

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Kinderklinik und Kinderpoliklinik der Technischen Universität München

(Direktor: Prof. Dr. Stefan Burdach)

Einfluss der Epstein-Barr-Virus
Heterogenität auf die Immunerkennung
durch
CD4+ und CD8+ T-Zellen

Ana Alicia Cirac Monteagudo

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

Doktors der Medizinischen Wissenschaft (Dr. med. sci.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Prof. Dr. Angelika Krackhardt

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Uta Behrends
2. Prof. Dr. Dirk H. Busch

Die Dissertation wurde am 06.06.2019 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 06.11.2019 angenommen.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

Cirac A, Stützele S, Dieckmeyer M, Adhikary D, Moosmann A, Körber N, Bauer T, Witter K, Delecluse HJ, Behrends U und Mautner J. Epstein-Barr virus strain heterogeneity impairs human T-cell immunity. *Cancer Immunol Immunother.* 2018; 67(4):663-674

Cirac A, Behrends U und Mautner J. Clinical implications of Epstein-Barr virus strain diversity. *J Immunological Sci.* 2018; 2(3): 51-55

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung	13
1.1 Entdeckung und Geschichte	13
1.2 Epidemiologie	13
1.3 Klassifikation und Aufbau	13
1.4 Genom und Sequenz	14
1.5 Primäre Infektion.....	17
1.6 Infektion der Epithel- und B-Zellen und Zelltropismus	17
1.7 Assoziierte Erkrankungen und geographische Häufungen	18
1.8 Die antivirale Immunantwort	19
1.8.1 Das angeborene Immunsystem.....	19
1.8.2 Die antivirale CD4+ T-Zellantwort	20
1.8.3 Die antivirale CD8+ T-Zellantwort	21
1.8.4 Die antivirale humorale Immunantwort.....	21
1.8.5 Einfluss von Polymorphismen der viralen Antigene auf die zelluläre Immunerkenung	22
1.9 Diagnostik.....	23
1.10 Therapie EBV-assoziiierter Erkrankungen	24
1.10.1 Adoptive T-Zelltherapie	24
1.10.2 Potenzielle klinische Auswirkungen der Diversität der EBV-Stämme	25
1.11 Fragestellung der Arbeit.....	26
2 Material	27
2.1 Antikörper.....	27

2.2	Affinitätschromatographiematrix zur Aufreinigung rekombinanter Proteine	28
2.3	DNA-modifizierende Enzyme	28
2.4	Kits.....	29
2.5	Chemikalien und Lösungen.....	29
2.6	Allgemeine Medien, Puffer und Lösungen	32
2.7	Zellkulturmedien	36
2.8	Verbrauchsmaterialien	37
2.9	Geräte.....	38
2.10	Software	39
2.11	Zelllinien	39
2.12	Bakterienstämme	40
2.13	Plasmide	41
3	Methoden	44
3.1	Sequenzanalyse	44
3.2	Mikrobiologische Methoden	44
3.2.1	Kultivierungsverfahren	44
3.3	Molekularbiologische Methoden.....	44
3.3.1	Prinzip der Klonierung von Genen.....	44
3.3.2	Isolierung von DNA aus EBV-infizierten LCL.....	45
3.3.3	Präparation von RNA aus EBV-infizierten LCL.....	45
3.3.4	Reverse Transkription der RNA.....	46
3.3.5	Elektrophoretische Auftrennung von DNA.....	47
3.3.6	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	48
3.3.7	Verdau der DNA mit Restriktionsendonukleasen	48
3.3.8	Synthese glatter Enden nach dem Restriktionsverdau.....	48
3.3.9	Ligation.....	48
3.3.10	Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung von DNA	49
3.3.11	Herstellung elektrokompenter Bakterien.....	49
3.3.12	Transformation elektrokompenter Bakterien.....	50

3.3.13 Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien	50
3.3.14 Präparation großer Mengen Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien	51
3.4 Zellkulturbiologische Methoden	52
3.4.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen	52
3.4.2 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen aus Spenderblut mittels Pancoll-Dichtegradienten-Zentrifugation	53
3.4.3 Bestimmung der Zellzahl	53
3.4.4 Etablierung von EBV-transformierten LCL aus PBMC	53
3.4.5 Kultivierung von LCL und Burkitt-Lymphom-Zelllinien	54
3.4.6 Generierung LCL-spezifischer T-Zelllinien	54
3.4.7 Kultivierung von HEK293T-Zellen	55
3.4.8 Einfrieren und Auftauen von Zellen	55
3.4.9 Herstellung von Viruskonzentrat	55
3.4.10 Transfektion antigenpräsentierender Zellen mittels Elektroporation	56
3.4.11 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	56
3.4.12 Bestimmung der T-Zell-Zytotoxizität	57
3.4.13 Durchflusszytometrie	57
3.4.14 Transfektion der HEK293T-Zellen mit Polyethylenimin und Proteinpräparation	58
3.5 Proteinbiochemische Methoden	59
3.5.1 Herstellung von Zell-Extrakten	59
3.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot	59
3.5.3 Immunologischer Nachweis der transferierten Proteine	60
3.6 Statistische Auswertung	61
4 Ergebnisse	62
4.1 Einfluss der EBV-Sequenzunterschiede auf die T-Zell-Erkennung	62
4.1.1 Proteine der Latenzphase variieren in größerem Maße als Proteine des lytischen Zyklus	62
4.1.2 Sequenzunterschiede in T-Zell-Epitopen	63

4.1.3	Einfluss von Aminosäureaustauschen in EBV-Epitopen auf die Erkennung durch CD8+ T-Zellen	74
4.1.4	Einfluss von Aminosäureaustauschen in T-Zellepitopen auf die Erkennung durch CD4+ T-Zellen	84
4.2	Kreuzreaktivität von B95.8-LCL- und M81-LCL-stimulierten T-Zelllinien ..	89
4.2.1	B95.8-LCL- versus M81-LCL- stimulierte T-Zelllinien wiesen keine phänotypischen Unterschiede auf.	89
4.2.2	B95.8-LCL- und M81-LCL-stimulierte T-Zelllinien sind kreuzreaktiv	91
4.2.3	Acyclovir-Vorbehandlung der Stimulatorzellen kann die Kreuzreaktivität vermindern	91
5	Diskussion	94
5.1	Sequenzunterschiede zwischen den untersuchten EBV-Stämmen	94
5.2	Einfluss der Sequenzunterschiede auf die T-Zell-Erkennung	95
5.2.1	Aminosäureaustausche in Epitopen können die CD8+ T-Zellerkennung beeinflussen	96
5.2.2	Aminosäureaustausche in Epitopen und/oder flankierenden Regionen haben Einfluss auf die CD4+ T-Zellerkennung	97
5.2.3	Die Erkennung verschiedener Epitopvarianten wird vermutlich durch den EBV-Stamm beeinflusst, mit dem der T-Zellspender infiziert ist	98
5.3	LCL-stimulierte T-Zelllinien erkennen Zielzellen, die mit unterschiedlichen Virusstämmen infiziert sind	99
5.4	Klinische Relevanz der variablen Erkennung von polymorphen T-Zellepitopen	101
5.5	Ausblick	103
6	Zusammenfassung	105
7	Summary	106
8	Literaturverzeichnis	107
	Danksagung	118

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des Epstein-Barr-Virus	14
Abbildung 2: Vergleich der M81-Proteinsequenzen mit anderen Virusstämmen.	65
Abbildung 3: Polymorphismen in T-Zellepitopen und flankierenden Regionen.	66
Abbildung 4: Erkennung der M81- und AG876-HPV-Epitopvarianten durch B95.8-epitopspezifische CD8+ T-Zellen.....	76
Abbildung 5: Erkennung von Zielzellen durch EBNA1-HPV-spezifische CD8+ T- Zellen nach endogener Expression verschiedener EBNA1- Varianten.....	77
Abbildung 6: Erkennung der M81- und AG876-VQT-Epitopvarianten durch B95.8-epitopspezifische CD8+ T-Zellen.....	78
Abbildung 7: Erkennung der M81-RAK-Epitopvarianten durch B95.8- epitopspezifische CD8+ T-Zellen.	79
Abbildung 8: Erkennung von Zielzellen durch BZLF1-VQT- und BZLF1-RAK- spezifische CD8+ T-Zellen nach endogener Expression verschiedener EBNA1-Varianten.....	80
Abbildung 9: Erkennung der M81-IED-Epitopvarianten durch B95.8- epitopspezifische CD8+ T-Zellen.	82
Abbildung 10: T-Zellerkennung der LMP2A-CLG-Epitopvarianten aus B95.8 und M81 nach exogener Beladung von Zielzellen.....	82
Abbildung 11: Erkennung der M81- IED, -CLG- und -LLW--Epitopvarianten durch B95.8-epitopspezifische CD4+ T-Zellen.....	83
Abbildung 12: Erkennung der M81- und AG876-IAE-Epitopvarianten durch B95.8-epitopspezifische CD4+ T-Zellen.....	85
Abbildung 13: Erkennung der M81-AIP-Epitopvarianten durch B95.8- epitopspezifische CD4+ T-Zellen.	85
Abbildung 14: Erkennung der M81- und AG876-KTS-Epitopvarianten durch B95.8-epitopspezifische CD4+ T-Zellen.....	86
Abbildung 15: Erkennung der M81- und AG876-ENP-Epitopvarianten durch B95.8-epitopspezifische CD4+ T-Zellen.....	86
Abbildung 16: Erkennung von Zielzellen durch EBNA3C-ENP- (A) und EBNA3C- SDD (B) spezifischen CD4+ T-Zellen nach exogener Beladung verschiedener EBNA3C-Varianten.....	88
Abbildung 17: Lytische Aktivität von LCL-stimulierten T-Zelllinien gegenüber autologen Zielzellen, die mit einem anderen Virusstamm infiziert worden waren.....	93

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ungekoppelte Immunglobulin G-Primärantikörper.....	27
Tabelle 2: Gekoppelte Immunglobulin G-Primärantikörper.....	27
Tabelle 3: Gekoppelte Immunglobulin G-Sekundärantikörper.....	28
Tabelle 4: Kommerzielle Kits.....	29
Tabelle 5: Chemikalien und Lösungen.....	29
Tabelle 6: Allgemeine Medien, Puffer und Lösungen.....	32
Tabelle 7: Zellkulturmedien.....	36
Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien.....	37
Tabelle 9: Geräte.....	38
Tabelle 10: HLA-Genotyp der verwendeten Zelllinien.....	39
Tabelle 11: Spezifität und HLA-Restriktion der verwendeten T-Zellklone.....	40
Tabelle 12: Verwendete, im Labor bereits vorhandene Plasmide.....	41
Tabelle 13: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Plasmide.....	42
Tabelle 14: Reaktionsansatz zur Denaturierung von mRNA und Bindung der dT- Primer.....	47
Tabelle 15: Reaktionsansatz zur Synthese von cDNA aus mRNA mittels SuperScript II Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen).....	47
Tabelle 16: Zusammensetzung des JETSTAR Plasmid Purification Kit-Puffers.....	51
Tabelle 17: Western-Blot-Entwicklungslösung.....	60
Tabelle 18: Verdünnung von Western-Blot-IgG-Antikörpern.....	60
Tabelle 19: Bezeichnung der Signifikanzniveaus.....	61
Tabelle 20: CD8+ T-Zellepitope einschließlich flankierender Regionen, die in mindestens einem der Virusstämme B95.8, AG876 oder M81 einen Polymorphismus aufwiesen.....	67
Tabelle 21: CD4+ T-Zellepitope einschließlich flankierender Regionen, die in mindestens einem der Virusstämme B95.8, AG876 oder M81 einen Sequenzunterschied aufwiesen.....	71
Tabelle 22: Getestete polymorphe CD8+ T-Zellepitope.....	75
Tabelle 23: Getestete polymorphe CD4+ T-Zell-Epitope.....	84
Tabelle 24: Phänotypische Profile der etablierten T-Zelllinien.....	90

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
$\gamma\delta$ -TCR	Gamma delta T-Zell-Rezeptor
Ω	Ohm – elektrischer Widerstand
μ F	Mikrofarad – elektrische Kapazität
μ l	Mikroliter
μ g	Mikrogramm
μ M	Mikrometer
AG876	Epstein-Barr-Virus-Stamm AG876
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
APC	Antigenpräsentierende Zellen
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Akt	Proteinkinase B
B95.8	Epstein-Barr-Virus-Stamm B95.8
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
BZLF1	<i>BamHI Z Epstein-Barr virus replication activator</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CIP	<i>Calf intestinal phosphatase</i>
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DEPC H ₂ O	Diethyldicarbonat-Wasser
DGPI	Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DOC	Deoxycholat
DZIF	Deutsches Zentrum für Infektionsmedizin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EBNA	Epstein-Barr-Virus nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAP1	Endoplasmatisches Reticulum-Aminopeptidase 1

FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence-activated cell scanning</i>)
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
x g	Vielfaches der Fallbeschleunigung g
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GVHD	<i>Graft-versus-host disease</i>
h	<i>hour</i> , Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonsäure
HEK293T	<i>Human embryonic kidney</i> -Zelllinie
His ₆	<i>Hexahistidin-Tag</i>
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HMGU	Helmholtz Zentrum München
IFN	Interferon
IITK	<i>Interleukin-2-inducible T-cell kinase</i>
IL	Interleukin
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IM	Infektiöse Mononukleose
ITK	<i>Interleukin-2-inducible T-cell kinase</i>
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kV	Kilovolt
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
LMP	Latentes Membranprotein
M	Molar
M81	Epstein-Barr-Virus Stamm M81
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minute(n)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
mg	Miligramm
ml	Mililiter
mM	Millimolar
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid

NaOH	Natriumhydroxid
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
ng	Nanogramm
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NKT-Zelle	Natürliche Killer-T-Zelle
NP40	NP40 Lyse-Puffer
NPC	Nasopharynxkarzinom
ORF	<i>Open reading frame</i>
oriP	<i>Origin of plasmid replication</i>
PAA	Polyacrylamid
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
pCMV	CMV-Promotor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimin
PI	Propidiumjodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PHA	Phytohämagglutinin
PTLD	<i>Post-transplant lymphoproliferative disorder</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIG-I	<i>Retinoic acid inducible gene I</i>
RIPA	Radioimmunopräzipitations-Assay
RNA	Ribonukleinsäure
Ras	<i>Rat sarcoma</i> , onkogenes G-Protein
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI 1640	Zellkulturmedium aus <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
S2-Labor	Labor der Sicherheitsstufe 2
SH2D1A	<i>SH2 domain-containing protein 1A</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOB	<i>Super optimal broth</i>
SV40	<i>Simian (vacuolating) virus 40</i>
TAP	Antigenpeptidtransporter
TEMED	Tetramethylethylenediamin

TUM	Technische Universität München
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TR	<i>Terminal repeats</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>Units</i>
VCA	Virales Kapsid-Antigen
WB	Western-Blot
WI-38	Fibroblastenzelllinie aus der Lunge eines weiblichen Fötus
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>

1 Einleitung

1.1 Entdeckung und Geschichte

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) oder Humane Herpes-Virus Typ 4 (HHV-4) ist ein ubiquitär vorkommendes, humanpathogenes Gammaherpesvirus, welches mit der Entstehung verschiedener Lymphome und Karzinome in kausaler Verbindung steht. Die Entdeckung des EBV begann 1957, als der irische Chirurg Denis Burkitt ein in Ostafrika gehäuft auftretendes Lymphom charakterisierte (Burkitt 1958). Wenige Jahre später wurde das onkogene Virus mittels Elektronenmikroskopie in Zellkulturen des nach ihm benannten Burkitt-Lymphoms nachgewiesen (Epstein et al. 1965). EBV ist das erste Virus, welches mit diversen Tumoren des Menschen ursächlich in Verbindung gebracht wurde.

1.2 Epidemiologie

Schätzungen zufolge sind weltweit über 90% der Erwachsenen mit EBV infiziert. Die Primärinfektion erfolgt meist im Kleinkindalter. In afrikanischen Regionen, in denen das Burkitt Lymphom endemisch ist, sind bereits 50% der Kinder vor Erreichen des zweiten Lebensjahres mit EBV infiziert. Im Gegensatz dazu sind in Industrieländern 50% der Jugendlichen und jungen Erwachsenen für EBV noch seronegativ. Während die Erstinfektion im Kleinkindalter meist asymptomatisch verläuft, erkrankt etwa ein Viertel der im Jugend- oder Erwachsenenalter infizierten Personen an Infektiöser Mononukleose (IM) (Longnecker R 2013).

1.3 Klassifikation und Aufbau

Wie andere Herpesviren hat sich EBV durch die Co-Evolution mit dem Menschen sowie durch den Austausch von genetischem Material zwischen verschiedenen Stämmen diversifiziert (Ba Abdullah et al. 2017b).

Die Struktur von EBV (Abbildung 1) ähnelt denen anderer Herpesviren: ein lineares Genom in Form einer doppelsträngigen DNA befindet sich in einem Nukleokapsid, welches von einem Proteintegument sowie einer äußeren glykoprotein-haltigen Membran umhüllt wird (Longnecker R 2013; Yamaguchi, Hinuma, and Grace 1967).

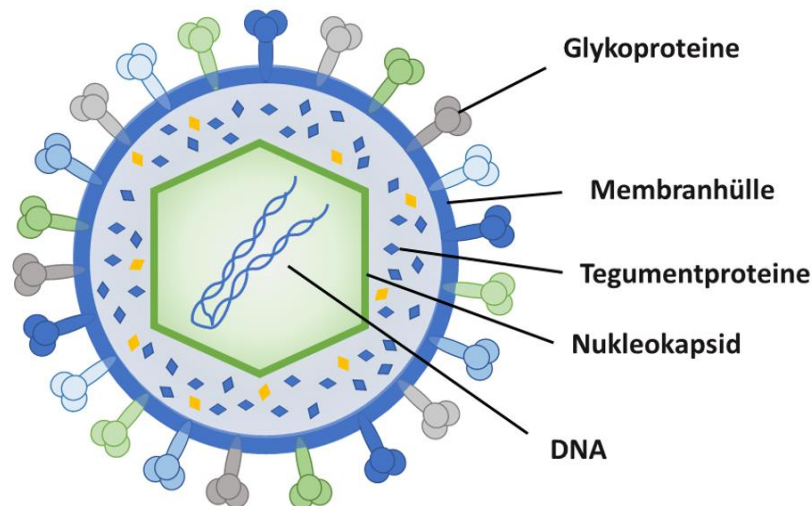


Abbildung 1: Struktur des Epstein-Barr-Virus¹

1.4 Genom und Sequenz

Als EBV-Referenzsequenz gilt die des Laborstammes B95.8 (GenBank: V01555.2), dessen Genom bereits 1984 komplett sequenziert wurde (Baer et al. 1984). Die virale DNA besteht aus etwa 172.000 Basenpaaren, darunter endständige repetitive Sequenzen (*terminal repeats*, TR) und offene Leserahmen (*open reading frames*, ORF), die für mehr als 80 Proteine codieren. Hochrepetitive Sequenzen innerhalb offener Leserahmen sind im Gegensatz zu den variablen TR während der Replikation relativ stabil, unterscheiden sich jedoch innerhalb verschiedener EBV-Stämme. Daher können neben Genomsequenzierungen auch Unterschiede in

¹ adaptiert aus Longnecker 2013

Proteingrößen zur Identifizierung verschiedener Virusisolate dienen (Longnecker R 2013).

Während das Genom im Viruspartikel in linearer Form vorliegt (Pritchett, Hayward, and Kieff 1975), befindet sich die DNA in einer infizierten Zelle als zirkuläres Episom im Zellkern, oder ist in sehr seltenen Fällen in das Genom der Wirtszelle integriert (Adams and Lindahl 1975a, 1975b).

In sich teilenden, latent infizierten Zellen wird das zirkuläre EBV-Genom selbständig repliziert (Lindahl et al. 1976; Nonoyama and Pagano 1972). Eine Schlüsselrolle spielt hierbei eine 1.7 kb große Region des EBV-Genoms namens *origin of plasmid replication (oriP)*, die die Replikation in menschlichen Zellen ermöglicht (Yates et al. 1984), solange das latente EBV-Kernantigen 1 (EBNA1) exprimiert ist (Lupton and Levine 1985; Yates, Warren, and Sugden 1985; Yates, Camiolo, and Bashaw 2000). Die Transkription der Latenzgene in latent infizierten Lymphozyten wird durch einen der zwei Promotoren (Cp oder Wp) am linken Ende des viralen Genoms initiiert (Woisetschlaeger et al. 1990). In der sogenannten Latenzform 1, in der lediglich EBNA1 exprimiert wird, übernimmt ein EBNA1-spezifischer Promotor (Qp) die Funktion der inaktiven Promotoren Cp und Wp. Dadurch wird sichergestellt, dass EBNA1 exprimiert und das virale Episom während der Zellteilung repliziert wird (Longnecker R 2013).

Das EBV-Genom codiert für mehr als 80 Proteine, wobei nicht alle näher charakterisiert und in ihrer Funktion oftmals noch unverstanden sind (Young LS 2007). Die viralen Genprodukte werden in latente Kernantigene (EBNA1, -2, -3A, -3B, -3C und EBNA-LP), latente Membranproteine (LMP1, LMP2A und LMP2B) und Proteine der lytischen Phase unterteilt. Die Nomenklatur der lytischen Gene ist historisch bedingt: Die nach *Bam*HI-Restriktionsverdau („**B**“) des EBV-Genoms entstandenen DNA-Fragmente wurden der Größe nach sortiert (absteigend von **A** bis **Z**), die enthaltenen Leserahmen nach der Leserichtung (*Right/Left*) unterteilt

und die Anzahl der Leserahmen (*reading frame* „F“) auf einem Fragment mit Zahlen nummeriert. So bezeichnet beispielsweise BHLF1 den ersten linksgerichteten Leserahmen auf dem *Bam*HI Fragment H. Die Proteine des lytischen Zyklus regulieren die Replikation des Virusgenoms und den Zusammenbau der Viruspartikel, sie bilden die Virushülle und inhibieren die Immunerkennung lytisch infizierter Zellen (Longnecker R 2013).

Die Latenz-Proteine erfüllen wichtige Funktionen in der Aufrechterhaltung der latenten EBV-Infektion. So ist EBNA1 an der Replikation des viralen Episoms beteiligt, EBNA2 und die EBNA3-Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Transformation der B-Zellen, während EBNA-LP dafür nicht essentiell ist (Yates, Warren, and Sugden 1985). Zudem ist das Transmembranprotein LMP1, welches wie ein konstitutiv aktiver CD40-Rezeptor wirkt, an der B-Zelltransformation beteiligt. Seine onkogene Wirkung wird zudem durch die Hochregulierung des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 verstärkt (Rowe et al. 1994). Von dem ebenfalls antiapoptotisch wirkenden LMP2 werden zwei Isoformen exprimiert: LMP2A und LMP2B. Während LMP2A als Homolog des B-Zellrezeptors zu einer B-Zellaktivierung über den Ras/ PI3K/ Akt-Signalweg beiträgt (Caldwell et al. 1998; Portis and Longnecker 2004), ist LMP2B an der Induktion des lytischen Zyklus beteiligt (Rechsteiner et al. 2008).

Aufgrund von Sequenzunterschieden in den EBNA2- und EBNA3-Genen werden EBV-Stämme in Typ 1 und Typ 2 unterteilt. Während Typ 1-Stämme weltweit vorkommen, dominieren Typ 2-Stämme vor allem in Afrika südlich der Sahara. Als in der Forschung etablierte Referenzstämme gelten B95.8 als Typ 1-, sowie AG876 als Typ 2-Stamm (Longnecker R 2013; Farrell 2015).

Kürzlich durchgeführte Sequenzanalysen zahlreicher EBV-Isolate verschiedener Gewebeproben und Ursprungsregionen ergaben, dass diese dichotome Klassifikation die Heterogenität verschiedener Stämme nicht ausreichend abdeckt

(Farrell 2015; Palser et al. 2015; Kim, Kang, and Lee 2006; Midgley et al. 2000; Yao et al. 1996). Eine weitere EBV-Gruppe bilden neuen Erkenntnissen zufolge asiatische Isolate, so zum Beispiel der aus dem Nasopharynxkarzinom (NPC) eines chinesischen Patienten isolierte Stamm M81 (Tsai et al. 2013; Feederle et al. 2015).

Was die Virusheterogenität bedingt, ist noch ungeklärt. Sowohl ethnische als auch immunologische Faktoren, wie die geographische Verbreitung bestimmter HLA-Haplotypen, könnten zur Selektion verschiedener Stämme beigetragen haben (Farrell 2015; Burrows et al. 2004; Midgley, Bell, McGeoch, et al. 2003; Midgley, Bell, Yao, et al. 2003; Lin et al. 2005; Lin et al. 2004; Nagamine et al. 2007; Tang et al. 2008; Duraiswamy et al. 2003).

1.5 Primäre Infektion

Die Verbreitung von EBV erfolgt in der Regel oral über infektiösen Speichel, selten auch durch Blut oder Transplantate. Als Wirtszellen der viralen Replikation kommen sowohl orale Epithelzellen als auch B-Zellen in der Schleimhaut in Frage. Die Inkubationszeit wird mit ca. 10-50 Tagen angegeben und in den meisten Fällen erfolgt die Infektion unbemerkt. Das Überleben des Wirtes sichert zusammen mit der Etablierung einer lebenslangen latenten, reaktivierbaren Infektion die Persistenz im Wirt und die Weitergabe des Virus innerhalb der Population (Tangye, Palendira, and Edwards 2017).

1.6 Infektion der Epithel- und B-Zellen und Zelltropismus

EBV infiziert sowohl naso- und oropharyngeale Epithel- als auch B-Zellen. Latent infizierte Gedächtnis-B-Zellen sichern als Virusreservoir die lebenslange Persistenz im infizierten Wirt. Im Gegensatz dazu dient die lytische Infektion von Epithelzellen der Produktion von infektiösen Viruspartikeln, die über den Speichel auf neue Wirte übertragen werden (Shannon-Lowe and Rowe 2014). Die Infektion

von B- und Epithelzellen erfolgt auf unterschiedlichen Wegen (Miller and Hutt-Fletcher 1992; Mohl et al. 2016). EBV nutzt das Oberflächenmolekül CD21 auf B-Zellen und Integrine auf Epithelzellen zur Zielzellbindung und -infektion. In welchem Maße verschiedene Virusstämme Unterschiede im Zelltropismus aufweisen, ist noch weitgehend unklar. 2013 beobachteten Tsai et al. erstmals einen verstärkten Epitheliotropismus bei dem neu charakterisierten EBV Stamm M81, der aus dem NPC eines chinesischen Patienten isoliert worden war. Zudem weisen B-Zellen, die mit M81 infiziert sind, ein ungewöhnlich hohes Maß an spontaner lytischer Replikation auf.

In B-Zellen kann EBV verschiedene Formen von Latenz etablieren, die durch die Expression unterschiedlicher Sets an Latenz-Proteinen gekennzeichnet sind. Durch die fehlende Expression von viralen Proteinen in Latenztyp 0 entgehen diese Zellen der Immunkontrolle und –elimination und ermöglichen die lebenslange Viruspersistenz im Wirt. In gesunden Trägern wird EBV ausschließlich in dieser Zellpopulation im Blut gefunden. Diese langlebigen B-Gedächtniszellen zirkulieren zwischen Blut und oropharyngealem lymphatischem Gewebe, sodass eine virale Reaktivierung an den Grenzflächen zur Produktion infektiöser Viren führen kann, die von da aus in den Speichel gelangen (Tangye, Palendira, and Edwards 2017).

1.7 Assoziierte Erkrankungen und geographische Häufungen

Bei einer primären Infektion in der Adoleszenz oder im Erwachsenenalter kann es zu einer IM kommen. Die z. T. schwere Symptomatik umfasst u. a. die klassische Trias von Fieber, Tonsillopharyngitis und Lymphknotenschwellungen sowie die Lymphozytose mit atypischen Lymphozyten im Differenzialblutbild. Darüber hinaus ist EBV mit der Pathogenese einiger lymphatischer und epithelialer Neoplasien assoziiert wie z. B. lymphoproliferativen Erkrankungen nach Organ- oder

Stammzelltransplantationen, Burkitt- und Hodgkin-Lymphomen, T- und NK-Zell-lymphomen, NPC und Magenkarzinomen (Longnecker R 2013). Trotz der weltweiten Prävalenz des Virus gibt es große Unterschiede hinsichtlich der Inzidenz dieser Erkrankungen in verschiedenen geographischen Regionen (Young and Rickinson 2004). Ursächlich kommen dafür, neben geographischen Besonderheiten wie z. B. Ernährung, Umwelt und genetischen Faktoren, möglicherweise auch regional vorkommende Stämme unterschiedlicher Pathogenität und Tropismus in Betracht (Chang et al. 2009).

1.8 Die antivirale Immunantwort

Die folgenden Informationen zur EBV-spezifischen Immunantwort (Abschnitte 3.11.1 bis 3.11.4) stammt größtenteils aus Übersichtsarbeiten (Tangye, Palendira, and Edwards 2017) (Longnecker R 2013).

1.8.1 Das angeborene Immunsystem

Die Rolle des angeborenen Immunsystems während der primären EBV-Infektion wird kontrovers diskutiert. NK- und NKT-Zellen scheinen eine Rolle in der frühen Phase der Infektionsabwehr zu spielen und ein Ausbleiben dieser Antwort könnte die Entwicklung einer IM möglicherweise begünstigen. So berichten z.B. Longnecker et al. über eine Korrelation hoher Zahlen an NK-Zellen während einer IM mit einer geringeren Viruslast im Blut, allerdings sind die Evidenzen zur Rolle der NK-Zellen im Rahmen einer IM kontrovers (Longnecker R 2013).

Klinische Hinweise für die Bedeutung der NKT-Zellen im Rahmen der frühen Immunantwort gegen EBV ergaben sich daraus, dass Patienten mit Mutationen in den Proteinen *SH2 domain-containing protein 1A* (SH2D1A), *X-linked inhibitor of*

apoptosis protein (XIAP), *interleukin-2-inducible T-cell kinase* (ITK) oder CD27 einen Mangel an NKT-Zellen aufwiesen und die EBV-Infektion in diesem Kontext häufig einen schweren Verlauf nimmt (Tangye, Palendira, and Edwards 2017).

Des Weiteren beinhaltet die angeborene Immunantwort eine Ausschüttung von Zytokinen. In IM-Patienten sind im Vergleich zu gesunden Kontrollen NK-Zellen-regulierende Zytokine (Interferone $-\alpha$, $-\beta$, $-\gamma$ und Interleukin-12 (IL-12)) signifikant erhöht. So werden beispielsweise Nukleinsäuren aus Herpesviren durch *toll-like*-Rezeptoren (TLRs) und *retinoic acid inducible gene I* (RIG-I) detektiert, woraufhin eine Immunkaskade zur Freisetzung von IFN- α und IFN- β aktiviert wird. Ebenso reagieren Monozyten bei Kontakt mit EBV-DNA oder Viruspartikeln mit der Produktion von Interleukin-8 (IL-8). Zudem beeinflusst die Präsenz von EBV die TLR-Dichte in B-Zellen (Longnecker R 2013).

1.8.2 Die antivirale CD4+ T-Zellantwort

EBV-spezifische CD4+ T-Zellen können bis zu 1% aller zirkulierenden CD4+ T-Zellen in IM-Patienten ausmachen, wobei diese Population nach Ablauf der Infektion auf ca. 0,1% zurückgeht (Amyes et al. 2003; Long et al. 2013). Um Blut von gesunden Virusträgern ist die Population der EBV-spezifischen CD4+ T-Zellen um ein zehnfaches geringer als die der CD8+ T-Zellen. CD4+ T-Zell-Antworten richten sich gegen ein breites Spektrum an viralen Antigenen, wobei virale Struktur- und im geringeren Maße Latenzantigene die immundominanten Zielstrukturen darstellen (Longnecker R 2013; Adhikary et al. 2007). Diese Zellen sezernieren nicht nur Zytokine, sondern können auch zytotoxisch wirken (Adhikary et al. 2006). Trotz der geringen Anzahl an EBV-spezifischen CD4+ T-Zellen scheinen diese eine wichtige Rolle in der Kontrolle der EBV-Infektion zu spielen (Amyes et al. 2003; Long et al. 2013). Dafür sprechen die hohe Viruslast sowie das Auftreten von EBV-assoziierten Lymphomen in Humane Immundefizienz-Virus/ *acquired*

immunodeficiency syndrome HIV/AIDS Patienten mit niedrigen CD4+ T-Zellzahlen (Petrara et al. 2013; Cohen 2015b). Des Weiteren fand sich eine verbesserte Ansprechrate bei Patienten mit *post-transplant lymphoproliferative disorder* (PTLD) verbessert, wenn die adoptiv transferierten EBV-spezifischen T-Zellpräparate CD4+ T-Zellen enthielten (Rooney et al. 1998; Haque et al. 2007; Tangye, Palendira, and Edwards 2017) und die klinische Wirksamkeit war bei Präparaten mit größeren CD4+ T-Zellanteilen erhöht (Haque et al. 2007).

1.8.3 Die antivirale CD8+ T-Zellantwort

Während der akuten IM ist die Gesamtzahl der CD8+ T-Zellen im peripheren Blut im Vergleich zu gesunden Virusträgern um das Fünf- bis Zehnfache erhöht (Callan et al. 2000; Taylor et al. 2015). Die Mehrheit der aktivierten CD8+ T-Zellen ist spezifisch für lytische Antigene, wobei Antworten gegen einzelne Epitope bis zu 50% des gesamten CD8+ T-Zellpools ausmachen können. Im Gegensatz dazu fällt die Immunantwort gegen Antigene der Latenzphase etwa zehnfach geringer aus (Callan et al. 2000; Leen et al. 2001; Taylor et al. 2015; Long et al. 2005a). Zusammen mit der Expansion der aktivierten CD8+ T-Zellen finden sich auch erhöhte Serumwerte proinflammatorischer und immunregulatorischer Zytokine (IFN- γ , Tumornekrosefaktor (TNF), IL-6, IL-10, *Transforming Growth Factor* (TGF- β)) (Callan et al. 2000; Panikkar et al. 2015). In Personen mit asymptomatischer Primärinfektion findet man hingegen einen geringeren Anstieg der EBV-spezifischen CD8+ T-Zellen auf bis zu 15% des gesamten CD8+ T-Zell-Pools. Nach Abklingen der Infektion verbleiben ca. 2-5% als virusspezifische CD8+ Gedächtnis-T-Zellen (Hislop et al. 2007; Tangye, Palendira, and Edwards 2017).

