

# Prospektive Pilotanalyse der EBV-spezifischen IgG-Antikörperantwort im Kontext der Infektiösen Mononukleose mittels innovativer Multiplex-Serologie

Ramona Weggel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung einer

Doktorin der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Gabriele Multhoff

Prüfer\*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Uta Behrends
2. Priv.-Doz. Dr. Josef Mautner

Die Dissertation wurde am 21.12.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.06.2023 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

---

---

## Inhalt

<b>Inhalt</b> .....	2
1 Abkürzungsverzeichnis.....	7
2 Einleitung .....	11
2.1 Die humorale Immunantwort .....	12
2.1.1 Entwicklung der humoralen Immunantwort .....	12
2.1.2 Immunglobuline .....	12
2.2 Das Epstein-Barr-Virus .....	15
2.2.1 Das EBV-Genom .....	16
2.2.2 EBV-assoziierte Erkrankungen .....	17
2.3 Infektiöse Mononukleose und die humorale Immunantwort .....	18
2.3.1 Infektiöse Mononukleose .....	18
2.3.2 Die EBV-spezifische humorale Immunantwort .....	19
2.4 Fragestellung .....	24
3 Material .....	25
3.1 Geräte.....	25
3.2 Verbrauchsmaterialien .....	26
3.3 Chemikalien und kommerzielle Reagenzien.....	26
3.4 Kommerzielle Kits .....	27
3.5 Allgemeine Puffer und Lösungen .....	28
3.6 Biochemische Puffer und Lösungen.....	28
3.7 Zellkulturmedien.....	29
3.8 Zelllinien.....	30
3.9 Bakterienstämme .....	30
3.10 Oligonukleotide für die Klonierung von Codon-optimierten EBV- Genen .....	31
3.11 DNA modifizierende Enzyme .....	32
3.12 Plasmide für die rekombinante Proteinexpression.....	32
3.13 Antikörper .....	33

# Inhaltsverzeichnis

---

---

3.14 Blutspender.....	34
4 Methoden .....	35
4.1 Molekularbiologische Methoden.....	35
4.1.1 Einführung in die Codonoptimierung.....	35
4.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	36
4.1.3 Agarose-Gelelektrophorese.....	37
4.1.4 Restriktionsverdau.....	38
4.1.5 Synthese von glatten Enden nach dem Restriktionsverdau .....	38
4.1.6 Phenol-Chloroform-Extraktion.....	39
4.1.7 Isolation und Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	39
4.1.8 Ligation von Vektor und Insert.....	40
4.1.9 Transformation von Bakterien.....	40
4.1.10 Präparation von Plasmid-DNA.....	41
4.1.10.1 Minipräparation .....	41
4.1.10.2 DNA-Sequenzanalyse.....	41
4.1.10.3 Verdünnungsausstrich .....	42
4.1.10.4 Maxipräparation .....	42
4.1.10.5 Bestimmung der DNA-Konzentration .....	43
4.2 Zellbiologische Methoden .....	43
4.2.1 Allgemeine Anmerkungen.....	43
4.2.2 Isolierung von PBMC durch Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation .....	43
4.2.3 Bestimmung der Zellzahl .....	44
4.2.4 Kryokonservierung von PBMC und Plasma .....	44
4.2.5 Kultivierung von HEK293T Suspensionszellen .....	45
4.2.6 Rekombinante Proteinexpression in HEK293T Suspensionszellen.....	45
4.2.6.1 Transfektion von HEK293T Zellen.....	45
4.2.6.2 Zellernte.....	46
4.2.6.3 Proteinisolation .....	46

# Inhaltsverzeichnis

---

---

4.2.6.4 Konzentrieren von Proteinen.....	47
4.3 Immunologische Nachweismethoden.....	47
4.3.1 Qualitativer Nachweis der Proteine.....	47
4.3.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	47
4.3.1.2 Protein-Transfer (Western-Blot) .....	48
4.3.1.3 Immunologischer Nachweis der Proteine .....	48
4.3.2 Untersuchung der EBV-spezifischen humoralen Immunantwort in Patienten mit Infektiöser Mononukleose.....	49
4.3.2.1 Allgemeines .....	49
4.3.2.2 Patientenkohorte.....	49
4.3.2.3 IgG-Standardreihe .....	50
4.3.2.4 Multiplex-Dot-Blot-Verfahren.....	51
4.4 Sequenzanalyse .....	52
4.5 Eingesetzte Software .....	53
4.6 Auswertung.....	53
5 Ergebnisse .....	55
5.1 Detektion EBV-spezifischer IgG-Serumantworten im fluoreszenzbasierten Dot-Blot-Verfahren.....	55
5.2 Proteinexpression und Codonoptimierung.....	56
5.2.1 Nachweis der EBV-Antigene im Dot-Blot- und Western-Blot-Verfahren .....	56
5.2.2 Erhöhte Proteinausbeute durch Codonoptimierung .....	58
5.3 Einflussfaktoren auf die Messung der humoralen Immunantwort .....	60
5.3.1 Keine Interferenz zwischen humanen IgG- und anti-His <sub>6</sub> -Antikörpern bei Bindung an die EBV-Antigene.....	60
5.3.2 Abhängigkeit der IgG-Serumantwort von der Antigenmenge .....	62
5.4 Analyse der EBV-spezifischen humoralen Immunantwort in Patienten der IMMUC-Studie .....	65
5.4.1 Charakterisierung der untersuchten Patientenkohorte .....	65
5.4.2 Bestimmung des Schwellenwerts für positive Serumsignale.....	67

# Inhaltsverzeichnis

---

---

5.4.3 Individuelle Muster der EBV-spezifischen Antikörperantwort im Krankheitsverlauf der Infektiösen Mononukleose.....	71
5.4.4 Antigenabhängige Kinetik der EBV-spezifischen IgG-Immunantwort im Verlauf der Infektiösen Mononukleose.....	73
5.4.4.1 Anti-BBLF1-IgG.....	73
5.4.4.2 Anti-BBLF2/BBLF3-IgG.....	75
5.4.4.3 Anti-BFRF3 (VCAp18)-IgG.....	76
5.4.4.4 Anti-BILF2-IgG.....	79
5.4.4.5 Anti-BLLF1 (gp350)-IgG.....	81
5.4.4.6 Anti-BLRF2 (VCAp23)-IgG.....	83
5.4.4.7 Anti-BMRF1 (EAp54)-IgG.....	85
5.4.4.8 Anti-BRRF2-IgG.....	85
5.4.4.9 Anti-BXLF1-IgG.....	90
5.4.4.10 Anti-BZLF1-IgG.....	90
5.4.4.11 Anti-EBNA1 <sup>GA</sup> -IgG.....	93
5.4.4.12 Anti-EBNA2-IgG.....	93
5.4.4.13 Anti-EBNA3-IgG.....	97
5.4.4.14 Anti-EBNA-LP-IgG.....	100
5.4.5 Höhere Rate IgG-positiver Serumantworten im Immunoblot als im Dot-Blot.....	102
5.4.6 Erniedrigte Titer EBV-spezifischer IgG-Antikörper einen Monat nach Symptombeginn.....	104
5.4.7 Die EBV-spezifische Immunantwort in Korrelation zum klinischen Verlauf der Infektiösen Mononukleose.....	106
5.4.7.1 Keine Assoziation zwischen der Stärke der EBV-spezifischen IgG-Immunantwort und dem klinischen Verlauf der Infektiösen Mononukleose.....	106
5.4.7.2 Kein Unterschied im Muster EBV-spezifischer IgG-Serumantworten von Patienten mit mildem oder schwerem Krankheitsverlauf.....	108
5.4.7.3 Dominierende IgG-Antikörperantworten gegen Latenzantigene von EBV B95.8 gegenüber jenen von EBV AG876.....	110
6 Diskussion.....	113

# Inhaltsverzeichnis

---

---

6.1 Der fluoreszenzbasierte Dot-Blot für die EBV-spezifische serologische Diagnostik...	113
6.2 Serologische Marker von Patienten mit Infektiöser Mononukleose.....	116
6.2.1 Individuelle Muster der EBV-spezifischen Antikörperantworten .....	116
6.2.2 Unterschiedliche Dynamik und Stärke der EBV-spezifischen IgG-Serumantwort je nach Antigen .....	118
6.2.2.1 Frühe und sehr frühe lytische Antigene .....	118
6.2.2.2 Viruskapsidantigene.....	120
6.2.2.3 Membran- und Hüllproteine.....	121
6.2.2.4 Latenzantigene .....	123
6.2.3 Ursachen für die Diskrepanz serologischer Testergebnisse .....	125
6.3 Abnahme der IgG-Titer einen Monat nach EBV-Primärinfektion.....	130
6.4 Keine Vorhersagbarkeit eines schweren Krankheitsverlaufs durch einzelne serologische Biomarker .....	132
6.4.1 Korrelation einzelner antigenspezifischer Serumantworten mit dem Verlauf der Infektiösen Mononukleose.....	132
6.4.2 Keine Korrelation zwischen gesamter EBV-spezifischer IgG-Serumantwort und Verlauf der Infektiösen Mononukleose.....	134
6.5 Ausblick .....	136
7 Zusammenfassung.....	138
8 Abbildungsverzeichnis.....	140
9 Tabellenverzeichnis.....	142
10 Literaturverzeichnis .....	143
Danksagung .....	151

## 1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AFU	<i>Arbitrary fluorescence units</i>
AGV	Abteilung für Genvektoren
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CAEBV	Chronisch aktive EBV(-Infektion)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cdo	Codon-optimiert
CF	<i>Cell fraction</i>
CFS	Chronisches Fatigue Syndrom
CLIA	<i>Chemoluminescence immunoassay</i>
C <sub>max</sub>	Maximale Komplexität (der IM)
CMV	Cytomegalievirus
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CRP	C-reaktives Protein
CW	<i>Continuous wave</i>
d	Tage (days)
DAO	<i>Days after onset</i>
DB	Dot-Blot
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>2'-Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DZIF	Deutsches Zentrum für Infektionsforschung
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EA	<i>Early antigen</i>
EBNA	Epstein-Barr-Virus nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	<i>Enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	<i>Enzyme immunoassay</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
etc.	Et cetera
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
g	Gramm
G	Guanin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
gp	Glykoprotein

# Abkürzungsverzeichnis

---

h	<i>Hour(s)</i> (Stunde(n))
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HHV	Humanes Herpesvirus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLH	Hämophagozytische Lymphohistiozytose
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IARC	<i>International Agency for Cancer Research</i>
IB	Immunoblot
IEA	<i>Immediate early antigen</i>
IFA	<i>Immunofluorescence assay</i>
Ig	Immunglobulin
IgG-pos.	IgG-positiv
IL	Interleukin
IM	Infektiöse Mononukleose
IMMUC	Infektiöse Mononukleose in München
inkl.	Inklusive
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaar
KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KI	Konfidenzintervall
KV	Kilovolt
l	Liter
LA	<i>Late antigen</i>
LB	<i>Luria Broth</i>
M	Mol(ar)
MA	<i>Membrane antigen</i>
Max	Maximum
ME	Myalgische Encephalomyelitis
MFI	<i>Multiplex flow immunoassay</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
Min	Minimum
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol(ar)
mm	Millimeter
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MS	Multiple Sklerose
MW	Mittelwert
µF	Mikrofarad



# Abkürzungsverzeichnis

---

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NC	Nitrocellulose
Ni	Nickel
NK	Natürliche Killer (Zelle)
nm	Nanometer
NPC	Nasopharynxkarzinom
nt	Nukleotid
NTA	Nitriloessigsäure
o. D.	Ohne Datum
ORF	<i>Open reading frame</i>
p	Promotor
PAA	Polyacrylamid
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>Phosphat-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEI	Polyethylenimin
p <sub>max</sub>	Maximale Protraktion (der IM)
pmol	Pikomol
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PTLD	<i>Post-transplant lymphoproliferative disease</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RA	Rheumatoide Arthritis
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
s	Sekunden
SD	<i>Standard deviation</i> (Standardabweichung)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
s <sub>max</sub>	Maximaler Schweregrad (der IM)
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SOC	<i>Super Optimal Broth with Catabolite repression</i>
T	Thymin
T	<i>Tween-20</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS	<i>TRIS-buffered saline</i>
TBS-T	<i>TRIS-buffered saline Tween 20</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

## Abkürzungsverzeichnis

---

tRNA	<i>Transfer RNA</i>
U	Uracil
U	Einheit für Enzymaktivität ( <i>unit</i> )
u. a.	Unter anderem
USA	<i>United States of America</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
VCA	<i>Virus capsid antigen</i>
z. B.	Zum Beispiel

Begriffe aus der englischen Sprache wurden in der Arbeit durch kursive Schreibweise gekennzeichnet. Aus Gründen der Lesbarkeit wurde im Text die männliche Form gewählt, dessen ungeachtet beziehen sich die Angaben auf Angehörige aller Gender.

## 2 Einleitung

Die menschliche Immunabwehr basiert auf den vier Säulen Erkennung, Elimination, Regulation und Gedächtnis. Man unterscheidet die angeborene von der adaptiven Immunantwort, die jeweils von zellulären und humoralen Mechanismen vermittelt werden. Während die angeborene Immunantwort, zu der Monozyten und Makrophagen, Granulozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Mastzellen sowie lösliche Faktoren wie das Komplementsystem zählen, unmittelbar nach Exposition eine erste unspezifische Abwehr gegenüber Erregern initiiert, erfolgt die adaptive Immunantwort erst verzögert nach mehreren Stunden bis Tagen. Über mustererkennende Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) identifizieren die Komponenten des angeborenen Immunsystems die Erreger anhand konservierter Merkmale (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs). Hierbei handelt es sich um erregerspezifische Eigenschaften, wie zum Beispiel (z. B.) mannosereiche Oligosaccharide, Peptidoglykane sowie Lipopolysaccharide der bakteriellen Zellwand oder virale und parasitäre Bestandteile. Mittels Phagozytose, komplementvermittelter Lyse und zytokinbasierter Inflammation wird eine erste Barriere beziehungsweise (bzw.) Erregerelimination garantiert und zudem eine adaptive Immunantwort in sekundären lymphatischen Organen ausgelöst. Die adaptive Immunantwort wird auch als antigenspezifische Immunantwort bezeichnet, da T- und B-Lymphozyten individuelle Merkmale der Antigene über antigenspezifische Rezeptoren erkennen, was in einer klonalen Expansion und Differenzierung der Zellen resultiert. Außerdem bildet die adaptive Immunantwort ein immunologisches Gedächtnis aus, sodass die Immunantwort bei einer erneuten Infektion mit demselben Erreger schneller erfolgen kann.

Die Effektorfunktionen des adaptiven Immunsystems werden von zellulären und humoralen Komponenten vermittelt. T-Lymphozyten sind in der Lage, infizierte und auch transformierte Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Antikörper binden extrazelluläre und Oberflächenantigene und neutralisieren so ihre Funktion oder markieren sie für Immunzellen (Murphy 2012).

## 2.1 Die humorale Immunantwort

### 2.1.1 Entwicklung der humoralen Immunantwort

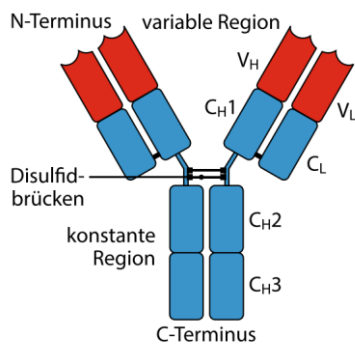
Die Basis der adaptiven, humoralen Immunantwort bilden Antikörper, die von B-Zellen produziert werden. Hierfür muss die antigenspezifische B-Zelle aktiviert werden, was sowohl die Bindung des Antigens an den spezifischen B-Zell-Rezeptor als auch in der Regel eine Interaktion mit einer antigenspezifischen T-Helfer-Zelle voraussetzt. Nachdem das Antigen an den spezifischen B-Zell-Rezeptor, ein membranständiges Immunglobulin (Ig), gebunden hat, wird es internalisiert, prozessiert und Spaltprodukte auf MHC-II-Molekülen (*major histocompatibility complex*, MHC) an der Oberfläche der B-Zelle präsentiert. Trifft das membrangebundene Antigenfragment auf eine entsprechende antigenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zelle (*cluster of differentiation*, CD), wird die B-Zelle über eine T-Zell-B-Zell-Interaktion stimuliert. Die Bindung des CD40-Rezeptors auf B-Zellen und dem CD40-Liganden auf T-Zellen resultiert in einer Aktivierung, klonalen Expansion und Differenzierung der für das Antigen spezifischen B-Zelle. Dabei kann die B-Zelle zwei unterschiedliche Differenzierungswege einschlagen: Entweder sie differenziert zum extrafollikulären Plasmablasten, der sofort Antikörper produziert und damit eine rasche primäre Immunität garantiert, oder die aktivierte B-Zelle durchläuft im Keimzentrum eines sekundären Lymphfollikels einen Reifungsprozess. Durch somatische Hypermutation in den Immunglobulingenen kommt es zu einer Affinitätsreifung und zur Bildung hochaffiner Antikörper, die das entsprechende Antigen stärker binden können. Ergebnis dieses Reifungsprozesses ist somit eine terminal differenzierte, nicht mehr teilungsfähige Plasmazelle, die hochaffine Antikörper sezerniert, oder eine B-Gedächtniszelle, die bei erneuter Infektion mit dem gleichen Pathogen schnell zu einer Antikörper sezernierenden Plasmazelle differenzieren kann (Batista und Harwood 2009; MacLennan 1994; Murphy 2012; Rajewsky 1996).

### 2.1.2 Immunglobuline

Antikörper oder Immunglobuline sind heterodimere Proteine, die in fünf verschiedene Klassen und innerhalb der Klassen in eigene Subtypen unterteilt werden können. Strukturell bestehen die Immunglobuline aus zwei schweren Ketten, die die Antikörperklasse definieren, und zwei leichten Ketten, die in die beiden Subklassen lambda und kappa unterteilt werden. Funktionell lassen sich die variablen Domänen von den konstanten Domänen unterscheiden. Die variablen Domänen des Antikörpers bilden die Antigenbindungsstellen, die ein spezifisches Antigen

# Einleitung

über nicht-kovalente Wechselwirkungen wie z. B. elektrostatische Wechselwirkungen, van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen binden. Die Affinität beschreibt die Stärke der Wechselwirkung zwischen dem Antigen und der Antigenbindungsstelle, also wie fest das Antigen gebunden werden kann. Durch somatische Hypermutation wird im Laufe der Immunantwort die Affinität des Antikörpermoleküls für das Antigen erhöht und somit die im vorangegangenen Abschnitt beschriebene Anpassungsfähigkeit an ein spezifisches Antigen ermöglicht. Die konstanten Domänen des Antikörpers vermitteln Effektorfunktionen, die sich je nach Antikörperisotyp und Subtyp bei gleicher Antigenspezifität unterscheiden können (Murphy 2012; Schroeder, Jr. und Cavacini 2010). Nachfolgende Abbildung illustriert vereinfacht den Aufbau eines Antikörpermoleküls (Murphy und Weaver 2018).



## Abbildung 2.1 Antikörper als heterodimere Proteine.

Immunglobuline sind heterodimere Proteine, die sich aus zwei schweren und zwei leichten Ketten zusammensetzen, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die leichten Ketten bestehen aus einer variablen Region ( $V_L$ ) und einer konstanten Region ( $C_L$ ), die schweren Ketten aus einer variablen Region ( $V_H$ ) und drei konstanten Regionen ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ). Die Verbindung zwischen der ersten konstanten Region ( $C_{H1}$ ) mit der zweiten konstanten Region ( $C_{H2}$ ) der schweren Kette bildet die sogenannte Gelenkregion. Die beiden variablen Regionen der jeweiligen leichten und schweren Kette am N-terminalen Ende des Antikörpers repräsentieren die beiden identischen Antigenbindungsstellen (rot dargestellt) (Murphy und Weaver 2018).

Insgesamt lassen sich Antikörper in fünf Klassen (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) unterteilen, die sich in Struktur, Plasmaverteilung und Funktion unterscheiden. Zu den drei wesentlichen Effektorfunktionen der Immunglobuline gehören die Neutralisation von Antigenen, die Opsonierung und die Komplementaktivierung. Indem Antikörper Antigene (Erreger oder Erregertoxine) binden und damit neutralisieren, verhindern sie die Infektion weiterer Zellen bzw. deren Schädigung. Dieser Effekt wurde erstmals 1890 von Behring und Kitasato im Zusammenhang mit dem Diphtherietoxin beschrieben. Die Opsonierung beruht auf der Ausbildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes, der die Phagozytose des Antigens durch Fresszellen erleichtert. Die Komplementaktivierung führt entweder über den klassischen Weg zur Ausbildung eines Membran-attackierenden Komplexes mit Erregerlyse, oder erleichtert im Rahmen der Opsonierung über den alternativen Komplementweg ebenfalls die Phagozytose (Murphy 2012;

# Einleitung

Schroeder, Jr. und Cavacini 2010). Welcher Isotyp vorliegt, wird von der konstanten Region der schweren Kette ( $C_H$ ) definiert. Zu Beginn der Immunantwort bilden die B-Zellen Antikörper vom IgM und IgD Typ, nach Antigen- und Zytokinstimulation kann später ein Klassenwechsel zu IgG, IgA oder IgE erfolgen. Welche Antikörperklasse gebildet werden soll, hängt dabei vom Antigen, der Stimulation durch CD4+ T-Helferzellen und deren Zytokinsekretion sowie dem Umgebungsmilieu ab. Tabelle 2.1 fasst die Eigenschaften der verschiedenen Antikörperisotypen zusammen (Schroeder, Jr. und Cavacini 2010).

**Tabelle 2.1 Immunglobulin-Isotypen und ihre Funktion in der Immunabwehr.**

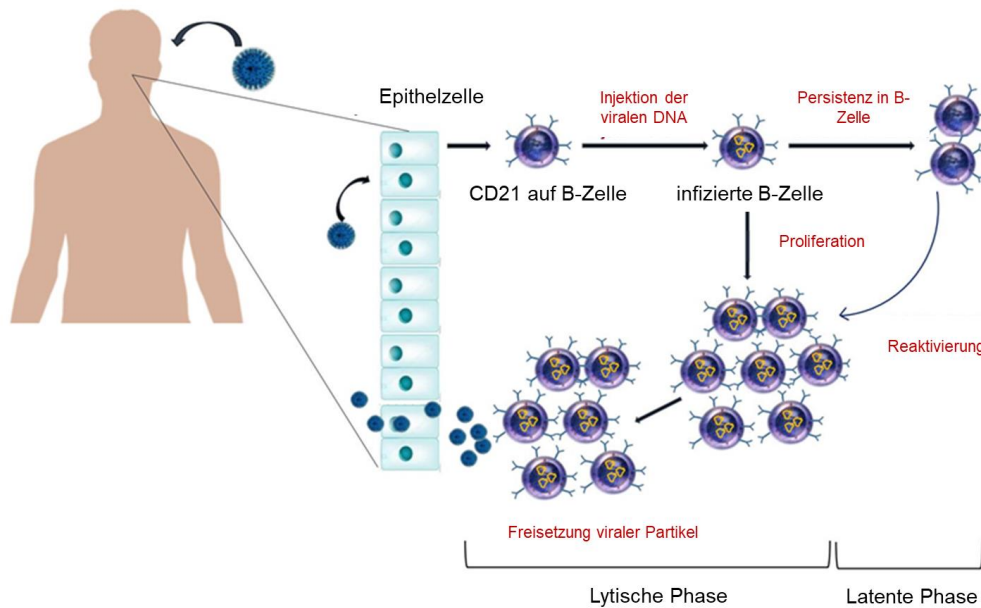
Isotyp	Mengenanteil	Struktur	Hauptfunktion
IgG	75 %	Monomer	Sekundäre Immunantwort Neutralisation, Komplementaktivierung, Opsonierung
IgM	10 %	Pentamer	Primäre Immunantwort Neutralisation, Komplementaktivierung, Opsonierung
IgA	15 %	Monomer, Dimer	Schleimhautschutz, Neutralisationsfunktion in Körpersekreten (Schleim, Schweiß, Speichel, Muttermilch, Tränenflüssigkeit)
IgD	< 0,5 %	Monomer	weitgehend unklar, vorwiegend membrangebunden
IgE	< 0,01 %	Monomer	Helminth-Abwehr, allergische Typ-I-Sofortreaktion

Immunglobuline vom IgG Typ haben die höchste Konzentration im Serum und lassen sich aufgrund struktureller und funktioneller Unterschiede in den konstanten Regionen der schweren Kette nochmals in vier verschiedene Subtypen unterteilen. Diese unterscheiden sich maßgeblich in ihrer Plasmakonzentration sowie in ihrer Fähigkeit zur Komplementaktivierung und Opsonierung (Schroeder, Jr. und Cavacini 2010). Alle IgG Subtypen sind plazentagängig und vermitteln den sogenannten Nestschutz, die Leihimmunität der Mutter während der Schwangerschaft und den ersten Wochen nach der Geburt. Der durch maternale Antikörper vermittelte Nestschutz ist essentiell, da das adaptive Immunsystem eines Fötus und Neugeborenen noch nicht vollständig ausgereift ist (Murphy 2012; Schroeder, Jr. und Cavacini 2010). Eine weitere Gemeinsamkeit aller IgG Subtypen ist deren lange Plasmahalbwertszeit, wodurch ein langanhaltender Immunschutz gewährleistet wird (Schroeder, Jr. und Cavacini 2010). Aufgrund der quantitativen Dominanz der IgG-Antikörper im Serum und ihrer Rolle bei der sekundären Immunantwort soll die IgG-vermittelte humorale Immunantwort bei einer Epstein-Barr-Virus (EBV)-Infektion in der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert werden.

## 2.2 Das Epstein-Barr-Virus

EBV ist weltweit verbreitet und mit zahlreichen nicht-malignen und malignen Erkrankungen assoziiert. Es gehört zur Familie der humanen Herpesviren (HHV-4) und wurde zum ersten Mal aus einer Burkitt-Lymphom Zelllinie von Epstein et al. im Jahr 1964 isoliert (Epstein et al. 1964). Sein Wirt ist ausschließlich der Mensch und die Transmission erfolgt primär über Tröpfcheninfektion, wobei Bluttransfusionen und Organtransplantationen ebenfalls zu einer Übertragung von EBV führen können (Odumade et al. 2011; Smatti et al. 2018). Nach oraler Aufnahme befällt das Virus hauptsächlich Epithelzellen und B-Lymphozyten des Oropharynx, was in einer für Herpesviren charakteristischen lebenslang persistierenden Infektion resultiert. Die Infektion der B-Lymphozyten erfolgt über das virale Hüllglykoprotein gp350, das an den Oberflächenrezeptor CD21 der B-Zellen bindet (Bornkamm und Hammerschmidt 2001; Nemerow et al. 1987; Young und Rickinson 2004). In neu infizierten B-Zellen wird nur eine limitierte Anzahl an viralen Proteinen, die sogenannten Latenzproteine, exprimiert, die die infizierte Zelle wachstumstransformieren. In diesen Zellen kann es durch bislang nur zum Teil aufgeklärte Signale zur lytischen Reaktivierung des Virus und zur Freisetzung infektiöser Viruspartikel kommen. Diese können weitere B-Zellen infizieren, oder auf andere Individuen übertragen werden (Bornkamm und Hammerschmidt 2001). Dieser Zusammenhang wird in Abbildung 2.2 illustriert. Die Virusvermehrung und das Auswachsen latent infizierter B-Zellen werden in gesunden Individuen maßgeblich durch eine zellulär vermittelte Immunantwort kontrolliert. Die Hauptakteure sind vor allem CD4+ und CD8+ T-Zellen sowie NK-Zellen. Patienten mit T- und/oder NK-Zell-Defekten und auch iatrogen immunsupprimierte Patienten nach einer Stammzell- oder Organtransplantation sind deshalb besonders gefährdet, EBV-assoziierte Erkrankungen zu entwickeln (Chijioko et al. 2013; Hislop und Taylor 2015; Odumade et al. 2011; Rickinson et al. 2014). Welche Rolle die humorale Immunantwort in der akuten Phase der Infektion spielt und wieso einige EBV-Träger trotz suffizienter T-Zell-Antwort EBV-assoziierte Erkrankungen inklusive (inkl.) EBV-positiver Malignome entwickeln, ist jedoch noch weitgehend ungeklärt (Niedobitek et al. 2001; Rickinson et al. 2014).

# Einleitung



## Abbildung 2.2 Der EBV-Lebenszyklus mit latenter und lytischer Phase.

Dargestellt ist die Interaktion zwischen dem Epstein-Barr-Virus (EBV) und seinem Wirt. Das Virus infiziert primär Epithelzellen oder B-Zellen des Oropharynx. In B-Zellen etabliert EBV eine latente Infektion, in der keine Virusproduktion stattfindet und nur ein Teil der viralen Proteine, die Latenzproteine, exprimiert werden. Verschiedene Signale, etwa die Differenzierung der infizierten B-Zellen zu Plasmazellen, können zu einer Reaktivierung des Virus und zum Eintritt in den lytischen Zyklus und zur Virusproduktion und -freisetzung führen (Smatti et al. 2018).

### 2.2.1 Das EBV-Genom

Das EBV-Genom besteht aus einer doppelsträngigen, linearen Desoxyribonukleinsäure (2'-*deoxyribonucleic acid*, DNA) von etwa 172 Kilobasenpaaren (kbp) und codiert für mehr als 85 Proteine (Smatti et al. 2018). Die Nomenklatur der EBV-Gene basiert historisch auf der Fragmentierung des Genoms des EBV-Prototyps B95.8 mit dem Restriktionsenzym BamHI, wodurch unterschiedlich große DNA-Fragmente entstanden. Diese wurden absteigend ihrer Größe nach alphabetisch mit A, B, C et cetera (etc.) und a, b, c etc. sowie nach ihrer Leserichtung (*left*, L; *right*, R) bezeichnet (Baer et al. 1984; Gärtner et al. 2010; Smatti et al. 2018; Young und Rickinson 2004). Die Sequenzierung des Genoms von EBV B95.8 durch Baer et al. gilt als Pionierleistung, da vor 1984 ein DNA-Abschnitt von dieser Größe noch nie sequenziert worden war und EBV damit das erste Virus mit molekularbiologisch vollständig identifiziertem Genom wurde. Die Arbeitsgruppe schuf damit die Grundlage, den Lebenszyklus des Virus zu verstehen und den Pathomechanismus der EBV-assoziierten Tumorgenese weiter zu untersuchen (Young und Rickinson 2004). Der Großteil der Gene kodiert für lytische Proteine, die den Nukleotidmetabolismus, die Replikation und die Bildung viraler Strukturkomponenten



# Einleitung

---

sicherstellen (Smatti et al. 2018). Man unterscheidet zwischen den sehr frühen (*immediate early antigen*, IEA), frühen (*early antigen*, EA) und späten (*late antigen*, LA) lytischen Proteinen. Während der latenten Phase wird nur ein Bruchteil des offenen Leserahmens (ORF) exprimiert, nämlich die Kernantigene EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, und EBNA-LP sowie die Membranproteine LMP1, LMP2A und LMP2B (Smatti et al. 2018). Weltweit gibt es mehrere EBV-Stämme, die sich auf Sequenzebene unterscheiden und zum Teil eine unterschiedliche geographische Verteilung aufweisen. Aufgrund von Sequenzunterschieden werden EBV-Stämme in Typ I und II unterteilt. EBV Typ I und II unterscheiden sich hauptsächlich in ihren EBNA2-Genen, die nur in 54 % identisch sind, sowie Abweichungen in den EBNA3-Genen, während das übrige Genom zu mehr als 95 % deckungsgleich ist. Allgemein anerkannter Prototyp für Typ-I-Viren ist EBV B95.8 und für Typ-II-Viren EBV AG876. Mit EBV M81 konnte darüber hinaus kürzlich ein neuer Subtyp aus einem chinesischen Nasopharynxkarzinom (NPC) isoliert werden (Cirac et al. 2018; Correia et al. 2018; Sample et al. 1990; Smatti et al. 2018; Tsai et al. 2013). Bis auf Afrika und Papua Neuguinea, in denen Typ-I- und Typ-II-EBV etwa gleich häufig vorkommen, sind Typ-I-Stämme weltweit vorherrschend (Dunmire et al. 2018; Smatti et al. 2018; Zimmer et al. 1986).

## 2.2.2 EBV-assoziierte Erkrankungen

Über 90 % der Weltbevölkerung sind mit EBV infiziert (Bu et al. 2016; Dunmire et al. 2018; Goswami et al. 2017; Liu et al. 2018; Smatti et al. 2018). In der westlichen Welt erfolgt die Primärinfektion in 40-65 % der Fälle in der frühen Kindheit und verläuft dann in der Regel asymptomatisch. Dagegen äußert sich die erstmalige Infektion während der Adoleszenz oder dem Erwachsenenalter oftmals als Infektiöse Mononukleose oder Pfeiffersches Drüsenfieber, auf das nachfolgend näher eingegangen wird (Cameron et al. 2006). Außerdem ist die EBV-Infektion mit verschiedenen hämatologischen und epithelialen Neoplasien, wie dem Burkitt-Lymphom, dem Hodgkin-Lymphom, dem Magenkarzinom und dem NPC, assoziiert (Dunmire et al. 2018; Niedobitek et al. 2001; Young und Rickinson 2004). Weltweit scheint das Epstein-Barr-Virus jährlich etwa 200.000 Krebsfälle zu verursachen (Hislop und Taylor 2015; Liu et al. 2018) und wurde bereits 1997 von der Internationalen Agentur für Krebsforschung (*International Agency for Cancer Research*, IARC) als Gruppe 1 Karzinogen deklariert (Niedobitek et al. 2001). EBV scheint neben seinem onkogenen Potential auch mit der Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen, wie der Multiplen Sklerose (MS), dem Systemischen Lupus erythematodes (SLE), der Rheumatoiden Arthritis (RA) und dem chronischen Fatigue Syndrom (synonym Myalgische Enzephalomyelitis, ME/CFS), assoziiert zu sein (Loebel et al.

2017). Darüber hinaus können in immunsupprimierten Transplantationspatienten EBV-assoziierte, lymphoproliferative Erkrankungen (*post-transplant lymphoproliferative disease*, PTLD) auftreten (Craig et al. 1993; Dunmire et al. 2018). Besonders gefährdet sind EBV-seronegative Patienten, die sich unter Immunsuppression mit EBV anstecken, oder das Transplantat eines EBV-positiven Spenders erhalten haben. Insgesamt ist EBV für 90 % der PTLD im Kindesalter und für 70 % der PTLD im Erwachsenenalter verantwortlich (Bieling et al. 2018).

## 2.3 Infektiöse Mononukleose und die humorale Immunantwort

### 2.3.1 Infektiöse Mononukleose

Die Infektiöse Mononukleose (IM), das Pfeiffersche Drüsenfieber, ist die häufigste klinische Manifestation der primären EBV-Infektion. Als Namensgeber gelten Sprunt und Evans, die das klinische Syndrom bereits 1920 vor Entdeckung des Virus im Zusammenhang mit atypischen großen peripheren Blutlymphozyten, den sogenannten Pfeiffer-Zellen, beschrieben haben (Odumade et al. 2011). Schließlich konnte 1968 EBV als Pathogen der IM kausal zugeordnet werden (Henle et al. 1968). Die aktuelle Inzidenz der IM in den USA wird auf ungefähr fünf Erkrankungsfälle pro 1000 Personenjahre geschätzt, wobei der Erkrankungsgipfel im Alter von 15 bis 24 Jahren liegt (Luzuriaga und Sullivan 2010). In einer von Balfour et al. publizierten Studie erkrankten 77 % aller primärinfizierten Studenten eines Abschlussjahrgangs der *University of Minnesota* an IM (Balfour, Jr. et al. 2013). Die IM präsentiert sich meist mit der klassischen Trias aus Lymphadenopathie, Tonsillopharyngitis und Fieber. Normalerweise ist die IM selbstlimitierend und dauert durchschnittlich 16 Tage. Es können jedoch auch lebensbedrohliche Komplikationen, wie z. B. eine Hepatitis, Myokarditis, Milzruptur sowie neurologische und hämatologische Komplikationen auftreten. Die IM kann sich mit einer sekundären Hämophagozytischen Lymphohistiozytose (HLH) manifestieren (Odumade et al. 2011; Vouloumanou et al. 2012). In seltenen Fällen kann die primäre EBV-Infektion auch zu persistierenden oder rekurreierenden IM-typischen Symptomen (Fieber, Lymphadenopathie und Hepatosplenomegalie) mit anhaltend hoher Viruslast führen, was bei einer Dauer von mindestens sechs Monaten als chronisch aktive EBV-Infektion (CAEBV) klassifiziert wird (Odumade et al. 2011; Zhong et al. 2017). Diagnostiziert wird die IM anhand der klinischen Symptome, dem Blutbild und der Serologie, auf die noch im Detail eingegangen wird. Im Blutbild von IM-Patienten dominiert meist eine Leukozytose mit 40-90 % mononukleären Zellen und Reizformen der Lymphozyten, den bereits erwähnten Pfeiffer-Zellen, bei denen es sich um aktivierte, zytotoxische

# Einleitung

---

T-Lymphozyten handelt (Herold 2018; Luzuriaga und Sullivan 2010). Bei atypischer Präsentation kann die Verdachtsdiagnose durch die Bestimmung der Viruslast in Vollblut, PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) oder Blutplasma bestätigt werden. Die Therapie der unkomplizierten IM beschränkt sich auf supportive Maßnahmen, während bei schweren Verläufen Corticosteroide als Goldstandard gelten. Die Studienlage zum Einsatz von Virostatika, wie z. B. Aciclovir und Ganciclovir, ist begrenzt und lässt noch keinen einheitlichen Konsens über deren Nutzen in der Therapie der primären EBV-Infektion zu (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) 2019; Vouloumanou et al. 2012).

## 2.3.2 Die EBV-spezifische humorale Immunantwort

Die EBV-spezifische humorale Immunantwort hat wichtige Bedeutung für die Diagnostik, das pathogenetische Verständnis der Infektion und therapeutische Optionen, insbesondere für die Entwicklung eines geeigneten EBV-Vakzins. Historisch wurde bereits 1932 von Paul und Bunnell eine nicht EBV-spezifische Antikörperantwort beschrieben (Paul und Bunnell 1974). Hierbei handelt es sich um heterophile Antikörper vom IgM Typ, die sich gegen Glycolipide auf fremden Erythrozyten richten. Diese werden vermutlich von polyreaktiven, naiven B-Zellen nach unspezifischer Zytokin- und EBV-Stimulation in den ersten Wochen der Primärinfektion produziert. Gibt man Patientenserum zu fremden roten Blutzellen, meist vom Schaf, Pferd oder Ziege, kann man *ex vivo* eine Aggregation beobachten, die als positive Paul-Bunnell-Reaktion oder als positiver Mononukleostest interpretiert wird. Während die heterophilen Antikörper bei 85-90 % der Adoleszenten und Erwachsenen mit IM detektiert werden können, zeigen Kleinkinder oft ein falsch negatives Ergebnis, sodass dieser diagnostische Ansatz nur eine begrenzte Aussagekraft besitzt (Middeldorp 2015; Paschale und Clerici 2012). Nach der Entdeckung von EB-Viruspartikeln in Burkitt-Lymphom-Zellen etablierten Henle et al. die Immunfluoreszenz-basierte EBV-Serologie als diagnostischen Goldstandard (Henle et al. 1979). Bei diesem Ansatz werden Burkitt-Lymphom-Zellen *in vitro* kultiviert, von denen ein kleiner Teil lytische Antigene exprimiert. Durch Zugabe von humanem Serum bildet sich ein Antigen-Antikörper-Komplex, der mit indirekter Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden kann (Middeldorp 2015). Von den *Immunfluoreszenzassays* (IFAs), die nach wie vor als Goldstandard in der serologischen Diagnostik gelten, hat sich die Technik über *Enzymimmunoassays* (EIAs) zu *Chemolumineszenzimmunassays* (CLIAs) und innovativen *Multiplex Flow Immunassays* (MFIs) weiterentwickelt. Die Sensitivität und Spezifität der Assays hängt dabei maßgeblich von der Art des Antigens und deren Präparation ab. Die neueren Screeningsysteme verwenden meist rekombinante EBV-Antigene. Hierbei handelt es sich in der Regel um die Antigene des

# Einleitung

Viruskapsidkomplexes (*virus capsid antigen*, VCA), um frühe lytische Antigene (*early antigen*, EA) und das EBV nukleäre Antigen 1 (EBNA1). In kommerziellen Immunoblots, die Lysate virustransformierter Zellen oder rekombinante Antigene verwenden, können die Ergebnisse des Suchtests anschließend bestätigt werden (Bauer 2001; Goswami et al. 2017; Hess 2004; Paschale und Clerici 2012).

Die Antikörperproduktion gegenüber den genannten Antigenen folgt einer charakteristischen Kinetik, die die Grundlage der serologischen Diagnostik einer EBV-Infektion und deren zeitlichen Einordnung darstellt. Typischerweise ist die frische EBV-Infektion durch anti-VCA-IgM und/oder anti-VCA-IgG in Abwesenheit von anti-EBNA1-IgG-Antworten gekennzeichnet. Liegt die Infektion länger zurück, so werden keine anti-VCA-IgM, dafür aber anti-VCA-IgG- und anti-EBNA1-IgG-Antikörperantworten detektiert. Die nachfolgende Tabelle zeigt allerdings, dass die Interpretation des serologischen Profils selbst in immunkompetenten Patienten nicht immer eindeutig ist, sodass häufig verschiedene serologische und molekularbiologische Tests miteinander kombiniert oder Verlaufskontrollen durchgeführt werden müssen (Hess 2004; Odumade et al. 2011; Paschale und Clerici 2012).

**Tabelle 2.2 EBV-spezifisches serologisches Profil bei immunkompetenten Individuen.**

	VCA-IgM	VCA-IgG	EBNA1-IgG	Interpretation
1	-	-	-	Keine Infektion
2	+	-	-	Akute Infektion oder Unspezifität
3	+	+	-	Akute Infektion
4	-	+	+	Persistierende Infektion
5	-	+	-	Akute oder persistierende Infektion
6	+	+	+	Späte Phase der Primärinfektion oder Reaktivierung
7	-	-	+	Unspezifität

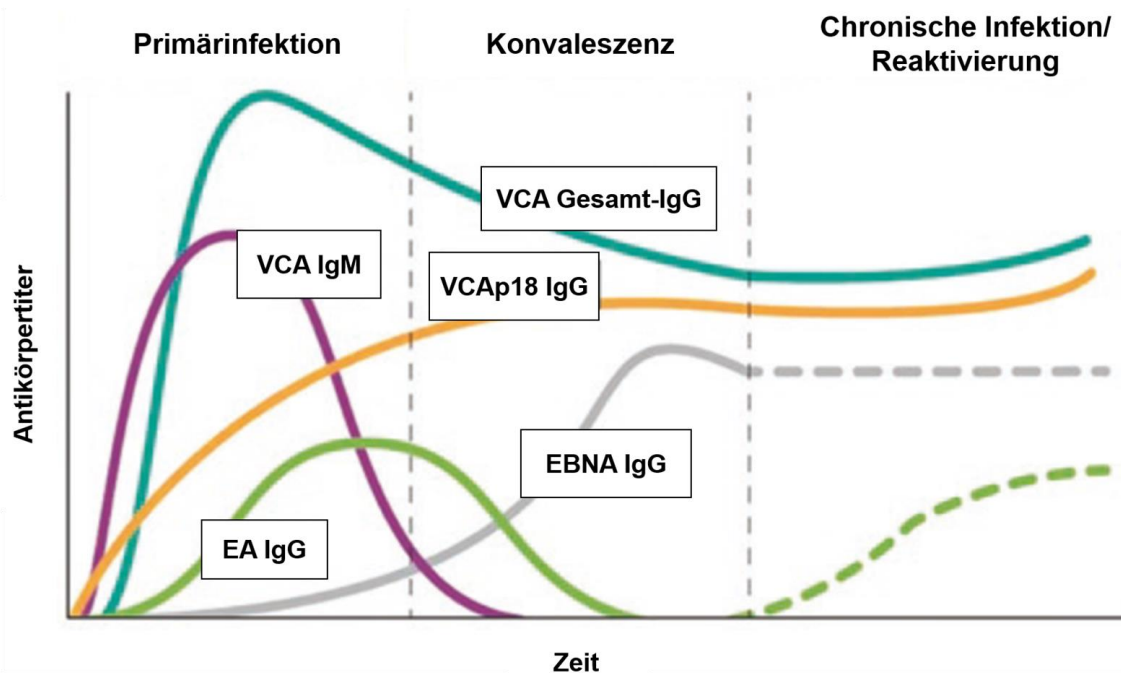
IgG- und IgM-Antikörper gegen Antigene des Viruskapsidkomplexes lassen sich bereits ab Symptombeginn nachweisen. Während anti-VCA-IgG-Antikörper lebenslang detektierbar sind, ist der Nachweis von anti-VCA-IgM auf die frühe Phase der Primärinfektion beschränkt. Allerdings zeigen nicht alle Individuen während der akuten Infektion eine anti-VCA-IgM-Reaktion (Hess 2004; Paschale und Clerici 2012). Mögliche unspezifische Reaktionen durch Rheumafaktoren oder Autoantikörper bzw. Kreuzreaktionen gegenüber Humanes Cytomegalievirus (HCMV), Humanes Immundefizienz-Virus (HIV) oder Hepatitis-A-Viren sind ebenfalls zu berücksichtigen (Paschale und Clerici 2012; Robertson et al. 2003). Bei unklarer akuter Infektion sollte dementsprechend die Diagnostik auf die Bestimmung von anti-EA-IgG erweitert werden. Bis zu drei Monate nach Primärinfektion entwickeln 60-80 % der Patienten anti-EA-IgG-Antikörper (Hess 2004; Paschale und Clerici 2012). Allerdings können hohe anti-EA-IgG-Titer

# Einleitung

---

auch im Rahmen einer Reaktivierung, in Patienten mit NPC und in Immunsupprimierten auftreten (Henle und Henle 1981; Paschale und Clerici 2012). Außerdem finden sich anti-EA-IgG auch in EBV-positiven Individuen (Hess 2004; Luzuriaga und Sullivan 2010), sodass die EA-Serodiagnostik nicht als einziges Kriterium für die Klassifikation des exakten Serostatus herangezogen werden kann, sondern im Rahmen einer Stufendiagnostik unter Berücksichtigung aller labortechnischer und klinischer Befunde erfolgen soll. Anti-EBNA1-IgG lassen sich nicht innerhalb der ersten drei bis vier Wochen nach Primärinfektion nachweisen und gelten dementsprechend als Seromarker für eine persistierende Infektion (Henle et al. 1987; Luzuriaga und Sullivan 2010; Paschale und Clerici 2012). Der Literatur zu Folge findet sich jedoch in 5 % der immunkompetenten Patienten keine anti-EBNA1-IgG-Produktion nach EBV-Infektion. Patienten mit chronisch aktiver Infektion oder unter Immunsuppression sind in der Regel ebenfalls negativ für EBNA1-IgG (Bauer 2001). Beim isolierten Nachweis von anti-VCA-IgG kann somit nicht zwischen einer akuten Infektion mit fehlender oder bereits abgeklungener IgM-Serumantwort, oder einer persistierenden Infektion mit ausbleibender Serokonversion für anti-EBNA1-IgG unterschieden werden. Auch hier empfiehlt sich eine erweiterte Diagnostik, die eine Verlaufskontrolle, einen Immunoblot oder eine Aviditätsbestimmung für anti-VCA-IgG umfasst (Hess 2004; Paschale und Clerici 2012). Die Gesamtbindungsstärke oder Avidität der anti-VCA-IgG-Antikörper nimmt im Laufe der Infektion zu und lässt sich im EIA, IFA oder Immunoblot bestimmen. Hierfür werden zwei Aliquots derselben Patientenprobe untersucht, wobei eine Probe mit Harnstofflysepuffer behandelt wird. Dabei wird der Antigen-Antikörper-Komplex bei geringer Avidität der Antikörperbindung wieder zerstört. Anhand des Quotienten aus nicht mit Harnstoff und mit Harnstoff versetzter Probe lässt sich die Bindungsstärke und somit das Stadium der Immunantwort abschätzen (Hess 2004; Paschale und Clerici 2012; Schubert et al. 1998). Die Aviditätsbestimmung ist vor allem auch dann sinnvoll, wenn ein Patient gleichzeitig positiv für VCA-IgM, VCA-IgG und EBNA1-IgG reagiert. Differentialdiagnostisch wären sowohl eine späte Primärinfektion als auch eine Reaktivierung möglich, wobei für Letztere VCA-IgG-Antikörper mit hoher Avidität sprechen würden (Nystad und Myrmeel 2007). Bleibt das serologische Profil dennoch uneindeutig, kann die Messung der Viruslast im peripheren Blut mittels *real-time*-PCR bei der Diagnostik hilfreich sein (Vouloumanou et al. 2012). Die zeitliche Entwicklung der EBV-spezifischen humoralen Immunantwort ist in Abbildung 2.3 veranschaulicht.

# Einleitung



**Abbildung 2.3 Kinetik der EBV-spezifischen humoralen Immunantwort.**

Dargestellt sind die Antikörpertiter im zeitlichen Verlauf einer EBV-Infektion. Bei Primärinfektion lassen sich anti-VCA-IgM, anti-VCA-IgG und anti-EA-IgG nachweisen. Nach überstandener Primärinfektion (Konvaleszenz) verschwinden anti-VCA-IgM und anti-EA-IgG, wohingegen anti-VCA-IgG lebenslang detektierbar bleiben. Die anti-EBNA1-IgG-Serokonversion setzt erst verzögert ein. Im Falle einer Reaktivierung oder einer chronisch aktiven EBV-Infektion kann es zu Schwankungen in den anti-EBNA1-IgG-Titern und zu einem erneuten Anstieg von anti-EA-IgG kommen (Middeldorp 2015).

Während sich die Methodik der serologischen Nachweisverfahren zur Untersuchung der humoralen Immunantwort gegenüber EBV weiterentwickelt hat, ist die Auswahl der EBV-Antigene immer noch auf wenige limitiert (Goswami et al. 2017). Kommerzielle Immunoblots umfassen EBNA1, VCA (p18 und p23), EA (p54 und p138), einige neuere Assays zusätzlich noch die Membranantigene gp350/gp250 sowie das sehr frühe lytische Antigen BZLF1 (Paschale und Clerici 2012). Die Tatsache, dass das EBV-Genom aber für mehr als 85 verschiedene Proteine kodiert, die alle potenzielle Antigene darstellen, verdeutlicht die Grenzen der aktuellen serologischen Diagnostik. So werden in der Literatur humorale Immunantworten gegenüber EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, LMP1, BZLF1, BRLF1, BMRF2, BXLF1, BGLF5, BcLF1, BALF2 und BLLF1 als diagnostisch relevant diskutiert. Außerdem sind die zum Einsatz kommenden Antigene vor allem auf die Diagnose einer primären EBV-Infektion ausgerichtet, während Antigene, die bei EBV-assoziierten Tumorerkrankungen eine Rolle spielen, wie z. B. LMP1 (Liu et al. 2018; Niedobitek et al. 2001; Smatti et al. 2018), meist unberücksichtigt bleiben (Goswami et al. 2017). Die Diversität der EBV-spezifischen Antikör-

# Einleitung

---

perproduktion kann allerdings nur mit einem serologischen Assay erfasst werden, dessen Antigene das gesamte EBV-Proteom abdecken. Goswami et al. nennen außerdem zwei weitere Kritikpunkte, die den Nachweis der humoralen Immunantwort vom IgG Typ gegen das gesamte EBV-Proteom erschweren. In den meisten Studien handelt es sich bei den Antigenen um Lysate unterschiedlichster EBV-infizierter Zelllinien, die hinsichtlich Antigenzusammensetzung und -expressionsstärke kaum vergleichbar sind (Goswami et al. 2017). Zusätzlich enthalten die Zelllysate neben EBV-spezifischen Proteinen auch Autoantigene der entsprechenden Zelllinie, sodass nicht zwischen EBV-spezifischen Antikörpern und Autoantigen-spezifischen Antworten differenziert werden kann. Um die gesamte EBV-spezifische IgG-Antikörperantwort zu erfassen, müssen also zwei Voraussetzungen erfüllt sein. Erstens sollte es sich bei den Antigenen um Vollängenproteine handeln. Zweitens müssen die Antigene als aufgereinigte und in einem eukaryotischen Expressionssystem hergestellte Proteine vorliegen. Dadurch können unspezifische Reaktionen vermieden und die Expression jedes einzelnen Proteins über eine zusätzlich angefügte Erkennungssequenz quantifiziert werden.

Von verbesserten Serumanalysen auf Basis des gesamten EBV-Proteoms werden neue diagnostische und prognostische Marker für EBV-assoziierte Erkrankungen erwartet. Denn bislang existieren keine eindeutigen Parameter, die zwischen einem komplizierten oder unkomplizierten Verlauf einer IM unterscheiden (Rickinson et al. 2014). So zeigte sich 1980 in einer Studie an 18 Patienten mit IM zwar ein positiver Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Erkrankung und der zellulären Immunreaktion gegenüber löslichen, intrazellulären Antigenen, es konnte jedoch kein Unterschied in der Antikörperreaktion gegenüber dem Viruskapsidkomplex und den frühen lytischen Antigenen in Patienten mit schwerer versus milder IM gefunden werden (Goldstein et al. 1980). In einer anderen Studie wurden acht Patienten mit prolongierter IM (Krankheitssymptome für mindestens sechs Monate) mit Patienten verglichen, bei denen die EBV-Infektion nach sechs Wochen selbstlimitierend war. Die beiden Gruppen zeigten identische anti-VCA-IgG- und anti-VCA-IgM-Serumantworten, während die Patienten mit prolongierter IM eine schnellere und höhere anti-EBNA1-IgG-Serokonversion entwickelten (Cameron et al. 2006). Pannikar et al. konnten in Patienten mit akuter IM im Vergleich zu gesunden, EBV-positiven Individuen in der frühen Phase der Erkrankung keine neutralisierenden Antikörper gegen gp350/BLLF1 finden. Darüber hinaus postulierten Grimm et al., dass hohe anti-gp350-IgG-Titer einen milden Verlauf der IM begünstigen würden (Grimm et al. 2016; Panikkar et al. 2015). Einen gegenteiligen Schluss zogen Bu et al. nach Untersuchung der Antikörperantworten gegen verschiedene ausgewählte EBV-Antigene, darunter auch gp350, in IM-Patienten. Sie konnten keinen Zusammenhang zwischen Titer und Schweregrad der Erkrankung feststellen (Bu et al. 2016).

## 2.4 Fragestellung

Die unterschiedliche Studienlage und die Grenzen der aktuell erhältlichen kommerziellen Testsysteme verlangen eine Optimierung der bisherigen serologischen Immunassays, um die Diagnostik, die Therapie und das pathogenetische Verständnis der IM zu verbessern. In dieser Arbeit sollte daher ein serologischer Assay mit rekombinant produzierten Antigenen des gesamten EBV-Proteoms etabliert werden und die EBV-spezifischen Antikörperantworten im Plasma von Patienten mit IM zu verschiedenen Zeiten der Krankheitsphase untersucht werden. Die Patientenkohorte wurde im Rahmen der vom Deutschen Zentrum für Infektionsforschung (DZIF) geförderten Studie zur IM in München („Infektiöse Mononukleose in München“ Studie, IMMUC) von den klinischen Kooperationspartnern rekrutiert. Vier Kernfragen standen in der eigenen Arbeit im Vordergrund.

1. Gelingt die Entwicklung eines serologischen Tests, mit dem in einem Ansatz humane Antikörperantworten gegen alle Antigene des EBV-Lebenszyklus erfasst werden können?
2. Wie verhalten sich Antigenauswahl, Kinetik und Stärke der EBV-spezifischen Serumantwort von IM-Patienten? Können neue immunogene Antigene identifiziert werden?
3. Korrelieren Quantität und Qualität der EBV-spezifischen IgG-Antikörperproduktion in den unterschiedlichen Krankheitsphasen der IM mit Komplexität ( $c_{max}$ ), Schweregrad ( $s_{max}$ ) und Protraktion ( $p_{max}$ ) der Erkrankung? Lässt sich der Krankheitsverlauf anhand eines serologischen Biomarkers vorhersagen?
4. Können leicht und schwer erkrankte IM-Patienten anhand spezifischer Muster ihrer EBV-spezifischen Antikörperantwort unterschieden werden?



## 3 Material

### 3.1 Geräte

Für die Laborarbeiten standen die in Tabelle 3.1 aufgeführten Geräte zur Verfügung.

**Tabelle 3.1 Liste der verwendeten Geräte.**

Gerät	Hersteller
Bakterieninkubator B6030	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Bakterienschüttler Innova 44	New Brunswick Scientific (Edison, USA)
Biophotometer plus	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Brutschrank	Binder (Neckarsulm, Deutschland)
DNA Thermal Cycler	Perkin Elmer (Waltham, USA)
Elektrophoresekammer Horizon 20-25	Whatman Inc. (Little Chalfont, UK)
Falcon-Schüttler REAX 2	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Gefrierschrank Hera freeze (-80 Grad)	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Gefrierschrank premium (-20 Grad)	Liebherr (Bulle FR, Schweiz)
Geldokumentationssystem Quantum ST4	Vilber Lourmat (Eberhardzell, Deutschland)
Imaging System Fusion FX SPECTRA	Vilber Lourmat (Eberhardzell, Deutschland)
Infrared Imaging System Odyssey	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)
Kryotank Adur B	Messer (Bad Soden am Taunus, Deutschland)
Kühlschrank	Liebherr (Bulle FR, Schweiz)
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Lichtmikroskop	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Magnetrührer MR 3001	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Multikanal-Pipette Transferpette -12	Brand (Wertheim, Deutschland)
Neubauer-Zählkammer	Brand (Wertheim, Deutschland)
pH-Meter 763 Multi-Calimatic	Knick (Berlin, Deutschland)
Pipetten	Gilson (Middleton, USA)
Pipettierhilfe Pipetboy comfort	Integra Biosciences (Zizers, Schweiz)
Röntgenfilmentwicklungsmaschine OPTIMAX	Typon (Baden-Baden, Deutschland)
Schüttelinkubator KS 250 basic	IKA (Staufen im Breisgau, Deutschland)
Sicherheitsabzug	Prutscher (Neudörfel, Österreich)
Spannungsquelle Power Pac Basic	Bio-Rad (Hercules, USA)
Sterilbank Sicherheitsstufe II	BDK Luft- und Reinraumtechnik (Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Tischzentrifuge Galaxy Ministar	VWR (Radnor, USA)
Tischzentrifuge Mikro 20	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
UV Transilluminator (400 M)	Kodak (Rochester, USA)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Waage 1209 MP	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Western Blot Dual Gel Caster SE 600	Hofer Inc. (Holiston, USA)
Western Blot Gel sandwich assembly SE 600	Hofer Inc. (Holiston, USA)
Western Blot Tank Transfer Unit SE 600	Hofer Inc. (Holiston, USA)
Zentrifuge Avanti-J26XP	Beckmann Coulter (München, Deutschland)
Zentrifuge Rotanta 46 RC	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)

# Material

## 3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.2 nennt die in den Versuchen verwendeten Materialien.

**Tabelle 3.2 Liste der verwendeten Materialien.**

Material	Hersteller
CEA Medical X-Ray Screen Film Blue Sensitive	Agfa Health Care (Mortsel, Belgien)
Glaspipetten	Hirschmann (Eberstadt, Deutschland)
Kryoröhrchen Nunc 1,8 ml	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Kunststoffpipetten Cellstar	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Mikro-Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Mikro-Reaktionsgefäß 0,5 ml	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Mikro-Schraubröhre Protein LB 2 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Nitrocellulose-Membran 0,45 µm	Amersham plc. (Little Chalfont, UK)
Parafilm M	Bemis (Neenah, USA)
Pipettenspitzen Diamond	Gilson (Middleton, USA)
Pipettenspitzen, RNase und DNase frei	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Pipettenspitzen, RNase und DNase frei	Kisker (Steinfurt, Deutschland)
Polystyren-Mikrotitrationsplatte	Falcon (Corning, USA)
PVDF-Membran 0,45 µm	Amersham (Little Chalfont, UK)
Sterilfilter-Einheiten Stericup 0,22 µm	Merck Millipore (Burlington, USA)
Zellkulturflaschen Cellmaster	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Zentrifugenröhrchen Falcon 15 ml und 50 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zentrifugal-Filter-Einheiten Amicon Ultra MWCO 10 kDa/ 50 kDa/ 100 kDa	Merck Millipore (Burlington, USA)

## 3.3 Chemikalien und kommerzielle Reagenzien

Nachfolgende Tabelle informiert über die eingesetzten Reagenzien.

