

Etablierung und Evaluierung innovativer Stimulatorantigene zur Charakterisierung des zellulären Immunstatus von Patienten mit EBV-assoziiierter Infektiöser Mononukleose

Johannes Mücke

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der
Technischen Universität München zur Erlangung eines
Doktors der Medizinischen Wissenschaft (Dr. med. sci.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Dirk H. Busch

Prüfer*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Uta Behrends
2. Prof. Dr. Ulrike Protzer

Die Dissertation wurde am 21.07.2022 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.08.2023 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Epstein-Barr-Virus, Geschichtliches	5
1.2	Struktur von EBV	6
1.3	EBV-Infektion	7
1.3.1	Die EBV Primärinfektion	7
1.3.2	Die latente Infektion	8
1.3.3	Der lytische Zyklus	12
1.4	EBV-assoziierte Erkrankungen	14
1.4.1	Die infektiöse Mononukleose (IM)	14
1.4.2	Chronisch aktive EBV-Infektion (CAEBV)	15
1.4.3	X-chromosomale lymphoproliferative Erkrankung (XLP)	16
1.4.4	EBV-assoziierte Tumorerkrankungen	16
1.4.5	Posttransplantations-Lymphoproliferative Erkrankung (PTLD)	17
1.4.6	EBV-assoziierte Autoimmunerkrankungen	18
1.5	Die Rolle der angeborene Immunantwort während der Primärinfektion	19
1.5.1	Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen)	19
1.5.2	Andere Zelltypen der angeborenen Immunantwort	19
1.6	Die erworbene Immunantwort bei Primär- und persistierender Infektion	20
1.6.1	Antikörper-Reaktion	20
1.6.2	Die EBV-spezifische T-Zell-Antwort	22
1.6.3	Symptomatische versus asymptomatische Infektion	26
1.7	Aktuelle Nachweisverfahren der EBV-spezifischen T-Zellantwort	27
2	Ziele der Arbeit	30
3	Material	31
3.1	Zelllinien	31
3.1.1	Lymphoblastoide Zelllinien	31
3.1.2	Burkitt-Lymphom Zelllinien	31
3.1.3	Adhärent wachsende Epithelzelllinien	31
3.1.4	T-Zellklone	32
3.2	Bakterienstämme	32

3.3	Plasmide.....	32
3.4	Antikörper.....	33
3.4.1	Primärantikörper	33
3.4.2	Sekundärantikörper.....	34
3.4.3	Antikörper für die Durchflusszytometrie	34
3.5	Chemikalien	35
3.6	Verbrauchsmaterialien	36
3.7	Allgemeine Medien, Puffer, Lösungen	37
3.8	Zellkulturmedien.....	37
3.9	Geräte	38
3.10	Computerprogramme.....	39
4	Methoden.....	40
4.1	Zellbiologische Methoden	40
4.1.1	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	40
4.1.2	Bestimmung der Zellzahl	40
4.1.3	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	41
4.1.4	Transfektion von HEK293T-Zellen mittels Polyethylenimin.....	42
4.1.5	Transfektion von HEK293/2089.17 und HEK293/TR- Zellen mittels Polyethylenimin	43
4.2	Immunologische Methoden	43
4.2.1	Durchflusszytometrie	43
4.2.2	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	51
4.3	Mikrobiologische Methoden	52
4.4	Molekularbiologische Methoden	52
4.4.1	Transformation von Bakterien	52
4.4.2	Isolation großer Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien.....	53
4.4.3	Schneiden der DNA mit Restriktionsendonukleasen	54
4.4.4	Elektrophoretische Auftrennung der DNA mittels Agarosegelelektrophorese 54	
4.5	Proteinbiochemische Methoden.....	55
4.5.1	Aufreinigung rekombinanter Proteine mittels Metall-Chelat- Affinitätschromatographie.....	55

4.5.2	Konzentrierung rekombinanter EBV-Proteine	56
4.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	56
4.5.4	Coomassie-Färbung.....	57
4.5.5	Immunologischer Nachweis von Proteinen	57
4.5.6	Konzentrationsbestimmung von rekombinanten EBV-Proteinen.....	59
4.5.7	Aufreinigung und Konzentrierung von Wildtyp Viren und VLP.....	61
4.5.8	Konzentrationsbestimmung von Wildtyp-EBV.....	61
5	Ergebnisse.....	62
5.1	Etablierung einer Suspensions-HEK293T-Zelllinie	62
5.2	Herstellung rekombinanter EBV-Proteine zur Stimulation von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	65
5.2.1	Nachweis und Konzentrationsbestimmung der Proteine	65
5.2.2	Stimulation von CD4 ⁺ T-Zellen mit den rekombinanten EBV Proteinen	67
5.3	VLP – standardisierte Herstellung und Nachweis.....	69
5.4	Durchflusszytometrische Analyse der EBV-spezifischen T-Zell-Antwort.....	72
5.4.1	T-Zell-Antwort nach VLP-Stimulation	73
5.4.2	T-Zell Antwort nach LCL(Z-)-Stimulation	78
6	Diskussion.....	84
6.1	Analyse der rekombinant exprimierten und aufgereinigten EBV-Proteine	85
6.2	VLP für das EBV-spezifische Immunmonitoring	86
6.3	LCL(Z-) zum EBV-spezifischen Immunmonitoring.....	89
6.4	Ausblick.....	93
7	Zusammenfassung	95
8	Summary	96
	Abkürzungsverzeichnis.....	97
	Abbildungsverzeichnis.....	99
	Tabellenverzeichnis.....	100
	Literaturverzeichnis	101

1 Einleitung

1.1 Epstein-Barr-Virus, Geschichtliches

Das Epstein-Barr-Virus (EBV), auch als Humanes Herpesvirus 4 (HHV4) bezeichnet, gehört zur Unterfamilie der γ -Herpesviren, Gattung Lymphokryptoviren. EBV ist ein weitverbreitetes humanpathogenes Virus, mit dem mehr als 90% der gesamten Weltbevölkerung infiziert sind (Cohen, 2000).

Großen Anteil an der Entdeckung von EBV hatte der britische Forscher Denis Burkitt. Er beschrieb in den späten 1950er und frühen 1960er Jahren erstmals einen in Ost- und Zentralafrika endemisch auftretenden Tumor (Burkitt, 1958; Burkitt & O'Connor, 1961), welcher später nach ihm benannt wurde. Aufgrund der geographischen und klimagebundenen Verteilung des Tumors vermutete er eine umweltbedingte oder infektiöse Ursache. Im Jahr 1964 gelang Anthony Epstein, Bert Achong und Yvonne Barr der elektronenmikroskopische Nachweis von Viren in Burkitt-Lymphom (BL)-Zellen (Epstein, Achong, & Barr, 1964). 1968 konnte dann der ätiologische Zusammenhang zwischen EBV und Infektiöser Mononukleose (IM) aufgezeigt werden (Klein et al., 1968) und 1970 wurde EBV-DNA erstmals in Tumorbiopsien von Patienten gefunden, die an Nasopharynxkarzinom (NPC) erkrankt waren (zur Hausen et al., 1970). Seitdem wurde EBV auch mit der Entstehung von Non-Hodgkin-Lymphomen und oraler Haarleukoplakie in Patienten mit *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS) in Zusammenhang gebracht (Greenspan et al., 1985; Ziegler et al., 1982) und die EBV-DNA in weiteren Tumorentitäten, zum Beispiel Hodgkin- (Weiss, Movahed, Warnke, & Sklar, 1989) und T-Zell-Lymphomen (Jones et al., 1988), nachgewiesen.

1997 schließlich wurde EBV von der *International Agency for Research on Cancer* (IARC), einer spezialisierten Krebsforschungsgruppe der Weltgesundheitsorganisation, als Tumovirus klassifiziert (IARC, 1997). Neuere Forschungsergebnisse deuten außerdem auf einen Zusammenhang zwischen bestimmten Autoimmunerkrankungen, wie z.B. Multipler Sklerose, und einer EBV-Infektion hin (Ascherio & Munger, 2010).

1.2 Struktur von EBV

Wie auch andere Herpesviren besitzt das EBV ein lineares, doppelsträngiges DNA-Genom, welches im Viruskern vorliegt und von einem Kapsid umgeben wird, welches sich aus mehreren unterschiedlichen Proteinen zusammensetzt. Außerhalb des Nukleokapsids befindet sich eine weitere Schicht, das sogenannte Tegument, welches ebenfalls aus mehreren unterschiedlichen viralen Proteinen besteht. Umschlossen wird das Tegument von der äußeren Virushülle, einer Lipiddoppelmembran mit eingelagerten Glykoproteinen.

Das EBV-Genom umfasst 184 Kilobasenpaare (Baer et al., 1984) und kodiert für etwa 100 verschiedene Proteine (Longnecker, Kieff, & Cohen, 2007). An beiden Enden der linearen DNA befinden sich die *terminal repeats* (TR) (Given, Yee, Griem, & Kieff, 1979), 0,5 kbp lange repetitive Sequenzen, die durch homologe Rekombination die Zirkularisierung des viralen Genoms in infizierten Zellen bewirken (Kutok & Wang, 2006). Zwischen diesen TR befinden sich eine singuläre kurze (US) und eine singuläre lange (UL) Sequenzdomäne, welche von internen Sequenzwiederholungen (IR1), sogenannten *internal repeats* (IR), voneinander getrennt werden (Cheung & Kieff, 1982). Die US-Domäne besteht aus einer einzigen Sequenzdomäne (U1), während die UL-Domäne aus vier Sequenzdomänen (U2-U5) besteht, welche wiederum durch interne Sequenzwiederholungen (IR2-IR4) voneinander getrennt sind. In der latenten Phase der Infektion erfolgt die DNA-Replikation ausgehend vom Replikationsursprung *oriP* (*origin of plasmid replication*) durch die zelluläre DNA-Polymerase (Rawlins, Milman, Hayward, & Hayward, 1985; Yates, Warren, Reisman, & Sugden, 1984), in der lytischen Phase des EBV-Zyklus dagegen ausgehend von den zwei Replikationsursprüngen *oriLyt* (*origin of lytic replication*) durch die virale DNA-Polymerase (Hammerschmidt & Sugden, 1988).

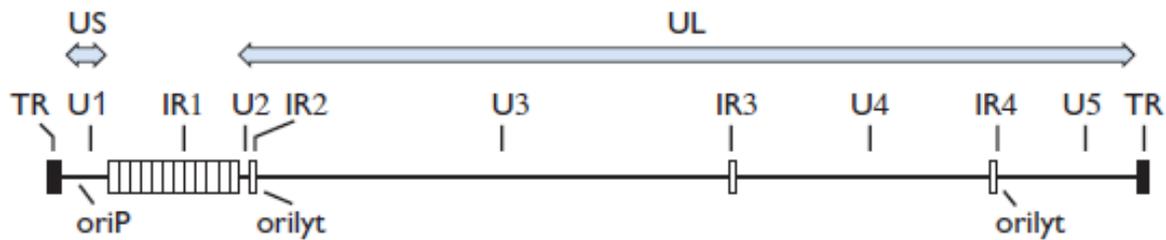


Abbildung 1.2-1: Schematische Darstellung des linearen EBV- Genoms: Lineare Anordnung des EBV-Genoms mit singulärer kurzer (US) und singulärer langer (UL) Domäne, welche in weitere einzelne Sequenzdomänen (U1-U5) unterteilt werden. Diese werden wiederum durch interne Sequenzwiederholungen (IR1-IR4) getrennt. An beiden Enden befinden sich terminale Sequenzwiederholungen (TR). Die Replikationsursprünge der latenten (oriP) und lytischen (oriL) Phase der Infektion sind dargestellt (Longnecker et al., 2007).

Aufgrund von Sequenzunterschieden in den nukleären Antigenen EBNA-LP, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B und EBNA-3C wird EBV in zwei Subtypen unterteilt; EBV Typ 1 und Typ 2, auch bekannt als Typ A und Typ B (Longnecker et al., 2007). Diese beiden EBV-Typen unterscheiden sich in ihren transformierenden Eigenschaften und ihrer geographischen Verteilung (Zimmer et al., 1986). Typ 1 ist vorherrschend in der westlichen Hemisphäre und Südostasien, während Typ 1 und Typ 2 in Afrika in etwa gleichhäufig vorkommen (Rickinson, Young, & Rowe, 1987).

1.3 EBV-Infektion

1.3.1 Die EBV Primärinfektion

EBV wird hauptsächlich durch Speichel übertragen und gelangt im Hals-Nasen-Rachen-Raum in Kontakt mit dem lymphatischen Gewebe. Ob zuerst Epithelzellen im Rachen und danach eingewanderte B-Lymphozyten, oder B-Zellen direkt infiziert werden, konnte noch nicht abschließend geklärt werden, ganz im Gegensatz zu den einzelnen molekularen Mechanismen, die zur Infektion führen.

Mittels Glykoprotein (gp) 350, einem Glykoprotein der Virushülle, bindet EBV an den Komplementrezeptor CD21 auf der Oberfläche von B-Zellen (Nemerow, Mold, Schwend,

Tollefson, & Cooper, 1987). Nach Rezeptor-vermittelter Endozytose der Virionen kommt es zur Fusion von Virus- und Zellmembran, was durch Bindung von viralem gp42 an humane Leukozyten-Antigene (HLA) der Klasse II vermittelt wird (Borza & Hutt-Fletcher, 2002). Auch die viralen Proteine gB, gH und gL spielen dabei eine Rolle. Während EBV-Mutanten, die kein gp350 in der Virushülle tragen, B-Zellen noch mit niedriger Effizienz infizieren können (Janz et al., 2000), ist dies ohne gp42 nicht mehr möglich (X. Wang & Hutt-Fletcher, 1998).

Der Mechanismus der Infektion von Epithelzellen verläuft dagegen anders. Sowohl gp350-abhängige, als auch mehrere gp350-unabhängige Wege der Virus-Zell-Bindung wurden hierfür beschrieben (Hutt-Fletcher, 2007). Außerdem ist eine Infektion von Epithelzellen auch ohne gp42 nicht nur möglich, sondern sogar effizienter (X. Wang, Kenyon, Li, Mullberg, & Hutt-Fletcher, 1998). Die Fusion von Virus und Zelle wird dabei vor allem durch einen Komplex aus gH und gL vermittelt, welcher an zelluläre Integrine bindet (Borza, Morgan, Turk, & Hutt-Fletcher, 2004; Chesnokova, Nishimura, & Hutt-Fletcher, 2009).

Aufgrund der unterschiedlichen Wege von Bindung an und Fusion mit B-Zellen und Epithelzellen wird postuliert, dass EBV, welches aus B-Zellen stammt, effektiver Epithelzellen infiziert und umgekehrt (Bornkamm, Behrends, & Mautner, 2006; Borza & Hutt-Fletcher, 2002). Vermutlich wird dadurch eine Reinfektion viral infizierter Zellen vermieden und ein Viraustausch zwischen verschiedenen Geweben erleichtert.

1.3.2 Die latente Infektion

In neu infizierten B-Zellen etabliert EBV eine latente Infektion, in der es zu keiner Produktion von infektiösen Viren kommt. In dieser Latenzphase werden nur wenige, maximal neun verschiedene virale Proteine, die sogenannten Latenzproteine, und zwei nicht kodierende virale RNAs exprimiert. Es gibt vier verschiedene Formen der Latenz mit einem jeweils charakteristischen Expressionsmuster der viralen Latenzproteine (**Tabelle 1.3-1**). In **Latenzphase 0** werden lediglich die zwei nicht-kodierenden *EBV encoded RNAs* (EBERs) und womöglich *latent membrane protein 2A* (LMP2A) exprimiert (Miyashita, Yang, Babcock, & Thorley-Lawson, 1997). Diese Phase kommt in ruhenden Gedächtnis-B-Zellen gesunder Erwachsener vor. In **Latenzphase I** werden die EBERs und *EBV nuclear antigen 1* (EBNA1)

exprimiert. Sie ist charakteristisch für Zellen des BL (Heslop, 2009; Rowe et al., 1987). In **Latenzphase II** werden die EBERs, EBNA1, *latent membrane protein 1* (LMP1), LMP2A und LMP2B exprimiert. Sie ist in Zellen des EBV-positiven Hodgkin-Lymphoms, des NPC und des peripheren T-Zell-Lymphoms zu finden. Alle neun Latenzantigene: EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, EBNA-LP, LMP1, LMP2A und LMP2B sowie die EBERs werden in **Latenzphase III** exprimiert, welche sich bei *post-transplant lymphoproliferative disease* (PTLD) und IM finden lässt. Außerdem ist sie typisch für lymphoblastoide Zelllinien (LCL), die durch Infektion von B-Zellen mit EBV *in vitro* entstehen und als Modell zur Untersuchung von EBV-infizierten B-Zellen genutzt werden (Young & Rickinson, 2004).

Tabelle 1.3-1: Expressionsmuster der EBV-Latenzproteine in den verschiedenen Latenzformen und Erkrankungen:

Latenz-phase	EBERs	EBNA1	EBNA2	EBNA3s	EBNA-LP	LMP1	LMP2	Erkrankung
0	+	-	-	-	-	-	+	Gedächtnis B-Zelle
I	+	+	-	-	-	-	-	BL
II	+	+	-	-	-	+	+	HL, NPC, pTCL
III	+	+	+	+	+	+	+	PTLD, IM

BL, Burkitt-Lymphom; HL, Hodgkin-Lymphom; NPC, Nasopharynxkarzinom; pTCL, peripheres T-Zell-Lymphom; PTLD, *post-transplant-lymphoproliferative disease*; IM, Infektiöse Mononukleose.

Den einzelnen Latenzantigenen kommen dabei unterschiedliche wichtige Funktionen zu:

Die **EBERs** sind zwei kleine und nicht-kodierende RNAs, die in allen Latenzphasen vorkommen und deren genaue Rolle für die Infektion noch nicht eindeutig geklärt werden konnte (Kutok & Wang, 2006), für die aber eine Apoptose-inhibierende und Onkogenese-fördernde Wirkung vermutet wird (Komano, Maruo, Kurozumi, Oda, & Takada, 1999).

EBNA1 bindet an den *oriP* des viralen Genoms und führt so zu dessen episomaler Erhaltung und Replikation (Lee, Diamond, & Yates, 1999). Weiterhin verankert es die virale DNA an die zellulären Chromosomen, was während der Zellteilung die Weitergabe des Genoms an

die Tochterzellen gewährleistet (Longnecker et al., 2007). Eine Glycin-Alanin-Wiederholung in der Aminosäuresequenz von EBNA1 verhindert dessen proteasomalen Abbau und inhibiert somit die Präsentation von Antigenpeptiden auf MHC-I an der Zelloberfläche, was die effektive Erkennung durch CD8⁺ T-Zellen verhindert (Levitskaya, Sharipo, Leonchiks, Ciechanover, & Masucci, 1997).

EBNA2 ist ein wichtiger Transaktivator sowohl viraler Gene, z.B. LMP1 und LMP2A (Abbot et al., 1990; F. Wang, Tsang, Kurilla, Cohen, & Kieff, 1990), als auch zellulärer Oberflächenmarker wie CD21 und CD23 (Cordier et al., 1990). Weiterhin wird EBNA2 eine essenzielle Rolle bei der Transformation von B-Lymphozyten zugesprochen (Cohen, Wang, Mannick, & Kieff, 1989).

Die EBNA3-Familie besteht aus drei Proteinen: EBNA3A, EBNA3B und EBNA3C. **EBNA3A** und **EBNA3C** sind notwendig für die effektive Proliferation der EBV-infizierten B-Zelle, indem sie wichtige Tumorsuppressor-Signalwege modulieren (Cooper et al., 2003; Maruo et al., 2009). Im Gegensatz dazu wirkt **EBNA3B** eher tumorsuppressiv und vermindert das onkogene Potential von EBV (Allday, Bazot, & White, 2015).

EBNA-LP (*EBV nuclear antigen leader protein*) spielt eine Schlüsselrolle in der Hochregulierung zellulärer Gene, die für das Auswachsen von lymphoblastoiden Zellen wichtig sind (Mannick, Cohen, Birkenbach, Marchini, & Kieff, 1991), und verstärkt zudem das Transaktivierungspotential von EBNA 2 (Harada & Kieff, 1997).

LMP1 ist ein funktionelles Homolog von CD40 und wirkt entsprechend als B-Zell-Aktivierungs- und Differenzierungsrezeptor (Kilger, Kieser, Baumann, & Hammerschmidt, 1998; Uchida et al., 1999) und aktiviert den NFκB-Signalweg, wodurch das Überleben der Zelle gefördert wird (Mosialos et al., 1995). Außerdem führt es im transgenen Mausmodell zur Ausbildung von B-Zell-Lymphomen (Kulwichit et al., 1998) und zeigt somit onkogenes Potential.

LMP2A imitiert einen aktivierten B-Zell-Rezeptor und sendet somit wichtige Überlebenssignale in die Zelle (Merchant, Caldwell, & Longnecker, 2000), moduliert den B-Zell-Rezeptor aber außerdem negativ (C. L. Miller et al., 1995), wodurch der Eintritt in die lytische Phase des EBV-Zyklus durch Antigenstimulation verhindert wird. **LMP2B** scheint

einen Gegenspieler zu LMP2A darzustellen und führt bei Überexpression zu vermehrter Expression der lytischen Antigene von EBV (Rechsteiner et al., 2008).

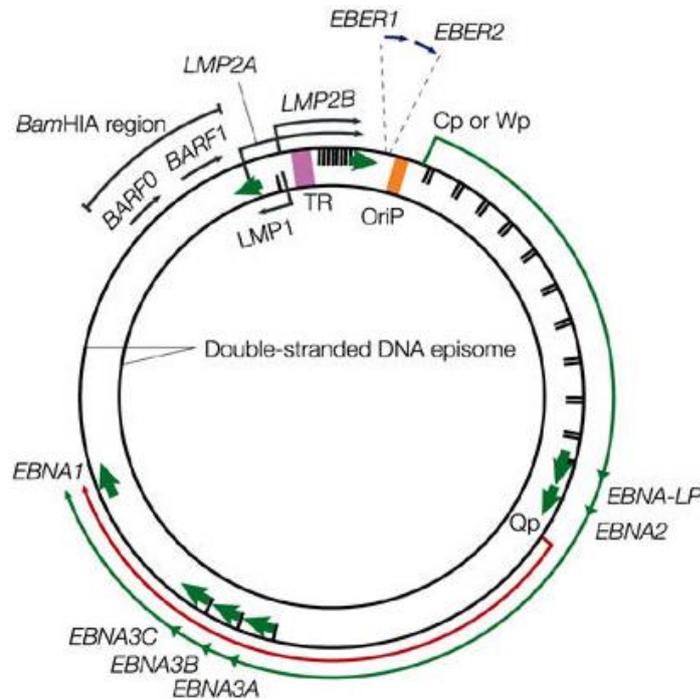


Abbildung 1.3-1 Das episomale EBV-Genom: Gezeigt sind Lage und Transkriptionsrichtung der EBV-Latenzantigene auf dem aus einer Doppelstrang-DNA bestehenden DNA-Episom. Der Replikationsursprung OriP ist in orange dargestellt. Die kurzen, grünen Pfeile repräsentieren die Latenzantigene und deren Transkriptionsrichtung. Die *terminal repeats* (TR) sind in lila dargestellt. Die kurzen blauen Pfeile zeigen die nicht kodierenden EBERs (EBER1 und EBER2). Der außenliegende, lange grüne Pfeil zeigt, ausgehend von den Cp- oder Wp-Promotoren, die Transkription während der Latenzphase III, in der alle EBNAs exprimiert werden. Der rote dünne Pfeil dagegen repräsentiert die Transkription während der Latenzphasen I und II, in denen EBNA1 ausgehend vom Qp-Promotor transkribiert wird (Young & Rickinson, 2004).

Nach überstandener Primärinfektion findet sich EBV hauptsächlich in ruhenden Gedächtnis-B-Zellen (Yao, Ogan, Rowe, Wood, & Rickinson, 1989). In gesunden Erwachsenen sind nur zwischen einer und 50 von einer Million B-Zellen, die im Blut zirkulieren, mit EBV infiziert. Diese Anzahl an latent infizierten Zellen scheint im Verlauf mehrerer Jahre stabil zu bleiben (Khan, Miyashita, Yang, Babcock, & Thorley-Lawson, 1996). Die Eradikation einer EBV-

Infektion mittels allogener Knochenmarktransplantation (Gratama et al., 1988) sowie die Beobachtung, dass Patienten mit X-chromosomaler Agammaglobulinämie (Faulkner et al., 1999), einer Erkrankung bei der keine reifen B-Zellen gebildet werden, nicht mit EBV infiziert werden, unterstreichen die Notwendigkeit des B-Zellkompartiments für die persistierende EBV-Infektion.

1.3.3 Der lytische Zyklus

Der Übergang von der latenten Phase zum lytischen Zyklus von EBV wird durch die Expression zweier viraler Transkriptionsfaktoren, **BZLF1** (auch bekannt als ZEBRA, Zta, EB1, oder Z) und **BRLF1** (auch bekannt als Rta, oder R) ausgelöst (G. Miller, El-Guindy, Countryman, Ye, & Gradoville, 2007). BZLF1 ist dabei der Hauptinitiator des lytischen Zyklus und seine Expression in latent infizierten Zellen alleine reicht aus, um diesen auszulösen (Grogan et al., 1987). In einigen EBV-positiven Zelllinien dagegen induziert BRLF1 den lytischen Zyklus, indem es die Expression von BZLF1 induziert (Ragoczy, Heston, & Miller, 1998). BZLF1 und BRLF1 werden zu den sehr frühen Antigenen (*immediate early antigen, IEA*) des lytischen Zyklus gezählt. Beide aktivieren sowohl eigenständig als auch synergistisch mehrere frühe Antigene (*early antigen, EA*), welche für Proteine kodieren, die an der viralen DNA-Replikation beteiligt sind. BZLF1 bindet außerdem an den Replikationsursprung *OriLyt* und ist essenziell für die DNA-Replikation (Schepers, Pich, & Hammerschmidt, 1996).

Der nächste Schritt im lytischen Zyklus ist die DNA-Replikation. Die Amplifikation des Genoms erfordert die Replikationsproteine, zu denen u.a. BZLF1 und die frühen Antigene BALF2, BBLF4, BSLF1, BBLF2/3, BALF5 und BMRF1 zählen (Fixman, Hayward, & Hayward, 1995). Die Replikation findet in intranukleären Kompartimenten statt (Daikoku et al., 2005) und die DNA wird dort 100-1000 mal amplifiziert (Hammerschmidt & Sugden, 1988).

Zuletzt kommt es zur Expression von circa 36 späten Antigenen (*late antigen, LA*) (Yuan, Cahir-McFarland, Zhao, & Kieff, 2006). Diese kodieren für virale Strukturproteine, die essentiell sind für die Formation und Reifung des Kapsids, die Verpackung der viralen DNA im Kapsid, die Fusion mit der Zellmembran, die Anheftung der Viren an neue Zellen und die

Internalisierung während der *de novo* Infektion sowie dem Schutz lytisch infizierter Zellen vor der Immunantwort des Wirts (McKenzie & El-Guindy, 2015). Die Produktion und Freisetzung der neuen Viren führt letztlich zur Zerstörung der Wirtszelle (Longnecker et al., 2007).

Verschiedene Induktoren des lytischen Zyklus wurden *in vitro* und *in vivo* beschrieben. In der Zellkultur können mehrere chemische und biologische Agenzien eine EBV-Reaktivierung induzieren. Hierzu zählen Inhibitoren von Histon-Deacetylasen (*histone deacetylase inhibitor*, HDACi) (Luka, Kallin, & Klein, 1979), Agonisten der Proteinkinase C (zur Hausen, O'Neill, Freese, & Hecker, 1978), Inhibitoren der DNA-Methyltransferase (Ben-Sasson & Klein, 1981), anti-Immunglobulin (Takada, 1984) und TGF-beta (*transforming growth factor beta*) (Fahmi, Cochet, Hmama, Opolon, & Joab, 2000). Frühere Studien ließen vermuten, dass *in vivo* eine Differenzierung latent infizierter B-Zellen mit der EBV-Reaktivierung zusammenhängt (Crawford & Ando, 1986; Longnecker et al., 2007). Später konnte dann gezeigt werden, dass eine Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen zu einer lytischen Reaktivierung führt, vermittelt von dem B-Zell-Differenzierungsfaktor XBP-1 (Bhende, Dickerson, Sun, Feng, & Kenney, 2007). Außerdem führte in Epithelzellen von Patienten mit oraler Haarleukoplakie die Expression des Differenzierungsmarkers BLIMP1 ebenfalls zur Induktion des lytischen Zyklus (Buettner et al., 2012). Neben der zellulären Differenzierung scheinen auch Hypoxie (Kenney & Mertz, 2014) und Stress für das endoplasmatische Retikulum (G. M. Taylor, Raghuwanshi, Rowe, Wadowsky, & Rosendorff, 2011) eine Rolle zu spielen.

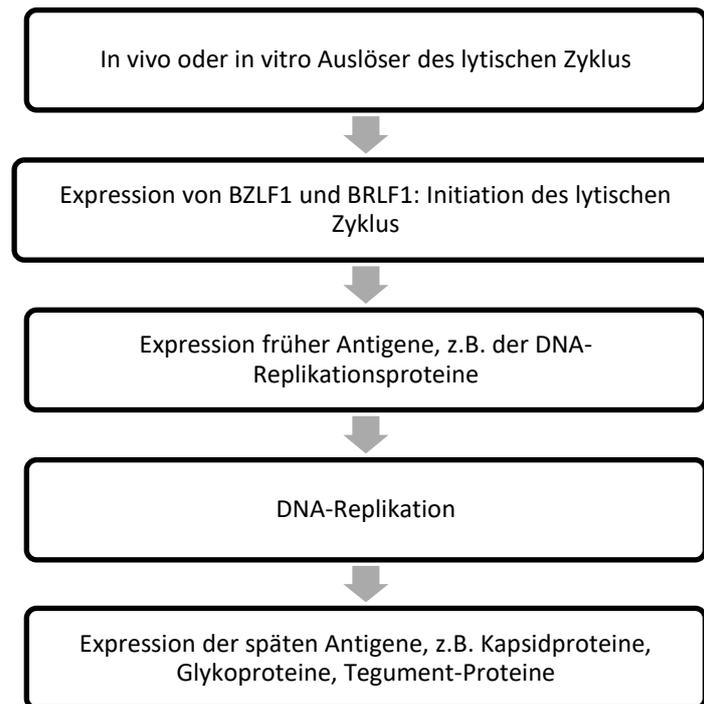


Abbildung 1.3-2: Zeitlicher Ablauf des lytischen Zyklus von EBV

1.4 EBV-assoziierte Erkrankungen

1.4.1 Die infektiöse Mononukleose (IM)

Die IM wurde erstmals 1920 von Sprunt und Evans als Syndrom beschrieben, das mit atypisch großen, mononukleären Zellen einhergeht (Dunmire, Hogquist, & Balfour, 2015). Diese atypischen Zellen, die auch als Downey Zellen bekannt sind, stellten sich später als aktivierte CD8⁺ T-Lymphozyten heraus. 1968 wurde dann erstmals der Zusammenhang zwischen der IM und EBV hergestellt (G. Henle, Henle, & Diehl, 1968). Die Primärinfektion mit EBV erfolgt im Säuglings- und Kindesalter meist asymptomatisch oder geht mit nicht spezifischen Symptomen einher (Grose, 1985), während sie bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen vermehrt zur IM mit charakteristischen Symptomen führt. In entwickelten Ländern kommt es häufiger zur IM als in Entwicklungsländern, was vor allem auf die besseren hygienischen und sanitären Bedingungen zurückzuführen ist, die wohl eine spätere Primärinfektion mit EBV und somit auch eine erhöhte Anfälligkeit für die IM zur

Folge haben (Hjalgrim, Friborg, & Melbye, 2007). Dies konnte durch sero-epidemiologische Studien bestätigt werden (Crawford et al., 2006; Takeuchi et al., 2006).