1.8.4 Die antivirale humorale Immunantwort

Während Antikörper-vermittelte Immunantworten gegen viele Viruserkrankungen schützen können, vermitteln sie keinen ausreichenden Schutz vor einer EBV-

Infektion (Longnecker R 2013). Trotz der durch die EBV-Infektion induzierten Antikörperantwort werden in gesunden Virusträgern Neuinfektionen mit weiteren EBV-Virusstämmen beobachtet. Auch konnte die Impfung gegen das EBV-Glykoprotein gp350 in einer Phase 2-Doppelblindstudie eine EBV-Erstinfektion in seronegativen Erwachsenen nicht mit statistischer Signifikanz verhindern (Sokal et al. 2007). Allerdings verlief die Serokonversion in den meisten Fällen asymptomatisch. Diese Ergebnisse deuten darauf, dass die virusspezifische Antikörperantwort eventuell die Schwere der Symptomatik beeinflusst, aber nicht vor einer Infektion schützt. Konventionelle Impfungen gegen EBV lassen somit keinen ausreichenden Schutz erwarten (Cohen 2015b; Sokal et al. 2007; Tangye, Palendira, and Edwards 2017). Neben der Induktion von Virus-spezifischen Antikörpern zielen neue Impfstrategien deshalb auch auf eine breite Aktivierung der EBV-spezifischen T-Zell-Antwort.

1.8.5 Einfluss von Polymorphismen der viralen Antigene auf die zelluläre Immunerkennung ²

Kurz nachdem erstmals Sequenzunterschiede beschrieben und eine rasch wachsende Zahl an unterschiedlichen EBV-Stämmen als Typ 1 oder Typ 2 subklassifiziert worden war, wurden Unterschiede in der T-Zellerkennung von Zielzellen beobachtet, die verschiedene EBV-Stämme trugen (Moss et al. 1988). Die Bedeutung der Sequenzunterschiede auf die Immunerkennung wurde offensichtlich, als die Identifikation des ersten EBV-spezifischen CD8+ T-Zellepitops gelang. Im Gegensatz zu dem im Typ 1 Stamm B95.8 identifizierten Epitop wies die entsprechende Aminosäuresequenz im Typ 2-Referenzstamm AG876 zwei Aminosäureaustausche auf, was zu einem Verlust der T-Zellerkennung führte (Burrows, Sculley, et al. 1990). Mit der Identifizierung weiterer CD8+ T-Zellepitope (Hislop

² Textpassage modifiziert aus Cirac A, Behrends U, Mautner J. Clinical implications of Epstein-Barr virus strain diversity. *J Immunological Sci.* (2018); 2(3): 51-55

et al. 2007) sowie diverser EBV-Stämme ergab sich ein komplexes Bild der EBV-spezifischen antiviralen T-Zellantwort. Während manche CD8+ T-Zellepitope in allen Stämmen konserviert waren (Burrows, Misko, et al. 1990), unterschieden sich andere zwischen den verschiedenen EBV-Typen (Schmidt et al. 1991). Darüber hinaus wurden auch innerhalb eines Virustyps mehrere Epitopvarianten beschrieben (Apolloni et al. 1992; Lee et al. 1993; Midgley, Bell, Yao, et al. 2003; Gras et al. 2010; Bell et al. 2008; Brooks et al. 2000). Die Aminosäureaustausche in den CD8+ T-Zellepitopen hatten einen verstärkenden, vermindernenden, oder keinen Einfluss auf die T-Zell-Erkennung (Burrows et al. 1996; Gras et al. 2010; Midgley, Bell, Yao, et al. 2003; Lee et al. 1993; Brooks et al. 2000; Apolloni et al. 1992). All diese Studien implizierten, dass EBV-Sequenzunterschiede die antivirale CD8+ T-Zellantwort beeinflussen können. Daraus ergab sich die Frage, welcher Anteil der CD8+ T-Zellepitope Sequenzunterschiede aufwies, ob Polymorphismen auch in CD4+ T-Zellepitopen auftraten und wie diese die T-Zellerkennung beeinflussten.

1.9 Diagnostik

Die Diagnostik einer akuten Infektion beinhaltet sowohl das Erfassen der klinischen Symptomatik als auch die Auswertung des Blutbildes. Eine Leukozytose mit 40-90% mononukleären Zellen und Reizformen der Lymphozyten sowie ein serologischer Nachweis von anti-VCA-IgM und anti-VCA-IgG bei fehlendem Nachweis von anti-EBNA1-IgG deuten auf eine frische EBV-Infektion hin. Im Gegensatz dazu finden sich nach überstandener Primärinfektion anti-VCA-p18-IgG und anti-EBNA1-IgG im Blut (DGPI-Handbuch 2018).

1.10 Therapie EBV-assoziiierter Erkrankungen

Die Therapie der IM erfolgt in der Regel symptomatisch, im Falle schwerer Manifestationen auch immunsuppressiv. Für die Behandlung EBV-assoziiierter Neoplasien stehen neben konventionellen onkologischen Behandlungsoptionen zunehmend auch EBV-spezifische Immuntherapien zur Verfügung (DGPI-Handbuch 2018).

1.10.1 Adoptive T-Zelltherapie ³

Die Erkennung viraler Antigene durch EBV-spezifische T-Zellen ist für die Infektionskontrolle von zentraler Bedeutung. Insbesondere hemmt die adaptive Immunantwort die EBV-induzierte Lymphoproliferation, welche in Patienten mit T-Zelldefekten zu schwerwiegenden Erkrankungen führen kann (Taylor et al. 2015; Long, Taylor, and Rickinson 2011). Solche EBV-assoziierten Erkrankungen können durch die Infusion Virus-spezifischer T-Zellen erfolgreich behandelt werden (Heslop and Rooney 1997; Gottschalk and Rooney 2015; Merlo et al. 2011; Bollard et al. 2014; McLaughlin, Bollard, and Keller 2018). Die Herstellung der T-Zellpräparate erfolgte ursprünglich durch wiederholte Stimulation peripherer T-Zellen mit EBV-transformierten autologen lymphoblastoiden B-Zell Linien (LCL) *in vitro* (Rooney et al. 1998). Später wurden als antigenpräsentierende Zellen (APC) modifizierte LCL eingeführt, die mit viralen Antigenen in Form von synthetischen Peptiden beladen waren oder nach Transduktion virale Proteine exprimierten und präsentierten. Da LCL-basierte Verfahren zur Herstellung klinischer T-Zellpräparate mehrere Wochen erfordern, wurden neue Methoden zur schnelleren und effizienteren Herstellung virusspezifischer T-Zellen entwickelt. Diese basieren auf der Selektion EBV-spezifischer T-Zellen mittels *major histocompatibility complex*

³ Textpassagen übersetzt übernommen aus Cirac A, Behrends U, Mautner J. Clinical implications of Epstein-Barr virus strain diversity. J Immunological Sci. (2018); 2(3): 51-55

(MHC)-Multimeren, immunomagnetischer Isolierung IFN γ -sezernierender T-Zellen nach Stimulation mononukleärer Zellen des peripheren Bluts (PBMC) mit viralen Epitopeptiden oder auf der Verwendung EBV-gentransfizierter dendritischer Zellen als APC (McLaughlin, Bollard, and Keller 2018; Rooney et al. 1998; Moosmann et al. 2010; Bollard 2013). Erste Studien weisen auf eine ähnliche klinische Wirksamkeit der verschiedenen generierten T-Zellpräparate hin. Allerdings beschränken sich die neueren Protokolle meist auf die Selektion von T-Zellen mit Spezifitäten für wenige Epitope, welche auf der Sequenz des Referenzstammes B95.8 basieren (Hislop et al. 2007; Taylor et al. 2015). Inwiefern EBV-spezifische Immuntherapien und Vakzine, welche ausschließlich auf B95.8-Sequenzen basieren, auch gegen andere EBV Stämme wirksam sind, ist noch unklar.

1.10.2 Potenzielle klinische Auswirkungen der Diversität der EBV-Stämme⁴

Viruspezifische T-Zellantworten werden in Patienten mit EBV-assoziierten Erkrankungen häufig mittels überlappender Peptidbibliotheken analysiert, welche hauptsächlich Latenzantigene umfassen, wie z.B. EBNA3 (Tischer et al. 2014; Korber et al. 2016). Eine auf B95.8-Sequenzen basierende PeptidAuswahl kann aber möglicherweise die T-Zellantwort nur unzureichend abbilden, wenn der Patient mit einem abweichendem EBV-Stamm infiziert ist. Ebenso konzentrieren sich aktuelle Ansätze zur Impfstoffentwicklung sowie Protokolle zur Generierung viruspezifischer T-Zellen für den klinischen Einsatz bislang auf wenige Latenz-Proteine des Stammes B95.8 (Taylor and Steven 2016; Smith and Khanna 2015; Cohen 2015a; Bollard and Heslop 2016; Moosmann et al. 2010; Icheva et al. 2013; Haque et al. 2007; O'Reilly et al. 2016a; Bollard 2013). Da diese Proteine ausgesprochen polymorph sind, kann eine verminderte klinische Wirksamkeit bei Patienten, die mit einem abweichenden EBV Stamm infiziert sind, nicht ausgeschlossen werden.

⁴ Textpassagen übersetzt übernommen aus Cirac A, Behrends U, Mautner J. Clinical implications of Epstein-Barr virus strain diversity. *J Immunological Sci.* (2018); 2(3): 51-55

1.11 Fragestellung der Arbeit

Die stetig steigende Zahl an neu beschriebenen EBV-Stämmen warf die Frage auf, welche Auswirkungen die Sequenzunterschiede auf die Biologie des Virus haben, ob diese Unterschiede für die geographischen Prävalenzen EBV-assoziiierter Erkrankungen (mit)verantwortlich sind und welche Auswirkungen sie auf die EBV-spezifische Immunantwort haben. Diese Arbeit sollte sich der letzten Frage widmen und dazu drei repräsentative EBV-Stämme, den Typ-1-Referenzstamm B95.8, den Typ-2-Referenzstamm AG876 sowie den aus einem chinesischen NPC isolierten Stamm M81 untersuchen. Zunächst sollten alle EBV-Proteine sowie publizierte CD4+ und CD8+ T-Zell-Epitope des EBV in den drei Stämmen verglichen werden. Anschließend sollten mittels etablierter T-Zellklone die Erkennung der verschiedenen Epitopvarianten in den drei Stämmen untersucht werden. Sowohl bei den *in silico*- als auch bei den *in vitro*-Analysen sollten die flankierenden Regionen der Epitope, definiert als die jeweils fünf N- und C-terminalen Aminosäuren, mitberücksichtigt werden. Um Hinweise darauf zu erhalten, ob EBV-spezifische T-Zellpräparate, wie sie in der Klinik eingesetzt werden, protektiv gegen verschiedene Virusstämme wirken, sollten zunächst periphere T-Zellen von drei gesunden Spendern wiederholt *in vitro* mit autologen LCL, die entweder das B95.8- oder das M81-Virus trugen, stimuliert werden. Anschließend sollten die resultierenden virusspezifischen T-Zelllinien phänotypisch charakterisiert sowie die durch sie vermittelte Erkennung und Lyse von Zielzellen, die mit unterschiedlichen Virusstämmen infiziert waren, untersucht werden.

2 Material

2.1 Antikörper

Tabelle 1: Ungekoppelte Immunglobulin G-Primärantikörper

Spezifität	Gegen Spezies	Wirt	Anwendung	Bezugsquelle
Anti-BZLF1	EBV	Maus	WB	Argene
Anti-His ₆	His-Etikett	Maus	WB	Hybridomüberstand; zur Verfügung gestellt von Dres. E. Kremmer und R. Feederle (Helmholtz Zentrum München, München)
Anti-GAPDH	Human	Maus	WB	Millipore
Anti-Tubulin	Human	Kaninchen	WB	Argene

Tabelle 2: Gekoppelte Immunglobulin G-Primärantikörper

Spezifität	Gegen Spezies	Wirt	Gekoppelt mit	Anwendung	Bezugsquelle
Anti-CD3	Human	Maus	FITC	FACS	BD Pharmingen
Anti-CD4	Human	Maus	PE	FACS	BD Pharmingen
Anti-CD4	Human	Maus	FITC	FACS	BD Pharmingen
Anti-CD8	Human	Maus	PE	FACS	BD Pharmingen
Anti-MHCI (HLA-ABC)	Human	Maus	PE	FACS	ImmunoTools

Anti-MHCII (HLA-DR, DP, DQ)	Human	Maus	FITC	FACS	BD Pharmingen
Anti-CD45RA	Human	Maus	FITC	FACS	BD Pharmingen
Anti-CD45RO	Human	Maus	APC	FACS	BD Pharmingen
Anti-IgG+IgM	Maus	Ziege	PE	FACS	Jackson
Anti-CD25	Human	Maus	APC	FACS	BD Biosciences
Anti- $\gamma\delta$ TCR	Human	Maus	PE	FACS	BioLegend
Anti-IgG1, kappa Isotyp	Human	Maus	PE	FACS	eBioscience

Tabelle 3: Gekoppelte Immunglobulin G-Sekundärantikörper

Spezifität	Gegen Spezies	Wirt	Gekoppelt mit	Anwendung	Bezugsquelle
Anti-IgG	Maus	Schaf	HRP	WB	Amersham
Anti-IgG+IgM	Ratte	Ziege	HRP	WB	Jackson

2.2 Affinitätschromatographiematrix zur Aufreinigung rekombinanter Proteine

Zur Aufreinigung His₆-markierter, rekombinanter Proteine aus HEK293T-Zellen wurde Ni-NTA-Agarose von Qiagen verwendet.

2.3 DNA-modifizierende Enzyme

Falls nicht anders aufgeführt, wurden die Restriktionsenzyme, die T4-Polymerase, *calf intestinal alkaline phosphatase* (CIP), sowie die T4-DNA-Ligase mit entsprechenden Puffern von New England Biolabs und MBI Fermentas verwendet.

2.4 Kits

Tabelle 4: Kommerzielle Kits

Bezeichnung	Verwendung	Bezugsquelle
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Development System <ul style="list-style-type: none">• Human GM-CSF• Human IFN-γ	T-Zell-ELISA	Mabtech
JETSTAR Plasmid Purification Kit	Plasmidaufreinigung aus Bakterien	Invitrogen
QIAEX II Gel Extraction Kit	Extraktion von DNA aus Gelen	Qiagen
RNeasy Midi Kit	RNA-Isolierung aus Zellen	Qiagen
Superscript II Reverse Transkriptase Kit	cDNA-Synthese	ThermoFischer Scientific
BD OptEIA Substrate Reagent Set (A + B)	ELISA-Entwicklungslösung	BD Biosciences

2.5 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 5: Chemikalien und Lösungen

Chemikalien und Lösungen	Bezugsquelle
Acyclovir	Sigma-Aldrich
Agarose	Invitrogen
Agar	Invitrogen
AIM-V	Invitrogen
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Merck

Amphotericin B	Gibco BRL
Ampicillin	Sigma-Aldrich
β -Mercaptoethanol	Merck
BSA	MP Biomedicals
Bromphenolblau	IBI
Butanol	Merck
Calcein AM	Invitrogen
Chloroform	Merck
Cyclosporin A	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
DMEM	Gibco BRL
DMSO	Sigma-Aldrich
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL
Gentamycin	Gibco BRL
Glucose	Gibco BRL
Glycerin	Merck
HEPES	Gibco BRL
Harnstoff	Merck
Humanes IL-2 (Proleukin)	Chiron-Novartis
Humanes Serum	Peripheres Blut freiwilliger Spender
Imidazol	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid	Merck

Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
L-Glutamin	Gibco BRL
Magermilchpulver	Merck
Methanol	Merck
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich
Natriumbutyrat	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natrium-Heparin	Braun
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumpyruvat	Gibco BRL
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	Gibco BRL
Pancoll	Pan Biotech
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
Phenol	Merck
Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich
Phytohämagglutinin (PHA)	Sigma-Aldrich
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich
Propidiumjodid (PI)	Sigma-Aldrich
Proteinaseinhibitor-Cocktail	Roche
RPMI 1640 mit und ohne Phenolrot	Gibco BRL
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck
Triton X-100	Merck
Trypan Blue 0,4% Zellfärbelösung	Gibco BRL
Trypsin-EDTA	Gibco BRL
Tween 20	Sigma-Aldrich

2.6 Allgemeine Medien, Puffer und Lösungen

Tabelle 6: Allgemeine Medien, Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blockpuffer WB	5% Magermilchpulver PBS
DNA-Ladepuffer	0,25% Bromphenolblau 50 mM Tris HCl 50 mM EDTA 50% Glycerol pH 7,5
ELISA-Blockpuffer	PBS 1% BSA 5% Sucrose 0,05% NaN ₃
ELISA-Waschpuffer	PBS 0,05% Tween 20
Elutionspuffer pH 7,5	100 ml Lysepuffer 0,5 M Imidazol pH 7,5
FACS-Puffer	PBS 2% FCS 0,05 % NaN ₃
Ethidiumbromidlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid ddH ₂ O
LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)	10 g Trypton 5 g Hefe-Extrakt 10 g NaCl ad 1l H ₂ O dest. autoklaviert

Laufpuffer	3 g Tris 14 g Glycin 10ml 10% SDS Ad 1000 ml H ₂ O
Lysepuffer pH 8,0	8 M Harnstoff 0,1 M Na ₂ HPO ₄ 0,01 M Tris 0,05% Tween 20 20 mM Imidazol
PBS	154 mM NaCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Reagent Diluent (ELISA)	PBS 1 % BSA, sterilfiltriert
RIPA-Puffer Western-Blot	1% NP40 0,5% DOC (Deoxycholat) 0,15 M NaCl 5 mM EDTA 50 mM Tris pH 8,0 0,1% SDS in H ₂ O 1 mg/ml Proteinaseinhibitor-Cocktail (Roche) frisch zugefügt
Sammelgel Western-Blot	2 ml PAA 7,5 ml 2x Tris/SDS pH 6,8 5,4 ml ddH ₂ O 90 µl APS 10 µl TEMED

SDS-Elektrophoresepuffer	0,025 M Tris-Base 0,2 M Glycin 0,1% SDS H ₂ O
SDS-Ladepuffer	150 mM Tris/Hcl pH 6,8 0,3% SDS 30% Glycerin 0,03% β-Mercaptoethanol Bromphenolblau H ₂ O
SOB-Medium	20 g Trypton 5 g Hefe-Extrakt 0,5 g NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ ad 1l H ₂ O dest. Autoklaviert
SOC-Medium	SOB-Medium 0,2% Glukose sterilfiltriert
Superbroth-Medium	32 g Trypton 20 g Hefe-Extrakt 25 g NaCl ad 1l H ₂ O dest. autoklaviert
50x TAE	2M Tris 50mM EDTA H ₂ O pH 8,5

1x TE	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA H ₂ O pH 7,5
Transferpuffer WB	21 g Glycin 4,5 g Tris 300 ml Methanol Ad 1500 ml H ₂ O
Trenngel 10,5% WB	7 ml PAA 10 ml 2x Tris/SDS pH 8,8 2,8 ml ddH ₂ O 167 µl APS 17 µl TEMED
2x Tris/SDS pH 8,8	90,72 g Tris 10ml 20% SDS Ad 1000ml H ₂ O pH 8,8
2x Tris/SDS pH 6,8	30,24 g Tris 10ml 20% SDS Ad 1000ml H ₂ O pH 6,8
Waschpuffer WB	1 % Magermilchpulver PBS
WB Entwicklungslösung A	40 ml 0,1 M Tris-HCl (pH 8,6) 10 mg Luminol
WB Entwicklungslösung B	20 ml DMSO 22 mg para-Hydroxycoumarinsäure

2.7 Zellkulturmedien

Tabelle 7: Zellkulturmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) – Kompletmedium (HEK293T-Medium)	DMEM 10% FCS 2 mM L-Glutamin 2,5 µg/ml Amphotericin B 50 µg/ml Gentamycin
Einfriermedium	10% DMSO 90% FCS
RPMI 1640 - Kompletmedium (LCL-Medium)	RPMI 1640 10% FCS 2 mM L-Glutamin 1 mM Na-Pyruvat 1% nicht-ess. Aminosäuren 2,5 µg/ml Amphotericin B 50 µg/ml Gentamycin
T-Zell-Medium	AIM-V 10% humanes hitzeinakt. Serum 2 mM L-Glutamin 10 mM HEPES 2,5 µg/ml Amphotericin B optional 10 U/ml IL-2
Waschmedium in der Zellkultur	RPMI 1640

2.8 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Amicon Ultra-15 Zentrifugal-Filtereinheiten	Millipore
ELISA-Platten	Corning Incorporated
Falcon-Reaktionsgefäße (15 ml und 50 ml)	BD Falcon; Sarstedt
Filter 0.45 und 0.22 µm	Millipore
Gestopfte Pipettenspitzen	ART Molecular Bio Products
MACS Separationssäulen LS	Miltenyi Biotec
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf
Parafilm	American National Can
Dialyse-Membran	Spectrumlabs
Zellkulturflaschen	Greiner-Bio-One
Zellkulturplatten	BD-Falcon
Zellkulturschalen	Nunc

2.9 Geräte

Tabelle 9: Geräte

Gerät	Marke
Bio Photometer plus	Eppendorf
Bestrahlungsanlage Gammacell 40 (Cäsium-137, γ -Strahler)	AECL
Brutschrank	Forma Scientific
ELISA-Lesegerät	Tecan
FACS Aria	Becton Dickinson
FACS Calibur	Becton Dickinson
Falcon-Roller	Coulter Electronics Limited
Gefrierschrank -80°C	Colora, Thermo
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
GenePulser II	Bio-Rad
Kühlschrank	Liebherr
Lichtmikroskop/ Axioskop	Zeiss
Millipore-Anlage	Millipore
Nanodrop 800	Thermo scientific
Neubauer Zählkammer	Marienfeld
pH-Messgerät	Knick
Pipetten	Gilson, Rainin
Schüttelinkubatoren	New Brunswick Scientific
Sterilbank	BDK
NEON Transfektionsgerät	Invitrogen
UV-Transilluminator	UVP Inc.
Vortexer Genie 2	Scientific Industries
Zentrifugen	Beckman, Eppendorf, Hettich, Sorvall, Thermo

2.10 Software

Clone Manager Basic 8, Endnote X4, Expasy, FlowJo, Matlab (Kooperation mit Michael Dieckmeyer), Microsoft Excel, Microsoft Word, NCBI Blast, Vector NTI Advance (Version 11.5)

2.11 Zelllinien

Tabelle 10: HLA-Genotyp der verwendeten Zelllinien

Linie	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DRB1	HLA-DQ	HLA-DPB1	HLA-DRB3*, -4, -5
DG75	0201, 6601	4101, 5001	0602, 17	0404, 1301	B1*0402, 0603	0401	DRB3*0101 , DRB4*0103
LCL JM B95.8; LCL Z- JM B95.8; LCL JM M81; LCL Z- JM M81	0201, 0301	1529, 5101	1203, 1402	0801, 1301	A1*0103, 0401, B1*0402, 0603	0401, 1301	DRB3*0101 1
LCL GB B95.8; LCL Z- GB B95.8; LCL GB M81	0101	1501	0304, 0602	1101, 1301	A1*0103, 0501, B1*0301, 0603	0401, 0402	DRB3*0202
LCL UB B95.8; LCL Z- UB B95.8; LCL UB M81	0101, 0201	0702, 3503	0401, 0702	0701, 1101	A1*0201, 0505, B1*0301, 0303	0201, 0301	DRB3*0202 , DRB4*0103 1
LCL HM	1101, 2902	3501, 5201	0401, 1202	0101, 1502	B1* 0501, 0602	0201, 0401	DRB5*0102
LCL F Z-	0101, 0302	0801, 2705	0102, 0701	0301, 1101	B1* 0201, 0301	0101, 0201	DRB3*0101 , DRB3*0202

Tabelle 11: Spezifität und HLA-Restriktion der verwendeten T-Zellklone

T-Zellklon	Antigen	Epitop	HLA-Restriktion
EBNA1 1C3	EBNA1	AA ₅₂₇₋₅₄₁ -AIPQCRLTPLSRLPF-	HLA-DRB1*1301
EBNA1 3E10	EBNA1	AA ₄₈₁₋₄₉₅ -IAEGLRALLARSHVE-	HLA-DQB1*0402
EBNA1 HPV	EBNA1	AA ₄₀₇₋₄₁₇ -HPVGEADYFEY-	HLA-B*3501
GB EBNA1 3G2	EBNA1	AA ₅₁₄₋₅₂₈ -KTSLYNLRRGTALAI-	HLA- DRB1*1101
EBNA3C 5H11	EBNA3C	AA ₃₂₅₋₃₃₉ -ENPYHARRGIKEHVI-	HLA- DRB1*0801
SL E3C	EBNA3C	AA ₃₈₇₋₄₀₀ -SDELDPYIDPNMEPV-	HLA-DQB1*0501
RAK	BZLF1	AA ₁₉₀₋₁₉₇ -RAKFKQLL-	HLA-B*0801
IED	LMP2A	AA ₂₀₀₋₂₀₈ -IEDPPFNSL-	HLA-*B4001
CLG	LMP2A	AA ₄₂₆₋₄₃₄ -CLGGLTMV-	HLA-A*0201

2.12 Bakterienstämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich der *E. coli*-Stamm XL1-blue MRF⁺ (Stratagene) verwendet.

2.13 Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten und selbst klonierten Plasmide enthielten den Cytomegalievirus (CMV)-Promotor pCMV sowie ein Ampicillinresistenzgen.

Tabelle 12: Verwendete, im Labor bereits vorhandene Plasmide

Plasmid	Beschreibung
pCMV-EHis	Vektor für Genexpression in eukaryoten Zellen. pCMV/cyto Vektor von Invitrogen für C-terminale Fusion des EBNA1- sowie des His ₆ -Etiketts.
pCMV-EBNA1 ^{GA} -His	cDNA-Sequenz von EBNA1 des B95.8-Stammes mit Ausnahme der Glycin-Alanin-Repeats, sowie zusätzlicher C-terminaler Fusion eines His ₆ -Etiketts
pCMV-BZLF1-Ehis	cDNA-Sequenz von BZLF1 des B95.8-Stammes mit C-terminaler Fusion eines EBNA1- als auch eines His ₆ -Etiketts
pCMV-LMP2A-His	cDNA-Sequenz von LMP2A des B95.8-Stammes mit C-terminaler Fusion eines His ₆ -Etiketts
pCMV-EBNA3C-AG876-Ehis	cDNA-Sequenz von EBNA3C des AG876-Stammes mit C-terminaler Fusion eines EBNA1- als auch eines His ₆ -Etiketts
HLA-Plasmide	
pCMV-HLA-B*3501	Expressionsplasmid für HLA-B*3501
pCMV-HLA-B*0801	Expressionsplasmid für HLA-B*0801
pCMV-HLA-*B4001	Expressionsplasmid für HLA-B*4001

Tabelle 13: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung
pCMV-EBNA1 ^Δ GA-M81-His	cDNA-Sequenz von EBNA1 des M81-Stammes mit Ausnahme der Glycin-Alanin-Repeats (Aminosäuren 1-91 und 333-646), mit His ₆ -Etikett am C-Terminus
pCMV-EBNA1 ^Δ GA-AG876-His	cDNA-Sequenz von EBNA1 des M81-Stammes mit Ausnahme der Glycin-Alanin-Repeats (Aminosäuren 1-92 und 328-641 durch ein eingefügtes Threonin verbunden), mit His ₆ -Etikett am C-Terminus
pCMV-EBNA2-M81-EHis	cDNA-Sequenz von EBNA2 des M81-Stammes mit C-terminaler Fusion eines EBNA1- als auch eines His ₆ -Etiketts
pCMV-EBNA3A-M81-EHis	DNA von EBNA3A des M81-Stammes mit C-terminaler Fusion eines EBNA1- als auch eines His ₆ -Etiketts
pCMV-EBNA3B-M81-EHis	cDNA-Sequenz von EBNA3B des M81-Stammes mit C-terminaler Fusion eines EBNA1- als auch eines His ₆ -Etiketts
pCMV-EBNA3C-M81-EHis	cDNA-Sequenz von EBNA3C des M81 Stammes mit C-terminaler Fusion eines EBNA1- als auch eines His ₆ -Etiketts
pCMV-LMP1-M81-EHis	cDNA-Sequenz von LMP1 des M81-Stammes mit C-terminaler Fusion eines EBNA1- als auch eines His ₆ -Etiketts
pCMV-LMP2A-M81-EHis	cDNA-Sequenz von LMP2A des M81-Stammes mit C-terminaler Fusion eines EBNA1- als auch eines His ₆ -Etiketts

pCMV-BALF4-M81-EHis	cDNA-Sequenz von BALF4 des M81-Stammes mit C-terminaler Fusion eines EBNA1- als auch eines His ₆ -Etiketts
pCMV-BGLF5-M81-EHis	cDNA-Sequenz von BGLF5 des M81-Stammes mit C-terminaler Fusion eines EBNA1- als auch eines His ₆ -Etiketts
pCMV-BLLF1-M81-EHis	cDNA-Sequenz von BLLF1 des M81-Stammes mit C-terminaler Fusion eines EBNA1- als auch eines His ₆ -Etiketts
pCMV-BNRF1-M81-EHis	cDNA-Sequenz von BNRF1 des M81-Stammes mit C-terminaler Fusion eines EBNA1- als auch eines His ₆ -Etiketts
pCMV-BXLF2-M81-EHis	cDNA-Sequenz von BXLF2 des M81-Stammes mit C-terminaler Fusion eines EBNA1- als auch eines His ₆ -Etiketts
pCMV-BZLF1-M81-EHis	cDNA-Sequenz von BZLF1 des M81-Stammes mit C-terminaler Fusion eines EBNA1- als auch eines His ₆ -Etiketts
pCMV-BZLF1-AG876-EHis	cDNA-Sequenz von BZLF1 des AG876-Stammes mit C-terminaler Fusion eines EBNA1- als auch eines His ₆ -Etiketts

3 Methoden

3.1 Sequenzanalyse

DNA- und Proteinsequenzen verschiedener EBV-Stämme wurden der NCBI-Datenbank entnommen: B95.8 (GenBank Nr. V01555.2), M81 (GenBank Nr. KF373730.1), AG876 (GenBank Nr. DQ279927.1), C666-1 (GenBank Nr. AM182486.1), und HKNPC1 (GenBank Nr. JQ009376). Sequenzvergleiche wurden in Kooperation mit Michael Dieckmeyer mithilfe eines MatLab-Algorithmus durchgeführt und mit Vector NTI Advance (Version 11.5) validiert. Des Weiteren wurden bekannte EBV-Epitope des Referenzstammes B95.8 mit den entsprechenden Sequenzabschnitten in M81 und AG876 verglichen, um Abweichungen in den Epitopsequenzen zu finden.

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Kultivierungsverfahren

Die Anzucht des *E. coli*-Stammes XL-1 blue MRF⁺ erfolgte bei 37°C in LB-Medium. Um transformierte Bakterien zu selektionieren, wurde dem Fest- oder Flüssigmedium Ampicillin (100 µg/ml) zugesetzt.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Prinzip der Klonierung von Genen

In dieser Arbeit wurden v.a. Gene des EBV-Stammes M81 kloniert. Dabei erfolgte zunächst eine Amplifizierung des gewünschten Genes mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus viraler DNA bzw. cDNA. Das Produkt der korrekten Länge wurde nach Auftrennung mittels Gelelektrophorese aus dem Gel isoliert. An die Enden des Genes wurden mit Hilfe der verwendeten Primer zum Vektor passende Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen angefügt. Der Vektor, pCMV-EHis,

wurde in einem parallelen Ansatz mit den gleichen Restriktionsendonukleasen geschnitten, sodass sich nun bei der Ligation das Insert (das Gen) passend in den Vektor einfügte.

3.3.2 Isolierung von DNA aus EBV-infizierten LCL

LCL enthalten neben ihrer eigenen genomischen DNA auch das Genom des EBV-Stammes, durch den sie infiziert und transformiert worden waren. Zur Isolierung genomischer DNA – und damit auch des viralen Genoms – wurden 2×10^7 Zellen in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei $530 \times g$ zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes und Zugabe von 20 ml PBS wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in 13 ml 1 x TE Puffer, 1 ml 10% SDS und 100 μ l RNaseA (Roche; 10 mg/ml) resuspendiert. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurden 75 μ l Proteinase K (Roche; 50 U/ml) zum Reaktionsansatz hinzugefügt und 4 h im Wasserbad bei 60°C inkubiert. Daraufhin wurden 6 ml 5 M NaCl-Lösung zugegeben und für 30 min bei $21000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Der DNA-enhaltende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt. Die DNA wurde anschließend bei $21000 \times g$ für 20 min und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt. Nachdem das Pellet bei Raumtemperatur (RT) getrocknet war, wurde dieses in 1 ml TE gelöst. Nach vollständiger Lösung wurde die DNA-Konzentration im Nanodrop 800 bestimmt.

3.3.3 Präparation von RNA aus EBV-infizierten LCL

Zur Isolierung von RNA – darunter auch viraler mRNA – wurden 1×10^7 LCL in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei $530 \times g$ zentrifugiert. Nach Zugabe von 10 ml PBS wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Die Isolation erfolgte mit dem RNeasy Midi Kit der Firma Qiagen. Das Zellpellet wurde in 600 μ l RTL Puffer aufgenommen und mit 6 μ l

Mercaptoethanol versetzt. Um die genomische DNA mechanisch zu fragmentieren und damit die spätere Trennung von der gewünschten RNA zu erleichtern, wurde der Reaktionsansatz mit einer Spritze und einer 1 mm dicken sterilen Kanüle mehrmals auf- und abgezogen. Nach Zugabe von 700 µl Ethanol (70%) wurde der Ansatz auf eine Säule geladen und für 1 min bei 21.000 x g zentrifugiert. Während die Ribonukleinsäuren dabei an der Matrix gebunden blieben, sammelten sich alle anderen Zellbestandteile in der Durchlaufraction, welche verworfen wurde. Auf die Säule wurden nun 700 µl RWI Puffer geladen und für 15 sec bei 21.000 x g zentrifugiert, um die Säule anschließend zwei Mal mit je 600 µl RPE Wasch-Puffer für 15 sec bei 21.000 x g zu waschen. Danach wurde die Säule erneut mit 600 µl RPE Wasch-Puffer für 2 min bei 21.000 x g gewaschen. Die Säule wurde in ein neues steriles Auffanggefäß überführt und für 1 min bei 21.000 x g getrocknet. Anschließend wurde die Säule in das endgültige Reaktionsgefäß überführt und die Nukleinsäuren zwei Mal mit je 25µl DEPC H₂O für 1 min bei 21.000 x g eluiert. Zuletzt wurde die Konzentration mittels Nanodrop 800 bestimmt.