**Tabelle 3.3 Liste der eingesetzten Chemikalien.**

Chemikalie	Hersteller
Agarose	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Amphotericin B 250 µg/ml	Gibco BRL (Carlsbad, USA)
Ampicillin	BioFroxx (Einhausen, Deutschland)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Chloroform	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Chlorwasserstoffsäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ciprofloxacin	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
DNA-Größenmarker 1 kB	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
DNA-Ladepuffer	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
ECL Western Blotting Reagent	Amersham (Little Chalfont, UK)
Ethanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Essigsäure 96%	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Fötales Kälberserum (FCS)	Bio&Sell (Feucht, Deutschland)
Gammunex 100 mg/ml	Grifols (Barcelona, Spanien)
Gentamycin 50 mg/ml	Gibco BRL (Carlsbad, USA)

# Material

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Glucose	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glycerol	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Glycin	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Imidazol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Isopropanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumdihydrogenmonophosphat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Komplettmedium RPMI 1640	Gibco BRL (Carlsbad, USA)
L-Glutamin 200 mM	Gibco BRL (Carlsbad, USA)
Luria Broth Base	Gibco BRL (Carlsbad, USA)
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Methanol	HMGU Hauptlager (Neuherberg, Deutschland)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumdihydrogenmonophosphat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumpyruvat 100 mM	Gibco BRL (Carlsbad, USA)
Nicht-essentielle Aminosäuren 100 x	Gibco BRL (Carlsbad, USA)
Ni-NTA-Agarose	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Nonfat dried milk powder	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham USA)
Pancoll Separating Solution	Pan-Biotech (Aidenbach, Deutschland)
Phenol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Pluronsäure	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Polyacrylamid 30%	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Polyethylenimin (PEI)	Polysciences (Hirschberg an der Bergstraße, Deutschland)
Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurat (Tween)	BioFroxx (Einhausen, Deutschland)
SDS ultra pure	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Select Peptone 140	Gibco BRL (Carlsbad, USA)
Select Yeast Extract	Gibco BRL (Carlsbad, USA)
Serumfreies Medium Opti-Mem	Gibco BRL (Carlsbad, USA)
Tetanol-Adsorbatimpfstoff Tetanol Pur	GSK Vaccines (Marburg, Deutschland)
Tetanol-Diphtherie-Adsorbatimpfstoff Td Pur	Astro Pharma GmbH (Wien, Österreich)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	BioFroxx (Einhausen, Deutschland)
Urea	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)

## 3.4 Kommerzielle Kits

Die in den Experimenten verwendeten kommerziellen Reaktionskits sind in Tabelle 3.4 aufgelistet.

**Tabelle 3.4 Liste der verwendeten kommerziellen Kits.**

<b>Reaktionskit</b>	<b>Hersteller</b>
Gel Extraktion Kit (500)	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Hi Pure Plasmid Maxiprep Kit	Invitrogen (Carlsbad, USA)

# Material

## 3.5 Allgemeine Puffer und Lösungen

Die in der folgenden Tabelle aufgeführten Puffer wurden protokollkonform von Mitarbeitern des Helmholtz Zentrums hergestellt.

**Tabelle 3.5 Liste der eingesetzten Puffer und Lösungen.**

Puffer	Zusammensetzung	
Phosphat-gepufferte Salzlösung, PBS	0,2 g	KCl
	0,2 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	1,43 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	8 g	NaCl
	ad 1 l	H <sub>2</sub> O pH 7,3
10 % Natriumlaurylsulfat	100 g	SDS
	ad 1 l	H <sub>2</sub> O
20 % Natriumlaurylsulfat	200 g	SDS
	ad 1 l	H <sub>2</sub> O
TRIS-Acetat-EDTA (TAE) Puffer 50 x	243 g	TRIS
	18,6 g	EDTA
	20,5 g	Natriumacetat
	90 ml	Essigsäure
	ad 1 l	H <sub>2</sub> O pH 7,8
TRIS-buffered Saline, TBS 10 x	2 g	KCl
	30 g	NaCl
	80 g	TRIS
	ad 1 l	H <sub>2</sub> O
		pH 8,0
TBS mit Tween (TBS-T)	1 ml	Tween (20%)
	100 ml	TBS 10 x
	ad 1 l	H <sub>2</sub> O

## 3.6 Biochemische Puffer und Lösungen

Die nachfolgenden Puffer wurden nach Protokoll selbstständig hergestellt und pH korrigiert.

**Tabelle 3.6 Liste der hergestellten und eingesetzten biochemischen Puffer.**

Puffer	Zusammensetzung	
Harnstoffelutionspuffer (pH 7,5)	6,8 g	Imidazol
	200 ml	Harnstofflysepuffer 8 M
Harnstofflysepuffer 8 M (pH 8,0)	1,2 g	TRIS
	1,3 g	Imidazol
	480,5 g	Urea
	0,5 ml	Tween-20
	100 ml	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	ad 1 l	H <sub>2</sub> O
Harnstoffpuffer 4 M	50 %	Harnstofflysepuffer 8 M
	50 %	PBS
Milchpuffer-PBS	30 g (3 %)	Milchpulver (NFM)
	50 g (5 %)	PBS
	ad 1 l	

# Material

Puffer	Zusammensetzung	
Elektrophoresepuffer 10 x	30 g	TRIS
	140 g	Glycin
	100 ml	SDS 10 %
	ad 1 l	H <sub>2</sub> O
2 x SDS-TRIS (pH 6,8)	7,56 g	TRIS
	2,5 ml	SDS 20 %
	ad 0,25 l	H <sub>2</sub> O
2 x SDS-TRIS (pH 8,8)	22,68 g	TRIS
	2,5 ml	SDS 20 %
	ad 0,25 l	H <sub>2</sub> O
3,3 x SDS Ladepuffer	0,04 ml	Bromphenolblau 1 %
	0,3 ml	2-Mercaptoethanol
	1,5 ml	TRIS 1 M pH 6,8
	2,2 ml	H <sub>2</sub> O
	3 ml	Glycerol
	3 ml	SDS 10%
Transferpuffer 10 x	30,2 g	TRIS
	144 g	Glycine
	ad 1 l	H <sub>2</sub> O

## 3.7 Zellkulturmedien

Die für die Kultivierung von prokaryotischen und eukaryotischen Zellen verwendeten Medien sind in Tabelle 3.7 dargestellt.

**Tabelle 3.7 Liste der eingesetzten Zellkulturmedien und Zusätze.**

Medium	Zusammensetzung	
Ciprofloxacin	1 g	Ciprofloxacin
	ad 0,5 l	H <sub>2</sub> O
Glucoselösung 1 M	180,16 g	D-Glucose
	ad 1 l	H <sub>2</sub> O
Kryomedium	10 %	DMSO
	90 %	FCS
LB-(Luria-Broth) Medium	25 g	Luria Broth Base
	ad 1 l	H <sub>2</sub> O
LB-Ampicillin-Agar	0,01 %	Ampicillin
	15 %	Agar
		LB-Medium
Pluronsäurelösung 10 %	100 g	Pluronsäure
	ad 1 l	PBS
Polyethylenimin 10 x	1 g	Polyethylenimin
	ad 100 ml	H <sub>2</sub> O
		pH 7,00 +/- 0,05
Stammmedium (HEK293T Zellkulturmedium)	0,6 ml	Gentamicin 50 mg/ml
	3 ml	Amphotericin B 250 µg/ml
	3 ml	Ciprofloxacin 2 g/l
	6 ml	L-Glutamin 200 mM
	6 ml	Natriumpyruvat 100 mM
	6 ml	Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)
	15 ml	Glucoselösung 1 M
	15 ml	Fötales Kälberserum (FCS)
	500 ml	RPMI 1640 Medium

# Material

Medium	Zusammensetzung	
Super Optimal Broth Medium, SOB	0,18 g	KCl
	0,58 g	NaCl
	5 g	Hefeextrakt
	20 g	Select Peptone 140
	ad 1 l	H <sub>2</sub> O
Super Optimal Broth Medium, SOC	0,1 g	Glucose
	50 ml	SOB-Medium
Superbroth	6,25 g	NaCl
	25 g	Hefeextrakt
	40 g	Select Peptone 140
	ad 1 l	H <sub>2</sub> O

Die optimale Löslichkeit von Ciprofloxacin wurde bei einem pH zwischen 4 und 5 durch Zugabe von verdünnter Salzsäure (32 %) erreicht. Die Ciprofloxacin-, Glucose- und Pluronsäurelösungen wurden durch 0,22 µm Filtereinheiten steril gefiltert.

## 3.8 Zelllinien

Zur rekombinanten Proteinexpression der EBV-Antigene wurde die Zelllinie HEK293T verwendet. Hierbei handelt es sich um eine humane embryonale Nierenzelllinie, die durch die Expression der Gene E1a und E1b des Adenovirus Typ 5 immortalisiert worden war. Zusätzlich exprimiert die Zelllinie das *large T antigen* von SV40, welches die Replikation von episomalen Plasmiden mit dem SV40 *origin of replication* ermöglicht (Lin et al. 2014).

## 3.9 Bakterienstämme

Zur Klonierung von Expressionsplasmiden diente der *E. coli* Stamm XL1-blue MRF (Stratagene). Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

## 3.10 Oligonukleotide für die Klonierung von Codon-optimierten EBV-Genen

Die für die Klonierung von Expressionsplasmiden verwendeten Oligonukleotide (100 pmol/μl) stammten von der Firma Metabion International (Planegg/Steinkirchen, Deutschland) und sind in Tabelle 3.8 aufgeführt.

**Tabelle 3.8 Liste der eingesetzten Oligonukleotide.**

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
BHRF1 se 1 (NcoI)	GCGCCATGGCTTACAGCACCAGAGAAATTCTGCTGGCCCTGTGC ATCCGGGACAGCCGGGTGCACGGCAATGGCACCCTG
BHRF1 se 2	CACGGCAATGGCACCCTGCACCCTGTGCTGGAGCTGGCAGCCCG GGAGACACCCCTGCGGCTGAGCCCTGAGGACACCGT
BHRF1 se 3	GAGCCCTGAGGACACCGTGGTCCTGCGCTACCACGTGCTTCTGG AAGAAATCATCGAGAGAAATTCTGAAACCTTCACCG
BHRF1 se 4	GAAATTCTGAAACCTTCACCGAGACCTGGAACAGATTTATCACCC ACACAGAACATGTGGATCTGGACTTCAACAGCGTC
BHRF1 se 5	ATCTGGACTTCAACAGCGTCTTCCTCGAGATCTTCACAGAGGAG ACCCAGCCTGGGCCGGGCTCTGGCTTGGATGGCC
BHRF1 an 1	CCACCACGTAGTAGGGAGTGTCTGTGTTGCAGCAGAGTGTCTCG CAGGCGTGCATGCACCAGGCCATCCAAGCCAGAGCC
BHRF1 an 2	TGCTGGTGGATCCATCCATCCAGGCCCTCGCTGGCCTCCAGCAT GCCCCGACAGACAGGTCCACCACGTAGTAGGGAGT
BHRF1 an 3	GTCCAGGAGAAGCGCGGCTGCCAGGGATGTTGTCTTCAATCAG TGTGCTCCAGCCGCCCTGCTGGTGGATCCATCCATC
BHRF1 an 4	TGCTGATGAACAGGTAGCTGCAGATCACCAGGAGGCTGAGGGTG AGGCCCGCCAGGAAGAGGGTCCAGGAGAAGCGGCCG
BHRF1 an 5 (XbaI)	GCGTCTAGATTCAAGTGGTATGATGGTGGTGGTGGCGGCCCTG CTGATGAACAGGTAGCTG
BXRF1 se 1 (NcoI)	GCGCCATGGACCCACCCGGGGCCTCTGTGCCCTGAGCACCCAT GACCTGGCCAAGTTCCACAGCCTGCCTCCTGCCCGG
BXRF1 se 2	GCCTGCCTCCTGCCCGGAAGGCTGCCGGCAAGAGGGGCCACCT GCGGTGCTACAGCAAGCTGCTCTCCCTGAAGTCTCTGG
BXRF1 se 3	GCTCTCCCTGAAGTCTGGGAGCAGCTTGCCAGCTTCCCTCAGCC TTCTCCAGGCCCAACCTTCACCGACTTCCGCCTCT
BXRF1 an 1	TAGGGCTGCAGGGCCACCACCACACAGTCAGCAATTCTTCTCCC CAGGGTCACCTCAAAGAAGAGGGCGGAAGTTCGGTGAA
BXRF1 an 2	CGCTCTGGGGATTGGCTGTGTTGCTCATGGCAGTTTTGAAGTCCA CAATATAGCAGCGGGGGTAGGGCTGCAGGGCCACC
BXRF1 an 3 (KpnI)	CGCGGTACCGCAGTCACACAGCTGAGCTGTGCCCTCCAATCTCT GGCCTTTCTGGTGACGCTCTGGGGATTGGCTG
BXRF1 se A (KpnI blunt)	CCAATTCCTGCGCACCAGCTGCCCCCTGTGCTGGGCTCCCAG GGGCTGGAGGTCTGGCTGCTCTGGTGTTCAGAAG
BXRF1 se B	CTGCTCTGGTGTTCAGAACCAGAGGCCTCAGGACCCTCCAG GTGGAATTTCCAGCCTTGGGACAGAAGACACTGCC
BXRF1 se C	GGGACAGAAGACTGCCACATCCACCACCGGGCTCCTGAACC TGCTGTCCCCTGGCAGGACGGGGCCCTCCGGGC
BXRF1 an a	CTTGGGGCCACGTGGGTTCTTGGCCTGTGGCCCTGGGCCGTG GGCCGGGGCCTGTCCAGGCGGGCCCGAGGGCCCGCT
BXRF1 an b	TTCCTGCCCCAGCCCGGCCAGCCCTGGCAGACCTGGGCACTCT TGCTGTGAGCTGGCTGGGCTTGGGGCCACGTGGGT
BXRF1 an c	TGGTGGTATGATGGTGTCTGTGCTCCAGGGCAGACCTGCC CACAGCTCCAACCTGGCCCTTCTGCCCCAGCCCG
BXRF1 an d (XbaI)	GCGTCTAGATTCAAGTGGTATGATGGTGTTC

## 3.11 DNA modifizierende Enzyme

Für optimale Reaktionsbedingungen wurden die Enzyme (Tabelle 3.9) mit den nach Herstellerangaben empfohlenen Puffern kombiniert. Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) stammten von der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA).

**Tabelle 3.9 Liste der DNA modifizierenden Enzyme.**

Reagenz	Hersteller
Phusion-High-Fidelity Polymerase	Thermo Fisher Scientific (Waltham USA)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland)
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland)
T4-DNA-Polymerase	New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland)

## 3.12 Plasmide für die rekombinante Proteinexpression

Die folgenden Plasmide wurden zur rekombinanten Proteinexpression verwendet. Neben den selbst klonierten Plasmiden pCMV-BHRF1<sub>cdo</sub>-His und pCMV-BXRF1<sub>cdo</sub>-His wurde hierbei auch auf bereits in der Arbeitsgruppe existierende Expressionsplasmide zurückgegriffen. Durch das auf allen Plasmiden vorhandene Ampicillinresistenzgen konnten transformierte Bakterien selektioniert werden. Allen EBV-Proteinen wurde C-terminal eine Abfolge von sechs Histidinen (His<sub>6</sub>-tag) und in manchen Fällen zusätzlich die Erkennungssequenz eines EBNA1-spezifischen Antikörpers angefügt, was zu den Bezeichnungen „-His“ bzw. „-EHis“ führte und eine Aufreinigung und den Nachweis der Vollängenproteine ermöglichte. Um ein höheres Protein-Expressionsniveau zu erreichen, wurde die Nukleotidsequenz einiger viraler offener Leserahmen codonoptimiert, diese Genvarianten sind durch das Suffix „cdo“ gekennzeichnet. Tabelle 3.10 gibt eine Übersicht der zur Transfektion eingesetzten Plasmide.

**Tabelle 3.10 Liste der transfizierten Plasmide.**

pCMV-BALF1-EHis	pCMV-BMLF1-His	pCMV-BXRF1 <sub>cdo</sub> -His
pCMV-BALF1 <sub>cdo</sub> -EHIS	pCMV-BMLF1 <sub>cdo</sub> -His	pCMV-BZLF1-His
pCMV-BALF2-His	pCMV-BMRF1-His	pCMV-BZLF1 <sub>cdo</sub> -His
pCMV-BALF5-EHis	pCMV-BMRF2-EHis	pCMV-EBNA1 <sup>GA</sup> -His
pCMV-BARF1-EHis	pCMV-BNLF2a-EHis	pCMV-EBNA1 <sup>GA</sup> <sub>cdo</sub> -His
pCMV-BBLF2/BBLF3-EHis	pCMV-BNLF2a <sub>cdo</sub> -EHIS	pCMV-EBNA2-AG876 <sub>cdo</sub> -His
pCMV-BBRF1-His	pCMV-BNRF1-His	pCMV-EBNA2 <sub>cdo</sub> -His
pCMV-BcLF1-EHis	pCMV-BORF1 <sub>cdo</sub> -His	pCMV-EBNA3A-AG876-His
pCMV-BcRF1-EHis	pCMV-BPLF1-EHis	pCMV-EBNA3A-His
pCMV-BcRF1 <sub>cdo</sub> -His	pCMV-BPLF1-I-EHis	pCMV-EBNA3B-AG876-His
pCMV-BDLF4-EHis	pCMV-BPLF1-II-EHis	pCMV-EBNA3B-His
pCMV-BFRF1a <sub>cdo</sub> -His	pCMV-BPLF1-III-EHis	pCMV-EBNA3C-AG876-His
pCMV-BFRF1-EHis	pCMV-BPLF1-IV-EHis	pCMV-EBNA3C-His
pCMV-BGLF1-EHis	pCMV-BPLF1-V-EHis	pCMV-EBNA-LP-His
pCMV-BGLF1 <sub>cdo</sub> -His	pCMV-BPLF1-Va-EHis	pCMV-GFP-EHis
pCMV-BGLF3-EHis	pCMV-BPLF1-Vb-EHis	pCMV-LF1-EHis



# Material

pCMV-BGLF4-EHis	pCMV-BPLF1-Vb-1-EHis	pCMV-LF1 <sub>cdo</sub> -His
pCMV-BHLF1s-His	pCMV-BPLF1-Vb-2-EHis	pCMV-LF3-Acc-EHis
pCMV-BHRF1 <sub>cdo</sub> -His	pCMV-BPLF1-Vb <sub>cdo</sub> -His	pCMV-LF3-EHis
pCMV-BILF2-EHis	pCMV-BRLF1-His	pCMV-LF3-KpnI-EHis
pCMV-BILF2 <sub>cdo</sub> -EHis	pCMV-BRRF1-His	pCMV-LMP2A-His
pCMV-BKRF3-EHis	pCMV-BRRF2 <sub>cdo</sub> -His	pCMV-LMP2A <sub>cdo</sub> -His
pCMV-BLLF1-EHis	pCMV-BTRF1-EHis	pCMV-sLF3-His
pCMV-BLRF1-EHis	pCMV-BVLF1-EHis	pCMV-sLF3 <sub>cdo</sub> -His
pCMV-BLRF3 <sub>cdo1</sub> -His	pCMV-BVLF1 <sub>cdo</sub> -His	
pCMV-BLRF3 <sub>cdo2</sub> -His	pCMV-BXRF1-EHis	

## 3.13 Antikörper

Tabelle 3.11 und Tabelle 3.12 listen die eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper auf.

**Tabelle 3.11 Liste der verwendeten Primärantikörper.**

Antikörper	Spezifität	Spezies	Anwendung	Hersteller
Anti-EBNA1	EBNA1	Ratte	Western Blot	Hybridomüberstand HMGU (München, Deutschland)
Anti-His	HIS <sub>6</sub>	Maus	Dot Blot Western Blot	Hybridomüberstand HMGU (München, Deutschland)
Anti-LMP2A	LMP2A	Ratte	Western Blot	Hybridomüberstand HMGU (München, Deutschland)

**Tabelle 3.12 Liste der verwendeten Sekundärantikörper.**

Antikörper	Spezifität	Spezies	Kopplung	Anwendung	Hersteller
Anti-Human-IgG	Human-IgG	Schaf	HRP*	Western Blot	Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
Anti-Maus-IgG	Maus-IgG	Schaf	HRP	Western Blot	GE Healthcare (München, Deutschland)
Anti-Ratte-IgG	Ratte-IgG	Ziege	HRP	Western Blot	Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
Anti-Human-IgG	Human-IgG	Ziege	IR Dye 800	Dot Blot	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)
Anti-Maus-IgG	Maus-IgG	Ziege	IR Dye 680	Dot Blot	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)
Anti-Maus-IgG	Maus-IgG	Ziege	IR Dye 800	Dot Blot	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)

\*HRP = *horseradish peroxidase*

## **3.14 Blutspender**

Das Blutplasma stammte von Patienten der IMMUC-Studie, die in der Methodik ausführlich beschrieben wird. Die entsprechende Aufarbeitung des Patientenmaterials erfolgte durch die Immunmonitoring Einheit in Zusammenarbeit mit der Abteilung Genvektoren (AGV) des Helmholtz Zentrums München. Für Kontrollproben standen die Blutseren von freiwilligen Spendern aus der AGV zur Verfügung. Des Weiteren wurden zur Assayvalidierung zwei EBV-Serumkonversionspanels (SCP-EBV001 und SCP-EBV002) von der Firma DiaMex (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Alle Untersuchungen an humanem Material wurden nach den Richtlinien der Ethikkommission der Technischen Universität München durchgeführt (ein positives Votum für die IMMUC-Studie und für gesunde Spender liegt mit der Projekt-Nr. 112/14 vor).

## 4 Methoden

### 4.1 Molekularbiologische Methoden

#### 4.1.1 Einführung in die Codonoptimierung

Um das Protein-Expressionsniveau zu erhöhen, wurde die Nukleotidsequenz einiger EBV-Gene codonoptimiert. Da bei der Genexpression jeweils drei aufeinanderfolgende Basen für eine Aminosäure (AS) codieren, ergeben sich aus der Kombination der vier Kernbasen Guanin (G), Uracil (U), Adenin (A) und Thymin (T) insgesamt 64 mögliche Codons, wobei UAA, UAG, UGA als Stoppcodons fungieren. Für die Translation der 20 kanonischen AS stehen somit 61 Codons zu Verfügung, das heißt einzelne AS können von unterschiedlichen Basentriplets codiert werden, was als degenerierter genetischer Code bezeichnet wird (Rassow et al. 2012; Thermo Fisher Scientific o. D.). Da allerdings anti-Codon tragende *transfer* RNAs (tRNAs) in verschiedenen Organismen unterschiedlich häufig vorkommen können, kann die Translation einzelner Codons, die für die gleiche AS codieren, in unterschiedlichen Organismen unterschiedlich effizient erfolgen. Diese Codonpräferenz hängt vom Organismus ab, in dem ein Protein exprimiert werden soll, und stellt oft eine Herausforderung für eine effiziente Proteinexpression dar. Verschiedene, auf Algorithmen basierende Programme, berücksichtigen neben der Codonpräferenz auch weitere sequenzbezogene Parameter, die auf multiplen Ebenen der Genexpression eine Rolle spielen. Eine Auswahl zeigt Tabelle 4.1 (Thermo Fisher Scientific o. D.).

**Tabelle 4.1 Einflussfaktoren auf die Proteinexpression.**

<b>Ebene der Proteinexpression</b>	<b>Einflussfaktoren</b>
Transkription	<ul style="list-style-type: none"><li>• Anteil an Guanin und Cytosin</li><li>• Spleißen (<i>Splicing</i>) der prä-mRNA</li><li>• Shine-Dalgarno Sequenz (Prokaryoten)</li><li>• TATA-Box und Kozak Sequenz (Eukaryoten)</li><li>• Terminationssignale</li><li>• artifizielle Rekombinationsstellen</li></ul>
Messenger RNA (mRNA)	<ul style="list-style-type: none"><li>• RNA-Stabilität</li><li>• ribosomale Bindungsstellen</li><li>• repetitive Sequenzen</li></ul>
Translation	<ul style="list-style-type: none"><li>• Codon</li><li>• frühreife poly(A)-Sequenzen</li><li>• Sekundärstrukturen</li></ul>

Basierend auf dieser Theorie wurde die Wildtypsequenz niedrig exprimierter EBV-Antigene mit Hilfe des Webservers *Codon Optimization On-Line* (<http://cool.syncti.org/>) modifiziert und aus partiell überlappenden Oligonukleotiden mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) Codonoptimierte Genvarianten synthetisiert (Yu et al. 2017).

## 4.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) dient der gezielten Amplifikation einer gewünschten Nukleinsäuresequenz, wofür grundsätzlich eine thermostabile DNA-Polymerase, Desoxyribunkleosidtriphosphate (dNTPs), eine geringfügige Menge an Ausgangs-DNA (*template*) und passende *Oligonukleotidprimer* benötigt werden. Da im Rahmen der Codonoptimierung der ORF von EBV-Genen neu synthetisiert wurde, wurden anstelle der Ausgangs-DNA zunächst zwei partiell überlappende Oligonukleotide verwendet. Je nach Gengröße wurden nach einer bestimmten Zahl an Reaktionszyklen weitere Oligonukleotide hinzugegeben. Jeder PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten: Zunächst wird die DNA-Matrize bzw. das bereits synthetisierte PCR-Produkt bei 98 °C denaturiert, sodass es zur Trennung der Doppelstränge kommt. Im *Annealingsschritt* wird die Temperatur gesenkt, sodass die eingesetzten *Primer* hybridisieren können. Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) ist durch die *Primer* vorgegeben und lässt sich für kurze Oligonukleotide mit einer Länge von 20 Basen näherungsweise aus dem Gehalt an Guanin und Cytosin (GC) sowie an Adenin und Thymin (AT) mit folgender Gleichung berechnen:

$$T_m = 4 \times \sum(\text{GC}) + 2 \times \sum(\text{AT})$$

Im letzten Schritt, der Elongation, wird die Temperatur auf das Arbeitsoptimum der DNA-Polymerase bei 72 °C erhöht, um eine optimale Zweitstrangsynthese zu gewährleisten. Am Ende eines Zyklus sollte die DNA in doppelter Menge vorliegen (Mülhardt 2009). In Tabelle 4.2 findet sich der Reaktionsansatz für eine Standard-PCR.

**Tabelle 4.2 Standard-PCR-Ansatz.**

H <sub>2</sub> O	69 µl
5 x <i>Phusion</i> Reaktionspuffer	20 µl
DMSO	5 µl
dNTPs (10 mmol)	2 µl
DNA- <i>Template</i> /PCR-Produkt	1 µl
<i>Oligonukleotidprimer</i> 1 (100 pmol/µl)	1 µl
<i>Oligonukleotidprimer</i> 2 (100 pmol/µl)	1 µl
<i>Phusion-High-Fidelity</i> -Polymerase (2 U/µl)	1 µl

Vor Beginn der PCR wurde der Ansatz ohne DNA-Polymerase mit 50 µl Paraffinöl überschichtet, um ein Verdunsten des Tubeninhalts zu vermeiden. Sobald die Maschine die Ausgangstemperatur von 98 °C erreichte, wurde die *Phusion*-Polymerase durch die Ölschicht hinzugegeben. Vorteil der *Phusion*-Polymerase gegenüber der *Taq*-Polymerase ist die deutlich höhere Temperaturstabilität sowie die zusätzliche 3'-5'-Exonukleaseaktivität und eine Korrekturleseaktivität (*proofreading*), die die Fehlerhäufigkeit reduziert (Mülhardt 2009). Nach Zugabe der

# Methoden

Polymerase wurde das PCR-Programm, das entsprechend der Schmelztemperatur der eingesetzten *Primer* und der Länge der PCR-Produkte (15 s/kb) ausgewählt wurde, fortgeführt. Tabelle 4.3 stellt das Standard-PCR-Programm mit 35 Zyklen dar.

**Tabelle 4.3 Standard-PCR-Programm.**

Schritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	98 °C	15 s
Anlagerung	63-65 °C	15 s
Elongation	72 °C	15 s

Nach der PCR wurde das Reaktionsprodukt mit ungefähr  $\frac{1}{4}$  Volumen DNA-Ladepuffer versetzt und auf einem 1-2 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

## 4.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Agarose-Gelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente von 0,5-25 kb trennen und entsprechend ihrer Größe identifizieren (Mülhardt 2009). Hierfür wurde Agarose mit einer Endkonzentration von 1-2 % in 1 x TAE-Puffer gegeben, erhitzt, nach Abkühlen mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in eine Gelapparatur gegossen (siehe Tabelle 4.4). Dann wurde der mit DNA-Ladepuffer versetzte Reaktionsansatz in die Tasche des erkalteten Agarosegels aufgetragen, als Referenz für die Größe der DNA-Fragmente diente dabei der 1kb-Größenmarker in der benachbarten Geltasche. Durch das Anlegen einer Spannung von 120 V entstand ein elektrisches Feld, in dem die DNA-Fragmente vom Minus- zum Pluspol wanderten. Die Laufgeschwindigkeit der Fragmente ist stets indirekt proportional zu ihrer Größe. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA Doppelhelix und absorbiert Ultraviolett (UV)-Licht bei einem Absorptionsmaximum von 330 oder 500 nm unter Emission von 590-605 nm, sodass die entsprechenden Banden im Geldokumentationssystem Quantum ST4 unter Belichtung mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht und mit den Banden des Größenmarkers verglichen werden konnten (Carl Roth o. D.; Le Pecq 1971).

**Tabelle 4.4 Agarose-Gelelektrophorese.**

Elektrophoresepuffer	
TAE 50 x	40 ml
Wasser	1960 ml
Agarosegel	
Agarose	4 g
Elektrophoresepuffer	400 ml
Ethidiumbromid 0,5%	50 µl

## 4.1.4 Restriktionsverdau

Für analytische und präparative Zwecke wurde ein Restriktionsverdau der DNA mit Restriktionsenzymen durchgeführt. Restriktionsenzyme sind bakterielle Endonukleasen, die eine Abfolge von meist vier bis acht Basenpaare in einem DNA-Strang sequenzspezifisch erkennen und ihre Zielsequenz mit hoher Präzision schneiden (Mülhardt 2009). Dadurch ergeben sich DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe, die durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht sowie für weitere Experimente eingesetzt werden können. Die ausgewählten Restriktionsenzyme wurden jeweils nach Herstellerangaben mit den optimalen Reaktionspuffern kombiniert. Es wurden sowohl Einzel- als auch Doppelspaltungen durchgeführt, wobei Doppelspaltungen mit Enzymen, die unterschiedliche Puffer benötigten, vor dem zweiten Verdau eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung verlangten. Pro Spaltung wurde der in Tabelle 4.5 dargestellte Ansatz für 1-2 Stunden (h) bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. Danach wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von DNA-Glycerin-Ladepuffer gestoppt und in ein Agarosegel aufgetragen oder für weitere Behandlungen verwendet.

**Tabelle 4.5 Ansatz DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen.**

	Analytischer Restriktionsverdau	Präparativer Restriktionsverdau
DNA	1 µg	20 µg
10 x Puffer	2 µl	10 µl
Enzym	1 µl (5-50 U/µl)	3 µl (5-50 U/µl)
H <sub>2</sub> O	16 µl	87 µl

## 4.1.5 Synthese von glatten Enden nach dem Restriktionsverdau

Die T4-DNA-Polymerase besitzt neben ihrer 5'-3' Polymeraseaktivität auch eine 3'-5' Exonukleaseaktivität, die es ermöglicht, Einzelstrangüberhänge in glatte Enden umzuwandeln (Mülhardt 2009). Hierfür wurde der Vektor nach dem Restriktionsverdau in dem in Tabelle 4.6 aufgeführten Ansatz für 10-15 Minuten (min) bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss mit Phenol und Chloroform extrahiert.

**Tabelle 4.6 T4-DNA-Polymerase Behandlung.**

Restriktionsverdau	100 µl
dNTPs	1 µl
T4-DNA-Polymerase	1 µl

## 4.1.6 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion wurde nach Behandlung der DNA mit der T4-DNA-Polymerase oder mit Restriktionsenzymen angewandt, um die Enzymreaktion zu beenden und die Nukleinsäuren zu reinigen (Mülhardt 2009). Dafür wurde die wässrige DNA-Lösung im Verhältnis 1:1 mit Phenol und Chloroform versetzt, gemischt und für 10 min bei 13000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Von den zwei erhaltenen Phasen wurde die obere, DNA-haltige Phase abgenommen und mit reinem Ethanol versetzt, sodass eine Alkoholkonzentration von 70-80% erreicht wurde. Anschließend wurde die DNA durch 20-minütige Zentrifugation bei 16000 x g und 4 °C gefällt, der Überstand abgekippt, das *Pellet* getrocknet und danach in H<sub>2</sub>O gelöst.

## 4.1.7 Isolation und Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Nach der Gelelektrophorese wurden die DNA-Fragmente entsprechender Größe unter Belichtung mit dem UV-Transilluminator bei längerwelligem UV-Licht von 365 nm, um UV-bedingte Schäden der DNA zu reduzieren, ausgeschnitten und mit dem Gel Extraktions Kit der Firma Qiagen aufgereinigt. Hierfür wurde das ausgeschnittene Gelstück in ein 15 ml Spitzbodenröhrchen überführt, abgewogen und in 4 ml/g Q x 1 *Solution Buffer* unter Zugabe von 15 µl Silica-Material („Glasmilch“) gelöst. In Anwesenheit hoch konzentrierter chaotroper Salze bindet das Silica-Material die DNA, die nach einem Waschschrift mit einem Salz-Ethanol-Puffer wieder abgelöst werden kann (Mülhardt 2009). Sobald das Gelstück vollständig gelöst war, wurde die Lösung für 5 min bei 2000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurde der Niederschlag erneut in 1 ml Q x 1 *Solution Buffer* resuspendiert, in ein Eppendorfgesäß überführt, für 1 min bei 13000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Im Anschluss erfolgten zwei Waschschriffe mit je 1 ml PE-Puffer und anschließender einminütiger Zentrifugation bei 13000 x g. Nach dem letzten Waschschrift wurde das *Pellet* mit offenem Deckel für 15 min getrocknet. Erfolgte im Anschluss mit dem isolierten DNA-Produkt eine weitere PCR, so wurde das *Pellet* in 50 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert, 5 min bei 50 °C inkubiert, erneut für 1 min bei 13000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgesäß überführt. Sollte das entsprechende DNA-Produkt zur Ligation eingesetzt werden, erfolgte die Resuspension in zwei Mal 10 µl H<sub>2</sub>O, wobei ebenfalls jeweils 5 min bei 50 °C inkubiert, 1 min bei 13000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgesäß überführt wurde. Um die isolierte DNA-Menge quantifizieren zu können, wurden im Anschluss 2 µl des Überstandes mit 10 µl H<sub>2</sub>O und 3 µl

DNA-Ladepuffer versetzt und neben dem Vektor in ein Agarosegel aufgetragen und für 30 min bei 120 V gelelektrophoretisch aufgetrennt.

## 4.1.8 Ligation von Vektor und Insert

Die ATP-abhängige T4-DNA-Ligase katalysiert die kovalente Verbindung kompatibler Enden von DNA-Molekülen. Um die Effizienz der Klonierung zu gewährleisten, wurden *Insert* und Vektor im Verhältnis von 3:1 in einem Endvolumen von 8 µl gemischt (Mülhardt 2009). Dann wurden 1 µl Ligase-Puffer und zuletzt 1 µl Ligase hinzugegeben und der Reaktionsansatz über Nacht im Wasserbad bei 16 °C inkubiert.

## 4.1.9 Transformation von Bakterien

Für die Klonierung der Expressionsplasmide wurde auf die von der Arbeitsgruppe hergestellten und bei -80 °C gelagerten, elektrokompetenten Bakterien des *E. coli* Stamms XL1-blue MRF (*Stragene*) zurückgegriffen. Die Transformation der Bakterien erfolgte mittels Elektroporation. Hierbei wird ein elektrisches Feld erzeugt, das Poren in die Zellwand der Bakterien einführt, durch welche die Fremd-DNA ins Zellinnere gelangen kann (Dower et al. 1988; Miller et al. 1988). Während des Auftauens der Bakterien auf Eis wurden die für die Transformation benötigten Küvetten und Eppendorfgefäße ebenfalls auf Eis vorgekühlt. Anschließend wurden 20 µl der Bakteriensuspension mit 1 µl des Ligationsansatzes in einem Eppendorfgefäß gemischt und in eine Küvette mit 1 mm Elektrodenabstand transferiert. Die Elektroporation erfolgte mit einem Stromimpuls von 1,5 KV, 25 µF und 100 Ohm. Unmittelbar nach dem Stromimpuls wurden die Bakterien in 1 ml SOC-Medium resuspendiert und in einem Eppendorfgefäß für 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 100 µl des Transformations-Ansatzes auf eine LB-Agarplatte (0,01% Ampicillin) verteilt. Anschließend wurde der Rest der Suspension für 5 min bei 5000 x g zentrifugiert. Nach Verwerfen von ungefähr 800 µl des Überstandes wurde das Bakteriensediment im restlichen SOC-Medium resuspendiert, auf eine zweite antibiotikahaltige LB-Agarplatte gegeben und erneut ein Ausstrich angefertigt. Die Bakterienplatten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.



## 4.1.10 Präparation von Plasmid-DNA

### 4.1.10.1 Minipräparation

Die Minipräparation von Plasmid-DNA erfolgte, wenn für weitere Verfahren nur geringe Mengen an DNA (< 20 µg) benötigt wurden. In dieser Arbeit diente die Methode dazu, festzustellen, ob die Klonierung des Expressionsplasmids erfolgreich war. Für diesen Zweck wurden acht Bakterien-Flüssigkulturen angesetzt, indem jeweils 4 ml LB-Ampicillin-Medium mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C kultiviert wurden. Am nächsten Tag wurde jeweils 1 ml jeder Bakteriensuspension in ein Eppendorfgefäß überführt und dieses für 2 min bei 7000 x g zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Bakterienpellet in 100 µl E1-Puffer resuspendiert und mit 100 µl E2-Lysepuffer versetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl E3-Neutralisationspuffer beendet. Die molekularbiologische Theorie zu dieser Methodik, die auf alkalischer Lyse der Bakterien basiert (Birnboim und Doly 1979), ist im Detail der Maxipräparation zu entnehmen. Nach Neutralisation sedimentierten die zellulären Bestandteile durch einen 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 16000 x g und 4 °C. Der Plasmid-DNA-haltige Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 800 µl reinem Ethanol versetzt und durch erneute Zentrifugation bei 16000 x g und 4 °C gefällt. Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet luftgetrocknet, bevor es in 100 µl H<sub>2</sub>O gelöst wurde. Anschließend erfolgte ein Kontrollverdau (siehe Tabelle 4.5), um den richtigen Bakterienklon zu identifizieren. Tabelle 4.7 listet die für die DNA-Isolation notwendigen Puffer.

#### **Tabelle 4.7 Übersicht der für die Minipräparation eingesetzten Puffer.**

E1-Resuspensionspuffer	1 x TE-Puffer, 0,1 mg/ml RNaseA
E2-Lysepuffer	1% SDS, 0,2 M NaOH in H <sub>2</sub> O
E3-Neutralisationspuffer	300 ml 5 M Kaliumacetat; 57,5 ml Eisessig; 142,5 ml H <sub>2</sub> O

### 4.1.10.2 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse der Plasmid-DNA erfolgte durch die Firma GATC Biotech (Konstanz) nach dem Prinzip des *cycle sequencing*. Dieses basiert auf dem nach Sanger et al. beschriebenen Kettenabbruchverfahren mit Di-Desoxynukleotiden (Sanger und Coulson 1975).

### 4.1.10.3 Verdünnungsausstrich

Für die Gewinnung einer reinen Bakterienkultur wurde ein Verdünnungsausstrich des durch Minipräparation und DNA-Sequenzanalyse identifizierten Bakterienklons angefertigt. Hierfür wurden 10 µl der Bakteriensuspension auf eine LB-Ampicillin-Agarplatte gegeben und in der Peripherie der Platte in einer Linie ausgestrichen. Anschließend wurde die Pipettenspitze gewechselt und ein Teil des Materials im ersten Sektor großflächig verteilt. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt, sodass das Bakterienmaterial die gesamte Platte bedeckte. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank über Nacht bei 37 °C.

### 4.1.10.4 Maxipräparation

Um für die Transfektion der HEK293T Zellen ausreichende Mengen an Plasmid-DNA zu gewinnen, erfolgte die Maxipräparation mittels „Hi Pure Plaxmid Maxiprep Kit“ der Firma Invitrogen. 400 ml Superbroth-Medium wurden mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt und mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und im Schüttelinkubator bei 37 °C und 180 rpm über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 500 µl der Bakteriensuspension mit 500 µl Einfriermedium (32 % Glycerin in LB-Medium) in einem Kryoröhrchen bei -80 °C gelagert. Der Rest der Bakteriensuspension wurde für 10 min bei 4 °C und 5000 x g zentrifugiert. Nach Resuspension der Bakterien in 10 ml R3-Resuspensionspuffer mit RNaseA wurde die homogene Suspension in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 10 ml L7-Lysepuffer versetzt. Die fünfminütige Lyse erfolgte bei Raumtemperatur, wobei die Zellmembran durch SDS aufgelöst und die bakteriellen Proteine, Plasmid-DNA und chromosomale DNA unter Verdau bakterieller RNA denaturiert wurden. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 ml N3-Präzipitationspuffer beendet. Die durch Mischen erhaltene homogene Suspension wurde bei 4500 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand des Bakterienlysats durch Zellstoff filtriert und in eine Anionenaustauschsäule überführt. Diese wurde zuvor mit 30 ml EQ1-Puffer äquilibriert. Um unerwünschte bakterielle DNA und Proteine zu entfernen, wurde jeweils dreimal mit 20 ml W8-Waschpuffer gewaschen. Durch Zugabe von 15 ml E4-Elutionspuffer wurde die an das Säulenmaterial gebundene DNA in ein 50 ml Reaktionsgefäß eluiert. Für die Fällung des Eluats wurden 10,5 ml Isopropanol zugesetzt. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 4500 x g und 4 °C wurde der Überstand verworfen, das DNA-Pellet luftgetrocknet und anschließend in 1 ml TE-Puffer gelöst.

## **4.1.10.5 Bestimmung der DNA-Konzentration**

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte über die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Nukleinsäurekonzentration ergab sich dabei aus der gemessenen Extinktion, der Verdünnung und einem für doppelsträngige DNA spezifischen Verdünnungsfaktor (Mülhardt 2009).

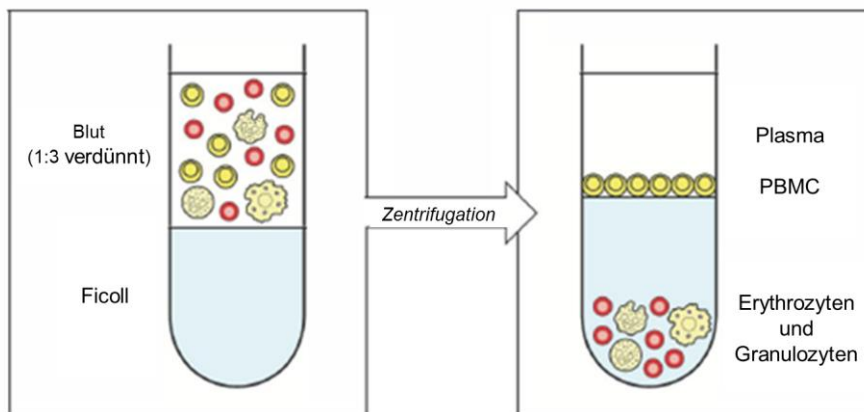
## **4.2 Zellbiologische Methoden**

### **4.2.1 Allgemeine Anmerkungen**

Zur Prävention von Kontaminationen mit Mikroorganismen erfolgten sämtliche Experimente mit lebenden Zellen in einer sterilen Werkbank und mit autoklavierten bzw. sterilen Materialien.

### **4.2.2 Isolierung von PBMC durch Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation**

Für die Gewinnung von PBMC wurde von den Probanden der IMMUC-Studie in der Kinderklinik Schwabing venöses Blut in mit Kalium-EDTA-beschichteten Monovetten entnommen und innerhalb von maximal 4 h aufgearbeitet. Zur Verbesserung der Zellausbeute wurde das Vollblut zunächst im Verhältnis von 1:3 mit PBS verdünnt und 30 ml des verdünnten Blutes anschließend in einem 50 ml Röhrchen mit 15 ml Ficoll-Lösung (Pancoll, Pan) unterschichtet. Um eine wie in Abbildung 4.1 dargestellte Phasentrennung zu erreichen, wurde das Blut anschließend für 20 min bei 800 x g und 19 °C ohne Verwendung der Zentrifugenbremse zentrifugiert. Danach wurde ein Großteil des Plasmas abgenommen und in den für die verschiedenen Kooperationspartner vorgesehenen Volumina aliquotiert. Anschließend konnten die PBMC, die sich in einem Ring oberhalb der Ficoll-Lösung sammelten, durch vorsichtiges Absaugen mit der 1 ml Pipette von Erythrozyten und den restlichen Blutbestandteilen getrennt werden. Die PBMC wurden im Folgenden zunächst in 20 ml PBS und dann in je 10 ml PBS resuspendiert und insgesamt dreimal für 10 min bei 300 x g und 19 °C zentrifugiert, gezählt und kryokonserviert.



### **Abbildung 4.1 PBMC-Isolation mittels Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation.**

Das verdünnte Patientenblut wurde mit Ficoll unterschichtet. Die Zentrifugation bewirkte eine Phasentrennung. Die PBMC sammelten sich oberhalb der Ficoll-Lösung und wurden mit der Pipette entnommen (Murphy 2012).

### **4.2.3 Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension entnommen und mit Trypanblau 1:2 verdünnt. Trypanblau färbt tote Zellen an, die somit von lebenden Zellen durchlichtmikroskopisch unterschieden werden können. Im Anschluss wurden dann 10 µl der Färbung in eine Neubauer-Zählkammer gegeben, alle vier Großquadranten ausgezählt und aus dem Ergebnis der Mittelwert gebildet. Die Gesamtzellzahl ergab sich aus der folgenden Formel:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Mittelwert} \times \text{Verdünnungsfaktor} (2) \times 10^4 \times \text{Volumen in ml}$$

### **4.2.4 Kryokonservierung von PBMC und Plasma**

Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die PBMC in je 1 ml Kryomedium pro 10 Millionen Zellen eingefroren. Zunächst wurden die Zellen für etwa 72 h bei -80 °C in dem mit Isopropanol gefüllten Freezing Container Mr Frosty zwischengelagert und anschließend in -196 °C Stickstoff-Behälter überführt. Das Patientenplasma wurde bei -80 °C eingefroren.

## 4.2.5 Kultivierung von HEK293T Suspensionszellen

Die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293T wurde in 450 ml Stammmedium (siehe Tabelle 3.7) in Rollflaschen in einem Zellinkubationsschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> unter ständiger Rotation kultiviert. Alle vier Tage erfolgte ein Mediumwechsel, indem die Stammflaschen auf 1350 ml aufgefüllt und die HEK293T Zellen je auf zwei weitere Flaschen aufgeteilt wurden. Das Stammmedium und entsprechende Zusatzstoffe wurden bei 4 °C gelagert und nicht länger als zwei Wochen nach Anbruch verwendet.

## 4.2.6 Rekombinante Proteinexpression in HEK293T Suspensionszellen

### 4.2.6.1 Transfektion von HEK293T Zellen

Das Einbringen von Fremd-DNA in Säugerzellen folgte dem Prinzip der chemischen Transfektion mit einer wässrigen Lösung aus Polyethylenimin (PEI). Das Polykation komplexiert die DNA und fusioniert im Kulturmedium mit der Zellmembran, sodass die Plasmid-DNA ins Zellinnere und anschließend in den Zellkern gelangt (Teifel 2012). Hierfür wurden jeweils 450 ml der HEK293T Zellsuspension bei 2000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und anschließend das Medium verworfen. Das Zellpellet wurde dann mit dem Transfektionsmix (siehe Tabelle 4.8) in 200 ml Stammmedium aufgeschüttelt und anschließend in die Rollflaschen überführt. Nach 24 h Kultivierung wurde mit neuem Medium auf 450 ml aufgefüllt und nach insgesamt 48 h wurden die transfizierten Zellen geerntet.

**Tabelle 4.8 Transfektionsmix.**

Opti-Mem	15 ml
PEI 1 x (1 mg/ml)	2,7 ml
Plasmid-DNA	450 µg

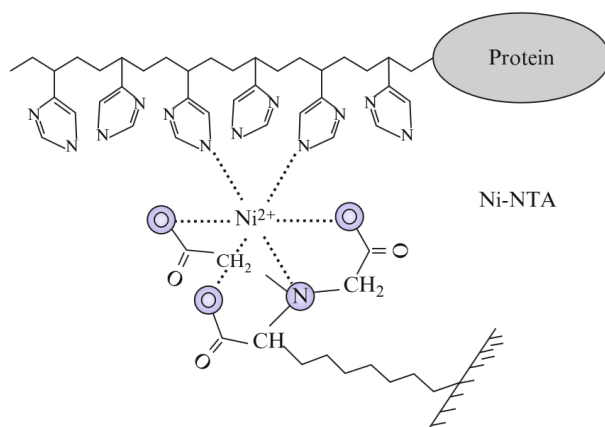
Vor Zugabe der PEI-Lösung wurde die Plasmid-DNA im Opti-Mem resuspendiert und der Transfektionsmix anschließend mindestens 15 min inkubiert.

## 4.2.6.2 Zellernte

Zwei Tage nach der Transfektion wurde die Zellsuspension bei 2000 x g und 4 °C zentrifugiert und das Zellpellet in 45 ml 8 M Harnstoffpuffer lysiert. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 4500 x g und 4 °C sammelten sich unlösliche Bestandteile als Niederschlag am Boden des Röhrchens. Der proteinhaltige Überstand wurde anschließend durch zweilagigen Zellstoff in ein neues 50 ml Röhrchen überführt, mit 300 µl Nickel-Nitriloessigsäure-Agarose (Ni-NTA-Agarose) versetzt und über Nacht im Kühlraum geschüttelt.

## 4.2.6.3 Proteinisolation

Das C-terminale Hexahistidin-Etikett ermöglichte es, die Proteine nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose aufzureinigen (Abbildung 4.2). Die immobilisierten zweiwertigen Nickel-Ionen binden mit mikromolarer Affinität an den Imidazolring des Histidins und bilden einen stabilen Chelat-Komplex. Die Proteine lassen sich mit imidazolhaltigem Harnstoffelutionspuffer eluieren, indem das Histidin kompetitiv aus dem Chelat-Komplex verdrängt wird (Porath et al. 1975).



### Abbildung 4.2 Proteinaufreinigung nach dem Prinzip der Nickel-Chelatchromatographie.

Dargestellt ist die Interaktion zwischen Poly-His-Tag und der Ni-NTA-Agarose. Die Nickel-Ionen bilden mit dem Imidazolring des Histidins einen stabilen Chelat-Komplex aus (Block et al. 2009).

Dazu wurden die über Nacht geschüttelten 50 ml Röhrchen zunächst bei 2000 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die im Ni<sup>2+</sup>-Chelatkomplex fixierten Proteine wurden dann mit je dreimal 5 ml 8 M Harnstofflysepuffer in ein 15 ml Falcon überführt. Es wurde erneut bei 2000 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Röhrchen mit 5 ml 8 M Harnstofflysepuffer aufgefüllt, dreimal umdrehend geschwenkt und nochmals zentrifugiert. Anschließend folgte das Eluieren der Proteine aus dem Chelat-Komplex mit

imidazolhaltigem Harnstoffelutionspuffer. Hierzu wurde insgesamt dreimal 300 µl Elutionslösung in das 15 ml Falcon gegeben, gemischt und 5 min bei 2000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Proteinüberstand wurde dann in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Um ein möglichst reines Proteineluat zu erhalten, wurde nochmals für 5 min bei 13000 x g zentrifugiert, das Eluat in ein beschriftetes Sarstedt-Schraubröhrchen überführt und bei -20 °C eingefroren.

#### **4.2.6.4 Konzentrieren von Proteinen**

Niedrig exprimierte Proteine mussten in Zentrifugal-Filter-Einheiten aufkonzentriert werden. Je nach Proteingröße und Fragestellung standen Filter mit unterschiedlicher Ausschlussgröße (10 kDa, 50 kDa und 100 kDa) zur Auswahl, wobei die EBV-Proteine für die ersten 101 Patienten der IMMUC-Kohorte einheitlich mit dem 10 kDa Filter konzentriert wurden. Hierzu wurden die gepoolten, niedrigkonzentrierten Aufarbeitungen in die Filtereinheit gegeben und die Flüssigkeit durch Zentrifugieren bei 2000 bis maximal 3500 x g bis zum gewünschten Volumen eingengt. Im Anschluss wurde nochmals 1:1 mit 4 M Harnstoffpuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Der konzentrierte Proteinüberstand wurde dann in das Sarstedt-Schraubröhrchen zurücküberführt.

### **4.3 Immunologische Nachweismethoden**

#### **4.3.1 Qualitativer Nachweis der Proteine**

##### **4.3.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen folgte der von Laemmli beschriebenen *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) (Laemmli 1970). Die Acrylamidkonzentration der Polyacrylamidgele betrug im Sammelgel 4 % und im Trenngel 10,5 % (Tabelle 4.9). Als standardisierter Größenmarker diente der *Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific). Zunächst wurden 10 µl des Proteins mit 5 µl 3,3 x SDS-Ladepuffer versetzt, anschließend wurde der Ansatz für 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Proteine wurden entsprechend ihrer Größe bei einer Spannung von 80-130 V für 2-3 h aufgetrennt.

## 4.3.1.2 Protein-Transfer (Western-Blot)

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen. Nach Aktivierung der Membran mit Methanol erfolgte der Transfer der Proteine aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel in einer Nassblotanlage in Transferpuffer (Tabelle 4.9) bei 300 mA für 2 h und 4 °C.

**Tabelle 4.9 SDS-PAGE und Protein-Transfer.**

Trenngel (10,5 %)	7 ml 30 % PAA; 10 ml 2 x TRIS/ SDS pH 8,8; 2,8 ml H <sub>2</sub> O; 167 µl APS; 17 µl TEMED
Sammelgel (4 %)	2 ml 30 % PAA; 7,5 ml 2 x TRIS/ SDS pH 6,6; 5,4 ml H <sub>2</sub> O; 90 µl APS; 10 µl TEMED
1 x SDS-Elektrophoresepuffer	100 ml 10 x Elektrophoresepuffer; ad 1 l H <sub>2</sub> O
1 x SDS-Transferpuffer	150 ml 10 x Transferpuffer; 300 ml Methanol; ad 1,5 l H <sub>2</sub> O

## 4.3.1.3 Immunologischer Nachweis der Proteine

Nach Proteintransfer wurde die PVDF-Membran zur Absättigung von freien Bindungsstellen für 1 h bei Raumtemperatur in Blockpuffer (5 % Magermilchpulver in PBS) geschwenkt. Anschließend inkubierte die Membran für mindestens 4 h bei Raumtemperatur oder bevorzugt über Nacht bei 4 °C mit der Primärantikörperlösung. Zum Entfernen ungebundenen Primärantikörpers wurde die Membran dreimal mit Waschpuffer (3 % Magermilchpulver in PBS) für jeweils 10 min geschwenkt und anschließend für 1-2 h mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper hybridisiert. Nach drei 10-minütigen Waschschrritten erfolgte der Proteinnachweis mit dem ECL-Plus-Detektionssystem (Amersham) entsprechend den Herstellerangaben und nachfolgender Belichtung eines Röntgenfilms (CEA Medical X-Ray Screen Film Blue Sensitive, Agfa Health-Care) oder alternativ mit dem Imaging System Fusion FX Spectra (Vilber Lourmat). Die Antikörper wurden stets in 3 % Magermilchpulver in PBS gelöst. Die Primärantikörper zur Proteindetektion wurden in einer Konzentration von 1:50, humanes Serum zur Bestätigung EBV-spezifischer Serumantworten in einer Konzentration von 1:1000 und die mit HRP-gekoppelten Sekundärantikörper in einer Konzentration von 1:10000 eingesetzt.



### 4.3.2 Untersuchung der EBV-spezifischen humoralen Immunantwort in Patienten mit Infektiöser Mononukleose

#### 4.3.2.1 Allgemeines

Die eukaryotisch exprimierten und aufgereinigten EBV-Proteine bildeten die Grundlage des Multiplex-Dot-Blot Screenings. Dieses sollte EBV-spezifische IgG-Antikörper im Plasma von Patienten mit IM detektieren.

#### 4.3.2.2 Patientenkohorte

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Kohorte umfasste insgesamt 101 Studienteilnehmer mit IM-Beginn vor maximal 28 Tagen im Alter von 0-39 Jahren. Die Probanden mussten mindestens eines der krankheitsspezifischen Symptome wie Tonsillopharyngitis, Fieber von mindestens 38,5°C, Lymphadenopathie und/oder Abgeschlagenheit (Fatigue) sowie folgende Laborkonstellation erfüllen: i) initial positives EBV-VCA-IgM und/oder EBV-VCA-IgG und/oder positive Viruslast (positives PCR-Ergebnis in PBMC und/oder Blutplasma) und ii) initial negatives EBNA1-IgG in mindestens einem Test und im Immunoblot maximal einfach positiv und iii) eindeutige Serokonversion im Verlauf. Die serologischen Parameter wurden mittels CLIA (ARCHITECT™ i1000SR, Abbott Core Laboratory) und Immunoblot (*recomLine EBV IgG*, Microgen), die Viruslast via standardisierter *real-time-PCR* durch die Virologie der Technischen Universität München bestimmt. Als Ausschlusskriterium zählte eine Schwangerschaft in den zurückliegenden 12 Monaten. Die klinischen Kooperationspartner an der Kinderklinik Schwabing rekrutierten die Patienten aus privaten Arztpraxen und Krankenhäusern in München und Umgebung. Um krankheitsphasenspezifische Antikörper zu detektieren, wurde das Plasma der Patienten zu drei definierten Zeitpunkten untersucht: i) T0 (geplant zum Zeitpunkt der Diagnose), ii) T1 (geplant einen Monat nach Diagnose) und iii) T6 (geplant sechs Monate nach Diagnose). Der tatsächliche Studienbesuch lag zum Teil aus organisatorischen Gründen etwas versetzt zum geplanten Zeitpunkt, was bei der Auswertung durch Angabe der Tage nach Symptombeginn (*days after onset*, DAO) berücksichtigt wurde. Das verwendete Plasma wurde bei -80 °C gelagert und für die Experimente frisch aufgetaut. Nur in Ausnahmefällen wurde maximal einmal wiederholt aufgetautes und eingefrorenes Patientenmaterial verwendet.

Klinisch wurden die Patienten abhängig von ihrer maximalen Symptomausprägung ( $s_{max}$ ) und der Protraktion ihrer Erkrankung ( $p_{max}$ ) fünf verschiedenen IM-Stadien zugeordnet, wobei sowohl klinische als auch laborchemische Parameter im *Score* berücksichtigt wurden. Die IM-Stadien gruppieren sich in Stadium 1 (mild), Stadium 2 (mäßig), Stadium 3 (schwer), Stadium

# Methoden

---

4 (sehr schwer) und Stadium 5 (letal). Der Schweregrad der IM ( $s_{max}$ ) wurde in s1 (mild), s2 (mäßig), s3 (schwer), s4 (sehr schwer) und s5 (letal) graduiert. Je nach Dauer und Ausprägung der Symptomatik wurde für die Protraktion zwischen p0 (kurz), p1 (milde Symptomatik an T1), p2 (milde Symptomatik an T6), p3 (moderate Symptomatik an T1), p4 (moderate Symptomatik an T6), p5 ((sehr) schwere Symptomatik an T1) und p6 ((sehr) schwere Symptomatik an T6) differenziert. Außerdem wurde jedem Patienten abhängig von der Gesamtzahl an pathologischen Befunden während seines Krankheitsverlaufs ein Komplexitätsgrad ( $c_{max}$ ) zugeordnet, der insgesamt 28 mögliche Parameter umfasste (Stand 05.09.2019).

Die in dieser Arbeit verwendete klinische Graduierung für die untersuchte Kohorte (Studienpatient 1-101) basiert auf einer vorläufigen Einteilung mit Stand vom September 2019. Bei der Auswertung der Gesamtkohorte ( $n = 200$ ) wird aktuell eine vereinfachte Einteilung der Protraktionsgrade vorgenommen, um Protraktion und Schweregrad als unabhängige Parameter auswerten zu können.

### 4.3.2.3 IgG-Standardreihe

Im Multiplex-Dot-Blot-Verfahren wurde als Positivkontrolle für die Detektion der Serumantwort humanes IgG, für die Detektion der Proteinmenge mittels murinen anti-His-Antikörper IgG von der Maus verwendet.

Der humane IgG-Standard (*Gammunex 10 %*, 100 mg/ml, Grifols) wurde vorab in einer Verdünnung von 1:3<sup>4</sup> (1,235 mg/ml) in PBS einheitlich aliquotiert und bei -80 °C tiefgefroren. Zum Einfrieren wurde gezielt diese Verdünnungsstufe ausgewählt, um zu verhindern, dass noch geringkonzentrierteres IgG bei den niedrigen Temperaturen zerfallen könnte. Da in dieser Konzentration (1:3<sup>4</sup>) sehr hohe Fluoreszenzsignale zu erwarten waren, die nicht mehr in den Detektionsbereich des *Odyssey Infrared Imaging Systems* fielen, musste das humane IgG nach Auftauen in abwechselnd 2:3- und 1:2-Schritten für einen optimalen Titrationsbereich mit linearer Signalabnahme weiter verdünnt werden (Tabelle 4.10).