Klinisch präsentiert sich die IM nach einer Inkubationszeit von 30 bis 50 Tagen typischerweise mit der Symptomtrias Fieber, Halsschmerzen und Lymphadenopathie (Hurt & Tammaro, 2007) und geht mit teils ausgesprochener Abgeschlagenheit und Krankheitsgefühl einher. Häufig kommen Hepato- und Splenomegalie, Bauchschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Hautausschlag vor. Außerdem kann es zu Komplikationen kommen, die zwar selten sind, jedoch schwerwiegend sein können. Zu diesen zählen beispielweise hämolytische Anämie, Thrombozytopenie, Hämophagozytische Lymphohistiozytose, Neutropenie, Peri- und Myokarditis, sowie neurologische und psychiatrische Komplikation (Dunmire et al., 2015). Meist ist die Erkrankung jedoch selbstlimitierend und klingt nach 4-6 Wochen wieder ab (Vouloumanou, Rafailidis, & Falagas, 2012). Während der IM findet eine massive Expansion der CD8⁺ T-Zellen und in geringerem Maße auch der CD4⁺ T-Zellen statt (Longnecker et al., 2007; Precopio, Sullivan, Willard, Somasundaran, & Luzuriaga, 2003), und es lassen sich hohe Virustiter im Rachenspülwasser der Patienten nachweisen (Balfour et al., 2005).

1.4.2 Chronisch aktive EBV-Infektion (CAEBV)

Die CAEBV zeichnet sich durch eine unzureichende Immunkontrolle der viralen Replikation aus (Okano et al., 1991) und führt zu chronischen, IM-ähnlichen Symptomen, die länger als sechs Monate bestehen, sowie zu atypischen EBV-spezifischen Antikörpertitern und einer erhöhten Viruslast (Kimura et al., 2001). Die Erkrankung ist zwar selten, geht jedoch mit einer hohen Mortalität, bedingt durch Komplikationen wie Panzytopenie, Leberversagen und die Entwicklung von T- und NK-Zell-Lymphomen, einher (Okano, 2002; Suzuki et al., 2004). Neben den B-Zellen werden bei der CAEBV auch T- und NK-Zellen infiziert und transformiert, was zu deren unkontrollierter Proliferation führen kann (Ohshima et al., 2008). Bisher scheint als Therapie der CAEBV lediglich die Stammzelltransplantation erfolgsversprechend zu sein (Cohen, 2009).

1.4.3 X-chromosomale lymphoproliferative Erkrankung (XLP)

Die XLP (Synonyme: *Duncan's disease*, "Purtilo-Syndrom") basiert auf einem seltenen Immundefekt und manifestiert sich nach EBV-Primärinfektion als schwer verlaufende und häufig letal endende IM (Grierson & Purtilo, 1987; Mroczek, Weisenburger, Grierson, Markin, & Purtilo, 1987). Neben einer fulminanten IM kann es außerdem zur Entstehung von B-Zell-Lymphomen (Harrington, Weisenburger, & Purtilo, 1987) und zu einer Dysgammaglobulinämie kommen. Ursache der Erkrankung, die nur das männliche Geschlecht betrifft, ist eine Mutation im X-chromosomal kodierten Gen *SAP (signaling lymphocyte activation molecule [SLAM]-associated protein)*, welches für die Interaktion von B- und T-Zellen wichtig ist (Sayos et al., 1998). Dies führt letztendlich zu einer unkontrollierten Vermehrung EBV-infizierter B-Zellen (Cohen, 2000). Inzwischen wurden weitere primäre Immundefekte mit hohem Risiko EBV-assoziiierter Komplikationen beschrieben (Cohen, 2015).

1.4.4 EBV-assoziierte Tumorerkrankungen

Das BL, HL, NPC und das Magenkarzinom sind die häufigsten EBV-assoziierten Tumorerkrankungen in immunkompetenten Individuen. Typischerweise treten sie erst Jahre nach der EBV-Primärinfektion auf, so dass die EBV-Infektion wahrscheinlich nur ein Faktor eines vermutlich komplexen, mehrstufigen Prozesses der malignen Transformation darstellt (Kutok & Wang, 2006).

Das BL war der erste mit EBV assoziierte Tumor. Es werden drei verschiedene Formen des BL unterschieden: das endemische, das sporadische und das Immundefekt-assoziierte BL (Jaffe, 2009). Vor allem das in Afrika endemisch auftretende BL zeigt mit über 95% eine starke Assoziation mit EBV, während nur 10-30% der vor allem in Europa und Amerika auftretenden sporadischen Form EBV-positiv sind (IARC, 1997). Das AIDS-assoziierte BL ist in 30-50% der Fälle EBV-positiv (Carbone, 2003).

Der Zusammenhang zwischen HL und EBV gilt als wahrscheinlich. So zeigen sich insgesamt circa 40% der klassischen HL EBV-positiv, mit einer unterschiedlichen Verteilung bei den einzelnen Subtypen (zwischen 10% beim lymphozytenreichen HL und 85% beim

lymphozytenarmen HL)(Glaser et al., 1997). Nach einer durchgemachten IM zeigt sich außerdem ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines HL, welches sich erst nach zehn Jahren wieder auf das Ausgangsrisiko reduziert (Hjalgrim, Smedby, et al., 2007). Der genaue Beitrag von EBV bei der Tumorentstehung bleibt allerdings weiterhin ungeklärt.

Das NPC lässt sich in zwei Formen, die keratinisierende und nicht-keratinisierende Form unterteilen. Das nicht-keratinisierende NPC tritt deutlich häufiger auf und zeigt eine nahezu 100%-ige Assoziation mit EBV (Klein et al., 1974; Niedobitek et al., 1991). Es tritt endemisch in Südostasien, in Nordafrika und bei den Inuit in Alaska auf, in Europa und Amerika kommt es dagegen nur sporadisch vor (Nicholls, Agathangelou, Fung, Zeng, & Niedobitek, 1997). Das EBV-Genom findet sich in allen Epithelzellen des NPC, jedoch nicht in den ins Tumorgewebe eingewanderten Lymphozyten (Kutok & Wang, 2006). Erhöhte EBV-spezifische Antikörpertiter nach Therapie gehen mit einer schlechten Prognose einher, während konstante oder fallende Titer mit einer besseren Prognose assoziiert sind (Halprin et al., 1986).

Seltenere Tumorentitäten, die ebenfalls eine EBV-Assoziation aufweisen, sind extranodale NK- und T-Zelllymphome, lymphoepitheliale Tumoren und Leiomyosarkome (Hjalgrim, Friborg, et al., 2007).

1.4.5 Posttransplantations-Lymphoproliferative Erkrankung (PTLD)

Die PTLD ist eine seltene aber häufig fatale Komplikation, die durch eine iatrogene Immunsuppression nach Organ- oder Stammzelltransplantation begünstigt wird (Hopwood & Crawford, 2000). Die Erscheinungsformen der PTLD sind heterogen (Harris, Ferry, & Swerdlow, 1997) und werden nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO) in vier Gruppen eingeteilt: reaktive plasmazytäre Hyperplasien, monomorphe PTLD, polymorphe PTLD und HL-ähnliche PTLD. Ursächlich ist eine gestörte T-Zellfunktion, welche zu einer ungestörten Proliferation EBV-infizierter B-Zellen führt. So finden sich nach Transplantation oft erhöhte Virustiter im Speichel und es kommt zu einem Anstieg EBV-infizierter B-Zellen und einem vermehrten Nachweis von EBV-DNA im Blut (Kenagy et al., 1995; Preiksaitis, Diaz-Mitoma, Mirzayans, Roberts, & Tyrrell, 1992; Savoie, Perpete, Carpentier, Joncas, &

Alfieri, 1994). Die Inzidenz liegt zwischen 1% und 10%, abhängig von der Art der Transplantation und dem Grad der Immunsuppression (Végso, Hajdu, & Sebestyén, 2011){van Zyl, 2018 #296}. Ein erhöhtes Risiko für eine PTLD haben außerdem EBV-negative Patienten, die erst nach der Transplantation und während der Immunsuppression eine EBV-Primärinfektion durchlaufen (Ho et al., 1985). Als Therapie hat sich der Einsatz des anti-CD20-Antikörpers Rituximab etabliert, welcher die Anzahl der EBV-infizierten B-Zellen reduziert und in Kombination mit einer Reduktion der Immunsuppression und ggf. Chemotherapie bei über 60% der Patienten zu Erfolgen führt (Fox et al., 2014; Mynarek, Schober, Behrends, & Maecker-Kolhoff, 2013). Zudem scheinen experimentelle Ansätze, welche den adoptiven Transfer autogener oder allogener Virus-spezifischer T-Zellen nutzen, vielversprechend und effektiv zu sein (Moosmann et al., 2010; Rooney, Leen, Vera, & Heslop, 2014).

1.4.6 EBV-assoziierte Autoimmunerkrankungen

Die EBV-Infektion scheint mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen assoziiert zu sein, die sich als seltene immunpathologische Folge einer langedauernden Virusträgerschaft manifestieren (G. S. Taylor, Long, Brooks, Rickinson, & Hislop, 2015). Einige Hinweise deuten z.B. auf eine Beteiligung bei der Entstehung der Multiplen Sklerose (MS) hin. Zum einen zeigte sich bei MS-Patienten im Vergleich zu Kontrollen eine erhöhte EBV-Seroprävalenz (Pohl et al., 2006), MS-Patienten weisen oftmals schon Jahre vor Beginn der Erkrankung erhöhte EBV-spezifische Antikörpertiter auf (Munger, Levin, O'Reilly, Falk, & Ascherio, 2011) und schließlich führt eine durchgemachte IM im Vergleich zu asymptomatischer Serokonversion zu einem zwei- bis dreifach erhöhtem Risiko an MS zu erkranken (Thacker, Mirzaei, & Ascherio, 2006). Neben der MS wird EBV auch als ein auslösender Faktor des systemischen Lupus erythematodes postuliert (James & Robertson, 2012).

1.5 Die Rolle der angeborene Immunantwort während der Primärinfektion

1.5.1 Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen)

NK-Zellen werden als die Haupteffektorzellen der angeborenen Immunantwort gegen EBV betrachtet (Rickinson, Long, Palendira, Munz, & Hislop, 2014). Ihre wichtige antivirale Funktion wird dadurch deutlich, dass Personen mit NK-Zell-Defizienz eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Herpesvirusinfektionen aufweisen (Orange, 2013). Während der IM kommt es zu einem Anstieg der absoluten NK-Zellzahl im peripheren Blut (Balfour et al., 2013). Dies scheint vor allem durch die Expansion von früh differenzierten CD56dim NKG2A+ KIR- NK-Zellen bedingt zu sein, welche nach der Primärinfektion Zeichen der terminalen Differenzierung aufweisen und für mindestens 6 Monate in erhöhter Frequenz vorliegen (Azzi et al., 2014). Als direktes Ziel der NK-Zellen konnten lytisch infizierte B-Zellen identifiziert werden (Chijioke et al., 2013). Interessanterweise nimmt die Häufigkeit genau dieser NK-Zellpopulation mit steigendem Alter ab, während die Häufigkeit der IM zunimmt, was darauf hindeutet, dass eine altersabhängige Reduktion der NK-Zell-vermittelten Abwehr gegen EBV das Auftreten von IM begünstigt. Neben ihrer Rolle in der Kontrolle der EBV-Primärinfektion scheinen NK-Zellen zudem die Fähigkeit der Zelltransformation von EBV zu limitieren, so dass Störungen der NK-Zell-Funktion eine EBV-assoziierten Tumorentstehung begünstigen könnten (Lunemann, Vanoaica, Azzi, Nadal, & Munz, 2013).

1.5.2 Andere Zelltypen der angeborenen Immunantwort

Neben NK-Zellen als Haupteffektorzellen der angeborenen Immunantwort spielen noch weitere Zelltypen eine Rolle. Monozyten sind in der Lage EB-Virionen über TLR2 (*toll like receptor 2*) zu erkennen (Gaudreault, Fiola, Olivier, & Gosselin, 2007). Sowohl Monozyten als auch plasmazytäre dendritische Zellen (pDC) können unmethylierte EBV-DNA mittels TLR9 erkennen (Fiola, Gosselin, Takada, & Gosselin, 2010), während myeloide dendritische Zellen (mDC) durch die von latent infizierten Zellen freigesetzten EBERs über TLR3 aktiviert werden (Iwakiri et al., 2009). All diese Mechanismen führen zu einer Zytokinkaskade, die letztlich in der Freisetzung von Interferon alpha (IFN α) durch pDC und Interleukin-12 (IL12) durch mDC mündet (Lunemann et al., 2013; Quan, Roman, Rudenga, Holers, & Craft, 2010),

was wiederum zu einer Aktivierung von NK-Zellen führt. Die genaue Rolle dieser Mechanismen bei der Kontrolle der EBV-Infektion ist noch nicht abschließend geklärt, zumal EBV über eine Vielzahl von Mechanismen dieser Art der Immunkontrolle entgehen kann (Lunemann, Rowe, & Nadal, 2015).

1.6 Die erworbene Immunantwort bei Primär- und persistierender Infektion

1.6.1 Antikörper-Reaktion

Die Dynamik und unterschiedliche Antigen-Spezifität der humoralen Immunantwort gegen EBV nach der Primärinfektion spiegelt verschiedene Stadien viraler Aktivität wieder, einschließlich der initialen B-Zell-Transformation, -Aktivierung und -Proliferation, sowie der lytischen Replikation in (sub)epithelialen Zellen und Virusverbreitung im Speichel (Middeldorp, 2015). Dieser Prozess involviert verschiedene Phasen einer genau regulierten und örtlich unterschiedlich ablaufenden viralen Antigenexpression, welche zu lokalen und systemischen Immunreaktionen führen. Der genaue Ablauf und Ort der frühen humoralen Immunantwort ist noch nicht gänzlich verstanden, aber die Variabilität der Antikörperreaktion gegen EBV deutet an, dass dies kein einheitlich ablaufender Prozess ist (Middeldorp, 2015).

Initial kommt es bei der Primärinfektion zu einer Aktivierung polyklonaler B-Zellen mit erhöhten Immunglobulin (Ig) G-, IgM-, und IgA-Titern; es werden heterophile Antikörper produziert, die aber nicht spezifisch für EBV sind (Longnecker et al., 2007; Mockridge et al., 2004). Heterophile Antikörper erreichen ihren Höchststand 2-5 Wochen nach Symptombeginn und verschwinden meist innerhalb eines Jahres wieder (Svahn et al., 1997). Neben heterophilen Antikörpern finden sich zu Symptombeginn meist auch IgM und IgG gegen VCA (*viral capsid antigen*). Während IgG-Antikörper gegen VCA lebenslang persistieren, verschwinden IgM-VCA nach einiger Zeit wieder (De Paschale & Clerici, 2012). Weiterhin lassen sich einige Wochen nach Symptombeginn Antikörper gegen frühe Antigene (*early antigen, EA*) bei den meisten Personen nachweisen, welche meist maximal 3-4 Monate lang nachweisbar sind. Hohe Titer werden vor allem bei schwer verlaufender

IM, CAEBV und Patienten mit EBV-Reaktivierung und NPC beobachtet (De Paschale & Clerici, 2012). Langsam ansteigende EBNA1-IgG-Antikörper lassen sich in der Regel frühestens 3-4 Wochen nach Symptombeginn nachweisen und sind Zeichen der Rekonvaleszenz (W. Henle et al., 1987). Interessanterweise passiert dies zeitgleich mit der ebenso verzögert ablaufenden EBNA1-spezifischen CD4⁺ T-Zell-Antwort (Long et al., 2013). EBNA1-IgG-Antikörper finden sich meist ein Leben lang, können bei einigen Gesunden, immunsupprimierten Patienten und bei CAEBV allerdings fehlen (G. Miller et al., 1987). Zusammenfassend ist der zeitliche Ablauf der Antikörperreaktion in **Abbildung 1.6-1** zu sehen.

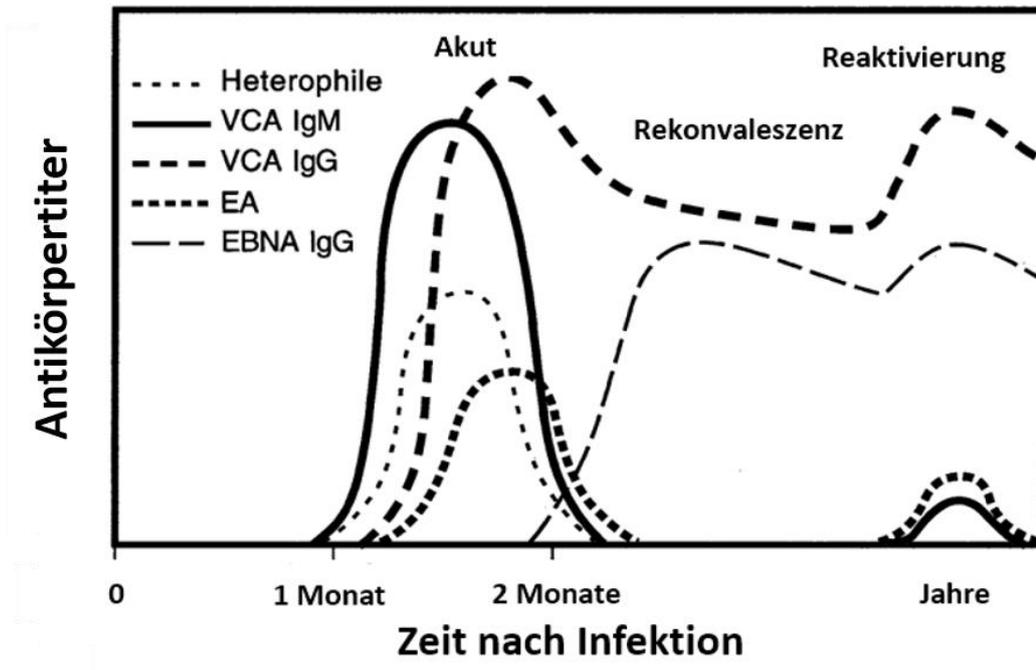


Abbildung 1.6-1: Antikörpertiter nach EBV-Infektion Höhe der jeweiligen Antikörpertiter in Abhängigkeit von der Zeit nach der Infektion mit EBV. Dabei lassen sich einzelne Stadien unterscheiden: Akut, akute IM; Rekonvaleszenz; Reaktivierung, mögliche Reaktivierung bei Immundefizienz (Gulley, 2001).

1.6.2 Die EBV-spezifische T-Zell-Antwort

1.6.2.1 CD8⁺ T-Zell-Antwort

Während der IM kommt es zu einer massiven Expansion des CD8⁺ T-Zell-Kompartiments im peripheren Blut und es können hohe Frequenzen EBV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen mittels Major Histokompatibilitätskomplex-I (MHC-I)-Tetrameren nachgewiesen werden (Balfour et al., 2013). Hierbei sind bis zu 50% aller CD8⁺ T-Zellen spezifisch für lytische Epitope von EBV, wobei sich die Spezifität vor allem gegen die sehr frühen (IE) und frühen (E) und weniger gegen die späten (L) lytischen EBV-Antigene richtet (Abbott et al., 2013). Grund für die IE>E>>L-Hierarchie der Immundominanz könnte einerseits sein, dass CD8⁺ T-Zellen, spezifisch für die IE- und E-Antigene, die weitere Replikation und somit die Expression der L Antigene verhindern (Pudney, Leese, Rickinson, & Hislop, 2005); andererseits könnten die E-Antigene durch immunevasive Mechanismen die effiziente Prozessierung und Präsentation der L-Antigene unterbinden (Quinn et al., 2014). CD8⁺ T-Zell-Antworten gegen latente EBV-Antigene kommen weniger häufig vor als die gegen lytische, können aber trotzdem bis zu 5% der gesamten CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut ausmachen, wobei der Fokus vor allem auf den Proteinen der EBNA3-Familie liegt (Catalina, Sullivan, Bak, & Luzuriaga, 2001; Hislop, Annels, Gudgeon, Leese, & Rickinson, 2002) (siehe **Abbildung 1.6-2**).

Die Expansion der CD8⁺ T-Zellen geschieht ungefähr zeitgleich mit dem Beginn der Symptome der IM und führt zu einer raschen Reduktion der EBV-infizierten B-Zellen im Blut, während das hohe Level der Virusfreisetzung aus dem epithelialen Kompartiment im Mund-Rauch-Raum circa weitere sechs Monate anhält (Balfour et al., 2013; Fafi-Kremer et al., 2005). Dies könnte an der geringen Expression von Migrationsmarkern für das tonsilläre Kompartiment, wie CCR7 oder CD62-L, auf den CD8⁺-T-Zellen liegen, was dort zu einer geringeren Frequenz der EBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen als im peripheren Blut führt (Hislop et al., 2005).

Zeitgleich mit dem Abfall der Viruslast kommt es zu einer raschen Normalisierung des CD8⁺ T-Zell-Kompartiments und es verbleibt ein Gedächtnispool an CD8⁺ T-Zellen, der bis zu 2% für die lytischen und 0,5% für die latenten EBV-Antigene ausmacht, was auch die

Verhältnisse bei gesunden Virusträgern widerspiegelt. Die ursprüngliche Hierarchie der Immundominanz während der Primärinfektion bleibt auf Ebene der Gedächtniszellen erhalten (Catalina et al., 2001; Hislop et al., 2002; Woodberry et al., 2005). Die CD8⁺ T-Gedächtniszellen befinden sich in einem ruhenden Zustand, befinden sich nicht im Zellzyklus und exprimieren hohe Level an anti-apoptotisch wirkenden Bcl-2 (*B cell lymphoma 2*) und Bcl-xL (*B cell lymphoma extra large*) (Faint et al., 2001)

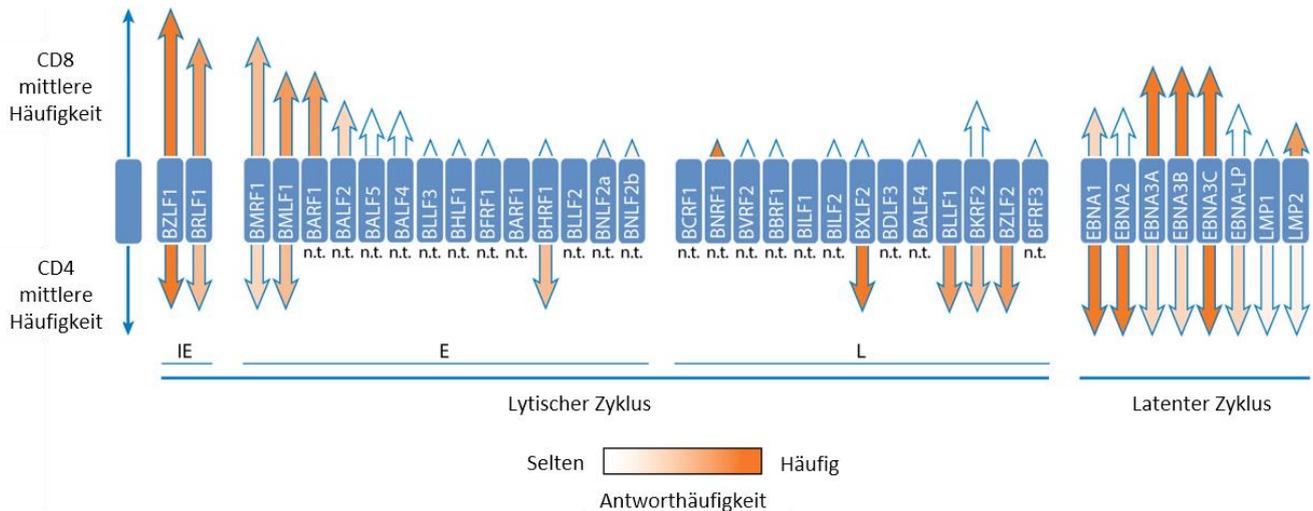


Abbildung 1.6-2: Spezifität und Häufigkeit von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen für lytische und latente EBV-Antigene Die Länge der Pfeile repräsentiert für jedes Protein die mittlere Häufigkeit der spezifischen T-Zell-Antwort. Je tiefer der Farbton eines Pfeils, umso mehr Individuen zeigen Antworten gegen das spezifische Antigen bezogen auf die gesamte Kohorte. Die Länge der Pfeile ist dabei nicht maßstabgetreu. CD8⁺ T-Zell-spezifische Antworten kommen im Mittel 10- bis 20-mal häufiger vor als CD4⁺ T-Zell-spezifische. Abkürzungen: n.t., nicht getestet; IE, *immediate early* (sehr früh); E, *early* (früh); L, *late* (spät) (G. S. Taylor et al., 2015).

1.6.2.2 CD4⁺ T-Zell-Antwort

Im Vergleich zum CD8⁺ T-Zell-Kompartiment ist die Rolle der CD4⁺ T-Zellen bei der Immunkontrolle der EBV-Infektion noch nicht eindeutig geklärt, was vor allem an der vergleichsweise geringen Häufigkeit virusspezifischer CD4⁺ T-Zellen während der EBV-Primärinfektion und in gesunden Virusträgern liegt und daran, dass bis vor kurzem verlässliche Methoden zur Messung der EBV-spezifischen CD4⁺ T-Zell-Antwort nicht vorhanden bzw. nicht sensitiv genug waren (Hislop & Taylor, 2015; Milosevic, Behrends,

Adhikary, & Mautner, 2006). Mittlerweile scheint sich aber die potenziell wichtige Funktion als Effektorzellen gegen MHC-II-tragende Zielzellen, wie EBV-infizierte B-Zellen, herauszukristallisieren und sich die genauere Charakterisierung durch bessere Verfahren, wie den Einsatz von MHC-II-Tetrameren, zu verbessern (Nepom, 2012).

Während der IM kommt es zwar zu keiner stark ausgeprägten Expansion der CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut (Balfour et al., 2013). Dennoch lassen sich EBV-spezifische CD4⁺ T-Zellen nachweisen, die zwischen 0,04% und 5,2% des CD4⁺ T-Zellkompartiments ausmachen können (Amyes et al., 2003). Hinsichtlich der Spezifität der CD4⁺ T-Zellen finden sich unterschiedliche Aussagen: Einerseits konnte gezeigt werden, dass vor allem lytische Antigene Hauptangriffspunkt der CD4⁺ T-Zellen sind. CD4⁺ T-Zellen aus dem peripheren Blut akut oder chronisch EBV-Infizierter, die *in vitro* durch lymphoblastoide Zellen stimuliert wurden, waren größtenteils gegen die viralen Strukturproteine aus der lytischen Phase von EBV gerichtet, während latente Antigene nur wenig oder gar nicht erkannt wurden (Adhikary et al., 2007). Andererseits zeigten Untersuchungen mit MHC-II-Multimeren, dass Antworten gegen latente *versus* lytische Antigene erhöht sind; so waren in einer Studie bis zu 1,5% der CD4⁺ T-Zellen spezifisch für individuelle latente Antigene, während nur 0,5% spezifisch für individuelle lytische Antigene waren (Long et al., 2013). Im Gegensatz zur CD8⁺ T-Zell-Antwort gibt es bei den CD4⁺ T-Zellen keine klare Hierarchie hinsichtlich der Immundominanz einzelner Antigene, sondern eine breit gestreute Antwort mit einer Vielzahl individueller lytischer und latenter Antigene (Long et al., 2011; Mautner & Bornkamm, 2012).

Mit dem Verschwinden der akuten Symptome der IM kommt es innerhalb kurzer Zeit zu einem zügigen Abfall der Frequenzen EBV-spezifischer CD4⁺ T-Zellen (Precopio et al., 2003). Während der akuten IM lassen sich für alle Latenzantigene spezifische CD4⁺ T-Zellen nachweisen, außer für EBNA1. Ähnlich wie die EBNA1-spezifische IgG-Antwort entwickelt sich die CD4⁺ T-Zellantwort gegen dieses Antigen nach der Primärinfektion zeitlich verzögert (Long et al., 2013). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass EBNA1 nur unzureichend aus der infizierten Zelle ausgeschleust wird und somit nicht von benachbarten Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen werden kann (Leung, Haigh, Mackay, Rickinson, & Taylor, 2010).

Trotz der geringen Zahl kommt den EBV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen eine wichtige Funktion zu. CD4⁺ T-Zellen können effektiv EBV-infizierte Zellen erkennen und abtöten und somit den Anteil an infizierten B-Zellen reduzieren (Adhikary et al., 2006; Long et al., 2011; Nikiforow, Bottomly, Miller, & Munz, 2003). Dies beschränkt sich zudem nicht nur auf die lytisch infizierten Zellen, sondern gilt auch für Nachbarzellen, welche die von infizierten Zellen freigesetzten viralen Strukturproteine mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose aufnehmen, prozessieren und präsentieren können (Adhikary et al., 2007). Die Wichtigkeit des CD4⁺ T-Zell-Kompartiments für die Kontrolle der EBV-Infektion zeigt sich auch in der Klinik. Zum einen sind niedrige CD4⁺ T-Zell-Zahlen ein wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung einer PTLD (Sebelin-Wulf et al., 2007). Weiterhin zeigten PTLD-Patienten ein besseres Ansprechen auf allogene T-Zell-Therapie, wenn die T-Zell-Präparate einen hohen Anteil an CD4⁺ T-Zellen enthielten (Haque et al., 2007).

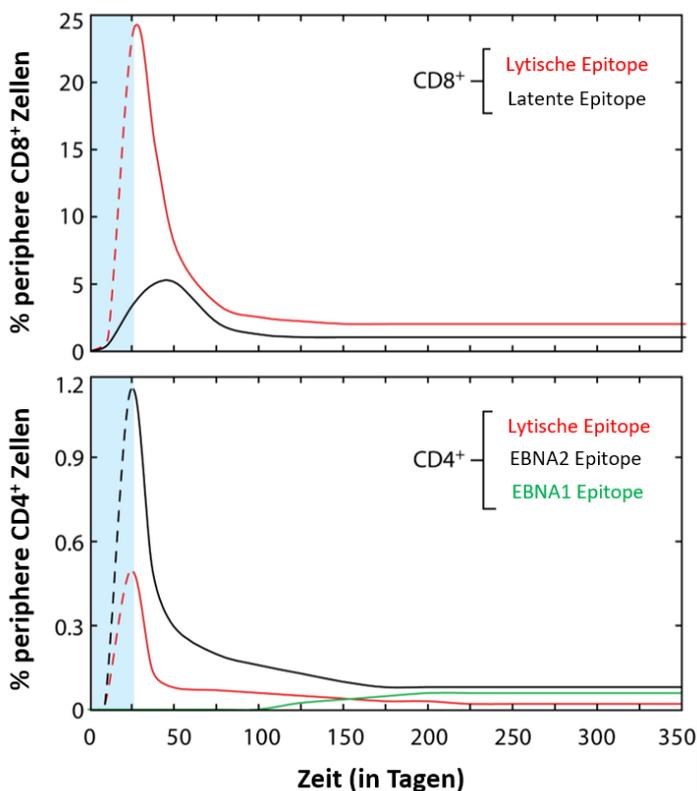


Abbildung 1.6-3: Dynamik der peripheren CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Antwort nach EBV-Primärinfektion Häufigkeit der im peripheren Blut gemessenen antiviralen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Spezifitäten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Primärinfektion (G. S. Taylor et al., 2015).