3.3.4 Reverse Transkription der RNA

Für die Synthese von cDNA aus mRNA wurden 4 µg RNA mit 2 µl dT Primern (Roche) versetzt und auf 34 µl mit DEPC-behandeltem Wasser aufgefüllt (Tabelle 14). Dieser Reaktionsansatz wurde für 5 bis 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend unverzüglich auf Eiswasser abgekühlt. Nach Abkühlung wurde der zur reversen Transkription nötige Reaktionsansatz des SuperScript II Reverse Transcriptase Kits (Invitrogen) hinzupipettiert (

Tabelle 15) und für 1 h bei 42°C inkubiert. Das Enzym wurde für 15 min bei 70°C inaktiviert und die Konzentration wurde daraufhin im Nanodrop 800 bestimmt.

Tabelle 14: Reaktionsansatz zur Denaturierung von mRNA und Bindung der dT-Primer

Reaktionsansatz	
RNA	4 µg
dT-Primer (Roche; 8 nmol)	2 µl (0,32 nmol)
DEPC-H ₂ O	Ad 34 µl

Tabelle 15: Reaktionsansatz zur Synthese von cDNA aus mRNA mittels SuperScript II Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen)

Reaktionsansatz	
5 x First Strand buffer	10 µl
dNTPs (40 mmol)	2 µl
DTT (100 mM)	2 µl
SuperScript (200 U/µl)	2 µl

3.3.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden diese mit 1/5 des Volumens an DNA Ladepuffer versetzt und in eine Geltasche geladen. Das Gel enthielt ca. 0,9% Agarose und 0,4 µg/ml Ethidiumbromid; der Agarosegehalt richtete sich nach der Größe der geladenen DNA-Fragmente. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TAE-Puffer, als Referenz wurde eine 1 kb DNA-Leiter (MBI Fermentas) aufgetragen.

3.3.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels einer UV-Lichtquelle konnten einzelne Banden sichtbar gemacht und mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten werden. Um die darin enthaltene gewünschte DNA zu extrahieren, wurde anschließend das entsprechende Agarosegelstück mithilfe des QIAEX II Gel Extraction Kits den Angaben des Herstellers entsprechend verarbeitet.

3.3.7 Verdau der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zu Klonierungszwecken und zur Überprüfung präparierter Plasmid-DNA wurden DNA-Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Dazu wurden 2-4 U des Restriktionsenzym zu 1 µg DNA in dem vom Hersteller (New England Biolabs) empfohlenen Puffer gegeben und bei der empfohlenen Temperatur für 1-2 h inkubiert. Anschließend wurden die entstandenen Fragmente elektrophoretisch in Agarosegelen aufgetrennt und durch UV-Licht sichtbar gemacht.

3.3.8 Synthese glatter Enden nach dem Restriktionsverdau

Da manche Restriktionsendonukleasen DNA-Enden mit Einzelstrangüberhängen produzieren, wurden diese bei Bedarf in glatte Enden umgewandelt. Dazu wurde nach erfolgtem Restriktionsverdau 1 µl einer 10 mM dNTP-Lösung und 10 U T4-DNA-Polymerase zum Reaktionsgemisch zugegeben und für 15 min bei RT inkubiert.

3.3.9 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten, z.B. des zu klonierenden Genes in den Vektor, erfolgte enzymatisch mithilfe der T4-Ligase. Dazu wurde ein Vektor-zu-Insert-Konzentrationsverhältnis von 1:3 hergestellt und 8 µl dieser Mischung mit 1 µl T4-

DNA-Ligase sowie 1 µl T4-Ligase-Puffer versetzt und über Nacht bei 16°C inkubiert.

3.3.10 Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung von DNA

Um DNA von Verunreinigungen zu befreien, wurde der DNA-Lösung das gleiche Volumen an Phenol und Chloroform zugesetzt und gemischt. Anschließend wurde das Gemisch bei 21.000 x g für 10 min und RT zentrifugiert. Danach wurde die DNA-haltige, wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von drei Volumenteilen 100% Ethanol und Zentrifugation für 30 min bei 21.000 x g und 4°C gefällt. Das Pellet wurde in 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Das trockene Pellet wurde in sterilem ddH₂O gelöst und die DNA-Konzentration mittels Nanodrop 800 bestimmt.

3.3.11 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Um größere Mengen eines Plasmids herzustellen, wurde es in Bakterien eingebracht und vermehrt. Für die Transformation der Bakterien mittels Elektroporation mußten diese entsprechend vorbehandelt werden. Zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurde eine Einzelkolonie des Bakterienstammes XL1-blue MRF' in 400 ml SOB-Medium mit 10 µg/ml Tetrazyklin in einem Erlenmeyerkolben bei 37°C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ zwischen 0,5 und 0,7 erreicht war. Anschließend wurde die Kultur für 15 min auf Eis abgekühlt und dann für 15 min bei 4.800 x g und 4°C zentrifugiert. Nach Resuspendierung der pelletierten Bakterien in 250 ml kalter Glycerin-Lösung (10% in H₂O) wurde erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 2-4 ml der vorgekühlten Glycerin-Lösung aufgenommen und davon Aliquots von je 50 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dauerhaft bei -80°C aufbewahrt. Diese Aufgabe wurde freundlicherweise von den technischen Assistentinnen des Labors übernommen.

3.3.12 Transformation elektrokompenter Bakterien

Um eine größere Menge eines Plasmids zu erhalten, wurden die zuvor hergestellten elektrokompenten XL1-Bakterien zur Vermehrung des gewünschten Plasmids genutzt. Dazu wurden je 20 µl der bei -80°C gelagerten Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 1 ng Plasmid versetzt. Nach guter Durchmischung wurde der Ansatz in eine Elektroporationsküvette der Spaltbreite 0,1 cm überführt und im Gene-Pulser II (BioRad) mit 1,5 kV, 25 µF und 100 Ω elektroporiert. Direkt nach der Elektroporation wurde der Ansatz in 1 ml SOC-Medium aufgenommen, in ein kleines Reaktionsgefäß überführt und für 30 min bei 37°C geschüttelt. Nach der Inkubation wurden die Bakterien für 2 min bei 4.800 x g zentrifugiert und ca. 700 µl des Überstandes verworfen. Das Pellet wurde dann in den verbliebenen 300 µl resuspendiert und auf eine LB-Agarplatte, welche 100 µg/ml Ampicillin enthielt, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.3.13 Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien

Um zu überprüfen, ob die transformierten Bakterien das gewünschte Plasmid tragen, wurden einzelne Kolonien auf der LB-Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze in je 4 ml LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin überführt. Nach Inkubation über Nacht im Schüttler bei 37°C wurden aus den Bakteriensuspensionen die Plasmide für die genauere Untersuchungen isoliert. Die verwendeten Puffer wurden von der Firma Invitrogen bezogen; ihre genaue Zusammensetzung ist in Tabelle 16 aufgeführt. Zunächst wurde je 1 ml der Bakteriensuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und 2 min lang bei 4.800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die pelletierten Bakterien wurden in 100 µl E1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl E2-Lysepuffer und 1-3 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz mit 100 µl E3-Puffer neutralisiert und für 10

min bei 21.000 x g und 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 800 µl Ethanol und Zentrifugation für 20 min bei 21000 x g und 4°C wurde die DNA pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das DNA-Pellet bei RT getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl H₂O aufgenommen und ein Restriktionsverdau durchgeführt. Wurde nach Agarosegel-Elektrophorese das erwartete Fragmentmuster erhalten, wurde die Identität der Plasmid-DNA mittels Sequenzierung durch die Firma GATC Biotech verifiziert.

Tabelle 16: Zusammensetzung des JETSTAR Plasmid Purification Kit-Puffers

Puffer	Zusammensetzung
E1: Suspensionspuffer	50 mM Tris/ HCl 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A pH 8,0
E2: Lysepuffer	200 nM NaOH 1% SDS
E3: Neutralisationspuffer	3,1 M Kaliumacetat pH 8,0

3.3.14 Präparation großer Mengen Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien

Die Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien erfolgte ebenfalls mit dem JETSTAR Plasmid Purification Kit von Invitrogen. Zunächst wurden 400 ml Superbroth-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin in einem großen Erlenmeyerkolben gegeben, mit einer Plasmid-tragenden Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Bakteriensuspension für 20 min bei 4.800 x g bei 4°C zentrifugiert und

der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Bakterien in 10 ml E1-Lösung resuspendiert, durch Zugabe von 10 ml E2-Lösung lysiert und dann mit 10 ml E3-Lösung neutralisiert. Anschließend wurde die Mischung für 30 min bei 4800 x g bei 4°C zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurde eine Maxi-Säule des Kits mit 20 ml E4-Lösung äquilibriert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand des Bakterienlysats durch eine Gaze hindurch auf die Maxi-Säule geladen. Beim Durchlauf durch die Säule wurde die Plasmid-DNA gebunden und anschließend drei Mal mit je 20 ml E5-Lösung gewaschen. Danach wurde die DNA mit 15 ml E6-Elutionspuffer von der Säule eluiert, mit 11,5 ml Isopropanol versetzt und bei 21.000 x g für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde im Anschluss mit 70% Ethanol gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt (ebenfalls bei 21.000 x g für 20 min bei 4°C) wurde das getrocknete Pellet in 500 µl 1 x TE-Lösung aufgenommen. Anschließend wurde die DNA-Konzentration im Nano-drop 800 bestimmt und die Identität der Plasmid-DNA durch Restriktionsverdau und/oder Sequenzierung überprüft.

3.4 Zellkulturbiologische Methoden

3.4.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die Arbeit mit Zellkulturen erfolgte in einem S2-Labor unter sterilen Bedingungen in einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten Materialien und sterilen Lösungen. Die Zellen wurden in Inkubatoren bei 5% CO₂ und 37°C kultiviert. Zellkulturmedien und -lösungen wurden entsprechend den Herstellerangaben aufbewahrt und verwendet. Zur Beurteilung der Zelllinien bezüglich des Wachstums und zum Ausschluss von Kontaminationen wurden diese regelmäßig unterm Lichtmikroskop überprüft.

3.4.2 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen aus Spenderblut mittels Pancoll-Dichtegradienten-Zentrifugation

PBMC wurden mittels Pancoll-Dichtegradienten-Zentrifugation aus Vollblut freiwilliger Spender gewonnen. Zunächst wurden zu 30 ml Blut jeweils 150 µl einer 0,5 M EDTA Lösung mit pH 8,2 zugefügt, um die Gerinnung zu hemmen. Anschließend wurde das Vollblut mit 15 ml Pancoll (Pan-Biotech) unterlegt und dann bei 940 x g und RT für 30 min ohne Bremse zentrifugiert. Die leukozytenhaltige Interphase wurde abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Um verschlepptes Pancoll auszuwaschen, wurden die Zellen drei Mal mit RPMI 1640 gemischt und durch anschließende Zentrifugation (530 x g, RT, 10 min) pelletiert. Nach dem letzten Waschschrift wurden die abzentrifugierten Leukozyten in T-Zell-Medium resuspendiert.

3.4.3 Bestimmung der Zellzahl

Zum Zählen von Zellen wurden 10 µl der Zellsuspension mit dem gleichen Volumen an 0,5% Trypanblau versetzt. 10 µl dieser Mischung wurde unter ein Deckglas der Neubauer-Zählkammer gegeben, zwei Bereiche mit je 16 Kleinquadraten ausgezählt und anschließend der Mittelwert gebildet. Berechnet wurde die Gesamtzellzahl wie folgt:

Mittelwert der Zellzahl x 2 (Trypanblau-Verdünnung) x 10^4 (Eichung der Zählkammer) x Volumen (ml) der gesamten Zellsuspension.

3.4.4 Etablierung von EBV-transformierten LCL aus PBMC

Zur Etablierung humaner lymphoblastoider Zelllinien wurden humane B-Zellen *in vitro* mit EBV-Überstand inkubiert. Dazu wurden je 2×10^6 PBMC eines Spenders in 100 µl LCL-Medium in einem Loch einer 96-Lochplatte ausgebracht und mit 100 µl Virussuspension des EBV-Stammes M81 (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Henri-Jacques Delecluse, DKFZ Heidelberg) versetzt. Am nächsten Tag wurde

die Hälfte des Mediums verworfen und durch neues, Cyclosporin A-haltiges (1 mg/ml) LCL-Medium ersetzt. Zudem wurden pro Loch 500-1000 WI-38 Zellen zugegeben. Zwei Mal wöchentlich wurde die Hälfte des Kulturüberstands durch frisches, Cyclosporin A-haltiges LCL-Medium ersetzt. Bei einsetzendem Wachstum der Kulturen wurde die Hälfte der Zellen in ein zweites Loch der Platte überführt. Nach ca. drei Monaten konnten 30 Löcher in einer kleinen Zellkulturflasche vereinigt werden. Ab der Kultur in der Flasche fand keine weitere Zugabe von Cyclosporin A mehr statt.

3.4.5 Kultivierung von LCL und Burkitt-Lymphom-Zelllinien

LCL und DG75 wurden in RPMI 1640-Komplettmedium in Zellkulturflaschen kultiviert und bei Bedarf in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:10 geteilt und mit frischem Medium versetzt. Wurden LCL zur Generierung von T-Zelllinien verwendet, wurden diese in RPMI 1640-Komplettmedium gehalten, welches statt FCS Humanserum enthielt. Sollte die Virusfreisetzung aus LCL gehemmt werden, wurde dem Medium 200 µM Acyclovir bereits min. 14 Tage vor der ersten Stimulation der T-Zellen zugesetzt und diese Konzentration durchgehend aufrechterhalten.

3.4.6 Generierung LCL-spezifischer T-Zelllinien

LCL-spezifische T-Zelllinien wurden aus PBMC von gesunden, EBV-positiven Spendern etabliert. Dazu wurden 1×10^6 mit 80 Gy bestrahlte LCL zusammen mit 1×10^6 PBMC desselben Spenders in 24-Loch-Platten in 2 ml T-Zellmedium ohne IL-2 ausgebracht. Nach 48 h wurde 10 U/ml IL-2 zugesetzt. Alle 14 Tage wurden die T-Zellen erneut 1:1 mit bestrahlten LCL desselben Spenders stimuliert. Etablierte T-Zelllinien wurden in T-Zellmedium kultiviert und je nach Wachstum geteilt und mit frischem, IL-2 haltigem T-Zellmedium versetzt.

3.4.7 Kultivierung von HEK293T-Zellen

HEK293T-Zellen wurden in HEK293T-Medium in Zellkulturschalen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Waren sie zu 70-100% konfluent, wurden sie 1:4 bis 1:10 geteilt. Dazu wurden die Zellen mit 1 x Trypsin-EDTA für 5 min bei 37°C im Inkubator inkubiert. Nachdem sich die Zellen von der Zellkulturschale ablösten, wurden sie abpipettiert und in der gewünschten Dichte neu ausgebracht.

3.4.8 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden 1×10^7 Zellen abzentrifugiert, in 1,8 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Das Röhrchen wurde zunächst in Zellstofftücher eingewickelt, um ein langsames abkühlen im -80°C Gefrierschrank zu gewährleisten. Nach 48h wurden die Kryoröhrchen in Tanks mit Flüssigstickstoff (-196°C) überführt.

Um die Zellen wieder aufzutauen wurden die Kryoröhrchen unter fließendes, lauwarmes Wasser gehalten und geschwenkt, bis die Zellsuspension aufgetaut war. Im Anschluss wurden die Zellen in 10 ml RPMI 1640 überführt, gemischt und abzentrifugiert (530 x g, RT, 5 min). Das Zellpellet wurde insgesamt drei Mal in frischem RPMI 1640 resuspendiert und abzentrifugiert, um das Einfriermedium auszuwaschen. Nach dem Waschen der Zellen wurden diese in Kultur genommen.

3.4.9 Herstellung von Viruskonzentrat

Zur Herstellung von EBV-Konzentrat wurde Zellüberstand der B95.8-Zelllinie mit Hilfe einer Spritze durch ein 0,45 µm Filter gedrückt. Zuvor waren die Zellen möglichst dicht kultiviert worden. Die sterilfiltrierten Viruspartikel wurden anschließend in einer Beckmann-Zentrifuge bei 100.000 x g und 4°C für 2 h zentrifugiert und der Niederschlag in sterilem PBS resuspendiert. Das Viruskonzentrat wurde bei 4°C gelagert.

3.4.10 Transfektion antigenpräsentierender Zellen mittels Elektroporation

Am Tag vor der Transfektion wurden DG75-Zellen 1:1 geteilt und mit frischem LCL-Medium versorgt. Am nächsten Tag wurden 1×10^7 Zellen für 5 min bei 530 x g zentrifugiert, der Zelleniederschlag in 10 ml RPMI 1640 gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 10 ml OPTIMEM resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 5 min bei 530 x g wurden die Zellen in 300 µl OPTIMEM aufgenommen und 20 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA hinzugefügt. Nach gutem Durchmischen wurde die Suspension in eine Elektroporationsküvette (0,4 cm Spaltbreite) überführt und diese in den Gene-Pulser II eingesetzt. Die Elektroporation erfolgte bei 230 V und 975 µF. Im Anschluss wurden die Zellen in 1 ml FCS aufgenommen und in 5 ml LCL-Medium in einer 6-Loch-Platte ausgebracht.

3.4.11 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Für die qualitative und quantitative Erfassung von T-Zellantworten nach Antigenerkennung wurde die Ausschüttung von IFN γ und GM-CSF mittels ELISA-Kits von Mabtech nach Herstellerangaben gemessen.

Dazu wurden zunächst 5×10^4 APC mit 5×10^4 T-Zellen in einem Loch einer 96-Lochplatte in 200 µl LCL-Medium kokultiviert. Am nächsten Tag wurden 100 µl Überstand auf eine ELISA-Platte übertragen. Die ELISA-Platte war am Abend zuvor pro Loch mit 100 µl in PBS verdünntem Capture-Antikörper beladen, am nächsten Morgen nach dreimaligem Waschen mit ELISA-Waschpuffer für 1 h mit 300 µl ELISA-Blockpuffer geblockt und abschließend erneut drei Mal gewaschen worden. Die so vorbereiteten ELISA-Platten wurden für 2 h bei RT mit dem Überstand der T-Zell-APC-Kokultur inkubiert, anschließend drei Mal gewaschen und pro Loch mit 100 µl in *reagent diluent* verdünntem Detection-Antikörper für 2 h bei RT versetzt. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden 100 µl BD OptEIA-

Substratlösung zugesetzt und die Enzymreaktion nach etwa 5 min durch Zugabe von 50 µl 2N H₂SO₄ gestoppt. Abschließend wurde die Absorption bei 450 nm im ELISA-Lesegerät (Tecan) gemessen.

3.4.12 Bestimmung der T-Zell-Zytotoxizität

Zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von T-Zellen wurden 5 x 10⁵ Zielzellen mit Calcein (Invitrogen) entsprechend dem Herstellerprotokoll gefärbt. Nach Inkubation für 30 min bei 37°C wurden die Zellen mit RPMI 1640 ohne Phenolrot gewaschen, zentrifugiert (530 x g, 5 min, RT), 5 x 10⁴ Zielzellen in 100 µl RPMI 1640 ohne Phenolrot in einer 96-Lochplatte mit V-Boden ausgebracht und mit unterschiedlichen Mengen an T-Zellen für 3 h bei 37°C kokultiviert. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität des Überstandes in einem Infinite F200 PRO Reader gemessen. Spontane und maximale Lyse wurden bestimmt, indem je 100 µl RPMI 1640 ohne Phenolrot oder 1% Triton X-100 in PBS den Zielzellen anstatt der T-Zellen zugefügt wurden. Die spezifische Lyse wurde wie folgt berechnet:

Spezifische Lyse [%] = [(gemessene Lyse – spontane Lyse) / (maximale Lyse – spontane Lyse)] x 100

3.4.13 Durchflusszytometrie

Zur Charakterisierung von neu etablierten T-Zelllinien wurden die T-Zellen mittels Antikörper gegen Oberflächenmarker gefärbt und anschließend mittels Durchflusszytometrie (FACS) analysiert. Dazu wurden 1 x 10⁶ Zellen zwei Mal in FACS-Puffer gewaschen (530 x g, 5 min, 4°C), danach in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und in eine 96-Lochplatte mit Rundboden auf Eis transferiert. Je nach Färbung wurden 2 µl FITC-, PE- oder APC-gekoppelte Antikörper zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Platte wurde im Dunkeln für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben drei Mal mit je 200 µl FACS-Puffer gewaschen. Nach

Aufnahme der Proben in 200 μ l FACS-Puffer wurden die Proben am FACS-Calibur vermessen und die Ergebnisse mithilfe der FloJo-Software ausgewertet.

3.4.14 Transfektion der HEK293T-Zellen mit Polyethylenimin und Proteinpräparation

Zur Produktion eines gewünschten Proteins wurden HEK293T-Zellen (DuBridge et al. 1987) mittels Lipofektion transfiziert, wenn sie etwa 60-80% Konfluenz erreicht hatten. Dazu wurde das Medium abgenommen und 20 ml Transfektionsmix auf jede Zellkulturschale gegeben. Der Transfektionsmix für 10 Zellkulturschalen setzte sich wie folgt zusammen: Zuerst wurde 450 μ g der Plasmid-DNA in 15 ml OPTIMEM gegeben und gut durchmischt, dann wurden 675 μ l der Polyethylenimin (PEI)-Lösung hinzuzufügen und die Mischung gründlich gemischt. Nach Inkubation für 15 min bei RT wurde der Transfektionsmix zu 200 ml HEK293T-Medium gegeben. Nach 12 h wurde das Medium durch frisches HEK293T-Medium ersetzt und die Zellen nach 48 h geerntet. Dazu wurden die Zellen mit einem sauberen Spatel von der Platte abgetragen und zentrifugiert (530 x g, 10 min, RT). Das Zellpellet wurde in 50 ml Lysepuffer aufgenommen und durch eine Perfusorspritze mit Kanüle auf- und abgezogen, um die zelluläre DNA zu scheren. Anschließend wurde die Suspension erneut zentrifugiert (3.300 x g, 15 min, RT) und der proteinhaltige Überstand gewonnen. Das gewünschte Protein, welches ein His₆-Etikett am C-Terminus aufwies, wurde mittels 300 μ l Ni-NTA-Agarose gemäß Herstellerprotokoll (Qiagen) aufgereinigt. Anschließend wurde das gewonnene Protein gegen PBS dialysiert.

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Herstellung von Zell-Extrakten

Um proteinhaltige Zellextrakte für Western Blots (WB) herzustellen, wurden 1×10^7 Zellen bei $530 \times g$ für 5 min zentrifugiert und in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 100 μ l kaltem RIPA-Puffer resuspendiert und für 30 min auf Eis gestellt. Um unerwünschte Zellbestandteile von dem proteinhaltigem Überstand zu trennen, wurde das Gemisch bei $21.000 \times g$ für 15 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diesem Überstand wurde in einem Verhältnis von 3:1 3x SDS-Ladepuffer zugesetzt und der Ansatz für 5 min bei 95°C gekocht.

3.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot

Um die zuvor gewonnenen, proteinhaltigen RIPA-Extrakte näher zu untersuchen, wurden die darin enthaltenen Proteine mittels *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) aufgetrennt. Die aufgetragenen Proben durchliefen zuerst ein Sammelgel, dann ein Trenngel. Eine Proteinleiter (Page Ruler Prestained Protein Ladder, Fermentas) wurde als Größenmarker aufgetragen. Das Gel wurde in einer mit SDS-Laufpuffer gefüllten Gelkammer befestigt und eine Spannung von 60-100 V für 2-5 h angelegt. Nach der SDS-PAGE mussten die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) - Membran übertragen werden. Dies geschah in einer mit Transferpuffer gefüllten Blotkammer bei 300 mA für ca. 2 h bei 4°C .

3.5.3 Immunologischer Nachweis der transferierten Proteine

Nachdem die Proteine auf die PVDF-Membran übertragen worden waren, wurde die Membran in Blockpuffer für WB für 1 h bei RT geschwenkt und anschließend drei Mal für 10 min in Waschpuffer für WB gewaschen. Anschließend wurde sie über Nacht bei 4°C mit in Waschpuffer für WB verdünntem Primärantikörper geschwenkt. Am nächsten Tag wurde die Membran erneut drei Mal für 10 min in Waschpuffer gewaschen und für 1 h mit in Waschpuffer verdünntem Sekundärantikörper bei RT geschwenkt. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde die Membran mit einer WB-Entwicklungslösung (siehe Tabelle 17: Western-Blot-Entwicklungslösung) entwickelt. Nach 3 min wurden die leuchtenden Proteine als Beleuchtungsquelle eines Röntgenfilmes (CEA Medical X-Ray Screen Film Blue Sensitive von Agfa Healthcare) verwendet und somit sichtbar gemacht. Die Verdünnung der Primär- und Sekundärantikörper kann Tabelle 18 entnommen werden.

Tabelle 17: Western-Blot-Entwicklungslösung

Western-Blot (WB) Entwicklungslösung	
WB-Entwicklungslösung A	4 ml
WB-Entwicklungslösung B	400 µl
98% Wasserstoffperoxidlösung	1,2 µl

Tabelle 18: Verdünnung von Western-Blot-IgG-Antikörpern

Spezifität	Spezies	Verdünnung
His6-Tag	Maus	1:50
GAPDH	Maus	1:5.000
Tubulin	Ratte	1:5.000
Maus-IgG	Schaf	1:10.000
Ratte-IgG/IgM	Ziege	1:10.000

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 5. P-Werte wurden mittels t-test mit Bonferroni-Korrektur verwendet und wie folgt definiert:

Tabelle 19: Bezeichnung der Signifikanzniveaus

Signifikanzniveau	Bezeichnung
$p > 0,05$	n.s. (nicht signifikant)
$P \leq 0,05$	*
$P \leq 0,01$	**
$P \leq 0,001$	***

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss der EBV-Sequenzunterschiede auf die T-Zell-Erkennung⁵

4.1.1 Proteine der Latenzphase variieren in größerem Maße als Proteine des lytischen Zyklus

Sequenzvergleiche verschiedener EBV-Stämme zeigten eine Häufung nicht-synonymer Polymorphismen insbesondere in Latenzgenen, was zur Subklassifizierung der Stämme als Typ 1 oder Typ 2 führte (Feederle et al. 2015; Tsai et al. 2013; Kwok et al. 2014; Palser et al. 2015). Obwohl in den Latenz-Proteinen von EBV viele T-Zellepitope identifiziert worden waren, blieb der Einfluss dieser Polymorphismen auf die virale Immunerkennung großteils unerforscht. Deshalb wurden in dieser Arbeit zunächst die Proteinsequenzen der aus B-Zellen isolierten EBV-Referenzstämme Typ-1 (B95.8) und Typ-2 (Ag876) mit drei aus NPC gewonnenen Virusstämmen (C666-1, HKNPC1 und dem kürzlich charakterisierten M81) verglichen. Dazu wurde M81 als Referenzstamm gewählt, die viralen Proteine in verschiedene funktionelle Gruppen unterteilt und mit den anderen Virusstämmen verglichen (Abbildung 2).

In den Latenz-Proteinen differierten die untersuchten Stämme in durchschnittlich 6.6% von der M81-Sequenz, wobei die Unterschiede stammabhängig stark variierten (B95.8: 3.7%; AG876: 17.5%; C666-1: 4.0%; HKNPC1: 1.0%). Da M81 als Typ 1-Stamm beschrieben wurde (Tsai et al. 2013), waren die großen Unterschiede gegenüber AG876 in den Proteinen EBNA2 (46.7%), EBNA3A (16.1%), EBNA3B (33.3%) und EBNA3C (27.0%) (Abbildung 2A) nicht unerwartet.

⁵ übernommen aus Cirac, A., Stützle, S., Dieckmeyer, M. et al. Cancer Immunol Immunother (2018) 67: 663-674. <https://doi.org/10.1007/s00262-018-2118-z>

Im Gegensatz dazu betrug die Abweichung aller Stämme in den Proteinen der lytischen Phase insgesamt nur 0.5% (Abbildung 2B-D), wobei die nähere Verwandtschaft von M81 mit den aus NPC (Abweichung 0.1 - 0.2%) als mit den aus B-Zellen isolierten Stämmen B95.8 und AG876 (Abweichung etwa 0.8%) deutlich wurde. Dies ließ vermuten, dass Sequenzunterschiede in den Proteinen der lytischen Phase weniger die Einteilung in Typ-1 oder -2 widerspiegeln, sondern eher durch den geografischen Ursprung oder den Zelltropismus bestimmt werden. So zeigte M81 ein besonders hohes Maß an Homologie zu den anderen NPC Stämmen in den Gruppen der Strukturproteine, Immunevasine sowie denjenigen Proteinen, die an der Infektion von Epithelzellen beteiligt sind. Auch in den Proteinen, die bei der lytischen Replikation eine Rolle spielen, waren die Abweichungen in B95.8 (0.85%) und AG876 (0.72%) größer als in C666-1 (0.11%) und HKNPC1 (0.41%).

4.1.2 Sequenzunterschiede in T-Zell-Epitopen

Um den Einfluss der Polymorphismen in EBV-Antigenen auf die Immunerkennung zu ermitteln, wurden zunächst die Sequenzen von allen in der Literatur beschriebenen T-Zellepitopen in den EBV-Stämmen B95.8, M81 und AG876 verglichen. Dabei handelte es sich um 183 T-Zellepitope, wovon 118 von CD8+ und 65 von CD4+ T-Zellen erkannt wurden. Fast alle diese Epitope wurden im B95.8-Stamm identifiziert. Da die die Epitope umgebenden Aminosäuren einen Einfluss auf die Prozessierung und die Bindung an MHC-Moleküle haben (Walker et al. 2016; Steers et al. 2014), wurden die jeweils fünf N- und C-terminal an das Epitop angrenzenden Aminosäuren als „flankierende Regionen“ definiert und in diese Analysen mit eingeschlossen. Eine Liste der Epitope und deren flankierenden Regionen, welche Polymorphismen in mindestens einem der Stämme aufweisen, sind in Tabellen 20 und 21 dargestellt. Dabei zeigte sich, dass ca. die Hälfte aller von CD4+ und ein Drittel aller von CD8+ T-Zellen erkannten Epitope mindestens eine

Abweichung in der Epitopsequenz und/oder den flankierenden Regionen aufwiesen (Abbildung 3). Die meisten Sequenzunterschiede fanden sich beim Vergleich der beiden Typ 1-Stämme B95.8 und M81 mit dem Typ 2-Stamm AG876 (82% Abweichung in CD4+ und 35% in CD8+ T-Zellepitopen). Obwohl sie beide den Typ 1-Stämmen zugerechnet werden, unterschieden sich B95.8 und M81 noch in 48% der CD4+ und 27% der CD8+ T-Zellepitope.

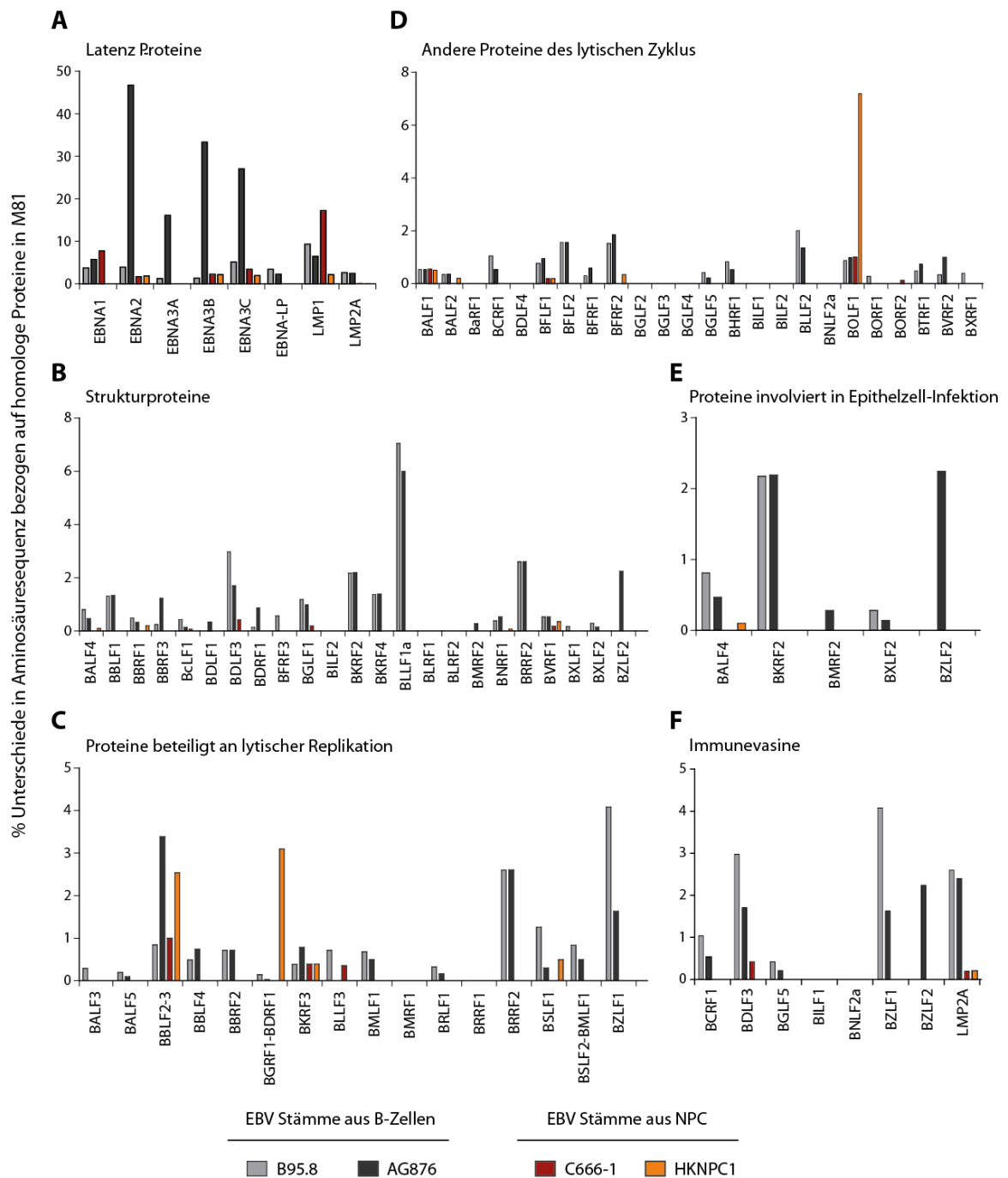


Abbildung 2: Vergleich der M81-Proteinsequenzen mit anderen Virusstämmen.