Analog zum humanen IgG wurde das IgG von der Maus in einer Verdünnung von 1 mg/ml in PBS einheitlich aliquotiert, bei -80 °C tiefgefroren und anschließend aufgrund hoher Fluoreszenzsignale weiter verdünnt. Hierfür wurde zunächst mit 1:10 auf 0,1 mg/ml verdünnt, welches dann in 0,01 bzw 0,005 mg/ml Schritten weiter verdünnt und schließlich in den folgenden Konzentrationen 0,05 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,03 mg/ml, 0,025 mg/ml, 0,02 mg/ml, 0,015 mg/ml und 0,01 mg/ml verwendet wurde.

## 4.3.2.4 Multiplex-Dot-Blot-Verfahren

Als Trägermaterial des Screening-Verfahrens diente eine Nitrocellulose-Membran (NC-Membran; 0,45 µm), auf die die in Tabelle 4.10 aufgelisteten Antigene aufgetragen wurden. Das humane IgG wurde in PBS titriert und in einem Volumen von 2,5 µl eingesetzt. Es diente als zusätzliche Positivkontrolle für die Messung bei einer Wellenlänge von 800 nm, sofern keine EBV-spezifischen Antworten detektierbar waren. Da die Proteine in 4 M Ureapuffer gelöst waren, folgten drei 5 µl-Spots des Puffers, um einen Referenzwert für pufferbedingte Hintergrundsignale zu erhalten. Drei *Background*-Spots wurden nicht mit Antigen benetzt, sodass unspezifische Hintergrundsignale der Membran erfasst werden konnten. Ab Reihe B wurden jeweils 5 µl der 86 EBV-Antigene mit der Multikanalpipette aufgetragen. Das ebenfalls in HEK293T Zellen produzierte nicht EBV-spezifische Protein GFP-EHis fungierte als Negativkontrolle, um zu beweisen, dass der EBNA1-Tag, mit dem einige Proteine zusätzlich versehen waren, keine EBNA1-spezifischen Antikörperreaktionen gegen andere Proteine des EBV-Genoms hervorrief. Das Tetanol oder Tetanol/Diphtherie-Toxoid diente neben dem human-IgG-Standard als zweite Positivkontrolle für die Messung bei einer Wellenlänge von 800 nm und sollte einen Anhaltspunkt für eine bestehende Immunität beim Patienten geben. Der Impfstoff wurde 1:2 mit 8 M Harnstoffpuffer verdünnt und ebenfalls in einem Volumen von 5 µl eingesetzt.

# Methoden

**Tabelle 4.10 Schematische Übersicht der Dot-Blot-Membran.**

human IgG 0,091 mg/ml	human IgG 0,046 mg/ml	human IgG 0,030 mg/ml	human IgG 0,015 mg/ml	human IgG 0,010 mg/ml	human IgG 0,05 mg/ml	4 M urea	4 M urea	4 M urea	back-ground	back-ground	back-ground
<b>BALF1*</b>	BALF2	BALF3	BALF4	BALF5	BARF1	BaRF1	BBLF1	BBLF2/ BBLF3	BBLF4	BBRF1	BBRF2
BBRF3	BcLF1	<b>BcRF1*</b>	BCRF1	BDLF1	BDLF2	BDLF3	BDLF4	BdRF1	BFLF1	BFLF2	BFRF1
<b>BFRF1a*</b>	BFRF2	BFRF3	<b>BGLF1*</b>	BGLF2	BGLF3	BGLF4	BGLF5	BGRF1/ BDRF1	BHLF1s	<b>BHRF1*</b>	BILF1
<b>BILF2*</b>	BKRF2	BKRF3	BKRF4	BLLF1	BLLF2	BLLF3	BLRF1	BLRF2	<b>BLRF3*</b>	BMLF1	BMRF1
BMRF2	BNLF2a	BNLF2b	BNRF1	BOLF1	<b>BORF1*</b>	BORF2	<b>BPLF1*</b>	BRLF1	BRRF1	<b>BRRF2*</b>	BSLF1
BSLF2/ BMLF1	BSRF1	BTRF1	<b>BVLF1*</b>	BVRF1	BVRF2	BXLF1	BXLF2	<b>BXRF1*</b>	<b>BZLF1*</b>	<b>BZLF2*</b>	EBNA1 <sup>AGA</sup>
<b>EBNA2*</b>	EBNA3A	EBNA3B	EBNA3C	EBNALP	LMP1	<b>LMP2A*</b>	<b>LF1*</b>	LF2	<b>sLF3*</b>	<b>EBNA2 AG876*</b>	EBNA3A AG876
EBNA3B AG876	EBNA3C AG876	GFP	Tetanol								

Codon-optimierte Gene sind mit „\*“ und Fettdruck hervorgehoben.

Nach Aufbringen der Antigene wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in Blockpuffer (5 % Milchpuffer in PBS) geschwenkt. Über Nacht inkubierte die Membran in 20 ml der Primärantikörperlösung (Tabelle 4.11) bei 4 °C. Um alle ungebundenen Antikörper von der Membran zu entfernen, wurde diese nach 20-24 h dreimal für 10 min mit Waschpuffer (3 % Milchpuffer in PBS) gewaschen. Danach wurde die Membran mit fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern für 1,25-1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert (Tabelle 4.12). Nach insgesamt vier Waschschritten für je 5 min mit TBS-T wurden die Fluoreszenzsignale mit dem *Odyssey Infrared Imaging System* von Li-Cor bei einer Wellenlänge von 700 und 800 nm erfasst und im Programm *ImageView* quantifiziert. Die Antikörper inkubierten stets in 3 % Milchpulver in PBS.

**Tabelle 4.11 Primärantikörper des Multiplex-Dot-Blot-Verfahrens.**

Spezifität	Spezies	Anwendung	Konzentration
His <sub>6</sub>	Maus	Detektion der EBV-Proteinmenge	1:50
Blutplasma (Patientenmaterial)	Mensch	Detektion der EBV-spezifischen Serumantwort	1:1000

**Tabelle 4.12 Sekundärantikörper des Multiplex-Dot-Blot-Verfahrens.**

Spezifität	Kopplung	Wellenlänge	Konzentration
Maus-IgG	IR Dye 680	700 nm	1:10000
Human-IgG	IR Dye 800	800 nm	1:10000

## 4.4 Sequenzanalyse

DNA- und Proteinsequenzen der beiden EBV-Stämme wurden der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) entnommen, NCBI: B95.8 (Genbank Nr. V01555.2) und NCBI: AG876 (Genbank Nr. DQ279927.1). Für Informationen zu Proteineigenschaften und -funktionen wurde *UniProt* herangezogen (The UniProt Consortium 2019).

## 4.5 Eingesetzte Software

Für sequenzspezifische Details der eingesetzten EBV-Plasmide und die Beurteilung der Fragmentgrößen des Restriktionsverdau wurde das Programm *CloneManager* eingesetzt. Die graphische Auswertung der Agarose-Gel-Elektrophorese erfolgte mit *Quantum STX*. Die via *Odyssey Infrared Imaging System* gemessenen Fluoreszenzsignale wurden durch die Software *ImageView* in *arbitrary fluorescence units* im Tool *Grit Analysis* quantifiziert. Die Absolutwerte (*Total*) wurden als Rohdaten in eine Excel-Tabelle überführt. Für die Auswertung und graphische Darstellung der im Dot-Blot gemessenen Signale diente *Microsoft Excel 2010* und *GraphPadPrism*. Die Sequenzen von Codon-optimiertem und nicht Codon-optimiertem EBV-Gen wurden über *ExpASy (Bioinformatics Resource Portal)* mittels *LALIGN-Tool (Pairwise alignment)* verglichen, das die Algorithmen von Huang und Miller anwendet (Huang und Miller 1991).

## 4.6 Auswertung

Die in *ImageView* generierten Rohdaten der Fluoreszenzsignale der Dot-Blot-Experimente wurden in Excel für beide Wellenlängen (700 und 800 nm) identisch ausgewertet. Es wurde sowohl der Mittelwert für die harnstoffspezifischen Hintergrundsignale als auch die Störsignale für die reine Membran gebildet. Von den Absolutwerten des humanen IgG-Standards wurde der Mittelwert des reinen Hintergrunds subtrahiert, während die in 4 M Harnstoff gelösten Proteine mit dem Mittelwert des harnstoffspezifischen Hintergrundes verrechnet wurden. Nachdem die unspezifischen Hintergrundsignale von den Absolutwerten abgezogen worden waren, konnte der Quotient zwischen den Werten für die Wellenlänge von 800 nm (EBV-spezifische IgG-Antikörper im Patientenplasma) und 700 nm (gespottete EBV-Proteinmenge) gebildet werden. So konnte die Serumantwort des Patienten stets auf die pipettierte Proteinmenge bezogen werden, was die Vergleichbarkeit der Blots untereinander sowie die trotz Codonoptimierung unterschiedliche Expressionstärke der Antigene verlangte.

Der Schwellenwert, ab welchem ein Signal als positive Serumantwort gewertet wurde, wurde auf Grundlage der Virus-spezifischen IgG-Serumantwort von fünf EBV-negativen Spendern berechnet, worauf in 5.4.2 detailliert eingegangen wird. Für jedes Antigen wurde ein individueller *Cut-Off* aus dem Mittelwert (MW) zuzüglich der zweifachen Standardabweichung (SD) des Quotienten (CW 800/CW 700) der Negativkontrollen bestimmt. Für Proteine mit sehr kleinem Schwellenwert wurde der *Cut-Off* als 0,1 definiert. Die strenge Definition des *Cut-Offs*

# Methoden

---

erfolgte mit dem Ziel, für diese neue Methode zunächst stringente Kriterien anzulegen und nur signifikante Serumantworten zu untersuchen.

Die statistischen Auswertungen wurden mittels *GraphPadPrism* durchgeführt, wobei in den Analysen alle IgG-Serumantworten und nicht nur jene über dem *Cut-Off* berücksichtigt wurden. Die untersuchte Kohorte wurde mittels deskriptiver statistischer Methoden beschrieben.

Um die Kinetik der EBV-spezifischen Antikörperantwort von der Primärinfektion bis zur Rekonvaleszenz zu erfassen, wurden jeweils die Tage nach Symptombeginn mit den antigenspezifischen IgG-Antworten (Quotient CW 800/CW 700) korreliert. Außerdem wurde untersucht, ob zwischen antigenabhängigen IgG-Serumantworten an den einzelnen Untersuchungszeitpunkten und dem Krankheitsverlauf ( $C_{max}$ ,  $S_{max}$ ,  $p_{max}$ ) sowie Entzündungsparametern (Ferritin, CRP) ein quantitativer Zusammenhang bestand. Neben antigenabhängigen IgG-Serumantworten wurde auch die gesamte EBV-spezifische humorale Immunantwort an T0, T1 und T5-T12 mit dem klinischen Bild der Patienten und der Viruslast in PBMC korreliert. Für alle Korrelationsanalysen wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman mit 95 % Konfidenzintervall (KI) berechnet, der sich als nicht-parametrischer Test für nicht-normalverteilte Daten eignet und als Rangkoeffizient robust gegenüber Ausreißern ist. Korrelationskoeffizienten von  $> 0,7$ ; zwischen  $0,5$  und  $0,7$  und von  $< 0,5$  wurden als starke, mäßige und schwache Korrelation interpretiert (Liu et al. 2019).

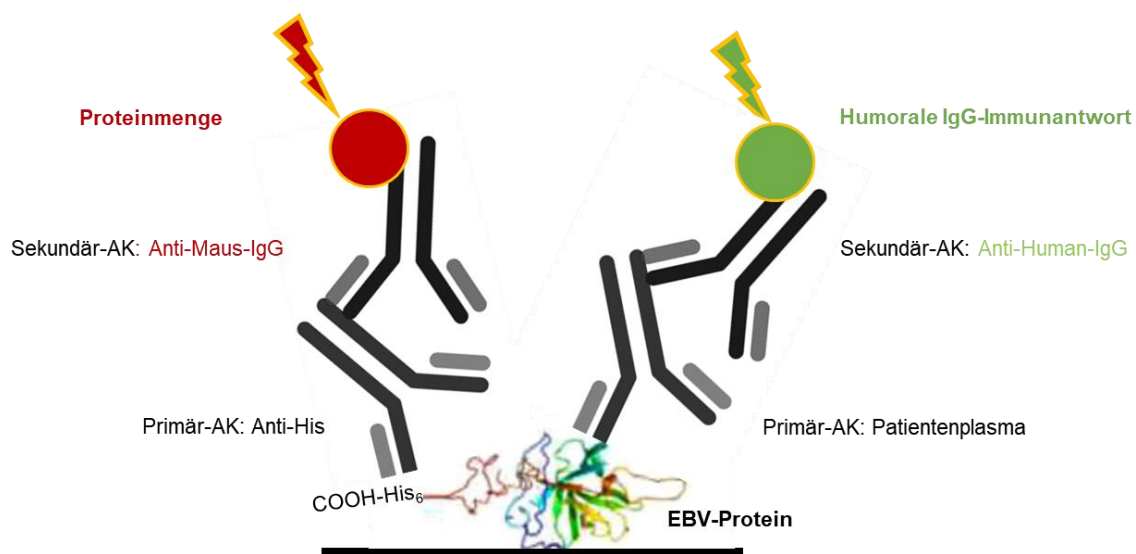
Für den Vergleich der EBV-spezifischen IgG-Titer an T0 und T1 wurde der gepaarte, nicht-parametrische t-Test (*t-test* nach Wilcoxon) für verbundene Stichproben angewandt. Das Signifikanzniveau alpha betrug für alle Analysen 5 %.

Aufgrund des explorativen Charakters der Studie, mit dem Ziel neue Zusammenhänge im serologischen Profil von IM-Patienten zu finden und keine a-priori definierten Hypothesen zu testen, wurde das Signifikanzniveau alpha nicht im Sinne des multiplen Testprocedures korrigiert (Bender und Lange 2001). Die Ergebnisse gelten nur für die in der eigenen Arbeit untersuchten Kohorte und sind nicht auf die Gesamtheit von IM-Patienten übertragbar, sofern die Aussagen nicht anhand einer größeren Kohorte reproduziert und in einem konfirmatorischen Studiendesign bestätigt werden können.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Detektion EBV-spezifischer IgG-Serumantworten im fluoreszenzbasierten Dot-Blot-Verfahren

Zur Analyse der EBV-spezifischen IgG-Antikörperantwort im Plasma von Patienten mit IM wurde ein in der Arbeitsgruppe etabliertes, fluoreszenzbasiertes Dot-Blot-Verfahren angewandt. Dabei werden die C-terminal mit einem His<sub>6</sub>-Etikett versehenen EBV-Proteine in HEK 293T Zellen exprimiert, über Nickel-Agarosebeads aufgereinigt, auf eine Nitrozellulose (NC)-Membran gespottet und mit Patientenplasma sowie einem gegen das His<sub>6</sub>-Etikett gerichteten Mausantikörper inkubiert. Mit Hilfe von anti-Human-IgG- und anti-Maus-IgG-Sekundärantikörpern, die mit verschiedenen Fluorochromen gekoppelt sind, lassen sich im *Odyssey Infrared Imaging System* (Li-Cor) durch Belichtung bei einer Wellenlänge von 700 und 800 nm sowohl die aufgetragenen Proteinmengen als auch die EBV-spezifische IgG-Antwort als *arbitrary fluorescence units* (AFU) quantifizieren. Eine schematische Darstellung des etablierten Dot-Blot-Immunoassays zeigt Abbildung 5.1.



**Abbildung 5.1 Detektion von Proteinmenge und humoraler IgG-Immunantwort im fluoreszenzbasierten Dot-Blot-Nachweisverfahren.**

EBV-Proteine wurden auf eine Nitrozellulose-Membran gespottet. Anschließend wurde die Membran mit Patientenplasma sowie einem murinen Antikörper, der gegen das His<sub>6</sub>-Etikett gerichtet war, das allen EBV-Proteinen am C-Terminus angefügt worden war, inkubiert. Gebundene Antikörper wurden durch Inkubation mit anti-Maus- und anti-Human-Zweitantikörpern detektiert, die mit unterschiedlichen Fluorochromen gekoppelt waren. Dadurch konnten parallel die aufgetragenen Proteinmengen und gegen EBV-Proteine gerichtete IgG-Immunantworten als *arbitrary fluorescence units* (AFU) im *Odyssey Infrared Imaging System* quantifiziert werden (Lv et al. 2019; Volgger und Lichtscheidl o. D.).

## 5.2 Proteinexpression und Codonoptimierung

### 5.2.1 Nachweis der EBV-Antigene im Dot-Blot- und Western-Blot-Verfahren

Die aktuell verfügbaren serologischen Nachweismethoden unterscheiden sich vor allem in der Art und Präparation der eingesetzten Antigene. So ist nach Goswami et al. ein Vergleich der Antigenzusammensetzung und -konzentration der in den meisten Studien verwendeten Lysate verschiedener EBV-infizierter Zelllinien nur schwer möglich (Goswami et al. 2017). Aus dieser Kritik wird die Forderung nach einer quantitativen und qualitativen Überprüfung der exprimierten Antigene vor deren Einsatz in einem diagnostischen Test laut.

In der eigenen Arbeit wurden die über das C-terminale His<sub>6</sub>-Etikett aufgereinigten Proteine mittels anti-His<sub>6</sub>-Antikörper sowohl im Dot-Blot als auch im Western-Blot detektiert. Im fluoreszenzbasierten Dot-Blot-Verfahren konnte die Proteinkonzentration als *arbitrary fluorescence units* (AFU) quantifiziert werden. Dadurch wurde bestätigt, dass das jeweilige Protein tatsächlich exprimiert werden konnte, allerdings nicht, ob es sich tatsächlich um das richtige EBV-Antigen handelte. Dies erforderte den qualitativen Nachweis des Proteins über sein Molekulargewicht mittels SDS-PAGE-Gelelektrophorese und anschließender chemolumineszenzbasierter Überprüfung im Western-Blot. Alle im Nachweisverfahren eingesetzten EBV-Antigene konnten auf diese Weise bestätigt werden. In Abbildung 5.2 ist der Proteinnachweis für ausgewählte EBV-Antigene exemplarisch dargestellt. Proteine, die im Dot-Blot sehr hohe Fluoreszenzsignale zeigten, ergaben auf der Western-Blot-Membran trotz kurzer Expositionszeit eine sehr starke Bande, was die Dot-Blot-Ergebnisse nochmals untermauerte. Tabelle 5.1 zeigt die Anordnung und Größe der gespotteten EBV-Proteine.

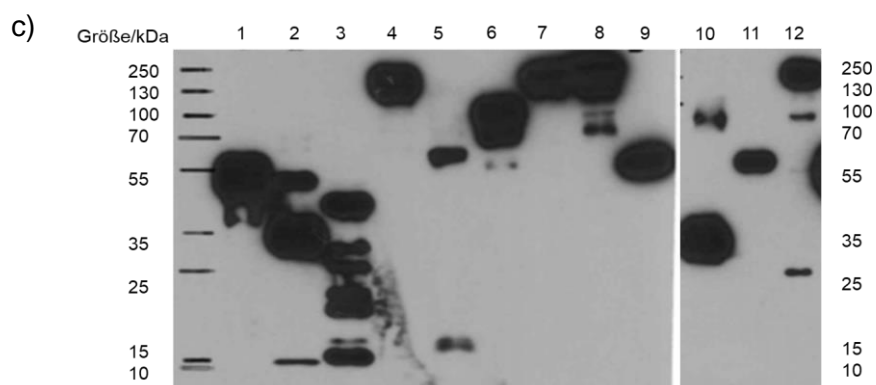
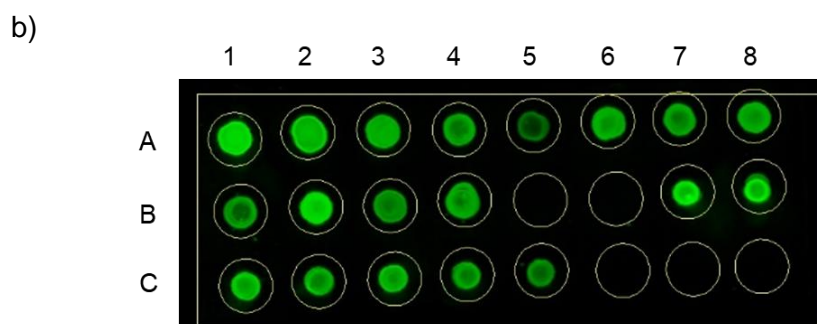
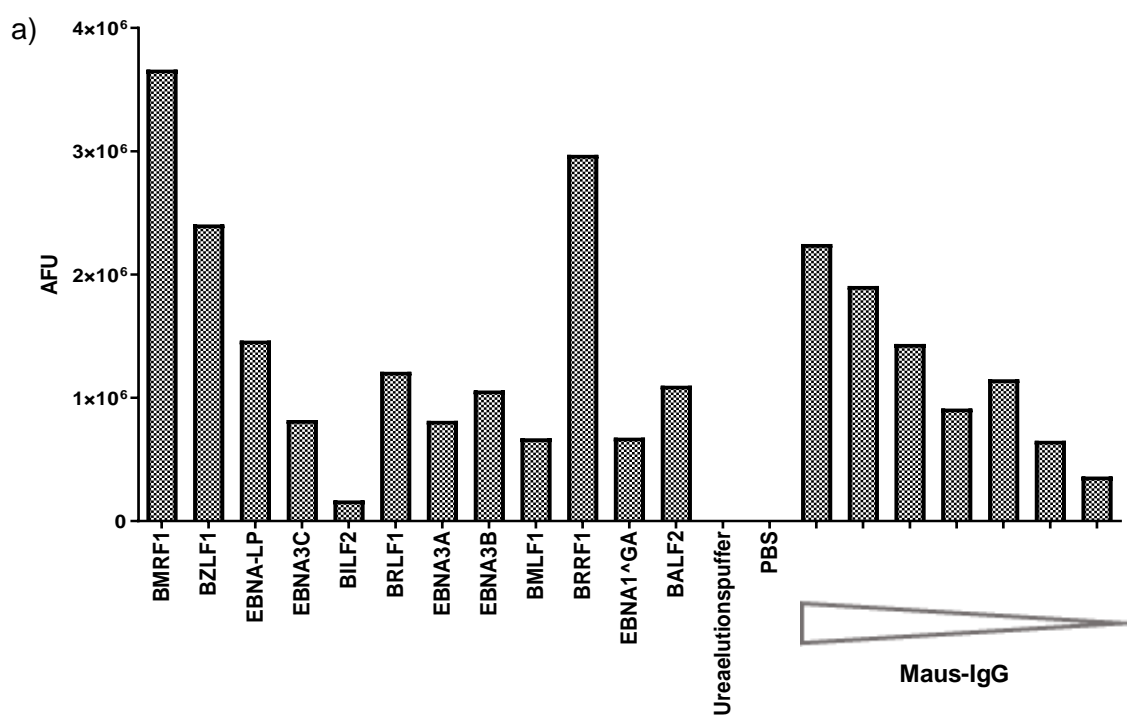
**Tabelle 5.1 Anordnung und Größe der aufgetragenen EBV-Proteine.**

Protein	Dot-Blot	Western-Blot	Größe in kDa*
<b>BMRF1</b>	A1	1	43
<b>BZLF1</b>	A2	2	27
<b>EBNA-LP</b>	A3	3	55
<b>EBNA3C</b>	A4	4	109
<b>BILF2</b>	A5	5	27
<b>BRLF1</b>	A6	6	67
<b>EBNA3A</b>	A7	7	103
<b>EBNA3B</b>	A8	8	103
<b>BMLF1</b>	A9	9	53
<b>BRRF1</b>	A10	10	35
<b>EBNA1^GA</b>	A11	11	56
<b>BALF2</b>	A12	12	123

\* Die Größe der EBV-Antigene wurde der Datenbank Uniprot entnommen (The UniProt Consortium 2019).



# Ergebnisse



**Abbildung 5.2 Überprüfung der EBV-Proteine mittels Dot-Blot und Western-Blot.**

a) Die Konzentration der rekombinant hergestellten und aufgereinigten EBV-Proteine wurde mit Hilfe des anti-His<sub>6</sub>-Antikörpers im Dot-Blot-Verfahren *als arbitrary fluorescence units (AFU)* quantifiziert. Als Standard diente IgG der Maus. Harnstoffelutions- und PBS-Puffer wurden als Negativkontrollen mitgeführt. b) Dargestellt ist das Fluoreszenzbild des Dot-Blots: Proteine (A1-B4), Harnstoffelutionspuffer (B5-B6), Maus-IgG-Verdünnungsreihe (B7-C5), PBS (C6-C8). c) Die gelelektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennten Proteine wurden im Western-Blot mittels anti-His<sub>6</sub>-Antikörpers nachgewiesen. Die Anordnung der Proteine und ihr Molekulargewicht in kDa sind in Tabelle 5.1 aufgeführt.

## 5.2.2 Erhöhte Proteinausbeute durch Codonoptimierung

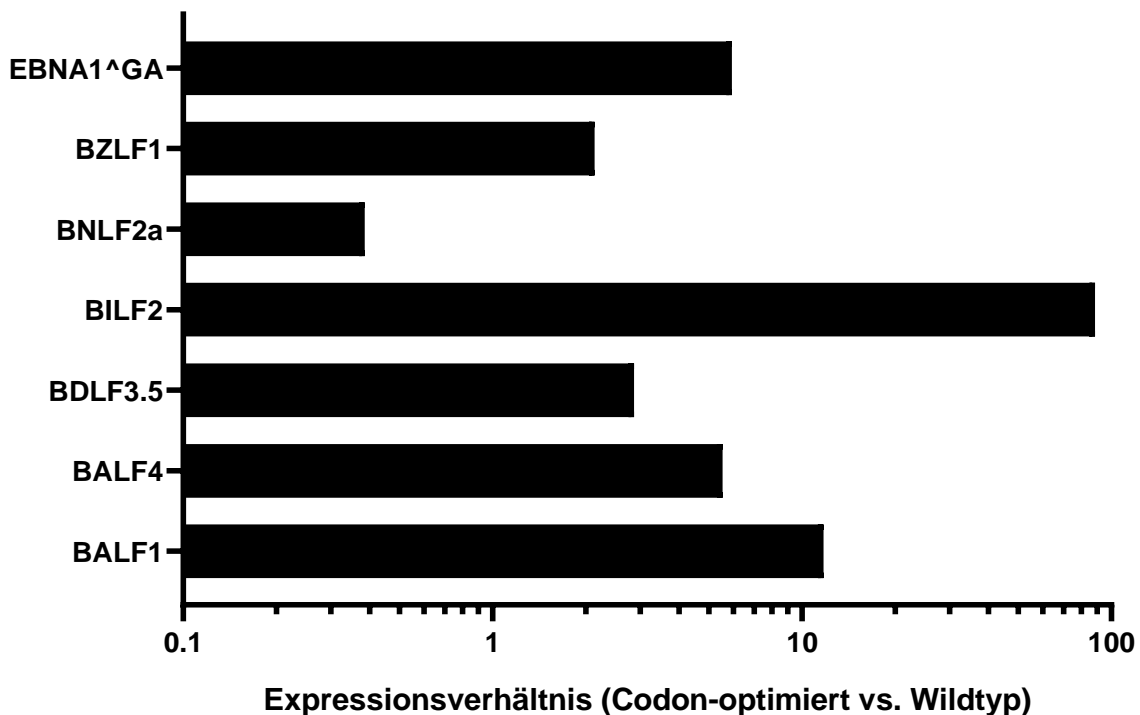
Während die Expressionsrate eines EBV-Proteins in HEK293T Zellen in unterschiedlichen Versuchen kaum variierte, unterschieden sich die einzelnen Proteine trotz gleicher Versuchsbedingungen zum Teil immens in ihrer Expressionsstärke.

Um für die Messung der Antikörperantworten in allen IM-Patienten ausreichende Mengen an EBV-Proteinen zur Verfügung zu haben, war es notwendig, die Proteinherstellung weiter zu optimieren. Da das Expressionsniveau für zahlreiche Antigene zufriedenstellend war, konnte prinzipiell von einer guten Transfektionseffizienz ausgegangen werden. Zahlreiche Studien belegen aber, dass die Effizienz der Proteinexpression maßgeblich durch die Codonverwendung beeinflusst wird (Fath et al. 2011; Gustafsson et al. 2004; Zhou et al. 1999). Basierend auf dem degenerierten genetischen Code, der es erlaubt, Codons gezielt auszutauschen, ohne die AS-Sequenz zu verändern, wurde für niedrig exprimierte Antigene die Wildtypsequenz mit Hilfe des frei zugänglichen Webservers *Codon Optimization On-Line* (<http://cool.syncti.org/>) modifiziert. Aus partiell überlappenden Oligonukleotiden wurden mittels PCR Codon-optimierte Genvarianten synthetisiert und in HEK293T Zellen transfiziert. In Tabelle 5.2 sind exemplarisch die prozentualen Sequenzübereinstimmungen zwischen Wildtyp- und Codon-optimierter Sequenz für ausgewählte Antigene dargestellt. Um den Effekt der Codonoptimierung auf die Expression zu untersuchen, wurden die Wildtyp und die Codon-optimierten Genvarianten parallel in HEK293T Zellen exprimiert und die isolierten Proteinmengen im Dot-Blot-Verfahren verglichen (Abbildung 5.3). Die Proteinausbeute der meisten Antigene konnte durch Codonoptimierung deutlich gesteigert werden, einzig bei BNLF2a führte die Codonoptimierung zu einer verminderten Proteinausbeute. Da es sich bei BNLF2a um ein sehr kleines Protein von lediglich 60 AS handelt, kommt vermutlich ein expressionssteigernder Effekt der Codonoptimierung nicht zum Tragen. So betrug der Median der Codon-optimierten Antigene mehr als das Fünffache des Medians der Wildtyp-Antigene mit einer sehr großen *range* von 88,2 [0,4; 88,6]. Insgesamt wurden von 19 der 86 EBV-Antigenen Codon-optimierte Genvarianten hergestellt und exprimiert, um genügend Protein für den diagnostischen Einsatz im serologischen Assay zu erhalten. Diese sind in Tabelle 4.10 entsprechend gekennzeichnet.

## Ergebnisse

**Tabelle 5.2 Sequenzunterschiede zwischen Wildtyp und Codon-optimierten Varianten ausgewählter EBV-Gene.**

Gen	ORF Länge Wildtyp (nt)	ORF Länge Codon-optimiert (nt)	Übereinstimmung (%)
BALF1	546	546	85
BALF4	2598	2592	78
BDLF3.5	252	252	82
BILF2	744	744	78
BNLF2	180	180	78
BZLF1	735	735	79
EBNA1^GA	1239	1242	74
BHRF1	573	573	75
BXRF1	744	744	76



**Abbildung 5.3 Gen-abhängige Erhöhung der Proteinexpression durch Codonoptimierung.**

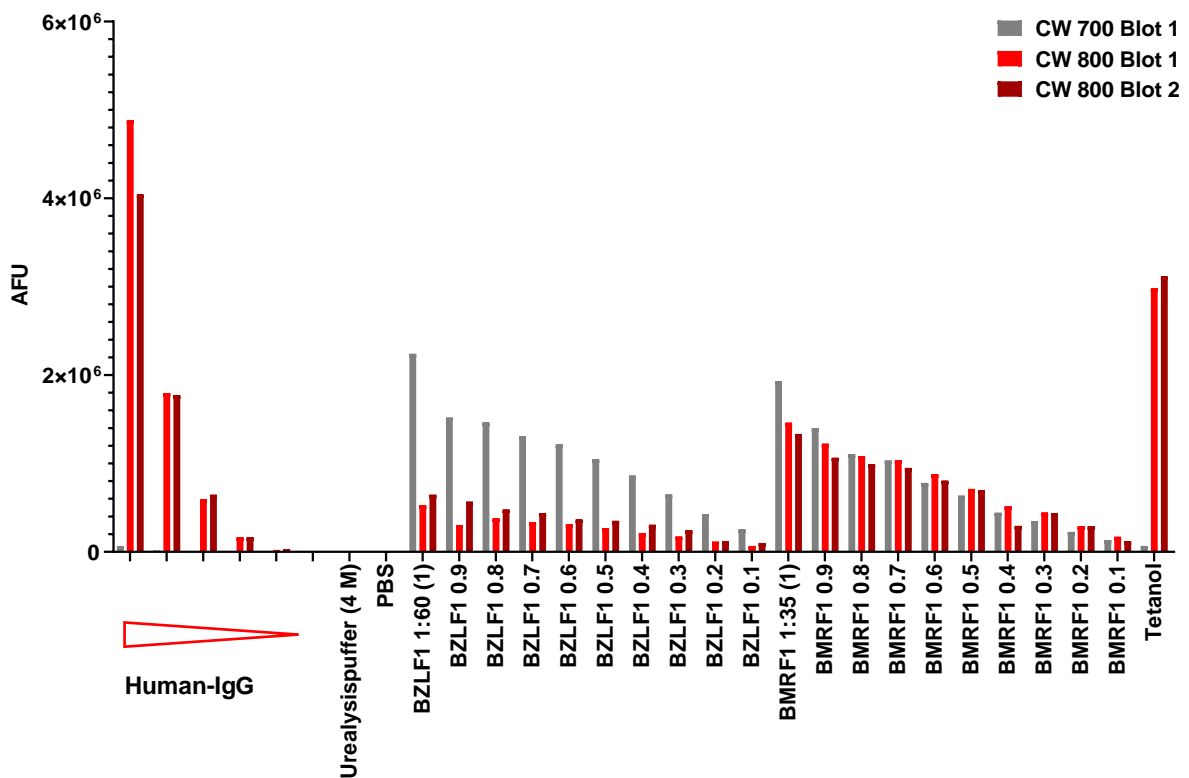
HEK293T Zellen wurden mit Expressionsplasmiden der Wildtyp- und der Codon-optimierten (cdo) Genvarianten transfiziert und die exprimierten Proteine via Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Proteinmenge wurde mittels anti-His<sub>6</sub>-Antikörper detektiert und im Dot-Blot-Verfahren als *Arbitrary Fluorescence Units* (AFU) quantifiziert: Dargestellt ist das Verhältnis der Expressionsstärke von Codon-optimierter und Wildtyp-Sequenz für ausgewählte EBV-Antigene. Im Median konnte die Proteinausbeute durch Codonoptimierung um den Faktor 5,5 bei einer *range* von 88,2 [0,4; 88,6] gesteigert werden.

## **5.3 Einflussfaktoren auf die Messung der humoralen Immunantwort**

### **5.3.1 Keine Interferenz zwischen humanen IgG- und anti-His<sub>6</sub>-Antikörpern bei Bindung an die EBV-Antigene**

Da im Dot-Blot-Nachweisverfahren Proteinmenge und Serumantwort gleichzeitig erfasst wurden, stellte sich die Frage, ob die beiden Primärantikörper um die Bindung an die jeweiligen EBV-Antigene auf der Membran konkurrierten. Um eine Beeinflussung der gemessenen IgG-Serumantwort durch den anti-His<sub>6</sub>-Antikörper auszuschließen, wurde ein Patientenplasma mit bekannt hohen IgG-Titern gegen die beiden EBV-Antigene BMRF1 und BZLF1 ausgewählt. Parallel wurden zwei identische Dot-Blot-Membranen mit Verdünnungsreihen der beiden Proteine angesetzt. Die eine Membran wurde mit anti-His<sub>6</sub>-Antikörper und dem Patientenplasma, die andere Membran nur mit dem Patientenplasma über Nacht inkubiert. Abbildung 5.4 zeigt, dass die am nächsten Tag gemessenen Serumantworten in beiden Versuchen nahezu identisch waren. Folglich wurde die IgG-Serumantwort durch die Bindung des anti-His<sub>6</sub>-Antikörpers an die EBV-Antigene auf der NC-Membran nicht beeinflusst, sodass Proteinmenge und humorale Immunantwort gleichzeitig bestimmt werden konnten. Außerdem stieg die IgG-Serumantwort mit zunehmender Antigenmenge an.

# Ergebnisse



**Abbildung 5.4 Keine Interferenz bei der Messung EBV-Antigen-gebundener humaner IgG- und anti-His<sub>6</sub>-Antikörper.**

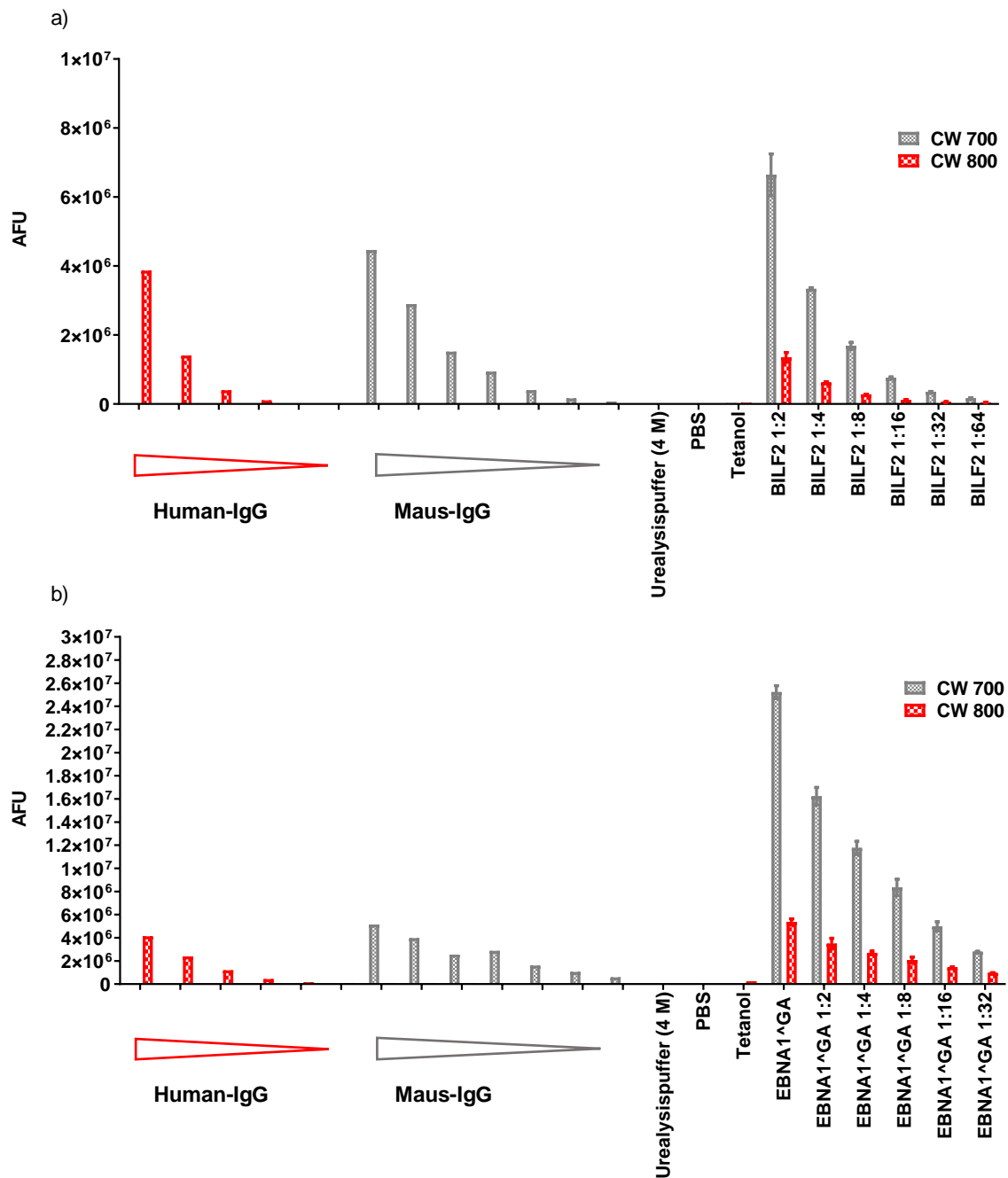
Dargestellt ist die IgG-Serumantwort eines ausgewählten EBV-positiven Spenders (EP-A016-02) gegen die zwei lytischen Antigene BZLF1 und BMRF1, die im Dot-Blot-Verfahren als *arbitrary fluorescence units* (AFU) quantifiziert wurden. Graduelle Verdünnungen der EBV-Proteine BZLF1 und BMRF1 in Harnstoff-Lysepuffer wurden parallel auf zwei Membranen aufgetragen. Die erste Membran (Blot 1) wurde sowohl mit dem anti-His<sub>6</sub>-Antikörper zur Erfassung der Proteinmenge bei einer Wellenlänge von 700 nm (CW 700) als auch mit dem Patientenserum (EP-A016-02) zur Erfassung humaner anti-BZLF1- und BMRF1-IgG-Antikörper bei einer Wellenlänge von 800 nm (CW 800) inkubiert. Parallel wurde Blot 2 nur mit Serum inkubiert und die humorale Immunantwort bei einer Wellenlänge von 800 nm gemessen, ohne die Proteinmenge zu erfassen. Die Immunreaktion gegen den Tetanol-Impfstoff diente jeweils als Positivkontrolle, wobei aufgrund des fehlenden His<sub>6</sub>-Etiketts keine Bestimmung der Proteinmenge möglich war. Als Standardverdünnungsreihe wurde humanes Immunglobulin verwendet. PBS und Harnstoff-Lysepuffer dienen als Negativkontrollen.

## 5.3.2 Abhängigkeit der IgG-Serumantwort von der Antigenmenge

Der in Abbildung 5.4 beobachtete positive Zusammenhang zwischen Proteinmenge und Antikörperantwort wurde mit verschiedenen EBV-Antigenen und Seren weiterer IM-Patienten bzw. EBV-positiver Spender näher untersucht. Im Experiment wurden die beiden EBV-Proteine BILF2 und EBNA1<sup>GA</sup> in mehreren Verdünnungsstufen auf eine NC-Membran gespottet. Dabei wurde ein Konzentrationsbereich gewählt, der deutlich über und unter die Proteinmenge hinausreichte, die zur Messung der Patientenproben eingesetzt wurde (BILF2 1:3 und EBNA1<sup>GA</sup> 1:9). Damit sollte geklärt werden, ob schwache Serumsignale gegen geringkonzentrierte Proteine und starke Serumantworten gegen konzentriertere Proteine vergleichbar waren. Auch sollte geklärt werden, ob bzw. wann die Serumantwort bei sehr hohen Antigenmengen ein Plateau erreichen würde. Wie in Abbildung 5.5 zu sehen, stieg die Serumantwort proportional mit der Proteinmenge an und selbst im hohen Konzentrationsbereich erreichten die Fluoreszenzsignale kein Plateau. Der Quotient aus humoraler Immunantwort und Proteinmenge (Abbildung 5.6) blieb somit unabhängig vom Antigen und Spender über einen großen Konzentrationsbereich konstant und stieg erst bei sehr kleinen Proteinkonzentrationen an, vermutlich weil in diesem Konzentrationsbereich kleine Messschwankungen stärker ins Gewicht fallen. Ein entsprechendes Phänomen zeigte sich sowohl bei BILF2 als auch bei EBNA1<sup>GA</sup> (Abbildung 5.6)

Dieses Ergebnis war für die nachfolgende Auswertung der Serumanalysen von Bedeutung, da die Expressionsstärke zwischen den verschiedenen Antigenen variierte und eine präzise Angleichung der Proteinmengen selbst bei ähnlichen Expressionsniveaus nicht immer möglich war. Der Quotient aus Serumantwort und Proteinexpression (CW 800/CW 700) ermöglichte nicht nur einen Vergleich der humoralen Immunantworten gegen verschiedene EBV-Antigene auf der gleichen Membran (Intra-Assay-Immunantworten) und gegen das gleiche Antigen in verschiedenen Versuchen (Inter-Assay-Immunantworten), sondern verhinderte auch Messfehler aufgrund von Pipettierungenauigkeiten beim Auftragen der Proteine.

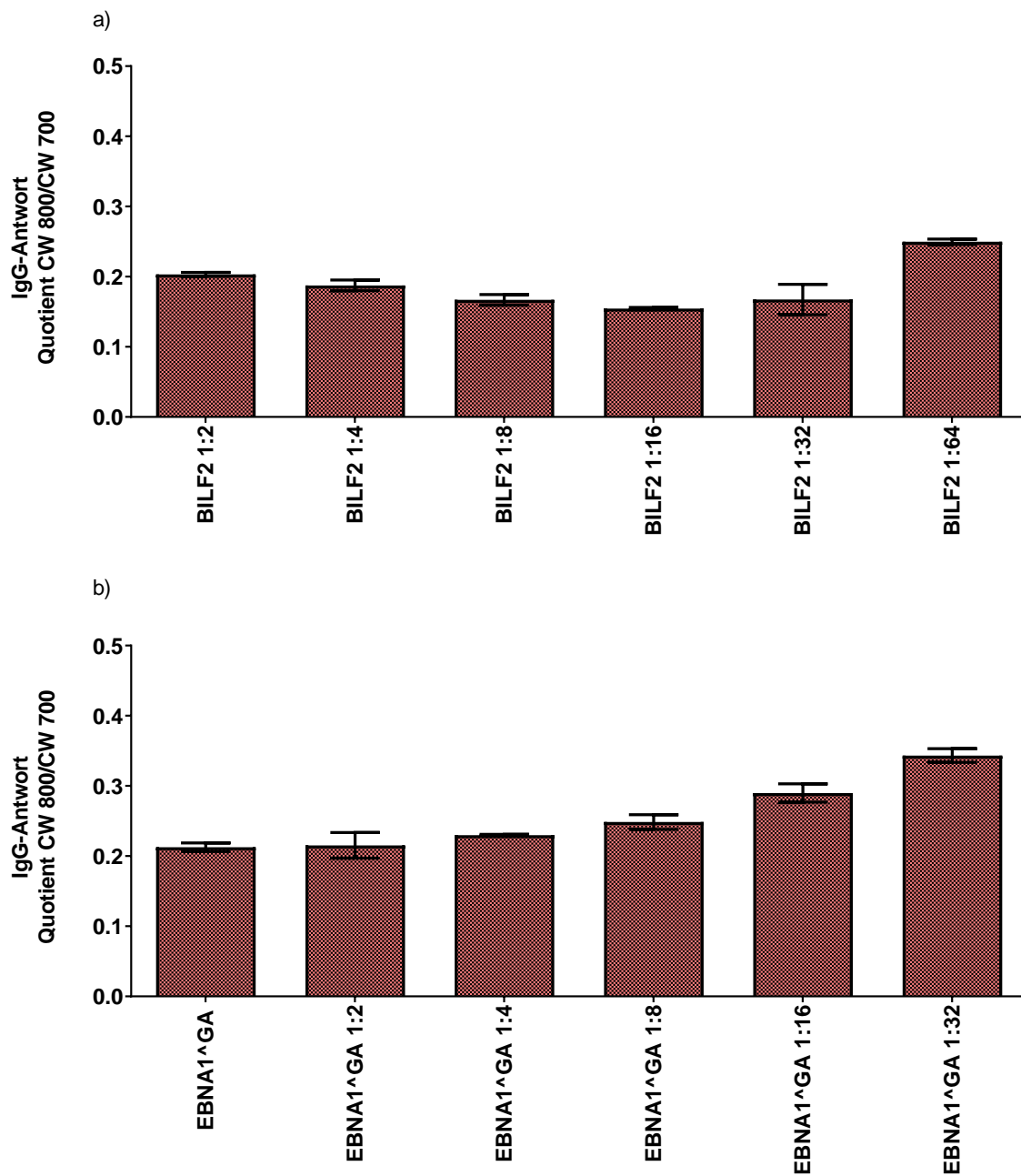
# Ergebnisse



**Abbildung 5.5 Anstieg der IgG-Serumantwort mit zunehmender Antigenmenge.**

Abnehmende Mengen ausgewählter EBV-Proteine wurden jeweils als Duplikate auf eine Membran gespottet, mit Plasma verschiedener EBV-positiver Spender sowie anti-His<sub>6</sub>-Antikörper inkubiert und die IgG-Immunantworten im Dot-Blot-Verfahren bestimmt. Dargestellt sind jeweils die in *arbitrary fluorescence units* (AFU) quantifizierte Proteinmenge (CW 700) und Serumantwort (CW 800) (MW plus SD): a) BILF2 und anti-BILF2-IgG-Immunantwort (Spender EP-A052-03), b) EBNA1<sup>GA</sup> und anti-EBNA1<sup>GA</sup>-IgG-Immunantwort (Spender C). Die Immunreaktion gegen den Tetanus-Impfstoff diente als Positivkontrolle, PBS und Harnstoff-Lysepuffer wurden als Negativkontrolle mitgeführt. Als Standardverdünnungsreihe wurde humanes und murines Immunglobulin verwendet.

# Ergebnisse



**Abbildung 5.6 Direkte Proportionalität zwischen der IgG-Antikörperantwort und Proteinmenge über einen großen Konzentrationsbereich.**

Abnehmende Mengen ausgewählter EBV-Proteine wurden jeweils als Duplikate auf eine Membran gespottet, mit Plasma verschiedener EBV-positiver Spender sowie anti-His<sub>6</sub>-Antikörper inkubiert und die IgG-Immunantworten im Dot-Blot-Verfahren bestimmt (MW plus SD). Die Serumantworten der Spender (CW 800) wurden durch die ermittelte Proteinmenge (CW 700) dividiert: a) anti-BILF2-IgG-Immunantwort (Spender EP-A052-03), b) anti-EBNA1<sup>GA</sup>-IgG-Immunantwort (Spender C).



## 5.4 Analyse der EBV-spezifischen humoralen Immunantwort in Patienten der IMMUC-Studie

Um die Rolle der humoralen Immunantwort in der IM besser zu verstehen und Biomarker für den Krankheitsverlauf und mögliche Folgeerkrankungen zu identifizieren, wurden EBV-spezifische IgG-Serumantworten im Patientenplasma mit Hilfe des in 5.1 beschriebenen fluoreszenzbasierten Dot-Blot-Nachweisverfahrens untersucht.

### 5.4.1 Charakterisierung der untersuchten Patientenkohorte

Von den untersuchten 101 IM-Patienten der IMMUC-Studie (siehe Methodenteil 4.3.2.2) stand von 73 Patienten Probenmaterial zu drei Zeitpunkten (*Visits*), von 20 Patienten zu zwei Zeitpunkten und von acht Patienten zu einem Zeitpunkt nach Symptombeginn zur Verfügung. In Tabelle 5.3 sind die Zeitpunkte aufgelistet, die durch die IMMUC-Studienzentrale der Kinderklinik Schwabing definiert worden waren (Stand 05.09.2019).

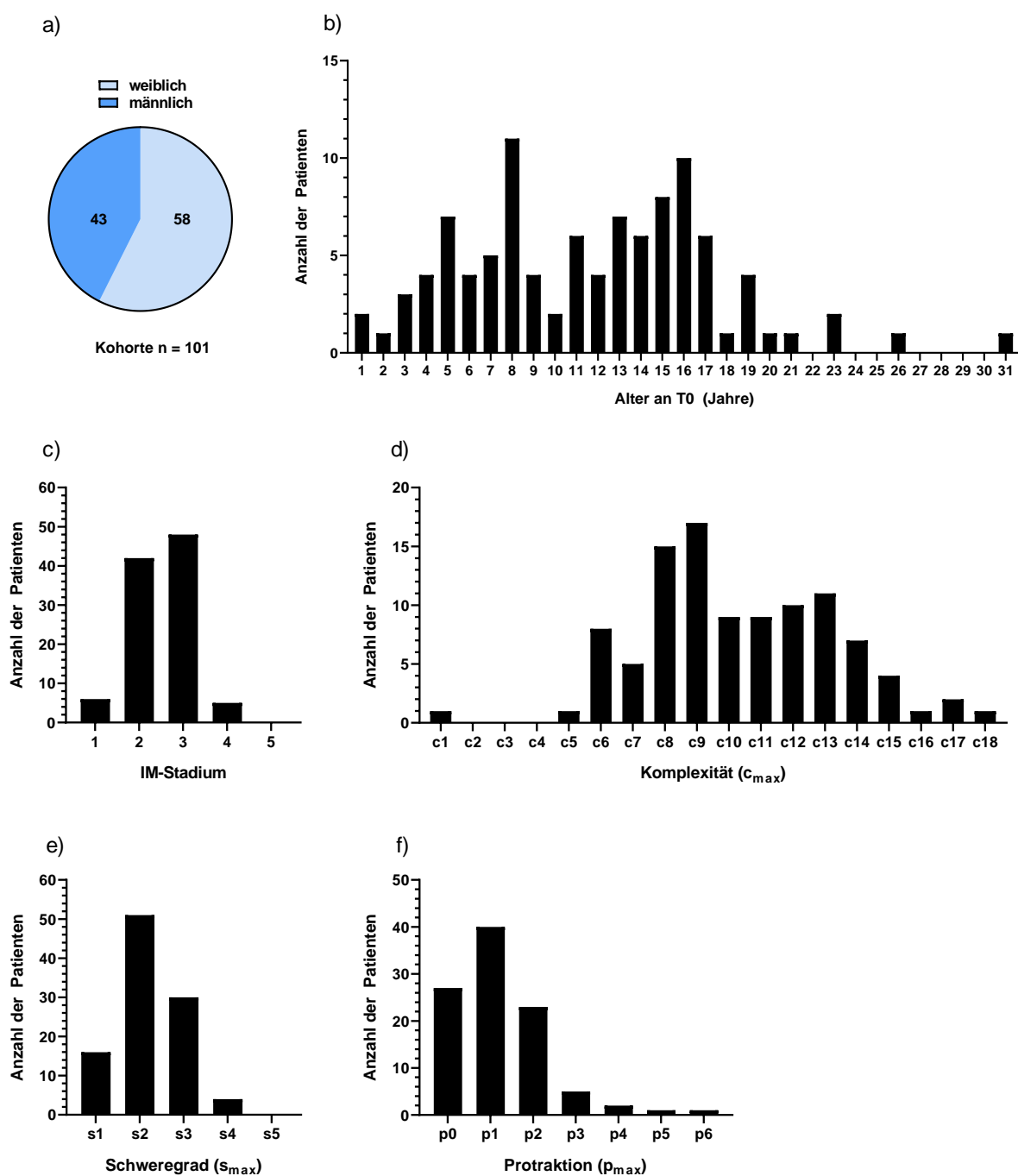
**Tabelle 5.3 Zeitpunkt und statistische Verteilung der Probenentnahmen nach Krankheitsbeginn.**

<i>Visit</i>	Tage nach Symptombeginn	Anzahl Proben	Median [Min; Max] in Tagen
<b>T0</b>	0-27	93	10 [2; 28*]
<b>T1</b>	28-52	89	32 [23; 52]
<b>T2-T4</b>	53-135	2	79,5 [72; 87]
<b>T5-T7</b>	136-225	73	187 [150; 225]
<b>T8-T12</b>	226-365	10	247 [230; 349]

„\*“, bei zwei Patienten erfolgte die Erstvorstellung nach 28 Tagen, sie wurden aber noch als T0 gewertet.

In Abbildung 5.7 sind die anamnestischen und klinischen Daten der untersuchten Patientenkohorte dargestellt (Stand 05.09.2019). Je nach Schweregrad ( $s_{max}$ ) und/oder Progression der Symptomatik ( $p_{max}$ ) wurden die Patienten fünf verschiedenen IM-Stadien zugeordnet. Außerdem wurde für jeden Patienten, abhängig von der Anzahl seiner pathologischen Befunde, die sowohl klinische als auch laborchemische, von der Norm abweichende Parameter umfassten, die maximale Komplexität ( $c_{max}$ ) des Krankheitsverlaufs berücksichtigt. Eine detaillierte Beschreibung der (vorläufigen) klinischen Einteilung der Patienten durch die IMMUC-Studienzentrale der Kinderklinik Schwabing ist dem Methodenteil 4.3.2.2 zu entnehmen.

# Ergebnisse



**Abbildung 5.7 Klinische Einteilung der serologisch untersuchten Kohorte.**

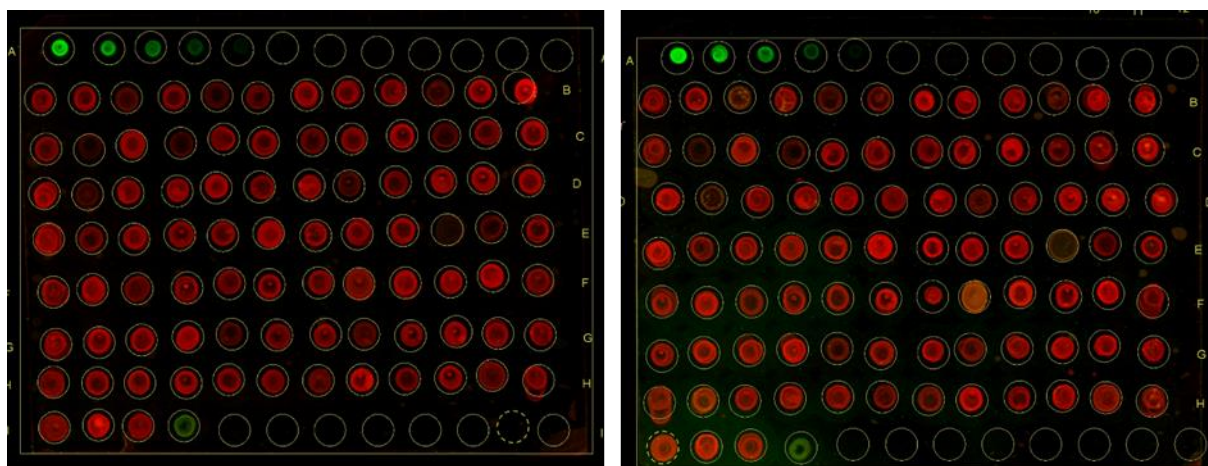
a) Geschlechterverteilung der IM-Patienten: Die Kohorte umfasste 58 weibliche und 43 männliche IM-Patienten. b) Altersverteilung: Das Altersspektrum der IM-Patienten reichte von 1 bis 31 Jahre. Das mediane Alter betrug zwölf Jahre. c) Einteilung der Patienten in IM-Stadien: Die meisten Patienten entfielen auf die Stadien 2 (mäßig) und 3 (schwer). d) Komplexität der Krankheitssymptome: Die Komplexität im Krankheitsverlauf der IM reichte von einem bis 18 pathologisch veränderten Parametern, wobei der Median an pathologischen Befunden bei 10 lag. e) Einteilung in Schweregrad der Erkrankung: Im Median präsentierte sich die vorliegende Kohorte mit einer mäßig maximalen Symptomausprägung (s2). f) Krankheitsprotraktion: Der Median der IM-Patienten zeigte an T1 noch eine milde Symptomatik (p1). Die Einteilung erfolgte durch die Studienzentrale der Kinderklinik Schwabing (Stand 05.09.2019).

## 5.4.2 Bestimmung des Schwellenwerts für positive Serumsignale

Um den Schwellenwert zu definieren, ab welchem ein Signal als positiv gewertet werden konnte, wurde die Virus-spezifische IgG-Serumantwort von EBV-negativen Spendern analysiert. Dazu wurden Seren von drei EBV-negativen Spendern einzeln getestet sowie zwei Serum-Pools von jeweils fünf EBV-negativen Spendern analysiert. Die EBV-Seronegativität der Kontrollprobanden war vorab mittels kommerziellem Immunoblot (*Mikrogen*) in der virologischen Routinediagnostik (Institut für Virologie, Technische Universität München) verifiziert worden. Exemplarisch sind die Membranen von zwei EBV-negativen Kontrollprobanden dargestellt (Abbildung 5.8).

Aus den erhaltenen Ergebnissen wurde für jedes Antigen ein individueller *Cut-Off* aus dem Mittelwert zuzüglich der zweifachen Standardabweichung des Quotienten (CW 800/CW 700) der Negativkontrollen bestimmt. Für Proteine mit sehr kleinem Schwellenwert wurde der *Cut-Off* als 0,1 definiert, um die Spezifität des Assays zu erhöhen (Tabelle 5.4). Die stringente Definition des *Cut-Offs* war notwendig, da einige Patienten insbesondere in der Akutphase der Erkrankung ein hohes Hintergrundsignal zeigten. Die hohen Fluoreszenzsignale gegen alle EBV-Antigene könnten auf eine Reaktivität gegen Autoantigene der HEK293T Zellen hindeuten, die einige IM-Patienten im Zuge der starken Aktivierung des Immunsystems unmittelbar nach Krankheitsbeginn entwickeln. Der *Cut-Off* wurde bewusst so gesetzt, da für diese neue Methode zunächst stringente Kriterien angelegt und nur signifikante Serumantworten untersucht werden sollten. In Zukunft, wenn eine größere Zahl an EBV-negativen Kontrollen eine exaktere Bestimmung des Hintergrunds zulässt, sollte der *Cut-Off* antigenabhängig genauer bestimmt und angewandt werden. Proteine, die an mindestens einem Zeitpunkt nach Symptombeginn über dem *Cut-Off* lagen, wurden in dieser Arbeit als immunogen klassifiziert. Tabelle 5.4 zeigt die Anzahl der Patienten mit Signalen über dem jeweiligen antigenspezifischen Schwellenwert. Dabei wurde zwischen der Gesamtzahl der Patienten, für die mindestens einmal im Verlauf der IM ein Signal über dem Testtrennwert gemessen werden konnte, und zwischen den einzelnen Zeitpunkten (T0, T1, T2-T4, T5-T7, T8-T12) differenziert.

