

**Immunologische Mechanismen des Harnstoff-vermittelten
Proteintransfers in antigenpräsentierende Zellen und
dessen Bedeutung für den Nachweis antigenspezifischer T-
Zellen und ihrer Zielstrukturen**



Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
- Biologie und Vorklinische Medizin -
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Sascha Barabas

aus Kolbermoor

Regensburg 2007

Das Promotionsgesuch wurde am 19.04.2007 eingereicht.

Prüfungsausschuss:

- | | |
|---------------|----------------------|
| Vorsitzender: | Prof. Dr. Hauska |
| 1. Gutachter: | Prof. Dr. Tschochner |
| 2. Gutachter: | Prof. Dr. Wolf |
| 3. Prüfer: | Prof. Dr. Schneuwly |

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitates gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt

Regensburg, den 20.04.2007

(Sascha Barabas)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	11
1.1 Das Epstein-Barr Virus	11
1.1.1 Virusaufbau	12
1.1.2 Infektionsstadien	12
1.1.3 Immortalisierung und latente Infektion	14
1.1.4 Lytische Infektion	16
1.1.5 Die Bedeutung der humoralen Immunantwort bei der Kontrolle einer EBV-Infektion	17
1.1.6 Die Bedeutung der zellulären Immunantwort bei der Kontrolle einer EBV-Infektion	18
1.1.7 EBV-assoziierte Krankheitsbilder und ihre Pathogenese	20
1.2 Immunologische Grundlagen als Basis für die Entwicklung neuartiger Verfahren zur Diagnostik, Therapie und Prävention von EBV-Infektionen	23
1.2.1 T-Zellen	24
1.2.2 Die „klassischen“ Prozessierungs- und Präsentationswege	25
.....	27
1.2.3 <i>Cross-presentation</i>	28
1.2.4 Einschleusen exogener Antigenen in den HLA-Klasse-I Weg in vivo	31
1.2.5 Impfstoffentwicklung gegen EBV	33
1.2.6 Therapie EBV-assozierter Erkrankungen	34
1.2.7 T-Zell-Diagnostik	34
1.3 Zielsetzung der Arbeit	37
2. Material und Methoden	40
2.1 Material	40
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	40
2.1.2 Synthetische Peptide	40
2.1.3 Rekombinante Antigene	43
2.1.4 Antikörper	44
2.1.5 Humane Zellen und Nährmedien	45
2.1.6 Materialien für gentechnische Arbeiten	47
2.1.7 Computerprogramme	49
2.2 Methoden	49

2.2.1 Molekularbiologische Methoden	49
2.2.2 Gewinnung und Kultivierung von Zellen	57
2.2.3 Immunologische Methoden	62
 3. Ergebnisse.....	66
 3.1 Molekulare und immunologische Mechanismen des Harnstoff-vermittelten Proteintransfers in APC.....	66
3.1.1 Analyse der durch uBZLF1 aktivierte Lymphozytenpopulationen	66
3.1.2 Bedeutung von IL-12 für die NK-Zellaktivierung nach Stimulation mit uBZLF1.....	69
3.1.4 Einfluss einer PTD-ähnlichen Domäne in BZLF1 auf dessen Transfer in den MHC Klasse I Präsentationsweg von APC	73
3.1.5 Analyse der Fähigkeit verschiedener APC Populationen Epitope aus uBZLF1 cross zu präsentieren	76
3.1.6 Weiterführende Untersuchungen zur Aufnahme und Prozessierung von uBZLF1.....	78
3.1.7 Übertragung des Verfahrens der Harnstoffadjuvierung: <i>Cross-presentation</i> des Parvovirus B19 Proteins NS1	85
 3.2 Identifizierung eines neuen MHC Klasse I restringierten Epitopes in BZLF1 ..	90
3.2.1 Identifizierung eines HLA Moleküls welches ein bislang unbekanntes Peptid präsentiert	90
3.2.2 Grobkartierung des auf HLA B18 präsentierten Epitopes aus BZLF1	92
3.2.3 Feinkartierung des HLA B18 restringierten Epitopes aus BZLF1	94
 3.3 Überwachung von virologischen, serologischen und immunologischen Parametern in immunsupprimierten Patienten nach Nierentransplantation	96
 4. Diskussion	101
 4.1 Harnstoff-adjuviertes BZLF1 (uBZLF1) aktiviert verschiedene T- und NK- Zellpopulationen.....	101
4.2 Der Transfer von uBZLF1 in den MHC Klasse I Präsentationsweg wird durch Harnstoff-Adjuvierung, nicht aber durch eine putative Proteintranslokationsdomäne vermittelt	103
4.3 Verschiedene APC Populationen sind in der Lage uBZLF1 zu prozessieren.	105
4.4 Untersuchungen der Aufnahme und Prozessierung von Harnstoff-adjuviertem BZLF1	107
4.5 Übertragung des Verfahrens der Harnstoff-Adjuvierung auf das Parvovirus NS1 Protein.....	109

4.6 Identifizierung eines neuen HLA-B18 restriktierten CTL Epitopes in uBZLF1	111
4.7 Bestimmung virologischer, serologischer und immunologischer Parameter der EBV Infektion in nach Nierentransplantation immunsupprimierten Patienten	113
Literatur	116
Zusammenfassung	128
Publikationsliste	131
Danksagung	134

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µ	mikro (10^{-6})
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ADCC	Antikörper-abhängige Zell-Zytotoxizität (<i>antibody dependent cell cytotoxicity</i>)
Antp	Antennapedia
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BFA	Brefeldin A
BL	Burkitt's -Lymphom
bp	Basenpaar
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CHQ	Chloroquin
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalie Virus
CTL	Zytotoxische T-Zellen (cytotoxic T-cells)
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid
dim	vermindert (diminished)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure (DNS)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DP	Doppelt positiv
DTT	Dithiotreithol
E	Extinktion
EBNA	<i>EBV nuclear antigen</i>
EBV	Epstein-Barr Virus
ECD	PE-TexasRed Konjugat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enzym chemolumineszenz</i>

EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Titriplex III)
ELISpot	<i>enzyme-linked-immunospot</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERG	Eppendorff Reaktionsgefäß
Exc	Extinktion
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FS	<i>Forward scatter</i>
g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
gp	Glycoprotein
h	Stunde
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HBsAg	Hepatitis B Virus Oberflächen Antigen
HD	Morbus Hodgkin (<i>Hodgkin disease</i>)
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes Wasser aus einer Millipore Anlage
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Merrettich-Peroxidase)
iDC	Immature dendritische Zellen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IM	infektöse Mononukleose
k	kilo
kbp	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
L/l	Liter
LCL	lymphoblastoide Zelllinien
LMP	Latentes Membran Protein
LPS	Lipopolysaccharid (Endotoxin)
Lsg.	Lösung
µ	Mikro (10^{-6})
m	Meter oder Milli
M	Molar (Mol pro Liter)
mDC	Mature dendritische Zellen
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (<i>major-histocompatibility complex</i>)
min	Minute
ml	Milliliter
MW	Molekulargewicht
n	Nano (10^{-9})

NaDoc	Natriumdeoxycholat
NBT	4-Nitro blue tetrazolium chloride
n.d.	<i>not detected</i>
NK	Natürliche Killer (-Zellen)
NPC	Nasopharynxkarzinom
OVA	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	Peripherie Blutlymphozyten
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
Pc5	Peridinin chlorophyll protein-cyanin 5.5
PE	Phycoerithrin
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
pH	Konzentration der H ⁺ -Ionen in einer Lösung
PI	Propidium Iodid
pmol	Picomol
PTD	Proteintransduktionsdomäne
PTLD	<i>post transplant lymphoproliferative disorder</i>
pZTL	Vorläufer (<i>precursor</i>) zytotoxische T-Zelle
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RRE	<i>R responsive element</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfate
sek	Sekunde
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
SFC	<i>spot forming cell</i>
SS	<i>Side scatter</i>
Strep	Streptavidin
Tab.	Tabelle
TAP	<i>Transporter associated with antigen processing</i>
Tat	<i>transactivator of transcription</i>
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung (<i>Tris Buffered Saline</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
TTBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20 (<i>Tween-Tris Buffered Saline</i>)
TZM	T-Zell Medium
TZR	T-Zell Rezeptor
U	Enzymeinheit (Units)
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht

v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
VCA	<i>virus capsid antigen</i>
VLP	Virus-ähnlicher Partikel (<i>virus-like particle</i>)
VZV	Varizella Zoster Virus
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZRE	<i>Z-response element</i>
z.T.	zum Teil

Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren

A	Alanin	L	Leucin
R	Arginin	K	Lysin
N	Asparagin	M	Methionin
C	Cystein	F	Phenylalanin
Q	Glutamin	P	Prolin
E	Glutaminsäure	S	Serin
G	Glycin	T	Threonin
H	Histidin	W	Tryptophan
I	Isoleucin	Y	Tyrosin
D	Asparaginsäure	V	Valin

1. Einleitung

1.1 Das Epstein-Barr Virus

Das ubiquitäre Epstein-Barr Virus (EBV) tritt mit einer Prävalenz von über 90% bei Menschen auf (Masucci & Ernberg, 1994). Es gehört zur Familie der Herpesviren, innerhalb derer es der Unterfamilie der Gammaherpesvirinae zugeordnet wird. Entdeckt wurde das EBV von Tony Epstein und Yvonne Barr, die es als das infektiöse Agens für das bei Kindern in Äquatorialafrika häufige Burkitt's -Lymphom (BURKITT, 1962) postulierten. Diese beiden Wissenschaftler wiesen Herpesvirus-ähnliche Partikel in einem kleinen Teil der Burkitt's -Lymphomzellen nach (EPSTEIN, ACHONG et al., 1964). Von Gertrud und Werner Henle wurden diese Partikel als neue Vertreter der Familie der Herpesviren klassifiziert (Henle & Henle, 1966).

In der Regel findet die Erstinfektion mit EBV nach Übertragung durch Speichel in der frühen Kindheit statt und verläuft meist klinisch inapparent. Dagegen resultieren Primärinfektionen bei Jugendlichen und Erwachsenen gehäuft in dem Auftreten einer Infektiösen Mononukleose (IM), auch als Pfeiffer'sches Drüsenvirus bekannt. Das lymphotrope Virus persistiert wie alle anderen Herpesviren nach der Erstinfektion lebenslang im Menschen. In latent infizierten Zellen liegt das 172 - 186 kbp umfassende virale Genom episomal, zirkularisiert, in mehreren Kopien im Zellkern vor. Eine Integration der viralen Erbinformation in das Genom der Wirtszelle konnte in Burkitt's -Lymphom-(BL)-Zelllinien (Delecluse, Bartnizke et al., 1993) und lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) (Hurley, Agger et al., 1991) beobachtet werden.

Die Nomenklatur der EBV Gene basiert auf Größe und Orientierung der beim Verdau mit der Restriktionsendonuklease *BamH1* entstandenen Subfragmente. Ihrer Größe nach wurden diese Fragmente alphabetisch benannt. So ist das A-Fragment das größte, B- das zweitgrößte und so weiter. Die einzelnen Leserahmen werden den Fragmenten auf denen sie liegen zugeordnet und durchnummeriert. Dabei wird berücksichtigt, ob sie in rechter (*right frame*, RF) oder linker (*left frame*, LF) Leserichtung orientiert sind. Aus dieser Angabe lässt sich ersehen, auf welchem DNS-Strang das jeweilige Gen kodiert ist. So liegt das Gen von BZLF1 in dem ersten nach links orientierten offenen Leserahmen des nach einem *BamH1* Verdau entstandenen Z-Fragments. Des Weiteren werden die Proteine auch unter Verwendung ihrer Molekulargewichte benannt. So steht beispielsweise gp350/220 für ein Glykoprotein entsprechender Größe.

1.1.1 Virusaufbau

Das Epstein-Barr Virus ist wie alle Herpesviren behüllt und weist einen Durchmesser von 120 bis 180 nm auf. In die Lipidhülle sind zahlreiche Membranproteine eingelagert, von denen die viralen Glykoproteine gp350/220 und gp85 den größten Anteil ausmachen (Heineman, Gong et al., 1988). Unterhalb der Membran befindet sich die Tegumentschicht und das aus 162 Kapsomeren bestehende Nukleokapsid, wobei ein Kapsomer wiederum aus drei Kapsomerproteinen mit den Molekulgewichten 28, 47 und 160 kD besteht (Dolyniuk, Pritchett et al., 1976). Im Nukleokapsid liegt das virale Genom als doppelsträngige, lineare DNS vor, die um ein virales Kernprotein (*core*) gewickelt ist.

1.1.2 Infektionsstadien

Das Epstein-Barr Virus wird durch Speichel auf die Mund- und Rachenschleimhaut, in der Epithelzellen und B-Lymphozyten in enger Nachbarschaft vorliegen, übertragen. Welche Zellpopulation das primäre Ziel einer EBV-Infektion darstellt, konnte bis *dato* noch nicht eindeutig geklärt werden. Es gibt jedoch starke Hinweise darauf, dass B-Lymphozyten die primären Zielzellen des Virus darstellen (Karajannis, Hummel et al., 1997). Die Infektion der B-Zellen verursacht eine polyklonale B-Zellaktivierung, die eine massive humorale und zelluläre Immunantwort auslöst. Dieser Vorgang äußert sich in den bei der Infektiösen Mononukleose (IM) beobachteten hämatologischen Markern (Lymphozytose, verändertes Verhältnis von CD8⁺ zu CD4⁺ Zellen) sowie klinischen Symptomen wie Fieber, Hals-Rachen-Entzündung, Schwellung der Lymphknoten, der Milz und der Tonsillen. Der lytischen Replikation in den Zellen des oropharyngealen Epithels oder in den Mukosa-assoziierten lymphatischen Geweben folgt die Etablierung der Latenz in infizierten B-Lymphozyten, was zur Schaffung eines stabilen *Pools* an nicht-lytisch infizierten Zellen führt und damit die Persistenz des Virus gewährleistet (Tierney, Steven et al., 1994).

Vermutlich wandern Lymphozyten, die aufgrund der Differenzierung nach Antigenkontakt permissiv für die lytische Vermehrung geworden sind, in den Bereich des Hals-Rachenraums und können dort vom Immunsystem nicht erkannt werden. Die Produktion der Viren für die Übertragung erfolgt in diesem Bereich. Die hauptverantwortliche Zellpopulation ist dabei gegenwärtig unbekannt. Bislang war die Ansicht verbreitet, dass die Virusvermehrung in der Mundschleimhaut stattfindet (Masucci & Ernberg, 1994). Diese Hypothese wurde jedoch in der letzten Zeit wieder angezweifelt, da bei der Analyse von Speichelproben und histologischen Sektionen

EBV nur in B-Lymphozyten, nicht aber in Epithelzellen nachweisbar war (Karajannis, Hummel, Anagnostopoulos, & Stein, 1997).

1.1.2.1 Adsorption

Wie alle Gammaherpesviren besitzt das EBV ein sehr enges Wirtsspektrum. Als Rezeptor für die Adsorption von EBV wurde CD21 identifiziert (Fingeroth, Weis et al., 1984). CD21 ist der Rezeptor für den Komplementfaktor C3d, der zur Superfamilie der Immunglobuline gehört (Moore, Cooper et al., 1987). Da dieser Oberflächenmarker bevorzugt auf B- und T-Lymphozyten vorkommt, infiziert das EBV hauptsächlich diese Zellpopulationen. Der virale Bindungspartner von CD21 ist das Glycoprotein gp350/220 (Tanner, Whang et al., 1988).

Derzeit wird der zelluläre Rezeptor für EBV auf Epithelzellen noch kontrovers diskutiert. Bekannt ist, dass Epithelzellen nur sehr wenige CD21-Moleküle auf ihrer Oberfläche tragen und die Adsorption von EBV an diese Zellen im Vergleich zu B-Lymphozyten sehr ineffizient verläuft. Bislang ist unklar, ob bei der Adsorption von EBV an epitheliale Zellen noch weitere, bislang nicht identifizierte Rezeptoren beteiligt sind. Zur Entstehung des Nasopharynxkarzinoms ist die Infektion von Epithelzellen durch EBV allerdings notwendig (Becker, Leser et al., 1991).

1.1.2.2 Penetration und Uncoating

Die Bindung des EBV-Hüllproteins gp350/220 an den CD21-Rezeptor der Wirtszelle induziert eine Quervernetzung der Rezeptormoleküle (Tanner, Weis et al., 1987) und die nachfolgende Internalisierung der Rezeptor-gebundenen Viruspartikel in zytoplasmatische Vesikel (Carel, Myones et al., 1990). In diesen Vesikeln kommt es zur Fusion der viralen und vesikulären Membranen und dadurch zur Freisetzung des Nukleokapsides und des Teguments in das Zytoplasma (Tanner, Weis, Fearon, Whang, & Kieff, 1987).

16 h nach der Infektion enthält jede infizierte Zelle ein durch homologe Rekombination der *terminal repeats* entstandenes episomales EBV-Genom (Lindahl, Adams et al., 1976), das in der Regel extrachromosomal in mehrfacher Kopienzahl im Nukleoplasma verbleibt. Ob sich nun die Latenz oder die replikative Phase etabliert, wird mit großer Wahrscheinlichkeit von zellulären Transkriptionsfaktoren entschieden (Miller, 1990), welche die Aktivität der beiden viralen Gene BZLF1 und BRLF1 zelltyp- und differenzierungsspezifisch steuern.

1.1.2.3 Zusammenlagerung und Freisetzung neuer Virionen

Beim Eintritt in den lytischen Zyklus erfolgt im Nukleus die Zusammenlagerung des Nukleokapsids. Eine erste Umhüllung erhält das Virus beim Durchtritt durch die innere Kernmembran in das Lumen des endoplasmatischen Retikulum (ER). Durch Fusion dieser primären Hüllmembran mit der Membran des ER wird das Nukleokapsid in das Zytosol freigesetzt. Bei der Durchquerung der Zyttoplasmamembran oder der Membran von Post-Golgi-Vesikeln erhalten diese Nukleokapside ihre entgültige Membran. Dieser Vorgang ist innerhalb der Familie der Herpesviren einzigartig, da alle anderen Vertreter ihre Hülle beim Durchtritt durch die Kernmembran erhalten (Spear, 1985).

1.1.3 Immortalisierung und latente Infektion

Im Anschluss an die replikative Phase kann das Epstein-Barr Virus wie alle Herpesviren in ihren Zielzellen in einem inaktiven Zustand, der sogenannten Latenz, persistieren. Durch entsprechende Stimuli kann diese Latenz wieder aufgehoben werden (Roizman, 1996) und es kommt erneut zu einer replikativen Phase. In einem solchen Fall spricht man von einer Reaktivierung. Eine Reihe von Versuchen deutet darauf hin, dass die Mehrzahl der an der Immortalisierung beteiligten Proteine nicht direkt an der Etablierung der Latenz beteiligt ist (Rowe, 1999).

1.1.3.1 Immortalisierung

Das Epstein-Barr Virus immortalisiert infizierte B-Lymphozyten überaus effizient (Henderson, Miller et al., 1977). Die Ähnlichkeit dieser Zellen mit Immunoblasten führte zu ihrer Namensgebung als lymphoblastoide Zelllinien (LCL). Die Fähigkeit von EBV, B-Zellen zu immortalisieren ist so bedeutungsvoll, weil sie mit der Pathogenese lymphoproliferativer Erkrankungen in Verbindung steht (Klein, 1989). Typisch für die durch das Virus verursachte Lymphoproliferation ist die Expression mindestens zehn viralen Gene. Wichtig ist dabei die Expression der sechs *EBV nuclear antigens* Gene (EBNA1-6) und der beiden latenten Membranprotein Gene (LMP1 und LMP2). Die Proteine EBNA1, EBNA2, EBNA3A und -3C, EBNA5 und LMP1 sind notwendig, um B-Lymphozyten zu immortalisieren (Roth, Curiel et al., 1994; Hammerschmidt & Sugden, 1989; Cohen, Wang et al., 1991; Kaye, Izumi et al., 1993).

1.1.3.2 Latenz

Unabhängig vom Verlauf der Primärinfektion, führt die Persistenz des Virus zu einem lebenslangen Virusträgerstatus mit Phasen zeitweiliger Virusfreisetzung in den Speichel (Yao, Rickinson et al., 1985). Die Infektion führt zu einem charakteristischen Muster virusspezifischer Antikörper gegen verschiedene virale Proteine der Latenz und der lytischen Vermehrungsphasen, einer hohen Frequenz an EBV-spezifischen Vorläufer zytotoxischer T-Zellen (pCTL) und einem *Pool* an latent infizierten B-Lymphozyten (Khan, Miyashita et al., 1996), die sich der Erkennung durch das Immunsystem entziehen.

Der Ort, an dem die Persistenz stattfindet, ist vermutlich das lymphoide Kompartiment (Yao, Ogan et al., 1989; Gratama, Oosterveer et al., 1988), möglicherweise ruhende Gedächtnis-B-Lymphozyten. Im Blut eines gesunden, seropositiven Spenders sind zwischen 10^1 und 10^3 von 10^7 B-Lymphozyten mit EBV infiziert und stellen vermutlich das latente Reservoir des Virus dar (Babcock, Decker et al., 1998). An der Aufrechterhaltung der Latenz ist möglicherweise das LMP2 Protein des Virus beteiligt, das in der Lage ist, die zur Reaktivierung führende Signalkaskade nach Stimulation der ruhenden B-Zellen über deren membranständigen B-Zellrezeptor zu hemmen (Miller, Burkhardt et al., 1995). Auf diese Weise wird die Menge der im peripheren Blut zirkulierenden infizierten Zellen konstant gehalten. Ein anderes, an der Aufrechterhaltung der Latenz beteiligtes Protein, ist EBNA1. Durch Förderung der episomalen Replikation sorgt es dafür, dass das EBV bei der Teilung der Wirtszelle nicht verloren geht.

Latent durch EBV infizierte Zellen, die bis zu acht virale Proteine synthetisieren können (EBNA1, EBNA2, EBNA3A/3B/3C, EBNA6, LMP1 und LMP2A) werden von virusspezifischen, zytotoxischen T-Zellen effizient erkannt und eliminiert (Khanna, Burrows et al., 1995). Nach bisheriger Ansicht liegt die fehlende Erkennung EBV-infizierter EBNA1-exprimierender Zellen darin begründet, dass sich dieses Protein aufgrund einer Glycin-Alanin-Wiederholung, der Prozessierung durch das Proteasom und dadurch der Präsentation auf HLA-I entzieht (Levitskaya, Coram et al., 1995). Neuere Untersuchungen von Rickinson und Kollegen belegen, dass die fehlende Erkennung von EBNA1 exprimierenden Zellen durch EBNA1-spezifische pCTL aber nicht auf der Wirkung der GA-Wiederholung sondern auf einer generell schwachen Expression des EBNA1 Proteins beruht.

Ruhende, infizierte Zellen können aus einer Phase der Latenz in eine Phase des Wachstums eintreten, was zur Immortalisierung dieser Zellen führt. In diesen Zellen lässt sich die Expression der Proteine EBNA1 - 6, LMP1 und LMP2 nachweisen. Neben der Immortalisierung und Proliferation führt dies allerdings auch zu einer

spezifischen Erkennung und Zerstörung dieser Zellen durch Effektoren des zellulären Immunsystems (Khanna, Burrows, & Moss, 1995).

1.1.4 Lytische Infektion

Es wurde gezeigt, dass Epithelzellen, abhängig von ihrem Differenzierungsgrad, permissiv für den lytischen Zyklus sind (Sixbey, Nedrud et al., 1984). Andere Untersuchungen belegten, dass die lytische Replikation bei Patienten mit IM nicht in Epithelzellen stattfindet. Ebenso wurde in gesunden Spendern eine lytische Replikation ausschließlich in B-Lymphozyten im lymphoepithelialen Gewebe des Hals-Rachenraums nachgewiesen (Anagnostopoulos, Hummel et al., 1995; Tao, Srivastava et al., 1995).

Die Induktion des lytischen Zyklus führt in infizierten Zellen zu den, für Herpesviren charakteristischen zytopathischen Effekten. Über 80 verschiedene virale RNS-Spezies treten nach dem Eintritt in den lytischen Zyklus kaskadenartig in Erscheinung (Takada & Ono, 1989). Die Einteilung der exprimierten RNS-Spezies erfolgt nach ihrem zeitlichen Auftreten. So ordnet man die Genprodukte drei Klassen zu. Zuerst erscheinen die *immediate-early* RNS Moleküle (z.B. BZLF1, BRLF1), gefolgt von den *early* Transkripten (z.B. BMLF1) bis schließlich die *late* RNSs (kodierend vorwiegend für Strukturproteine) transkribiert werden.

In vitro kann die Latenz durch Phorbolester, N-Butyrat, Calcium-Ionophore oder durch Quervernetzung von Oberflächenimmunglobulinen aufgehoben werden (Bauer, Hofler et al., 1982; Luka, Kallin et al., 1979; Mellinghoff, Daibata et al., 1991). Auch *in vivo* kommt es entweder durch Stress oder spontan ausgelöst zum Übergang aus der Latenz in den lytischen Zyklus. Die ersten bei dieser Umstellung exprimierten Proteine sind die *immediate-early* Transaktivatorproteine BZLF1, BRLF1, und BL'LF-1 (Biggin, Bodescot et al., 1987; Marschall, Schwarzmann et al., 1991). Funktion dieser bereits zwei Stunden nach Induktion exprimierten Proteine (Packham, Brimmell et al., 1993) ist die Regulation der Expression der *early* Gene. Von besonderer Bedeutung ist das 38 kD große BZLF1 Protein, welches in latent infizierten B-Lymphozyten in der Lage ist, die Latenz zu beenden und den lytischen Zyklus einzuleiten. Seine Funktion übt dieses Protein als Transkriptionsfaktor aus, der als Homodimer an *Z-responsive-elements* (ZRE) in den Promotoren unterschiedlicher *early*-Gene bindet, und diese aktiviert. Neben der Expression der *early*-Gene vermag BZLF1 auch die Replikation des Virus sowie die Expression der *late*-Gene regulieren. Später beeinflusst es zudem die Assemblierung der Virionen (Buisson, Manet et al., 1989).

Die Fähigkeit eines weiteren *immediate-early*-Genproduktes, des 96 kD großen, phosphorylierten Proteins BRLF1, die Latenz zu brechen, wird kontrovers diskutiert. So widerlegten neuere Untersuchungen von Ragoczy und Mitarbeitern (Ragoczy, Heston et al., 1998) die früher vorherrschende Ansicht, dass BRLF1 alleine nicht ausreichend ist, um den lytischen Zyklus einzuleiten (Cox, Mathieson et al., 1990). Die Ursache für die kontroversen Ergebnisse beruht möglicherweise auf der Beteiligung zellspezifischer Faktoren (Zalani, Holley-Guthrie et al., 1996). Die vom BRLF1 Homodimer erkannte DNS Sequenz nennt man *R-responsive-element* (RRE). Den beiden Transaktivatorproteinen BZLF1 und BRLF1 ist gemein, dass sie ihre eigene Expression hochregulieren.

Die von den *immediate-early*-Proteinen durch Bindung an die entsprechenden Promotorbereiche induzierten *early*-Gene werden noch vor der Replikation des viralen Genoms exprimiert. Gegen Ende des lytischen Zyklus erfolgt dann die Expression der *late*-Gene, welche in erster Linie für Strukturproteine kodieren. Prominente Vertreter dieser Gruppe sind das 150 kD große virale Kapsidantigen (VCA), das Tegumentprotein BNLF1 sowie die in den Leserahmen BLLF1 und BALF4 kodierten Glykoproteine gp350/220 und gp85.

1.1.5 Die Bedeutung der humoralen Immunantwort bei der Kontrolle einer EBV-Infektion

Während der Infektiösen Mononukleose kommt es infolge der polyklonalen B-Zellaktivierung zur Bildung von gegen unterschiedliche Antigene gerichteten heterophilen Immunglobulinen und Autoantikörpern (Henle & Henle, 1981). Sie stellen eine erste Indikation für eine frische EBV-Infektion dar. Die akute Primärinfektion korreliert mit dem Auftreten und Titeranstieg von anti-VCA IgM Antikörpern. Während der Rekonvaleszenz werden sie von anti-VCA IgG Antikörpern abgelöst, die sich auf einem stabilen Niveau einpendeln. Die zur selben Zeit auftretenden IgG Antikörper gegen Antigene aus *early*-Proteinen sind nach der Primärinfektion bei asymptomatischen Virusträgern nicht mehr messbar. Erst sehr spät im Krankheitsverlauf werden neutralisierende Antikörper gegen die Hüllproteine gp350/220 gebildet und können somit nicht zur Kontrolle der Virusverbreitung bei einer Erstinfektion beitragen. Antikörper gegen gp350/220 und gegen gp110 besitzen noch eine weitere protektive Wirkung, da sie durch Bindung an diese, in der replikativen Phase auf der Oberfläche infizierter Zellen befindlichen Hüllproteine, eine Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) induzieren (Khyatti, Patel et al., 1991; Jilg, Bogedain et al., 1994). Obgleich der ADCC-Mechanismus bei der Kontrolle einer etablierten Infektion keine Rolle zu spielen scheint, schützt er jedoch nach

älteren Untersuchungen vor einer erneuten Infektion mit EBV (Rickinson & Moss, 1997). Neuere Studien an gesunden Individuen belegen allerdings die Existenz von EBV-Superinfektionen, was wenn man die multiple Infektion mit mehreren EBV-Genotypen in dem Zeitraum vor Ausbildung einer immunologischen Kontrolle ausschließt, darauf hindeutet, dass eine EBV-Infektion nicht vor einer Überinfektion mit einem anderen Genotyp schützt (Walling, Brown et al., 2003). Gestützt wird diese Hypothese durch epidemiologische Daten bei anderen Humanen Herpesviren. So belegen Untersuchungen, dass mit attenuierten Varizella Zoster Virus (VZV) geimpfte Individuen nicht vor einer Superinfektion mit einem anderen Virusstamm geschützt sind (Ampofo, Saiman et al., 2002). Die Höhe der gegen lytische Antigene gerichteten Antikörpertiter korreliert häufig mit der Stärke der Virusreplikation. In wieweit die humorale Immunantwort zur Kontrolle einer EBV-Infektion beiträgt ist nicht bekannt. Der Beitrag von Antikörpern zur Kontrolle infizierter Zellen der Latenz und immortalisierter Zellen ist jedoch sicherlich gering, da diese Zellen keine der für Antikörper erkennbaren späten Proteine exprimieren. Die Kontrolle über diese Infektionsstadien wird von der zellulären Immunantwort vermittelt, die spezifisch Epitope aus EBV-Proteinen latent infizierter und immortalisierter Zellen erkennt (Rickinson & Moss, 1997).

1.1.6 Die Bedeutung der zellulären Immunantwort bei der Kontrolle einer EBV-Infektion

Eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle von EBV-Infektionen spielt die zelluläre Immunantwort. Zytotoxische T-Zellen erkennen hierbei virusinfizierte Zellen, welche Bruchstücke (Epitope) endogener viraler Proteine in Verbindung mit HLA-Klasse-I auf ihrer Oberfläche präsentieren und zerstören diese durch Lyse oder das Auslösen von Apoptose. Bei der überwiegenden Mehrzahl betroffener Personen wird so eine EBV-Infektion sehr erfolgreich kontrolliert und das Auftreten EBV-assozierter Erkrankungen verhindert.

So zeigen Patienten, die eine akute IM entwickeln, starke CTL Reaktivitäten gegen verschiedene Epitope aus latenten und lytischen EBV Antigenen. Die meisten bekannten CTL Epitope wurden hierbei in den lytischen Antigenen BRLF1, BALF2, BMRF1, BMLF1, BHLF1 und BZLF1 beschrieben. In neueren Studien wurde aber auch die Existenz starker CTL Reaktivitäten gegen die EBV Strukturantigene gp350, gp85 und gp110 gezeigt (Khanna, Sherritt et al., 1999). Manche dieser Reaktivitäten können enorme Ausmaße erreichen. So können in HLA B8 positiven Individuen während einer akuten IM bis zu 44% der CD8⁺ CTL eine Spezifität für ein Epitop innerhalb des *immediate early* Proteins BZLF1 aufweisen. Der Großteil dieser

antigenspezifischen CTL zeigt mit der Expression von HLA DR, CD38 und CD45RO den klassischen Phänotyp aktiverter T-Zellen. Auf der anderen Seite sind die CTL Vorläuferfrequenzen gegen Antigene der Latenz mit 1,2 bis 2,2% relativ gering (Callan, Tan et al., 1998).

Unter den Antigenen der Latenz ist das Phänomen der Immundominanz in einer Studie mit über 60 gesunden Individuen entdeckt worden. Die CTL Reaktivitäten gegen Epitope aus der EBNA3 Familie (EBNA3, -4 und -6) verhalten sich dominant gegenüber der Erkennung von Epitopen aus anderen latenten Antigenen (Khanna, Burrows, & Moss, 1995). Dieses Muster der klonalen Dominanz bildet sich schon früh in der Primärinfektion aus und bleibt danach für mindestens drei Jahre bestehen (Silins, Cross et al., 1996).

Ein weiterer interessanter Befund bei der CTL Erkennung von Epitopen aus latenten Antigenen ist, dass diese vornehmlich in Verbindung mit HLA B Allelen wie HLA B7, -B8, -B27 und -B44 präsentiert werden, wohingegen auf HLA A Allelen präsentierte Epitope nur schwache CTL Antworten induzieren (Khanna, Burrows, & Moss, 1995). Die CTL Reaktivitäten gegen die *immediate early* Antigene BZLF1 (Bogedain, Wolf et al., 1995) und BRLF1 (Pepperl, Benninger-Doring et al., 1998) sind auch in gesunden EBV seropositiven Individuen stark. Durch diese Reaktivitäten werden latent infizierte Zellen bei dem Übergang in den lytischen Zyklus rechtzeitig vor der Freisetzung von Viruspartikeln erkannt und vernichtet. Dagegen besitzen gesunde Spender nur sehr schwache CTL Reaktivitäten gegen die Strukturantigene gp85, gp110 und gp350. Die Immundominanz mancher Antigene mag darin begründet sein, dass diese in höherer Konzentration in den infizierten Zellen vorliegen oder eine effizientere Epitopprozessierung durch das Immunproteasom aufweisen. Dieses Phänomen kann auf unterschiedlichen Affinitäten von Peptiden zu den jeweiligen Bindestellen auf den HLA Molekülen beruhen. Vergleicht man quantitativ die CTL Reaktivitäten auf verschiedene Antigene ausgehend von der Primärinfektion bis weit in die Latenz hinein, stellt man fest, dass es sich bei späteren Antworten nicht um eine abgeschwächte Primärantwort handelt. So werden zum Beispiel die zu Beginn beobachtbaren Unterschiede in der Erkennung von immundominanten und subdominanten Epitopen geringer. Wie oben bereits erwähnt, nimmt auch die Vorläuferfrequenz der BZLF1 spezifischen CTL nach der Rekonvaleszenz einer akuten IM ab, bleibt jedoch gut messbar. Das Auftreten von CD8⁺ CTL Antworten während des Infektionsverlaufs ist somit ein dynamischer Prozess (Catalina, Sullivan et al., 2001).

Neben reaktiven CD8⁺ CTL sind bei einer akuten IM auch aktivierte EBV-spezifische CD4⁺ T-Zellen nachweisbar, die allerdings in ihrer Frequenz nach dem Abklingen der Krankheitssymtome bald abnehmen. Die Stärke der spezifischen CD4⁺ Antwort scheint mit der Viruslast zu korrelieren. Zur Stimulation spezifischer CD4⁺ T-Zellen

scheint hierbei eine Aufnahme von zirkulierenden Viruspartikeln mittels des HLA-Klasse-II Prozessierungs- und Präsentationsweges erforderlich zu sein, die bei einer persistierenden Infektion aufgrund der geringen Zahl in der Zirkulation vorkommender Viren nicht mehr in ausreichendem Maße stattfindet (Precopio, Sullivan et al., 2003).

Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung CD8⁺ zytotoxischer T-Zellen für die Kontrolle einer EBV-Infektion. Eine Beeinträchtigung der Erkennung infizierter Zellen durch CTL kann dagegen zu dem Auftreten verschiedener maligner Erkrankungen, wie dem Burkitt's-Lymphom, dem Nasopharynxkarzinom, dem Hodgkin-Lymphom sowie von B- und T-Zelllymphomen führen (Khanna, Burrows, & Moss, 1995), die in den nachfolgenden Kapiteln vorgestellt werden.

1.1.7 EBV-assoziierte Krankheitsbilder und ihre Pathogenese

Das Epstein-Barr Virus wird mit einer Anzahl lymphoider und epithelialer Erkrankungen, die entweder akut oder chronisch verlaufen können, in Verbindung gebracht. So kann EBV neben der meist harmlos verlaufenden Infektionen Mononukleose (IM) eine Reihe maligner Erkrankungen, wie das Burkitt's-Lymphom, das Nasopharynxkarzinom (NPC), das Hodgkin-Lymphom sowie B- und T-Zelllymphome (Khanna, Burrows, & Moss, 1995) hervorrufen.

1.1.7.1 Infektiöse Mononukleose

Erfolgt die Primärinfektion mit EBV im Kindesalter, verläuft sie in der Regel inapparent. Eine Infektion in einem höheren Lebensalter führt dagegen häufig zum Auftreten des Pfeiffer'schen Drüsenviebers („*kissing disease*

1.1.7.2 Hodgkin-Lymphom

Bei dieser Erkrankung handelt es um eine heterogene Gruppe von lymphoproliferativen Erkrankungen, die sich durch die Ausbildung von Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen auszeichnet. Bedeutung erlangt diese Erkrankung nicht nur durch ihren malignen Verlauf, sondern auch durch die Tatsache, dass es sich hierbei um das am häufigsten auftretende Lymphom in der westlichen Welt handelt. In 50% der Hodgkinlymphome konnte EBV nachgewiesen werden (Herbst & Niedobitek, 1993). Eine IM erhöht das Risiko, an Morbus Hodgkin (HD) zu erkranken, um das 3 bis 4-fache (Munoz, Davidson et al., 1978). Bei dieser Erkrankung erfolgt keine Erkennung und Eliminierung der transformierten Zellen durch das zelluläre Immunsystem immunkompetenter Personen. Eine mögliche Ursache für die ungenügende Immunogenität der Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen liegt in der selektiven Expression der wenig immunogenen Proteine EBNA1, LMP1 und LMP2. So beinhalten die LMP-Proteine nur subdominante CTL-Epitope, wodurch die Zellen vor einer Erkennung durch CTL geschützt sind (Oudejans, Jiwa et al., 1997). Die Expression von hochimmunogenen Proteinen der EBNA3-Familie wird in Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen dagegen nicht beobachtet. Weiterhin schützen sich diese entarteten Zellen durch die Produktion der immunsuppressiven Zytokine IL-10 und TGF- β vor einer Erkennung durch das Immunsystem (Chapman, Rickinson et al., 2001).

1.1.7.3 Nasopharynxkarzinom (NPC)

Das undifferenzierte Nasopharynxkarzinom ist zu 100% mit EBV infiziert. Dieser maligne, stark metastasierende Tumor, dessen Ursprung im Nasen-Rachenbereich liegt, ist weltweit verbreitet. Am häufigsten tritt er jedoch in Südchina und seltener in Nordafrika auf, was auf genetische und verhaltensbedingte Kofaktoren wie das Trinken phorbolesterhaltiger Tees und die Aufnahme von Nitrosaminen mit der Nahrung bei der Induktion der Erkrankung schließen lässt. Bei Studien in Südostasien konnte ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für Träger der HLA-Typen A2/Bw46 und A19/B17 sowie ein verringertes Risiko für HLA A11 Träger gezeigt werden (Lu, Day et al., 1990). Die Korrelation mit bestimmten HLA Typen könnte daran liegen wie effizient immunogene Epitope auf diesen HLA Molekülen präsentiert werden können.

1.1.7.4 Burkitt' s-Lymphom

Der bei Kindern in Zentralafrika am häufigsten auftretende Tumor ist das Burkitt' s-Lymphom (BL). Außer dieser endemischen Form, bei der mehr als 95% der Tumore EBV positiv sind, gibt es auch Fälle von sporadisch auftretendem BL, bei denen nur in 10 bis 25% der Tumore EBV nachgewiesen werden kann, sowie eine HIV-assoziierte Form des BL. Bei dem BL handelt es sich um einen, auf einen monoklonalen Ursprung zurückzuführenden, schnell wachsenden Tumor, der vor allem in der Kieferregion lokalisiert ist, aber auch im Abdomen oder Knochenmark auftreten kann. Die Ursache der Transformation der Zellen ist in allen drei Fällen gleich. Es handelt sich um eine Chromosomentranslokation, bei der das auf Chromosom acht liegende c-myc Gen unter den Einfluss eines *Enhancers* der Immunglobulingene auf den Chromosomen 2, 14 oder 22 gerät (Klein, 1993). BL-Zellen entgleiten möglicherweise der immunologischen Kontrolle, weil sie eine verringerte Syntheserate der Proteine *transporters associated with antigen processing* TAP-1 und TAP-2 haben (Khanna, Burrows et al., 1994) und darüber hinaus weniger HLA-Klasse-I Moleküle exprimieren (Jilg, Voltz et al., 1991). Durch das Fehlen dieser Proteine wird die Prozessierung und Präsentation endogener Antigene erheblich beeinträchtigt.

1.1.7.5 Polyklonale B-Zell-Lymphome bei immunsupprimierten Patienten

Im Zuge einer Immunsuppression wird die Zahl und Funktionalität spezifischer T-Zellen drastisch reduziert, weshalb proliferierende, durch EBV immortalisierte B-Lymphozyten von T-Zellen nicht mehr kontrolliert werden. Nach Organtransplantationen kommt es immer wieder zur Reaktivierung von EBV und damit einhergehend zur Ausbildung von Abstoßungsreaktionen.

Das Gesamtrisiko lymphoproliferative Erkrankungen (PTLDs) zu entwickeln liegt bei Empfängern fester Organe zwischen 1 und 2 %. Allerdings hängt die Wahrscheinlichkeit von der Art des transplantierten Organs ab. Die Inzidenz der Entwicklung einer PTLD nach Organtransplantation ist mit 31 % in intestinalen Transplantaten extrem hoch, bei Empfängern von Lungen (3,8 % - 11,7 %) und Lebern (6,8 % - 13,1 %) beträchtlich und in Empfängern von Nieren mit 1,2 % bis 9 % ebenfalls signifikant (Cockfield, 2001; Opelz & Dohler, 2004). Die beobachteten Unterschiede der Inzidenzen mögen die Stärke der notwendigen Immunsuppression (am höchsten in intestinalen Transplantaten) und die Menge des, im transplantierten Organ enthaltenen lymphoiden Gewebes wiederspiegeln. Das größte Risiko eine PTLD zu entwickeln haben EBV seronegative Transplantatempfänger weil sie keine

EBV spezifischen Gedächtnis T-Zellen besitzen. Sie haben ein, verglichen mit EBV seropositiven Empfängern bis zu 70-fach erhöhtes Risiko eine PTLD zu entwickeln (Cockfield, 2001).

Die Art und die Intensität der Immunsuppression sind zwei unabhängige Risikofaktoren für die Entwicklung von PTLDs. T-Zell depletierende Strategien entweder durch monoklonale Antikörper (z.B. anti-CD3-Antikörper; OKT3) oder polyklonale Antikörper (z.B. anti-Thymozyten Globulin; ATG) in Kombination mit anderen potenten immunsuppressiven Medikamenten (z.B. FK506) erhöhen das Risiko an einer PTLD zu erkranken (Newell, Alonso et al., 1996).

PTLDs entstehen entweder innerhalb der ersten zwei Jahre nach Transplantation und werden dann früh auftretend genannt oder sie entstehen „spät“, d.h. über zwei Jahre nach Transplantation (Faull, Hollett et al., 2005). Früh einsetzende PTLDs sind meist mit EBV Primärinfektion assoziiert (z.B. ein EBV seronegativer Spender bekommt ein seropositives Organ) wohingegen spät einsetzende PTLDs meist unabhängig vom EBV Status sind (Leblond, Davi et al., 1998). Interessanterweise sind die Zellen, aus denen sich PTLDs in Empfängern fester Organe entwickeln in der Regel Empfängerzellen, obwohl in nicht mit EBV infizierten Empfängern das Virus vom EBV positiven Spenderorgan stammt (Weissmann, Ferry et al., 1995; Haque, Thomas et al., 1996).