Proteinsequenzen der EBV-Stämme aus B-Zellen (B95.8 und AG876) und Nasopharynxkarzinomen (NPC) (C666-1 und HKNPC1) wurden mit denen aus M81 verglichen. Dargestellt wurde die anteilige Abweichung (%) der Aminosäuresequenzen der EBV-Stämme von denen des M81 bezogen auf verschiedene funktionelle Proteingruppen. Die M81-Proteinsequenzen wiesen ein hohes Maß an Homologie mit denen der anderen EBV-Stämme aus NPC auf. Die Latenz-Proteine (A) wiesen höhere Raten an Polymorphismen auf als die Proteine der lytischen Phase (B-F).

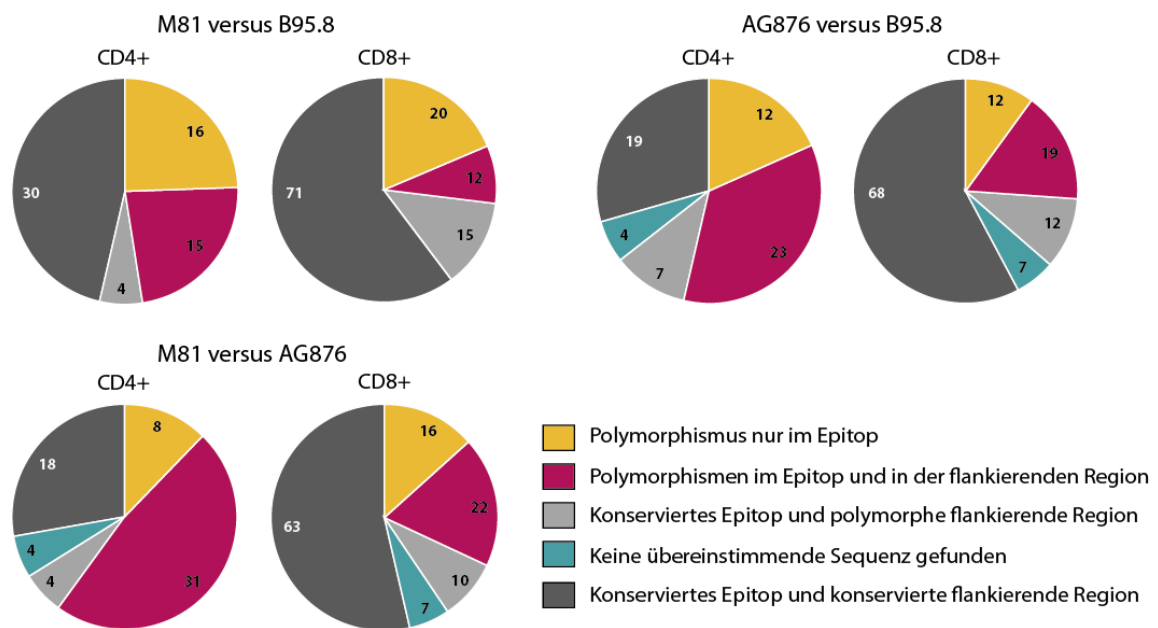


Abbildung 3: Polymorphismen in T-Zellepitopen und flankierenden Regionen.

Die Aminosäuresequenzen publizierter CD4+ (n=65) und CD8+ (n=118) T-Zellepitope aus B95.8 und deren flankierenden Regionen wurden mit den entsprechenden Epitopsequenzen in M81 (oben links) und AG876 (oben rechts) verglichen. Ein Vergleich der Epitopsequenzen aus M81 und AG876 ist im unteren Teil der Abbildung gezeigt. Als flankierende Regionen wurden die jeweils fünf N- und C-terminalen Aminosäuren definiert, die an die Epitope angrenzten. Die Zahlen in den Kreisdiagrammen zeigen die Anzahl der Epitope in jeder der farblich markierten Kategorien.

Tabelle 20: CD8+ T-Zellepitope einschließlich flankierender Regionen, die in mindestens einem der Virusstämme B95.8, AG876 oder M81 einen Polymorphismus aufwiesen.

CD8+ T-Zellepitope						
Antigen	Position im B95.8-Protein (Aminosäure)	HLA-Restriktion	B95.8-Epitopsequenz	M81-Epitopsequenz	AG876-Epitopsequenz	Referenz
EBNA1	72-80	B7	RDGVR-RPQKRPSCI -GCKGT	RDGVR-RPQKRPSCI -GCKGA	Identisch mit M81	(Blake et al. 2000)
	407-417	B35.01	RRPFF-HPVGEADYFEY -HQEGG	RRPFF-HPVGDADYFEY -LQEGG	RRPFF-HPVAEADYFEY -HQEGG	(Blake et al. 1997)
	476-494	n.d.	KHRGQ-GGSNPKFENIAEGL RALLA -RSHVE	KHRGQ-GGSNPKFENIAEGL RVLLA -RSHVE	KHRGE-GGSQKFENIAEGL RLLLA -RCHVE	(Fogg et al. 2009)
	508-526	n.d.	DEGTW-VAGVFVYGGSKTS LYNLRR -GTALAI	EEGNW-VAGVFVYGGSKTS LYNLRR -GIALAV	EDGNW-VAGVFVYGGSKTS LYNLRR -GIGLAI	(Fogg et al. 2009)
	528-536	B7	GTALA-IPQCRLTPL -SRLPF	GIALA-VPQCRLTPL -SRLPF	GIGLA-IPQCRLTPL -SRLPF	(Blake et al. 2000)
	574-582	A2.03	IFAEG-VLKDAIKDL -VMTKP	Identisch mit B95.8	IFAEG-(del)LKDAIKDL -VLPKP	(Blake et al. 1997)
EBNA2	14-23	B38	HGGQT-YHLIVDTSL -GNPSL	HGGQT-YHLIV-DTDSR-GNPSL	HGGQS-YNLIVDTDMS -GNPSL	(Chapman et al. 2001)
	42-51	A2/B51	QEQLS-DTPLPLTIF -VGENT	Identisch mit B95.8	Keine Übereinstimmung	(Schmidt et al. 1991)
	234-242	B55	LTVLQ-RPTELQPTP -SPPRM	LTVLQ-RPTELQPTP -SPQSM	PTPPP-RPTLPQPRI -PLIIP	Mackay LK. Unpublished (Hislop et al. 2007)
EBNA3A	158-166	B8	ASRRD-QAKWRLQTL -AAGWP	Identisch mit B95.8	Keine Übereinstimmung	(Burrows et al. 1994)
	176-184	A30.02	PMGYQ-AYSSWMYSY -TDHQT	Identisch mit B95.8	PMGYQ-AYSSWMYSY -TDPOV	(Steven et al. 1996)
	246-253	A24	QSCNP-RYSIFFDY -MAIHR	Identisch mit B95.8	QSSNP-CYSIFFDY -MAIHR	(Burrows et al. 1994)
	325-333	B8	AWNAG-FLRGRAYGI -DLLRT	AWNAG-FLRGRAYGL -DLLRT	AWNAG-LLRGRAYGQ -DLLRT	(Burrows, Sculley, et al. 1990)
	378-387	B27	GGPKV-KRPPIFIRRL -HRLLM	Identisch mit B95.8	SRDGT-KHRRPPIFIRRL -HRLLLM	Brooks J. Unpublished (Hislop et al. 2007)

	379-387	B7	<u>GP</u> KVK- RPPFI <u>R</u> RRL -HRLLM	Identisch mit B95.8	<u>RD</u> GTK- *ins(2aa)RPPFI <u>L</u> RRL -HRLLM	(Hill, Worth, et al. 1995)
	406-414	B62	QGKEV- LEKARGSTY -GTPRP	Identisch mit B95.8	Keine Übereinstimmung	(Rickinson and Moss 1997)
	450-458	B62	EPPTI- HLAAQGMAY - <u>PL</u> HEQ	EPPTI- HLAAQGMAY - <u>TL</u> HEQ	Keine Übereinstimmung	(Burrows et al. 1994) (Provenzano et al. 2007)
	458-466	B35.01	AQGMA- Y <u>PL</u> HEQHGM -APCPV	AQGMA- Y <u>TL</u> HEQHGM -APCPV	Keine Übereinstimmung	(Burrows et al. 1994)
	491-499	A29	DQLPG- V <u>ES</u> DGRVAC -APVPA	DQLPG- V <u>SS</u> DGRVAC -APVPA	DQLPG- V <u>PK</u> DGR <u>G</u> AC -APVPA	(Rickinson and Moss 1997)
	502-510	B7	VACAP- VP <u>A</u> PAGPIV -RPWEP <u>S</u>	Identisch mit B95.8	<u>G</u> ACAP- VP <u>A</u> L <u>A</u> GPIV -RPW <u>E</u> S	(Rickinson and Moss 1997)
	603-611	A3	RDRLA- RLRAEAQ <u>V</u> K -QASVE	Identisch mit B95.8	RDRLA- RLRAEAQ <u>A</u> R -QASVE	(Hill, Lee, et al. 1995)
	617-625	B46.01	QASVE- VQ <u>P</u> QLTQV -SPQQP	QASVE- VQ <u>P</u> QLTQV -SPQQP	Identisch mit M81	(Lin et al. 2008) (Whitney et al. 2002) (Midgley, Bell, McGeoch, et al. 2003)
EBNA3B	149-157	B27.05	CMTVR- HRCQAI <u>R</u> KK -PL <u>P</u> I <u>V</u>	Identisch mit B95.8	CMTVR- HRCQAI <u>R</u> QK -PL <u>P</u> I <u>D</u>	(Rickinson and Moss 1997)
	217-225	A24.02	<u>TR</u> HAT- TYSAGIVQ <u>I</u> -PR <u>I</u> SD	Identisch mit B95.8	<u>LR</u> HAI- TYSAGIVQ <u>L</u> -PR <u>M</u> SD	(Rickinson and Moss 1997)
	279-287	B58	G <u>T</u> KNR- V <u>S</u> F <u>I</u> EFVGW -LCKKD	Identisch mit B95.8	G <u>TR</u> NR- V <u>A</u> F <u>V</u> EFVGW -LCKKD	(Lee et al. 2000)
	399-408	A11	VYGRP- <u>A</u> V <u>F</u> D <u>R</u> K <u>S</u> DAK -STK <u>K</u> C	VYGRP- <u>A</u> V <u>F</u> N <u>R</u> K <u>S</u> DAK -STK <u>K</u> C	VYGRP- <u>S</u> V <u>F</u> Y <u>R</u> K <u>P</u> D <u>T</u> K -STK <u>K</u> C	(Gavioli et al. 1993)
	416-424	A11	KKCRA- IVT <u>D</u> ES <u>V</u> IK - <u>A</u> IE <u>E</u> E	KKCRA- IVT <u>D</u> ES <u>V</u> IN - <u>A</u> IE <u>E</u> E	KKCRA- IVT <u>D</u> LS <u>I</u> IK - <u>V</u> IE <u>D</u> E	(Gavioli et al. 1993)
	488-496	B35.01	GPQVT- <u>A</u> VLLHEESM -QGVQV	GPQVT- <u>I</u> VLLHEESM -QGVQV	Keine Übereinstimmung	(Rickinson and Moss 1997)
	657-666	B44	HQTPQ- VEITPYKPTW -AQIGH	Identisch mit B95.8	Keine Übereinstimmung	(Rickinson and Moss 1997)
EBNA3C	163-171	B44.03	GPLV <u>A</u> - EGGVGWRHW -LLTSP	Identisch mit B95.8	GPLV <u>V</u> - EGGVGWRHW -LLTSP	(Morgan et al. 1996)
	249-258	B27.05	AEVRF- LRGKWQRR <u>Y</u> R -RI <u>Y</u> DL	Identisch mit B95.8	AEVRF- LRGKWQRR <u>F</u> R -RI <u>F</u> DL	(Brooks et al. 1993)
	258-266	B27.02/04/05	WQRRY- RRI <u>D</u> LIEL -CGSLH	Identisch mit B95.8	WQRR <u>F</u> - RRI <u>D</u> LIEL -CGSLH	35)

	271-278	B39	LCGSL- HHI <u>WQ</u> NLL -QTEEN	Identisch mit B95.8	LCGSL- HH <u>VWQ</u> NML -QTEEN	(Rickinson and Moss 1997)
	281-290	B44.02	NLLQT- EENLLDFVRF -MGVMS	Identisch mit B95.8	NMLQT- EENLLDFVRF -MGVMS	(Burrows, Sculley, et al. 1990)
	335-343	B4402	ARRGI- KE <u>HVIQ</u> NAF -RKAQI	ARRGI- KD <u>HVIQ</u> NAF -RKAQL	ARRGI- KE <u>QVIQ</u> KAF -LKAQR	(Khanna et al. 1992)
	343-351	B27.05	VIQNA- FRKAQIQGL -SMLAT	VIQNA- FRKAQLQGL -SMLAT	VIQKA- FLKAQRQGL -SMLAT	(Brooks et al. 1993)
EBNA-LP	284-292	A2	RPPAR- SLREWLLR <u>I</u> -RDHFE	RPPAR- SLREWLLR <u>M</u> -RASFE	QPPAQ- SLREWLLR <u>I</u> -SERFD	(Lee et al. 2000)
LMP1	38-46	n.d.	LLALL- FWLYIVMS <u>D</u> -WTGGA	LLALL- FWLYIVMS <u>N</u> -WTGGA	Identisch mit B95.8	(Meij et al. 2002)
	72-82	B40	LIIFI- FRRDLLCPLG <u>A</u> -LGILL	LIIFI- FRRDLLCPLG <u>G</u> -LGILL	Identisch mit B95.8	(Meij et al. 2002)
	125-133	A2, A6802, A6901	LG <u>I</u> WI- Y <u>L</u> LE <u>M</u> LWRL -GATIW	LGL <u>W</u> I- Y <u>F</u> LE <u>L</u> JLWRL -GATIW	LGL <u>W</u> I- Y <u>L</u> LE <u>L</u> JLWRL -GATIW	(Khanna et al. 1998)
	166-174	A2	QQNWW- TLLVDLLW <u>L</u> -LL <u>F</u> LA	QQNWW- TLLVDLLW <u>L</u> -LL <u>F</u> MA	Identisch mit B95.8	(Khanna et al. 1998)
LMP2	141-154	n.d.	LAAIA- ASCFTASVSTV <u>V</u> TA -TGLAL	LAAIA- ASCFTASVSTV <u>S</u> A -TGLAL	Identisch mit B95.8	(Meij et al. 2002)
	144-152	A68	IAASC- FTASVSTV <u>V</u> -TATGL	IAASC- FTASVSTV <u>V</u> -SATGL	Identisch mit B95.8	(Straathof et al. 2005)
	200-208	B40.01	CLTWR- IEDPPFNS <u>L</u> -LFALL	CLTWR- IEDPPFNS <u>I</u> -LFALL	Identisch mit B95.8	(Lee et al. 1996)
	236-244	B27.04	LILAY-RRRWRLTV- CGG <u>I</u> M	LILAY-RRRWRLTV- CGG <u>M</u> M	Identisch mit B95.8	(Brooks et al. 1993)
	237-245	B14.01	ILAYR- RRWRRLTV <u>C</u> -GG <u>I</u> MF	ILAYR- RRWRRLTV <u>C</u> -GG <u>M</u> MF	Identisch mit B95.8	(Straathof et al. 2005)
	240-250	B27	YRRRW- RRLTVCGG <u>I</u> MF -LAC <u>V</u> L	YRRRW- RRLTVCGG <u>M</u> MF -LAC <u>V</u> L	Identisch mit B95.8	(Straathof et al. 2005)
	243-251	A1	RWRRL- TVCGG <u>I</u> MFL -AC <u>V</u> LV	RWRRL- TVCGG <u>M</u> MFL -AC <u>V</u> LV	Identisch mit B95.8	(Straathof et al. 2005)
	249-262	n.d.	VCGG <u>I</u> - MFLAC <u>V</u> LVLIVDAV -LQLSP	VCGG <u>M</u> - MFLAC <u>V</u> LVLIVDAV -LQLSP	Identisch mit B95.8	(Meij et al. 2002)
	257-265	A*0204, A*0217	AC <u>V</u> LV- LIVDAVLQ <u>L</u> -SPLLG	AC <u>L</u> VV- LIVDAVLQ <u>L</u> -SPLLG	Identisch mit B95.8	(Straathof et al. 2005)
	340-350	A11	VLLIC- SSCSCPLSK <u>I</u> -LLARL	VLLIC- SSCSCPLSK <u>V</u> -LLARL	Identisch mit B95.8	(Lee et al. 1996)
	350-359	A29	CPLSK- <u>I</u> LLARLFLY -ALALL	CPLSK- <u>V</u> LLARLFLY -ALALL	Identisch mit B95.8	(Straathof et al. 2005)
	419-427	A24	GSGNR- TYGPFV <u>M</u> CL -GGLLT	GSGNR- TYGPFV <u>M</u> SL -GGLLT	Identisch mit B95.8	(Lee et al. 1996)

	426-434	A2.01	GPVFM- <u>C</u> LGGLTMV -AGAVW	GPVFM- <u>S</u> LGGLTMV -AGAVW	Identisch mit B95.8	(Lee et al. 1993)
	442-451	A25	AVWLT- VM <u>S</u> NTLLSAW -ILTAG	AVWLT- VM <u>T</u> NTLLSAW -ILTAG	Identisch mit M81	(Rickinson and Moss 1997)
	447-455	A2	VM <u>S</u> NT-LLSAWILTA -GFLIF	VM <u>T</u> NT-LLSAWILTA -GFLIF	Identisch mit M81	(Lee et al. 2000)
BZLF1	52-64	B35.08	VLWPV- LPEPLPQQQLTAY -HV <u>S</u> T <u>A</u>	VLWPV- LPEPLPQQQLTAY -HV <u>S</u> <u>A</u>	Identisch mit M81	(Green et al. 2004)
	54-63	B35.01	WPVLP- EPLPQQQLTAY -HV <u>S</u> T <u>A</u>	WPVLP- EPLPQQQLTAY -HV <u>S</u> <u>A</u>	Identisch mit M81	(Saulquin et al. 2000)
	66-75	B58.01	LTAYH- V <u>S</u> T <u>A</u> PTGSWF - <u>S</u> APQP	LTAYH- V <u>S</u> <u>A</u> PTGSWF - <u>P</u> APQP	Identisch mit M81	(Abbott et al. 2013)
	81-89	B35.01	<u>S</u> APQP- APENAYQAY -AAPQL	<u>P</u> APQP- APENAYQAY -AAPQL	Identisch mit M81	(Redchenko and Rickinson 1999)
	172-183	B18	SLEEC- DSE <u>L</u> EIKRYKNR -VASRK	Identisch mit B95.8	SLEEC- DSE <u>L</u> IKRYKNR -VASRK	(Saulquin et al. 2000)
	186-201	C6	NRVAS- RKCRAKFK <u>Q</u> LLQHYS -EVA <u>A</u>	NRVAS- RKCRAKFK <u>H</u> LLQHYS -EVA <u>S</u>	Identisch mit M81	(Bogedain et al. 1995)
	190-197	B8	ASRKC- RAKFK <u>Q</u> LL -QHYS	ASRKC- RAKFK <u>H</u> LL -QHYS	Identisch mit M81	(Bogedain et al. 1995)
	121-129	B15.01	GDNST- VQ <u>I</u> AAAV <u>V</u> <u>E</u> -ACPGA	GDNST- VQ <u>P</u> AAAV <u>V</u> <u>L</u> -ACPGA	GDNST- VQ <u>P</u> AAAV <u>V</u> <u>E</u> -ACPGA	(Fiebiger et al. 2015)
	197-205	C8	KFK <u>Q</u> L- LQHYREV <u>A</u> <u>A</u> -AKSSE	KFK <u>H</u> L- LQHYREV <u>S</u> -AKSSE	Identisch mit M81	(Pudney et al. 2005)
	209-217	B60	<u>A</u> <u>A</u> AKS- SENDRLRL -LKQMC	<u>A</u> <u>S</u> AKS- SENDRLRL -LKQMC	Identisch mit M81	(Scotet et al. 1996)
BMLF1	435-444	B14	RSASC- SRLVRAILSP - <u>G</u> TGSL	RSASC- SRLVRAILSP - <u>A</u> TGSL	Identisch mit B95.8	Annels NE. Unpublished (Hislop et al. 2007)

Polymorphe Aminosäuren unterstrichen und fettgedruckt. Epitope von flankierenden Sequenzen durch Bindestrich getrennt. (del), Deletion von einer bis mehreren Aminosäuren. (ins), Insertion von einer bis mehrere Aminosäuren. Die HLA-Restriktionen der T-Zellen wurde von der Epstein-Barr-Virus T-Zellantigen Database <http://research4.dfci.harvard.edu/cvc/ebv/> des Dana-Faber Cancer Institute, Boston, USA, übernommen. n.d., HLA Restriktion ist nicht definiert.

Tabelle 21: CD4+ T-Zellepitope einschließlich flankierender Regionen, die in mindestens einem der Virusstämme B95.8, AG876 oder M81 einen Sequenzunterschied aufwiesen.

CD4+ T-Zell-Epitope						
Antigen	Position im B95.8-Protein (Aminosäure)	HLA-Restriktion	B95.8-Epitopsequenz	M81-Epitopsequenz	AG876-Epitopsequenz	Referenz
EBNA 1	71-85	DR11	HRDGV- RRPQKRPSICGCKG <u>T</u> -HGGTG	HRDGV- RRPQKRPSICGCKG <u>A</u> -HGGTG	Identisch mit M81	(Leen et al. 2001)
	403-417	DQ2	PPPGR- RPFHPV <u>GE</u> ADYFEY - <u>HQ</u> EGG	PPPGR- RPFHPV <u>GD</u> ADYFEY - <u>LQ</u> EGG	PPPGR- RPFHPV <u>AE</u> ADYFEY - <u>HQ</u> EGG	(Leen et al. 2001)
	429-448	DR1, DR3, DQ2, DQ5	DGEPD- <u>V</u> PPGAIEQGP <u>A</u> DDP GEGPST -GPRGQ	DGEPD- <u>V</u> PPGAIEQGP <u>T</u> DDP GEGPST -GPRGQ	DGEPD- <u>M</u> PPGAIEQGP <u>A</u> DDP GEGPST -GPRGQ	(Leen et al. 2001)
	455-469	n.d.	PRGQG- DGGRRKKGW <u>F</u> GKHR - <u>GQ</u> GGG	Identisch mit B95.8	PRGQG- DGGRRKKGW <u>Y</u> GKHR - <u>GE</u> GGG	(Leen et al. 2001)
	475-489	DR11	GQGGG- <u>N</u> PKFENIAEGLR <u>A</u> LL - <u>AR</u> SHV	GQGGG- <u>N</u> PKFENIAEGLR <u>V</u> LL - <u>AR</u> SHV	GEGGG- <u>S</u> QKFENIAEGLR <u>L</u> LL - <u>AR</u> CHV	(Leen et al. 2001)
	481-495	DQ2/3	<u>P</u> KFEN- IAEGLR <u>A</u> LLAR <u>S</u> HVE - <u>RT</u> DE	<u>P</u> KFEN- IAEGLR <u>V</u> LLAR <u>S</u> HVE - <u>RT</u> EE	<u>Q</u> KFEN- IAEGLR <u>L</u> LLAR <u>C</u> HVE - <u>RT</u> ED	(Paludan et al. 2002)
	481-500	DQ3, DQB1*04 02	<u>P</u> KFEN- IAEGLR <u>A</u> LLAS <u>H</u> VER <u>TT</u> DE - <u>GT</u> WVA	<u>P</u> KFEN- IAEGLR <u>V</u> LLAR <u>S</u> HVER <u>TT</u> EE - <u>GN</u> WVA	<u>Q</u> KFEN- IAEGLR <u>L</u> LLAR <u>C</u> HVER <u>TT</u> ED - <u>GN</u> WVA	(Paludan et al. 2002)
	485-499	n.d.	NIAEG- LR <u>A</u> LLARSHVERT <u>D</u> - <u>EG</u> TWV	NIAEG- LR <u>V</u> LLARSHVERT <u>E</u> - <u>EG</u> NWV	NIAEG- LR <u>L</u> LLARSHVERT <u>E</u> - <u>DG</u> NWV	(Leen et al. 2001)
	509-528	DR11, DR13, DQ3, DQ6	VAGVF- VYGGSKTSLYNLRRG <u>T</u> ALA <u>I</u> -PQCRL	VAGVF- VYGGSKTSLYNLRRG <u>I</u> ALA <u>V</u> -PQCRL	VAGVF- VYGGSKTSLYNLRRG <u>I</u> GLA <u>I</u> -PQCRL	(Leen et al. 2001)
	514-528	DRB1*11 01	VYGGG- KTSLYNLRRT <u>A</u> LA <u>I</u> -PQCRL	VYGGG- KTSLYNLRRG <u>I</u> ALA <u>V</u> -PQCRL	VYGGG- KTSLYNLRRG <u>I</u> GLA <u>I</u> -PQCRL	Unveröffentlichte Daten
	515-528	DR1	YGGSK- TSLYNLRRG <u>T</u> ALA <u>I</u> -PQCRL	YGGSK- TSLYNLRRG <u>I</u> ALA <u>V</u> -PQCRL	YGGSK- TSLYNLRRG <u>I</u> GLA <u>I</u> -PQCRL	(Khanna et al. 1995)
	518-530	DP3	SKTSL- YNLRRG <u>T</u> ALA <u>I</u> PQ -CRLTP	SKTSL- YNLRRG <u>I</u> ALA <u>V</u> PQ -CRLTP	SKTSL- YNLRRG <u>I</u> GLA <u>I</u> PQ -CRLTP	(Voo et al. 2002)
	519-533	DR4, DQ3	KTSLY- NLRRT <u>A</u> LA <u>I</u> PQCRL -TPLSR	KTSLY- NLRRG <u>I</u> ALA <u>V</u> PQCRL -TPLSR	KTSLY- NLRRG <u>I</u> GLA <u>I</u> PQCRL -TPLSR	(Leen et al. 2001)
	527-541	DR13	RG <u>T</u> AL- A <u>I</u> PQCRL <u>T</u> PLSRLPF -GMAPG	RG <u>I</u> AL- A <u>V</u> PQCRL <u>T</u> PLSRLPF -GMAPG	RG <u>I</u> GL- A <u>I</u> PQCRL <u>T</u> PLSRLPF -GMAPG	(Mautner et al. 2004)
	529-543	DR14	<u>T</u> ALA <u>I</u> - PQCRL <u>T</u> PLSRLPFGM -APGPG	<u>T</u> ALA <u>V</u> - PQCRL <u>T</u> PLSRLPFGM -APGPG	<u>I</u> GLA <u>I</u> - PQCRL <u>T</u> PLSRLPFGM -APGPG	(Leen et al. 2001)

	544-563	DR1, DR3, DQ2, DQ5	LPFGM- APGPGPQPGLRES IVCYF <u>M</u> -VFLQT	Identisch mit B95.8	LPFGM- APGPGPQPGLRES IVCYF <u>I</u> -VFLQT	(Leen et al. 2001)
	551-570	DR1	GPGPQ- PGPRESIVCYF <u>M</u> VFL QTHI -FAE <u>V</u> L	Identisch mit B95.8	GPGPQ- PGPRESIVCYF <u>I</u> VFL QTHI -FAE <u>G</u> L	(Paludan et al. 2002)
	554-573	DR1, DR3, DQ2, DQ5	PQGPQ- LRESIVCYF <u>M</u> VFLQTH IFAE -VLKDA	Identisch mit B95.8	PQGPQ- LRESIVCYF <u>I</u> VFLQTH IFAE -GLKDA	(Leen et al. 2001)
	561-573	DR11, 12, 13	ESIVC- YF <u>M</u> VFLQTHIFAE -VLKDA	Identisch mit B95.8	ESIVC- YF <u>I</u> VFLQTHIFAE -GLKDA	(Voo et al. 2005)
	574-593	DR1, DR3, DQ2, DQ5	HIFAE- VLKDAIKDLV <u>M</u> T KPAPTCNI -RVTVC	HIFAE- VLKDAIKDLV <u>M</u> T KPAPTCNI -KVTVC	HIFAE- GLKDAIKDLV <u>L</u> P KPAPTCNI -KVTVC	(Leen et al. 2001)
	594-613	n.d.	PTCNI- RVTVCSDGVDLPP WFPPM -VEGAA	PTCNI- KVTVCSDGVDLPP WFPPM -VEGAA	Identisch mit M81	(Leen et al. 2001)
EBNA2	11-30	DR4	LALHG- GQTY <u>H</u> LIVDT <u>S</u> LG NPSSLV-IP <u>S</u> NP	LALHG- GQTY <u>H</u> LIVDT <u>S</u> RG NPSSLV -IP <u>S</u> NP	LALHG- GQSY <u>N</u> LIVDT <u>M</u> SG NPSSLV -IP <u>T</u> NP	(Long et al. 2005a)
	46-65	n.d.	SDT <u>P</u> L- I <u>P</u> L <u>T</u> I <u>E</u> VGENTG <u>V</u> PP L <u>P</u> PP -PPPP	SDT <u>P</u> L- I <u>P</u> L <u>T</u> I <u>E</u> VGENTG <u>V</u> PP P <u>P</u> PP -PPPP	S <u>N</u> N <u>P</u> L- I <u>Q</u> L <u>I</u> <u>V</u> VGENG <u>A</u> P <u>P</u> P <u>Q</u> PP -PPPP	(Long et al. 2005a)
	206-225	n.d.	TPPTP- LPPATL <u>T</u> VPPRPR PTTLPP -TPLLT	TPPTP -LPPATL <u>L</u> VPPRPR PTTLPP -TPLLT	Keine Übereinstimmung	(Long et al. 2005a)
	276-295	DR7, 52a, 52b, 52c	PDSPE- PRSP <u>T</u> VFYNI <u>P</u> MPL PPSQL -PPPAA	PDSPE- PRSP <u>N</u> VFYNI <u>P</u> MPL PPSQL -PPPAA	Keine Übereinstimmung	(Long et al. 2005a) (Lin et al. 2008)
	280-290	DQ2/DQ 7	EPRSP- T <u>V</u> FYNI <u>P</u> MPL -PPSQL	EPRSP- N <u>V</u> FYNI <u>P</u> MPL -PPSQL	Keine Übereinstimmung	(Khanna et al. 1997)
EBNA3A	364-383	DR15	SDGDD- E <u>D</u> L <u>P</u> C <u>I</u> VS <u>R</u> G <u>G</u> P K <u>V</u> K <u>R</u> PP <u>I</u> F -I <u>R</u> RL <u>H</u>	Identisch mit B95.8	SDGDD- E <u>E</u> L <u>P</u> R <u>V</u> S <u>R</u> D <u>G</u> T K <u>H</u> R <u>R</u> PP <u>I</u> F -L <u>R</u> RL <u>H</u>	(Long et al. 2005a)
	649-668	n.d.	G <u>A</u> P <u>F</u> S- QVAD <u>V</u> <u>R</u> A <u>P</u> G <u>V</u> P AMQP <u>Q</u> YF -DL <u>P</u> L <u>I</u>	Identisch mit B95.8	G <u>S</u> P <u>F</u> S- QVAD <u>V</u> A <u>R</u> E <u>S</u> G <u>V</u> P AMQP <u>Q</u> YF -DL <u>P</u> L <u>I</u>	(Long et al. 2005a)
EBNA3C	66-80	DR1, DR13, DQ5, DQ6	S <u>R</u> G <u>D</u> E- NRGWMQ <u>R</u> IRRR RRRR -A <u>A</u> L <u>S</u> G	Identisch mit B95.8	R <u>R</u> G <u>D</u> E- NRGWMQ <u>R</u> IRRR RRRR -A <u>A</u> L <u>S</u> G	(Leen et al. 2001)
	100-119	DR16	PPW <u>L</u> P- PHDITY <u>P</u> Y <u>I</u> ARNIR DAAC <u>R</u> AV -K <u>Q</u> S <u>H</u> L	PPW <u>L</u> P- PHDITY <u>P</u> Y <u>I</u> ARNIR DAAC <u>R</u> AV -K <u>V</u> S <u>M</u> P	PPW <u>E</u> P- PHDITY <u>P</u> Y <u>V</u> ARNIR DAAC <u>Q</u> AV -K <u>H</u> S <u>H</u> L	(Landais et al. 2004)
	141-155	DR13	LDTQH- ILCFVMAARQLQDI -RRG <u>P</u> L	LDTQH- VLCFVMAARQLQDI -RRG <u>P</u> L	LDTQH- L <u>L</u> CFVMAARQLQDI -RRG <u>P</u> L	(Leen et al. 2001)
	325-339	DRB1-080 1	NAPPN- ENPYHARRGI <u>E</u> H <u>V</u> I -Q <u>N</u> A <u>F</u> R	NAPPN- ENPYHARRGI <u>K</u> D <u>H</u> V -Q <u>N</u> A <u>F</u> R	NAPPN- ENPYHARRGI <u>E</u> Q <u>V</u> I -Q <u>K</u> A <u>F</u> L	(Yu et al. 2015)