1.6.3 Symptomatische versus asymptomatische Infektion

Warum es bei einigen Individuen während der Primärinfektion mit EBV zu Symptomen und somit zur IM kommt und bei anderen nicht, und warum die Wahrscheinlichkeit einer IM mit dem Alter steigt, ist weiterhin Gegenstand aktueller Untersuchungen. Zwillingsstudien deuten auf eine genetische Komponente hin. So findet sich bei eineiigen Zwillingen eine höhere Konkordanz für das Auftreten einer IM als bei zweieiigen und ein weiterer Abfall der Konkordanz mit Abnahme des Verwandtschaftsgrades (Hwang et al., 2012; Rostgaard, Wohlfahrt, & Hjalgrim, 2014). Involvierte Gene könnten dabei solche sein, die an der Immunantwort beteiligt sind, wie zum Beispiel Interleukin-10 (IL10), *transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1), oder Interleukin-1 alpha (IL1 α) (Hatta et al., 2007; Helminen, Lahdenpohja, & Hurme, 1999; Vollmer-Conna et al., 2008). Durch die massive Expansion der CD8⁺ T-Zellen könnten auch Kreuzreaktivitäten vermehrt auftreten. So steigt mit dem Alter auch die Anzahl der Pathogene, mit denen das Immunsystem in Kontakt kommt, und zu denen sich Kreuzreaktivitäten ausbilden können (Clute et al., 2005). Bislang konnte zumindest eine Beteiligung, allerdings keine massive Expansion kreuzreaktiver Zellen während der IM nachgewiesen werden (Odumade et al., 2012). Möglicherweise spielt auch der mit zunehmendem Alter einhergehende Verlust bestimmter NK-Zellpopulationen eine Rolle, welcher durch einen Anstieg an virusspezifischen CD8⁺ T-Zellen kompensiert wird (Azzi et al., 2014).

Als gesichert gilt, dass es sich bei der IM um einen immunpathologischen Prozess handelt, der durch die EBV-Infektion ausgelöst wird. Die beschriebenen Symptome sind dabei Ausdruck einer massiven CD8⁺ T-Zellaktivierung, aber nicht der Infektion per se. So findet man im Blut asymptomatisch Infizierter ebenso hohe Virustiter wie bei IM-Patienten (Silins et al., 2001). Zudem lassen sich aktivierte EBV-spezifische CD8⁺-T-Zellen nachweisen, aber es kommt zu keiner massiven Expansion des gesamten CD8⁺ T-Zell-Kompartiments, wie es bei Patienten mit IM beobachtet wird (Jayasooriya et al., 2015).

1.7 Aktuelle Nachweisverfahren der EBV-spezifischen T-Zellantwort

Zu den gängigen Methoden des Monitorings der EBV-spezifischen T-Zell-Immunantwort gehört die Durchflusszytometrie-basierte Detektion Antigen-spezifischer T-Zellen mit Hilfe von Peptid-MHC-Multimeren (Abbott et al., 2017; Long et al., 2013; Macedo et al., 2005; Mees et al., 2014; Scherrenburg, Piriou, Nanlohy, & van Baarle, 2008). Ähnlich wie mittels *enzyme-linked immuno-spot* (ELISpot)-Assay können damit auch T-Zellen mit niedriger Frequenz nachgewiesen werden (Tischer et al., 2014). Voraussetzung für den Nachweis der T-Zellen ist allerdings die Kenntnis des HLA-Genotyps des Spenders, was den Einsatz in großen klinischen Studien schwierig macht. Auch können Proben bislang nur mit wenigen Peptid-MHC-Multimeren parallel analysiert werden. Eine detaillierte Beschreibung der EBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort, die gegen eine Reihe von Antigenen gerichtet sein kann, erfordert somit entsprechend große Patientenproben und Probendurchsatz. Diese Methode findet daher eher Anwendung in der genaueren Charakterisierung bestimmter Epitop-spezifischer T-Zellantworten in ausgesuchten Patientengruppen (Calarota, Aberle, Puchhammer-Stockl, & Baldanti, 2015). Selbst für die immundominanten EBV-Antigene, wie z.B. BZLF1, werden immer wieder neue T-Zell-Epitope charakterisiert (Rist, Neller, Burrows, & Burrows, 2015), so dass davon auszugehen ist, dass für viele der anderen EBV-Antigene nicht ausreichend Peptid-MHC-Multimere zur Verfügung stehen, um die volle Bandbreite der T-Zell-Epitope abzudecken. In Kombination mit der intrazellulären Detektion von Zytokinen (z.B. IFN γ , TNF), Chemokinen (z.B. MIP1- α) und Zytotoxinen (z.B. Perforine, Granzyme) eignen sich die Peptid-MHC-Multimere auch zur Analyse der Funktionalität von T-Zellen (Casalegno-Garduno et al., 2010). So basiert ein Großteil des heutigen Wissens über Größe, Kinetik und Phänotyp der EBV Epitop-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort während der IM und im gesunden Organismus auf dem Einsatz von MHC-I-Multimeren (Hislop, Taylor, Sauce, & Rickinson, 2007; G. S. Taylor et al., 2015) und so konnte eine klar definierte Hierarchie in der EBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort gezeigt werden. Die immundominanten Antigene gehören dabei hauptsächlich zu den *immediate early* und *early* Antigenen des lytischen Zyklus (Hislop et al., 2007; Pudney et al., 2005). Mit der Entwicklung von MHC-II-Multimeren (Nepom, 2012) konnten in letzter Zeit auch Fortschritte in der genaueren Charakterisierung der EBV-spezifischen CD4⁺ T-Zellantwort erzielt werden (Long et al., 2013; Long, Meckiff, & Taylor, 2019; Meckiff et al., 2019). Im

Gegensatz zur CD8⁺ T-Zellantwort scheint die antivirale CD4⁺ T-Zellantwort individuell unterschiedlich und gegen ein breiteres Repertoire an Antigenen ohne klar definierte Hierarchie gerichtet zu sein. Die wichtigsten Zielstrukturen der CD4⁺ T-Zellantwort stellen Latenz- und Strukturantigene dar (Adhikary et al., 2007). Durch die begrenzte Verfügbarkeit von unterschiedlichen Peptid-MHC-II-Multimeren und die große Bandbreite an Antigenen erscheint es fraglich, ob die EBV-spezifische CD4⁺ T-Zellantwort in näherer Zukunft mit MHC-Multimeren umfassend analysiert werden kann.

Zur Analyse der Funktionalität EBV-spezifischer T-Zellen stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Zu den gebräuchlichsten gehören das *intracellular cytokine staining* (ICS) (Lam et al., 2018; Meckiff et al., 2019; Precopio et al., 2003) und der ELISPOT-Assay (Cassaniti et al., 2019; Lam et al., 2018). Beide ermöglichen über die Messung der Zytokinproduktion nach spezifischer T-Zell-Aktivierung eine Bestimmung der Quantität und der Qualität der Immunantwort (Calarota et al., 2015). Zur Stimulation EBV-spezifischer T-Zellantworten können definierte Peptide (Abbott et al., 2013; Icheva et al., 2013; Tischer et al., 2014), überlappende Peptid-Bibliotheken (Abbott et al., 2013; Lam et al., 2018) oder ganze EBV-Proteine (Barabas et al., 2008) eingesetzt werden. Während der Einsatz definierter Peptid-Epitope wiederum HLA-abhängig ist, besteht der Vorteil der Peptidbibliotheken und Proteine darin, dass diese Methoden HLA-unabhängig eingesetzt werden können. Peptide mit einer Länge von 15 Aminosäuren können zur Stimulation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen eingesetzt werden, kürzere Peptide mit einer Länge von 8 bis 10 Aminosäuren stimulieren bevorzugt CD8⁺ T-Zellantworten (Kiecker et al., 2004). Ein potenzieller Nachteil überlappender Peptidbibliotheken ist eine Verringerung der Sensitivität des Nachweises durch den Einsatz großer Peptidgemische. Dies wurde nach Verwendung von Peptid-Pools, welche große EBV-Proteine abdecken, berichtet (Tischer et al., 2014). Der Vorteil bei der Verwendung ganzer Proteine zur Stimulation von T-Zellantworten wird darin gesehen, dass sie aktiv von Antigen-präsentierenden Zellen prozessiert werden und so eine umfassende und physiologische Analyse Antigen-spezifischer T-Zellen ermöglichen. Zudem konnte gezeigt werden, dass speziell mit Harnstoff behandelte EBV-Proteine nicht nur in den MHC-II, sondern über Clathrin-vermittelte Endozytose und proteasomale Prozessierung auch in den MHC-I Präsentationsweg gelangen (sogenannte Kreuzpräsentation) und somit auch CD8⁺ T-

Zellantworten auslösen können (Barabas et al., 2008). Jedoch stehen bis dato kaum validierte EBV-Proteine für das Immunmonitoring zur Verfügung.

Einige wichtige Erkenntnisse zur virusspezifischen Immunität wurden in Versuchen mit LCL als T-Zell-Stimulatorzellen gewonnen. LCL exprimieren nicht nur alle Latenzantigene von EBV, sondern nach spontaner lytischer Reaktivierung in einem kleinen Prozentsatz der Zellen (2-5%) auch die gesamte Bandbreite der lytischen Antigene (Long et al., 2013). Deshalb werden LCL erfolgreich benutzt, um *in vitro* EBV-spezifische T-Zellen zu expandieren, welche wiederum ein Korrelat der *in vivo* Situation der EBV-spezifischen T-Zellabwehr darstellen (Mautner & Bornkamm, 2012; Orlova, Wang, & Fogg, 2011). Weiterhin können sie zur *ex vivo* Stimulation von *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) und somit zur Analyse der Quantität und Qualität EBV-spezifischer T-Zellen eingesetzt werden (Abbott et al., 2013; Meckiff et al., 2019). Zudem zeichnen sich LCL als gute antigenpräsentierende Zellen (APC) aus. Sie haben gute immunstimulierende Eigenschaften und können leicht und schnell *in vitro* expandiert werden, was sie zu einer guten Quelle potenter APCs macht, welche CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zur Immuntherapie primen können (Tan et al., 2018). EBV-spezifische T-Zellpräparationen, welche durch wiederholte Stimulation von peripheren T-Zellen mit autologen LCL generiert wurden und sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen enthalten, werden seit vielen Jahren erfolgreich zur Behandlung der EBV-positiven PTLD eingesetzt (Rooney et al., 1998).

2 Ziele der Arbeit

Die Primärinfektion mit dem onkogenen EBV im jungen Kindesalter erfolgt überwiegend asymptomatisch. In industrialisierten Ländern verschiebt sich der Zeitpunkt der Primärinfektion zunehmend in das spätere Lebensalter und manifestiert sich dann häufig als IM (Longnecker et al., 2007). Für die zum Teil schweren Verläufe sowie die Spätfolgen der IM wird eine Immundysregulation verantwortlich gemacht. Allerdings fehlen bis dato verlässliche Risikomarker sowie präventive Strategien. Viele der bis dato zur Verfügung stehenden Arbeiten zur *ex vivo* Analyse EBV-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen beschränken sich hauptsächlich auf die Messung der IFN γ -Antworten nach Stimulation mit ausgewählten Peptiden oder überlappenden Peptid-Pools (Abbott et al., 2013; Almeida et al., 2009) und Peptid-HLA-Multimeren (Long et al., 2013; Scherrenburg et al., 2008).

In dieser Doktorarbeit sollten deshalb verschiedene Nachweismethoden evaluiert und etabliert werden, die eine Charakterisierung des zellulären Immunstatus von IM-Patienten ermöglichen. Hierbei sollten sowohl die EBV-spezifische CD4⁺ als auch die CD8⁺ T-Zellantwort mittels Durchflusszytometrie-basierter Analysen und neuer, HLA-unabhängiger Stimulatorantigene analysiert werden. Die Assays sollten zunächst mit Hilfe von Proben EBV-positiver und EBV-negativer, gesunder Probanden validiert und anschließend auf Proben von Patienten mit IM angewandt werden. Zur Stimulation der EBV-spezifischen T-Zellen sollen latent mit EBV-infizierte, autologe B-LCL, rekombinante EBV-ähnliche Partikel (*virus like particles*, VLP) und rekombinante, latente und lytische EBV-Proteine eingesetzt werden. Diese Stimulatorantigene sollten zuvor eigens in Zellkultur hergestellt, aufgereinigt und letztlich für den Einsatz in Durchflusszytometrie-basierten Assays validiert werden.

3 Material

3.1 Zelllinien

3.1.1 Lymphoblastoide Zelllinien

Von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurden LCL und LCL(Z-) (Tabelle 3.1-1). LCL sind humane B-Zellen, die durch EBV-Infektion *in vitro* transformiert wurden. LCL(Z-) wurden durch Infektion von humanen B-Zellen mit einer BZLF1-Deletionsmutante (B95.8 ΔBZLF1) des EBV generiert. LCL(Z-) unterscheiden sich phänotypisch nicht von LCL, können aber keine Genprodukte des lytischen Zyklus exprimieren und folglich auch keine Virionen produzieren (Feederle et al., 2000).

Der HLA-Genotyp der LCL ist abhängig vom jeweiligen Spender und wurde bestimmt, um sie zur spezifischen Stimulation von T-Zellen einsetzen zu können.

Tabelle 3.1-1: Verwendete lymphoblastoide Zelllinien (LCL) und deren HLA-Genotyp

Linie	HLA-A	HLA-B	HLA-Cw	HLA-DRB1*	HLA-DQB1*	HLA-DPB1*	HLA-DRB3*/4*/5*
LCL JM, LCL(Z-) JM	0201, 0301	1529, 5101	1203, 1402	0801, 1301	0402, 0603	0401, 1301	DRB3* 01011

3.1.2 Burkitt-Lymphom Zelllinien

Von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurden die BL-Zelllinie Elijah 5E5, welche zur Antigenpräsentation und Quantifizierung von VLP verwendet wurde. Raji ist eine EBV-positive BL-Zelllinie, wobei das Virusgenom in dieser Zelllinie eine Deletion aufweist, so dass keine Viruspartikel gebildet werden können (Karpova et al., 2005). Elijah dagegen ist eine EBV-negative BL-Zelllinie (Busse et al., 2010).

3.1.3 Adhärenz wachsende Epithelzelllinien

Von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurden die adhärenz wachsenden Epithelzelllinien HEK293, HEK293T, HEK293/TR- und HEK293/2089.17. HEK293 (*Human Embryonic Kidney*, HEK) ist eine humane embryonale Nierenzelllinie, die durch Einführung

der Gene *E1a* und *E1b* des Adenovirus Typ 5 transformiert worden war (Graham, Smiley, Russell, & Nairn, 1977). HEK293T ist eine Variante dieser Zelllinie, die zusätzlich das T-Antigen des SV40-Virus exprimiert (Pear, Nolan, Scott, & Baltimore, 1993).

Die *virus like particle* (VLP) produzierende Zelllinie HEK293/TR- ist durch Transfektion von HEK293-Zellen mit einer EBV-Mutante ohne *terminal repeats* (TR) generiert worden (Delecluse, Pich, Hilsendegen, Baum, & Hammerschmidt, 1999). Die HEK293/2089.17 Zelllinie trägt das Wildtyp EBV-Genom (Adhikary, Behrends, Feederle, Delecluse, & Mautner, 2008). Zur Selektion transfizierter Zellen tragen beide Virusgenome das Hygromycinresistenzgen.

3.1.4 T-Zellklone

Von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurden folgende EBV-spezifische T-Zellklone.

Tabelle 3.1-2: EBV-spezifische T-Zellklone

T-Zellklon	Antigen	Epitop	HLA-Restriktion
GP1D6	gp350	AA ₆₅₋₇₉ -FGQLTPHTKAVYQPR-	HLA-DRB1*1301
JMN1H7	BNRF1	AA ₅₄₈₋₅₆₁ -LGGLNFVNDLSPV-	HLA-DRB3*0101
Vβ13.2-13	BMLF1	AA ₂₂₋₃₄ -DPTPAHAIPAPRPS-	HLA-DQA1*0505 HLA-DQB1*0301
3C5H11	EBNA3C	AA ₃₂₅₋₃₃₉ -ENPYHARRGIKEHVI-	HLA-DRB1*0801

3.2 Bakterienstämme

In allen Versuchen wurde ausschließlich der *Escherichia coli* Stamm XL1-blue MRF⁺ (Stratagene) verwendet.

3.3 Plasmide

Folgende Plasmide wurden von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3.3-1: Verwendete Plasmide und deren Eigenschaften.

Plasmid	Eigenschaft
pCMV-EBNA1deltaGA-His	EBNA1-Expressionsplasmid, vermehrte Synthese und bessere Präsentation auf MHC-I durch Deletion der Glycin-Alanin-haltigen Region, 6xHistidin-Tag
pCMV-EBNA3A-His	EBNA3A-Expressionsplasmid, 6xHistidin-Tag
pCMV-EBNA3C-His	EBNA3C-Expressionsplasmid, 6xHistidin-Tag
pCMV-BMLF1-His	BMLF1-Expressionsplasmid, 6xHistidin-Tag
pCMV-BRLF1-His	BRLF1-Expressionsplasmid, 6xHistidin-Tag
pCMV-BZLF1-His	BZLF1-Expressionsplasmid, 6xHistidin-Tag
p509-BZLF1	BZLF1-Expressionsplasmid (Induktion des lytischen Zyklus in HEK293/TR- und HEK293/2089.17-Zelllinien)
pHL2823	GFP-Expressionsplasmid

3.4 Antikörper

3.4.1 Primärantikörper

Tabelle 3.4-1: Verwendete Primärantikörper (IgG)

Spezifität	Spezies	Anwendung	Hersteller
Anti-BMLF1	Ratte	Western Blot	Hybridomüberstand; zur Verfügung gestellt von Dr. E. Kremmer (HMGU, München)
Anti-BRLF1	Maus	Western Blot	Argene
Anti-BZLF1	Maus	Western Blot	Argene
Anti-EBNA1	Ratte	Western Blot	Hybridomüberstand; zur Verfügung gestellt von Dr. E. Kremmer (HMGU, München)
Anti-EBNA3A	Ratte	Western Blot	Hybridomüberstand; zur Verfügung gestellt von Dr. E. Kremmer (HMGU, München)
Anti-EBNA3C	Maus	Western Blot	Hybridomüberstand; zur Verfügung gestellt von Dr. E. Kremmer (HMGU, München)
Anti-gp350	Maus	Durchflusszytometrie	Hybridomüberstand; zur Verfügung gestellt von Dr. E. Kremmer (HMGU, München)
Anti-His ₆	Maus	Western Blot	Hybridomüberstand; zur Verfügung gestellt von Dr. E. Kremmer (HMGU, München)

3.4.2 Sekundärantikörper

Tabelle 3.4-2: Verwendete Sekundärantikörper

Spezifität	Spezies	Kopplung	Anwendung	Hersteller
Anti-Kaninchen-IgG	Ziege	Meerrettichperoxidase (HRP)	Western Blot	Jackson
Anti-Ratte-IgG/IgM	Ziege	HRP	Western Blot	Jackson
Anti-Maus-IgG	Schaf	HRP	FACS	Amersham

3.4.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tabelle 3.4-3: Antikörper für die Durchflusszytometrie (IgG)

Spezifität	Kopplung	Klon	Hersteller
Anti-CD154	FITC	TRAP1	BD, Becton Dickinson (Heidelberg, Germany)
Anti-CD8	FITC	SK1	BD, Becton Dickinson (Heidelberg, Germany)
Anti-CD8	PE	SK1	BD, Becton Dickinson (Heidelberg, Germany)
Anti-CD8	ECD	SCFI21Thy2D3	Beckman Coulter (Krefeld, Germany)
Anti-CD4	PerCP	SK3	BD, Becton Dickinson (Heidelberg, Germany)
Anti-CD45RA	PE-Cy7	L48	BD, Becton Dickinson (Heidelberg, Germany)
Anti-CD3	eFluor450	OKT3	eBioscience (Frankfurt am Main, Germany)
Anti-CD3	V500	SP34-2	BD, Becton Dickinson (Heidelberg, Germany)
Anti-CD8	APC	SK1	BD, Becton Dickinson (Heidelberg, Germany)
Anti-CD3	Alexa 700	UCHT1	BD, Becton Dickinson (Heidelberg, Germany)
Anti-CD154	PE-Cy7	24-31	BioLegend (Fell, Germany)
Anti-IL2	FITC	MQ1-17H12	eBioscience (Frankfurt am Main, Germany)
Anti-IL4	PE	3010.211	BD, Becton Dickinson (Heidelberg, Germany)

Anti-IL10	APC	JES3-19F1	BD, Becton Dickinson (Heidelberg, Germany)
Anti-IFN γ	Alexa 700	B27	BD, Becton Dickinson (Heidelberg, Germany)
Anti-TNF	eFluor450	MAb11	eBioscience (Frankfurt am Main, Germany)
Anti-CD28-kostimulatorischer Antikörper	-	L293	BD, Becton Dickinson (Heidelberg, Germany)

3.5 Chemikalien

Tabelle 3.5-1: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Firma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol absolut	Merck
Glycerin	Merck
Hydrogenperoxid 30%	Roth
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Methanol	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumazid (NaN $_3$)	Sigma-Aldrich
Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
Polyethylenimin	Merck
Propidiumiodid (Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck
Salzsäure (HCl; 32%)	Merck

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Qualität p.A. eingesetzt. Nicht erwähnte Standard-Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Sigma-Aldrich, oder Roth verwendet. Weitere Reagenzien wurden von den Firmen Becton-Dickinson (BD), Bio-Rad,

GE Healthcare, Integra, Invitrogen, MBI-Fermentas, Millipore, New England Biolabs, Neolab, Perkin Elmer, Promega, Qiagen, Roche und Stratagene bezogen.

3.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.6-1: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
3 MM Whatman Papier	Whatman
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad
ELISA-Platten	Corning Incorporated
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Development System, Human IFN γ	R&D Systems
Filter 0,45 und 0,22 μ m	Millipore
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA
Fotofilme	Kodak
Fungizone, Amphotericin 250 μ g/ml	Gibco BRL
Gel Drying Film	Promega
Gentamycin	Gibco BRL
Gestopfte Pipettenspitzen	ART Molecular Bio Products
Hybond-P-Blotting Membran	Amersham
L-Glutamin, 200 mM	Gibco BRL
Lochplatten	Nunc
Natriumpyruvat	Gibco BRL
Nicht-essenzielle Aminosäuren	Gibco BRL
Parafilm „M“	American National Can
Polystyren-Zellkulturschalen	BD-Falcon
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 mL)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (15 und 50 mL)	BD-Falcon und Sarstedt
Rollflaschen für die Zellkultur (2000 ml)	Greiner-Bio-One
RPMI 1640	Gibco BRL
Tiefkühlgefäße/Kryoröhrchen	Nunc
Trypsin-EDTA	Gibco BRL
Zellkulturflaschen	Greiner-Bio-One
Zellkulturplatten	BD-Falcon
Zellkulturschalen	Nunc

3.7 Allgemeine Medien, Puffer, Lösungen

Die in **Tabelle 3.7-1** gelisteten Puffer kamen bei verschiedenen Verfahren zum Einsatz.

Tabelle 3.7-1: Allgemein verwendete Medien, Puffer, Lösungen

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	154 mM NaCl pH 7,4 8 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄
PBS-T	PBS 0,05% Tween-20

Puffer oder Lösungen, die nur bei einer bestimmten Methode zur Anwendung kamen, werden bei der entsprechenden Methode beschrieben. Sämtliche Chemikalien, die für die Herstellung von Puffern und Lösungen verwendet wurden, wurden von Merck, Fluka, Roth, oder Sigma in Analysequalität bezogen.

3.8 Zellkulturmedien

Die in **Tabelle 3.8-1** beschriebenen Medien kamen in verschieden Verfahren zum Einsatz.

Tabelle 3.8-1: Verwendete Zellkulturmedien

<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) - Komplettmedium</i>	DMEM 10% FCS 2 mM L-Glutamin 1,25 µg/ml Amphotericin B 50 µg/ml Gentamycin
RPMI-Komplettmedium/LCL-Medium	RPMI 1640 10% FCS 1,25 µg/ml Amphotericin B 50 µg/ml Gentamycin 2 mM L-Glutamin 1 mM Na-Pyruvat 1 % nicht-essenzielle Aminosäuren
FCS-reduziertes RPMI-Komplettmedium	RPMI 1640 2% FCS 1,25 µg/ml Amphotericin B

	50 µg/ml Gentamycin 2 mM L-Glutamin 1 mM Na-Pyruvat 1 % nicht-essenzielle Aminosäuren 30 mM Glucose 0,1% Pluronsäure
Einfriermedium	90% FCS 10% DMSO

3.9 Geräte

Tabelle 3.9-1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Bakterienschüttler Innova 4400	New Brunswick Scientific
CO ₂ -Zellkultur-Inkubator Hera cell 150	Heraeus
Elektrophoresekammer Horizon 20-25	Life Technologies
ELISA-Lesegerät	Tecan
FACS Calibur	Becton Dickenson
FACS Fortessa	Becton Dickenson
Falcon Roller	Coulter Electronics Limited
Feinwaage SBC32	SCALTEC
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Gefrierschrank -80°C	Colora bzw. Thermo
Gene Pulser II (Elektroporation)	Bio-Rad
Kühlschrank	Liebherr
Lichtmikroskop Axiovert 40C	Zeiss
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld
pH-Messgerät	Knick
Photometer Biophotometer Plus	Eppendorf
Pipetten	Gilson und Rainin
Pipettierhilfe	Integra Biosciences
Power-Pac 200	Bio-Rad
Schüttler Polymax 1040	Heidolph
Sterilbank	BDK
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Überkopfschüttler Reax2	Heidolph
Ultrazentrifuge I-60	Beckman Coulter

UV-Transilluminator	Vilber-Lourmat
Vortex Reax 2000	Heidolph
Waage 440-17	Kern
Western-Blot Kammer	Hoefer
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf
Zentrifuge Avanti J-26XP	Beckman Coulter
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich
Zentrifuge Universal 16R	Hettich

3.10 Computerprogramme

Microsoft Word

Microsoft Excel

Microsoft PowerPoint

FlowJo Version 9.7

FACSDiva Version 6.2

GraphPad Prism 7

SPICE 5

Pestle Version 5

Endnote X8

CellQuest

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur Vorbereitung für die Kryokonservierung wurden die Zellen bei 500 x g für 5 min zentrifugiert. Danach wurden 1×10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in ein geeignetes Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden anschließend in einen mit Isopropanol gefüllten Behälter gestellt, der ein gleichmäßiges Abkühlen von $1^\circ\text{C}/\text{Minute}$ gewährleistet, und dann bei -80°C eingefroren. Nach einigen Tagen wurden die Röhrchen in Tanks mit flüssigem Stickstoff (-196°C) überführt.

Das Auftauen der eingefrorenen Zellen erfolgte durch rasches Erwärmen der Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C und sofortiges Überführen in RPMI-Komplettmedium. Zum Entfernen des DMSO wurden die Zellen bei 500 x g 5 min zentrifugiert, der Kulturüberstand abgesaugt und das Zellsediment einmal mit RPMI-Medium gewaschen. Nach Aufnahme der Zellen in das entsprechende Kulturmedium wurden sie in Zellkulturflaschen oder Kulturplatten überführt.

4.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzahlbestimmung wurden $10 \mu\text{l}$ aus einer homogenen Zellsuspension entnommen und mit gleichem Volumen Trypanblau vermischt. Hiervon wurden $10 \mu\text{l}$ in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Da Trypanblau tote Zellen anfärbt, können diese von lebenden Zellen unter dem Durchlichtmikroskop unterschieden werden. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden alle vier Großquadranten ausgezählt und der Mittelwert pro Quadrant gebildet. Die Gesamtzellzahl ließ sich mit folgender Formel berechnen:

Gesamtzellzahl = Mittelwert aus der Anzahl der Großquadranten x Verdünnungsfaktor x 10^4
x Volumen in ml

4.1.3 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle eukaryotischen Zellen wurden in einem CO₂-Zellkultur-Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zellkulturmedien wurden bei 4°C gelagert und nicht länger als drei Monate benutzt. Das Serum für die Zellkultur wurde bei -20°C, die anderen Zusätze entsprechend den Herstellerangaben gelagert.

4.1.3.1 Kultivierung adhärent wachsender Zelllinien

Die humane, embryonale Nierenzelllinie HEK293T wurde in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 14 cm in 20-30 ml DMEM-Komplettmedium kultiviert. Durch Abnehmen des Mediums, Zugabe von 5 ml Trypsin-EDTA und Inkubation für 5 min bei 37°C wurden die Zellen vom Boden abgelöst. Die Zellsuspension wurde in DMEM-Komplettmedium aufgenommen und je nach vorheriger Zelldichte im Verhältnis 1:5 bis 1:10 auf neue Kulturschalen mit 20-30 ml Endvolumen ausgebracht. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurde dies alle 3-4 Tage wiederholt.

Die HEK293/TR- und HEK293/2089.17 Zelllinien wurden ebenfalls in Zellkulturschalen mit 14 cm Durchmesser kultiviert. Als Kulturmedium wurden 30 ml RPMI1640-Komplettmedium + 100 µg/ml Hygromycin pro Kulturschale verwendet. Durch Abnehmen des Mediums, Zugabe von 1,5 ml Trypsin-EDTA und Inkubation für 5 min bei 37°C wurden die Zellen vom Boden abgelöst. Die Zellsuspension wurde in RPMI1640-Komplettmedium aufgenommen und je nach vorherigen Zelldichte im Verhältnis 1:5 bis 1:10 auf neue Kulturschalen mit 30 ml Endvolumen ausgebracht. Zur Selektion der Zellen wurden 100 µg/ml Hygromycin pro Kulturschale hinzugefügt.

4.1.3.2 Kultivierung von Suspensionszellen

Die LCL, LCL(Z-) und BL Suspensionszelllinien wurden in RPMI 1640-Komplettmedium kultiviert. Wenn nicht anders angegeben, wurden diese in Zellkulturflaschen kultiviert und je nach Bedarf alle 3 bis 4 Tage in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:10 (Zellsuspension zu frischem Medium) verdünnt.

Die Suspensionszelllinie HEK293T wurde in FCS-reduziertem RPMI 1640-Komplettmedium in 2000 ml fassenden, runden Zellkulturflaschen (*roller bottles*) kultiviert. Dabei wurde eine Zelldichte von 4×10^5 bis 3×10^6 Zellen/ml angestrebt bei maximaler Füllung der Flaschen mit 400 ml. Je nach Dichte wurden die Zellen alle 3-4 Tage verdünnt. Dazu wurden 100-300 ml der Zellsuspension aus den *roller bottles* entnommen und bis zu einem Gesamtvolumen von insgesamt 400 ml mit frischem Medium wieder aufgefüllt.

4.1.4 Transfektion von HEK293T-Zellen mittels Polyethylenimin

4.1.4.1 Transfektion adhärenter HEK293T-Zellen

Für die Transfektion der adhärenenten HEK293T-Zellen wurde eine Konfluenz von 60-80% in den Zellkulturschalen angestrebt. Hierzu wurden dicht bewachsene Zellkulturschalen am Vortag im Verhältnis von ca. 1:5 auf weitere Zellkulturschalen mit 14 cm Durchmesser ausgesät und mit frischem DMEM-Komplettmedium auf 30 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Zur Transfektion wurde ein Transfektionsmix, wie in **Tabelle 4.1-1** beschrieben, hergestellt. Hierzu wurde als erstes OPTIMEM-Medium mit dem zu transfizierenden Plasmid versetzt und gut gemischt. Anschließend wurde eine Polyethylenimin (PEI)-Lösung hinzugegeben und das Gemisch für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 1,5 ml des Transfektionsmixes in jede der Kulturschalen gegeben und durch leichtes Hin- und Herbewegen der Schalen vorsichtig im vorhandenen Zellkulturmedium verteilt. Nach 24 h wurden pro Platte zusätzlich 20 ml frisches DMEM-Komplettmedium zugesetzt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen geerntet.

