulatorproteine spezifisch und erkannten LCL besser als mini-LCL. Dagegen reagierten die mit BORF2 oder BMLF1 stimulierten T-Zelllinien zwar antigenspezifisch mit PBMC, aber mit LCL schlechter als mit mini-LCL. Bei den T-Zelllinien, die mit BGLF5 oder BBLF4 stimuliert worden waren, war nach sieben Passagen keine Spezifität für das relevante Protein, aber eine bessere Reaktivität mit EBV-positiven als EBV-negativen Zielzellen zu erkennen. Dagegen wies die mit BALF5 stimulierte Linie keine eindeutige Spezifität auf.

4.3.2 T-Zell-Assays mittels Interferon- γ -ELISA

Nach der *siebten Stimulationspassage* führten wir auch IFN- γ -ELISAs durch, da diese insgesamt weniger Hintergrundaktivität erwarten ließen. Diese Assays zeigten für alle bis auf die BBLF4 stimulierte T-Zelllinien in den PBMC-Analysen eine klare Antigen-spezifität und in den Tests mit EBV-positiven Zellen eine bessere Reaktivität mit LCL als mit mini-LCL, wenn auch in etwas unterschiedlicher Ausprägung.

Somit war die im GM-CSF-Assay verloren geglaubte Antigen-spezifität der mit BALF5 stimulierten Linie wieder klar erkennbar, die Antigen-spezifität der mit BMLF1 stimulierten Linie kam wesentlich deutlicher als im GM-CSF-Assay zum Ausdruck, und eine bessere LCL als mini-LCL-Erkennung war für die BGLF5 und BMLF1 stimulierten Linien zu erkennen. Für die mit BGLF5 stimulierte Linie zeigte sich hier erstmals eine Antigen-spezifität. Nur die mit BBLF4 stimulierte Linie zeigte weiterhin keine Spezifität (**Abb. 24**).

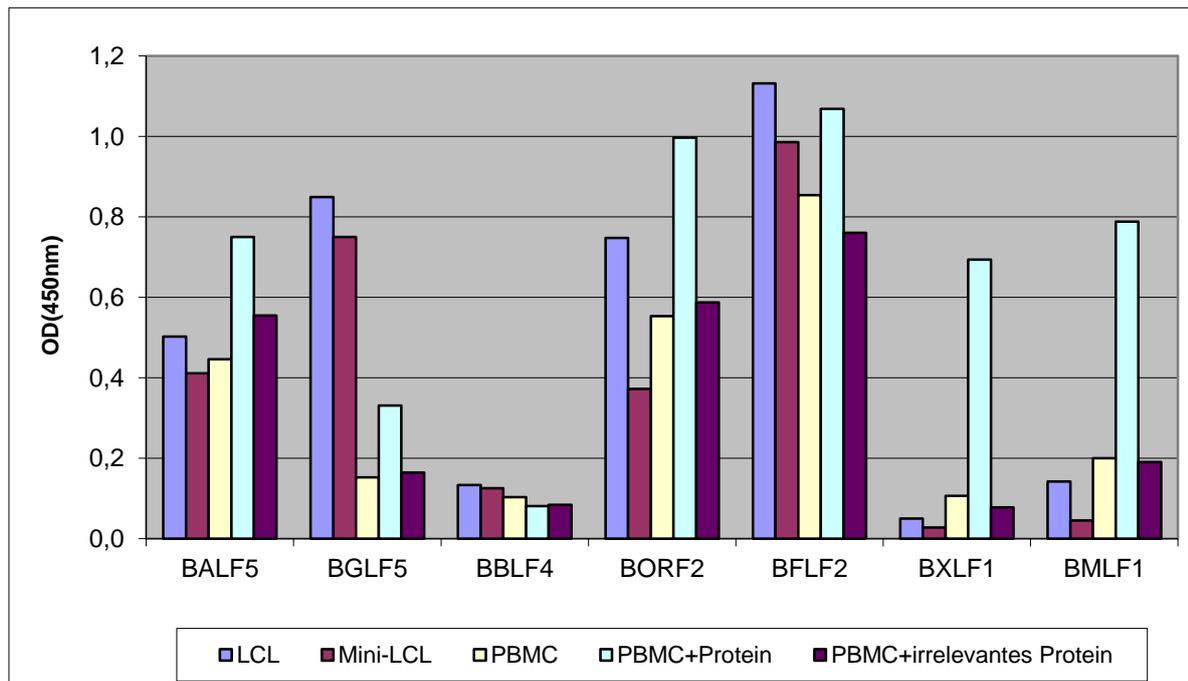


Abbildung 24: Passage 7 – IFN- γ -ELISA von EBV-Protein-spezifisch stimulierten CD4+ T-Zelllinien

Alle T-Zelllinien bis auf die mit BBLF4 stimulierte T-Zelllinie zeigten hier eine Reaktivität mit den spezifisch proteinbeladenen, nicht aber den unbeladenen oder irrelevant beladenen PBMC und waren somit antigenspezifisch. Darüber hinaus reagierten alle Linien stärker mit LCL als mit mini-LCL und erkannten somit eventuell das Stimulatorantigen auf den LCL. Die mit BBLF4 stimulierte Linie ließ weiterhin keine Antigen-spezifität erkennen.

Nach der *achten Stimulationspassage* blieben alle zuvor beobachteten Antigen-spezifitäten erhalten, und die antigenspezifischen Linien erkannten LCL besser als mini-LCL, lediglich bei der BGLF5 stimulierten Linie ließen sich eventuelle Unterschiede zwischen den beiden EBV-positiven Zielzellen wegen der hohen Reaktivität nicht mehr erfassen. In den mit BORF2 oder BXLF1 stimulierten Linien ließ sich ein besonders hoher Anteil antigenspezifischer Populationen feststellen.

Die vorbeschriebene unspezifische Reaktivität der BBLF4 stimulierten Linie blieb ebenfalls erhalten. Auch für die mit BILF2 stimulierte Linie zeigte sich weiterhin keine Antigen-spezifität.

Ein neues Reaktionsmuster zeigte sich für die mit BCRF1 stimulierte T-Zelllinie; sie reagierte mit allen unbeladenen oder irrelevant beladenen Zielzellen, nicht aber mit den BCRF1-beladenen Zielzellen. Das war am ehesten damit zu erklären, dass das IL-10-Homolog BCRF1 bekanntermaßen die IFN- γ -Sekretion sowie die Expression von MHCII und damit die MHCII-restringierte T-Zellerkennung inhibieren kann (**Abb. 25**).

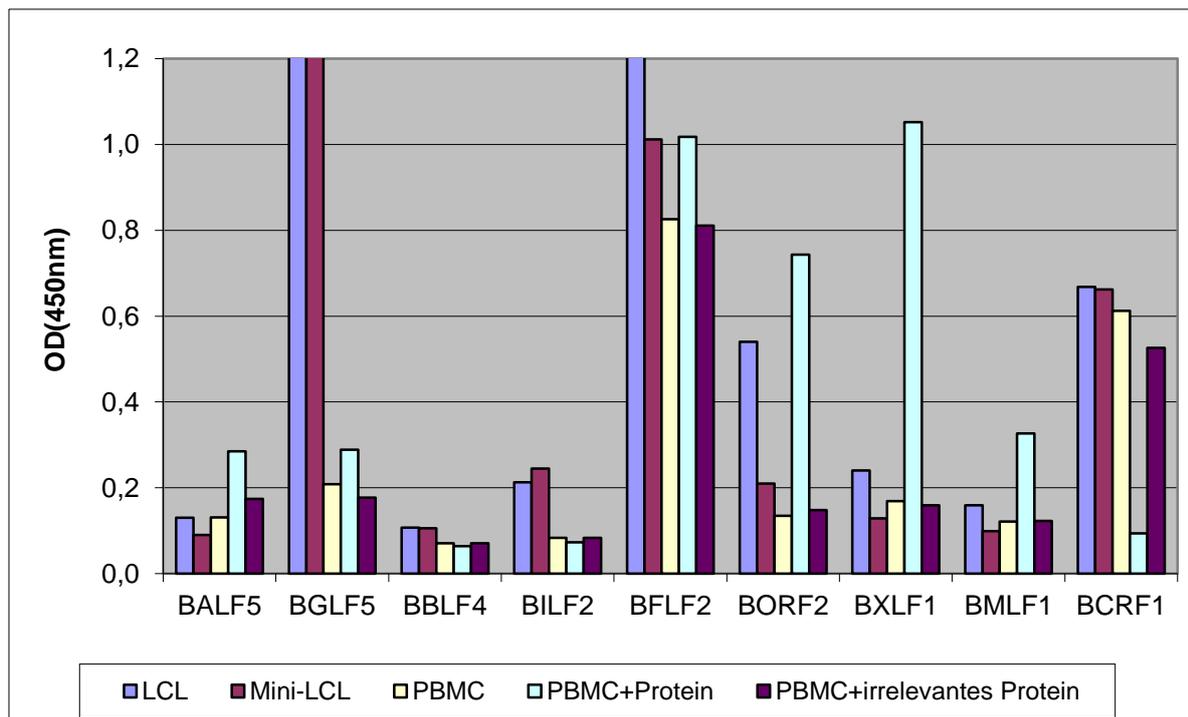


Abbildung 25: Passage 8 – IFN- γ -ELISA von EBV-Protein-spezifisch stimulierten CD4+ T-Zelllinien

Die mit BXLF1, BORF2, BFLF2, BALF5, BALF5 und BMLF1 stimulierten T-Zelllinien zeigten weiterhin eine antigenspezifische Reaktion in den Analysen mit PBMC, wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung. Die Antigen-spezifität war besonders ausgeprägt für die mit BXLF1, BORF2 und BMLF1 stimulierten Linien; diese Linien ließen auch eine deutlich stärkere Reaktivität mit LCL als mit mini-LCL erkennen. Keine Antigen-spezifität wiesen die mit BBLF4, BILF2 und BCRF1 stimulierten Linien auf, wobei das exogen zugeführte Antigen BCRF1 sogar einen negativen Effekt auslöste.

Für die neunte und zehnte Stimulationspassage wurden proteinbeladene mini-LCL anstelle der proteinbeladenen PBMC in die Zytokinassays eingesetzt, da die mini-LCL des Spenders im Gegensatz zu PBMC erstens unlimitiert verfügbar waren und zweitens nachweislich kein

IFN- γ produzierten (Mautner, persönliche Mitteilung). Aufgrund des Letzteren durfte weniger Hintergrundreaktivität im IFN- γ -ELISA erwarten werden.

Nach der *neunten Stimulationspassage* zeigte jedoch nur noch die BMLF1 stimulierte T-Zelllinie eine eindeutige Spezifität für das relevante Protein, die Erkennung von LCL war der von mini-LCL nicht mehr überlegen. Eine angedeutete Antigen-spezifität war auch für die mit BALF5 und BGLF5 stimulierten Linien zu erkennen, bei BALF5 auch kombiniert mit einer etwas besseren Erkennung von LCL verglichen mini-LCL. In der mit BBLF4 stimulierten Linie war erstmal eine kleine antigenspezifische Population zu vermuten. Alle anderen Linien zeigten in diesen Analysen keine Spezifität für das Stimulatorantigen (**Abb. 26**).

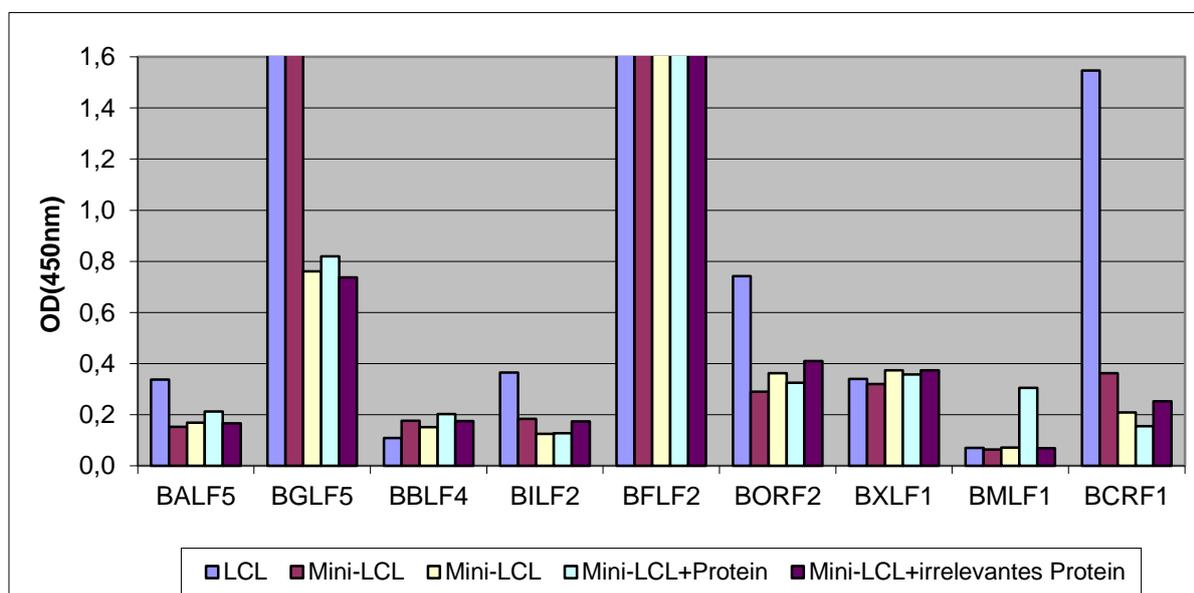


Abbildung 26: Passage 9 – IFN- γ -ELISA von EBV-Protein-spezifisch stimulierten CD4+ T-Zelllinien

Nach der *neunten Stimulationspassage* zeigte nur die BMLF1-stimulierte T-Zelllinie eine eindeutige Spezifität für das relevante Protein, allerdings wurden LCL nicht mehr besser als mini-LCL erkannt. Eine angedeutete Antigen-spezifität war auch für die mit BALF5 und BGLF5 stimulierten Linien zu erkennen, bei BALF5 kombiniert mit einer etwas besseren Erkennung von LCL verglichen mit mini-LCL. In der mit BBLF4 stimulierten Linie war erstmal fraglich eine kleine antigenspezifische Population zu erkennen. Alle anderen Linien zeigten keine Spezifität für das Stimulatorprotein.

Nach der *zehnten Stimulationspassage* zeigte von allen in früheren Passagen antigenspezifisch reagierenden Linien nur noch die mit BMLF1 stimulierte T-Zelllinie eine angedeutete Spezifität für das relevante Protein. Die mit BILF2 stimulierte Linie zeigte allerdings hier erstmal eine fragliche Antigen-spezifität. Somit hatten die beiden zusätzlichen

Stimulationsrunden erste Hinweise darauf geliefert, dass wahrscheinlich auch für BBLF4 bzw. BILF2 eine kleine spezifische CD4+ Gedächtniszellpopulation in gesunden Virusträgern existiert.

Die Tatsache, dass sich die Antigen-spezifität der T-Zelllinien nach Wechsel der Zielzellen von PBMC auf mini-LCL und weiterer Passagierung schlechter darstellen ließ, könnte ein Hinweis darauf sein, dass in den T-Zelllinien ein großer Anteil autoreaktiver T-Zellen präsent war, der mit Autoantigenen reagierte, welche von mini-LCL deutlich besser als von PBMC exprimiert oder präsentiert worden waren. Alternativ war es möglich, dass autoreaktive T-Zellen die Testantigen-spezifischen T-Zellen nach erneuter Stimulation überwachsen hatten.

In jedem Falle legten die Ergebnisse insgesamt nahe, dass für alle untersuchten frühen lytischen Antigene sowie für das Strukturantigen BILF2 spezifische CD4+ Gedächtniszellen aus dem peripheren Blut gesunder Virusträger zirkulieren (**Abb. 27**).