Das Absetzen der immunsuppressiven Behandlung, führt zu einem schnellen Rückgang der Tumoren, aber man riskiert im Gegenzug eine Transplantatabstoßung. In den PTLD-Zellen werden die Proteine EBNA1 bis EBNA6 sowie LMP1 und 2 exprimiert (Thomas, Hotchin et al., 1990). PTLD-Zellen können einen heterogenen Phänotyp aufweisen. So wurden beispielsweise auch Zellen mit einem Burkitt's Lymphom-ähnlichem Phänotyp beschrieben (Khanna, Burrows, & Moss, 1995).

1.2 Immunologische Grundlagen als Basis für die Entwicklung neuartiger Verfahren zur Diagnostik, Therapie und Prävention von EBV-Infektionen

Die Funktionalität der zellvermittelten Immunantwort spielt, wie in den vorhergehenden Kapiteln veranschaulicht, sowohl bei der Kontrolle des Epstein-Barr Virus, als auch bei der Entstehung EBV assoziierter Erkrankungen eine zentrale Rolle. Deshalb erfordert die rationale Entwicklung verbesserter diagnostischer, therapeutischer und präventiver Verfahren eine solide Kenntnis der Abläufe, die zur Stimulation, Vernetzung und Regulation der Effektoren des zellulären Arms des Immunsystems beitragen. In dem nachfolgenden Absatz werden wesentliche Akteure

der zellulären Immunantwort und die an ihrer Aktivierung beteiligten Mechanismen kurz vorgestellt.

1.2.1 T-Zellen

Ihren Namen erhielt diese Zellpopulation nach dem Ort ihrer Reifung, dem Thymus. Von dort gelangen sie in die Blutbahn und auf diesem Weg in die Peripherie des Körpers (Res & Spits, 1999). T-Zellen zirkulieren solange im peripheren lymphatischen Gewebe bis sie auf ihr spezifisches Antigen treffen und zur klonalen Expansion angeregt werden. Innerhalb der T-Zellpopulation lassen sich nicht aktivierte, naive T-Zellen anhand der Expression verschiedener Isoformen des Lymphozytenmarkers CD45 von aktivierten T-Zellen und Gedächtnis T-Zellen unterscheiden (Clement, 1991).

Zur spezifischen Erkennung von Antigenen besitzen T-Zellen den T-Zell-Rezeptor (TZR). Dieses Transmembranprotein ist ein durch eine Disulfidbrücke kovalent verbundenes Heterodimer, das über nicht kovalente Wechselwirkungen mit dem CD3 Komplex und einem zytosolisch orientierten Homodimer aus zwei ζ -Ketten verbunden ist. Bei der Mehrzahl der Zellen besteht dieses Heterodimer aus einer α - und einer β -Kette, während 5% der Zellen einen TZR aus einer γ - und δ -Kette aufweisen. Nach Erkennung des Antigens durch den $\alpha\beta$ TZR kommt es zur Signaltransduktion über den CD3 Komplex sowie die ζ -Kette des Homodimers. Damit die Zellen jedes beliebige Antigen erkennen können, ist eine enorm große Zahl verschiedener TZR notwendig. Die Gene der beiden TZR-Ketten sind in verschiedenen Regionen kodiert. In jeder Region gibt es auf Keimbahnebene eine Anzahl von Segmenten. Durch somatische Rekombination der Segmente aus unterschiedlichen Regionen sowie durch eine unpräzise Verknüpfung durch terminale Transferasen wird diese gewaltige Vielfalt ermöglicht (Wang, Bogue et al., 1997).

Anders als B-Lymphozyten erkennen die T-Lymphozyten als Organe der zellulären Immunantwort ihre Antigene nicht in löslicher Form sondern im Komplex mit HLA Molekülen. Für die Wechselwirkung und Erkennung zwischen TZR und dem jeweiligen HLA ist ein Korezeptor notwendig. In Abhängigkeit davon, ob dieser Korezeptor CD4 oder CD8 ist, erkennt die T-Zelle Antigene im Zusammenhang mit HLA-II oder HLA-I Molekülen. Die mit HLA-I Molekülen interagierenden CD8 restriktiven T-Zellen zerstören nach einem erfolgreichen Kontakt die präsentierende Zelle und werden deshalb zytotoxische T-Zellen (CTL) genannt. Die CD4⁺ Zellen interagieren mit HLA-II exprimierenden APC und werden aufgrund ihrer

zentralen Rolle bei der Auslösung und Koordination von Immunreaktionen T-Helferzellen genannt (Janeway, Jr., Carding et al., 1988).

Für die klonale Expansion von T-Zellen reicht das spezifische Erkennen peptidbeladener HLA Moleküle (Signal 1) allein nicht aus. Dafür sind weitere, kostimulatorische Signale notwendig (Signal 2). Diese erfolgen durch eine spezifische Interaktion kostimulatorischer Moleküle, wie CD80 und CD86 auf der APC mit den auf der Oberfläche von T-Zellen befindlichen Liganden, z.B. CD28 (Lenschow, Walunas et al., 1996). Wird eine T-Zelle nur über Signal 1 stimuliert, führt das zu einem Zustand der Anergie (Medema & Borst, 1999). Die vollständige Stimulation von T-Zellen führt über die verstärkte Expression der IL-2 Rezeptoren bei gleichzeitiger IL-2 Sekretion über autokrine Signalübertragung zur Proliferation.

1.2.2 Die „klassischen“ Prozessierungs- und Präsentationswege

Humane Zellen sind mit einem effizienten Entsorgungs- und Recyclingsystem zum Abbau fremder oder nicht mehr benötigter zelleigener Proteine ausgestattet. Ein spezifisches Polypeptid, Ubiquitin kennzeichnet unerwünschte Proteine als „Müll“. Diese so markierten Proteine werden mit Hilfe von Chaperonen entfaltet und der fassartigen Struktur des Proteasoms zugeführt, in der sie hydrolytisch in kürzere Fragmente gespalten werden (Parham, 1999). Die vom Proteasom freigegebenen Peptide werden entweder im Zytosol zu Aminosäuren degradiert oder ins ER transportiert.

Normalerweise werden auf diesem Weg körpereigene Proteine wiederverwertet. Aber in infizierten Zellen gelangen Proteine des Pathogens in diesen Prozessierungsweg (siehe Abb. 1-1). In einer nicht infizierten Zelle werden ständig körpereigene Peptide von sogenannten „Haushaltsproteasomen“ erzeugt und in das Lumen des ER transportiert. Dieser Transport erfolgt durch spezielle *transporter associated with antigen processing* (TAP) Transportermoleküle, die zur Familie der ABC-Transporter gehören und Heterodimere aus den beiden nicht kovalent verbundenen Untereinheiten TAP-1 und TAP-2 bilden. Im Falle einer Infektion mit einem Erreger führt der Einbau von drei neuen Proteasomproteinuntereinheiten, LMP2, LMP7 und MECL1, zur Bildung eines sogenannten „Immunoproteasoms“ (Benham & Neefjes, 1997), welches gegenüber dem normalen Haushaltsproteasom eine effizientere Produktion von auf HLA-I präsentierbarer Peptide aufweist. Vom Proteasom freigesetzte Peptide binden schnell an die zytosolische Seite des TAP-Transporters und werden umgehend durch den Kanal transloziert. Auf der luminalen Seite der ER-Membran werden daraufhin HLA-Klasse-I Moleküle mit diesen Peptiden beladen. Die beiden Polypeptidketten des HLA-I, die größere α -Kette und das β_2 -

Mikroglobulin werden getrennt am rauen ER synthetisiert. Die neue schwere Kette wird zunächst von dem Chaperon Calnexin gebunden, welches dann bei der Bindung von β_2 -Mikroglobulin durch Calreticulin ausgetauscht wird und bindet schließlich mit Hilfe des Chaperons Tapasin an TAP (Li, Paulsson et al., 2000). Diese gewährleisten, dass die Polypeptidketten nicht vorzeitig ihre mature Konformation annehmen. Für HLA-Moleküle charakteristisch ist die haplotypspezifische Bindegroove. Die Faltung dieser Moleküle wird vervollständigt, wenn ein von TAP transloziertes Peptid, der HLA-Ligand, dort bindet und ein ternärer Komplex gebildet ist. Dieser ternäre Komplex wird nun von TAP und den Chaperons entlassen und über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche sezerniert. Über die Transmembrandomäne der α -Kette des HLA-I bleibt der Komplex an der Zelloberfläche verankert. Auf diese Weise wird nun dieses Peptid CD8 restriktionspräsentierten T-Zellen auf HLA-I präsentiert (siehe Abb. 1-1).

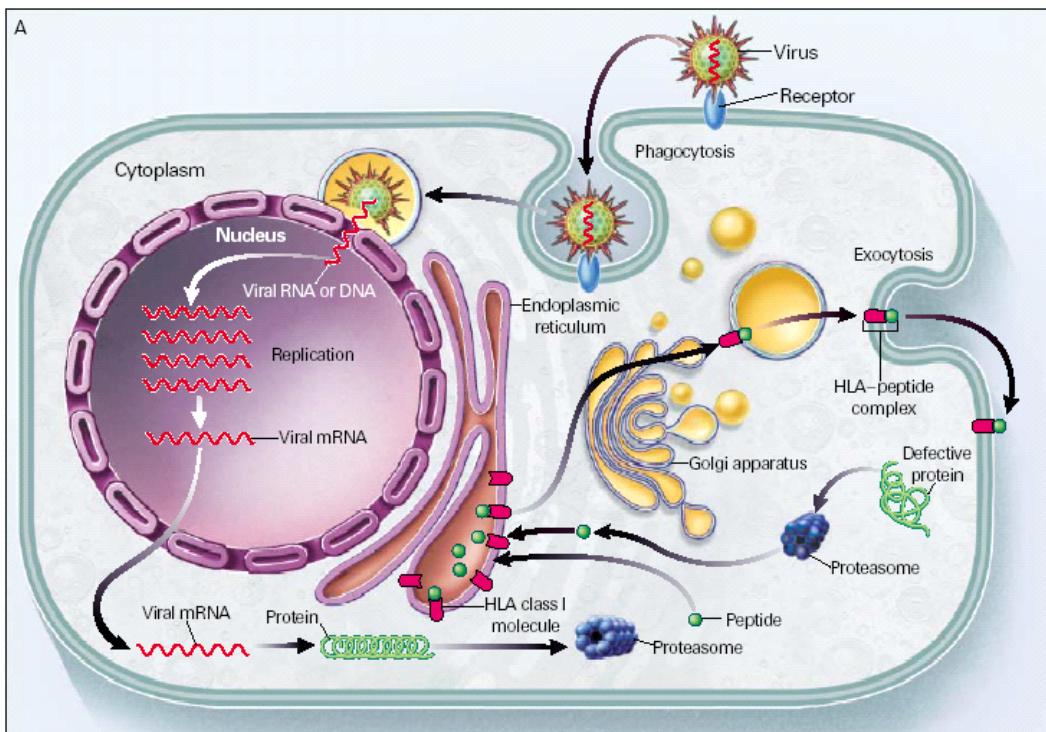


Abbildung 1.1: Darstellung des endogenen HLA-Klasse-I Antigenprozessierungs- und Präsentationswegs (Klein & Sato, 2000).

Extrazelluläre lösliche Proteine werden dagegen auf dem exogenen HLA Klasse II Weg degradiert. Sie gelangen durch Endozytose innerhalb von endozytotischen Vesikeln in die Zellen wo sie mit primären Lysosmen, angefüllt mit proteolytischen Enzymen, verschmelzen (Parham, 1999). Innerhalb dieser Kompartimente werden die aufgenommenen Proteine zunächst in Peptide und schließlich in einzelne Aminosäuren gespalten. In das endolysosomale Kompartiment gelangen frisch synthetisierte HLA-II Moleküle im Komplex mit einem Protein, das die

Peptidbindestelle verdeckt und *invariant chain* genannt wird. Diese *invariant chain* wird im saueren endolysosomalen Kompartiment abgedaut wodurch die Bindestelle frei wird. Somit wird sichergestellt, dass die HLA-II Moleküle nicht vorzeitig mit körpereigenen Peptiden, sondern exogenen Peptiden beladen werden. Die peptidbeladenen HLA-II Moleküle werden dann zur Zelloberfläche exportiert, wo sie ihre Fracht T-Helferzellen präsentieren (siehe Abb. 1-2).

Die Proteinprozessierung und Beladung von HLA-I findet in nahezu allen Zellen statt. Im Gegensatz dazu beschränkt sich die Epitop-Prozessierung und Beladung auf HLA-II in der Regel auf Monozyten, Makrophagen, B-Lymphozyten, und dendritische Zellen, die in der Lage sind, Fremdantigene sehr effizient mittels Endo- und Phagozytose aufzunehmen. Obwohl die meisten auf HLA-Klasse-I Molekülen präsentierte Epitope endogenen- und die meisten auf HLA-Klasse-II Moleküle geladenen Peptide exogenen Antigenen entstammen, ist diese Trennung nicht absolut, worauf im Folgenden genauer eingegangen wird.

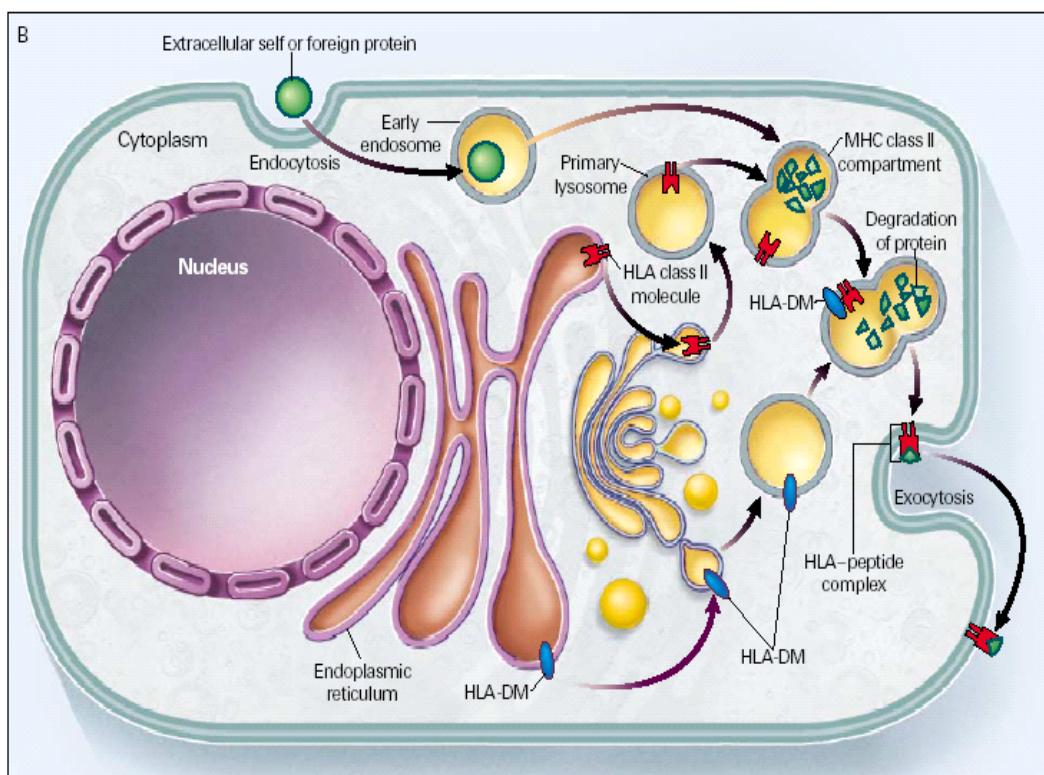


Abb. 1.2: Darstellung des exogenen HLA-II Antigenprozessierungs- und Präsentationswegs (Klein & Sato, 2000).

1.2.3 Cross-presentation

Nicht immer werden exogene Antigene auf dem zuvor beschriebenen, klassischen HLA-Klasse-I Prozessierungs- und Präsentationsweg abgebaut und präsentiert. Durch einen als *cross-priming oder cross-presentation* bekannten Mechanismus können spezielle exogen vorliegende Antigene über den endozytotischen Weg auf HLA-Klasse-I Moleküle geladen werden (Ackerman, Kyritsis et al., 2003). Dieses Phänomen des *cross-priming* ist speziell in dendritischen Zellen zu beobachten (Mellman & Steinman, 2001). Dieser Präsentationsweg spielt bei der Ausprägung einer T-Zelltoleranz gegen extralymphatische „Eigen“ Antigene in Abwesenheit des kostimulatorischen Signals 2, sowie bei der Induktion einer zytotoxischen T-Zellantwort gegen zellfreie Viren und Tumorzellen eine herausragende Rolle (Heath & Carbone, 2001). Unter physiologischen Bedingungen ist das *cross-priming* ein Prozess von außerordentlicher Bedeutung, denn sonst könnten keine T-Zellantworten gegen Pathogene generiert werden, die keine APC infizieren.

Es gibt verschiedene Wege für die Internalisierung von Antigenen zur *cross-präsentation* in DC und andere APC (Rock & Shen, 2005). Meistens erfolgt der Verdau durch das Proteasom und Transport der generierten Peptide ins ER durch TAP. Dies legt den Schluss nahe, dass endozytierte Antigene in APC den endozytotischen Weg verlassen und dadurch der Proteolyse im sauren endolysosomalen Kompartiment entgehen, bevor sie vergleichbar endogen synthetisierten Proteinen prozessiert und präsentiert werden. Obwohl dieser Ansatz zeigt wie MHC Klasse I Liganden von endozytierten Proteinen für die *Cross-präsentation* gerettet werden können stellt dies ein topologisches Problem dar, denn es gibt keinen gut verstandenen Mechanismus der erklärt wie Material aus endozytotischen Strukturen über die Membran ins Zytosol transferiert wird um Zugang zum Proteasom zu bekommen. Einige bakterielle Toxine können Poren ausbilden, die so ihren Transport ins Zytosol ermöglichen (Sandvig & van Deurs, 2002). Aber es scheint noch andere universeller einsetzbare Wege für das Entkommen aus dem endozytotischen Kompartiment ins Zytosol zu geben; Es wird spekuliert endozytotische Kompartimente könnten einen Teil ihres Inhaltes durch Leckströme, Kanäle oder eventuell durch Translokatoren ins Zytosol entlassen und so internalisierte Proteine oder Fragmente davon dem proteasomalen Verdau zugänglich zu machen (siehe Abb. 1.3) und so die Beladung von MHC Klasse I Molekülen zu ermöglichen (Ackerman & Cresswell, 2004; Rodriguez, Regnault et al., 1999). Obwohl dies eine Erklärungen für einen möglichen Mechanismus für *cross-presentation* liefert, verbleiben die zellulären und molekularen Mechanismen des Entkommens von endozytiertem Material ins Zytosol weitgehend unverstanden. Eine andere Möglichkeit für endozytierte Proteine in den endogenen MHC Klasse I Weg

eingeschleust zu werden ist der retrograde Weg vom Endosom zum Golgi-Apparat. Von dort können sie zum ER weitertransportiert und schließlich zur Degradierung am Proteasom ins Zytosol exportiert werden (siehe Abb. 1.3a).

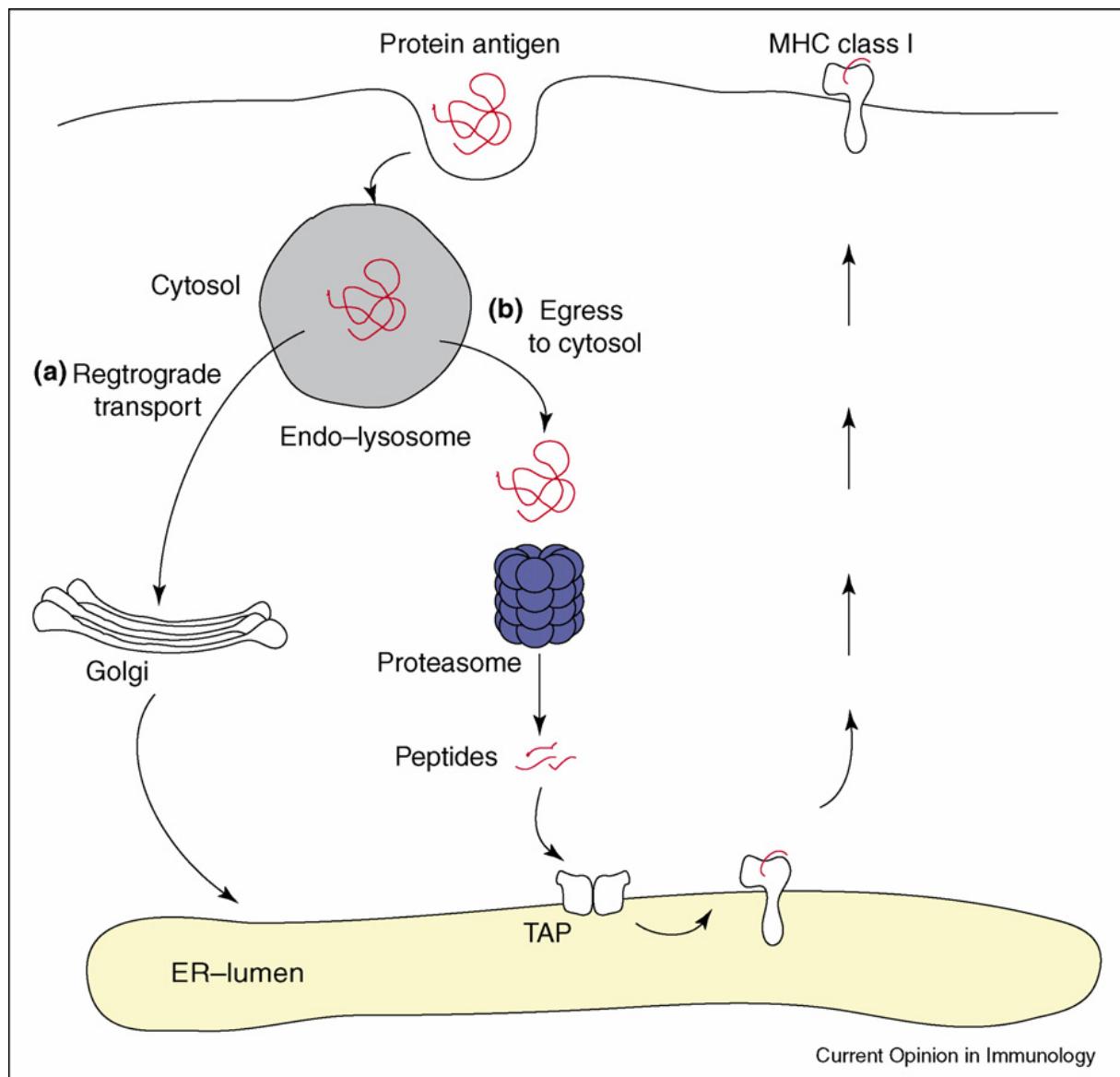


Abb. 1.3: Mögliche Routen aus endosomalen und lysosomalen Kompartimenten auf denen internalisierte Antigene zur cross-präsentation ins ER gelangen können (Monu & Trombetta, 2007).

Ungeachtet der genauen Mechanismen die das Entkommen ins Zytosol vermitteln, mag die limitierte Degradierung von internalisiertem Antigen in DC zu ihrer hohen Effizienz zur *cross-präsentation* beitragen (Delamarre, Pack et al., 2005). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Inhibition der endolysosomalen Ansäuerung und Proteolyse durch Chloroquine und NH₄Cl die Effizienz der *cross-präsentation* erhöht (Accapezzato, Visco et al., 2005).

In dendritischen Zellen wurde auch das Phagosom als das Kompartiment beschrieben, in dem *cross-presentation* stattfindet. Es wurde gezeigt, dass in

dendritischen Zellen das invaginierende Phagosom der ER-Membran direkt benachbart ist und dass die Membranen beider Kompartimente schon während oder kurz nach der Abschnürung miteinander fusionieren (siehe Abb.1.4a). Dieser Befund erklärt auch, auf welche Weise der Sec61 genannte Proteintransportkanal in die Membran von Phagolysosomen gelangt. Dieses Transportmolekül transloziert üblicherweise die naszierende Polypeptidkette der am rauen ER frisch synthetisierten Proteine ins Lumen des ER und ist an dem Export von zur Degradierung bestimmten Proteinen aus dem ER zum Proteasom beteiligt (Wiertz, Tortorella et al., 1996). Desjardins und seine Kollegen konnten zeigen, dass Proteasomen direkt mit der zytosolischen Seite der Phagosomenmembran assoziiert sind. Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei der Verschmelzung des ER mit dem Phagosom funktionelle TAP-Transporter (Houde, Bertholet et al., 2003) und HLA-I Moleküle ins Phagosom gelangen.

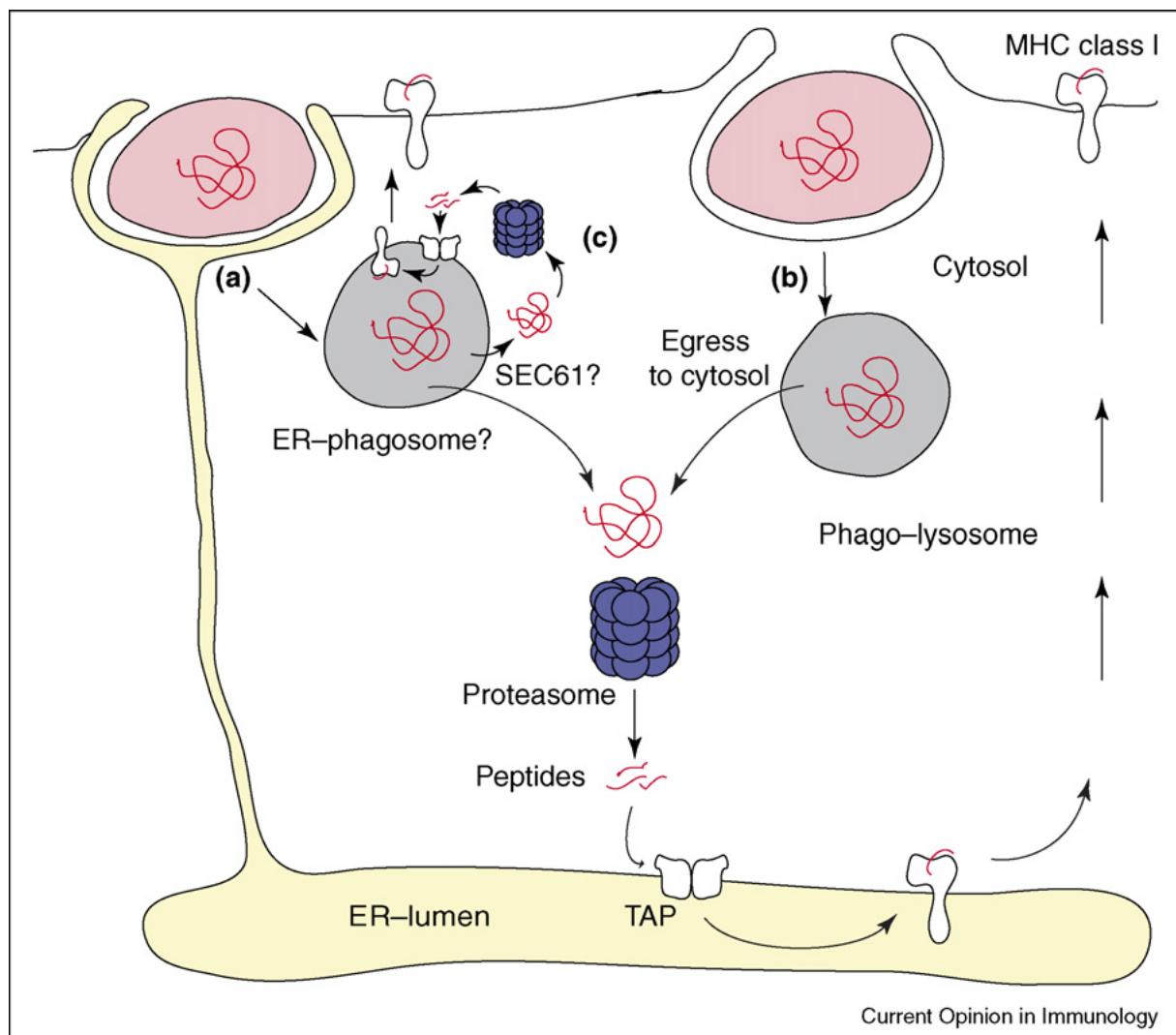


Abb. 1.4: Mögliche Routen für phagozytierte Antigene um Zugang zu den Proteasomen im Zytosol zu bekommen (Monu & Trombetta, 2007).

So scheint es möglich, dass exogene Proteine durch den Sec61 Kanal ins Zytosol transportiert werden, wo sie vom Proteasom degradiert und als Peptide durch den TAP Transporter zurück ins Phagosom gelangen und schließlich auf HLA-I geladen werden (Guermonprez, Saveanu et al., 2003) (siehe Abb. 1.4c). Der in Abbildung 1.4b dargestellte Weg repräsentiert den normalen Weg der Phagozytose wobei die Plasmamembran den internalisierten Partikel umschließt und das frühe Phagosom bildet welches dann mit Elementen des lysosomalen Systems verschmilzt. Von dort könnten Antigene wie in Abbildung 1.3 beschrieben Zugang zum Zytosol bekommen. Eine alternative Route zur endolysosomalen HLA-I Beladung mit Peptiden aus exogenen Proteinen ist die Beladung von rezyklierende HLA-I Molekülen nach Prozessierung im saueren Endolysosom (Harding & Song, 1994; Gromme, Uytdehaag et al., 1999).

Verschiedene Subpopulationen von APC sind in der Lage Antigene *cross* zupräsentieren. Ursprünglich wurde diese Fähigkeit hauptsächlich DC und Makrophagen zugesprochen (Rock & Shen, 2005; Heath, Belz et al., 2004). Weitere Studien zeigten aber, dass auch andere Zellpopulationen unter bestimmten Bedingungen dazu in der Lage sind. So besitzen auch B-Zellen (Hon, Oran et al., 2005), Neutrophile (Tvinnereim, Hamilton et al., 2004) und Endothelzellen (Bagai, Valujskikh et al., 2005) diese Fähigkeit bestimmte Antigene *cross* zupräsentieren.

1.2.4 Einschleusen exogener Antigenen in den HLA-Klasse-I Weg *in vivo*

In vivo stellen wahrscheinlich Immunkomplexe, opsonisierte Antigene sowie apoptotische und nekrotische Zellen die Hauptquelle von exogenen Antigenen für die *cross-präsentation* dar. Auch konnte kürzlich aufgeklärt werden, in welcher Weise apoptotische und nekrotische Zellen in dendritischen Zellen fragmentiert und erzeugte Peptide auf HLA-I Moleküle beladen werden. Nach Aufnahme der Zellen mittels Phagozytose oder Makropinozytose werden diese in saure endolysosomale Vesikel transportiert und anschließend im späten Endolysosom proteolytisch Cathepsin D abhängig angedaut. Die erzeugten kleineren Fragmente werden dann ins Zytosol transloziert und durch das Proteasom zu HLA-präsentierbaren Peptiden prozessiert. Über den TAP-Transporter gelangen diese dann ins ER, wo sie auf neu synthetisierte HLA-Klasse-I Moleküle geladen und dann an die Zelloberfläche transportiert werden (Fonteneau, Kavanagh et al., 2003).

Auch antigenhaltige Zelllysate können über einen Weg des *cross-primings* in den HLA-Klasse-I Prozessierungs- und Präsentationsweg gelangen. Der zugrundeliegende Mechanismus ist allerdings noch weitgehend unbekannt. Bisher ist nur belegt, dass die Prozessierung am Proteasom erfolgt. Die Effizienz dieses

Verfahrens ist nicht sehr hoch. Die Fähigkeit zum *cross-priming* liegt bei den meisten Spendern unter 10% und ist unabhängig von der Zahl der dendritischen Zellen (Maecker, Ghanekar et al., 2001).

Dendritische Zellen können Antigen aber auch von lebenden Zellen aufnehmen. Bei einem Vorgang der als „Knabbern“ beschrieben worden ist (Harshyne, Watkins et al., 2001) nehmen sie Teile der Membran und damit beladene MHC Klasse I Moleküle von benachbarten Zellen auf. Vermittelt wird diese Aufnahme von Scavenger Rezeptoren (Harshyne, Zimmer et al., 2003) und führt, da in den meisten Fällen der Kostimulus fehlt eher zur Toleranz als zur Immunität.

Eine andere Quelle aus der cross-präsentierte Epitope stammen können sind Proteine die sogenannte Proteintranslokationsdomänen enthalten. Entdeckt wurden solche Domänen ursprünglich in dem HIV Tat (Frankel & Pabo, 1988) und dem *D. melanogaster* Protein Antennapedia (Joliot, Pernelle et al., 1991). PTDs sind arginin- und/oder lysinreiche Aminosäuresequenzen, die nicht kovalente Wechselwirkungen mit Glykosaminoglykanen der extrazellulären Matrix von Zellen eingehen und dann mittels Endozytose (Richard, Melikov et al., 2003) in diese aufgenommen werden. Dieser Vorgang erfolgt temperaturabhängig. Über den weiteren Prozessierungsweg PTD-gekoppelter Proteine ist noch relativ wenig bekannt (Console, Marty et al., 2003).

Auch mit Palmitinsäure gekoppelte Peptide gelangen in die Zellen und vermitteln eine Epitoppräsentation auf HLA-Klasse-I Proteinen. Allerdings ist hier noch nicht verstanden, auf welchem Weg diese Immunogene in das Zytosol gelangen. Schließlich werden aus diesen Proteinen stammende Peptide auf HLA-I geladen, und über den Golgiapparat an die Zelloberfläche transportiert (Stittelaar, Hoogerhout et al., 2001).

Eine weitere Möglichkeit der Beladung von Epitopen aus exogenen Proteinantigenen auf HLA-I Moleküle führt über die Aufnahme von Immunkomplexen. Dieser Mechanismus ist auf Antigene mit einem Molekulargewicht von weniger als 40 kD beschränkt. Der Transport ins Zytosol dieser Antigene erfordert eine vorherige Dissoziatlon der Immunkomplexe im Endolysosom (Rodriguez, Regnault, Kleijmeer, Ricciardi-Castagnoli, & Amigorena, 1999).

Darüber hinaus ist auch für Proteinaggregate und partikuläre Strukturen (Schirmbeck, Bohm et al., 1995) die Fähigkeit zum *cross-priming* nachgewiesen worden.

Von einer infizierten „nicht“-APC können auch Peptide aus immunogenen Proteinen in den endogenen MHC Klasse I Weg benachbarter Antigen-präsentierender Zellen durch *gap-junctions* transferiert werden. Dies ist eine Fähigkeit die in den meisten Tumoren verloren geht. Durch die hohe zytosolische Peptidase Aktivität erflogt die

Proteintranslokation nur in direkt benachbarte Zellen und nicht über weitere Strecken (Neijssen, Herberts et al., 2005).

1.2.5 Impfstoffentwicklung gegen EBV

Die Entwicklung eines Impfstoffes gegen EBV hat zwei Ziele. Eines ist die Vermeidung des Auftretens der akuten Infektiösen Mononukleose, insbesondere bei jungen Erwachsenen, um den wirtschaftlichen Schaden entstehend durch Ausfall von Arbeitskräften zu verringern; das andere ist die Verhinderung von EBV-assoziierten malignen Erkrankungen, wie dem Nasopharynxkarzinom, Burkitt's-Lymphom oder der Morbus Hodgkin.

Aufgrund früherer Beobachtungen, die zeigten, dass in Patienten mit akuter IM starke Immunreaktionen gegen die Strukturproteine auftreten (Khanna, Sherritt, & Burrows, 1999) und dass insbesondere das EBV Hüllprotein gp220/350 ein bedeutendes Ziel virusneutralisierender Antikörper darstellt (Thorley-Lawson, 1979), konzentrierten sich die Vakzinologen lange Zeit auf die Entwicklung von Impfstoffen auf der Basis des EBV Hüllproteins gp220/350. In Tierversuchen stellte sich allerdings heraus, dass die Entwicklung neutralisierende Antikörper in geimpften Versuchstieren nicht immer mit dem Schutz vor einer EBV Infektion korreliert. Zudem sind gegen Strukturproteine gerichtete Antikörper nicht in der Lage, latent mit EBV infizierte, oder transformierte Zellen zu erkennen. Zur Bekämpfung infizierter Zellen ist die Induktion einer zellulären Immunantwort gegen latente, *immediate early* und frühe Proteine von EBV erforderlich. In Folge dieser Erkenntnisse wurde verstärkt an der Entwicklung von Impfstoffen gearbeitet, die in der Lage sind eine humorale und zelluläre Immunantwort gegen verschiedene EBV Proteine zu induzieren. So konnte in Immunisierungsstudien mit Tamarinen gezeigt werden, dass rekombinante Vakzinia Viren, die die EBV Proteine gp350 und gp85 exprimieren, eine protektive zellvermittelte Immunantwort auslösen. Durch diese Versuche ermutigt wurde von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Wolf bereits in den 80 er Jahren in China eine erste Impfstudie unter Verwendung eines, das Hüllprotein gp220/350 exprimierenden Vakzinia Virus (Impfstamm Tien Tan) im Menschen durchgeführt (Gu, Huang et al., 1995). In dieser Studie konnte in sechs von neun Impflingen eine schützende Immunantwort erzielt werden. Derzeit werden EBV Impfstoffkandidaten favorisiert, welche verschiedene Proteine aus unterschiedlichen Lebensstadien des Virus beinhalten. Zudem ist der Einsatz von Vektoren die vollständige Polypeptide exprimieren gegenüber epitopbasierenden Ansätzen vorteilhaft, da so das Problem der HLA Restriktion der CTL Erkennung in Menschen umgangen werden kann (Khanna, Sherritt, & Burrows, 1999). In dieser Richtung ist sicherlich noch viel

Entwicklungsarbeit zu leisten, besonders hinsichtlich der Entwicklung sicherer und kostengünstiger proteinbasierter Vakzinen zur Stimulation einer effizienten humoralen und zellulären Immunantwort.

1.2.6 Therapie EBV-assoziierter Erkrankungen

Für die Therapie von IM und anderen EBV assoziierten Erkrankungen stehen die Nukleosidanaloga Aciclovir und Ganciclovir zur Verfügung. Die Symptome der akuten IM verschwinden mit einer Reduktion der Viruslast und der latent infizierte Virusträger ist danach wieder gesund. Bei Patienten mit malignen EBV-assozierten Erkrankungen, z.B. einer lymphoproliferativen Erkrankung unter Immunsuppression, wurden in verschiedenen Studien Behandlungserfolge mit *ex vivo* expandierten Virus-spezifischen CTL erzielt (Heslop, Savoldo et al., 2004). Zudem führte der adoptive Transfer autologer EBV spezifischer CTL in anderen Studien in einigen der behandelten Patienten zu einer Regression EBV-assoziierter Lymphome und einem Sinken der Viruslast (Liu, Savoldo et al., 2002). Andere Studien konnten jedoch keine Wirksamkeit von Immuntherapien in Patienten mit lymphoproliferativen Erkrankungen nach Immunsuppression mit Cyklosporin A im Zuge einer Organtransplantation beobachten, da die immunsuppressiven Medikamente auch die Funktionalität der transferierten Zellen beeinträchtigten (Zhan, Brown et al., 2003).

1.2.7 T-Zell-Diagnostik

Die Bestimmung der Anzahl und Aktivität verschiedener Populationen erregerspezifischer T-Zellen stellt bei vielen Patienten mit mikrobiellen Infekten eine sehr effiziente Methode dar, um Aufschlüsse über den aktuellen Krankheitsverlauf oder eine bereits überwundene Erkrankung zu erlangen. Des Weiteren sind solche Verfahren beispielsweise zum Überwachen der Effizienz therapeutischer und prophylaktischer Impfungen zur Stimulation einer T-Zellantwort, sowie zum diagnostischen Nachweis von Immunzellaktivitäten bei chronischen Entzündungen, Autoimmunerkrankungen und bei der Transplantatabstoßung von großer Bedeutung. Derzeit sind verschiedene Verfahren zur Stimulation unterschiedlicher Populationen von Immunzellen verfügbar, welche in unterschiedlichem Ausmaß für den Nachweis spezifischer Populationen antigenspezifischer Immunzellen geeignet sind.

Der diagnostische Nachweis der Spezifität oder Frequenz von T-Zellen aus einem Patienten erfordert einerseits Verfahren zur Gewinnung der entsprechenden

Immunzellen und zum anderen die Verfügbarkeit geeigneter Reagenzien, um diese spezifisch zu stimulieren. Darüber hinaus bedarf es eines Ausleseverfahrens zum Nachweis reaktiver T-Zellen. Ein routinemäßig verwendetes Verfahren zur Stimulation von T-Zellen beruht auf der Kokultivierung mit autologen, Peptid-präsentierenden APC. Der Nachweis der infolge einer Stimulation aktivierten T-Zellen erfolgt bei CD4⁺ Zellen beispielsweise über die Bestimmung der Zellproliferation oder Zytokinproduktion und bei CD8⁺ CTL über die Messung der Zytokinproduktion bzw. der Zytotoxizität. Die Proliferation von T-Helferzellen kann anhand des Einbaus des radioaktiven Wasserstoffisotops Tritium in die DNS replizierender Zellen bestimmt werden. Die Fähigkeit von CTL, ihre Zielzellen spezifisch zu lysieren wird in ⁵¹Chrom-Freisetzungstests ausgenutzt. Dabei werden autologe epitoppräsentierende Zielzellen mit ⁵¹Chrom beladen und dann mit den zu untersuchenden T-Zellen kokultiviert. Bei einer epitopspezifischen Erkennung der ⁵¹Chrom markierten Zielzellen durch eine spezifische CTL wird das radioaktive Isotop infolge der Lyse der Zielzelle in den Überstand freigesetzt und dient als Maß für die spezifische CTL Aktivität. Dieser Versuchsaufbau ist der einzige, der direkt die Funktionalität der CTL beweist. Für diese Methode ist jedoch zur Steigerung der Sensitivität eine Vorstimulation der Zellen erforderlich. Deshalb ist dieses Verfahren zur Bestimmung von CTL Vorläuferfrequenzen nicht geeignet. Des Weiteren besteht die Möglichkeit die spezifische Aktivierung von T-Zellen anhand der damit einhergehenden Zytokinproduktion zu analysieren. Zur Bestimmung der Zytokinproduktion auf Einzelzellebene eignet sich der *Elispot-assay* oder die intrazelluläre Zytokinfärbung mit anschließender durchflußzytometrischer Analyse. Die letztere Methode bietet hierbei einige Vorteile, da sie die gleichzeitige Bestimmung der Zytokinproduktion aus verschiedenen Zellpopulationen direkt aus dem Vollblut erlaubt. Eine Möglichkeit der Stimulation von T-Zellen beruht auf der direkten Beladung von auf der Oberfläche von APC befindlichen HLA Molekülen mit exogenen Peptiden. So können sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen spezifisch mit Peptiden geeigneter Größe stimuliert werden. Voraussetzung ist allerdings die Kenntnis des jeweiligen Zielepitopes der zu bestimmenden T-Zellpopulation, sowie die Verfügbarkeit des entsprechenden Peptids. Einschränkend wirkt auch, dass in der Regel ein bestimmtes Peptid jeweils nur von einem einzigen HLA Typ präsentiert wird, wodurch das jeweilige Verfahren Probanden angewendet werden kann, die dieses HLA Allel besitzen. Dafür bietet dieses Verfahren ein sehr hohes Maß an Spezifität. Die Beschränkung auf ein T-Zellepitop und die damit verbundene strikte HLA-Restriktion kann durch den Einsatz vollständiger Polypeptide zur Stimulation umgangen werden. Jedoch werden lösliche Proteine fast ausschließlich über den HLA-Klasse-II Prozessierungs- und Präsentationsweg aufgenommen und sind somit nur zum Nachweis von CD4⁺ T-Helferzellen geeignet.

Eine Möglichkeit vollständige Proteine sowohl dem Klasse-I als auch dem Klasse-II Prozessierungs und Präsentationsweg zuzuführen, beruht auf der Denaturierung dieser mittels Hitze oder Natriumdodecylsulfat (SDS). Im Mausmodell konnte mit diesen Antigenen eine Epitoppräsentation auf HLA-I und HLA-II Molekülen erzielt werden. Beide Verfahren waren jedoch aufgrund ihrer geringen Effizienz zur Stimulation von CD8⁺ T-Zellen (Hitze-denaturiertes Protein) bzw. hohen zytotoxischen Aktivität (SDS-denaturiertes Protein) nur bedingt zur Bestimmung von T-Zellaktivitäten aus humanem Zellgemischen geeignet (Schirmbeck, Deml et al., 1995).