## Ergebnisse



**Abbildung 5.8 EBV-negative Kontrollproben.**

Dargestellt sind die Fluoreszenzsignale der Dot-Blots von zwei EBV-negativen Kontrollproben (SCP-EBV-001 Panel 1 und AM). In Reihe 1 wurden jeweils eine Verdünnungsreihe an humanem IgG, Harnstofflysepuffer und PBS, in den Reihen 2-9 die EBV-Antigene, GFP als Negativkontrolle und der Tetanus-Impfstoff als Positivkontrolle aufgetragen (siehe Tabelle 4.10). Rote Fluoreszenzsignale (Wellenlänge 700 nm) zeigen die aufgetragenen Proteinmengen an, grüne Signale (Wellenlänge 800 nm) visualisieren humane IgG-Antikörper.

**Tabelle 5.4 Antigene verschiedener Stadien des EBV-Lebenszyklus als Angriffspunkt der humoralen Immunantwort von IM-Patienten.**

EBV-Antigen	Cut-Off	Gesamt (n/101)	T0 (n/93)	T1 (n/89)	T2-T4 (n/2)	T5-T7 (n/73)	T8-T12 (n/10)
BALF1	0,100	0	0	0	0	0	0
BALF2	0,109	0	0	0	0	0	0
<b>BALF3*</b>	<b>0,352</b>	<b>37</b>	<b>35</b>	<b>11</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>BALF4*</b>	<b>0,100</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>BALF5*</b>	<b>0,571</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>BARF1*</b>	<b>0,202</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>BaRF1*</b>	<b>0,100</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>BBLF1*</b>	<b>0,100</b>	<b>23</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>16</b>	<b>2</b>
<b>BBLF2/BBLF3*</b>	<b>0,100</b>	<b>29</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>19</b>	<b>4</b>
<b>BBLF4*</b>	<b>0,203</b>	<b>44</b>	<b>40</b>	<b>16</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
BBRF1	0,100	0	0	0	0	0	0
BBRF2	0,120	0	0	0	0	0	0
<b>BBRF3*</b>	<b>0,220</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>BcLF1*</b>	<b>0,856</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>BcRF1*</b>	<b>0,162</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>BCRF1*</b>	<b>0,300</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
BDLF1	0,100	0	0	0	0	0	0
<b>BDLF2*</b>	<b>0,100</b>	<b>13</b>	<b>11</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>BDLF3*</b>	<b>0,100</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>BDLF4*</b>	<b>0,100</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
BdRF1	0,100	0	0	0	0	0	0
<b>BFLF1*</b>	<b>0,129</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>BFLF2*</b>	<b>0,100</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>BFRF1*</b>	<b>0,100</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
BFRF1a	0,100	0	0	0	0	0	0
<b>BFRF2*</b>	<b>0,716</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>BFRF3*</b>	<b>0,153</b>	<b>59</b>	<b>18</b>	<b>13</b>	<b>2</b>	<b>45</b>	<b>5</b>
<b>BGLF1*</b>	<b>0,100</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
BGLF2	0,100	0	0	0	0	0	0

# Ergebnisse

EBV-Antigen	Cut-Off	Gesamt (n/101)	T0 (n/93)	T1 (n/89)	T2-T4 (n/2)	T5-T7 (n/73)	T8-T12 (n/10)
<b>BGLF3*</b>	<b>0,119</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
BGLF4	0,100	0	0	0	0	0	0
<b>BGLF5*</b>	<b>0,118</b>	<b>52</b>	<b>42</b>	<b>24</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>0</b>
<b>BGRF1/BDRF1*</b>	<b>0,100</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
BHLF1s	0,100	0	0	0	0	0	0
<b>BHRF1*</b>	<b>0,100</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
BILF1	0,100	0	0	0	0	0	0
<b>BILF2*</b>	<b>0,100</b>	<b>62</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	<b>52</b>	<b>5</b>
<b>BKRF2*</b>	<b>0,273</b>	<b>11</b>	<b>9</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
BKRF3	0,100	0	0	0	0	0	0
<b>BKRF4*</b>	<b>0,100</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>BLLF1*</b>	<b>0,100</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>1</b>
BLLF2	0,100	0	0	0	0	0	0
BLLF3	0,100	0	0	0	0	0	0
BLRF1	0,100	0	0	0	0	0	0
<b>BLRF2*</b>	<b>0,100</b>	<b>13</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>1</b>
<b>BLRF3*</b>	<b>2,479</b>	<b>14</b>	<b>12</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>BMLF1*</b>	<b>0,100</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>0</b>
<b>BMRF1*</b>	<b>0,100</b>	<b>26</b>	<b>22</b>	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>0</b>
<b>BMRF2*</b>	<b>0,178</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
BNLF2a	0,100	0	0	0	0	0	0
<b>BNLF2b*</b>	<b>0,236</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
BNRF1	0,101	0	0	0	0	0	0
<b>BOLF1*</b>	<b>0,101</b>	<b>11</b>	<b>9</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
BORF1	0,100	0	0	0	0	0	0
<b>BORF2*</b>	<b>0,127</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>BPLF1*</b>	<b>0,270</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>BRLF1*</b>	<b>0,100</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
BRRF1	0,100	0	0	0	0	0	0
<b>BRRF2*</b>	<b>0,100</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>0</b>
<b>BSLF1*</b>	<b>0,100</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
BSLF2/BMLF1	0,136	0	0	0	0	0	0
<b>BSRF1*</b>	<b>0,118</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
BTRF1	0,115	0	0	0	0	0	0
BVLF1	0,100	0	0	0	0	0	0
<b>BVRF1*</b>	<b>0,184</b>	<b>37</b>	<b>35</b>	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>0</b>
<b>BVRF2*</b>	<b>0,100</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>0</b>
<b>BXLF1*</b>	<b>0,100</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>0</b>
<b>BXLF2</b>	<b>0,118*</b>	<b>20</b>	<b>19</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
BXRF1	0,100	0	0	0	0	0	0
<b>BZLF1*</b>	<b>0,100</b>	<b>68</b>	<b>42</b>	<b>26</b>	<b>0</b>	<b>30</b>	<b>3</b>
<b>BZLF2*</b>	<b>0,100</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>EBNA1^GA*</b>	<b>0,100</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>0</b>
<b>EBNA2*</b>	<b>0,404</b>	<b>58</b>	<b>29</b>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>33</b>	<b>5</b>
<b>EBNA3A*</b>	<b>0,186</b>	<b>25</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>23</b>	<b>0</b>
<b>EBNA3B*</b>	<b>0,144</b>	<b>26</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>24</b>	<b>2</b>
<b>EBNA3C*</b>	<b>0,100</b>	<b>47</b>	<b>14</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>38</b>	<b>2</b>
<b>EBNALP*</b>	<b>0,100</b>	<b>24</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>16</b>	<b>3</b>
<b>LMP1*</b>	<b>0,100</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>LMP2a*</b>	<b>0,123</b>	<b>21</b>	<b>19</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
LF1	0,100	0	0	0	0	0	0
<b>LF2*</b>	<b>0,100</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>sLF3*</b>	<b>0,100</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>EBNA2-AG876*</b>	<b>0,267</b>	<b>18</b>	<b>13</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>1</b>
<b>EBNA3A-AG876*</b>	<b>0,100</b>	<b>21</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>21</b>	<b>0</b>
<b>EBNA3B-AG876*</b>	<b>0,282</b>	<b>10</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>0</b>
<b>EBNA3C-AG876*</b>	<b>0,100</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>

## Ergebnisse

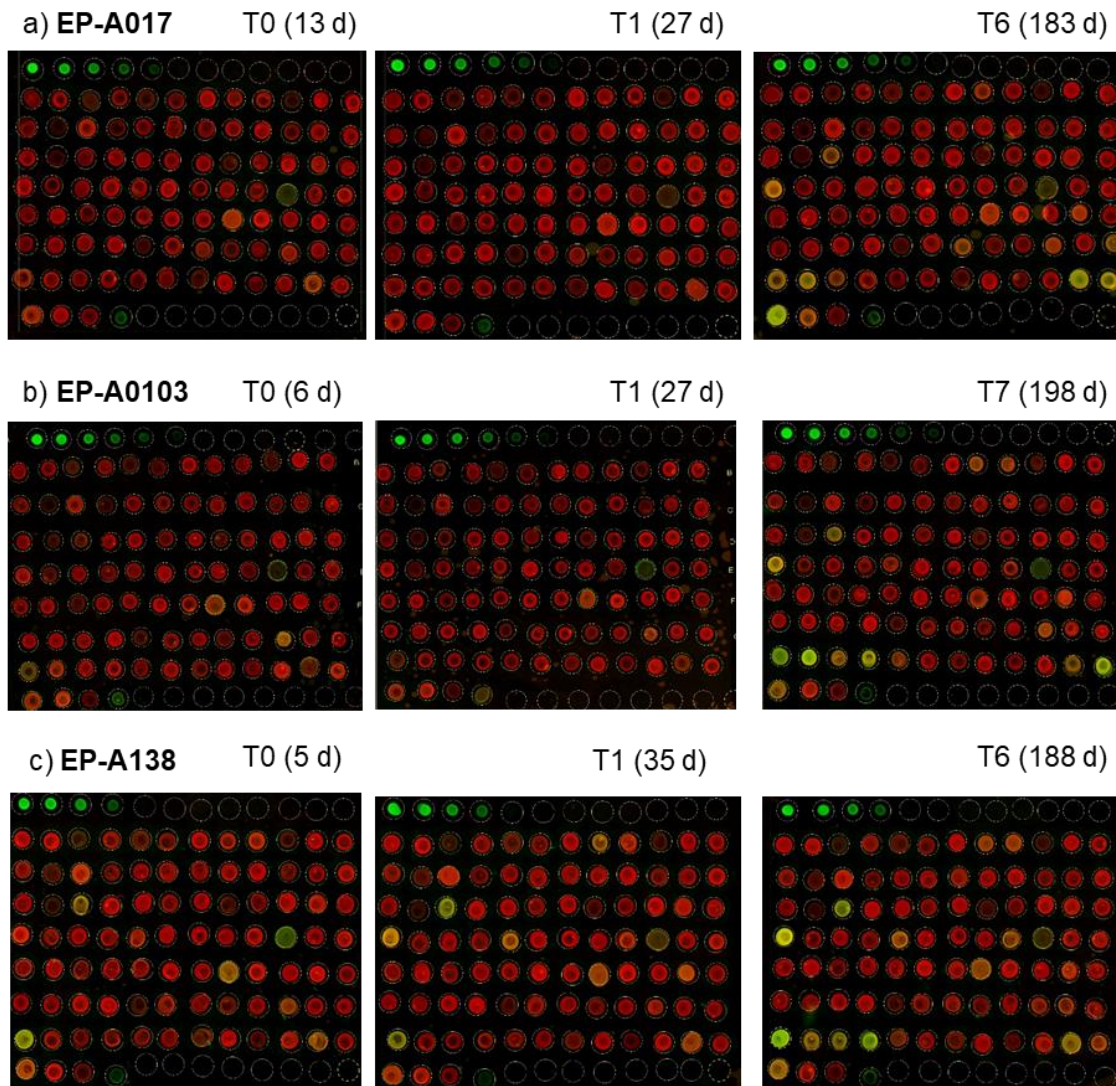
EBV-Antigen	Cut-Off	Gesamt (n/101)	T0 (n/93)	T1 (n/89)	T2-T4 (n/2)	T5-T7 (n/73)	T8-T12 (n/10)
GFP	0,251	0	0	0	0	0	0

„\*“ Antigene mit Fluoreszenzsignalen über dem *Cut-Off* wurden als immunogen definiert.

Aus den in Tabelle 5.4 gezeigten Ergebnissen wurde offensichtlich, dass die Mehrheit der untersuchten IM-Patienten nur gegen einen Teil der über 80 EBV-Proteine Antikörper bildete. Die EBV-spezifische humorale Immunantwort in IM-Patienten war zudem gegen verschiedene Antigene des latenten und lytischen Zyklus gerichtet und nicht auf die in kommerziellen Kits verwendeten Antigene beschränkt. Besonders bemerkenswert war hierbei das Membranglykoprotein BILF2, gegen das in mehr als zwei Drittel der Patienten (69 %) IgG-Antikörper ein halbes Jahr nach Primärinfektion detektiert werden konnten. Neben den Antigenen des VCA-Komplexes und/oder EBNA-1 könnte es sich hierbei um einen neuen, diagnostischen Marker für eine EBV-Serokonversion handeln. Antikörper gegen latente EBV-Antigene wurden ebenfalls regelmäßig detektiert, wobei auf die einzelnen antigenspezifischen Immunantworten noch separat eingegangen wird. Betrachtet man die Dynamik der humoralen Immunantwort, so lässt sich feststellen, dass sich Immunantworten gegen einige Antigene zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der Krankheitsphase entwickelten, in der Konvaleszenz aber wieder verschwanden und neue dafür nachgewiesen werden können. Diese Beobachtung wird Gegenstand der Diskussion sein.

## 5.4.3 Individuelle Muster der EBV-spezifischen Antikörperantwort im Krankheitsverlauf der Infektiösen Mononukleose

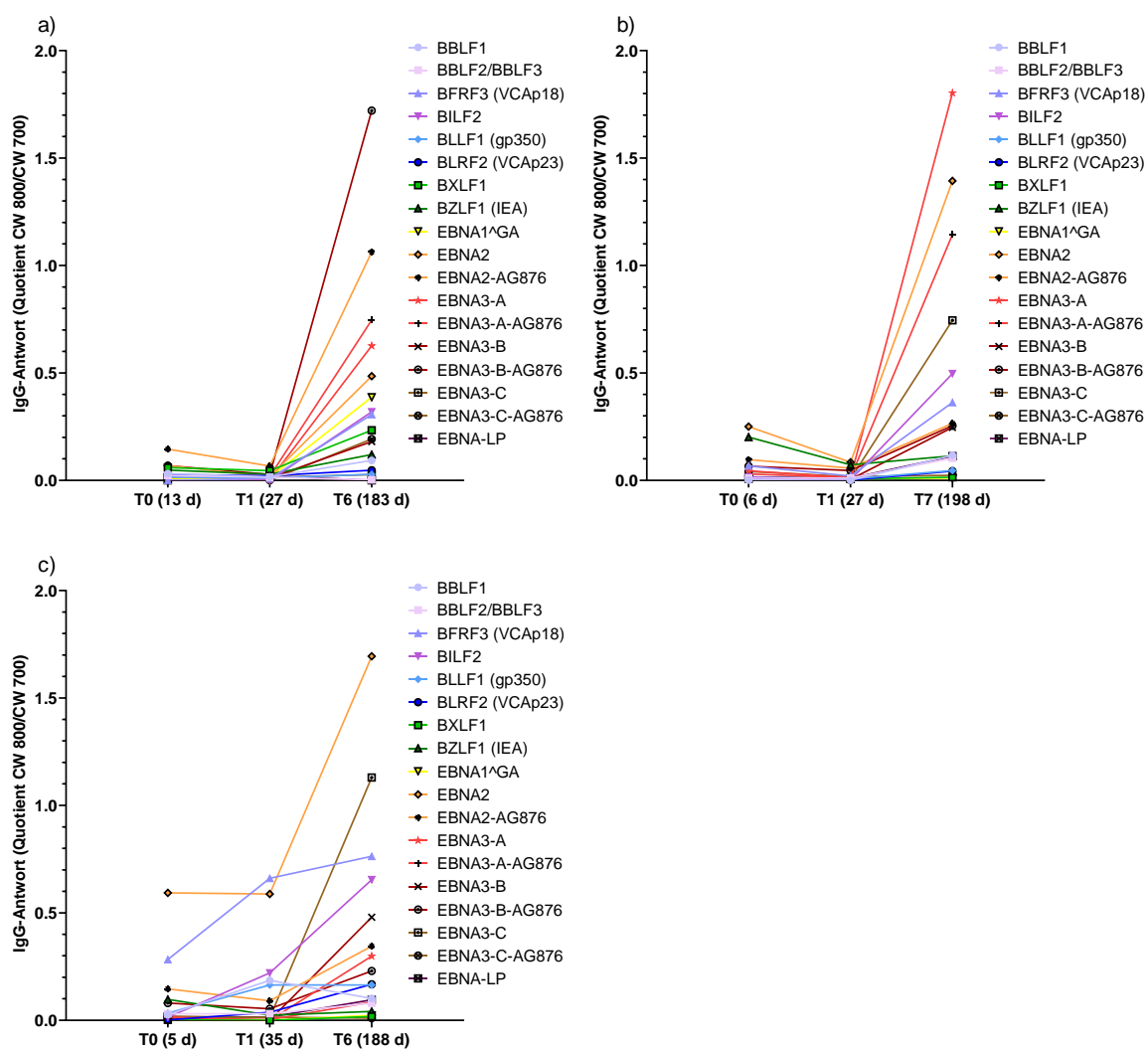
Wie in Tabelle 5.4 ersichtlich, variierte die EBV-spezifische Antikörperantwort in der IM-Kohorte hinsichtlich Antigenmuster, Stärke und Kinetik. In Abbildung 5.9 und Abbildung 5.10 sind Antikörperantworten verschiedener Patienten exemplarisch dargestellt.



**Abbildung 5.9 Individuelle Muster der antiviralen IgG-Antikörperantworten von IM-Patienten.**

Dargestellt sind die Fluoreszenzsignale der Dot-Blots von den drei IM-Patienten a) EP-A017, b) EP-A103 und c) EP-A138 zu je drei Zeitpunkten nach Erkrankung. In Reihe 1 wurden jeweils eine Verdünnungsreihe an humanem IgG, Harnstofflysepuffer und PBS, in den Reihen 2-9 die EBV-Antigene, GFP als Negativkontrolle und der Tetanus-Impfstoff als Positivkontrolle aufgetragen (siehe Tabelle 4.10). Rote Fluoreszenzsignale (Wellenlänge 700 nm) zeigen die aufgetragenen Proteinmengen an, grüne Signale (Wellenlänge 800 nm) visualisieren gebundene humane IgG-Antikörper und stehen damit für eine EBV-Antigen-spezifische Immunantwort. Die Abbildungen zeigen exemplarisch die heterogenen Antikörperreaktionen von drei Studienpatienten im Verlauf der IM.

# Ergebnisse



**Abbildung 5.10 Interindividuelle Unterschiede in Stärke und Spezifität der antiviralen IgG-Immunitäten.**

Im fluoreszenzbasierten Dot-Blot-Verfahren wurden für jeden Patienten zu jeweils drei Zeitpunkten die IgG-Antikörperantworten gegen 86 EBV-Antigene als *arbitrary fluorescence units* (AFU) gemessen und auf die Proteinmenge des jeweiligen Antigens (AFU CW 800/CW 700) bezogen. Die Grafiken a-c) zeigen die entsprechend quantifizierten Fluoreszenzsignale der drei IM-Patienten: a) EP-A017, b) EP-A103, c) EP-A138.



## 5.4.4 Antigenabhängige Kinetik der EBV-spezifischen IgG-Immunität im Verlauf der Infektiösen Mononukleose

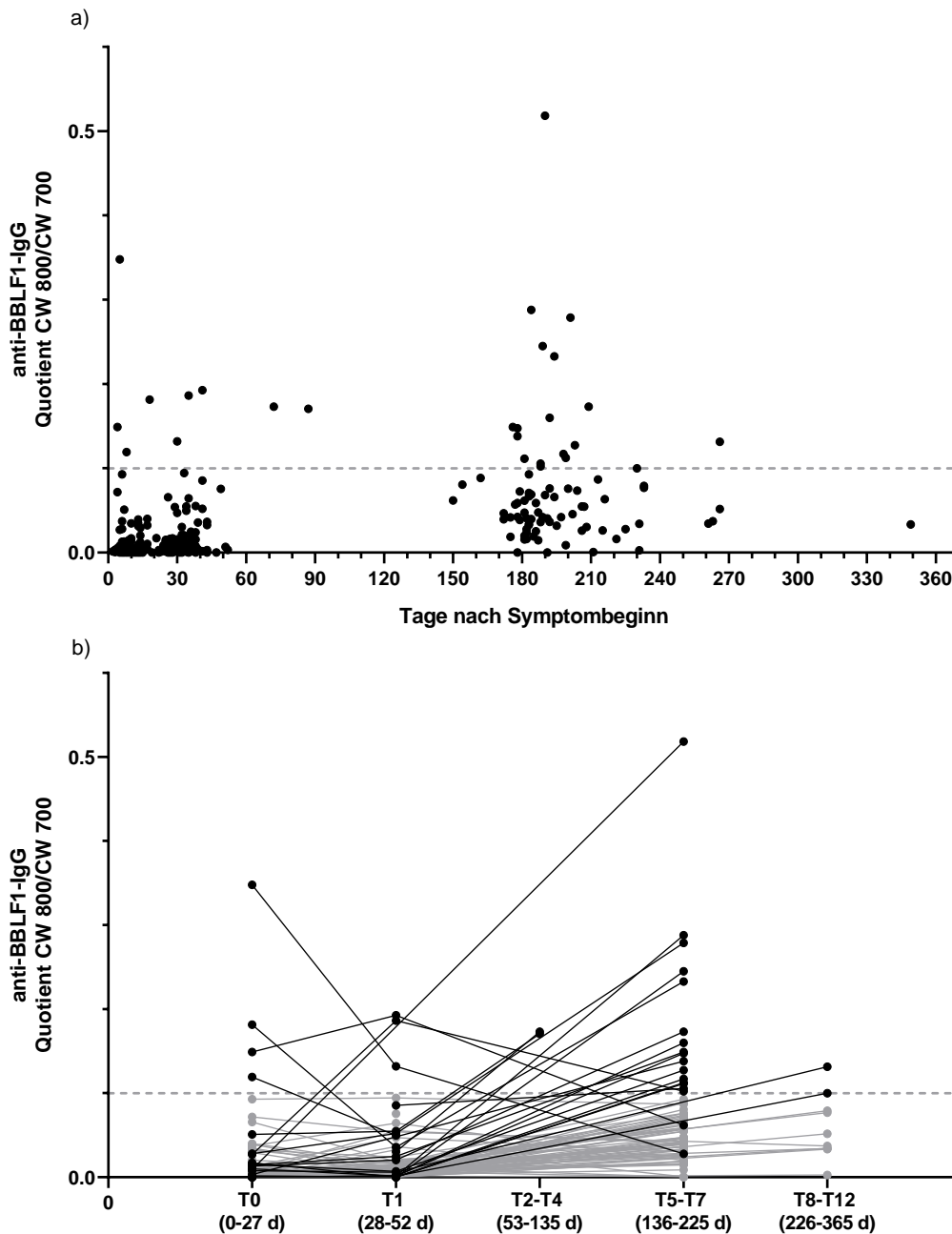
Die Kinetik der EBV-spezifischen Antikörperantwort von der Primärinfektion bis zur Rekonvaleszenz wurde bei allen Patienten mittels Dot-Blot-Verfahren untersucht. Um serologische Biomarker für den diagnostischen Nachweis der IM und möglicherweise den Krankheitsverlauf zu identifizieren, wurden die Antikörperreaktionen der untersuchten Kohorte ( $n = 101$ ) gegen ausgewählte immunogene EBV-Antigene jeweils einzeln untersucht. Im Mittelpunkt standen der zeitliche Verlauf der Antikörperantworten sowie deren Korrelation mit klinischen und laborchemischen Befunden der Patienten. Außerdem wurden die Antikörperantworten zu den drei Hauptuntersuchungszeitpunkten jeweils mit den in der Routinediagnostik bestimmten Entzündungsparametern CRP und Ferritin sowie der maximalen klinischen Graduierung der Patienten nach Abschluss ihrer Rekrutierung korreliert. So wurde analysiert, ob und wie stark die Antikörperantwort der Patienten in der Akutphase der Erkrankung (T0), einen Monat nach Symptombeginn (T1) und zum letzten Rekrutierungszeitpunkt (T5-T12) mit der maximalen Komplexität  $c_{\max}$  (c1-c18), dem Schweregrad  $s_{\max}$  (s1-s5) und der Protraktion  $p_{\max}$  (p0-p6) der Erkrankung korrelierte. Die angewandte Statistik ist im Methodenteil unter 4.6 beschrieben.

### 5.4.4.1 Anti-BBLF1-IgG

BBLF1 wird im lytischen Zyklus exprimiert und könnte als zytosolisches Protein eine wichtige Rolle bei der Virusreifung spielen (The UniProt Consortium 2019). Bei einzelnen Patienten ließen sich bereits unmittelbar nach Symptombeginn IgG-Antikörper gegen BBLF1 mit sehr niedrigen bis zu deutlich über dem *Cut-Off* liegenden Titern detektieren, die zu späteren Zeitpunkten zum Teil wieder rückläufig waren. Insgesamt zeigte sich aber ein positiver Zusammenhang zwischen den Tagen nach Symptombeginn und den anti-BBLF1-IgG-Titern ( $r_s = 0,515$ , Abbildung 5.11). Die Korrelation zwischen den anti-BBLF1-IgG- und CRP-Werten an T0 ergab einen schwach positiven Zusammenhang ( $r_s = 0,258$ , Abbildung 5.12a). Es gab keinen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen den anti-BBLF1-IgG- und CRP-Werten zu anderen Untersuchungszeitpunkten und auch die Korrelation mit den Ferritin-Werten zeigte keine Signifikanz (Daten nicht gezeigt). Die Korrelation der anti-BBLF1-IgG-Immunität mit der klinischen Graduierung ergab lediglich an T1 einen signifikant negativen Zusammenhang zwischen den einen Monat nach Symptombeginn gemessenen anti-BBLF1-IgG-Antikörpern und der Gesamtzahl pathologisch veränderter Parameter ( $c_{\max}$ ) der Patienten im Verlauf der Infektion ( $r_s = -0,252$ , Abbildung 5.12b). Zwischen der anti-BBLF1-IgG-Immunität und dem

# Ergebnisse

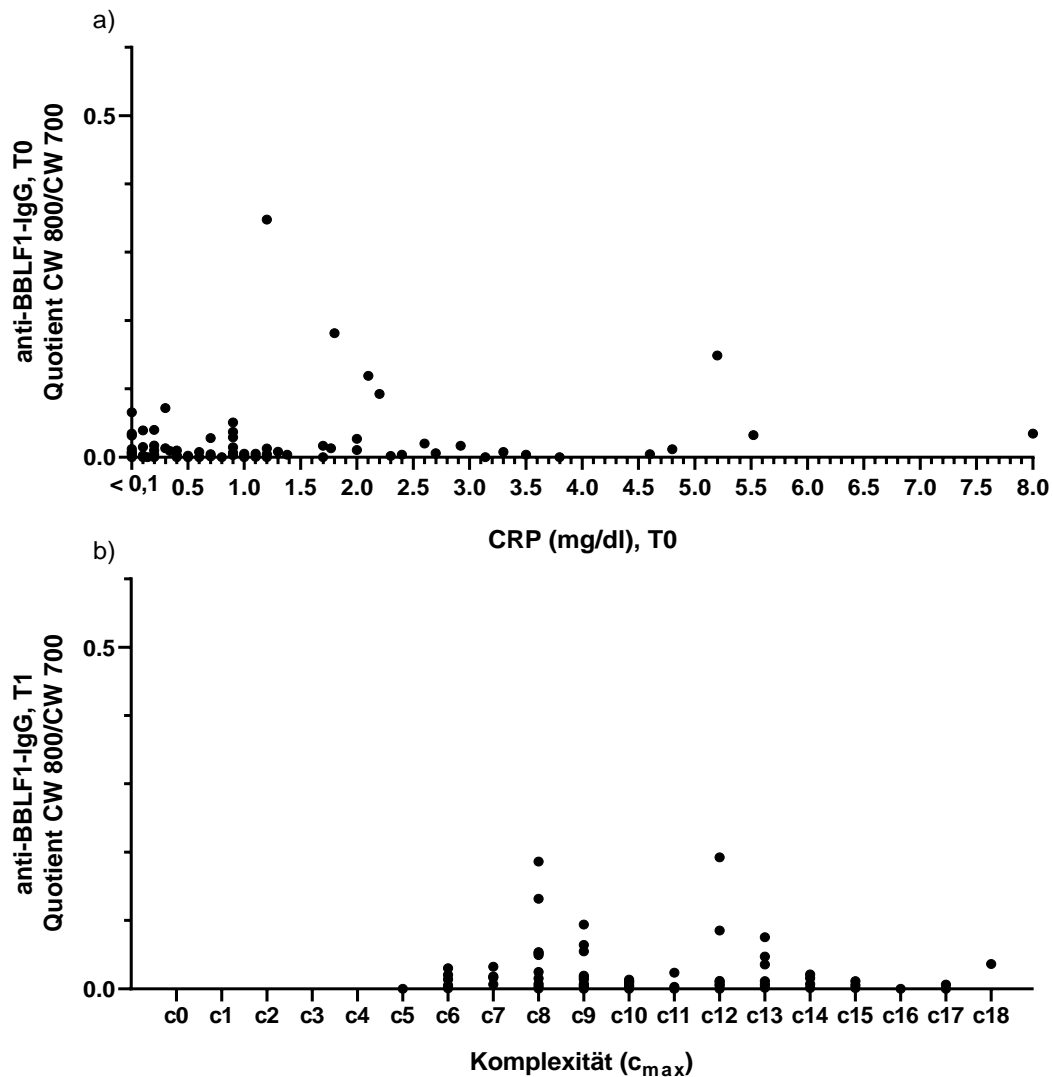
Schweregrad ( $s_{\max}$ ) sowie der Protraktion ( $p_{\max}$ ) der Erkrankung ergab sich ebenfalls kein Hinweis auf einen signifikanten Zusammenhang (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 5.11 Entwicklung einer anti-BBLF1-IgG-Immunität bereits ab Symptombeginn oder erst in der Rekonvaleszenz.**

In a) wurde die anti-BBLF1-IgG-Immunität der gesamten Kohorte mit den Tagen nach Symptombeginn korreliert,  $r_s = 0,515$  mit 95%-KI [0,418; 0,600]. Abbildung b) zeigt den individuellen Verlauf der IgG-Antikörper gegen das EBV-Antigen BBLF1. Die durchgezogenen Linien verbinden jeweils die anti-BBLF1-IgG-Antworten von einem IM-Patienten an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten, die gestrichelte Linie markiert den *Cut-Off*. Patienten ohne nachweisliche anti-BBLF1-IgG sind grau markiert. Die Immunantwort (CW 800) und BBLF1-Proteinmengen (CW 700) wurden im fluoreszenzbasierten Dot-Blot-Verfahren als *arbitrary fluorescence units* (AFU) quantifiziert und ins Verhältnis zueinander gesetzt.

# Ergebnisse



**Abbildung 5.12 Positive Korrelation zwischen anti-BBLF1-IgG-Titern und CRP-Werten sowie der Komplexität der IM im ersten Monat nach Symptombeginn.**

In a) sind die anti-BBLF1-IgG-Antikörper gegen den in der Routinediagnostik bestimmten Entzündungsparameter CRP zum Untersuchungszeitpunkt T0 (0-27 d) sowie in b) die anti-BBLF1-IgG-Antikörper an T1 (28-52 d) gegen die Anzahl pathologischer Befunde (Komplexität  $c_{max}$ ) im Gesamtverlauf der IM dargestellt. Es wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman mit 95 % Konfidenzintervall berechnet: a) CRP und anti-BBLF1-IgG an T0,  $r_s = 0,258$  [0,048; 0,445]; b)  $c_{max}$  und anti-BBLF1-IgG an T1,  $r_s = -0,252$  [-0,443; -0,040].

## 5.4.4.2 Anti-BBLF2/BBLF3-IgG

Die zeitliche Entwicklung der Antikörperproduktion war auch gegenüber dem frühen lytischen Antigen BBLF2/BBLF3, Bestandteil des DNA-Helikase/Primase-Komplexes, sehr individuell (The UniProt Consortium 2019). Während einige Patienten bereits unmittelbar nach Diagno-

## Ergebnisse

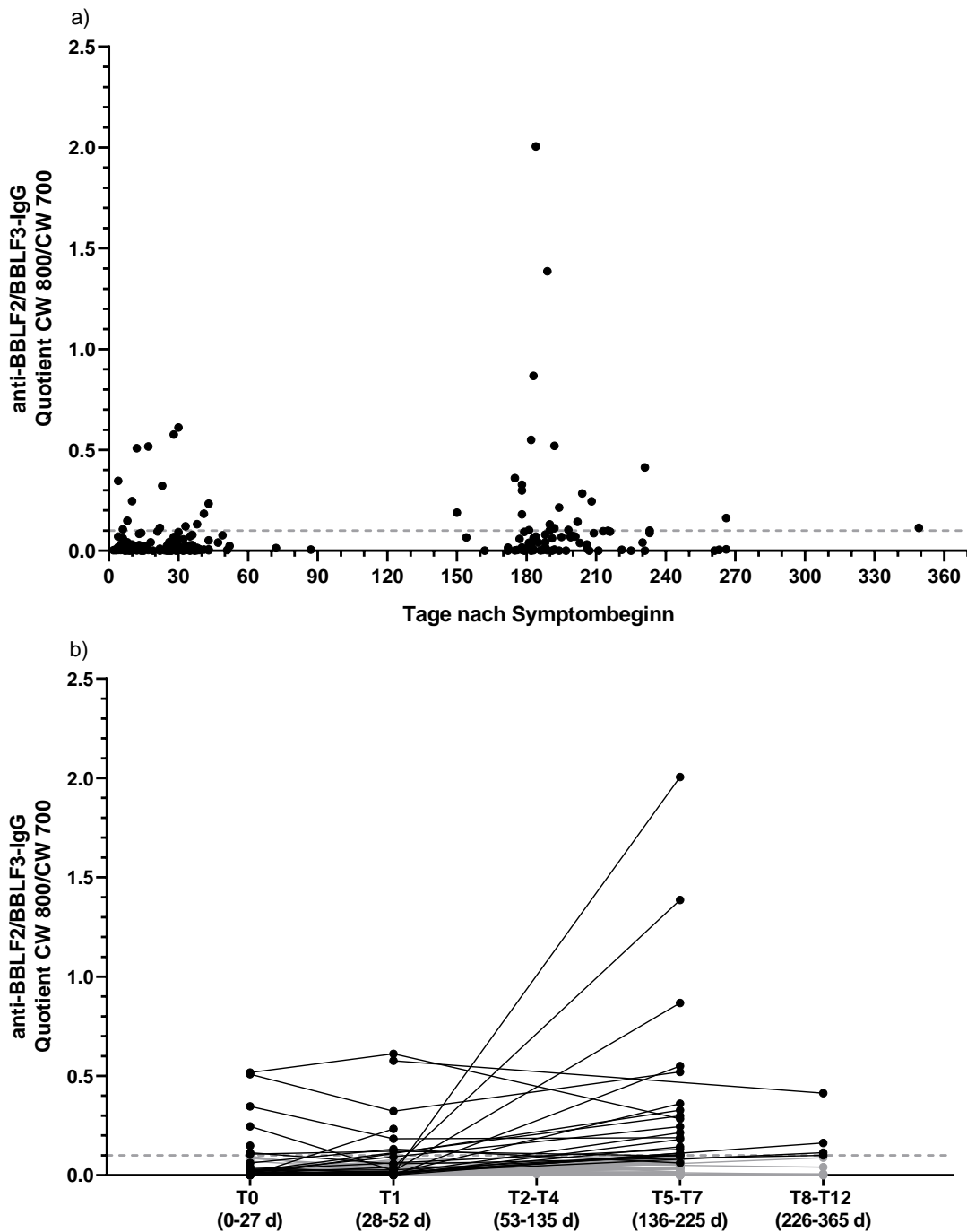
---

sestellung anti-BBLF2/BBLF3-IgG aufwiesen, deren Stärke im weiteren Krankheitsverlauf konstant blieb oder sogar geringfügig abnahm, konnten für die gesamte Kohorte steigende anti-BBLF2/BBLF3-IgG-Antworten vor allem in der Rekonvaleszenz der IM detektiert werden (Abbildung 5.13b). Diese Beobachtung kann durch die signifikant positive Korrelation zwischen der Zeit nach Krankheitsbeginn und den anti-BBLF2/BBLF3-IgG-Titern bestätigt werden ( $r_s = 0,207$ ; Abbildung 5.13a). Unabhängig vom Untersuchungszeitpunkt ergab sich kein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der anti-BBLF2/BBLF3-IgG-Immunität und den Entzündungsmarkern CRP und Ferritin sowie der maximalen Graduierung ( $c_{max}$ ,  $s_{max}$ ,  $p_{max}$ ) der IM-Erkrankungen (Daten nicht gezeigt).

### 5.4.4.3 Anti-BFRF3 (VCAp18)-IgG

BFRF3 (VCAp18) zählt zu den Viruskapsidantigenen (VCA) und ist an der Assemblierung reifer Viruspartikel beteiligt (The UniProt Consortium 2019). In der Routinediagnostik wird BFRF3 als Seromarker sowohl für eine akute als auch eine zurückliegende EBV-Infektion eingesetzt. Je nach verwendetem Test werden Serumantworten gegen den gesamten Viruskapsidkomplex oder gegen rekombinantes VCAp18 gemessen. Gegen das Volllängenprotein BFRF3 bildeten insgesamt 58 % (59/101) der IM-Patienten IgG-Antikörper. Etwa ein halbes Jahr nach EBV-Primärinfektion (T5-T12) zeigten 60 % (50/83) der Probanden eine positive Antikörperantwort gegen BFRF3 (Tabelle 5.4). Damit lag der Prozentsatz an anti-VCAp18-IgG-positiven Patienten deutlich unter den 98-100 %, die laut Literatur normalerweise nach EBV-Infektion erwartet werden (Bauer 2001; Hess 2004; Paschale und Clerici 2012). Ob diese Diskrepanz auf einer unterschiedlichen Sensitivität der Testmethoden oder unterschiedlichen Abnahmezeitpunkten nach Primärinfektion beruht, ist momentan noch unklar. Die Dynamik der anti-BFRF3-IgG-Antikörperantwort der analysierten IMMUC-Kohorte stimmte allerdings mit der in der Literatur beschriebenen VCA-IgG-Serokonversion nach EBV-Infektion überein (Hess 2004; Paschale und Clerici 2012). Anti-BFRF3-IgG konnten bei einigen Patienten bereits unmittelbar nach Krankheitsbeginn nachgewiesen werden, die Titer stiegen aber vor allem während der Rekonvaleszenz deutlich an, was sich in der positiven Korrelation zwischen den Tagen nach Symptombeginn und der Stärke der Serumantwort widerspiegelt ( $r_s = 0,403$ ; Abbildung 5.14). Allerdings war nur an T1 eine stärkere anti-BFRF3-IgG-Immunität tendenziell mit erhöhten Ferritin-Werten assoziiert ( $r_s = 0,230$ ; Abbildung 5.15). Ansonsten korrelierte die anti-BFRF3-IgG-Immunität weder mit den CRP-Werten zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten noch mit Komplexität ( $c_{max}$ ), Schweregrad ( $s_{max}$ ) oder Protraktion ( $p_{max}$ ) der IM (Daten nicht gezeigt).

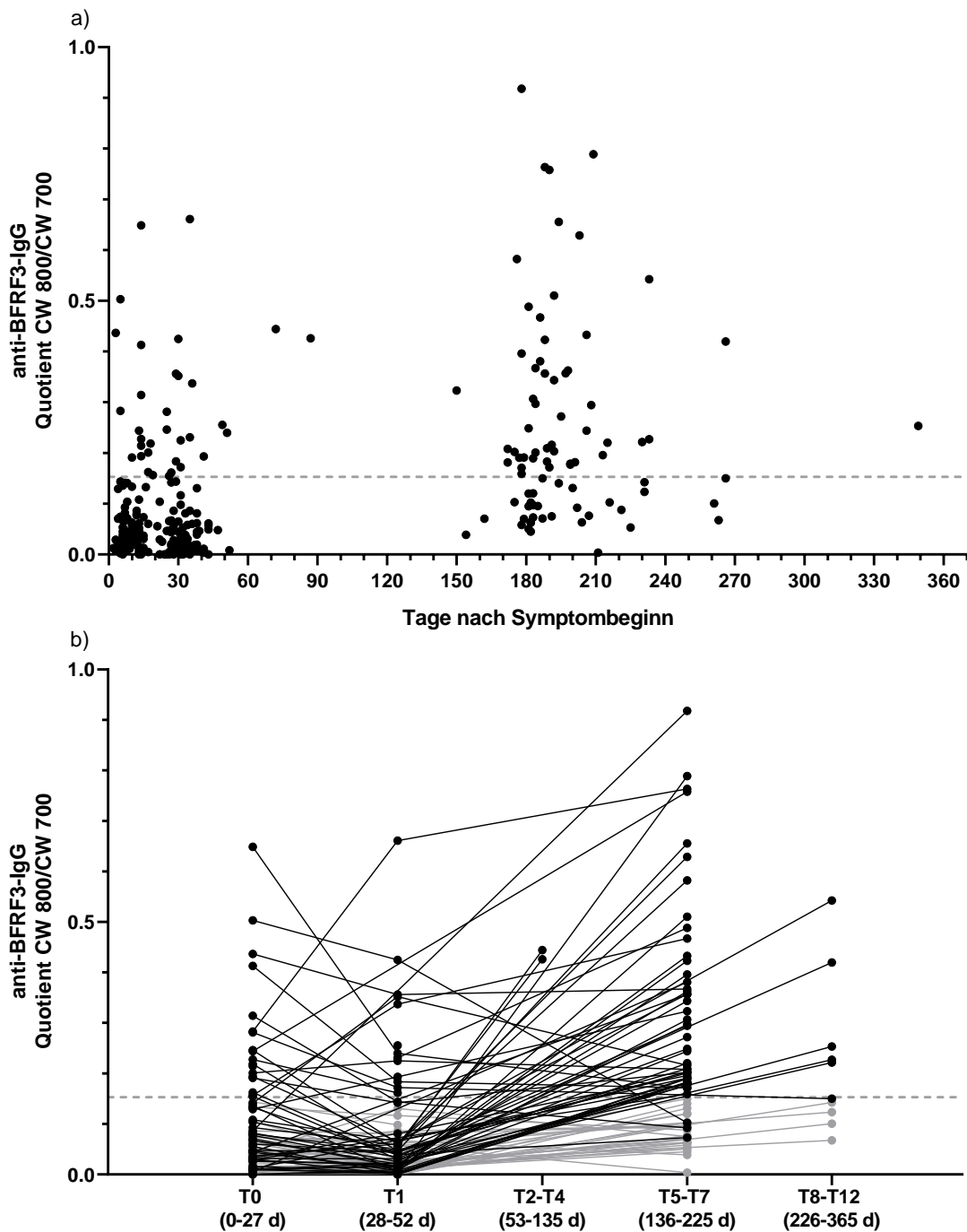
# Ergebnisse



**Abbildung 5.13 Korrelation der BBLF2/BBLF3-spezifischen IgG-Antwort mit der Rekonvaleszenz.**

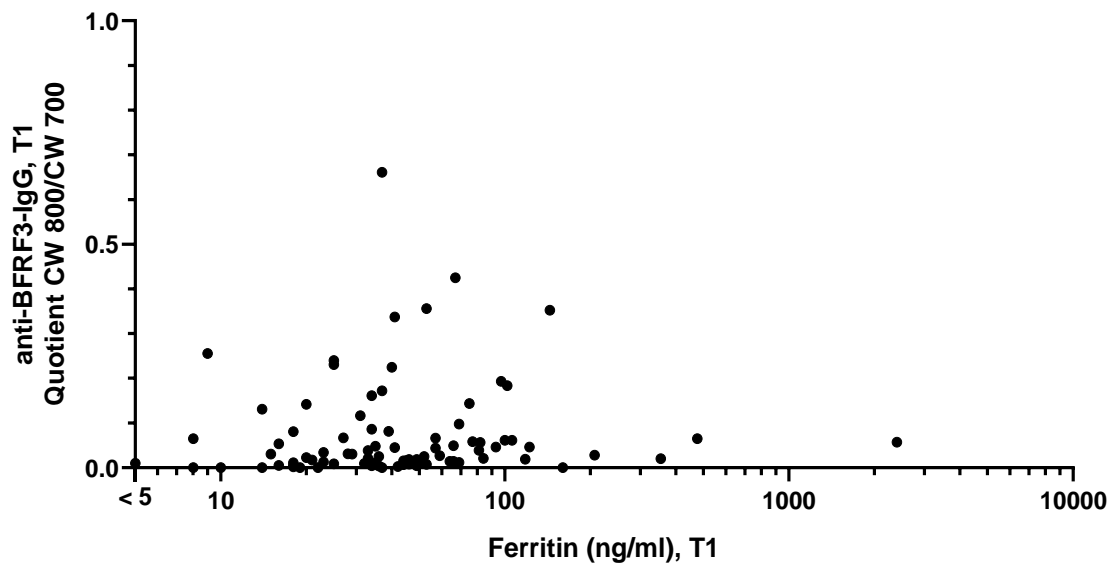
In a) wurde die anti-BBLF2/BBLF3-IgG-Immunantwort der gesamten Kohorte mit den Tagen nach Symptombeginn korreliert,  $r_s = 0,207$  mit 95%-KI [0,085; 0,322]. Abbildung b) zeigt den individuellen Verlauf der IgG-Antikörper gegen das EBV-Antigen BBLF2/BBLF3. Die durchgezogenen Linien verbinden jeweils die anti-BBLF2/BBLF3-IgG-Antworten von einem IM-Patienten an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten, die gestrichelte Linie markiert den *Cut-Off*. Patienten ohne nachweisliche anti-BBLF2/BBLF3-IgG sind grau markiert. Die Immunantwort (CW 800) und BBLF2/BBLF3-Proteinmengen (CW 700) wurden im fluoreszenzbasierten Dot-Blot-Verfahren als *arbitrary fluorescence units (AFU)* quantifiziert und ins Verhältnis zueinander gesetzt.

# Ergebnisse



**Abbildung 5.14 Anti-BFRF3 (VCAp18)-IgG-Serumantworten in der Mehrzahl der IM-Patienten früh nach Infektion nachweisbar und im Verlauf meist weiter ansteigend.**

In a) wurde die anti-BFRF3 (VCAp18)-IgG-Immunität der gesamten Kohorte mit den Tagen nach Symptombeginn korreliert,  $r_s = 0,403$  mit 95%-KI [0,294; 0,501]. Abbildung b) zeigt den individuellen Verlauf der IgG-Antikörper gegen das EBV-Antigen BFRF3. Die durchgezogenen Linien verbinden jeweils die anti-BFRF3-IgG-Antworten von einem IM-Patienten an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten, die gestrichelte Linie markiert den *Cut-Off*. Patienten ohne nachweisliche anti-BFRF3-IgG sind grau markiert. Die Immunantwort (CW 800) und BFRF3-Proteinmengen (CW 700) wurden im fluoreszenzbasierten Dot-Blot-Verfahren als *arbitrary fluorescence units (AFU)* quantifiziert und ins Verhältnis zueinander gesetzt.



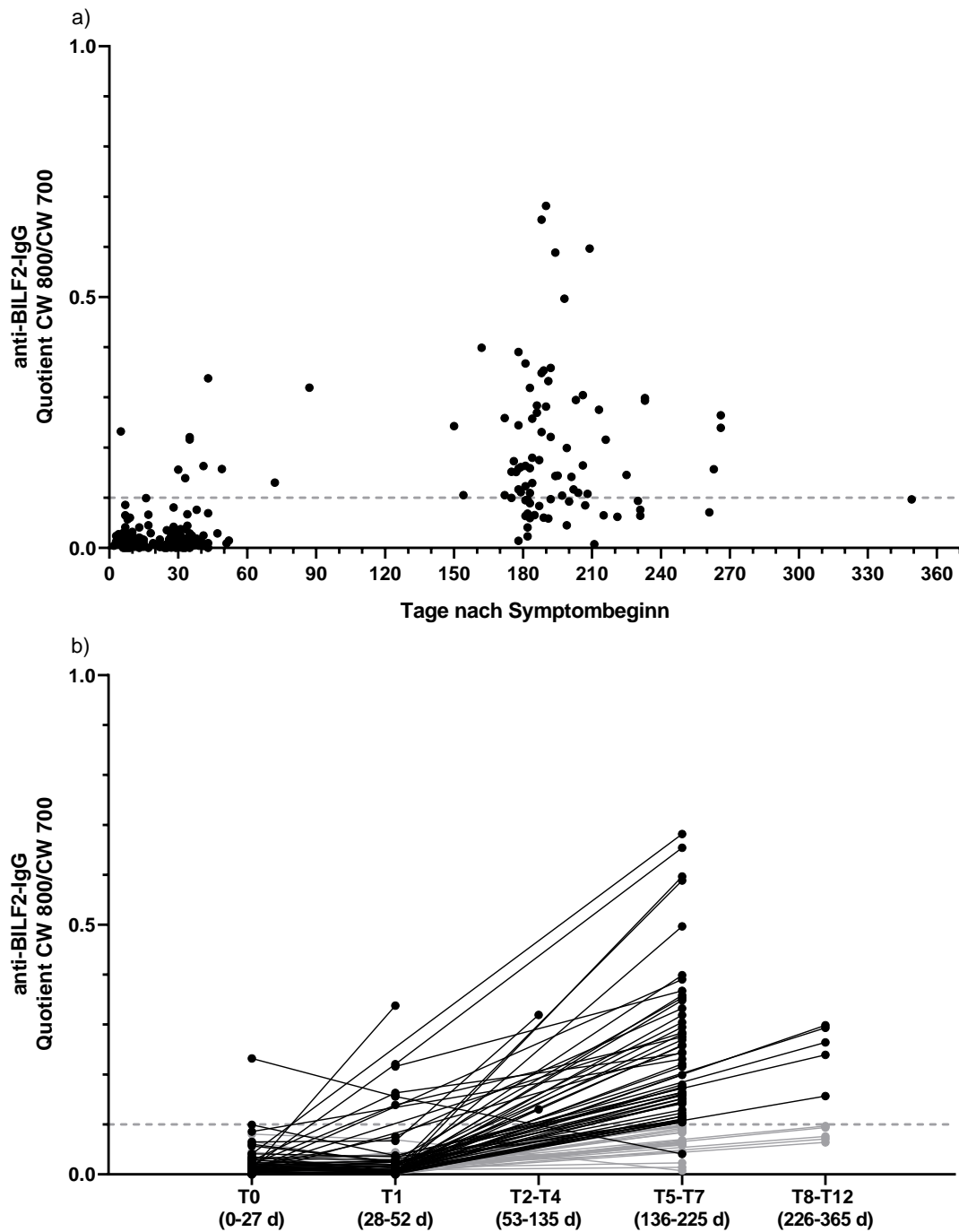
**Abbildung 5.15 Positiver Zusammenhang zwischen anti-BFRF3-IgG-Titern und Ferritin-Werten an T1.**

In der Abbildung sind die anti-BFRF3-IgG-Immunantworten gegen das in der Routinediagnostik bestimmte Akut-Phase-Protein Ferritin zum Untersuchungszeitpunkt T1 (28-52 d) aufgetragen. Es wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman mit 95 % Konfidenzintervall berechnet: Ferritin und anti-BFRF3-IgG an T1,  $r_s = 0,230$  [0,015; 0,424].

#### 5.4.4.4 Anti-BILF2-IgG

Das Membranglykoprotein BILF2 findet sich in der Virushülle sowie in der Membran infizierter Zellen und könnte, ähnlich wie andere Glykoproteine, die Bindung des Virus an noch nicht infizierte Zielzellen beeinflussen (Paschale und Clerici 2012). Anti-BILF2-IgG-Antikörper könnten somit Virus-neutralisierende Eigenschaften besitzen. Mehr als zwei Drittel aller IM-Patienten zeigten eine ausgeprägte anti-BILF2-IgG-Antikörperantwort ein halbes Jahr nach Diagnosestellung (Tabelle 5.4). Anders als gegen VCA bildeten sich anti-BILF2-Immunantworten später, mit Ausnahme eines Patienten (EP-A075) frühestens einen Monat nach Symptombeginn. Bis auf den kontinuierlichen Anstieg nach Symptombeginn ( $r_s = 0,611$ ; Abbildung 5.16) korrelierten die anti-BILF2-IgG-Titer weder mit den Entzündungsparametern CRP und Ferritin noch der Krankheitsschwere ( $c_{max}$ ,  $s_{max}$ ,  $p_{max}$ ) (Daten nicht gezeigt).

# Ergebnisse



**Abbildung 5.16 Kontinuierlicher Anstieg der anti-BILF2-IgG-Antikörperantworten in der Rekonvaleszenz.**

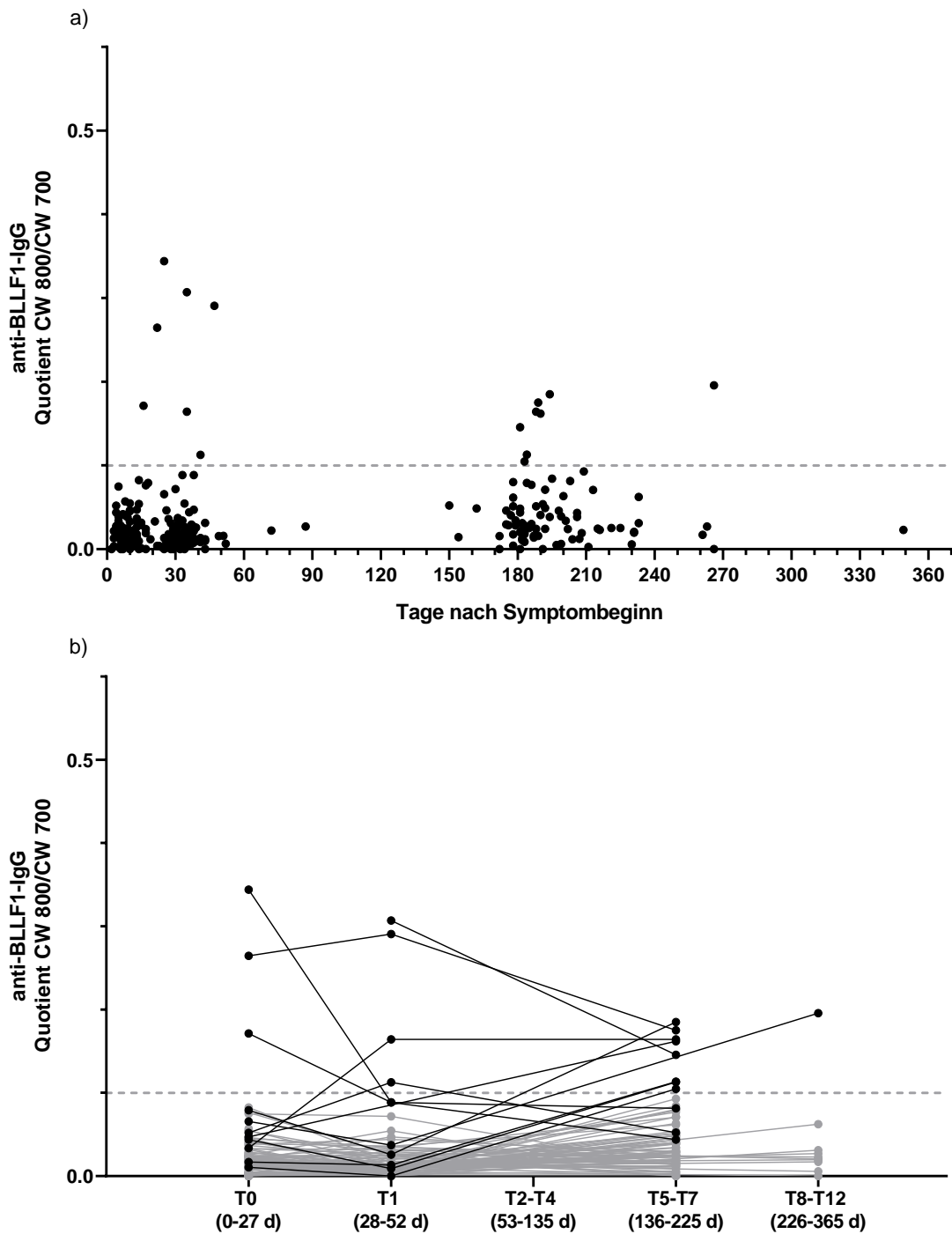
In a) wurde die anti-BILF2-IgG-Immunantwort der gesamten Kohorte mit den Tagen nach Symptombeginn korreliert,  $r_s = 0,611$  mit 95%-KI [0,527; 0,683]. Abbildung b) zeigt den individuellen Verlauf der IgG-Antikörper gegen das EBV-Antigen BILF2. Die durchgezogenen Linien verbinden jeweils die anti-BILF2-IgG-Antworten von einem IM-Patienten an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten, die gestrichelte Linie markiert den *Cut-Off*. Patienten ohne nachweisliche anti-BILF2-IgG sind grau markiert. Die Immunantwort (CW 800) und BILF2-Proteinmengen (CW 700) wurden im fluoreszenzbasierten Dot-Blot-Verfahren als *arbitrary fluorescence units (AFU)* quantifiziert und ins Verhältnis zueinander gesetzt.



### 5.4.4.5 Anti-BLLF1 (gp350)-IgG

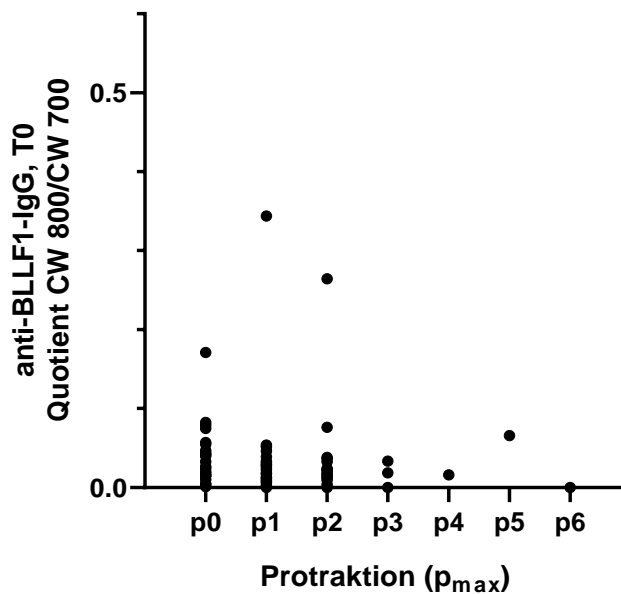
Das Membranglykoprotein BLLF1 (gp350) spielt eine zentrale Rolle bei der Infektion von B-Zellen, indem es an deren CD21-Oberflächenrezeptor bindet (Paschale und Clerici 2012). Neutralisierende Antikörper gegen dieses virale Hüllprotein sind deshalb Gegenstand vieler Studien. Innerhalb der untersuchten IMMUC-Kohorte wurden positive anti-BLLF1-IgG-Messwerte unmittelbar nach der Infektion und zum letzten Untersuchungszeitpunkt (T5-T7 oder T8-T12) detektiert. Dieser scheinbar doppelgipflige Verlauf der Antikörperproduktion wird allerdings durch die Tatsache relativiert, dass nur drei Patienten zum Zeitpunkt T0 eine verstärkte anti-BLLF1-IgG-Produktion aufwiesen, die in der Rekonvaleszenz der Erkrankung bei allen dreien rückläufig war und bei zwei sogar unter den *Cut-Off* sank (Abbildung 5.17b). Dass die Patienten im Krankheitsverlauf zunehmend anti-BLLF1-IgG bildeten, bestätigte sich in einer signifikant positiven Korrelation zwischen den Tagen nach Symptombeginn und der Stärke der Serumantwort ( $r_s = 0,222$ ; Abbildung 5.17a). Allerdings wurde an keinem der drei Hauptuntersuchungszeitpunkte eine Korrelation zwischen anti-BLLF1-IgG-Antworten und Entzündungsparametern, Komplexität ( $c_{max}$ ) und Schweregrad ( $s_{max}$ ) beobachtet (Daten nicht gezeigt). Jedoch zeigten Patienten mit einer kürzeren Symptombdauer höhere anti-BLLF1-IgG-Titer ( $r_s = -0,245$ ; Abbildung 5.18) an T0.