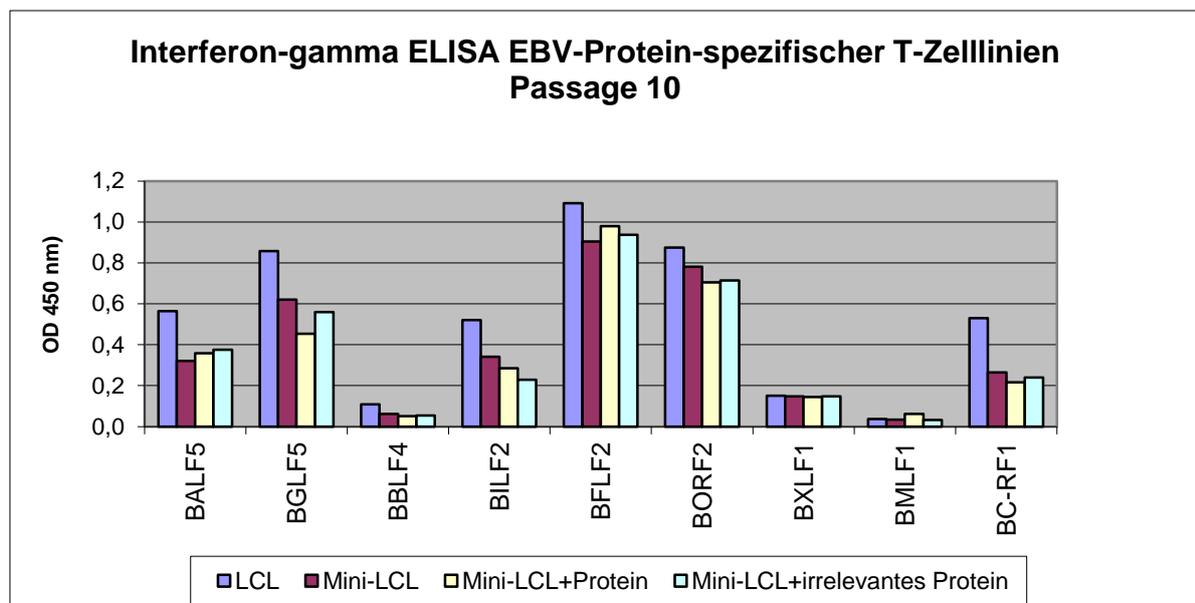


Abbildung 27: Passage 10 – IFN- γ -ELISA von EBV-Protein-spezifisch stimulierten CD4+ T-Zelllinien

Nach zehnten Stimulationspassage zeigten die mit BXLF1, BORF2, BFLF2, BALF5, BGLF5 oder BBLF4 stimulierten Linien keine Antigen-spezifität mehr. Allein die mit BMLF1 stimulierte Linie ließ noch eine schwache Antigen-spezifität erkennen. Neu erkennbar war eine schwache Antigen-spezifität der mit BILF2 stimulierten Linie, die auch LCL besser erkannte als mini-LCL. Die negative Wirkung des rekombinanten BCRF1 war in diesen Analysen weniger deutlich ausgeprägt.

Das Ergebnis der T-Zellassays nach fünf bis zehn Stimulationen findet sich in **Tab. 4** zusammengefaßt.

Passage	Zielzellen	Zytokin	BXLF1	BORF2	BFLF2	BALF5	BGLF5	BBLF4	BMLF1	BCRF1	BILF2
5	PBMC	GM-CSF	A +	A +	A -	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			L +	L -	L -	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6	PBMC	GM-CSF	A +	A +	A +	A +	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			L +	L +	L +	L +	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
7	PBMC	GM-CSF	A +	A +	A +	A -	A -	A -	A +	n.d.	n.d.
			L +	L -	L +	L -	L -	L -	L -	n.d.	n.d.
7.	PBMC	IFN- γ	A +	A +	A +	A +	A +	A -	A +	n.d.	n.d.
			L +	L +	L +	L +	L +	L -	L +	n.d.	n.d.
8	PBMC	IFN- γ	A +	A +	A +	A +	A +	A -	A +	A -	A -
			L +	L +	L +	L +	L ?	L -	L +	L -	L -
9	mini-LCL	IFN- γ	A -	A -	A ?	A +	A +	A +	A +	A -	A -
			L -	L -	L ?	L -	L -	L -	L -	L -	L -
10	mini-LCL	IFN- γ	A -	A -	A -	A -	A -	A -	A +	A -	A +
			L -	L -	L -	L -	L -	L -	L -	L -	L -
Klone	mini-LCL	IFN- γ	A -	A +		A -			A +		
			L -	L +		L -			L -		

Tabelle 4: Ergebnis der T-Zellassays

Gezeigt ist das Ergebnis der T-Zellassays nach antigenspezifischer Stimulation (Passage 5 bis 10) bzw. nach *limiting dilution* und PHA-Stimulation. PBMC bzw. mini-LCL: eingesetzte Zielzellpopulation. GM-CSF bzw. IFN- γ : gemessenes Zytokin. A +/-: Die antigenbeladenen Testzellen werden besser/nicht besser erkannt als ihre unbeladene oder irrelevant beladene Kontrolle. L +/-: LCL werden besser/nicht besser erkannt als mini-LCL.

4.4 Einzelzellklonierung und funktionelle Analyse

Um die spezifisch mit rekombinantem Antigen reaktiven T-Zellen genauer charakterisieren zu können, vereinzelteten wir diese mit Hilfe des *limiting dilution* Verfahrens und testeten die generierten Klone im IFN- γ -ELISA. Dabei wurden zwei verschiedene Verdünnungsansätze durchgeführt: in einem Ansatz befand sich rechnerisch im Mittel eine Zelle pro Loch einer 96 Mikrotiterplatte und in dem anderen Ansatz im Mittel drei Zellen pro Loch. Die ausgesäten Zellen wurden im Folgenden mit Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert. Die auswachsenden

Zellpopulationen werden im Folgenden Klone genannt, ohne dass Ihre Klonalität durch Analyse der T-Zellrezeptor-V β -Ketten gesichert wurde. Die *limiting dilution* Klonierung wurde in der siebten Stimulationspassage aus Linien unternommen, die mit BXLF1, BMLF1, BORF2 und BALF5 stimuliert worden waren, und zu diesem Zeitpunkt im IFN- γ -Assay spezifisch mit dem Stimulatorprotein und besser mit LCL als mit mini-LCL reagiert hatten (vgl. **Abb. 24**).

4.4.1 Klone aus den mit BXLF1- oder BALF5 stimulierten CD4+ T-Zelllinien

Die Klone aus den mit BXLF1- oder BALF5 stimulierten und in der siebten Passage im IFN- γ -Assay mit PBMC deutlich antigenspezifischen T-Zelllinien zeigten in dem PBMC-freien Test keine Antigenspezifität mehr. Sie reagierten offensichtlich wie die weiter propagierten Linien in erster Linie mit zellulären Autoantigenen, die von den EBV-positiven Zielzellen effizient präsentiert wurden. Mit proteinbeladenen und unbeladenen PBMC wurden diese Klone noch nicht getestet (**Abb. 28**).

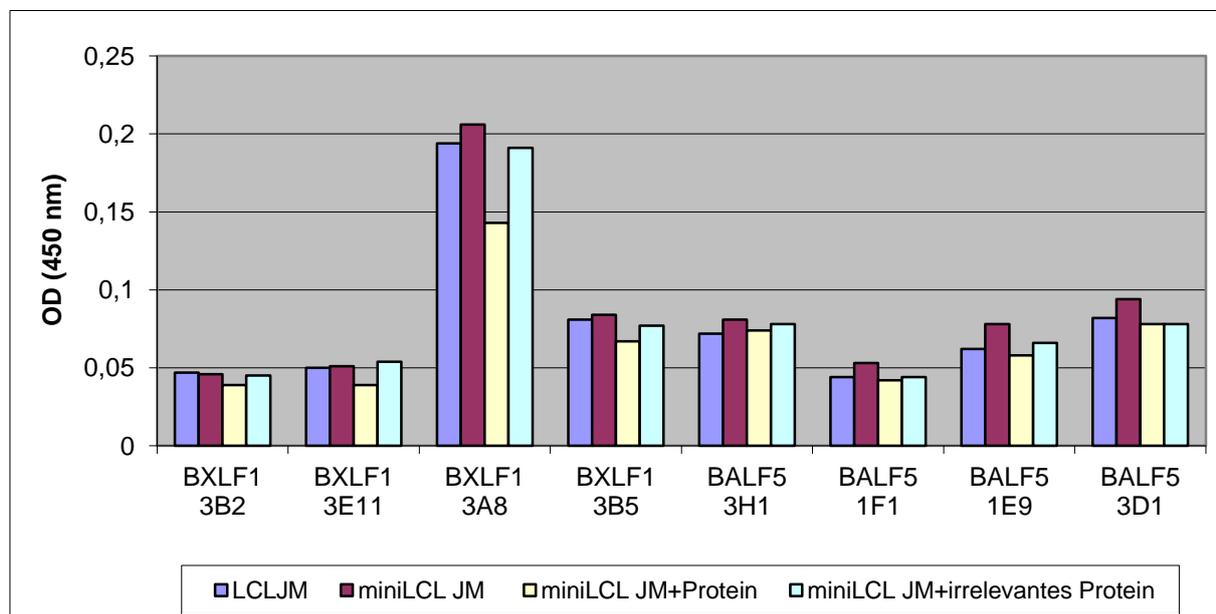


Abbildung 28: IFN- γ -ELISA von Klonen aus BXLF1- oder BALF5 stimulierten CD4+ T-Zelllinien

Alle acht Klone zeigen eine unterschiedlich ausgeprägte, Testantigen-unabhängige Autoreaktivität.

4.4.2 Klone aus den mit BMLF1- oder BORF2 stimulierten CD4+ T-Zelllinien

Der Klon aus der mit BMLF1 stimulierten CD4+ T-Zelllinie zeigte dieselbe Spezifität wie die Ursprungszelllinie. Er reagierte wie die ursprüngliche T-Zelllinie in den mini-LCL-Analysen antigenspezifisch und zeigte keine bessere Erkennung von LCL verglichen mit mini-LCL. Das sprach dafür, dass BMLF1 hier nicht effizient von LCL präsentiert wurde (**Abb. 29**).

Aus der mit BORF2 stimulierten CD4+ T-Zelllinie wurden ausschließlich Klone generiert, die wie die Ursprungszelllinie nicht nur eine eindeutige Antigenpezifität in den mini-LCL-Analysen aufwies, sondern auch mit LCL wesentlich stärker als mit mini-LCL reagierte. Dies legte nahe, dass BORF2 auf LCL effizient an die spezifischen T-Zellen präsentiert worden war (**Abb. 30**).

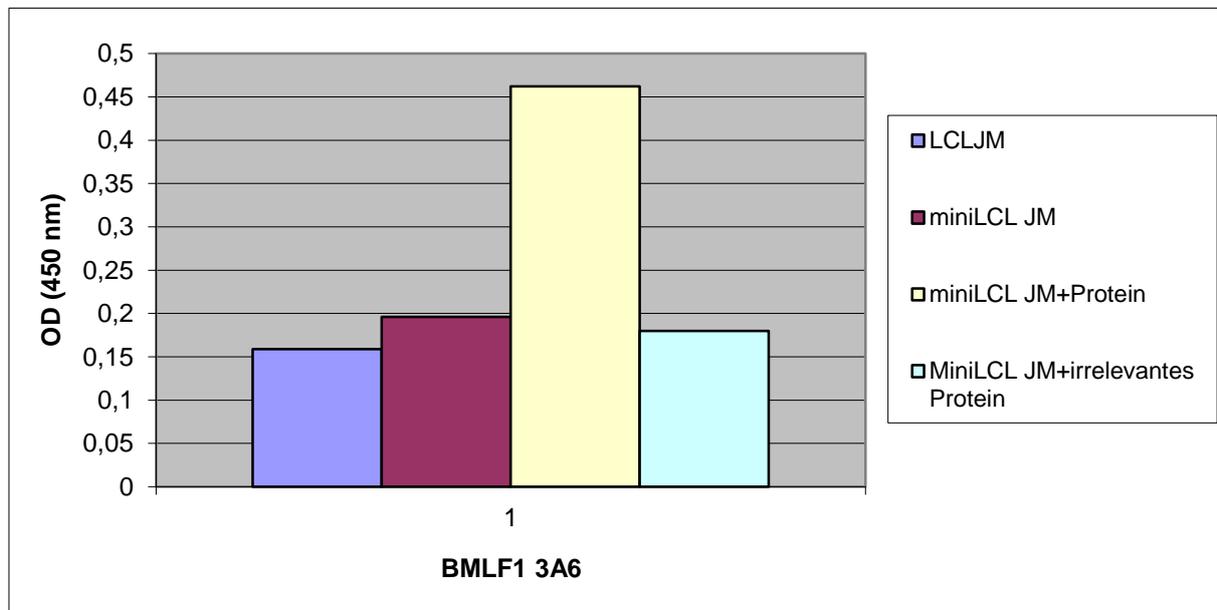


Abbildung 29: IFN- γ -ELISA eines BMLF1-spezifischen CD4+ T-Zellklons

Dieser T-Zellklon erkannte wie die Ursprungslinie das von mini-LCL präsentierte rekombinante EBV-Protein, nicht jedoch LCL, mini-LCL ohne Proteinbeladung oder mini-LCL mit Beladung durch ein irrelevantes Protein. Er ist somit für BMLF1 spezifisch, erkennt das Antigen aber nicht nachweislich auf LCL.

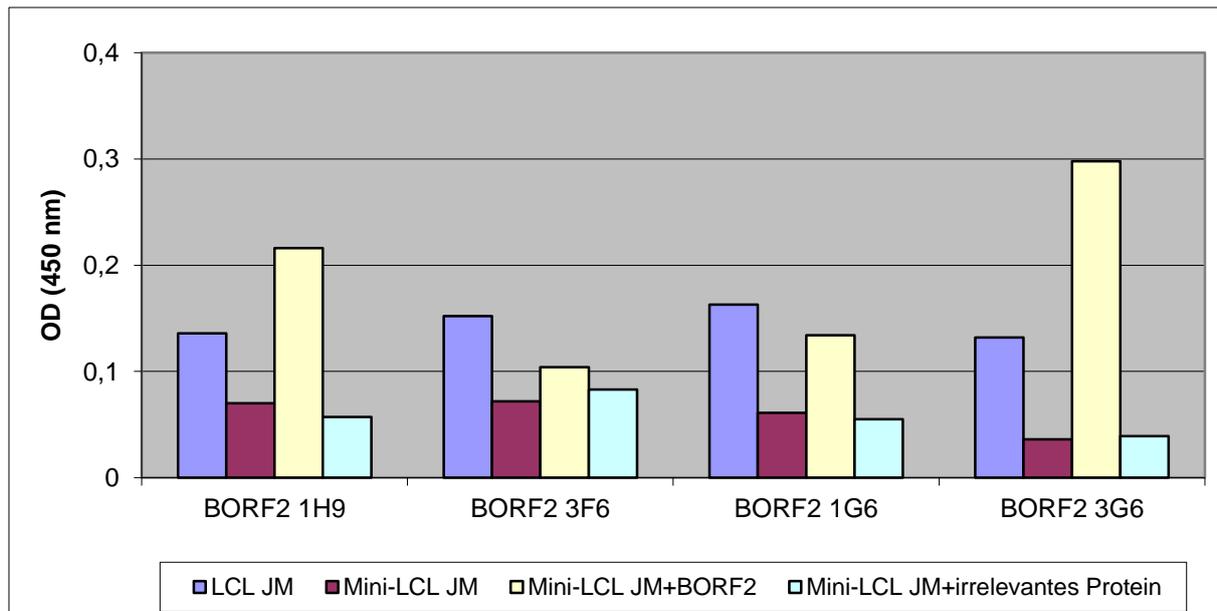


Abbildung 30: IFN- γ -ELISA von BORF2-spezifischen CD4+ T-Zellklonen

Diese Klone erkannten alle sowohl BORF2-beladene mini-LCL als auch LCL, nicht jedoch unbeladene oder irrelevant beladene mini-LCL, was dafür sprach, dass sie spezifisch für BORF2 waren, und dass BORF2 auf LCL ausreichend präsentiert wurde.