	401-415	DR11, DR14, DQ3, DQ5	NMEPV- QQRPMFVSRV <u>PAKK</u> -PR <u>KLP</u>	Identisch mit B95.8	NMEPV- QQRPMFVSRV <u>PVRK</u> -PRT <u>LP</u>	(Leen et al. 2001)
	546-560	DR1, DR13, DQ5, DQ6	RSGRR- QKRA <u>APPTVSPSDIG</u> -PP <u>AVG</u>	RSGRR- QKRA <u>APPTVSPSDIG</u> -PP <u>AAG</u>	RSGRR- QKRAM <u>PPVSPDAG</u> -PP <u>STR</u>	(Leen et al. 2001)
	586-600	DR1, DR13, DQ5, DQ6	PAAGP- PAAGPPAAG <u>PRILA</u> -P <u>LSAG</u>	PAAGP- PAAGPPAAG <u>PAAG</u> -P <u>PRIMA</u>	Keine Übereinstimmung	(Leen et al. 2001)
	626-640	DR11, DR14, DQ3, DQ5	<u>RIMAP</u> - PP <u>VVRMFRERQLPQ</u> -ST <u>GRK</u>	Identisch zu B95.8	<u>PRDMA</u> - PT <u>VVHMFRERLLIQ</u> -ST <u>GPA</u>	(Leen et al. 2001)
	649-660	n.d.	ST <u>GRK</u> - P <u>QCFWEMRAG</u> <u>REITQ</u> -M <u>QQEP</u>	ST <u>GRK</u> - P <u>QCFWEMRAG</u> <u>GEITQ</u> -M <u>QQEP</u>	ST <u>GPA</u> - P <u>RSFWEMRAG</u> <u>RDAPK</u> -I <u>QQEP</u>	(Leen et al. 2001)
	741-760	DR1/DR4	<u>DVAAQ</u> - P <u>APQAPYQGYQEP</u> P <u>APQAPY</u> -Q <u>GYQE</u>	Identisch mit B95.8	<u>GREDL</u> - Q <u>ATQAPYPGYQEP</u> <u>RPPQAPF</u> -V <u>GDYG</u>	(Leen et al. 2001)
	961-986	DR4, DQ2, DQ3, DQ5	QAT <u>AE</u> - AQEILSDNSEISVFPK -DAKQT	Identisch mit B95.8	QAT <u>SE</u> - AQEILSDNSEISVFPK -DAKQT	(Leen et al. 2001)
LMP1	130-144	DR1, DR4, DQ1, DQ3	<u>YLLEM</u> - LWRLGATI <u>WQL</u> LAF <u>F</u> -LAF <u>FL</u>	<u>YFLEI</u> - LWRLGATI <u>WQLLAFI</u> -LAF <u>FL</u>	<u>YLLEI</u> - LWRLGATI <u>WQLLAFF</u> -LAF <u>FL</u>	(Leen et al. 2001) (Pati et al. 2001) (Thach et al. 2001)
	212-226	DQ0601	QATDD- <u>SGHESDSNSNE</u> GRHH -LL <u>VSG</u>	QATDD- <u>SSHESDSNSNE</u> GRHH -LL <u>VSG</u>	QATDD- <u>SGHESDSNSNE</u> GRHH -LL <u>VIG</u>	(Haigh et al. 2008)
	340-354	n.d.	<u>GPPLM</u> - TDGGG <u>GSHSDS</u> <u>GHGG</u> -GDP <u>HL</u>	<u>DPPSM</u> - TDGGG*del(10aa)* -GDP <u>HL</u>	<u>GPPSM</u> - TDGGG*del(10aa)* -GDP <u>HL</u>	(Leen et al. 2001)
LMP2	149-163	DR1	FTASV- STV <u>V</u> TATGLALSLLL -LA <u>AVA</u>	FTASV- STV <u>V</u> SATGLALSLLL -LA <u>AVA</u>	Identisch mit B95.8	(Leen et al. 2001)
	169-182	DR1, DR13, DQ5, DQ6	AA <u>VAS</u> - SS <u>Y</u> AAAQRKLLTPV -TVL <u>TA</u>	AA <u>VAN</u> - SS <u>Y</u> AAAQRKLLTPV -TVL <u>TA</u>	Identisch mit B95.8	(Leen et al. 2001)
	224-243	n.d.	LQGIY- VLV <u>M</u> LVLLILAYRRR WRRLT -VCGG <u>I</u>	LQGIY- VLV <u>M</u> LVLLILAYRRR WRRLT -VCGG <u>M</u>	Identisch mit B95.8	(Leen et al. 2001)
	385-398	n.d.	FKSLS- STEFIP <u>N</u> LCM <u>LL</u> -IVAGI	FKSLS- STEFIP <u>H</u> LCM <u>LL</u> -IVAGI	Identisch mit B95.8	(Leen et al. 2001)
BZLF1	174-188	DR13	EECD <u>S</u> - EL <u>D</u> IKRYKNRVASRK -CRAK <u>F</u>	Identisch mit B95.8	EECD <u>S</u> - EL <u>D</u> IKRYKNRVASRK -CRAK <u>F</u>	(Adhikary et al. 2006)
	207-221	DQB1*04 02	EVA <u>AA</u> - KSS <u>EN</u> DRLLLLKQM -CPSL <u>D</u>	EVA <u>SA</u> - KSS <u>EN</u> DRLLLLKQM -CPSL <u>D</u>	Identisch mit M81	(Adhikary et al. 2006)

BLLF1	61-81	DRw15	GKKH Q - L D LDFG Q LTPHT KAVYQPRGA -FGGSE	Identisch mit B95.8	GKKH K - L N LDFG L LTPHT KAVYQPRGA -FGGSE	(Wallace et al. 1991)
	65-79	DRB1*13 01	Q L D L D - FG Q LTPHTKAVYQPR -GAFGG	Identisch mit B95.8	K L N L D - FG L LTPHTKAVYQPR -GAFGG	(Adhikary et al. 2006)

Gelistet sind Epitope und deren flankierende Regionen, welche als die jeweils fünf N- und C-terminal angrenzenden Aminosäuren definiert und durch Bindestrich abgegrenzt wurden. Polymorphe Aminosäuren wurden fettgedruckt und unterstrichen, analog Tabelle 20. Die HLA-Restriktionen der T-Zellen wurde von der Epstein-Barr-Virus T-Zellantigen Database <http://research4.dfci.harvard.edu/cvc/ebv/> des Dana-Faber Cancer Institute, Boston, USA, übernommen. n.d., HLA Restriktion ist nicht definiert.

4.1.3 Einfluss von Aminosäureaustauschen in EBV-Epitopen auf die Erkennung durch CD8+ T-Zellen

Aminosäureaustausche in T-Zellepitopen können die Antigenprozessierung, MHC-Bindung, oder Erkennung durch den T-Zellrezeptor beeinflussen (Neefjes et al. 2011; Desai and Kulkarni-Kale 2014). Um den Einfluss von Polymorphismen in EBV-Epitopen auf die T-Zellerkennung zu untersuchen, wurden fünf Epitope ausgewählt, die in anderen Viren Aminosäureaustausche aufwiesen und gegen die T-Zellklone zur Verfügung standen. Damit wurde die T-Zellerkennung der verschiedenen Epitopvarianten getestet (siehe Tabelle 22). Die verwendeten T-Zellklone erkannten unterschiedliche lytische oder latente Antigene aus B95.8 und waren aus verschiedenen EBV-positiven Spendern von der Arbeitsgruppe etabliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden.

Tabelle 22: Getestete polymorphe CD8+ T-Zellepitope

	EBNA1 "HPV"	BZLF1 "RAK"	BZLF1 "VQT"	LMP2A "IED"	LMP2A "CLG"
HLA- Restriktion	HLA-B*3501	HLA-B*0801	HLA-B*1501	HLA-*B4001	HLA-A*0201
Epitop- position (B95.8)	AA 407-417	AA 190-197	AA 121-129	AA 200-208	AA 426-434
B95.8	RRPFF- HPVGEADYFEY -HQEGG	ASRKC- RAKFKQLL -QHYRE	GDNST- VQTAAAVVF -ACPGA	CLTWR- IEDPPFNSL -LFALL	GPVFM CLGGLTMV AFAVW
M81	RRPFF- HPVGDADYFEY -LQEGG	ASRKC- RAKFKHLL -QHYRE	GDNST- VQPAAAVVL -ACPGA	CLTWR- IEDPPFNSI -LFALL	GPVFM SLGGLTMV AGAVW
AG876	RRPFF- HPVAEADYFEY -HQEGG	#	GDNST- VQPAAAVVF -ACPGA	*	*

* wie B95.8 Sequenz; # wie M81 Sequenz
Epitopsequenzen fettgedruckt, Aminosäure (AA) -austausche unterstrichen.

Wurden EBNA1-HPV-spezifische CD8+ T Zellen mit HLA-B*3501-exprimierenden APC kokultiviert, die mit den drei verschiedenen EBNA1-HPV-Epitoppeptidvarianten in steigender Konzentrationen beladen worden waren, so führte der Aminosäureaustausch von Glutaminsäure zu Asparaginsäure (E>D) an Position 5 des M81-Epitopes zu einem starken Abfall der T-Zellantwort. Im Gegensatz dazu hatte der Glycin zu Alanin Austausch an Position 4 des AG876-Epitops keinen Effekt auf die Erkennung durch den B95.8-Epitop spezifischen T-Zellklon (Abbildung 4).

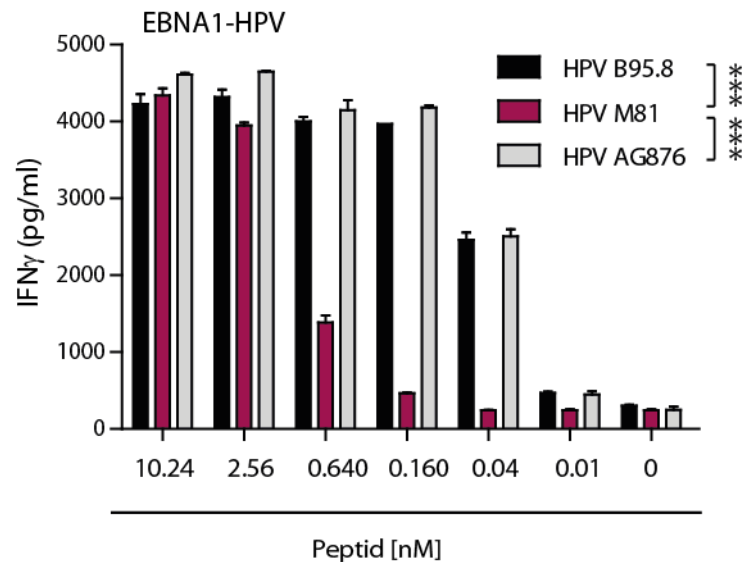


Abbildung 4: Erkennung der M81- und AG876-HPV-Epitopvarianten durch B95.8-epitopspezifische CD8+ T-Zellen.

HLA-B*3501-positive antigenpräsentierende Zellen wurden mit den verschiedenen EBNA1-HPV-Epitopvarianten der EBV-Stämme B95.8, M81 und AG876 beladen. Anschließend wurden sie mit CD8+ T-Zellen kokultiviert, die spezifisch für das HPV-Epitop des EBNA1-Proteins aus B95.8 waren. Die IFN γ -Sekretion der T-Zellen als Maß der T-Zellerkennung wurde mittels ELISA gemessen.

Um darüber hinaus den Einfluss der Aminosäureaustausche auf endogen exprimierte Antigene zu bestimmen, wurden die mit einem His₆-Etikett versehenen Versionen der verschiedenen *EBNA1*-Gene auf Plasmide kloniert und in EBV-negative DG75-Zellen zusammen mit einem Expressionsplasmid für HLA-B*3501 transfiziert. Wie im Peptidtitrationsexperiment erkannte dabei der B95.8-spezifische HPV-T-Zellklon Zellen, die mit den EBNA1-Varianten aus B95.8 und AG876, jedoch kaum Zellen, die mit der M81-Variante transfiziert worden waren. Um auszuschließen, dass diese unterschiedliche Erkennung der Zielzellen auf verminderter Transfektionseffizienz oder Proteinexpression beruhte, wurde Western-Blot-Analysen der Transfektanten durchgeführt. Alle drei EBNA1-Proteine zeigten ähnliche Expressionsniveaus, sodass vermutlich der E>D Aminosäureaustausch im Epitop auch für die verminderte Erkennung der endogen exprimierten EBNA1-Variante aus M81 verantwortlich war (Abbildung 5).

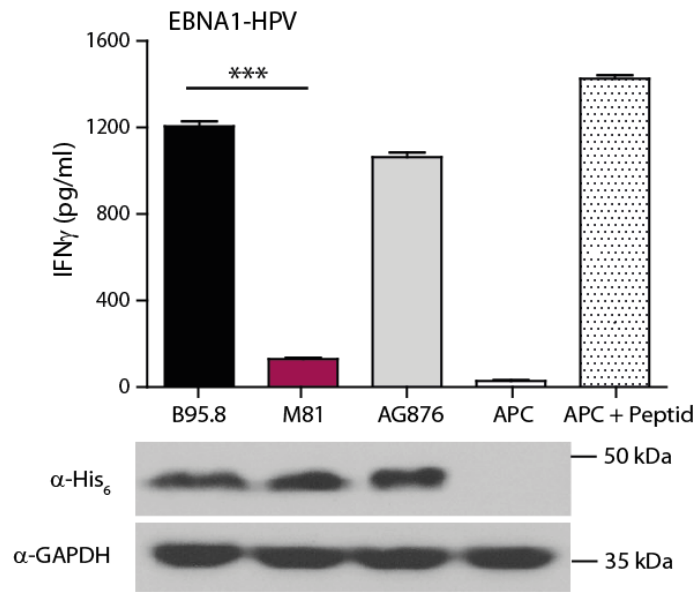


Abbildung 5: Erkennung von Zielzellen durch EBNA1-HPV-spezifische CD8+ T-Zellen nach endogener Expression verschiedener EBNA1-Varianten.

Die Präsentation von endogenen Antigenen wurde nach Transfektion EBV-negativer DG75-Zellen mit Expressionsvektoren für das HLA-B*3501-Allel sowie jeweils einer der Glycin-Alanin-(GA)-Repeat-deletierten EBNA1-Varianten der drei Viren (B95.8, M81 und AP876) und Kokultivierung der transfizierten Zellen mit B95.8-HPV-spezifischen CD8+ T-Zellen getestet. Als Negativkontrolle dienten DG75-Zellen, die nur mit dem HLA-Gen transfiziert worden waren (APC), während als Positivkontrolle diese transfizierten Zellen mit B95.8-HPV-Peptid beladen wurden (APC+Peptid). Die T-Zellantwort wurde mittels eines IFN γ -ELISA gemessen. Die Transfektionseffizienz der drei rekombinanten EBNA1-Proteine wurde mittels Western-Blot erfasst, da die His₆-Markierung der rekombinanten Proteine mit einem His₆-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden konnte (α -His₆). Der Nachweis von GAPD diente als Ladekontrolle (α -GAPDH).

Ähnliche Versuche wurden für das EBV-Protein BZLF1 durchgeführt, welches zwei polymorphe CD8+ T-Zellepitope, VQT und RAK, enthält, für die spezifische T-Zellklone zur Verfügung standen (Tabelle 22). Um wiederum den Einfluss von Aminosäureaustauschen in den T-Zellepitopen zu untersuchen, wurden im Falle des BZLF1-VQT-Epitops HLA*B-1501-positive APC mit den verschiedenen Epitopvarianten in Peptidform beladen. Dabei erkannten die B95.8-VQT-spezifischen CD8+ T-Zellen lediglich die B95.8-Variante, jedoch nicht die M81- oder AG876-Peptide, sodass die Aminosäure Threonin an Position drei, welche in M81 und AG876 durch Prolin ersetzt ist, essentiell für die Erkennung des Epitops durch B95.8-spezifische T-Zellen war (Abbildung 6). Da der Aminosäureaustausch T>P zu einem vollständigen Verlust der T-Zellerkennung führte, konnte der Einfluss des zusätzlichen Polymorphismus an Position neun mit der Substitution von Phenylalanin durch Leucin (F>L) im M81 Epitop nicht beurteilt werden.

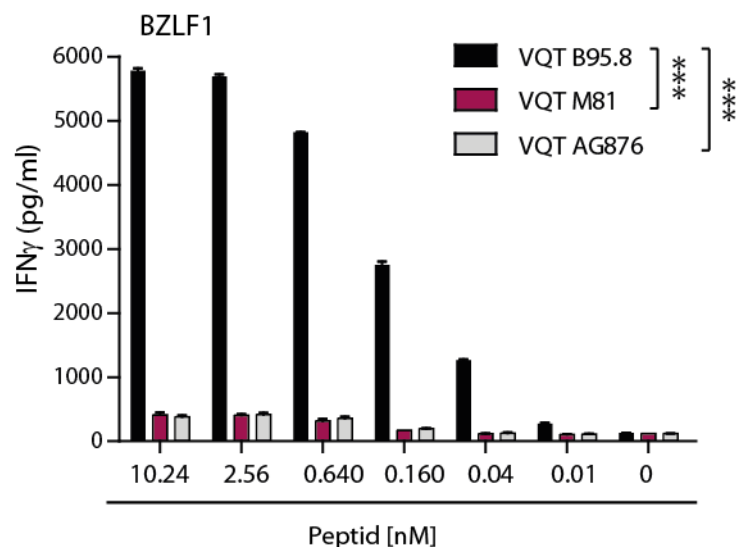


Abbildung 6: Erkennung der M81- und AG876-VQT-Epitopvarianten durch B95.8-epitopspezifische CD8+ T-Zellen.

Antigenpräsentierende Zellen wurden mit den BZLF1-VQT-Epitopvarianten der EBV-Stämme B95.8, M81 und AG876 beladen (Peptid) und mit CD8+ T-Zellen abgefragt, welche spezifisch für das VQT-Epitop des BZLF1- Proteins von B95.8 waren. Die T-Zellantwort wurde mittels eines IFN γ -ELISA gemessen.

Im Falle des ebenfalls aus BZLF1 stammenden RAK-Epitops führte ein Austausch von Glutamin zu Histidin (Q>H) im Epitop aus M81 und AG876 zu einer verstärkten Erkennung durch CD8+ T-Zellen (Abbildung 7).

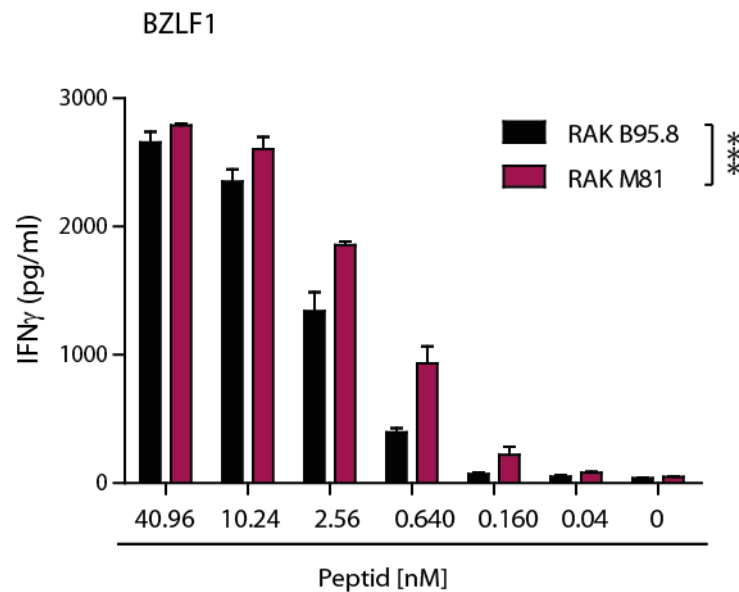


Abbildung 7: Erkennung der M81-RAK-Epitopvarianten durch B95.8-epitopspezifische CD8+ T-Zellen.

Antigenpräsentierende Zellen wurden mit den BZLF1-RAK-Epitopvarianten der EBV-Stämme B95.8 und M81 beladen (Peptid) und danach mit CD8+ T-Zellen spezifisch für das RAK-Epitop des BZLF1-Proteins aus B95.8 über Nacht kokultiviert. Die IFN γ -Ausschüttung der T-Zellen wurde mittels ELISA quantifiziert.

Konsistente Ergebnisse wurden in analogen Experimenten nach endogener Expression der BZLF1-Varianten aus den drei Virusstämmen erhalten. Während VQT-spezifische T-Zellen lediglich Zielzellen erkannten, die mit BZLF1 aus B95.8 transfiziert worden waren, wurden alle Zielzellen gleichermaßen von den RAK-spezifischen CD8+ T-Zellen erkannt. Wie in den Peptidtitrationsexperimenten wurde die M81- und AG876-RAK-Epitopvariante besser als die B95.8-Sequenz erkannt (Abbildung 8). Dadurch konnte auch ausgeschlossen werden, dass die fehlende Erkennung durch VQT-spezifische T-Zellen auf einem unterschiedlich ausgeprägten Expressionsniveau der Proteine beruhte.

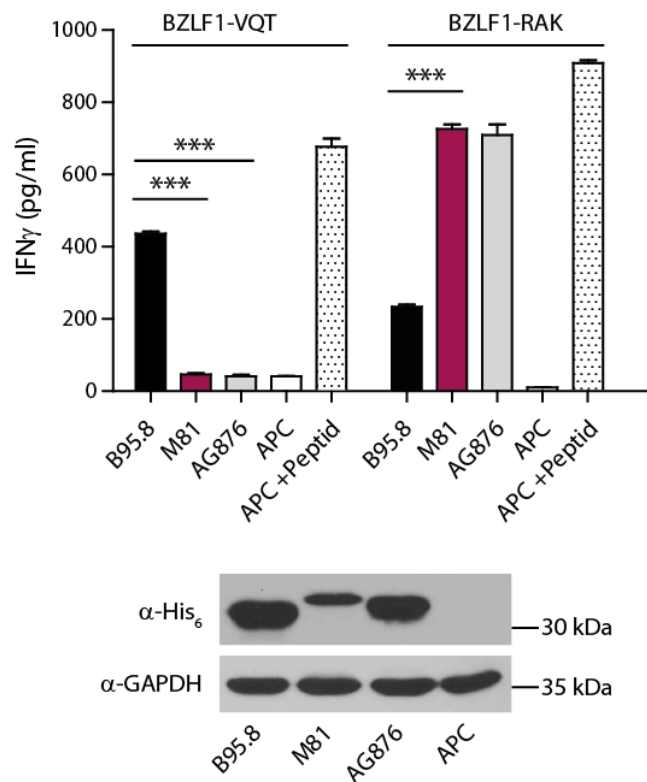


Abbildung 8: Erkennung von Zielzellen durch BZLF1-VQT- und BZLF1-RAK-spezifische CD8⁺ T-Zellen nach endogener Expression verschiedener EBNA1-Varianten.

Die Präsentation von endogenem Antigen wurde nach Transfektion EBV-negativer DG75-Zellen mit Expressionsvektoren für HLA-B*1501 oder HLA-B*0801 sowie jeweils einer BZLF1-Variante der drei Viren (B95.9, M81, AG876) und anschließender Kokultivierung der transfizierten Zellen mit B95.8-VQT- oder B95.8-RAK-spezifischen CD8⁺ T-Zellen getestet. Als Negativkontrolle dienten DG75 Zellen, die nur mit dem entsprechenden HLA-Gen transfiziert worden waren (APC), während als Positivkontrolle diese Zellen mit dem entsprechenden B95.8-Peptid beladen wurden (APC+Peptid). Die T-Zellantwort wurde mittels eines IFN γ -ELISA gemessen. Die Transfektionseffizienz der drei rekombinanten BZLF1-Proteine wurde mit Hilfe eines gegen das His₆-Etikett am C-Terminus gerichteten Antikörpers im Western-Blot überprüft (α -His₆). Der Nachweis von GAPDH diente dabei als Ladekontrolle (α -GAPDH).

Analoge Versuche wurden für die beiden polymorphen Epitope IED und CLG des Proteins LMP2A durchgeführt, für die freundlicherweise spezifische CD8⁺ T-Zellklone von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurden. Im Vergleich zur B95.8-Sequenz führte der Austausch von Leucin zu Isoleucin (L>I) auf Position

neun des IED-Epitops in M81 zu einem Abfall der Antwort nach exogener Beladung von Zielzellen mit entsprechenden Peptiden (Abbildung 9), sowie nach endogener Expression der LMP2A-Varianten. Im Gegensatz dazu führte der Aminosäureaustausch Cystein zu Serin (C>S) auf Position eins des CLG-Epitops in M81 zu einer gesteigerten T-Zellerkennung in Peptidtitrationsexperimenten (Abbildung 10), wohingegen die Erkennung nach endogener LMP2A-Expression vermindert war (Abbildung 11). Dieser Abfall der T-Zellantwort basierte nicht auf einer verminderten Expression der LMP2A-Variante aus M81, denn in Western-Blots konnte sogar eine im Gegensatz zur B95.8-Variante gesteigerte LMP2A-Expression in den transfizierten Zellen gezeigt werden. Um zu testen, ob LMP2A aus M81 ineffizienter prozessiert wird als die B95.8-Variante und/oder ausgeprägtere immunevasive Eigenschaften besaß (Rancan et al. 2015), wurde auch die Präsentation des in beiden Stämmen konservierten LLW-Epitops in den transfizierten Zellen untersucht. Die im Vergleich zur B95.8-Variante bessere Erkennung des konservierten LLW-Epitops auf Zielzellen, die mit den LMP2A-Variante aus M81 transfiziert worden waren, legte nahe, dass das Protein einer effizienten endogenen Antigenprozessierung unterlag und die verminderte Erkennung des CLG-Epitops nicht durch eine erhöhte immunevasive Funktion des LMP2A Proteins aus M81 erklärt werden konnte. Die Zusammenschau dieser Ergebnisse wies vielmehr auf eine verminderte Antigenprozessierung des M81-CLG-Epitops hin. Ob hierzu der C>S-Austausch an Position eins des Epitops oder der F>G-Austausch in der C-terminalen flankierenden Region beitrug, müssen weitere Experimente zeigen. Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass Polymorphismen in T-Zellepitopen unvorhersehbare Auswirkung auf die T-Zellerkennung haben können. Darüber hinaus wiesen sie darauf hin, dass Aminosäureaustausche in Epitopen und/oder direkt flankierenden Regionen möglicherweise die Antigenprozessierung beeinflussen.

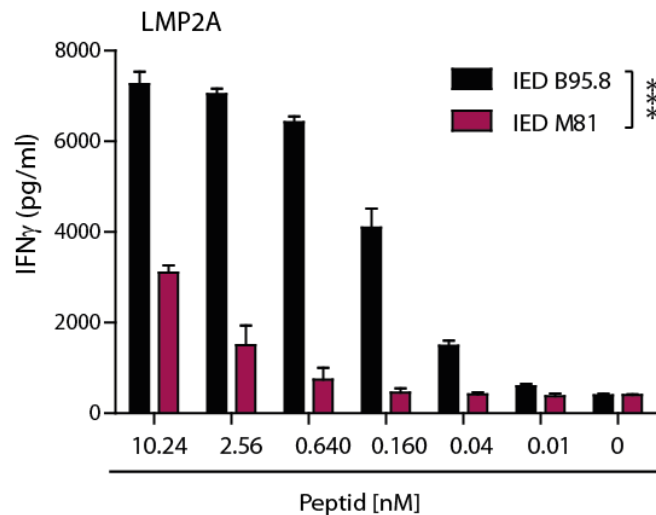


Abbildung 9: Erkennung der M81-IED-Epitopvarianten durch B95.8-epitopspezifische CD8+ T-Zellen.

Antigenpräsentierende Zellen wurden mit den entsprechenden Peptiden der LMP2A-IED-Epitopvarianten der EBV-Stämme B95.8 und M81 in abnehmenden Mengen beladen und anschließend mit CD8+ T-Zellen spezifisch für das IED-Epitop des LMP2A-Proteins aus B95.8 kokultiviert. Die IFN γ -Sekretion der T-Zellen als Maß für die Antigenerkennung wurde mittels ELISA gemessen.

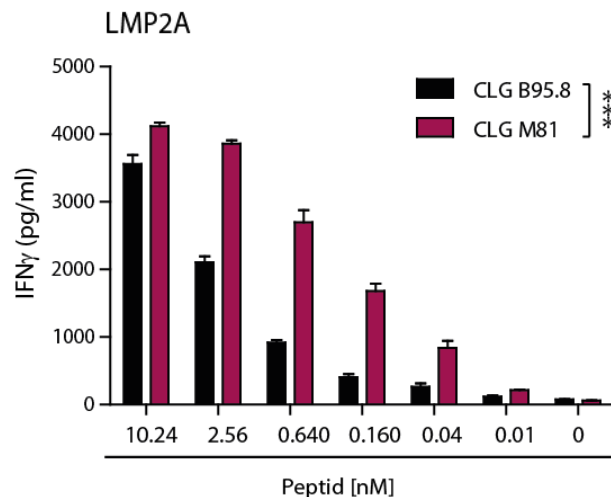


Abbildung 10: T-Zellerkennung der LMP2A-CLG-Epitopvarianten aus B95.8 und M81 nach exogener Beladung von Zielzellen.

Antigenpräsentierende Zellen wurden mit den entsprechenden Peptiden der LMP2A-CLG-Epitopvarianten der EBV-Stämme B95.8 und M81 in unterschiedlichen Mengen beladen. Nach Kokultur mit CD8+ T-Zellen, die spezifisch für das CLG-Epitop des LMP2A Proteins aus B95.8 waren, wurde die Konzentration an IFN γ im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt.

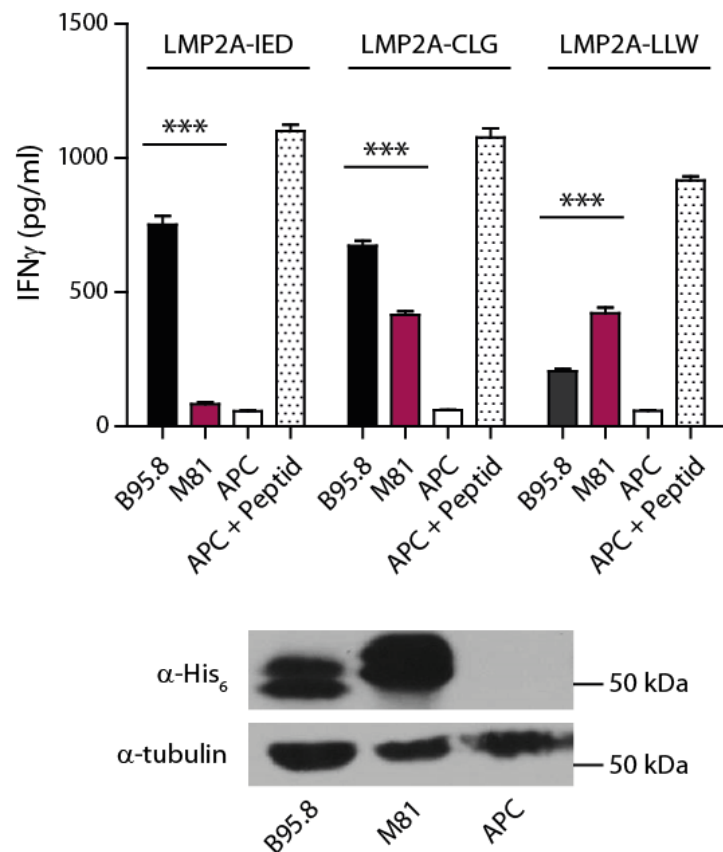


Abbildung 11: Erkennung der M81- IED, -CLG- und -LLW--Epitopvarianten durch B95.8-epitopspezifische CD4+ T-Zellen.

Um die Präsentation der endogenen Antigene zu untersuchen, wurden die EBV-negativen DG75-Zellen mit Expressionsvektoren für HLA-B*4001 und HLA-A*0201 sowie den LMP2A-Varianten aus B95.8 oder M81 transfiziert. Anschließend wurden die transfizierten Zellen mit B95.8-IED, B95.8-CLG oder B95.8-LLW-spezifischen CD8+ T-Zellen kokultiviert. Als Negativkontrolle dienten DG75 Zellen, die nur mit den HLA-Genen transfiziert worden waren (APC). Als Positivkontrolle dienten HLA-transfizierten Zellen, die mit den entsprechenden B95.8-Peptiden beladen worden waren (APC+Peptid). Als Kontrolle der Effizienz der Antigenpräsentation dienten analoge Experimente mit LMP2A-LLW-spezifischen CD8+ T-Zellen, welche ein in M81 konserviertes LMP2A-Epitop erkannten. Die T-Zell-Erkennung wurde mittels eines IFN γ -ELISA ermittelt. Die Transfektionseffizienz der zwei rekombinanten LMP2A-Proteine wurde mittels eines gegen die His₆-Markierung der Proteine gerichteten Antikörpers überprüft (α -His₆). Der Nachweis von Tubulin diente als Ladekontrolle (α -tubulin).

4.1.4 Einfluss von Aminosäureaustauschen in T-Zellepitopen auf die Erkennung durch CD4+ T-Zellen

Analoge Experimente wurden mit CD4+ T-Zellklonen durchgeführt, welche spezifisch für vier verschiedene polymorphe Epitope der Proteine EBNA1 und EBNA3C des B95.8-Stammes waren (Tabelle 23). In allen vier Fällen führten Polymorphismen in den Epitopvarianten der Stämme M81 und AG876 zu Veränderungen der CD4+ T-Zellerkennung im Rahmen von Peptidtitrationsexperimenten. So waren die T-Zellantworten gegen die Epitopeptide IAE (Abbildung 12) und AIP (Abbildung 13) aus EBNA1 sowie ENP aus EBNA3C (Abbildung 15) der Stämme M81 und AG876 gegenüber den B95.8 Varianten statistisch signifikant erhöht, während die T-Zellerkennung des EBNA1-KTS-Epitops aus M81 gegenüber dem aus AG876 und B95.8 vermindert war (Abbildung 14).