Tabelle 4.1-1: Transfektionsmix für adhärenente und in Suspension wachsende HEK293T-Zellen sowie für HEK293/2089.17- und HEK293/TR-Zellen

Zusammensetzung des Transfektionsmixes für 20 Zellkulturschalen adhärenter bzw. 2×10^8 Suspensions-HEK293T-Zellen	
OPTIMEM	30 ml
Plasmid-DNA	900 µg
PEI-Lösung: 1 mg/ml PEI in H ₂ O, pH 7,0	1350 µl

4.1.4.2 Transfektion von Suspensions-HEK293T-Zellen

Für die Transfektion von Suspension-HEK293T-Zellen wurden pro Ansatz 2×10^8 Zellen verwendet. Hierzu wurden die am Vortag ausgedünnten Zellen zuerst gezählt und die Zellkonzentration berechnet. Anschließend wurden 2×10^8 Zellen entnommen und für 5 min bei $500 \times g$ zentrifugiert, das alte Medium verworfen, die Zellen in 170 ml frischem FCS-reduziertem RPMI1640-Komplettmedium aufgenommen und 30 ml Transfektionsmix hinzugefügt (siehe **Tabelle 4.1-1**). Nach 24 h wurden 200 ml frisches FCS-reduziertes RPMI1640-Komplettmedium zugesetzt, so dass sich ein Gesamtvolumen von 400 ml ergab. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen geerntet.

4.1.5 Transfektion von HEK293/2089.17 und HEK293/TR- Zellen mittels Polyethylenimin

Zur Produktion von Wildtyp (wt) -Virus und VLP wurden HEK293/2089.17 und HEK293/TR-Zellplatten mit dem BZLF1-Expressionsplasmid p509 transfiziert.

Zur Transfektion wurde das Zellkulturmedium aus den Zellkulturschalen abgenommen und ein Transfektionsmix gemäß **Tabelle 4.1-1** angefertigt. 1,5ml des Transfektionsmixes wurden zusammen mit 20 ml FCS-reduziertem RPMI1640-Komplettmedium auf den Zellkulturschalen ausgebracht und durch vorsichtiges Hin- und Herschwenken verteilt. Nach 24 h wurde das Medium samt Transfektionsmix wieder von den Platten abgenommen und 20 ml frisches, FCS-reduziertes RPMI1640-Komplettmedium auf die Platten gegeben. Nach weiteren 48 h wurde der Überstand mit den enthaltenen wt-Viren bzw. VLP von den Platten geerntet.

4.2 Immunologische Methoden

4.2.1 Durchflusszytometrie

Die Untersuchung und Analyse bestimmter intrazellulärer Merkmale und/oder Oberflächenmoleküle erfolgte mittels Durchflusszytometrie durch Messung der Fluoreszenzintensität in einem FACS-(*fluorescence activated cell sorting*)Gerät (FACS

Calibur, FACS Fortessa; Becton-Dickinson). Für die Untersuchungen war es zumeist notwendig, die Merkmale und Oberflächenstrukturen von Interesse mittels Fluoreszenzgekoppelter Antikörper sichtbar zu machen. Eine Analyse der GFP-Expression der Zellen konnte hingegen ohne Antikörperfärbung durchgeführt werden. Je nach Fragestellung und zu untersuchenden Zellen kamen verschiedene Protokolle zur Anwendung (siehe unten).

4.2.1.1 Analyse von Transfektionseffizienz und Proteinexpression in Suspensions-HEK293T-Zellen

Zur Etablierung der Suspensions-HEK293T-Zelllinie wurde die Transfektionseffizienz von Zellen gemessen, die unter verschiedenen Bedingungen kultiviert und transfiziert worden waren (z.B. unterschiedliche Zusammensetzung des Mediums, Zusammensetzung und Menge des Transfektionsmixes, Transfektionsdauer). Um den Anteil transfizierter Zellen zu ermitteln, wurde das Expressionsniveau von rekombinantem GFP in den Zellen durch FACS-Analyse ermittelt. Weil das transfizierte Plasmid eine Sequenz enthielt, die für das GFP-Protein kodierte, konnte das Ausmaß der im FACS gemessenen Grünfluoreszenz der Zellen als Ausdruck der Transfektionseffizienz gewertet werden. Zu diesem Zweck wurden ca. 1×10^5 HEK293T-Zellen für 5 min bei 500 x g zentrifugiert und in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 200 μ l FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der FlowJo-Software.

FACS-Puffer: 2% FCS in PBS

4.2.1.2 Quantifizierung von VLP und Wildtypviren

Zur Quantifizierung von VLP bzw. wt-Viren in Zellkulturüberstand wurden ca. 5×10^4 Elijah Zellen in 1 ml RPMI1640-Komplettmedium mit unterschiedlichen Mengen von VLP bzw. virushaltigem Zellkulturüberstand beladen und über Nacht (üN) bei 4°C inkubiert. In dieser Zeit konnten die VLP bzw. wt-Viren über ihr gp350-Hüllprotein an CD21 auf den Zielzellen binden. Am nächsten Tag wurden die Zielzellen 5 min bei 500 x g zentrifugiert und der

Überstand verworfen. Die Zellen wurden 2 x in 200 µl FACS-Puffer gewaschen und anschließend mit 100 µl Primärantikörper 72A1 (1:2 in FACS-Puffer), welcher gegen das Glykoprotein gp350 gerichtet war, für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde erneut 5 min bei 500 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und 2 x in 200 µl FACS-Puffer gewaschen. Ein zweiter Inkubationsschritt folgte mit einem PE-gekoppelten Sekundärantikörper (anti-mouse; 1:200 in FACS-Puffer) für 30 min auf Eis. Schließlich wurden die Zellen 5 min bei 500 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und erneut 2 x in 200 µl FACS-Puffer gewaschen. Zur Analyse im Durchflusszytometer wurden die Zellen schließlich in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen.

4.2.1.3 Durchflusszytometrie-basierte Analyse der EBV-spezifischen T-Zell-Antwort

Für die Etablierung eines EBV-spezifischen Durchflusszytometrie-basierten Panels und zur Untersuchung der EBV-spezifischen T-Zellantwort wurden kryokonservierte PBMC von IM Patienten sowie EBV-seropositiver und EBV-seronegativer Kontrollspender aufgetaut, mit EBV-Antigenen stimuliert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Der Einsatz von Patientenproben für diese Zwecke wurde im Vorhinein durch die Ethikkommission der Technischen Universität München freigegeben (Projektnummer: 112/14; Titel: „Biomarkers and causative factors of complicated and/or protracted Epstein-Barr virus-associated infectious mononucleosis“).

4.2.1.3.1 Ex-Vivo Stimulation EBV-spezifischer T-Zellen

Zur Stimulation wurden 1×10^6 der aufgetauten PBMC des jeweiligen Patienten/Kontrollspenders in 150 µl RPMI-10 Medium, welches mit dem kostimulatorischen anti-CD28-Antikörper versetzt war (1 µg/ml), aufgenommen, in das Loch einer 96-Loch-Rundbodenplatte gegeben und anschließend mit Antigen(en) stimuliert. Zu diesem Zweck wurden pro Loch entweder 10 µl der selbstproduzierten VLP, 2×10^5 LCL(Z-) des jeweiligen Patienten/Kontrollspenders, oder 10 µl der selbstproduzierten VLP zusammen mit 2×10^5 LCL(Z-) des jeweiligen Patienten/Kontrollspenders zu den PBMC gegeben. Zusätzlich wurde immer eine nichtstimulierte Negativkontrolle mitgeführt. Die

Proben wurden dann für 18 h im CO₂-Zellkultur-Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden 10 µg/ml des Golgi-Apparat-Inhibitors Brefeldin A (BFA) zur intrazellulären Anreicherung der von den Zellen synthetisierten Zytokine in einem Gesamtvolumen von 50 µl RPMI-10 Medium auf die Proben gegeben, ohne diese zu mischen, und für weitere 4 h im CO₂-Zellkultur-Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Proben wurden dann bis zur Färbung bei 4°C gelagert.

4.2.1.3.2 Oberflächen- und intrazelluläre Zytokinfärbung

Die PBMC wurden, vor der Fixierung und Permeabilisierung, mittels *LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit (NIR)* zur Bestimmung der Zellviabilität gefärbt. Dazu wurde eine Lösung aus NIR und FACS-Puffer (5 µl NIR/ml FACS Puffer) hergestellt und die Zellen mit 50 µl dieser Lösung pro Loch versetzt. Das Gemisch wurde dann für 30 min im Dunkeln und auf Eis inkubiert, anschließend mit 150 µl FACS Puffer pro Loch aufgefüllt und 5 min bei 560 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen zweimal mit 200 µl FACS Puffer gewaschen, erneut 5 min bei 560 x g zentrifugiert und der Überstand schließlich wieder verworfen.

Nun wurden die Zellen mittels *Cytofix/Cytoperm Reagent* fixiert und permeabilisiert, um sie dann anschließend intrazellulär anfärben zu können. Dazu wurde pro Loch 100 µl *Cytofix/Cytoperm Reagent* auf die Zellen gegeben und 20 min im Dunkeln und auf Eis inkubiert. Anschließend wurde mit 100 µl *Perm/Wash* Puffer aufgefüllt, bei 560 x g und 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und dann zweimal in 200 µl *Perm/Wash* Puffer gewaschen. Schließlich wurden die Zellen erneut 5 min bei 560 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Letztlich folgte die Oberflächen- und intrazelluläre Färbung der Zellen. Hierzu wurde ein Antikörper-Mix hergestellt. Dieser Mix wurde nach dem Schema in **Tabelle 4.2-1** in einem Eppendorf-Gefäß präpariert, 5 min bei 16090 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand schließlich in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Nun wurden die Zellen pro Loch in 30 µl des Antikörper-Mixes und 50 µl *Perm/Wash*-Puffer aufgenommen und für 30 min im Dunkeln und auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann mit 150 µl *Perm/Wash*-Puffer

aufgefüllt und 5 min bei 560 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen zweimal in 200 µl *Perm/Wash*-Puffer gewaschen. Schließlich wurde erneut für 5 min bei 560 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen pro Loch in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden anschließend, bis zur Aufzeichnung der Durchflusszytometrie-basierten Daten, im Dunkeln und auf Eis gelagert.

Tabelle 4.2-1: Antikörper-Mix zur Oberflächen- und intrazellulären Färbung der PBMC

Antikörper bzw. Reagenz	µl pro Loch
CD3-V500	0,5
CD4-PerCP	4
CD8-ECD	0,25
CD154-PE-Cy7	0,05
IL2-FITC	2,5
IL4-PE	7,5
IL10-APC	1,5
IFNγ-AI700	0,05
TNF-eF450	2,5
FACS Puffer	11,15
Gesamtvolumen	30

Zur späteren Anfertigung einer Kompensation am Computer wurde außerdem bei jeder Messung eine Kompensationsreihe mit nicht stimulierten Zellen mitgeführt, bei der nicht mit einem Antikörper-Mix, sondern mit einzelnen Antikörpern nach dem Schema in **Tabelle 4.2-2** gearbeitet wurde. Alle anderen Schritte der NIR-Färbung, Fixierung und Permeabilisierung liefen wie bei der Färbung mit dem Antikörper-Mix ab.

Tabelle 4.2-2: Schema für das Pipettieren der Kompensationsantikörper und der Proben

Kompensation Einzelfärbung	CMP X	CMP S	CMP CD8 FITC	CMP CD8 PE	CMP CD8 ECD	CMP CD4 PerCP	CMP CD154 PE-Cy7	CMP CD3 eF450	CMP CD3 V500	CMP CD8 APC	CMP CD3 AI700
Spender 1 Antikörpermix	neg	10 µl VLP	2x10 ⁵ LCL (Z-)	10µl VLP + 2x10 ⁵ LCL (Z-)							
Spender 2 Antikörpermix	neg	10 µl VLP	2x10 ⁵ LCL (Z-)	10µl VLP + 2x10 ⁵ LCL (Z-)							

Cytofix/Cytoperm Reagent: *Cytofix/Cytoperm fixation/permeabilization Kit*; B&D, Becton Dickinson (Heidelberg, Germany)

Perm/Wash Puffer: *Cytofix/Cytoperm fixation/permeabilization Kit*; B&D, Becton Dickinson (Heidelberg, Germany)

LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit (NIR): Life Technologies GmbH, Invitrogen (Darmstadt, Germany)

FACS Puffer: *Stain Buffer*, B&D, Becton Dickinson (Heidelberg, Germany)

4.2.1.3.3 Aufzeichnung der Durchflusszytometrie-basierten Daten

Die Aufzeichnung der Daten am Durchflusszytometer erfolgte innerhalb von sechs Stunden (h) nach der Färbung an einem LSR2/LSR Fortessa Durchflusszytometer mithilfe der FACSDiva Software Version 6.2. Die Spannung des Photomultipliers wurde mithilfe von NIR-gefärbten Zellen eingestellt, die Mittelwerte für die Autofluoreszenz wurden auf ungefähr 10^2 in allen Kanälen eingestellt. Die Analyse der gewonnenen Daten erfolgte anschließend mittels der FlowJo Software Version 9.7.

4.2.1.3.4 Gating-Strategie und Interpretation der gewonnenen Daten

Jedes Gate wurde zunächst in der unstimulierten Negativkontrolle gesetzt, mit Berücksichtigung einer Herunterregulierung des T-Zell-Rezeptors in den stimulierten Proben, und dann auf die stimulierten Proben bezogen. Mehrmaliges unabhängiges Prüfen des *Gatings* diente zur Kontrolle der angewendeten Strategie und der einzelnen Gates. Anhand der unterschiedlichen Expression der Marker IFN γ , TNF, IL2, IL4 und IL10 wurden zunächst die CD3⁺ Subpopulationen und im nächsten Schritt die CD4⁺ und CD8⁺ Subpopulationen zur weiteren Analyse identifiziert. Schließlich erfolgte die Expressionsanalyse der einzelnen Zytokine IFN γ , TNF, IL2, IL4 und IL10. Hierbei wurden die Zytokin-positiven Populationen immer in Bezug auf die unstimulierte Negativkontrolle ausgewählt. Aufgrund von Unregelmäßigkeiten bei der Färbung mit dem Marker CD154 wurde dieser im Farbmix enthaltene Marker von der späteren Analyse ausgeschlossen. Das genaue Schema beim *Gating* ist **Abbildung 4.2-1** zu entnehmen.

Anschließend wurde mittels der Software „Pestle Version 5.0“ eine Subtraktion der Hintergrundsignale durchgeführt und ein individueller Grenzwert für jede einzelne Subpopulation errechnet. Dies war wichtig, um eine adäquate Korrektur der Daten zu ermöglichen, da sich unspezifische Hintergrundsignale erst mit steigender Anzahl positiver Antworten verringern. Einen individuellen Grenzwert zu identifizieren kann jedoch schwierig sein. Ein Ansatz besteht darin, anzunehmen, dass die Verteilung der Hintergrundwerte symmetrisch um den Nullpunkt herum ist: Eine Schätzung des oberen Grenzwertes kann vorgenommen werden, indem die Verteilung der negativen Werte untersucht und ein Wert in der Nähe des unteren Endes dieses Bereichs gewählt wird (Roederer, Nozzi, & Nason, 2011). Negative Werte konnten sich bei hohen Hintergrundsignalen in Bezug auf die Negativkontrolle ergeben. Der individuelle Grenzwert für jede T-Zell-Subpopulation wurde definiert als die 90. Perzentile der Verteilung aller negativen Werte in den stimulierten Proben. Um einzelne Ausreißer zu identifizieren und auszuschließen, kam der individuelle Grenzwert allerdings nur zur Anwendung, wenn mindestens fünf Prozent aller T-Zell-Antworten in der jeweiligen Subpopulation negativ waren und wenn diese negativen Werte von mindestens drei verschiedenen Probanden kamen. War dies nicht der Fall, so wurde für die jeweilige Subpopulation kein individueller Grenzwert gesetzt. Nach Anwendung des individuellen Grenzwertes wurden alle Antworten, die geringer als der Grenzwert waren, auf „0“ gesetzt. Zusätzlich zu dem individuellen Grenzwert wurde ein genereller Grenzwert (*limit of detection*; LoD) von 0,005% auf die Gesamtantwort der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen angewendet.

Um die Häufigkeit IFN γ -positiver T-Zellen zu ermitteln, wurden alle IFN γ -positiven Subpopulationen addiert. Dies geschah respektive für die anderen Zytokine. Zudem wurde die gesamte Zytokinantwort der Antigen-spezifischen T-Zellen errechnet, indem alle möglichen Kombinationen Zytokin-positiver Zellen addiert wurden.

Die graphische Darstellung und statistische Analyse der gewonnenen Daten wurde mittels der Software „GraphPad Prism“ verwirklicht.

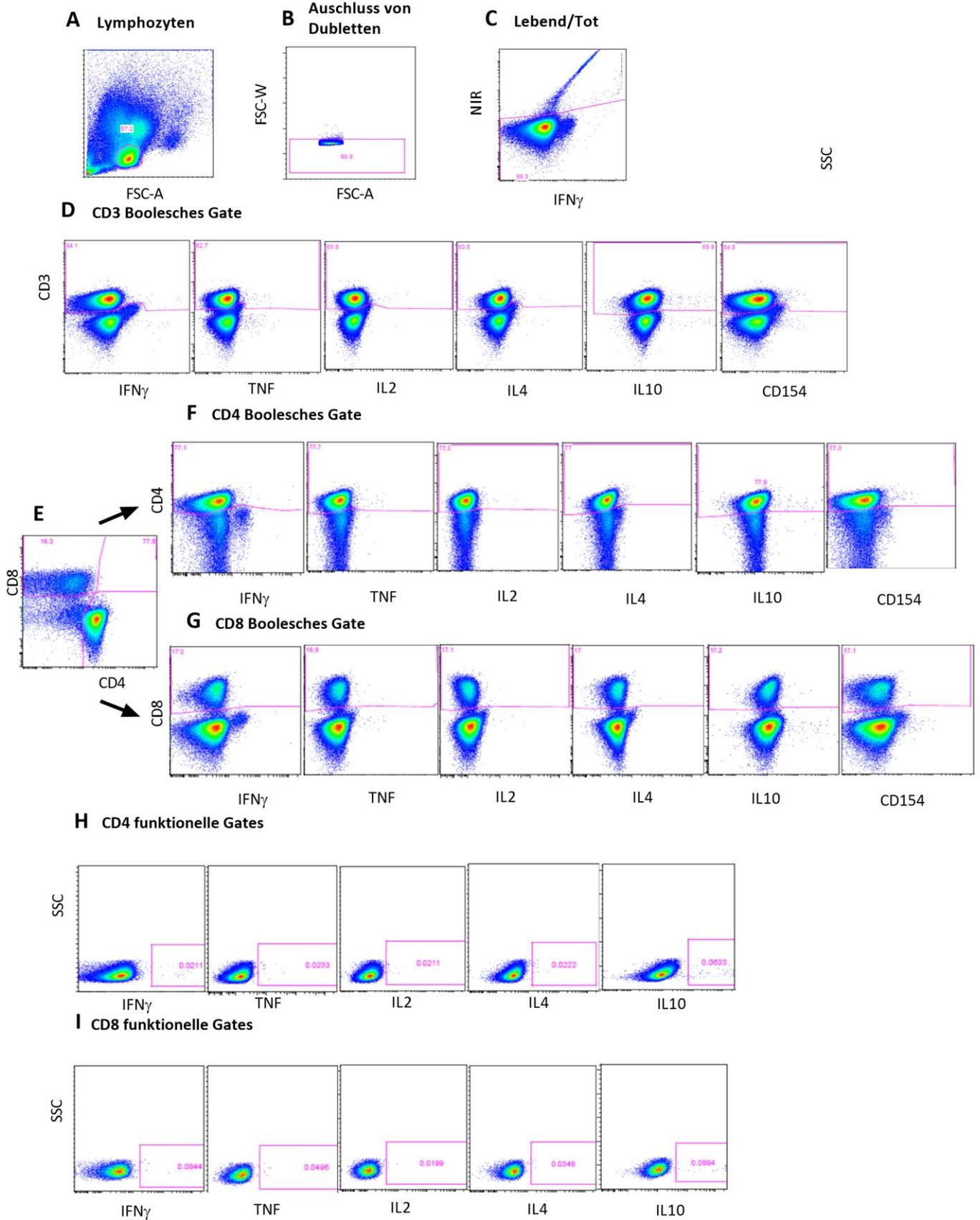


Abbildung 4.2-1: Repräsentative Gating-Strategie für die Analyse der T-Zell-Antwort aus kryokonservierten PBMC im EBV-Effektor-Panel: Lymphozyten wurden im Forward Scatter (FSC) vs Side Scatter (SSC) Plot gegatet (A), Dubletten danach im FSC-A vs FSC-W Plot ausgeschlossen (B) und anschließend tote Zellen durch NIR-Färbung ausgeschlossen (C). CD3⁺ Zellen wurden gegen alle funktionellen Marker gegatet, um die Herunterregulierung von CD3 bei antigenspezifischen T-Zellantworten zu berücksichtigen und diese Gates anschließend mit der Booleschen Operatorfunktion „oder“ kombiniert; dadurch wurde die CD3⁺ Zellpopulation identifiziert (D). Nach dem gleichen Prinzip wurden anschließend die CD4⁺ und CD8⁺ Zellpopulationen identifiziert (F und G) und die CD4⁺ Zellen aus der CD8⁺ Zellpopulation ausgeschlossen und vice versa (E). Schließlich wurden dann CD4⁺ Zellen (H) und CD8⁺ Zellen (I) positiv für die funktionellen Marker IFN γ , TNF, IL2, IL4 und IL10 identifiziert. Die Auswahl der positiven Zellpopulationen erfolgte im Vergleich mit unstimulierten Kontrollproben der jeweiligen Person.

4.2.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Für die Analyse der Antigenerkennung durch T-Zellen wurden IFN γ -ELISAs mit Hilfe des Kits der Firma R&D System gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden je 100 μ l des entsprechenden *Capture*-AK (1:180 in PBS) in ein Loch einer 96-Loch-Platte gegeben und \ddot{u} N bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer mit je 300 μ l/Loch Blockpuffer für mindestens eine Stunde bei RT geblockt. Nach erneutem dreimaligem Waschen folgte eine zweistündige Inkubation mit 100 μ l Kulturüberstand bzw. 100 μ l einer IFN γ -Standardlösung in *Reagent diluent*. Anschließend wurden die Platten erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen und je 100 μ l/Loch *Detection*-AK (1:180 in *Reagent diluent*) zugegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden je 100 μ l/Loch Streptavidin-HRP (1:200 in *Reagent diluent*) hinzugegeben und für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Zuletzt wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen, mit 100 μ l/Loch Färbelösung versetzt und die Färbereaktion nach 5-20 min, je nach Intensität der Blaufärbung, mit je 50 μ l Stopplösung abgestoppt. Die Färbung wurde umgehend bei 450 nm mit einem Referenzwert von 620 nm im ELISA-Lesegerät gemessen.

ELISA-Blockpuffer: PBS; 1% BSA; 5% Sucrose; 0,05% NaN₃

ELISA-Waschpuffer: PBS; 0,05% Tween-20

Reagent diluent: PBS; 1% BSA; sterilfiltriert

Färbelösung: BD OptEIA Substrat Reagenz A und B (1:1 gemischt)

Stopplösung: 2 N H₂SO₄

4.3 Mikrobiologische Methoden

Als Standardmedium für die Anzucht des *E. coli*-Stammes XL1-blue MRF' wurde LB-Medium verwendet. Die Anzucht der Zellen erfolgte aerob bei 37°C. Mit Plasmiden transformierte Bakterien wurden in Gegenwart von Ampicillin (100 µg/ml) bzw. Kanamycin (25 µg/ml) in Fest- oder Flüssigmedium kultiviert. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Bio-Photometer (Eppendorf) bestimmt.

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 Transformation von Bakterien

Elektrokompetente *E. coli* Bakterien des Stammes XL-1 blue MRF' wurden von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Nach Auftauen der elektrokompetenten XL-1 blue MRF' auf Eis wurden 20 µl der Bakteriensuspension entnommen, mit 1 µl der Plasmid-DNA vermischt und in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette (1 mm Spaltbreite) transformiert (1500 V, 25 µF und 100 Ω). Die Bakterien wurden umgehend in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und für ½ h bei 37°C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Schließlich wurden 10 – 50 µl der Suspension, je nach Größe des Plasmids, auf mit Ampicillin versetzten LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Bakterienplatten wurden anschließend 16 h bei 37°C inkubiert.

SOB-Medium: 20 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 0,5 g NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ ad 1 l dH₂O

SOC-Medium: SOB-Medium; 0,2% Glucose; sterilfiltriert

LB-Medium: 10 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt ad 1 l dH₂O; pH 7,0

LB-Agar: 10 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 20 g Bacto-Agar ad 1 l dH₂O; pH 7,0

4.4.2 Isolation großer Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Herstellung großer Mengen Plasmid-DNA (Maxi-Präp) erfolgte mittels „JetStar 2.0-Kit“ der Firma Genomed. Dafür wurden 400 ml Superbroth-Medium, welches mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt war, mit der gewünschten Bakterienkolonie angeimpft. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator wurden 900 µl der Bakteriensuspension entnommen, mit 900 µl Einfriermedium vermischt und bei -80°C gelagert. Die restliche Kultur wurde für 10 min bei 4.600 x g sedimentiert. Das Pellet wurde in 10 ml E1-Puffer resuspendiert und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Lyse der Zellen wurde 10 ml E2-Puffer hinzugegeben und für 5 min bei leichtem Schwenken inkubiert. Während dieser Zeit erfolgte die Auflösung der Zellmembran durch *sodium dodecyl sulfate* (SDS) und durch das enthaltene NaOH die Denaturierung von Proteinen, Plasmid-DNA und chromosomaler DNA. Nach Neutralisation durch Zugabe von 10 ml E3-Puffer wurde der Ansatz für 20 min bei 7.000 x g und 4°C zentrifugiert, wodurch die im Überstand befindliche Plasmid-DNA von anderen Zellbestandteilen getrennt wurde. Währenddessen wurde eine Maxi-Säule mit 20 ml E4-Puffer äquilibriert. Der Überstand des Bakterienlysats wurde nach der Zentrifugation auf diese Säule gegeben und danach dreimal mit je 20 ml E5-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit 15 ml E6-Puffer eluiert. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol und Zentrifugation für 20 min bei 7.000 x g und 4°C. Das DNA-Pellet wurde nach Abkippen des Überstandes luftgetrocknet und anschließend in 1 ml TE-Puffer gelöst. Die Ausbeute an Plasmid-DNA wurde durch die Ermittlung der DNA-Konzentration am Bio-Photometer (Eppendorf) (Wellenlänge 260 nm) bestimmt. Zur Überprüfung der Identität der Plasmid-DNA wurde diese in fünf unterschiedlichen Ansätzen mit jeweils unterschiedlichen Restriktionsenzymen geschnitten, und die Restriktionsfragmente durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

Superbroth-Medium: 35 g Trypton, 20 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 5 ml NaOH (1N)

Einfriermedium: LB-Medium; 40% Glycerin

Puffer E4: 100 mM Natriumacetat (pH 5,0); 600 mM NaCl; 0,15% Triton-X-100 in H₂O

Puffer E5: 100 mM Natriumacetat (pH 5,0); 800 mM NaCl in H₂O

Puffer E6: 100 mM Natriumacetat (pH 5,0); 1500 mM NaCl in H₂O

TE Puffer: 10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA in H₂O

4.4.3 Schneiden der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA mittels Restriktionsverdau wurde unter den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Der Verdau erfolgte bei entsprechender Temperatur für 1-2 h. Der Erfolg der Spaltung wurde durch Auftrennung der Fragmente in einem Agarosegel überprüft.

Tabelle 4.4-1: Reaktionsansatz für den DNA-Verdau mittels Restriktionsendonukleasen

Plasmid-DNA	1 µg
10x Puffer	2 µl
Enzym	1 µl
H₂O	ad 20 µl

4.4.4 Elektrophoretische Auftrennung der DNA mittels Agarosegelelektrophorese

Durch die elektrophoretische Auftrennung der DNA in einem Agarosegel konnten die DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt werden. Zur Herstellung der Agarosegele wurde 1% Agarose in 1 x TAE-Laufpuffer aufgenommen und anschließend in der Mikrowelle bis zum vollständigen Auflösen der Agarose erhitzt. Der Lösung wurde nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,2 µl/ml zugesetzt und das Gemisch dann in eine Gel-Gießapparatur gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel in 1 x TAE-Puffer überführt.

Die DNA-Fragmente wurden mit DNA-Ladepuffer versetzt. Das darin enthaltene Glycerin diente als Beschwerung und verhinderte das Diffundieren der DNA in den umliegenden Puffer, das darin enthaltene Bromphenolblau diente der visuellen Detektion der Proben im Gel.

Sowohl die DNA-Proben als auch ein 1 kb DNA-Größenstandard wurden anschließend in die dafür vorgesehenen Geltaschen pipettiert und eine Spannung von 120 Volt angelegt. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente im Gel wurden diese letztlich durch das im Gel enthaltene Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert und im UV-Licht fluoresziert, im UV-Transilluminator bei 253 nm detektiert.

TAE-Puffer: 40 mM Tris/HCl pH 7,8; 5 mM NaAc; 1 mM EDTA

Ladepuffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,05% Bromphenolblau; 10% Glycerin

4.5 Proteinbiochemische Methoden

4.5.1 Aufreinigung rekombinanter Proteine mittels Metall-Chelat-Affinitätschromatographie

Die EBV-Protein-exprimierenden HEK293T-Zellen wurden geerntet und 10 min bei 900 x g zentrifugiert. Nach einem Waschschrift in PBS wurde das Zellpellet eines Transfektionsansatzes (20 Platten bzw. 2×10^8 Suspensionszellen) mit 50 ml Harnstoff-Lysispuffer versetzt und das Lysat durch mehrmaliges Auf- und Abziehen durch eine Kanüle homogenisiert. Das homogene Zelllysate wurde dann mindestens 20 min bei 4600 x g zentrifugiert, so dass DNA-Komplexe und Zelldetritus ein Pellet formten, während die Proteine im klaren Überstand verblieben. Dem Überstand wurden 150 μ l Nickel-Nitriloessigsäure-Agarose (Ni-NTA-Agarose) hinzugefügt und das Gemisch wurde μ N bei 4°C in einem Überkopfschüttler inkubiert.

Da die Proteine mit einem His-Etikett, d.h. mit 6 carboxyterminalen Histidinen, versehen waren, war eine schnelle und effiziente Aufreinigung über die spezifische Bindung an Ni-NTA-Agarose möglich. Die an Agarose geknüpfte Nitrilotriacetsäure (NTA) bildet dabei mit den Imidazolringen des 6x-His-Endes einen Chelatkomplex, in dem Ni als Zentralion über sechs koordinative Bindungen vorliegt. Imidazol allein kann diese Bindungen ebenfalls einnehmen. Durch Erhöhung der Imidazolkonzentration oder durch Erniedrigung des pH-Wertes des Harnstoffpuffers konnten die Proteine aus dem Komplex gelöst und aufgereinigt werden.