4.4.3.1 MHC-Restriktion der BORF2-spezifischen CD4+ T-Zellklone

Um die restringierenden MHC-Moleküle zu identifizieren, wurden die BORF2-spezifischen CD4+ T-Zellklone „Clone 1“ und „Clone 3“ mit BORF2-beladenen PBMC von verschiedenen Spendern inkubiert, die jeweils unterschiedliche MHCII-Moleküle mit dem Spender der primär untersuchten Zellen gemeinsam hatten. Dabei fanden sich zwei verschiedene MHC-Restriktionsmuster.

„Clone 1“ erkannte das Antigen im Kontext eines MHCII-Moleküls, das offensichtlich nur auf den Zellen des primär untersuchten Spenders vorkam. Dagegen erkannte „Clone 3“ das Antigen BORF2 auch auf mini-LCL von allogenen Spendern mit partiell überlappendem HLA-Typ. Mittels Ausschlussverfahren ließ sich annehmen, dass „Clone 1“ wahrscheinlich DR8 oder DP1301 restringiert und „Clone 3“ entweder DR13, DQ0603 oder DP0401 restringiert war.

Die Tatsache, dass das Ergebnis der HLA-Restriktion klar abzulesen war, sprach dafür, dass es sich bei den beiden BORF2-spezifischen T-Zellpopulationen tatsächlich um klonale Populationen handelte. Eine identische HLA-Restriktion wäre bei oligoklonalen Populationen unwahrscheinlich (**Abb. 31**).

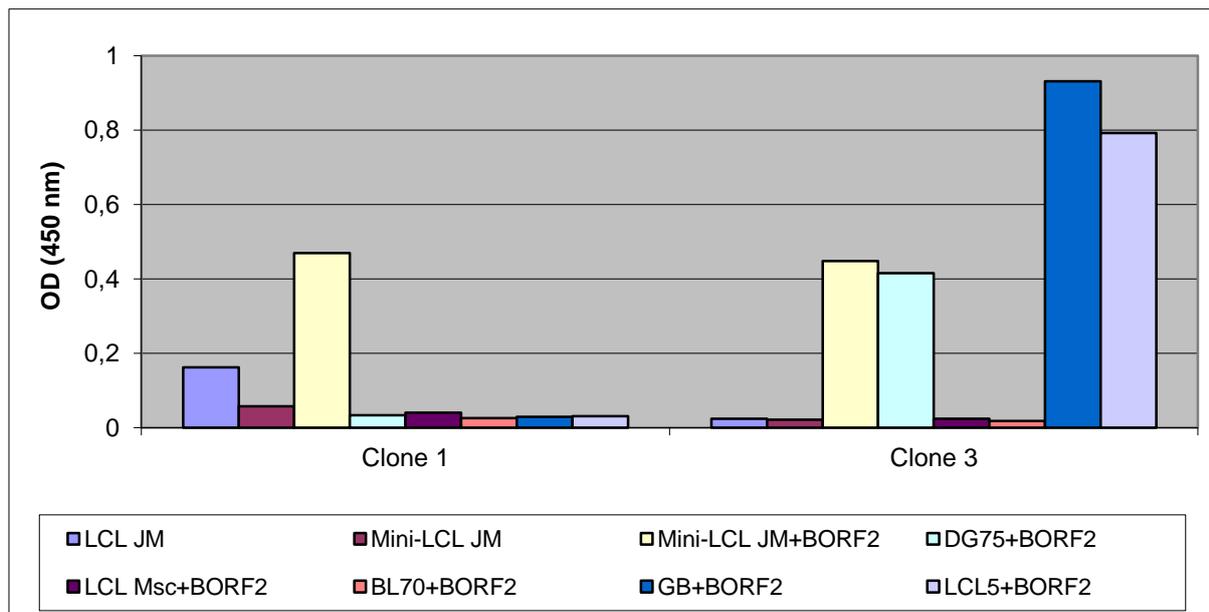


Abbildung 31: HLA-Restriktion der BORF2-spezifischen CD4+ T-Zellklone

Die beiden dargestellten Klone zeigten im IFN- γ -ELISA verschiedene HLA-Restriktionen. Während das Antigen im Falle von Clone 1 nur auf Zellen des Spenders JM erkannt wurde, wurde es im Falle von Clone 3 auch auf Zellen von drei allogenen Spendern erkannt wurde, deren MHCII-Moleküle partiell überlappten.

5 Diskussion

5.1 Breite CD4+ T-Zellantwort gegen Proteine des lytischen Zyklus

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Breite der EBV-spezifischen CD4+ T-Zellantwort näher zu charakterisieren und dabei auf Proteine des lytischen Zyklus zu fokussieren, die nicht zu den Strukturproteinen zählen.

Zu diesem Zweck wurden sieben Nicht-Strukturproteine des frühen lytischen Zyklus (BALF5, BGLF5, BBLF4, BORF2, BFLF2, BXLF1, BMLF1), ein Nicht-Strukturprotein des späten lytischen Zyklus (BCRF1) und ein Strukturprotein des späten lytischen Zyklus (BILF2) ausgewählt und rekombinant exprimiert. Die rekombinanten Proteine wurden auf autologe PBMC eines gesunden Virusträgers geladen und in dieser Form zur repetitiven Stimulation und Expansion von EBV-antigenspezifischen CD4+ T-Zelllinien aus autologen PBMC eingesetzt.

Aus allen neun Stimulationsansätzen konnten CD4+ T-Zelllinien generiert werden. Ihre Spezifität wurde mit Hilfe von verschiedenen autologen Zielzellen charakterisiert. Nach sieben und acht Stimulationen zeigten sechs T-Zelllinien im IFN- γ -ELISA eine Spezifität für das jeweilige Stimulatorprotein (BXLF1, BMLF1, BALF5 und BORF2 bzw. BGLF5 und BFLF2), während die mit BBLF4, BCRF1 und BILF2 generierten T-Zelllinien zunächst ausschließlich autoreaktiv waren. Nach zwei weiteren Stimulationsrunden zeigte sich angedeutet auch eine Spezifität für die Stimulatorproteine BBLF4 und BILF2. In dem untersuchten gesunden Virusträger war somit ein peripheres CD4+ T-Zellgedächtnis für alle sieben frühen lytischen Antigene und das späten Strukturproteins BILF2 nachweisbar.

Der Nachweis einer MHCII-restringierten Immunantwort gegen fünf der untersuchten lytischen Antigene war neu. Für die Ribonukleotidreduktase BORF2 und das Strukturprotein BILF2 hatten bereits ältere serologische Vorbefunde darauf hingedeutet, dass eine Erkennung durch CD4+ T-Helferzellen möglich ist (Ginsburg et al., 1990, Mackett et al., 1990). Im Gegensatz zu BILF2-IgG-Serumantikörpern waren die BORF2-spezifischen IgG-Serumantikörper allerdings nur im Kontext von NPCs und nicht bei gesunden Virusträgern detektiert worden (vgl. Kapitel 4.1.4, 4.1.6).

Die Ergebnisse untermauerten die in den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe bereits angedeutete große Breite der CD4+ T-Zellantwort gegen lytische EBV-Proteine. Sie zeigte im Besonderen, dass neben den vorbeschriebenen, immundominanten CD4+ T-Zellantworten gegen Strukturproteine auch CD4+ T-Zellantworten gegen diverse Nicht-Strukturproteine des lytischen Zyklus in gesunden Virusträgern induziert werden. Die Ergebnisse lieferten

darüberhinaus Hinweise auf eine signifikante Bedeutung von zellulären Autoantigenen bei der MHCII-restringierten T-Zellerkennung von EBV-infizierten Zellen.

5.2 CD4+ T-Zelllinien mit Spezifität für frühe lytische Antigene erkennen autologe LCL

Die BXLF1-, BMLF1-, BALF5-, BFLF2- und BORF2-spezifischen T-Zelllinien reagierten nach acht Stimulationszyklen mit LCL stärker als mit mini-LCL, was darauf hinwies, dass das jeweils relevante lytische Antigen von den LCL exprimiert und erfolgreich an CD4 + T-Zellen präsentiert wurde. Von mini-LCL konnte der lytische Zyklus aufgrund der BZLF1-Deletion im EBV-Genom nicht induziert und daher keine Expression und Präsentation von lytischem Antigen an T-Zellen erwartet werden.

Erste Evidenzen dafür, dass LCL und EBV-assoziierte Tumoren trotz der überwiegend latenten Infektion lytische Antigene exprimieren können, hatten ältere immunzytologische bzw. -histologische Untersuchungen geliefert. Sie zeigten, dass bis zu 5 % der LCL-Zellen einer Kultur spontan in die lytische Infektion übergehen können und dann Proteine des lytischen Zyklus exprimieren. In EBV-assoziierten Tumoren wurden ebenfalls kleine Populationen lytisch infizierter Zellen beschrieben (Kieff und Rickinson 2007).

Am Beispiel des späten lytischen Antigens BLLF1 (gp340/gp350), einem Strukturglykoprotein der Virushülle, war erstmals gezeigt worden, dass CD4+ T-Zellen mit Spezifität für lytische Proteine LCL direkt erkennen können. Als Erklärung wurde postuliert, dass von lytisch infizierten LCL-Zellen freigesetztes Antigen durch latent infizierte Zellen internalisiert, prozessiert und dann im Kontext von MHCII an CD4+ T-Zellen präsentiert wird; der genaue Mechanismus blieb zunächst unbekannt (Lee et al., 1993).

Unsere eigene Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass LCL nicht nur von BLLF1-spezifischen, sondern auch von CD4+ T-Zellen mit Spezifität für BALF4, einem weiteren Glykoprotein der Virushülle, direkt erkannt werden. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die glykoproteinspezifischen CD4+ T-Zellen neben LCL auch Burkitt-Lymphomzellen direkt erkennen und die Proliferation beider Zelltypen durch Granzyme-Perforin-vermittelte Lyse inhibieren können. Interessanterweise fand die T-Zellvermittelte Lyse der EBV-infizierten Zellen innerhalb weniger Stunden nach Viruskontakt statt, so dass die Zelle eliminiert wurde, bevor das Virus sie transformieren und sich darin vermehren konnte (Adhikary et al 2006). Diese Ergebnisse ließen den therapeutisch hoch interessanten Schluss zu, dass CD4+ T-Zellantworten gegen EBV-Strukturproteine möglicherweise zur Limitation der Infektionsausbreitung und zur Kontrolle der EBV-induzierten B-Zellproliferation beitragen.

Der Nachweis einer vermutlich antigenspezifischen LCL-Reaktivität von fünf der sechs mit frühen Nicht-Strukturproteinen generierten T-Zelllinien verlieh diesen Populationen hohe klinische Relevanz und sprach dafür, dass neben CD4+ T-Zellen mit Spezifität für späte Strukturproteine auch CD4+ T-Zellen mit Spezifität für frühe Nicht-Strukturproteine zur Begrenzung der EBV-Infektion und zur Kontrolle der EBV-assoziierten B-Zellproliferation beitragen könnten.

5.3 Mechanismen der LCL-Erkennung durch CD4+ T-Zelllinien mit Spezifität für lytische Antigene

Prinzipiell müssen bei der MHCII-restringierten Antigenpräsentation an CD4+ T-Zellen zwei verschiedene Quellen von Antigen diskutiert werden. Gemäß dem klassischen Modell der MHCII-restringierten Antigenpräsentation findet vor allem endozytirt, exogenes und membranständiges Antigen Anschluss an den MHCII-restringierten Präsentationsweg (Janeway et al., 2008). Jüngere Daten zeigten ergänzend, dass auch endogene Antigene der Zielzelle auf deren Oberfläche MHCII-restringiert an CD4+ T-Zellen präsentiert werden können. In der eigenen Arbeitsgruppe war anhand eines zytoplasmatischen Modellantigens erstmals Autophagie als verantwortlicher Mechanismus der endogenen MHCII-restringierten Antigenpräsentation identifiziert worden (Nimmerjahn et al., 2003).

Für EBV-Antigene waren verschiedene exogene und endogene MHCII-Antigenprozessierungswege beschrieben worden, die zur direkten Erkennung von virusinfizierten Zellen durch CD4+ T-Zellen führen können (Heller et al., 2006). Sie werden im Folgenden diskutiert und durch einen möglichen BCRF1-spezifischen Mechanismus ergänzt.

5.3.1 CD21-vermittelte Aufnahme von Virionen aus umgebenden virusproduzierenden Zellen (*bystander* Effekt)

Mit Hilfe von Zellmix-Experimenten konnte die eigene Arbeitsgruppe den Mechanismus aufklären, der der direkten Erkennung von LCL durch die untersuchten Strukturprotein-spezifischen T-Zellen zu Grunde lag. Er beruht auf einem *bystander*-Effekt der wenigen lytisch infizierten Zellen in der Kultur. Diese setzten Virionen in den Zellkulturüberstand frei, die von den latent infizierten Nachbarzellen nach Bindung an den CD21-Rezeptor auf der Zelloberfläche aufgenommen und prozessiert worden waren. Auf diese Weise entstanden

Spaltprodukte von Strukturproteinen, die im Kontext von MHCII auf der Oberfläche der LCL präsentiert wurden und innerhalb von wenigen Stunden nach Virusinternalisierung eine Perforin-Granzyme-vermittelte Lyse von ca. 30% der LCL-Kulturen durch Strukturantigen-spezifische CD4+ T-Zellen induzierten (Adhikary et al., 2006, Heller et al., 2006).

5.3.2 Aufnahme von exogenem Antigen mittels unspezifischer Phagozytose von Zellfragmenten lytisch infizierter Zellen

Für das frühe lytische Antigen BHRF1 war eine Aufnahme in LCL über Phagozytose von Zellfragmenten untergegangener lytisch infizierter Zellen beschrieben worden. Die Erkennung der LCL durch BHRF1-spezifische CD4+ T-Zellen hatte in diesen Experimenten nach einem etwa dreiwöchigen Antigentransferprozess zu 40-80% Lyse in den LCL-Kulturen geführt (Landais et al., 2005). Auch für nukleäre EBV-Antigene wird eine MHCII-restringierte Präsentation nach interzellulärem Proteintransfer postuliert (Taylor et al., 2006).

5.3.3 Aufnahme von exogenem Antigen über einen antigenspezifischen Rezeptor

Zum Mechanismus der BCRF1-Präsentation durch LCL läßt sich spekulieren, dass dieses virale Homolog von hIL-10 möglicherweise nach interzellulären Proteintransfer über die Bindung an den zellulären hIL-10-Rezeptor in die Zelle aufgenommen und im endosomalen/lysosomalen Kompartiment prozessiert wird. In den eigenen Experimenten war die Reaktion der BCRF1-stimulierten T-Zellen mit LCL deutlich stärker als mit mini-LCL, was auf eine mögliche Rolle des Antigens bei der LCL-Erkennung schließen ließ. Allerdings war die Antigen-spezifität der Linie mit antigenbeladenen PBMC oder mini-LCL *versus* unbeladenen oder irrelevant beladenen Analoga nicht zu belegen, was – wie unten ausführlich diskutiert – am ehesten daran lag, dass das in großen Mengen zugesetzte rekombinante BCRF1 noch funktionell war (Liu et al., 1997). Es hatte möglicherweise analog dem hIL-10 nach IL-10-Rezeptorbindung immunmodulierend auf die antigenspezifische T-Zellantwort gewirkt (vgl. Kapitel 5.7).

5.3.4 MHCII-assoziierte Präsentation nach Ko-Migration von endogenem Antigen mit MHCII-Molekülen im MHCII-Beladungskompartiment

Für die MHCII-restringierte Erkennung von endogenem Antigen auf LCL können theoretisch zwei Mechanismen diskutiert werden (vgl. Kapitel 5.3.4, 5.3.5). Im Kontext der CMV- und Influenzavirusinfektion fanden sich Evidenzen dafür, dass virale Antigene (gB bzw. HA) mit den MHCII-Molekülen im MHCII-Beladungskompartiment ko-migrieren können (Hegde et al., 2005, Kittlesen et al., 1993). Hinweise auf diesen Mechanismus gibt es allerdings im Kontext der EBV-Infektion meines Wissens noch nicht. Es ist auch nicht klar, wie effizient dieser Antigenpräsentationsweg wirklich ist, da die meisten Zellen die MHCII-Beladung im endoplasmatischen Retikulum durch Blockade der Antigenbindungsstelle mittels der Invarianten Kette unterbinden (Aichinger et al., 1997).