Auch Peptide aus Lysaten virusinfizierter oder entarteter Zellen werden sowohl auf HLA-I und HLA-II Molekülen präsentiert. Da sie aber auch immunologische *Danger*-Signale beinhalten sind sie *per se* immunmodulatorisch. Darüber hinaus wurde im Mausmodell gezeigt, dass ihre Effizienz zur Stimulation von T-Zellantworten vergleichbar gering ist (Galea-Lauri, Wells et al., 2004).

Ein anderer Ansatz für die Transfektion von Zellen mit Proteinen beruht auf der Verwendung der bereits erwähnten Proteintransduktionsdomänen (PTD). Hierbei handelt es sich um ein sehr effizientes Verfahren zur Bestimmung von CD4- und CD8-Zellen, da mit PTDs fusionierte Proteine über den HLA Klasse I und II Prozessierungs- und Präsentationsweg gelangen (Mitsui, Inozume et al., 2006). Ein gravierender Nachteil dieser Methode ergibt sich aus der Notwendigkeit, die entsprechenden Fusionsproteine im Vorfeld rekombinant herzustellen. Eine gleichzeitige Epitoppräsentation auf HLA-I und –II Proteinen ist auch durch den Einsatz partikulärer Strukturen zu erreichen. Bei diesem Verfahren werden die Proteine von Interesse in partikuläre Strukturen wie Liposomen, virusähnliche Partikel oder Lipoproteinpartikel integriert (Deml, Speth et al., 2005). Nachteile dieser Methode sind einerseits der hohe Arbeits- und Kostenaufwand zur Herstellung dieser Immunogene und andererseits die Tatsache, dass solche Partikel *per se* immunmodulatorische Eigenschaften besitzen, welche das erzielte Ergebnis verfälschen können.

Des Weiteren kann eine gleichzeitige Epitopbeladung von HLA-I und II Proteinen durch den Einsatz geeigneter Vektoren, wie Plasmiden, RNS Molekülen oder viralen Vektoren erzielt werden, welche eine endogene Synthese des jeweiligen Proteins bewirken. Beim Einsatz von Plasmiden wirkt sich die geringe Transfizierbarkeit von APC negativ auf ihre Anwendbarkeit aus. Da man einzelne Zellpopulationen in einem Zellgemisch nicht selektiv transfizieren kann, ist es zudem erforderlich die APC zur Transfektion von den zu diagnostizierenden T-Zellen zu trennen um eine Beeinträchtigung deren Funktion zu verhindern. Dadurch wird der Arbeitsaufwand sehr hoch. Dagegen zeigen virale Vektoren oftmals immunmodulatorische Eigenschaften, indem sie entweder die zellulären Mechanismen der

Epitopprozessierung und Präsentation beeinflussen oder *per se* immunaktivierende Eigenschaften besitzen (Jenne, Schuler et al., 2001; Ribas, 2005).

Kürzlich wurden mit der Tetra- und Pentamertechnologie weitere interessante Verfahren zum Nachweis epitopspezifischer CD8⁺ CTL und CD4⁺ T-Helferzellen vorgestellt. Beschränkungen dieser Verfahren für einen breiten Einsatz in der T-Zelldiagnostik sind jedoch in den sehr hohen Kosten für die Herstellung der Di- und Tetramere begründet. Zudem ist die Tetra- und Pentamertechnologie bislang nur für eine begrenztes Repertoire von HLA Typen, insbesondere für häufige HLA Klasse I Proteine, beispielsweise HLA A2 verfügbar. Zudem erlaubt diese Technik nur den Nachweis definierter Epitop-spezifischer T-Zellen. Die Austestung von T-Zellreaktivitäten gegen multiple Epitope ist mit diesem Verfahren jedoch nur mit einem großen Zeit- und Kostenaufwand durchführbar.

Ein weiteres sehr aktuelles Verfahren zur Messung Antigen-spezifischer T-Zellen beruht auf dem Einsatz peptidbeladener HLA-Moleküle, die mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) gekoppelt sind. Die epitopspezifische Erkennung und Bindung dieser Komplexe durch den TZR führt zu einer Internalisierung der GFP-markierten Peptide, wodurch die entsprechende CTL sichtbar wird (Tomaru, Yamano et al., 2003).

Für diagnostische Zwecke benötigt man, anders als bei Entwicklung neuer Impfstoffe oder Immuntherapieverfahren ein Stimulatorantigen ohne immunmodulatorische Eigenschaften, da keine neuen T-Zellantworten generiert sondern lediglich bereits bestehende reaktiviert werden sollen. Des Weiteren sollte ein Stimulatorantigen für die T-Zelldiagnostik nach Möglichkeit mehrere HLA Klasse I und II restringierte Epitope enthalten, um ein möglichst breites Spektrum an T-Zellsubpopulationen in Individuen unabhängig deren HLA Ausstattung detektieren zu können. Zusätzlich muss ein Verfahren für diagnostische Zwecke möglichst einfach durchzuführen sein, wenn es in der Routinediagnostik Einzug halten soll. Aus diesen Gründen werden Stimulatorantigene benötigt, die sich bestenfalls direkt auf PBMC oder gar in Vollblut einsetzen lässt.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Arbeitsgruppe für T-Zellimmunologie und T-Zelldiagnostik unter der Leitung von Herrn Dr. Ludwig Deml am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene beschäftigt sich seit mehr als 5 Jahren mit der Entwicklung innovativer Verfahren zur Bestimmung antigenspezifischer T-Zellen und ihrer Zielstrukturen. Dabei wurde unter Mitarbeit von Herrn Barabas mit der Harnstoff-Adjuvierung des BZLF1 Proteins ein

neuartiges Verfahren zum Transfer von löslichen exogenen Proteinen in den MHC Klasse I und II Prozessierungs- und Präsentationsweges entwickelt. Mit Harnstoff-adjuvierte BZLF1 beladene APC erwiesen sich als effiziente Stimulatoren verschiedener Subpopulationen Antigen-spezifischer T-Zellen. Weiterführende molekularbiologische und immunologische Untersuchungen ergaben zudem, dass Harnstoff-adjuvantes BZLF1 (uBZLF1) mittels eines *cross-presentation* Weges in den endogenen Prozessierungsweg von APC eingeschleust und die erzeugten Peptide auf neu synthetisierte MHC Klasse I Moleküle geladen werden.

Auf welchem Weg uBZLF1 von APC internalisiert wird und in welchem Kompartiment die Prozessierung der Epitope erfolgt war bislang unbekannt und sollte in dieser Arbeit ermittelt werden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, welche Faktoren den Transfer von uBZLF1 in den *cross-presentation* Weg vermitteln. Dabei sollte die Bedeutung des Harnstoffs, sowie der Einfluss einer argininreichen Domäne im C-terminalen Bereich des BZLF1 Proteins mit Ähnlichkeit zu der Proteintranslokationsdomäne des Drosophila Antennapedia Proteins untersucht werden. Die Übertragbarkeit der mittels des Modellantigens BZLF1 gewonnenen Daten zur Harnstoff-vermittelten Proteintranslokation in APC auf andere Proteine sollte am Beispiel des Parvovirus B19 Proteins NS1 überprüft werden.

Zudem sollten weitere Stimulationsexperimente mit gereinigten APC darüber Aufschluss geben, welchen APC Subpopulationen zur *cross-presentation* von Harnstoff-adjuvierten Proteinen befähigt sind und zur Reaktivierung verschiedener T-Zellsubpopulationen beitragen. Frühere Untersuchungen belegten, dass die Stimulation von Blutlymphozyten mit Harnstoff-adjuviertem BZLF1 eine spezifische Stimulation CD3-negativer Lymphozyten bewirkt, die mit der Reaktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen einhergeht. Die Identität dieser Zellpopulation war bislang unklar und sollte durchflusszytometrisch bestimmt werden.

In einer weiteren Fragestellung sollte die praktische Anwendbarkeit von Harnstoff-adjuvierten Proteinen für die Identifizierung neuer Zielstrukturen CD8⁺ CTL und das Monitoring von T-Zellantworten bei Patienten näher untersucht werden.

So hatten vorangegangene Untersuchungen ergeben, dass neben HLA B8-positiven Probanden, welche starke CTL Reaktivitäten gegen ein bekanntes Epitop innerhalb von BZLF1 aufweisen, auch etwa 55 % der HLA B8-negativen EBV-positiven Probanden CTL-Reaktivitäten gegen BZLF1 aufweisen. Ziel der geplanten Untersuchungen war es deshalb, unter Einsatz von Harnstoff-adjuviertem BZLF1 diese bislang unbekannten Zielstrukturen von CTL und ihre HLA Restriktion zu bestimmen.

Darüber hinaus sollte in einer bereits laufenden prospektiven Studie die Eignung von uBZLF1 zur immunologischen Überwachung BZLF1-spezifischen T-Zellen in einem 100 Personen umfassenden Kollektiv immunsupprimierter Patienten nach

Nierentransplantation untersucht werden. Dabei sollte den Patienten nach einem vorher festgelegten Schema vor und während der immunsuppressiven Behandlung Blut entnommen werden, um wichtige diagnostische Marker wie Serologie, Viruslast, und T-Zellreaktivitäten zu bestimmen. Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, ob sich Harnstoff-adjuvierte Proteine zum Monitoring immunsuppressiver Behandlungen eignen und ob sich die Frequenz und Funktionalität BZLF1-spezifischer T-Zellen als prognostischer Marker für das Auftreten von EBV-Reaktivierungen und EBV-assozierter Krankheitsbilder, wie lebensbedrohlichen lymphoproliferativen Erkrankungen eignet.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagentien

Alle Chemikalien und Reagentien wurden - wenn nicht anders vermerkt - von den Firmen SIGMA (Deisenhofen), FLUKA Chemie (Buchs, Schweiz) oder Merck (Darmstadt) bezogen. Ansonsten wurden die Herstellerfirmen der verwendeten Reagenzien, Enzyme und Chemikalien an entsprechender Stelle genannt.

2.1.2 Synthetische Peptide

Das zur Aufklärung des Prozessierungs- und Präsentationsweges Harnstoff-adjuvierter BZLF1 Proteine verwendete RAK Peptid, welches ein HLA B8-restringiertes CTL Epitop innerhalb des Epstein-Barr Virus (EBV) BZLF1 Proteins darstellt, sowie das als Negativkontrolle verwendete Peptid E10F aus dem HIV p24 Protein (Bogedain, Wolf, Modrow, Stuber, & Jilg, 1995) wurden von der Firma Biosyntan (Berlin) bezogen (Peptidbank 2). Die zur Grobkartierung neuer CTL Epitope verwendeten Peptide wurden von Frau Prof. Modrow zur Verfügung gestellt (Peptidbank 1) und die zur Feinkartierung verwendeten Peptide wurden von der Firma peptides & elephants, Nuthetal (Peptidbank 3) bezogen. Diese Peptide sind in der folgenden Tabelle aufgelistet. Die Peptide lagen zunächst in lyophilisierter Form vor und wurden entweder mit einer Konzentration von 1 mg/ml in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) oder von 10 mg/ml in DMSO gelöst, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Peptidbank 1

Peptidnummer	Aminosäuresequenz
206	M M D P N S T S E D V K F T
207	E D V K F T P D P Y Q V P F
208	D P Y Q V P F V Q A F D Q A

Peptidbank 1

Peptidnummer	Aminosäuresequenz
209	Q A F D Q A T R V Y Q D L G
210	L W P V L P E P L P Q G Q L
211	S W F S A P Q P A P E N A Y
212	Y Q D L G G P S Q A P L P C
214	Q P A P E N A Y Q A Y A A P
215	P Q G Q L T A Y H V S T A P
221	A P Q P G D N S T V Q T A A
224	G Q Q L A D I G V P Q P A P
225	V P Q P A P V A A P A R R T
226	P A R R T R K P Q Q P E S L
227	Q Q P E S L E E C D S E L E
228	C D S E L E I K R Y K N R V
232	D V D S I I P R T P D V L H
233	L K Q M C P S L D V D S P I P
235	Q L L Q H Y R E V A A A K S
236	V A A A K S S E N D R L R L
295	P S Q A P L P C V
296	S Q A P L P C V L
297	S Q A P L P C V L W
298	S Q A P L P C V L W P V L
308	S Q A Q L P C V L
309	Q A P L P C V L
310	Q A P L P C V K
357	R K C R A K F K Q L
358	C R A K F K Q L L Q
359	K F K Q L L Q H Y R
360	P V S D I T Q N Q Q T N Q A G
374	N D R L R L L L K Q M C P S L
381	K C R A K F K Q L L Q
382	R A K F K Q L L Q H
383	A K F K Q L L Q H Y
386	K F K Q L L Q H Y

Peptidbank 1

Peptidnummer	Peptidnummer
387	RAKFKQLLQ
438	RAKFKHLLQ
439	RAKFKQLL
440	KCRAKFKQLLQHYR
441	CRAKFKQLLQHYR
442	RAKFKQLLQHYR
443	AKFKQLLQHYR
448	RKCRAKFKQLLQH
449	RKCRAKFKQLQH
535	RKCRAKFKQLLQHYRE
536	RKCRAKFKQLLQHYREV
537	SRKCRAKFKQLLQHYR
538	ASRKCRAKFKQLLQHYR
539	ASRKCRAKFKQLLQHYRE
540	ASRKCRAKFKQLLQHYREV
613	AKCRKFQLLQ
614	RACRAKFKQLLQ
615	RKAKRAKFQLLQ
616	RKCAAKFQLLQ
617	RKCRAAFKQLLQ
618	RKCRAKAKQLLQ
619	RKCRAKFAQLLQ
620	RKCRAKFKALLQ
621	RKCRAKFKQALQ
622	RKCRAKFKQLAQ
623	RKCRAKFKQLLA

Peptidbank 2

Peptidname	Aminosäuresequenz
E10F	EPFRDYVDRF
RAK	RAKFKQLL

Peptidbank 3

Peptidname	Aminosäuresequenz
PE1	C D S E L E I K R Y K N R V
PE2	D S E L E I K R Y
PE3	S E L E I K R Y K
PE4	E L E I K R Y K N
PE5	L E I K R Y K N R
PE6	E I K R Y K N R V
PE7	D S E L E I K R Y K
PE8	D S E L E I K R Y K N
PE9	D S E L E I K R Y K N R
PE10	D S E L E I K R Y K N R V
PE11	D S E L E I K R Y K N R V A
PE12	D S E L E I K R Y K N R V A S
PE13	D S E L E I K R Y K N R V A S R
PE23	C D S E L E I K
PE24	D S E L E I K R
PE25	S E L E I K R Y
PE26	E L E I K R Y K
PE27	L E I K R Y K N
PE28	E I K R Y K N R
PE29	I K R Y K N R V

Tabelle 2.1: Auflistung der verwendeten synthetischen Peptide und ihrer Bezeichnungen.

2.1.3 Rekombinante Antigene

Das Epstein-Barr Virus Protein uBZLF1 und gentechnisch modifizierte uBZLF1 Δ PTD wurde dankenswerterweise von Frau Dr. Petra Lindner (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Regensburg) nach Expression in *E. coli* und anschließender Aufreinigung zur Verfügung gestellt. uBZLF1 lag in einer Konzentration von 1 mg/mL, uBZLF1 $\Delta_{176-189}$ in 0,71 mg/mL in 8 M Harnstoff, 2 M NaCl und 2 mM DTE vor. Das nach Dialyse von Harnstoff gereinigte, schließlich in

einer Konzentration von 1 mg/ml verliegende BZLF1 Protein wurde ebenfalls von Frau Dr. Petra Lindner zur Verfügung gestellt.

2.1.4 Antikörper

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
monoklonale Antikörper für <i>Elispot-assays</i>		
Maus anti-Human IFN γ	Abfangantikörper	MabTech, Hamburg
Maus anti-Human IFN γ Biotin	Detektion	MabTech, Hamburg
monoklonale Antikörper für FACS-Analysen		
Maus anti-Human CD3; FITC	Färbung	BectonDickinson, Heidelberg
Maus anti-Human CD3; ECD	Färbung	Beckman Coulter, Krefeld
Maus anti-Human CD4; Pc5	Färbung	Beckman Coulter, Krefeld
Maus anti-Human CD8; ECD	Färbung	Beckman Coulter, Krefeld
Maus anti-Human CD14, FITC	Färbung	BectonDickinson, Heidelberg
Maus anti-Human CD16; Pc5	Färbung	BectonDickinson, Heidelberg
Maus anti-Human CD19; Pc5	Färbung	BectonDickinson, Heidelberg
Maus anti-Human CD28	Kostimulation	BectonDickinson, Heidelberg
Maus anti-Human CD45; FITC	Kompensation	BectonDickinson, Heidelberg
Maus anti-Human CD45; PE	Kompensation	BectonDickinson, Heidelberg
Maus anti-Human CD45; ECD	Kompensation	BectonDickinson, Heidelberg
Maus anti-Human CD45; Pc5	Kompensation	BectonDickinson, Heidelberg
Maus anti-Human CD49d	Kostimulation	BectonDickinson, Heidelberg
Maus anti-Human CD56; Pc5	Färbung	Beckman Coulter, Krefeld
Maus anti-Human CD80; FITC oder PE	Färbung	BectonDickinson, Heidelberg

monoklonale Antikörper für FACS-Analysen		
Maus anti-Human CD83; FITC oder PE	Färbung	Becton Dickinson, Heidelberg
Maus anti-Human CD86; FITC oder PE	Färbung	Becton Dickinson, Heidelberg
Maus anti-Human IFN γ ; PE	Färbung	Becton Dickinson, Heidelberg
Maus anti-Human HLA-DR; FITC	Färbung	Becton Dickinson, Heidelberg
Isotypkontrollen		
Maus FITC	Kontrollfärbung	Beckman Coulter, Krefeld
Maus PE	Kontrollfärbung	Beckman Coulter, Krefeld
Maus ECD	Kontrollfärbung	Beckman Coulter, Krefeld
Maus Pc5	Kontrollfärbung	Beckman Coulter, Krefeld
Ziege	Kontrolle	Abcam, Cambridge; USA
Inhibitorische Antikörper		
Maus Anti-IL-12	Hemmung	Abcam, Cambridge; USA
monoklonale Antikörper für Western Blotts		
Maus anti-BZLF1	Primärer Antikörper	DAKO, Hamburg
Ratte anti-Maus-IgG	Sekundärer Antikörper	Biorad, München

Tabelle 2.2: Auflistung der verwendeten Antikörper, ihres Verwendungszweckes und ihrer Hersteller.

2.1.5 Humane Zellen und Nährmedien

Die für diese Arbeit benötigten Spenden peripherer Blutlymphozyten entstammten zum Großteil Kollektiven gesunder Spender des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene und des Instituts für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Regensburg. Des Weiteren wurden im Rahmen eines gemeinsamen ReForM C Projektes „Funktionsverlust bei Nierentransplantaten:

Bedeutung immunologischer und nicht-immunologischer Faktoren“ von Herrn Prof. Dr. B. K. Krämer der Klinik und Polyklinik für Innere Medizin II des Klinikums Regensburg Blutproben von Patienten zu verschiedenen Zeiten vor und nach einer erfolgten Nierentransplantation zur Verfügung gestellt.

Der EBV Status der individuellen Spender wurde, sofern nicht bereits bekannt, in der Virusdiagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie bestimmt. Die HLA Klasse-I und –II Typisierung erfolgte am Institut für Klinische Chemie der Universität Regensburg mittels eines serologischen Verfahrens (Testkit von BMT Laborprodukte, Krefeld) aus CPDA Blut. Die Ergebnisse der HLA Typisierung aller an dieser Studie teilhabenden gesunder Spender (Tab. 2.3) sind nachfolgend aufgelistet.

Spender	HLA-A-Allel	HLA-B-Allel	HLA-C-Allel
FS	1; 3	7; 8	Cw4; 7
SD	1; 2	8; 44(12)	Bw4,6; Cw5,7
MF	1; 3	8; 39	Bw6; Cw7
SW	19; *	18; 44(12)	Bw4,6; Cw5
AD	1; 11	18; 51(5)	Bw3,7
DH	2; 26(10)	18; 37	Bw4,6; Cw6,7
MA	2; 30	18; 62	Bw6; Cw3,7
ST	31(19); 32(19)	7; 18	Bw6; Cw7
HH	24(9); *	35; 44(12)	Bw4,6; Cw5
TH	9; 19	17; 35	Bw4,6; Cw4
JL	24(9); 25	13; 37	Bw4; Cw2,6
IK	3; 33	35; 45(12)	Bw4,6; Cw4,6
PM	2; 3	44(12); 45	n.d.

Tabelle 2.3: Übersicht über die HLA Ausstattung des Kollektivs gesunder Spender. Alle Spender sind EBV seropositiv. Aus Gründen des Datenschutzes sind die Namen codiert.

Die wegen Nierentransplantation immunsupprimierten Patienten sind in der Tabelle 2.4 näher zusammengefasst. Die Immunsuppression wurde mit einer Kombination eines Calcineurininhibitors, eines Proliferationsinhibitors und einem allgemein entzündungshemmenden Glukokortikoid durchgeführt.

Charakterisierung der Patienten	Anzahl
Geschlecht (m/f)	99 (76/23)
Durschnittsalter bei Transplantation	51 (20-75) Jahre
Erkankt an:	
PTLD	0
andere EBV assoziierte Erkrankungen	0
EBV Serologie der Patienten	
Durchseuchungstiter (IgG)	98
Temporäres Auftreten von anti EBV IgM	3
Viruslast in den Patienten	
unter der Nachweisgrenze	64
Temporär zw. 100 und 1000 Kopien	29
Temporär zw. 1000 und 10.000 Kopien	6
Temporär über 10.000 Kopien	0
HLA Status	
HLA B8	24
HLA B18	9

Tabelle 2.4: Charakterisierung der Patient. Die Werte sind, wenn nicht anders angegeben, die Anzahl der Patienten.

Aus humanen Monozyten gewonnene unreife und reife Dendritische Zellen wurden freundlicherweise von Herrn Christian Schütz (Institut für Innere Medizin I, Regensburg) zur Verfügung gestellt.

Alle zur Kultivierung der Zellen verwendeten Zellkulturmedien und Medienzusätze wurden von der Firma PanSystems (Aidenbach) bezogen.

2.1.6 Materialien für gentechnische Arbeiten

2.1.6.1 Plasmide

Der Vektor pET-5c wurde als Ausgangsvektor für die Klonierung und anschließende Modifizierung des BZLF1 Leserasters verwendet. Er ist kommerziell bei Novagen (Madison, USA) erhältlich.

2.1.6.2 Oligonukleotide

Die konstruierten Oligonukleotide wurden als Primer für die PCR eingesetzt und von der Firma Invitrogen, Karlsruhe synthetisiert. Die in lyophilisierter Form gelieferten Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 100 pmol/ μ L in TE aliquotiert und bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert. Für das Einsetzen der Oligonukleotide in PCR-Reaktionen wurde die Stammlösung auf eine Konzentration von 10 pmol/ μ L mit H₂O_{bid.} verdünnt.

2.1.6.3 Restriktionsenzyme

Für die Klonierungen und analytischen Untersuchungen von Plasmiden wurden Enzyme mit den zugehörigen Puffern von den Firmen Roche (Mannheim) oder New England Biolabs (NEB) GmbH (Schwalbach, Taunus) verwendet.

2.1.6.4 Bakterienstämme und Nährmedien

Die während dieser Arbeit durchgeführten Klonierungsarbeiten wurden ausschließlich mit dem *Escherichia coli* (*E. coli*) K12-Bakterienstamm DH5 α (Hanahan, 1983) durchgeführt.

DH5 α : F-(ϕ 80dlacZ Δ M15) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 ($r_k^-m_k^+$)supI
 Δ (lacZYA-argF) U169
(Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Göttingen)

Bakterien wurden als Suspensionskultur in sterilem *Luria Bertani* (LB)-Medium oder zur Vereinzelung von Kolonien auf LB-Agar-Platten kultiviert. Die Selektion erfolgte durch Zugabe von Ampicillin in das Medium.

LB₀-Medium: 1% Bacto-Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl; pH 7,5 einstellen mit NaOH

LB_{amp}-Medium: 1% Bacto-Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl; pH 7,5 einstellen mit NaOH; Zugabe von Ampicillin auf eine Endkonzentration von 0,1 mg/mL

LB_{amp}-Platten: LB_{amp}-Medium + 1,5% Agar

2.1.7 Computerprogramme

Der Text und die Tabellen wurden mit den Programmen Word und Excel für Windows, Version 2000 (Microsoft) auf einem IBM-kompatiblen Personal Computer erstellt. Die Diagramme wurden mit Power Point für Windows Version 2000 (Microsoft) oder mit Sigma Plot 8.0 für Windows Version 2002 erstellt. Die Auswertung der FACS Daten erfolgte unter Verwendung der Expo 32 ADC Software (Beckman Coulter, Krefeld). Zur Auswertung der Elispot-Platten wurde eine bereits auf dem Bioreader 2000 installierte Software der Firma Bio-Sys (München) genutzt. Die Bildbearbeitung erfolgte unter Einsatz der „Adobe Photoshop“ Software (Adobe Systems Inc., San Jose, USA). Für die Literatursuchen wurde das PubMed Suchprogramm benutzt. Die Erstellung des Literaturverzeichnisses erfolgte mit dem Programm Reference Manager 10 für Windows (Research Information Systems Inc., Carlsbad, USA). Für DNA-Sequenzuntersuchungen und Planung von Klonierungsstrategien wurden die Programme Generunner (Hastings Software Inc.), Chromas (Conor McCarthy) und DNAMan (Lynnon BioSoft, Quebec, Kanada) verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien nach der RbCl-Methode wurden 200 mL SOC/SOB-Medium (Sambrook, Fritsch *et al.*, 1989) in einem Verhältnis von 1:100 mit einer ÜN-Bakterienkultur angeimpft. Nach Erreichen einer OD von 0,3 bis 0,5 bei einer Wellenlänge von 600 nm wurden die Bakterien bei 4°C und 400 × g in einer Tischzentrifuge sedimentiert (Centrifuge 5417C, Eppendorf, Hamburg), in 100 mL Transformationspuffer T1 (100 mM 3-N-Morphololinopropansulfonsäure, pH 5,8, 30 mM KAc, 10 mM RbCl, 15% Glyzerin) resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Nach anschließender Resuspension mit 50 mL Transformationspuffer T2 (10 mM MOPS, pH 6,5, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂ × 2 H₂O, 15% Glyzerin) wurde die resultierende

Bakteriensuspension aliquotiert, unmittelbar in flüssigem Stickstoff rasch eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.1.2 Transformation von *Escherichia coli* mit Plasmid-DNA

Kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*)-Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit 50 ng bis 1 µg Plasmid-DNA versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10-30 min auf Eis, in der die DNA an die Zellen adsorbieren konnte, wurden die Proben für 45 Sekunden auf 42°C (Hitzeschock) erwärmt und anschließend 5 min auf Eis gestellt. Der Reaktionsansatz wurde nach Zugabe von 900 µL LB-Medium für 1 Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert, wobei die Antibiotikaresistenz des transformierten Plasmids exprimiert werden konnte. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf LB_{amp}-Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank angezogen, um transformationspositive Einzelkolonien zu erhalten.

2.2.1.3 Kultivierung und Aufbewahrung von Bakterien

2.2.1.3.1 Flüssigkulturen

Steriles LB_{amp}-Medium wurde mit einer Bakterien-Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C in einem Inkubationsschüttler (Orbital Shaker, Forma Scientific, Marietta, OH, USA) bei 180 rpm inkubiert. Die Bestimmung der Bakterienkonzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm (UVICON 930 Spektrometer, Kontron Instruments) gegen das Kulturmedium (1 OD₆₀₀ = 8 x 10⁸ Bakterien/mL).

2.2.1.3.2 Plattenkulturen

Mit einer sterilen Impföse wurden von einer einzelnen Bakterienkolonie, aus einer Flüssigkultur oder einer Glyzerinkultur Bakterien aufgenommen und auf einer LB- oder, im Falle von transformierten Bakterien mit Ampicillinresistenz, auf LB_{amp}-

Agarplatten so ausgestrichen, dass nach Inkubation über Nacht im 37°C Brutschrank (Heraeus Instruments) Einzelkolonien isoliert werden konnten.

2.2.1.3.3 Glyzerinkulturen

Die Bakterien einer Einzelkolonie wurden in 5 mL Flüssigkultur aufgenommen. Nach Erreichen der stationären Phase wurde die Bakteriensuspension bei 4.000 rpm für 5 min in einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5417R, Eppendorf) abzentrifugiert, in 0,5 mL LB-Medium resuspendiert und in *CryoTube™*-Gefäßen (Nalge Nunc International, Hereford, UK) mit 0,5 mL steriles Glyzerin (37%) gemischt. Die so erhaltenen Kulturen sind bei -80°C in einem Ultra-Gefrierschrank (Heraeus Sepatec, Osterode) nahezu unbegrenzt haltbar.

2.2.1.4 Präparation und Reinigung von Plasmid-DANN

2.2.1.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Schnelllyse

Kleine Mengen von Plasmid-DNA für Klonierungsarbeiten und zur Charakterisierung positiver Klone wurden aus 5 mL Übernachtkulturen durch alkalische Schnelllyse gewonnen (Birnboim & Doly, 1979). Hierzu wurden jeweils 1,5 mL der Bakterienkultur in 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 5.000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das resultierende Bakteriensediment wurde in 300 µL Puffer S1 (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg RNase A/mL, pH 8) resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µL Puffer S2 (200 mM NaOH, 1% SDS) wurde der Inhalt des Reaktionsgefäßes durch wiederholtes Schwenken gemischt. Anschließend wurden 300 µL eiskalter Puffer S3 (2,8 M KAc, pH 5,1) zur Fällung von Proteinen, SDS und chromosomaler DNA zum Ansatz pipettiert. Nach vorsichtigem Mischen und einer 20-minütigen Inkubation auf Eis wurden die gefällten Komponenten durch Zentrifugation bei 14.000 rpm für 30 min in der Tischzentrifuge pelletiert. Der resultierende Überstand wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 630 µL Isopropanol durch Schwenken gemischt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz bei 14.000 rpm für 30 min in der Tischzentrifuge

abzentrifugiert, um die durch das Isopropanol gefällte Plasmid-DNA zu pelletieren. Das erhaltene DNA-Pellet wurde im Weiteren mit 1 mL 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µL H₂O_{bid.} aufgenommen. Üblicherweise wurden 10 µL dieser Plasmid-Lösung im Restriktionsansatz verwendet.

2.2.1.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA über Nucleobond®-Säulen

Für die Sequenzierungsreaktionen wurde Plasmid-DNA in der Regel über Nucleobond®-Säulen (Anionenaustausch-Chromatographie) nach Angaben des Herstellers (Macherey-Nagel, Düren) gereinigt. Hierbei wurden Midi-(Nucleobond-AX100) Säulen verwendet.

Die Konzentration und Reinheit isolierter Plasmid-DNA wurde analog zu B.2.1.5. ermittelt. Die erhaltene DNA wurde auf eine Konzentration von < 5 µg/µL mit H₂O_{bid.} eingestellt, um DNA-Degradation bei einer Lagerung bei -20°C zu vermeiden.

2.2.1.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration und Reinheit isolierter Plasmid-DNA wurde mit Hilfe eines Zweistrahl Spektrometers (UVICON 930 Spektrometer, Kontron Instruments) in einem UV-Absorptionsspektrum zwischen 230 nm und 300 nm ermittelt. Aus dem Wert der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 258 nm (OD₂₅₈) konnte anschließend die Konzentration doppelsträngiger DNA (dsDNA) nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet werden (1 OD₂₅₈ = 47,5 µg dsDNA/mL).

2.2.1.6 Präparativer Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die aus *E. coli* isolierte Plasmid-DNA wurde für präparative Zwecke mit Restriktionsendonukleasen enzymatisch geschnitten. Eine Einheit (U) bezeichnet dabei die Enzymaktivität, die benötigt wird, um 1 µg λ-DNA in einer Stunde bei optimalen Temperatur-, Puffer- und pH-Bedingungen vollständig zu schneiden.

In einem Standardansatz für einen präparativen Verdau wurden 5 µg bis 30 µg Plasmid-DNA mit je 60 U Restriktionsenzym (Roche, Mannheim oder NEB, Frankfurt am Main) und in 1/5 Volumen Restriktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 50 µL bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur für mindestens 90 min inkubiert.

2.2.1.7 Auf trennung von DNA Fragmenten mittels Agarosegelektrophorese

Prinzip:

Bei der Gelektrophorese werden DNA Fragmente elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt, da die kleineren negativ geladenen DNA Stücke schneller die Siebstruktur des Gels zum Pluspol durchwandern als die größeren. Zur Auf trennung wurde jeweils ein einprozentiges TBE-Agarosegel verwendet.

Durchführung:

Man wiegt 1% (w/v) Agarose ein und kocht es in einem entsprechenden Flüssigkeitsvolumen TBE-Puffer auf bis es vollkommen klar ist. Nach Zugabe von Ethidiumbromid in einer Konzentration von etwa 0,2 µg/mL, das zum Färben und Sichtbarmachen der DNA dient, kann das noch flüssige Gel in die Apparatur gegossen werden. Ethidiumbromid lagert sich interkalierend in die DNA ein, die somit im UV-Licht sichtbar gemacht werden kann.

Nach Erhärten des Gels können die mit Probenauftragspuffer versetzen Proben auf das Gel aufgetragen werden. Zum Beschweren der DNA-Fragmente beinhaltet der DNA-Probenauftragspuffer Glycerin (30% v/v). Damit man den DNA-Lauf verfolgen kann, sind dem Auftragspuffer zusätzlich Xylencyanol und Bromphenolblau zugesetzt, die im Agarosegel wie DNA-Fragmente von etwa 2000 bzw. 500 bp Länge migrieren.

Als Größenmarker wurden der Marker VII und VIII der Firma Roche (Mannheim) und der 1kb-ladder der Firma NEB verwendet.

Die Elektrophorese erfolgte im TBE Laufpuffer (54 g Tris-Base, 27,5 g Borsäure, 20 mL 0,5 M EDTA pH 8,0, auf 1000 mL H₂O).

2.2.1.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die mit Restriktionsendonukleasen geschnittenen und über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente wurden für die anschließende Ligation aus dem Agarosegel ausgeschnitten und unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) eluiert. Alle im Versuch verwendeten Puffer wurden von der Firma Qiagen mitgeliefert. Die zu eluierende, ausgeschnittene Bande wurde in 300 µL Puffer QG unter 10-minütigem Schütteln bei 50°C gelöst und anschließend mit 100 µL Isopropanol versetzt. Die resultierende Suspension wurde im darauf folgenden Schritt in QIAquick-Säulchen gefüllt. Durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (1 min, 13.000 rpm, RT) wurde die Lösung durch die Säule gepresst, wobei die DNA an die glasmilchhaltige Säulenmatrix adsorbierte. Nach zweimaligem Waschen mit 750 µL Puffer PE wurde die DNA mit 50 µL H₂O_{bid.} von der Säulenmatrix eluiert

2.2.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die isolierten Vektor- und Fragment-DNAs wurden je nach Fragmentgröße in einem molaren Verhältnis von 1:2 bis 1:50 in die Ligationsreaktion eingesetzt. Der 20 µL Standard-Ligationsansatz enthielt neben der Fragment-DNA die Vektor-DNA (100 ng), 1 µL (1 U) T4-DNA-Ligase (NEB, Schwalbach, Taunus) und 2 µL des 10-fach konzentrierten T4-Ligase-Puffers (20 mM Tris/HCl pH 7,6, 5 mM Dithiothreitol (DTT), 5 µg/mL BSA (bovine serum albumine), 0,1 mM ATP). Die Reaktion erfolgte über Nacht bei einem Temperaturgradienten von 0°C bis RT und konnte anschließend direkt zur Transformation von *E. coli* verwendet werden.

2.2.1.10 DNA-Sequenzierung

Alle DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Entelechon GmbH (Regensburg, Deutschland) nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Die DNA wurde in der Regel in einer Konzentration von 0,1-0,2 µg/µL zur Sequenzierung geliefert.

2.2.1.11 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Prinzip:

Bei der SDS-PAGE werden Proteine in Gegenwart eines hohen SDS-Überschusses elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dabei lagert sich das negativ geladene SDS in konstanten Gewichtsverhältnissen an die Proteine an und kompensiert deren positive Ladungen in einer Weise, dass alle Proteine ihrer Größe entsprechend zur Anode wandern. Nach LAEMMLI (Laemmli, 1970) werden die Probenproteine unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel konzentriert und wandern von dort gemeinsam in das eigentliche Trenngel ein.

Durchführung:

Der Aufbau der verwendeten Gelapparaturen (Biorad, München) und das Gießen der Gele sind der Beschreibung der Gerätehersteller, die genaue Zusammensetzung der Gellsösungen der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

Die Proteinproben wurden vor dem Aufbringen auf das Gel mit mindestens dem gleichen Volumen eines 2-fach konzentrierten SDS-Probenpuffers (125 mM Tris, 2% 2-Mercaptoethanol, 10% Glycerin, 1 mM EDTA pH 6,8, 0,005% Bromphenolblau) versetzt und für 5 bis 10 min im Heizblock bei 100 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in einem speziellen Laufpuffer (15 g Tris, 72 g Glycin, 25 ml 20% SDS, auf 5 l mit H₂O_{bid}) bei 20 bis 50 mA und wurde direkt nach dem Auslaufen der Bromphenolblau-Bande gestoppt.

Nach der SDS-PAGE konnten die aufgetrennten Proteine über eine Anfärbung des Gels mittels Coomassie Brilliant Blau oder mit Silbersalzen nachgewiesen werden.

Trenngellösung	Sammelgellösung
12,5 %	5 %
Protogel™, reinst	
(30 % Acrylamid,	6 ml
0,8 % Bisacrylamid)	0,99 ml
1,88 M Tris/HCl	3,6 ml
pH 8,8	

0,625 M Tris/HCl		1,2 ml
pH 6,8		
0,5 % SDS	3,6 ml	1,2 ml
H ₂ O bid.	4,8 ml	2,6 ml
TEMED	15 µl	6 µl
10 % Ammonium-peroxodisulfat	90 µl	30 µl

Tabelle 2.5: Typische Zusammensetzung von PA-Gelen

2.2.1.12 Färbung mit Coomassie Brilliant Blau

Für die Anfärbung von Proteinen mittels Coomassie Brilliant Blau wurden die Proteingele nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mindestens für 1 h bei Raumtemperatur in einer Coomassie-Färbelösung (45% Methanol, 10% Essigsäure, 0,25% Coomassie Brilliant Blau R250) inkubiert. Anschließend wurden die gefärbten Gele in einer Entfärbelösung (45% Methanol, 10% Essigsäure) solange leicht geschüttelt, bis der Hintergrund klar und nur noch die Proteinbanden blau gefärbt waren. Zur Konservierung wurden die Gele anschließend auf Whatman 3MM-Papier im Vakuum bei 70°C für 2 h getrocknet.

2.2.1.13 Detektion spezifischer Proteine mit Hilfe monoklonaler Antikörper im Western-Blot

Der Transfer von aufgetrennten Proteinen aus einem Polyacrylamid-Gel auf Nitrocellulose (Millipore Immobilon NC pure, MILLIPORE, Bedford) erfolgte in einer Fast-Blot „semidry“-Apparatur (BIOMETRA, Göttingen) mit dem BIORAD-Transferpuffer (150 mM Glycin, 25 mM Tris pH 8,3, 10% Methanol) nach Angabe des Herstellers für 20 bis 60 min bei einer Stromstärke von 5 mA/cm². Die denaturierten Proteine wandern, entsprechend ihres Molekulargewichts in Richtung Anode und werden auf der Nitrocellulose immobilisiert. Zur Überprüfung des erfolgten Proteintransfers und zur Markierung der Molekulargewichtsstandards wurden die Proteine reversibel mit Ponceaurot S-Lösung angefärbt und anschließend durch

Waschen mit TTBS-Puffer (*tween-tris buffered saline*: 150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,02 M Tween 20) wieder entfärbt.

Der Nachweis von Proteinen beruht auf der spezifischen Bindung eines primären, monoklonalen Antikörpers und dessen Erkennung durch einen sekundären, Enzym-konjugierten Antikörper. Die chemische Reaktion durch das an den sekundären Antikörper gekoppelte Enzym Alkalische Phosphatase (AP) bzw. Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase*, HRP) führt schließlich zu einer Anfärbung in der Umgebung des Proteins. Die Absättigung freier und unspezifischer Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran nach dem Proteintransfer erfolgte für mindestens eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C mit einer 5%igen Magermilch-TBS-(*tris buffered saline*: 150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7,5) Lösung. Danach wurde die Nitrocellulosemembran dreimal 15 min mit TBS gewaschen, abschließend einmal 10 min mit TTBS, bevor sie über Nacht bei 4°C mit einer 1:2.000-Verdünnung des primären Antikörpers inkubiert, wiederum mit TBS und TTBS gewaschen und anschließend mindestens eine Stunde mit einer 1:2.000 Verdünnung des AP- bzw. HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers geschüttelt wurde. Nach erneutem Waschen folgte die Färbung mit den chromogenen Substraten der alkalischen Phosphatase (200 µl NBT/BCIP in 10 ml AP-Puffer: 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM Tris) bzw. Meerrettich-Peroxidase (5 ml 0,5 M Tris/HCl pH 7,5, 2,4 ml 10% NiCl₂, 30 µl 30% H₂O₂, eine Spatelspitze 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), ad 50 ml H₂O_{bid}). Die Färbereaktionen wurden durch Waschen der Nitrocellulosemembran mit H₂O_{bid}. abgestoppt.

2.2.2 Gewinnung und Kultivierung von Zellen

2.2.2.1 Aufreinigung von peripheren Blutzellen (PBMC)

Periphere Lymphozyten aus dem Blut (PBMC) wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus heparinisiertem Vollblut (Heparin-Endkonzentration: 25 IU/ml) verschiedener EBV-negativer, HLA B8-positiver-, oder EBV-positiver, HLA B8-negativer bzw. EBV-positiver, HLA B8-positiver Probanden gewonnen. Hierfür wurde in speziellen 50 ml Leucosep-Röhrchen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) 15 ml Ficoll (PAN, Aidenbach) vorgelegt und mit Vollblut (2:1

mit PBS verdünnt) überschichtet. Bei der anschließenden Zentrifugation (30 min, $800 \times g$, Ausschwingrotor, Raumtemperatur) erfolgte eine Auftrennung in Plasma, PBMC und Erythrozyten. Die gewünschten PBMC wurden abgezogen und in ca. 30 ml PBS zweimal gewaschen. Die Sedimentation der Zellen erfolgte jeweils durch kurze Zentrifugation (5 min, $250 \times g$, Raumtemperatur). Das Zellpellet wurde abschließend in T-Zellmedium aufgenommen, die Zellzahl ermittelt und die Zellen in den entsprechenden Versuchen eingesetzt.

2.2.2.2 Kultivierung von humanen Zellen

Die Kultivierung von gereinigten peripheren Blutlymphozyten (PBMC) und reifen dendritischen Zellen erfolgte in RPMI-1640 Medium, angereichert mit 10% (v/v) hitzeaktiviertem (30 min, 56°C) fötalem Kälberserum (FKS), 2 mM L-Glutamin, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml). Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (PBMC) bzw. 6-Napf Platten (Dendritische Zellen) (BD, Heidelberg) bei 37°C und einer befeuchteten Atmosphäre mit 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert.

2.2.2.3 Bestimmung der Lebendzellzahl in der Zellkultur

Die Lebendzellzahl wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierfür wurden 50 µl der Zellsuspension mit der gleichen Menge einer 0,5%-igen Trypanblaulösung (Merck, Darmstadt) vermischt. Tote Zellen erscheinen durch den in die Zellmembran eindringenden Farbstoff blau und können so von vitalen, transparenten Zellen unterschieden werden.

2.2.2.4 Untersuchung von Apoptose in Lymphozyten

Prinzip:

Ein frühes Ereignis nach Apoptoseinduktion in einer Zelle ist die Translokation von Phosphatidylserin von der Innenseite der Zellmembran auf deren Außenseite. Die Verschiebung dieses Phospholipids kann durch die Anlagerung des spezifischen Moleküls Annexin V durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Da dieses

Moleköl aber auch in nekrotischen Zellen bindet, muss zusätzlich zu der Annexin V Färbung auch noch eine Färbung mit einem DNA-markierenden Farbstoff wie z. B. Propidiumjodid (PI) durchgeführt werden. PI gelangt nur nach Zerstörung der Zellmembran in die Zelle und interkaliert dort in die DNA. Bei dem Auftragen der doppelt gefärbten Zellen als Dotplot kann man dann apoptotische und nekrotische Zellen von vitalen unterscheiden.