So fand zunächst ein Waschschrift mit Waschpuffer pH 6,8 statt, bei dem die Bindungen von unspezifischen Proteinen gelöst und diese so entfernt wurden. Danach kam es zur Elution der noch gebundenen Proteine über eine weitere Absenkung des pH auf 5,9 und 4,5, bzw.

durch eine Erhöhung der Imidazolkonzentration von 20 mM auf 150-300 mM. Die Ni-NTA-Agarose wurde 5 min bei 900 x g abzentrifugiert und der Überstand gesammelt.

Harnstoffpuffer: 8 M Harnstoff, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris HCl, 0,05% Tween20, 20 mM Imidazol

Lysispuffer: pH 8,0

Waschpuffer: pH 6,8

Elutionspuffer: pH 5,9 und 4,5

Imidazol-Elutionspuffer: pH 8,0; 150-300 mM Imidazol

4.5.2 Konzentrierung rekombinanter EBV-Proteine

Zur weiteren Verwendung der rekombinanten Proteine war eine hohe Konzentration und somit weitere Konzentrierung notwendig. Dazu wurden die Proteine zwei Tage lang gegen PBS) dialysiert und danach in 90% Ethanol bei -20 °C über Nacht gefällt. Durch die Dialyse wurden Salze, die bei der Konzentrierung ausgefallen wären und gestört hätten, entfernt.

Am nächsten Tag wurden die ausgefallen Proteine 30 min bei 30.000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen, nochmals mit 90%-igem Ethanol gewaschen und erneut 30 min bei 30.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die pelletierten Proteine kurz an der Luft getrocknet und danach in 4 M Harnstoffpuffer aufgenommen.

4.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970). Die Acrylamidkonzentration der Polyacrylamidgele betrug im Sammelgel 4% und im Trenngel, je nach Größe der zu detektierenden Proteine, 10,5%, oder 14%. Als Proteinstandard wurde der „Page Ruler Prestained Protein Ladder“ (Fermentas) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in einer Gelkammer in 1 x SDS-Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 120 V für 2-3 h oder bei 20-30 V üN. Durch die Western-Blot-Analyse oder eine Coomassie-Färbung konnten Proteine anschließend detektiert werden.

2 x Tris/SDS pH 6,8: 7,56 g Tris-Base; 2,5 ml 20% SDS pH 6,8; H₂O ad 250 ml

2 x Tris/SDS pH 8,8: 22,68 g Tris-Base; 2,5 ml 20% SDS; pH 8,8; H₂O ad 250 ml

1 x SDS-Elektrophoresepuffer: 0,025 M Tris-Base; 0,2 M Glycin; 0,1% SDS in H₂O

Sammelgel: 2 ml 30 % PAA; 7,5 ml 2 x Tris/SDS pH 6,8; 5, 4 ml H₂O; 90 µl 10% APS; 10 µl TEMED

Trenngel (10,5%): 7 ml 30% PAA; 10 ml 2 x Tris/SDS pH 8,8; 2,8 ml H₂O; 167 µl 10% APS; 17 µl TEMED

Trenngel (14%): 9,3 ml 30% PAA; 10 ml 2 x Tris/SDS pH 8,8; 0,5 ml H₂O; 167 µl 10% APS; 17 µl TEMED

4.5.4 Coomassie-Färbung

Coomassie-Brillant-Blau bindet an kationische und unpolare Seitenketten von Aminosäuren und färbt somit Proteine unspezifisch an. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurde das Polyacrylamidgel für 15 min in ddH₂O gewaschen. Anschließend wurde es in Coomassie-Färbelösung (PageBlue Protein Staining Solution, Fermentas) üN unter Schwenken inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Gel durch Waschen in ddH₂O entfärbt, bis die gewünschte Färbeintensität erreicht war. Anschließend wurde das Gel für 15 min in Entfärbelösung unter Schwenken inkubiert. Um das Gel zu trocknen, wurde es anschließend zwischen zwei zuvor mit Entfärbelösung angefeuchteten Folien (Gel Drying Film, Promega) eingebettet und in einen Rahmen üN zum Trocknen eingespannt.

Entfärbelösung: 40% MeOH; 10% Glycerin; 7,5% Essigsäure in H₂O

4.5.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen

4.5.5.1 Protein-Transfer durch Western Blot

Zur spezifischen Detektion von Proteinen wurden diese nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE elektrophoretisch auf eine Trägermembran übertragen. Mittels einer Nassblotanlage

erfolgte der Transfer von Proteinen aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (Hybond-P, GE Healthcare) in Transferpuffer. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 300 mA für 1-2 h bei 4°C.

Transfer-Puffer: 21 g Glycin; 4,5 g Tris; 300 ml Methanol; ad 1,5 l H₂O

4.5.5.2 Western-Blot-Hybridisierung mit Antikörper

Nach dem Transfer der Proteine wurde die PVDF-Membran zur Absättigung von freien Bindestellen für 1 h bei RT, oder 1 h bei 4 °C in Block-Puffer geschwenkt. Anschließend wurde die Membran zweimal für 10 min mit Wasch-Puffer gewaschen und bei RT für 2 h, oder 1 h bei 4°C mit der Primärantikörper-Lösung unter Schwenken inkubiert. Um ungebundenen Primärantikörper zu entfernen, wurde die Membran dreimal mit Waschpuffer unter Schwenken gewaschen, worauf die Membran für 1 h mit der Sekundär-Antikörperlösung inkubiert wurde. Nach drei weiteren Waschschrritten wurden die Proteine mit Hilfe des *enhanced chemiluminescence* (ECL)-Plus-Detektionssystems (GE Healthcare) nach Anleitung des Herstellers und nachfolgender Belichtung eines Röntgenfilms (CEA Medical X-Ray Screen Film Blue Sensitive, Agfa HealthCare) nachgewiesen. Alternativ zu dem erwähnten ECL-Kit wurden selbst hergestellte ECL-Lösungen für die Detektion verwendet. Hierzu wurden pro Membran 4 ml Lösung A mit 1,2 µl 98%-iger Wasserstoffperoxidlösung und 400 µl Lösung B vermischt und auf die Membran gegeben. Nach 3-minütiger Entwicklungszeit konnten die Signale ebenfalls durch Belichtung eines Röntgenfilms nachgewiesen werden.

Block-Puffer: 5% Magermilchpulver in PBS

Wasch-Puffer: 1% Magermilchpulver in PBS

Lösung A: 40 ml 0,1 M TRIS-HCl (pH 8,6); 10 mg Luminol

Lösung B: 20 ml DMSO; 22 mg para-Hydroxycoumarinsäure

Die Primärantikörper wurden in folgender Konzentration eingesetzt:

Tabelle 4.5-1: Konzentration der Primärantikörper im Western Blot

Spezifität	Spezies	Verdünnung
BMLF1	Ratte/Maus	1:10
BRLF1	Maus	1:500
BZLF1	Maus	1:500
EBNA1	Ratte	1:5
EBNA3A	Ratte	1:5
EBNA3C	Maus	1:5
His6	Maus	1:20

Die HRP-gekoppelten Sekundärantikörper anti-Maus-IgG, anti-Ratte-IgG und -IgM wurden 1:10.000 verdünnt eingesetzt.

4.5.6 Konzentrationsbestimmung von rekombinanten EBV-Proteinen

Zur Bestimmung der Protein-Konzentration von rekombinanten EBV-Proteinen kamen mehrere Methoden zur Anwendung.

4.5.6.1 Bestimmung mittels Coomassie-Färbung und BSA-Standard

Zum einen wurde die Konzentration der Proteine über die Bandenstärke auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel nach Coomassie-Färbung abgeschätzt. Dazu wurden sowohl das Protein in mehreren Verdünnungen als auch ein Standard, der aus mehreren Verdünnungen von BSA bekannter Konzentration bestand, auf das Gel aufgetragen und gefärbt. Als Referenz wurden meist BSA-Konzentrationen von 0,125 mg/ml bis 2,0 mg/ml verwendet. Schließlich konnten die Intensitäten der gefärbten Protein- und BSA-Banden verglichen und dadurch die Konzentration der rekombinanten Proteine abgeschätzt werden. Da sich die Proteine im Gegensatz zu den BSA-Standards allerdings häufig in mehrere Banden auftrennten, war die Angabe der Gesamtkonzentration zum Teil erschwert.

4.5.6.2 Bestimmung mittels Bradford-Assay

Dieser Test beruht auf der Bindung von Coomassie-Brilliant-Blau G-250 (CBBG) an die kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen in saurer Lösung. Dabei kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsspektrums von CBBG von 470 nm auf 595 nm. Die zunehmende Extinktion bei 595 nm durch vermehrte Proteinbindung wurde photometrisch detektiert und mit Hilfe Proteinstandards bekannter Konzentration quantifiziert.

Dabei wurden Wasser und Reaktionslösung im Verhältnis 4:1 gemischt. Je 1 ml der verdünnten Lösung wurden 20 µl Standardproteinlösung bzw. rekombinante Proteinproben in unterschiedlichen Verdünnungen beigemischt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Im Vergleich mit der anhand des BSA-Standards ermittelten Standardkurve wurden die Konzentrationen der rekombinanten Proteine ermittelt.

Die Probleme, die sich bei dieser Methode der Konzentrationsmessung zeigten, ergaben sich daraus, dass die Proteine aufgrund der hohen Konzentration nicht komplett in Lösung vorlagen. Nur durch eine Erhöhung der Harnstoffkonzentration konnten die Proteine in Lösung gebracht werden. Zu hohe Harnstoffkonzentrationen führten allerdings zu Ungenauigkeiten bei der Messung der Proben. Weiterhin ergaben sich im Bradford-Assay für unterschiedliche Proteine aufgrund von unterschiedlichen Bindungseigenschaften teilweise stark abweichende Werte trotz gleicher Konzentration.

4.5.6.3 Bestimmung mittels Fluorometer

Ähnlich dem Bradford-Assay funktioniert auch die Konzentrationsbestimmung mit dem Qubit® 2.0 Fluorometer. Die Konzentration des Zielmoleküls wird über einen Fluoreszenzfarbstoff gemessen, welcher nur bei Bindung an ein Zielmolekül ein Signal emittiert. Laut Hersteller kommt es im Vergleich zu anderen Methoden vor allem zu geringeren Störsignalen durch DNA oder RNA.

Für die Messung wurde das Qubit™ Reagenz mit dem mitgelieferten Qubit™ Puffer im Verhältnis 1:199 gemischt und zu einer *working solution* verarbeitet. 190 µl der *working*

solution wurden mit je 10 µl des mitgelieferten Standards inkubiert, mit denen das Gerät kalibriert und eine Standardkurve errechnet wurde. Daraufhin wurden je nach erwarteter Proteinkonzentration 180-199 µl der *working solution* mit 1-20 µl der Proteinproben auf ein Endvolumen von 200 µl vermischt und inkubiert. Die Berechnung der Konzentration der Proben erfolgte automatisch am Gerät.

4.5.7 Aufreinigung und Konzentrierung von Wildtyp Viren und VLP

Der von den Platten geerntete, wt-Viren bzw. VLP enthaltende Überstand wurde zunächst durch Millex-HV-Filter (Millipore) mit einer Porenweite von 0,45 µm eingeeengt.

Anschließend wurde der Überstand für 2 h bei 85.000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in PBS gewaschen und bei gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde schließlich in PBS aufgenommen, was einer Konzentrierung des Kulturüberstands von 100- bis 150-fach entsprach.

Funktionalität und Konzentration der wt-Viren bzw. VLP wurden indirekt mittels T-Zell-basiertem IFN γ -ELISA und anti-gp350-FACS gemessen. Hierbei wurden als Vergleich wt-Viren bekannter Konzentration verwendet.

4.5.8 Konzentrationsbestimmung von Wildtyp-EBV

Die Konzentrationsbestimmung der wt-Viren zur Verwendung als Standard erfolgte extern am Labor des Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg (Prof. Henri-Jacques Delecluse, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg)

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung einer Suspensions-HEK293T-Zelllinie

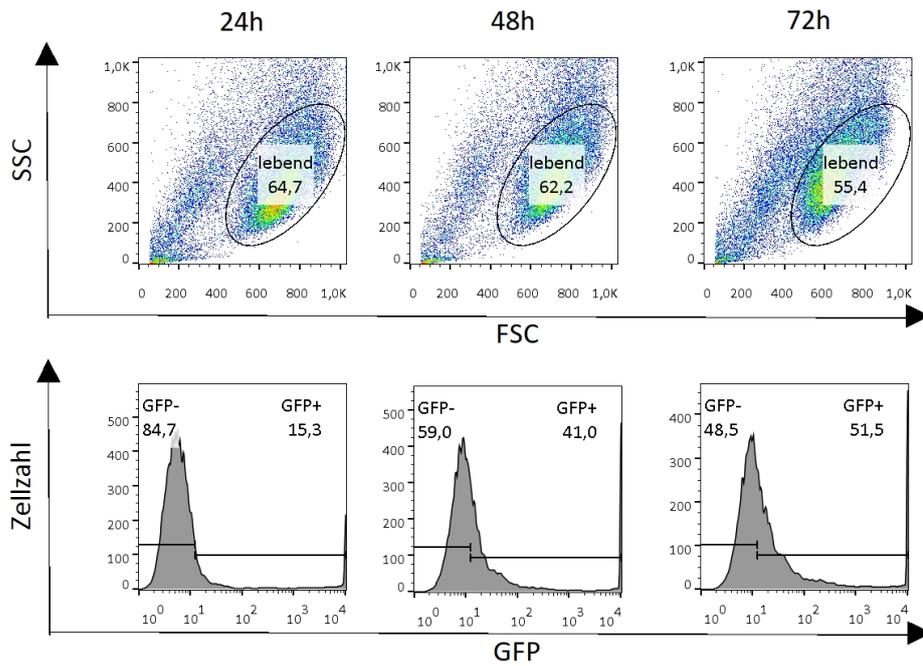
In dieser Arbeit wurde eine in Suspension wachsende HEK293T-Zelllinie etabliert und für die Proteinexpression verwendet. Die Adaptation an das Wachstum in Suspension geschah dabei schon in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, während hier die Effizienz der Transfektion und der Proteinexpression unter verschiedenen Bedingungen untersucht wurde.

Zum einen wurde die Rezeptur des Mediums, in dem die Zellen gehalten wurden, verändert. Es wurde ein FCS-Anteil im Medium von 10% verglichen mit einem Anteil von 2% und anschließend die Transfektionseffizienz über die Grünfluoreszenz Durchflusszytometrie-basiert bestimmt. Dies geschah zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion (24 h, 48 h, 72 h), um zusätzlich den optimalen Zeitpunkt für das Ernten der Zellen abschätzen zu können (siehe **Abbildung 5.1-1**). Hierbei erwiesen sich ein FCS-Anteil im Medium von 2% und ein Ernten der Zellen nach 48 h als beste Kulturbedingungen.

Weiterhin wurde die Auswirkung unterschiedlicher Mengen an Transfektionsmix auf die Transfektionseffizienz untersucht, ebenfalls zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transfektion. Hierbei wurde insbesondere auf das Überleben der Zellen geachtet, da große Mengen an Transfektionsmix toxisch auf die Zellen wirken können. Als Grundlage (1 x Transfektionsmix) diente dabei der Einsatz von 450 µg Plasmid-DNA und 675 µl PEI-Lösung in 15 ml OPTIMEM. Darüber hinaus wurden das Zwei- und Vierfache dieses Ansatzes getestet. Dabei zeigte sich bei Verwendung des zwei- und vierfachen Transfektionsmixes die höchste GFP-Expression und somit Transfektionseffizienz, was jedoch bei Verwendung des vierfachen Ansatzes mit einer deutlich höheren Toxizität einherging (siehe **Abbildung 5.1-2**). Hinsichtlich des Zeitpunktes der Zellernte zeigte sich bereits nach 48 h eine hohe Transfektionseffizienz, die auch mit längerer Inkubationszeit nicht weiter anstieg.

Somit konnten ein Medium mit einem FCS-Anteil von 2%, der Einsatz des zweifachen Transfektionsmixes sowie das Ernten der Proteine 48 h nach der Transfektion als beste Bedingungen für die in Suspension gehaltenen HEK293T-Zellen festgelegt werden.

A: 10% FSC



B: 2% FSC

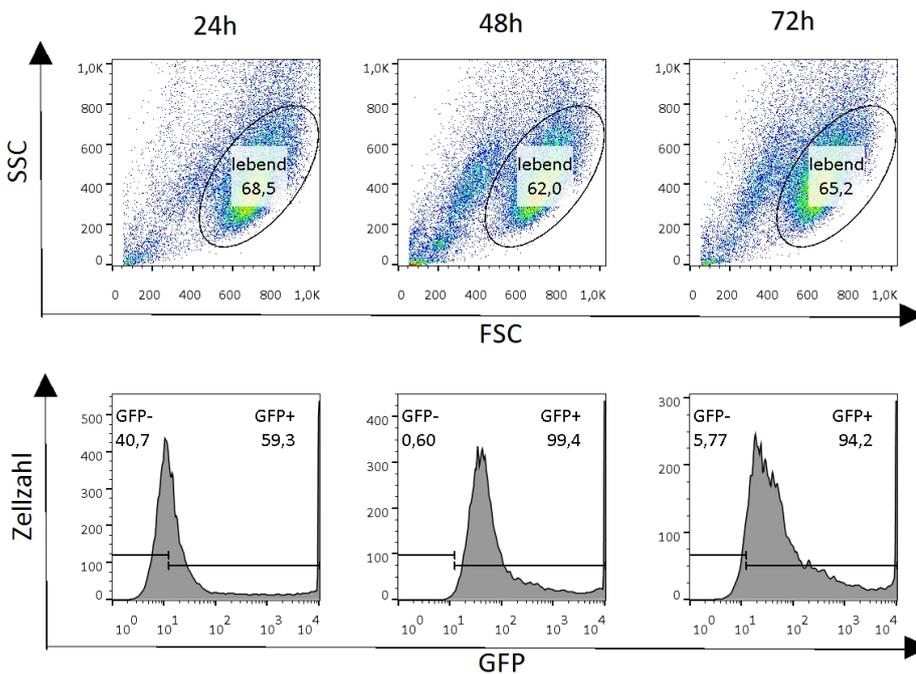
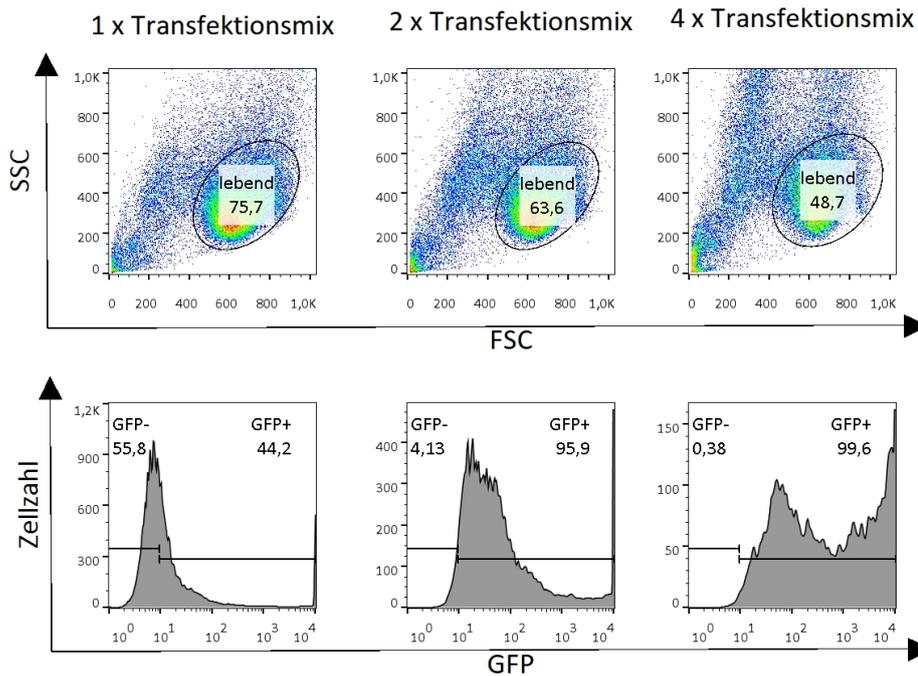


Abbildung 5.1-1 GFP-Expression in Suspensions-HEK293T-Zellen in Abhängigkeit von Serumkonzentration und zu verschiedenen Zeiten nach Transfektion: In Suspension wachsende HEK293T-Zellen wurden mit dem GFP-Expressionsplasmid pHL2823 transfiziert und anschließend die Viabilität und die Grünfluoreszenz der Zellen zu unterschiedlichen Zeiten (24 h, 48 h, 72 h) nach Transfektion mittels FACS untersucht. Zudem wurden die Zellen in Medium mit 10% FCS (A) oder 2% FCS (B) gehalten.

A: 48h



B: 72h

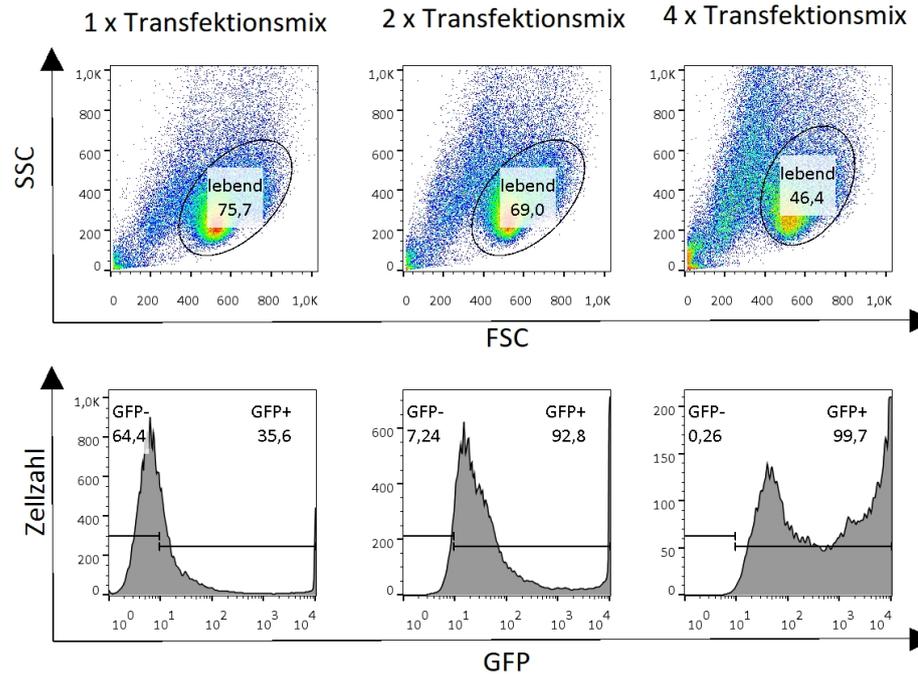


Abbildung 5.1-2 GFP-Expression in Suspensions-HEK293T-Zellen unter unterschiedlichen Kulturbedingungen und zu unterschiedlichen Zeiten: In Suspension wachsende HEK293T-Zellen wurden mit dem GFP-Expressionsplasmid pHL2823 transfiziert und anschließend die Viabilität und die Grünfluoreszenz der Zellen zu unterschiedlichen Zeiten (A: 48 h, B: 72 h) nach Transfektion mittels FACS untersucht.

5.2 Herstellung rekombinanter EBV-Proteine zur Stimulation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

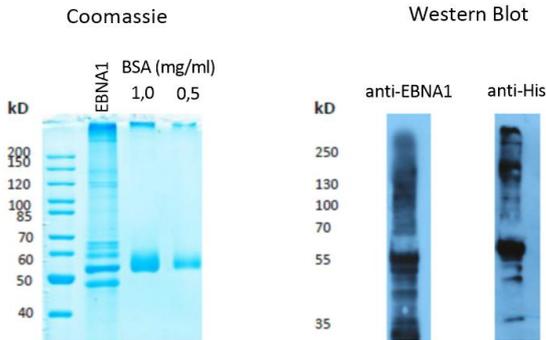
Zur Stimulation von EBV-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden mit BZLF1, BRLF1 und BMLF1 drei immundominante Antigene des lytischen Zyklus und mit EBNA1deltaGA, EBNA3A und EBNA3C drei immundominante Proteine der latenten Phase ausgewählt (Steven et al., 1997).

5.2.1 Nachweis und Konzentrationsbestimmung der Proteine

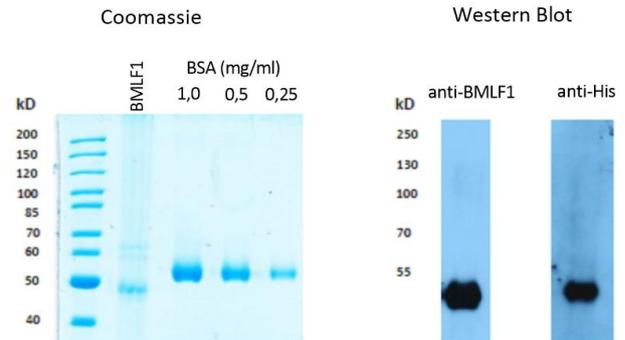
Die ausgewählten Proteine wurden in HEK293T-Zellen exprimiert, mittels ihres carboxyterminalen Poly(6x)-Histidin-Etiketts isoliert und aufgereinigt. Um eine möglichst hohe Proteinkonzentration zu erreichen, wurden sie durch Ethanolfällung und Zentrifugation konzentriert und schließlich in 4 molarem (M) Harnstoffpuffer aufgenommen. Es folgte ein standardisierter Nachweis der Proteine mittels Western-Blot. Hierfür wurde jeweils ein Antikörper, der gegen das Polyhistidin-Etikett gerichtet war, und ein spezifisch gegen das jeweilige Protein gerichteter Antikörper verwendet.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration kamen verschiedene Methoden zum Einsatz, die sich allerdings aufgrund der hohen Harnstoffkonzentration, welche zur Lösung der Proteine notwendig war, und aufgrund der teils proteinspezifischen (in Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz der Proteine) Unterschiede mitunter inkonsistente Ergebnisse lieferten. Letztendlich wurde die Proteinkonzentration über einen Vergleich der Proteinbanden im Coomassie-gefärbten Gel zu BSA-Standards mit bekannter Proteinkonzentration genähert (siehe **Abbildung 5.2-1**). Oft kam es im Coomassie-Gel zur Darstellung zusätzlicher Banden, die nicht mit der erwarteten Größe der Proteine übereinstimmten. Um einen Hinweis auf die Identität dieser Proteine zu erhalten, wurden die Bandmuster mit denen im Western-Blot verglichen. In den meisten Fällen stimmten die Bandenmuster überein, so dass es sich vermutlich um Multimere oder Degradationsprodukte der rekombinanten Proteine handelte (siehe **Abbildung 5.2-1**).

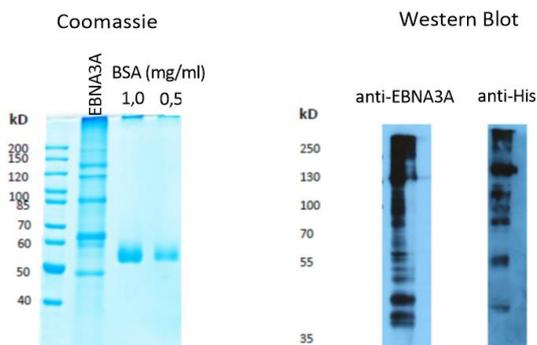
A EBNA1



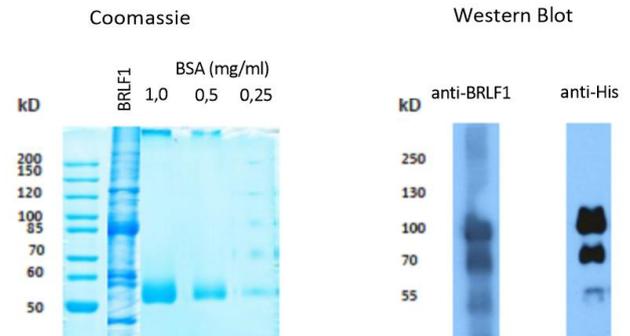
D BMLF1



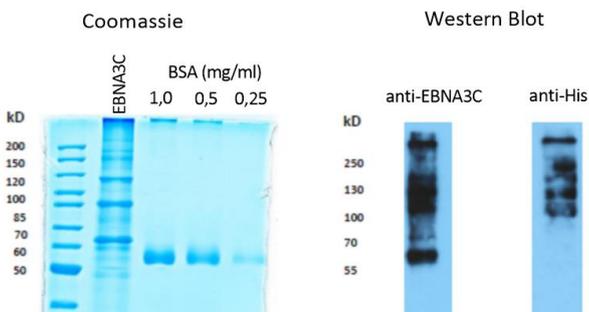
B EBNA3A



E BRLF1



C EBNA3C



F BZLF1

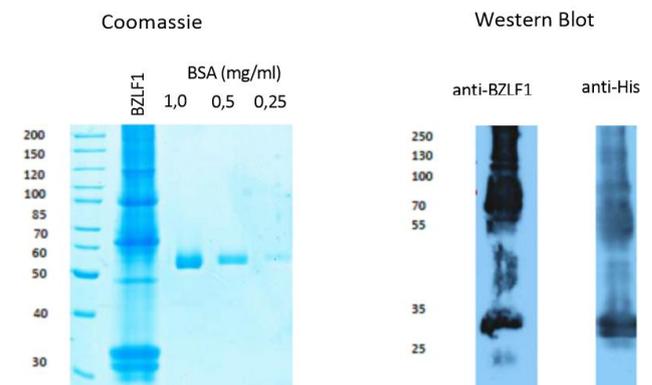


Abbildung 5.2-1 Analyse der rekombinant exprimierten und aufgereinigten EBV Proteine. Um Reinheit und Menge der rekombinanten EBV Proteine EBNA1deltaGA (A), EBNA3A (B), EBNA3C (C), BMLF1 (D), BRLF1 (E) und BZLF1 (F) zu überprüfen, wurden die Proteine mittels SDS-PAGE größensepariert und mit Coomassie-Lösung angefärbt (links). Zur Abschätzung der Proteinkonzentration wurde jeweils ein BSA-Standard mitgeführt. Parallel dazu wurden zwei Western-Blots der aufgetrennten Proteine angefertigt und jeweils mit einem Protein-spezifischen und einem 6xHis-Etikett-spezifischen Antikörper detektiert (rechts).

5.2.2 Stimulation von CD4⁺ T-Zellen mit den rekombinanten EBV Proteinen

Zur Überprüfung der Immunogenität der Proteine wurden sie zur Stimulation von CD4⁺ T-Zellen eingesetzt. Dazu wurden APC, die mit den unterschiedlichen Proteinen in steigenden Mengen beladen worden waren, mit einem jeweils für das Antigen spezifischen CD4⁺ T-Zellklon kokultiviert und anschließend die IFN γ -Produktion mittels ELISA gemessen. Da geplant war, die Proteine kombiniert als Stimulationsmix einzusetzen, wurde eine mögliche Wirkungsabschwächung der T-Zell-stimulierenden Wirkung des Proteincocktails ebenfalls untersucht. Dazu wurde zu dem jeweils spezifischen Protein ein Proteingemisch, bestehend aus den anderen fünf Proteinen, zugemischt. Die gemessenen IFN γ -Mengen beider Titrationsreihen wurden dann miteinander verglichen. Bei allen Proteinen war eine Dosisabhängige IFN γ -Produktion zu sehen, eine Abschwächung durch Beimischung des Proteingemisches konnte nicht beobachtet werden.