# Ergebnisse



**Abbildung 5.17** Langsamer Anstieg der anti-BLLF1-IgG-Antikörperantworten in der Rekonvaleszenz.

In a) wurde die anti-BLLF1 (gp350)-IgG-Immunantwort der gesamten Kohorte mit den Tagen nach Symptombeginn korreliert,  $r_s = 0,222$  mit 95%-KI [0,101; 0,336]. Abbildung b) zeigt den individuellen Verlauf der IgG-Antikörper gegen das EBV-Antigen BLLF1. Die durchgezogenen Linien verbinden jeweils die anti-BLLF1-IgG-Antworten von einem IM-Patienten an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten, die gestrichelte Linie markiert den *Cut-Off*. Patienten ohne nachweisliche anti-BLLF1-IgG sind grau markiert. Die Immunantwort (CW 800) und BLLF1-Proteinmengen (CW 700) wurden im fluoreszenzbasierten Dot-Blot-Verfahren als *arbitrary fluorescence units (AFU)* quantifiziert und ins Verhältnis zueinander gesetzt.



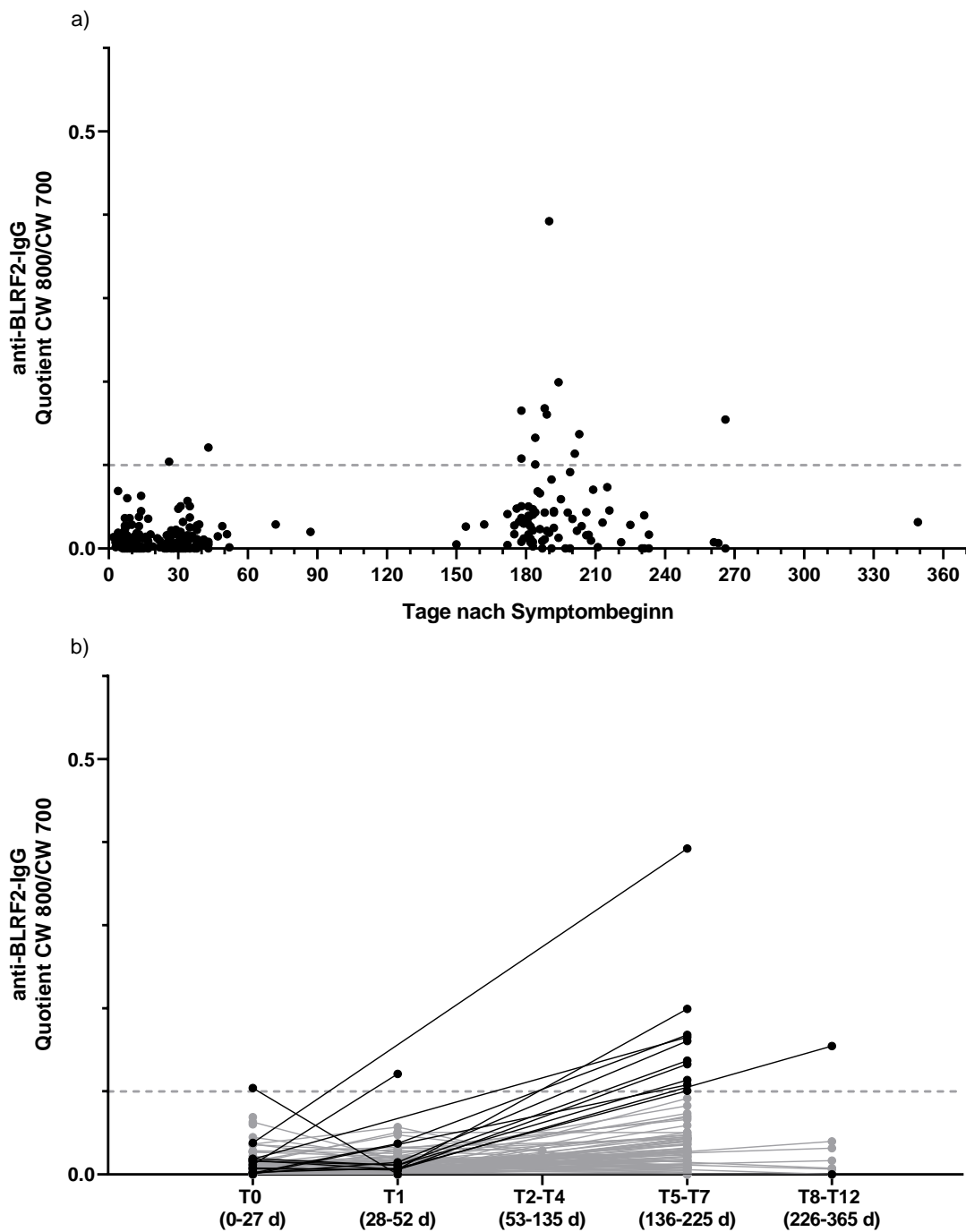
**Abbildung 5.18 Kürzere Symptombdauer ( $p_{max}$ ) von Patienten mit höheren BLLF1-spezifischen IgG-Immunantworten an T0.**

Dargestellt ist die IgG-Immunantwort gegen das Antigen BLLF1 (gp350) zum Untersuchungszeitpunkt T0 (0-27 d) in Zusammenhang mit der maximalen Protraktion ( $p_{max}$ ) im Verlauf der IM. Es wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman mit 95 % Konfidenzintervall berechnet:  $p_{max}$  und anti-BLLF1-IgG an T0,  $r_s = -0,245 [-0,434; -0,035]$ .

#### 5.4.4.6 Anti-BLRF2 (VCAp23)-IgG

Das Viruskapsidantigen BLRF2 (VCAp23), das bereits in kommerziellen Immunoblots eingesetzt wird, bestätigte sich auch bei den untersuchten IM-Patienten als immunogenes Protein. Die anti-BLRF2-IgG-Antikörperantworten nahmen im zeitlichen Verlauf zu ( $r_s = 0,361$ , Abbildung 5.19a). Allerdings überschritten nur knapp 13 % (11/83) der Patienten zum letzten Rekrutierungszeitpunkt (T5-T7 oder T8-T12) den *Cut-Off* (Tabelle 5.4). In anderen Studien wurden dagegen in 98 % der Fälle nach abgelaufener und in 74 % der Fälle bei akuter EBV-Infektion anti-VCAp23-IgG im Immunoblot detektiert (Bauer 2001). Diese Diskrepanz wird in der Diskussion nochmals aufgegriffen. Die anti-BLRF2-IgG-Titer der verschiedenen Untersuchungszeitpunkte ließen keine Rückschlüsse auf die Höhe der Entzündungsparameter und den Krankheitsverlauf ( $c_{max}$ ,  $s_{max}$ ,  $p_{max}$ ) zu (Daten nicht gezeigt), was möglicherweise auf die allgemein schwach ausgeprägte anti-BLRF2-IgG-Immunantwort in den vorliegenden Analysen zurückzuführen war.

# Ergebnisse



**Abbildung 5.19 Bildung von anti-BLRF2-IgG-Antikörpern während der Rekonvaleszenz der IM.**

In a) wurde die anti-BLRF2 (VCAp23)-IgG-Immunantwort der gesamten Kohorte mit den Tagen nach Symptombeginn korreliert,  $r_s = 0,361$  mit 95%-KI [0,249; 0,464]. Abbildung b) zeigt den individuellen Verlauf der IgG-Antikörper gegen das EBV-Antigen BLRF2. Die durchgezogenen Linien verbinden jeweils die anti-BLRF2-IgG-Antworten von einem IM-Patienten an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten, die gestrichelte Linie markiert den *Cut-Off*. Patienten ohne nachweisliche anti-BLRF2-IgG sind grau markiert. Die Immunantwort (CW 800) und BLRF2-Proteinmengen (CW 700) wurden im fluoreszenzbasierten Dot-Blot-Verfahren als *arbitrary fluorescence units (AFU)* quantifiziert und ins Verhältnis zueinander gesetzt.

# Ergebnisse

---

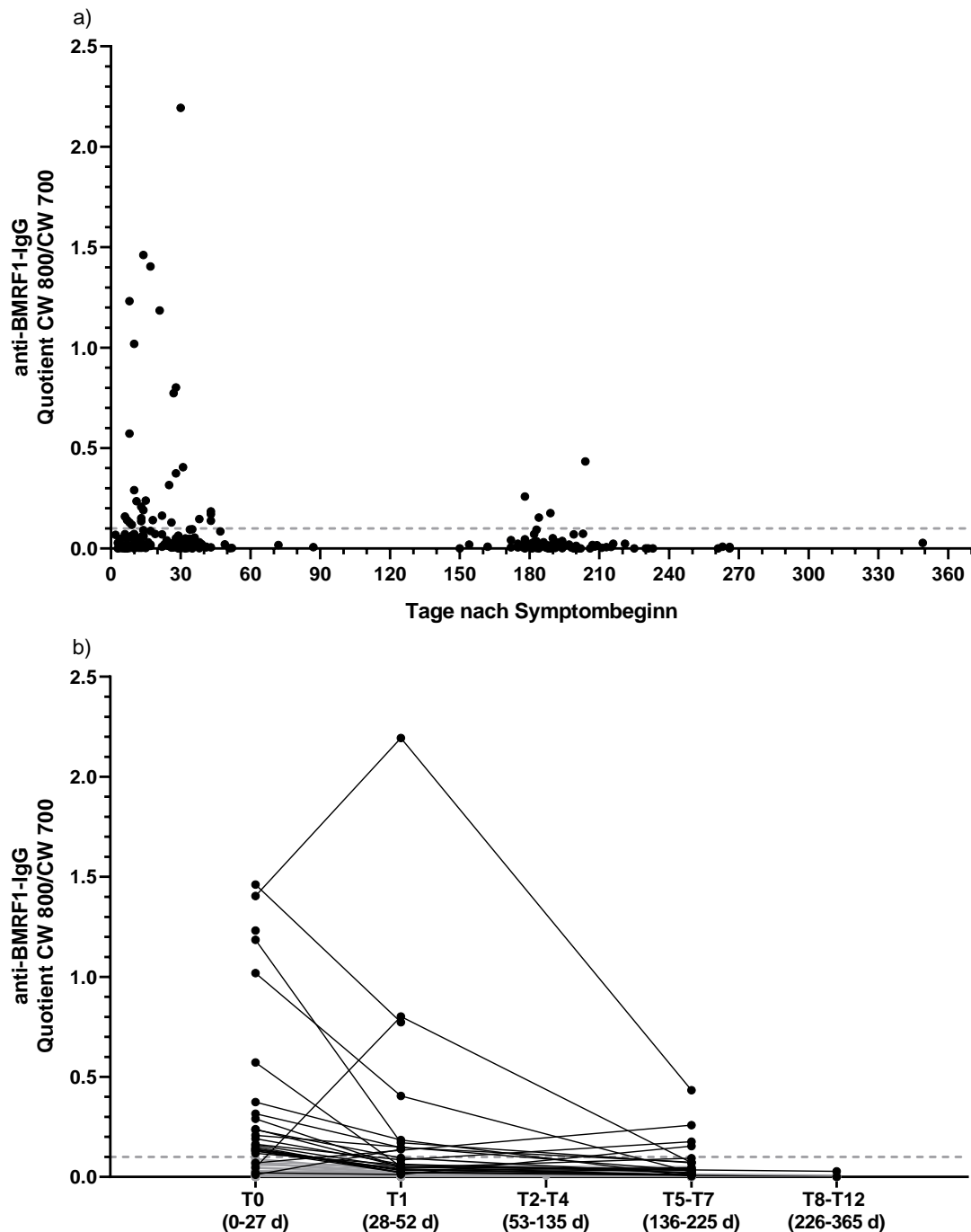
## 5.4.4.7 Anti-BMRF1 (EAp54)-IgG

BMRF1 (EAp54) zählt zu den frühen lytischen Antigenen. Im Vergleich zur Literatur, in der in etwa in der Hälfte aller frisch EBV-infizierten Spender anti-EAp54-IgG nachgewiesen wurden (Bauer 2001), zeigten insgesamt weniger IM-Patienten (20 %) anti-BMRF1-IgG an T0 (Tabelle 5.4). In diesen Fällen waren die anti-BMRF1-IgG-Antworten allerdings sehr hoch. Die anti-BMRF1-IgG Immunantwort wurde im Zeitverlauf schwächer, sodass nach Rekonvaleszenz nur noch wenige Patienten positiv waren ( $r_s = -0,177$ , Abbildung 5.20). Diese Ergebnisse finden sich auch bei Bauer et al., die im Immunoblot *recomBlot* (Microgen) nur noch bei 11 % der Seren nach überstandener Primärinfektion anti-EAp54-IgG detektierten (Bauer 2001). Die Korrelation zwischen den anti-BMRF1-IgG-Antworten und den CRP- bzw. Ferritin-Werten zu den drei unterschiedlichen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf ergab keine Signifikanz (Daten nicht gezeigt). Allerdings zeigten Patienten, deren Symptomausprägung als komplexer eingestuft wurde, eine stärkere anti-BMRF1-IgG-Immunantwort an T0 und T1 (T0:  $r_s = 0,232$ , T1:  $r_s = 0,242$ ; Abbildung 5.21a und b). Gleichzeitig bildeten diejenigen Patienten mit einer kürzeren Krankheitsdauer ( $p_{max}$ ) mehr anti-BMRF1-IgG in der Rekonvaleszenz der IM (T5-T12) als Patienten mit einer länger anhaltenden Symptomatik ( $r_s = -0,266$ , Abbildung 5.21c). Ob eine anti-BMRF1-IgG-Immunantwort somit für einen komplexeren, insgesamt aber kürzeren Krankheitsverlauf spricht oder ob die negative Korrelation zwischen der Antikörperantwort und der Protraktion der IM nur zufällig auf die insgesamt sehr schwachen Antworten am letzten Rekrutierungszeitpunkt zurückzuführen ist, muss weiter untersucht werden.

## 5.4.4.8 Anti-BRRF2-IgG

Laut Literatur weisen gesunde, EBV-positive Spender IgG-Antikörper gegen das virale Hüllprotein BRRF2 auf (Goswami et al. 2017; Liu et al. 2018; The UniProt Consortium 2019). In den Dot-Blot-Analysen wurden auch bei IM-Patienten IgG-Antworten gegen BRRF2 detektiert, die zudem mit der Dauer nach Symptombeginn korrelierten ( $r_s = 0,560$ , Abbildung 5.22). Da ein Patient bereits in der Akutphase der IM IgG-Antikörper gegen BRRF2 aufwies, scheinen Immunantworten gegen dieses Antigen auch schon vor der Rekonvaleszenz gebildet zu werden. Leider war von diesem Patienten kein Probenmaterial von späteren Zeitpunkten verfügbar, so dass die Kinetik der Antikörperantwort nicht beurteilt werden kann. Zwischen den anti-BRRF2-IgG-Antworten und den CRP- bzw. Ferritin-Werten konnte kein Hinweis auf einen Zusammenhang gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Allerdings korrelierte die anti-BRRF2-IgG-Immunantwort mit dem Krankheitsverlauf (Abbildung 5.23).

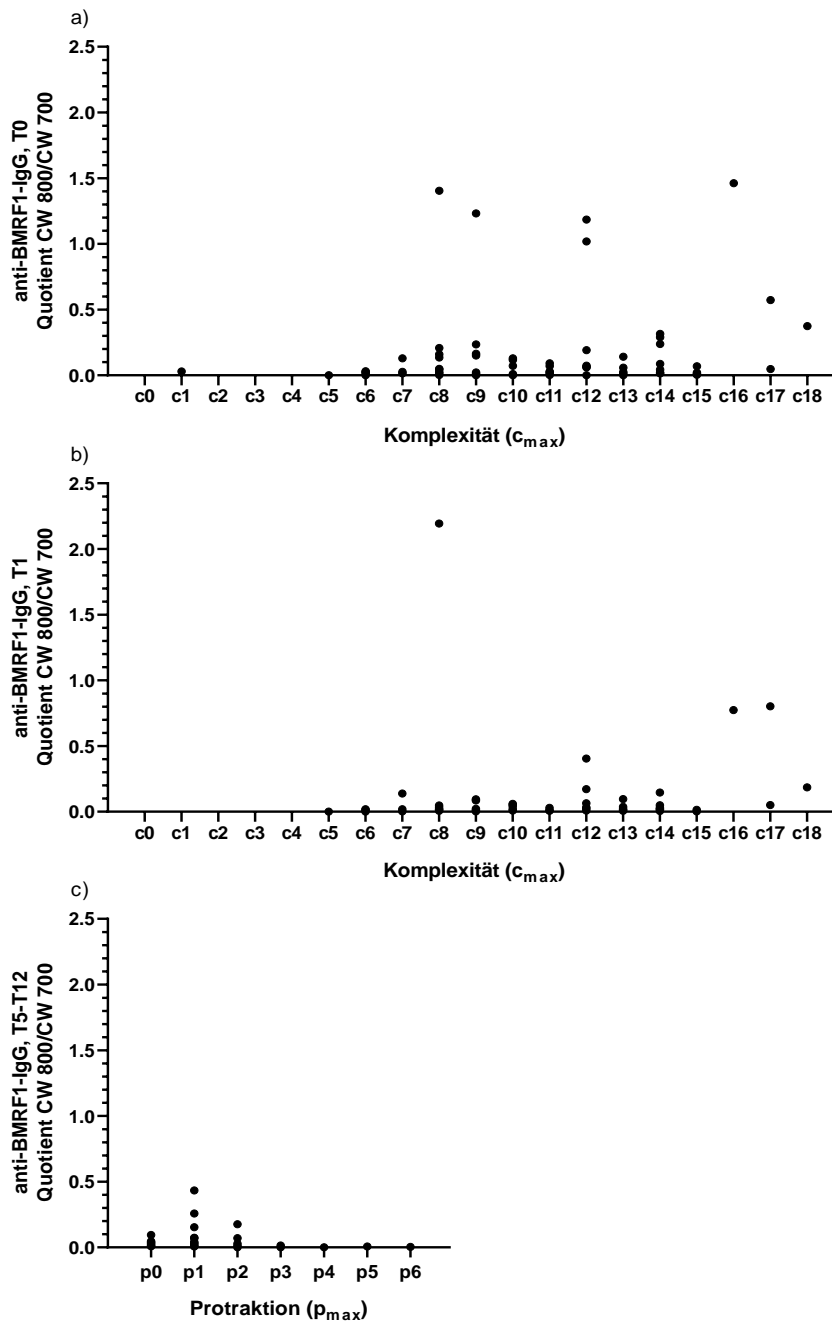
# Ergebnisse



**Abbildung 5.20 Bildung von anti-BMRF1-IgG-Antikörpern früh nach Infektion mit einer Abnahme im Verlauf der IM.**

In a) wurde die anti-BMRF1 (EAp54)-IgG-Immunität der gesamten Kohorte mit den Tagen nach Symptombeginn korreliert,  $r_s = -0,177$  mit 95%-KI  $[-0,294; -0,055]$ . Abbildung b) zeigt den individuellen Verlauf der IgG-Antikörper gegen das EBV-Antigen BMRF1. Die durchgezogenen Linien verbinden jeweils die anti-BMRF1-IgG-Antworten von einem IM-Patienten an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten, die gestrichelte Linie markiert den *Cut-Off*. Patienten ohne nachweisliche anti-BMRF1-IgG sind grau markiert. Die Immunantwort (CW 800) und BMRF1-Proteinmengen (CW 700) wurden im fluoreszenzbasierten Dot-Blot-Verfahren als *arbitrary fluorescence units* (AFU) quantifiziert und ins Verhältnis zueinander gesetzt.

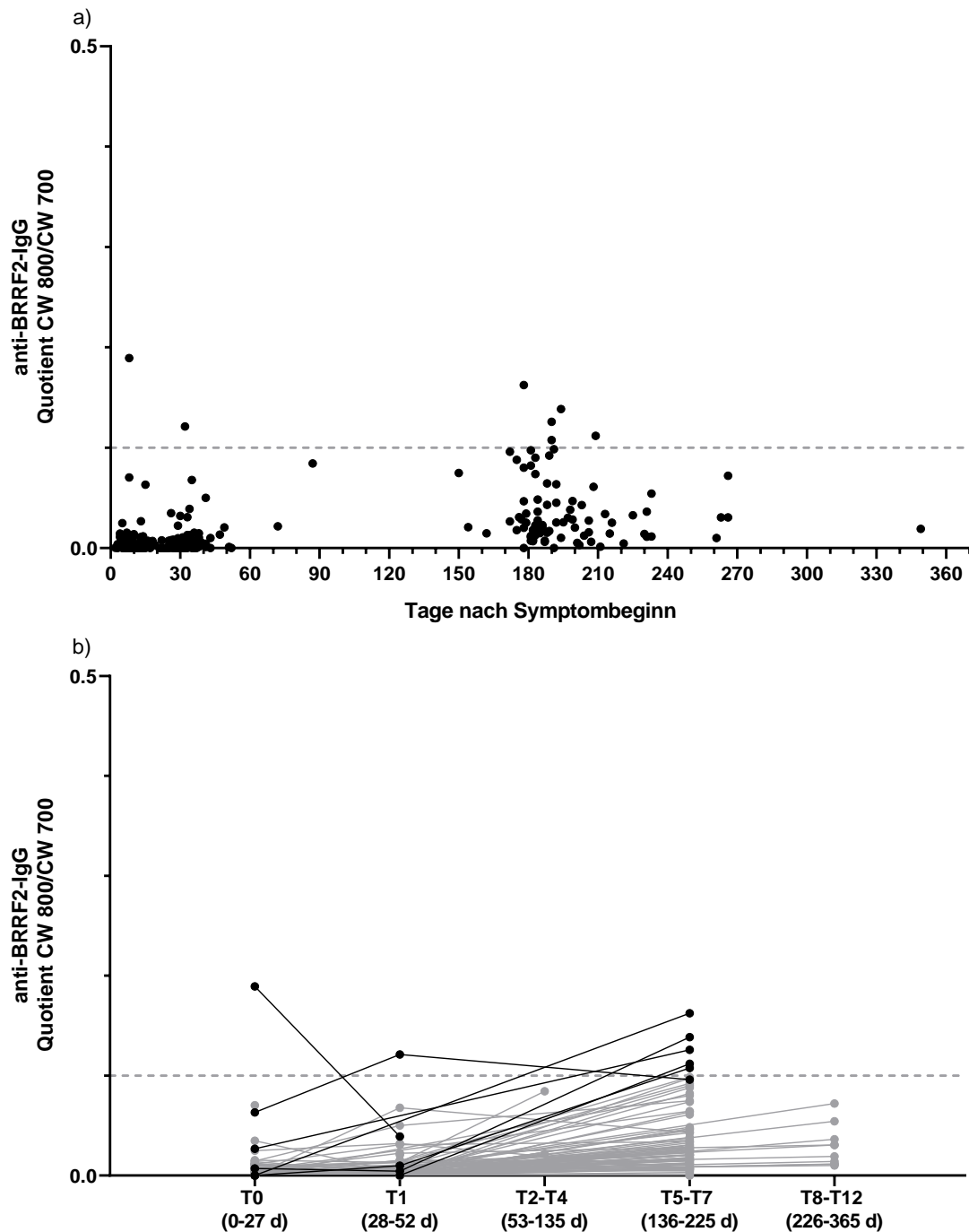
# Ergebnisse



**Abbildung 5.21 Korrelation zwischen der Stärke der anti-BMRF1-IgG-Antikörperantwort und der klinischen Graduierung der IM.**

Dargestellt ist die IgG-Immunantwort gegen das Antigen BMRF1 (EAp54) an den Zeitpunkten T0 (0-27 d) und T1 (28-52 d) in Zusammenhang mit der maximalen Anzahl pathologischer Befunde (Komplexität C<sub>max</sub>) sowie die anti-BMRF1-IgG-Titer am Zeitpunkt T5-T12 (136-365 d) mit der maximalen Protraktion der IM (p<sub>max</sub>). Es wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman mit 95 % Konfidenzintervall berechnet: a) C<sub>max</sub> und anti-BMRF1-IgG-Antwort an T0,  $r_s = 0,232$  [0,024; 0,421]; b) C<sub>max</sub> und anti-BMRF1-IgG-Antwort an T1,  $r_s = 0,242$  [0,029; 0,433]; c) p<sub>max</sub> und anti-BMRF1-IgG-Antwort an T5-T12,  $r_s = -0,266$  [-0,460; -0,046].

# Ergebnisse

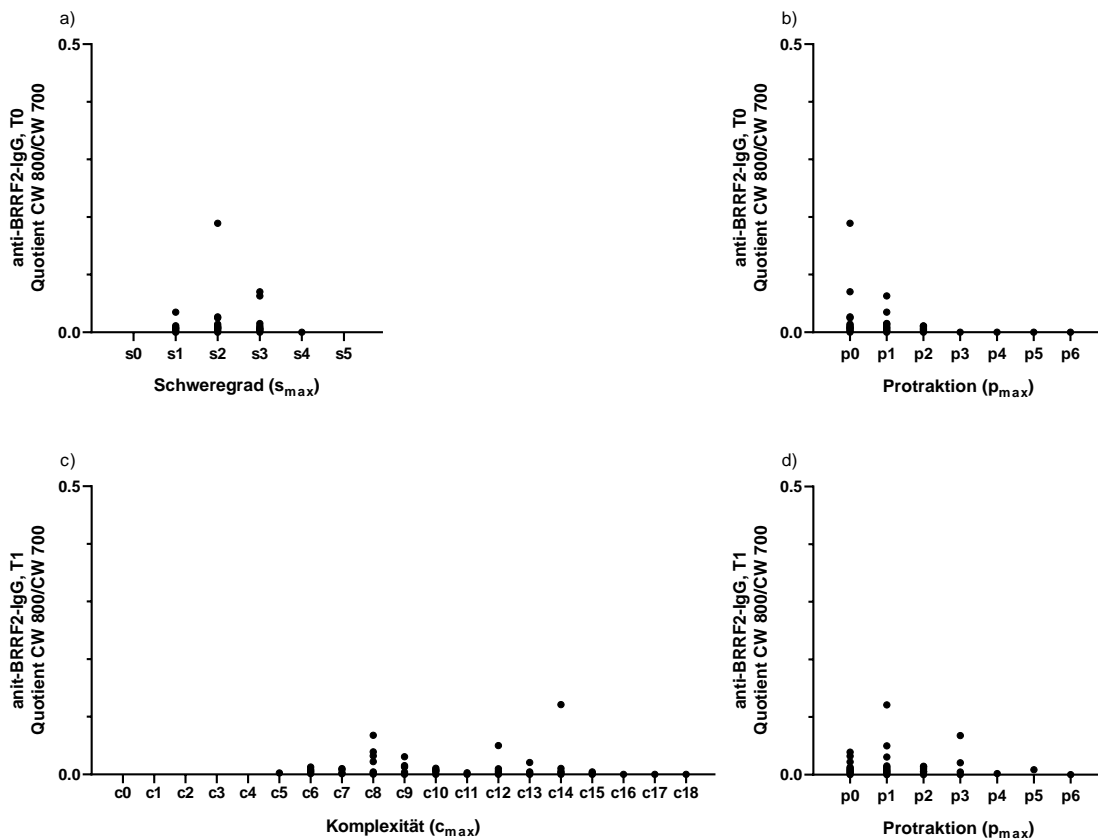


**Abbildung 5.22 Entwicklung einer schwachen anti-BRRF2-IgG-Antikörperantwort im Verlauf der IM.**

In a) wurde die anti-BRRF2-IgG-Immunantwort der gesamten Kohorte mit den Tagen nach Symptombeginn korreliert,  $r_s = 0,560$  mit 95%-KI [0,469; 0,639]. Abbildung b) zeigt den individuellen Verlauf der IgG-Antikörper gegen das EBV-Antigen BRRF2. Die durchgezogenen Linien verbinden jeweils die anti-BRRF2-IgG-Antworten von einem IM-Patienten an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten, die gestrichelte Linie markiert den *Cut-Off*. Patienten ohne nachweisliche anti-BRRF2-IgG sind grau markiert. Die Immunantwort (CW 800) und BRRF2-Proteinmengen (CW 700) wurden im fluoreszenzbasierten Dot-Blot-Verfahren als *arbitrary fluorescence units (AFU)* quantifiziert und ins Verhältnis zueinander gesetzt.



# Ergebnisse



**Abbildung 5.23 Korrelation der anti-BRRF2-IgG-Immunantwort mit dem Krankheitsverlauf.**

Dargestellt ist jeweils die IgG-Immunantwort gegen das Antigen BRRF2 in Korrelation mit der maximalen Symptomausprägung (Schweregrad  $s_{max}$ ), der Krankheitsprotraktion (Protraktion  $p_{max}$ ) und der Anzahl pathologischer Befunde (Komplexität  $c_{max}$ ) der IM-Patienten zum Untersuchungszeitpunkt T0 (0-27 d) und T1 (28-52 d). Es wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman mit 95 % Konfidenzintervall berechnet: a)  $s_{max}$  und anti-BRRF2-IgG-Antwort an T0,  $r_s = -0,231 [-0,421; -0,023]$ ; b)  $p_{max}$  und anti-BRRF2-IgG-Antwort an T0,  $r_s = -0,344 [-0,518; -0,143]$ ; c)  $c_{max}$  und anti-BRRF2-IgG-Antwort an T1,  $r_s = -0,222 [-0,416; -0,008]$ ; d)  $p_{max}$  und anti-BRRF2-IgG-Antwort an T1,  $r_s = -0,218 [-0,413; -0,004]$ .

Patienten mit höheren anti-BRRF2-IgG-Werten an T0 und T1 zeigten eine geringere Krankheitsprotraktion ( $p_{max}$ ) (T0:  $r_s = -0,344$ ; T1:  $r_s = -0,218$ ; Abbildung 5.23b und d). Der Schweregrad ( $s_{max}$ ) bzw. die Komplexität ( $c_{max}$ ) der Erkrankung korrelierte negativ mit den anti-BRRF2-IgG Antworten an T0 ( $r_s = -0,231$ , Abbildung 5.23a) bzw. mit den anti-BRRF2-IgG-Antworten an T1 ( $r_s = -0,222$ , Abbildung 5.23c).

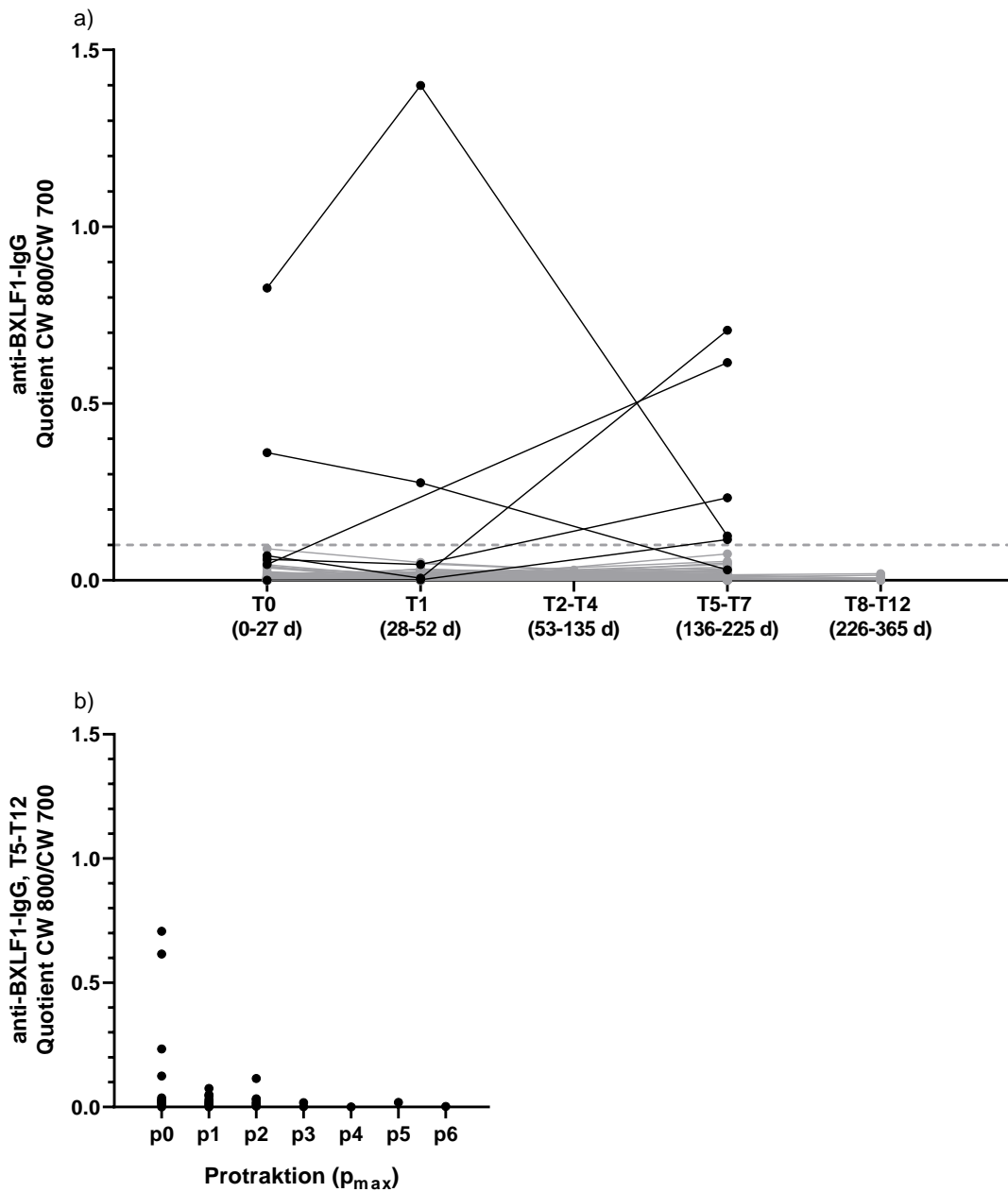
## 5.4.4.9 Anti-BXLF1-IgG

BXLF1 ist eine virale Thymidin-Kinase und an der viralen Replikation beteiligt (The UniProt Consortium 2019). Bisher ist dieses Antigen nicht Bestandteil kommerzieller Immunoassays. IgG-Antikörper gegen dieses Antigen traten in wenigen Patienten auf, in denen allerdings meist in hohen Titern. Zudem wurden zwei gegenläufige Verlaufsmuster beobachtet, bei einigen Patienten waren die Titer zum Diagnosezeitpunkt am höchsten und nahmen während der Rekonvaleszenz ab, bei anderen stiegen die Titer kontinuierlich im Krankheitsverlauf an (Abbildung 5.24a). Die Korrelation der anti-BXLF1-IgG-Antworten mit den Entzündungsparametern sowie dem Schweregrad ( $s_{max}$ ) und der Komplexität ( $c_{max}$ ) der IM lieferte zu keinem Untersuchungszeitpunkt ein signifikantes Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Interessant war allerdings, dass höhere anti-BXLF1-IgG-Titer in der Rekonvaleszenz mit einer geringen Protraktion ( $p_{max}$ ) der Erkrankung einhergingen ( $r_s = -0,253$ ; Abbildung 5.24b). Aufgrund der generell eher sporadischen anti-BXLF1-IgG-Serumantwort muss diese Aussage in weiteren Analysen verifiziert werden.

## 5.4.4.10 Anti-BZLF1-IgG

Das Protein BZLF1, ein sehr frühes lytisches Antigen, reguliert die Virus-Replikation, indem es kaskadenartig die Expression der viralen lytischen Proteine induziert. Antikörper gegen das Schlüsselprotein des lytischen Zyklus sind somit nicht nur im Rahmen der IM, sondern vor allem im Zusammenhang mit einer Virusreaktivierung von klinischer Relevanz (Paschale und Clerici 2012; The UniProt Consortium 2019). Insgesamt konnten bei 68 IM-Patienten (67 %) IgG-Antikörper gegen BZLF1 detektiert werden (Tabelle 5.4). Der zeitliche Verlauf war allerdings nicht einheitlich (Abbildung 5.25a), sodass kein Zusammenhang zwischen den Tagen ab Symptombeginn und den anti-BZLF1-IgG-Antworten hergestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Allerdings gingen einen Monat nach Symptombeginn höhere anti-BZLF1-IgG-Titer mit höheren CRP-Werten ( $r_s = 0,247$ ; Abbildung 5.25b) einher, eine Korrelation mit den Ferritin-Werten sowie der maximalen Graduierung ( $c_{max}$ ,  $s_{max}$ ,  $p_{max}$ ) der IM wurde an keinem Untersuchungszeitpunkt beobachtet (Daten nicht gezeigt).

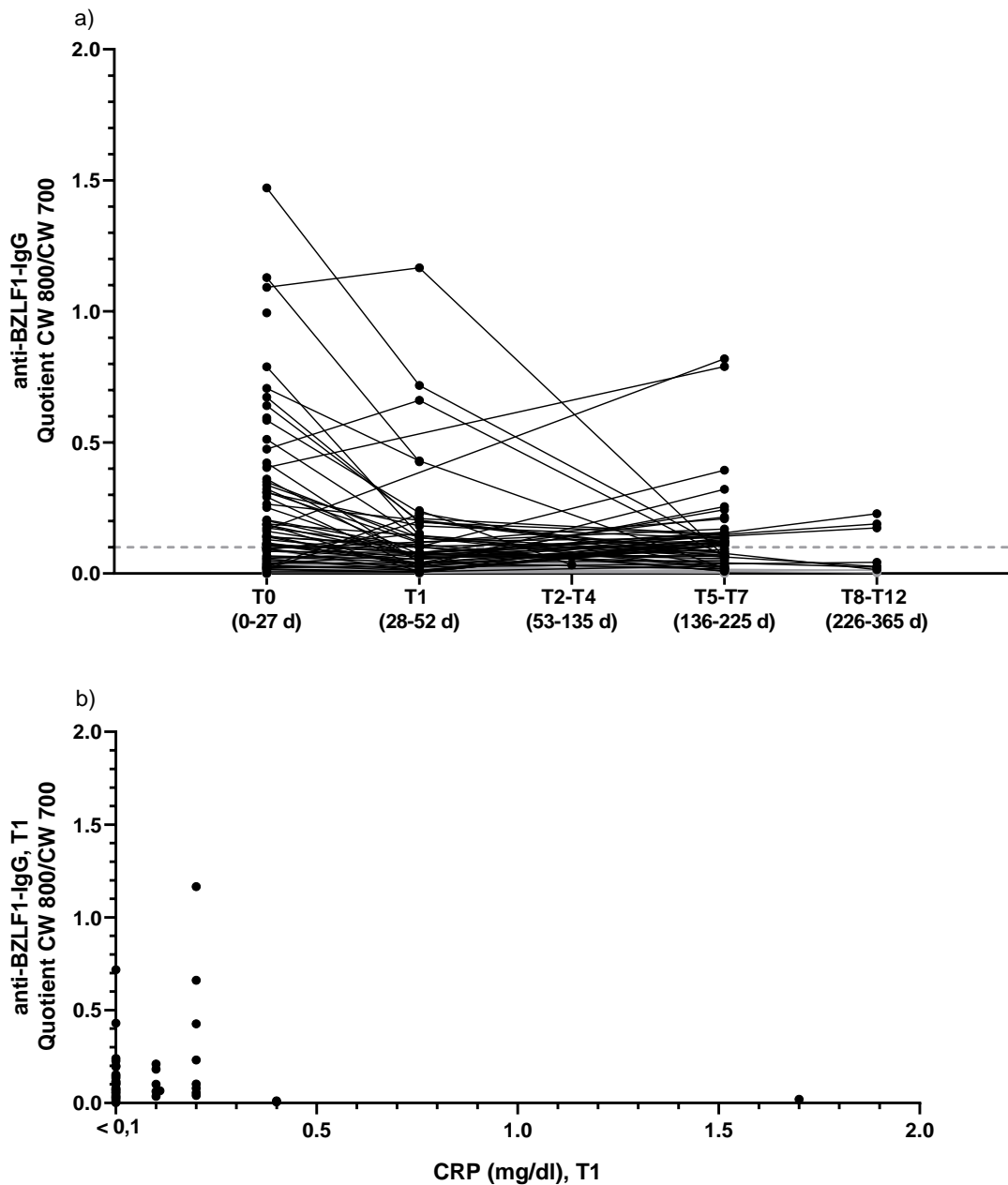
# Ergebnisse



**Abbildung 5.24 Hohe anti-BXLF1-IgG-Titer bei einzelnen Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Erkrankung.**

Abbildung a) zeigt den individuellen Verlauf der IgG-Antikörper gegen das EBV-Antigen BXLF1. Die durchgezogenen Linien verbinden jeweils die anti-BXLF1-IgG-Antworten von einem IM-Patienten an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten, die gestrichelte Linie markiert den *Cut-Off*. Patienten ohne nachweisliche anti-BXLF1-IgG sind grau markiert. In Abbildung b) sind die anti-BXLF1-IgG-Messwerte des letzten Kontrolltermins (T5-T12) gegen die Protraktion ( $p_{max}$ ) der IM aufgetragen. Es wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman mit 95 % Konfidenzintervall berechnet:  $r_s = -0,253 [-0,450; -0,033]$ . Die Immunantwort (CW 800) und BXLF1-Proteinmengen (CW 700) wurden im fluoreszenzbasierten Dot-Blot-Verfahren als *arbitrary fluorescence units* (AFU) quantifiziert und ins Verhältnis zueinander gesetzt.

# Ergebnisse



**Abbildung 5.25 Heterogene Verläufe der IgG-Antikörperantworten gegen BZLF1 bei IM-Patienten und Korrelation mit erhöhten CRP-Werten an T1.**

Abbildung a) zeigt den individuellen Verlauf der IgG-Antikörper gegen das EBV-Antigen BZLF1 (IEA). Die durchgezogenen Linien verbinden jeweils die anti-BZLF1-IgG-Antworten von einem IM-Patienten an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten, die gestrichelte Linie markiert den *Cut-Off*. Patienten ohne nachweisliche anti-BZLF1-IgG sind grau markiert. In Abbildung b) sind die einen Monat nach Symptombeginn gemessenen anti-BZLF1-IgG-Titer gegen die CRP-Werte aufgetragen. Es wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman mit 95 % Konfidenzintervall berechnet:  $r_s = 0,247 [0,035; 0,438]$ . Die Immunantwort (CW 800) und BZLF1-Proteinmengen (CW 700) wurden im fluoreszenzbasierten Dot-Blot-Verfahren als *arbitrary fluorescence units (AFU)* quantifiziert und ins Verhältnis zueinander gesetzt.

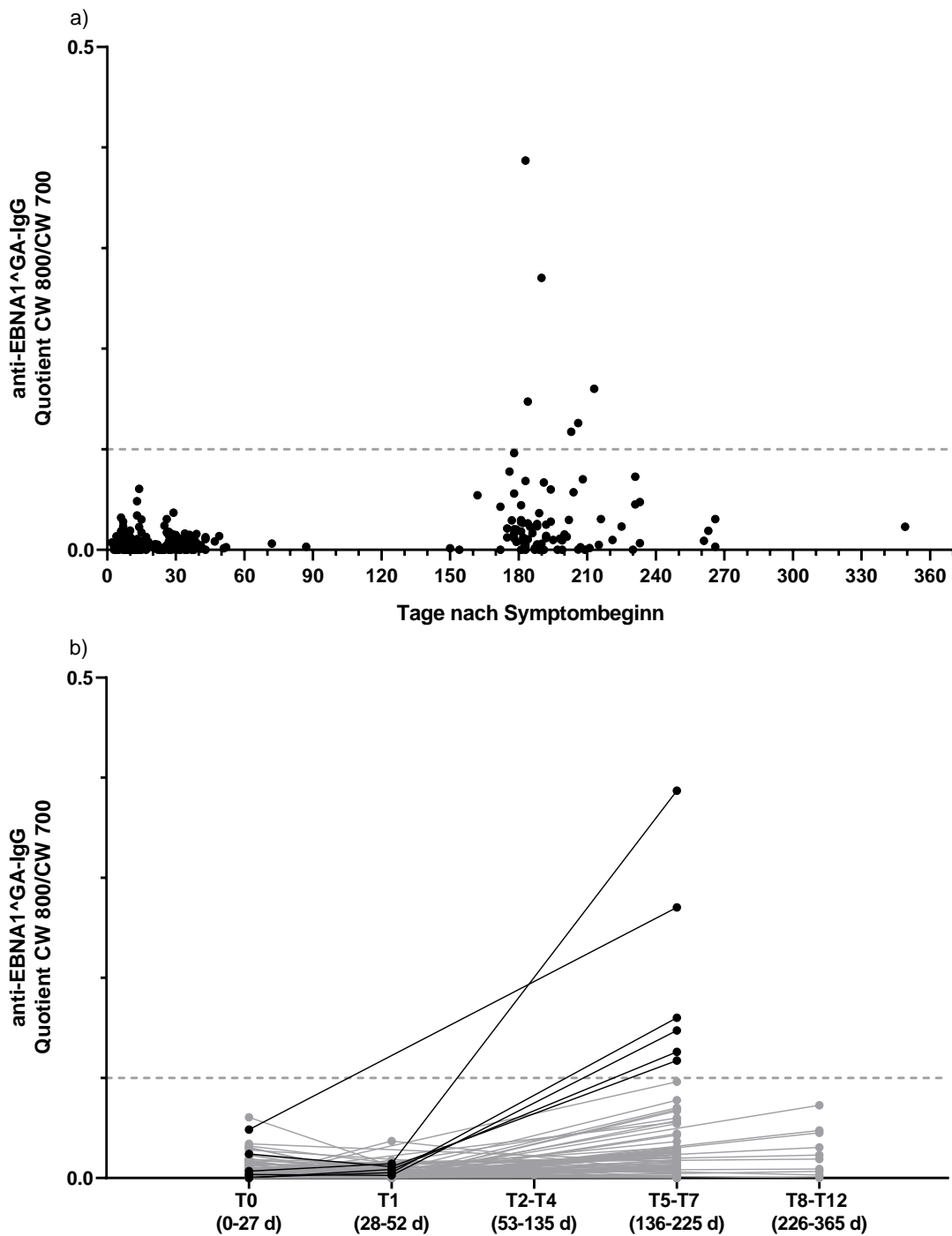
### 5.4.4.11 Anti-EBNA1<sup>GA</sup>-IgG

Die humorale Immunantwort gegen das Latenzprotein EBNA1 ist seit Jahrzehnten Gegenstand vieler Studien, was in seiner biologischen und diagnostischen Bedeutung begründet ist. Als Transkriptionsfaktor bindet EBNA1 an die episomal vorliegende, virale DNA und vermittelt die Replikation des viralen Genoms in latent infizierten Zellen (Paschale und Clerici 2012; The UniProt Consortium 2019). Die Proteinsequenz von EBNA1 enthält eine Glycin-Alanin (GA)-Wiederholungssequenz, die eine Erkennung und Degradation des Proteins durch das Proteasom verhindert (Middeldorp 2015). Diese AS-Sequenz fehlte dem im Dot-Blot eingesetzten Protein EBNA1<sup>GA</sup>. Da anti-EBNA1-IgG-Antikörper erst Wochen nach der Primärinfektion detektiert werden, kann bei einem positiven Nachweis eine frische Infektion ausgeschlossen werden. Eine negative anti-EBNA1-IgG-Antwort bei nachgewiesener EBV-Infektion spricht allerdings nicht automatisch für eine frische Infektion, da 5 % aller EBV-Infizierten keine Antikörper gegen dieses Latenzantigen bilden oder die Titer im Rahmen einer Immunsuppression oder einer Virusreaktivierung unter die Detektionsgrenze absinken können (Bauer 2001; Hess 2004; Paschale und Clerici 2012). Der zeitliche Verlauf der im Dot-Blot detektierten anti-EBNA1<sup>GA</sup>-IgG-Antworten der untersuchten Patienten bestätigte die Beobachtungen aus der Literatur, wonach anti-EBNA1-IgG-Immunantworten erst einige Monate nach Primärinfektion auftraten ( $r_s = 0,314$ ; Abbildung 5.26). Damit war die bereits an T0 im ELISA der Routinediagnostik nachgewiesene positive anti-EBNA1-IgG-Antwort zweier Patienten weder im Dot-Blot noch im Immunoblot reproduzierbar. Dass im Dot-Blot nur 7 % (6/83) der IM-Patienten IgG-Antikörper gegen EBNA1<sup>GA</sup> in der Rekonvaleszenz zeigten, widerspricht der wesentlich höheren EBNA1-Serokonversionsrate in den bisherigen Studien. Die anti-EBNA1<sup>GA</sup>-IgG-Immunantwort korrelierte nicht mit den Entzündungsparametern der Patienten sowie der Komplexität, dem Schweregrad und der Protraktion der IM (Daten nicht gezeigt).

### 5.4.4.12 Anti-EBNA2-IgG

Das Latenzprotein EBNA2 spielt eine entscheidende Rolle bei der Transformation infizierter B-Lymphozyten. Als viraler Transkriptionsfaktor vermittelt es nicht nur die Expression anderer Latenzgene (EBNA1-6, LMP1, LMP2), sondern auch die Transkription des CD21, CD23 und c-myc Gens der Wirtszelle, was in einer verstärkten Proliferation und Immortalisation resultiert (Bauer 2001; Paschale und Clerici 2012; The UniProt Consortium 2019). Bei den untersuchten IM-Patienten erwies sich EBNA2 als sehr immunogenes Antigen.

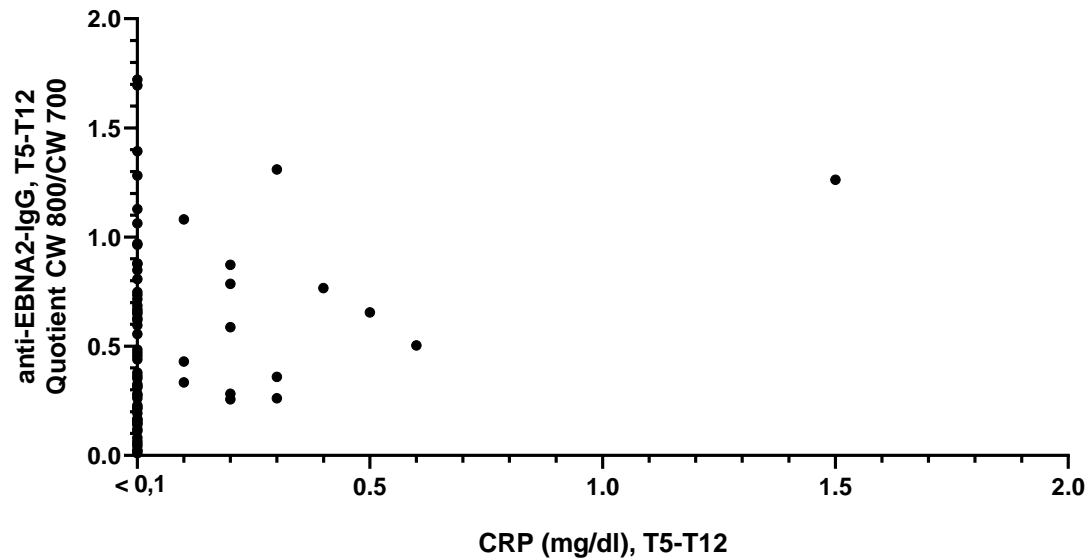
# Ergebnisse



**Abbildung 5.26 Nachweis von IgG-Antikörpern gegen das Latenzantigen EBNA1<sup>GA</sup> erst Monate nach Primärinfektion.**

In a) wurde die anti-EBNA1<sup>GA</sup>-IgG-Immunität der gesamten Kohorte mit den Tagen nach Symptombeginn korreliert,  $r_s = 0,314$  mit 95%-KI [0,198; 0,421]. Abbildung b) zeigt den individuellen Verlauf der IgG-Antikörper gegen das EBV-Antigen EBNA1<sup>GA</sup>. Die durchgezogenen Linien verbinden jeweils die anti-EBNA1<sup>GA</sup>-IgG-Antworten von einem IM-Patienten an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten, die gestrichelte Linie markiert den *Cut-Off*. Patienten ohne nachweisliche anti-EBNA1<sup>GA</sup>-IgG sind grau markiert. Die Immunantwort (CW 800) und EBNA1<sup>GA</sup>-Proteinmengen (CW 700) wurden im fluoreszenzbasierten Dot-Blot-Verfahren als *arbitrary fluorescence units (AFU)* quantifiziert und ins Verhältnis zueinander gesetzt.

## Ergebnisse

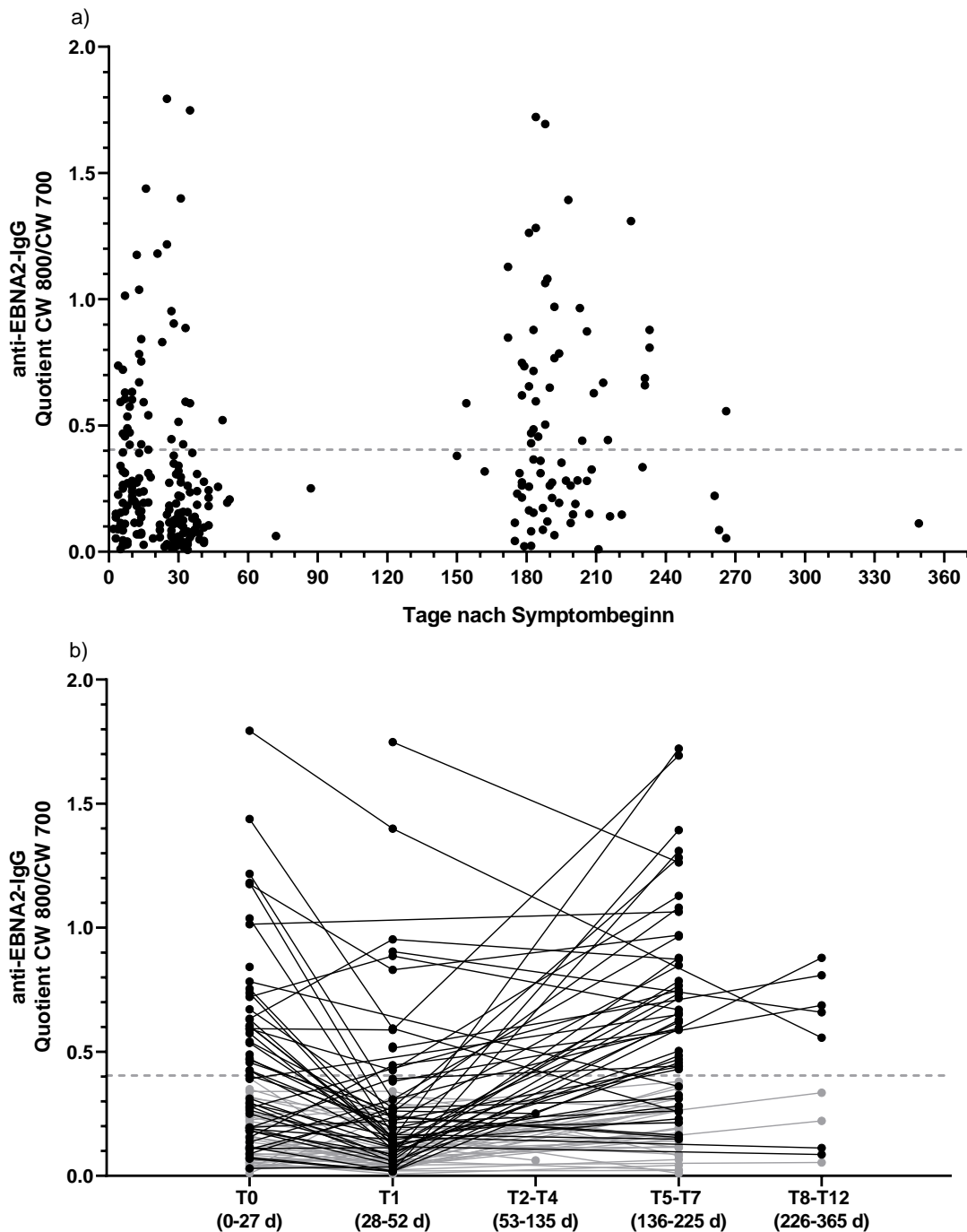


**Abbildung 5.27 Positive Korrelation zwischen anti-EBNA2-IgG-Titern und CRP-Werten mindestens ein halbes Jahr nach primärer EBV-Infektion.**

In der Abbildung sind die anti-EBNA2-IgG-Antikörper gegen den in der Routinediagnostik bestimmten Entzündungsparameter CRP zum finalen Untersuchungszeitpunkt T5-T12 (136-365 d) aufgetragen. Es wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman mit 95 % Konfidenzintervall berechnet: CRP und anti-EBNA2-IgG an T5-T12,  $r_s = 0,262$  [0,043; 0,457].

Im Gegensatz zum Latenzprotein EBNA1<sup>GA</sup>, dessen Antikörperantworten seltener, schwächer und auch erst zu einem späteren Zeitpunkt messbar waren, konnten bei über der Hälfte aller Patienten (58/101) mindestens einmal in der Rekrutierungsphase anti-EBNA2-IgG gemessen werden. Frühere Studien wiesen bereits vereinzelt auf eine mögliche anti-EBNA2-IgG-Antikörperproduktion in der Frühphase der IM hin. So waren anti-EBNA2-IgG-Antikörper in bis zu 30 % der Fälle und damit seltener als bei der hier untersuchten Kohorte nachweisbar (Bauer 2001; Paschale und Clerici 2012). Ähnlich wie beim Antigen BLLF1 konnte ein biphasischer Titerverlauf mit hohen Werten an T0, einem Abfall an T1 und einem erneuten starken Anstieg in der Rekonvaleszenz beobachtet werden. Aufgrund dieser V-förmigen Kinetik korrelierte die Höhe der anti-EBNA2-IgG-Antikörperantwort nur schwach mit den Tagen nach Symptombeginn ( $r_s = 0,153$ ; Abbildung 5.28). Die Höhe der anti-EBNA2-IgG-Titer in den unterschiedlichen Phasen der IM ließ keine Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf ( $c_{max}$ ,  $s_{max}$ ,  $p_{max}$ ) zu (Daten nicht gezeigt). Allerdings gab es einen positiven Zusammenhang zwischen den CRP-Werten und den anti-EBNA2-IgG-Antworten in der Rekonvaleszenz ( $r_s = 0,262$ ; Abbildung 5.27).

# Ergebnisse



**Abbildung 5.28 Anti-EBNA2-IgG-Antworten bereits ab Beginn der IM bis zur Rekonvaleszenz nachweisbar.**

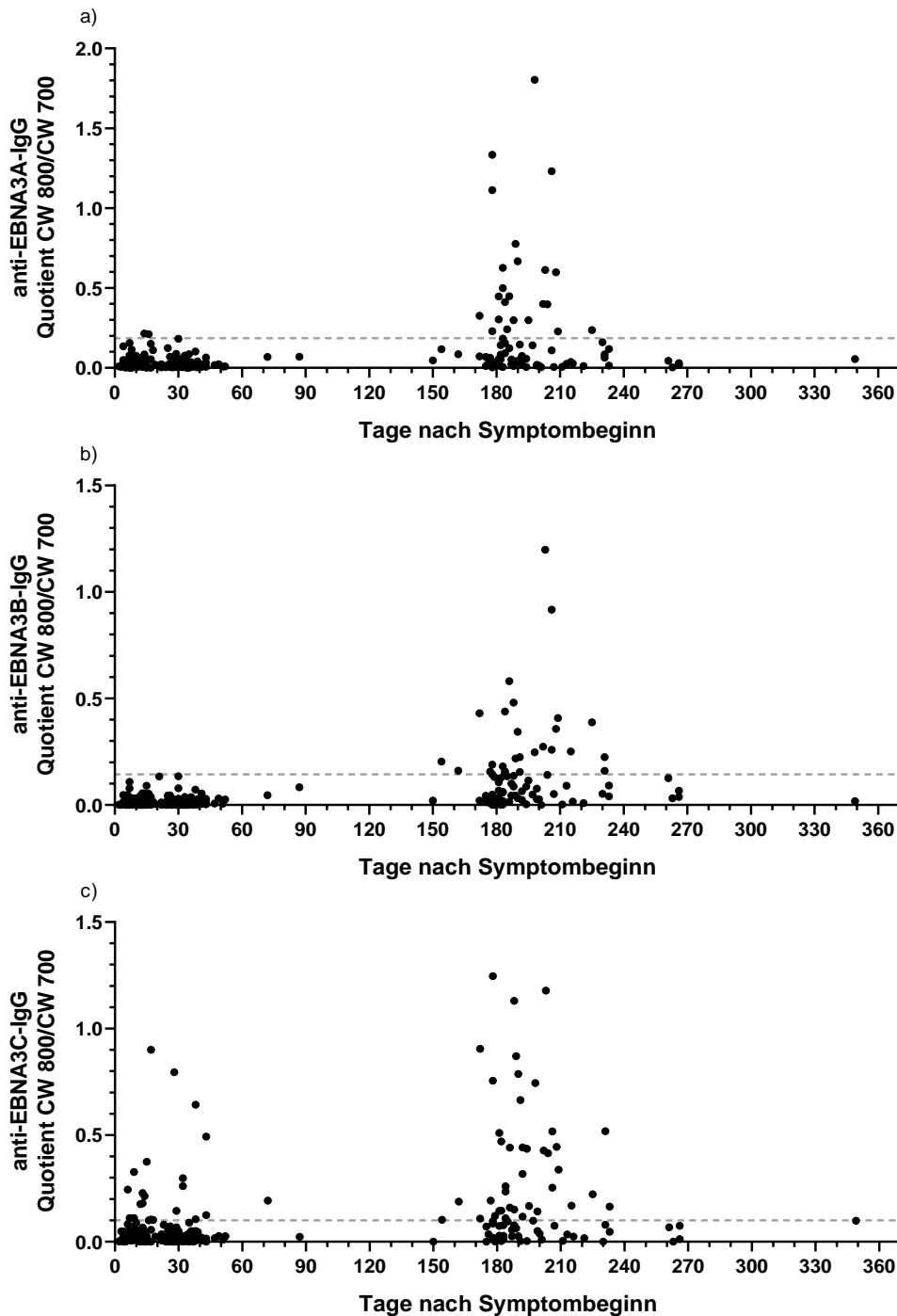
In a) wurde die anti-EBNA2-IgG-Immunantwort der gesamten Kohorte mit den Tagen nach Symptombeginn korreliert,  $r_s = 0,153$  mit 95%-KI [0,030; 0,271]. Abbildung b) zeigt den individuellen Verlauf der IgG-Antikörper gegen das EBV-Antigen EBNA2. Die durchgezogenen Linien verbinden jeweils die anti-EBNA2-IgG-Antworten von einem IM-Patienten an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten, die gestrichelte Linie markiert den *Cut-Off*. Patienten ohne nachweisliche anti-EBNA2-IgG sind grau markiert. Die Immunantwort (CW 800) und EBNA2-Proteinmengen (CW 700) wurden im fluoreszenzbasierten Dot-Blot-Verfahren als *arbitrary fluorescence units* (AFU) quantifiziert und ins Verhältnis zueinander gesetzt.