Durchführung:

Zur Detektion von Apoptose wurden Zellen mit eiskaltem PBS (PAA) zweimal gewaschen (300x g, 10 Minuten, 4°C). Bei der Verarbeitung der Proben ist eine durchgehende Kühlung sehr wichtig, da Apoptose ein enzymatischer, energieabhängiger Prozess ist und durch eine Erhöhung der Temperatur das Ergebnis verfälscht werden kann. Die Proben wurden in 100 µl Annexin V-Bindungspuffer (1ml HEPES, 8,12 g NaCl und 0,28 g CaCl₂ ad 1 l H₂O) resuspendiert und mit 10 µl PI Lösung (50 µg/ml in PBS) sowie 5 µl Annexin V-FITC (Caltag) für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 400 µl Annexin V-Bindungspuffer wurden die Proben innerhalb einer Stunde im Durchflusszytometer (EPICSXL-MCL, Coulter Electronics) analysiert. Bei der Auswertung der durchflusszytometrischen Daten konnten die Anzahl toter Zellen ermittelt werden.

2.2.2.5 Bestimmung der Zytotoxizität chemischer Substanzen

Zur Bestimmung der zytotoxischen Eigenschaften von chemischen Substanzen wurden jeweils 1×10^6 PBMC in 400 µl TZM in Näpfen einer 48-Napfplatte (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) beispielsweise mit 100 µL 0 M bis 8 M Harnstofflösung oder anderer Substanzen in TZM versetzt und die Zellen für 20 h bei 37°C und 5% CO₂ in einem befeuchteten Brutschrank inkubiert. Danach wurden am Boden befindliche Zellen durch wiederholtes auf und ab pipettieren resuspendiert und das Verhältnis lebender zu toter Zellen mittels Annexin V / PI Färbung (siehe Absatz 2.2.2.4) ermittelt.

2.2.2.6 Isolierung verschiedener Lymphozytensubpopulation mit dem MACS System

Prinzip:

Bestimmte, auf Antigen cross-Präsentation von uBZLF1 zu untersuchende Zellpopulationen wie B-Zellen oder Monozyten wurden mit an paramagnetische Kugelchen gekoppelte Antikörper markiert und an einem Magneten immobilisiert, während die nicht-markierten Zellen weggewaschen wurden. Auf diese Weise lassen sich diverse PBMC Subpopulationen einzeln anreichern oder aus einem Gesamtansatz entfernen.

Durchführung:

Mit Hilfe des MACS-System (*magnetic cell sorting*) wurden Monozyten und B-Zellen aus frisch präparierten PBMC durch positive Selektion aufgereinigt. Dazu wurden die Zellen mit entgastem PBS (80 µl / 10^7 Zellen) versetzt und 15 Minuten bei 2-8°C mit anti-CD14- oder anti-CD19-MicroBeads (20 µl / 10^7 Zellen; Antikörper mit paramagnetischen Partikeln, Miltenyi Biotec) inkubiert, anschließend gewaschen und über eine LS-Säule (Miltenyi Biotec) mit magnetisierbarem Säulenmaterial in ein starkes Magnetfeld geleitet. Dabei wurden die markierten Lymphozyten in der Säule zurückgehalten, nicht markierte Zellen verließen die Säule im Eluat. Nach dem Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld wurden die markierten Zellen aus der Säule gewaschen und nochmals auf eine neue Säule aufgetragen, um durch wiederholte Anreicherung die Reinheit zu erhöhen. Im Anschluss an die Aufreinigung wurden die Lymphozyten mit einer FACS-Färbung auf ihre Reinheit hin untersucht. Die angereicherten APC Populationen bestanden zu $\geq 99\%$ aus CD14⁺ Monozyten bzw. CD19⁺ B-Zellen.

2.2.2.6 Depletion verschiedener Lymphozytensubpopulation mit dem Dynal System

Prinzip:

Bestimmte T-Zellpopulationen wie CD4⁺ Th-Zellen oder CD8⁺ CTL wurden mit an paramagnetische Kugelchen gekoppelte Antikörper markiert und an einem Magneten

immobilisiert, während die nicht-markierten Zellen aufgefangen wurden. Auf diese Weise lassen sich diverse PBMC Subpopulationen einzeln aus einem Gesamtansatz entfernen.

Durchführung:

Mit Hilfe des Dynal Systems wurden CD4⁺ T_h-Zellen oder CD8⁺ CTL aus PBMC Komplettpopulationen entfernt. Dabei wurden zunächst die verwendeten paramagnetischen Dyna-Kügelchen in 1 ml PBS gewaschen. Alle Reagenzien und die Zellen wurden während dieses Verfahren bei 2 – 8 °C gehalten um die Phagozytoseaktivität bestimmter Zellen und andere metabolische Prozesse zu unterbinden. Die zu depletierende Zellen wurden auf 2,5 x 10⁷ / ml in PBS mit 0,1 % BSA eingestellt. Dann wurden 50 µl/ml Dyna-Kügelchen zugegeben und das Gemisch 30 min bei 2 – 8 °C geschwenkt. Nach dieser Markierung der zu entfernenden Zellen wurde das Zellgemisch in einen Magneten gespannt, woraufhin sich alle markierten Zellen am Rande des Reaktionsröhrchens anhefteten. Die gesuchten, nicht markierten Zellen konnten nun mit dem Überstand abgenommen werden. Im Anschluss an die Aufreinigung wurden die Lymphozyten mit einer FACS-Färbung auf ihre Reinheit hin untersucht. Die depletierten PBMC enthielten jeweils 0,0% verbleibende CD4⁺ oder CD8⁺ Zellen.

2.2.2.7 Phänotypisierung von APC- oder T-Zellpopulationen

Der Phänotyp der verwendeten Zellpopulationen wurde durch Analysen im FACS (*fluorescent-activated cell sorter*) z.B. zur Bestimmung der Reinheit von Depletionen oder zur Überprüfung der Reifung dendritischer Zellen bestimmt. Dazu wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und zweimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 300 x g für 10 Minuten bei 4°C). Anschließend wurden sie für 30 min mit PBS auf Eis inkubiert, um die unspezifische Bindung von Antikörpern und/oder Fluorochromen zu verhindern. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 100 µl PBS resuspendiert und nach Zugabe der Antikörper bzw. der entsprechenden Isotypkontrollen (Tab. 2.2) für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wiederum zweimal in PBS gewaschen und in 500 µl PBS mit 1 % Paraformaldehyd aufgenommen. Die Analyse erfolgte mit einem EPICSXL-MCL

(Coulter Electronics) Durchflusszytometer. Die Daten wurden mit der EXPO 32 Software ausgewertet. Einige Färbungen wurden als Vierfarbenanalysen durchgeführt. Durch die Verwendung von Fluorochromen, die Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittieren, wie FITC Fluoreszeinisothiocyanat), PE (Phycoerythrin), ECD (Konjugat aus PE und Texasrot) oder Pc5 (Konjugat aus PE und Cycrom 5) können vier Merkmale einer Zelle gleichzeitig analysiert werden. Die Darstellung der Zweifarbenanalysen erfolgt durch logarithmisches Auftragen der beiden Fluoreszenzintensitäten gegeneinander. Die einzelnen Ereignisse bzw. Zellen werden dabei als Punkte dargestellt (Dotplot).

2.2.3 Immunologische Methoden

2.2.3.1 Enzyme-Linked Immunospot-Assay (Elispot)

Prinzip:

Mit Hilfe des *enzyme-linked immunospot-assays* (Elispot) können antigenspezifische T-Zellen anhand ihrer Zytokinsekretion detektiert werden. Im Unterschied zu anderen Standardmethoden, wie etwa dem Chromfreisetzungstest und dem Proliferationsassay, stellt der Elispot eine schnelle und hochsensitive Testmethode dar, die eine quantitative Aussage über die Frequenz antigenspezifischer T-Zellen erlaubt.

Durchführung:

Nitrozellulosebeschichtete Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (MAHA N 45, Millipore, Eschborn) wurden mit monoklonalen, anti-human IFN γ Antikörpern (Mabtech, Hamburg) beschichtet (5 μ g/ml in PBS) und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Antikörperlösung wurde abpipettiert und die Platten dreimal mit je 200 μ l PBS/Ansatz gewaschen. In einem anschließenden Schritt wurden freie Bindungsstellen durch Zugabe von je 200 μ l Blockierungspuffer (TZM mit 10% FKS) während einer einstündigen Inkubation bei RT blockiert. PBMC wurden in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/Ansatz in einem Volumen von 100 μ l TZM/Ansatz (je 5 Replikate) eingesetzt. Die Stimulation erfolgte direkt in der Platte durch Zugabe von 50 μ l Antigenlösung (Endkonzentration: BZLF1: 10 μ g/ml; Peptide: 10 μ g/ml). Nach einer 20 stündigen Inkubation (37°C, 5% CO₂) wurde die Zellsuspension

abgezogen und eventuell noch anhaftende Zellen durch 5 maliges Waschen entfernt (je 200 µl PBS mit 0,05% Tween 20, je 3 min Inkubation mit Waschpuffer). Danach erfolgte die Zugabe des sekundären, biotinylierten Antikörpers (1 µg/ml in PBS, je 100 µl/Ansatz). Die Platten wurden für 2 Stunden bei RT inkubiert, anschließend gewaschen (5 x je 200 µl PBS/Ansatz, pro Waschschnitt drei Minuten Inkubation) und für weitere 2 Stunden mit einem Streptavidin-Alkalische Phosphatase (AP)-Konjugat (1 µg/ml in PBS; je 100 µl/Ansatz; Mabtech, Hamburg) inkubiert. Nach einem letzten Waschschnitt (5 x je 200 µl PBS/Ansatz) erfolgte die Färbereaktion durch Zugabe des Enzymsubstrates NBT/BCIP (Boehringer, Mannheim). Dafür wurde eine Färbelösung [200 µl NBT/BCIP-Stammlösung auf 10 ml Färbepuffer (0,1 M Tris-Puffer, pH 9,5 mit 0,05 M MgCl₂, 0,1 M NaCl)] hergestellt und jeweils 100 µl/Ansatz eingesetzt. Nach 5-10 min (spenderspezifisch) wurde die kolorimetrische Reaktion durch Waschen der Platten mit entionisiertem Wasser gestoppt. Die Auswertung der Platten erfolgte an einem Bioreader 2.000 (Bio-Sys, München). Als Positivkontrolle wurden Zellen mit PHA (Endkonzentration 5 µg/ml in PBS;) stimuliert, als Negativkontrolle mit einem irrelevantem HIV-Peptid (E10F, Endkonzentration: 10 µg/ml) oder 0,08 M Harnstoff.

2.2.3.2 Intrazelluläre Zytokinfärbung und *Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)* Analyse

Prinzip:

Ein weiteres Verfahren die Zytokinproduktion auf Einzelzellniveau zu detektieren, und somit die Zahl Antigen-spezifischer pCTL zu bestimmen, beruht auf der durchflußzytometrische Messung von intrazellulären Zytokinen. Dieses Verfahren ist geeignet neben der Zahl zytokinproduzierender Zellen auch ihre Populationszugehörigkeit zu bestimmen. Dazu werden die Zellen im Vollblut mit einem Antigen stimuliert und für 4-5 h mit Brefeldin A (BFA) inkubiert. BFA verursacht die Membranfusion des Endoplasmatischen Retikulum (ER) und den Kompartimenten des Golgi-Apparates (Nebenfuhr, Ritzenhaller et al., 2002) wodurch die beiden Kompartimente miteinander verschmelzen und die Sekretion der Zytokine aus der Zelle verhindert wird. Die Zellen werden anschließend fixiert und permeabilisiert. Die Permeabilisierung ermöglicht das Eindringen zytokin-spezifischer Antikörper in die Zelle, die durchflusszytometrisch gemessen und ausgewertet werden können.

Durchführung:

Einem Spender wurden 10 ml Vollblut in eine Heparin Monovette (Sarstedt, Nümbrecht) entnommen. Es wurden davon je 2 ml in ein steriles Falcon Tube (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) pipettiert. Ein Ansatz stellt die Negativkontrolle dar, hier wurden zu dem Vollblut nur die monoklonalen Antikörper gegen die kostimulatorischen Moleküle CD28 und CD49d (Becton Dickinson, Heidelberg) in einer finalen Konzentration von 1 µg/ml hinzugegeben. Ein weiterer Ansatz ist die Positivkontrolle. Hier wird zusätzlich zu den monoklonalen Antikörpern CD28 und CD49d ein Superantigen zugesetzt. Es handelt sich dabei um das Staphylokokken Enterotoxin B (SEB). Es wird in einer finalen Konzentration von 1 µg/ml hinzugeben. In einem dritten Ansatz wird zu dem Vollblut mit den monoklonalen Antikörpern noch das für die Restimulation verwendete Antigen hinzugegeben. Die Konzentration sollte für jede Charge neu austitriert werden. In diesem Fall konnten sowohl mit dem synthetischen Peptid als auch mit dem modifizierten Protein optimale Ergebnisse mit einer finalen Konzentration von 10 µg/ml erreicht werden. Die Röhrchen wurden danach mit losem Deckel (der Gasautausch ermöglicht) stehend, in einem Standardbrutschrank (37 °C, 5 % CO₂ und H₂O-gesättigte Atmosphäre) inkubiert. Nach 2,5 h wurde zu den Proben Brefeldin A hinzugegeben, so dass eine finale Konzentration von 10 µg/ml erreicht wurde. Die Proben wurden auf einem Vortex gut durchmischt und weitere 5 h im Brutschrank inkubiert.

Nach insgesamt 7,5 Stunden Kurzzeitkultur wurden 11 % des Kulturvolumens an eiskalter EDTA -Lösung (EDTA in PBS, 20 mM) hinzupipettiert. Die Proben wurden kurz gevortext und dann für maximal 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben noch einmal gründlich gevortext, damit auch die adhärenten Zellen von der Röhrchenwand abgelöst wurden.

Zu den Proben wurde dann mindestens das 9-fache des Kulturvolumens an FACS „Lysing Solution“ (BD, Heidelberg) hinzugegeben. Die Röhrchen wurden dann wieder für maximal 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C für 8 min mit 340 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und die Zellen dann mit 5 ml FACS-Puffer (PBS + 0,1 % w/v NaN₃ + 1 % w/v FCS) gewaschen und wieder bei 340 g für 8 min zentrifugiert.

Danach wurden die Zellen in einer geringen Menge FACS-Puffer resuspendiert und die Zellen auf die Röhrchen (z.B. Falcon Nr.2054) zum Färben verteilt. Pro Färbeansatz sollten mindesten 2 × 10⁶ Zellen vorhanden sein. Dann wird zu den Zellen die Permeabilisierungslösung (PBS + 0,5 % w/v Saponin) in einer Menge von 1 ml pro 2 × 10⁶ Zellen pipettiert. Der Ansatz wird gut gevortext und für maximal 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen werden dann mit 5 ml FACS-Puffer gewaschen und bei 340 g für 8 min zentrifugiert.

Danach konnten die Zellen gefärbt werden. Dies geschah in einem Färbevolumen von 100 µl. Es wurden die monoklonalen Antikörper in einem Verhältnis von FITC

1:10, PE 1:10, ECD 1:10 und Pc5 1:10 hinzupipettiert. Ein typisches 4-Farb-Röhrchen würde dann zum Beispiel die Antikörper CD3 FITC, anti-IFN- γ -PE, CD4 ECD und CD8 Pc5 enthalten. Die Färbung erfolgte für mindestens 30 min bei RT und in Dunkelheit. Die Zellen wurden danach mindestens zweimal mit 5 ml FACS-Puffer gewaschen und nach jedem Waschschritt für 8 min bei 340 g zentrifugiert. Für die Messung wurden die Zellen dann in mindestens 200 μ l FACS Puffer aufgenommen und sofort an einem Durchflusszytometer analysiert. Sofern die Proben nicht gleich gemessen wurden, wurden die Zellen mit 1 % PFA (Paraformaldehyd) in FACS-Puffer fixiert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Die Ergebnisse wurden dann mit Hilfe der Expo 32 ADC -Software (Beckman Coulter, Krefeld) ausgewertet.

Nach der Permeabilisierung wurden folgende Färbungen durchgeführt:

- Ansatz 1: Kontrolle, ungefärbt
- Ansatz 2: CD3 FITC / IFN- γ PE / CD8 ECD / CD4 Pc5
- Ansatz 3: CD16 FITC / IFN- γ PE / CD3 ECD / CD56 Pc5
- Ansatz 4: CD3 FITC / Isotyp-Kontrolle PE / CD8 ECD / CD4 Pc5

3. Ergebnisse

3.1 Molekulare und immunologische Mechanismen des Harnstoff-vermittelten Proteintransfers in APC

Frühere in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Arbeiten mit löslichem Harnstoff-adjuviertem EBV BZLF1 Protein (uBZLF1) zeigten dessen Fähigkeit verschiedene Subpopulationen antigenspezifischer T-Zellen, insbesondere MHC Klasse I restringierte zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) zu reaktivieren nachdem es auf einem *cross-presentation* Weg auf HLA Moleküle von antigenpräsentierenden Zellen (APC) gelangt ist. Welche APC Subpopulationen Epitope aus uBZLF1 *cross-präsentieren* und durch welche Mechanismen uBZLF1 internalisiert und prozessiert wird war bislang unbekannt und sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Darüber hinaus galt es die Faktoren herauszuarbeiten welche den Transfer von uBZLF1 in den Klasse I Prozessierungs- und Präsentationsweg vermitteln. Außerdem sollte untersucht werden, ob dieser Effekt auf intrinsischen Eigenschaften des BZLF1 Proteins beruht oder ob das Verfahren der Harnstoff-adjuvierung auch auf andere Proteine übertragbar ist.

3.1.1 Analyse der durch uBZLF1 aktivierten Lymphozytenpopulationen

Im Rahmen der Diplomarbeit von Herrn Barabas wurde bereits gezeigt, dass uBZLF1 auf einem *cross-presentation* Weg in APC gelangt und anschließend CD8⁺ CTL spezifisch restimuliert. Neben dieser Population werden auch antigenspezifische T-Helferzellen (T_h-Zellen) und CD4⁺CD8⁺ doppelt positive (DP) T-Zellen restimuliert, welche ihre Epitope in Kontext mit MHC Klasse II Molekülen erkennen. Darüber hinaus war auch eine Aktivierung CD3⁻ NK-Zellen (ca. 0,4 %) und einer weiteren nicht näher charakterisierten nicht-T-Zellpopulation zur IFN- γ Produktion zu beobachten. Diese Zellpopulation sollte näher charakterisiert, d.h. ihre Identität und der Mechanismus ihrer Aktivierung näher untersucht werden.

Hierbei wurde heparinisiertes Vollblut eines HLA B8⁺ und EBV seropositiven gesunden Spenders mit uBZLF1 oder dem HLA B8 restringierten CTL Epitop RAK (Bogedain, Wolf, Modrow, Stuber, & Jilg, 1995) aus BZLF1 7 h inkubiert. Während

der letzten 5 h der Inkubation hemmten 10 µg/ml Brefeldin A (BFA) die Proteinsekretion. Auf diese Weise wurden neu synthetisierte Zytokine in den aktivierten Zellen zurückgehalten. Im Anschluss an die Stimulation erfolgte die Analyse der Populationen IFN- γ produzierender Zellen in den verschiedenen Stimulationsansätzen mittels der vierfarb FACS Technologie. Als Kontrolle diente mit Harnstoffpuffer alleine inkubiertes Vollblut. Die Unterscheidung der einzelnen Zellsubpopulationen ist exemplarisch in Abb. 3.1 gezeigt.

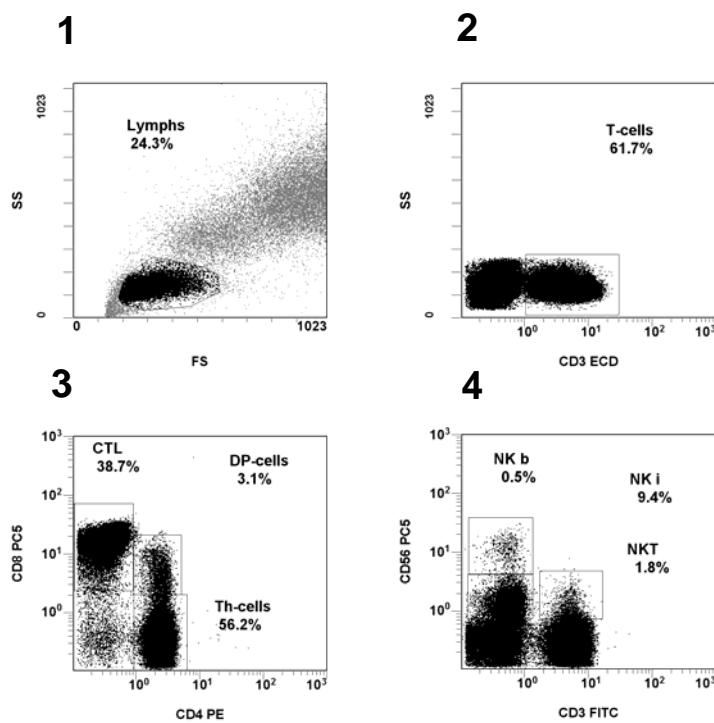


Abb. 3.1: Darstellung des Gatingverfahrens verschiedener Lymphozytenpopulationen zur intrazellulären Zytokinbestimmung. Im Anschluss an die Stimulation der Zellen in Vollblut werden die Erythrozyten lysiert. Die verbleibenden Zellen werden durchflusszytometrisch im FACS analysiert. Zur Auswertung werden zunächst die Lymphozyten anhand charakteristischer Streulichteigenschaften aus der Gesamtpopulation herausgegated (1). Zur Bestimmung der T-Zellen werden zunächst die CD3⁺ Zellen gegated (2). Im nächsten Plot werden die T-Zellen aufgrund ihrer CD4 und CD8 Expression in ihrer Subpopulationen aufgetrennt. Dabei kann man die CD4⁺CD8⁻ Th-Zellen von den CD4⁻CD8⁺ CTL und den CD4⁺CD8⁺ doppelt positiven (DP) T-Zellen unterscheiden. Von diesen lassen sich die CD3⁺CD16⁺CD56⁺ NKT-Zellen (C) separieren. Bei der Analyse der CD3⁻ NK-Zellsubpopulationen (4) kann man zwischen den CD16⁺CD56^{bright} (A) und den CD16⁺CD56^{intermediate} (B) unterscheiden.

Auf Grund der früheren Beobachtung, dass NK-Zellen CD56 nur schwach exprimieren und demzufolge die Färbung dieses Markers alleine nur in einem schwachen Fluoreszenzsignal auf den Zellen resultiert, wurde zusätzlich CD16,

ebenfalls auf NK Zellen exprimiert, mit dem gleichen Fluoreszensfarbstoff (Pc5) gefärbt. Dies ermöglicht eine sensitivere Analyse von NK-Zellsubpopulationen. Wegen der Limitation des Durchflusszytometers auf 4 verschiedene Farben wurden die aktivierte T- und NK-Zellen in parallelen Ansätzen gemessen. Die Analyse der Zellen des Spenders SD zeigte, dass verschiedene T-Zellsubpopulationen durch uBZLF1 reaktiviert werden. Der Grossteil der IFN- γ produzierenden Zellen im T-Zellkompartiment gehörte hierbei zur Gruppe der CD8 $^{+}$ CTL (Abb. 3.2), von denen 2,6 % reaktiviert wurden. Darüber hinaus produzierte ein großer Prozentsatz (4,9 %) der CD4 $^{+}$ CD8 $^{+}$ doppelt positiven (DP) T-Zellen nach Stimulation mit uBZLF1 IFN- γ , wenngleich diese Population nur einen kleinen Teil der CD3 $^{+}$ T-Zellen darstellt. Dem Phänootyp nach zu urteilen handelt es sich bei diesen Zellen um CD4 $^{+}$ CD8 $^{\text{dim}}$ T-Zellen, denen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle viraler Infekte zugeschrieben wird (Suni, Ghanekar et al., 2001). Die Vorläuferfrequenz BZLF1 spezifischer CD4 $^{+}$ Th-Zellen im Blut dieses Spenders war mit 0,2 % hingegen deutlich geringer. Das verbesserte Färbeverfahren für NK-Zellen ermöglichte nun eine umfassende Charakterisierung aller übrigen nach uBZLF1 Stimulation IFN- γ produzierenden nicht-T-Zellen. Dabei war in 21,8 % der CD3 $^{+}$ CD16 $^{+}$ CD56 $^{+}$ NKT-Zellen, in 7,0 % der CD16/56 hoch positiven (*bright*) und in 7,2 % der CD16/56 intermediär positiven (*intermediate*) NK-Zellen eine Aktivierung zu beobachten (Abb. 3.2). Die vergleichende Stimulation mit dem, ein HLA B8 restringiertes CTL Epitop darstellendes Peptid RAK resultierte in einer selektiven Aktivierung von CD8 $^{+}$ CTL (0,8 %). Nach Stimulation mit RAK und Harnstoffpuffer war eine geringe Frequenz IFN- γ produzierender NKT Zellen zu beobachten. Ob die beobachtete Zytokinsekretion aber auf die Stimulation zurückzuführen ist oder spontan erfolgte ist unklar. Ansonsten führte die Inkubation mit Harnstoffpuffer in keiner Zellpopulation zu einer unspezifischen IFN- γ Produktion.

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass durch uBZLF1 anders als beispielsweise durch Peptide viele verschiedene Zellpopulationen in einem Ansatz restimuliert werden können. Der Mechanismus der Aktivierung der NK- und NKT-Zellen zur IFN- γ Produktion konnte bei diesem Versuchsaufbau nicht beurteilt werden, da diese Zellen anders als T-Zellen nicht peptidbeladene MHC Moleküle erkennt, sondern auf andere Weise, beispielsweise durch Zytokine aktiviert werden.

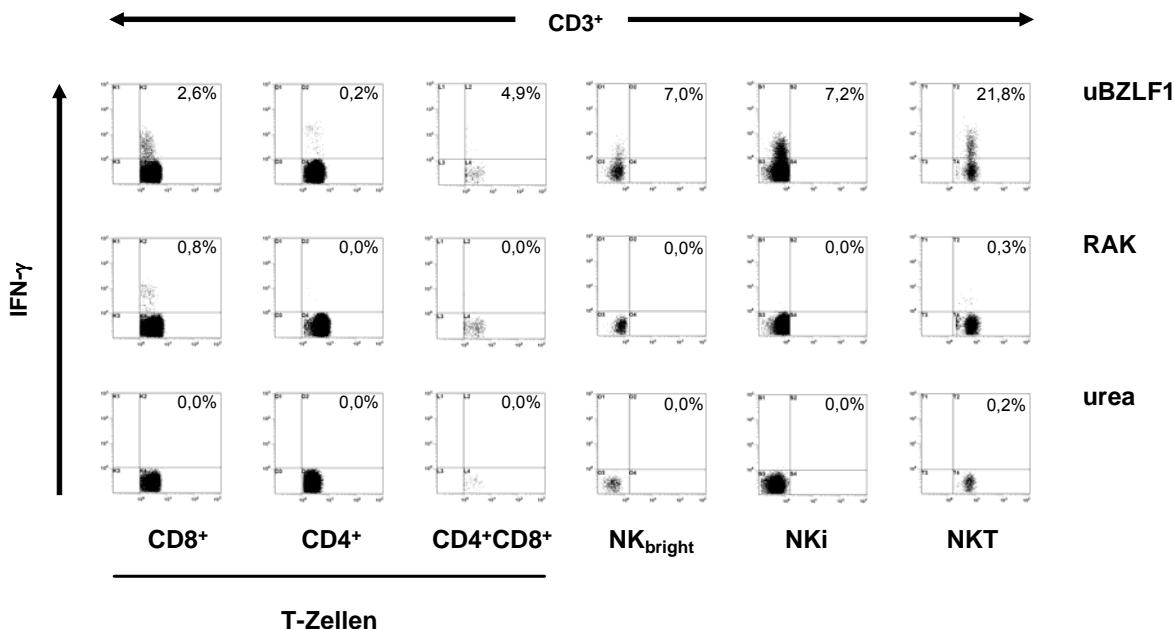


Abb. 3.2: uBZLF1 stimuliert neben T_h-Zellen auch CTL und doppelt positive T-Zellen. Ein ml heparinisiertes Vollblut des HLA B8 positiven und EBV seropositiven Spenders SD wurde mit jeweils 10 µg/ml uBZLF1 (1. Reihe) oder dem CTL Epitop RAK (2. Reihe) aus BZLF1 bei 37 °C und 5% CO₂ stimuliert. Harnstoffpuffer (0,08 M Harnstoff) ohne Antigen (3. Reihe) diente als Negativkontrolle. Nach 2 h wurde Brefeldin A (BFA) zugegeben und die Stimulation 5 h fortgesetzt. Oberflächenmarker wurden vor und intrazelluläres Zytokin nach Fixierung und Permeabilisierung gefärbt. Nach dem Durchfluss von mindestens 3 x 10⁴ CTL bzw. NK-Zellen wurde die FACS Messung gestoppt. Bei der Auswertung wurden die T- und NK-Zellsubpopulationen wie in Abb. 3.1 gezeigt gegated. Anschließend wurden die einzelnen Zellpopulationen bezüglich IFN-γ Produktion analysiert. Die Diagramme zeigen jeweils den Logarithmus der Fluoreszensintensität. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von 10 Untersuchungen mit Zellen von 5 verschiedenen Spendern.

3.1.2 Bedeutung von IL-12 für die NK-Zellaktivierung nach Stimulation mit uBZLF1

Ziel der nachfolgenden Untersuchungen war die Analyse der immunologischen Mechanismen, welche der beobachteten NK-Zellaktivierung zu Grunde liegen.

Um eine mögliche Aktivierung von NK-Zellen durch IL-12 zu untersuchen, wurde heparinisiertes Vollblut eines HLA B8⁺, EBV seropositiven und HIV seronegativen gesunden Spenders mit uBZLF1 oder RAK entweder in Anwesenheit von 4 µg/ml

anti-IL-12 spezifischer Antikörper oder mit der gleichen Menge einer Isotypkontrolle 7 h inkubiert, wobei die letzten 5 h BFA im Ansatz enthalten war. Anschließend wurde die Zahl IFN- γ sezernierender Zellen durchflusszytometrisch ermittelt. Um die unspezifischen biologischen Effekte der verwendeten Antikörper zu untersuchen, wurde auch eine Stimulation in Abwesenheit eines Antikörpers als sogenannter Referenzansatz durchgeführt. Als Negativkontrolle diente das aus dem HIV p24 Protein stammende Peptid E10F. Dieses wurde in allen Ansätzen vergleichend zur uBZLF1 Stimulation eingesetzt. Zur besseren Übersichtlichkeit der Darstellung wurden in den jeweiligen Versuchsgruppen die unspezifisch aktivierten Zellen, ermittelt in der Negativkontrolle von den spezifisch durch uBZLF1 aktivierte Zellen abgezogen und die resultierenden Werte als Nettowerte angegeben.

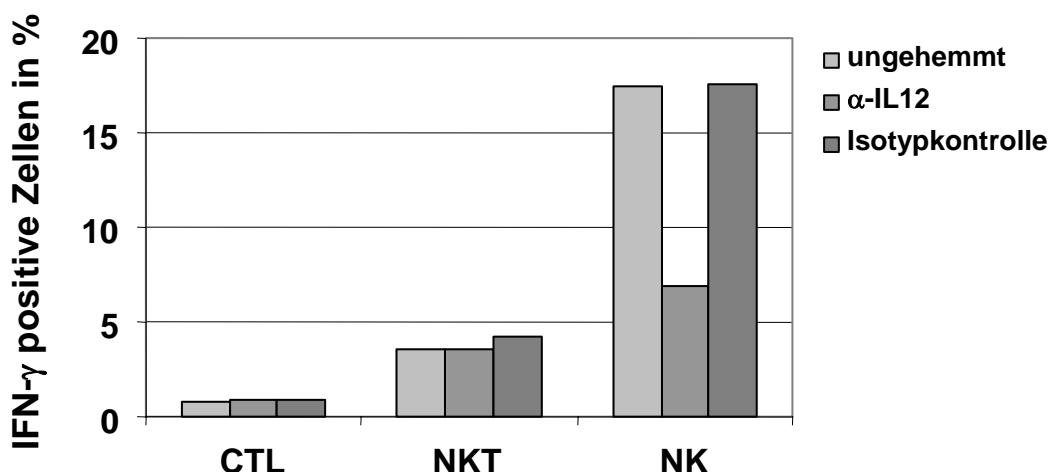


Abb. 3.3: Anti-IL-12 Antikörper inhibieren die IFN- γ Produktion in NK Zellen nach Stimulation mit uBZLF1. Ein ml heparinisiertes Vollblut des HLA B8 positiven und EBV seropositiven Spenders GG wurde mit jeweils 10 $\mu\text{g/ml}$ uBZLF1 in An- oder Abwesenheit von anti-IL-12 Antikörpern oder Isotypkontrolle stimuliert. Das Peptid E10F (10 $\mu\text{g/ml}$) aus HIV p24 diente als Negativkontrolle. Nach 2 h Stimulation wurde Brefeldin A (BFA) zugegeben und die Inkubation weitere 5 h fortgesetzt. Oberflächenmarker wurden vor und intrazelluläres Zytokin nach Fixierung und Permeabilisierung gefärbt. Nach dem Durchfluss von mindestens 3×10^4 CTL oder NK-Zellen wurde die FACS Messung gestoppt. Nach Färbung der Oberflächenmarker und intrazellulärem IFN- γ wurden die einzelnen Zellpopulationen analysiert. Die Balken stellen die IFN- γ nettopositiven Zellen in % bezogen auf die jeweilige Subpopulation nach Stimulation mit uBZLF1 dar. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von 3 Untersuchungen.

Die Analyse der Zellen des Spenders GG zeigte (Abb. 3.3), dass die Zahl der durch uBZLF1 zur IFN- γ Produktion induzierten NK-Zellen bei Koinkubation mit anti-IL12

Antikörper von 17,4 % in der Referenzstimulation auf 6,9 % zurückging. Im Gegensatz dazu zeigte der Kontrollantikörper mit dem gleichen Isotyp keinen vergleichbaren Effekt. Die Reaktivierung von BZLF1 spezifischen T-Zellen wurde weder durch den anti-IL12 Antikörper noch die Isotypkontrolle beeinflusst, da die drei durchgeführten Stimulationen in vergleichbaren (jeweils um die 0,9 %) Zahlen an reaktivierten T-Zellen resultieren. Auch die Aktivierung der NKT-Zellen erfolgte über einen IL-12 unabhängigen Mechanismus. Im Referenzansatz wurden 3,6 % der Population aktiviert, genauso wie in dem anti-IL12 Antikörper enthaltenden Ansatz. Vergleichbares ergab mit 4,2 % auch die Isotypkontrolle.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Aktivierung von NK-Zellen im Gegensatz zu NKT-Zellen und T-Zellen nach Stimulation mit uBZLF1 durch IL-12 vermittelt wird.

3.1.3 Untersuchung des Einflusses von Harnstoff auf den Transfer von uBZLF1 in den MHC Klasse I Präsentationsweg

Nachdem gezeigt wurde, dass uBZLF1 in den MHC Klasse I Prozessierungs- und Präsentationsweg eingeschleust wird, was für ein lösliches, exogenes Protein ungewöhnlich ist (Heath, Belz, Behrens, Smith, Forehan, Parish, Davey, Wilson, Carbone, & Villadangos, 2004), waren die zugrundeliegenden Faktoren zu ermitteln welche diesen Transfer ermöglichen. Hierbei sollte zunächst die Bedeutung des Harnstoffs für die Translokation von uBZLF1 untersucht werden.

Dafür wurde der Harnstoff durch extensive Dialyse von dem Stimulatorantigen uBZLF1 entfernt und das erhaltene Protein mittels Westernblotanalyse unter Verwendung eines BZLF1 spezifischen Kaninchenserums detektiert. In beiden Antigenpräparationen waren zwei spezifische Banden zu sehen, welche die phosphorylierte und nicht phosphorylierte Zustandsformen des BZLF1 Proteins darstellen (Abb. 3.4a).

Anschließend wurden die beiden Stimulatorantigene uBZLF1 und BZLF1 ohne Harnstoff hinsichtlich ihrer Fähigkeit antigenspezifische CD8⁺ CTL zu reaktivieren untersucht. Dazu wurde heparinisiertes Vollblut eines HLA B8⁺, EBV seropositiven und HIV seronegativen gesunden Spenders mit 10 µg/ml uBZLF1 oder BZLF1 für 7 h inkubiert, die letzten 5 h in Anwesenheit von BFA und durchflusszytometrisch untersucht. Als Negativkontrolle diente das HIV Peptid E10F und das Peptid RAK als

Positivkontrolle. Beide Peptide wurden mit einer Endkonzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Dieser Versuch zeigte, dass das Entfernen des Harnstoffs von uBZLF1 zu einem vollständigen Verlust der Fähigkeit zur Induktion von CTL führt (Abb. 3.4b). So war nach Stimulation mit BZLF1 keine signifikante Zahl IFN- γ produzierender CTL zu beobachten, wohingegen uBZLF1 wie auch RAK 1,1 % bzw. 1,4 % der CTL zur IFN- γ Produktion anregte. Dagegen führte die Inkubation mit Harnstoff alleine zu keiner Aktivierung.

Diese Ergebnisse unterstreichen die essentielle Bedeutung der Anwesenheit von Harnstoff für den Transfer dieses Stimulatorantigens in den endogenen MHC Klasse I Prozessierungsweg.

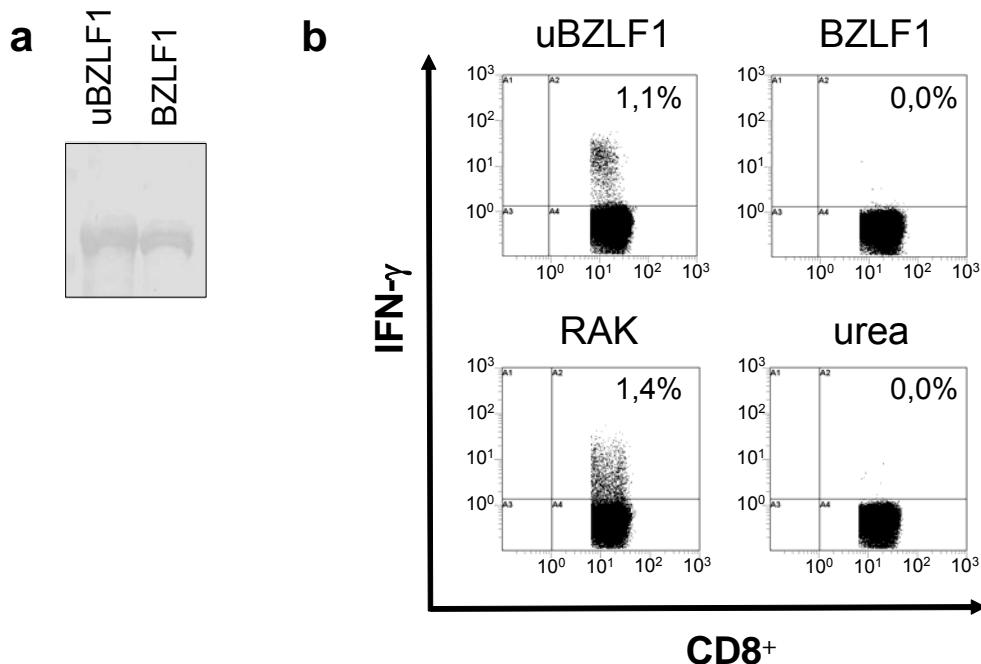


Abb. 3.4: Bedeutung von Harnstoff für die uBZLF1 vermittelte Aktivierung von CD8 $^{+}$ CTL zur IFN- γ Produktion. Für diesen Versuch wurde der Harnstoff mittels extensiver Dialyse aus uBZLF1 entfernt. (a) Biochemische Charakterisierung des dialysierten BZLF1 und des harnstoffadjuvierten (u)BZLF1 durch Westernblottanalyse eines 12,5 %-igen SDS-Polyacrylamidgels, beladen mit jeweils 2 µg Protein, mit BZLF1 spezifischen Antikörpern. Ein ml heparinisiertes Vollblut des HLA B8 positiven und EBV seropositiven Spenders GG wurde mit jeweils 10 µg/ml uBZLF1 oder BZLF1 bei 37 °C und 5% CO₂ stimuliert. Harnstoffpuffer (0,08 M Harnstoff) alleine oder RAK dienten als negativ bzw. positiv Kontrollen. Nach 2 h wurde BFA zugegeben und die Stimulation 5 h fortgesetzt. Oberflächenmarker wurden vor und intrazelluläres Zytokin nach Fixierung und Permeabilisierung gefärbt. Nach dem Durchfluss von mindestens 3 × 10⁴ CTL wurde die FACS Messung gestoppt. Bei der Auswertung wurden die T-Zellsubpopulationen wie in Abb. 3.1 schematisch gezeigt gegated. Anschließend wurde

die Population der CD8⁺ CTL auf IFN- γ Produktion analysiert. Die Diagramme zeigen jeweils den Logarithmus der Fluoreszensintensität (**b**). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von 3 Untersuchungen mit Zellen verschiedener Spender.

3.1.4 Einfluss einer PTD-ähnlichen Domäne in BZLF1 auf dessen Transfer in den MHC Klasse I Präsentationsweg von APC

In vorangegangenen Arbeiten wurde im C-terminalen Bereich von BZLF1 eine argininreiche Region (AS 176-189) entdeckt, die Ähnlichkeiten zu bekannten Proteintranslokationsdomänen (PTD) des HIV Tat Proteins (Vives, Brodin et al., 1997) und des Antennapedia Proteins von *Drosophila melanogaster* (Derossi, Joliot et al., 1994) aufweist. Deswegen sollte untersucht werden ob diese argininreiche Domäne an dem beobachteten Transfer von uBZLF1 in APC beteiligt ist.

Zunächst wurde die diese Domäne in BZLF1 kodierende Nukleinsäuresequenz in dem BZLF1 Gen mittels PCR deletiert (Abb. 3.5a). Die Expression in *E. coli* und Reinigung des verkürzten Proteins (BZLF1 $\Delta_{176-190}$) wurde in Analogie zum BZLF1 Protein von der Arbeitsgruppe von Petra Lindner, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Regensburg, am Forschungszentrum Landshuterstraße in Regensburg durchgeführt. Nach der Reinigung lagen die Proteine in Harnstoffpuffer (8 M Harnstoff, 2 M NaCl und 2 mM DTE) vor. Die folgenden Untersuchungen zur Rolle der PTD ähnlichen Domäne für die Translokation des BZLF1 Proteins in APC wurden von Frau Regina Gary im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt. Zur Visualisierung wurden die beiden Antigene uBZLF1 und uBZLF1 $\Delta_{176-190}$ durch Gelelektrophorese in einem 12,5 %-tigen SDS-Polyacrylamidgel der Größe nach aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und schließlich mit Hilfe eines BZLF1 spezifischen Kaninchenserums detektiert (Abb. 3.5b). Im Vergleich zu uBZLF1 weist uBZLF1 $\Delta_{176-190}$ infolge der Deletion von 14 AS eine um ca. 2,2 kD verringerte Masse auf. Sowohl uBZLF1 als auch uBZLF1 $\Delta_{176-190}$ erscheinen auf dem Blott als Doppelbande, da beide Proteine in einer phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Form vorliegen. Im Folgenden wurden die beiden Harnstoff-adjuvierten Proteine bezüglich ihrer Fähigkeit zur Restimulation von T-Zellen miteinander verglichen. In diesen Untersuchungen wurden periphere blutmononukleäre Zellen (PBMC) von 10 EBV seropositiven

gesunden Spendern mit geeigneter HLA Ausstattung entweder mit 10 µg/ml uBZLF1 oder 10 µg/ml uBZLF1 $\Delta_{176-190}$ stimuliert und die Anzahl IFN-γ produzierender Zellen als Maß für die T-Zellaktivierung im *ELISpot assay* ermittelt. Als Negativkontrolle wurden die Zellen in parallelen Ansätzen mit 10 µg/ml E10F stimuliert. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass alle getesteten Spender nach Stimulation mit uBZLF1 und uBZLF1 $\Delta_{176-190}$ eine vergleichbare Frequenz spezifisch restimulierter, IFN-γ produzierender Zellen aufwiesen. Im Gegensatz dazu war nach Stimulation mit E10F nur eine sehr gering Zahl aktiver Zellen nachweisbar (Abb. 3.5c). Diese Daten weisen darauf hin, dass die im C-Terminus von uBZLF1 enthaltene PTD ähnliche Domäne keinen wesentlichen Beitrag zur Reaktivierung BZLF1 spezifischer T-Zellen durch uBZLF1 leistet. Um aber sicherzustellen, dass in den gezeigten Experimenten nicht nur ungewöhnlich hohe Zahlen BZLF1 spezifischer Th-Zellen gemessen wurden die Epitope des Antigens nach Prozessierung und Präsentation auf dem klassischen MHC Klasse II Weg erkannt haben, wurde die Identität der restimulierten T-Zellen im FACS nach Kurzzeitstimulation und intrazellulärer Zytokinfärbung eingehender untersucht. Dazu wurde heparinisiertes Vollblut mit 10 µg/ml uBZLF1 oder uBZLF1 $\Delta_{176-190}$ 7 h bei 37 °C stimuliert und die Frequenz BZLF1 spezifischer Th-Zellen und CTL durchflußzytometrisch bestimmt wurden. Hierbei führte Stimulation mit uBZLF1 und uBZLF1 $\Delta_{176-190}$ zu der vergleichbaren Reaktivierung (jeweils 0,1 %) spezifischer Th-Zellen und CTL. Das als Kontrollpeptid verwendete E10F verursachte keine unspezifische T-Zellaktivierung (Daten nicht gezeigt).