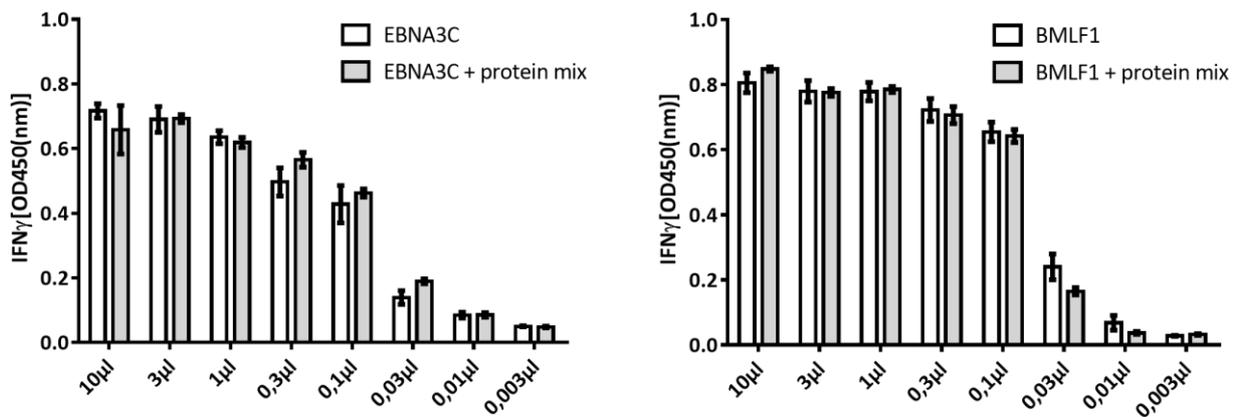


Abbildung 5.2-2 T-Zellerkennung rekombinanter EBV-Proteine nach LCL-Beladung: LCL des T-Zellspenders wurden mit unterschiedlichen Mengen an rekombinantem EBNA3C- (links) oder BMLF1- (rechts) Protein alleine, oder im Gemisch mit anderen EBV-Proteinen über Nacht beladen. Anschließend wurden die Zellen jeweils mit einem EBNA3C-spezifischen (links, T Zellklon V β 13.2-13) oder BMLF1-spezifischem (rechts, T Zellklon 3C5H11) CD4⁺ T-Zellklon kokultiviert und nach 20 Stunden die IFN γ -Konzentration im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen einschließlich der Standardabweichung.

Zunächst wurden die Versuche mit LCL als APC durchgeführt (siehe **Abbildung 5.2-2**). Anschließend wurden die Versuche mit PBMC als APC wiederholt, um eine Verwendung der Proteine in auf PBMC basierenden Assays (ELISpot, Durchflusszytometrie-basierte Analyse zum Immunmonitoring) besser beurteilen zu können (siehe **Abbildung 5.2-3**). Hierbei konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden.

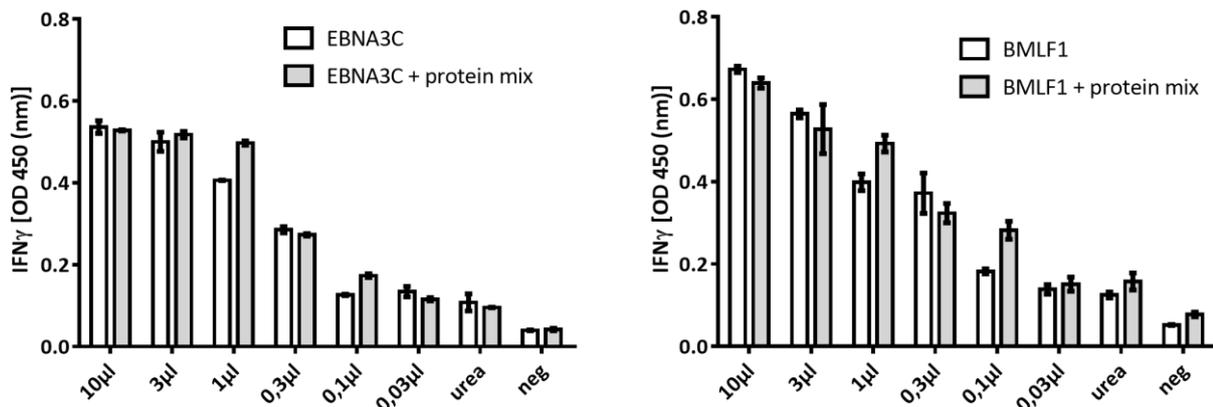


Abbildung 5.2-3 T-Zellerkennung rekombinanter EBV-Proteine nach PBMC-Beladung: PBMC des T-Zellspenders wurden mit unterschiedlichen Mengen an rekombinantem EBNA3C- (links) oder BMLF1- (rechts) Proteinen entweder alleine, oder als Teil eines Proteinmixes über Nacht beladen. Anschließend wurden die Protein-beladenen PBMC jeweils mit EBNA3C-spezifischen (links, T Zellklon V β 13.2-13) oder BMLF1-spezifischen (rechts, T Zellklon 3C5H11) CD4⁺ T-Zellklon für 20 Stunden kokultiviert. Danach wurde die IFN γ -Produktion mittels ELISA bestimmt. Unbehandelte Zellen, sowie Zellen, die nur mit Puffer (urea) beladen worden waren, wurden als Kontrollen mitgeführt. Angegeben sind die Mittelwerte einschließlich Standardabweichung von Dreifachbestimmungen.

5.3 VLP – standardisierte Herstellung und Nachweis

Die aus der HEK293/TR-Zelllinie gewonnenen VLP wurden zunächst mit Hilfe von spezifischen CD4⁺ T-Zellklonen hinsichtlich ihrer Immunogenität überprüft. Hierzu wurden APC mit den VLP beladen und anschließend mit CD4⁺ T-Zellklonen spezifisch für gp350 (GP1D6) oder BNRF1 (JMN1H7), beides Proteine der Virushülle, kokultiviert. Anschließend wurde die VLP-dosisabhängige IFN γ -Produktion im ELISA gemessen. Eine dosisabhängige IFN γ -Produktion konnte mit beiden T-Zellklonen beobachtet werden (siehe **Abbildung 5.3-1**).

Zusätzlich wurden VLP mit den aus der HEK293/2089.17 Zelllinie gewonnenen wt-EBV verglichen. Hierzu wurden analog zum Vorversuch APC mit wt-Viren beladen und die Dosisabhängige IFN γ -Produktion der T-Zell-Klone GP1D6 und JMN1H7 im ELISA gemessen. Die Ergebnisse der Stimulation mit wt-EBV und VLP konnten so direkt miteinander verglichen werden (siehe **Abbildung 5.3-1**). Der Virustiter der wt-Viren wurde extern mittels PCR bestimmt. Dadurch konnte eine einem bestimmten Virustiter entsprechende VLP-Konzentration ermittelt werden.

Neben der Überprüfung der VLP mit Hilfe von T-Zellklonen wurde auch ein Nachweis mittels anti-gp350-Antikörper-basierter Durchflusszytometrie durchgeführt. Hierzu wurden Elijah-Zellen mit unterschiedlichen Mengen an VLP beladen, was zu einer Bindung an den CD21 (Komplementrezeptor 2) -Rezeptor auf den Elijah-Zellen führte und anschließend einen Nachweis gebundener VLP über einen Fluorochrom-gekoppelten anti-gp350-Antikörper in der Durchflusszytometrie ermöglichte. Dazu wurden unterschiedliche Inkubationszeiten getestet (3 h, über Nacht). Zwar konnte bereits nach 3 h ein eindeutiges Signal in Abgrenzung zur Antikörperkontrolle detektiert werden, doch eine Inkubation über Nacht führte zu deutlicheren Signalen und somit besseren Ergebnissen (siehe **Abbildung 5.3-2**). Weiterhin wurden unterschiedliche Sekundärantikörper getestet, die mit unterschiedlichen Fluorochromen gekoppelt waren. Hierbei zeigte sich eine bessere Abgrenzung der VLP von der Antikörperkontrolle mit PE- als mit Cy5- gekoppelten Antikörpern.

Anschließend wurden die VLP auch mittels Durchflusszytometrie mit wt-EBV verglichen. Hierzu wurden Elijah-Zellen mit unterschiedlichen Mengen VLP oder wt-Viren inkubiert und nach Inkubation mit anti-gp350-Antikörpern mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe

Abbildung 5.3-3). Die hier erhaltenen Ergebnisse waren ähnlich den Ergebnissen der IFN γ -ELISAs, insbesondere den Ergebnissen mit dem gp350-spezifischen T-Zell-Klon GP1D6.

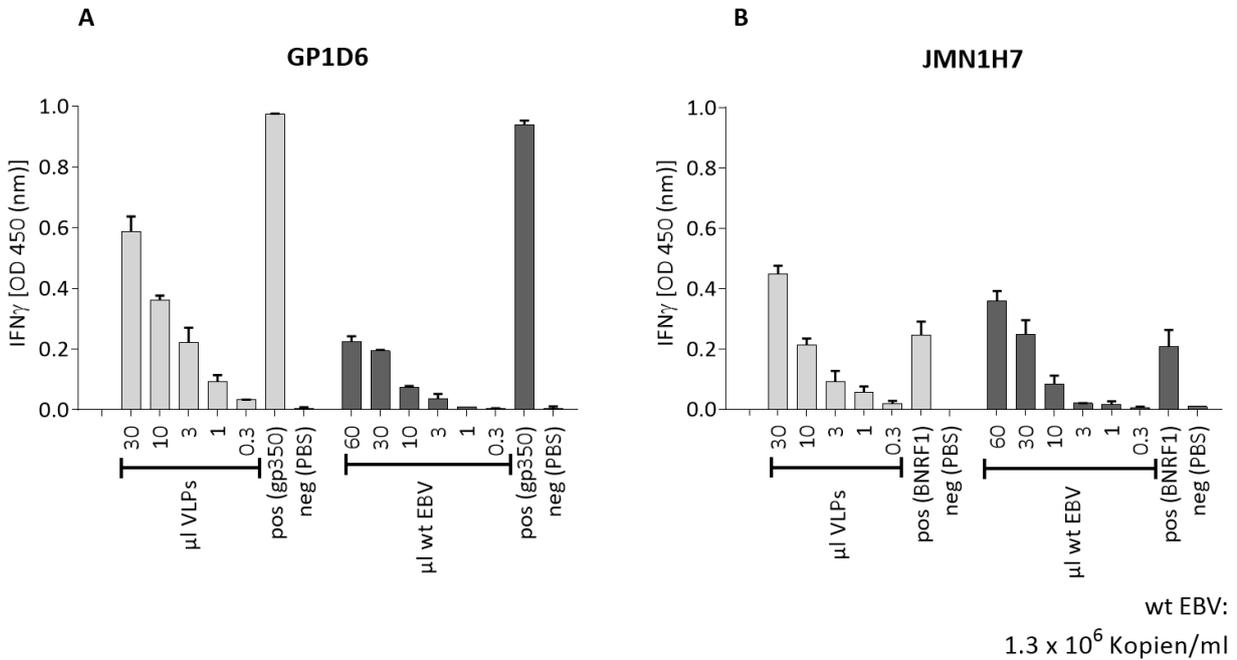


Abbildung 5.3-1: Vergleich der T-Zell-Immunogenität von VLP und wt-EBV: LCL des T-Zellspenders wurden mit unterschiedlichen Mengen VLP oder wt-EBV über Nacht beladen und anschließend mit dem gp350-spezifischen CD4⁺ T-Zellklon GP1D6 (**A**) oder dem BNRF1-spezifischen CD4⁺ T-Zellklon JMN1H7 (**B**) für 20 h kokultiviert. Anschließend wurde mittels ELISA die IFN γ -Ausschüttung der T-Zellen ermittelt. Es wurden je eine Positivkontrolle (Peptid: gp350, BNRF1) und eine Negativkontrolle (PBS) mitgeführt. Angegeben sind die Mittelwerte einschließlich Standardabweichung von Dreifachbestimmungen.

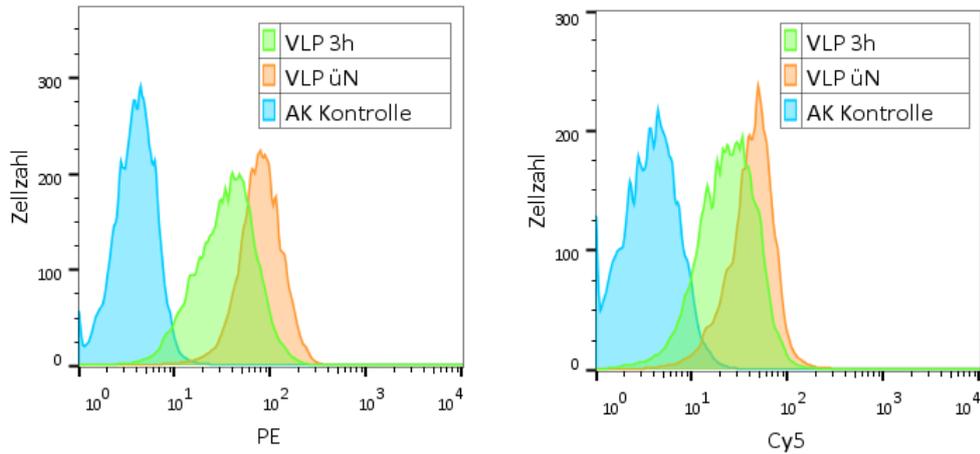


Abbildung 5.3-2 Überprüfung der Bindungseigenschaften der VLP an B-Zellen: EBV-negative Elijah-Zellen wurden mit VLP für unterschiedlich lange Zeit (3 h oder über Nacht (üN)) inkubiert und anschließend mit einem gegen gp350 gerichteten Antikörper gefärbt. Zur Detektion gebundener Antikörper wurden zwei unterschiedliche Sekundärantikörper verwendet, die mit verschiedenen Farbstoffen gekoppelt waren (PE, Cy5). Eine Antikörperkontrolle (AK) wurde jeweils mitgeführt.

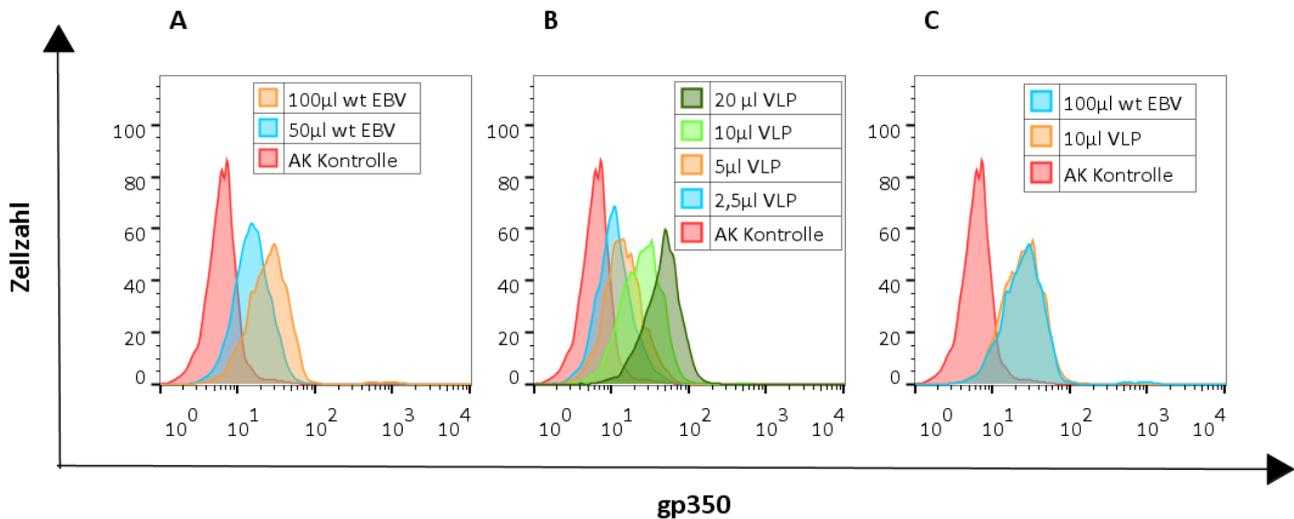


Abbildung 5.3-3 Bestimmung der VLP-Konzentration durch Vergleich mit wt-EBV: EBV-negative Elijah-Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen wt-EBV (A) oder VLP (B) über Nacht inkubiert und anschließend die Menge an gebundenen Viruspartikeln mit Hilfe eines gegen gp350 gerichteten Antikörpers durchflusszytometrisch untersucht. Eine Antikörperkontrolle (AK) wurde mitgeführt. Aufgrund der gemessenen Signalintensitäten wurde ein direkter, mengenangepasster Vergleich zwischen wt-EBV und VLP durchgeführt (C).

5.4 Durchflusszytometrische Analyse der EBV-spezifischen T-Zell-Antwort

Zur Untersuchung der EBV-spezifischen T-Zell-Antwort mittels Durchflusszytometrie-basierter Analysen sollten VLP als neuartiges EBV-spezifisches Stimulanz evaluiert und etabliert werden. Hierbei wurde nach dem Schema in **Abbildung 5.4-1**, unter Verwendung kryokonservierter PBMC, vorgegangen. Zur Ergänzung der VLP, die v.a. die Überprüfung der CD4⁺ T-Zell-Antwort gegen die strukturellen Bestandteile von EBV ermöglichten, wurde die CD8⁺ T-Zell-Antwort gegen die Latenzantigene von EBV mittels Einsatzes von LCL(Z-) getestet. Hierfür wurde die T-Zell-Antwort nach Stimulation mit den jeweiligen Antigenen in drei verschiedenen Spendergruppen untersucht und miteinander verglichen: 1. EBV-seronegative, gesunde erwachsene Kontrollspender (NK), 2. EBV-seropositive, gesunde erwachsene Kontrollspender (PK), 3. pädiatrische Patienten mit gesicherter, frischer EBV-Primärinfektion (IM). Zur Analyse der Zellen wurden nach einer lebend/tot-Färbung die Oberflächenmarker CD3, CD4, und CD8 und die intrazellulär angereicherten Zytokine IFN γ , TNF, IL2, IL4 und IL10 untersucht.

Es ergaben sich für jeden Spender, jede Gruppe und jedes Antigen Werte für die Anzahl Zytokin-positiver CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Bezug auf die Gesamtzahl der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Dies ist beispielhaft für die Gesamtzytokinantwort in **Tabelle 5.4-1** und **Tabelle 5.4-2** dargestellt.

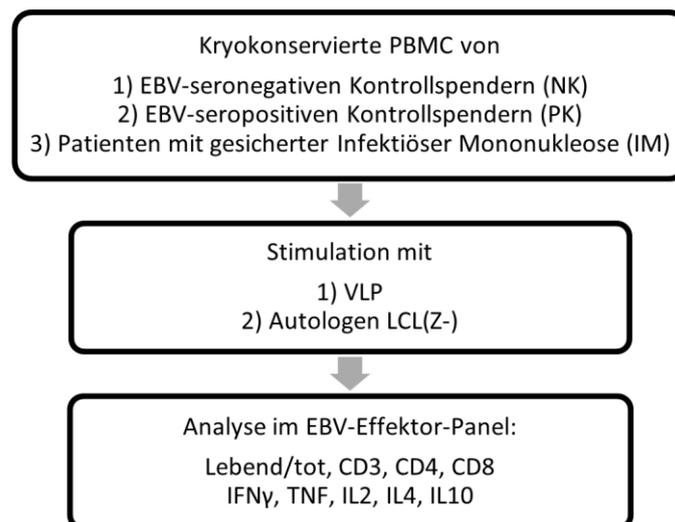


Abbildung 5.4-1 Durchflusszytometrie-basierte Analyse der EBV-spezifischen T-Zell-Antwort

5.4.1 T-Zell-Antwort nach VLP-Stimulation

Tabelle 5.4-1: T-Zell-Antwort nach VLP-Stimulation (Gesamtzytokinantwort)

	Zytokin-positive T-Zellen nach VLP-Stimulation					
	[% von allen CD4 ⁺ T-Zellen]			[% von allen CD8 ⁺ T-Zellen]		
ID n=22	NK n=6	PK n=7	IM n=9	NK n=6	PK n=7	IM n=9
IM01			0,0776			0,0677
IM02			0,1907			0,0963
IM03			0,1780			0
IM04			0,2783			0,0693
IM05			0,1997			0,0331
IM06			0,0781			0,0110
IM07			0,0990			0
IM08			0,2300			0,0197
IM09			0,6146			0,0848
NK01	0			0		
NK02	0			0		
NK03	0,0079			0		
NK04	0,0065			0		
NK05	0,0129			0,0447		
NK06	0			0,0312		
PK01		0,0702			0,0326	
PK02		0,0260			0,0058	
PK03		0,0162			0	
PK04		0,0943			0	
PK05		0,0418			0,0525	
PK06		0,0090			0	
PK07		0,0654			0	
Median	0,0032	0,0418	0,1907	0	0	0,0311

Tabelle 5.4-1 und **Abbildung 5.4-2** ist zu entnehmen, dass VLP valide Stimulatorantigene für die Messung EBV-spezifischer CD4⁺ T-Zell Antworten liefern. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Gesamtzytokinantwort der CD4⁺ T-Zellen zwischen den drei Gruppen (Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,0001$). In der paarweisen Analyse zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe der IM-Patienten und der Gruppe der EBV-seronegativen Kontrollspender ($p = 0,0004$), zwischen IM-Patienten und EBV-seropositiven Kontrollspendern ($p = 0,0007$), sowie zwischen EBV-seronegativen und EBV-seropositiven Kontrollspendern ($p = 0,0023$). Während in der Gruppe der IM-Patienten nach VLP-

Stimulation im Median 0,1907% (*range*: 0,0776%-0,6146%) der CD4⁺ T-Zellen Zytokin-positiv waren, konnten in der Gruppe der EBV-seronegativen Kontrollspender nur geringe oder gar keine Zytokinantworten gemessen werden (Median: 0,0032%; *range*: 0-0,0129%). Die Frequenz Zytokin-positiver CD4⁺ T-Zellen in der Gruppe der EBV-seropositiven Kontrollspender befand sich dazwischen (Median: 0,0418%; *range*: 0,009%-0,0943%). Der Hauptanteil der Zytokinproduktion entfiel dabei auf IFN γ - und TNF-produzierende CD4⁺ T-Zellen (siehe **Abbildung 5.4-3**). In der Gruppe der IM-Patienten zeigte sich zudem eine signifikant erhöhte IL10-Produktion der CD4⁺ T-Zellen im Vergleich sowohl zu den EBV-seronegativen ($p=0,0005$) als auch den EBV-seropositiven Kontrollspendern ($p=0,0034$). IL2- und IL4-positive CD4⁺ T-Zellen wurden vereinzelt in der Gruppe der IM-Patienten beobachtet, jedoch ohne einen signifikanten Gruppenunterschied.

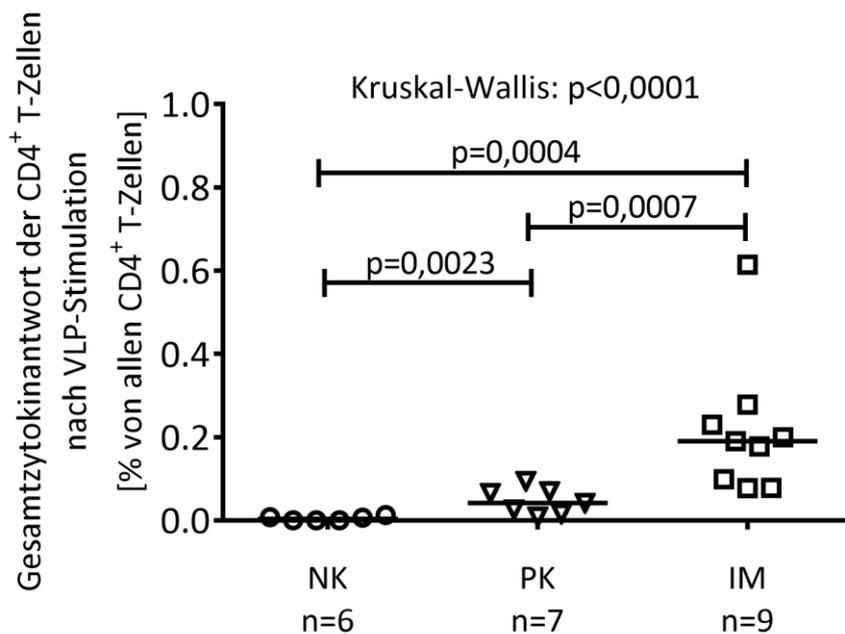


Abbildung 5.4-2 Gesamtzytokinantwort der CD4⁺ T-Zellen von drei verschiedenen Spendergruppen nach Stimulation mit VLP: Nach Stimulation von PBMC EBV-seronegativer (NK) und EBV-seropositiver Kontrollspender (PK) sowie von Patienten mit IM (IM) mit VLP wurde die Frequenz Zytokin-positiver (IFN γ , TNF, IL2, IL4 und IL10) CD4⁺ T-Zellen Durchflusszytometrie-basiert bestimmt und addiert (Gesamtzytokinantwort). Die Balken stellen den Median dar. Der statistische Gruppenvergleich erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test, der anschließende paarweise Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test.

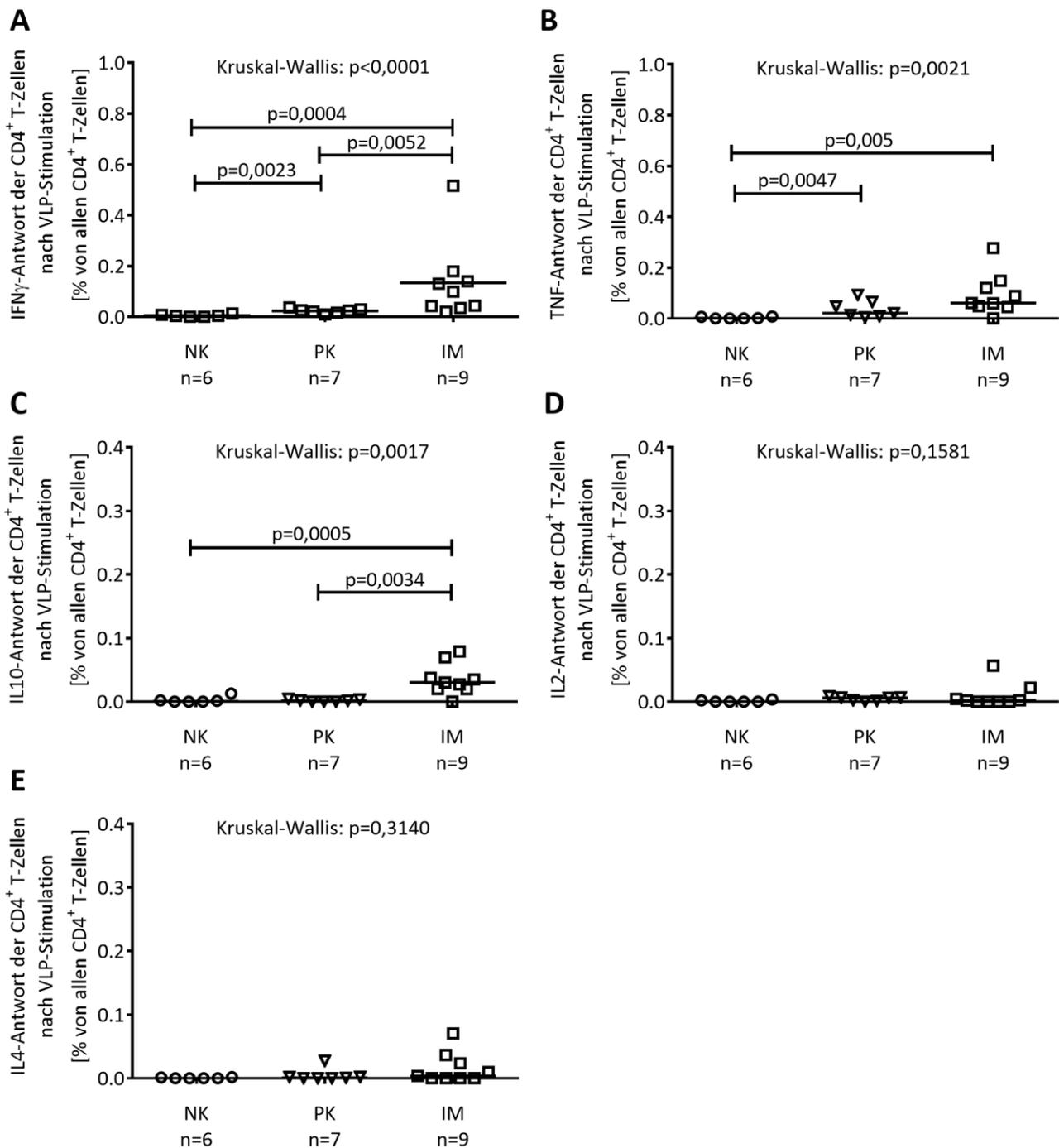


Abbildung 5.4-3 Zytokinantwort der CD4⁺ T-Zellen von drei verschiedenen Spendergruppen nach VLP-Stimulation: PBMC EBV-seronegativer (NK) und EBV-seropositiver Kontrollspender (PK) sowie von IM-Patienten (IM) wurden mit VLP inkubiert und die relative Häufigkeit Zytokin-positiver (A: IFN γ , B: TNF, C: IL10, D: IL2 und E: IL4) CD4⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Balken stellen den Median dar. Der statistische Gruppenvergleich erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test, der anschließende paarweise Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test.

Bei genauerer Betrachtung der Zusammensetzung der Zytokinantwort der einzelnen Proben (siehe **Abbildung 5.4-4**) wurde deutlich, dass die Ergebnisse von Spender zu Spender teils deutlich variierten. So unterschieden sich beispielsweise die IM-Patienten IM03 und IM05 bzw. IM01 und IM07 deutlich hinsichtlich ihrer einzelnen Zytokinmuster, während die Höhe der addierten Zytokine bei beiden fast identisch war. Gleiches war auch bei den EBV-seropositiven Kontrollspendern, beispielsweise bei PK01 und PK07, zu beobachten.