## 5.4.4.13 Anti-EBNA3-IgG

Die EBNA3-Proteinfamilie wird in EBNA3A, EBNA3B und EBNA3C unterteilt, welche als Latenzantigene - analog zu EBNA2 - ebenfalls Einfluss auf die Wachstumstransformation humaner B-Lymphozyten haben (The UniProt Consortium 2019). Die humoralen Immunantworten gegen diese Proteine wiesen im Verlauf der IM sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede auf. So konnten Antikörperantworten gegen EBNA3A, -3B und -3C in 25 %, 26 % und 47 % der Patienten detektiert werden (Tabelle 5.4). Zudem korrelierten die anti-EBNA3-IgG-Titer jeweils positiv mit den Tagen nach Symptombeginn (EBNA3A:  $r_s = 0,267$ ; EBNA3B:  $r_s = 0,481$ ; EBNA3C:  $r_s = 0,306$ ; Abbildung 5.29). Während anti-EBNA3A- und anti-EBNA3B-Antworten oft erst in der Rekonvaleszenz detektiert wurden, bildeten einige Patienten bereits an T0 Antikörperantworten gegen EBNA3C, die dann allerdings rückläufig waren (Abbildung 5.30). Auffällig war außerdem, dass sich die humorale Immunantwort häufig nicht nur gegen eines der EBNA3-Antigene, sondern gegen zwei oder gar alle drei Proteine gleichzeitig richtete (Daten nicht gezeigt). Unabhängig vom Untersuchungszeitpunkt konnte für keines der EBNA3-Proteine ein Zusammenhang zwischen Titern und den Entzündungsparametern, dem Schweregrad ( $s_{max}$ ), der Komplexität ( $c_{max}$ ) oder der Protraktion ( $p_{max}$ ) der IM festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

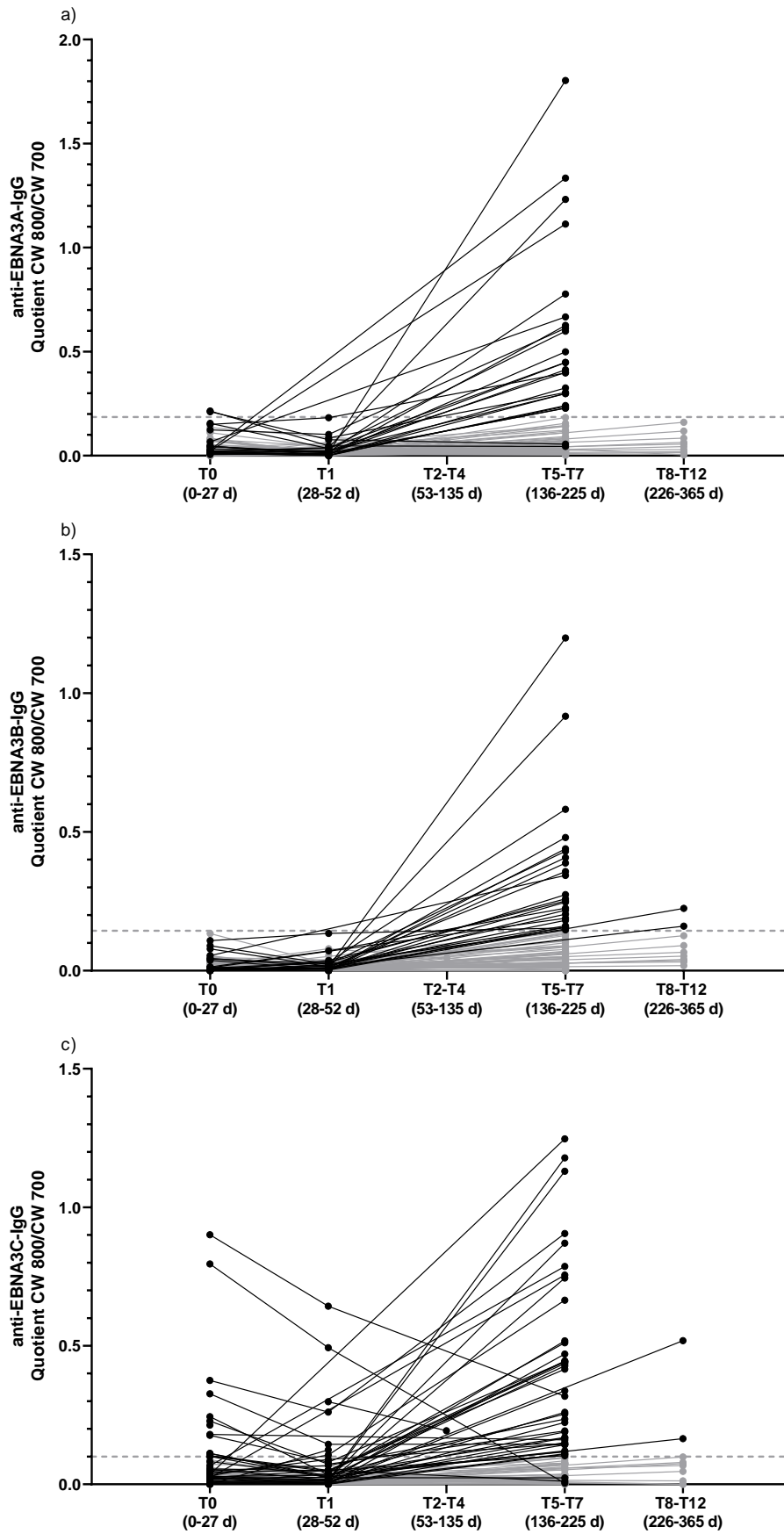
# Ergebnisse



**Abbildung 5.29 Anstieg der humoralen Immunantwort gegen die EBNA3-Antigene mit den Tagen nach Symptombeginn.**

In der Abbildung wurden jeweils die anti-EBNA3-IgG-Antikörperantworten der gesamten Kohorte gegen die Tage nach Symptombeginn aufgetragen. Es wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman mit 95 % Konfidenzintervall berechnet: a) anti-EBNA3A-IgG mit  $r_s = 0,267$  [0,149; 0,378]; b) anti-EBNA3B-IgG mit  $r_s = 0,481$  [0,380; 0,570]; c) anti-EBNA3C-IgG mit  $r_s = 0,306$  [0,189; 0,414]. Die Immunantwort (CW 800) und Proteinmengen (CW 700) der drei verschiedenen EBNA3-Proteine wurden im fluoreszenzbasierten Dot-Blot-Verfahren als *arbitrary fluorescence units* (AFU) quantifiziert und ins Verhältnis zueinander gesetzt. Die gestrichelte Linie markiert den *Cut-Off*.

# Ergebnisse



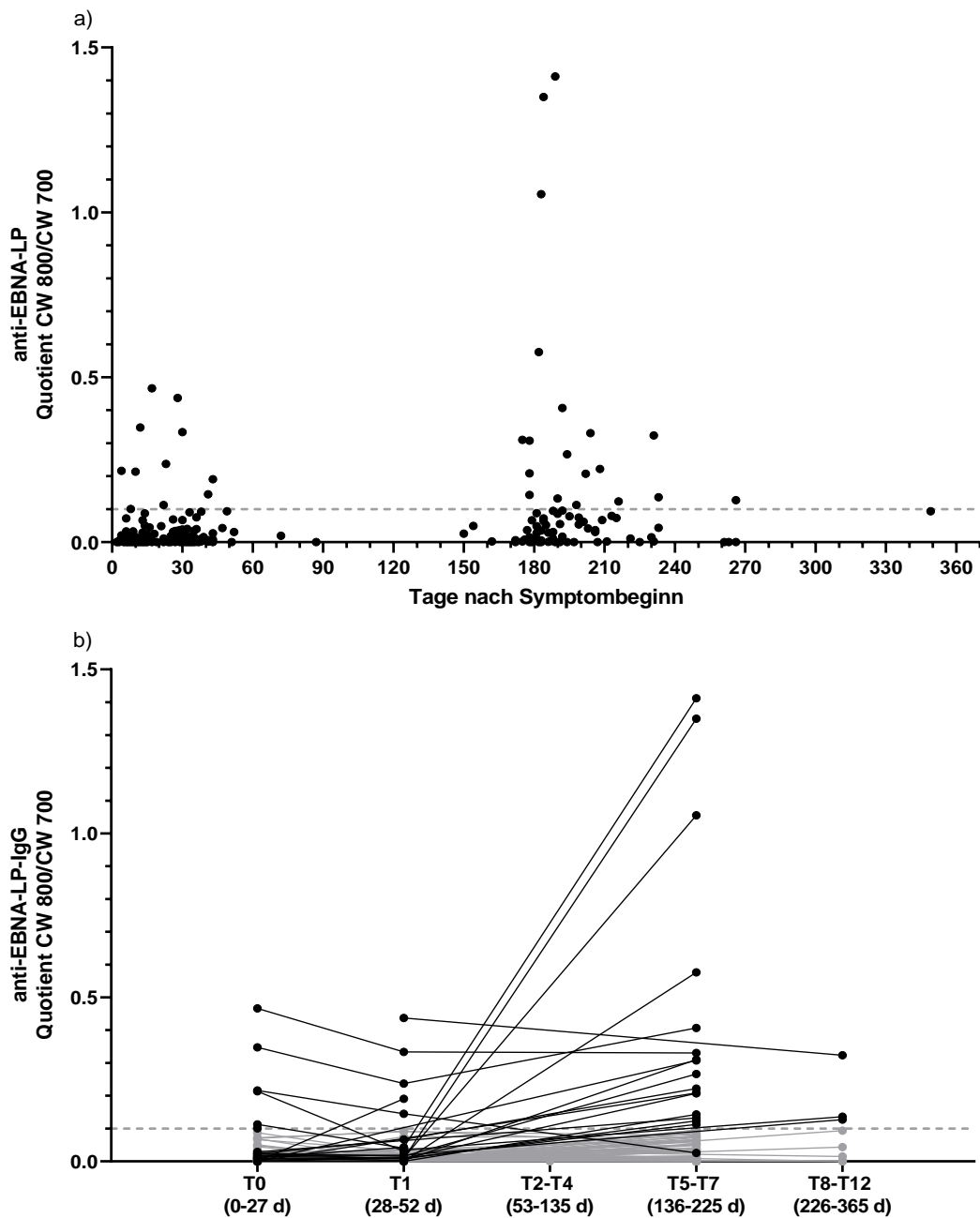
## **Abbildung 5.30 Regelmäßiger Nachweis von IgG-Antikörpern gegen EBNA3-Antigene in der Rekonvaleszenz der IM.**

Die Abbildung zeigt den individuellen Verlauf der IgG-Antikörper gegen die EBV-Antigene: a) EBNA3A, b) EBNA3B und c) EBNA3C. Die durchgezogenen Linien verbinden jeweils die anti-EBNA3-IgG-Antworten von einem IM-Patienten an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten, die gestrichelte Linie markiert jeweils den *Cut-Off*. Patienten ohne nachweisliche anti-EBNA3-IgG sind grau markiert. Die Immunantwort (CW 800) und Proteinmengen (CW 700) der drei verschiedenen EBNA3-Proteine wurden im fluoreszenzbasierten Dot-Blot-Verfahren als *arbitrary fluorescence units (AFU)* quantifiziert und ins Verhältnis zueinander gesetzt.

### **5.4.4.14 Anti-EBNA-LP-IgG**

Das Latenzantigen EBNA-LP ist ein Koaktivator von EBNA2 und damit an der Immortalisation humaner B-Zellen beteiligt (The UniProt Consortium 2019). Die humorale Immunantwort gegen EBNA-LP ähnelte der gegen die EBNA3-Antigene, insbesondere EBNA3C. Während in den meisten Fällen die Titer im Krankheitsverlauf anstiegen, waren einzelne IM-Patienten bereits an T0 oder T1 IgG-positiv für EBNA-LP, wobei deren Werte im weiteren Verlauf auf konstant niedrigem Niveau verharrten. Insgesamt konnte ein direkter Zusammenhang zwischen den Titern und zunehmender Zeit nach Primärinfektion ( $r_s = 0,271$ , Abbildung 5.31) festgestellt werden. Die anti-EBNA-LP-Titer an den drei Zeitpunkten T0, T1 und T5-T12 korrelierten weder mit den Entzündungsparametern noch mit der maximalen Graduierung ( $c_{max}$ ,  $s_{max}$ ,  $p_{max}$ ) der IM-Patienten (Daten nicht gezeigt).

# Ergebnisse



**Abbildung 5.31 Detektion von anti-EBNA-LP-IgG-Antikörperantworten bei einzelnen IM-Patienten bereits unmittelbar nach Symptombeginn und genereller Titeranstieg über die Zeit.**

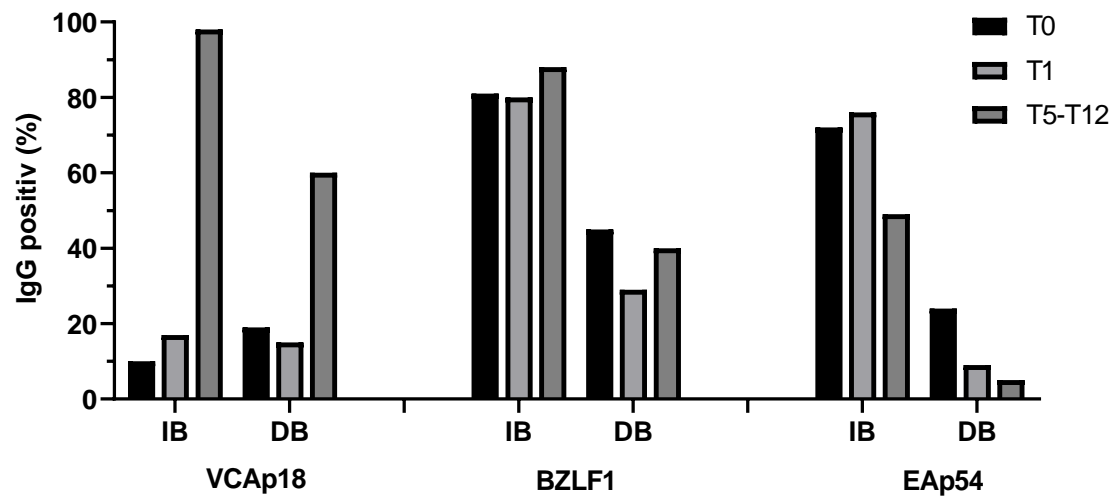
In a) wurde die anti-EBNA-LP-IgG-Immunantwort der gesamten Kohorte mit den Tagen nach Symptombeginn korreliert,  $r_s = 0,271$  mit 95%-KI [0,152; 0,382]. Abbildung b) zeigt den individuellen Verlauf der IgG-Antikörper gegen das EBV-Antigen EBNA-LP. Die durchgezogenen Linien verbinden jeweils die anti-EBNA-LP-IgG-Antworten von einem IM-Patienten an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten, die gestrichelte Linie markiert den *Cut-off*. Patienten ohne nachweisliche anti-EBNA-LP-IgG sind grau markiert. Die Immunantwort (CW 800) und EBNA-LP-Proteinmengen (CW 700) wurden im fluoreszenzbasierten Dot-Blot-Verfahren als *arbitrary fluorescence units (AFU)* quantifiziert und ins Verhältnis zueinander gesetzt.

### 5.4.5 Höhere Rate IgG-positiver Serumantworten im Immunoblot als im Dot-Blot

Um Sensitivität und Spezifität des Dot-Blots zu beurteilen, wurden dessen Ergebnisse mit denen des Immunoblots (*recomLine EBV IgG*, Microgen) der Klinischen Virologie verglichen. Der Immunoblot ist ein Nitrozellulose-Streifen mit aufgesprühten, gentechnologisch hergestellten EBV-Antigenen, nämlich EBNA1, VCAp18, VCAp23, BZLF1, EAp138 und EAp54. Nach Inkubation mit verdünntem Plasma (1:100) werden antigenspezifische IgG-Antikörper mittels Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Die Interpretation des Teststreifens (negativ, grenzwertig, 1- bis 3-fach positiv) erfolgt durch optischen Vergleich der Antigenbanden mit der *Cut-Off*-Bande (Microgen GmbH o. D.). Um den Vergleich von Immunoblot und Dot-Blot zu vereinfachen, wurden im Immunoblot 1- bis 3-fach positive Befunde einheitlich als positiv, im Dot-Blot ein Signal über dem antigenspezifischen *Cut-Off*-Wert (Tabelle 5.4) als IgG-positiv gewertet. Anschließend wurden die relativen Häufigkeiten positiver IgG-Antworten der beiden Tests einander gegenübergestellt (Abbildung 5.32).

Die Rate IgG-positiver Befunde des Immunoblots war für alle EBV-Antigene höher als die des Dot-Blots. Am stärksten waren die Unterschiede für EBNA1, VCAp23 und insbesondere für EAp138, für das im Immunoblot bei fast der Hälfte der Patienten an allen *Visits* eine positive Bande registriert wurde, während im Dot-Blot überhaupt kein anti-EAp138-IgG nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Für VCAp18, BZLF1 und EAp54 war die Übereinstimmung besser (Abbildung 5.32). Im Hinblick auf die Kinetik der IgG-Antikörperproduktion im Krankheitsverlauf erzielten der Immunoblot und Dot-Blot mit Ausnahme von EAp138 vergleichbare Ergebnisse. Ob die höheren Positivraten des Immunoblots für eine höhere Sensitivität gegenüber dem Dot-Blot sprechen oder mit experimentellen Unterschieden zusammenhängen könnten, ist Gegenstand der Diskussion. Hierbei muss nochmals explizit auf die unterschiedlichen Testtrennwerte der beiden Verfahren und die stringente Festlegung des *Cut-Offs* im Dot-Blot, der als neu etablierte Methode nur signifikante Serumantworten detektieren sollte, hingewiesen werden. Bei niedrig exprimierten Proteinen mögen die strengen Kriterien des *Cut-Offs* wegen eines höheren Hintergrunds gerechtfertigt gewesen sein, bei Proteinen, die verdünnt eingesetzt wurden, könnte dies einige reale Antworten eliminiert haben.

## Ergebnisse



**Abbildung 5.32 Häufigere Detektion EBV-spezifischer Antikörper im Immunoblot als im Dot-Blot.**

Dargestellt sind die relativen Häufigkeiten der IgG-Serumantworten von IM-Patienten gegen die Antigene VCAp18, BZLF1 und EA54 im Immunoblot (IB) und Dot-Blot (DB) an den drei *Visits*.

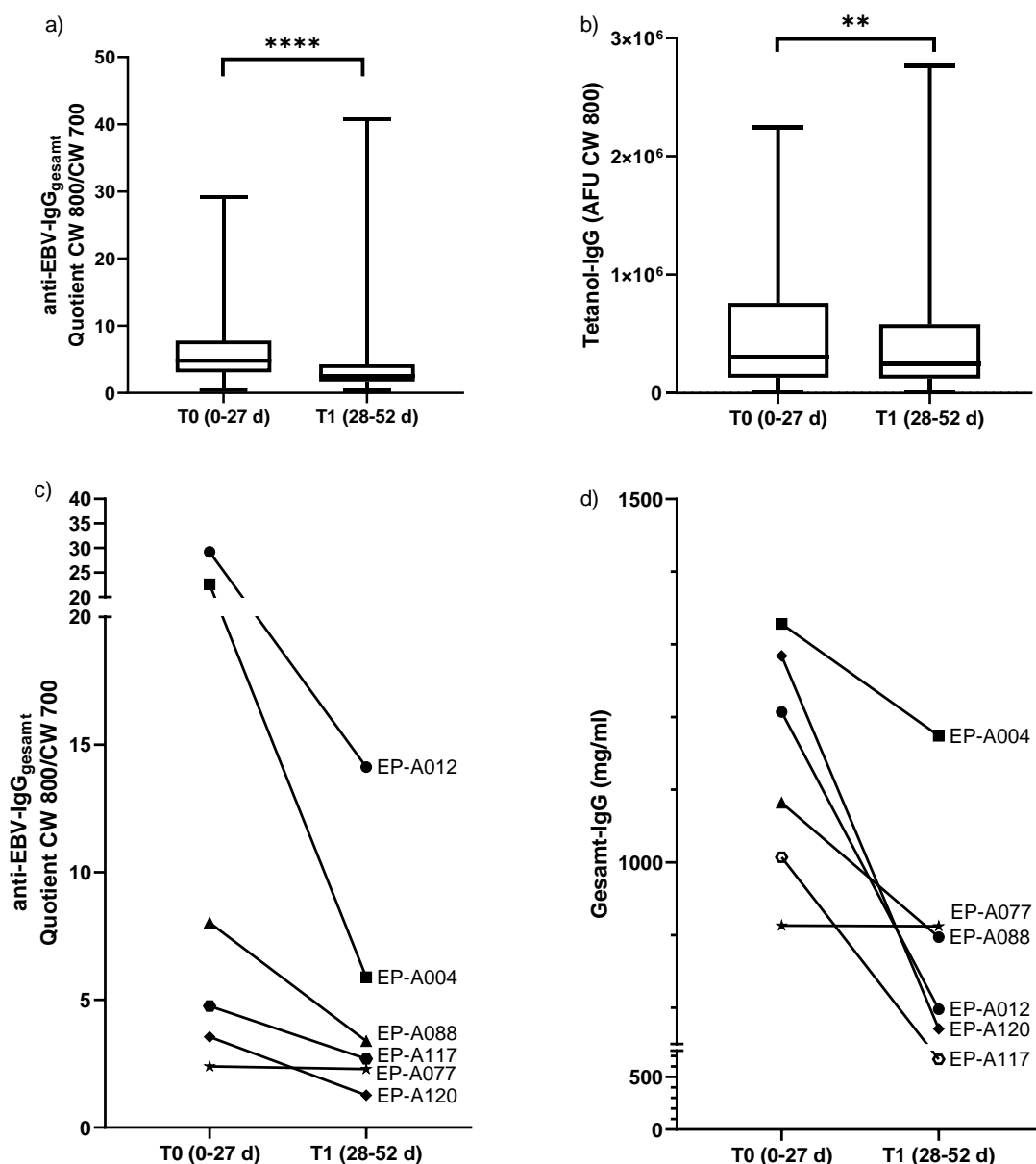
### 5.4.6 Erniedrigte Titer EBV-spezifischer IgG-Antikörper einen Monat nach Symptombeginn

Die bisherigen Ergebnisse (immunogene Antigene in Tabelle 5.4, individuelle und antigenspezifische Immunantworten in 5.4.3 und 5.4.4) lassen einen Abfall der EBV-spezifischen IgG-Antworten vom Zeitpunkt T0 auf T1 erkennen. Dies wurde unabhängig vom EBV-Antigen für die gesamte Kohorte nochmals überprüft, indem für jeden Patienten die gesamten Fluoreszenzsignale (Quotient CW 800/CW700) gegen alle 86 im Dot-Blot getesteten EBV-Antigene an T0 und T1 addiert wurden. Der Median der beiden Untersuchungszeitpunkte wurde im gepaarten, nicht-parametrischen *t*-Test (*t*-test nach Wilcoxon) untersucht. Trotz der jeweils großen Spannweite war der Median an T0 annähernd doppelt so hoch wie an T1 (*t*-test nach Wilcoxon  $p < 0,0001$ ; Abbildung 5.33a) und das, obwohl ein Patient (EP-A048) auffällig hohe Serumantworten gegen verschiedenste EBV-Proteine zum Zeitpunkt T1 zeigte, von diesem Patienten aber leider kein Untersuchungsmaterial an T0 zur Verfügung stand. Um zu untersuchen, ob die Signalabnahmen der EBV-spezifischen Antikörper von T0 auf T1 auf einer Abnahme der Gesamt-IgG-Menge im Patientenplasma einen Monat nach Symptombeginn beruhten, wurde anhand der IgG-Serumantworten gegen den Tetanus-Impfstoff an T0 und T1 überprüft. Auch der Median der Tetanus-Impftiter war an T0 höher als an T1 (*t*-test nach Wilcoxon:  $p = 0,0050$ ; Abbildung 5.33b). Die medianen Tetanus-Impftiter am letzten Untersuchungszeitpunkt (T5-T12) unterschieden sich signifikant von denen an T0, aber nicht signifikant von denen an T1 (Daten nicht gezeigt).

Die Beobachtung der abnehmenden Antikörperantworten war außerdem kein Dot-Blot-spezifisches Phänomen, sondern bestätigte sich stichprobenartig in der Routinediagnostik. So wurden für Patienten mit besonders auffälligen Signalabnahmen die Dot-Blot-Ergebnisse mit den in der Klinischen Chemie bestimmten Gesamt-IgG-Titern verglichen: Patienten mit abnehmender EBV-spezifischer Serumantwort im Dot-Blot hatten an T1 niedrigere Gesamt-IgG-Werte im Vergleich zu T0, stabile Titer im Dot-Blot gingen mit konstantem Gesamt-IgG einher (Abbildung 5.33c und d). Die Gesamt-IgG-Titer der Patienten, für die die Titerhöhe sowohl unmittelbar als auch einen Monat nach Symptombeginn ermittelt wurde, lagen jeweils im altersspezifischen Normbereich, an T0 tendenziell an der oberen und an T1 an der unteren Grenze. Damit drängt sich einerseits die Frage auf, was zu der Erhöhung der EBV-spezifischen IgG- und Gesamt-IgG-Antikörper an T0 und deren Abnahme innerhalb des ersten Monats im Krankheitsverlauf der IM geführt haben könnte, und andererseits, wie sich die Gesamt-IgG-Titer in der Rekonvaleszenz der IM entwickeln, für die in dieser Studie leider keine Daten vorliegen und für zukünftige Analysen ebenfalls bestimmt werden sollten.



# Ergebnisse



**Abbildung 5.33 Höhere EBV-spezifische IgG-Serumantworten von IM-Patienten an T0 als an T1.**

a) Für jeden Patienten wurde die Gesamtsumme der Fluoreszenzsignale (Quotient aus Immunantwort und Proteinmenge) gegen alle 86 EBV-Antigene zum Zeitpunkt T0 und T1 gebildet. Der Box-Plot zeigt die EBV-spezifische Serumantwort der Kohorte an den beiden Untersuchungszeitpunkten T0 (Median Quotient 4,8) und T1 (Median Quotient 2,5); Wilcoxon-t-Test  $p < 0,0001$ . b) vergleicht die IgG-Serumantworten (CW 800) gegen den Tetanolimpfstoff an T0 (Median 300152 AFU) und T1 (Median 250184 AFU), Wilcoxon-t-Test  $p = 0,0050$ . In c) und d) sind die Antikörperverläufe innerhalb des ersten Monats der IM für ausgewählte Patienten dargestellt, die Linien verbinden jeweils die für den einzelnen Patienten an T0 und T1 bestimmten Werte: Abbildung c) zeigt die Gesamtsumme der EBV-spezifischen IgG-Serumantworten im Dot-Blot, Abbildung d) die in der Routinediagnostik bestimmten Gesamt-IgG-Titer in mg/ml.

## 5.4.7 Die EBV-spezifische Immunantwort in Korrelation zum klinischen Verlauf der Infektiösen Mononukleose

### 5.4.7.1 Keine Assoziation zwischen der Stärke der EBV-spezifischen IgG-Immunantwort und dem klinischen Verlauf der Infektiösen Mononukleose

Die vorangegangenen Auswertungen zeigten, dass die humorale Immunantwort bei IM-Patienten individuell variiert. In Punkt 5.4.4 wurde bereits untersucht, ob Serumantworten gegen einzelne immunogene Antigene mit den klinischen Parametern der IM-Patienten korrelierten und als Biomarker für den Krankheitsverlauf eingesetzt werden könnten. Nachfolgend wurde analysiert, inwiefern die gesamte EBV-spezifische Immunantwort mit dem klinischen Verlauf korreliert. Dafür wurden die gesamten Fluoreszenzsignale (Quotient CW 800/CW 700) der einzelnen Patienten gegen alle 86 im Dot-Blot aufgetragenen EBV-Antigene sowie differenziert gegen die 74 lytischen und acht latenten Antigene aus dem EBV-Prototyp B95.8 an T0, T1 und T5-T12 addiert und als EBV-spezifische IgG-Titer erfasst. Zudem wurde überprüft, ob die Anzahl IgG-positiver Antigene an den drei Untersuchungszeitpunkten mit dem Krankheitsverlauf assoziiert war. Es wurde jeweils die Zahl aller Antigene erfasst, die zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt über dem *Cut-Off* lagen. Anti-EBV-IgG-Titer sowie die Anzahl der erkannten Antigene wurden mit der maximalen Komplexität ( $c_{max}$ ), dem maximalen Schweregrad ( $s_{max}$ ) und der maximalen Protraktion der Symptomatik ( $p_{max}$ ) korreliert, wobei kein Hinweis auf einen Zusammenhang gefunden wurde (Daten nicht gezeigt). Insgesamt variierte die Stärke (summarisch anti-EBV-IgG<sub>gesamt</sub>) und Vielfalt (Anzahl IgG-pos. Antigene) der IgG-Immunantwort sehr stark von Patient zu Patient und zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten (Tabelle 5.5).

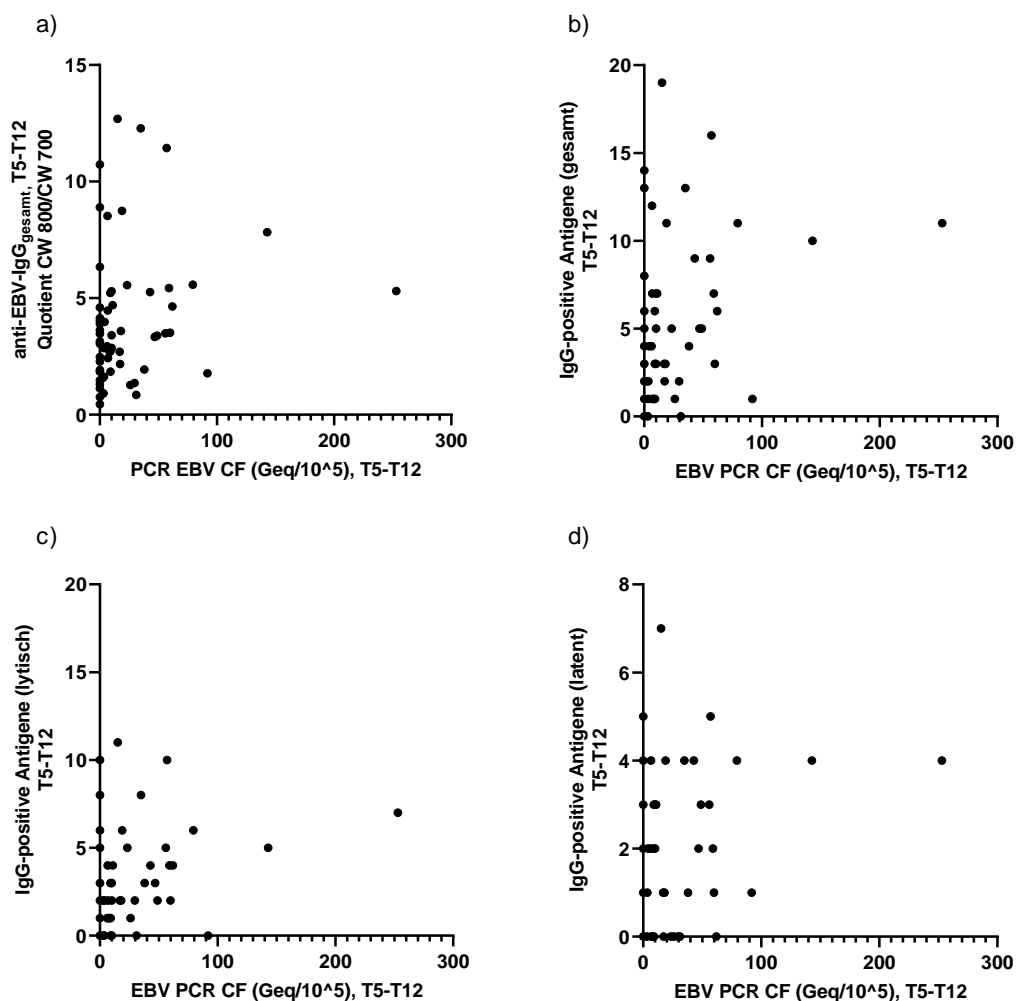
**Tabelle 5.5 Stärke und Vielfalt der gesamten EBV-spezifischen IgG-Antworten im zeitlichen Krankheitsverlauf.**

<i>Visit</i>	summarisch anti-EBV-IgG (gesamt)	Anzahl IgG-pos. Antigene (gesamt)	summarisch anti-EBV-IgG (lytisch)	Anzahl IgG-pos. Antigene (lytisch)	summarisch anti-EBV-IgG (latent)	Anzahl IgG-pos. Antigene (latent)
	<i>Median [Min; Max]</i>					
<b>T0</b>	4,8 [0,4; 29,2]	4 [0; 35]	3,9 [0,4; 24,7]	2 [0; 29]	0,5 [0,0; 2,5]	0 [0; 4]
<b>T1</b>	2,5 [0,4; 40,8]	1 [0; 39]	2,1 [0,3; 35,4]	1 [0; 35]	0,3 [0,0; 2,4]	0 [0; 2]
<b>T5-T12</b>	3,5 [0,4; 16,4]	4 [0; 25]	2,1 [0,4; 12,5]	2 [0; 18]	1,0 [0,0; 4,5]	2 [0; 7]

Weil es deutlich mehr lytische als latente Antigene gibt, waren sowohl Titer als auch die Anzahl positiver Antigene des lytischen Zyklus zu allen drei Zeitpunkten höher als die des Latenzstadiums. Allerdings fällt auf, dass IgG-Titer und Anzahl positiver Antworten gegen lytische Proteine von T0 zu T5-T12 konstant blieben bzw. sogar leicht abnahmen, während es bei den

# Ergebnisse

latenten Proteinen zu einem Antikörperanstieg in der Konvaleszenz kam. Warum manche Patienten auf die EBV-Primärinfektion mit einer starken IgG-Antwort reagierten und andere eine vergleichsweise schwache Antikörperproduktion aufwiesen, lässt sich in der untersuchten Kohorte nicht mit der Krankheitsausprägung der Patienten erklären. Jedoch zeigte sich eine schwache Assoziation zwischen den anti-EBV-IgG-Titern und der Viruslast in der PBMC-Zellfraktion (*cell fraction*, CF) in der Rekonvaleszenz der Erkrankung. Patienten mit einer höheren Viruslast ein halbes Jahr nach EBV-Primärinfektion hatten nachweislich höhere anti-EBV-IgG<sub>gesamt</sub> Titer ( $r_s = 0,253$ ; Abbildung 5.34a), eine höhere Zahl von IgG-Antworten gegen alle EBV-Antigene ( $r_s = 0,282$ ; Abbildung 5.34b), gegen lytische EBV-Antigene ( $r_s = 0,249$ ; Abbildung 5.34c) und gegen latente EBV-Antigene ( $r_s = 0,259$ ; Abbildung 5.34d) an T5-T12.



**Abbildung 5.34 Positive Korrelation zwischen einer höheren PBMC-Viruslast und EBV-spezifischen IgG-Antikörpern in der Rekonvaleszenz der IM.**

EBV-spezifische IgG-Titer und die Zahl IgG-positiver Antigene wurden mit der Viruslast in der PBMC-Zellfraktion (CF in  $\text{Geq}/10^5$ ) in der Rekonvaleszenz der Erkrankung (T5-T12) korreliert und der Korrelationskoeffizient nach Spearman mit 95 % Konfidenzintervall berechnet: a) anti-EBV-IgG<sub>gesamt</sub> und Viruslast,  $r_s = 0,253$  [0,008; 0,469]; b) IgG-positive Antigene (gesamt) und Viruslast,  $r_s = 0,282$  [0,039; 0,493]; c) IgG-positive Antigene (lytisch) und Viruslast,  $r_s = 0,249$  [0,004; 0,466]; d) IgG-positive Antigene (latent) und Viruslast  $r_s = 0,259$  [0,015; 0,474].

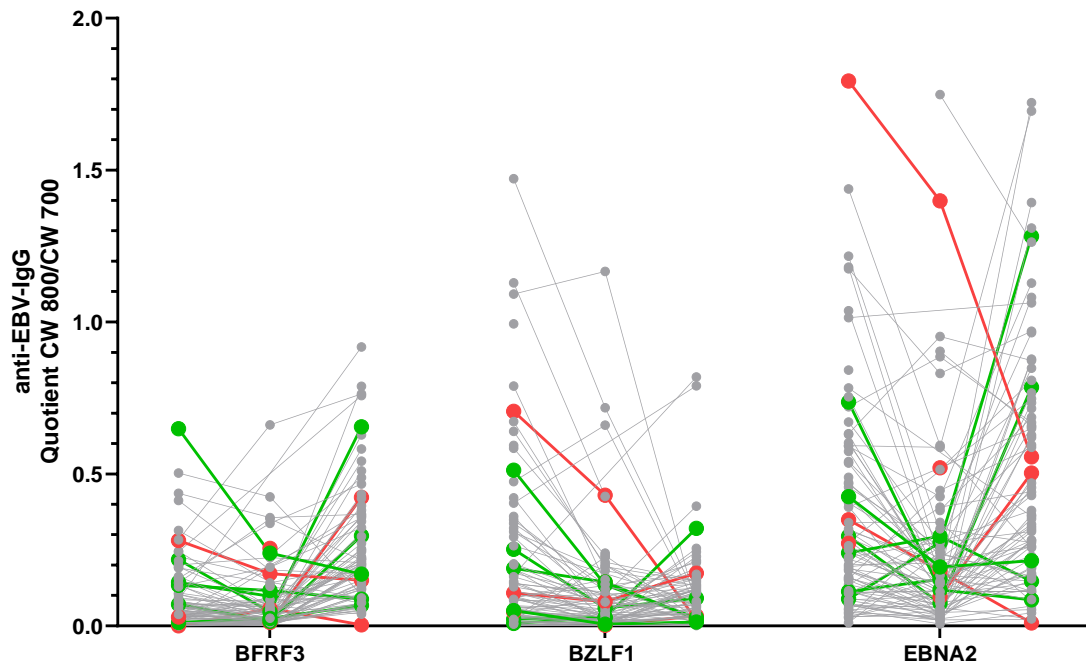
### 5.4.7.2 Kein Unterschied im Muster EBV-spezifischer IgG-Serumantworten von Patienten mit mildem oder schwerem Krankheitsverlauf

Nachdem zwar einzelne Antigene zu bestimmten Zeitpunkten, jedoch weder die Gesamttiter der EBV-spezifischen IgG-Immunantwort noch die Anzahl IgG-positiver Antigene mit den klinischen Parametern  $C_{max}$ ,  $S_{max}$  und  $p_{max}$  korrelierten, stellte sich die Frage, ob sich leicht erkrankte Patienten in ihrem Muster an EBV-spezifischen IgG-Antikörpern von schwer erkrankten Patienten unterschieden. Hierfür wurden die Verläufe der IgG-Serumantworten gegen ausgewählte lytische Antigene und alle Latenzantigene von Patienten mit mildem (Stadium I) und sehr schwerem Verlauf (Stadium IV) mit denen der übrigen Kohorte verglichen.

IM-Patienten aller Krankheitsstadien bildeten Antikörper gegen verschiedene Antigene des lytischen und latenten Zyklus. In allen vier Stadien gab es sowohl ansteigende als auch abnehmende Antikörperverläufe. Die Kinetik der EBV-spezifischen IgG-Antwort in Gruppe IV kann allerdings nur eingeschränkt beurteilt werden, da von den fünf Patienten mit sehr schwerem Verlauf nur von zwei Patienten Plasma an allen drei *Visits* zur Verfügung stand, während sich das Probenmaterial bei den anderen Patienten auf zwei (T1 und T5-T12) oder sogar auf nur einen (T0 oder T1) Untersuchungszeitpunkt beschränkte. Während einige Antigene (z. B. BBLF2/BBLF3, BFRF3, BILF2, BMRF1, BZLF1, EBNA2, EBNA3C, ELP) sehr starke IgG-Immunantworten induzierten, war die humorale Immunantwort gegen andere Antigene (z. B. BLLF1, BLRF2, BRRF2) deutlich schwächer oder ließ sich nur an T0 (z. B. LMP1, LMP2a) nachweisen. Dies wurde sowohl für Patienten mit mildem als auch mit schwerem Krankheitsverlauf beobachtet. Stadienunabhängig konnten zum Teil sehr hohe IgG-Titer, meist in der Rekonvaleszenz, nachgewiesen werden. Exemplarisch sind diese Beobachtungen für die Antigene BFRF3, BZLF1 und EBNA2, gegen die häufig Serumantworten nachweislich waren, in Abbildung 5.35 dargestellt. Die restlichen genannten, immunogenen Antigene werden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt.

Auf Grundlage der vorliegenden Daten können die Verläufe der IM-Erkrankungen nicht allein anhand ihrer Antikörperprofile vorhergesagt oder abgebildet werden, da die IgG-Immunantwort in allen IM-Stadien in Stärke und Spezifität sehr vielfältig war. Ob sich bestimmte Antikörperprofile dennoch als Biomarker für bestimmte Krankheitsstadien abzeichnen, wenn man eine deutlich größere Kohorte leicht und schwer kranker Patienten analysiert, muss in zukünftigen Untersuchungen stärker in den Fokus rücken.

# Ergebnisse



**Abbildung 5.35 Vergleichbare Antikörperantworten von leicht und schwer kranken IM-Patienten.**

Dargestellt sind die IgG-Antikörperantworten der IM-Patienten gegen die EBV-Antigene BFRF3, BZLF1 und EBNA2 unmittelbar (T0), einen Monat (T1) und ein halbes Jahr (T5-T12) nach Symptombeginn. Patienten verschiedener IM-Stadien sind farblich markiert: Stadium I/mild (grün), Stadium II/moderat und Stadium III/schwer (grau), Stadium IV/sehr schwer (rot).

### **5.4.7.3 Dominierende IgG-Antikörperantworten gegen Latenzantigene von EBV B95.8 gegenüber jenen von EBV AG876**

Die IM-Patienten zeigten unterschiedlich hohe Signale gegenüber den Latenzantigenen von EBV B95.8 und EBV AG876. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, existieren weltweit mehrere EBV-Varianten, die hauptsächlich aufgrund von Sequenzunterschieden in EBNA2- und den EBNA3-Genen in Typ I (Prototyp B95.8) und Typ II (Prototyp AG876) unterteilt wurden. Da Typ-I-Stämme weltweit vorherrschend sind, wurde das vollständige Proteom von EBV B95.8 sowie zusätzlich die vier besonders variablen Latenzantigene EBNA2, EBNA3A, -3B und -3C von EBV AG876 hergestellt und im Dot-Blot-Nachweisverfahren eingesetzt. Ein direkter Vergleich der IgG-Titer gegen die Latenzantigene von EBV B95.8 und EBV AG876 sollte Aufschluss darüber geben, ob serologische Verfahren Hinweise darauf geben könnten, mit welchem EBV-Typ ein Patient infiziert ist. In den allermeisten Fällen, wie exemplarisch für die Patienten EP-A103 und EP-A138 gezeigt, wurden stärkere humorale Immunantworten gegen EBNA2 und die EBNA3-Proteinfamilie von EBV B95.8 als von EBV AG876 beobachtet. Dagegen zeigte Patient EP-A017 eine stärkere Antikörperantwort gegen die Latenzantigene von EBV AG876 als von EBV B95.8, was auf eine Infektion dieses Patienten mit einem EBV-Typ-II-Stamm hinweisen könnte (Abbildung 5.36a). Falls sich diese Ergebnisse durch virale Sequenzanalysen bestätigen ließen, erschiene eine systematische Analyse dazu interessant, ob serologische Tests Hinweise auf die individuelle Infektion mit EBV-Typ I oder II liefern könnten. Da sich etwa die Hälfte der CD4+ und ein Drittel der CD8+ T-Zell-Epitope von EBV B95.8 und EBV AG876 unterscheiden, ist eine Kenntnis des infizierenden Virusstamms für immuntherapeutische Behandlungsansätze von besonderer Bedeutung (Cirac et al. 2018). Auch würden serologische Tests eine schnelle und einfache Untersuchung einer möglichen Assoziation zwischen Typ-I- oder Typ-II-Virus und EBV-bedingten Erkrankungen bzw. Krankheitsverläufen ermöglichen.

Da das etablierte Dot-Blot-Verfahren eine Untersuchung zwischen einer Infektion mit dem EBV-Typ I (Prototyp B95.8) und Typ II (Prototyp AG876) ermöglichen könnte, erschien es interessant zu prüfen, wie viele Studienpatienten eine stärkere humorale Immunantwort gegen die Latenzproteine von EBV AG876 als von EBV B95.8 zeigten, und ob diese Patienten sich anamnestisch oder klinisch von den anderen Patienten unterschieden. Für jeden Patienten wurden jeweils die IgG-Titer gegen EBNA2 und EBNA3A-C aus EBV B95.8 und EBV AG876 an T0, T1 und T5-T12 addiert und der Mittelwert der Untersuchungszeitpunkte gebildet. Insgesamt waren die mittleren IgG-Titer gegen die EBNA2- und EBNA3-Proteine von EBV AG876 bei zehn Patienten höher als gegen EBV B95.8 (Abbildung 5.36b). Während die Ergebnisse

## Ergebnisse

bei drei Patienten (EP-A017, EP-A085, EP-A116) sehr stark auf eine Infektion mit dem Virus-typ II hinwiesen, waren die Befunde bei den anderen sieben Patienten weniger indikativ. Im Vergleich der 10 Patienten mit Hinweis auf eine Typ-II-EBV-Erkrankung und den anderen 91 Patienten zeigte sich eine ähnlich breite Streuung der Altersverteilung und der Krankheits-schwere, -komplexität und -dauer, allerdings gab es in der „EBV-AG876-Gruppe“ mehr weib-liche Patienten (Tabelle 5.6).

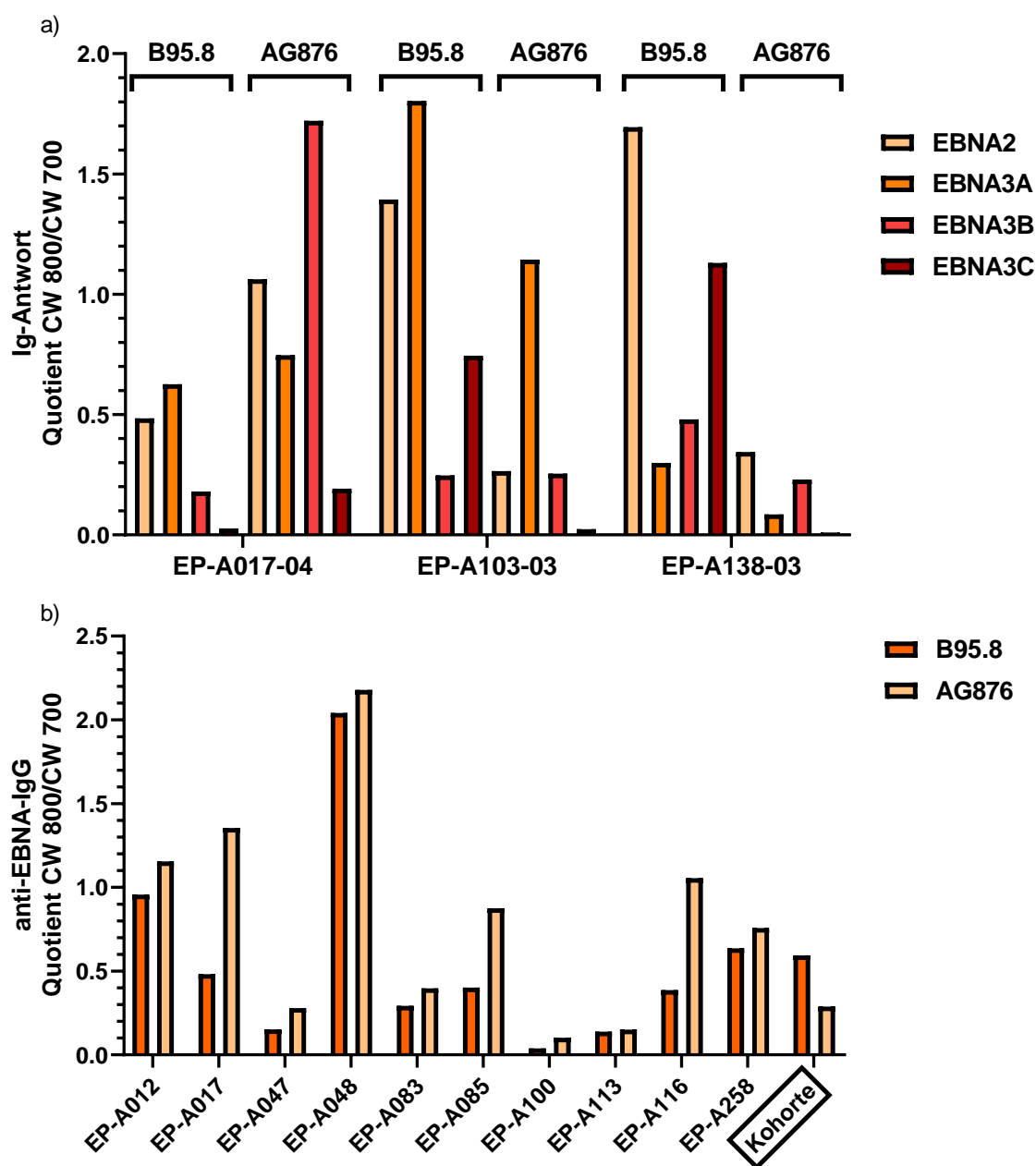
**Tabelle 5.6 Kein Unterschied des Alters oder Krankheitsverlaufs von Patienten mit Typ-I- und Typ-II-dominanter IgG-Antwort.**

EBV-Typ	Anzahl <i>n</i>	Geschlecht		Alter Median [Min; Max]	$c_{\max}$ (1-28)	$s_{\max}$ (1-5)	$p_{\max}$ (0-6)
		Relative Häufigkeit					
		w	m				
<b>AG876</b>	10	80 %	20 %	11,5 [3; 31]	11 [6; 18]	2,5 [1; 4]	1 [0; 6]
<b>B95.8</b>	91	55 %	45 %	12 [1; 26]	10 [1; 17]	2 [1; 4]	1 [0; 5]

Unter den Patienten mit einer dominierenden Immunantwort gegenüber dem Typ-II-EBV ver-dient der Patient EP-A258 eine besondere Erwähnung, da er unter einem sehr schweren und komplikationsreichen Krankheitsverlauf litt. Der 31-jährige Patient war von französischer Her-kunft. An Vorerkrankungen verzeichnete er lediglich eine arterielle Hypertonie und eine sub-stitutionspflichtige Hypothyreose, Anzeichen für einen angeborenen Immundefekt lagen nicht vor. Anamnestisch auffällig war eine Japanreise unmittelbar vor Beginn der klinischen Symp-tomatik. Im Verlauf der IM entwickelte der Patient als seltene, aber schwere infektassoziierte Komplikation eine Hämophagozytische Lymphohistiozytose (HLH) mit Fieber, einer Bilytopenie (Anämie, Thrombopenie), einer schweren Hyperferritinämie, einer Hypertriglyceridämie, einem löslichen IL2-Rezeptor (sCD25) im Blut, einer massiven Splenomegalie, einer fast voll-ständig fehlenden NK-Zytotoxizität und einer Proliferation von histiozytären und lymphozytären Zellen mit Nachweis von Hämophagozytose im Knochenmark (Herold 2018; Lachmann et al. 2019; Luzuriaga und Sullivan 2010; Odumade et al. 2011; Vouloumanou et al. 2012). Dass dieser Patient höhere IgG-Titer gegenüber den Latenzantigenen von EBV AG876 aufwies, insbesondere gegen EBNA3C-AG876 an T0 und T1, die unter immunsuppressiver Therapie in der Rekonvaleszenz der Erkrankung wieder rückläufig waren, scheint in Zusammenhang mit dem schweren Krankheitsverlauf und der anamnestisch bestätigten Japanreise vor Krank-heitsbeginn sehr interessant.

Bei den anderen neun Patienten fand sich weder solch eine fulminante Symptomatik noch eine ähnliche Reiseanamnese.

## Ergebnisse



**Abbildung 5.36 Unterschiedlich effiziente Erkennung von Latenzproteinen von EBV AG876 und EBV B95.8 je nach Patientenserum.**

In a) sind die IgG-Antikörperantworten von drei Patienten gegen die Latenzproteine EBNA2, EBNA3A, -3B und -3C aus dem Typ-I-EBV-Stamm B95.8 und dem Typ-II-EBV-Stamm AG876 gezeigt. In der Rekonvaleszenz der IM zeigte EP-A017 (an T6) höhere IgG-Antworten gegen die Latenzantigene von EBV AG876, während EP-A103 (an T7) und EP-A138 (an T6) die EBNA-Antigene von EBV B95.8 deutlich besser erkannten. b) Dargestellt sind die über die drei Untersuchungszeitpunkte gemittelten IgG-Titer gegen die Latenzproteine EBNA2, EBNA3A, -3B und -3C von dem Typ-I-EBV-Stamm B95.8 und dem Typ-II-EBV-Stamm AG876 von zehn Patienten mit einer Typ-II-dominierten Antikörperantwort im Vergleich zur gesamten Kohorte (Mittelwert).



## 6 Diskussion

### 6.1 Der fluoreszenzbasierte Dot-Blot für die EBV-spezifische serologische Diagnostik

Trotz großer Fortschritte der EBV-Diagnostik in den letzten Jahrzehnten wird nach wie vor die Notwendigkeit zuverlässiger serologischer Testmethoden betont, welche sowohl für die epidemiologische Forschung als auch für den klinischen Einsatz von großer Bedeutung sind (Abusalah et al. 2020). Der in der Arbeitsgruppe entwickelte fluoreszenzbasierte Nachweis EBV-spezifischer Antikörperantworten könnte das Spektrum der bisher zur Verfügung stehenden serologischen Methoden erweitern (Abbildung 5.1).

Der erste serologische Test geht auf den Monospot-Test nach Paul und Bunnell im Jahr 1932 zurück, der heterophile Antikörper im Plasma von IM-Patienten insbesondere in der Akutphase der Erkrankung detektiert (Paul und Bunnell 1974). Mit der Isolation von EBV aus Burkitt-Lymphom-Zellen begann die Suche nach virusspezifischen Testmethoden (Epstein et al. 1964), unter welchen die von Henle et al. etablierte Immunfluoreszenz-basierte EBV-Serologie lange Zeit als diagnostischer Goldstandard galt (Abusalah et al. 2020; Henle et al. 1979; Hess 2004; Middeldorp 2015). Jedoch ist die IFA nur schwer zu standardisieren, da die verschiedenen Laboratorien verschiedene Zelllinien, Serumtitrationen und mikroskopische Analysetechniken einsetzen. Versuch und Auswertung der Ergebnisse erfordern spezialisiertes Personal und sind nicht automatisierbar (Abusalah et al. 2020; Hess 2004; Middeldorp 2015). Außerdem sind bei der IFA, die EBV-transformierte Burkitt-Lymphomzellen verwendet, falsch positive oder nicht interpretierbare Befunde möglich, da Serumproben auf Antigene der Zelllinie reagieren können (Bauer 2001), weshalb die IFA in der Routinediagnostik weitgehend von Enzymimmunoassays (EIA oder ELISA) und Immunoblotanalysen abgelöst wurde. Beide Ansätze verwenden je nach Hersteller synthetische Peptide, Fusionsproteine, native oder rekombinante Proteine als EBV-Antigene. Enzymimmunoassays detektieren summarisch VCA-IgM, VCA-IgG, EBNA1-IgG, EA-IgG und EA-IgA und sind als sensitive, kostengünstige, schnelle und automatisierbare Methode klinisch erprobt (Abusalah et al. 2020; Hess 2004; Niller und Bauer 2017). Mit EIA/ELISA lässt sich der EBV-Serostatus (akute oder zurückliegende Infektion) aber nicht immer eindeutig definieren (Abusalah et al. 2020; Niller und Bauer 2017). Unklare Befunde können durch chemolumineszenzbasierte Western-Blot- oder Immunoblotanalysen verifiziert werden (Abusalah et al. 2020; Hess 2004). Diese Ansätze umfassen meist die Antigene EBNA1, VCAp18, VCAp23, EA<sub>p54</sub>, EA<sub>p138</sub>, MA (gp350/250) und BZLF1 (Abusalah et al. 2020; Bauer 2001; Hess 2004; Niller und Bauer 2017; Paschale und Clerici 2012). Jedoch

## Diskussion

---

wird bei den kommerziell verfügbaren Immunoblots genauso wie bei den ELISAs stets die herstellerabhängige Antigenauswahl und die damit einhergehende fehlende Standardisierung kritisiert (Abusalah et al. 2020; Hess 2004).

Darüber hinaus existieren weitere innovative Ansätze, um die serologische EBV-Diagnostik zu verbessern, etwa in Form von Multiplexanalysen (MFI, *multiplex flow immunoassay*) (Abusalah et al. 2020). Dazu gehören beispielsweise mit Antigenen beladene Biochips (Lv et al. 2019), die sowohl mit verschiedenen Antigenen als auch mit mehreren Patientenseren gleichzeitig beladen werden und die EBV-spezifischen IgM- und IgG-Antworten als Fluoreszenzsignale mittels Microarray-Scanner gleichzeitig quantifizieren können. Insgesamt dauerte das von Lv et al. etablierte diagnostische Procedere – von der Aktivierung der Biochips bis hin zur Detektion der Antikörperantworten in 274 Patientenproben – 4,5 Stunden (Lv et al. 2019). Mit 20 bis 24 Stunden ist das fluoreszenzbasierte Dot-Blot-Verfahren dagegen deutlich zeitaufwändiger. Allerdings beschränkte sich die Antigenauswahl bei Lv et al. auf die bereits bekannten Antigene EBNA1 und VCA, die potentielle Diversität der humoralen EBV-spezifischen Immunantwort blieb unberücksichtigt. Zudem werden die Antigene im Dot-Blot als Vollängenproteine eingesetzt, während Lv et al. uneinheitliche Aufarbeitungen verwendeten. So lag VCA als natives Protein (gp125 VCA) vor, EBNA1 dagegen als Proteinfragment (Lv et al. 2019). Somit würden sich Biochips nach dem Prinzip von Lv et al. für epidemiologische Studien eignen, um möglichst effizient den EBV-Serostatus großer Populationen zu erfassen, liefern aber nur begrenzte Informationen über das Antikörperprofil.