Tabelle 23: Getestete polymorphe CD4+ T-Zell-Epitope

	EBNA1 "IAE"	EBNA1 "AIP"	EBNA1 "KTS"	EBNA3C "ENP"
HLA	DQB1*0402	DRB1*1301	DRB1*1101	DRB1*0801
Epitop- position (B95.8)	AA 481-500	AA 527-541	AA 514-528	AA 325-339
B95.8	PKFEN IAEGLRALLAR- SHVE RTTDE	RGTAL AIPQCRLTPLSRLPF GMAPG	VYGGG KTSLYNLRRGTA- LAI PQCRL	NAPPN ENPYHARR- GIKEHVI QNAFR
M81	PKFEN IAEGLRVLLAR- SHVE RTTEE	RGIAL AVPQCRITPLSRLPF GMAPG	VYGGG KTSLYNLRRGI- ALAV PQCRI	NAPPN ENPYHARR- GIKDHVI QNAFR
AG876	<u>Q</u> KFEN IAEGLRLL- LARCHVE RTTED	*	VYGGG KTSLYNLRR- GIGLAI PQCRL	NAPPN ENPYHARR- GIKE<u>Q</u>VI <u>Q</u> KAFL
* wie B95.8; Epitope fettgedruckt, Aminosäure (AA) -austausche unterstrichen				

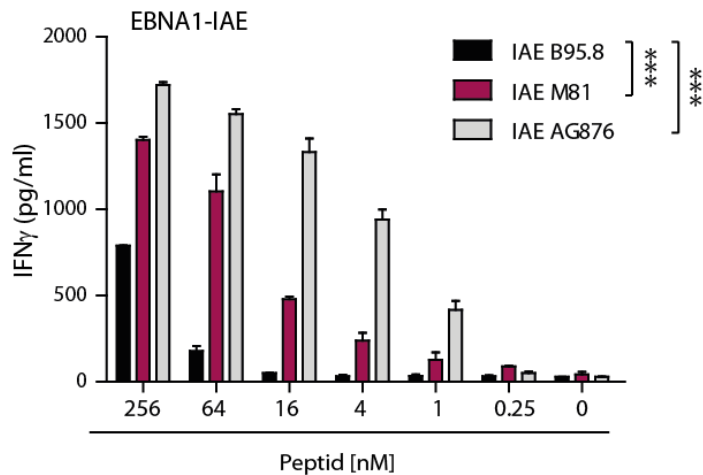


Abbildung 12: Erkennung der M81- und AG876-IAE-Epitopvarianten durch B95.8-epitopspezifische CD4+ T-Zellen.

Antigenpräsentierende Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen der entsprechenden Peptide der EBNA1-IAE-Epitopvarianten der EBV-Stämme B95.8, M81 und AG876 beladen und anschließend mit CD4+ T-Zellen kokultiviert, die spezifisch für das IAE-Epitop des EBNA1-Proteins von B95.8 waren. Die IFN γ -Sekretion der T-Zellen als Maß der Antigenerkennung wurde einen Tag später mittels-ELISA bestimmt.

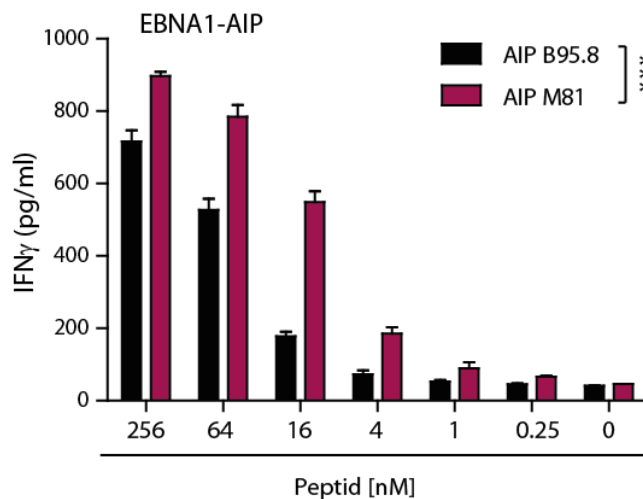


Abbildung 13: Erkennung der M81-AIP-Epitopvarianten durch B95.8-epitopspezifische CD4+ T-Zellen.

Antigenpräsentierende Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen der entsprechenden Peptide der EBNA1-AIP-Epitopvarianten der EBV-Stämme B95.8 und M81 exogen beladen. Anschließend wurden die Zielzellen über Nacht mit CD4+ T-Zellen kokultiviert, die spezifisch für das AIP-Epitop des EBNA1-Proteins aus B95.8 waren. Am nächsten Tag wurde die IFN γ -Konzentration im Kulturüberstand mittels ELISA ermittelt.

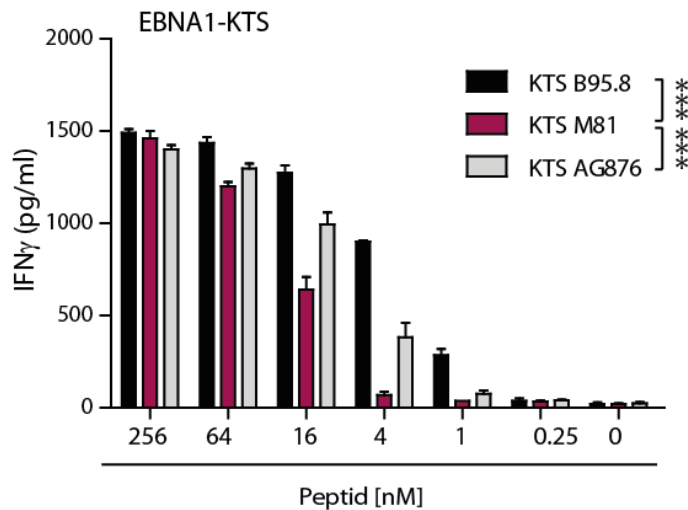


Abbildung 14: Erkennung der M81- und AG876-KTS-Epitopvarianten durch B95.8-epitopspezifische CD4+ T-Zellen.

Antigenpräsentierende Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen der entsprechenden Peptide der EBNA1-KTS-Epitopvarianten aus den EBV-Stämmen B95.8, M81 und AG876 beladen und anschließend mit CD4+ T-Zellen kokultiviert, die spezifisch für das EBNA1-KTS-Epitop aus B95.8 waren. Die Menge an ausgeschüttetem IFN γ wurde 20 h später mittels ELISA ermittelt.

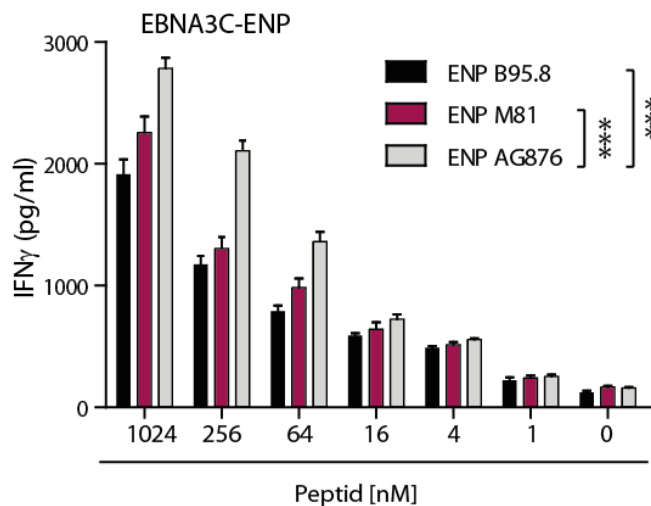
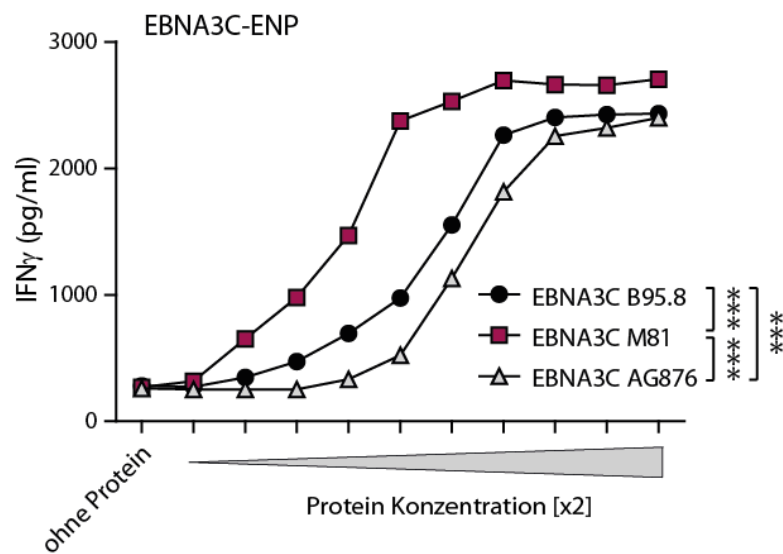


Abbildung 15: Erkennung der M81- und AG876-ENP-Epitopvarianten durch B95.8-epitopspezifische CD4+ T-Zellen.

Antigenpräsentierende Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen an Peptiden beladen, die den verschiedenen EBNA3C-ENP-Epitopvarianten der EBV-Stämme B95.8, M81 und AG876 entsprachen. Danach wurden die Zellen mit CD4+ T-Zellen kokultiviert, die spezifisch für das ENP-Epitop des EBNA3C-Proteins aus B95.8 waren. Am nächsten Tag wurde die IFN γ -Konzentration im Kulturüberstand mittels ELISA ermittelt.

In den oben gezeigten Peptidtitrationsexperimenten wurde der Einfluss von Polymorphismen in den flankierenden Regionen auf die Antigenprozessierung und -präsentation nicht erfasst, da die verwendeten Peptide keine flankierenden Sequenzen enthielten. Somit stellte sich auch hier die Frage, ob angrenzende Aminosäuresequenzen die Prozessierung und Präsentation des Epitops beeinflussen können. Um dies zu untersuchen, wurden die EBNA3C-Varianten der drei EBV Stämme als Vollängenproteine rekombinant exprimiert, auf APC titriert und anschließend die Erkennung durch ENP-Epitop-spezifische CD4⁺ T-Zellen abgefragt (Abbildung 16A). Als Kontrolle der titrierten Proteinmengen diente ein EBNA3C-SDD-spezifischer CD4⁺ T-Zellklon, der ein in allen drei Stämmen konserviertes Epitop einschließlich der flankierenden Regionen erkannte (Abbildung 16B). Trotz einer im Vergleich zu B95.8 besseren Erkennung der EBNA3C-ENP-Epitope aus M81 und AG876 in Peptidtitrationsexperimenten, war die Erkennung des AG876-Vollängenproteins im Vergleich zur B95.8-Variante vermindert. Im Gegensatz zu M81 wies die AG876-Variante zusätzlich zwei weitere Aminosäureaustausche in den flankierenden Regionen auf (Abbildung 16). Wie bei CD8⁺ T-Zellepitopen konnten demnach Polymorphismen innerhalb des Epitops oder in den flankierenden Regionen Einfluss auf die T-Zellerkennung haben.

A



B

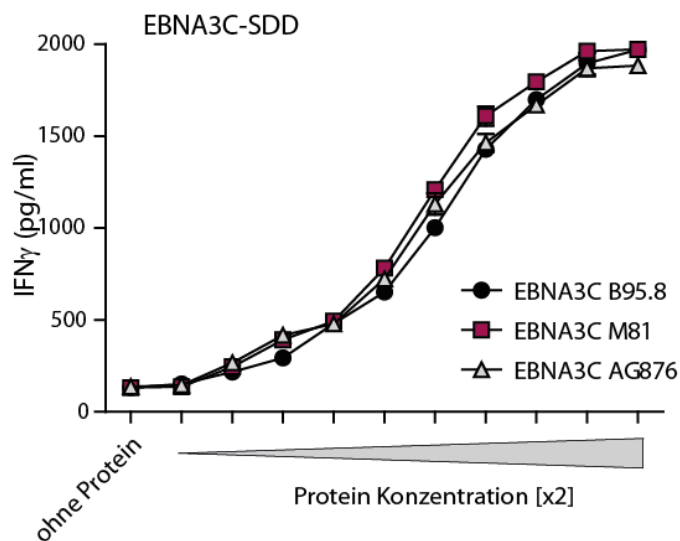


Abbildung 16: Erkennung von Zielzellen durch EBNA3C-ENP- (A) und EBNA3C-SDD (B) spezifischen CD4+ T-Zellen nach exogener Beladung verschiedener EBNA3C-Varianten.

Antigenpräsentierende Zellen wurden mit steigenden Mengen der rekombinant hergestellten und aufgereinigten EBNA3C-Proteinvarianten der EBV-Stämme B95.8, M81 und AG876 für 24 h beladen. Anschließend wurden die Zellen mit CD4+ T-Zellen kokultiviert, die (A) spezifisch für das ENP-Epitop des EBNA3C-Proteins aus B95.8 waren, oder (B) das in allen drei Virusstämmen konservierte SDD-Epitop des EBNA3C-Proteins erkannten. Die IFN γ -Ausschüttung der T-Zellen wurde mittels ELISA gemessen.

4.2 Kreuzreaktivität von B95.8-LCL- und M81-LCL-stimulierten T-Zelllinien

Durch die hohe Rate an Polymorphismen in T-Zellepitopen und die dadurch oftmals bedingte verminderte T-Zellerkennung stellte sich die Frage, wie wirksam T-Zelllinien, die durch Stimulation mit einem bestimmten Virusstamm generiert worden waren, gegen andere Virusstämme waren. Analog der Herstellung für den klinischen Einsatz wurden deshalb T-Zelllinien durch wiederholte Stimulation mit autologen LCL generiert. Die dabei verwendeten LCL wurden durch Infektion von B-Zellen des peripheren Bluts mit B95.8- oder M81-Virus generiert und in An- oder Abwesenheit von Acyclovir kultiviert. Von drei EBV-positiven, gesunden, freiwilligen Spendern wurden parallel T-Zelllinien durch wiederholte Stimulation mit den jeweils zwei autologen Stimulatorzelllinien etabliert, phänotypisch charakterisiert und die Erkennung der verwendeten Stimulator-LCL sowie der mit dem jeweils anderen Virusstamm infizierten LCL untersucht.

4.2.1 B95.8-LCL- versus M81-LCL- stimulierte T-Zelllinien wiesen keine phänotypischen Unterschiede auf.

T-Zelllinien, deren Stimulation mit B95.8- oder M81-transformierten LCL erfolgte, welche in Medium mit oder ohne Acyclovir kultiviert worden waren, wurden durch durchflusszytometrische Analysen auf die Expression typischer Oberflächenmarker hin charakterisiert. In mehreren unabhängigen Versuchen wurde die Expression von CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CCR7, CD62L, CD45RA, CD45RO, CD56, CD19 und $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor ($\gamma\delta$ -TCR) für alle Linien bestimmt. Im Durchschnitt waren 97% der Zellen CD3+ und demnach T-Zellen, 17% davon CD4+ und 61% CD8+. Nur wenige NK-Zellen (0,3%) und $\gamma\delta$ T-Zellen (6,0%) oder B-Zellen (0,3% CD19+) wurden detektiert. 98% der Zellen waren CD45RO+, 15% davon CD62L+ und 0,4% CCR7+. Dies deutete darauf hin, dass es sich mehrheitlich um Effektor-Gedächtnis-T-Zellen handelte. Darüber hinaus exprimierten 71% der Zellen CD28, während nur 30% CD27 exprimierten. Obwohl T-Zelllinien nach mehreren Stimulationsrunden immer noch ein sehr heterogenes T-Zellgemisch darstellen und die

phänotypischen Merkmale entsprechend variieren konnten, wurden zwischen den verschiedenen T-Zelllinien keine signifikanten phänotypischen Unterschiede festgestellt. Eine Übersicht der phänotypischen Marker aller in dieser Arbeit etablierten T-Zelllinien findet sich in Tabelle 24.

Tabelle 24: Phänotypische Profile der etablierten T-Zelllinien.

Acyclovir	Spender #1				Spender #2				Spender #3			
	LCL-B95.8		LCL-M81		LCL-B95.8		LCL-M81		LCL-B95.8		LCL-M81	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
CD3+	97.0 ± 2.3	98.6 ± 0.4	90.9 ± 3.8	98.6 ± 1.3	88.2 ± 8.0	98.9 ± 0.8	93.1 ± 6.8	99.3 ± 0.4	97.8 ± 1.7	99.9 ± 0.1	99.8 ± 0.1	98.7 ± 0.7
CD4+ CD8-	26.8 ± 7.4	13.3 ± 6.3	39.5 ± 3.1	4.4 ± 1.6	4.1 ± 4.6	12.8 ± 6.6	4.3 ± 3.3	9.2 ± 4.6	19.5 ± 3.1	54.2 ± 21.7	6.6 ± 0.7	6.6 ± 0.4
CD8+ CD4-	42.4 ± 6.4	63.7 ± 0.3	28.8 ± 2.3	82.8 ± 10.7	57.3 ± 16.4	69.7 ± 7.4	65.0 ± 19.2	72.3 ± 11.9	72.7 ± 1.7	32.8 ± 21.5	64.0 ± 14.0	84.6 ± 5.2
CD4+ CD8+	4.3 ± 1.1	7.4 ± 3.6	17.2 ± 11.1	4.3 ± 1.9	2.9 ± 3.6	11.3 ± 4.9	1.1 ± 0.4	6.8 ± 3.7	3.3 ± 1.2	11.2 ± 8.3	17.2 ± 13.4	2.3 ± 1.4
CD4- CD8-	26.6 ± 0.1	5.6 ± 0.4	14.6 ± 11.9	8.4 ± 7.2	35.8 ± 24.5	6.3 ± 4.1	29.6 ± 16.8	11.7 ± 3.6	4.6 ± 0.3	1.8 ± 0.9	12.2 ± 1.4	6.5 ± 3.8
CD3- CD56+	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.2
γδTCR+	1.7 ± 0.4	1.2 ± 0.2	0.5 ± 0.3	3.4 ± 1.5	11.4 ± 6.4	4.8 ± 2.1	4.6 ± 2.4	4.3 ± 1.7	6.3 ± 1.6	3.8 ± 2.4	18.2 ± 2.8	11.1 ± 10.9
CD45RA+	0.1 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.1 ± 0.1	29.4 ± 29.2	0.1 ± 0.2	0.8 ± 0.6	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	1.1 ± 0.0	0.6 ± 0.4	6.9 ± 6.6	1.1 ± 0.4
CD45RO+	98.2 ± 1.4	99.3 ± 0.6	98.2 ± 1.6	96.4 ± 3.6	95.4 ± 2.1	99.7 ± 0.3	96.4 ± 2.3	99.4 ± 0.5	98.7 ± 1.3	97.9 ± 1.5	98.7 ± 0.3	99.6 ± 0.3
CD62L+	35.0 ± 11.8	16.9 ± 13.8	32.9 ± 3.6	37.7 ± 10.5	1.5 ± 1.1	9.3 ± 6.9	2.0 ± 0.6	4.5 ± 2.3	5.9 ± 1.1	6.9 ± 3.8	17.8 ± 0.0	6.6 ± 3.9
CCR7+	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.5 ± 0.3	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.8 ± 0.5	2.4 ± 2.9
CD27+	49.3 ± 10.6	38.8 ± 7.8	68.3 ± 4.2	46.3 ± 16.2	11.4 ± 8.4	14.3 ± 12.3	30.4 ± 17.2	14.0 ± 2.5	31.6 ± 8.1	30.4 ± 7.7	11.0 ± 6.8	15.3 ± 5.3
CD28+	80.2 ± 14.4	55.1 ± 31.7	90.2 ± 8.9	70.0 ± 5.8	76.5 ± 12.8	93.5 ± 0.4	56.3 ± 15.6	64.6 ± 15.0	59.7 ± 9.9	87.1 ± 3.7	63.3 ± 11.2	61.2 ± 20.9
CD19+	n. a.	0.1 ± 0.0	n. a.	0.4 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.9 ± 0.0	0.3 ± 0.0	1.0 ± 0.0

4.2.2 B95.8-LCL- und M81-LCL-stimulierte T-Zelllinien sind kreuzreaktiv

B95.8- oder M81-LCL-stimulierten T-Zelllinien wurden alle zwei Wochen mit den entsprechenden LCL stimuliert, welche entweder ohne oder mit Acyclovir-Zusatz –entsprechend klinischer Herstellungsprotokolle- kultiviert worden waren. Am Tag neun nach der vierten Stimulationsrunde wurden die vier verschiedenen T-Zelllinien von jeweils drei Spendern mittels eines *calcein release*-Assays auf Zytotoxizität und Kreuzreaktivität hin getestet. Alle T-Zelllinien wurden drei Mal in unabhängigen Versuchen etabliert und getestet. Als Zielzellen wurden B95.8-LCL, M81-LCL oder als Negativkontrolle EBV-negative PHA-Blasten eingesetzt. Bei der Erkennung der mit den verschiedenen EBV-Stämmen infizierten Zielzellen zeigten die T-Zelllinien aller drei Spender, die mit unbehandelten LCL stimuliert worden waren, ein hohes Maß an Kreuzreaktivität gegenüber Zielzellen, die mit dem jeweils anderen Virusstamm infiziert waren (Abbildung 17).

4.2.3 Acyclovir-Vorbehandlung der Stimulatorzellen kann die Kreuzreaktivität vermindern

Wurden die Stimulationszellen während des gesamten Zeitraums mit Acyclovir behandelt, kam es zu Abweichungen in der Erkennung der Zielzellen. So zeigten die in Anwesenheit von Acyclovir mit B95.8-LCL stimulierten T-Zelllinien von Spender 1 wenig Erkennung der M81-LCL. Acyclovir hemmt bekanntlich die lytische Replikation und damit die Expression der späten lytischen Antigene, welche die immundominanten CD4+ T-Zell-Antigene darstellen (Adhikary et al., 2007). Beide T-Zelllinien von Spender 2 reagierten auch gegen die EBV-negativen PHA-Blasten, was auf eine Reaktivität der T-Zellen gegen zelluläre Autoantigene hindeutet. Nur die T-Zelllinien von Spender 3 zeigten keine Unterschiede in der Erkennung der Zielzellen, unabhängig davon, ob sie durch Stimulation mit Acyclovir-behandelten oder unbehandelten LCL generiert worden waren.

Diese Ergebnisse implizierten, dass LCL-stimulierte T-Zelllinien gegen nicht-poly-morphe Antigene gerichtet sind und deshalb protektiv gegen andere Virusstämme wirken können. Die Acyclovirbehandlung der Stimulatorzelllinien, wie für den klinischen Einsatz durchgeführt, kann die Spezifität der Linien verändern und so einen Verlust der Kreuzreaktivität gegenüber anderen EBV-Stämmen oder eine Zunahme der Autoreaktivität bewirken.

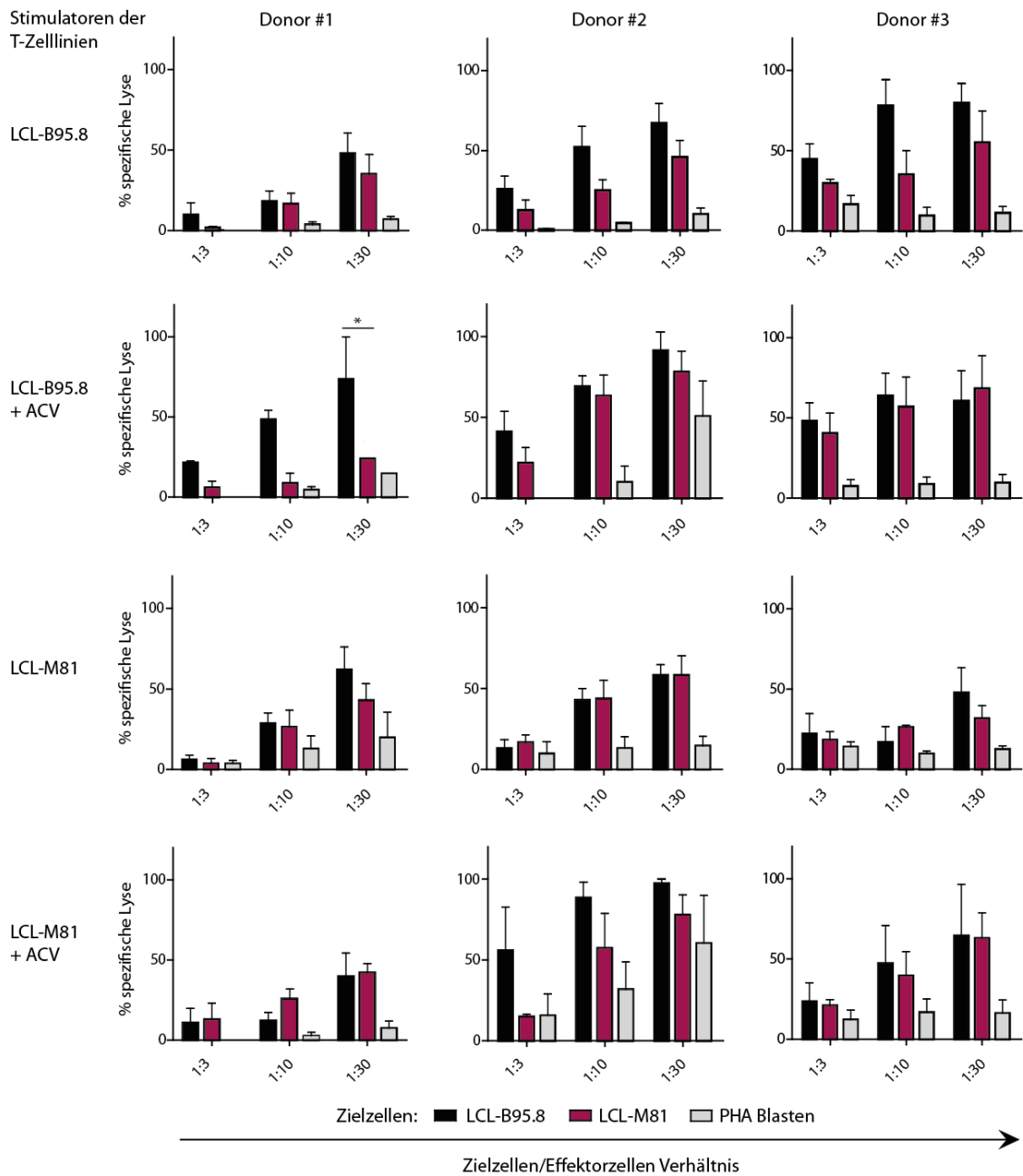


Abbildung 17: Lytische Aktivität von LCL-stimulierten T-Zelllinien gegenüber autologen Zielzellen, die mit einem anderen Virusstamm infiziert worden waren.

Von drei EBV-positiven Spendern wurden durch wiederholte Stimulation mit autologen LCL, die durch Infektion von peripheren mononukleären Blutzellen mit B95.8 oder M81 generiert und in An- (+ACV) oder Abwesenheit von Acyclovir kultiviert worden waren, virusspezifische T-Zelllinien etabliert. Anschließend wurde die lytische Aktivität der Zellen gegenüber verschiedenen autologen Zielzellen getestet. Dazu wurden die Zielzellen mit Calcein gefärbt und im Verhältnis 1:3, 1:10 oder 1:30 mit den verschiedenen T-Zelllinien kokultiviert. Die Freisetzung von Calcein wurde mittels Fluoreszenzintensitätsmessung berechnet und damit der Anteil der spezifisch lysierten von den ursprünglichen Zielzellen erfasst.

5 Diskussion⁶

5.1 Sequenzunterschiede zwischen den untersuchten EBV-Stämmen

Obwohl die Sequenzheterogenität verschiedener EBV-Isolate aus diversen geographischen Regionen bekannt war, blieb die Auswirkung auf die Wirksamkeit von Impfungen und immuntherapeutischen Ansätzen, welche hauptsächlich auf Antigenen des Laborstammes B95.8 basieren, bislang unbekannt. In dieser Arbeit wurden die Proteinsequenzen der Stämme B95.8 aus den USA, M81 aus Asien und AG876 aus Afrika verglichen und die Auswirkungen der Sequenzunterschiede auf die T-Zellerkennung untersucht.

Im Einklang mit bisher publizierten Studien (Tsai et al. 2013; Kwok et al. 2014), unterschieden sich die in der eigenen Arbeit analysierten Proteome von M81, sowie anderer aus Nasopharynxkarzinomen isolierter EBV-Stämme, von B95.8 in etwa 1,2%. Die in der eigenen Arbeit detektierte Sequenzabweichung von ca. 3,2% zwischen M81 und dem Typ 2-Stamm AG876 war erheblich höher aufgrund der bereits bekannten Divergenz in EBNA2- und den EBNA3-Proteinen. Abgesehen davon weichte M81 in ähnlichem Maße von den beiden aus B-Zellen isolierten Stämmen B95.8 und AG876 ab. Diese Sequenzunterschiede spiegelten vermutlich den unterschiedlichen Phänotyp und Tropismus von M81 oder die geografisch bedingten, genetischen Merkmale des asiatischen Patienten, aus dem M81 isoliert wurde, wider.

Die Untersuchung der Sequenzunterschiede in den publizierten T-Zellepitopen ergab, dass über 50% der CD4+ und fast 40% der CD8+ T-Zellepitope und/oder flankierende Regionen in M81 sich vom Referenzstamm B95.8 unterschieden. Wurden die beiden Typ 1-Stämme B95.8 und M81 mit dem Typ 2-Stamm AG876

⁶ Bis auf Absatz 5.3 übersetzt übernommen aus Cirac, A., Stützle, S., Dieckmeyer, M. et al. *Cancer Immunol Immunother* (2018) 67: 663-674. <https://doi.org/10.1007/s00262-018-2118-z>

verglichen, so waren die Abweichungen noch ausgeprägter. Mehr als 70% aller CD4+ und über 40% aller CD8+ T-Zell-Epitope einschließlich flankierender Regionen wiesen mindestens einen Polymorphismus auf.

5.2 Einfluss der Sequenzunterschiede auf die T-Zell-Erkennung

Aminosäureaustausche in den Epitopen oder deren flankierenden Regionen können die T-Zellerkennung auf unterschiedliche Weise beeinflussen. Im Falle von CD8+ T-Zellepitopen können solche Polymorphismen Auswirkungen auf die Antigenprozessierung, den Transport von Antigenen ins endoplasmatische Retikulum (ER) mittels Antigenpeptidtransporter (TAP), das Trimmen der Peptide durch die endoplasmatische Reticulum Aminopeptidase 1 (ERAP1) sowie die Bindungsaffinität zu MHC-Klasse-I-Molekülen und dem T-Zellrezeptor haben (Lazaro, Gamarra, and Del Val 2015; Fruci et al. 2003; Chang et al. 2005; Trujillo et al. 2014; Edwards and Evavold 2011; Ossendorp et al. 1996). Ebenso können Aminosäureaustausche in und um CD4+ T-Zellepitope die Antigenprozessierung, die Bindung an MHC-Klasse-II-Moleküle und die Erkennung durch den T-Zellrezeptor beeinflussen (Hastings 2013; Rossjohn et al. 2015; Neefjes and Ovaas 2013). Darüber hinaus können C-terminal flankierende Regionen die Affinität der T-Zellrezeptorbindung verändern (Cole et al. 2012). Um diese vielfältigen, möglichen Effekte zu berücksichtigen, wurden im Rahmen dieser Arbeit neben Peptidtitrationen auch Versuche mit gesamten Proteinen, welche exogen auf Zielzellen beladen oder endogen von APC exprimiert wurden, durchgeführt. Als APC diente die EBV-negative Burkitt Lymphom-Zelllinie DG75, welche entsprechend mit dem zu testenden Antigen beladen bzw. transfiziert wurde. Ein direkter Vergleich der T-Zellerkennung von LCL, die mit B95.8, M81 oder AG876 infiziert waren, war aufgrund von Unterschieden in der Rate der spontanen lytischen Replikation und dadurch der Expression von lytischen Antigenen nicht möglich (Tsai et al. 2013). Zudem exprimierten sie polymorphe Varianten viraler Proteine mit immunmodulatorischen

Funktionen, welche die Antigenpräsentation und die Expression kostimulatorischer Moleküle beeinflussen und somit die Ergebnisse der T-Zell-Erkennung verfälschen konnten (Brooks et al. 2009; Rancan et al. 2015).

5.2.1 Aminosäureaustausche in Epitopen können die CD8+ T-Zellerkennung beeinflussen

Die im Ergebnisteil beschriebenen Versuche zeigten, dass Polymorphismen in T-Zellepitopen des EBV oder deren direkt flankierenden Regionen die T-Zellerkennung in verschiedener und unvorhersehbarer Weise beeinflussen können. So führten manche Aminosäureaustausche zu einer verstärkten (e.g. BZLF1-RAK, B95.8 *versus* M81), äquivalenten (e.g. EBNA1-HPV, B95.8 *versus* AG876), verminderten (EBNA1-HPV, B95.8 *versus* M81), oder zu einem kompletten Verlust der T-Zellerkennung (BZLF1-VQT, B95.8 *versus* M81 and AG876). In vielen Fällen wurde eine erheblich höhere Konzentration der polymorphen Peptidvariante zu einer zu B95.8-äquivalenten T-Zellaktivierung benötigt. Daraus ließ sich schließen, dass Polymorphismen im klinischen Setting zu einem Verlust einer effektiven Erkennung der mit einer abweichenden Virusvariante infizierter Zielzellen führen könnten, insbesondere dann, wenn die Erkennung von LCL, welche das entsprechende Antigen exprimieren, nicht sehr ausgeprägt ist. In einigen Fällen konnten Aminosäureaustausche in Peptidregionen, welche für die Interaktion mit dem T-Zellrezeptor von großer Bedeutung waren, gefunden werden (Rossjohn et al. 2015). Bis zum Abschluss dieser Arbeit waren keine Programme verfügbar, welche in konkreten Fällen die Auswirkungen solcher Polymorphismen auf die T-Zellrezeptoraffinität hätten vorhersagen können. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass in Fällen, in denen die Aminosäureaustausche bekannte Ankeraminosäuren der CD8+ T-Zellepitope betreffen, die Auswirkungen auf die T-Zellerkennung nicht systematisch vorhergesagt werden können, sondern diese stets immunologisch verifiziert werden sollten. So ist in der Literatur beschrieben, dass das HLA-

B*4001-Allel die Aminosäuren Leucin (L), Isoleucin (I) und Valin (V) als C-Terminus des Peptids bevorzugt (Hillen et al. 2008). Daher war im Falle des Aminosäureaustausches L>I des in dieser Arbeit untersuchten "IED"-Epitops des Stammes M81 kein großer Effekt auf die T-Zell-Erkennung zu erwarten. Allerdings zeigte sich in den vorliegenden Versuchen, dass eine in etwa 16-fach höhere Konzentration des M81-Peptids nötig war, um das gleiche Niveau der T-Zellaktivierung zu erzielen wie durch die B95.8-Peptidvariante. Ebenso wurden Zielzellen, welche das LMP2A-Protein aus M81 exprimierten, kaum durch die IED-spezifischen CD8+ T-Zellen erkannt. Diese Ergebnisse waren vereinbar mit Studien, welche zeigten, dass T-Zellrezeptoren zwischen Peptiden, die sich in einer Ankeraminosäure unterscheiden, differenzieren konnten (Madura et al. 2015). Darüber hinaus zeigten die gegensätzlichen Ergebnisse der T-Zellerkennung des CLG-Epitops nach Peptidbeladung verglichen mit endogener Expression des Volllängenproteins, dass einzelne Aminosäureaustausche auch Auswirkungen auf die Antigenprozessierung und -präsentation haben können, die im Rahmen einer Peptidtitrationen nicht erfasst werden. Dies lässt den Schluss zu, dass Peptidtitrationen - wie bisher in der Literatur üblich - nicht ausreichen, um den Effekt von Aminosäureaustauschen in Epitopen auf die T-Zellerkennung abschließend beurteilen zu können. Vielmehr sollten diese Untersuchungen stets durch Experimente ergänzt werden, welche die Prozessierung des Antigens miteinschließen.