5.3.5 MHCII-assoziierte Präsentation von endogenem Antigen über Autophagie

Ein anderer Mechanismus der endogenen Antigenpräsentation auf MHCII beruht – wie oben bereits erwähnt – auf der Makroautophagie endogener Antigene der Zielzellen. Nach Erstbeschreibung dieses Antigenpräsentationsmechanismus in unserer Gruppe (Nimmerjahn et al., 2003) wurde von der Arbeitsgruppe um C. Münz gezeigt, dass auch das nukleäre EBV-Latenzprotein EBNA1 Anschluss an die Autophagie-vermittelte MHCII-restringierte Antigenpräsentation finden kann (Paludan et al., 2005). Autophagie wurde inzwischen für die MHCII-assoziierte Präsentation verschiedener natürlicher und modellartiger, zytoplasmatischer und nukleärer Antigene verantwortlich gemacht (Riedel et al., 2008, Gannage et al., 2009).

5.4 Mechanismen, die die LCL-Erkennung durch CD4+ T-Zelllinien mit Spezifität für lytische Antigene verhindern können

5.4.1 Fehlender oder nur spurenweiser Einbau des Antigens in Virionen

Der CD21-vermittelte *bystander*-Effekt virusproduzierender LCL-Zellen kann natürlich nur dann zum Tragen kommen, wenn sich eine signifikante Menge an Antigen im infektiösen Viruspartikel befindet. Dies ist bei allen Strukturproteinen *per definitionem* der Fall, nicht aber

bei den übrigen lytischen Antigenen. Die sehr frühen und frühen lytischen Antigene kommen in der Regel nur in Spuren oder gar nicht in den Virionen vor (Rickinson & Kieff, 2007). So überraschte es nicht, dass CD4⁺ T-Zellen mit Spezifität für den sehr frühen lytischen Transaktivator BZLF1 nicht in der Lage waren, die LCL-Kulturen zu erkennen, die von den glykoproteinspezifischen CD4⁺ T-Zellen effizient erkannt und lysiert wurden (Adhikary et al., 2006). Es gibt jedoch Ausnahmen unter den Nicht-Strukturproteinen des frühen lytischen Zyklus. So wurden beispielsweise das DNA-Bindungsprotein BALF2 und die DNA-Polymeraseuntereinheit BMRF1 durchaus in Virionen nachgewiesen und eine rezeptorvermittelte Aufnahme dieser lytischen Antigene diskutiert (Johannssen et al., 2004).

Die in der eigenen Arbeit beobachtete schwache LCL-Reaktivität der CD4⁺ T-Zellen mit Spezifität für die Thymidinkinase BXLF1, das Kernexportprotein BMLF1 und die DNA-Polymerase BALF5 sowie die nicht nachweisbare LCL-Reaktivität der mit BILF2 und BBLF4 generierten CD4⁺ T-Zellen könnte somit auf der Tatsache beruhen, dass diese frühen lytischen Antigene nicht oder nur in Spuren in die Viruspartikel eingebaut werden (Rickinson & Kieff, 2007).

5.4.2 Ungenügendes Antigenexpressionsniveau

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für eine fehlende oder geringe LCL-Reaktivität könnte darin liegen, dass das Expressionsniveau der Antigene in den lytisch infizierten LCL zu gering war, um ausreichend endogenes oder exogenes Antigen für die Präsentation an T-Zellen bereitzustellen.

Dass das endogene Expressionsniveau von EBV-Proteinen für die MHCII-restringierte Präsentation auf LCL kritisch sein kann, war von der eigenen Arbeitsgruppe bereits am Beispiel des Latenzantigens EBNA1 gezeigt worden (Mautner et al., 2004). Das endogene EBNA1-Protein wird in LCL mit 25.000 – 44.000 Molekülen pro Zelle exprimiert (Sternas et al., 1990) und in unseren Händen in dieser Frequenz nicht von EBNA1-spezifischen CD4⁺ T-Zellklonen erkannt. Wurde jedoch durch Überexpression ein 60-fach höherer EBNA1-Spiegel erzielt, wurde endogenes EBNA1 effizient auf MHCII präsentiert und von EBNA1-spezifischen CD4⁺ T-Zellklonen erkannt (Mautner et al., 2004).

5.4.3 Abortiver lytischer Zyklus

Bei der Expression von lytischen Proteinen ist weiterhin zu bedenken, dass es sogenannte abortive lytische Infektionen gibt, d.h. lytische Infektionen, bei denen der lytische Zyklus zwar initiiert wird, aber nicht vollständig zu Ende läuft und deshalb manche lytische Proteine nicht zur Expression kommen (Martel-Renoir et al., 1995, Al Tabaa et al., 2009). Dies könnte eventuell eine Erklärung dafür sein, dass die mit BILF2 und BBLF4 generierten CD4+ T-Zellen keinerlei LCL-Reaktivität erkennen ließen.

5.4.4 Gestörte endosomale Antigenprozessierung

Des Weiteren war denkbar, dass die endosomale Prozessierung von BILF2 und BBLF4 in den untersuchten LCL gestört war, und dass diese Proteine deshalb von LCL nicht ausreichend auf MHCII-Moleküle geladen und an die proteinspezifischen CD4+ T-Zellen präsentiert werden konnten.

Dazu passend war für das Tumorantigen MAGE-A3 gezeigt worden, dass die endosomale Prozessierung von den im jeweiligen Zelltyp der APC vorhandenen und aktivierten Enzymen der intrazellulären Kompartments abhing (Marturano et al., 2008). Es war demnach möglich, dass die untersuchten LCL geringere Mengen proteinspezifischer Proteasen besaßen als die autologen PBMC bzw. mini-LCL, dass daher in LCL eine schlechtere endosomale Prozessierung stattgefunden hatte, und dass dies in einer verminderten Proteinpräsentation und Antigenerkennung durch die proteinspezifische CD4+ T-Zellen resultierte.

Für Latenzantigene von EBV waren bereits Besonderheiten der endosomalen Prozessierung in LCL beschrieben worden (Mautner et al., 2004, Leung et al., 2010).

5.4.5 Ungenügendes Expressionsniveau oder ungenügende Bindungsaffinität der restringierenden MHC-Moleküle

Eine weitere mögliche Erklärung für die fehlende Erkennung von LCL durch autologe EBV-antigenspezifische CD4+ T-Zellen könnte darin liegen, dass das Expressionsniveau oder die Bindungsaffinität der restringierenden MHCII-Moleküle nicht für eine effiziente Präsentation auf den LCL ausreichte. Da die jeweils restringierenden MHCII-Moleküle in dieser Arbeit nicht für die LCL-areaktiven Linien identifiziert wurden, läßt sich diese Hypothesen hier nicht

verifizieren. Es ist jedoch gut bekannt, dass verschiedene MHC-Moleküle einer Zelle im endosomalen Kompartiment um die Bindung von Proteinfragmenten konkurrieren, und somit die MHC-Moleküle mit der höchsten Expression und Bindungsaffinität eine Selektionierung bestimmter Epitope bewirken können (Marturano et al., 2008). Für LCL ist vorbeschrieben, dass HLA-DR-1,-3,-4, und 5 stärker exprimiert werden, als andere MHCII-Moleküle, so dass Epitope, die von diesen MHC-Molekülen präsentiert werden, unter Umständen besser präsentiert werden als Epitope, die im Kontext anderer MHC-Moleküle erkannt werden (Gonwa et al., 1986, Meyer et al., 1997).

5.4.6 Intra- und interindividuelle Schwankungen der Virusproduktion durch LCL

Die eigene Arbeitsgruppe hatte beobachtet, dass die spontane Virusproduktion von LCL-Kulturen und damit der mögliche *bystander* Effekt lytisch infizierten LCL-Zellen starken inter- und intraindividuellen Schwankungen unterlag. Es ist deshalb bei allen Untersuchungen zur LCL-Erkennung durch T-Zellen mit Spezifität für lytische Antigene zu bedenken, dass negative Ergebnisse auf tages- und spenderabhängigen Schwankungen der lytischen Aktivität der LCL beruhen können (Adhikary et al., 2008).

5.5 Expansion von BORF2- und BMLF1-spezifischen CD4+ T-Zellklonen

5.5.1 Erstmaliger Nachweis von BORF2-spezifischen CD4+ T-Zellen bei gesunden Virusträgern

Der ältere Nachweis von IgG-Serumantikörpern mit Spezifität für BORF2 bei Patienten mit NPC (Ginsburg 1990) lieferte erste indirekte Hinweise auf eine MHCII-restringierte Immunerkennung dieser RNR, denn hochtitrige IgG-Serumantikörper können nur dann von B-Zellen produziert werden, wenn sie antigenspezifische Hilfe von CD4+ T-Zellen erhalten und daraufhin ihren Immunglobulin-*switch* vollziehen.

In der eigenen Arbeit gelang erstmals der direkte Nachweis, die antigenspezifische Expansion, die Klonierung und eine annähernde Bestimmung der HLA-Restriktion von BORF2-spezifischen CD4+ T-Zellen.

Darüber hinaus belegt die eigene Arbeit erstmals, dass BORF2 auch bei gesunden Virusträgern eine MHCII-restringierte Immunantwort auslösen kann. In der Arbeit von

Ginsburg waren BORF2-spezifische Serumantikörper nur bei Patienten mit NPC und nicht bei gesunden Virusträgern nachweisbar. Das liegt möglicherweise daran, dass die CD4+ T-Gedächtniszellantwort im Kontext des EBV-positiven NPCs durch abundantes Antigen sehr effizient reaktiviert wird.

Experimente zur Bestätigung der Klonalität sowie zur Untersuchung des möglichen zytotoxischen und antiproliferativen Potentials der BORF2-spezifischen Klone befinden sich in Arbeit. Diese Experimente sind Teil der systematischen funktionellen Analyse EBV-spezifischer CD4+ T-Zellklone in der Arbeitsgruppe und *bis dato* noch nicht abgeschlossen.

5.5.2 Alle BORF2-spezifischen CD4+ T-Zellpopulationen erkennen LCL

Die BORF2-spezifische Zelllinie und alle durch *limiting dilution* generierten BORF2-spezifischen CD4+ T-Zellklone zeigten eine deutliche Erkennung von LCL, so dass angenommen werden darf, dass LCL endogen synthetisiertes und/oder von extern aufgenommenes BORF2 effizient im Kontext von MHCII präsentieren.

Die erfolgreiche Präsentation des BORF2 auf LCL spricht zunächst einmal dafür, dass dieses frühe Nicht-Strukturprotein in LCL-Kulturen relativ hoch exprimiert wird. Für hoch exprimierte EBV-Proteine ist die Wahrscheinlichkeit, einer MHCII-restringierten Präsentation an CD4+ T-Zellen größer als für niedrig exprimierte EBV-Proteine (Lee et al., 1993). Das liegt daran, dass die Peptid-Bindungstasche der MHCII-Moleküle nach Dissoziation der invarianten Kette im Golgi-Apparat kompetitiv von Peptidfragmenten besetzt wird. Hochfrequente Peptide haben somit eine bessere Chance, mit den passenden MHCII-Molekülen auf die Zelloberfläche transportiert und an spezifische CD4+ T-Zellen präsentiert zu werden. Ob die präsentierten BORF2-Peptide von exogenem oder endogenem Antigen stammen, ist *bis dato* Gegenstand von Spekulationen:

Ein Transfer von BORF2 über eine CD21-rezeptorvermittelte Aufnahme von Virionen auf latent infizierte LCL ist eher unwahrscheinlich, da sich in der Literatur keine Hinweise auf eine Einschleusung des früh im lytischen Zyklus exprimierten BORF2 in infektiösen EBV-Partikel finden (Rickinson & Kieff, 2007). Denkbar wäre eher, dass exogenes BORF2 wie BHRF1 (Landais et al., 2005) nach unspezifischer Phagozytose von EBV-Antigen-haltigem Zellmaterial auf MHCII der LCL präsentiert wird. Diese Hypothese könnte in Zellmix-Experimenten geprüft werden.

Alternativ wäre prinzipiell auch eine Präsentation endogenen Antigens während der lytischen EBV-Infektion der Zielzelle denkbar. *Bis dato* gibt es noch keine publizierten Daten, die eine

direkte Erkennung von lytisch infizierten Zellen belegen. Die Analyse der direkten Erkennung lytisch infizierter Zellen wird durch die asynchrone lytische Infektion aller nicht-rekombinanten EBV-positiven Zielzellkulturen erschwert. In der eigenen Arbeitsgruppe wurde deshalb kürzlich ein konditionales System entwickelt, das eine synchrone Induktion des lytischen Zyklus in rekombinanten EBV-infizierten B-Zellen zulässt. Mit Hilfe von T-Zellklonen, die gegen bestimmte lytische Antigene gerichtet sind, kann in diesem System untersucht werden, ob und zu welchem Zeitpunkt die lytisch infizierten B-Zellen einer EBV-spezifischen, MHCII-restringierten Immunerkennung zugänglich sind.

Mit dem Nachweis ihrer LCL-Erkennung sind BORF2-spezifische T-Zellen therapeutisch hochinteressant. Sobald eine Vereinzelnung der BORF2-spezifischen T-Zellklone gelungen ist, sollen diese analog der BLLF1- und BALF4-spezifischen Klone (Adhikary et al., 2006) *in vitro* in Zytotoxizitäts- und Proliferationsassays mit verschiedenen EBV-positiven Zielzellkulturen eingesetzt sowie *in vivo* in den in der Arbeitsgruppe verfügbaren LCL- und PBMC induzierten PTLD-Mausmodellen auf ihr therapeutisches Potential getestet werden.

5.5.3 Erstmaliger Nachweis und Klonierung von BMLF1-spezifischen CD4+ T-Zellen im peripheren Blut

Nach *limiting dilution* konnte aus der mit BMLF1 stimulierten CD4+ T-Zelllinie ein BMLF1-spezifischer CD4+ T-Zellklon expandiert werden. Die eigene Arbeit belegte damit erstmals und eindeutig, dass BMLF1 im Kontext von MHCII effizient an T-Zellen präsentiert werden kann. Der Klonalitätsnachweis mittels Analyse der T-Zellrezeptor V β -Ketten sowie die Bestimmung der MHCII-Restriktion stehen noch aus.

Berichte über BMLF1-spezifische Serumantikörper als indirekte Hinweise auf eine MHCII-restringierte Immunerkennung von BMLF1 fanden sich in der verfügbaren Literatur nicht. Bislang war nur über CD8+ T-Zellen mit Spezifität für BMLF1 berichtet worden. Popescu und Kollegen berichteten, dass drei von vier gesunden Virusträgern 0.23% bis 1.14% BMLF1-spezifische CD8+ T-Zellen d.h. eine vergleichsweise hochfrequente MHCI-restringierte T-Zellantwort gegen BMLF1 aufwiesen, was für eine hohe Antigenexpression sprechen könnte. Sie lieferten darüber hinaus Hinweise auf ein mögliches *in vitro priming* von BMLF1-spezifischen CD8+ T-Zellen durch Stimulation mit LCL-beladenen, autologen dendritischen Zellen und vermuteten, dass *cross priming* dafür verantwortlich war (Popescu et al., 2003). Mit Hilfe von BMLF1-spezifischen Tetrameren detektierten Tan und Kollegen BMLF1-spezifische CD8+ T-Zellen auch in der Synovialflüssigkeit von Arthritispatienten (Tan et al., 2000).

5.5.4 Der BMLF1-spezifische CD4+ T-Zellklon reagiert nicht besser mit LCL als mini-LCL, obwohl dies bei der BMLF1-spezifische T-Zelllinie der Fall war

Der durch *limiting dilution* generierte BMLF1-spezifische CD4+ T-Zellklon erkannte ausschließlich mit BMLF1-beladene, aber keine unbeladenen EBV-positiven Zielzellen. Das sprach dafür, dass weder exogen aufgenommenes noch endogenes Antigen in relevanter Menge von den hier eingesetzten LCL auf MHCII präsentiert wurde. Da allerdings die BMLF1-spezifische CD4+ T-Zelllinie durchaus etwas besser mit LCL als mit mini-LCL reagiert hatte, war nicht auszuschließen, dass BMLF1-spezifische CD4+ T-Zellen prinzipiell zur immunologischen Kontrolle der EBV-Infektion und EBV-assoziierten B-Zellproliferation beitragen können.