In der Summe zeigen diese Daten, dass die PTD ähnliche Domäne im C-Terminus von BZLF1 keinen Einfluss auf den Transfer von uBZLF1 in den MHC Klasse I Prozessierungs- und Präsentationsweg hat.

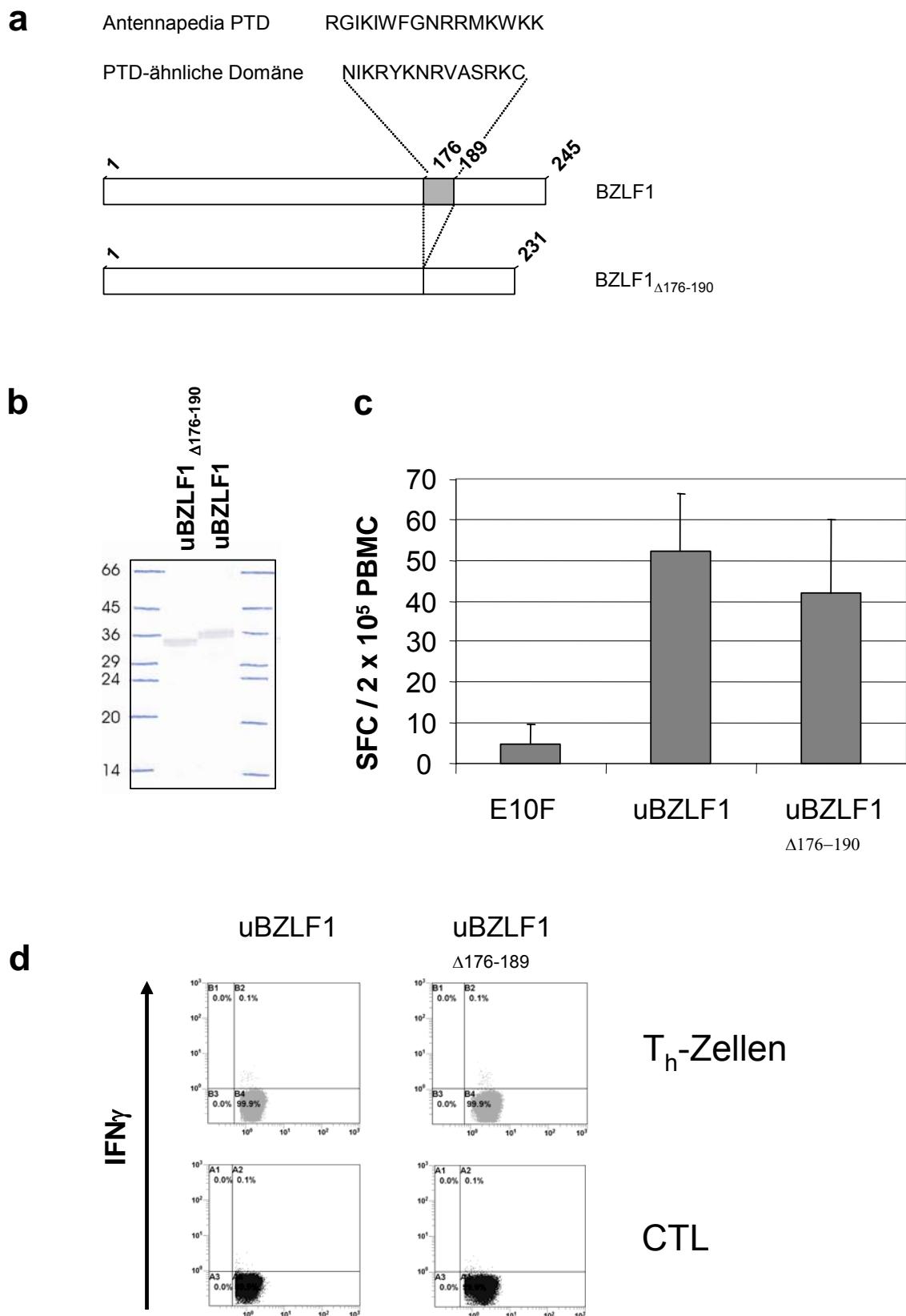


Abb. 3.5: Eine PTD ähnliche Domäne in der BZLF1 Aminosäuresequenz trägt nicht wesentlich zum Transfer von uBZLF1 in den MHC Klasse I Weg bei. (a) Der codierende Bereich für eine argininreiche Domäne im C-Terminalen Bereich von BZLF1 mit Ähnlichkeit zur PTD des Antp Proteins von D.

melanogaster wurde mittels PCR deletiert. (b) Der Westernblott zeigt je 1 µg von aus *E. coli* gereinigtem uBZLF1_{□176-190} und uBZLF1 nach gelelektrophoretischer Auftrennung in einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel. Detektiert wurden die Proteine mit BZLF1 spezifischen polyklonalen Kaninchenantikörpern. (c) Zum Vergleich der stimulatorischen Kapazität von uBZLF1_{□176-190} und uBZLF1 wurden 2 x 10⁵ PBMC eines gesunden EBV seropositiven Spenders mit jeweils 10 µg/ml beider Antigene 19 h lang stimuliert. Das mit gleicher Konzentration eingesetzte Peptid E10F aus dem HIV p24 Protein diente hierbei als Negativkontrolle. Die Zahl IFN-γ sezernierender Zellen wurde mit einem *EL/Spot assay* ermittelt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) aus 5 unabhängigen Experimenten. Der dargestellte Versuch wurde mit vergleichbarem Ergebnis mit PBMC aus zwei weiteren gesunden Spendern durchgeführt. (d) Weiterführende FACS Analysen zeigten, dass durch sowohl die Stimulation mit uBZLF1 als auch mit uBZLF1_{□176-190} in einer Reaktivierung Antigen-spezifischer CD8⁺ CTL resultiert. Dafür wurde je 1 ml Vollblut / Stimulationsansatz eines EBV seropositiven gesunden Spenders mit 10 µg/ml des jeweiligen Antigens inkubiert und nach 7 h die Zahl IFN-γ produzierender T_h-Zellen und CTL mittels intrazellulärer Zytokinfärbung im FACS ermittelt. Zur Hemmung der Zytokinfreisetzung wurde nach 2 h Inkubation BFA zugegeben. Die Messung wurde nach dem Durchfluss von 3 x 10⁴ CTL gestoppt. Bei der Auswertung wurden die T-Zellsubpopulationen wie in Abb. 3.1 schematisch gezeigt *gated*. Die Diagramme zeigen jeweils den Logarithmus der Fluoreszensintensität.

3.1.5 Analyse der Fähigkeit verschiedener APC Populationen Epitope aus uBZLF1 cross zu präsentieren

Nicht alle APC Subpopulationen besitzen die gleiche Kapazität Antigene cross zu präsentieren. Frühere Arbeiten zeigten, dass insbesondere DC aber auch in eingeschränktem Maße Monozyten die Fähigkeit besitzen Antigene cross zu präsentieren. Dagegen wird diese Fähigkeit bei B-Zellen kontrovers diskutiert.

Um zu untersuchen welche Zellen in der Lage sind Epitope aus uBZLF1 aufzunehmen, zu prozessieren und letztlich an CTL-Zellen zu präsentieren, wurden die einzelnen APC Populationen entweder direkt aus PBMC HLA B8 positiver EBV seropositive gesunder Spender aufgereinigt oder aus solchen Zellen generiert. Monozyten und B-Zellen konnten auf Grund ihres häufigen Vorkommens in PBMC direkt mit dem MACS oder dem Dynal System angereichert werden. Die Reinheit der erhaltenen Populationen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und nur wenn sie über 98 % lag wurden die Zellen in die Versuche eingesetzt. Immature (iDC) und mature dendritische Zellen (mDC) wurden aufgrund ihrer geringen Frequenz in PBMC aus Monozyten durch Kultivierung unter Verwendung etablierter

Zytokingemische ausdifferenziert. Die reinen APC Populationen wurden dann 2 h bei 37 °C jeweils mit 10 µg/ml uBZLF1 oder RAK beladen. Als Negativkontrolle fungierten E10F beladene APC. Im Anschluss an die Beladung wurde überschüssiges, d.h. nicht aufgenommenes Antigen durch Waschen mit PBS entfernt, bevor die beladenen APC 1:1, 1:5 oder 1:20 mit autologen PBMC 19 h kokultiviert wurden. Mit diesen PBMC wurden antigenspezifische T-Zellen in den Ansatz eingebracht, die auf Erkennen „ihres“ Antigens mit IFN- γ Sekretion reagierten. Die Frequenz dieser Zellen wurde im *ELISpot* assay detektiert. Sowohl mDC als auch iDC des Spenders MF (Abb. 3.6) sind in der Lage, uBZLF1 sehr effizient aufzunehmen, zu prozessieren und Epitope daraus zu präsentieren. In beiden Fällen war die Zahl der reaktivierten T-Zellen mit ca. 150 pro 2×10^5 PBMC zum einen absolut sehr hoch und zum anderen war eine effizientere Aktivierung von T-Zellen zu beobachten, als nach Stimulation mit dem Peptid RAK. Auch Monozyten waren dazu in der Lage aber deutlich ineffizienter. Verglichen mit RAK beladenen wurden von mit uBZLF1 beladenen Monozyten nur halbsoviele T-Zellen reaktiviert. Noch schwächer ausgeprägt war die Fähigkeit der B-Zellen uBZLF1 zu prozessieren und präsentieren. Hierbei wurden von mit uBZLF1 beladenen B-Zellen nur ein gutes drittel der von RAK beladenen Zellen reaktivierten T-Zellen reaktiviert. Bei diesen Untersuchungen war eine deutliche Korrelation der Zahl spezifisch reaktiver T-Zellen und der Anzahl der in den Stimulationsansatz eingesetzten antigenbeladenen APC beobachtbar. Mit dem Kontrollpeptid E10F beladene APC stimulierten in keinem Ansatz T-Zellen unspezifisch zur IFN- γ Sekretion. Damit zeigt dieser Versuch die außerordentliche Fähigkeit dendritischer Zellen Epitope aus uBZLF1 cross zu präsentieren. Dagegen ist die Fähigkeit von Monozyten und B-Zellen zur cross-präsentation von uBZLF1 deutlich geringer ausgeprägt.

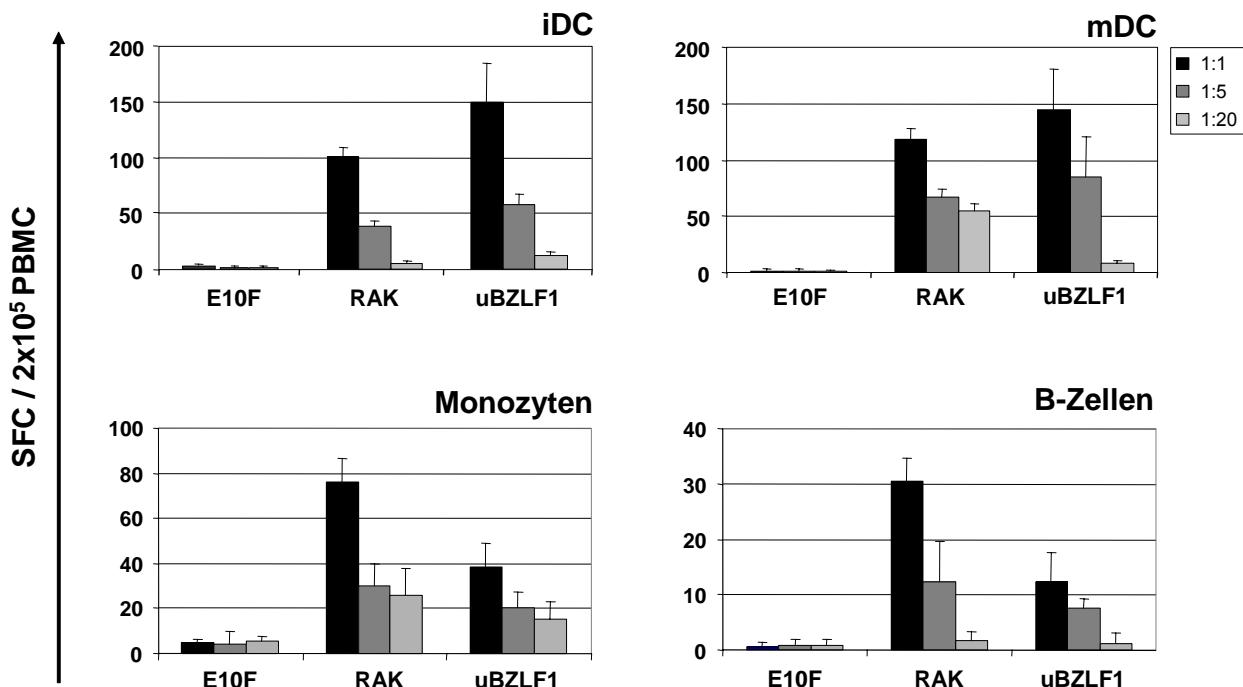


Abb. 3.6: Verschiedene Populationen antigenpräsentierender Zellen (APC) sind in der Lage Epitope aus uBZLF1 zu prozessieren und auf MHC Klasse I Molekülen CD8⁺ CTL zu präsentieren. Dafür wurden B-Zellen und Monozyten direkt aus PBMC HLA B8 positiver und EBV seropositiver gesunder Spender präpariert. Unreife (iDC) und reife dendritische Zellen (mDC) wurden mit Zytokinen aus Monozyten differenziert. Die Reinheit der verwendeten APC Populationen lag über 98 %. Zur Beladung wurden die APC jeweils 2 h mit 10 µg/ml E10F (Negativkontrolle), RAK (T-Zell Funktionskontrolle) oder uBZLF1 inkubiert. Nach zweimaligem Waschen zum Entfernen des nicht aufgenommenen Antigens wurden APC mit 1 x 10⁵ unbeladenen PBMC im Verhältnis 1:1, 1:5 oder 1:20 pro Versuchsansatz für 19 h kokultiviert. Die Zahl IFN-γ sezernierender Zellen wurde mit einem *ELISpot* assay ermittelt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) aus 5 parallel durchgeföhrten Stimulationsansätzen. Der dargestellte Versuch wurde mit vergleichbarem Ergebnis mit unterschiedlichen Spendern 2 x reproduziert

3.1.6 Weiterführende Untersuchungen zur Aufnahme und Prozessierung von uBZLF1

Vorangegangene Arbeiten hatten gezeigt, dass uBZLF1 auf einem *cross-presentation* Weg in die APC gelangt. In Abhängigkeit von der Natur eines Antigens kann es auf vielerlei Weise, z.B. durch Endozytose, Makropinozytose oder Phagozytose aufgenommen werden. In Abhängigkeit von der Route, über die ein

Antigen internalisiert wird, kann die Prozessierung auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Die Untersuchung der Aufnahme und Prozessierungsmechanismen von uBZLF1 war Gegenstand dieser Arbeit.

3.1.6.1 Aufnahme von uBZLF1 in APC durch Endozytose

Normalerweise werden lösliche exogene Proteine über Endozytose internalisiert. Größere Immunogene wie Immunkomplexe oder ganze Bakterien werden dagegen über Phagozytose aufgenommen. Die Clathrin-vermittelte Endozytose stellt einen Mechanismus dar, der durch hohe Konzentrationen Saccharose hemmbar ist (Martinez-Kinader, Lipford et al., 1995).

Um die Internalisierung von uBZLF1 an *clathrin-coated pits* zu untersuchen wurden PBMC von HLA B8 positiven EBV seropositiven Spendern mit steigenden Konzentrationen Saccharose behandelt. Um die Wirkung des Inhibitors bei Kontakt der APC mit dem Antigen sicherzustellen, wurden die PBMC für 45 min mit Saccharose vorinkubiert. Danach wurden die Zellen mit jeweils 10 µg/ml uBZLF1, RAK oder E10F (Negativkontrolle) versetzt und für weitere 19 h inkubiert. Anschließend wurde die Zahl der IFN- γ sezernierenden Zellen als Maß für die T-Zellaktivierung im *ELISpot* assay ermittelt (Abb. 3.7a). Diese Untersuchungen ergaben bei Stimulation mit uBZLF1 in Anwesenheit von 0,06 M Saccharose eine leicht erhöhte Zahl IFN- γ sezernierender Zellen. Ab dem Einsatz von 0,12 M Saccharose dagegen wurde die Zahl der nach Stimulation mit uBZLF1 aktivierten T-Zellen dramatisch um ca. 90 % reduziert und mit 0,24 M Saccharose sank der Wert noch weiter ab (95 %). Allerdings war auch in mit RAK stimulierten Zellen nach Zugabe von Saccharose ein Rückgang der Zahl reaktivierter T-Zellen von ca. 285 SFC / 2×10^5 PBMC ohne Saccharose auf ca. 225 SFC / 2×10^5 PBMC bei Verwendung der höchsten Saccharosekonzentration zu beobachten. Das als Negativkontrolle fungierende Peptid E10F aktivierte keine nennenswerte Zahl an T-Zellen zur IFN- γ Produktion. Darüber hinaus zeigte diese Kontrolle, dass der verwendete Inhibitor per se nicht immunstimulatorisch ist (Daten nicht gezeigt). Das die eingesetzten Konzentrationen des Inhibitors nicht zytotoxisch waren und so das Ergebnis verfälschten, ist in der Abbildung 3.7b gezeigt. Zur Differenzierung von lebenden und toten Zellen wurden die PBMC mit dem lebend/tot Farbstoff PI gefärbt

und anschließend jeweils 1×10^4 Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Mit steigender Saccharosekonzentration sank die Zahl der überlebenden Zellen kontinuierlich von 98,9 % auf 94,1 % ab.

Dieser Versuch zeigt somit, dass die Internalisierung von uBZLF1 in APC an *clathrin-coated pits* über Endozytose erfolgt.

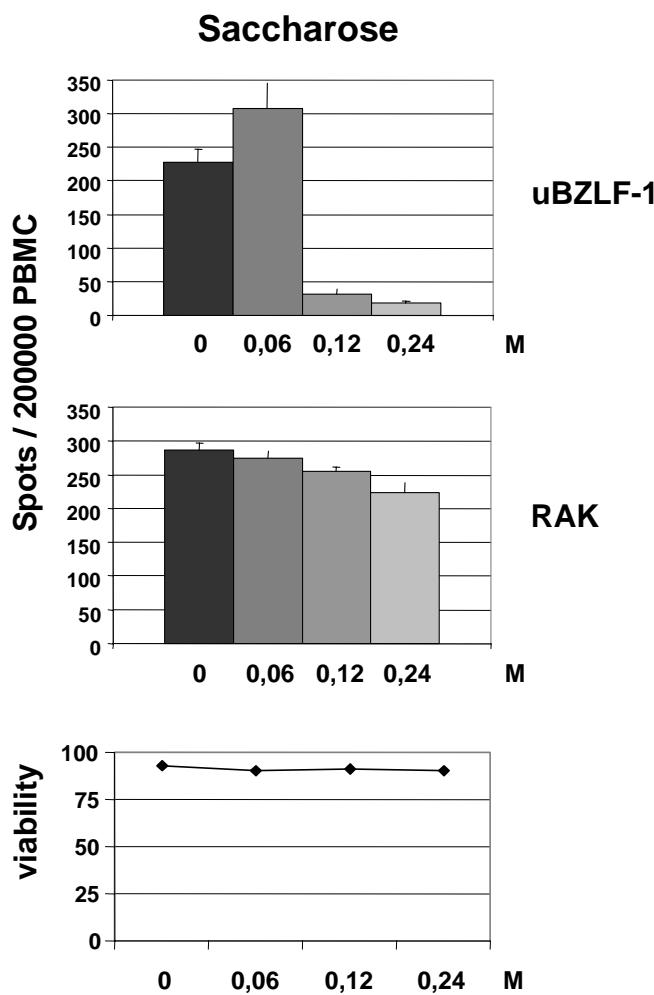


Abb. 3.7: uBZLF1 wird an *clathrin-coated pits* durch Endozytose aufgenommen. (a) Dazu wurden 2×10^5 PBMC pro Ansatz von HLA B8 positiven, gesunden EBV seropositiven Spendern 45 min mit steigenden Konzentrationen Saccharose, einem Inhibitor der Clathrin vermittelten Endozytose, vorinkubiert. Danach wurde jeweils 10 µg/ml E10F (als Negativkontrolle), RAK (als T-Zell Funktionskontrolle) oder uBZLF1 zugegeben und die Inkubation 19 h fortgesetzt. Die Zahl IFN- γ sezernierender Zellen wurde mittels *ELISpot* assay ermittelt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) aus 5 parallel durchgeführten Stimulationsansätzen. Der dargestellte Versuch wurde mit dem gleichen Ergebnis mit anderen Spendern 2-mal reproduziert. (b) Vergleichend wurde die Zytotoxizität der verwendeten Substanzen ermittelt. Hierfür wurden PBMC dieser Spender unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Das Verhältnis lebender zu toten Zellen wurde mit PI

Färbung analysiert. Dargestellt ist der Protzentsatz lebender Zellen als *viability*. Ein repräsentatives von drei Experimenten ist gezeigt.

3.1.6.2 Prozessierung von uBZLF1 im sauren Endolysosom

Exogene Proteine werden klassischerweise über Endozytose internalisiert. Nach der Aufnahme durchlaufen die aufgenommen Antigene zunehmend saurer werdende Kompartimente. Durch Verhinderung der Ansäuerung im Endolysosom wird die proteolytische Aktivität der dort vorliegenden Proteasen inhibiert (Yewdell, Norbury et al., 1999). Um zu untersuchen, ob diese Proteasen an der Prozessierung von uBZLF1 beteiligt sind, wurden PBMC von HLA B8 positiven EBV seropositiven Spendern mit Chloroquin oder NH₄Cl, zwei spezifischen Inhibitoren der endolysosomalen Ansäuerung behandelt. Dazu wurden die PBMC 45 min vor Beginn der Stimulation mit steigenden Konzentrationen (15 – 25 mM NH₄Cl und 50 - 100 µM Chloroquin) der jeweiligen Inhibitoren vorinkubiert. Danach wurden je 2 x 10⁵ PBMC in Anwesenheit des entsprechenden Inhibitors mit jeweils 10 µg/ml uBZLF1, RAK oder E10F (Negativkontrolle) versetzt und für weitere 19 h inkubiert. Anschließend wurde die Zahl der IFN-γ sezernierenden Zellen als Maß für die T-Zellaktivierung im *ELISpot assay* ermittelt (Abb. 3.8a). Keine der eingesetzten NH₄Cl oder Chloroquin Konzentrationen führte zu einer signifikanten Reduktion der T-Zellaktivierung nach Stimulation mit uBZLF1. In Anwesenheit von 100 µM Chloroquin scheint die Generierung von CTL Epitopen aus uBZLF1 sogar verstärkt zu werden. Ein ähnliches Bild zeichnet sich ab für die Stimulation mit dem RAK Peptid in Anwesenheit von NH₄Cl. Hingegen geht die Zahl der aktivierten T-Zellen in den mit Chloroquin behandelten Ansätzen nach RAK Stimulation leicht zurück, was mit der ebenfalls verminderten Überlebensrate der Zellen in diesen Ansätzen zusammenhängen könnte. Das als Negativkontrolle fungierende Peptid E10F aktivierte keine nennenswerte Zahl an T-Zellen. Zudem ergaben diese Versuche, dass die beiden verwendeten Inhibitoren per se nicht immunstimulatorisch sind (Daten nicht gezeigt). Zur Überprüfung der Toxizität der verwendeten Inhibitoren wurden PBMC nach 20 h Koinkubation mit PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die eingesetzten Konzentrationen NH₄Cl waren nicht toxisch, dagegen zeigte Chloroquin bei höheren Konzentrationen eine geringe aber signifikante Toxizität. So waren bei der höchsten

Konzentration 20 % tote Zellen zu beobachten (Abb. 3.8b). Durch die geringe Zytotoxizität der Substanzen wurde die Zahl der spezifisch reaktivierten T-Zellen nicht beeinträchtigt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen unterstreichen somit, dass die endolysosomalen Proteasen nicht an der Prozessierung von Epitopen aus uBZLF1 beteiligt sind.

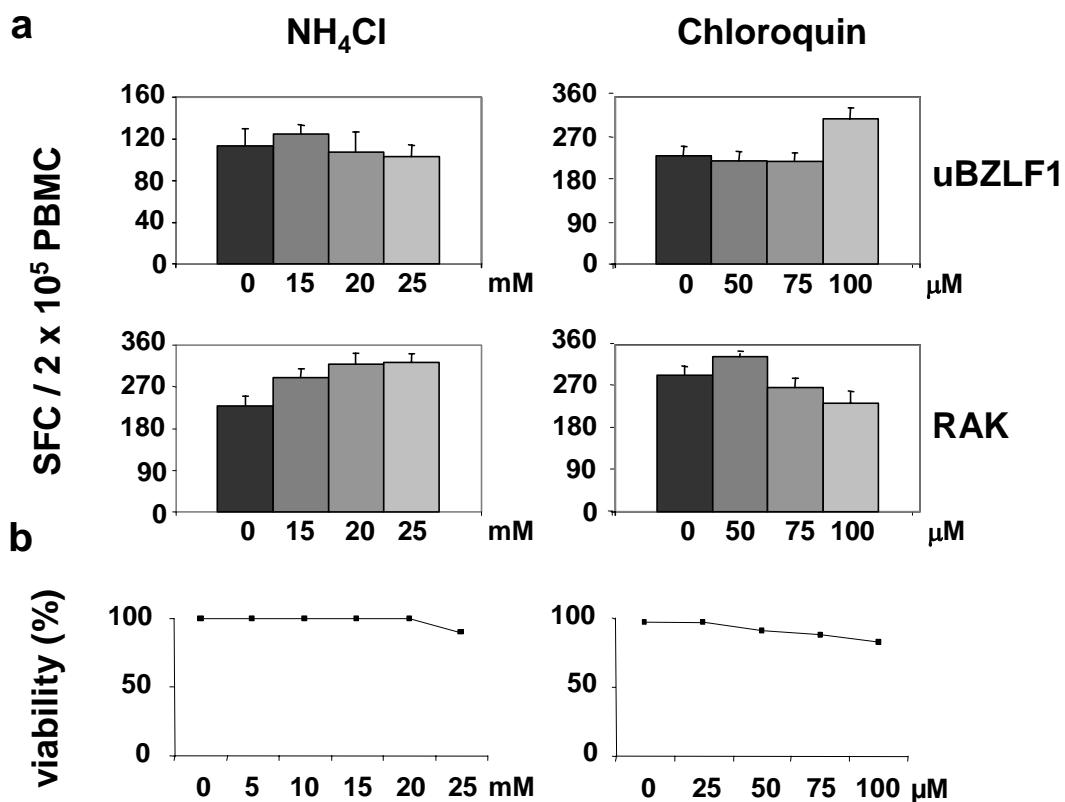


Abb. 3.8: Endolysosomale Ansäuerung ist nicht notwendig für die Prozessierung und Präsentation von Epitopen aus uBZLF1. (a) Dafür wurden 2×10^5 PBMC pro Ansatz von HLA B8 positiven, gesunden EBV seropositiven Spendern 45 min mit steigenden Konzentration NH_4Cl oder Chloroquin, zwei Inhibitoren der endolysosomalen Ansäuerung, vorinkubiert. Danach wurde jeweils 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ uBZLF1 oder RAK (als T-Zell Funktionskontrolle) zugegeben und für 19 h weiterinkubiert. Die Zahl IFN- γ sezernierender Zellen wurde mit einem *ELISpot* assay ermittelt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) aus 5 parallel durchgeführten Stimulationsansätzen. Der dargestellte Versuch wurde mit vergleichbarem Ergebnis mit unterschiedlichen Spendern 2 mal reproduziert. (b) Vergleichend wurde die Zytotoxizität der verwendeten Substanzen ermittelt. Hierfür wurden PBMC dieser Spender unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Das Verhältnis lebender zu toten Zellen wurde mit PI Färbung analysiert. Dargestellt ist der Protzentsatz lebender Zellen als *viability*. Ein repräsentatives von drei Experimenten ist gezeigt.

3.1.6.3 Das Proteasom ist für die Prozessierung von uBZLF1 notwendig

In der Regel werden Peptide zur Präsentation auf MHC Klasse I Molekülen vom Proteasom im Zytosol prozessiert, unabhängig davon ob sie auf dem klassischen MHC Klasse I Weg oder auf einem *cross presentation* Weg dorthin gelangen. Die Inhibitoren Lactacystin und Epoxomycin hemmen die proteolytische Aktivität des Proteasoms, indem sie verschiedene Untereinheiten dieses Proteinkomplexes binden. Um zu untersuchen, ob diese Proteasen an der Prozessierung von uBZLF1 beteiligt sind, wurden PBMC von HLA B8 positiven EBV seropositiven Spendern mit Lactacystin und Epoxomycin behandelt.

Dazu wurden PBMC 45 min vor Beginn der Stimulation mit steigenden Konzentrationen (1 – 100 nM Epoxomycin oder 10 - 40 µM Lactacystin) der jeweiligen Inhibitoren vorinkubiert. Danach wurden je 2×10^5 PBMC in Anwesenheit des entsprechenden Inhibitors mit jeweils 10 µg/ml uBZLF1, RAK oder E10F (Negativkontrolle) versetzt und für weitere 19 h inkubiert. Anschließend wurde die Zahl der IFN- γ sezernierenden Zellen als Maß für die T-Zellaktivierung mittels *ELISpot* ermittelt (Abb. 3.9a). Sowohl Epoxomycin als auch Lactacystin führen schon bei der geringsten eingesetzten Konzentration zu einer Reduktion der uBZLF1 vermittelten T-Zellaktivierung um ca. 75 %. Diese an sich schon sehr starke Reduktion ließ sich durch den Einsatz höhere Konzentrationen Epoxomycin nicht weiter steigern. Im Gegensatz dazu ließ sich die T-Zellreaktivierung durch höhere Lactacystinkonzentrationen nahezu vollständig reduzieren. Dagegen war die T-Zellreaktivierung nach Stimulation mit RAK Peptid nicht wesentlich beeinträchtigt. Das als Negativkontrolle fungierende Peptid E10F aktivierte keine nennenswerte Zahl an T-Zellen und gleichzeitig wurde damit gezeigt, dass die beiden verwendeten Inhibitoren per se nicht immunstimulatorisch sind (Daten nicht gezeigt). Zur Überprüfung der Toxizität der verwendeten Inhibitoren wurden PBMC nach 20 h Koinkubation mit PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. In den mit Epoxomycin behandelten Ansätzen blieb die Zahl überlebender Zellen in Anwesenheit steigender Konzentrationen gleich (96,2 % lebende Zellen bei 1 nM und 96,8 % mit 100 nM Epoxomycin). Ebenso zeigte Lactacystin bei keiner der verwendeten Konzentrationen zytotoxische Eigenschaften. So bewirkte die höchste Konzentration Lactacystin einen Rückgang der Überlebensrate um weniger als 1 %.

Somit zeigen diese Ergebnisse, dass uBZLF1 nach Freisetzung aus den endosomalen Kompartimenten durch das Proteasom prozessiert wird und die generierten Peptide auf MHC Klasse I Moleküle geladen und präsentiert werden.

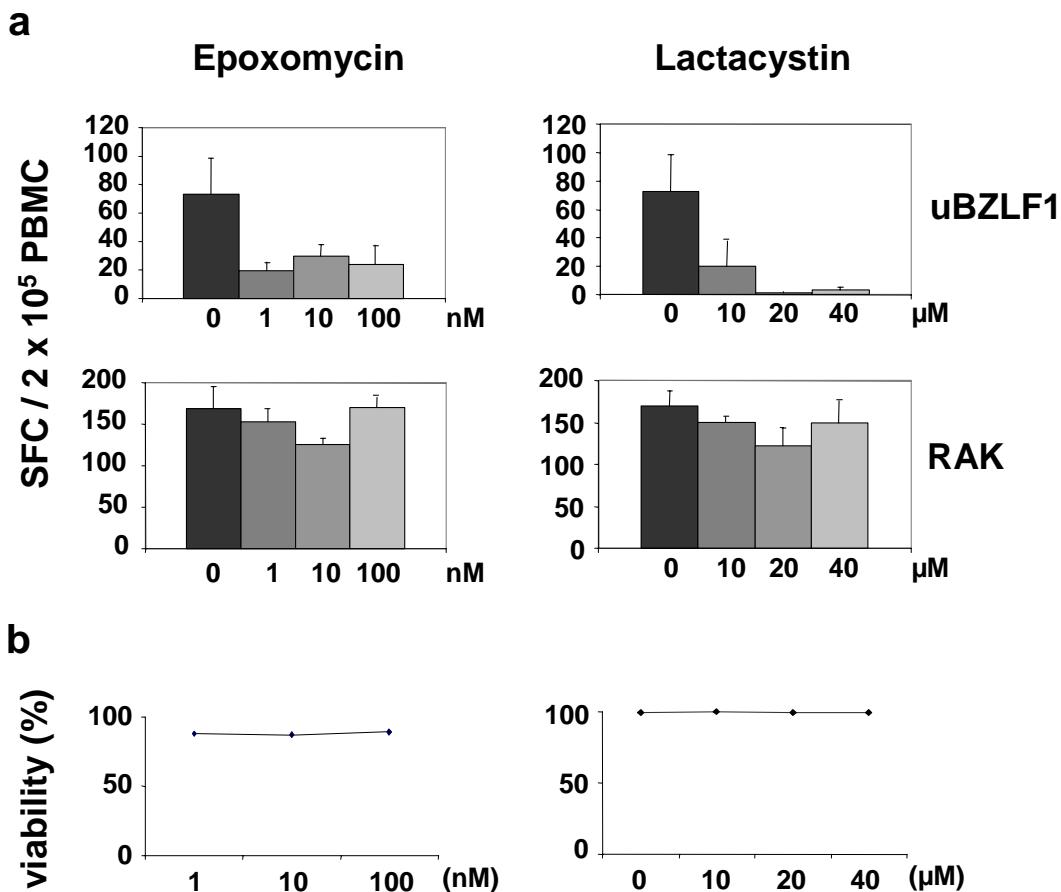


Abb. 3.9: Zur Prozessierung von Epitopen aus uBZLF1 wird die proteolytische Aktivität des Proteasoms benötigt. (a) Um dies zu zeigen wurden 2×10^5 PBMC pro Ansatz von HLA B8 positiven, gesunden EBV seropositiven Spendern 45 min mit steigenden Konzentrationen Epoxomycin oder Lactacystin, zwei Inhibitoren verschiedener Untereinheiten des Proteasoms, vorinkubiert. Danach wurde jeweils 10 μg/ml uBZLF1, RAK (als T-Zell Funktionskontrolle) oder E10F (als Negativkontrolle) zugegeben und für 19 h weiterinkubiert. Die Zahl IFN-γ sezernierender Zellen wurde mit einem *ELISpot* assay ermittelt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) aus 5 parallel durchgeföhrten Stimulationsansätzen. Der dargestellte Versuch wurde mit vergleichbarem Ergebnis mit unterschiedlichen Spendern zweifach reproduziert. (b) Vergleichend wurde die Zytotoxizität der verwendeten Substanzen ermittelt. Hierfür wurden PBMC dieser Spender unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Das Verhältnis lebender zu toten Zellen wurde mit PI Färbung analysiert. Dargestellt ist der Protzentsatz lebender Zellen als *viability*. Ein repräsentatives von drei Experimenten ist gezeigt.

3.1.7 Übertragung des Verfahrens der Harnstoffadjuvierung: Cross-presentation des Parvovirus B19 Proteins NS1

Bis dato wurden sämtliche Untersuchungen zum Verfahren der Harnstoffadjuvierung mit dem Modellantigen BZLF1 des Epstein-Barr Virus durchgeführt. Um den möglichen Einfluss bislang unbekannter intrinsischer Eigenschaften des BZLF1 Proteins auf den Harnstoff-vermittelten Transfer zu beurteilen, war es notwendig das Verfahren auf eine zweites Modellantigen zu übertragen. Für diese Untersuchungen wurde das NS1 ausgewählt, da in Spendern mit vorangegangenem Kontakt eine ausreichend hohe Vorläuferfrequenz antigenspezifischer CTL persistiert. Darüber hinaus ist es ein geeignetes Antigen, weil die Durchseuchungsrate mit Parvovirus B19 in der Bevölkerung um die 50 % liegt, wodurch sowohl B19-positive als auch negative Kontrollspender in ausreichender Zahl zur Verfügung stehen. Zudem liegt gegen dieses Protein eine überwiegend MHC Klasse I restriktive T-Zellantwort vor, wodurch gewährleistet ist, dass das Ergebnis nicht von einer starken T_h -Zell Antwort überdeckt wird. Außerdem bildet NS1 keine partikulären Strukturen aus. Dies ist von Bedeutung, da solche Strukturen auch ohne Harnstoff-Adjuvierung cross-präsentiert werden (Rock & Shen, 2005).

Dieses Modellantigen wurde von Juha Lindner aus der AG Modrow zur Verfügung gestellt, der in Vorarbeiten in Parvovirus B19 seropositiven gesunden Spendern NS1 spezifische T-Zellen nachweisen konnte, nicht aber in B19 seronegativen Probanden. Die Identität des von der Firma Mikrogen produzierten NS1 Protein wurde mit einem NS1 spezifischen Antikörper nach dem Western Blot von 2 µg NS1 bestätigt (Abb. 3.10a).

3.1.7.1 Die Depletion CD8⁺ Zellen nicht aber CD4⁺ verhindert die Aktivierung NS1 spezifischer T-Zellen

Die vorangegangenen Arbeiten zeigten zwar die Existenz, gaben aber keinen Aufschluss über die Identität der IFN-γ produzierenden T-Zellen da die Stimulationen der PBMC mit *ELISpot*-assays analysiert wurden. Um zu untersuchen ob uNS1 in Analogie zu uBZLF1 auch cross präsentiert wird und spezifische CTL reaktiviert werden, wurden in Zusammenarbeit mit Juha Lindner Stimulationsexperimente

durchgeführt, bei denen entweder die CD4⁺ (u.a. alle T_h-Zellen) oder die CD8⁺ (hauptsächlich CTL) depletiert wurden.

Hierfür wurden PBMC von Parvovirus B19 seropositiven gesunden Spendern aus heparinisiertem Blut präpariert. Anschließend wurden aus einem Aliquot dieser Zellen die CD4⁺ Zellen mit Hilfe von paramagnetischen Dynabeads (Dynal, Karlsruhe) depletiert und aus einem Anderen die CD8⁺ Zellen. Die Effizienz der Depletion wurde durchflusszytometrisch überprüft. In dem in Abbildung 3.10b gezeigten Experiment mit PBMC des Spendern SM wurde eine annähernd 100 %-ige Depletion sowohl der CD4⁺ als auch der CD8⁺ Zellen erreicht. Dargestellt ist zum einen die natürliche Zusammensetzung der T-Zellsubpopulationen dieses Spenders und zum anderen die um der um CD4⁺ oder CD8⁺ Zellen abgereicherten Populationen. Anschließend wurden pro Ansatz 2 x 10⁵ Zellen der drei Zellgemische PBMC, PBMC ohne CD4⁺ und PBMC ohne CD8⁺ mit jeweils 10 µg/ml uNS1 19 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Anzahl IFN-γ produzierender Zellen im *ELISpot-assay* quantifiziert. Als Negativkontrolle dienten in parallelen Ansätzen mit 10 µg/ml E10F stimulierte PBMC. Dabei ging die Zahl der spezifisch reaktivierten T-Zellen des Spenders SM (Abb. 3.10c) in Abwesenheit der CD4⁺ Zellen nur minimal zurück, in Abwesenheit der CD8⁺ Zellen dagegen sank die Zahl der reaktivierten T-Zellen bis in den Bereich der unspezifischen IFN-γ Sekretion.

Damit zeigt dieser Versuch deutlich, dass uNS1 mehrheitlich CD8⁺ Zellen (CTL und bestimmte Subpopulationen dendritischer Zellen) und nicht CD4⁺ Zellen (T_h-Zellen und Monozyten) zur spezifischen IFN-γ Sekretion anregt. Somit ist dies ein starker Hinweis darauf das auch exogenes, harnstoffadjuviertes NS1 auf einem *cross-presentation* Weg in APC gelangt.

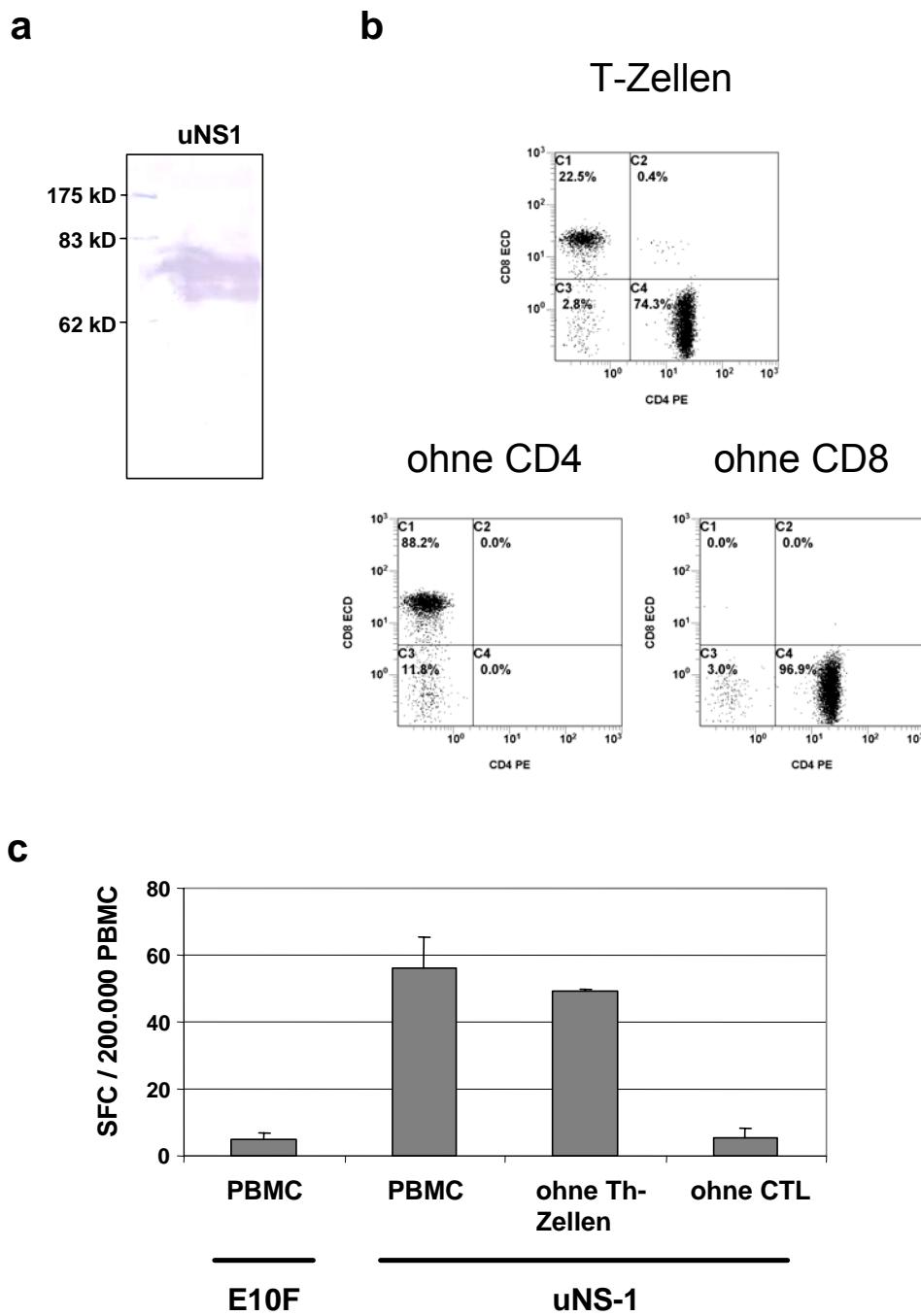


Abb. 3.10: Harnstoff-adjuviantes Parvovirus NS1 Protein (uNS1) aktiviert CD8⁺ Zellen. Zur Analyse der NS1 spezifischen T-Zellsubpopulationen wurden aus den PBMC eines gesunden Parvovirus seropositiven Spenders einmal die CD4⁺ und einmal die CD8⁺ Zellen Zellen depletiert. **(a)** Die Effizienz der Depletion wurde durchflusszytometrisch im FACS überprüft. Dazu wurden die charakteristischen Oberflächenmarker CD3, CD4 und CD8 gefärbt. Je Messung wurden 1×10^4 Zellen analysiert. Zur Auswertung wurde analog dem in Abb. 3.1 vorgestellten Schema gegatet. Die Diagramme zeigen jeweils den Logarithmus der Fluoreszensintensität. **(b)** Anschließend wurden je 2×10^5 PBMC, CD4 depletierte PBMC oder CD8 depletierte PBMC mit jeweils $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ uNS1 für 19h inkubiert. Vergleichend wurde mit E10F als Negativkontrolle stimuliert. Die Zahl IFN- γ sezernierender Zellen wurde mit einem EL/Spot assay ermittelt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm

Standardabweichung (SD) aus 3 parallel durchgeführten Stimulationsansätzen. Der Versuch wurde mit zwei weiteren gesunden Parvovirus seropositiven Spender reproduziert.