5.2.2 Aminosäureaustausche in Epitopen und/oder flankierenden Regionen haben Einfluss auf die CD4+ T-Zellerkennung

Im Falle der CD4+ T-Zellepitope kam es bei allen Peptidtitrationsversuchen zu Unterschieden in der Erkennung der polymorphen Epitopvarianten. Während EBNA-KTS aus M81 und AG876 schlechter als die B95.8-Variante erkannt wurde, wurden die EBNA1-IAE-, EBNA1-AIP- und EBNA3C-ENP-Epitopvarianten aus M81 und AG876 besser erkannt als die jeweiligen Epitope aus B95.8.

Ähnlich wie bei der CD8⁺ T-Zell-Erkennung wurden auch mit CD4⁺ T-Zellen unterschiedliche Ergebnisse nach Inkubation von Zielzellen mit EBNA3C-Peptid *versus* Volllängenprotein erhalten. Diese Unterschiede deuteten ebenfalls darauf hin, dass einzelne Aminosäureaustausche Auswirkungen auf die Antigenprozessierung und -präsentation auf MHC-II haben können. In diesem Fall wurde die Abweichung in der Erkennung durch einen Polymorphismus in der flankierenden Region bedingt, sodass möglicherweise die Proteinprozessierung, z.B. durch Verlust einer Schnittstelle einer Protease, beeinträchtigt wurde. Alternativ konnten die Polymorphismen in der C-terminal flankierenden Region auch Auswirkungen auf die T-Zellrezeptorbindung gehabt haben (Cole et al. 2012; Hastings 2013; van Kasteren and Overkleeft 2014). Welche dieser Möglichkeiten für die verminderte T-Zellerkennung im Falle des EBNA3C-Volllängenproteins aus AG876 verantwortlich war, müssen weitere Experimente klären.

5.2.3 Die Erkennung verschiedener Epitopvarianten wird vermutlich durch den EBV-Stamm beeinflusst, mit dem der T-Zellspender infiziert ist

Unerwarteterweise wurden die EBNA1-IAE-Epitopvarianten aus M81 und AG876 deutlich besser erkannt als das entsprechende B95.8-Peptid. Dies war erstaunlich, da der verwendete CD4⁺ T-Zellklon aus PBMC eines gesunden europäischen Virusträgers durch wiederholte Stimulation mit rekombinanten EBNA1-Protein aus B95.8, dem in westlichen Ländern vermutlich am weitesten verbreitete EBV-Stamm, etabliert worden war (Mautner et al. 2004). Aufgrund der beschriebenen Effekte von Polymorphismen auf die T-Zellerkennung wurde das *EBNA1*-Gen des besagten Spenders sequenziert. Interessanterweise unterschied sich die IAE-Epitopsequenz dieses Virusstamms (QKFEN-**IAEGLRTLLARCHVE-RTTDE) von der der drei untersuchten EBV-Stämme. Zielzellen, welche mit dieser Peptidvariante**

beladen worden waren, wurden bereits bei geringeren Peptidkonzentrationen von den T-Zellen erkannt als die anderen Epitopvarianten.

Die unterschiedliche Erkennung von Epitopvarianten könnte demnach davon abhängig gewesen sein, mit welchem Virusstamm die T-Zellspender infiziert waren, und damit eine Erklärung für die beobachtete, bessere Erkennung mancher Epitopvarianten aus M81 oder AG876 (z.B. BZLF1-RAK) liefern. Sequenzunterschiede zwischen dem in der Regel zur T-Zellstimulation verwendeten B95.8-Stamms und den Virusstämmen, mit denen die T-Zell-Spender infiziert sind, könnten auch dafür verantwortlich sein, dass verschiedene T-Zell-Klone gleicher Spezifität aber von verschiedenen Spendern z.T. unterschiedliche Affinitäten aufweisen (Long et al. 2005b; Mautner et al. 2004; Haigh et al. 2008).

5.3 LCL-stimulierte T-Zelllinien erkennen Zielzellen, die mit unterschiedlichen Virusstämmen infiziert sind

In den letzten Jahren widmeten sich viele Studien dem adoptiven T-Zelltransfer als therapeutische Option für immungeschwächten Patienten bei therapierefraktären viralen Infektionen (z.B. EBV, Cytomegalievirus (CMV) oder Adenovirus). Bevor epitopbasierte Selektionsverfahren eingeführt wurden, konzentrierten sich die Protokolle auf die *in vitro*-Selektion und -Expansion von EBV-spezifischen T-Zelllinien mithilfe von autologen LCL, die durch Infektion von B-Zellen mit B95.8-Virus generiert worden waren. T-Zelllinien bieten gegenüber T-Zellklonen zum einen den Vorteil, dass sie schneller verfügbar sind, was bei der oft raschen Progression EBV-assoziiierter Erkrankungen von Wichtigkeit ist. Zum anderen umfassen sie ein breites Spektrum an virusspezifischen T-Zellen. In manchen Studien wurden sogar erfolgreich polyklonale T-Zelllinien gegen mehrere Viren generiert und eingesetzt (CMV, EBV und Adenovirus) (Leen et al. 2006). Angesichts der gut dokumentierten genetischen Heterogenität von EBV und der in der eigenen Arbeit beschriebenen Konsequenzen für die T-Zellerkennung bietet ein breites T-

Zellrepertoire womöglich den Vorteil, dass genügend nicht-polymorphe Epitope von den transferierten T-Zelllinien erkannt und somit antivirale Immunantworten gegen verschiedene Virusstämme etabliert werden können. Dies wird auch durch die großen klinischen Erfolge bestätigt, die bei der Behandlung der PTLD mit B95.8-LCL-stimulierten T-Zelllinien erzielt wurden (Gottschalk and Rooney 2015; Heslop and Rooney 1997; Rooney et al. 1998).

Die Ergebnisse der Versuche zur Kreuzreaktivität bestätigten diese Vermutung ebenfalls. T-Zelllinien, die durch Stimulation mit autologen B95.8-LCL oder M81-LCL generiert worden waren, erkannten LCL, die den jeweils anderen Virusstamm trugen. Somit mussten die LCL-stimulierten T-Zelllinien zumindest zum Teil gegen Antigene gerichtet sein, die von beiden LCL präsentiert wurden. Vermutlich handelte es sich hierbei um nicht-polymorphe Epitope oder um Epitope, in denen die vorhandenen Aminosäureaustausche die T-Zellerkennung nicht beeinträchtigten. Allerdings kam es tendenziell zu einer Abnahme der Kreuzreaktivität, wenn die T-Zelllinien durch Stimulation mit Acyclovir-behandelten LCL generiert wurden. Acyclovir unterdrückt bekanntlich die Expression der späten lytischen Antigene, welche die immundominanten Zielstrukturen der virusspezifischen CD4+ T-Zellantwort darstellen (Adhikary 2006, 2007, 2008) und nur geringe Sequenzvariabilität aufweisen. Durch den Verlust dieser Antigene war die T-Zellantwort hauptsächlich gegen frühe lytische und Latenzantigene gerichtet, die ein höheres Maß an Sequenzunterschieden zwischen den Stämmen aufwiesen. Zudem schienen die Linien T-Zellen zu enthalten, die gegen Autoantigene gerichtet waren. So wurden z.T. auch PHA-Blasten erkannt, obwohl diese keine viralen Antigene exprimierten. Ähnliche Ergebnisse wurden auch erhalten, wenn T-Zellen mit LCL stimuliert wurden, die in Folge einer genetischen Manipulation des Virus keine lyti-

schen Antigene exprimieren konnten (Adhikary et al., 2007; Long et al., 2005). Unter diesen Stimulationsbedingungen waren die erhaltenen T-Zelllinien, insbesondere die CD4+ Subpopulation, vornehmlich gegen Autoantigene gerichtet.

Dennoch scheinen die GVHD oder Autoimmunphänomene nach Infusion LCL-stimulierter T-Zelllinien keine signifikante Komplikation darzustellen. Zahlreiche Studien belegen hingegen eine gute Wirksamkeit dieser T-Zelltherapie, ohne dass gravierende Nebenwirkungen aufgetreten waren (Dobrovina et al. 2012; Heslop and Rooney 1997; Rooney et al. 1998; O'Reilly et al. 2016a).

5.4 Klinische Relevanz der variablen Erkennung von polymorphen T-Zellepitopen

Die beschriebene, variable T-Zellerkennung von Epitopvarianten könnte weitreichende Bedeutung für das Monitoring der EBV-spezifischen Immunantwort, die EBV-spezifische Impfstoffentwicklung und die Immuntherapie von EBV-assoziierten Erkrankungen haben.

So wird beispielsweise die virusspezifische Immunität in immunsupprimierten Patienten üblicherweise mittels überlappender EBV-Peptidbibliotheken kontrolliert, welche meist von viralen Proteinen der latenten Phase, z.B. EBNA3, abstammen (Tischer et al. 2014; Korber et al. 2016). Diese Peptidbibliotheken leiten sich von B95.8-Proteinsequenzen ab und könnten zu falschen Messergebnissen führen, wenn der endogene EBV-Stamm des Patienten von B95.8 divergiert.

Ebenso konzentrieren sich die publizierten Ansätze zur Entwicklung therapeutischer EBV-Vakzine, welche EBV-spezifische T-Zellpopulationen im Patienten mit EBV-assoziierten Erkrankungen stimulieren und expandieren sollen, auf die Latenz-Proteine von B95.8 (Taylor and Steven 2016; Smith and Khanna 2015; Cohen 2015a). Auch hier ist eine verminderte Wirksamkeit denkbar, wenn der Virusstamm, mit dem der Patient infiziert ist, stark von B95.8 abweicht.

Auch die Ansätze zur Entwicklung einer prophylaktischen EBV-Vakzine würden womöglich davon profitieren, dass Sequenzunterschiede in EBV-Antigenen Berücksichtigung finden. Bisher konnten Impfstoffe, die auf der B95.8-Variante des Membranproteins gp350 basierten, die EBV-Infektion in EBV-seronegativen, gesunden chinesischen Kindern (Gu et al. 1995), gesunden jungen Erwachsenen in Belgien (Sokal et al. 2007) oder pädiatrischen Transplantationspatienten in England (Rees et al. 2009) nicht verhindern.

Während in der Vergangenheit überwiegend LCL-stimulierte T-Zelllinien zur Behandlung von EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen in Transplantationspatienten eingesetzt wurden, so werden aktuell, um die aufwändige und lange Herstellungsdauer zu umgehen, zunehmend schnellere Isolationsmethoden angewendet, die meist auf der Selektion der T-Zellen mit B95.8-basierte Peptidgemischen beruhen (Bollard and Heslop 2016; Moosmann et al. 2010; Icheva et al. 2013; Uhlin et al. 2010; Haque et al. 2007; O'Reilly et al. 2016b; Bollard 2013). Jedoch können T-Zellspender und -empfänger mit unterschiedlichen EBV-Stämmen infiziert sein, was im Falle einer signifikanten genetischen Divergenz der Stämme die klinische Wirksamkeit der infundierten T-Zellen beeinträchtigen könnte, insbesondere wenn sich diese nur gegen ein limitiertes Set an Antigenen richten. Die eigene Arbeit legt daher nahe, dass die entsprechenden Herstellungsprotokolle die weltweite Sequenzheterogenität berücksichtigen und idealerweise gegen ein Set konservierter, oder ein breites Spektrum an Antigenen gerichtet sein sollten.

Interessante Beispiele aus der Literatur unterstreichen die Bedeutung der Sequenzheterogenität im Rahmen der adoptiven Immuntherapie: So wurden Fälle beschrieben, in denen Patienten mit EBV-assoziierten Erkrankungen nicht auf den adoptiven Transfer EBV-spezifischer Spender-T-Zellen ansprachen, welche *in vitro* mit B95.8-Antigenen stimuliert worden waren. Tatsächlich konnten diese T-Zellen

die LCL desselben Spenders, welche mit dem endogenen EBV-Stamm des Patienten transformiert worden waren, nicht erkennen und lysieren. Jedoch konnten T-Zelllinien des Spenders, die durch Stimulation mit spontan aus PBMC-Kulturen auswachsenden LCL des Patienten generiert worden waren, diese spontanen LCL erkennen und lysieren. In einem ähnlichen Fall konnte die fehlende Wirksamkeit der Therapie auf eine Mutation in EBNA-3B des Virusstamms des Patienten zurückgeführt werden, denn die durch Stimulation mit B95.8-LCL generierten T-Zellen waren hauptsächlich gegen EBNA3B gerichtet (O'Reilly et al. 2016a; Gottschalk et al. 2001; Doubrovina et al. 2012).

Zusammen mit diesen klinischen Beispielen aus der Literatur zeigten die Ergebnisse der eigenen Arbeit, dass die Sequenzheterogenität der EBV-Stämme weltweit bedeutende Auswirkungen auf Diagnostik, Prävention und Immuntherapie von EBV-assoziierten Erkrankungen haben könnte und die Identifizierung konservierter viraler Epitope von großer Bedeutung für zukünftige klinische Anwendungen ist.

5.5 Ausblick

Die aufgezeigten, immunologischen Konsequenzen der T-Zellepitopvariabilität ließen sich vermeiden, wenn es gelänge, ein Set an T-Zellepitopen zu identifizieren, das in möglichst vielen EBV-Stämmen weltweit konserviert ist. Sollte dies nicht möglich sein, so könnten mit Hilfe dieser Sequenzanalysen zumindest Konsensusepitopsequenzen definiert werden, die die höchste Übereinstimmung zwischen den weltweit verbreiteten EBV-Stämmen aufweisen. Dazu werden momentan in der eigenen Arbeitsgruppe Sequenzanalysen aller bekannten T-Zellepitope in den aktuell etwa 150 publizierten EBV-Stämmen durchgeführt. Solch ein Set an konservierten T-Zellepitopen hätte hohe klinische Relevanz, denn es könnte die

Grundlage bilden für einheitliche und weltweit anwendbare diagnostische Nachweisverfahren und immuntherapeutische Protokolle, die auch außerhalb spezialisierter Zentren zur Anwendung kommen könnten. Darüber hinaus könnten sie die Wirksamkeit von prophylaktischen oder therapeutischen EBV-Vakzinen erhöhen.

Für die EBV-Vakzinentwicklung ist auch die Erforschung des Ausmaßes der erworbenen Immunantwort nach primärer EBV-Infektion von großer Bedeutung. In den wenigen, bislang näher untersuchten Fällen wurde eine beträchtliche Variabilität der EBV-Sequenzen innerhalb eines infizierten Individuums gefunden. Dies könnte auf einen hohen Immenselektionsdruck im Zuge der latenten Infektion (Weiss et al. 2018; Apolloni and Sculley 1994; Srivastava et al. 2000), oder auf eine Co-Infektion mit mehreren EBV-Stämmen (Smatti et al. 2017), einschließlich häufiger Rekombinationsereignisse (Ba Abdullah et al. 2017a), hinweisen.

Die eigenen Befunde legen nahe, dass die Immunantwort nach primärer EBV-Infektion nicht ausreicht, um weitere Infektionen mit anderen EBV-Stämmen zu verhindern. Die erworbene Immunität gegen EBV könnte daher hauptsächlich stammspezifisch sein. Somit könnten sukzessive verschiedene EBV-Stämme dasselbe Individuum trotz vorhergegangener EBV-Infektion infizieren. Die Ausmaße der Auswirkungen von Lücken im EBV-spezifischen T-Zellrepertoire aufgrund der viralen Epitopvariabilität auf die antivirale Immunität und deren Rolle bei der Co-Infektion mit mehreren EBV-Stämmen sind bisher noch unerforscht. Sie sind aber von hoher Relevanz für die Vakzinentwicklung. Durch die rasanten technischen Fortschritte, welche die Sequenzierung gesamter EBV-Genome aus verschiedenen Geweben zunehmend erleichtern, könnten diese Untersuchungen in naher Zukunft realisierbar werden (Weiss et al. 2018; Zhou et al. 2017; Palser et al. 2015; Kwok et al. 2014; Correia et al. 2017).

6 Zusammenfassung

In Sequenzvergleichen verschiedener Isolate des Epstein-Barr-Virus (EBV) aus unterschiedlichen Regionen der Welt wurde eine nicht erwartete Virusstammheterogenität nachgewiesen. In welchem Maße die Sequenzunterschiede die antivirale Immunität beeinträchtigen, ist noch ungeklärt. Die vorliegende Arbeit untersuchte für die repräsentativen EBV-Stämme B95.8, M81 und AG876 den Einfluss der Sequenzunterschiede in bekannten Antigenstrukturen auf die Erkennung durch die zelluläre, erworbene Immunantwort.

Auf Proteinebene unterschieden sich die Latenz-Proteine aus B95.8 und AG876 in 3.7% bzw. 17.5% von M81. Proteine der lytischen Phase dagegen unterschieden sich in nur etwa 0.5%. Ein Vergleich aller bekannten T-Zellepitope ergab, dass die drei Virusstämme in der Hälfte aller CD4+ und in einem Drittel aller CD8+ T-Zellepitope Sequenzunterschiede aufweisen. Wurden die epitopflankierenden Regionen in die Untersuchungen mit einbezogen, so fanden sich Polymorphismen in knapp zwei Dritteln aller CD4+ und in über 40% aller CD8+ T-Zellepitope.

In funktionellen Untersuchungen hatten diese Aminosäureaustausche unvorhersehbare Auswirkungen auf die T-Zellerkennung, die von erkenntnissteigernd bis zu einem vollständigen Verlust der T-Zellerkennung reichten. Aminosäureaustausche in den bisher wenig berücksichtigten, flankierenden Regionen zeigten darüber hinaus Einfluss auf die Antigenprozessierung und -präsentation und damit auf die Stärke der T-Zell-Erkennung. Mit Hilfe von durch lymphoblastoide Zelllinien (LCL) stimulierten T-Zelllinien konnte nachgewiesen werden, dass das virale Antigenom eine ausreichende Zahl an T-Zellepitopen umfasst, die eine Immunität gegenüber unterschiedlichen Virusstämmen vermitteln können.

Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der Virusheterogenität für die antivirale Immunität. Darüber hinaus hat die beschriebene, variable T-Zellerkennung von Epitopvarianten Bedeutung für das Monitoring der EBV-spezifischen Immunantwort, die Impfstoffentwicklung und die Immuntherapie von EBV-assoziierten Erkrankungen.

7 Summary

Sequence comparisons of different Epstein-Barr virus (EBV) isolates from different regions of the world have revealed unexpected virus strain heterogeneity. To what extent the sequence differences affect antiviral immunity is still unclear. For the representative EBV strains B95.8, M81, and AG876, the present study investigated the influence of sequence differences in known antigenic structures on the recognition by the cellular, adaptive immune system.

At the protein level, the latency proteins of B95.8 and AG876 differed from M81 in 3.7% and 17.5%, respectively. In contrast, proteins of the lytic phase differed between the viruses in only about 0.5%. A comparison of all known T-cell epitopes revealed that the three virus strains differ in half of all CD4+ and in one third of all CD8+ T-cell epitopes. When the epitope-flanking regions were included in these analyses, polymorphisms were found in nearly two thirds of all CD4+ and in over 40% of all CD8 + T-cell epitopes.

In functional studies, these amino acid exchanges had unpredictable effects on T-cell recognition, ranging from recognition enhancing to complete loss of T-cell recognition. Amino acid exchanges in the hitherto neglected flanking regions also showed an influence on antigen processing and presentation and thus on the strength of T-cell recognition. Experiments with lymphoblastoid cell line (LCL)-stimulated T-cell lines provided evidence that the viral antigenome encompasses a sufficient number of T-cell epitopes that can confer immunity against different virus strains.

These results highlight the importance of viral strain heterogeneity for antiviral immunity. In addition, the described variable T-cell recognition of epitope variants has implications for the monitoring of EBV-specific immune responses, vaccine development and immunotherapy of EBV-associated diseases.

8 Literaturverzeichnis

- Abbott, R. J., L. L. Quinn, A. M. Leese, H. M. Scholes, A. Pachnio und A. B. Rickinson. 2013. 'CD8+ T cell responses to lytic EBV infection: late antigen specificities as subdominant components of the total response', *J Immunol*, 191: 5398-409.
- Adams, A. und T. Lindahl. 1975a. 'Epstein-Barr virus genomes with properties of circular DNA molecules in carrier cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72: 1477-81.
- Adams, A. und T. Lindahl. 1975b. 'Intracellular forms of Epstein-Barr virus DNA in Raji cells', *IARC Sci Publ*: 125-32.
- Adhikary, D., U. Behrends, H. Boerschmann, A. Pfunder, S. Burdach, A. Moosmann, K. Witter, G. W. Bornkamm und J. Mautner. 2007. 'Immunodominance of lytic cycle antigens in Epstein-Barr virus-specific CD4+ T cell preparations for therapy', *PLoS One*, 2: e583.
- Adhikary, D., U. Behrends, A. Moosmann, K. Witter, G. W. Bornkamm und J. Mautner. 2006. 'Control of Epstein-Barr virus infection in vitro by T helper cells specific for virion glycoproteins', *J Exp Med*, 203: 995-1006.
- Amyes, Elisabeth, Chris Hatton, Damien Montamat-Sicotte, Nancy Gudgeon, Alan B. Rickinson, Andrew J. McMichael und Margaret F.C. Callan. 2003. 'Characterization of the CD4⁺ T Cell Response to Epstein-Barr Virus during Primary and Persistent Infection', *J Exp Med*, 198: 903-11.
- Apolloni, A., D. Moss, R. Stumm, S. Burrows, A. Suhrbier, I. Misko, C. Schmidt und T. Sculley. 1992. 'Sequence variation of cytotoxic T cell epitopes in different isolates of Epstein-Barr virus', *Eur J Immunol*, 22: 183-9.
- Apolloni, A. und T. B. Sculley. 1994. 'Detection of A-type and B-type Epstein-Barr virus in throat washings and lymphocytes', *Virology*, 202: 978-81.
- Ba Abdullah, M., R. Palermo, A. Palser, N. E. Grayson, P. Kellam, S. Correia, A. Szymula und R. White. 2017b. 'Heterogeneity of the Epstein-Barr virus major internal repeat reveals evolutionary mechanisms of EBV and a functional defect in the prototype EBV strain B95-8', *J Virol*.
- Baer, R., A. T. Bankier, M. D. Biggin, P. L. Deininger, P. J. Farrell, T. J. Gibson, G. Hatfull, G. S. Hudson, S. C. Satchwell, C. Seguin und et al. 1984. 'DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome', *Nature*, 310: 207-11.
- Bell, M. J., R. Brennan, J. J. Miles, D. J. Moss, J. M. Burrows und S. R. Burrows. 2008. 'Widespread sequence variation in Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 influences the antiviral T cell response', *J Infect Dis*, 197: 1594-7.
- Blake, N., T. Haigh, G. Shaka'a, D. Croom-Carter und A. Rickinson. 2000. 'The importance of exogenous antigen in priming the human CD8+ T cell response: lessons from the EBV nuclear antigen EBNA1', *J Immunol*, 165: 7078-87.
- Blake, N., S. Lee, I. Redchenko, W. Thomas, N. Steven, A. Leese, P. Steigerwald-Mullen, M. G. Kurilla, L. Frappier und A. Rickinson. 1997. 'Human CD8+ T cell responses to EBV EBNA1: HLA class I presentation of the (Gly-Ala)-containing protein requires exogenous processing', *Immunity*, 7: 791-802.
- Bogedain, C., H. Wolf, S. Modrow, G. Stuber und W. Jilg. 1995. 'Specific cytotoxic T lymphocytes recognize the immediate-early transactivator Zta of Epstein-Barr virus', *J Virol*, 69: 4872-9.
- Bollard, C. M. 2013. 'Improving T-cell therapy for epstein-barr virus lymphoproliferative disorders', *J Clin Oncol*, 31: 5-7.
- Bollard, C. M., S. Gottschalk, V. Torrano, O. Diouf, S. Ku, Y. Hazrat, G. Carrum, C. Ramos, L. Fayad, E. J. Shpall, B. Pro, H. Liu, M. F. Wu, D. Lee, A. M. Sheehan, Y. Zu, A. P. Gee, M. K. Brenner, H. E. Heslop und C. M. Rooney. 2014. 'Sustained complete responses in

- patients with lymphoma receiving autologous cytotoxic T lymphocytes targeting Epstein-Barr virus latent membrane proteins', *J Clin Oncol*, 32: 798-808.
- Bollard, C. M. und H. E. Heslop. 2016. 'T cells for viral infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant', *Blood*, 127: 3331-40.
- Brooks, J. M., D. S. Croom-Carter, A. M. Leese, R. J. Tierney, G. Habeshaw und A. B. Rickinson. 2000. 'Cytotoxic T-lymphocyte responses to a polymorphic Epstein-Barr virus epitope identify healthy carriers with coresident viral strains', *J Virol*, 74: 1801-9.
- Brooks, J. M., S. P. Lee, A. M. Leese, W. A. Thomas, M. Rowe und A. B. Rickinson. 2009. 'Cyclical expression of EBV latent membrane protein 1 in EBV-transformed B cells underpins heterogeneity of epitope presentation and CD8+ T cell recognition', *J Immunol*, 182: 1919-28.
- Brooks, J. M., R. J. Murray, W. A. Thomas, M. G. Kurilla und A. B. Rickinson. 1993. 'Different HLA-B27 subtypes present the same immunodominant Epstein-Barr virus peptide', *J Exp Med*, 178: 879-87.
- Burkitt, D. 1958. 'A sarcoma involving the jaws in African children', *Br J Surg*, 46: 218-23.
- Burrows, J. M., L. Bromham, M. Woolfit, G. Piganeau, J. Tellam, G. Connolly, N. Webb, L. Poulsen, L. Cooper, S. R. Burrows, D. J. Moss, S. M. Haryana, M. Ng, J. M. Nicholls und R. Khanna. 2004. 'Selection pressure-driven evolution of the Epstein-Barr virus-encoded oncogene LMP1 in virus isolates from Southeast Asia', *J Virol*, 78: 7131-7.
- Burrows, J. M., S. R. Burrows, L. M. Poulsen, T. B. Sculley, D. J. Moss und R. Khanna. 1996. 'Unusually high frequency of Epstein-Barr virus genetic variants in Papua New Guinea that can escape cytotoxic T-cell recognition: implications for virus evolution', *J Virol*, 70: 2490-6.
- Burrows, S. R., J. Gardner, R. Khanna, T. Steward, D. J. Moss, S. Rodda und A. Suhrbier. 1994. 'Five new cytotoxic T cell epitopes identified within Epstein-Barr virus nuclear antigen 3', *J Gen Virol*, 75 (Pt 9): 2489-93.
- Burrows, S. R., I. S. Misko, T. B. Sculley, C. Schmidt und D. J. Moss. 1990. 'An Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T-cell epitope present on A- and B-type transformants', *J Virol*, 64: 3974-6.
- Burrows, S. R., T. B. Sculley, I. S. Misko, C. Schmidt und D. J. Moss. 1990. 'An Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cell epitope in EBV nuclear antigen 3 (EBNA 3)', *J Exp Med*, 171: 345-9.
- Caldwell, R. G., J. B. Wilson, S. J. Anderson und R. Longnecker. 1998. 'Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals', *Immunity*, 9: 405-11.
- Callan, M. F., C. Fazou, H. Yang, T. Rostron, K. Poon, C. Hatton und A. J. McMichael. 2000. 'CD8(+) T-cell selection, function, and death in the primary immune response in vivo', *J Clin Invest*, 106: 1251-61.
- Chang, C. M., K. J. Yu, S. M. Mbulaiteye, A. Hildesheim und K. Bhatia. 2009. 'The extent of genetic diversity of Epstein-Barr virus and its geographic and disease patterns: a need for reappraisal', *Virus Res*, 143: 209-21.
- Chang, S. C., F. Momburg, N. Bhutani und A. L. Goldberg. 2005. 'The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a "molecular ruler" mechanism', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 17107-12.
- Chapman, A. L., A. B. Rickinson, W. A. Thomas, R. F. Jarrett, J. Crocker und S. P. Lee. 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: 6219-26.
- Cirac A., Behrends U. und Mautner J. Clinical implications of Epstein-Barr virus strain diversity. *J Immunological Sci*. 2018; 2(3): 51-55

- Cirac A., Stützle S., Dieckmeyer M., Adhikary D., Moosmann A., Körber N., Bauer T., Witter K., Delecluse H.J., Behrends U. und Mautner J. Epstein-Barr virus strain heterogeneity impairs human T-cell immunity. *Cancer Immunol Immunother.* 2018 Apr; 67(4):663-674
- Cohen, J. I. 2015a. 'Epstein-barr virus vaccines', *Clin Transl Immunology*, 4: e32.
- Cohen, Jeffrey I. 2015b. 'Epstein-barr virus vaccines', *Clin Trans Immunol*, 4: e32.
- Cole, D. K., K. Gallagher, B. Lemercier, C. J. Holland, S. Junaid, J. P. Hindley, K. K. Wynn, E. Gostick, A. K. Sewell, A. M. Gallimore, K. Ladell, D. A. Price, M. L. Gougeon und A. Godkin. 2012. 'Modification of the carboxy-terminal flanking region of a universal influenza epitope alters CD4(+) T-cell repertoire selection', *Nat Commun*, 3: 665.
- Correia, S., A. Palser, C. Elgueta Karstegl, J. M. Middeldorp, O. Ramayanti, J. I. Cohen, A. Hildesheim, M. D. Fellner, J. Wiels, R. E. White, P. Kellam und P. J. Farrell. 2017. 'Natural Variation of Epstein-Barr Virus Genes, Proteins, and Primary MicroRNA', *J Virol*, 91.
- Desai, D. V. und U. Kulkarni-Kale. 2014. 'T-cell epitope prediction methods: an overview', *Methods Mol Biol*, 1184: 333-64.
- DGPI-Handbuch. 2018. 'Deutsche Gesellschaft für Infektiologie'.
- Dobrovina, E., B. Oflaz-Sozmen, S. E. Prockop, N. A. Kernan, S. Abramson, J. Teruya-Feldstein, C. Hedvat, J. F. Chou, G. Heller, J. N. Barker, F. Boulad, H. Castro-Malaspina, D. George, A. Jakubowski, G. Koehne, E. B. Papadopoulos, A. Scaradavou, T. N. Small, R. Khalaf, J. W. Young und R. J. O'Reilly. 2012. 'Adoptive immunotherapy with unselected or EBV-specific T cells for biopsy-proven EBV+ lymphomas after allogeneic hematopoietic cell transplantation', *Blood*, 119: 2644-56.
- DuBridge, R. B., P. Tang, H. C. Hsia, P. M. Leong, J. H. Miller und M. P. Calos. 1987. 'Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system', *Mol Cell Biol*, 7: 379-87.
- Duraiswamy, J., J. M. Burrows, M. Bharadwaj, S. R. Burrows, L. Cooper, N. Pimthanohai und R. Khanna. 2003. 'Ex vivo analysis of T-cell responses to Epstein-Barr virus-encoded oncogene latent membrane protein 1 reveals highly conserved epitope sequences in virus isolates from diverse geographic regions', *J Virol*, 77: 7401-10.
- Edwards, L. J. und B. D. Evavold. 2011. 'T cell recognition of weak ligands: roles of signaling, receptor number, and affinity', *Immunol Res*, 50: 39-48.
- Epstein, M. A., G. Henle, B. G. Achong und Y. M. Barr. 1965. 'MORPHOLOGICAL AND BIOLOGICAL STUDIES ON A VIRUS IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA', *J Exp Med*, 121: 761-70.
- Farrell, P. J. 2015. 'Epstein-Barr Virus Strain Variation', *Curr Top Microbiol Immunol*, 390: 45-69.
- Feederle, R., O. Klinke, A. Kutikhin, R. Poirey, M. H. Tsai und H. J. Delecluse. 2015. 'Epstein-Barr Virus: From the Detection of Sequence Polymorphisms to the Recognition of Viral Types', *Curr Top Microbiol Immunol*, 390: 119-48.
- Fiebiger, B. M., H. Pfister, U. Behrends und J. Mautner. 2015. 'Polyubiquitination of lysine-48 is an essential but indirect signal for MHC class I antigen processing', *Eur J Immunol*, 45: 716-27.
- Fogg, M. H., L. J. Wirth, M. Posner und F. Wang. 2009. 'Decreased EBNA-1-specific CD8+ T cells in patients with Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 3318-23.
- Fruci, D., G. Lauvau, L. Saveanu, M. Amicosante, R. H. Butler, A. Polack, F. Ginhoux, F. Lemonnier, H. Firat und P. M. van Endert. 2003. 'Quantifying recruitment of cytosolic peptides for HLA class I presentation: impact of TAP transport', *Journal of immunology*, 170: 2977-84.