Nach Erhalt eines in T-Zellrezeptor V β -Kettenanalysen bestätigten BMLF1-spezifischen CD4+ T-Zellklon soll dieser wie alle anderen in der Arbeitsgruppe generierten EBV-antigenspezifischen CD4+ T-Zellklone im Tiermodell bezüglich seines möglichen Beitrags zur Wachstumskontrolle von EBV-assoziierten Lymphomen getestet werden.

5.6 Immundominanz von autoantigenspezifischen über virusspezifische CD4+ T-Zellklone

Auffällig war der Befund, dass nach zehn antigenspezifischen Stimulationen nur noch die BMLF1- und die BILF2-spezifischen T-Zelllinien eine antigenspezifische Reaktion erahnen ließen, obwohl in den vorangegangenen Passagen bei allen außer der BCRF1-stimulierten Linie ein gewisse Antigenspezifität nachweisbar war. Diese Beobachtung legte eine immundominante Rolle von Autoantigenen nahe.

Passend zu der Hypothese der Immundominanz von autoantigen-spezifischen gegenüber virusspezifischen T-Zellpopulationen konnten die bis zur achten Passage nachweisbaren BXLF1- und BALF5-spezifischen CD4+ T-Zellklone im Gegensatz zu autoreaktiven Klonen nicht durch *limiting dilution* Klonierung expandiert werden.

Auffällig war, dass die T-Zelllinien in vielen Assays mit EBV-positiven Zellen stärker reagierten als die mit unbeladene PBMC. Dies war am ehesten dadurch zu erklären, dass die relevanten Autoantigene in EBV-positiven Zellen besser exprimiert oder präsentiert wurden. Im Falle der mini-LCL kamen Autoantigene in Frage, die im Rahmen der Latenzinfektion überexprimiert wurden. Im Falle der LCL waren darüber hinaus auch B-Autoantigene zu diskutieren, die im Verlauf des lytischen Zyklus hochreguliert wurden. Welche Autoantigene dies im Einzelnen waren, blieb hier offen.

Die Tatsache, dass das Wachstum der mit BBLF4- und BCRF1-generierten T-Zelllinie ab Passage fünf unspezifisch beeinträchtigt war, sprach dafür, dass hier außerdem ein unspezifischer Störfaktor die antigenspezifische T-Zellexpansion beeinträchtigte.

Dass die EBV-Infektion mit Autoimmunphänomenen assoziiert sein kann, ist gut bekannt. Beschrieben sind beispielsweise EBV-induzierte Thrombozytopenien (Kanegane et al., 1994; Kagoya et al., 2010) und autoimmunhämolytische Anämien (Cataldo et al., 1994; Sevilla et al., 2004). Eine pathogene Rolle des EBV wird darüberhinaus bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen diskutiert, so zum Beispiel bei der Multiplen Sklerose, der Rheumatoiden Arthritis, dem Lupus erythematoses und dem primären Sjögren-Syndrom (Toussirot et al., 2008).

5.7 Immunmodulierende Wirkung des rekombinanten BCRF1

Im Falle des BCRF1 musste eine spezifische Störung der antigenspezifischen T-Zellexpansion festgestellt werden. Es fiel auf, dass die mit BCRF1 stimulierten T-Zellen auf antigenbeladene PBMC deutlich schwächer reagierten als auf unbeladene PBMC.

Es ist bekannt, dass das virale BCRF1 wie das hIL-10 zum Einen eine verminderte Sekretion von IFN- γ und zum Anderen eine verminderte Expression von MHCII-Molekülen und damit verminderte Antigenexpression durch PBMC bewirken kann. Um eine biologische Restaktivität des rekombinanten vIL-10 zu vermeiden, war das rekombinante deshalb in den eigenen Untersuchungen unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt worden. Da es sich jedoch um ein sehr kleines Protein von 18,8 kDa handelte, kam es offensichtlich zu einem spontanen Zurückfallen dieses Proteins, womit die biologische Funktion wieder erlangt und das Ergebnis der BCRF1-spezifischen T-Zell-Assays wahrscheinlich verfälscht wurde.

Evidenzen dafür, dass BCRF1-spezifische CD4⁺ T-Zellvorläufer prinzipiell durchaus im peripheren Blut vorkommen und BCRF1-Peptide in Konkurrenz mit Autoantigenen effizient von LCL präsentiert werden können, hatten Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe geliefert. Bei der Analyse der Zielantigene von LCL-stimulierten CD4⁺ T-Zelllinien hatte sich BCRF1 als eines der wenigen Nicht-Strukturproteine qualifiziert, die von LCL-stimulierten T-Zelllinien erkannt werden (Adhikary et al., 2007).

Indirekte Hinweise darauf, dass BCRF1 CD4⁺ T-Zellantworten hervorrufen kann, hatten serologische Vorbefunde ergeben. Serumantikörper mit Spezifität für BCRF1 waren bei Patienten mit NPC, CAEBV oder EBV-assoziierten LPDs detektiert worden (Tanner et al.,

1997). Interessanterweise hatte ein Patient mit CAEBV anti-BCRF1-Antikörper, die die IL-10-Bioaktivität *in vitro* neutralisierte.

5.8 Ausblick

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse erstmals, dass im peripheren Blut gesunder Virusträger neben den von der eigenen und anderen Arbeitsgruppen vorbeschriebenen Latenzantigen-spezifischen und Strukturantigen-spezifischen CD4+ T-Gedächtniszellen verschiedene CD4+ T-Gedächtniszellpopulationen zirkulieren, die Nicht-Strukturantigene des lytischen Zyklus von EBV erkennen. Die EBV-spezifische CD4+ T-Zellantwort in gesunden Virusträgern ist damit noch breiter angelegt als bislang beschrieben.

MHC-Restriktion, Zytokinprofil und mögliche antiproliferative Eigenschaften der in dieser Arbeit expandierten EBV-Antigen-spezifischen T-Zellpopulationen werden in laufenden Experimenten der Arbeitsgruppe *in vitro* näher charakterisiert. In LCL- bzw. PBMC-induzierten PTLD-Mausmodellen können verschiedene Mischungen der hier expandierten EBV-antigen-spezifischen CD4+ T-Zellen mit anderen EBV-spezifischen CD8+ und CD4+ T-Zellen auf ihr individuelles und gemeinsames prophylaktisches und therapeutisches Potential *in vivo* getestet werden. Anhand des konditionalen *in vitro* Modells der Arbeitsgruppe zum lytischen Zyklus von EBV und der in der eigenen Arbeit generierten CD4+ T-Zelllinien und –klone kann geprüft werden, ob lytisch infizierte Zielzellen, die die relevanten Nicht-Strukturproteine exprimieren, direkt erkannt und lysiert werden können. Wenn dies der Fall ist, kann geprüft werden, ob die endogene Antigenpräsentation auf MHCII über den von der Arbeitsgruppe beschriebenen Autophagieprozess erfolgt (Nimmerjahn et al., 2003, Riedel et al., 2008). Mit Hilfe des von der Arbeitsgruppe entwickelten DANI-Verfahrens (Milosevic et al., 2005 und 2006) können die für die CD4+ T-Zellerkennung relevanten Epitope der hier untersuchten Nicht-Strukturantigene charakterisiert werden. Alle identifizierten Epitope sollen schließlich in den EBV-Peptid-spezifischen Über-Nacht-Stimulationsansatz eingehen, der in Kollaboration mit Moosmann und Kollegen zur Generierung von EBV-spezifischen T-Zellen für den adoptiven Transfer in Patienten mit PTLD eingesetzt wird (Moosmann et al., 2010).

Bemerkenswert war in dieser Arbeit die Beobachtung, dass viele Nicht-Strukturantigene des EBV eher subdominante Immunantworten auslösen, die *in vitro* von Autoimmunantworten überlagert werden. Diese Beobachtung paßt gut zu den zahlreichen Autoimmunphänomenen, die klinisch mit EBV assoziiert werden. Dass die Induktion von Immunantworten gegen EBV-abhängige Autoantigene zur selektiven Kontrolle der EBV-

Primärinfektion beiträgt, ist anzunehmen, wenn auch noch nicht bewiesen. Welche Autoantigene hier eine Rolle spielen, ist noch unklar.

Die eigene Analyse zielte zusammen mit anderen Untersuchungen der Arbeitsgruppe mittelfristig auf ein besseres Verständnis der EBV-Immunität ab und dient dem langfristigen Ziel, effiziente und breit anwendbare Strategien zur EBV-Immuntherapie und –Prophylaxe bereitzustellen. Mit Hilfe optimierter Ansätze für den EBV-spezifischen adoptiven T-Zelltransfer soll eines Tages die PTLD eine heilbare oder sogar vermeidbare Erkrankung werden. Es ist zu hoffen, dass ein verbessertes Verständnis der EBV-Immunologie eines Tages dazu beitragen kann, dass aktive EBV-Vakzine entwickelt werden können, und EBV-spezifische Impfmaßnahmen alle schweren und lebensbedrohlichen EBV-assoziierten Erkrankungen verhindern.

6 Zusammenfassung

Mehr als 90% der Weltbevölkerung sind seropositiv für EBV. Eine ganze Reihe von Malignomen wie beispielsweise lymphoproliferative Erkrankungen nach Organ- oder Stammzelltransplantationen sind bekannterweise mit EBV assoziiert. Mittels adoptiven Transfers von EBV-spezifischen T-Zellen können diese Erkrankungen, die mit hoher Morbidität und Mortalität verbunden sind, nur durch äußerst aufwendige und zeitintensive Verfahren in einigen Fällen geheilt werden. Erforderlich ist die Entwicklung effizienter und breit anwendbarer Ansätze für die EBV-spezifische adoptive T-Zelltherapie. Langfristig wäre die Entwicklung einer aktiven EBV-Vakzine wünschenswert, um alle schweren und lebensbedrohlichen EBV-assoziierten Erkrankungen zu verhindern.

Nach einer Primärinfektion persistiert EBV lebenslang in seinem Wirt. Während dieser Phase der klinischen Latenz kommt es zur zyklischen Reaktivierung von latent infizierten B-Zellen. Bei Immunsuppression im Rahmen von Organ- oder Stammzelltransplantationen kann es durch diese EBV-Reaktivierung zu einer unkontrollierten Vermehrung der infizierten B-Zellen kommen und somit eine lymphoproliferative Erkrankung ausgelöst werden. Die EBV-spezifische Antwort von CD8+ T-Zellen ist bereits gut charakterisiert. Für die Entwicklung von passiven und aktiven, EBV-spezifischen Impfstoffen ist es notwendig, relevante T-Zell-Antigene der EBV-spezifischen CD4+ T-Zell-Antwort zu identifizieren.

In dieser Arbeit wurde die CD4+ Immunantwort gesunder Virusträger gegen neun Proteine des lytischen Zyklus von EBV untersucht. Ausgewählt und rekombinant exprimiert wurden sieben Nicht-Strukturproteine des frühen lytischen Zyklus (BALF5, BGLF5, BBLF4, BORF2, BFLF2, BXLF1, BMLF1), ein Nicht-Strukturprotein des späten lytischen Zyklus (BCRF1) und ein Strukturprotein des späten lytischen Zyklus (BILF2). Die rekombinanten Proteine wurden auf autologe PBMC eines gesunden Virusträgers geladen und in dieser Form zur repetitiven Stimulation und Expansion von EBV-antigenspezifischen CD4+ T-Zelllinien und -Klonen aus autologen peripheren mononukleären Blutzellen eingesetzt. Aus allen neun Stimulationsansätzen konnten CD4+ T-Zelllinien generiert werden, deren Spezifität mit Hilfe von verschiedenen autologen Zielzellen charakterisiert wurde. Acht der neun generierten CD4+ T-Zelllinien zeigten eine Spezifität für das jeweilige Stimulatorprotein. In dem untersuchten gesunden Virusträger war somit ein breites peripheres CD4+ T-Zellgedächtnis für lytische Antigene nachweisbar.

Die Ergebnisse zeigten erstmals, dass neben den vorbeschriebenen, immundominanten CD4+ T-Zellantworten gegen Strukturproteine auch CD4+ T-Zellantworten gegen diverse Nicht-Strukturproteine des lytischen Zyklus in gesunden Virusträgern induziert werden. Die Ergebnisse lieferten darüberhinaus Hinweise auf eine signifikante Bedeutung von zellulären Autoantigenen bei der MHCII-restringierten T-Zellerkennung von EBV-infizierten Zellen.

7 Literaturverzeichnis

Adams A, Lindahl T. Epstein-Barr virus genomes with properties of circular DNA molecules in carrier cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;72:1577-1581.

Adhikary D, Behrends U, Moosmann A, Witter K, Bornkamm GW, Mautner J. Control of Epstein-Barr virus infection in vitro by T helper cells specific for virion glycoproteins. *J Exp Med*. 2006;203:995-1006.

Adhikary D, Behrends U, Boerschmann H, Pfünder A, Burdach S, Moosmann A, Witter K, Bornkamm GW, Mautner J. Immunodominance of lytic cycle antigens in Epstein-Barr virus-specific CD4+ T cell preparations for therapy. *PLoS ONE* 2007; 2:e583.

Adhikary D, Behrends U, Feederle R, Delecluse HJ, Mautner J. Standardized and highly efficient expansion of Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD4+ T cells using virus-like particles. *J Virol* 2008 Apr;82(8):3903-3911.

Aichinger G, Karlsson L, Jackson MR, Vestberg M, Vaughan JH, Teyton L, Lechler RI, Peterson PA. Major histocompatibility complex class II-dependent unfolding, transport, and degradation of endogenous proteins. *J Biol Chem*. 1997;272:29127-29136.

Anagnostopoulos I, Hummel M, Kreschel C, Stein H. 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* 1995; 85:744-750.

Alfieri C, Tanner J, Carpertier L, Perpete C, Savoie A, Paradis K, Delage G, Joncas J. Epstein-Barr virus transmission from a blood donor to an organ transplant recipient with recovery of the same virus strain from the recipient's blood and oropharynx. *Blood* 1996; 87:812-817.

Allaudeen HS, Bertino JR. Isolation of a herpesvirus-specific DNA polymerase from tissues of an American patient with Burkitt lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1978; 75:4505-4507.

Al Tabaa Y, Tuailon E, Bollore K, Foulongne V, Petitjean G, Seigneurin JM, Duperray C, Desgranges C, Vendrell JP. Functional Epstein-Barr virus reservoir in plasma cells derived from infected peripheral blood memory B cells. *Blood*. 2009;113:604-611.

Avila-Carino J, Lewin N, Yamamoto K, Tomita Y, Mellstedt H, Brodin B, Rosen A, Klein A. EBV infection of B-CLL cells in vitro potentiates their allostimulatory capacity if accompanied by acquisition of the activated phenotype. *Int J Cancer* 1994;58:678-685.

Baer R, Bankier AT, Biggin MD, Deininger PL, Farrell PJ, Gibson TJ, Hatfull G, Hudson GS, Satchwell SC, Séguin C, Tuffnell PS, Barrell BG. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 1984;310:207-211.

Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979;7:1513-1523.

Birnboim HC. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol*. 1983;100:243-255.

Bogedain C, Wolf H, Modrow S, Stuber G, Jilg W. Specific cytotoxic T lymphocytes recognise the immediate early transactivator Zta of Epstein-Barr virus. *J Virol* 1995;69:4872-4879.

Bollard CM, Aguilar L, Straathof KC, Gahn B, Huls MH, Rousseau A, Sixbey J, Gresik MV, Carrum G, Hudson M, Dilloo D, Gee A, Brenner MK, Rooney CM, Heslop HE. Cytotoxic lymphocyte therapy for Epstein-Barr virus Hodgkin's disease. *J Exp Med* 2004;200:1623-1633.

Bornkamm GW, Hammerschmidt W. Molecular virology of Epstein-Barr virus. *Phil Trans R Soc Lond B* 2001;356:437-459.

Bornkamm GW, Behrends U, Mautner J. The infectious kiss: Newly infected B cells deliver Epstein-Barr virus to epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:7201-7202.