Um die Vielfalt der EBV-spezifischen IgG-Serumantworten abzudecken, wählten Goswami et al. einen ähnlichen Ansatz wie den der eigenen Arbeit (Goswami et al. 2017). Sie klonierten 75 ORFs des EBV-Genoms, transfizierten die Plasmide in HEK293 Zellen und übertrugen die Lysate der rekombinanten Zellen auf eine NC-Membran. Diese wurde sowohl mit einem anti-FLAG-Mausantikörper, der sich gegen das FLAG<sub>3</sub>-Etikett der rekombinanten Proteine richtete, als auch mit EBV-negativen und EBV-positiven Serum inkubiert. Die Detektion der humoralen Immunantwort und Proteinexpression erfolgte wie im Dot-Blot mittels *Odyssey Infrared Imaging System* (Goswami et al. 2017). Wie in der eigenen Arbeit konnte die Arbeitsgruppe somit nicht nur die humorale Immunantwort, sondern auch die jeweilige Menge des im untersuchten Zelllysats enthaltenen rekombinanten Proteins erfassen. Nachteilig war allerdings, dass Goswami et al. keine aufgereinigten Vollängenproteine als Antigene verwendeten, sondern Zelllysate, in denen Autoantigene falsch positive Signale hervorrufen können (Hess 2004). So reagierten die Proben von EBV-negativen und EBV-positiven Spendern schwach positiv auf Lysate EBV-negativer Zelllinien (DG75, BJAB), die als Kontrollen mitgeführt wurden. Außerdem zeigten Seren EBV-negativer Spender IgG-Antworten gegen durchschnittlich 1,5 +/- 0,5

## Diskussion

---

der getesteten EBV-Proteine, was die Autoren damit erklärten, dass ihr Test entweder weniger spezifisch oder sensitiver war als die bislang in der klinischen Diagnostik verwendeten Tests. Gegen welchen Standardtest die Seren zuvor untersucht worden waren, ließen die Autoren allerdings unbeantwortet (Goswami et al. 2017). Eine solche unspezifische Reaktion wäre bei IM-Patienten in der Akutphase der Erkrankung, die mit einer starken Aktivierung des Immunsystems inklusive der Bildung heterophiler Antikörper und Kreuzreaktionen einhergehen kann, vermutlich noch ausgeprägter als bei EBV-Durchseuchten, weshalb bei der Entwicklung serologischer Tests zugunsten einer höchstmöglichen Spezifität eher auf Zelllysate verzichtet werden sollte. Auch Goswami et al. beobachteten Limitationen bei der Proteinexpression in eukaryotischen Zelllinien. So mussten einige ORFs anstelle von Vollängenproteinen als Fragmente exprimiert werden, während 13 Gene überhaupt nicht exprimiert werden konnten. Dass sich nicht alle Antigene gleich effizient exprimieren lassen, wurde auch in der eigenen Arbeit beobachtet und gab Anlass zu der geschilderten Codonoptimierung in den EBV-Genen (Abbildung 5.3).

Liu et al. leisten ebenfalls einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung neuer innovativer Ansätze in der EBV-spezifischen Serologie (Liu et al. 2018). Sie untersuchten beispielsweise eine große Kohorte (n=289) gesunder Erwachsener aus Taiwan auf EBV-spezifische IgA- und IgG-Antikörper mit einem bereits etablierten Protein-Mikroarray (Doolan 2011). Dabei wird ein mit einer NC-Membran beschichteter Glaschip mit Proteinen bedruckt und Serumantworten als Fluoreszenzsignale quantifiziert. Der von Liu et al. verwendete Chip wurde mit drei Proteinen (VCAp18, EBNA1, EAdp47/BMRF1) und insgesamt 199 Proteinsequenzen (86 Proteine) fünf verschiedener EBV-Stämme (B95.8, Mutu, Rajii, AG876 und Akata) beladen. Besonders zu würdigen ist die Detektion von Immunantworten gegen das gesamte EBV-Proteom unter Berücksichtigung fünf verschiedener EBV-Stämme. Anders als im Dot-Blot wurden die Antigene nicht in einer humanen Zelllinie exprimiert, sondern zellfrei *in vitro* translatiert. Die *in vitro* Translation ermöglicht zum einen eine effiziente Proteinexpression, da Verluste im Rahmen der Proteinaufreinigung nicht zum Tragen kommen, zum anderen können durch ein zellfreies Expressionssystem unspezifische Reaktionen gegen Antigene der Zelllinie ausgeschlossen werden. Allerdings verwiesen die Autoren darauf, dass bei der Verwendung von Polypeptiden anstelle von Vollängenproteinen Serumantworten gegen Antigene, bei denen Glykosylierung bzw. posttranslationale Modifikationen eine wichtige Rolle spielen, unentdeckt bleiben könnten. Außerdem konnten mit dieser Methode nur 85 % der Sequenzen als vollständige Transkripte exprimiert werden (Liu et al. 2018).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das fluoreszenzbasierte Dot-Blot-Verfahren an die Fortschritte der EBV-spezifischen Serologie anknüpft. Insgesamt werden 86 Proteine als

potentielle Zielstrukturen eingesetzt, wodurch die qualitative und quantitative Vielfalt der EBV-spezifischen IgG-Antikörperantwort untersucht und neue immunogene Antigene beschrieben werden konnten. Im Zuge der Vorteile der von Lv et al. und Liu et al. verwendeten Protein-Arrays wäre die Umstellung des Dot-Blots auf einen Chip mit allen EBV-Proteinen bzw. einem Subset an relevanten immunogenen Antigenen prinzipiell sinnvoll, was die Vorteile der drei Verfahren – einen hohen Probenumsatz, ein breites Antigenspektrum in Form von eukaryotisch exprimierten Volllängenproteinen und die gleichzeitige Detektion von Antikörpern verschiedener Ig-Klassen – vereinen würde.

## **6.2 Serologische Marker von Patienten mit Infektiöser Mononukleose**

Im Rahmen der prospektiven Untersuchung EBV-spezifischer IgG-Immunitäten von IM-Patienten möglichst bald nach, einen Monat nach und ein halbes Jahr nach Symptombeginn sollte überprüft werden, ob die in der Literatur beschriebenen serologischen Marker der EBV-Infektion in der untersuchten Kohorte reproduzierbar waren und ob durch das erweiterte Antigenspektrum neue EBV-spezifische Biomarker definiert werden konnten, mithilfe derer der Verlauf der IM vorhergesagt oder im Labor abgebildet werden konnte.

### **6.2.1 Individuelle Muster der EBV-spezifischen Antikörperantworten**

In den Dot-Blot-Untersuchungen wurde eine unerwartet große interindividuelle Heterogenität der humoralen Immunantworten während der EBV-Primärinfektion offensichtlich. IM-Patienten entwickeln nicht selten ein sehr individuelles IgG-Antikörpermuster gegen das Virus, worauf in Ansätzen bereits Niller und Bauer hinwiesen (Bauer 2001; Niller und Bauer 2017). Dass die IgG-Serumantworten von IM-Patienten keinem einheitlichen Muster folgen, ist für die klinische Bewertung serologischer Testergebnisse durchaus relevant: Trotz Kombination unterschiedlicher Antigene, die sowohl den lytischen als auch latenten Lebenszyklus von EBV repräsentieren, kann zwar meist der Infektionsstatus (EBV-positiv oder -negativ), jedoch rückwirkend nicht der exakte und mit längerer Latenz auch nicht der ungefähre Zeitpunkt der Infektion anhand des serologischen Profils zuverlässig bestimmt werden. IM-Patienten unterschieden sich hinsichtlich der seropositiven Antigenkombination sowie der Stärke und Kinetik ihrer EBV-spezifischen IgG-Produktion deutlich (Abbildung 5.9, Abbildung 5.10). Innovative serologische

## Diskussion

---

Assays, die das gesamte EBV-Antigenom abdecken, bestätigen die interindividuelle Heterogenität EBV-spezifischer IgG-Serumantworten. Diese zeigte sich auch im Plasma gesunder EBV-positiver Spender und ist somit wohl kein IM-spezifisches Phänomen. In den Untersuchungen von Liu et al. bildeten gesunde Probanden mit dem einfachsten Antikörpermuster gegen 24 % (21/86) und diejenigen mit dem vielfältigsten Antikörpermuster gegen 98 % (84/86) der möglichen EBV-Proteine IgG-Antikörper (Liu et al. 2018), im eigenen Dot-Blot betrug diese Raten für die IM-Kohorte 0 % (0/86) und 45 % (39/86) (Tabelle 5.5). In den Analysen von Liu et al. zeigten fast alle gesunden EBV-positiven Probanden ( $\geq 95$  %) IgG-Antworten gegen die folgenden 14 EBV-Proteine: EBNA3B und EBNA1 (latente Antigene); BILF1, BDLF4, BLRF2 und BGLF5 (frühe lytische Antigene); BRRF2, BFRF3, VCAp18 und BPLF1 (späte lytische Antigene); BZLF2, BDLF3, BBRF3 und BMRF2 (Glykoproteine) (Liu et al. 2018). In der eigenen Arbeit stellten sich die genannten Proteine bis auf BILF1 ebenfalls als immunogene Antigene heraus, gegen die in der untersuchten IM-Kohorte IgG-Antikörper detektiert werden konnten (Tabelle 5.4). Auch bei Goswami et al. waren sowohl Stärke als auch Vielfalt der EBV-spezifischen IgG-Serumantworten spenderabhängig, wobei durchschnittlich 17 Antigene der 75 exprimierten ORFs erkannt wurden (Goswami et al. 2017). Ähnlich wie in der eigenen Arbeit detektierten beide Arbeitsgruppen IgG-Antworten gegen Proteine unterschiedlicher Phasen des EBV-Lebenszyklus, von denen Glykoproteine am häufigsten (68,4 %) im Protein-Mikroarray von Liu et al. erkannt wurden (Goswami et al. 2017; Liu et al. 2018). Dies ist insofern interessant, als dass BILF2, ebenfalls ein Glykoprotein, zu den immundominanten EBV-Antigenen der in der eigenen Arbeit untersuchten IM-Kohorte zählte. Während Goswami et al. BILF2 nicht als potentiell Zielantigen untersuchten, gelang auch Liu et al. der Nachweis einer humoralen Immunantwort gegen BILF2, so bildeten 94 % der gesunden EBV-positiven Probanden IgG- und 47 % der Probanden IgA-Antikörper gegen BILF2 (Liu et al. 2018) (ergänzende Daten). In der eigenen Arbeit zeigten insgesamt 61 % der IM-Patienten eine BILF2-IgG-Serumantwort, zum letzten Untersuchungszeitpunkt (T5-T12) waren 69 % der IM-Patienten BILF2-IgG-positiv. Wie sich die IgG-Serumantworten gegen Proteinsequenzen verschiedener EBV-Stämme verhielten und ob sich, ähnlich wie im eigenen Dot-Blot, mögliche Hinweise auf den verantwortlichen Virusstamm ergaben, blieb in den Analysen von Liu et al. leider unbeantwortet.

### 6.2.2 Unterschiedliche Dynamik und Stärke der EBV-spezifischen IgG-Serumantwort je nach Antigen

Trotz erwähnter individueller Unterschiede wurde für einige der EBV-Antigene in einem Großteil der Patienten ein ähnliches Erkennungsmuster beobachtet. Solche Antigene, die IgG-Antworten in einem hohen Prozentsatz aller IM-Patienten auslösten, sind potenziell von besonderer Bedeutung für die serologische Diagnostik.

#### 6.2.2.1 Frühe und sehr frühe lytische Antigene

Die frühen lytischen Antigene BMRF1 (EAp54) und BALF2 (EAp138) werden vorrangig zur Differenzierung zwischen einer akuten und einer zurückliegenden EBV-Infektion in diversen serologischen Tests (IFA, EIA, ELISA, CLIA und Immunoblot) eingesetzt. Die Beobachtung, dass 60-80 % der Patienten auf eine EBV-Primärinfektion mit IgG gegen EAp54 und/oder EAp138 reagieren, stimmt nicht mit den Ergebnissen des eigenen Dot-Blots überein, was an dem sehr streng angelegten *Cut-Off* des Letzteren liegen könnte (Bauer 2001; Crowley et al. 2012; Henle et al. 1987; Hess 2004; Odumade et al. 2011; Paschale und Clerici 2012). Im Dot-Blot zeigte sich bei keinem der Patienten anti-BALF2-IgG und nur knapp 24 % der IM-Patienten entwickelten messbare anti-BMRF1-IgG in der Akutphase der Erkrankung. Innerhalb des ersten Monats nach Symptombeginn wurden sehr hohe anti-BMRF1-IgG-Titer erreicht, die (passend zu einem EA) im Zeitverlauf abnahmen und meist wieder unter die Detektionsgrenze abfielen. In der Rekonvaleszenz der Erkrankung zeigten nur noch 5 % der Patienten eine anti-BMRF1-IgG-Immunantwort (Tabelle 5.4, Abbildung 5.20). Dass im Dot-Blot seltener als erwartet anti-EA-IgG detektiert wurden, bestätigte der Vergleich mit den Ergebnissen des in der Routinediagnostik durchgeführten Immunoblots, dessen Seroprävalenzraten für anti-EA-IgG in der untersuchten IM-Kohorte deutlich höher waren und etwa denen der Literatur entsprachen (Abbildung 5.32). Da anti-EA-IgG-Antikörper noch viele Monate nach EBV-Primärinfektion und ebenso bei gesunden EBV-positiven Spendern vorkommen, bietet der Nachweis von anti-EA-IgG-Antikörpern für die Differentialdiagnose einer Reaktivierung bei immunkompetenten Patienten keinen wesentlichen diagnostischen Mehrwert (Bauer 2001; Crowley et al. 2012; Henle et al. 1987; Hess 2004; Luzuriaga und Sullivan 2010; Odumade et al. 2011). Aus diesem Grund sollte zur Abklärung einer EBV-Reaktivierung anstelle von Antikörpern gegen den EA-Komplex bevorzugt die Viruslast im Blut mittels PCR bestimmt werden (Hess 2004).

## Diskussion

---

Neben BMRF1 induzierten weitere frühe Antigene bereits unmittelbar nach Symptombeginn eine humorale Immunantwort. So waren insgesamt 23 von 101 Patienten (23 %) IgG-positiv auf das Antigen BBLF1 (Tabelle 5.4), von denen wenige Patienten anti-BBLF1-IgG-Antikörper schon an T0 zeigten, die im weiteren Verlauf wieder abfielen, während die meisten Patienten die höchsten Titer in der Rekonvaleszenz der Erkrankung erreichten (Abbildung 5.11). Eine ähnliche zeitliche Entwicklung der Antikörpertiter konnte auch für das frühe lytische Antigen BBLF2/BBLF3 (Abbildung 5.13) festgestellt werden. Die virale Thymidin-Kinase (TK) BXLF1 zählt ebenfalls zum EA-Komplex und erwies sich – wenn auch nur bei wenigen Patienten – als immunogenes Antigen, gegen das sich abhängig vom Patienten entweder bereits unmittelbar nach Symptombeginn (DAO 7-10) oder in der Rekonvaleszenz der Erkrankung (DAO 183-209) eine ausgeprägte IgG-Immunantwort entwickelte (Abbildung 5.24a). BBLF1 und BBLF2/BBLF3 waren zuvor noch nicht als immunogen beschrieben worden. Dagegen verweisen andere Studien auf eine anti-BXLF1-IgG-Serumantwort bei Patienten mit fortgeschrittenem NPC (Fachiroh et al. 2004).

Zwei Drittel der IM-Patienten bildeten Antikörper gegen BZLF1, das als Schlüsselprotein des lytischen Zyklus die Expression viraler lytischer Proteine induziert, zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf (Tabelle 5.4). Während viele Patienten bereits zum Zeitpunkt der Rekrutierung (T0, DAO 3-28) IgG-positiv auf BZLF1 waren, stiegen die anti-BZLF1-IgG-Antikörpertiter bei anderen Patienten erst zu einem späteren Zeitpunkt der IM an, nämlich an T1 (DAO 28-49) oder gar erst in der Rekonvaleszenz der Erkrankung (T5-T12, DAO 154-233) (Abbildung 5.25a). Diese Beobachtung bestätigte sich im Immunoblot der Routinediagnostik, wobei dieser häufiger IgG-positive Befunde für BZLF1 ergab, was wiederum an dem in den eigenen Untersuchungen streng angelegten *Cut-off* liegen könnte (Abbildung 5.32). Zur Kinetik der anti-BZLF1-IgG-Antikörperantwort finden sich in der Literatur nur wenige vergleichbare Beobachtungen von IM-Patienten. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der eigenen Arbeit wurden anti-BZLF1-IgG-Serumantworten in verschiedenen Stadien einer EBV-Infektion beschrieben (Niller und Bauer 2017; Paschale und Clerici 2012). Studien zufolge besitzen 60-74 % gesunder EBV-positiver Spender BZLF1-IgG-Antikörper, in den Analysen von Goswami et al. zeigten sogar alle EBV-Positiven anti-BZLF1-IgG-Antikörper, was aufgrund der niedrigen Probenzahl (n = 15) allerdings nicht verallgemeinert werden kann (Fachiroh et al. 2004; Goswami et al. 2017; Grunsvén et al. 1993; Meij et al. 1999).

## 6.2.2.2 Viruskapsidantigene

Unter den 86 getesteten Antigenen waren IgG-Antikörperantworten gegen BFRF3 (VCAp18) mitunter am häufigsten und am stärksten ausgeprägt. Ein halbes Jahr nach EBV-Primärinfektion (T5-T12) hatten 60 % der Probanden nachweislich anti-BFRF3-IgG-Antikörper (Tabelle 5.4, Abbildung 5.14). Damit lag der Prozentsatz VCA-IgG-positiver Patienten allerdings deutlich unter den 98-100 %, die laut Literatur normalerweise bei Patienten mit akuter EBV-Infektion erwartet werden (Balfour, Jr. et al. 2013; Bauer 2001; Hess 2004; Odumade et al. 2011; Paschale und Clerici 2012; Schillinger et al. 1993). Die Dynamik der anti-BFRF3-IgG-Antikörperantwort der analysierten IM-Patienten stimmte allerdings mit den beschriebenen Verläufen überein, wobei von einem Titeranstieg in der Rekonvaleszenz der Erkrankung und einer lebenslangen Persistenz der Antikörper ausgegangen wird (Grunsven et al. 1993; Hess 2004; Luzuriaga und Sullivan 2010; Middeldorp 2015; Odumade et al. 2011; Paschale und Clerici 2012). Vergleicht man die anti-BFRF3-IgG-Antikörperantworten mit der Literatur, muss außerdem unterschieden werden, ob Antikörper gegen VCA, einen Komplex aus verschiedenen Antigenen (p18, p23, p40 und p160), oder spezifisch gegen VCAp18 (BFRF3) untersucht wurden (Bauer 2001; Fachiroh et al. 2004; Goswami et al. 2017; Hess 2004; Middeldorp 2015; Paschale und Clerici 2012). VCA-Antikörper können bereits in der Akutphase der Erkrankung vorkommen, was laut Niller und Bauer auch für VCAp18 zutrifft und für 19 % der IM-Patienten mit nachweisbaren anti-BFRF3-IgG an T0 im Dot-Blot bestätigt werden konnte (Niller und Bauer 2017). Ob die IgG-Seroprävalenz für VCAp18 initial genauso hoch ist wie die gegen den gesamten VCA-Komplex (nahezu 100 %), bleibt unbeantwortet, da sich die meisten Arbeiten nur auf VCA-Antikörper beziehen (Abusalah et al. 2020; Hess 2004; Luzuriaga und Sullivan 2010; Odumade et al. 2011; Paschale und Clerici 2012; Rea et al. 2002). Dagegen verwenden einige Immunoblots, wie beispielsweise der in der Routinediagnostik eingesetzte *rekomLine* assay (Mikrogen), eine trunkierte Variante von VCAp18 mit Epitopen, die erst zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion erkannt werden und VCAp18 damit als späten Marker definieren (Bauer 2001; Mikrogen GmbH o. D.; Niller und Bauer 2017; Paschale et al. 2009). Ein Vergleich der anti-BFRF3-IgG-positiven Patienten im Dot-Blot und Immunoblot ist demnach nur bedingt möglich. Die Verwendung des modifizierten VCAp18 als späten Marker, gegen den frühestens nach drei bis vier Wochen IgG-Serumantworten nachweislich seien (Mikrogen GmbH o. D.; Niller und Bauer 2017), muss allerdings kritisch hinterfragt werden, da im routinemäßig erhobenen *rekomLine* Immunoblot 11 % der IM-Patienten bereits nach fünf bis 22 Tagen (T0) IgG-positiv gegen VCAp18 waren und angesichts des Verlaufs eindeutig kürzlich eine frische Infektion durchgemacht hatten (Abbildung 5.32). Möglicherweise hängt der Befund von späteren IgG-Antworten zum Beginn der Symptome auch davon ab, wie lange die individuelle Inkubationszeit war.



## Diskussion

---

Die Prävalenz von anti-VCAp23-IgG-Antikörpern der untersuchten Kohorte lässt ebenfalls Diskrepanzen zur verfügbaren Literatur erkennen. Die anti-BLRF2-IgG-Immunantwort korrelierte positiv mit den Tagen nach Symptombeginn und die höchsten Titer wurden in der Rekonvaleszenz der Erkrankung erreicht (Tabelle 5.4, Abbildung 5.19). Im Dot-Blot waren allerdings deutlich weniger Patienten (13 %) VCAp23-IgG-positiv als in anderen Studien beschrieben, welche in 98 % der Fälle nach abgelaufener und in 74 % der Fälle in der Frühphase einer akuten EBV-Infektion anti-VCAp23-IgG im Immunoblot (*recomLine assay*) nachweisen konnten. Die Autoren betonen jedoch, dass insbesondere nach frischer Infektion anti-VCAp23-IgG fehlen oder nur schwach nachweisbar sein können (Bauer 2001; Buisson et al. 1999; Niller und Bauer 2017). Abweichende Ergebnisse ergaben sich auch im *recomLine assay* der Routinediagnostik, der im Vergleich zum Dot-Blot häufiger anti-BLRF2-IgG detektierte (Daten nicht gezeigt). Die in der Literatur beschriebene hohe Seroprävalenz für anti-BLRF2-IgG war in der Rekonvaleszenz der IM im Immunoblot reproduzierbar, dagegen waren unmittelbar und einen Monat nach Symptombeginn anti-VCAp23-IgG mit jeweils nur knapp 30 % im Immunoblot deutlich seltener nachweislich als bislang beschrieben.

### 6.2.2.3 Membran- und Hüllproteine

EBV infiziert humane B-Zellen über das Hüllglykoprotein BLLF1 (gp350), das an deren Oberflächenrezeptor CD21 bindet (Bornkamm und Hammerschmidt 2001; Nemerow et al. 1987; Paschale und Clerici 2012; Young und Rickinson 2004). Seit verschiedene Arbeitsgruppen zeigen konnten, dass anti-gp350-IgG-Antikörper virusneutralisierende Eigenschaften besitzen, gilt BLLF1 als immunogenes und therapeutisch interessantes Antigen (Odumade et al. 2011; Panikkar et al. 2015; Thorley-Lawson und Geilinger 1980). Im Dot-Blot korrelierten die anti-BLLF1-IgG-Titer signifikant positiv mit den Tagen nach Symptombeginn, wobei die Mehrheit der Patienten aber zum letzten Untersuchungszeitpunkt immer noch anti-BLLF1-IgG-negativ war (Abbildung 5.17). Panikkar et al. konnten bei IM-Patienten keine spezifischen Antikörper gegen BLLF1 in der Akutphase der Infektion nachweisen, diese entwickelten sich frühestens nach sechs Monaten und waren insgesamt niedriger als die anti-BLLF1-IgG-Titer EBV-gesunder Kontrollen (Panikkar et al. 2015). Dagegen detektierten Grimm et al. bei fünf von neun erkrankten Erstsemesterstudenten der *University of Minnesota* anti-gp350-IgG sogar einige Tage vor Ausbruch der IM. Die anti-BLLF1-IgG-Immunantwort verlief bei primärer EBV-Infektion, wobei nicht zwischen asymptomatisch und symptomatisch differenziert wurde, biphasisch, mit hohen Titern innerhalb der ersten und einem Maximum nach 40 Wochen

## Diskussion

---

(Grimm et al. 2016). Ob ein solcher Peak in der IMMUC-Kohorte ebenfalls auftrat, bleibt unbeantwortet, da die letzte Blutabnahme bereits ein halbes Jahr nach Primärinfektion und nur in Ausnahmefällen ( $n = 10$ ) zu einem späteren Zeitpunkt erfolgte. Die positive Korrelation zwischen Tagen nach Symptombeginn und anti-BLLF1-IgG-Titern ergab allerdings keinen Hinweis auf einen wie den von Grimm et al. beschriebenen biphasischen Verlauf.

Im Vergleich zur relativ schwachen Serumantwort gegen BLLF1 erwies sich ein anderes Glykoprotein, BILF2, als immundominantes Antigen mit einer charakteristischen Kinetik im Krankheitsverlauf. Mehr als zwei Drittel der Patienten bildeten anti-BILF2-IgG-Antikörper in der Rekonvaleszenz der IM (Tabelle 5.4). Die anti-BILF2-IgG-Titer korrelierten positiv mit den Tagen nach Symptombeginn und überschritten erst frühestens einen Monat nach der EBV-Primärinfektion den *Cut-Off* (Abbildung 5.16). Eine humorale Immunantwort von IM-Patienten gegen BILF2 wurde zuvor noch nie beschrieben, wohl aber von EBV-positiven gesunden Probanden (Liu et al. 2018). Im von Goswami et al. etablierten Multiplex-Verfahren, das ebenfalls neue EBV-Antigene als immunogen charakterisieren konnte, fehlt BILF2, da es vermutlich zu denjenigen Antigenen zählte, die sich laut Autoren in HEK293 Zellen nicht exprimieren ließen (Goswami et al. 2017). Ähnliche Beobachtungen ergaben sich auch in Vorexperimenten dieser Arbeit, weshalb BILF2 Codon-optimiert wurde, um es in ausreichender Konzentration im Dot-Blot einsetzen zu können. Die Ergebnisse klassifizieren das BILF2-Protein nicht nur als immunogenes Antigen, sondern auch als zuverlässigen Marker, den Infektionsstatus näher einzuordnen, denn anti-BILF2-IgG-Antikörper schließen eine akute Infektion mit hoher Wahrscheinlichkeit aus. Dies stellt einen diagnostischen Vorteil gegenüber dem Nachweis von Antikörpern gegen BFRF3 dar, welche bereits in der Akutphase der Erkrankung vorhanden sein können und somit keine zeitliche Einordnung der EBV-Infektion ermöglichen. Als später Marker könnte BILF2 eine erfolgreiche Serokonversion bestätigen, was insbesondere bei atypischen serologischen Profilen, wie beispielsweise einer fehlenden anti-EBNA1-IgG-Antikörperproduktion von großem Nutzen wäre. Während bei der anti-BILF2-IgG-Serumantwort keine Parallelen zu den Analysen von Goswami et al. gezogen werden können, beschrieb die Arbeitsgruppe eine humorale Immunantwort gegen BRRF2, ebenfalls ein virales Strukturprotein, die auch in der untersuchten IM-Kohorte zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion detektiert wurde, besonders in der Rekonvaleszenz der IM (Abbildung 5.22). Im Gegensatz zu Goswami et al, die aufgrund von Häufigkeit und Stärke der anti-BRRF2-IgG-Serumantworten gesunder EBV-positiver Spender BRRF2 als immundominantes Protein beschrieben, hatten allerdings nur wenige IM-Patienten (7 %) nachweislich anti-BRRF2-IgG. Ob dies damit zusammenhängt, dass sich die anti-BRRF2-IgG-Immunantwort erst mit zunehmender Zeit nach EBV-Primärinfektion entwickelt, bleibt eine Hypothese (Goswami et al. 2017).

### 6.2.2.4 Latenzantigene

Die humoralen Antikörperantworten von IM-Patienten gegen die Latenzantigene LMP1 und LMP2a erscheinen vernachlässigbar, positive IgG-Signale wurden nur bei wenigen Patienten von mildem bis schwerem Verlauf in der Akutphase der Erkrankung detektiert, die im weiteren Verlauf meist wieder verschwanden. Dagegen induzierten Antigene der EBNA-Proteinfamilie antigenabhängig eine starke humorale Immunantwort bereits in der akuten Phase der Infektion oder in der Rekonvaleszenz (Tabelle 5.4).

Wie in der Literatur beschrieben, war eine anti-EBNA1-IgG-Antwort im Dot-Blot erst einige Monate nach der EBV-Primärinfektion nachweisbar. Die auf der im ELISA vereinzelt registrierten positiven anti-EBNA1-IgG-Antwort an T0 bei IM-typischer Symptomatik angelehnte Hypothese, dass IM-Patienten bereits in der Akutphase der Erkrankung anti-EBNA1-IgG bilden können, lässt sich anhand der Dot-Blot-Ergebnisse nicht bestätigen. So lag die anti-EBNA1-IgG-Antwort im untersuchten Kollektiv an T0 stets unter dem *Cut-off*. Dass nicht alle IM-Patienten in der Rekonvaleszenz anti-EBNA1-IgG-Antikörper bildeten, war aufgrund publizierter Daten erwartet worden. Dass allerdings nur 7 % der Patienten positive anti-EBNA1-IgG-Signale am letzten Untersuchungszeitpunkt zeigten, war überraschend und muss kritisch hinterfragt werden (Tabelle 5.4, Abbildung 5.26). In bisherigen Studien macht der Anteil immunkompetenter EBV-positiver Spender mit fehlender anti-EBNA1-IgG-Immunantwort nur etwa 5 % aus (Bauer 2001; Hess 2004; Niller und Bauer 2017; Paschale und Clerici 2012). Der Erklärungsansatz, ein kompromittiertes Immunsystem im Zuge eines noch unentdeckten Immundefekts könnte die Ursache der fehlenden anti-EBNA1-IgG-Antwort sein, mag für den Einzelfall denkbar, aber nicht für das gesamte Patientenkollektiv zutreffend sein. Die routinemäßig erhobenen Immunoblotbefunde mit einer EBNA1-IgG-Serumkonversion von 66 % am letzten Untersuchungszeitpunkt sprechen vielmehr für falsch negative anti-EBNA1-IgG-Befunde des Dot-Blots (Daten nicht gezeigt). Da zuvor im Dot-Blot getestete Positivkontrollen gesunder Spender nachweislich anti-EBNA1-IgG hatten (Daten nicht gezeigt), eignet sich der Assay prinzipiell für den Nachweis von Antikörpern gegen das Latenzantigen EBNA1. Eventuell waren die niedrigen anti-EBNA1-IgG-Signale des Dot-Blots in niedrigen Titern begründet, die zwar im Immunoblot, jedoch nicht im Dot-Blot positive Signale hervorriefen. Dass die Patienten zu einem späteren Zeitpunkt höhere anti-EBNA1-IgG-Titer entwickelt hätten, die auch im Dot-Blot hätten registriert werden können, erscheint plausibel. Dennoch sollten anti-EBNA1-IgG-Serumantworten bereits ab der vierten Woche, typischerweise allerdings zwischen dem dritten und sechsten Monat nach EBV-Primärinfektion durch einen zuverlässigen serologischen Test auch erkannt werden (Bauer 2001; Luzuriaga und Sullivan 2010; Niller und Bauer 2017; Odumade et al. 2011; Paschale und Clerici 2012). Vermutlich ist die schwache anti-EBNA1-

## Diskussion

---

IgG-Antikörperantwort auf die geringe Antigenkonzentration von EBNA1 zurückzuführen, so dass nur hohe IgG-Titer als positive Signale im Dot-Blot erkannt wurden, was leider erst nachträglich im Zuge der Codonoptimierung verbessert werden konnte. Wenn nur große Mengen an anti-EBNA1-IgG erkannt werden, stellt dies einerseits eine Schwäche des Testsystems dar, andererseits lässt sich mutmaßen, dass die humorale Immunantwort gegen EBNA1 in der Rekonvaleszenz der Erkrankung schwächer ist als jene gegen andere EBV-Proteine. So war die Prävalenz von anti-EBNA1-IgG-positiven Serumproben in Goswamis Multiplex-Analysen zwar höher als in der untersuchten Kohorte, die absoluten IgG-Werte bezogen auf die Proteinexpression aber ebenfalls deutlich niedriger als gegen andere immundominante Antigene, wie beispielsweise BFRF3, BLRF2, BPLF1p3 und BRRF2 (Goswami et al. 2017).

Im Gegensatz zur verzögerten anti-EBNA1-IgG-Immunantwort geht man davon aus, dass etwa ein Drittel der IM-Patienten unmittelbar nach Symptombeginn anti-EBNA2-IgG-Antikörper bilden, sodass eine entsprechende anti-EBNA2-IgG-Serumantwort bei den untersuchten IM-Patienten erwartet worden war (Bauer 2001; Henle et al. 1987; Niller und Bauer 2017; Paschale und Clerici 2012). Sogar mehr als die Hälfte der IM-Patienten reagierte bereits an T0 auf EBNA2, deutlich mehr als auf die frühen Antigene BALF2 und BMRF1, was einen diagnostischen Vorteil von EBNA2 zu Beginn der IM bedeuten würde (Tabelle 5.4). Der biphasische Verlauf ergab sich durch eine Abnahme der Titer an T1, die vermutlich mit der insgesamt schwächeren EBV-spezifischen humoralen Immunantwort an T1 und einem erneuten Anstieg von anti-EBNA2-IgG in der Rekonvaleszenz der Erkrankung zusammenhing (Abbildung 5.28).

Die Antigene der EBNA3-Proteinfamilie können ebenfalls eine humorale Immunantwort, vor allem in der Rekonvaleszenz, induzieren. Während IgG-Antikörper gegen EBNA3A und EBNA3B erst in der Rekonvaleszenz die Detektionsgrenze überschritten, reagierten wenige Patienten bereits an T0 auf EBNA3C. Antikörper gegen EBNA3A und EBNA3B stiegen im Krankheitsverlauf stets an, anti-EBNA3C-IgG-Antikörper verschwanden in einigen Fällen wieder. Außerdem richtete sich die humorale Immunantwort eines Patienten häufig nicht nur gegen eines der EBNA3-Antigene, sondern gegen zwei oder alle drei Proteine gleichzeitig (Abbildung 5.29, Abbildung 5.30). Die Antikörperreaktion gegen EBNA-LP verlief ähnlich wie die gegen EBNA3C (Abbildung 5.31). Da die Rolle der humoralen Immunantwort gegen Latenzproteine mit Ausnahme von EBNA1 bis heute nur wenig untersucht wurde, fehlen entsprechende Vergleiche mit der Literatur. Dass die Antigene der EBNA3-Proteinfamilie eine wichtige Rolle im Rahmen einer EBV-Infektion spielen, belegen allerdings verschiedene Studien zur zellulären Immunantwort, die eine dominante T-Zell-Antwort gegen Epitope der EBNA3-Antigene nach EBV-Primärinfektion beschreiben (Lam et al. 2018; Tamaki et al. 1995). Loebel et al. verglichen unter Mitarbeit einer Doktorandin der eigenen Arbeitsgruppe EBV-spezifische

## Diskussion

---

Antikörperantworten von Patienten mit ME/CFS, das infolge einer IM oder anderen Virusinfektionen auftreten kann, mit EBV-gesunden Kontrollen (Hess 2004; Loebel et al. 2017; Luzuriaga und Sullivan 2010; Vouloumanou et al. 2012). Im Vergleich zu gesunden EBV-positiven Spendern zeigten ME/CFS-Patienten höhere IgG-Antworten gegen eine bestimmte EBNA3C-Peptidwiederholungssequenz und insgesamt höhere IgG-Titer gegen das EBNA3C-Volllängenprotein (Loebel et al. 2017). Ob bestimmte IM-Patienten die beschriebene EBNA3C-Wiederholungssequenz eventuell ebenso effizient erkennen wie ME/CFS-Patienten und ob dies gegebenenfalls ein Prädiktor für die Entwicklung eines ME/CFS wäre, sollte Gegenstand weiterer Analysen sein.

### 6.2.3 Ursachen für die Diskrepanz serologischer Testergebnisse

Insgesamt wurden im Dot-Blot seltener EBV-spezifische IgG-Antikörper gegen bereits als immunogen beschriebene Antigene, dafür aber solche gegen bislang nicht serologisch untersuchte Antigene detektiert. Es lässt sich nicht bestreiten, dass die entsprechend der Literatur erwarteten IgG-Serumantworten gegen EBNA1, VCAs und EAs der untersuchten IM-Patienten im Immunoblot der Routinediagnostik besser reproduzierbar waren als im Dot-Blot. Das lag möglicherweise an einem zu streng gewählten *Cut-off* in den eigenen Analysen. Jedoch zeigte der hier verwendete klinisch eingesetzte Immunoblot im Vergleich zu publizierten Daten ebenfalls abweichende Ergebnisse für einige Antigene, wie beispielsweise eine seltenere EBNA1-Serokonversion (66 % versus 95 %) der IM-Patienten (Abbildung 5.32). Warum unterschiedliche serologische Tests zu unterschiedlichen Resultaten führen können, soll zusammenfassend erörtert werden.

Ein erster Aspekt, der die Einschätzung serologischer Studienergebnisse erschwert, ist die mangelnde Vergleichbarkeit der untersuchten Probanden. So muss unterschieden werden, ob es sich um gesunde EBV-positive Spender, um IM-Patienten mit primärer EBV-Infektion oder um Patienten mit EBV-assoziierten Erkrankungen (ME/CFS, NPC, Burkitt-Lymphom, PTLD) handelt, und ob die Patienten immunkompetent oder immunsupprimiert sind. Die geografische Herkunft muss ebenfalls berücksichtigt werden, da weltweit verschiedene EBV-Varianten existieren (Cirac et al. 2018; Correia et al. 2018; Smatti et al. 2018), die, wie im Dot-Blot gezeigt, die humorale Immunantwort beeinflussen können.

Aus Studien zur IM und zur Evaluation verschiedener serologischer Testmethoden (z. B. IFA, EIA/ELISA, CLIA und Immunoblot) können zumindest Daten zur Seroprävalenz von Antikörpern gegen die klassischen EBV-Seromarker (anti-VCA-IgG/IgM, anti-EBNA1-IgG und anti-

## Diskussion

---

EA-IgG) nach primärer EBV-Infektion abgeleitet werden. Allerdings handelt es sich häufig nicht um prospektive Längsschnittstudien mit mehreren Untersuchungszeitpunkten im Krankheitsverlauf, sondern um Querschnittstudien, in denen der Infektionsstatus (akute oder zurückliegende EBV-Infektion) nur einmalig auf Basis des serologischen Profils und bestenfalls in Kombination mit IM-typischen Symptomen erhoben wird. Ein Beispiel hierfür wären die Analysen zum *recomBlot/recomLine* (Firma Mikrogen) von Bauer, in welchen der Immunoblot mit der IFA als Referenzmethode verglichen wurde. Seren von Patienten mit akuter und persistierender EBV-Infektion wurden ohne Verlaufskontrollen auf EBV-spezifische Antikörper hin untersucht, sodass zwar zwischen den Antikörperprofilen von akut Infizierten und gesunden Virusträgern differenziert, aber nicht die individuelle Kinetik der EBV-spezifischen Immunantwort nach primärer EBV-Infektion beurteilt werden konnte (Bauer 2001). Außerdem fehlen häufig detaillierte zeitliche Angaben zur EBV-Primärinfektion, die insbesondere die Akutphase der Erkrankung betreffen, sodass Stärke, Vielfalt und Kinetik der Antikörperproduktion zu Beginn der IM schwer zu beurteilen bzw. nur bedingt auf die Antworten der IMMUC-Kohorte übertragbar sind, für die die exakten Tage nach Symptombeginn bekannt waren (Bauer 2001; Hess 2004; Niller und Bauer 2017). Insbesondere in Übersichtsartikeln, die die Seroprävalenz EBV-spezifischer Antikörper von IM-Patienten verschiedener Querschnitt- und Längsschnittstudien zusammenfassen, ist nicht eindeutig definiert, welchen Zeitraum nach Infektion bzw. Symptombeginn die Autoren als Akutphase der Erkrankung interpretieren (Hess 2004).

Innovative Multiplex-Assays, die das gesamte EBV-Antigenom abdecken, wurden bislang noch nicht an IM-Patienten angewandt. Die EBV-spezifische humorale Immunantwort von IM-Patienten ist selbst in der Rekonvaleszenz der Erkrankung vermutlich noch nicht mit derjenigen von EBV-positiven Spendern, bei denen die Primärinfektion eventuell jahrzehntelang zurückliegt, zu vergleichen. Somit ist es nicht verwunderlich, dass in Publikationen zu Serumantworten EBV-positiver Spender eine noch stärkere Heterogenität individueller Antikörpermuster im Vergleich zur untersuchten IM-Kohorte detektiert wurde (Goswami et al. 2017; Liu et al. 2018).

Zudem werden in den meisten IM-Studien Adoleszente oder Erwachsene untersucht (Fedyagina et al. 2021). Inwiefern das Alter die IM-Diagnostik beeinflussen kann, wurde von Shi et al. demonstriert, die Sensitivität und Spezifität verschiedener diagnostischer Tests an IM-Patienten im Alter von acht Monaten bis 15 Jahren evaluierten. Erhoben wurden die Lymphozytenzahl im peripheren Blut, die Viruslast im Plasma und das Vorkommen EBV-spezifischer Antikörper (VCA-IgM/IgG, EA-IgG, EBNA1-IgG) mittels IFA. Basierend auf den Studiendaten empfahlen die Autoren je nach Alter und Krankheitsstadium unterschiedliche Tests um die Verdachtsdiagnose IM zu bestätigen. Bei Kindern unter drei Jahren soll stets die Viruslast im

## Diskussion

---

Plasma bestimmt werden, zwischen drei und sechs Jahren sind die Bestimmung von Lymphozytenzahl und Viruslast bis sieben Tage nach Symptombeginn diagnostisch gleichwertig. Erst ab sechs Jahren und mindestens drei Tage nach Symptombeginn wird die VCA-IgG-Aviditätsbestimmung und damit ein serologischer Test empfohlen (Shi et al. 2021). Hieraus lässt sich ableiten, dass der Nachweis EBV-spezifischer Antikörper mitunter vom Alter der IM-Patienten abhängt, bei jungen Kindern mit frischer Infektion oft nicht gelingt und beim Vergleich verschiedener Publikationen die untersuchten Altersgruppen berücksichtigt werden müssen.

Der zweite Aspekt ist die fehlende Standardisierung EBV-spezifischer serologischer Tests (Hess 2004; Liu et al. 2019). Sie unterscheiden sich in den verwendeten Serumkonzentrationen, Antigenen, Technologien und Interpretation der Testergebnisse, die je nach *Cut-Off* des Herstellers variieren können (Hess 2004), siehe auch die oben stehenden Überlegungen zur Auswahl des eigenen streng gesetzten *Cut-Offs*.

Darüber hinaus hat die Probenverdünnung Einfluss auf das Testergebnis (Bauer 2001) und in verschiedenen Studien wurden unterschiedliche Serumverdünnungen eingesetzt, von 1:30 (Lv et al. 2019), über 1:100 (Bauer 2001; Buisson et al. 1999; Doolan 2011; Mikrogen GmbH o. D.; Niller und Bauer 2017) bis 1:500 (Goswami et al. 2017). Um die Testspezifität zu steigern wurde im Dot-Blot, im Gegensatz zum Immunoblot der Routinediagnostik (1:100), eine Verdünnung von 1:1000 gewählt. Die höhere Plasmakonzentration im Immunoblot könnte u. a. dessen höhere Sensitivität begründen.

Entscheidend für die Vergleichbarkeit serologischer Tests sind vor allem die verwendeten Antigene. Diese sind native oder rekombinante Proteine, Fusionsproteine oder synthetische Peptide (Abusalah et al. 2020; Hess 2004). In Western-Blots werden häufig Zelllysate, in Streifenblots rekombinante Antigene eingesetzt. Auch die verwendeten Protokolle sind selten einheitlich (Abusalah et al. 2020; Hess 2004). Synthetische Antigene sind weniger sensitiv und spezifisch, weil charakteristische Epitope des nativen Proteins verändert sein können (Hess 2004), eine Überlegung, die im Hinblick auf den Dot-Blot berücksichtigt werden muss: Im Dot-Blot werden die Proteine nämlich in denaturierter Form verwendet, wodurch Antigenbindungsstellen und folglich die Sensitivität beeinflusst werden könnte. Handelt es sich um rekombinante Proteine, muss außerdem unterschieden werden, in welcher Zelllinie diese exprimiert wurden. Um viruspezifische Serumantworten zu erfassen, sind humane Zelllinien den Hefen oder bakteriellen Expressionssystemen, welche aufgrund von Kreuzreaktionen zu falsch positiven Befunden führen können, vorzuziehen (Goswami et al. 2017). Außerdem hängt das Testergebnis nicht nur davon ab, in welcher Form, sondern in welcher Menge das Antigen eingesetzt wird (Goswami et al. 2017; Lv et al. 2019). In der eigenen Arbeit wurde gezeigt, dass die Serumantwort erwartungsgemäß weitgehend proportional zur Antigenmenge ist, die abhängig

## Diskussion

---

vom jeweiligen Expressionsniveau variieren kann, sodass die antigenspezifischen IgG-Antworten der Patienten ins Verhältnis zur Proteinmenge gesetzt werden müssen. Obwohl der Quotient aus IgG-Serumantwort und Proteinexpression in einem großen Konzentrationsbereich konstant blieb, stellte sich im Zuge weiterer Analysen heraus, dass einige Proteine womöglich höher konzentriert eingesetzt werden müssten. Dies gilt beispielsweise für EBNA1, gegen das steigende Titer im Krankheitsverlauf der IM registriert werden konnten, allerdings mehrheitlich ohne den *Cut-Off* zu überschreiten, sodass diese Antworten nicht als anti-EBNA1-IgG-positiv gewertet wurden.

Inwiefern in Zukunft die Verwendung von Antigenen verschiedener EBV-Stämme in serologischen Tests standardisiert werden kann, ist momentan noch unklar. Da weltweit viele verschiedene EBV-Stämme existieren, stellt sich die Frage, ob serologische Tests weiterhin auf EBV B95.8 oder dem regional jeweils vorherrschenden Virusstamm basieren sollten. Dass unterschiedliche EBV-Stämme für die humane Immunerkennung relevant sind, wurde durch eine Doktorandin der Arbeitsgruppe anhand von T-Zellanalysen gezeigt (Cirac et al. 2018; Cirac et al. 2021).

Der Vergleich zwischen Dot-Blot- und Immunoblotbefunden unterstreicht den Einfluss des *Cut-offs* auf das Testergebnis und die Herausforderung diesen so zu definieren, dass eine optimale Sensitivität und Spezifität der Testmethode erreicht wird. Die stringente Definition des *Cut-Offs* im Dot-Blot, um insbesondere bei niedrig exprimierten Proteinen Hintergrundsignale zu reduzieren, könnte einige reale Antworten, die im Immunoblot detektiert wurden, eliminiert haben. Da der Dot-Blot in der eigenen Arbeit als neue Methode etabliert wurde, sollten zunächst stringente Kriterien angelegt werden, um nur signifikante Serumantworten zu untersuchen. In Zukunft, wenn eine größere Zahl an EBV-negativen Kontrollen eine genauere Bestimmung des Hintergrunds zulässt und im Zuge der Codonoptimierung der Einsatz niedrig exprimierter Proteine reduziert wird, soll der *Cut-Off* Antigen-abhängig genauer ermittelt werden, sodass die Sensitivität des Dot-Blots gesteigert werden kann.

Um Diskrepanzen zwischen verschiedenen serologischen Testmethoden aufzuzeigen, hatten Liu et al. 66 Plasmapools von Probanden (NPC-Patienten, Patienten ohne NPC mit hohen und niedrigen EBV-IgA-Titern, gesunde Kontrollprobanden und Patienten mit familiären NPC-Risiko) auf IgA-, IgG- und IgM-Immunitäten gegen VCA, EBNA1, EA-EBNA1, BZLF1 und EA hin untersucht (Liu et al. 2019). Insgesamt wurden die Befunde von 26 Assays und sechs verschiedenen Laboratorien evaluiert, wobei sowohl neue experimentelle Ansätze als auch kommerzielle Tests verwendet wurden. Nähere Informationen zu den Antigeneigenschaften (rekombinant, synthetisch, nativ, denaturiert) standen nicht bei allen Assays zur Verfügung, was die Autoren kritisch anmerkten. Die Übereinstimmung von Assays zum Nachweis von anti-



## Diskussion

---

VCA-IgA betrug 12-98 % und von anti-EBNA1-IgA 29-95 %. Assays zum Nachweis von Serumantworten gegen andere Proteine korrelierten schwach bis moderat. Zu erwähnen ist außerdem, dass die Ergebnisse von jeweils zwei anti-VCA-IgA- und anti-EBNA1-IgA-Assays, die vom gleichen Hersteller stammten, aber in zwei unterschiedlichen Laboratorien mit unterschiedlichen *Cut-Offs* ausgewertet wurden, ebenfalls nur moderat miteinander korrelierten. Dies bestätigt nochmals die Vermutung, dass die mangelnde Übereinstimmung zwischen Dot-Blot- und Immunoblotbefunden in der eigenen Arbeit u. a. auf die stringente Definition des *Cut-Offs* der im Dot-Blot eingesetzten Antigene zurückzuführen ist. Da die beste Übereinstimmung für Assays mit identischen Antigenen bzw. Epitopen erzielt wurde, verwiesen Liu et al. wie in der eigenen Arbeit darauf, dass beim Nachweis von anti-VCA-Antikörpern berücksichtigt werden muss, ob diese gegen den VCA-Komplex oder nur gegen einzelne VCA-Antigene gerichtet sind. Denn der VCA-Komplex weist verschiedene immundominante Domänen auf, was je nach verwendetem Antigen zu unterschiedlichen anti-VCA-Titern führen könnte. Zusammenfassend demonstrierte diese Untersuchung, dass deutliche Unterschiede in den erfassten Serumantworten in verschiedenen Assays auftreten können, sowohl in Bezug auf die Antikörpertiter als auch auf den Serostatus, was sich mit den Beobachtungen der eigenen Arbeit deckt (Liu et al. 2019).

### 6.3 Abnahme der IgG-Titer einen Monat nach EBV-Primärinfektion

Unabhängig vom Antigen und sogar bei Antigenen, deren Serumantworten positiv mit den Tagen nach Symptombeginn korrelierten und zum letzten Untersuchungszeitpunkt ihr Maximum erreichten, war oftmals eine deutliche Signalabnahme von T0 auf T1 erkennbar (5.4.6). Zu dieser Beobachtung sind verschiedene Erklärungsansätze denkbar.

Zum einen könnte die Signalabnahme mit einer initial starken Aktivierung des Immunsystems im Rahmen der akuten Infektion zusammenhängen, die innerhalb weniger Wochen wieder abklingt. Hierfür spricht die Beobachtung, dass sowohl die Titer der gesamten EBV-spezifischen Antikörper als auch die IgG-Titer gegen den Tetanus-Impfstoff einen Monat nach Symptombeginn signifikant niedriger waren im Vergleich zu T0 (Abbildung 5.33a und b). Zudem überschritten viele Antigene nur einmalig an T0 den *Cut-Off*, was für eine generell erhöhte Erkennung der EBV-Antigene in der Akutphase der IM spricht. Unspezifische Reaktionen im Rahmen einer IM bzw. einer EBV-Infektion sind nicht überraschend, sie wurden bereits im Zusammenhang mit einer antizellulären Reaktivität bei der IFA als Referenzmethode und gegenüber HEK293 Lysaten beschrieben (Bauer 2001; Goswami et al. 2017). Eine EBV-Infektion kann zu einer polyklonalen Stimulation IgG-produzierender B-Lymphozyten oder zu einer antigenunabhängigen Expansion IgM-produzierender Zellen führen (Al Tabaa et al. 2011; Garzelli et al. 1994; Niller und Bauer 2017; Rosén et al. 1977). Aktivierte T-Lymphozyten im Umgebungsmilieu sekundär lymphatischer Organe könnten die Stimulation der B-Lymphozyten und deren Differenzierung in Antikörper-sezernierende Plasmazellen initiieren (Al Tabaa et al. 2011; Bernasconi et al. 2002). Die Folge sind erhöhte Titer polyklonaler IgG-Antikörper gegen diverse Antigene (Al Tabaa et al. 2011; Niller und Bauer 2017). In der Akutphase der IM machen latent infizierte B-Zellen bis zu 50 % aller peripheren B-Gedächtniszellen aus. Innerhalb der folgenden fünf bis sechs Wochen nimmt die Anzahl dieser Zellpopulation aber dramatisch ab (Al Tabaa et al. 2011; Hadinoto et al. 2008; Hochberg et al. 2004). Dass sich die Abnahme der IgG-Titer von T0 auf T1 nicht nur bei den in HEK293T Zellen exprimierten EBV-Antigenen, sondern auch gegen den synthetischen Tetanus-Impfstoff zeigte und stichprobenartig auch anhand der Gesamt-IgG-Titer der Klinischen Chemie reproduzierbar war, unterstützt die Hypothese der polyklonalen Stimulation IgG-produzierender Zellen (Abbildung 5.33c und d). Allerdings muss diese Überlegung insofern relativiert werden, dass gegen zahlreiche EBV-Antigene zu keinem Zeitpunkt der Erkrankung Serumantworten über dem Schwellenwert detektiert werden konnten und bei einer ungerichteten Antikörperproduktion eine erhöhte Erkennung aller im Test eingesetzter Antigene an T0 zu erwarten wäre. Die Gesamt-IgG-Titer der

## Diskussion

---

sechs Patienten mit sequenzieller IgG-Messung (an T0 und T1) waren zu beiden Untersuchungszeitpunkten normwertig, wobei die Werte an T0 eher im oberen und die an T1 im unteren Normbereich lagen, was für eine initial stärkere Antikörperproduktion oder einen vermehrten Antikörperverbrauch (siehe unten) im Verlauf sprach. Um den Titerverlauf besser einzuschätzen, müssten die Gesamt-IgG-Titer in der Rekonvaleszenz herangezogen werden, für die allerdings keine Daten vorlagen und die in zukünftigen Analysen zu berücksichtigen sind. Einen Anhaltspunkt stellen die IgG-Titer gegen den synthetischen Tetanus-Impfstoff dar, die sich an T5-T12 ähnlich wie an T1 verhielten und damit niedriger waren als an T0.

Plausibel wäre außerdem, dass der exponentielle Abfall latent infizierter B-Zellen innerhalb des ersten Monats nach Krankheitsbeginn direkt für den Titerabfall von T0 auf T1 verantwortlich ist. Der Untergang vieler EBV-infizierter Zellen und die damit verbundene Bindung von EBV-spezifischen Antikörpern könnte zu niedrigeren Spiegeln im peripheren Blut führen. Diese Hypothese ist in weiteren Analysen zu überprüfen, in denen die absolute und relative Anzahl infizierter B-Lymphozyten an T0 und T1 bestimmt und die Reduktion der Zellzahl mit der Abnahme der Serumantwort korreliert werden sollten. Die vermehrte Elimination von Antikörpern durch den Zerfall EBV-infizierter Zellen würde die Abnahme der EBV-spezifischen IgG-Antikörper erklären, warum aber Gesamt-IgG- und IgG-Titer gegen den synthetischen Tetanus-Impfstoff ebenfalls rückläufig waren, lässt sich mit diesem Erklärungsansatz nicht beantworten.

Die vorangegangenen Überlegungen sollten in zukünftigen Analysen weiter untersucht werden. Primär sollte anhand einer größeren Kohorte überprüft werden, ob der Abfall der EBV-spezifischen IgG-Titer sowie der Abfall der Gesamt-IgG- und Tetanol-Impftiter von T0 auf T1 reproduzierbar ist. Hierfür sollten die Gesamt-IgG-Titer für alle Patienten an T1 und zusätzlich an T5-T12 bestimmt werden, um besser beurteilen zu können, ob einen Monat nach Symptombeginn weniger Antikörper produziert werden oder ob die Titer initial nur erhöht sind und dann wieder auf ein konstantes Niveau abfallen.

### **6.4 Keine Vorhersagbarkeit eines schweren Krankheitsverlaufs durch einzelne serologische Biomarker**

Die Gefahr von fulminanten Verläufen verdeutlicht die Notwendigkeit der optimalen ärztlichen Versorgung eines IM-Patienten – begonnen bei der richtigen Diagnose bis zur Genesung – mit engmaschigen Verlaufskontrollen, um frühzeitig intervenieren zu können. Während das Antikörperprofil ausschlaggebend für die Diagnose der IM ist, trägt die zelluläre Immunantwort, insbesondere eine ausgeprägte CD8+ T-Zelltoxizität, zur Kontrolle der Virus-Replikation und zur Schwere der Symptomatik bei (Hess 2004; Luzuriaga und Sullivan 2010; Macsween et al. 2010; Odumade et al. 2011). Welchen Einfluss die humorale Immunantwort auf das Krankheitsgeschehen von IM-Patienten hat und ob einzelne Antikörper, bestimmte Muster der Antikörperantworten und die gesamte EBV-spezifische IgG-Immunantwort mit einem bestimmten Verlauf einhergehen oder diesen vorhersagen, sollte in dieser Arbeit anhand der großen Antigenauswahl des etablierten Dot-Blots erstmals analysiert werden.

#### **6.4.1 Korrelation einzelner antigenspezifischer Serumantworten mit dem Verlauf der Infektiösen Mononukleose**

Auffällig war, dass Patienten mit einer komplexeren Symptomatik ( $c_{max}$ ) an T0 und/oder T1 höhere Serumantworten gegen BMRF1 und niedrigere gegen BBLF1 zeigten. Gleichzeitig gingen hohe anti-BBLF1-IgG-Titer mit höheren CRP-Werten in der Akutphase der Erkrankung einher. Die anti-BRRF2-IgG-Immunantwort innerhalb des ersten Monats nach Symptombeginn war mit einem milderem Verlauf assoziiert, da die Titer an T0 bzw. T1 negativ mit dem maximalen Schweregrad ( $s_{max}$ ) bzw. der Komplexität der Symptomatik ( $c_{max}$ ) korrelierten. Dass höhere anti-BMRF1-IgG-Titer an T0 und T1 mit einer komplexeren Symptomlast assoziiert sind, erscheint durchaus plausibel. Ähnliche Schlussfolgerungen ziehen Niller und Bauer, die anti-EA-Antikörper mittels IFA zwar nur selten in Patientenproben detektierten, deren Nachweis aber oft mit klinischen Komplikationen einherging (Niller und Bauer 2017). Einige antigenspezifische Serumantworten korrelierten zudem mit der Protraktion der IM ( $p_{max}$ ). Patienten mit einer stärkeren anti-BMRF1-IgG-Produktion in der Rekonvaleszenz der Erkrankung verzeichneten eine kürzere Symptombdauer. Damit könnte eine starke anti-BMRF1-IgG-Immunantwort in der Akutphase der Erkrankung für eine umfangreiche Symptomatik stehen, während ein kürzerer Krankheitsverlauf ( $p_{max}$ ) mit noch moderat erhöhten anti-BMRF1-IgG-Titern ein halbes Jahr nach Symptombeginn assoziiert ist. Ähnliches gilt auch für ein anderes

## Diskussion

---

Protein des EA-Komplexes. So korrelierte die anti-BXLF1-IgG-Immunantwort in der Rekonvaleszenz der Erkrankung mit einem kürzeren Krankheitsverlauf. Hohe anti-BRRF2-IgG-Titer an T0 und/oder T1 gingen nicht nur mit einem weniger schweren ( $s_{max}$ ) bzw. komplexen Krankheitsbild ( $c_{max}$ ), sondern auch mit einer kürzeren Symptombdauer ( $p_{max}$ ) einher. Antikörper gegen das Strukturprotein BRRF2 könnten damit protektiven Charakter haben. Goswami et al. klassifizieren BRRF2 bereits als immundominantes Antigen, da die meisten EBV-positiven Spender nachweislich hohe anti-BRRF2-IgG-Titer hatten (Goswami et al. 2017).

Die kontroverse Diskussion, ob anti-BLLF1-IgG-Antikörper ein krankheitsmodifizierender Biomarker nach EBV-Infektion sein könnten, wird auch in der eigenen Arbeit aufgegriffen. Die Fähigkeit von manchen anti-BLLF1-IgG-Antikörpern, Viruspartikel zu neutralisieren, legt die Vermutung nahe, dass Antikörper gegen BLLF1 mit einem günstigeren Krankheitsverlauf einhergehen könnten (Luzuriaga und Sullivan 2010; Odumade et al. 2011). Die Tatsache, dass Patienten mit akuter IM neutralisierende Antikörper frühestens sechs Monate nach Symptombeginn bilden und deren Titer dennoch niedriger sind als bei EBV-positiven Individuen, stärkt diese Hypothese (Panikkar et al. 2015). Laut Grimm et al. würden anti-gp350 (BLLF1)-IgG einen milden Verlauf der IM begünstigen, während Bu et al. keinen Zusammenhang zwischen Titer und Schweregrad der Erkrankung fanden (Bu et al. 2016; Grimm et al. 2016). Mäßig erfolgreiche Studien für die Entwicklung eines auf gp350-basierenden Impfstoffes zeigten, dass geimpfte Probanden zwar nicht zuverlässig vor einer EBV-Infektion geschützt werden können, allerdings weniger wahrscheinlich Symptome einer IM entwickeln als nicht geimpfte Studienteilnehmer (Dunmire et al. 2018; Luzuriaga und Sullivan 2010; Odumade et al. 2011). Die Dot-Blot-Ergebnisse ergaben einen signifikant negativen Zusammenhang zwischen den unmittelbar nach Symptombeginn gemessenen anti-BLLF1-IgG-Titern und der Protraktion ( $p_{max}$ ) der Erkrankung, was ebenfalls die protektive Rolle der anti-gp350-Antikörper betonen würde. Jedoch muss dieses Ergebnis kritisch bewertet werden, da die anti-gp350-IgG-Immunantwort der untersuchten Kohorte insgesamt sehr schwach war, insbesondere an T0 zeigten nur wenige Patienten überhaupt Antikörper über dem *Cut-Off*, welche im Verlauf zum Teil wieder sanken. Die einen Monat und ein halbes Jahr nach EBV-Primärinfektion gemessenen Titer korrelierten dagegen nicht mit der Krankheitsprotraktion ( $p_{max}$ ). Bevor außerdem von einem protektiven Schutz der im Dot-Blot detektierten anti-BLLF1-IgG-Antikörper ausgegangen werden kann, müsste in weiteren Experimenten überprüft werden, ob die anti-BLLF1-IgG-Antikörper auch virusneutralisierende Eigenschaften besitzen. Der klinisch günstige Charakter von Antikörpern gegen gp350 bei IM-Patienten bleibt damit weiterhin eine Hypothese.