3.1.7.2 Genaue Charakterisierung der durch uNS1 aktivierten T-Zellen

Da T_h -Zellen nicht die einzige in PBMC enthaltene CD4 exprimierende Zellpopulation sind und neben CTL auch noch andere Zellpopulationen CD8 Expression aufweisen, wurden die Identität der nach Stimulation mit uNS1 IFN- γ produzierenden Zellen mit Hilfe der intrazellulären Zytokinfärbung und anschließender FACS Analyse näher charakterisiert.

In diesen Untersuchungen wurde Vollblut eines HLA B8 positiven, Parvovirus und EBV seropositiven gesunden Spenders mit 10 µg/ml uNS1 7 h bei 37 °C inkubiert. Für die letzten 5 h der Inkubation wurde 10 µg/ml Brefeldin A (BFA), einem Hemmstoff der Proteinsekretion zugegeben. Im Anschluss erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Populationen IFN- γ produzierender Zellen in den verschiedenen Stimulationsansätzen mittels der FACS Technologie. Die Funktionalität der T-Zellen wurden mit dem EBV Peptid RAK aus BZLF1 überprüft und als Kontrolle für unspezifische Zytokinproduktion diente die Inkubation mit dem Peptid E10F.

Die Analyse der Zellen des Spenders GG ergab (Abb. 3.11), dass 0,1 % der Population der CTL nach uNS1 Stimulation IFN- γ produzierten. Daneben war auch eine Reaktivierung einer geringen Zahl spezifisch IFN- γ produzierender T_h -Zellen zu beobachten (0,05 % der Gesamt T_h -Zellpopulation). Die beobachtete IFN- γ Produktion aus CD4 $^+$ CD8 $^+$ DP Zellen (1,1 %) war dagegen nicht NS1 spezifisch, da diese Zellen auch in den Ansätzen mit den Peptiden RAK und E10F zu nachweisbar waren. Auch das Peptid RAK stimulierte eine kleine, in ihrer Größe mit der NS1 spezifischen vergleichbare CTL Population (0,1 %). Anders als nach der Proteinstimulation wurden aber keine T_h -Zellen reaktiviert (0,0 %). In den CTL und T_h -Zellen dieses Spenders war anders als in den DP T-Zellen keine unspezifische IFN- γ Produktion messbar.

Diese Ergebnisse zeigen, dass auch exogenes Harnstoff-denaturiertes NS1 cross präsentiert wird. Dabei gelangen Epitope aus dem NS1 Protein sowohl auf MHC Klasse I als auch auf Klasse II Moleküle.

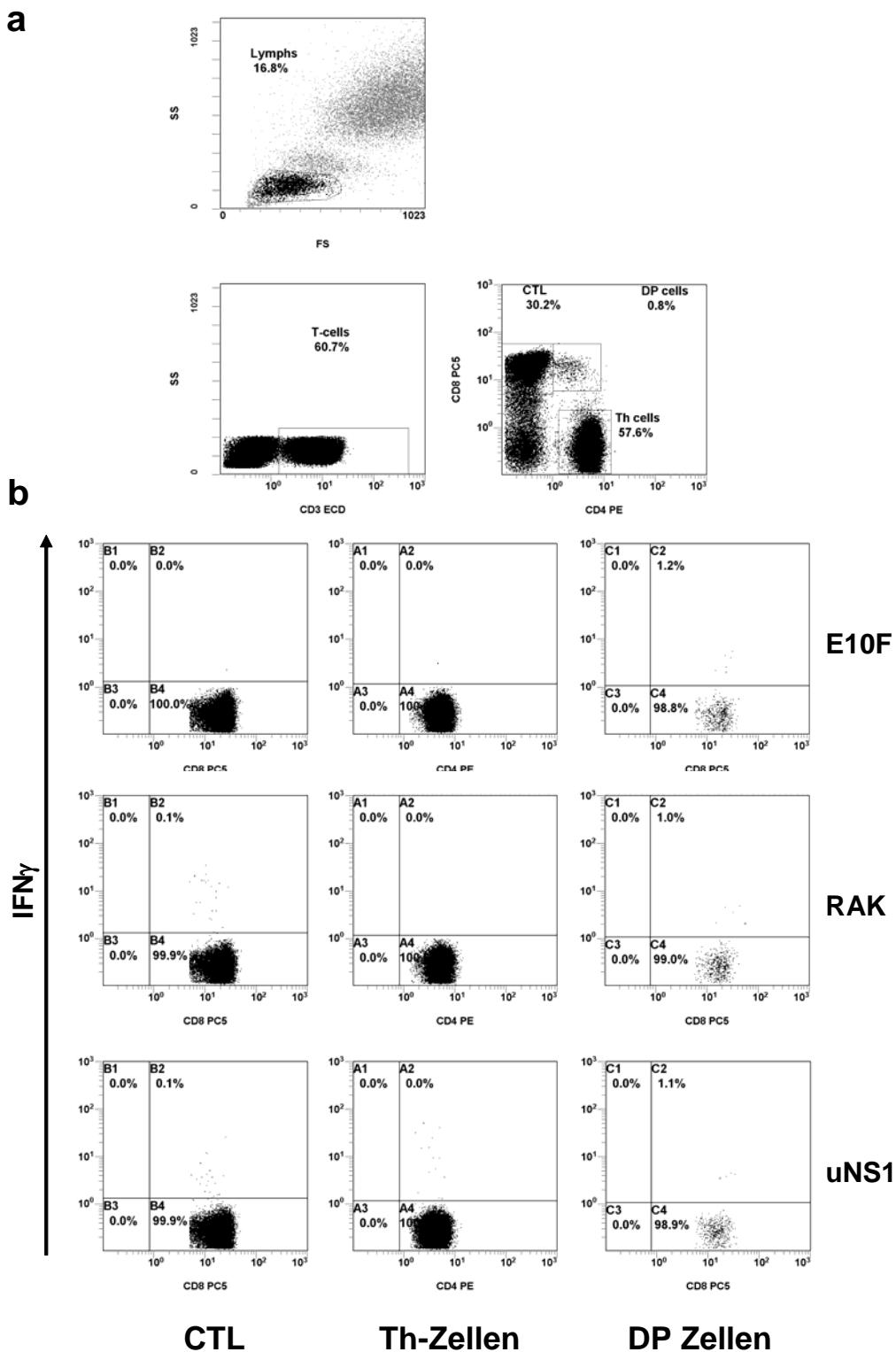


Abb. 3.11: Phänotypische Analyse der durch uNS1 reaktivierten T-Zellen durch intrazelluläre Zytokinfärbung. (b) Ein ml heparinisiertes Vollblut Parvovirus und EBV seropositiven Spenders GG wurde mit jeweils 10 µg/ml E10F (1. Reihe), dem CTL Epitop RAK aus BZLF1 (2. Reihe) oder uNS1 bei 37 °C und 5% CO₂ stimuliert. Nach 2 h wurde Brefeldin A (BFA) zugegeben und die Stimulation 5 h fortgesetzt. Oberflächenmarker wurden vor und intrazelluläres Zytokin nach Fixierung und Permeabilisierung gefärbt. Nach dem Durchfluss von mindestens 3 × 10⁴ CTL wurde die FACS

Messung gestoppt. Bei der Auswertung wurden die T-Zellsubpopulationen wie in (a) gezeigt *gated*. Anschließend wurden die einzelnen T-Zellpopulationen auf IFN- γ Produktion analysiert. Die Diagramme zeigen jeweils den Logarithmus der Fluoreszensintensität.

3.2 Identifizierung eines neuen MHC Klasse I restringierten Epitopes in BZLF1

Bei der Verwendung des Harnstoff-adjuvierten BZLF1 Proteins zur Restimulation antigenspezifischer CTL wird nicht nur das bereits bekannte und publizierte HLA B8 restringierte Epitop RAK (Bogedain, Wolf, Modrow, Stuber, & Jilg, 1995) oder das überlappende Cw6 restringierte Peptid RKC generiert sondern auch andere, bislang unbekannte immunogene Peptide mit unbekannter HLA Restriktion (Diplomarbeit Barabas 2003). Die größte Schwierigkeit bei der Identifizierung neuer Zielstrukturen antigenspezifischer T-Zellen ist das präsentierende HLA Molekül zu finden. Die Kenntnis eines solchen ermöglicht die rationale Suche nach dem auf diesem Molekül präsentierten Epitops mittels des Peptid-scan Verfahrens.

3.2.1 Identifizierung eines HLA Moleküls welches ein bislang unbekanntes Peptid präsentiert

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen zur Bestimmung BZLF1 spezifischer T-Zellen im Blut von mehr als 100 EBV seropositiven gesunden Spendern und Patienten vor Beginn ihrer aufgrund einer bevorstehende Nierentransplantation durchgeführte Immunsuppression ergaben, dass neben 95 % der HLA B8 positiven auch 55 % der HLA B8 und Cw6 negativen Spender eine deutliche Zahl IFN- γ produzierender Zellen nach Stimulation mit uBZLF1 aufwiesen. Dies legt den Schluss nahe, dass noch weitere Epitope aus dem BZLF1 Protein auf bislang unbekannten HLA Molekülen von T-Zellen erkannt werden. Um das HLA Molekül zu bestimmen auf dem ein weiteres Peptid aus BZLF1 präsentiert wird fand das Verfahren der „HLA-Subtraktion“ Anwendung. Hierbei werden HLA Moleküle von Spendern ohne Reaktivitäten gegen uBZLF1 von den HLA Molekülen von Spendern

mit starken Reaktivitäten gegen uBZLF1 subtrahiert. Dabei ist das Ziel möglichst fünf der sechs MHC Allele eines Spenders auszuschließen.

a

HLA Allele von Spendern mit starken Reaktivitäten gegen BZLF1			
Spender	HLA A	HLA B	HLA C
SW	19,*	18, 44(12)	Bw4,6; Cw5
AD	1,11	18, 51(5)	Bw3,7
DH	2, 26(10)	18, 37	Bw4,6; Cw6,7
MA	2, 30	18, 62	Bw6; Cw3,5
SD	31(19), 32(19)	7, 18	Bw6; Cw7
HLA Allele von Spendern ohne Reaktivitäten gegen BZLF1			
Spender	HLA A	HLA B	HLA C
HH	24(9), *	35, 44(12)	Bw4,6; Cw5
TH	9, 19	17, 35	Bw4,6; Cw4
JL	24(9), 25	13, 37	Bw4; Cw2,6
IK	3, 33(19)	35, 45(12)	Bw4,6; Cw4,6
PM	2, 3	44(12), 45	n.d.

b

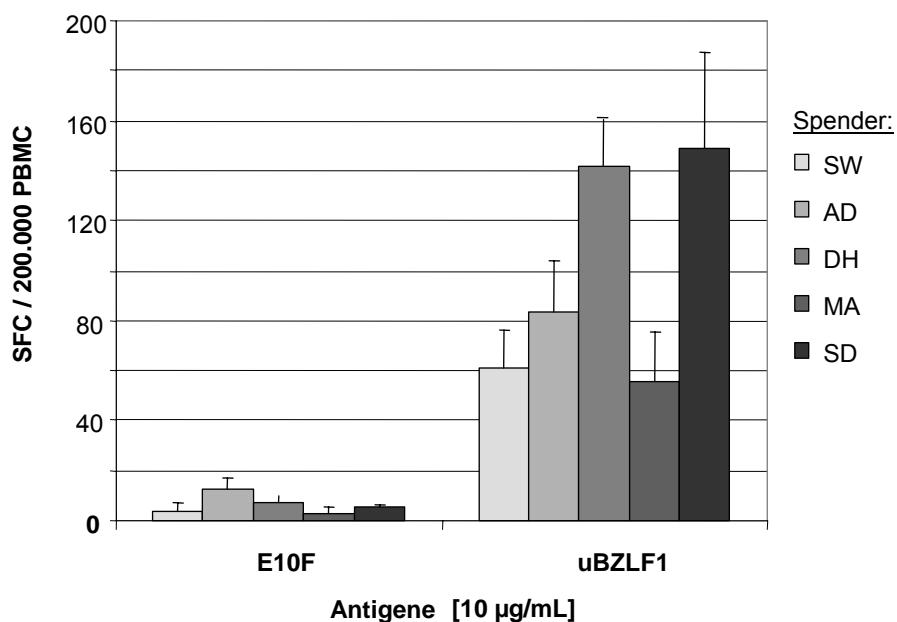


Abb. 3.12: Identifizierung von Epitoppräsentierenden HLA Molekülen durch das Verfahren der HLA Subtraktion. Dazu wurden HLA Moleküle (rot) von EBV seropositiven Spendern ohne BZLF1

spezifische T-Zellen von den HLA Molekülen von EBV seropositiven Spendern die eine hohe Zahl BZLF1 spezifischer T-Zellen aufweisen subtrahiert. (a) Die verbleibenden HLA Moleküle stellen potentielle Präsentiermoleküle für Epitope aus BZLF1 dar. (b) BZLF1 spezifische Reaktivitäten in HLA B18 positiver Probanden. Je 2×10^5 PBMC pro Ansatz von 5 solcher Spender wurden 20 h mit jeweils 10 µg/ml uBZLF1 oder E10F (Negativkontrolle) stimuliert. Die Zahl IFN-γ sezernierender Zellen wurde mit einem *ELISpot assay* ermittelt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) aus 5 parallel durchgeführten Stimulationsansätzen.

Auf diese Weise gelang es durch Subtraktion der HLA Allele der Spender HH, TH, JL, IK und PM, welche zu keinem untersuchten Zeitpunkt eine IFN-γ Produktion in PBMC nach Stimulation mit uBZLF1 gezeigt hatten, von den HLA Allelen der Spender SW, AD, DH, MA und SD mit starken uBZLF1 spezifischen Reaktivitäten das Molekül HLA B18 als mutmaßliches Epitop-präsentierendes Molekül einzuschränken (Abb. 3.12a). Eine Stimulation von PBMC dieser fünf HLA B18 positiven Spender mit uBZLF1 ist in Abbildung 3.12b dargestellt. Zudem wiesen alle weiteren untersuchten HLA B18 positiven Spender deutliche uBZLF1 spezifische Reaktivitäten auf. Diese Versuche deuten darauf hin, dass auf HLA B18 ein bislang unbekanntes Epitop aus BZLF1 präsentiert wird.

3.2.2 Grobkartierung des auf HLA B18 präsentierten Epitopes aus BZLF1

Um zu untersuchen, welches Peptid aus BZLF1 auf diesem HLA Molekül präsentiert wird, wurde das Peptid-scan Verfahren eingesetzt. Bei diesem Verfahren werden PBMC eines geeigneten Spenders mit kurzen, überlappenden Peptiden aus dem zu untersuchenden Protein stimuliert. Dabei reaktivieren immunogene Peptide antigenspezifische T-Zellen. Dabei wurde eine bereits am Institut vorliegende Peptidbank, bestehend aus 66 partiell überlappenden Peptiden aus BZLF1 mit Längen zwischen 8 und 19 Aminosäuren (AS) verwendet (Abb. 3.13a). Zur Grobkartierung wurden PBMC des HLA B18 positiven EBV seropositiven Spenders SD mit jeweils einem dieser Peptide stimuliert und die Frequenz Peptid-spezifischer T-Zellen im *ELISpot-assay* quantifiziert. Dabei reaktivierten nur die überlappenden Peptide 227 (QQP), 228 (CDS) und uBZLF1 eine signifikante Zahl von T-Zellen (Abb. 3.13b). Dieses Ergebnis war eine starke Indikation dafür, dass diese Peptide ein neues T-Zellepitop enthalten. Aufgrund der höheren Zahl reaktivierter Zellen wurde das Peptid CDS für die weiterführende Charakterisierung verwendet.

a

1 MMDPNSTSED VKFTPDPYQV PFVQAFDQAT RVYQDLGGPS
 41 QAPLPCVLPW VLPEPLPQQQ LTAYHVSTAP TGSWFSAPQP
 81 APENAYQAYA APQLFPVSDI TQNQQTNQAG GEAPQPGDNS
 121 TVQTAAAVVF ACPGANQQGQQ LADIGVPQPA PVAA PARRTR
 161 KPQQPESLEECDSELEIKRY KNRVASRKCR AKFKQLLQHY
 201 REVAAAKSSE NDRLRLLLKQ MCPSLDVDSI IP RTPDVLHE
 241 DLLNF

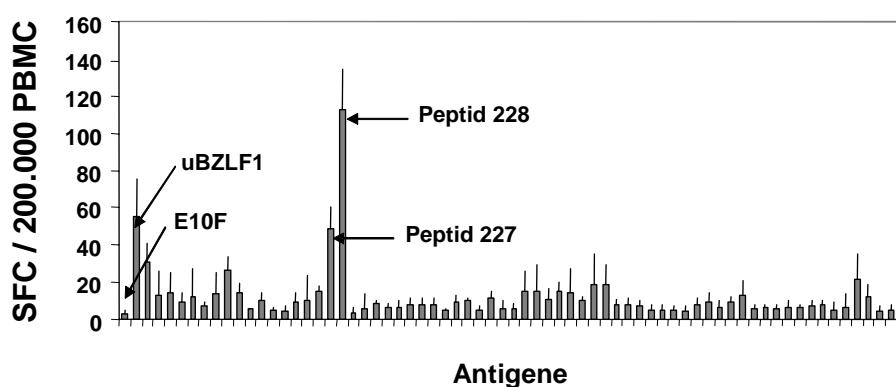
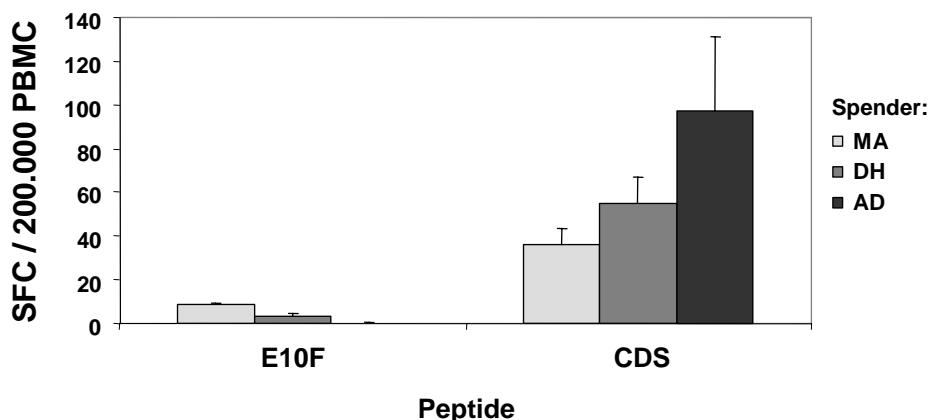
b**c**

Abb. 3.13: Grobkartierung bislang unbekannter, auf HLA B18 präsentierter Epitope. Um das putative Epitop zu finden wurden PBMC von HLA B18 positiven EBV seropositiven Spendern mit überlappenden Peptiden stimuliert. (a) Darstellung der im Hause verfügbaren Peptidbank. Zur besseren Übersicht wurden die einzelnen, teilweise überlappenden Peptide grau, kursiv und unterstrichen dargestellt. (b) Zur Kartierung wurden 2×10^5 PBMC / Ansatz des Spenders SD mit jeweils einem der

66 überlappenden Peptide aus BZLF1 20h inkubiert. Als Positivkontrolle diente uBZLF1 und E10F als Negativkontrolle. Alle Antigene wurden 10 µg/ml eingesetzt. Die Zahl IFN- γ sezernierender Zellen wurde mit einem *ELISpot assay* ermittelt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) aus 3 parallel durchgeföhrten Stimulationsansätzen. (c) Um sicherzustellen, dass das Peptid 228 (CDS) wirklich B18 restriktiv ist, wurden PBMC der 3 positiven Spender aus der Subtraktionstabelle (Abb. 3.11a) unter den gleichen Bedingungen mit diesem Peptid stimuliert und quantifiziert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) aus 5 parallel durchgeföhrten Stimulationsansätzen.

Um die Korrelation dieses Peptides mit HLA B18 zu bestätigen, wurden PBMC von drei weiteren HLA B18 positiven EBV seropositiven gesunden Spendern mit 10 µg/ml CDS 20 h inkubiert und die Zahl IFN- γ produzierender Zellen im *ELISpot-assay* quantifiziert. Dabei wiesen die drei getesteten Probanden anders als gegen das verwendete Kontrollpeptid E10F gut messbare Reaktivitäten gegen CDS auf (Abb. 3.13c). Somit zeigen diese Untersuchungen, dass in dem 14 AS langen Peptid CDS ein HLA B18 restriktives T-Zellepitop enthalten sein muss.

3.2.3 Feinkartierung des HLA B18 restriktierten Epitopes aus BZLF1

Da die im Abschnitt 3.2.2 verwendete Peptidbank aus dem Haus nicht alle möglichen CTL Epitope enthielt und die vorhandenen Peptide großteils länger waren als die üblicherweise auf MHC Klasse I präsentierten 8 – 10 mer (Rock & Shen, 2005) eignete sich diese Peptidbank nur zu einer groben Kartierung des präsentierten Epitopes. Um sowohl Minimal- als auch Optimalsequenz des in CDS enthaltenen CTL-Epitopes zu bestimmen, wurden alle in dem 14 mer Peptid enthaltenen 8 mer und 9 mer synthetisch hergestellt (peptides & elephants, Nutheital). Nachdem das Epitopvorhersageprogramm SYFPEITHI das 9 mer DSELEIKRY als potentielles Epitop prognostizierte, wurden ausgehend von diesem 9 mer C-terminal verlängerte Peptide synthetisiert um die Prozessierung an diesem Ende des Peptides näher zu untersuchen. Die Aminosäuresequenzen und Überlappungsbereiche dieser Peptide sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Peptidname	Aminosäuresequenz
Jpt63	C D S E L E I K R Y K N R V
PE1	C D S E L E I K R Y K N R V
PE2	D S E L E I K R Y
PE3	S E L E I K R Y K
PE4	E L E I K R Y K N
PE5	L E I K R Y K N R
PE6	E I K R Y K N R V
PE23	C D S E L E I K
PE24	D S E L E I K R
PE25	S E L E I K R Y
PE26	E L E I K R Y K
PE27	L E I K R Y K N
PE28	E I K R Y K N R
PE29	I K R Y K N R V
PE7	D S E L E I K R Y K
PE8	D S E L E I K R Y K N
PE9	D S E L E I K R Y K N R
PE10	D S E L E I K R Y K N R V
PE11	D S E L E I K R Y K N R V A
PE12	D S E L E I K R Y K N R V A S
PE13	D S E L E I K R Y K N R V A S R

Tab. 3.1: Auflistung der zur Feinkartierung synthetisierten Peptide, die mit dem Peptid CDS überlappen.

Dann wurden PBMC des HLA B18 positiven, HLA B8 negativen und EBV seropositiven Spenders MA mit jeweils 10 µg/ml dieser Peptide für 19 h stimuliert und die Zahl IFN-γ sezernierender Zellen im *EL/Spot-assay* quantifiziert (Abb. 3.14). Als Negativkontrollen dienten Medium alleine, das Peptid E10F (Spender HIV seronegativ) und das Peptid RAK. In keinem dieser Ansätze war eine signifikante Anzahl IFN-γ sezernierender Zellen zu verzeichnen. Als „Referenz“-Stimulans diente uBZLF1 und das 14 mer Peptid CDS. Auch diese beiden Antigene wurden 10 µg/ml eingesetzt. Beide reaktivierten die gleiche Zahl Antigen-spezifischer T-Zellen. Vergleichbare Ergebnisse wurden durch Stimulation mit dem zur Kontrolle nachsynthetisierten 14 mer CDS (PE1) erzielt. Ebenso lieferten das 10 mer Peptid DSE und die C-terminal bis zum 16 mer verlängerten Peptidvarianten vergleichbare Resultate. Von den getesteten 9 meren reaktivierten nur die Peptide DSE (PE2) und

SEL (PE3) signifikante Zahlen antigenspezifischer T-Zellen. Dabei übertrafen diese sogar die Stimulationen mit uBZLF1 und CDS (14 mer). Nur eines der 8 mere, SEL (PE25), war geeignet CTL zu reaktivieren und stellt somit das Minimallepitop dar. Somit konnte mit Hilfe von harnstoffadjuviertem BZLF1 ein weiteres HLA Moleköl welches ein Epitop aus BZLF1 präsentiert beschrieben und die Identität dieses Peptides aufgeklärt werden.

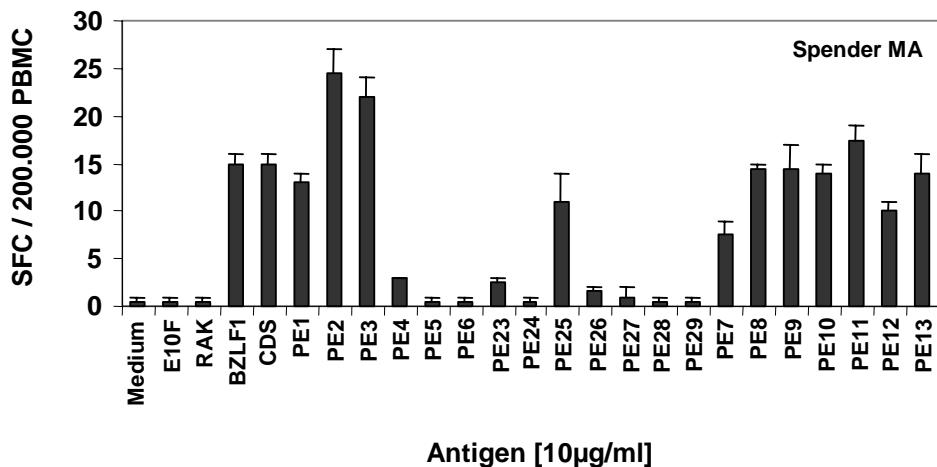


Abb: 3.14: Feinkartierung des in dem Peptid 228 (CDS) enthaltenen CTL Epitops. Dafür wurden 2×10^5 PBMC pro Ansatz vom HLA B18 positiven Spender MA mit je 10 µg/ml kurzer überlappender Peptide (siehe Tab. 1) 19 h stimuliert. Als Positivkontrollen dienten das Peptid CDS und uBZLF1 und als Negativkontrollen wurde Medium ohne Antigen, das HIV Peptid E10F und das HLA „mismatch“ Peptid RAK verwendet. Auch in den Kontrollen wurden die Antigene 10 µg/ml eingesetzt. Die Zahl IFN-γ sezernierender Zellen wurde mit einem *ELISpot assay* ermittelt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) aus 3 parallel durchgeföhrten Stimulationsansätzen. Zur Reproduktion wurde der Versuch mit gleichem Ergebnis mit einem zweiten HLA B18 positiven Spender wiederholt.

3.3 Überwachung von virologischen, serologischen und immunologischen Parametern in immunsupprimierten Patienten nach Nierentransplantation

Patienten die eine Organspende bekommen werden immunsupprimiert, um die Abstoßung des vom Immunsystem als „Fremd“ erkannten Organs zu verhindern. Das birgt allerdings die Gefahr, dass das Immunsystem die Kontrolle über persistierende

Viren wie EBV verliert. Dies kann zu Reaktivierungsereignissen und zur Entwicklung von lymphoproliferativen Erkrankungen, sogenannten PTLDs führen. Erste Marker für eine solche Entwicklung sind das Auftreten von EBV spezifischen IgM Antikörpern, eine stark erhöhte Viruslast oder ein extremes Absinken der Anzahl EBV spezifischer T-Zellen. Im Rahmen des ReForM C Projekts „Funktionsverlust bei Nierentransplantaten“ wurden diese Parameter an 99 Patienten ein Jahr lang bestimmt.

Eine Übersicht über die in der Studie eingeschlossenen Patienten gibt Tabelle 2.1. Jedem dieser Patienten wurde nach dem in Abbildung 3.15 vorgestellten Schema vor Beginn der Immunsuppression und in regelmäßigen Abständen unter Immunsuppression 20 ml Zitratblut und 5 ml Blut ohne Antikoagulans abgenommen.

Zeitschema der Blutentnahmen:

Zeitpunkt:

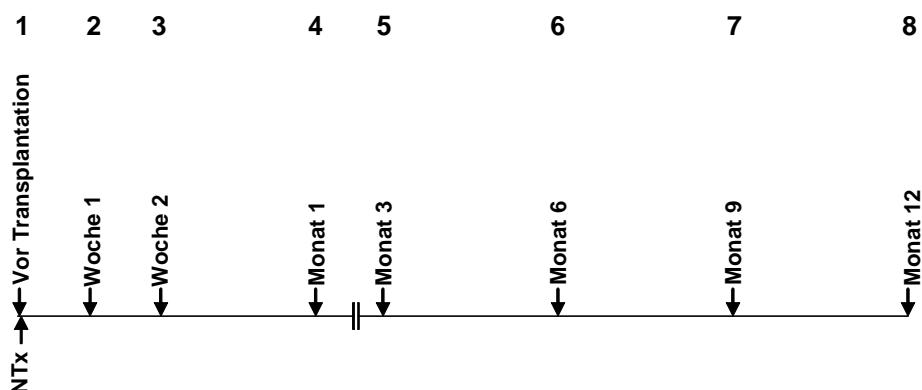


Abb 3.15: Schema der Blutentnahmen an Patienten vor und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Nierentransplantation. An den mit einem nach unten zeigenden Pfeil markierten Tagen wurde den untersuchten Patienten jeweils 20 ml Citratblut abgenommen und die Zahl uBZLF1 spezifischer T-Zellen mittels ELISpot assay quantifiziert.

Anschließend wurden aus dem Zitratblut PBMC präpariert und je 2×10^5 PBMC entweder mit uBZLF1 oder E10F als Negativkontrolle 19 h stimuliert. Die Zahl der vorhandenen BZLF1 spezifischen T-Zellen wurde im *ELISpot-assay* ermittelt. In den Versuchsgruppen wurden jeweils die unspezifisch aktivierte Zellen, ermittelt in der Negativkontrolle von den spezifisch durch uBZLF1 aktivierte Zellen abgezogen und

die resultierenden Werte als Nettowerte angegeben. Dabei wurde für jeden Patienten die Entwicklung der BZLF1 spezifischer T-Zellen im Vergleich zu dem Ausgangswert vor Beginn der Immunsuppression untersucht. 77 % der Probanden wiesen zu mindestens einem untersuchten Zeitpunkt BZLF1 spezifische T-Zellen auf, wogegen in 23 % der Probanden zu keinem untersuchten Zeitpunkt BZLF1 spezifische T-Zellen gefunden wurden, was an ungünstiger HLA Ausstattung liegen kann (Abb. 3.16). Nach Einsetzen der Immunsuppression fallen die Zahlen BZLF1 spezifisch restimulierbarer T-Zellen im Blut der Spender in den ersten Wochen zunächst ab. 1 bis 3 Monate nach dem Start der Suppression war ein Anstieg der Zahl spezifisch reaktivierbarer T-Zellen zu beobachten und nach 1 Jahr übertreffen sie schließlich in einigen Probanden den Ausgangswert.

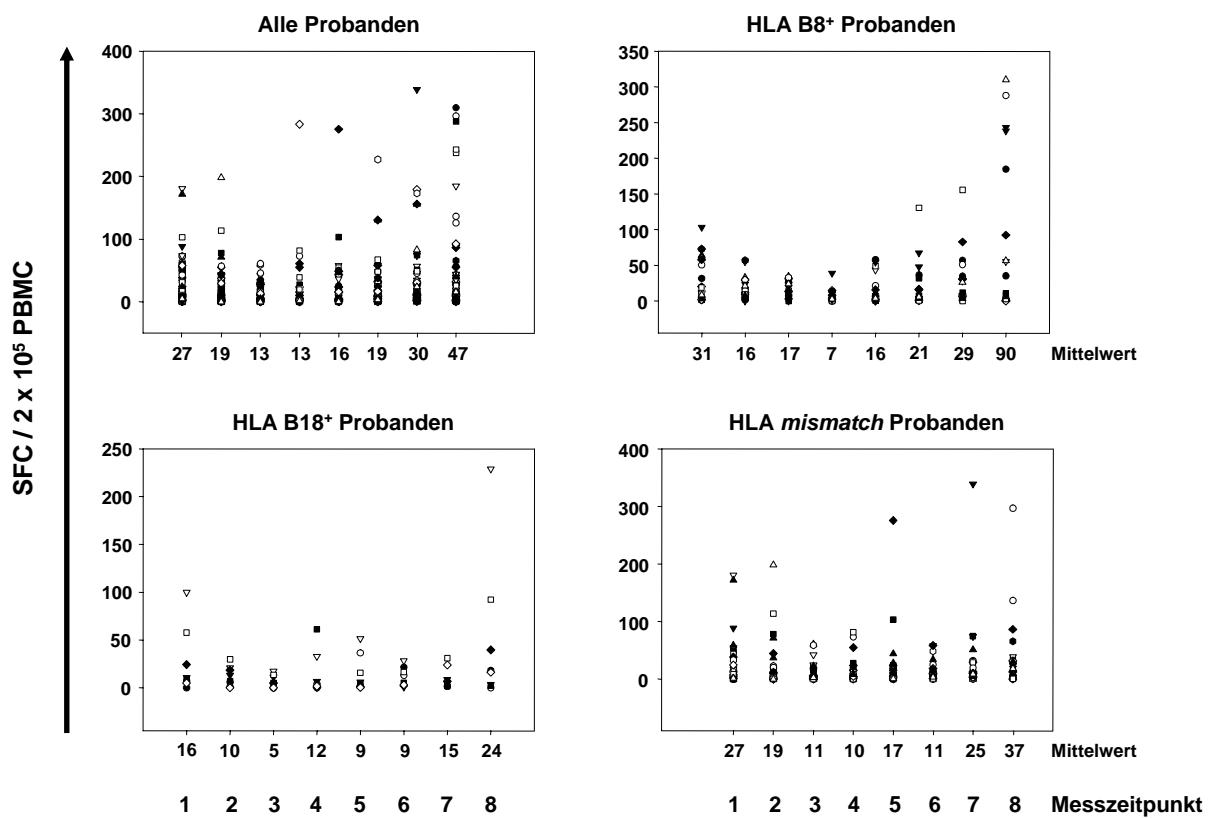


Abb. 3.16: Frequenz der uBZLF1 spezifischer T-Zellen in Patienten nach Nierentransplantation. Die einzelnen Blutentnahmen folgten dem in Abb. 3.15 dargestellten Schema. 2×10^5 PBMC jedes Spenders wurden entweder mit 10 µg/ml uBZLF1 oder mit 10 µg/ml E10F für 19 h stimuliert und die Zahl IFN-γ sezernierender Zellen mittels ELISpot assays bestimmt. Jeder in den Diagrammen gezeigte Messpunkt ist der Mittelwert aus 5 unabhängigen parallel durchgeföhrten Stimulationen. Im Diagramm links oben sind sämtliche Messpunkte aller Patienten dargestellt. Die anderen drei Diagramme stellen Auszüge aus diesem Gesamtbild dar. Das Diagramm rechts oben zeigt nur

Messwerte von HLA B8 positiven Spendern und links unten sind nur die Ergebnisse der Stimulationen von PBMC HLA B18 positiver Spender dargestellt. Die Zahl reaktivierter T-Zellen von Spendern die keines dieser HLA Moleküle besitzen ist im Diagramm rechts unten gezeigt. Unter den Punktwolken ist der Mittelwert der Zahl reaktivierten T-Zellen aller gezeigten Patienten zum jeweils gleichen Zeitpunkt in Relation zu ihrer Transplantation dargestellt.

Betrachtet man ausschließlich Spender, die mit HLA B8 (Abb. 3.16 rechts oben) oder mit HLA B18 (Abb. 3.16 links unten) Moleküle besitzen, von denen bekannt ist, dass sie Epitope aus BZLF1 präsentieren, zeichnet sich ein vergleichbares Bild ab. Nach einer initialen Reduktion der BZLF1 spezifischen T-Zellen rekonstituiert sich diese Population nach 6 Monaten wieder und übertrifft nach einem Jahr den Ausgangswert. Bei diesen Patienten ist auch der prozentuale Anteil derer, die zur Prozessierung und Präsentation von uBZLF1 nicht fähig sind oder keine BZLF1 spezifischen Zellen im Blut haben mit 13 % (HLA B8) und 12,5 % (HLA B18) geringer. Dabei sind im Durchschnitt die Vorläuferfrequenzen BZLF1 spezifischer T-Zellen gegen B8 restriktive Epitope höher als gegen B18 restriktive. Aber auch in vielen (62 %) der Patienten, die kein HLA Molekül besitzen welches ein bekanntes Epitop aus BZLF1 präsentiert, konnten BZLF1 spezifische T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.16 rechts unten). Auch hier ist zunächst wieder der Rückgang dieser Zellpopulation zu beobachten, bevor sie sich nach ca. 9 Monaten wieder regeneriert. Obwohl die BZLF1 spezifischen T-Zellzahlen teilweise sehr gering bis unter der Nachweisgrenze waren, entwickelte keiner der Patienten entwickelte eine lymphoproliferative Erkrankung.

Als zusätzlichen Marker wurde von der Diagnostikabteilung im Haus aus PBMC mittels quantitativer PCR die Viruslast bestimmt. Bei 29 Patienten waren sporadisch geringe Virusmengen (100-1000 Kopien: Befund schwach positiv (Nachweisgrenze)) nachweisbar. 6 Patienten wiesen einmalig höhere Viruslasten von bis zu 6100 Kopien pro 1×10^6 PBMC auf. Dieser höchste beobachtete Wert korreliert mit einer Serokonversion des betroffenen Patienten. Zu diesem Zeitpunkt wurde der Patient mit EBV infiziert, was sich zunächst in einer erhöhten Viruslast und dem Auftreten von IgM Antikörpern äußerte, bevor die Viruslast unter die Nachweisgrenze fiel und die IgM von IgG Antikörpern abgelöst wurden.

Die Antikörpertiter wurden nach Gerinnung des Blutes aus Serum bestimmt wobei verschiedene EBV spezifische IgG und IgM Isotypen untersucht wurden. Diese Arbeiten wurden von der Routinediagnostik im Haus durchgeführt. 98 der Patienten

waren schon vor der Transplantation EBV seropositiv, erkenntlich an der Anwesenheit von EBV spezifischen IgG Antikörpern. Neben dem einen, bereits erwähnten Patienten, welcher während der Beobachtungsphase eine Serokonversion durchmachte, traten bei zwei weiteren Patienten temporär IgM Antikörper auf. Da diese beiden Patienten aber vorher schon EBV seropositiv waren handelte es sich in diesen Fällen um Virusreaktivierungen. Diese beiden Ereignisse korrelierten aber nicht mit erhöhter Viruslast. Dafür zeigte einer dieser Patienten parallel zu den IgM Antikörpern auch eine etwas erhöhte Zahl BZLF1 spezifischer T-Zellen auf (14 statt $1,4 / 2 \times 10^5$ am Messpunkt zuvor).

Zusammen zeigen diese Daten, dass die Immunsuppression in diesem Patientenkollektiv sehr gut eingestellt ist da keine EBV assoziierten Erkrankungen auftraten. Darüber hinaus wurde die besondere Eignung von uBZLF1 als Stimulatorantigen deutlich, da auch Patienten untersucht werden konnten für deren HLA Moleküle keine Epitope bekannt waren.

4. Diskussion

4.1 Harnstoff-adjuviertes BZLF1 (uBZLF1) aktiviert verschiedene T- und NK-Zellpopulationen

Frühere Arbeiten dieser Arbeitsgruppe zeigten das Epitope aus löslichem, exogenem uBZLF1 sowohl klassisch auf MHC Klasse II Molekülen als auch nach *cross-presentation* auf MHC Klasse I Molekülen präsentiert werden. So können verschiedene T-Zellsubpopulationen restimuliert werden. Die darüber hinaus zur IFN- γ Produktion aktivierten Lymphozyten konnten bislang mit Ausnahme von NK-Zellen nicht vollständig charakterisiert werden.

Intrazelluläre Zytokinfärbungen in Lymphozyten zeigten, dass unterschiedliche Zellpopulationen durch uBZLF1 aktiviert werden. So werden neben CD4 $^{+}$ T_h-Zellen auch CD8 $^{+}$ CTL, CD4 $^{+}$ CD8 $^{+}$ doppelt positiver (DP) T-Zellen sowie NKT und NK Zellen zur IFN- γ Produktion aktiviert. Die vergleichende Stimulation mit dem synthetischen Peptid RAK resultierte dagegen in einer nahezu ausschließlichen Reaktivierung Antigen-spezifischer CTL. Der als Negativkontrolle eingesetzte Harnstoffpuffer alleine verursachte keine messbare IFN- γ Produktion in T- oder NK Zellen und ist damit per se nicht immunstimulatorisch. Aber eine kleine Zahl von NKT Zellen war positiv für dieses Zytokin, unabhängig von dem zur Stimulation eingesetzten Antigen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass es sich um bereits im Spender aktivierte Zellen handeln könnte, zumal dieser Effekt in anderen vergleichbaren Experimenten nicht auftrat. Dagegen resultierte die Stimulation mit uBZLF1 in der spezifischen Aktivierung vieler verschiedener Lymphozytenpopulationen. Neben der nicht unerwarteten Reaktivierung von T_h-Zellen nach Stimulation mit einem exogenen löslichen Protein (Cresswell, 1994) wurden auch eine immense Anzahl von CTL und ein großer Prozentsatz DP T-Zellen reaktiviert. Die MHC Klasse I restringierten CTL werden nach *cross-presentation* von Epitopen aus BZLF1 restimuliert. Da BZLF1 mehr als das von Bogedain beschriebene CTL Epitop RAK beinhaltet wurden durch die Proteinstimulation eine größere Anzahl CTL reaktiviert als durch Restimulation mit einem einzelnen Peptid. Es gibt zwei Hauptpopulationen doppelt positiver teilweise hochaktivierter (Pahar, Lackner et al., 2006) Gedächtnis T-Zellen. Die einen stammen von einem MHC Klasse I restringierten einzeln CD8 positiven Vorläufer (Zloza, Sullivan et al., 2003),

die anderen gehen auf einen MHC Klasse II restriktiven einzeln CD4 positiven Vorläufer zurück (Suni, Ghanekar, Houck, Maecker, Wormsley, Picker, Moss, & Maino, 2001). Gemeinsam ist den beiden Zellpopulationen ihre zytotoxische Eigenschaft. Dem Phänotyp nach ähneln die durch uBZLF1 reaktivierten DP Zellen den von Suni beschriebenen CD4⁺CD8^{dim} T-Zellen. Diese Zellpopulation macht bis zu 2 % der CD3⁺ T-Zellen gesunder Menschen aus und spielt möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Kontrolle chronischer viraler Infektionen, die durch HIV, CMV und möglicherweise auch EBV hervorgerufen werden. Weil diese Viren teilweise über Möglichkeiten verfügen, die Epitoppräsentation auf HLA Klasse I Molekülen zu unterdrücken, stellt dies einen Schutzmechanismus dar, infizierte Zellen trotzdem zu eliminieren.