Brousset P, Knecht H, Rubin B, Drouet E, Chittal S, Meggetto, Saati TA, Bachmann E, Denoyel G, Sergeant A, Delsol G. Demonstration of Epstein-Barr virus replication in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Blood* 1993;82:872-876.

Burkitt D. A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg*. 1958;46:218-223.

Caldwell RG, Wilson JB, Anderson SJ, Longnecker R. Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* 1998;9:405-411.

Calender A, Billaud M, Aubry JP, Banchereau J, Vuillaume M, Lenoir GM. Epstein-Barr virus (EBV) induces expression of B-cell activation markers on in vitro infection of EBV-negative B-lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:8060-8064.

Callan MF. The immune response to Epstein-Barr virus. *Microbes Infect* 2004;6:937-945.

Callan MF, Tan L, Annels N, Ogg GS, Wilson JD, O'Callaghan CA, Steven N, McMichael AJ, Rickinson AB. Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus in vivo. *J Exp Med* 1998;187:1395-1402.

Cataldo F, Varrica D, Mele A, Oddo S, Varvara MG, Albeggiani A. Autoimmune hemolytic anemia with cold antibodies and hemoglobinuria secondary to EBV infection. *Minerva Pediatr* 1994 Sep;46:401-405.

Cen H, Breinig MC, Atchison RW, Ho M, McKnight JL. Epstein-Barr virus transmission via donor organs in solid organ transplantation: polymerase chain reaction and restriction fragment I polymorphism analysis of IR2, IR3, and IR4. *J Virol* 1991;65:976-980.

Chen W, Masterman KA, Basta S, Haeryfar SM, Dimopoulos N, Knowles B, Bennink JR, Yewdell JW. Cross-priming of CD8+ T cells by viral and tumor antigens is a robust phenomenon. *Eur J Immunol* 2004 ;34 :194-199.

Chevallier-Greco AE, Manet P, Chavrier P, Mosnier C, Daillie J, Sergeant A. Both Epstein-Barr virus (EBV)-encoded trans-acting factors, EB1 and EB2 are required to activate transcription from an EBV early promotor. *EMBO J* 1986;5:3243-3249.

Christensen JP, Cardin RD, Branum KC, Doherty PC. CD4+ T cell mediated control of a γ -herpesvirus in B-cell-deficient mice is mediated by IFN- γ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:5135-5140.

Chua H-H, Lee H-H, Chang S-S, Lu C-C, Yeh T-H, Hsu T-Y, Cheng T-H, Cheng J-T, Chen M-R, Tsai C-H. Role of the TSG101 gene in Epstein-Barr virus late gene transcription. *J Virol* 2007;81:2459-2471.

Comoli P, Pedrazzoli P, Maccario R, Basso S, Carminati O, Labirio M, Schiavo R, Secondino S, Frasson C, Perotti C, Moroni M, Locatelli F, Siena S. Cell therapy of stage IV nasopharyngeal carcinoma with autologous Epstein-Barr virus-targeted cytotoxic T lymphocytes. *J Clin Oncol* 2005;23:8942-8949.

Cook ID, Shanahan F, Farrell PJ. Epstein-Barr virus SM Protein. *Virology* 1994;205:217-227.

Crawford DH. Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001;356:461-473.

Creswell P. Invariant chain structure and MHCII function. *Cell* 1996;84:505-507.

Davis JE, Moss DJ. Treatment options for post-transplant lymphoproliferative disorder and other Epstein-Barr virus-associated malignancies. *Tissue Antigens.* 2004;63:285-292.

Diehl V, Henle G, Henle W, Kohn G. Demonstration of a herpes group virus in cultures of peripheral leukocytes from patients with infectious mononucleosis. *J Virol* 1968;2:663-669.

Dongre AR, Kovats S, deRoos P, McCornack AL, Nakagawa T, Pahakova-Vatchkova V, Eng J, Caldwell H, Yates 3rd JR, Rudensky AY. In vivo MHC class II presentation of cytosolic proteins revealed by rapid automated tandem mass spectrometry and functional analyses. *Eur J Immunol* 2001 ;31 :1485-1494.

Doyle MG, Catovsky D, Crawford DH. Infection of leukaemic B lymphocytes by Epstein Barr virus. *Leukemia* 1993;7:1858-1864.

Einsele H, Hebart H. CMV-specific immunotherapy. *Human Immunol* 2004;65:558-564.

Elenitoba-Johnson KS, Jaffe ES. Lymphoproliferative disorders associated with congenital immunodeficiencies. *Semin Diagn Pathol* 1997;14:35-47.

Engelhard VH. Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 1994 ;12 :181-207.

Epstein MA, Henle G, Achong BG, Barr YM. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J Exp Med.* 1965;121:761-770.

Evans AS, Niederman JC. Epstein-Barr virus. In *Viral Infections of Humans. New York, Plenum Press.* 1989; 265-292.

Farina A, Feederle R, Raffa S, Gonella R, Santarelli R, Frati L, Angeloni A, Torrisi MR, Faggioni A, Delecluse H-J. BFRF1 of Epstein-Barr virus is essential for efficient primary viral envelopment and egress. *J Virol* 2005;79:3703-3812.

Feng P, Ren EC, Liu D, Chan SH, Hu H. Expression of Epstein-Barr virus lytic gene BRLF1 in nasopharyngeal carcinoma: potential use in diagnosis. *J Gen Virol* 2000 ;81 :2417-2423.

Feuchtinger T, Matthes-Martin S, Richard C, Lion T, Führer M, Hamprecht K, Handgretinger R, Peters C, Schuster FR, Beck R, Schumm M, Lofti R, Jahn G, Lang P. Safe adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2006;134:64-76.

Fingerroth JD, Weiss JJ, Tedder TF, Strominger JL, Biro PA, Fearon DT. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4510-4514.

Fixman ED, Hayward GS, Hayward SD. *Trans*-Acting requirements for replication of Epstein-Barr virus ori.Lyt. *J Virol.* 1992;66:5030-5039.

Fujii K, Yokoyama N, Kiyono T, Kuzushima K, Homma M, Nishiyama Y, Fujita M, Tsurumi T. The Epstein-Barr virus catalytic subunit physically interacts with the BBLF4-BSLF1-BBLF2-3 complex. *J Virol* 2000;74:2550-2557.

Gan YY, Fones-Tan A, Chan SH, Tsao SY, Li B, Tan WH. Molecular cloning and expression of Epstein-Barr virus antigens in the lambda gt11 expression vector: antibodies towards proteins from the BORF2 and BKRF4 reading frames in nasopharyngeal carcinoma patients. *Intervirology* 1994;37:233-235.

Gannagé M, Münz C. Autophagy in MHC class II presentation of endogenous antigens. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009;335:123-140.

Gao Z, Krithivas A, Finan JE, Semmes J, Zhou S, Wang Y, Hayward D. The Epstein-Barr virus lytic transactivator Zta interacts with the helicase-primase replication proteins. *J Virol* 1998;72:8559-8567.

Garzelli C, Taub FE, Scharff JE, Prabhakar BS, Ginsberg-Fellner F, Notkins AL. Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes produce monoclonal autoantibodies that react with antigens in multiple organs. *J Virol* 1984;52:722-725.

Ginsburg M. Antibodies against the large subunit of the EBV-encoded ribonucleotide reductase in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer.* 1990;45:1048-1053.

Gonnella R, Farina A, Santarelli R, Raffa S, Feederle R, Bei R, Granato M, Modesti A, Frati L, Delecluse HJ, Torrisi MR, Angeloni A, Faggioni A. Characterization and intracellular localization of the Epstein-Barr virus protein BFLF2: interactions with BFRF1 and with the nuclear lamina. *J Virol.* 2005;79:3713-3727.

Gonwa TA, Frost JP, Karr RW. All human monocytes have the capability of expressing HLA-DQ and HLA-DP molecules upon stimulation with interferon-gamma. *J Immunol.* 1986 Jul 15;137:519-524.

Gottschalk S, Rooney CM, Heslop HE. Post-transplant lymphoproliferative disorders. *Annu Rev Med* 2005;56:29-44.

Gradoville NH, Grogan E, Taylor N, Miller G. Differences in the extent of activation of Epstein-Barr virus replicative gene expression among four nonproducer cell lines stably transformed by orip/BZLF1 plasmids. *Virology* 1990;178:345-354.

Graham FL, Smiley J. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by Human Adenovirus Type 5. *J Gen Virol* 1977 ;36 :59-72.

Han Z, Marendy E, Wang Y-D, Yuan J, Sample JT, Swaminathan S. Multiple roles of Epstein-Barr virus SM protein in lytic replication. *J Virol* 2007 ;81 :4058-4069.

Haque T, Wilkie GM, Taylor C, Amlot PL, Murad P, Iley A, Dombagoda D, Britton KM, Swerdlow AJ, Crawford DH. Treatment of Epstein-Barr-virus-positive post-transplantation lymphoproliferative disease with partly HLA-matched allogeneic cytotoxic T cells. *Lancet* 2002;360:436-442.

Hegde NR, Dunn C, Lewinsohn DM, Jarvis MA, Nelson JA, Johnson DC. Endogenous human cytomegalovirus gB is presented efficiently by MHC class II molecules to CD4+ CTL. *J Exp Med*. 2005;202:1109-1119.

Heller KN, Gürer C, Münz C. Virus-specific CD4+ T cells : ready for direct attack. *J Exp Med* 2006;203:805-808.

Henle W, Henle G. Seroepidemiology of the virus. In: Epstein MA, Achong BG, eds. The Epstein-Barr virus. Berlin, Germany: Springer-Verlag. 1979:61-78.

Henle G, Henle W. The virus as the etiologic agent of infectious mononucleosis. In Epstein MA, Achong BS eds. The Epstein-Barr virus. New York: Springer Verlag. 1979:297-320.

Henle W, Henle G, Andersson J, Ernberg I, Klein G, Horwitz CA, Marklund G, Rymo L, Wellinder C, Strauss SE. Antibody responses to Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen (EBNA)-1 and EBNA-2 in acute and chronic Epstein-Barr virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:570-574.

Heslop HE, NG CY, Li C, Smith CA, Loftin SK, Krance RA, Brenner MK, Rooney CM. Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nat Med* 1996;2:551-555.

Heslop HE, Rooney CM. Adoptive cellular immunotherapy for EBV lymphoproliferative disease. *Immunol Rev* 1997;157:217.

Heslop HE. Biology and treatment of Epstein-Barr virus-associated Non-Hodgkin Lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005;260-266.

Hochberg D, Middeldorp JM, Catalina M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Thorley-Lawson DA. Demonstration of the Burkitt's lymphoma Epstein-Barr virus phenotype in dividing latently infected memory cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:239-244.

Holton RH, Gentry GA. The Epstein-Barr virus genome encodes deoxythymidine kinase activity in a nested internal open reading frame. *Intervirology* 1996;39:270-274.

Hsing LC, Rudensky AY. The lysosomal cystein proteases in MHC II antigen presentation. *Immunol Rev* 2005;207:229-241.

Hsu DH, de Waal Malefyt R, Fiorentino DF, Dang MN, Vieira P, de Vries J, Spits H, Mosmann TR, Moore KW. Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF-1. *Science* 1990;250:830-832.

Hurley EA, Thorley-Lawson DA. B cell activation and the establishment of Epstein-Barr virus latency. *J Exp Med* 1988;168:2059-2075.

Imai S, Nishikawa J, Takada K. Cell-to-cell contact as an efficient mode of Epstein-Barr virus infection of diverse human epithelial cells. *J Virol* 1998;72:4371-4378.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunobiology: The immune system in health and disease. 7th Edition. Garland Science Publishing. 2008

Janz A, Oezel M, Kurzeder C, Mautner J, Pich D, Kost M, Hammerschmidt W, Delecluse HJ. Infectious Epstein-Barr virus lacking major glycoprotein BLLF1 (gp350/220) demonstrates the existence of additional viral ligands. *J Virol* 2000;74:10142-10152.

Johannsen E, Luftig M, Chase MR, Weicksel S, Cahir-McFarland E, Illanes D, Sarracino D, Kieff E. Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proc Nat Acad Sci USA* 2004;101:16286-16291.

Joncas J, Boucher J Granger-Julien M, Filion C. Epstein-Barr virus infection in the neonatal period and in childhood. *Can Med Assoc J* 1974;110:33-37.

Kagoya Y, Hangaishi A, Takahashi T, Imai Y, Kurokawa M. High-dose dexamethasone therapy for severe thrombocytopenia and neutropenia induced by EBV infectious mononucleosis. *Int J Hematol* 2010;91:326-327.

Kallin B, Sternås L, Saemundssen AK, Luka J, Jörnval H, Eriksson B, Tao P-Z, Nilsson MT, Klein G. Purification of Epstein-Barr virus DNA Polymerase from P3HR-1 Cells. *J Virol* 1985;54:561-568.

Kanegane H, Miyawaki T, Iwai K, Tsuji T, Tanguchi N. Acute thrombocytopenic purpura associated with primary Epstein-Barr virus infection. *Acta Paediatr Jpn* 1994 ;36:423-426.

Kanegane H, Wado T, Nunogani K, Seki H, Taniguchi N, Tosato G. Chronic persistent Epstein-Barr virus infection of natural killer cells and B cells associated with granular lymphocytes expansion. *Br J Hematol* 1996;71:108-117.

Kawa K. Epstein-Barr virus – associated diseases in humans. *Int J Hematol* 2000;71:108-117.

Khanna R, Burrows SR, Moss DJ. Immune regulation in Epstein-Barr virus associated diseases. *Microbiol Rev.* 1995;59:387-405.

Kieff E, Rickinson AB. Epstein-Barr virus and its replication. In *Fields's Virology*. 5th ed. D. M. Knipe , and P. M. Howley, eds. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA. 2007;2655-2701.

Kilger E, Kieser A, Baumann M, Hammerschmidt W. Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J* 1998;17:1700-1709.

Kittlesen DJ, Brown LR, Braciale VL, Sambrook JP, Gething MJ, Braciale TJ. Presentation of newly synthesized glycoproteins to CD4+ T lymphocytes. An analysis using influenza hemagglutinin transport mutants. *J Exp Med.* 1993;177:1021-1030.

Küppers R. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol* 2003;3:801-812.

Labrecque LG, Xue SA, Kazembe P, Phillips J, Lampert I, Wedderburn N, Griffin BE. Expression of Epstein-Barr virus lytically related genes in African Burkitt's lymphoma: correlation with patient response to therapy. *Int J Cancer* 1999;81:6-11.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–685.

Lan RY, Ansari AA, Lian ZX, Gershwin ME. Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2005;4:351-363.

Landais E, Saulquin X, Bonneville M, Houssaint E. Long-Term MHC class II presentation of the EBV lytic protein BHRF1 by EBV latently infected B cells following capture of BHRF1 antigen. *J Immunol* 2005;175:7939-7946.

Lee SP, Wallace LE, Mackett M, Arrand JR, Searle PF, Rowe M, Rickinson AB. MHC class II-restricted presentation of endogenously synthesized antigen: Epstein-Barr virus transformed B cell lines can present the viral glycoprotein gp340 by two distinct pathways. *Int Immunol* 1993;5:451-460.

Leen A, Meij P, Redchenko I, Middeldorp J, Bloemena E, Rickinson A, Blake N. Differential immunogenicity of Epstein-Barr virus latent-cycle proteins for human CD4(+) T-helper 1 responses. *J Virol* 2001;75:8649-8659.

Leen AM, Myers GD, Bollard CM, Huls MH, Sili U, Gee AP, Heslop HE, Rooney CM. T-Cell Immunotherapy for adenoviral infections of stem-cell transplant recipients. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1062:104-115.

Leung CS, Haigh TA, Mackay LK, Rickinson AB, Taylor GS. Nuclear location of an endogenously expressed antigen, EBNA1, restricts access to macroautophagy and the range of CD4 epitope display. *Proc Nat Acad Sci USA* 2010;107:2165-2170.

Levitskaya J, Coram M, Levitsky V, Imreh S, Steigerwald-Mullen PM, Klein G, Kurilla MG, Masucci MG. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* 1995;375:685-688.