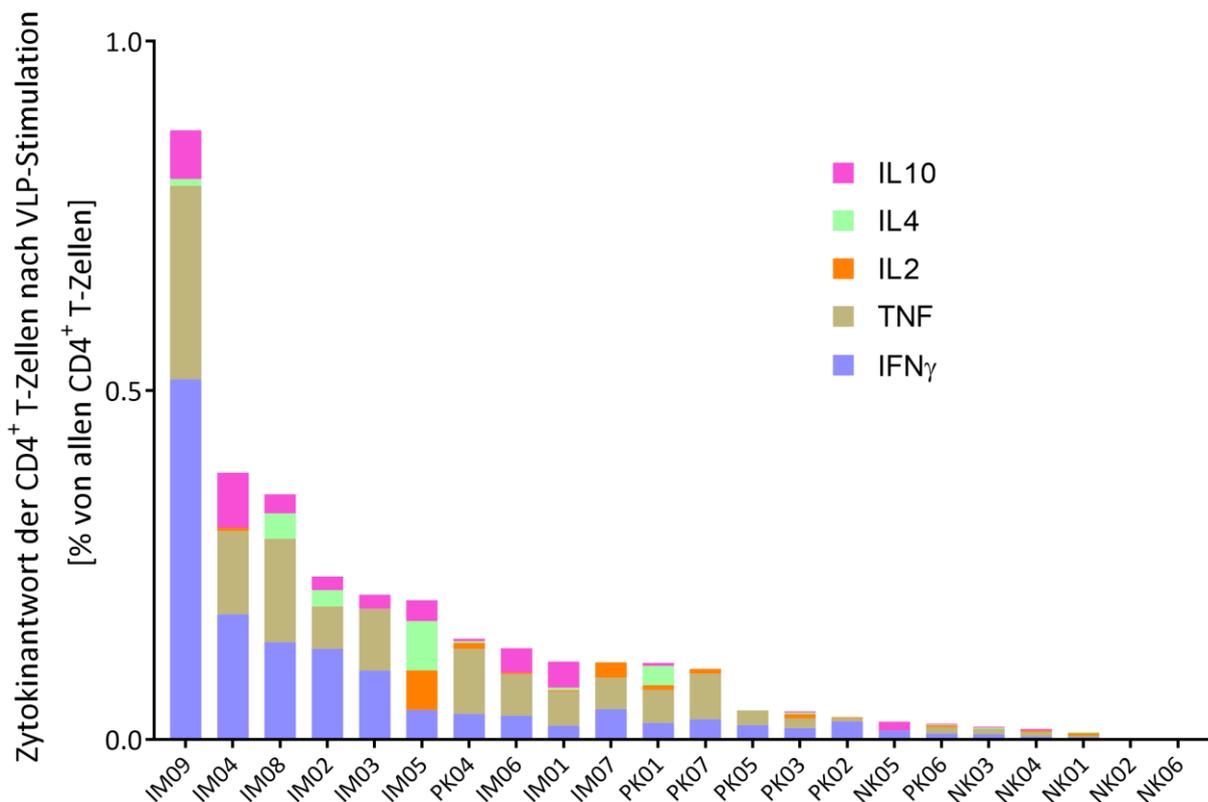


Abbildung 5.4-4 Individuelle Zusammensetzung der Gesamtzytokinantworten der CD4⁺ T-Zellen nach VLP-Stimulation: Dargestellt sind die verschiedenen Zytokine (IFN γ , TNF, IL2, IL4 und IL10) in unterschiedlichen Farben, sortiert nach der Höhe der addierten Zytokinantwort. Mehrfach positive Zellen wurden hierbei mehrfach erfasst. Zu sehen sind die unterschiedlichen Spender und deren Gruppenzugehörigkeit (IM = IM-Patienten; PK = EBV-seropositive Kontrollspender; NK = EBV-seronegative Kontrollspender).

Im Gegensatz zur Möglichkeit der Überprüfung EBV-spezifischer CD4⁺ T-Zell-Antworten mittels VLP als stimulierendes Antigen, zeigten sich diese nicht als effektives Mittel zur

Überprüfung EBV-spezifischer CD8⁺ T-Zell-Antworten. Die registrierten Zytokinantworten der CD8⁺ T-Zellen nach VLP-Stimulation waren von deutlich geringer Größenordnung als die der CD4⁺ T-Zellen. In der Gruppe der IM-Patienten wurden zwar bei sieben von neun Proben Zytokinantworten gemessen (Median: 0,0331%; range: 0-0,0963%) (siehe **Tabelle 5.4-1**), jedoch gab es keinen signifikanten Gruppenunterschied im Vergleich zu den EBV-seronegativen (Median: 0%; range: 0-0,0447%) oder EBV-seropositiven Kontrollspendern (Median: 0%, range: 0-0,0525%)

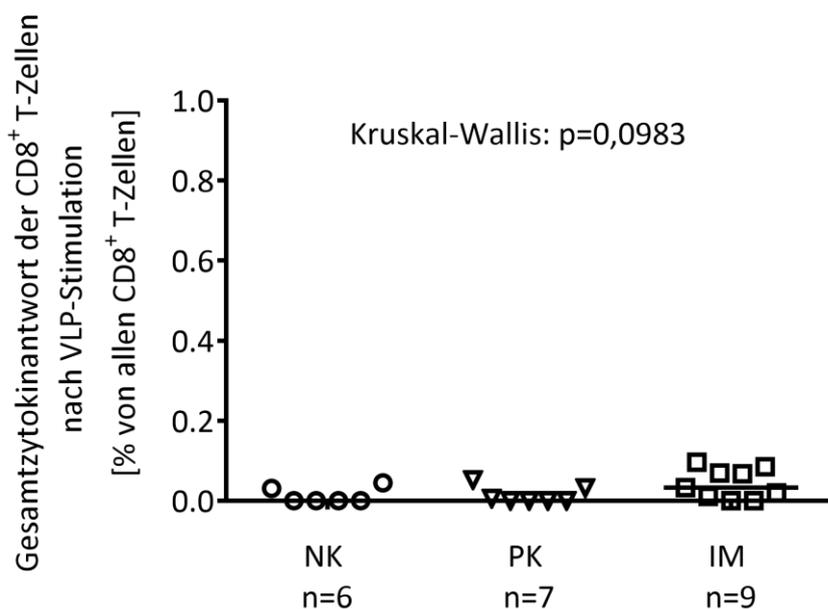


Abbildung 5.4-5 Gesamtzytokinantwort der CD8⁺ T-Zellen der unterschiedlichen Spendergruppen nach VLP-Stimulation: PBMC EBV-seronegativer (NK) und EBV-seropositiver Kontrollspender (PK) sowie von IM-Patienten (IM) wurden mit VLP inkubiert und die relative Häufigkeit Zytokin-positiver (IFN γ , TNF, IL2, IL4 und IL10) CD8⁺ T-Zellen Durchflusszytometrie-basiert bestimmt und addiert (Gesamtzytokinantwort). Mehrfach positive Zellen wurden dabei nicht mehrfach gewertet. Die Balken stellen den Median dar. Der statistische Gruppenvergleich erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test, der anschließende paarweise Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test.

5.4.2 T-Zell Antwort nach LCL(Z-)-Stimulation

Tabelle 5.4-2: T-Zell-Antwort nach LCL(Z-)-Stimulation (Gesamtzytokinantwort)

ID	Zytokin-positive T-Zellen nach LCL(Z-)-Stimulation					
	[% von allen CD4 ⁺ T-Zellen]			[% von allen CD8 ⁺ T-Zellen]		
n=22	NK n=6	PK n=7	IM n=7	NK n=6	PK n=7	IM n=7
IM01			0,3246			0,4722
IM02			0,5231			1,4655
IM03			0,4927			0,7890
IM04			0,9824			0,6366
IM05			0,5683			0,4600
IM06			0,2424			0,7258
IM07			0,2416			0,1469
NK01	0,0260			0,0000		
NK02	0,0493			0,2613		
NK03	0,0000			0,0000		
NK04	0,0231			0,0300		
NK05	0,0000			0,1432		
NK06	0,0259			0,0000		
PK01		0,0222			0,3575	
PK02		0,0363			0,0671	
PK03		0,0144			0,2686	
PK04		0,1093			0,9374	
PK05		0,0507			0,3605	
PK06		0,0000			0,1867	
PK07		0,0755			0,7056	
Median	0,0245	0,0363	0,4927	0,0150	0,3575	0,6366

Wie in **Tabelle 5.4-2** und **Abbildung 5.4-6** dargestellt, induzierte die Kokultur der Spender-PBMC mit autologen LCL(Z-) sowohl CD4⁺ (Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,0001$) als auch CD8⁺ T-Zell Antworten (Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,0013$) mit signifikanten Gruppenunterschieden.

In der Gruppe der IM-Patienten zeigten sich nach LCL(Z-)-Stimulation bei allen Spendern Zytokinantworten der CD4⁺ T-Zellen (Median: 0,04927%, *range*: 0,2416-0,9824%). Dagegen war die Frequenz Zytokin-positiver CD4⁺ T-Zellen in den Kontrollgruppen deutlich geringer (Median NK: 0,0245%, Median PK: 0,0363%). Somit kam es hinsichtlich der Gesamtzytokinantwort der CD4⁺ T-Zellen nach LCL(Z-)-Stimulation zu einem signifikanten Gruppenunterschied sowohl zwischen den IM-Patienten und den EBV-seronegativen

Kontrollspendern ($p=0,0012$) als auch zwischen den IM-Patienten und den EBV-seropositiven Kontrollspendern ($p=0,0006$).

Im Gegensatz dazu waren die Gesamtzytokinantworten der CD8⁺ T-Zellen sowohl in der Gruppe der IM-Patienten (Median: 0,6366%; *range*: 0,1469-1,4655%) als auch in der Gruppe der EBV-seropositiven Kontrollspender (Median: 0,3575%; *range*: 0,0671-0,9374%), nicht aber der EBV-seronegativen Kontrollspender (Median: 0,0150%, *range*: 0-0,2613%) deutlich erhöht. Somit unterschied sich die Gruppe der EBV-seronegativen Kontrollspender signifikant von den EBV-seropositiven Kontrollspendern ($p=0,0082$) und den IM Patienten ($p=0,00023$).

Die Gesamtzytokinantwort der CD4⁺ T-Zellen nach LCL(Z-)-Stimulation in der Gruppe der IM-Patienten setzte sich hauptsächlich aus IFN γ und TNF zusammen, zudem konnten IL10- und IL2-Antworten beobachtet werden (siehe **Abbildung 5.4-7**).

Die CD8⁺ T-Zell-Antwort nach LCL(Z-)-Stimulation war dominiert von IFN γ - und TNF-produzierenden Zellen in den Gruppen der EBV-seropositiven Kontrollspender und der IM-Patienten (siehe **Abbildung 5.4-8**). Zudem zeigte sich eine signifikant erhöhte IL2-Produktion in der Gruppe der EBV-seropositiven Kontrollspender im Vergleich zu den EBV-seronegativen Kontrollspendern ($p=0,0082$) und den IM-Patienten ($p=0,0157$). In der IM-Gruppe kam es zum Auftreten von IL10-Antworten bei zwei von sieben Spendern, zudem zeigte sich bei einem EBV-seropositiven Kontrollspender eine deutlich messbare IL4-Antwort.

Die Zytokinantworten der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation mit LCL(Z-) war insgesamt sehr heterogen. Es konnten interindividuellen Unterschiede der einzelnen Zytokinprofile der unterschiedlichen Spender beobachtet werden (siehe **Abbildung 5.4-9**).

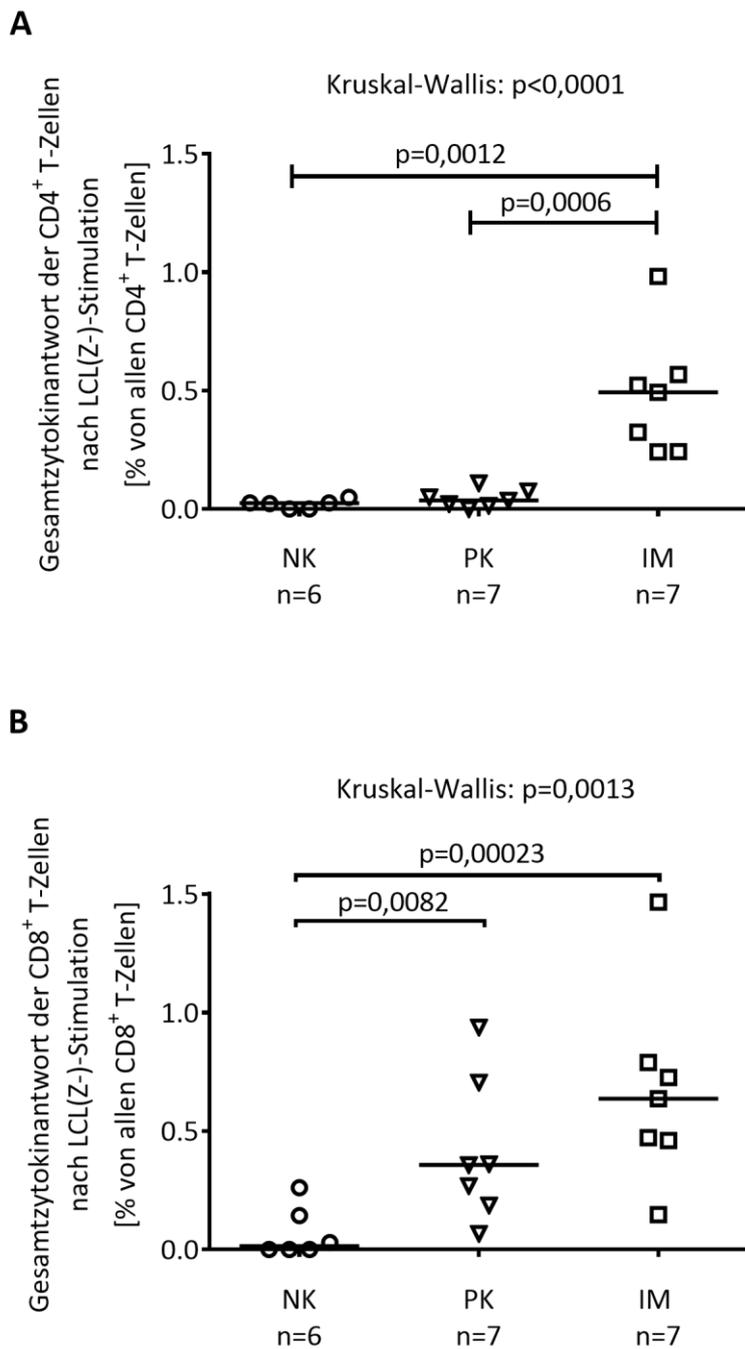


Abbildung 5.4-6 Gesamtzytokinantworten der CD4⁺ (A) und CD8⁺ (B) T-Zellen der unterschiedlichen Spendergruppen nach LCL(Z-)-Stimulation: PBMC EBV-seronegativer (NK) und EBV-seropositiver Kontrollspender (PK) sowie von IM-Patienten (IM) wurden mit autologen LCL(Z-) kokultiviert und die relative Häufigkeit Zytokin-positiver (IFN γ , TNF, IL2, IL4 und IL10) CD4⁺ (A) und CD8⁺ (B) T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (Gesamtzytokinantwort). Mehrfach positive Zellen wurden dabei nicht mehrfach gewertet. Die Balken stellen den Median dar. Der statistische Gruppenvergleich erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test, der anschließende paarweise Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test.

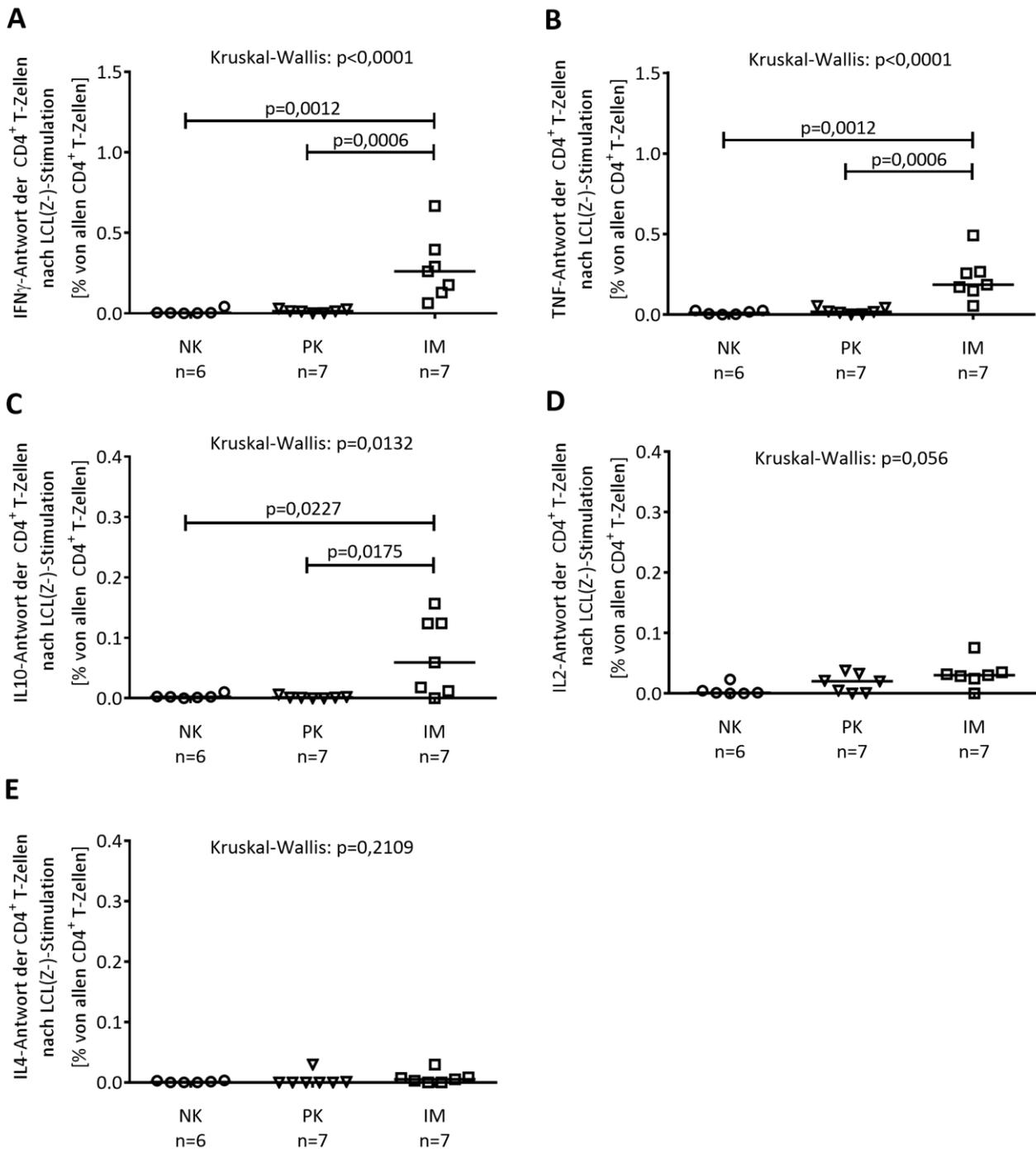


Abbildung 5.4-7 Zytokinantworten der CD4⁺ T-Zellen der unterschiedlichen Spendergruppen nach LCL(Z-)-Stimulation: PBMC EBV-seronegativer (NK) und EBV-seropositiver Kontrollspender (PK) sowie IM-Patienten (IM) wurden mit LCL(Z-) stimuliert und die relative Häufigkeit Zytokin-positiver (A: IFN γ , B: TNF, C: IL10, D: IL2 und E: IL4) CD4⁺ T-Zellen Durchflusszytometrie-basiert bestimmt. Die Balken stellen den Median dar. Der statistische Gruppenvergleich erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test, der anschließende paarweise Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test.

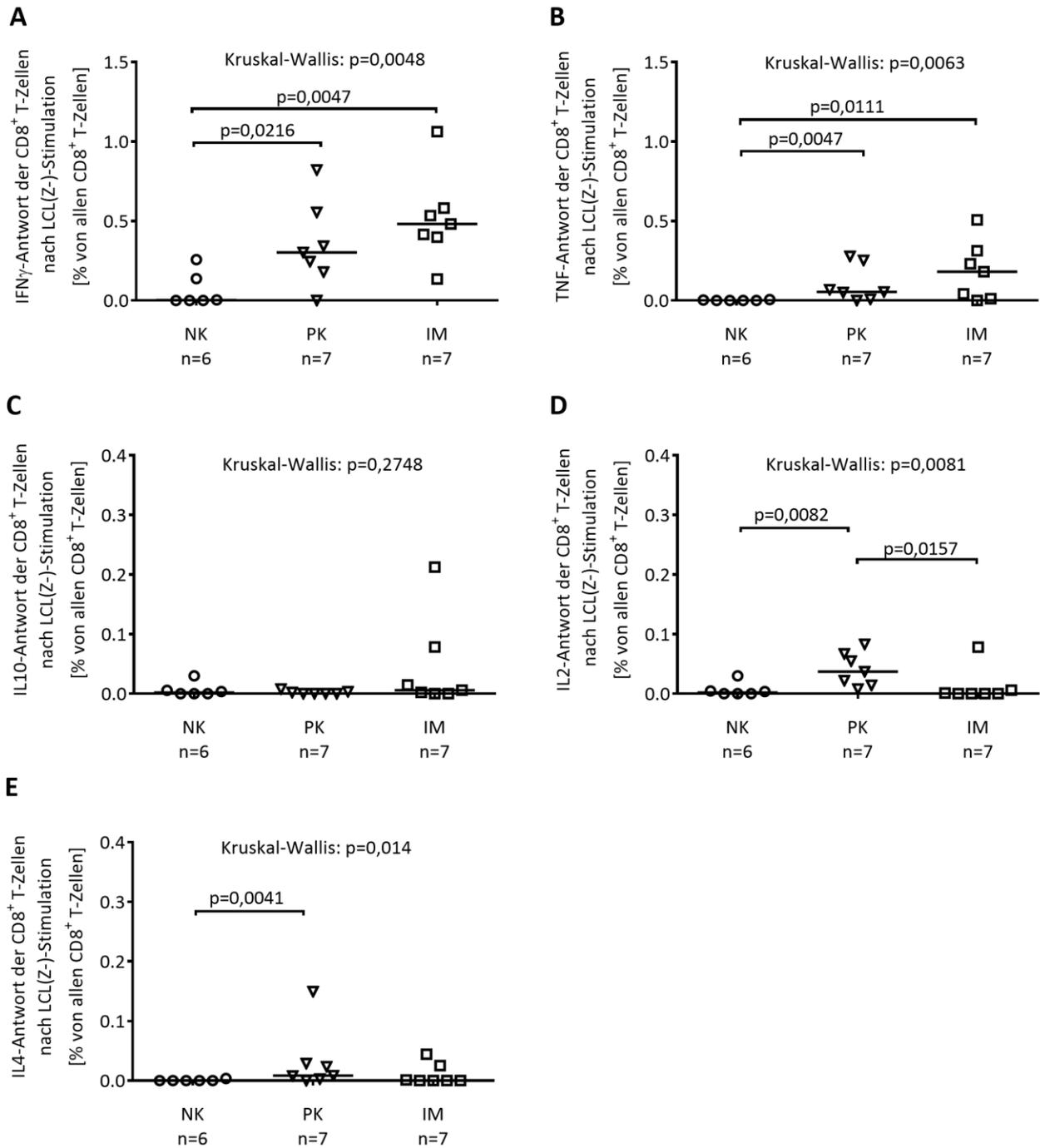


Abbildung 5.4-8 Zytokinantworten der CD8⁺ T-Zellen der unterschiedlichen Spendergruppen nach LCL(Z-)-Stimulation: PBMC von EBV-seronegativen (NK) und EBV-seropositiven Kontrollspender (PK) sowie IM-Patienten (IM) wurden mit LCL(Z-) kokultiviert und die relative Häufigkeit Zytokin-positiver (A: IFN γ , B: TNF, C: IL10, D: IL2 und E: IL4) CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Balken stellen den Median dar. Der statistische Gruppenvergleich erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test, der anschließende paarweise Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test.

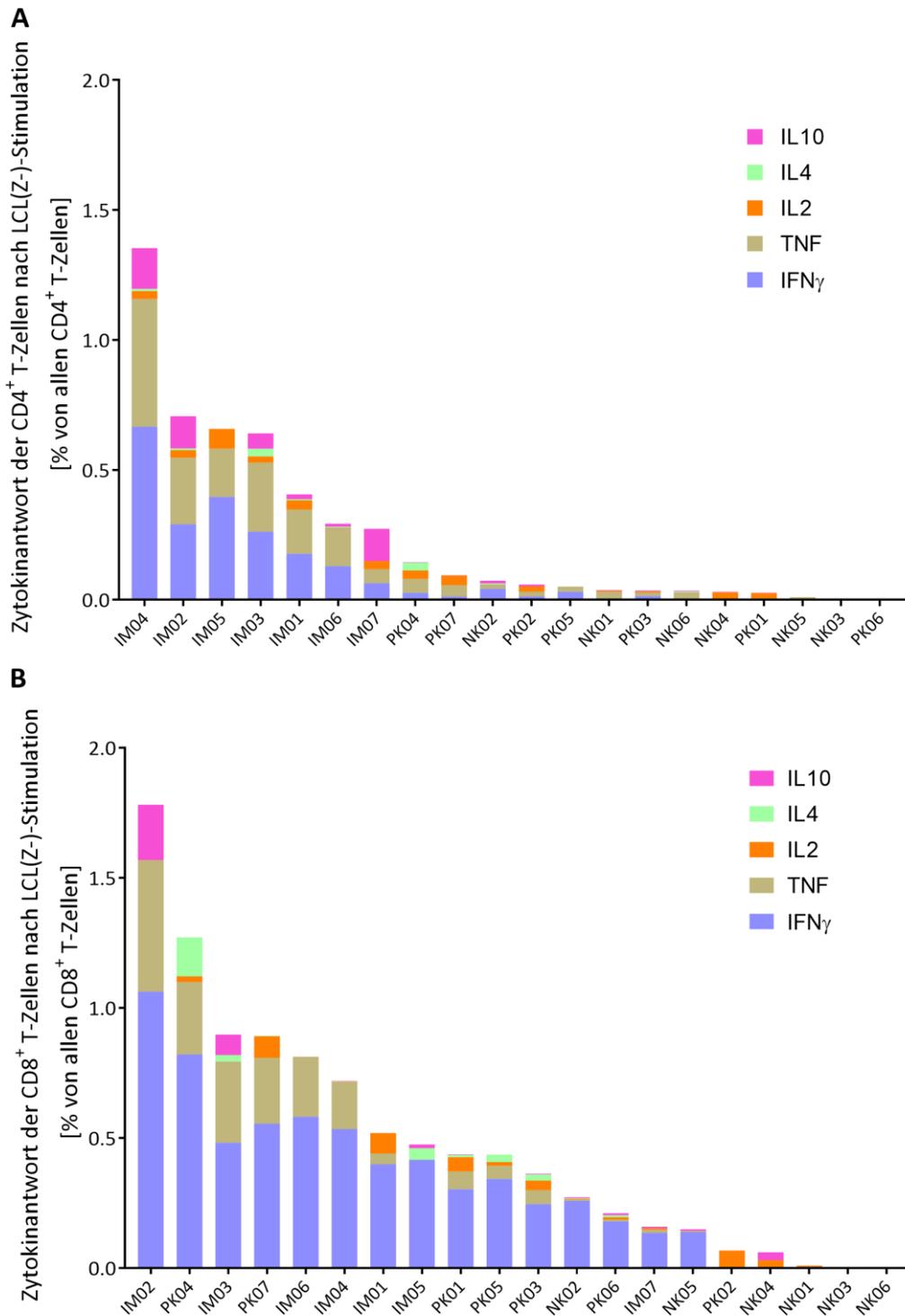


Abbildung 5.4-9 Individuelle Zusammensetzung der Gesamtzytokinantworten der CD4⁺ (A) und CD8⁺ (B) T-Zellen nach LCL(Z-)-Stimulation: Dargestellt sind die unterschiedlichen Zytokine (IFN γ , TNF, IL2, IL4 und IL10) in unterschiedlichen Farben, sortiert nach Höhe der addierten Zytokinantwort. Mehrfach positive Zellen wurden hierbei mehrfach erfasst. Zu sehen sind die unterschiedlichen Spender und deren Gruppenzugehörigkeit (IM = IM-Patienten; PK = EBV-seropositive Kontrollspender; NK = EBV-seronegative Kontrollspender).

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung und Evaluierung neuer Nachweismethoden für die Charakterisierung des zellulären Immunstatus von IM-Patienten. Hierbei sollte mit Hilfe neuer Antigengemische und Stimulatorzellen die EBV-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantwort ohne Vorkenntnis des HLA-Genotyps analysiert und verglichen werden. Als Antigengemische wurde rekombinant exprimierte Proteine des latenten und des lytischen Zyklus von EBV sowie VLP eingesetzt, als Stimulatorzelllinie die autologen LCL(Z-) des jeweiligen Spenders.

Zur Herstellung der EBV-Proteine wurde eine bereits in Vorarbeiten an das Wachstum in Suspension adaptierte HEK293T-Zelllinie verwendet. Wie auch die Vorgängerzelllinie HEK293 weist die adhärent wachsende Zelllinie HEK293T eine hohe Transfektionseffizienz auf. Bedingt durch das stabil in den Zellen exprimierte *SV40 large T*-Antigen in HEK293T-Zellen replizieren Plasmide, die den *SV40 origin of replication* tragen, in diesen Zellen sehr effizient, was zu einer hohen Kopienzahl und einer gesteigerten Proteinexpression führt (Pear et al., 1993). Jedoch ist die Handhabung großer Mengen dieser Zellen aufgrund des adhärenen Wachstums äußerst aufwändig. Deswegen wurden in dieser Arbeit zunächst die Wachstums- und Transfektionsbedingungen für die in Suspension wachsenden HEK293T-Zellen optimiert. Anschließend wurden einige der immundominanten Proteine des latenten (EBNA1, EBNA3A, EBNA3C) und des lytischen Zyklus (BZLF1, BRLF1, BMLF1) in den Zellen exprimiert (G. S. Taylor et al., 2015). Alle Proteine waren dabei mit einem carboxyterminalen Polyhistidin-Etikett versehen, was deren Aufreinigung aus den Zelllysaten mittels spezifischer Bindung an Ni²⁺-NTA-Agarose ermöglichte.

Als weiteres neuartiges Antigengemisch wurden *virus-like particles* (VLP) eingesetzt. Im Gegensatz zu Wildtyp EBV enthalten VLP keine virale DNA und sind somit auch nicht infektiös, was ihren diagnostischen Einsatz ohne spezielle Sicherheitsvorkehrungen ermöglicht. VLP enthalten alle viralen Strukturantigene, die als immundominante Zielstrukturen der virusspezifischen CD4⁺ T-Zellantwort gelten (Adhikary et al., 2007; Crisci, Barcena, & Montoya, 2012). In dieser Arbeit wurde die standardisierte Herstellung und Nachweis der VLP etabliert, wodurch zukünftig VLP mit vergleichbarer Konzentration und immunogener Wirkung bereitgestellt werden können.

Schließlich wurde der Einsatz von autologen LCL(Z-) als Stimulatorzelllinien für das EBV-spezifische Immunmonitoring getestet. Hierbei handelt es sich um B-Zellen, die durch Infektion mit einer BZLF1-Gen-defizienten EBV-Mutante generiert wurden. Da BZLF1 für die Aktivierung des lytischen Zyklus von EBV notwendig ist, werden in diesen Zellen nur Latenzantigene exprimiert (Feederle et al., 2000). So wie LCL gelten auch LCL(Z-) als ausgezeichnete antigenpräsentierende Zellen, die neben MHC auch diverse kostimulatorische Moleküle hoch exprimieren und somit von EBV-Latenzantigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen effizient erkannt werden (Kilger, Pecher, Schwenk, & Hammerschmidt, 1999; Moosmann et al., 2002). Damit erfüllen sie die Voraussetzungen für die Analyse der CD8⁺ T-Zellantwort gegen die EBV-Latenzantigene.

6.1 Analyse der rekombinant exprimierten und aufgereinigten EBV-Proteine

Nach Aufreinigung und Konzentrierung der EBV-Proteine erfolgte zunächst deren standardisierter Nachweis im Western-Blot. Zur Konzentrationsbestimmung der Proteine kamen verschiedene Methoden zum Einsatz (Bradford-Assay, Fluorometer). Die meisten Nachweismethoden wurden jedoch durch die hohe Konzentration an Harnstoff im Puffer gestört, der ein Verklumpen der Proteine verhinderte. Am geeignetsten für die Konzentrationsbestimmung erwies sich der Vergleich mit einem BSA-Standard nach Größenseparation mittels SDS-Page und anschließender Coomassie-Färbung.