Durch eine Verbesserung der Färbechnik konnten nun auch die bislang nicht charakterisierten durch uBZLF1 zur IFN- γ Produktion angeregten CD3⁻ Lymphozyten bestimmt werden (Nicholson, Kidd et al., 1996). Durch zusätzliche Färbung von CD16 als NK-Zellmarker ließen sich zwei distinkte Populationen von NK-Zellen unterscheiden. Zusätzlich waren die NKT-Zellen durch die Expression von CD3 gut von diesen beiden zu unterscheiden. Ca. 7 % beider NK-Zellpopulationen und sogar 20 % der NKT-Zellen produzierten nach Stimulation mit uBZLF1 IFN- γ , nicht jedoch nach Stimulation mit Harnstoffpuffer alleine. Darüber hinaus korreliert die Aktivierung von NK- und NKT-Zellen zur IFN- γ Produktion mit der Anwesenheit antigenspezifischer T-Zellen. Dadurch kann eine unspezifische Aktivierung von NK- und NKT-Zellen durch uBZLF1 oder den verwendeten Puffer ausgeschlossen werden. Da NK-Zellen, anders als T-Zellen nicht durch Erkennung von MHC-Peptid Komplexen sondern durch andere Faktoren wie beispielsweise durch bestimmte Zytokine (vor allem IL-12) aktiviert werden, galt es als nächstes zu untersuchen ob die nach uBZLF1 Stimulation beobachtete Aktivierung in diesen Zellpopulationen IL-12 abhängig ist. Die Anwesenheit eines hemmenden anti-IL-12 Antikörpers nicht aber einer Isotypkontrolle führte zu einer deutlichen Hemmung der Aktivierung von NK Zellen. Das nicht alle NK Zellen inhibiert wurden mag zum einen an einer zu niedrigen Konzentration des hemmenden Antikörpers liegen oder daran, dass der Antikörper keine vollständige Blockierung der Funktionalität verursachte. Allerdings könnten NK Zellen aber auch von anderen möglicherweise sezernierten Zytokinen wie Typ I Interferonen aktiviert werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass uBZLF1 die IL-12 Produktion in Antigen-präsentierenden Zellen (APC) induziert.

Bekannt ist die Hochregulation von bestimmten Aktivierungsmarkern auf APC, wie Ox40 Ligand (Ohshima, Hayakari et al., 1997}, begleitet von einer deutlich verstärkten Zytokinproduktion (unter anderem auch IL-12) nach Erkennung eines MHC Klasse II präsentierten Epitopes durch eine aktivierte T-Zelle (Ria, 1998). Auf diese Weise kann eine bestehende Immunreaktion verstärkt und eine erneute Immunantwort schneller initiiert und polarisiert werden. Im Gegensatz dazu war die Aktivierung der NKT Zellen komplett unabhängig von IL-12. Diese Zellpopulation wird, anders als NK Zellen nach Erkennung von endogenen Lipidantigenen, präsentiert auf den MHC ähnlichen CD1 Molekülen aktiviert (Mattner, 2005). Dies führt in Analogie zu NK Zellen zur Produktion von T_h1 Zell-polarisierenden Zytokinen wie IFN- γ . Somit ist uBZLF1 ein geeignetes Werkzeug zur simultanen Restimulation von vielen an der Kontrolle viraler und bakterieller Infekte beteiligten Lymphozytenpopulationen in einem Stimulationsansatz. Dadurch erlangt uBZLF1 eine große Bedeutung für diagnostische Zwecke.

4.2 Der Transfer von uBZLF1 in den MHC Klasse I Präsentationsweg wird durch Harnstoff-Adjuvierung, nicht aber durch eine putative Proteintranslokationsdomäne vermittelt

Nachdem in dieser Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass Epitope aus uBZLF1 cross-präsentiert werden war zu untersuchen welche Faktoren den dafür notwendigen Transfer in den MHC Klasse I Prozessierungs- und Präsentationsweg vermitteln. Normalerweise werden lösliche Proteine ineffizient cross-präsentiert (van der Most, Currie et al., 2006) da sie zum einen nicht ins Zytosol gelangen und zum anderen nach Endozytose schnell im Lysosom degradiert und mit MHC Klasse II Molekülen komplexiert werden. Ausnahmen bilden Proteine, wie das HIV Tat, die eine durch das gehäufte Auftreten basischer Aminosäuren gekennzeichnete Protein-Translokationsdomäne (PTD) beinhalten (Becker-Hapak, McAllister et al., 2001) und Heat-Shock Proteine (HSP) (Binder & Srivastava, 2005).

Vergleichende Kurzzeitstimulationsversuche und die Analyse der IFN- γ produzierenden Zellen im FACS zeigten, dass die Entfernung des Harnstoffs von uBZLF1 dessen Fähigkeit in den MHC Klasse I Weg zu gelangen und Antigen-spezifische CTL zu reaktivieren komplett aufhebt, obwohl beide Antigene in

identischen Konzentrationen eingesetzt wurden. Eine mögliche Erklärung für den beobachteten Effekt könnte in der Struktur des Proteins liegen. Durch Zugabe von uBZLF1 in den Stimulationsansatz erfolgt eine rasche, 100-fache Verdünnung des Harnstoffes von 8 M auf 0,08 M. Bei dieser Schockrückfaltung nimmt das Protein möglicherweise nicht seine natürliche Konformation an, sondern verbleibt in einem energetischen Zwischenzustand. Dadurch könnten hydrophobe Bereiche aus dem Inneren des Proteins Wechselwirkungen mit der Zellmembran von APC eingehen und dadurch die Aufnahme ermöglichen. Bei der Dialyse sinkt die Harnstoffkonzentration zwar auch schnell ab, jedoch steht dem Protein danach mehr Zeit für eine korrekte Rückfaltung zur Verfügung. Allerdings liegen keine Daten zur Struktur von uBZLF1 und BZLF1 vor. Untersuchungen von Dowdy zeigten, dass in 8 M Harnstoff denaturiertes und anschließend durch Entfernen des Harnstoffes renaturiertes HIV Tat Protein 1000-fach effizienter ins Lumen von Zellen transferiert wird. Im Gegensatz zu dem von uns beschriebenen Verfahren entfernte Dowdy den Harnstoff vollständig. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die geringe im Stimulationsansatz verbleibende Menge an Harnstoff (0,08 M) die Permeabilität der Zellmembran verändert und so die Penetration von uBZLF1 erleichtert wird.

Ein weiterer den Transfer von uBZLF1 in den Klasse I Präsentationsweg begünstigender Faktor könnte eine argininreiche Domäne im C-terminalen Bereich des Proteins sein, welche eine starke Ähnlichkeit zur PTD des *D. melanogaster* Antennapedia Proteins aufweist. Charakteristisch für derartige, den Transfer von mit ihnen verbundenen Polypeptiden in Zellen bewerkstelligenden Domänen ist der hohe Gehalt an den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin (Fuchs & Raines, 2004). Ein um diese argininreiche Domäne verkürztes Protein (uBZLF1_{Δ176-190}) wurde mit dem Wildtyp uBZLF1 hinsichtlich der Fähigkeit, prozessiert und auf MHC Klasse I Molekülen präsentiert zu werden untersucht. Erleichtert wurden diese Experimente dadurch, dass für uBZLF1_{Δ176-190} keine Modifikationen bezüglich des Expressions und Aufreinigungsverfahrens notwendig waren. So war die Harnstoffadjuvierung von uBZLF1_{Δ176-190} direkt mit der von uBZLF1 vergleichbar und beide Proteine lagen am Ende dieses Verfahrens mit in vergleichbarer Konzentration in 8 M Harnstoff vor. Vergleichende Stimulationsexperimente in EBV seropositiven Spendern zeigten, dass beide Antigene eine vergleichbare Zahl von Lymphozyten in ELISpot assays zur IFN-γ Sekretion anregten. Die vergleichende Charakterisierung der stimulatorischen Eigenschaften von uBZLF1 und uBZLF1_{Δ176-190} mittels FACS

Analysen stimulierter Zellen ergab weder ein Beeinträchtigung in der Reaktivierung von Th-Zellen noch von CTL. Somit weisen diese Experimente darauf hin, dass beide Antigene in vergleichbarer Weise von APC aufgenommen und prozessiert werden. Besonders interessant ist dabei der Befund, dass auch in Abwesenheit der putativen PTD Epitope aus uBZLF1 auf MHC Klasse I Moleküle geladen und anschließend von CTL erkannt werden, denn so kann eine Funktion dieser Domäne beim Transfer von uBZLF1 in den endogenen MHC Klasse I Prozessierungsweg ausgeschlossen werden. Andererseits ist der Schluss diese putative PTD besäße keinerlei Transferpotential auch nicht zulässig. So wäre es denkbar, dass die PTD des BZLF1 Proteins in Analogie zu der PTD aus Antp (Schwarze, Hruska et al., 2000) nur kleinere Polypeptide von bis zu 100 AS transferieren kann. Dagegen kann die PTD aus Tat sogar Proteine mit über 1000 AS Länge transferieren. Gemeinsam belegen diese Daten die essentielle Bedeutung des Harnstoffes nicht aber einer argininreichen Domäne in BZLF1 für den Transfer in einen *cross-presentation* Weg.

4.3 Verschiedene APC Populationen sind in der Lage uBZLF1 zu prozessieren

Nachdem in der Arbeitsgruppe gezeigt wurde, dass uBZLF1 auf einem *cross-presentation* Weg in APC aufgenommen wird, sollte untersucht werden welche Populationen antigenpräsentierender Zellen dazu in der Lage sind. Stimulationsexperimente mit gereinigten, antigenbeladenen APC zeigten, dass dendritische Zellen uBZLF1 sehr effizient *cross-präsentieren*. Aber auch Monozyten und B-Zellen waren, wenn auch weniger effizient, dazu fähig. Die Fähigkeit dendritischer Zellen zur *cross-präsentation* wurde in der Vergangenheit ausführlich untersucht (Brode & Macary, 2004). Abhängig von der Natur des Antigens können dendritische Zellen diese Antigene auf verschiedenen Wegen aufnehmen und *cross-präsentieren*. Auch Monozyten können verschiedene exogene Antigene *cross-präsentieren*. Dagegen ist dieser Antigenpräsentationsweg in B-Zellen derzeit noch wenig untersucht. Eine Arbeit beschreibt *cross-presentation* in B-Zellen nach Immunisierung mit einer sogenannten *gene-gun* (Hon, Oran, Brocker, & Jacob, 2005)

und eine andere nach Gabe von HSP-Antigen Chimären (Tobian, Harding et al., 2005).

Stimulationsexperimente zeigten, dass dendritische Zellen eine sehr hohe Kapazität besitzen uBZLF1 aufzunehmen, zu prozessieren und schließlich zu präsentieren. Dabei spielte der Grad ihrer Reife erstaunlicherweise keine Rolle. Beladen mit uBZLF1 waren beide Zellpopulationen in der Lage eine höhere Zahl antigenspezifischer T-Zellen zu reaktivieren, als durch alleinige Präsentation des Peptides RAK. Erklärbar ist dies mit der Tatsache, dass neben diesem bekannten RAK Epitop noch weitere teilweise unbekannte Epitope in BZLF1 enthalten sind. Ein neues HLA B18 restriktives Epitop wird unter anderem in dieser Arbeit beschrieben (siehe 3.2). Daneben zeigten sich auch Monozyten in der Lage uBZLF1 *cross-zupräsentieren*, wenn auch in geringerem Maß als dendritische Zellen. Hierbei werden durch uBZLF1 geringere Zahlen spezifischer T-Zellen reaktiviert als nach RAK Stimulation. Ähnliches ergaben die Versuche mit B-Zellen. Auch diese scheinen grundsätzlich in der Lage zu sein uBZLF1 aufzunehmen und zu prozessieren, allerdings noch weniger effizient als Monozyten.

Begründet kann diese unterschiedliche Ausprägung in den einzelnen APC Subpopulationen Epitope aus uBZLF1 zu prozessieren darin sein, dass sie sich grundsätzlich in ihrer Fähigkeit zur Aufnahme von Antigen aus der Umgebung unterscheiden. Unreife dendritische Zellen nehmen große Mengen Antigen über Endozytose, Makropinozytose und auch über Phagozytose auf (Steinman, Inaba et al., 1999). Nach Reifung nimmt die Phagozytose- und Makropinozytoseaktivität in dendritischen Zellen deutlich ab. Dies ist ein Hinweis darauf, dass uBZLF1 nicht über einen dieser beiden Mechanismen aufgenommen wird, sondern eher durch Endozytose. Möglicherweise können DCs uBZLF1 deswegen wesentlich besser cross-präsentieren als Monozyten, weil in dieser Zellpopulation die endo- und phagozytotischen Kompartimente nicht so stark angesäuert werden wie in Monozyten/Makrophagen (Blander & Medzhitov, 2006) und so größere Mengen uBZLF1 in den endogenen MHC Klasse I Weg entkommen können. Die biologische Ursache für diesen Unterschied liegt darin, dass Monozyten/Makrophagen in erster Linie Pathogene aufnehmen und auf diesem Weg eliminieren. Dendritische Zellen hingegen degradieren das Pathogen häufig nicht vollständig, da sie nach ihrer Reifung und Einwanderung in lymphatische Organe Epitope aus den internalisierten

Pathogenen an naive T-Zellen präsentieren und neue Immunantworten auslösen können.

4.4 Untersuchungen der Aufnahme und Prozessierung von Harnstoff-adjuviertem BZLF1

In der Vergangenheit konnte zwar aufgeklärt werden, dass uBZLF1 auf einem *Cross-präsentationsweg* in APC gelangt, die genauen Mechanismen der Aufnahme und Prozessierung waren noch unverstanden. Bereits bekannt war, dass uBZLF, wie bereits für die PTD-haltige Proteine Tat und Antp beschrieben (Console, Marty, Garcia-Echeverria, Schwendener, & Ballmer-Hofer, 2003), stark an der Zytoplasmamembran von APC adhäriert. Damit wird eine hohe Antigenkonzentration an der Oberfläche von APC geschaffen, wodurch möglicherweise die Aufnahme über Phagozytose oder Makropinozytose gesteigert wird. Das Phagolysosom ist dabei als *cross-presentation* kompetentes Organell beschrieben (Houde, Bertholet, Gagnon, Brunet, Goyette, Laplante, Princiotta, Thibault, Sacks, & Desjardins, 2003) (Guermonprez, Saveanu, Kleijmeer, Davoust, Van Endert, & Amigorena, 2003). Eine andere Möglichkeit ist die Aufnahme über Clathrin oder Kaveolin vermittelte Endozytose. So wird beispielsweise das Protein Tat an *clathrin-coated pits* aufgenommen (Vendeville, Rayne et al., 2004).

Untersuchungen zu dieser Fragestellung zeigten, dass die IFN- γ Induktion in PBMC nach Stimulation mit uBZLF1, nicht aber mit dem exogen, in einer Verdrängungsreaktion auf MHC Moleküle geladenen Peptid RAK, in Anwesenheit von Saccharose einem Inhibitor der Clathrin vermittelten Endozytose nahezu vollständig hemmbar war. Dieser Befund weist darauf hin, dass die Internalisierung von uBZLF1 nicht über Phagozytose oder Makropinozytose sondern über Endozytose an *clathrin-coated pits* erfolgt. Der Befund, dass die Inhibitoren der endolysosomalen Ansäuerung NH₄Cl und Chloroquin die Präsentation von Epitopen aus uBZLF1 nicht verhindern zeigt deutlich, dass endolysosomale Proteasen nicht an der Prozessierung von uBZLF1 zur *cross-Präsentation* beteiligt sind.

Im Gegenteil scheint die Prozessierung und Präsentation von uBZLF1 in Gegenwart der höchsten Chloroquinkonzentration sogar verstärkt zu sein. Dies ist in Übereinstimmung mit jüngeren Daten zur Prozessierung von löslichen partikulären

viralen Antigenen von HCV und HBV, deren *cross*-Präsentation durch Chloroquin verstärkt wird (Accapezzato, Visco, Francavilla, Molette, Donato, Paroli, Mondelli, Doria, Torrisi, & Barnaba, 2005). Die Erklärung für diese Befunde ist, dass das Antigen nicht durch Proteolyse im Endolysosom degradiert wird und somit mehr Antigen ins Zytosol freikommt. Auf welchem Weg das geschieht, ist bis dato weitgehend unbekannt (Monu & Trombetta, 2007), so auch für uBZLF1. Eine Ausnahme stellt das Hämagglutinin des Influenzavirus dar welches das Entkommen des Virus aus dem endolysosomalen Kompartiment ins Zytosol vermittelt. Zudem vermittelt eine davon abgeleitete, synthetisch hergestellte fusogene pH-abhängige amphipathische Alphahelix, gebildet aus fünf sich wiederholenden E-A Aminosäuren den Transfer von mit ihr konjugierten Polypeptiden ins Zytosol (Laus, Graddis et al., 2000). Dass uBZLF1 aus dem endolysosomalen Kompartiment freikommt und das Zytosol erreicht, kann hingegen als erwiesen betrachtet werden. Im Gegensatz zu endolysosomalen Proteasen spielt das Proteasom bei der *cross-präsentation* von Epitopen aus uBZLF1 eine wichtige Rolle, denn Versuche mit Lactacystin und Epoxomycin, zwei Inhibitoren verschiedener Untereinheiten des Proteasoms unterbanden diese sehr effizient. Die Präsentation des exogen auf MHC Klasse I Moleküle geladenen Peptides RAK wurde hingegen durch diese Substanzen nicht beeinflusst. Da die Hemmung der uBZLF1 Stimulation durch Lactacystin effizienter ist als die von Epoxomycin, kann darin begründet sein, dass die beiden Untereinheiten des Proteasoms die jeweils von einer der Substanz inhibiert werden unterschiedlich wichtig für die Generierung der auf die MHC Moleküle geladenen Peptide aus BZLF1 sind. Durch beide Befunde, dass endolysosomale Proteasen nicht an der Prozessierung beteiligt sind, das Proteasom hingegen essentiell ist, lässt sich eine Beladung von rezyklierenden MHC Klasse I Molekülen ausschließen (Gromme, Uytdehaag, Janssen, Calafat, van Binnendijk, Kenter, Tulp, Verwoerd, & Neefjes, 1999). Schließlich werden die am Proteasom generierten Peptide aus uBZLF1 in das ER transloziert und dort auf neu synthetisierte MHC Klasse I Moleküle geladen, bevor sie über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert werden. So wird die Aktivierung von CTL durch uBZLF1 von Brefeldin A einem Inhibitor des Vesikeltransports von ER zum Golgi-Apparat (Fonteneau, Kavanagh, Lirvall, Sanders, Cover, Bhardwaj, & Larsson, 2003) (Yewdell, Norbury, & Bennink, 1999) vollständig inhibiert (gezeigt in der Diplomarbeit von Herrn Barabas).

Eine zusammenfassende Übersicht des Prozessierungs- und Präsentationsweges von uBZLF1 ist in Abb. 4.1 dargestellt.

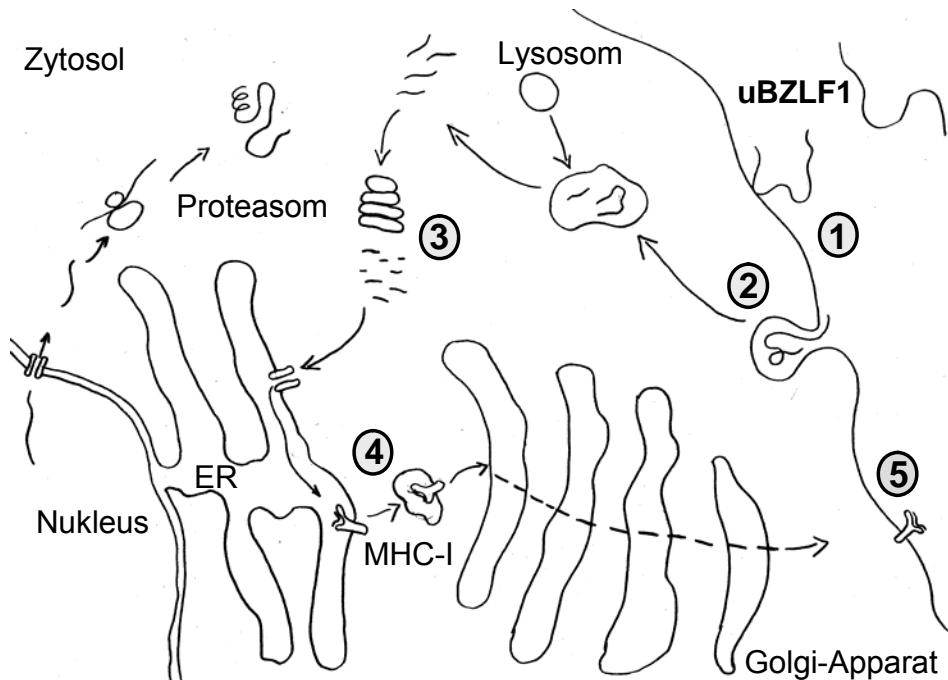


Abb. 4.1: Schematische Darstellung des *cross-presentation* Weges von uBZLF1. uBZLF1 weist eine starke Affinität zur Zytoplasmamembran von APC auf (1). Internalisiert wird es durch Clathrin-abhängige Endozytose (2) und gelangt dann auf einem nach wie vor unbekannten Weg in Zytosol bevor es im sauren Milieu des Endolysosoms degradiert wird. Im Zytosol wird uBZLF1 dann am Proteasom prozessiert (3) und die entstandenen Peptide zur Beladung neu synthetisierter MHC Klasse I Moleküle ins endoplasmatische Retikulum transportiert (4). Schließlich werden die so generierten MHC Komplexe über den sekretorischen Weg durch den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche sezerniert, wo sie von antigen-spezifischen CTL erkannt werden (5).

4.5 Übertragung des Verfahrens der Harnstoff-Adjuvierung auf das Parvovirus NS1 Protein

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass uBZLF1 durch die Harnstoff-Adjuvierung ins Zytoplasma von APC transloziert, dort prozessiert und schließlich auf MHC Klasse I Molekülen präsentiert wird. Dagegen blieb unklar ob der beobachtete Transfer von uBZLF1 in APC alleinig auf der Harnstoff-Adjuvierung beruht oder ob zusätzlich intrinsische Eigenschaften des BZLF1 Proteins dazu beitragen. Um eine Antwort auf

diese Frage zu erhalten, war es notwendig dieses Verfahren auf ein anderes Modellantigen zu übertragen. Für diese Untersuchungen wurde das Parvovirus NS1 Protein ausgewählt. Dieses Antigen eignet sich besonders, weil es ein lösliches, exogenes Protein ist, das *per se* keine CTL induziert. Daneben liegt die Durchseuchungsrate von Parvovirus im Menschen bei ungefähr 50 %. So sind sowohl zahlreiche seropositive als auch seronegative Spender am Institut vorhanden. Des Weiteren ist das NS1 Protein ein geeignetes Modellantigen, da es eine messbare CTL Antwort in infizierten Patienten induziert (Norbeck, Isa et al., 2005). Bei ersten Versuchen mit diesem in 8 M Harnstoff vorliegenden Protein wurden IFN- γ produzierende Zellen in PBMC Parvovirus B19-seropositiver Probanden mit *ELISpot* assays gefunden. Um die Identität dieser Zellen näher zu untersuchen, wurden Depletionsstudien durchgeführt bei denen jeweils die CD4 $^{+}$ oder CD8 $^{+}$ Zellen aus den PBMC entfernt wurden. Diese Versuche gaben eine sehr starke Indikation für die Reaktivierung antigenspezifischer CTL nach Stimulation mit uNS1, denn die Entfernung der CD4 $^{+}$ Zellen verringerte die Zahl IFN- γ sezernierender Zellen nicht wesentlich. Dagegen ging die Zahl IFN- γ sezernierender Zellen nach Depletion der CD8 $^{+}$ Zellen auf das Hintergrundniveau zurück. Dies zeigt, dass Epitope aus uNS1 auf MHC Klasse I Moleküle geladen und dann von antigenspezifischen CTL erkannt werden. Durch die Anwendung der positiven Selektion, bei der nur durch spezifische Antikörper markierten Zellen aus dem Ansatz entfernt wurden ließ sich eine unspezifische Aktivierung durch die verwendeten Antikörper ausschließen. Da CD8 auch auf einer kleinen Subpopulation dendritischer Zellen exprimiert wird, die durch die Depletion ebenfalls aus dem Ansatz entfernt wurde kann dies aber noch nicht als eindeutiger Beweis für die Cross-Präsentation von uNS1 gewertet werden. Theoretisch könnte es gerade diese Subpopulation von DCs sein, die für die Präsentation der Epitope aus uNS1 verantwortlich ist. Gegen diese Hypothese spricht jedoch der Befund, dass an der Präsentation von uBZLF1 DC, Monozyten und B-Zellen beteiligt sind. Um darüber Sicherheit zu erlangen wurde die Zahl und Identität der IFN- γ produzierenden Zellen nach Stimulation mit uNS1 in Vollblut geeigneter Spender durch intrazelluläre Zytokinfärbung und anschließende FACS Analyse untersucht. Diese Versuche bestätigten die Ergebnisse der Depletionsstudie denn sie zeigten die Fähigkeit von uNS1 zur Restimulation antigenspezifischer CTL. Aber Epitope aus uNS1 werden nicht nur auf MHC Klasse I sondern auch auf Klasse II Molekülen präsentiert denn es wurden auch T_h-Zellen restimuliert. Die IFN- γ

Produktion in der DP T-Zellpopulation war nicht auf die uNS1 Stimulation zurückzuführen da sie unabhängig vom eingesetzten Antigen zu beobachten war. Die DP T-Zellen in diesem Spender wiesen zudem einen anderen Phänotyp als die durch uBZLF1 reaktivierten DP T-Zellen auf. Die DP T-Zellen in diesem Versuch hatten einen CD4^{dim}CD8⁺ Phänotyp, was darauf hindeutet, dass sie sich aus einem CTL Vorläufer entwickelt haben. Anders als CD4⁺CD8^{dim} T-Zellen (Suni, Ghanekar, Houck, Maecker, Wormsley, Picker, Moss, & Maino, 2001; Pahar, Lackner, & Veazey, 2006) reagieren diese auf Kontakt mit „ihrem“ Antigen nicht mit IFN- γ oder IL-2 Produktion sondern eher mit Sekretion von IL-4 (Zloza, Sullivan, Connick, Landay, & Al Harthi, 2003). Zusammen zeigen diese Daten, dass auch uNS1 auf einem *cross-presentation* Weg prozessiert und die generierten Peptide auf MHC Klasse I Moleküle geladen werden. Das in diesen Versuchen die Vorläuferfrequenz NS1 spezifischer CTL geringer ist als die Frequenz der BZLF1 spezifischen CTL ist nicht überraschend, da sich das persistierende EBV, anders als Parvovirus B19 im Blut sporadisch repliziert und so die spezifische Immunantwort wiederholt restimuliert wird.

4.6 Identifizierung eines neuen HLA-B18 restriktionsen CTL Epitopes in uBZLF1

Da CTL bei der Kontrolle viraler Infekte und Tumorerkrankungen, aber auch bei der Ausbildung chronisch inflammatorischer und Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielen ist die Entdeckung ihrer Zielstrukturen für die Entwicklung neuer diagnostischer, therapeutischer und präventiver Verfahren von großer Bedeutung (Yewdell, Norbury, & Bennink, 1999). Das gängigste Verfahren zur Bestimmung von T-Zellepitopen beruht auf der Stimulation von PBMC mit kurzen, überlappenden Peptide aus bekannten Proteinantigenen (Anthony & Lehmann, 2003; Kiecker, Streitz et al., 2004). Limitiert wird die Methodik zum einen durch den hohen Kosten- und Arbeitsaufwand und zum anderen durch die großen Schwierigkeiten, das HLA Molekül auf dem das unbekannte Epitop präsentiert wird zu identifizieren. Denn dessen Kenntnis ermöglicht eine rationale Auswahl geeigneter Spender für die Epitopsuche.

Bisher konnten mit dem herkömmlichen Verfahren 3 Epitope in BZLF1 identifiziert werden. In unserer Arbeitsgruppe wurde das immundominante HLA B8 restriktierte Epitop RAK und das deutlich schwächere, teilweise mit RAK überlappende HLA Cw6 restriktierte Epitop RKC beschrieben (Bogedain, Wolf, Modrow, Stuber, & Jilg, 1995). Ein weiteres, HLA B35 restriktiertes Epitop (LPE) wurde von einer australischen Gruppe (Green, Miles et al., 2004) identifiziert.

Bei Stimulationsexperimenten wurden nicht nur in HLA B8 positiven Spendern, sondern auch in 55 % der HLA B8 negativen, EBV seropositiven gesunden Spender BZLF1 spezifische Reaktivitäten gefunden. Darüber hinaus fielen bei Versuchen mit PBMC verschiedener HLA B8 positiver, EBV seropositive Probanden einige Spender mit größeren Zahlen reaktivierter CTL nach Stimulation mit uBZLF1 als mit dem Peptid RAK auf. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass aus uBZLF1 mehr Epitope als das bereits bekannte RAK prozessiert, auf teilweise bislang unbekannten HLA Molekülen präsentiert und schließlich von Antigen-spezifischen CTL erkannt werden. Um diese Epitope und ihre HLA Restriktion aufzudecken wurde zunächst das Verfahren der HLA Subtraktion angewandt. Dabei wurden HLA Allele von Spendern, welche keine BZLF1 spezifischen T-Zellen aufwiesen von den HLA Allen von Spendern mit BZLF1 spezifischen T-Zellen subtrahiert. Ziel war es dabei möglichst 5 der 6 HLA Allele eines auf BZLF1 reagierenden Spenders zu eliminieren. So konnte HLA B18 als wahrscheinlicher Träger eines bis dato unbekannten Epitopes aus BZLF1 identifiziert werden. Dieses Epitop stellt möglicherweise ein immundominantes dar, da die Mehrzahl (87,5 %) der EBV seropositiven, HLA B18 positiven Spender eine deutliche Immunantwort gegen dieses Epitop aufwies.

Nachdem das präsentierende HLA Molekül nun bekannt war, wurde mittels im Hause synthetisierter, überlappender Peptide unterschiedlicher Länge eine Grobkartierung des präsentierten Epitopes durchgeführt. Dabei konnte das 14 AS lange Peptid CDS innerhalb der DNA Bindedomäne des BZLF1 Proteins identifiziert werden (Kouzarides, Packham et al., 1991). Dass es sich bei diesem 14 mer Peptid auch wirklich um ein CTL und nicht etwa um ein Th-Zellepitop handelt wurde mittels FACS-Analysen bestätigt. Normalerweise umfassen CTL Epitope 8 – 11 Aminosäuren (Bjorkman, Saper et al., 1987; Bjorkman & Parham, 1990). Deswegen war nicht zu erwarten, dass es sich bei dem 14 mer CDS um das Minimalepitop handeln würde. Aus diesem Grund wurden zur Feinkartierung 20 verkürzte, überlappende Peptide synthetisiert. Die Feinkartierung des B18 restriktierten Epitopes unter Verwendung

der 20, 8 – 16 AS langen Peptiden führte zur Identifizierung des Minimalepitopes, des 8 mers SEL. Eine größere Zahl antigenspezifischer CTL wurde durch die 9 mere DSE und SEL, welche beide das Minimalepitope beinhalteten, reaktiviert. Damit stellen sie Optimalepitope dar.

Alle untersuchten über 9 Aminosäuren hinaus verlängerten Varianten des Peptides DSE reaktivierten dem 14 mer CDS vergleichbare Zahlen Antigen-spezifische CTL, da alle das Minimalepitop enthielten. Dabei schien der unterschiedlich große C-terminale Überhang die Bindung an das MHC Molekül und Erkennung durch den TCR zwar ein wenig zu behindern aber nicht komplett zu unterbinden.

Klinische Relevanz hat die Kenntnis von Epitopen aus dem BZLF1 Protein vor allem deshalb, weil es einen wichtigen Schalter zum Übergang in den lytischen Zyklus und der Vermehrung von EBV darstellt, was es zu einer wichtigen Zielstruktur zytotoxischer T-Zellen macht, die wiederum wesentlich zur Kontrolle der Virusreplikation in infizierten Personen beitragen. Darüber hinaus stellt das BZLF1 Protein als *immediate early* Genprodukt ein für die Epitopsuche gut geeignetes Antigen dar, weil gut messbare, immundominate CTL Epitope am häufigsten in *immediate early* Proteinen gefunden werden. In *early* Genprodukten kommen sie seltener vor, während sie in *late* Genprodukten kaum vorhanden sind (Pudney, Leese et al., 2005).

Ein weiterer interessanter Aspekt dieser Ergebnisse ist, dass durch die Vorhersage von Epitope aus BZLF1 präsentierenden HLA Molekülen unabhängig die Funktionalität des Verfahrens der Harnstoff-Adjuvierung bestätigt wird.

4.7 Bestimmung virologischer, serologischer und immunologischer Parameter der EBV Infektion in nach Nierentransplantation immunsupprimierten Patienten

Eine weitere Anwendung fand das Harnstoff-adjuvierte BZLF1 Protein in der diagnostischen Bestimmung antigen-spezifischer T-Zellen in einem Kollektiv von 99 infolge einer Nierentransplantation immunsupprimierter Patienten. Ziel dieser prospektiven Studie war es, den Einfluss immunsuppressiver Substanzen auf Frequenz und Funktionalität EBV spezifischer T-Zellen und deren Korrelation mit Reaktivierungen und EBV assoziierten Erkrankungen zu untersuchen. Dabei wurden

Reaktivierungen an Hand des erneuten Auftretens von EBV spezifischen IgM Antikörpern, mittels ELISA und erhöhten Kopienzahlen viraler Genome, mittels quantitativer PCR bestimmt.

IgM Antikörper stellen an sich einen guten Marker für Neuinfektionen bzw. für Reaktivierungen dar. Allerdings sind in der Literatur falsch positive sowie falsch negative Ergebnisse beschrieben worden weswegen dieser Parameter alleine zur sicheren Bestimmung von Reaktivierungen nicht ausreicht (Horwitz, Henle et al., 1983) (Robertson, Beynon et al., 2003). Aus diesem Grund wurde zusätzlich die Viruslast in PBMC der Patienten bestimmt. Jedoch schwanken die Zahlen viraler Genome in Patienten mit PTLD stark. So werden bei manchen PTLD Patienten nur 1600 Kopien pro 10^6 PBMC gefunden während andere über 20.000 Kopien pro 10^6 PBMC im Blut hatten (Davis, Sherritt et al., 2004). Auf der anderen Seite befand sich im untersuchten Kollektiv ein Patient, der zwar 6100 Kopien pro 10^6 PBMC aufwies aber keine PTLD entwickelte. Da keine Schwellenwerte für die Diagnose PTLD existieren, muss die Viruslast zusammen mit CTL Reaktivitäten bestimmt werden, um eine zuverlässige Prognose über das Risiko der Entwicklung einer PTLD stellen zu können (Smets, Latinne et al., 2002). Zur Restimulation der CTL werden häufig synthetische Peptide verwendet. Voraussetzung dafür ist die Kenntnis der jeweiligen Epitop – HLA Korrelationen. Hier offenbart sich der große Vorteil der Verwendung von Harnstoff-adjuviertem BZLF1. Denn aus diesem Antigen werden nicht nur die bekannten HLA B8 und B18 restriktiven Epitope prozessiert und präsentiert, sondern auch weitere bislang unbekannte Epitope. Dies ist daran zu erkennen, dass 62 % der HLA B8 und B18 negativen EBV seropositiven Patienten BZLF1 spezifische T-Zellen im peripheren Blut aufwiesen. Dadurch wird es möglich, spezifische T-Zellen in einem großen Kollektiv von Patienten mit unterschiedlicher HLA Ausstattung mit einem Antigen zu untersuchen. Dieses Verfahren ermöglicht auch eine diagnostische Bestimmung EBV-spezifischer T-Zellen in Patienten für deren HLA Moleküle bisher keine Epitope beschrieben waren.

Nach Beginn der Immunsuppression war bei der Mehrzahl der Patienten in den ersten 2 Wochen eine starke Reduktion der Zahl BZLF1 spezifischer T-Zellen festzustellen. Im Verlauf der ersten 6 Monate nach Transplantation stagnierte die Zahl BZLF1 spezifischer Zellen in der Regel auf niedrigem Niveau. Nach 9 Monaten erholte sie sich bei vielen Patienten wieder und überstieg nach einem Jahr in einigen Fällen sogar den ursprünglichen Ausgangswert. Diese Entwicklung der T-

Zellreaktivitäten war unabhängig von der HLA Ausstattung der Patienten zu beobachten. Die absolut höchsten CTL Reaktivitäten wurden in den HLA B8 positiven Spendern gemessen, da in diesen das immundominante Epitop RAK aus BZLF1 präsentiert werden kann (Bogedain, Wolf, Modrow, Stuber, & Jilg, 1995). Aber auch diese Spender wiesen temporär BZLF1 spezifische CTL Vorläuferfrequenzen unter der Nachweisgrenze auf. Jedoch ist aus der Tatsache, dass im ganzen Kollektiv keine EBV assoziierten Erkrankungen auftraten zu schließen, dass bereits ein sehr geringe Frequenz EBV spezifischer T-Zellen eine effektiven Kontrolle der viralen Replikation vermittelt. Die gemessene Frequenz BZLF1 spezifischer T-Zellen korreliert nicht zwangsläufig mit der Frequenz von T-Zellen anderer Spezifität. Allerdings stellt gerade BZLF1 als *immediate early* Protein ein zentrales Ziel der EBV spezifischen CTL Antwort dar (Landais, Saulquin et al., 2005). Dagegen spricht auch, dass die immunsuppressive Therapie die Funktion der T-Zellen unabhängig von ihrer Spezifität hemmt. Da es trotz der teilweise sehr niedrigen Zahl BZLF1 spezifischer T-Zellen in den beobachteten Patienten zu keinen EBV-assozierten Erkrankungen kam zeigt, dass die zuständigen Nephrologen die Stärke der Immunsuppression gut eingestellt haben. Darüber hinaus ist das Risiko der Entwicklung von PTLDs in nierentransplantierten Patienten geringer als beispielsweise nach Herz- oder Lungentransplantation (Opelz & Dohler, 2004). Ein großes Risiko besteht dagegen für EBV negativen Patienten die ein EBV positives Organ bekommen, da hier der Serokonversion oft die Entstehung von PTLDs folgt (Cockfield, 2001). In der hier vorliegenden Studie war nur ein derartiger Risikopatient eingeschlossen, der zwar im beobachteten Zeitraum eine EBV Infektion gefolgt von einer Serokonversion hatte und zeitweise eine erhöhte Viruslast im Blut aufwies. Allerdings entwickelte auch dieser Patient keine PTLD oder andere EBV assoziierte Erkrankung. Auch war das Risiko der Entwicklung von PTLDs in diesem Kollektiv durch Vermeidung von T-Zelldepletiver Immunsuppression wie z.B. bei Verwendung von anti-Thymozyten Globulin verringert (Newell, Alonso, Whittington, Bruce, Millis, Piper, Woodle, Kelly, Koeppen, Hart, Rubin, & Thistlethwaite, Jr., 1996). Die hier eingesetzte Immunsuppression wurde durch eine Kombination aus die IL-2 Synthese hemmende Calcineurin Inhibitoren, durch entzündungshemmendes Glucocorticoid und durch Proliferationshemmer vermittelt.

Literaturverzeichnis

- Accapezzato, D., Visco, V., Francavilla, V., Molette, C., Donato, T., Paroli, M., Mondelli, M. U., Doria, M., Torrisi, M. R., and Barnaba, V. (2005). Chloroquine enhances human CD8+ T cell responses against soluble antigens in vivo. *J.Exp.Med.* **202**, 817-828.
- Ackerman, A. L. and Cresswell, P. (2004). Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat.Immunol.* **5**, 678-684.
- Ackerman, A. L., Kyritsis, C., Tampe, R., and Cresswell, P. (2003). Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 12889-12894.
- Ampofo, K., Saiman, L., LaRussa, P., Steinberg, S., Annunziato, P., and Gershon, A. (2002). Persistence of immunity to live attenuated varicella vaccine in healthy adults. *Clin.Infect.Dis.* **34**, 774-779.
- Anagnostopoulos, I., Hummel, M., Kreschel, C., and Stein, H. (1995). Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus. *Blood* **85**, 744-750.
- Anthony, D. D. and Lehmann, P. V. (2003). T-cell epitope mapping using the ELISPOT approach. *Methods* **29**, 260-269.
- Babcock, G. J., Decker, L. L., Volk, M., and Thorley-Lawson, D. A. (1998). EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* **9**, 395-404.
- Bagai, R., Valujskikh, A., Canaday, D. H., Bailey, E., Lalli, P. N., Harding, C. V., and Heeger, P. S. (2005). Mouse endothelial cells cross-present lymphocyte-derived antigen on class I MHC via a. *J.Immunol.* **174**, 7711-7715.
- Bauer, G., Hofler, P., and Zur, H. H. (1982). Epstein-Barr virus induction by a serum factor. I. Induction and cooperation with additional inducers. *Virology* **121**, 184-194.
- Becker, J., Leser, U., Marschall, M., Langford, A., Jilg, W., Gelderblom, H., Reichart, P., and Wolf, H. (1991). Expression of proteins encoded by Epstein-Barr virus trans-activator genes depends on the differentiation of epithelial cells in oral hairy leukoplakia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 8332-8336.
- Becker-Hapak, M., McAllister, S. S., and Dowdy, S. F. (2001). TAT-mediated protein transduction into mammalian cells. *Methods* **24**, 247-256.
- Benham, A. M. and Neefjes, J. J. (1997). Proteasome activity limits the assembly of MHC class I molecules after IFN-gamma stimulation. *J.Immunol.* **159**, 5896-5904.
- Biggin, M., Bodescot, M., Perricaudet, M., and Farrell, P. (1987). Epstein-Barr virus gene expression in P3HR1-superinfected Raji cells. *J.Viro.* **61**, 3120-3132.

- Binder, R. J. and Srivastava, P. K. (2005). Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8+ T cells. *Nat.Immunol.* **6**, 593-599.
- Bjorkman, P. J. and Parham, P. (1990). Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu.Rev.Biochem.* **59**, 253-288.
- Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. (1987). The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* **329**, 512-518.
- Blander, J. M. and Medzhitov, R. (2006). On regulation of phagosome maturation and antigen presentation. *Nat.Immunol.* **7**, 1029-1035.
- Bogedain, C., Wolf, H., Modrow, S., Stuber, G., and Jilg, W. (1995). Specific cytotoxic T lymphocytes recognize the immediate-early transactivator Zta of Epstein-Barr virus. *J.Viro.* **69**, 4872-4879.
- Brode, S. and Macary, P. A. (2004). Cross-presentation: dendritic cells and macrophages bite off more than they can chew! *Immunology* **112**, 345-351.
- Buisson, M., Manet, E., Trescol-Biemont, M. C., Gruffat, H., Durand, B., and Sergeant, A. (1989). The Epstein-Barr virus (EBV) early protein EB2 is a posttranscriptional activator expressed under the control of EBV transcription factors EB1 and R. *J.Viro.* **63**, 5276-5284.
- BURKITT, D. (1962). Determining the climatic limitations of a children's cancer common in Africa. *Br.Med.J.* **2**, 1019-1023.
- Callan, M. F., Tan, L., Annels, N., Ogg, G. S., Wilson, J. D., O'Callaghan, C. A., Steven, N., McMichael, A. J., and Rickinson, A. B. (1998). Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo. *J.Exp.Med.* **187**, 1395-1402.
- Carel, J. C., Myones, B. L., Frazier, B., and Holers, V. M. (1990). Structural requirements for C3d,g/Epstein-Barr virus receptor (CR2/CD21) ligand binding, internalization, and viral infection. *J.Biol.Chem.* **265**, 12293-12299.
- Catalina, M. D., Sullivan, J. L., Bak, K. R., and Luzuriaga, K. (2001). Differential evolution and stability of epitope-specific CD8(+) T cell responses in EBV infection. *J.Immunol.* **167**, 4450-4457.
- Chapman, A. L., Rickinson, A. B., Thomas, W. A., Jarrett, R. F., Crocker, J., and Lee, S. P. (2001). Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocyte responses in the blood and tumor site of Hodgkin's disease patients: implications for a T-cell-based therapy. *Cancer Res.* **61**, 6219-6226.
- Clement, L. T. (1991). Functional and phenotypic properties of 'naive' and 'memory' CD4+ T cells in the human. *Immunol.Res.* **10**, 189-195.
- Cockfield, S. M. (2001). Identifying the patient at risk for post-transplant lymphoproliferative disorder. *Transpl.Infect.Dis.* **3**, 70-78.