### **6.4.2 Keine Korrelation zwischen gesamter EBV-spezifischer IgG-Serumantwort und Verlauf der Infektiösen Mononukleose**

Detaillierte immunologische Untersuchungen, die den Zusammenhang zwischen Immunantwort und der Krankheitsschwere von IM-Patienten evaluieren, fokussieren vor allem auf die zelluläre EBV-spezifische Immunantwort. Eine ausgeprägte CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort korreliert mit einer symptomatischen Primärinfektion, dagegen geht eine erhöhte NK-Zellzahl mit einer milderen Symptomatik einher (Silins et al. 2001; Williams et al. 2005). Hadinoto et al. assoziierten die IM-Symptomatik mit einem massiven Untergang latent infizierter B-Gedächtniszellen infolge von Apoptose, was zu einer Reaktivierung und einer Zerstörung weiterer latent infizierter B-Lymphozyten durch aktivierte zytotoxische T-Zellen führt (Hadinoto et al. 2008). Die Analysen von Balfour et al. bestätigten einerseits die positive Korrelation zwischen Schweregrad der IM und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort, beschrieben andererseits aber auch einen positiven Zusammenhang zwischen Krankheitsschwere und NK-Zell-Antwort (Balfour, Jr. et al. 2013). Nach Yang et al. könnte die Viruslast die T-Zellantwort und das Inflammationsgeschehen im Körper beeinflussen und damit einen prognostischen Parameter darstellen, da sie einen positiven Zusammenhang zwischen einer hohen Viruslast im Plasma und systemischen Komplikationen sowohl bei Patienten mit primärer EBV-Infektion als auch nach Reaktivierung fanden (Yang und Gao 2020). In einer kürzlich publizierten Studie konnte gezeigt werden, dass Kinder im Alter von drei Monaten bis 16 Jahren mit prolongierter IM (Fieber, Lymphadenopathie oder Pharyngitis sechs Monate nach Symptombeginn) im Vergleich zu genesenen Patienten nachweislich signifikant weniger CD8<sup>+</sup> atypische mononukleäre Zellen und ein erhöhtes Verhältnis von CD4/CD8<sup>+</sup> Lymphozyten hatten (Fedyanina et al. 2021). Da Ausmaß und Verteilung der zellulären Immunantwort einen Bezug zum Schweregrad der IM nahelegen, wurde selbiges für die gesamte EBV-spezifische Immunantwort der untersuchten Kohorte vermutet. Die Hypothese, dass die EBV-spezifischen Gesamt-IgG-Titer bzw. die Gesamtzahl positiver Antigene Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf geben könnten, bestätigte sich nicht (5.4.7.1). Warum manche Patienten auf die EBV-Primärreaktion mit einer starken bzw. vielfältigen IgG-Antwort reagierten und andere eine vergleichsweise schwache Antikörperproduktion aufwiesen, war nicht an Komplexität, Schweregrad und Protraktion der Erkrankung festzumachen (Tabelle 5.5). Zudem konnten für leicht und schwer kranke IM-Patienten keine charakteristischen Antikörpermuster definiert werden, da unabhängig vom klinischen Stadium (mild, moderat, schwer und sehr schwer) die IgG-Serumantworten in Stärke und Spezifität sehr vielfältig waren (Abbildung 5.35). Auffällig war allerdings, dass eine stärkere EBV-spezifische humorale Immunantwort in der Rekonvaleszenz der Erkrankung – sowohl Titerhöhe als auch Anzahl IgG-positiver Antigene – mit einer höheren Viruslast in PBMC assoziiert war (Abbildung 5.34). In

## Diskussion

---

einer aktuellen, ähnlich konzipierten Studie kristallisierte sich ebenfalls kein einzelner Risikofaktor für einen protrahierten Krankheitsverlauf nach EBV-Primärinfektion heraus. In multivariaten Analysen wurden die klinischen, immunologischen, vegetativen und endokrinen Befunde von 200 Patienten (12 bis 20 Jahre) mit oder ohne Fatigue (47 % vs. 53%) sechs Monate nach EBV-Primärinfektion miteinander verglichen. Ein halbes Jahr nach Erkrankung litten die Patienten mit Fatigue deutlich stärker unter Symptomen wie Infektanfälligkeit, Krankheitsgefühl, Palpitationen und Temperaturintoleranz, die beiden Gruppen unterschieden sich allerdings nicht in Viruslast, Serologie (VCA-IgM, VCA-IgG und EBNA-IgG) und klinischen Befunden (Temperatur, Milzgröße). Im Vergleich zu genesenen Patienten zeigten Patienten mit Fatigue nur geringfügig höhere CRP-Werte und T-Zellzahlen sowie leichte Alterationen von autonomen und neuroendokrinen Parametern, von denen aber keiner stark mit der Symptomatik korrelierte (Kristiansen et al. 2019).

Abschließend lässt sich feststellen, dass IM-Patienten unabhängig von ihrem klinischen Bild eine unterschiedlich stark ausgeprägte EBV-spezifische Immunantwort entwickeln. Ein serologisches Profil, das zwischen einem günstigen und einem ungünstigen Krankheitsverlauf differenzieren und damit die Versorgung potentiell von Komplikationen gefährdeter Patienten verbessern könnte, konnte in der eigenen Arbeit nicht definiert werden. Sowohl Diagnose als auch Verlaufsbeurteilung von IM-Patienten basieren weiterhin auf der Trias aus klinischer Symptomatik, klinisch-chemischer Befunde und EBV-spezifischer Serologie. Diese Erkenntnis entspricht im Allgemeinen der ärztlichen Realität, da im Zentrum von Diagnose und Therapie niemals ein einzelner Laborwert, sondern immer der Patient als Ganzes stehen sollte.

Nochmals explizit betont werden muss die Tatsache, dass sich sämtliche Analysen und Korrelationen der eigenen Arbeit auf die (vorläufige), offizielle klinische Graduierung der IM vom September 2019 vor Abschluss der IMMUC-Studie beziehen und nur die erste Hälfte der rekrutierten Patienten untersucht wurde. Im Rahmen des prospektiven Studiendesigns mit zunehmender Expertise in der Versorgung von IM-Patienten könnte sich die klinische Graduierung nach Ende der Rekrutierungsphase verändert haben, um die Risikoabschätzung des Verlaufs der IM zu optimieren. Zukünftige, die gesamte Kohorte umfassende Analysen, können dementsprechend von den Ergebnissen der eigenen Arbeit abweichen und neue Zusammenhänge zwischen der EBV-spezifischen IgG-Immunantwort und der Klinik der IM-Patienten finden. Möglich ist auch, dass das Dot-Blot-basierte neue Verfahren im Kontext anderer EBV-assoziiierter Erkrankungen wertvolle diagnostische Informationen liefern kann. Dazu sind ebenfalls weiterführende Untersuchungen geplant.

## 6.5 Ausblick

Das etablierte Dot-Blot-Verfahren ermöglicht es, Antikörperantworten gegen alle Proteine des EBV-Genoms zu detektieren und damit die humorale Immunantwort im Rahmen EBV-assoziiierter Erkrankungen besser zu verstehen. Inwiefern sich dieses vielfältige Muster innerhalb der gesamten Kohorte von 200 Patienten wiederholt und die neu definierten immunogenen Antigene bestätigt werden können, sollen zukünftige Analysen zeigen. Wie sich Serumantworten anderer Ig-Klassen nach einer EBV-Primärinfektion verhalten, wird eine weitere Fragestellung sein. Ob Kinetik und Vielfalt der IgA- und IgM-Produktion von IM-Patienten mit der IgG-Antwort vergleichbar sind, ob sich Antikörper vom IgA und IgM Typ gegen ähnliche Antigene richten wie Antikörper vom IgG Typ oder gar neue immundominante Antigene identifiziert werden können, wird in weiteren Dot-Blot-Experimenten untersucht. Ob und wie schnell IM-Patienten unmittelbar nach Symptombeginn anti-EBNA1-IgG-Antikörper bilden können, muss in einer größeren Kohorte untersucht werden, da dies im untersuchten Kollektiv einerseits zu selten beobachtbar und andererseits abhängig vom serologischen Test war, um die bisherige Datenlage, welche eine anti-EBNA1-IgG-Immunantwort in der Akutphase der IM ausschließt, eindeutig zu widerlegen.

Die Korrelationsanalysen wurden unter der Annahme durchgeführt, dass ein einzelner Marker oder die gesamte EBV-spezifische IgG-Serumantwort die Komplexität, Schweregrad und Protraktion der IM prognostizieren könnten. Ob die Zuverlässigkeit der Vorhersage durch die Kombination mehrerer Marker erhöht werden könnte, muss in komplexen biostatistischen Analysen überprüft werden. Die biostatistische Auswertung der Immunantwort sollte außerdem weitere Parameter berücksichtigen, wie z. B. das Alter und Geschlecht der Patienten sowie deren Zell- und Zytokinantwort, um die individuellen Krankheitsverläufe besser nachvollziehen zu können.

Die Hypothese, dass durch die Kombination der EBNA2- und EBNA3-Antigene von EBV B95.8 und EBV AG876 serologisch zwischen einer Infektion mit EBV Typ I oder II unterschieden werden kann, muss mit Sequenzanalysen bestätigt werden. Eine Erweiterung des Antigenpektrums um Sequenzen weiterer EBV-Stämme wie z. B. M81 wäre dann sinnvoll, da ein Zusammenhang zwischen ethnischen Unterschieden bei EBV-assoziierten Erkrankungen und der unterschiedlichen geographischen Verteilung der einzelnen EBV-Stämme vermutet wird (Chang et al. 2009; Cirac et al. 2018; Correia et al. 2018).

Um das Dot-Blot-Verfahren für den klinischen Einsatz zu optimieren, sollten irrelevante Antigene, gegen die nie IgG-Immunantworten nachweislich waren, aussortiert werden und die immunogenen EBV-Proteine auf einen Biochip übertragen werden. Die Chip-Technologie bietet zahlreiche Vorteile: Sie sind über mehrere Monate haltbar, können mit bis zu 100 Seren pro



## Diskussion

---

Tag gleichzeitig inkubiert werden und ermöglichen den Nachweis unterschiedlicher Antikörperklassen durch Kombination mehrerer Sekundärantikörper (Doolan 2011).

In der eigenen Arbeit waren die Verlaufsuntersuchungen auf sechs bis maximal zwölf Monate nach Beginn der IM beschränkt. Ob die anti-EBNA1-IgG-Titer und die Gesamtzahl IgG-positiver Antigene mit zunehmender Zeit nach EBV-Primärinfektion steigen, ließe sich durch Weiterverfolgung der Patienten über einen längeren Zeitraum beantworten. Interessant wäre außerdem, ob die IM-Patienten Folgeerkrankungen wie z. B. ME/CFS, CAEBV oder eine EBV-Reaktivierung entwickeln und ob diese in Zusammenhang mit ihren EBV-spezifischen Antikörperantworten stehen.

Das Dot-Blot-Verfahren sollte außerdem nicht nur Anwendung bei IM-Patienten finden, sondern könnte die Diagnostik und das Verständnis EBV-assoziiierter Tumorerkrankungen (NPC, Hodgkin-Lymphom, Burkitt-Lymphom) sowie Autoimmunerkrankungen (MS, RA, SLE) bereichern.

## 7 Zusammenfassung

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist weltweit verbreitet und hat große klinische Relevanz, da es mit zahlreichen malignen und nicht-malignen Erkrankungen assoziiert ist. Trotz Fortschritten in der serologischen Diagnostik einer EBV-Primärinfektion beschränken sich die meisten Testmethoden nur auf eine begrenzte Zahl von Antigenen, weshalb die humorale Immunantwort gegen das für mehr als 80 Proteine kodierende EBV weitgehend unbekannt ist.

Im Rahmen der eigenen Arbeit sollte eine serologische Testmethode entwickelt werden, die Immunglobulin G (IgG)-Antikörperantworten gegen sämtliche Antigene des lytischen und latenten EBV-Lebenszyklus detektieren und somit die EBV-spezifische humorale Immunantwort von Patienten mit Infektiöser Mononukleose (IM) zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Erkrankung charakterisieren kann. Während die IM bei den meisten Patienten selbstlimitierend verläuft, leiden einige der Patienten unter einem komplikationsreichen bzw. protrahierten Krankheitsverlauf, den es rechtzeitig zu erkennen gilt. Die Suche nach einem Biomarker als Risikofaktor für eine schwer oder protrahiert verlaufende IM ist essentiell und sollte in der eigenen Arbeit die humorale Komponente der EBV-spezifischen Immunantwort berücksichtigen.

Mit Entwicklung des fluoreszenzbasierten Dot-Blots ist es gelungen, EBV-spezifische Antikörper gegen das vollständige EBV-Proteom zu untersuchen. Zum einen zeichnet sich der Dot-Blot durch sein umfassendes Spektrum an Antigenen aus, die als eukaryotisch exprimierte Volllängenproteine der Erfassung von möglichst spezifischen Serumantworten dienen sollen. Zum anderen ermöglicht der Dot-Blot die gleichzeitige Detektion von Serumantworten und Antigenmenge, sodass die Antikörpersignale in Bezug auf die Proteinmenge quantifiziert werden können. Nach erfolgreicher Testung EBV-positiver und -negativer Seren konnte der Dot-Blot für die Untersuchung der Serumproben von 101 Patienten der „Infektiöse Mononukleose in München“ Studie (IMMUC) eingesetzt werden.

Die untersuchten IM-Patienten unterschieden sich in ihrem Antigenspektrum, Kinetik und Stärke der EBV-spezifischen IgG-Serumantwort, die sich gegen verschiedene Antigene des EBV-Lebenszyklus richtete. Es fand sich eine große Heterogenität in der individuellen EBV-spezifischen IgG-Reaktion von IM-Patienten, was eine bekannte große Herausforderung für die Routinediagnostik darstellt. Eine eindeutige Korrelation der Antikörpermuster mit dem klinischen Verlauf ergab sich in den eigenen Untersuchungen an einem Teil der IMMUC-Kohorte nicht, soll aber an der gesamten IMMUC-Kohorte erweitert geprüft werden.

Interessanterweise ließen sich erstmals Serumantworten gegen EBV-Antigene beschreiben, die bislang in serologischen Untersuchungen nicht berücksichtigt oder nicht als reaktiv beobachtet worden waren. Bemerkenswert war beispielsweise der erstmalige Nachweis von anti-

## Zusammenfassung

---

BILF2-IgG-Antikörpern, die hier frühestens einen Monat nach Beginn der IM-Symptome nachweisbar waren. Vorzuschlagen sind daher zukünftige Untersuchungen, die diese neu entdeckten Serumantworten auf ihren möglichen klinischen Stellenwert im Kontext EBV-assoziiertes Erkrankungen hin prüfen.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1 Antikörper als heterodimere Proteine. ....	13
Abbildung 2.2 Der EBV-Lebenszyklus mit latenter und lytischer Phase.....	16
Abbildung 2.3 Kinetik der EBV-spezifischen humoralen Immunantwort.....	22
Abbildung 4.1 PBMC-Isolation mittels Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation.....	44
Abbildung 4.2 Proteinaufreinigung nach dem Prinzip der Nickel-Chelatchromatographie. ....	46
Abbildung 5.1 Detektion von Proteinmenge und humoraler IgG-Immunantwort im fluoreszenzbasierten Dot-Blot-Nachweisverfahren.....	55
Abbildung 5.2 Überprüfung der EBV-Proteine mittels Dot-Blot und Western-Blot. ....	57
Abbildung 5.3 Gen-abhängige Erhöhung der Proteinexpression durch Codonoptimierung. ....	59
Abbildung 5.4 Keine Interferenz bei der Messung EBV-Antigen-gebundener humaner IgG- und anti-His <sub>6</sub> -Antikörper. ....	61
Abbildung 5.5 Anstieg der IgG-Serumantwort mit zunehmender Antigenmenge.....	63
Abbildung 5.6 Direkte Proportionalität zwischen der IgG-Antikörperantwort und Proteinmenge über einen großen Konzentrationsbereich. ....	64
Abbildung 5.7 Klinische Einteilung der serologisch untersuchten Kohorte.....	66
Abbildung 5.8 EBV-negative Kontrollproben. ....	68
Abbildung 5.9 Individuelle Muster der antiviralen IgG-Antikörperantworten von IM-Patienten.....	71
Abbildung 5.10 Interindividuelle Unterschiede in Stärke und Spezifität der antiviralen IgG-Immunantworten. ....	72
Abbildung 5.11 Entwicklung einer anti-BBLF1-IgG-Immunantwort bereits ab Symptombeginn oder erst in der Rekonvaleszenz. ....	74
Abbildung 5.12 Positive Korrelation zwischen anti-BBLF1-IgG-Titern und CRP-Werten sowie der Komplexität der IM im ersten Monat nach Symptombeginn.....	75
Abbildung 5.13 Korrelation der BBLF2/BBLF3-spezifischen IgG-Antwort mit der Rekonvaleszenz. ....	77
Abbildung 5.14 Anti-BFRF3 (VCAp18)-IgG-Serumantworten in der Mehrzahl der IM-Patienten früh nach Infektion nachweisbar und im Verlauf meist weiter ansteigend. ....	78
Abbildung 5.15 Positiver Zusammenhang zwischen anti-BFRF3-IgG-Titern und Ferritin-Werten an T1. ....	79
Abbildung 5.16 Kontinuierlicher Anstieg der anti-BILF2-IgG-Antikörperantworten in der Rekonvaleszenz.....	80
Abbildung 5.17 Langsamer Anstieg der anti-BLLF1-IgG-Antikörperantworten in der Rekonvaleszenz. ....	82
Abbildung 5.18 Kürzere Symptombdauer ( $p_{max}$ ) von Patienten mit höheren BLLF1-spezifischen IgG-Immunantworten an T0.....	83
Abbildung 5.19 Bildung von anti-BLRF2-IgG-Antikörpern während der Rekonvaleszenz der IM.....	84
Abbildung 5.20 Bildung von anti-BMRF1-IgG-Antikörpern früh nach Infektion mit einer Abnahme im Verlauf der IM.....	86
Abbildung 5.21 Korrelation zwischen der Stärke der anti-BMRF1-IgG-Antikörperantwort und der klinischen Graduierung der IM.....	87
Abbildung 5.22 Entwicklung einer schwachen anti-BRRF2-IgG-Antikörperantwort im Verlauf der IM.....	88
Abbildung 5.23 Korrelation der anti-BRRF2-IgG-Immunantwort mit dem Krankheitsverlauf.....	89

# Abbildungsverzeichnis

---

---

Abbildung 5.24 Hohe anti-BXLF1-IgG-Titer bei einzelnen Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Erkrankung. ....	91
Abbildung 5.25 Heterogene Verläufe der IgG-Antikörperantworten gegen BZLF1 bei IM-Patienten und Korrelation mit erhöhten CRP-Werten an T1.....	92
Abbildung 5.26 Nachweis von IgG-Antikörpern gegen das Latenzantigen EBNA1 <sup>GA</sup> erst Monate nach Primärinfektion.....	94
Abbildung 5.27 Positive Korrelation zwischen anti-EBNA2-IgG-Titern und CRP-Werten mindestens ein halbes Jahr nach primärer EBV-Infektion.....	95
Abbildung 5.28 Anti-EBNA2-IgG-Antworten bereits ab Beginn der IM bis zur Rekonvaleszenz nachweisbar. ....	96
Abbildung 5.29 Anstieg der humoralen Immunantwort gegen die EBNA3-Antigene mit den Tagen nach Symptombeginn. ....	98
Abbildung 5.30 Regelmäßiger Nachweis von IgG-Antikörpern gegen EBNA3-Antigene in der Rekonvaleszenz der IM. ....	100
Abbildung 5.31 Detektion von anti-EBNA-LP-IgG-Antikörperantworten bei einzelnen IM-Patienten bereits unmittelbar nach Symptombeginn und genereller Titeranstieg über die Zeit.....	101
Abbildung 5.32 Häufigere Detektion EBV-spezifischer Antikörper im Immunoblot als im Dot-Blot.....	103
Abbildung 5.33 Höhere EBV-spezifische IgG-Serumantworten von IM-Patienten an T0 als an T1.....	105
Abbildung 5.34 Positive Korrelation zwischen einer höheren PBMC-Viruslast und EBV-spezifischen IgG-Antikörpern in der Rekonvaleszenz der IM. ....	107
Abbildung 5.35 Vergleichbare Antikörperantworten von leicht und schwer kranken IM-Patienten. ....	109
Abbildung 5.36 Unterschiedlich effiziente Erkennung von Latenzproteinen von EBV AG876 und EBV B95.8 je nach Patientenserum.....	112

# Tabellenverzeichnis

---

---

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Immunglobulin-Isotypen und ihre Funktion in der Immunabwehr.....	14
Tabelle 2.2 EBV-spezifisches serologisches Profil bei immunkompetenten Individuen.....	20
Tabelle 3.1 Liste der verwendeten Geräte.....	25
Tabelle 3.2 Liste der verwendeten Materialien.....	26
Tabelle 3.3 Liste der eingesetzten Chemikalien.....	26
Tabelle 3.4 Liste der verwendeten kommerziellen Kits.....	27
Tabelle 3.5 Liste der eingesetzten Puffer und Lösungen.....	28
Tabelle 3.6 Liste der hergestellten und eingesetzten biochemischen Puffer.....	28
Tabelle 3.7 Liste der eingesetzten Zellkulturmedien und Zusätze.....	29
Tabelle 3.8 Liste der eingesetzten Oligonukleotide.....	31
Tabelle 3.9 Liste der DNA modifizierenden Enzyme.....	32
Tabelle 3.10 Liste der transfizierten Plasmide.....	32
Tabelle 3.11 Liste der verwendeten Primärantikörper.....	33
Tabelle 3.12 Liste der verwendeten Sekundärantikörper.....	33
Tabelle 4.1 Einflussfaktoren auf die Proteinexpression.....	35
Tabelle 4.2 Standard-PCR-Ansatz.....	36
Tabelle 4.3 Standard-PCR-Programm.....	37
Tabelle 4.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	37
Tabelle 4.5 Ansatz DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen.....	38
Tabelle 4.6 T4-DNA-Polymerase Behandlung.....	38
Tabelle 4.7 Übersicht der für die Minipräparation eingesetzten Puffer.....	41
Tabelle 4.8 Transfektionsmix.....	45
Tabelle 4.9 SDS-PAGE und Protein-Transfer.....	48
Tabelle 4.10 Schematische Übersicht der Dot-Blot-Membran.....	52
Tabelle 4.11 Primärantikörper des Multiplex-Dot-Blot-Verfahrens.....	52
Tabelle 4.12 Sekundärantikörper des Multiplex-Dot-Blot-Verfahrens.....	52
Tabelle 5.1 Anordnung und Größe der aufgetragenen EBV-Proteine.....	56
Tabelle 5.2 Sequenzunterschiede zwischen Wildtyp und Codon-optimierten Varianten ausgewählter EBV-Gene.....	59
Tabelle 5.3 Zeitpunkt und statistische Verteilung der Probenentnahmen nach Krankheitsbeginn.....	65
Tabelle 5.4 Antigene verschiedener Stadien des EBV-Lebenszyklus als Angriffspunkt der humoralen Immunantwort von IM-Patienten.....	68
Tabelle 5.5 Stärke und Vielfalt der gesamten EBV-spezifischen IgG-Antworten im zeitlichen Krankheitsverlauf.....	106
Tabelle 5.6 Kein Unterschied des Alters oder Krankheitsverlaufs von Patienten mit Typ-I- und Typ-II- dominanter IgG-Antwort.....	111

## 10 Literaturverzeichnis

Abusalah, M. A. H.; Gan, S. H.; Al-Hatamleh, M. A. I.; Irekeola, A. A.; Shueb, R. H.; Yean Yean, C. (2020): Recent Advances in Diagnostic Approaches for Epstein-Barr Virus. In: *Pathogens* 9 (3), Artikel 226, 226. DOI: 10.3390/pathogens9030226.

Al Tabaa, Y.; Tuailon, E.; Jeziorski, E.; Ouedraogo, D. E.; Bolloré, K.; Rubbo, P.-A.; Foulongne, V.; Rodière, M.; Vendrell, J.-P. (2011): B-cell polyclonal activation and Epstein-Barr viral abortive lytic cycle are two key features in acute infectious mononucleosis. In: *J Clin Virol* 52 (1), S. 33–37. DOI: 10.1016/j.jcv.2011.05.023.

Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) (2019): Virusinfektionen bei Organ- und allogenen Stammzell-Transplantierten: Diagnostik, Prävention und Therapie. S2k-Leitlinie. Online verfügbar unter [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/093-002I\\_S2k\\_Virusinfektionen-Organtransplantierte-allogene-Stammzell-Transplantierten-Diagnostik-Prävention-Therapie\\_2019-06.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/093-002I_S2k_Virusinfektionen-Organtransplantierte-allogene-Stammzell-Transplantierten-Diagnostik-Prävention-Therapie_2019-06.pdf), zuletzt geprüft am 26.09.2022.

Baer, R.; Bankier, A. T.; Biggin, M. D.; Deininger, P. L.; Farrell, P. J.; Gibson, T. J.; Hatfull, G.; Hudson, G. S.; Satchwell, S. C.; Séguin, C.; Tuffnell, P. S.; Barrell, B. G. (1984): DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein—Barr virus genome. In: *Nature* 310 (5974), S. 207–211. DOI: 10.1038/310207a0.

Balfour, H. H., Jr.; Odumade, O. A.; Schmeling, D. O.; Mullan, B. D.; Ed, J. A.; Knight, J. A.; Vezina, H. E.; Thomas, W.; Hogquist, K. A. (2013): Behavioral, Virologic, and Immunologic Factors Associated With Acquisition and Severity of Primary Epstein-Barr Virus Infection in University Students. In: *J Infect Dis* 207 (1), S. 80–88. DOI: 10.1093/infdis/jjs646.

Batista, F. D.; Harwood, N. E. (2009): The who, how and where of antigen presentation to B cells. In: *Nat Rev Immunol* 9 (1), S. 15–27. DOI: 10.1038/nri2454.

Bauer, G. (2001): Simplicity through complexity: immunoblot with recombinant antigens as the new gold standard in Epstein-Barr virus serology. In: *Clin Lab* 47 (5-6), S. 223–230.

Bender, R.; Lange, S. (2001): Adjusting for multiple testing—when and how? In: *J Clin Epidemiol* 54 (4), S. 343–349. DOI: 10.1016/S0895-4356(00)00314-0.

Bernasconi, N. L.; Traggiai, E.; Lanzavecchia, A. (2002): Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. In: *Science* 298 (5601), S. 2199–2202. DOI: 10.1126/science.1076071.

Bieling, M.; Tischer, S.; Kalinke, U.; Blasczyk, R.; Buus, S.; Maecker-Kolhoff, B.; Eiz-Vesper, B. (2018): Personalized adoptive immunotherapy for patients with EBV-associated tumors and complications: Evaluation of novel naturally processed and presented EBV-derived T-cell epitopes. In: *Oncotarget* 9 (4), S. 4737–4757. DOI: 10.18632/oncotarget.23531.

Birnboim, H. C.; Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. In: *Nucleic Acids Res* 7 (6), S. 1513–1523. DOI: 10.1093/nar/7.6.1513.

Block, H.; Maertens, B.; Spriestersbach, A.; Brinker, N.; Kubicek, J.; Fabis, R.; Labahn, J.; Schäfer, F. (2009): Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review. In: R. R. Burgess und M. P. Deutscher (Hg.): *Guide to Protein Purification*, Bd. 463. 2. Aufl. San Diego, Calif.: Elsevier, Acad. Press (Methods in enzymology, 463), S. 439–473.

Bornkamm, G. W.; Hammerschmidt, W. (2001): Molecular virology of Epstein-Barr virus. In: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356 (1408), S. 437–459. DOI: 10.1098/rstb.2000.0781.

Bu, W.; Hayes, G. M.; Liu, H.; Gemmell, L.; Schmeling, D. O.; Radecki, P.; Aguilar, F.; Burbelo, P. D.; Woo, J.; Balfour, H. H., Jr.; Cohen, J. I. (2016): Kinetics of Epstein-Barr Virus (EBV)

## Literaturverzeichnis

---

- Neutralizing and Virus-Specific Antibodies after Primary Infection with EBV. In: *Clin Vaccine Immunol* 23 (4), S. 363–369. DOI: 10.1128/CVI.00674-15.
- Buisson, M.; Fleurent, B.; Mak, M.; Morand, P.; Chan, L.; Ng, A.; Guan, M.; Chin, D.; Seigneurin, J. M. (1999): Novel Immunoblot Assay Using Four Recombinant Antigens for Diagnosis of Epstein-Barr Virus Primary Infection and Reactivation. In: *J Clin Microbiol* 37 (8), S. 2709–2714. DOI: 10.1128/JCM.37.8.2709-2714.1999.
- Cameron, B.; Bharadwaj, M.; Burrows, J.; Fazou, C.; Wakefield, D.; Hickie, I.; French, R.; Khanna, R.; Lloyd, A.; Dubbo Infection Outcomes Study (2006): Prolonged illness after infectious mononucleosis is associated with altered immunity but not with increased viral load. In: *J Infect Dis* 193 (5), S. 664–671. DOI: 10.1086/500248.
- Carl Roth (o. D.): Ethidiumbromidlösung 1 % [Internetdokument]. Carl Roth GmbH + Co. KG. Karlsruhe. Online verfügbar unter <https://www.carlroth.com/de/de/faerbung-von-dna-gelen/ethidiumbromidloesung-1-%25/p/2218.1>, zuletzt geprüft am 30.11.2021.
- Chang, C. M.; Yu, K. J.; Mbulaiteye, S. M.; Hildesheim, A.; Bhatia, K. (2009): The extent of genetic diversity of Epstein-Barr virus and its geographic and disease patterns: a need for reappraisal. In: *Virus Res* 143 (2), S. 209–221. DOI: 10.1016/j.virusres.2009.07.005.
- Chijioke, O.; Müller, A.; Feederle, R.; Barros, M. H. M.; Krieg, C.; Emmel, V.; Marcenaro, E.; Leung, C. S.; Antsiferova, O.; Landtwing, V.; Bossart, W.; Moretta, A.; Hassan, R.; Boyman, O.; Niedobitek, G.; Delecluse, H.-J.; Capaul, R.; Münz, C. (2013): Human natural killer cells prevent infectious mononucleosis features by targeting lytic Epstein-Barr virus infection. In: *Cell Rep* 5 (6), S. 1489–1498. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.11.041.
- Cirac, A.; Poirey, R.; Dieckmeyer, M.; Witter, K.; Delecluse, H.-J.; Behrends, U.; Mautner, J. (2021): Immunoinformatic Analysis Reveals Antigenic Heterogeneity of Epstein-Barr Virus Is Immune-Driven. In: *Front Immunol* 12, S. 796379. DOI: 10.3389/fimmu.2021.796379.
- Cirac, A.; Stützle, S.; Dieckmeyer, M.; Adhikary, D.; Moosmann, A.; Körber, N.; Bauer, T.; Witter, K.; Delecluse, H.-J.; Behrends, U.; Mautner, J. (2018): Epstein-Barr virus strain heterogeneity impairs human T-cell immunity. In: *Cancer Immunol Immunother* 67 (4), S. 663–674. DOI: 10.1007/s00262-018-2118-z.
- Correia, S.; Bridges, R.; Wegner, F.; Venturini, C.; Palser, A.; Middeldorp, J. M.; Cohen, J. I.; Lorenzetti, M. A.; Bassano, I.; White, R. E.; Kellam, P.; Breuer, J.; Farrell, P. J. (2018): Sequence Variation of Epstein-Barr Virus: Viral Types, Geography, Codon Usage, and Diseases. In: *J Virol* 92 (22), e01132-18. DOI: 10.1128/JVI.01132-18.
- Craig, F. E.; Gulley, M. L.; Banks, P. M. (1993): Posttransplantation Lymphoproliferative Disorders. In: *Am J Clin Pathol* 99 (3), S. 265–276. DOI: 10.1093/ajcp/99.3.265.
- Crowley, A.; Connell, J.; Schaffer, K.; Hall, W.; Hassan, J. (2012): Is there diagnostic value in detection of immunoglobulin g antibodies to the epstein-barr virus early antigen? In: *Biores Open Access* 1 (6), S. 291–296. DOI: 10.1089/biores.2012.0274.
- Doolan, D. L. (2011): Plasmodium immunomics. In: *Int J Parasitol* 41 (1), S. 3–20. DOI: 10.1016/j.ijpara.2010.08.002.
- Dower, W. J.; Miller, J. F.; Ragsdale, C. W. (1988): High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. In: *Nucleic Acids Res* 16 (13), S. 6127–6145. DOI: 10.1093/nar/16.13.6127.
- Dunmire, S. K.; Verghese, P. S.; Balfour, H. H., Jr. (2018): Primary Epstein-Barr virus infection. In: *J Clin Virol* 102, S. 84–92. DOI: 10.1016/j.jcv.2018.03.001.
- Epstein, M. A.; Achong, B. G.; Barr, Y. M. (1964): VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. In: *Lancet* 1 (7335), S. 702–703. DOI: 10.1016/S0140-6736(64)91524-7.



## Literaturverzeichnis

---

Fachiroh, J.; Schouten, T.; Hariwiyanto, B.; Paramita, D. K.; Harijadi, A.; Haryana, S. M.; Ng, M. H.; Middeldorp, J. M. (2004): Molecular diversity of Epstein-Barr virus IgG and IgA antibody responses in nasopharyngeal carcinoma: a comparison of Indonesian, Chinese, and European subjects. In: *J Infect Dis* 190 (1), S. 53–62. DOI: 10.1086/421245.

Fath, S.; Bauer, A. P.; Liss, M.; Priestersbach, A.; Maertens, B.; Hahn, P.; Ludwig, C.; Schäfer, F.; Graf, M.; Wagner, R. (2011): Multiparameter RNA and codon optimization: a standardized tool to assess and enhance autologous mammalian gene expression. In: *PLoS One* 6 (3), e17596. DOI: 10.1371/journal.pone.0017596.

Fedyanina, O. S.; Filippova, A. E.; Demina, O. I.; Zhuliabina, O. A.; Tikhomirov, D. S.; Filatov, A. V.; Chebotareva, T. A.; Kuznetsova, S. A. (2021): The Nature and Clinical Significance of Atypical Mononuclear Cells in Infectious Mononucleosis Caused by the Epstein-Barr Virus in Children. In: *J Infect Dis* 223 (10), S. 1699–1709. DOI: 10.1093/infdis/jiaa601.

Gärtner, B.; Hammerschmidt, W.; Müller-Lantzsch, N. (2010): Herpesviren: Epstein-Barr-Virus (EBV). In: H. W. Doerr und W. H. Gerlich (Hg.): *Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen*. 2. Aufl. Stuttgart, New York, NY: Thieme (2., komplett überarb. und erw. Aufl.), S. 677–688.

Garzelli, C.; Incaprera, M.; Bazzichi, A.; Manunta, M.; Rognini, F.; Falcone, G. (1994): Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes produce natural antibodies to histones. In: *Immunol Lett* 39 (3), S. 277–282. DOI: 10.1016/0165-2478(94)90169-4.

Goldstein, K.; Lai, P. K.; Lightfoote, M.; Andrese, A. P.; Fuccillo, D.; Connor, R. J.; Levine, P. H. (1980): Relationship of in vitro immune responses to Epstein-Barr herpesvirus and severity of infectious mononucleosis. In: *Infect Immun* 29 (3), S. 945–952. DOI: 10.1128/iai.29.3.945-952.1980.

Goswami, R.; Shair, K. H. Y.; Gershburg, E. (2017): Molecular diversity of IgG responses to Epstein-Barr virus proteins in asymptomatic Epstein-Barr virus carriers. In: *J Gen Virol* 98 (9), S. 2343–2350. DOI: 10.1099/jgv.0.000891.

Grimm, J. M.; Schmeling, D. O.; Dunmire, S. K.; Knight, J. A.; Mullan, B. D.; Ed, J. A.; Brundage, R. C.; Hogquist, K. A.; Balfour, H. H., Jr. (2016): Prospective studies of infectious mononucleosis in university students. In: *Clin Transl Immunology* 5 (8), e94. DOI: 10.1038/cti.2016.48.

Grunsven, W. M. v.; Nabbe, A.; Middeldorp, J. M. (1993): Identification and molecular characterization of two diagnostically relevant marker proteins of the Epstein-Barr virus capsid antigen complex. In: *J Med Virol* 40 (2), S. 161–169. DOI: 10.1002/jmv.1890400215.

Gustafsson, C.; Govindarajan, S.; Minshull, J. (2004): Codon bias and heterologous protein expression. In: *Trends Biotechnol* 22 (7), S. 346–353. DOI: 10.1016/j.tibtech.2004.04.006.

Hadinoto, V.; Shapiro, M.; Greenough, T. C.; Sullivan, J. L.; Luzuriaga, K.; Thorley-Lawson, D. A. (2008): On the dynamics of acute EBV infection and the pathogenesis of infectious mononucleosis. In: *Blood* 111 (3), S. 1420–1427. DOI: 10.1182/blood-2007-06-093278.

Henle, G.; Henle, W.; Diehl, V. (1968): Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 59 (1), S. 94–101. DOI: 10.1073/pnas.59.1.94.

Henle, W.; Henle, G. (1981): Epstein-Barr virus-specific serology in immunologically compromised individuals. In: *Cancer Res* 41 (11 Pt 1), S. 4222–4225.

Henle, W.; Henle, G.; Andersson, J.; Ernberg, I.; Klein, G.; Horwitz, C. A.; Marklund, G.; Rymo, L.; Wellinder, C.; Straus, S. E. (1987): Antibody responses to Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen (EBNA)-1 and EBNA-2 in acute and chronic Epstein-Barr virus infection. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (2), S. 570–574. DOI: 10.1073/pnas.84.2.570.

# Literaturverzeichnis

---

Henle, W.; Henle, G.; Lennette, E. T. (1979): The Epstein-Barr Virus. In: *Sci Am* 241 (1), S. 48–59. DOI: 10.1038/scientificamerican0779-48.

Herold, G. (2018): Innere Medizin 2018. Köln: Gerd Herold.

Hess, R. D. (2004): Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: still challenging after 35 years. In: *J Clin Microbiol* 42 (8), S. 3381–3387. DOI: 10.1128/JCM.42.8.3381-3387.2004.

Hislop, A. D.; Taylor, G. S. (2015): T-Cell Responses to EBV. In: C. Münz (Hg.): Epstein Barr Virus Volume 2. One Herpes Virus: Many Diseases. Current Topics in Microbiology and Immunology, Bd. 391. Cham: Springer International Publishing Switzerland 2015 (391), S. 325–353.

Hochberg, D.; Souza, T.; Catalina, M.; Sullivan, J. L.; Luzuriaga, K.; Thorley-Lawson, D. A. (2004): Acute infection with Epstein-Barr virus targets and overwhelms the peripheral memory B-cell compartment with resting, latently infected cells. In: *J Virol* 78 (10), S. 5194–5204. DOI: 10.1128/jvi.78.10.5194-5204.2004.

Huang, X. Q.; Miller, W. (1991): A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. In: *Adv Appl Math* 12 (3), S. 337–357. DOI: 10.1016/0196-8858(91)90017-D.

Kristiansen, M. S.; Stabursvik, J.; O'Leary, E. C.; Pedersen, M.; Asprusten, T. T.; Leegaard, T.; Osnes, L. T.; Tjade, T.; Skovlund, E.; Godang, K.; Wyller, V. B. B. (2019): Clinical symptoms and markers of disease mechanisms in adolescent chronic fatigue following Epstein-Barr virus infection: An exploratory cross-sectional study. In: *Brain Behav Immun* 80, S. 551–563. DOI: 10.1016/j.bbi.2019.04.040.

Lachmann, G.; Knaak, C.; La Rosée, P.; Spies, C.; Nyvlt, P.; Oberender, C.; Sander, L. E.; Suttorp, N.; Müller-Redetzky, H. (2019): Hämophagozytische Lymphohistiozytose bei unspezifischer Virusinfektion [Hemophagocytic lymphohistiocytosis in unspecific virus infection]. In: *Anaesthesist* 68 (9), S. 626–632. DOI: 10.1007/s00101-019-00634-3.

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.

Lam, J. K. P.; Hui, K. F.; Ning, R. J.; Xu, X. Q.; Chan, K. H.; Chiang, A. K. S. (2018): Emergence of CD4+ and CD8+ Polyfunctional T Cell Responses Against Immunodominant Lytic and Latent EBV Antigens in Children With Primary EBV Infection. In: *Front Microbiol* 9, 416. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00416.

Le Pecq, J. B. (1971): Use of ethidium bromide for separation and determination of nucleic acids of various conformational forms and measurement of their associated enzymes. In: *Methods Biochem Anal* 20, S. 41–86. DOI: 10.1002/9780470110393.ch2.

Lin, Y.-C.; Boone, M.; Meuris, L.; Lemmens, I.; van Roy, N.; Soete, A.; Reumers, J.; Moisse, M.; Plaisance, S.; Drmanac, R.; Chen, J.; Speleman, F.; Lambrechts, D.; van de Peer, Y.; Tavernier, J.; Callewaert, N. (2014): Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. In: *Nat Commun* 5, 4767. DOI: 10.1038/ncomms5767.

Liu, Z.; Coghill, A. E.; Pfeiffer, R. M.; Proietti, C.; Hsu, W.-L.; Chien, Y.-C.; Lekieffre, L.; Krause, L.; Yu, K. J.; Lou, P.-J.; Wang, C.-P.; Mulvenna, J.; Middeldorp, J. M.; Bethony, J.; Chen, C.-J.; Doolan, D. L.; Hildesheim, A. (2018): Patterns of Interindividual Variability in the Antibody Repertoire Targeting Proteins Across the Epstein-Barr Virus Proteome. In: *J Infect Dis* 217 (12), S. 1923–1931. DOI: 10.1093/infdis/jiy122.

Liu, Z.; Yu, K. J.; Coghill, A. E.; Brenner, N.; Cao, S.-M.; Chen, C.-J.; Chen, Y.; Doolan, D. L.; Hsu, W.-L.; Labo, N.; Middeldorp, J. M.; Miley, W.; Simon, J.; Wang, C.-P.; Waterboer, T.; Whitby, D.; Xie, S.-H.; Ye, W.; Hildesheim, A. (2019): Multilaboratory Assessment of Epstein-

# Literaturverzeichnis

---

---

Barr Virus Serologic Assays: the Case for Standardization. In: *J Clin Microbiol* 57 (11), e01107-19. DOI: 10.1128/JCM.01107-19.

Loebel, M.; Eckey, M.; Sotzny, F.; Hahn, E.; Bauer, S.; Grabowski, P.; Zerweck, J.; Holenya, P.; Hanitsch, L. G.; Wittke, K.; Borchmann, P.; Ruffer, J.-U.; Hiepe, F.; Ruprecht, K.; Behrends, U.; Meindl, C.; Volk, H.-D.; Reimer, U.; Scheibenbogen, C. (2017): Serological profiling of the EBV immune response in Chronic Fatigue Syndrome using a peptide microarray. In: *PloS One* 12 (6), e0179124. DOI: 10.1371/journal.pone.0179124.

Luzuriaga, K.; Sullivan, J. L. (2010): Infectious mononucleosis. In: *N Engl J Med* 362 (21), S. 1993–2000. DOI: 10.1056/NEJMc1001116.

Lv, H.; Ye, L.; Liu, Q.; Li, S.-G.; Li, T.; Huang, N.-L.; Gao, Y.; Fan, L.-B.; Du, W.-D. (2019): S-S-PEG-COOH Self-Assembled Monolayer on Gold Surface Enabled a Combined Assay for Serological EBV Antibody Isotypes. In: *Proteomics Clin Appl* 13 (3), e1800067. DOI: 10.1002/prca.201800067.

MacLennan, I. C. (1994): Germinal centers. In: *Annu Rev Immunol* 12, S. 117–139. DOI: 10.1146/annurev.iy.12.040194.001001.

Macswen, K. F.; Higgins, C. D.; McAulay, K. A.; Williams, H.; Harrison, N.; Swerdlow, A. J.; Crawford, D. H. (2010): Infectious mononucleosis in university students in the United Kingdom: evaluation of the clinical features and consequences of the disease. In: *Clin Infect Dis* 50 (5), S. 699–706. DOI: 10.1086/650456.

Meij, P.; Vervoort, M. B.; Aarbiou, J.; van Dissel, P.; Brink, A.; Bloemena, E.; Meijer, C. J.; Middeldorp, J. M. (1999): Restricted low-level human antibody responses against Epstein-Barr virus (EBV)-encoded latent membrane protein 1 in a subgroup of patients with EBV-associated diseases. In: *J Infect Dis* 179 (5), S. 1108–1115. DOI: 10.1086/314704.

Middeldorp, J. M. (2015): Epstein-Barr Virus-Specific Humoral Immune Responses in Health and Disease. In: C. Münz (Hg.): Epstein Barr Virus Volume 2. One Herpes Virus: Many Diseases. Current Topics in Microbiology and Immunology, Bd. 391. Cham: Springer International Publishing Switzerland 2015 (391), S. 289–323.

Mikrogen GmbH (o. D.): recomLine EBV IgG [Avidität] [IgA] recomLine EBV IgM. Streifen-Immunoassay mit rekombinant produzierten Antigenen zum Nachweis von IgG-, IgA- und IgM-Antikörpern gegen das Epstein-Barr Virus (EBV) [Internetdokument]. Mikrogen GmbH. Neuried. Online verfügbar unter [https://www.mikrogen.de/produkte/produktuebersicht/weitere-info/index.php?eID=tx\\_securedownloads&file=/uploads/tx\\_oemikrogentables/dokumente/GARLEB014D.pdf&p=40&u=0&g=0&t=1638467988&hash=09b307f651f68cf46c68005028eb01427bef3d87](https://www.mikrogen.de/produkte/produktuebersicht/weitere-info/index.php?eID=tx_securedownloads&file=/uploads/tx_oemikrogentables/dokumente/GARLEB014D.pdf&p=40&u=0&g=0&t=1638467988&hash=09b307f651f68cf46c68005028eb01427bef3d87), zuletzt geprüft am 01.12.2021.

Miller, J. F.; Dower, W. J.; Tompkins, L. S. (1988): High-voltage electroporation of bacteria: genetic transformation of *Campylobacter jejuni* with plasmid DNA. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (3), S. 856–860. DOI: 10.1073/pnas.85.3.856.

Mülhardt, C. (2009): Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics. 6. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Murphy, K. M.; Weaver, C. (2018): Janeway Immunologie. Unter Mitarbeit von A. Mowat, L. Berg und D. Chaplin. 9. Aufl. 2018. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch).

Murphy, K. P. (2012): Janeway's Immunobiology. K. Murphy with acknowledgment to C. A. Janeway Jr., P. Travers, M. Walport. Unter Mitarbeit von A. Mowat und C. T. Weaver. 8. Aufl. New York, London: Garland Science; Taylor & Francis Group.

Nemerow, G. R.; Mold, C.; Schwend, V. K.; Tollefson, V.; Cooper, N. R. (1987): Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the

## Literaturverzeichnis

---

- EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. In: *J Virol* 61 (5), S. 1416–1420. DOI: 10.1128/JVI.61.5.1416-1420.1987.
- Niedobitek, G.; Meru, N.; Delecluse, H.-J. (2001): Epstein-Barr virus infection and human malignancies. In: *Int J Exp Pathol* 82 (3), S. 149–170. DOI: 10.1046/j.1365-2613.2001.iep0082-0149-x.
- Niller, H.-H.; Bauer, G. (2017): Epstein-Barr Virus: Clinical Diagnostics. In: *Methods Mol Biol* 1532, S. 33–55. DOI: 10.1007/978-1-4939-6655-4\_2.
- Nystad, T. W.; Myrmet, H. (2007): Prevalence of primary versus reactivated Epstein-Barr virus infection in patients with VCA IgG-, VCA IgM- and EBNA-1-antibodies and suspected infectious mononucleosis. In: *J Clin Virol* 38 (4), S. 292–297. DOI: 10.1016/j.jcv.2007.01.006.
- Odumade, O. A.; Hogquist, K. A.; Balfour, H. H., Jr. (2011): Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. In: *Clin Microbiol Rev* 24 (1), S. 193–209. DOI: 10.1128/CMR.00044-10.
- Panikkar, A.; Smith, C.; Hislop, A.; Tellam, N.; Dasari, V.; Hogquist, K. A.; Wykes, M.; Moss, D. J.; Rickinson, A.; Balfour, H. H., Jr.; Khanna, R. (2015): Impaired Epstein-Barr Virus-Specific Neutralizing Antibody Response during Acute Infectious Mononucleosis Is Coincident with Global B-Cell Dysfunction. In: *J Virol* 89 (17), S. 9137–9141. DOI: 10.1128/JVI.01293-15.
- Paschale, M. d.; Agrappi, C.; Manco, M. T.; Mirri, P.; Viganò, E. F.; Clerici, P. (2009): Seroepidemiology of EBV and interpretation of the "isolated VCA IgG" pattern. In: *J Med Virol* 81 (2), S. 325–331. DOI: 10.1002/jmv.21373.
- Paschale, M. d.; Clerici, P. (2012): Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. In: *World J Virol* 1 (1), S. 31–43. DOI: 10.5501/wjv.v1.i1.31.
- Paul, J. R.; Bunnell, W. W. (1974): The presence of heterophile antibodies in infectious mononucleosis. In: *Am J Med Sci* 267 (3), S. 178–188. DOI: 10.1097/00000441-197403000-00005.
- Porath, J.; Carlsson, J.; Olsson, I.; Belfrage, G. (1975): Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. In: *Nature* 258 (5536), S. 598–599. DOI: 10.1038/258598a0.
- Rajewsky, K. (1996): Clonal selection and learning in the antibody system. In: *Nature* 381 (6585), S. 751–758. DOI: 10.1038/381751a0.
- Rassow, J.; Hauser, K.; Netzker, R.; Deutzmann, R. (2012): Biochemie. 3., vollst. überarb. u. erw. Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1055/b-002-6235>.
- Rea, T. D.; Ashley, R. L.; Russo, J. E.; Buchwald, D. S. (2002): A systematic study of Epstein-Barr virus serologic assays following acute infection. In: *Am J Clin Pathol* 117 (1), S. 156–161. DOI: 10.1309/ETK2-L9MG-L6RA-N79Y.
- Rickinson, A. B.; Long, H. M.; Palendira, U.; Münz, C.; Hislop, A. D. (2014): Cellular immune controls over Epstein-Barr virus infection: new lessons from the clinic and the laboratory. In: *Trends Immunol* 35 (4), S. 159–169. DOI: 10.1016/j.it.2014.01.003.
- Robertson, P.; Beynon, S.; Whybin, R.; Brennan, C.; Vollmer-Conna, U.; Hickie, I.; Lloyd, A. (2003): Measurement of EBV-IgG anti-VCA avidity aids the early and reliable diagnosis of primary EBV infection. In: *J Med Virol* 70 (4), S. 617–623. DOI: 10.1002/jmv.10439.
- Rosén, A.; Gergely, P.; Jondal, M.; Klein, G.; Britton, S. (1977): Polyclonal Ig production after Epstein-Barr virus infection of human lymphocytes in vitro. In: *Nature* 267 (5606), S. 52–54. DOI: 10.1038/267052a0.

## Literaturverzeichnis

---

- Sample, J.; Young, L.; Martin, B.; Chatman, T.; Kieff, E.; Rickinson, A.; Kieff, E. (1990): Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. In: *J Virol* 64 (9), S. 4084–4092. DOI: 10.1128/JVI.64.9.4084-4092.1990.
- Sanger, F.; Coulson, A. R. (1975): A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. In: *J Mol Biol* 94 (3), S. 441–448. DOI: 10.1016/0022-2836(75)90213-2.
- Schillinger, M.; Kampmann, M.; Henninger, K.; Murray, G.; Hanselmann, I.; Bauer, G. (1993): Variability of humoral immune response to acute Epstein-Barr virus (EBV) infection: evaluation of the significance of serological markers. In: *Med Microbiol Lett* 2 (6), S. 296–303.
- Schroeder, H. W., Jr.; Cavacini, L. (2010): Structure and function of immunoglobulins. In: *J Allergy Clin Immunol* 125 (2 Suppl 2), S. 41–52. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.09.046.
- Schubert, J.; Zens, W.; Weissbrich, B. (1998): Comparative evaluation of the use of immunoblots and of IgG avidity assays as confirmatory tests for the diagnosis of acute EBV infections. In: *J Clin Virol* 11 (3), S. 161–172. DOI: 10.1016/S0928-0197(98)00061-0.
- Shi, T.; Huang, L.; Luo, L.; Yu, Q.; Tian, J. (2021): Diagnostic value of serological and molecular biological tests for infectious mononucleosis by EBV in different age stages and course of the disease. In: *J Med Virol* 93 (6), S. 3824–3834. DOI: 10.1002/jmv.26558.
- Silins, S. L.; Sherritt, M. A.; Silleri, J. M.; Cross, S. M.; Elliott, S. L.; Bharadwaj, M.; Le, T. T.; Morrison, L. E.; Khanna, R.; Moss, D. J.; Suhrbier, A.; Misko, I. S. (2001): Asymptomatic primary Epstein-Barr virus infection occurs in the absence of blood T-cell repertoire perturbations despite high levels of systemic viral load. In: *Blood* 98 (13), S. 3739–3744. DOI: 10.1182/blood.v98.13.3739.
- Smatti, M. K.; Al-Sadeq, D. W.; Ali, N. H.; Pintus, G.; Abou-Saleh, H.; Nasrallah, G. K. (2018): Epstein-Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update. In: *Front Oncol* 8, 211. DOI: 10.3389/fonc.2018.00211.
- Tamaki, H.; Beaulieu, B. L.; Somasundaran, M.; Sullivan, J. L. (1995): Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus in children. In: *J Infect Dis* 172 (3), S. 739–746. DOI: 10.1093/infdis/172.3.739.
- Teifel, M. (2012): Transfektion von Säugerzellen. In: M. Jansohn und S. Rothhämel (Hg.): *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. 5. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, S. 351–383.
- The UniProt Consortium (2019): UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. In: *Nucleic Acids Res* 47 (D1), D506-D515. DOI: 10.1093/nar/gky1049.
- Thermo Fisher Scientific (o. D.): GeneOptimizer Process for Successful Gene Optimization [Internetdokument]. Online verfügbar unter [https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cloning/gene-synthesis/geneart-gene-synthesis/geneoptimizer.html?gclid=EAlaIQobChMIrePh89jq4QIVWuR3Ch1XKwwUE-AAYASAAEgKm6fD\\_BwE&s\\_kwid=AL!3652!3!242672010416!b!!g!!%2Bgene%20%2Boptimization&ef\\_id=EAlaIQobChMIrePh89jq4QIVWuR3Ch1XKwwUE-AAYASAAEgKm6fD\\_BwE:G:s&s\\_kwid=AL!3652!3!242672010416!b!!g!!%2Bgene%20%2Boptimization](https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cloning/gene-synthesis/geneart-gene-synthesis/geneoptimizer.html?gclid=EAlaIQobChMIrePh89jq4QIVWuR3Ch1XKwwUE-AAYASAAEgKm6fD_BwE&s_kwid=AL!3652!3!242672010416!b!!g!!%2Bgene%20%2Boptimization&ef_id=EAlaIQobChMIrePh89jq4QIVWuR3Ch1XKwwUE-AAYASAAEgKm6fD_BwE:G:s&s_kwid=AL!3652!3!242672010416!b!!g!!%2Bgene%20%2Boptimization), zuletzt geprüft am 02.12.2021.
- Thorley-Lawson, D. A.; Geilinger, K. (1980): Monoclonal antibodies against the major glycoprotein (gp350/220) of Epstein-Barr virus neutralize infectivity. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 77 (9), S. 5307–5311. DOI: 10.1073/pnas.77.9.5307.
- Tsai, M.-H.; Raykova, A.; Klinke, O.; Bernhardt, K.; Gärtner, K.; Leung, C. S.; Geletneky, K.; Sertel, S.; Münz, C.; Feederle, R.; Delecluse, H.-J. (2013): Spontaneous lytic replication and

## Literaturverzeichnis

---

epitheliotropism define an Epstein-Barr virus strain found in carcinomas. In: *Cell Rep* 5 (2), S. 458–470. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.09.012.

Volgger, M.; Lichtscheidl, I. (o. D.): indirekte Immunfluoreszenz [Internetdokument]. University of Vienna, Austria. Online verfügbar unter [https://www.univie.ac.at/mikroskopie/3\\_fluoreszenz/fluorochrome/4c\\_indirekteIF.htm](https://www.univie.ac.at/mikroskopie/3_fluoreszenz/fluorochrome/4c_indirekteIF.htm), zuletzt geprüft am 03.12.2021.

Vouloumanou, E. K.; Rafailidis, P. I.; Falagas, M. E. (2012): Current diagnosis and management of infectious mononucleosis. In: *Curr Opin Hematol* 19 (1), S. 14–20. DOI: 10.1097/MOH.0b013e32834daa08.

Williams, H.; McAulay, K.; Macsween, K. F.; Gallacher, N. J.; Higgins, C. D.; Harrison, N.; Swerdlow, A. J.; Crawford, D. H. (2005): The immune response to primary EBV infection: a role for natural killer cells. In: *Br J Haematol* 129 (2), S. 266–274. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2005.05452.x.

Yang, Y.; Gao, F. (2020): Clinical characteristics of primary and reactivated Epstein-Barr virus infection in children. In: *J Med Virol* 92 (12), S. 3709–3716. DOI: 10.1002/jmv.26202.

Young, L. S.; Rickinson, A. B. (2004): Epstein-Barr virus: 40 years on. In: *Nat Rev Cancer* 4 (10), S. 757–768. DOI: 10.1038/nrc1452.

Yu, K.; Ang, K. S.; Lee, D.-Y. (2017): Synthetic Gene Design Using Codon Optimization On-Line (COOL). In: *Methods Mol Biol* 1472, S. 13–34. DOI: 10.1007/978-1-4939-6343-0\_2.

Zhong, H.; Hu, X.; Janowski, A. B.; Storch, G. A.; Su, L.; Cao, L.; Yu, J.; Xu, J. (2017): Whole transcriptome profiling reveals major cell types in the cellular immune response against acute and chronic active Epstein-Barr virus infection. In: *Sci Rep* 7 (1), 17775. DOI: 10.1038/s41598-017-18195-z.

Zhou, J.; Liu, W. J.; Peng, S. W.; Sun, X. Y.; Frazer, I. (1999): Papillomavirus Capsid Protein Expression Level Depends on the Match between Codon Usage and tRNA Availability. In: *J Virol* 73 (6), S. 4972–4982. DOI: 10.1128/JVI.73.6.4972-4982.1999.

Zimber, U.; Adldinger, H. K.; Lenoir, G. M.; Vuillaume, M.; Knebel-Doeberitz, M. v.; Laux, G.; Deşgranges, C.; Wittmann, P.; Freese, U.-K.; Schneider, U.; Bornkamm, G. W. (1986): Geographical prevalence of two types of Epstein-Barr virus. In: *Virology* 154 (1), S. 56–66. DOI: 10.1016/0042-6822(86)90429-0.

# Danksagung

---

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Uta Behrends und PD Dr. Josef Mautner, die mich in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen und mir dadurch das interessante Promotionsthema ermöglicht haben. Ganz großer Dank an Josef für die gute und kontinuierliche wissenschaftliche Betreuung, die vielen konstruktiven Gespräche bei Fragen und Problemstellungen und insbesondere für die gewissenhafte Korrektur meiner Arbeit.

Vielen Dank an alle Mitglieder der Arbeitsgruppe, Carola, Elisa, Julius, Grit, Doris, Dinesh und Julia für die fachliche Unterstützung und die schöne Laborzeit. Ganz herzlichen Dank vor allem an die Kooperationspartner der Kinder- und Jugendmedizin Schwabing, welche die „Infektiöse Mononukleose in München“ (IMMUC) Studie koordiniert haben, und an die Arbeitsgruppe Immunmonitoring des Instituts für Virologie der Technischen Universität München für die Aufbereitung der Proben. Ich bedanke mich besonders bei Katrin Gerrer, die bei sämtlichen Fragen stets eine Antwort fand und immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Danke an Elisabeth, Maria und Melanie, die mich sowohl als Doktorandin als auch später im Studium und im ersten Berufsjahr als Assistenzärztin immer unterstützt haben und unglaublich wichtig für mich sind!

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mir in allen Lebensphasen helfen, immer Verständnis und Geduld für mich aufbringen und bedingungslosen Rückhalt geben.