Lindahl T, Adams A, Bjursell G, Bornkamm GW, Kschka-Dierich, Jehn U. Covalently Closed Circular Duplex DNA of Epstein-Barr virus in a Human Lymphoid Cell Line. *J Mol Biol* 1976;102:511-530.

Little RF, Yarchoan R. Treatment of gammaherpesvirus-related neoplastic disorders in the immunosuppressed host. *Semin Hematol* 2003;40:163-171.

Littler E, Zeuthen J, McBride AA, Sorensen ET, Powell KL, Walsh-Arrand JE, Arrand JR. Identification of an Epstein-Barr virus-coded thymidine kinase. *The EMBO Journal* 1986;5:1959-1966.

Litwin SD; Hutteroth TH, Lin PK, Kennard J, Cleve H. Immunoglobulin expression of cells from human lymphoblastoid lines. II. Interrelationship among surface, cellular, and secreted immunoglobulins. *J Immunol* 1974;113:668-672.

Liu YJ, Arpin C. Germinal center development. *Immunol Rev* 1997;156:111-126.

Liu Y, de Waal Malefyt R, Briere F, Parham C, Bridon JM, Banchereau J, Moore KW, Xu J. The EBV IL-10 homologue is a selective agonist with impaired binding to the IL-10 receptor. *J Immunol*. 1997;158:604-613.

Long HM, Haigh TA, Gudgeon NH, Leen AM, Tsang CW, Brooks J, Landais E, Houssaint E, Lee SP, Rickinson AB, Taylor GS. CD4+ T-cell responses to Epstein-Barr virus (EBV) latent-cycle antigens and the recognition of EBV-transformed lymphoblastoid cell lines. *J Virol* 2005;79:4896-4907.

Mackett M, Conway MJ, Arrand JR, Haddad RS, Hutt-Fletcher LM. Characterization and expression of a glycoprotein encoded by the Epstein-Barr virus BamHI I Fragment. *J Virol* 1990;64:2545-2552.

MacLennan IC, Liu YL, Ling NR. B cell proliferation in follicles, germinal centre formation and the site of neoplastic transformation in Burkitt's lymphoma. *Curr Top Microbiol Immunol* 1988;141:138-148.

Magrath I. The pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Adv Cancer Res* 1990;55:133-270.

Marschall M, Leser U, Seibl R, Wolf H. Identification of proteins encoded by Epstein-Barr virus *trans*-Activator genes. *J Virol* 1989;63:938-942.

Martel-Renoir D, Grunewald V, Touitou R, Schwaab G, Joab I. Qualitative analysis of the expression of Epstein-Barr virus lytic genes in nasopharyngeal carcinoma biopsies. *J Gen Virol*. 1995 ;76 :1401-1408.

Marturano J, Longhi R, Casorati G, Protti MP. MAGE-A3₁₆₁₋₁₇₅ contains an HLA-DRβ4 restricted natural epitope poorly formed through indirect presentation by dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 2008;57:207-215.

Mautner J, Pich D, Nimmerjahn F, Milosevic S, Adhikary D, Christoph H, Witter K, Bornkamm GW, Hammerschmidt W, Behrends U. Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 evades direct immune recognition by CD4+ T helper cells. *Eur J Immunol* 2004 ;34 :2500-2509.

McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol* 2005 ;23 :487-513.

Medina-Palazon C, Gruffat H, Mure F, Filhol O, Vingtheux-Didier V, Drobecq H, Cochet C, Sergeant N, Sergeant A, Manet E. Protein kinase CK2 phosphorylation of EB2 regulates its function in the production of Epstein-Barr virus infectious viral particles. *J Virol*. 2007 ;81 :11850-11860.

Meyer CG, May J, Schnittger L. HLA-DP—part of the concert. *Immunol Today*. 1997;18:58-61.

Miller G, Robinson J, Heston L, Lipman M. Differences between laboratory strains of Epstein-Barr virus based on immortalization, abortive infection, and interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;71:4006-4010.

Miller RL, Glaser R, Rapp F. Studies of an Epstein-Barr virus-induced DNA Polymerase. *Virology* 1977;76:494-502.

Milosevic S, Behrends U, Adhikary D, Mautner J. Identification of MHC class II-restricted viral antigens and epitopes by a novel bacterial expression cloning approach. *J Immunol Methods* 2005;306:28-39.

Milosevic S, Behrends U, Adhikary D, Mautner J. 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* 2006;80:10357-10364.

Montone KT, Hodinka RL, Salhany KE, Lavi E, Rostami A, Tomaszewski JE. Identification of Epstein-Barr virus lytic activity in post-transplantation lymphoproliferative disease. *Mod Pathol* 1996;9:621-630.

Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan TA, Mosmann TR. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* 1990;248:1230-1234.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001 ;19 :683-765.

Moosmann A, Bigalke I, Tischer J, Schirrmann L, Kasten J, Tippmer S, Leeping M, Prevalsek D, Jaeger G, Ledderose G, Mautner J, Hammerschmidt W, Schendel DJ, Kolb HJ. Effective and long-term control of EBV PTLD after transfer of peptide-selected T cells. *Blood*. 2010 ;115 :2960-2970.

Münz C, Bickham KL, Subklewe M, Tsang ML, Chahroudi A, Kurilla MG, Zhang D, O'Donnell M, Steinman RM. Human CD4+ T lymphocytes consistently respond to the latent Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA1. *J Exp Med* 2000;191:1649-1660.

Murray PG, Young LS. Epstein-Barr virus infection: basis of malignancy and potential for therapy. *Expert Rev Mol Med* 2001;3:1-20.

Naher H, Gissmann L, Freese UK, Petzoldt D, Helfruch S. Subclinical Epstein-Barr virus infection of both the male and female genital tract. Indication for sexual transmission. *J Invest Dermatol* 1992;98:791-793.

Niederman JC, McCollum RW, Henle G, Henle W. Infectious mononucleosis. Clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *J Am Med Assn* 1968;203:205-209.

Nilsson K, Klein G, Henle W, Henle G. The establishment of lymphoblastoid lines from adult and fetal lymphoid tissues and its independence on EBV. *Int J Cancer* 1971;8:443-450.

Nimmerjahn F, Milosevic S, Behrends U, Jaffee EM, Pardoll DM, Bornkamm GW, Mautner J. Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur J Immunol* 2003 ;33 :1250-1259.

O'Garra AP, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 2004;1:801-805.

Ooka T, Calender A, de Turenne M, Daillie J. Effect of Arabinofuranosylthymine on the replication of Epstein-Barr virus and relationship with a new induced thymidine kinase activity. *J Virol* 1983;46:187-195.

Otahal, Hutchinson PSC, Mylin LM, Teyethia MJ, Teyethia SS, Schell TD. Inefficient cross-presentation limits the CD8+ T cell response to a subdominant tumor antigen epitope. *J Immunol* 2005;175:700-712.

Paludan C, Bickham K, Nikiforow S, Tsang ML, Goodman K, Hanekom WA, Fonteneau JF, Stevanovic S, Munz C. Epstein-Barr nuclear antigen 1-specific CD4+ Th1 cells kill Burkitt's lymphoma cells. *J Immunol* 2002;169:1593-1603.

Paludan C, Schmid D, Landthaler M, Vockerodt M, Kube D, Tuschl T, Munz C. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* 2005;307:593-596.

Papesch M, Watkins R. Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *Clin Otolaryngol* 2001;26:3-8.

Peggs KS, Verfuehrt S, Pizzey A, Khan N, Guiver M, Moss PA, Mackinnon S. Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T cell lines. *Lancet* 2003;362:1375-1377.

Pope JH, Horne MK, Scott W. Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. *Int J Cancer* 1968;3:857-866.

Popescu I, Macedo C, Zeevi A, Nellis J, Patterson KR, Logar A, Rowe D, Reyes J, Rao AS, Storkus WJ, Fung JJ, Metes D. Ex vivo priming of naïve T cells into EBV-specific Th1/Tc1 effector cells by mature autologous DC loaded with apoptotic/necrotic LCL. *Am J Transplant.* 2003;3:1369-1377.

Portnoy J, Ahronheim GA, Ghibu F, Cleaner B, Joncas JH. Recovery of Epstein-Barr virus from genital ulcers. *N Engl J Med* 1984;311:966-968.

Pritchett RF, Hayward SD, Kieff E. DNA of Epstein-Barr virus. I. Comparative Studies of the DNA of Epstein-Barr virus from HR-1 and B95-8 Cells: Size, Structure, and Relatedness. *J Virol* 1975;15:556-569.

Raslova H, Berebbi M, Rajcani J, Sarasin A, Matis J, Kudelova M. Susceptibility of mouse mammary glands to murine gammaherpesvirus 72 (MHV-72) infection: evidence of MHV-72 transmission via breast milk. *Microb Pathog* 2001;31:47-58.

Rickinson AB, Moss DJ. Human cytotoxic T lymphocyte response to Epstein-Barr virus infection. *Annu Rev Immunol* 1997 ;15 :405-431.

Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus. In *Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M. (Eds.) Fields Virology; Lippincott-Raven, Philadelphia 2007; 2603-2654.*

Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, Li CR, Agha ME, Greenberg PD. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 1992;257:238-241.

Riedel A, Nimmerjahn F, Burdach S, Behrends U, Bornkamm GW, Mautner J. Endogenous presentation of a nuclear antigen on MHC class II by autophagy in the absence of CRM1-mediated nuclear export. *Eur J Immunol.* 2008;38:2090-2095.

Robertson KA, Usherwood EJ, Nash AA. Regression of a murine γ -herpesvirus 68-positive B-cell lymphoma mediated by CD4 T lymphocytes. *J Virol* 2001;75:3480-3482.

Rooney CM, Smith CA, Ng CY, Loftin S, Li C, Krance RA, Brenner MK, Heslop HE. Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet* 1995;345:9-13.

Rooney CM, Smith CA, Ng CY, Loftin SK, Sixbey JW, Gan Y, Srivastava DK, Bowman LC, Krance RA, Brenner MK, Heslop HE. Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* 1998;92:1549-1555.

Rowe M, Glaunsinger B, van Leeuwen D, Zuo J, Sweetman D, Ganem D, Middeldorp J, Wiertz EJ, Rensing ME. Host shutoff during productive Epstein-Barr virus infection is mediated by BGLF5 and may contribute to immune evasion. *Proc Nat Acad Sci USA* 2007;104:3366-3371.

Rudensky AY, Preston-Hurlburt P, Hong SC, Barlow A, Janeway Jr CA. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 1991;33:622-627.

Salek-Ardakani S, Arrand JR, Mackett M. Epstein-Barr virus encoded Interleukin-10 inhibits HLA-Class I, Icam-1, and B7 expression on human monocytes: implications for immune evasion by EBV. *Viol* 2002;304:342-351.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory Manual. 2. Auflage. Cold Spring Harbor, N Y Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

Savoldo B, Goss JA, Hammer MM, Zhang L, Lopez T, Gee AP, Lin YF, Quiros-Tejeira RE, Reinke P, Schbert S, Gottschalk S, Finegold MJ, Brenner MK, Rooney CM, Heslop HE. Treatment of solid organ transplant recipients with autologous Epstein Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 2006;108:2942-2949.

Sevilla J, del Carmen Escudero M, Jiminez R, Gonzalez-Vicent M, Manzanares J, Garcia-Novo D, Madero L. Severe systemic autoimmune disease associated with Epstein-Barr virus infection. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004;26:831-833.

Shannon-Lowe CD, Neuhierl B, Baldwin G, Rickinson AB, Delecluse H-J. Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 2006;103:7065-7070.

Silins SL, Cross SM, Elliott SL, Pye SJ, Burrows SR, Burrows SR, Moss DJ, Argaet VP, Misko IS. Development of Epstein-Barr virus-specific memory T cell receptor clonotypes in acute infectious mononucleosis. *J Exp Med* 1996;184:1815-1824.

Sixbey JW. Epstein Barr virus and epithelial cells. In *Advances in viral oncology* 1989, vol. 8 (ed. G. Klein), pp.187-202. New York: Raven.

Sixbey JW, Yak QY. Immunoglobulin A-induced shift of Epstein-Barr virus tissue tropism. *Science* 1992;255:1578-1580.

Steel CM, Evans J, Joss AW, Arthur E. Antibody activity associated with immunoglobulins synthesised by human lymphoblastoid cell lines. *Nature* 1974;252:604-605.

Steven NM. Infectious mononucleosis. *EBV Reports* 1996;3:91-95.

Steven NM, Leese AM, Annels NE, Lee SP, Rickinson AB. Epitope focusing in the primary cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus and its relationship to T cell memory. *J Exp Med* 1996;184:1801-1813.

Steven NM, Annels NE, Kumar A, Leese AM, Kurilla MG, Rickinson AB. Immediate early and early lytic cycle proteins are frequent targets of the Epstein-Barr virus-induced cytotoxic T cell response. *J Exp Med* 1997;185:1605-1617.

Stevens SJ, Verschuuren EA, Verkuujlen SA, Van Den Brule AJ, Meijer CJ, Middeldorp JM. Role of Epstein-Barr virus DNA load monitoring in prevention and early detection of post-transplant lymphoproliferative disease. *Leuk Lymphoma* 2002;43:831-840.

Sternas L, Middleton T, Sugden B. The average number of molecules of Epstein-Barr nucleos antigen 1 per cell does not correlate with the average number of Epstein-Barr virus (EBV) DNA molecules per cell among different clones of EBV-immortalized cells. *J Virol* 1990;64:2407-2410.

Sutkowski N, Palkama T, Ciurli C, Sekaly RP, Thorley-Lawson DA, Huber BT. An Epstein-Barr virus-associated superantigen. *J Exp Med* 1996;184:971-980.

Swaminathan S, Hesselton R, Sullivan J, Kieff E. Epstein-Barr virus recombinants with specifically mutated BCRF1 genes. *J Virol* 1993;67:7406-7413.

Takasaka N, Tajima M, Okinaga K, Satoh Y, Hoshikawa Y, Katsumoto T, Kurata T, Sairenji T. Productive infection of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-genome-positive epithelial cell lines (GT38 and GT39) derived from gastric tissues. *Virology* 1998;247:152-159.

Tamaki H, Beaulieu BL, Somasundaran M, Sullivan JL. Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus in children. *J Infect Dis* 1995;172:739-746.

Tan LC, Gudgeon N, Annels NE, Samasuta P, O'Callaghan CA, Rowland-Jones S, McMichael AJ, Rickinson AB, Callan MF. A re-evaluation of the frequency of CD8+ T cells specific for EBV in healthy virus carriers. *J Immunol* 1999;162:1827-1835.

Tan LC, Mowat AG, Fazou C, Rostron T, Roskell H, Dunbar PR, Tournay C, Romagné F, Peyrat MA, Houssaint E, Bonneville M, Rickinson AB, McMichael AJ, Callan MF. Specificity of T cells in synovial fluid: high frequencies of CD8(+) T cells that are specific for certain viral epitopes. *Arthritis Res* 2000;2:154-164.

Tanner J, Weis J, Fearon D, Whang Y, Kieff E. Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping and endocytosis. *Cell* 1987;50:203-213.

Tatsumi E, Harada S, Bechtold T, Lipscomb H, Davis J, Kuszynski C, Volsky DJ, Han T, Armitage J, Purtilo DT. In-vitro infection of chronic lymphocytic leukemia cells by Epstein-Barr virus (EBV). *Leuk Res* 1986;10:167-177.

Taylor AL, Marcus E, Bradley JA. Post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD) after solid organ transplantation. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;56:155-167.

Taylor GS, Long HM, Haigh TA, Larsen M, Brooks J, Rickinson AB. A role for intercellular antigen transfer in the recognition of EBV-transformed B cell lines by EBV nuclear antigen-specific CD4+ T cells. *J Immunol* 2006;177:3746-3756.

Tewari MK, Sinnathamby G, Rajgopal D, Eisenlohr LC. A cytosolic pathway for MHC class II-restricted antigen processing that is proteasome and TAP dependent. *Nat Immunol* 2005;6:287-294.

Thomas R, Macsween KF, McAulay K, Clutterbuck D, Anderson R, Reid S, Higgins CD, Swerdlow AJ, Harrison N, Williams H, Crawford DH. Evidence of shared Epstein-Barr viral isolates between sexual partners, and low level EBV in genital secretions. *J Med Virol* 2006;78:1204-1209.