- Cohen, J. I., Wang, F., and Kieff, E. (1991). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 mutations define essential domains for transformation and transactivation. *J. Virol.* **65**, 2545-2554.
- Console, S., Marty, C., Garcia-Echeverria, C., Schwendener, R., and Ballmer-Hofer, K. (2003). Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) "protein transduction domains" promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* **278**, 35109-35114.
- Cox, G. W., Mathieson, B. J., Giardina, S. L., and Varesio, L. (1990). Characterization of IL-2 receptor expression and function on murine macrophages. *J. Immunol.* **145**, 1719-1726.
- Cresswell, P. (1994). Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 259-293.
- Davis, J. E., Sherritt, M. A., Bharadwaj, M., Morrison, L. E., Elliott, S. L., Kear, L. M., Maddicks-Law, J., Kotsimbos, T., Gill, D., Malouf, M., Falk, M. C., Khanna, R., and Moss, D. J. (2004). Determining virological, serological and immunological parameters of EBV infection in the development of PTLD. *Int. Immunol.* **16**, 983-989.
- Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., and Trombetta, E. S. (2005). Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* **307**, 1630-1634.
- Delecluse, H. J., Bartnizke, S., Hammerschmidt, W., Bullerdiek, J., and Bornkamm, G. W. (1993). Episomal and integrated copies of Epstein-Barr virus coexist in Burkitt lymphoma cell lines. *J. Virol.* **67**, 1292-1299.
- Deml, L., Speth, C., Dierich, M. P., Wolf, H., and Wagner, R. (2005). Recombinant HIV-1 Pr55gag virus-like particles: potent stimulators of innate and acquired immune responses. *Mol. Immunol.* **42**, 259-277.
- Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, 10444-10450.
- Dolyniuk, M., Pritchett, R., and Kieff, E. (1976). Proteins of Epstein-Barr virus. I. Analysis of the polypeptides of purified enveloped Epstein-Barr virus. *J. Virol.* **17**, 935-949.
- EPSTEIN, M. A., ACHONG, B. G., and BARR, Y. M. (1964). VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *Lancet* **15**, 702-703.
- Faull, R. J., Hollett, P., and McDonald, S. P. (2005). Lymphoproliferative disease after renal transplantation in Australia and New Zealand. *Transplantation* **80**, 193-197.
- Fingeroth, J. D., Weis, J. J., Tedder, T. F., Strominger, J. L., Biro, P. A., and Fearon, D. T. (1984). Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 4510-4514.

Fonteneau, J. F., Kavanagh, D. G., Lirvall, M., Sanders, C., Cover, T. L., Bhardwaj, N., and Larsson, M. (2003). Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. *Blood* **102**, 4448-4455.

Frankel, A. D. and Pabo, C. O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* **55**, 1189-1193.

Fuchs, S. M. and Raines, R. T. (2004). Pathway for polyarginine entry into mammalian cells. *Biochemistry* **43**, 2438-2444.

Galea-Lauri, J., Wells, J. W., Darling, D., Harrison, P., and Farzaneh, F. (2004). Strategies for antigen choice and priming of dendritic cells influence the polarization and efficacy of antitumor T-cell responses in dendritic cell-based cancer vaccination. *Cancer Immunol. Immunother.* **53**, 963-977.

Gratama, J. W., Oosterveer, M. A., Zwaan, F. E., Lepoutre, J., Klein, G., and Ernberg, I. (1988). Eradication of Epstein-Barr virus by allogeneic bone marrow transplantation: implications for sites of viral latency. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **85**, 8693-8696.

Green, K. J., Miles, J. J., Tellam, J., van Zuylen, W. J., Connolly, G., and Burrows, S. R. (2004). Potent T cell response to a class I-binding 13-mer viral epitope and the influence of HLA micropolymorphism in controlling epitope length. *Eur.J.Immunol.* **34**, 2510-2519.

Gromme, M., Uytdehaag, F. G., Janssen, H., Calafat, J., van Binnendijk, R. S., Kenter, M. J., Tulp, A., Verwoerd, D., and Neefjes, J. (1999). Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 10326-10331.

Gu, S. Y., Huang, T. M., Ruan, L., Miao, Y. H., Lu, H., Chu, C. M., Motz, M., and Wolf, H. (1995). First EBV vaccine trial in humans using recombinant vaccinia virus expressing the major membrane antigen. *Dev.Biol.Stand.* **84**, 171-177.

Guermonprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P., and Amigorena, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* **425**, 397-402.

Hammerschmidt, W. and Sugden, B. (1989). Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature* **340**, 393-397.

Haque, T., Thomas, J. A., Falk, K. I., Parratt, R., Hunt, B. J., Yacoub, M., and Crawford, D. H. (1996). Transmission of donor Epstein-Barr virus (EBV) in transplanted organs causes lymphoproliferative disease in EBV-seronegative recipients. *J.Gen.Viro.* **77 (Pt 6)**, 1169-1172.

Harding, C. V. and Song, R. (1994). Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J.Immunol.* **153**, 4925-4933.

- Harshyne, L. A., Watkins, S. C., Gambotto, A., and Barratt-Boyes, S. M. (2001). Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J.Immunol.* **166**, 3717-3723.
- Harshyne, L. A., Zimmer, M. I., Watkins, S. C., and Barratt-Boyes, S. M. (2003). A role for class A scavenger receptor in dendritic cell nibbling from live cells. *J.Immunol.* **170**, 2302-2309.
- Heath, W. R., Belz, G. T., Behrens, G. M., Smith, C. M., Forehan, S. P., Parish, I. A., Davey, G. M., Wilson, N. S., Carbone, F. R., and Villadangos, J. A. (2004). Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol.Rev.* **199**, 9-26.
- Heath, W. R. and Carbone, F. R. (2001). Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat.Rev.Immunol.* **1**, 126-134.
- Heineman, T., Gong, M., Sample, J., and Kieff, E. (1988). Identification of the Epstein-Barr virus gp85 gene. *J.Viro.* **62**, 1101-1107.
- Henderson, E., Miller, G., Robinson, J., and Heston, L. (1977). Efficiency of transformation of lymphocytes by Epstein-Barr virus. *Virology* **76**, 152-163.
- Henle, G. and Henle, W. (1966). Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J.Bacteriol.* **91**, 1248-1256.
- Henle, W. and Henle, G. (1981). Epstein-Barr virus-specific serology in immunologically compromised individuals. *Cancer Res.* **41**, 4222-4225.
- Herbst, H. and Niedobitek, G. (1993). Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease. *Int.J.Clin.Lab.Res.* **23**, 13-16.
- Heslop, H. E., Savoldo, B., and Rooney, C. M. (2004). Cellular therapy of Epstein-Barr-virus-associated post-transplant lymphoproliferative disease. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* **17**, 401-413.
- Hon, H., Oran, A., Brocker, T., and Jacob, J. (2005). B lymphocytes participate in cross-presentation of antigen following gene gun vaccination. *J.Immunol.* **174**, 5233-5242.
- Horwitz, C. A., Henle, W., Henle, G., Schapiro, R., Borken, S., and Bundtzen, R. (1983). Infectious mononucleosis in patients aged 40 to 72 years: report of 27 cases, including 3 without heterophil antibody responses. *Medicine (Baltimore)* **62**, 256-262.
- Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M. F., Thibault, P., Sacks, D., and Desjardins, M. (2003). Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* **425**, 402-406.
- Hurley, E. A., Agger, S., McNeil, J. A., Lawrence, J. B., Calendar, A., Lenoir, G., and Thorley-Lawson, D. A. (1991). When Epstein-Barr virus persistently infects B-cell lines, it frequently integrates. *J.Viro.* **65**, 1245-1254.

Janeway, C. A., Jr., Carding, S., Jones, B., Murray, J., Portoles, P., Rasmussen, R., Rojo, J., Saizawa, K., West, J., and Bottomly, K. (1988). CD4+ T cells: specificity and function. *Immunol.Rev.* **101**, 39-80.

Jenne, L., Schuler, G., and Steinkasserer, A. (2001). Viral vectors for dendritic cell-based immunotherapy. *Trends Immunol.* **22**, 102-107.

Jilg, W., Bogedain, C., Mairhofer, H., Gu, S. Y., and Wolf, H. (1994). The Epstein-Barr virus-encoded glycoprotein gp 110 (BALF 4) can serve as a target for antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). *Virology* **202**, 974-977.

Jilg, W., Voltz, R., Markert-Hahn, C., Mairhofer, H., Munz, I., and Wolf, H. (1991). Expression of class I major histocompatibility complex antigens in Epstein-Barr virus-carrying lymphoblastoid cell lines and Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res.* **51**, 27-32.

Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H., and Prochiantz, A. (1991). Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 1864-1868.

Karajannis, M. A., Hummel, M., Anagnostopoulos, I., and Stein, H. (1997). Strict lymphotropism of Epstein-Barr virus during acute infectious mononucleosis in nonimmunocompromised individuals. *Blood* **89**, 2856-2862.

Kaye, K. M., Izumi, K. M., and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 9150-9154.

Khanna, R., Burrows, S. R., Argaet, V., and Moss, D. J. (1994). Endoplasmic reticulum signal sequence facilitated transport of peptide epitopes restores immunogenicity of an antigen processing defective tumour cell line. *Int.Immunol.* **6**, 639-645.

Khanna, R., Burrows, S. R., and Moss, D. J. (1995). Immune regulation in Epstein-Barr virus-associated diseases. *Microbiol.Rev.* **59**, 387-405.

Khanna, R., Sherritt, M., and Burrows, S. R. (1999). EBV structural antigens, gp350 and gp85, as targets for ex vivo virus-specific CTL during acute infectious mononucleosis: potential use of gp350/gp85 CTL epitopes for vaccine design. *J.Immunol.* **162**, 3063-3069.

Khyatti, M., Patel, P. C., Stefanescu, I., and Menezes, J. (1991). Epstein-Barr virus (EBV) glycoprotein gp350 expressed on transfected cells resistant to natural killer cell activity serves as a target antigen for EBV-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J.Viro.* **65**, 996-1001.

Kiecker, F., Streitz, M., Ay, B., Cherepnev, G., Volk, H. D., Volkmer-Engert, R., and Kern, F. (2004). Analysis of antigen-specific T-cell responses with synthetic peptides -what kind of peptide for which purpose? *Hum.Immunol.* **65**, 523-536.

Klein, G. (1989). Viral latency and transformation: the strategy of Epstein-Barr virus. *Cell* **58**, 5-8.

- Klein, G. (1993). Multistep evolution of B-cell-derived tumors in humans and rodents. *Gene* **135**, 189-196.
- Klein, J. and Sato, A. (2000). The HLA system. Second of two parts. *N Engl J Med*. **343**, 782-786.
- Kouzarides, T., Packham, G., Cook, A., and Farrell, P. J. (1991). The BZLF1 protein of EBV has a coiled coil dimerisation domain without a heptad leucine repeat but with homology to the C/EBP leucine zipper. *Oncogene* **6**, 195-204.
- Landais, E., Saulquin, X., and Houssaint, E. (2005). The human T cell immune response to Epstein-Barr virus. *Int J Dev Biol*. **49**, 285-292.
- Laus, R., Graddis, T. J., Hakim, I., and Vidovic, D. (2000). Enhanced major histocompatibility complex class I-dependent presentation of antigens modified with cationic and fusogenic peptides. *Nat Biotechnol*. **18**, 1269-1272.
- Leblond, V., Davi, F., Charlotte, F., Dorent, R., Bitker, M. O., Sutton, L., Gandjbakhch, I., Binet, J. L., and Raphael, M. (1998). Posttransplant lymphoproliferative disorders not associated with Epstein-Barr virus: a distinct entity? *J Clin Oncol*. **16**, 2052-2059.
- Lenschow, D. J., Walunas, T. L., and Bluestone, J. A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*. **14**, 233-258.
- Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P. M., Klein, G., Kurilla, M. G., and Masucci, M. G. (1995). Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* **375**, 685-688.
- Li, S., Paulsson, K. M., Chen, S., Sjogren, H. O., and Wang, P. (2000). Tapasin is required for efficient peptide binding to transporter associated with antigen processing. *J Biol Chem*. **275**, 1581-1586.
- Lindahl, T., Adams, A., Bjursell, G., Bornkamm, G. W., Kaschka-Dierich, C., and Jehn, U. (1976). Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr virus in a human lymphoid cell line. *J Mol Biol*. **102**, 511-530.
- Liu, Z., Savoldo, B., Huls, H., Lopez, T., Gee, A., Wilson, J., Brenner, M. K., Heslop, H. E., and Rooney, C. M. (2002). Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T lymphocytes for the prevention and treatment of EBV-associated post-transplant lymphomas. *Recent Results Cancer Res*. **159**, 123-133.
- Lu, S. J., Day, N. E., Degos, L., Lepage, V., Wang, P. C., Chan, S. H., Simons, M., McKnight, B., Easton, D., Zeng, Y., and . (1990). Linkage of a nasopharyngeal carcinoma susceptibility locus to the HLA region. *Nature* **346**, 470-471.
- Luka, J., Kallin, B., and Klein, G. (1979). Induction of the Epstein-Barr virus (EBV) cycle in latently infected cells by n-butyrate. *Virology* **94**, 228-231.
- Maecker, H. T., Ghanekar, S. A., Suni, M. A., He, X. S., Picker, L. J., and Maino, V. C. (2001). Factors affecting the efficiency of CD8+ T cell cross-priming with exogenous antigens. *J Immunol*. **166**, 7268-7275.

- Marschall, M., Schwarzmann, F., Leser, U., Oker, B., Alliger, P., Mairhofer, H., and Wolf, H. (1991). The BI'LF4 trans-activator of Epstein-Barr virus is modulated by type and differentiation of the host cell. *Virology* **181**, 172-179.
- Martinez-Kinader, B., Lipford, G. B., Wagner, H., and Heeg, K. (1995). Sensitization of MHC class I-restricted T cells to exogenous proteins: evidence for an alternative class I-restricted antigen presentation pathway. *Immunology* **86**, 287-295.
- Masucci, M. G. and Ernberg, I. (1994). Epstein-Barr virus: adaptation to a life within the immune system. *Trends Microbiol.* **2**, 125-130.
- Medema, J. P. and Borst, J. (1999). T cell signaling: a decision of life and death. *Hum. Immunol.* **60**, 403-411.
- Mellinghoff, I., Daibata, M., Humphreys, R. E., Mulder, C., Takada, K., and Sairenji, T. (1991). Early events in Epstein-Barr virus genome expression after activation: regulation by second messengers of B cell activation. *Virology* **185**, 922-928.
- Mellman, I. and Steinman, R. M. (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* **106**, 255-258.
- Miller, C. L., Burkhardt, A. L., Lee, J. H., Stealey, B., Longnecker, R., Bolen, J. B., and Kieff, E. (1995). Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases. *Immunity* **2**, 155-166.
- Miller, G. (1990). The switch between latency and replication of Epstein-Barr virus. *J. Infect. Dis.* **161**, 833-844.
- Mitsui, H., Inozume, T., Kitamura, R., Shibagaki, N., and Shimada, S. (2006). Polyarginine-mediated protein delivery to dendritic cells presents antigen more efficiently onto MHC class I and class II and elicits superior antitumor immunity. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 1804-1812.
- Monu, N. and Trombetta, E. S. (2007). Cross-talk between the endocytic pathway and the endoplasmic reticulum in cross-presentation by MHC class I molecules. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 66-72.
- Moore, M. D., Cooper, N. R., Tack, B. F., and Nemerow, G. R. (1987). Molecular cloning of the cDNA encoding the Epstein-Barr virus/C3d receptor (complement receptor type 2) of human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **84**, 9194-9198.
- Munoz, N., Davidson, R. J., Witthoff, B., Ericsson, J. E., and De The, G. (1978). Infectious mononucleosis and Hodgkin's disease. *Int. J. Cancer* **22**, 10-13.
- Neijssen, J., Herberts, C., Drijfhout, J. W., Reits, E., Janssen, L., and Neefjes, J. (2005). Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature* **434**, 83-88.
- Newell, K. A., Alonso, E. M., Whitington, P. F., Bruce, D. S., Millis, J. M., Piper, J. B., Woodle, E. S., Kelly, S. M., Koeppen, H., Hart, J., Rubin, C. M., and Thistlethwaite, J. R., Jr. (1996). Posttransplant lymphoproliferative disease in pediatric liver

transplantation. Interplay between primary Epstein-Barr virus infection and immunosuppression. *Transplantation* **62**, 370-375.

Nicholson, J., Kidd, P., Mandy, F., Livnat, D., and Kagan, J. (1996). Three-color supplement to the NIAID DAIDS guideline for flow cytometric immunophenotyping. *Cytometry* **26**, 227-230.

Norbeck, O., Isa, A., Pohlmann, C., Brolden, K., Kasprowicz, V., Bowness, P., Klenerman, P., and Tolfvenstam, T. (2005). Sustained CD8+ T-cell responses induced after acute parvovirus B19 infection in humans. *J.Viro.* **79**, 12117-12121.

Opelz, G. and Dohler, B. (2004). Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. *Am.J.Transplant.* **4**, 222-230.

Oudejans, J. J., Jiwa, N. M., and Meijer, C. J. (1997). Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease: more than just an innocent bystander. *J.Pathol.* **181**, 353-356.

Packham, G., Brimmell, M., Cook, D., Sinclair, A. J., and Farrell, P. J. (1993). Strain variation in Epstein-Barr virus immediate early genes. *Virology* **192**, 541-550.

Pahar, B., Lackner, A. A., and Veazey, R. S. (2006). Intestinal double-positive CD4+CD8+ T cells are highly activated memory cells with an increased capacity to produce cytokines. *Eur.J.Immunol.* **36**, 583-592.

Parham, P. (1999). Immunogenetics. Soaring costs in defence. *Nature* **401**, 870-871.

Pepperl, S., Benninger-Doring, G., Modrow, S., Wolf, H., and Jilg, W. (1998). Immediate-early transactivator Rta of Epstein-Barr virus (EBV) shows multiple epitopes recognized by EBV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J.Viro.* **72**, 8644-8649.

Precopio, M. L., Sullivan, J. L., Willard, C., Somasundaran, M., and Luzuriaga, K. (2003). Differential kinetics and specificity of EBV-specific CD4+ and CD8+ T cells during primary infection. *J.Immunol.* **170**, 2590-2598.

Pudney, V. A., Leese, A. M., Rickinson, A. B., and Hislop, A. D. (2005). CD8+ immunodominance among Epstein-Barr virus lytic cycle antigens directly reflects the efficiency of antigen presentation in lytically infected cells. *J.Exp.Med.* **201**, 349-360.

Ragoczy, T., Heston, L., and Miller, G. (1998). The Epstein-Barr virus Rta protein activates lytic cycle genes and can disrupt latency in B lymphocytes. *J.Viro.* **72**, 7978-7984.

Res, P. and Spits, H. (1999). Developmental stages in the human thymus. *Semin.Immunol.* **11**, 39-46.

Ribas, A. (2005). Genetically modified dendritic cells for cancer immunotherapy. *Curr.Gene Ther.* **5**, 619-628.

Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik, L. V., and Lebleu, B. (2003). Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J.Biol.Chem.* **278**, 585-590.

- Rickinson, A. B. and Moss, D. J. (1997). Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu.Rev.Immunol.* **15**, 405-431.
- Robertson, P., Beynon, S., Whybin, R., Brennan, C., Vollmer-Conna, U., Hickie, I., and Lloyd, A. (2003). Measurement of EBV-IgG anti-VCA avidity aids the early and reliable diagnosis of primary EBV infection. *J.Med.Viro.* **70**, 617-623.
- Rock, K. L. and Shen, L. (2005). Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol.Rev.* **207**, 166-183.
- Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P., and Amigorena, S. (1999). Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat.Cell Biol.* **1**, 362-368.
- Roth, G., Curiel, T., and Lacy, J. (1994). Epstein-Barr viral nuclear antigen 1 antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *Blood* **84**, 582-587.
- Rowe, D. T. (1999). Epstein-Barr virus immortalization and latency. *Front Biosci.* **4**, D346-D371.
- Sandvig, K. and van Deurs, B. (2002). Membrane traffic exploited by protein toxins. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **18**, 1-24.
- Schirmbeck, R., Bohm, W., Melber, K., and Reimann, J. (1995). Processing of exogenous heat-aggregated (denatured) and particulate (native) hepatitis B surface antigen for class I-restricted epitope presentation. *J.Immunol.* **155**, 4676-4684.
- Schirmbeck, R., Deml, L., Melber, K., Wolf, H., Wagner, R., and Reimann, J. (1995). Priming of class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by vaccination with recombinant protein antigens. *Vaccine* **13**, 857-865.
- Schwarze, S. R., Hruska, K. A., and Dowdy, S. F. (2000). Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? *Trends Cell Biol.* **10**, 290-295.
- Silins, S. L., Cross, S. M., Elliott, S. L., Pye, S. J., Burrows, S. R., Burrows, J. M., Moss, D. J., Argaet, V. P., and Misko, I. S. (1996). Development of Epstein-Barr virus-specific memory T cell receptor clonotypes in acute infectious mononucleosis. *J.Exp.Med.* **184**, 1815-1824.
- Sixbey, J. W., Nedrud, J. G., Raab-Traub, N., Hanes, R. A., and Pagano, J. S. (1984). Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl.J.Med.* **310**, 1225-1230.
- Smets, F., Latinne, D., Bazin, H., Reding, R., Otte, J. B., Buts, J. P., and Sokal, E. M. (2002). Ratio between Epstein-Barr viral load and anti-Epstein-Barr virus specific T-cell response as a predictive marker of posttransplant lymphoproliferative disease. *Transplantation* **73**, 1603-1610.
- Steinman, R. M., Inaba, K., Turley, S., Pierre, P., and Mellman, I. (1999). Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Hum.Immunol.* **60**, 562-567.

- Stittelaar, K. J., Hoogerhout, P., Ovaa, W., van Binnendijk, R. R., Poelen, M. C., Roholl, P., van Els, C. A., Osterhaus, A. D., and Wiertz, E. J. (2001). In vitro processing and presentation of a lipidated cytotoxic T-cell epitope derived from measles virus fusion protein. *Vaccine* **20**, 249-261.
- Suni, M. A., Ghanekar, S. A., Houck, D. W., Maecker, H. T., Wormsley, S. B., Picker, L. J., Moss, R. B., and Maino, V. C. (2001). CD4(+)CD8(dim) T lymphocytes exhibit enhanced cytokine expression, proliferation and cytotoxic activity in response to HCMV and HIV-1 antigens. *Eur.J.Immunol.* **31**, 2512-2520.
- Takada, K. and Ono, Y. (1989). Synchronous and sequential activation of latently infected Epstein-Barr virus genomes. *J.Viro.* **63**, 445-449.
- Tanner, J., Weis, J., Fearon, D., Whang, Y., and Kieff, E. (1987). Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* **50**, 203-213.
- Tanner, J., Whang, Y., Sample, J., Sears, A., and Kieff, E. (1988). Soluble gp350/220 and deletion mutant glycoproteins block Epstein-Barr virus adsorption to lymphocytes. *J.Viro.* **62**, 4452-4464.
- Tao, Q., Srivastava, G., Chan, A. C., Chung, L. P., Loke, S. L., and Ho, F. C. (1995). Evidence for lytic infection by Epstein-Barr virus in mucosal lymphocytes instead of nasopharyngeal epithelial cells in normal individuals. *J.Med.Viro.* **45**, 71-77.
- Thomas, J. A., Hotchin, N. A., Allday, M. J., Amlot, P., Rose, M., Yacoub, M., and Crawford, D. H. (1990). Immunohistology of Epstein-Barr virus-associated antigens in B cell disorders from immunocompromised individuals. *Transplantation* **49**, 944-953.
- Thorley-Lawson, D. A. (1979). A virus-free immunogen effective against Epstein-Barr virus. *Nature* **281**, 486-488.
- Tierney, R. J., Steven, N., Young, L. S., and Rickinson, A. B. (1994). Epstein-Barr virus latency in blood mononuclear cells: analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state. *J.Viro.* **68**, 7374-7385.
- Tobian, A. A., Harding, C. V., and Canaday, D. H. (2005). Mycobacterium tuberculosis heat shock fusion protein enhances class I MHC cross-processing and -presentation by B lymphocytes. *J.Immunol.* **174**, 5209-5214.
- Tomaru, U., Yamano, Y., Nagai, M., Maric, D., Kaumaya, P. T., Biddison, W., and Jacobson, S. (2003). Detection of virus-specific T cells and CD8+ T-cell epitopes by acquisition of peptide-HLA-GFP complexes: analysis of T-cell phenotype and function in chronic viral infections. *Nat.Med.* **9**, 469-476.
- Tvinnereim, A. R., Hamilton, S. E., and Harty, J. T. (2004). Neutrophil involvement in cross-priming CD8+ T cell responses to bacterial antigens. *J.Immunol.* **173**, 1994-2002.
- van der Most, R. G., Currie, A., Robinson, B. W., and Lake, R. A. (2006). Cranking the immunologic engine with chemotherapy: using context to drive tumor antigen cross-presentation towards useful antitumor immunity. *Cancer Res.* **66**, 601-604.

- Vendeville, A., Rayne, F., Bonhoure, A., Bettache, N., Montcourrier, P., and Beaumelle, B. (2004). HIV-1 Tat enters T cells using coated pits before translocating from acidified endosomes and eliciting biological responses. *Mol.Biol.Cell* **15**, 2347-2360.
- Vives, E., Brodin, P., and Lebleu, B. (1997). A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J.Biol.Chem.* **272**, 16010-16017.
- Walling, D. M., Brown, A. L., Etienne, W., Keitel, W. A., and Ling, P. D. (2003). Multiple Epstein-Barr virus infections in healthy individuals. *J.Virol.* **77**, 6546-6550.
- Wang, C., Bogue, M. A., Roth, D. B., and Meek, K. (1997). Normal junctional diversification of immune receptors in p53-deficient mice. *J.Immunol.* **159**, 757-762.
- Weissmann, D. J., Ferry, J. A., Harris, N. L., Louis, D. N., Delmonico, F., and Spiro, I. (1995). Posttransplantation lymphoproliferative disorders in solid organ recipients are predominantly aggressive tumors of host origin. *Am.J.Clin.Pathol.* **103**, 748-755.
- Wiertz, E. J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T. R., Rapoport, T. A., and Ploegh, H. L. (1996). Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* **384**, 432-438.
- Yao, Q. Y., Ogan, P., Rowe, M., Wood, M., and Rickinson, A. B. (1989). Epstein-Barr virus-infected B cells persist in the circulation of acyclovir-treated virus carriers. *Int.J.Cancer* **43**, 67-71.
- Yao, Q. Y., Rickinson, A. B., and EPSTEIN, M. A. (1985). Oropharyngeal shedding of infectious Epstein-Barr virus in healthy virus-immune donors. A prospective study. *Chin Med.J.(Engl.)* **98**, 191-196.
- Yewdell, J. W., Norbury, C. C., and Bennink, J. R. (1999). Mechanisms of exogenous antigen presentation by MHC class I molecules in vitro and in vivo: implications for generating CD8+ T cell responses to infectious agents, tumors, transplants, and vaccines. *Adv.Immunol.* **73**, 1-77.
- Zalani, S., Holley-Guthrie, E., and Kenney, S. (1996). Epstein-Barr viral latency is disrupted by the immediate-early BRLF1 protein through a cell-specific mechanism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 9194-9199.
- Zhan, X., Brown, B., Slobod, K. S., and Hurwitz, J. L. (2003). Inhibition of ex vivo-expanded cytotoxic T-lymphocyte function by high-dose cyclosporine. *Transplantation* **76**, 739-740.
- Zloza, A., Sullivan, Y. B., Connick, E., Landay, A. L., and Al Harthi, L. (2003). CD8+ T cells that express CD4 on their surface (CD4dimCD8bright T cells) recognize an antigen-specific target, are detected in vivo, and can be productively infected by T-tropic HIV. *Blood* **102**, 2156-2164.

Zusammenfassung

Bei der Konzeption verbesserter Technologien zur Stimulation und Reaktivierung antigenspezifischer T-Zellen für diagnostische, therapeutische und präventive Anwendungen stellt das effiziente Einschleusen löslicher Proteine in den MHC Klasse I und II Prozessierungs- und Präsentationsweges eine große Herausforderung dar. In unserer Arbeitsgruppe wurde mit der Harnstoff-Adjuvierung am Modellantigen des Epstein-Barr Virus *immediate early* Proteins BZLF1 eine neuartige Strategie entwickelt, die diese Anforderungen erfüllt. Die Untersuchungen zeigten, dass Harnstoff-adjuviertes BZLF1 in Blutlymphozyten EBV-seropositiver Spender eine effiziente Reaktivierung BZLF1 spezifischer CD8⁺ und CD4⁺CD8⁺-positiver, zytotoxischer T-Zellen (CTL) und CD4⁺ T-Zellen (T-Helferzellen) induziert. Zudem war zu beobachten, dass die Reaktivierung CD3-positiver T-Zellen mit einer spezifischen Aktivierung von IFN- γ -positiven CD56⁺ NK- und CD3⁺CD56⁺ NKT-Zellen korrelierte. Blockierungsstudien mit neutralisierenden Antikörpern zeigten, dass die Stimulation der NK-Zellen durch IL-12 vermittelt wird. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind dagegen bislang nicht aufgeklärt.

Die im Rahmen der Dissertation durchgeföhrten Untersuchungen bestätigten und erweiterten frühere Befunde unserer Arbeitsgruppe, dass Harnstoff-adjuviertes BZLF1 mittels eines *cross-presentation* Weges von antigenpräsentierenden Zellen (APC) prozessiert wird. So weist Harnstoff-adjuviertes BZLF1 eine hohe Affinität zur Zellmembran auf, wird energieabhängig durch Endozytose an *Clathrin-coated pits* internalisiert und über einen nach wie vor unbekannten Mechanismus aus dem Endosom oder Endolysosom in das Zytosol freigesetzt wird. Dort wird es durch das Proteasom prozessiert bevor die generierten Peptide auf neu synthetisierte MHC Klasse I Moleküle geladen werden. Weiterführende Untersuchungen belegten, dass neben unreifen und reifen dendritischen Zellen in reduziertem Umfang auch Monozyten und B-Zellen zur *cross-presentation* von uBZLF1 befähigt sind. Weiterführende molekularbiologische und immunologische Untersuchungen unterstrichen die essentielle Rolle des Harnstoffs für die Translokation von BZLF1 in den endogenen Prozessierungsweg von APC. Dagegen zeigten Stimulationsexperimente mit Deletionsmutanten des BZLF1 Proteins, dass eine im C-terminalen Bereich von BZLF1 lokalisierte Arginin-reiche Domäne mit Homologien zu bekannten Proteintranslokationsdomänen für die Translokation von BZLF1

entbehrlich ist. Um zu überprüfen ob das Harnstoff-Verfahren zur Translokation von BZLF1 auf einzigartigen intrinsischen Eigenschaften dieses Proteins beruht oder aber auch auf andere Proteine übertragen werden kann, wurden weitere Stimulationsexperimente mit Harnstoff-adjuviertem Parvovirus B19 NS1 Protein durchgeführt. Auch in diesen Untersuchungen konnte eine spezifische Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden, was darauf hinweist dass die Harnstofftechnologie auch auf andere Proteine übertragen werden kann.

Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass neben 95% der HLA B8-positiven EBV-seropositiven Spender, welche CTL Reaktivitäten gegen ein bekanntes Epitop innerhalb von BZLF1 besitzen auch etwa 55% der HLA B8-negativen Personen eine signifikante Reaktivierung zytotoxischer T-Zellen nach Stimulation mit uBZLF1 aufweisen, was darauf hindeutete, dass in BZLF1 noch weitere, bislang unbekannte CTL Epitope enthalten sein müssen. Zur Identifizierung dieser Epitope und ihrer HLA Restriktion wurde unter Verwendung von uBZLF1 ein neues Verfahren entwickelt, das auf einer Kombination des HLA Subtraktionsverfahrens zur Identifizierung epitoptragender HLA Moleküle und der gängigen Peptid-Scanning Technologie zur Identifizierung der auf diesen HLA Molekülen präsentierten Epitope beruht. Mittels dieser Technologie konnte ein neues sehr effizientes HLA B18-restringiertes CTL Epitop identifiziert und feinkartiert werden.

Eine weitere Anwendung Harnstoff-adjuzierter Proteine besteht in dem effizienten Monitoring antigenspezifischer T-Zellen. So ergab eine prospektive Studie zur Analyse der Häufigkeit und Funktionalität EBV-spezifischer T-Zellen in einem Kollektiv von mehr als 100 immunsupprimierten Patienten nach Nierentransplantation und gesunden Probanden, dass Harnstoff-adjuvierte Proteine gegenüber anderen bislang verwendeten Stimulatorantigenen (Peptide, lösliche Proteine) mit der Möglichkeit einer gleichzeitigen Bestimmung verschiedener Subpopulationen Antigen-spezifischer T-Zellen und einer reduzierten Abhängigkeit von der HLA-Konstellation des Patienten entscheidende Vorteile aufweisen. Somit können mit Harnstoff-adjuvierten Proteinen jetzt auch Patienten T-Zell-diagnostisch betreut werden, die sich bislang aufgrund ihrer HLA-Konstellation einer derartigen Untersuchung entzogen.

In dieser Studie war innerhalb der ersten Wochen nach Immunsuppression ein starker und über mehrere Monate anhaltender Abfall BZLF1-spezifischer T-Zellen zu

beobachten. Die Zahl spezifisch reaktivierbarer T-Zellen rekonstituierte sich aber in den meisten Patienten wieder und überstieg bei einigen Patienten innerhalb eines Jahres nach Beginn der immunsuppressiven Behandlung sogar den Ausgangswert. Trotz der teilweise sehr geringen Frequenz EBV-spezifischer T-Zellen war nur in sehr wenigen Patienten eine transiente EBV Reaktivierung und kein Auftreten lymphoproliferativer Erkrankungen zu beobachten. Diese Ergebnisse weisen auf eine sehr gut eingestellte immunsuppressive Therapie in diesem Kollektiv nierentransplantierten Patienten hin.

Somit eröffnet die Technologie des Harnstoff-vermittelten Protein-Transfers neue Perspektiven für einen umfassenden diagnostischen Nachweis erregerspezifischer T-Zellen und ihrer Zielstrukturen und eröffnet zudem die Möglichkeit einer umfassenden *ex vivo* Expansion antigenspezifischer T-Zellen für therapeutische Anwendungen.

Publikationsliste

Veröffentlichungen:

1. **Barabas, S.**, Bauer, T., Weinberger, B., Püllmann, K., Lindner, J., Jilg, W., Wolf, H., and Deml, L.; Induction of MHC Class-I and -II restricted epitope presentation by Urea-treated Epstein-Barr Virus BZLF1 proteins. In preparation.
2. Lindner, J., **Barabas, S.**, Saar, K., Altmann, D., Pfister, A., Fleck, M., Deml, L., and Modrow, S.; CD4 T cell-responses against the VP1-unique region in individuals with recent and persistent parvovirus B19 infection. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2005 Sep; 52(7-8):356-61.
3. Deml, L., Aigner, M., Decker, J., Eckhardt, A., Schütz, C., Mittl, P., **Barabas, S.**, Denk, S., Knoll, G., Lehn, N. and Schneider-Brachert, W.; Characterization of the *Helicobacter pylori* Cysteine-Rich Protein A as a T-Helper Cell Type 1 Polarizing Agent. *Infect Immun.* 2005 Aug; 73(8): 4732–4742.

Vorträge:

1. **Barabas, S.**, Bauer, T., Weinberger, B., Püllmann, K., Lindner, J., Wagner, R., Jilg, W., Wolf, H. and Deml, L.; Induction of MHC class-I and -II restricted epitope presentation by urea-adjuvated soluble proteins: A novel technology for the simultaneous restimulation of various populations of antigen-specific T-cells. “11th International Symposium on Epstein Barr Virus and associated Diseases”, 20.-25.9.2004 Regensburg, Germany.
2. Lindner, J., **Barabas, S.**, Saar, K., Altmann, D., Schub, A., Deml, L., and Modrow, S.; CD4⁺ T cell-responses against the VP1-unique region in individuals with persistent or acute Parvovirus B19-infection. “International Parvovirus Meeting 2005”, 15.-16.7.2005 Leipzig, Germany.
3. **Barabas, S.**, Bauer, T., Lindner, J., Pfister, A., Weinberger, B., Jilg, W., Wolf, H., and Deml, L.; Urea-mediated protein transfer to antigen-presenting cells: A novel technology for the restimulation of different subpopulations of antigen-specific T-cells. “4th Workshop of the Society for Virology, Study group “Immunbiology of Viral Infection”, 28.-30.9.2005, Schloß Zeilitzheim, Germany.
4. Lindner, J., Schub, A., Obermeier, I., Saar, K., **Barabas, S.**, Altmann, D., Fleck, M., Deml, L., and Modrow, S.; Detection of CD4⁺ T-cell responses against the VP1-unique region in individuals with different courses of parvovirus B19 infection using transiently transfected B-cells for in vitro restimulation of peripheral blood cells.” Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie”, 15.-18.3.2006 München, Germany.
5. **Barabas, S.**, Bauer, T., Lindner, J., Gary, R., Altmann, D., Weinberger, B., Jilg, W., Wolf, H., and Deml, L.; Cross-presentation of soluble EBV BZLF1 protein mediated by urea-denadjuviation. “Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie”, 15.-18.3.2006 München, Germany.

6. Lindner, J., Schub, A., Obermeier, I., Saar, K., **Barabas, S.**, Altmann, D., Fleck, M., Deml, L., and Modrow, S.; Analysis of Parvovirus B19 Specific CD4⁺ T-Cell Responses Using B-cells Expressing Viral Genes as Antigen-specific Stimulators. "5th Workshop of the Study group Immunobiology of Viral Infections", 4.-6.10.2006, Schloß Zeilitzheim, Zeilitzheim.
7. **Barabas, S.**, Bauer, T., Lindner, P., Gary, R., Weinberger, B., Lindner, J., Püllmann, K., Jilg, W., Wolf, H., and Deml, L.; Urea-induced cross-presentation of soluble Epstein-Barr Virus (EBV) BZLF1; "5th Workshop of the Study group Immunobiology of Viral Infections", 4.-6.10.2006, Schloß Zeilitzheim, Zeilitzheim.

Posterpräsentationen:

1. **Barabas S.**, Bauer T., Weinberger B., Püllmann K., Lindner J., Wagner R., Jilg W., Wolf H., and Deml L.; Induction of MHC class –I and –II restricted epitope presentation by urea-treated Epstein-Barr Virus (EBV) BZLF1: A novel technology for the detection of protein-specific cytotoxic T-cells. "3rd European Conference on Viral Diseases", 14.-16.5.2004 Regensburg, Germany.
2. **Barabas S.**, Bauer T., Weinberger B., Püllmann K., Lindner J., Jilg W., Wolf H., and Deml L.; Induction of MHC class –I and –II restricted epitope presentation by urea-treated Epstein-Barr Virus (EBV) BZLF1: A novel technology for the detection of protein-specific cytotoxic T-cells. "12th International Congress of Immunology", 18.-23.7.2004 Montreal, Canada.
3. **Barabas S.**, Bauer T., Weinberger B., Püllmann K., Lindner J., Jilg W., Wolf H., and Deml L.; Induction of MHC class-I and –II restricted epitope presentation by urea-adjuvated soluble proteins: A novel technology for the simultaneous determination of various populations of antigen-specific T-cells. "11th International Symposium on Epstein Barr Virus and associated Diseases", 20.-25.9.2004 Regensburg, Germany.
4. **Barabas S.**, Jilg W., Wolf H., Deml L.; Dynamics of Epstein-Barr virus (EBV)-specific T-cell responses in immunocompromized patients after renal transplantation. "11th International Symposium on Epstein Barr Virus and associated Diseases", 20.-25.9.2004 Regensburg, Germany.
5. Lindner, J., **Barabas S.**, Saar K., Modrow S., and Deml L.; Detection of CD4+ T cell responses directed against the VP1-unique region in individuals with persistent or acute Parovirus B19-infection. "Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie", 16.-19.3.2005 Hannover, Germany.
6. **Barabas S.**, Bauer T., Weinberger B., Lindner J., Wagner R., Jilg W., Wolf H., and Deml L.; Development of a novel technology for the restimulation of protein-specific T-cells based on cross-presentation. "Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie", 16.-19.3.2005 Hannover.

7. **Barabas S.**, Lindner J., Krüger B., Krämer B., Jilg W., Wolf H., and Deml L.; Dynamics of Epstein-Barr virus (EBV)-specific T-cell responses in immunocompromized patients after renal transplantation. "Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie", 16.-19.3.2005 Hannover, Germany.
8. Lindner J., **Barabas S.**, Saar K., Modrow S., and Deml L.; Detection of VP1-unique region specific CD4+ T-cell responses in individuals with persistent and acute Parvovirus B19-infection using transiently transfected B-cells for specific restimulation. "Cellular Therapy 2005: 3rd International Symposium on the clinical use of cellular products", 17.-18.3.2005 Regensburg, Germany.
9. **Barabas S.**, Bauer T., Weinberger B., Lindner J., Jilg W., Wolf H., and Deml L.; Induction of MHC class-I and -II restricted epitope presentation by denatured EBV BZLF1 protein: A novel technology for the simultaneous restimulation of different populations of antigen-specific T-cells. "Cellular Therapy 2005: 3rd International Symposium on the clinical use of cellular products", 17.-18.3.2005 Regensburg, Germany.
10. **Barabas, S.**, Lindner, J., Bauer, T., Altmann, D., Weinberger, B., Jilg, H., Wolf, H., and Deml, L.; Simultaneous detection of different populations of EBV-specific T-cells based on cross-presentation of soluble proteins. "30th International Herpesvirus Workshop", 30.7. – 5.8.2005 Turku, Finland.
11. **Barabas, S.**, Lindner, J., Bauer, T., Altmann, D., Weinberger, B., Jilg, W., Wolf, H., and Deml, L.; Restimulation of multiple subpopulations of antigen-specific T cells by modified soluble proteins: implications for development of improved diagnostical tools. "36 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie", 21.-24.9.2005, Kiel, Germany.
12. **Barabas, S.**, Bauer, T., Gary, R., Lindner, J., Lindner, P., Weinberger, B., Püllmann, K., Jilg, W., Wolf, H., and Deml, L.; Urea-mediated antigen cross-presentation of soluble Epstein-Barr Virus BZLF1. "Cellular Therapy 2007: 4rd International Symposium on the clinical use of cellular products", 22.-23.3.2007 Regensburg, Germany.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Hans Wolf für die Möglichkeit, hier am Institut für Medizinische Mikrobiologie & Hygiene die Diplomarbeit durchführen zu können und die finanzielle Unterstützung bei nationalen und internationalen Kongressteilnahmen.

Herrn Prof. Dr. Herbert Tschochner danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens und die Vertretung der vorliegenden Arbeit vor der Biologischen Fakultät.

Meinem Betreuer Dr. Ludwig Deml danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und seine stets große Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Regina Gary, Juha Lindner, Dominik Altman und nicht zuletzt Andreas Pfister danke ich für die gute Zusammenarbeit im Labor.

Der Diagnostik-Crew um Barbara Hottenträger danke ich für viele nützliche Tips und die Durchführung von unzählbaren serologischen Tests.

Den Ärzten Dr. Annelie Plentz, Dr. Antje Knöll, Dr. Stephan Böhm und Dr. Sven Schimanski danke ich für ihre stete Bereitschaft den an dieser Studie beteiligten gesunden Spendern Blut abzunehmen.

Danken möchte ich auch allen nicht namentlich genannten Kolleginnen und Kollegen des Instituts für ihre Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima. Viele von ihnen sind mir zu Freunden geworden.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne die ich niemals bis hierhin gekommen wäre und natürlich Birgit, die mich in allen möglichen und unmöglichen Stresssituationen und der Zeit des Zusammenschreibens der Doktorarbeit ausgehalten und unterstützt haben.