- Gavioli, R., M. G. Kurilla, P. O. de Campos-Lima, L. E. Wallace, R. Dolcetti, R. J. Murray, A. B. Rickinson und M. G. Masucci. 1993. 'Multiple HLA A11-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitopes of different immunogenicities in the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 4', *J Virol*, 67: 1572-8.
- Gottschalk, S., C. Y. Ng, M. Perez, C. A. Smith, C. Sample, M. K. Brenner, H. E. Heslop und C. M. Rooney. 2001. 'An Epstein-Barr virus deletion mutant associated with fatal lymphoproliferative disease unresponsive to therapy with virus-specific CTLs', *Blood*, 97: 835-43.
- Gottschalk, S. und C. M. Rooney. 2015. 'Adoptive T-Cell Immunotherapy', *Curr Top Microbiol Immunol*, 391: 427-54.
- Gras, S., Z. Chen, J. J. Miles, Y. C. Liu, M. J. Bell, L. C. Sullivan, L. Kjer-Nielsen, R. M. Brennan, J. M. Burrows, M. A. Neller, R. Khanna, A. W. Purcell, A. G. Brooks, J. McCluskey, J. Rossjohn und S. R. Burrows. 2010. 'Allelic polymorphism in the T cell receptor and its impact on immune responses', *J Exp Med*, 207: 1555-67.
- Green, K. J., J. J. Miles, J. Tellam, W. J. van Zuylen, G. Connolly und S. R. Burrows. 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: 2510-9.
- Gu, S. Y., T. M. Huang, L. Ruan, Y. H. Miao, H. Lu, C. M. Chu, M. Motz und H. Wolf. 1995. 'First EBV vaccine trial in humans using recombinant vaccinia virus expressing the major membrane antigen', *Dev Biol Stand*, 84: 171-7.
- Haigh, T. A., X. Lin, H. Jia, E. P. Hui, A. T. Chan, A. B. Rickinson und G. S. Taylor. 2008. 'EBV latent membrane proteins (LMPs) 1 and 2 as immunotherapeutic targets: LMP-specific CD4+ cytotoxic T cell recognition of EBV-transformed B cell lines', *J Immunol*, 180: 1643-54.
- Haque, T., G. M. Wilkie, M. M. Jones, C. D. Higgins, G. Urquhart, P. Wingate, D. Burns, K. McAulay, M. Turner, C. Bellamy, P. L. Amlot, D. Kelly, A. MacGilchrist, M. K. Gandhi, A. J. Swerdlow und D. H. Crawford. 2007. 'Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial', *Blood*, 110: 1123-31.
- Hastings, K. T. 2013. 'GILT: Shaping the MHC Class II-Restricted Peptidome and CD4(+) T Cell-Mediated Immunity', *Front Immunol*, 4: 429.
- Heslop, H. E. und C. M. Rooney. 1997. 'Adoptive cellular immunotherapy for EBV lymphoproliferative disease', *Immunol Rev*, 157: 217-22.
- Hill, A. B., S. P. Lee, J. S. Haurum, N. Murray, Q. Y. Yao, M. Rowe, N. Signoret, A. B. Rickinson und A. J. McMichael. 1995. 'Class I major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T lymphocytes specific for Epstein-Barr virus (EBV)-transformed B lymphoblastoid cell lines against which they were raised', *J Exp Med*, 181: 2221-8.
- Hill, A., A. Worth, T. Elliott, S. Rowland-Jones, J. Brooks, A. Rickinson und A. McMichael. 1995. 'Characterization of two Epstein-Barr virus epitopes restricted by HLA-B7', *Eur J Immunol*, 25: 18-24.
- Hillen, N., G. Mester, C. Lemmel, A. O. Weinzierl, M. Muller, D. Wernet, J. Hennenlotter, A. Stenzl, H. G. Rammensee und S. Stevanovic. 2008. 'Essential differences in ligand presentation and T cell epitope recognition among HLA molecules of the HLA-B44 supertype', *Eur J Immunol*, 38: 2993-3003.
- Hislop, A. D., G. S. Taylor, D. Sauce und A. B. Rickinson. 2007. 'Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus', *Annu Rev Immunol*, 25: 587-617.
- Icheva, V., S. Kayser, D. Wolff, S. Tuve, C. Kyzirakos, W. Bethge, J. Greil, M. H. Albert, W. Schwinger, M. Nathrath, M. Schumm, S. Stevanovic, R. Handgretinger, P. Lang und T. Feuchtinger. 2013. 'Adoptive transfer of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1-

- specific t cells as treatment for EBV reactivation and lymphoproliferative disorders after allogeneic stem-cell transplantation', *J Clin Oncol*, 31: 39-48.
- Khanna, R., S. R. Burrows, M. G. Kurilla, C. A. Jacob, I. S. Misko, T. B. Sculley, E. Kieff und D. J. Moss. 1992. 'Localization of Epstein-Barr virus cytotoxic T cell epitopes using recombinant vaccinia: implications for vaccine development', *J Exp Med*, 176: 169-76.
- Khanna, R., S. R. Burrows, J. Nicholls und L. M. Poulsen. 1998. 'Identification of cytotoxic T cell epitopes within Epstein-Barr virus (EBV) oncogene latent membrane protein 1 (LMP1): evidence for HLA A2 supertype-restricted immune recognition of EBV-infected cells by LMP1-specific cytotoxic T lymphocytes', *Eur J Immunol*, 28: 451-8.
- Khanna, R., S. R. Burrows, P. M. Steigerwald-Mullen, S. A. Thomson, M. G. Kurilla und D. J. Moss. 1995. 'Isolation of cytotoxic T lymphocytes from healthy seropositive individuals specific for peptide epitopes from Epstein-Barr virus nuclear antigen 1: implications for viral persistence and tumor surveillance', *Virology*, 214: 633-7.
- Khanna, R., S. R. Burrows, S. A. Thomson, D. J. Moss, P. Cresswell, L. M. Poulsen und L. Cooper. 1997. 'Class I processing-defective Burkitt's lymphoma cells are recognized efficiently by CD4+ EBV-specific CTLs', *J Immunol*, 158: 3619-25.
- Kim, S. M., S. H. Kang und W. K. Lee. 2006. 'Identification of two types of naturally-occurring intertypic recombinants of Epstein-Barr virus', *Mol Cells*, 21: 302-7.
- Korber, N., U. Behrends, A. Hapfelmeier, U. Protzer und T. Bauer. 2016. 'Validation of an IFNgamma/IL2 FluoroSpot assay for clinical trial monitoring', *J Transl Med*, 14: 175.
- Kwok, H., C. W. Wu, A. L. Palser, P. Kellam, P. C. Sham, D. L. Kwong und A. K. Chiang. 2014. 'Genomic diversity of Epstein-Barr virus genomes isolated from primary nasopharyngeal carcinoma biopsy samples', *J Virol*, 88: 10662-72.
- Landais, E., X. Saulquin, E. Scotet, L. Trautmann, M. A. Peyrat, J. L. Yates, W. W. Kwok, M. Bonneville und E. Houssaint. 2004. 'Direct killing of Epstein-Barr virus (EBV)-infected B cells by CD4 T cells directed against the EBV lytic protein BHRF1', *Blood*, 103: 1408-16.
- Lazaro, S., D. Gamarra und M. Del Val. 2015. 'Proteolytic enzymes involved in MHC class I antigen processing: A guerrilla army that partners with the proteasome', *Mol Immunol*, 68: 72-6.
- Lee, S. P., A. T. Chan, S. T. Cheung, W. A. Thomas, D. CroomCarter, C. W. Dawson, C. H. Tsai, S. F. Leung, P. J. Johnson und D. P. Huang. 2000. 'CTL control of EBV in nasopharyngeal carcinoma (NPC): EBV-specific CTL responses in the blood and tumors of NPC patients and the antigen-processing function of the tumor cells', *J Immunol*, 165: 573-82.
- Lee, S. P., W. A. Thomas, N. W. Blake und A. B. Rickinson. 1996. 'Transporter (TAP)-independent processing of a multiple membrane-spanning protein, the Epstein-Barr virus latent membrane protein 2', *Eur J Immunol*, 26: 1875-83.
- Lee, S. P., W. A. Thomas, R. J. Murray, F. Khanim, S. Kaur, L. S. Young, M. Rowe, M. Kurilla und A. B. Rickinson. 1993. 'HLA A2.1-restricted cytotoxic T cells recognizing a range of Epstein-Barr virus isolates through a defined epitope in latent membrane protein LMP2', *J Virol*, 67: 7428-35.
- Leen, A. M., G. D. Myers, U. Sili, M. H. Huls, H. Weiss, K. S. Leung, G. Carrum, R. A. Krance, C. C. Chang, J. J. Mouldrem, A. P. Gee, M. K. Brenner, H. E. Heslop, C. M. Rooney und C. M. Bollard. 2006. 'Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals', *Nat Med*, 12: 1160-6.
- Leen, A., P. Meij, I. Redchenko, J. Middeldorp, E. Bloemena, A. Rickinson und N. Blake. 2001. 'Differential immunogenicity of Epstein-Barr virus latent-cycle proteins for human CD4(+) T-helper 1 responses', *J Virol*, 75: 8649-59.

- Lin, H. J., J. M. Cherng, M. S. Hung, Y. Sayion und J. C. Lin. 2005. 'Functional assays of HLA A2-restricted epitope variant of latent membrane protein 1 (LMP-1) of Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma of Southern China and Taiwan', *J Biomed Sci*, 12: 925-36.
- Lin, J. C., J. M. Cherng, H. J. Lin, C. W. Tsang, Y. X. Liu und S. P. Lee. 2004. 'Amino acid changes in functional domains of latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma of southern China and Taiwan: prevalence of an HLA A2-restricted 'epitope-loss variant'', *J Gen Virol*, 85: 2023-34.
- Lin, X., N. H. Gudgeon, E. P. Hui, H. Jia, X. Qun, G. S. Taylor, M. C. Barnardo, C. K. Lin, A. B. Rickinson und A. T. Chan. 2008. 'CD4 and CD8 T cell responses to tumour-associated Epstein-Barr virus antigens in nasopharyngeal carcinoma patients', *Cancer Immunol Immunother*, 57: 963-75.
- Lindahl, T., A. Adams, G. Bjursell, G. W. Bornkamm, C. Kaschka-Dierich und U. Jehn. 1976. 'Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr virus in a human lymphoid cell line', *J Mol Biol*, 102: 511-30.
- Long, H. M., T. A. Haigh, N. H. Gudgeon, A. M. Leen, C. W. Tsang, J. Brooks, E. Landais, E. Houssaint, S. P. Lee, A. B. Rickinson und G. S. Taylor. 2005a. 'CD4+ T-cell responses to Epstein-Barr virus (EBV) latent-cycle antigens and the recognition of EBV-transformed lymphoblastoid cell lines', *J Virol*, 79: 4896-907.
- Long, H. M., T. A. Haigh, N. H. Gudgeon, A. M. Leen, C. W. Tsang, J. Brooks, E. Landais, E. Houssaint, S. P. Lee, A. B. Rickinson und G. S. Taylor. 2005b. 'CD4+ T-cell responses to Epstein-Barr virus (EBV) latent-cycle antigens and the recognition of EBV-transformed lymphoblastoid cell lines', *J Virol*, 79: 4896-907.
- Long, H. M., G. S. Taylor und A. B. Rickinson. 2011. 'Immune defence against EBV and EBV-associated disease', *Current opinion in immunology*, 23: 258-64.
- Long, Heather M., Odette L. Chagoury, Alison M. Leese, Gordon B. Ryan, Eddie James, Laura T. Morton, Rachel J.M. Abbott, Shereen Sabbah, William Kwok und Alan B. Rickinson. 2013. 'MHC II tetramers visualize human CD4⁺ T cell responses to Epstein-Barr virus infection and demonstrate atypical kinetics of the nuclear antigen EBNA1 response', *J Exp Med*.
- Longnecker R, Kieff E, Cohen JI. . 2013. *Epstein-Barr virus, p 1898–1959. In Knipe DM, Howley P.M. (ed), Fields virology, 6th ed, vol 2. Lippincott, Williams und Wilkins, Philadelphia, PA.*
- Lupton, S. und A. J. Levine. 1985. 'Mapping genetic elements of Epstein-Barr virus that facilitate extrachromosomal persistence of Epstein-Barr virus-derived plasmids in human cells', *Mol Cell Biol*, 5: 2533-42.
- Madura, F., P. J. Rizkallah, C. J. Holland, A. Fuller, A. Bulek, A. J. Godkin, A. J. Schauenburg, D. K. Cole und A. K. Sewell. 2015. 'Structural basis for ineffective T-cell responses to MHC anchor residue-improved "heteroclitic" peptides', *Eur J Immunol*, 45: 584-91.
- Mautner, J., D. Pich, F. Nimmerjahn, S. Milosevic, D. Adhikary, H. Christoph, K. Witter, G. W. Bornkamm, W. Hammerschmidt und U. Behrens. 2004. 'Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 evades direct immune recognition by CD4+ T helper cells', *Eur J Immunol*, 34: 2500-9.
- McLaughlin, L. P., C. M. Bollard und M. D. Keller. 2018. 'Adoptive T Cell Therapy for Epstein-Barr Virus Complications in Patients With Primary Immunodeficiency Disorders', *Front Immunol*, 9: 556.
- Meij, P., A. Leen, A. B. Rickinson, S. Verkoeijen, M. B. Vervoort, E. Bloemena und J. M. Middeldorp. 2002. 'Identification and prevalence of CD8(+) T-cell responses directed against Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 and latent membrane protein 2', *Int J Cancer*, 99: 93-9.

- Merlo, A., R. Turrini, R. Dolcetti, P. Zanovello und A. Rosato. 2011. 'Immunotherapy for EBV-associated malignancies', *International journal of hematology*, 93: 281-93.
- Midgley, R. S., A. I. Bell, D. J. McGeoch und A. B. Rickinson. 2003. 'Latent gene sequencing reveals familial relationships among Chinese Epstein-Barr virus strains and evidence for positive selection of A11 epitope changes', *J Virol*, 77: 11517-30.
- Midgley, R. S., A. I. Bell, Q. Y. Yao, D. Croom-Carter, A. D. Hislop, B. M. Whitney, A. T. Chan, P. J. Johnson und A. B. Rickinson. 2003. 'HLA-A11-restricted epitope polymorphism among Epstein-Barr virus strains in the highly HLA-A11-positive Chinese population: incidence and immunogenicity of variant epitope sequences', *J Virol*, 77: 11507-16.
- Midgley, R. S., N. W. Blake, Q. Y. Yao, D. Croom-Carter, S. T. Cheung, S. F. Leung, A. T. Chan, P. J. Johnson, D. Huang, A. B. Rickinson und S. P. Lee. 2000. 'Novel intertypic recombinants of Epstein-Barr virus in the Chinese population', *J Virol*, 74: 1544-8.
- Miller, N. und L. M. Hutt-Fletcher. 1992. 'Epstein-Barr virus enters B cells and epithelial cells by different routes', *J Virol*, 66: 3409-14.
- Mohl, B. S., J. Chen, K. Sathiyamoorthy, T. S. Jardetzky und R. Longnecker. 2016. 'Structural and Mechanistic Insights into the Tropism of Epstein-Barr Virus', *Mol Cells*, 39: 286-91.
- Moosmann, A., I. Bigalke, J. Tischer, L. Schirrmann, J. Kasten, S. Tippmer, M. Leeping, D. Prevalsek, G. Jaeger, G. Ledderose, J. Mautner, W. Hammerschmidt, D. J. Schendel und H. J. Kolb. 2010. 'Effective and long-term control of EBV PTLD after transfer of peptide-selected T cells', *Blood*, 115: 2960-70.
- Morgan, S. M., G. W. Wilkinson, E. Floettmann, N. Blake und A. B. Rickinson. 1996. 'A recombinant adenovirus expressing an Epstein-Barr virus (EBV) target antigen can selectively reactivate rare components of EBV cytotoxic T-lymphocyte memory in vitro', *J Virol*, 70: 2394-402.
- Moss, D. J., I. S. Misko, S. R. Burrows, K. Burman, R. McCarthy und T. B. Sculley. 1988. 'Cytotoxic T-cell clones discriminate between A- and B-type Epstein-Barr virus transformants', *Nature*, 331: 719-21.
- Nagamine, M., K. Kishibe, M. Takahara, T. Nagato, H. Ishii, N. Bando, T. Ogino und Y. Harabuchi. 2007. 'Selected amino acid change encoding Epstein-Barr virus-specific T cell epitope of the LMP2A gene in Japanese nasal NK/T cell lymphoma patients', *Intervirology*, 50: 319-22.
- Neefjes, J., M. L. Jongsma, P. Paul und O. Bakke. 2011. 'Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation', *Nat Rev Immunol*, 11: 823-36.
- Neefjes, J. und H. Ovaa. 2013. 'A peptide's perspective on antigen presentation to the immune system', *Nat Chem Biol*, 9: 769-75.
- Nonoyama, M. und J. S. Pagano. 1972. 'Separation of Epstein-Barr virus DNA from large chromosomal DNA in non-virus-producing cells', *Nat New Biol*, 238: 169-71.
- O'Reilly, R. J., S. Prockop, A. N. Hasan, G. Koehne und E. Doubrovina. 2016a. 'Virus-specific T-cell banks for 'off the shelf' adoptive therapy of refractory infections', *Bone Marrow Transplant*, 51: 1163-72.
- O'Reilly, R. J., S. Prockop, A. N. Hasan, G. Koehne und E. Doubrovina. 2016b. 'Virus-specific T-cell banks for 'off the shelf' adoptive therapy of refractory infections', *Bone Marrow Transplant*.
- Ossendorp, F., M. Eggers, A. Neisig, T. Ruppert, M. Groettrup, A. Sijts, E. Mengede, P. M. Kloetzel, J. Neefjes, U. Koszinowski und C. Melief. 1996. 'A single residue exchange within a viral CTL epitope alters proteasome-mediated degradation resulting in lack of antigen presentation', *Immunity*, 5: 115-24.
- Palser, A. L., N. E. Grayson, R. E. White, C. Corton, S. Correia, M. M. Ba Abdullah, S. J. Watson, M. Cotten, J. R. Arrand, P. G. Murray, M. J. Allday, A. B. Rickinson, L. S. Young, P. J.

- Farrell und P. Kellam. 2015. 'Genome diversity of Epstein-Barr virus from multiple tumor types and normal infection', *J Virol*, 89: 5222-37.
- Paludan, C., K. Bickham, S. Nikiforow, M. L. Tsang, K. Goodman, W. A. Hanekom, J. F. Fonteneau, S. Stevanovic und C. Munz. 2002. 'Epstein-Barr nuclear antigen 1-specific CD4(+) Th1 cells kill Burkitt's lymphoma cells', *J Immunol*, 169: 1593-603.
- Panikkar, A., C. Smith, A. Hislop, N. Tellam, V. Dasari, K. A. Hogquist, M. Wykes, D. J. Moss, A. Rickinson, H. H. Balfour, Jr. und R. Khanna. 2015. 'Cytokine-Mediated Loss of Blood Dendritic Cells During Epstein-Barr Virus-Associated Acute Infectious Mononucleosis: Implication for Immune Dysregulation', *J Infect Dis*, 212: 1957-61.
- Pati, S., M. Cavrois, H. G. Guo, J. S. Foulke, Jr., J. Kim, R. A. Feldman und M. Reitz. 2001. 'Activation of NF-kappaB by the human herpesvirus 8 chemokine receptor ORF74: evidence for a paracrine model of Kaposi's sarcoma pathogenesis', *J Virol*, 75: 8660-73.
- Petrara, M. R., R. Freguja, K. Gianesin, M. Zanchetta und A. De Rossi. 2013. 'Epstein-Barr virus-driven lymphomagenesis in the context of human immunodeficiency virus type 1 infection', *Front Microbiol*, 4: 311.
- Portis, Toni und Richard Longnecker. 2004. 'Epstein-Barr virus (EBV) LMP2A mediates B-lymphocyte survival through constitutive activation of the Ras/PI3K/Akt pathway', *Oncogene*, 23: 8619.
- Pritchett, R. F., S. D. Hayward und E. D. Kieff. 1975. 'DNA of Epstein-Barr virus. I. Comparative studies of the DNA of Epstein-Barr virus from HR-1 and B95-8 cells: size, structure, and relatedness', *J Virol*, 15: 556-9.
- Provenzano, M., S. Selleri, P. Jin, E. Wang, R. Werden, S. Slezak, S. D. Adams, M. C. Panelli, S. F. Leitman, D. F. Stroncek und F. M. Marincola. 2007. 'Comprehensive epitope mapping of the Epstein-Barr virus latent membrane protein-2 in normal, non tumor-bearing individuals', *Cancer Immunol Immunother*, 56: 1047-63.
- Pudney, V. A., A. M. Leese, A. B. Rickinson und A. D. Hislop. 2005. 'CD8+ immunodominance among Epstein-Barr virus lytic cycle antigens directly reflects the efficiency of antigen presentation in lytically infected cells', *J Exp Med*, 201: 349-60.
- Rancan, C., L. Schirrmann, C. Huls, R. Zeidler und A. Moosmann. 2015. 'Latent Membrane Protein LMP2A Impairs Recognition of EBV-Infected Cells by CD8+ T Cells', *PLoS Pathog*, 11: e1004906.
- Rechsteiner, M. P., C. Berger, L. Zauner, J. A. Sigrist, M. Weber, R. Longnecker, M. Bernasconi und D. Nadal. 2008. 'Latent membrane protein 2B regulates susceptibility to induction of lytic Epstein-Barr virus infection', *J Virol*, 82: 1739-47.
- Redchenko, I. V. und A. B. Rickinson. 1999. 'Accessing Epstein-Barr virus-specific T-cell memory with peptide-loaded dendritic cells', *J Virol*, 73: 334-42.
- Rees, L., E. J. Tizard, A. J. Morgan, W. D. Cubitt, S. Finerty, T. A. Oyewole-Eletu, K. Owen, C. Royed, S. J. Stevens, R. C. Shroff, M. K. Tanday, A. D. Wilson, J. M. Middeldorp, P. L. Amlot und N. M. Steven. 2009. 'A phase I trial of Epstein-Barr virus gp350 vaccine for children with chronic kidney disease awaiting transplantation', *Transplantation*, 88: 1025-9.
- Rickinson, A. B. und D. J. Moss. 1997. 'Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection', *Annu Rev Immunol*, 15: 405-31.
- Rooney, C. M., C. A. Smith, C. Y. Ng, S. K. Loftin, J. W. Sixbey, Y. Gan, D. K. Srivastava, L. C. Bowman, R. A. Krance, M. K. Brenner und H. E. Heslop. 1998. 'Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients', *Blood*, 92: 1549-55.
- Rossjohn, J., S. Gras, J. J. Miles, S. J. Turner, D. I. Godfrey und J. McCluskey. 2015. 'T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules', *Annu Rev Immunol*, 33: 169-200.

- Rowe, M., M. Peng-Pilon, D. S. Huen, R. Hardy, D. Croom-Carter, E. Lundgren und A. B. Rickinson. 1994. 'Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1: a B-cell-specific response that is delayed relative to NF-kappa B activation and to induction of cell surface markers', *J Virol*, 68: 5602-12.
- Saulquin, X., C. Ibisch, M. A. Peyrat, E. Scotet, M. Hourmant, H. Vie, M. Bonneville und E. Houssaint. 2000. 'A global appraisal of immunodominant CD8 T cell responses to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus by bulk screening', *Eur J Immunol*, 30: 2531-9.
- Schmidt, C., S. R. Burrows, T. B. Sculley, D. J. Moss und I. S. Misko. 1991. 'Nonresponsiveness to an immunodominant Epstein-Barr virus-encoded cytotoxic T-lymphocyte epitope in nuclear antigen 3A: implications for vaccine strategies', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 9478-82.
- Scotet, E., J. David-Ameline, M. A. Peyrat, A. Moreau-Aubry, D. Pinczon, A. Lim, J. Even, G. Semana, J. M. Berthelot, R. Breathnach, M. Bonneville und E. Houssaint. 1996. 'T cell response to Epstein-Barr virus transactivators in chronic rheumatoid arthritis', *J Exp Med*, 184: 1791-800.
- Shannon-Lowe, C. und M. Rowe. 2014. 'Epstein Barr virus entry; kissing and conjugation', *Curr Opin Virol*, 4: 78-84.
- Smatti, M. K., H. M. Yassine, R. AbuOdeh, A. AlMarawani, S. A. Taleb, A. A. Althani und G. K. Nasrallah. 2017. 'Prevalence and molecular profiling of Epstein Barr virus (EBV) among healthy blood donors from different nationalities in Qatar', *PLoS One*, 12: e0189033.
- Smith, C. und R. Khanna. 2015. 'The Development of Prophylactic and Therapeutic EBV Vaccines', *Curr Top Microbiol Immunol*, 391: 455-73.
- Sokal, E. M., K. Hoppenbrouwers, C. Vandermeulen, M. Moutschen, P. Leonard, A. Moreels, M. Haumont, A. Bollen, F. Smets und M. Denis. 2007. 'Recombinant gp350 vaccine for infectious mononucleosis: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the safety, immunogenicity, and efficacy of an Epstein-Barr virus vaccine in healthy young adults', *J Infect Dis*, 196: 1749-53.
- Srivastava, G., K. Y. Wong, A. K. Chiang, K. Y. Lam und Q. Tao. 2000. 'Coinfection of multiple strains of Epstein-Barr virus in immunocompetent normal individuals: reassessment of the viral carrier state', *Blood*, 95: 2443-5.
- Steers, N. J., J. R. Currier, O. Jobe, S. Tovanabutra, S. Ratto-Kim, M. A. Marovich, J. H. Kim, N. L. Michael, C. R. Alving und M. Rao. 2014. 'Designing the epitope flanking regions for optimal generation of CTL epitopes', *Vaccine*, 32: 3509-16.
- Steven, N. M., A. M. Leese, N. E. Annels, S. P. Lee und A. B. Rickinson. 1996. 'Epitope focusing in the primary cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus and its relationship to T cell memory', *J Exp Med*, 184: 1801-13.
- Straathof, K. C., A. M. Leen, E. L. Buza, G. Taylor, M. H. Huls, H. E. Heslop, C. M. Rooney und C. M. Bollard. 2005. 'Characterization of latent membrane protein 2 specificity in CTL lines from patients with EBV-positive nasopharyngeal carcinoma and lymphoma', *J Immunol*, 175: 4137-47.
- Tang, Y. L., J. H. Lu, L. Cao, M. H. Wu, S. P. Peng, H. D. Zhou, C. Huang, Y. X. Yang, Y. H. Zhou, Q. Chen, X. L. Li, M. Zhou und G. Y. Li. 2008. 'Genetic variations of EBV-LMP1 from nasopharyngeal carcinoma biopsies: potential loss of T cell epitopes', *Braz J Med Biol Res*, 41: 110-6.
- Tangye, S. G., U. Palendira und E. S. Edwards. 2017. 'Human immunity against EBV-lessons from the clinic', *J Exp Med*, 214: 269-83.
- Taylor, G. S., H. M. Long, J. M. Brooks, A. B. Rickinson und A. D. Hislop. 2015. 'The immunology of Epstein-Barr virus-induced disease', *Annu Rev Immunol*, 33: 787-821.
- Taylor, G. S. und N. M. Steven. 2016. 'Therapeutic vaccination strategies to treat nasopharyngeal carcinoma', *Chin Clin Oncol*, 5: 23.

- Thach, D. C., S. R. Kleeberger, P. C. Tucker und D. E. Griffin. 2001. 'Genetic control of neuroadapted sindbis virus replication in female mice maps to chromosome 2 and associates with paralysis and mortality', *J Virol*, 75: 8674-80.
- Tischer, S., D. Dieks, C. Sukdolak, C. Bunse, C. Figueiredo, S. Immenschuh, S. Borchers, R. Stripecke, B. Maecker-Kolhoff, R. Blasczyk und B. Eiz-Vesper. 2014. 'Evaluation of suitable target antigens and immunoassays for high-accuracy immune monitoring of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus-specific T cells as targets of interest in immunotherapeutic approaches', *J Immunol Methods*, 408: 101-13.
- Trujillo, J. A., S. Gras, K. A. Twist, N. P. Croft, R. Channappanavar, J. Rossjohn, A. W. Purcell und S. Perlman. 2014. 'Structural and functional correlates of enhanced antiviral immunity generated by heteroclitic CD8 T cell epitopes', *J Immunol*, 192: 5245-56.
- Tsai, M. H., A. Raykova, O. Klinke, K. Bernhardt, K. Gartner, C. S. Leung, K. Geletneky, S. Sertel, C. Munz, R. Feederle und H. J. Delecluse. 2013. 'Spontaneous lytic replication and epitheliotropism define an Epstein-Barr virus strain found in carcinomas', *Cell Rep*, 5: 458-70.
- Uhlin, M., M. Okas, J. Gertow, M. Uzunel, T. B. Brismar und J. Mattsson. 2010. 'A novel haplo-identical adoptive CTL therapy as a treatment for EBV-associated lymphoma after stem cell transplantation', *Cancer Immunol Immunother*, 59: 473-7.
- van Kasteren, S. I. und H. S. Overkleeft. 2014. 'Endo-lysosomal proteases in antigen presentation', *Curr Opin Chem Biol*, 23: 8-15.
- Voo, K. S., T. Fu, H. E. Heslop, M. K. Brenner, C. M. Rooney und R. F. Wang. 2002. 'Identification of HLA-DP3-restricted peptides from EBNA1 recognized by CD4(+) T cells', *Cancer Res*, 62: 7195-9.
- Voo, K. S., G. Peng, Z. Guo, T. Fu, Y. Li, L. Frappier und R. F. Wang. 2005. 'Functional characterization of EBV-encoded nuclear antigen 1-specific CD4+ helper and regulatory T cells elicited by in vitro peptide stimulation', *Cancer Res*, 65: 1577-86.
- Walker, A., K. Skibbe, E. Steinmann, S. Pfaender, T. Kuntzen, D. A. Megger, S. Groten, B. Sitek, G. M. Lauer, A. Y. Kim, T. Pietschmann, T. M. Allen und J. Timm. 2016. 'Distinct Escape Pathway by Hepatitis C Virus Genotype 1a from a Dominant CD8+ T Cell Response by Selection of Altered Epitope Processing', *J Virol*, 90: 33-42.
- Wallace, L. E., J. Wright, D. O. Ulaeto, A. J. Morgan und A. B. Rickinson. 1991. 'Identification of two T-cell epitopes on the candidate Epstein-Barr virus vaccine glycoprotein gp340 recognized by CD4+ T-cell clones', *J Virol*, 65: 3821-8.
- Weiss, E. R., S. L. Lamers, J. L. Henderson, A. Melnikov, M. Somasundaran, M. Garber, L. Selin, C. Nusbaum und K. Luzuriaga. 2018. 'Early Epstein-Barr Virus Genomic Diversity and Convergence toward the B95.8 Genome in Primary Infection', *J Virol*, 92.
- Whitney, B. M., A. T. Chan, A. B. Rickinson, S. P. Lee, C. K. Lin und P. J. Johnson. 2002. 'Frequency of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes in the blood of Southern Chinese blood donors and nasopharyngeal carcinoma patients', *J Med Virol*, 67: 359-63.
- Woisetschlaeger, M., C. N. Yandava, L. A. Furmanski, J. L. Strominger und S. H. Speck. 1990. 'Promoter switching in Epstein-Barr virus during the initial stages of infection of B lymphocytes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 1725-9.
- Yamaguchi, J., Y. Hinuma und J. T. Grace, Jr. 1967. 'Structure of virus particles extracted from a Burkitt lymphoma cell line', *J Virol*, 1: 640-2.
- Yao, Q. Y., R. J. Tierney, D. Croom-Carter, G. M. Cooper, C. J. Ellis, M. Rowe und A. B. Rickinson. 1996. 'Isolation of intertypic recombinants of Epstein-Barr virus from T-cell-immunocompromised individuals', *J Virol*, 70: 4895-903.
- Yates, J. L., S. M. Camiolo und J. M. Bashaw. 2000. 'The minimal replicator of Epstein-Barr virus oriP', *J Virol*, 74: 4512-22.

- Yates, J. L., N. Warren und B. Sugden. 1985. 'Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells', *Nature*, 313: 812-5.
- Yates, J., N. Warren, D. Reisman und B. Sugden. 1984. 'A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81: 3806-10.
- Young, L. S. und A. B. Rickinson. 2004. 'Epstein-Barr virus: 40 years on', *Nat Rev Cancer*, 4: 757-68.
- Young LS, Arrand JR und Murray PG. 2007. 'EBV gene expression und regulation. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, et al., editors. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Chapter 27.' in (Cambridge University Press: Cambridge).
- Yu, X., M. Ilecka, E. J. Bartlett, V. Schneidt, R. Bhat, J. Mautner, R. Feederle und H. J. Delecluse. 2015. 'Antigen-armed antibodies targeting B lymphoma cells effectively activate antigen-specific CD4+ T cells', *Blood*, 125: 1601-10.
- Zhou, L., J. N. Chen, X. M. Qiu, Y. H. Pan, Z. G. Zhang und C. K. Shao. 2017. 'Comparative analysis of 22 Epstein-Barr virus genomes from diseased and healthy individuals', *J Gen Virol*, 98: 96-107.

Danksagung

Herzlichen Dank

... an alle, die mich auf dem langen Weg dieser Arbeit unterstützt haben!

... an Prof. Dr. Uta Behrends und PD Dr. Josef Mautner, die mich herzlich in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen und mich in jeglicher Hinsicht unterstützt und gefördert haben. Ich danke euch für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die intensive Betreuung, dank der diese Arbeit gelingen konnte.

... an die gesamte Arbeitsgruppe: Steffi, Wiebe, Kati, Johanna und Johannes, insbesondere auch an Doris und Grit, die immer ein offenes Ohr hatten.

...an Michi, der mich maßgeblich während dieser Arbeit unterstützt hat.

...an meine Familie und Marco, die immer für mich da sind.

...an die TUM Graduate School, die Medizinfakultät der TUM, das Helmholtz-Zentrum München (HMGU), das Deutsche Zentrum für Infektionsmedizin (DZIF), die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), die Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie (DGPI), die Manfred Lautenschläger-Stiftung und die Studienstiftung des Deutschen Volkes für die finanziellen Beiträge zu dieser Arbeit.