Thorley-Lawson DA, Gross A. Mechanisms of disease: persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med* 2004;350:1328-1337.

Toussiot E, Roudier J. Epstein-Barr virus in autoimmune diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2008;22:883-896.

Tsuchiya S. Diagnosis of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002;44:227-238.

Tsurumi T, Daikoku T, Kurachi R, Nishiyama Y. Functional interaction between Epstein-Barr virus DNA Polymerase catalytic subunit and its accessory subunit in vitro. *J Virol* 1993;67:7648-7653.

Vetsika EK, Callan M. Infectious mononucleosis and Epstein-Barr virus. *Expert Rev Mol Med.* 2004;6:1-16.

Voo KS, Peng G, Guo Z, Fu T, Li Y, Frappier L, Wang RF. Functional characterization of EBV-encoded nuclear antigen 1-specific CD4+ helper and regulatory T cells elicited by in vitro peptide stimulation. *Cancer Res* 2005;65:1577-1586.

Vyth-Dreese FA, DelleMijn TA, van Oostveen JW, Feltkamp CA, Hekman A. Functional expression of adhesion receptors and costimulatory molecules by fresh and immortalized B-cell non-Hodgkin's lymphoma cells. *Blood* 1995;85:2802-2812.

Watts C. The exogenous pathway for antigen presentation on major histocompatibility complex class II and CD1 molecules. *Nat Immunol* 2004;5:685-692.

Williams H, Crawford DH. Epstein-Barr virus: the impact of scientific advances on clinical practice. *Blood* 2006;107:862-869.

Yamaguchi J, Hinuma Y, Grace JT. Structure of virus particles extracted from a Burkitt lymphoma cell line. *J Virol* 1967;1:640-642.

Yata J, Desgranges C, de The G, Tachibana T. Lymphocytes in infectious mononucleosis. Properties of atypical cells and origin on the lymphoblastoid lines. *Biomedicine* 1973;19:479-483.

Yates JL, Warren N, Sugden B. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature.* 1985;313:812-815.

Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 2005;2:1542-1552.

Yoshiyama H, Imai S, Shimizu N, Takada K. Epstein-Barr virus infection of human gastric carcinoma cells: implication of the existence of a new virus receptor different from CD21. *J Virol* 1997;71:5688-5691.

Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 2004;4:757-768.

Zhou D, Lin Y, Lott JM, Hislop AD, Canaday DH, Brutkiewicz RR, Blum JS. Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens. *Immunity* 2005;22:571-581.

Zimber U, Adldinger HK, Lenoir GM, Vuillaume M, Knebel-Doeberitz MV, Laux G, Desgranges C, Wittmann P, Freese UK, Schneider U. Geographical prevalence of two types of Epstein-Barr virus. *Virology* 1986;154:56-66.

8 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Struktur des EBV-Virions
- Abb. 2 Lokalisation der Latenzgene im EBV-Genom
- Abb. 3 Linearisierte Darstellung der ORFs
- Abb. 4 Latenztyp I-III des Epstein-Barr-Virus
- Abb. 5 Zyklus der persistierenden EBV-Infektion
- Abb. 6 Endogene Antigenpräsentation auf MHC Klasse II-Molekülen
- Abb. 7 Schematische Darstellung des EBV-Genoms
- Abb. 8 Schematische Darstellung des Vektors pCMV-CHis
- Abb. 9 Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE der in dieser Arbeit untersuchten
- Abb. 10a Vektorkarte pCMV-BALF5-His
- Abb. 10b BALF5 im Western-Blot
- Abb. 10c BALF5-Aminosäuresequenz
- Abb. 11a Vektorkarte pCMV-BGLF5-His
- Abb. 11b BGLF5 im Western-Blot
- Abb. 11c BGLF5-Aminosäuresequenz
- Abb. 12a Vektorkarte pCMV-BBLF4-His
- Abb. 12b BBLF4 im Western-Blot
- Abb. 12c BBLF4-Aminosäuresequenz
- Abb. 13a Vektorkarte pCMV-BORF2-His
- Abb. 13b BORF2 im Western-Blot
- Abb. 13c BORF2-Aminosäuresequenz
- Abb. 14a Vektorkarte pCMV-BFLF2-His
- Abb. 14b BFLF2 im Western-Blot
- Abb. 14c BFLF2-Aminosäuresequenz

- Abb. 15a Vektorkarte pCMV-BILF2-His
- Abb. 15b BILF2-Aminosäuresequenz
- Abb. 16a Vektorkarte pCMV-BXLF1-His
- Abb. 16b BXLF1 im Western-Blot
- Abb. 16c BXLF1-Aminosäuresequenz
- Abb. 17a Vektorkarte pCMV-BMLF1-His
- Abb. 17b BMLF1 im Western-Blot
- Abb. 17c BMLF1-Aminosäuresequenz
- Abb. 18a Vektorkarte pCMV-BCRF1-His
- Abb. 18b BCRF1 im Western-Blot
- Abb. 18c BCRF1-Aminosäuresequenz
- Abb. 19 Experimentelle Strategie zur Generierung von T-Zelllinien mit Spezifität für
- Abb. 20 Passage 4 – GM-CSF-ELISA von EBV-Protein-spezifisch stimulierten CD4+
- Abb. 21 Passage 5 – GM-CSF-ELISA von EBV-Protein-spezifisch stimulierten CD4+
- Abb. 22 Passage 6 – GM-CSF-ELISA von EBV-Protein-spezifisch stimulierten CD4+
- Abb. 23 Passage 7 – GM-CSF-ELISA von EBV-Protein-spezifisch stimulierten CD4+
- Abb. 24 Passage 7 – IFN- γ -ELISA von EBV-Protein-spezifisch stimulierten CD4+ T-
- Abb. 25 Passage 8 – IFN- γ -ELISA von EBV-Protein-spezifisch stimulierten CD4+ T-
- Abb. 26 Passage 9 – IFN- γ -ELISA von EBV-Protein-spezifisch stimulierten CD4+ T-
- Abb. 27 Passage 10 – IFN- γ -ELISA von EBV-Protein-spezifisch stimulierten CD4+ T-
- Abb. 28 IFN- γ -ELISA von Klonen aus BXLF1- oder BALF5 stimulierten CD4+ T-
- Abb. 29 IFN- γ -ELISA eines BMLF1-spezifischen CD4+ T-Zellklons
- Abb. 30 IFN- γ -ELISA von BORF2-spezifischen CD4+ T-Zellklonen
- Abb. 31 HLA-Restriktion der BORF2-spezifischen CD4+ T-Zellklone

9 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1 EBV-assoziierte Erkrankungen lymphatischen Ursprungs
- Tab. 2 MHCII-Genotypen der verwendeten Zelllinien
- Tab. 3 Offener Leserahmen der Gene für lytische EBV-Antigene, die in dieser Arbeit kloniert und exprimiert wurden
- Tab. 4 Ergebnis der T-Zellassays

10 Abkürzungsverzeichnis

AIM	akute infektiöse Mononukleose
Ak	Antikörper
APC	antigenpräsentierende Zellen (<i>antigen presenting cell</i>)
CAEBV	Chronisch-aktive EBV-Infektionen
CDx	<i>Cluster of differentiation x</i>
CLIP	<i>Class II associated invariant chain peptide</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DC	dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNMPs	Desoxyribonucleosidmonophosphate
EA	Frühes Antigen (<i>early antigen</i>)
EBER	Epstein-Barr <i>encoded</i> RNA
EBNA	nukleäres Antigen des EBV (<i>Epstein-Barr virus nuclear antigen</i>)
EBNA-LP	EBNA-leading protein
EBV	Epstein-Barr-Virus
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter (<i>linked</i>) Immunadsorptionstest
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie (<i>colony</i>)-stimulierender Faktor
GvHD	Spender-gegen-Empfänger-Krankheit (<i>graft-versus-host disease</i>)

Gy	Gray
h	Stunde (<i>hour</i>)
HEK 293-Zelle	Menschliche embryonale Nierenzelle (<i>human embryonal kidney cell</i>) 293
HHV4	Humanes Herpes-Virus Typ 4
hIL-10	Humanes Interleukin-10
HLA	humanes Leukozytenantigen (<i>human leukocyte antigen</i>)
HLH	Hämophagozytische Lymphohistiozytose
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HSCT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation (<i>hematopoetic stem cell transplantation</i>)
HSV	Herpes simplex Virus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobase
l	Liter
LCL	lymphoblastoide Zelllinie (<i>lymphoblastoid cell line</i>)
LCL x	Lymphoblastoide Zelllinie eines anonymisierten Spenders
LMP	Latenzmembranprotein (<i>latent membrane protein</i>)
LPD	Lymphoproliferative Erkrankung (<i>lymphoproliferative disease</i>)
M	Molar
MA	<i>Membrane antigens</i>
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
mg	Milligramm
MHC	Major Histokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter

mM	Millimolar
MRA	Mycoplasma Removal Agent
mRNA	Boten (<i>messenger</i>) –RNA
µg	Mikrogramm
µl	microliter
ng	Nanogramm
NPC	Nasopharynxkarzinom (<i>nasopharyngeal carcinoma</i>)
NTA	Nitrilotriacetsäure
OD	Optische Dichte (<i>optical density</i>)
OPD	Ortho-Phenyldiamin
ORF	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
oriLyt	Lytischer Replikationsursprung
oriP	Plasmidaler Replikationsursprung
P	Passage
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Phospat gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PHA	Phytohämagglutinin
pAPC	Professionelle antigenpräsentierende Zellen
PTLD	Post-Transplantations LPD (<i>post-transplant lymphoproliferative disease</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNR	Ribonukleotidreduktase
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOT	Organtransplantation (<i>solid organ transplantation</i>)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TGF-β	<i>Transforming growth factor-β</i>

Th	T-Helferlymphozyt (<i>T helper cell</i>)
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TR	Terminal repeats
Treg	Regulatorische T-Zellen
Tween [®] 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U	Unit
UpM	Umdrehungen pro Minute
VCA	Virales Kapsid-Antigen (<i>viral capsid antigen</i>)
vIL-10	Virales Interleukin-10
°C	Grad Celsius

11 Danksagung

Die Dissertation wurde an der Kinderklinik der Technischen Universität München und dem Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik (Helmholtz Zentrum München) in der Klinischen Kooperationsgruppe (KKG) Pädiatrische Tumorummunologie durchgeführt.

Hiermit möchte ich allen danken, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin und Doktormutter Univ.-Prof. Dr. med. Uta Behrends für die Überlassung der Arbeit, die stetige Ansprechbarkeit bei Fragen und die unermüdliche Motivation, diese Arbeit mit mir zu einem guten Ende zu bringen.

Ganz herzlich möchte ich mich bedanken bei dem stellvertretenden Arbeitsgruppenleiter, PD Dr. rer. nat. Josef Mautner, für die Einführung in die experimentelle Tumorummunologie, die wissenschaftlichen Gespräche, sowie die ausgesprochen freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

Herzlich danke ich der Arbeitsgruppe, allen voran Dr. med. Dinesh Adhikary, Dr. rer. nat. Alexander Riedel und Dr. rer. nat. Thorsten Krause, für viele fachliche Ratschläge und Hilfestellungen, sowie die ausgesprochen kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Danken möchte ich auch Heike Christoph, Brigitte Lechner und Colette Zobywalski als technische Assistenten der KKG.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern die mir das Medizinstudium ermöglicht und mich bei meinen Vorhaben stets unterstützt haben.

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Heike Ulrike Boerschmann, geb. Höhler
Geburtsdatum/ -ort:	18. Juli 1978 in Koblenz
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet

Schulbildung

1984 – 1985	Grundschule Höhr-Grenzhausen
1985 – 1988	Rudolf-Steiner-Schule, Neuwied-Mittelrhein
1988 – 1997	Rudolf-Steiner-Schule, München-Daglfing
06/1997	Allgemeine Hochschulreife, Note: 2,4

Akademische Ausbildung

1999 – 2001	Studium der Medizin, LMU, München
2001 – 2006	Studium der Medizin, TUM, München
05/2006	Ärztliche Prüfung, Gesamtnote 1,83
06/2006	Approbation als Ärztin, Nr. 233148 /Bayerische Landesärztekammer

Beruflicher Werdegang

04/2005 – 08/2005	PJ-Studentin, Innere Medizin, Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, München
08/2005 – 12/2005	PJ-Studentin, Kinder- und Jugendmedizin, Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Klinikum rechts der Isar der TUM, München
12/2005 – 03/2006	PJ-Studentin, Viszeralchirurgie, All India Institute of medical sciences (AIIMS), Neu-Delhi, Indien
12/2006 – 03/2007	Assistenzärztin in Weiterbildung zur Fachärztin für Kinder- und Jugendmedizin an der Kinderklinik Hochried, Murnau

04/2007 – 04/2010 Assistenzärztin und wissenschaftliche Mitarbeiterin am
Institut für Diabetesforschung, München

seit 05/2008 Assistenzärztin Kinderklinik der TUM, Klinikum
Schwabing

Dissertation

seit 03/2004 Untersuchung der CD4+ Immunantwort gesunder
Virussträger gegen Proteine des lytischen Zyklus des
Epstein-Barr-Virus

Experimentelle Arbeit der klinischen
Kooperationsgruppe „Pädiatrische Tumorummunologie“
der Kinderklinik der TUM

bei Frau Univ.- Prof. Dr. med. Uta Behrends

Publikationen

Originalarbeiten

Boerschmann H, Pflueger M, Henneberger L, Ziegler AG, Hummel S. Prevalence and predictors of overweight and insulin resistance in offspring of mothers with gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2010 Aug;33(8):1845-9.

Boerschmann H, Walter M, Achenbach P, Ziegler AG. Survey of recent clinical trials of the prevention and immunointervention of type 1 diabetes. *Dtsch Med Wochenschr.* 2010 Feb;135(8):350-4.

Ziegler AG, Boerschmann H, Walter M. Antigen-based therapy for treating childhood type 1 diabetes. *Curr Diab Rep.* 2009 Apr;9(2):98-9.

Boerschmann H, Kreichauf S, Ziegler AG. Maternale Adipositas ist der stärkste Prädiktor für die Entstehung von Übergewicht bei Kindern von Frauen mit Gestationsdiabetes. Poster presentation DDG 2008, Munich, Germany.

Ziegler AG, Walter M, Boerschmann H. Inflammation of the islets of langerhans and its role for the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep.* 2008 Apr, 8(2):85-6.

Adhikary D, Behrends U, *Boerschmann H*, Pfünder A, Burdach S, Mossmann A, Witter K, Bornkamm GW, Mautner J. Immunodominance of lytic cycle antigens in epstein-barr virus-specific CD4+ T cell preparations for therapy. *PLoS ONE* 2007; 2:e583.

Buchbeitrag

Lehnert H., Rationelle Diagnostik und Therapie i. d. Endokrinologie, Diabetologie und Stoffwechsel, 3. Auflage, Kapitel 11.3, Typ 1 Diabetes, Michael Hummel, Heike *Boerschmann*, Wieland Kiess, Anette-G. Ziegler

Poster

Boerschmann H, Hummel M, Rabl W, Ziegler AG. Characterisation of patients with new onset diabetes and prospective follow-up from birth to diabetes onset. Poster presentation ESPE 2009, New York, USA.

Boerschmann H, Winkler C, Knopff A, Ziegler AG. Auftreten von Inselautoantikörpern und Typ 1 Diabetes mellitus bei Kindern von Frauen mit Gestationsdiabetes. Poster presentation DDG 2009, Leipzig, Germany.

Boerschmann H, Kreichauf S, Ziegler AG. Maternale Adipositas ist der stärkste Prädiktor für die Entstehung von Übergewicht bei Kindern von Frauen mit Gestationsdiabetes. Poster presentation DDG 2008, Munich, Germany.

Boerschmann H, Walter M, Ziegler AG. Postpartale Intervention mit Vildagliptin nach insulinpflichtigem Gestationsdiabetes – die PINGUIN-Studie. Poster presentation DDG 2008, Munich, Germany.