Anschließend wurde die Immunogenität der rekombinanten EBV-Proteine überprüft. Wurden Zielzellen mit steigenden Mengen an EBV-Proteinen beladen und anschließend mit spezifischen CD4⁺ T-Zellklonen kokultiviert, so kam es zu einer dosisabhängigen Ausschüttung an IFN γ . Diese Versuche wurden zunächst mit LCL durchgeführt und später mit kryokonservierten PBMC verifiziert. Gemische aller sechs untersuchten EBV-Proteine wiesen eine ähnlich T-Zell-stimulierende Wirkung auf wie die Einzelproteine, was deren zukünftigen diagnostischen Einsatz vereinfachen sollte.

Zur Untersuchung der CD8⁺ T-Zell-stimulierenden Wirkung wurden die Proteine mit Harnstoff behandelt, was die Kreuzpräsentation der exogen zugesetzten Antigene auf MHC-

I ermöglichen sollte (Barabas et al., 2008). Normalerweise werden exogen zugeführte Antigene über MHC-II den CD4⁺ T-Zellen präsentiert und gelangen nur spärlich oder gar nicht in den MHC-I Präsentationsweg. Trotz Harnstoffbehandlung konnte in dieser Arbeit keine CD8⁺ T-Zell-stimulierende Wirkung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise ist die bislang wenig verstandene chemische Modifikation der Proteine in Harnstoffpuffer, die eine Kreuzpräsentation der Antigene auf MHC-I ermöglicht, abhängig von der Aminosäuresequenz und erfolgt nicht für alle Antigene gleich effizient. Ein Vergleich der hier hergestellten Proteine mit kommerziell vertriebenen Aufarbeitungen idealerweise der gleichen Proteine, für die CD8⁺ T-Zell-stimulierende Eigenschaften beschrieben wurden, sollte hierüber Aufschluss geben.

6.2 VLP für das EBV-spezifische Immunmonitoring

Da VLP das ganze Spektrum der EBV-Strukturantigene abdecken, welche als wichtigste Zielstrukturen der antiviralen CD4⁺ T-Zellantwort gelten (Adhikary et al., 2007; Mautner & Bornkamm, 2012), sollten sie als innovatives Werkzeug zur Messung EBV-spezifischer T-Zellantworten erprobt werden. Dazu wurde die T-Zell-stimulierende Kapazität von VLP an PBMC von IM-Patienten sowie EBV-positiven und EBV-negativen Kontrollspendern untersucht. Die untersuchten Gruppen wiesen statistisch signifikante Unterschiede in den gemessenen CD4⁺ T-Zellantworten auf. In allen gesunden, EBV-positiven Kontrollspendern wurden CD4⁺ T-Zellantworten gegen VLP detektiert. Dabei lag die Frequenz der reaktiven CD4⁺ T-Zellen zwischen 0,009 und 0,0943 % (Median 0,04 %). Die Häufigkeit der CD4⁺ T-Zellantworten in der Gruppe der IM-Patienten lag zwischen 0,0776 und 0,6146 % (Median 0,19 %) und damit deutlich höher. Da bislang keine weiteren Untersuchungen zur Frequenz Strukturantigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellantworten vorliegen, kann nicht abschließend beurteilt werden, ob durch VLP eine effiziente Aktivierung dieser T-Zellen im hier durchgeführten Stimulationsansatz erfolgte. Die gemessenen Frequenzen liegen aber in ähnlichen Größenbereichen, wie für andere Stimulationsansätze beschrieben. Amyes et al. (2003) verwendeten ein Lysat EBV-infizierter B-Zellen zur Stimulation peripherer CD4⁺ T-Zellen *ex vivo* und berichteten eine Häufigkeit von 0,04 bis 5,2 % EBV-spezifischer CD4⁺ T-Zellen nach symptomatischer EBV-Primärinfektion. Während der Konvaleszenz fiel die

Frequenz dieser T-Zellen deutlich ab und lag bei gesunden, EBV-seropositiven Spendern bei 0,05 bis 1,26 %. Die verwendeten Lysate enthielten neben den späten auch frühe und sehr frühe lytische Antigene sowie Latenz- und Autoantigene, was die vergleichsweise höheren T-Zellfrequenzen erklären könnte. Long et al. (2013) dagegen nutzten Peptid-MHC-II-Tetramere zur Analyse der EBV-spezifischen CD4⁺ T-Zellantwort gegen vier Epitope von Proteinen des lytischen und fünf des latenten Zyklus. Mit einer Frequenz von 0 % bis 0,55 % lagen die CD4⁺ T-Zellantworten gegen alle lytischen Epitope etwa in derselben Größenordnung wie in der vorliegenden Arbeit. Jedoch wurden bei Long et al. nur vier Epitope von Proteinen des frühen lytischen Zyklus und keine Strukturantigene untersucht. Letztere stellen jedoch gemäß Vorarbeiten der eigenen Gruppe (Adhikary et al. (2007) die Hauptzielstrukturen der LCL-stimulierten CD4⁺ T-Zellantwort dar. Somit erscheinen die nach VLP-Stimulation gemessenen Antworten vergleichsweise niedrig. Dies könnte darauf hindeuten, dass die T-Zellantwort gegen Strukturantigene auf wenige Epitope fokussiert ist, oder dass mit dem verwendeten VLP-Stimulationsprotokoll nicht alle Strukturantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen effizient aktiviert werden. Sobald immundominante Epitope in Strukturantigenen und damit MHC-II-Tetramere zur Verfügung stehen, sollte letztere Möglichkeit über eine vergleichende Analyse der beiden Stimulationsansätze geklärt werden. Weder in der vorliegenden Arbeit noch in den erwähnten Publikationen wurden in der Gruppe der EBV-negativen Kontrollspender über der Detektionsgrenze liegende Antworten gemessen (Amyes et al., 2003; Long et al., 2013).

Da der Großteil der EBV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation IFN γ und TNF sezernierten, gehören sie wahrscheinlich dem T-Helferzell-Typ 1 (Th1) an. In der Gruppe der IM-Patienten konnten darüber hinaus auch IL10-Antworten detektiert werden, was in der Kontrollgruppe der gesunden Virusträger nicht der Fall war. IL10 scheint eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie EBV-assoziiierter Erkrankungen, vor allem der PTLD, zu spielen (Muti, Mancini, Ravelli, & Morra, 2005). IL10 gilt als immunsupprimierendes Zytokin, das beispielsweise die Produktion von IFN γ und IL2 in Th-1-Zellen unterdrückt (Fiorentino, Bond, & Mosmann, 1989; Moore, O'Garra, de Waal Malefyt, Vieira, & Mosmann, 1993). Gerade die Th1-Antwort ist aber zur Viruskontrolle wichtig, da sie die Entstehung Virus-spezifischer zytotoxischer T-Zellen fördert. So konnte beispielsweise eine erhöhte IL10-Expression in T-Zellen von Patienten mit CAEBV nachgewiesen werden (Ohga et al., 2004).

Dies könnte einen möglichen Grund für den langen Krankheitsverlauf bei der CAEBV darstellen. Die im Vergleich zu EBV-positiven gesunden Kontrollspendern erhöhte IL10-Produktion in CD4⁺ T-Zellen der IM-Patienten lässt auch eine Rolle von IL10 in der Pathogenese der IM vermuten. Dazu soll zukünftig untersucht werden, ob die IL10-Expression in Virus-spezifischen T-Zellen mit klinischen Parametern wie Symptomlast oder Krankheitsdauer korreliert. In der IM-Gruppe wurden darüber hinaus vereinzelt IL2- und IL4-Antworten detektiert. Auch hier ist momentan noch unklar, ob es sich um ein immunologisches Epiphänomen handelt, oder ein Korrelat des klinischen Verlaufs darstellt. Insgesamt betrachtet, variierten die Zytokinmuster von Spender zu Spender teilweise sehr stark. Auch Lam et al. (2018) beobachteten nach EBV-Primärinfektion individuell variierende Zytokinmuster sowie diverse Subgruppen an polyfunktionalen T-Zellen. Die Polyfunktionalität der Virus-spezifischen T-Zellen nahm dabei mit der Zeit nach Primärinfektion stetig zu. Auch Meckiff et al. (2019) kamen bei der Untersuchung der EBV-spezifischen CD4⁺ T-Zellantwort zu einem ähnlichen Ergebnis. Ähnlich wie in der hier vorliegenden Arbeit, produzierten die virusspezifischen CD4⁺ T-Zellen in IM-Patienten mehrheitlich IFN γ , während in gesunden Virusträgern TNF als Zytokin dominierte. Dabei verwendeten Meckiff et al. (2019) autologe LCL als stimulierendes Agens, während in der vorliegenden Arbeit LCL(Z-) sowie VLP-beladene PBMC als Stimulatoren verwendet wurden. Ein verändertes Zytokinprofil bei IM-Patienten und gesunden Spendern scheint somit ein generelles Phänomen und nicht von den verwendeten APC oder Antigenen abhängig zu sein. Diese dynamischen Veränderungen im sezernierten Zytokinmuster und in der Funktionalität der T-Zellen sollten bei der Suche nach prädiktiven, immunologischen Markern für den Krankheitsverlauf mit in Betracht gezogen werden. Dazu sollten diese Untersuchungen entweder zu einem ähnlichen Zeitpunkt nach Symptombeginn vorgenommen werden, oder durch eine detaillierte Charakterisierung des zeitlichen Verlaufs der T-Zellantworten nach Krankheitsbeginn ergänzt werden.

Die VLP erwiesen sich als ungeeignet für die Messung der EBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellantworten. Lediglich vereinzelte, niedrige CD8⁺ T-Zellantworten wurden in der IM-Gruppe detektiert. Sie entsprachen jedoch nicht der erwarteten, ausgeprägten CD8⁺ T-Zellantwort während der IM (G. S. Taylor et al., 2015). So wurden in einigen IM-Patienten CD8⁺ T-Zellantworten gegen einzelne Epitope meist in sehr frühen oder frühen lytischen

Antigenen detektiert, die bis zu 50% der CD8⁺ Population im peripheren Blut ausmachen können (G. S. Taylor et al., 2015). Die in den VLP enthaltenen späten lytischen Genprodukte zählen zwar nicht zu den immundominanten Zielstrukturen der CD8⁺ T-Zellantwort, dennoch konnten Abbott et al. (2013) sowohl in EBV-seropositiven, gesunden Spendern als auch in IM-Patienten CD8⁺ T-Zellantworten gegen Strukturantigene nachweisen. Allerdings scheint die Immunogenität der einzelnen Strukturantigene zu variieren. Gegen einige Antigene, wie etwa gp350, wurde bei keinem der 13 getesteten gesunden Spender eine CD8⁺ T-Zellantwort gemessen, während CD8⁺ T-Zellantworten gegen BRF1 bei 9/13 Spendern detektiert wurden. Die durchflusszytometrisch gemessenen, individuellen IFN γ -Antworten lagen dabei im Bereich von 0,1 bis 0,2 % der peripheren CD8⁺ T-Zellen. Nach Stimulation mit VLP wurden in dieser Arbeit keine Antworten in dieser Größenordnung detektiert, was vermutlich an der fehlenden Prozessierung und Präsentation der EBV-Strukturantigene der VLP auf MHC-I lag. Exogen zugesetzt gelangten die Strukturantigene vermutlich nicht, oder nur ineffizient, in den MHC Klasse-I-Präsentationsweg. Hierfür sprachen auch Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe, in denen VLP-beladene PBMC nicht von Strukturantigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen erkannt wurden (Daten nicht gezeigt). Somit stellen VLP ein neues Reagenz zur Messung der EBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort dar. Sie bieten ein breites Spektrum an Strukturantigenen und könnten so zu einem verbesserten Monitoring der EBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort beitragen. Eine gleichbleibende Qualität der VLP auch für zukünftige Untersuchungen konnte durch die Etablierung standardisierter Herstellungsprotokolle gewährleistet werden.

6.3 LCL(Z-) zum EBV-spezifischen Immunmonitoring

Im Gegensatz zu VLP ermöglichten autologe LCL(Z-) die Detektion Latenzantigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellantworten. In der Gruppe der IM-Patienten und in der Gruppe der gesunden Virusträger zeigten sich gegenüber den EBV-negativen Kontroll Spendern signifikant erhöhte CD8⁺ T-Zellantworten. Die hier gemessenen Antworten lagen innerhalb des in der Literatur beschriebenen Bereichs von 0,1% bis 5% (Hislop et al., 2007). Sowohl in gesunden Virusträgern als auch in Patienten mit IM wurden die CD8⁺ T-Zellantworten in dieser Arbeit dominiert von mono- oder bifunktionalen, IFN γ - und/oder TNF-

produzierenden Zellen. Dabei war der Anteil an bifunktionalen CD8⁺-T-Zellen in der Gruppe der gesunden Kontrollspender am höchsten (Mittelwert 10% in der IM-Gruppe vs. 27% in der EBV positiven Kontrollspendergruppe, Daten nicht gezeigt). Zudem zeigte sich eine signifikant erhöhte IL2-Produktion in der Gruppe der EBV-seropositiven Kontrollspender im Vergleich zu den IM-Patienten. Auch in einer früheren Untersuchung an IM-Patienten wurde ein Anstieg der IL2-produzierenden, EBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach Rekonvaleszenz beobachtet (Attarbaschi et al., 2003). In der IM-Gruppe wurden zudem IL10-Antworten in zwei von sieben Spendern beobachtet. Bei einem EBV-seropositiven Spender wurde darüber hinaus eine signifikante IL4-Antwort detektiert. Ob es sich hierbei um interindividuell unterschiedliche Antworten handelt und inwiefern diese mit dem klinischen Krankheitsbild korrelieren, müssen weitere Untersuchungen an einer größeren Patientenzahl zeigen. Überraschenderweise wurden auch in der Gruppe der EBV-seronegativen Kontrollspender vereinzelt CD8⁺ T-Zell Antworten gemessen. Da diese Antworten ausschließlich nach Stimulation mit LCL(Z-) gemessen wurden, handelte es sich vermutlich um Immunantworten gegen zelluläre Autoantigene, die von LCL(Z-) ebenfalls präsentiert werden. Dies wurde bereits für CD4⁺ T-Zellantworten nach Stimulation mit LCL(Z-) gezeigt (Linnerbauer et al., 2014). Zudem wurde kürzlich beschrieben, dass länger kultivierte LCL unspezifische T-Zell-Antworten induzieren können, vermutlich über die Akkumulation genetischer Mutationen (Tan et al., 2018). Alternativ könnten die gemessenen CD8⁺ T-Zellantworten auch auf einer Kreuzreaktivität von T-Zellen beruhen, die für homologe Antigene anderer Herpesviren spezifisch sind. Eine ausgeprägte Kreuzreaktivität von Virus-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen konnte beispielsweise zwischen den alpha-Herpesviren Varizella Zoster und Herpes Simplex gezeigt werden (Jing et al., 2016). Aslan et al. (2017) beobachteten auch eine Korrelation zwischen der Frequenz kreuzreaktiver Influenza-spezifischer CD8⁺ T-Zellen und der Schwere der IM. All diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass heterologe Immunität an der EBV-Immunantwort beteiligt sein kann. Alternativ wäre auch vorstellbar, dass ein Erstkontakt mit EBV nicht in allen Fällen zu einer persistierenden Infektion einschließlich Serokonversion führt. So könnte eine Infektion des Rachenepithels zu einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems und zu einer Eliminierung des Virus führen, bevor Latenz im B-Zellkompartiment etabliert werden kann. Bei den gemessenen T-Zellantworten in den EBV-

seronegativen Spendern würde es sich demnach um das immunologische Gedächtnis einer kurzzeitigen Begegnung handeln. Da momentan unklar ist, ob die gemessene CD8⁺ T-Zellantwort primär gegen EBV, gegen andere Viren, oder gegen Autoantigene gerichtet ist, müssen die Messergebnisse nach LCL(Z-) Stimulation mit Vorsicht interpretiert werden.

Nach Kokultur mit LCL(Z-) konnten CD4⁺ T-Zellantworten in der Gruppe der IM-Patienten, nicht aber in den beiden Kontrollgruppen, detektiert werden. Die Zytokinantworten wurden dominiert von IFN γ und TNF, vereinzelt wurde auch IL2, IL4 und IL10 gemessen. Somit scheinen LCL(Z-) zur Untersuchung der EBV-spezifischen CD4⁺ T-Zellimmunität gegen EBV-Latenzantigene zum Zeitpunkt der IM geeignet zu sein. Auch in einer kürzlich veröffentlichten Studie wurden nach LCL-Stimulation EBV-spezifische CD4⁺ T-Zellantworten in IM-Patienten detektiert und auch hier wurde die Zytokinantwort von IFN γ und TNF dominiert (Meckiff et al., 2019). Allerdings wurden von Meckiff et al. (2019) deutlich höhere CD4⁺ T-Zellantworten bei IM-Patienten gemessen als in den eigenen Untersuchungen. So konnten die Autoren Frequenzen von circa 1,3 % IFN γ -positiven und 1,0 % TNF-positiven CD4⁺ T-Zellen in der CD4⁺ T-Zellpopulation messen, während in dieser Arbeit die Frequenzen nur bei circa 0,3 % respektive 0,2 % lagen. Zudem konnten Meckiff et al. (2019) auch in der Gruppe der EBV-seropositiven Kontrollspender Antworten detektieren, was in der vorliegenden Arbeit nicht möglich war. Diese Unterschiede beruhen vermutlich auf der zusätzlichen Expression von lytischen Antigenen in LCL. Demnach ermöglichen LCL eine umfassendere Analyse der EBV-spezifischen CD4⁺ T-Zellantworten als LCL(Z-). Die erwähnte Freisetzung infektiöser Viruspartikel und die damit notwendigen Sicherheitsvorkehrungen sowie die zwischen verschiedenen LCL oftmals stark schwankende Expression von lytischen Antigenen verbieten jedoch den routinemäßigen Einsatz in der Diagnostik.

Insgesamt wurden in der interindividuellen Zusammensetzung der Zytokinantwort nach Stimulation mit LCL(Z-) sowohl bei den CD4⁺ als auch bei den CD8⁺ T-Zellen heterogene Zytokinprofile beobachtet, welche wahrscheinlich die Heterogenität der zellulären Immunantwort gegen EBV widerspiegeln.

Zusammenfassend stellen LCL(Z-) also ein interessantes Werkzeug zur Überprüfung des EBV-spezifischen Immunstatus dar. Jedoch ist noch ungeklärt, wie effizient Latenzantigene, insbesondere EBNA1, von LCL in vitro auf MHC-II präsentiert werden und somit zur Messung

der virusspezifischen CD4⁺ T-Zellantwort eingesetzt werden können. EBNA1 ruft für gewöhnlich starke CD4⁺ T-Zellantworten hervor, mit mehreren bekannten CD4-Epitopen (Leen et al., 2001). Diese EBNA1-spezifischen CD4⁺ T-Zellklone spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der EBV-Infektion *in vivo*, indem sie die Proliferation EBV-infizierter B-Zellen hemmen (Nikiforow et al., 2003). Trotzdem werden LCL *in vitro* nur in geringem Maße oder gar nicht von EBNA1-spezifischen CD4⁺ T-Zellklonen erkannt (Mautner et al., 2004). Während die anderen nukleären Latenzantigene EBNA2, EBNA3A und EBNA3C bei der Kultur von LCL in den Kulturüberstand abgegeben und dann von den Zellen als exogene Antigene aufgenommen, prozessiert und auf MHC-II präsentiert werden und somit zugänglich für CD4⁺ T-Zellen sind (G. S. Taylor et al., 2006), trifft dies für EBNA1 anscheinend nicht zu. Somit muss EBNA1 über endogene Prozessierung auf MHC-II präsentiert werden, wie beispielsweise durch Autophagie. Durch die Lokalisation im Nukleus scheint dieser Weg der Präsentation auf MHC-II jedoch limitiert zu sein (Leung et al., 2010). Aufgrund der zuvor beschriebenen Limitationen sowie aufgrund der zeitaufwendigen Handhabung bei der Herstellung und in der Zellkultur sind LCL(Z-) eher zur detaillierten Analyse spezieller Patientenfälle mit bestimmten Fragestellungen geeignet als für den diagnostischen Einsatz. Darüber hinaus präsentieren LCL(Z-) keine immundominanten *immediate early* und *early lytic* Antigene, so dass nur Latenzantigen-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantworten gemessen werden können.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit verschiedene neue Stimulanzen zur Durchflusszytometrie-basierten Messung der EBV-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantwort evaluiert und etabliert. Sie sollen zukünftig eine genauere Charakterisierung des zellulären Immunstatus von IM-Patienten ermöglichen. Die bislang zur Verfügung stehenden Nachweismethoden setzten entweder die Kenntnis des HLA-Genotyps voraus, wie etwa Peptid-MHC-Multimere, beschränkten sich auf einzelne/wenige Antigene, etwa in Form von überlappenden Peptid-Bibliotheken, oder sind für den routinemäßigen diagnostischen Einsatz ungeeignet, wie z.B. LCL, die wegen der Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln spezielle Sicherheitsvorkehrungen erfordern.

Für die Untersuchung der EBV-spezifischen CD4⁺ T-Zellantwort erwiesen sich VLP als bestens geeignet. Obwohl die Bedeutung dieser Zellpopulation für die Kontrolle der EBV-Infektion in klinischen Studien offensichtlich wurde (Haque et al., 2007), ist die Virus-

spezifische CD4⁺ T-Zellantwort bislang kaum untersucht. Die große Anzahl der enthaltenen viralen Proteine, die einfache, standardisierte Herstellung sowie die effiziente Rezeptorvermittelte Aufnahme durch PBMC und anschließende Präsentation von Spaltprodukten auf MHC-II machen VLP zu einem vielversprechenden und versatilen Reagenz für das Virus-spezifische Immunmonitoring.

Dagegen erscheinen LCL(Z-) aufgrund des langwierigen Herstellungsprozesses, der Beschränkung auf Latenzantigene und die zusätzliche Expression von Autoantigenen weniger für den diagnostischen Einsatz insbesondere großer Kohorten geeignet. Aufgrund ihrer effizienten Präsentation von Antigenen auf MHC-I und -II-Molekülen ermöglichen sie jedoch die gleichzeitige Analyse von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantworten und stellen für spezifische Fragestellungen eine interessante Ergänzung zu den bislang zur Verfügung stehenden Stimulanzen dar.

Rekombinante EBV-Proteine können CD4⁺ T-Zellantworten spezifisch und effizient reaktivieren und dadurch das virusspezifische Antigenespektrum der VLP komplettieren. Wenn in Gemischen verwendet, ermöglichen sie, ähnlich wie VLP, den ressourcenschonenden Nachweis von oftmals niedrigen und gegen unterschiedliche virale Antigene gerichteten CD4⁺ T-Zellantworten. Sollte durch chemische Modifizierung in Zukunft auch eine effiziente Stimulation von CD8⁺ T-Zellen gelingen, könnten sie ein bedeutendes Agens für die Analyse der EBV-spezifischen T-Zellantwort darstellen.

6.4 Ausblick

Die gewonnenen Daten ermöglichen weitergehende Analysen beispielsweise hinsichtlich der Funktionalität (mono-, bi- oder polyfunktional) von verschiedenen T-Zellsubpopulationen (Kutscher et al., 2013; Sprinzl et al., 2014).

Hinsichtlich der Verwendung eukaryot exprimierter EBV-Proteine als stimulierendes Agens sind noch weitere Experimente notwendig, bevor die Verwendung in größeren Kohorten sinnvoll ist. Insbesondere die gewünschte CD8⁺ T-Zell-stimulierende Wirkung mittels Harnstoffbehandlung muss in Zukunft noch detaillierter untersucht und validiert werden.

Die hier dargestellten Experimente legen den Einsatz der VLP für das EBV-spezifische klinische Immunmonitoring, insbesondere von CD4⁺ T-Zellantworten, nahe. Tatsächlich wurde auf Basis der eigenen Daten ein solches VLP-basiertes Monitoring von EBV-spezifischen T-Zellantworten in die vom Deutschen Zentrum für Infektionsforschung (DZIF) geförderten, von der eigenen Arbeitsgruppe koordinierten **IMMUC**-Studie (**Infectious Mononucleosis in MU**nich) übernommen. Diese zielt darauf ab, Biomarker zur Risikoabschätzung sowie verursachende Faktoren der komplizierten und/oder protrahierten IM zu identifizieren. Auch im Kontext anderer EBV-assoziiierter Erkrankungen wie z.B. HL oder NPC könnte das VLP-basierte EBV-spezifische Immunmonitoring an klinischer Bedeutung gewinnen.

Die immunogenen VLP stellen zudem ein interessantes Instrument zur Entwicklung effektiver Impfungen gegen EBV dar (Cohen, 2018; van Zyl, Mautner, & Delecluse, 2019). Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass VLP neutralisierende Antikörper- und T-Zellantworten hervorrufen (Ruiss et al., 2011). Zudem konnte das Antigenspektrum der VLP durch Fusion mit weiteren EBV-Latenzantigenen erhöht werden (van Zyl et al., 2018). Letzteres ging mit einer verbesserten Immunantwort einher und verspricht somit einen besseren Schutz vor einer EBV-Infektion. Ein VLP-basierter EBV-Impfstoff ist derzeit in Kooperation der Klinik und Poliklinik für Kinder und Jugendmedizin des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München mit dem Helmholtz Zentrum München und dem DZIF in der eigenen Arbeitsgruppe in Entwicklung.

7 Zusammenfassung

Die Primärinfektion mit dem onkogenen Epstein-Barr Virus (EBV) im jungen Kindesalter erfolgt meist asymptomatisch. In industrialisierten Ländern verschiebt sich der Zeitpunkt der Primärinfektion zunehmend ins höhere Lebensalter und manifestiert sich dann häufig als Infektiöse Mononukleose (IM). Für die zum Teil schweren Verläufe und Spätfolgen der IM wird eine Immundysregulation verantwortlich gemacht. Bislang fehlen jedoch verlässliche Risikomarker sowie präventive Strategien. Viele der bis dato vorliegenden Arbeiten zur *ex vivo* Analyse EBV-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen beschränken sich im Wesentlichen auf die Messung von Interferon-gamma-Antworten nach Stimulation mit ausgewählten Peptiden oder überlappenden Peptid-Pools und Peptid-HLA-Multimeren.

In dieser Arbeit wurden daher verschiedene Methoden etabliert und evaluiert, die eine genauere Charakterisierung des zellulären Immunstatus von IM-Patienten ermöglichen sollten. Ausgewählte EBV-Vollängenantigene wurden standardisiert mittels rekombinanter eukaryoter Proteinexpression hergestellt. In multiparametrischen Durchflusszytometrie-basierten Untersuchungen wurde die EBV-spezifische stimulatorische Kapazität dieser Antigene sowohl für das CD4⁺ als auch für das CD8⁺ T-Zellkompartiment überprüft. Rekombinante lytische und latente EBV-Proteine konnten in T-Zell-Assays CD4⁺ T-Zellantworten spezifisch und effizient reaktivieren. Ein gepoolter Einsatz in Gemischen war ohne Wirkabschwächung möglich, sodass eine ressourcenschonende Detektion niedrigfrequenter und gegen unterschiedliche virale Antigene gerichteter CD4⁺ T-Zellantworten möglich war. Eine CD8⁺ T-Zell-stimulierende Wirkung der exogen zugeführten Proteine konnte trotz einer speziellen Harnstoffbehandlung, die eine Kreuzpräsentation auf MHC-I ermöglichen sollte, nicht nachgewiesen werden, sodass hierzu weitere Untersuchungen erforderlich sind. Rekombinante EBV-ähnliche Partikel (VLP) wurden zur Messung der EBV-spezifischen CD4⁺ T-Zellantwort gegen die hierfür bedeutsamen EBV-Strukturantigene generiert. Sie erwiesen sich hierfür als sehr gut geeignet, sodass ein routinemäßiger Einsatz als Stimulatorantigen möglich scheint. Autologe BZLF1-knock-out Lymphoblastoide Zelllinien ermöglichten effektiv die Präsentation der EBV-Latenzantigene an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, sind jedoch aufgrund der aufwendigen Herstellung und aufgrund der möglichen Expression von Autoantigenen eher zur ergänzenden Untersuchung des Immunprofils in speziellen Patientenfällen als für den regelmäßigen Einsatz im Immunmonitoring geeignet.

Insgesamt konnten im Rahmen dieser Arbeit vielversprechende neue Möglichkeiten für das klinische EBV-spezifische T-Zellmonitoring entwickelt werden.

8 Summary

Primary infection with oncogenic Epstein-Barr virus (EBV) in young children is usually asymptomatic. In developed countries, the time of primary infection is increasingly shifting to an older age and often manifests as infectious mononucleosis (IM). Immune dysregulation is thought to be responsible for the sometimes severe courses and late sequelae of IM. However, reliable risk markers and preventive strategies are still lacking. Much of the work available on the ex vivo analysis of EBV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells is limited to the measurement of interferon-gamma responses after stimulation with selected peptides or overlapping peptide pools and peptide-MHC-multimers.

Therefore, in this work, several methods were established and evaluated to allow a more accurate characterization of the cellular immune status of IM patients. Selected full-length EBV antigens were produced in a standardized manner by recombinant eukaryotic protein expression. Multiparametric flow cytometry-based assays were used to test the EBV-specific stimulatory capacity of these antigens for both the CD4⁺ and CD8⁺ T cell compartments. Recombinant lytic and latent EBV proteins were able to specifically and efficiently reactivate CD4⁺ T cell responses in T cell assays. Pooled use in mixtures was possible without impairment of sensitivity, allowing for resource-efficient detection of low-level CD4⁺ T cell responses directed against multiple viral antigens. A CD8⁺ T cell stimulatory effect of the exogenously introduced proteins could not be detected despite a special urea treatment, which was supposed to enable cross-presentation on MHC-I. Thus, further investigations are required in this regard. Recombinant EBV-like particles (VLP) were generated to measure the EBV-specific CD4⁺ T cell response against the EBV structural antigens, which are known to play an essential role in inducing EBV-specific CD4⁺ T cell immunity *in vivo*. They were found to be well suited for this purpose, allowing routine use as stimulatory antigens. Autologous BZLF1-knock-out lymphoblastoid cell lines effectively allowed presentation of EBV latency antigens to CD4⁺ and CD8⁺ T cells. However, they are more suitable for additional immune profiling in selected patients than for routine use in immune monitoring because of their laborious production and the possibility of false-positive responses due to autoantigens.

Overall, this work has developed promising new approaches for clinical EBV-specific T cell monitoring.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BL	Burkitt Lymphom
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CAEBV	Chronisch aktive EBV-Infektion
CD	<i>cluster of differentiation</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EA	<i>early antigen</i>
EBER	<i>EBV encoded RNA</i>
EBNA	<i>EBV nuclear antigen</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELISpot	<i>enzyme-linked immuno-spot</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
gp	Glykoprotein
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HLA	Humane Leukozyten-Antigene
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IEA	<i>immediate early antigen</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IM	Infektiöse Mononukleose
KCl	Kaliumchlorid
LA	<i>late antigen</i>
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
LMP	<i>latent membrane protein</i>
M	Molar
mDC	myeloide dendritische Zellen
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>

mM	Millimolar
MS	Multiple Sklerose
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NIR	<i>Near-IR Dead Cell Stain Kit</i>
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
NPC	Nasopharynxkarzinom
NTA	Nitrilotriacetsäure
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
pDC	plasmazytäre dendritische Zellen
PEI	Polyethylenimin
PTLD	Posttransplantations-Lymphoproliferative Erkrankung
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TGF-beta	<i>transforming growth factor beta</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TR	<i>terminal repeats</i>
üN	über Nacht
VCA	<i>viral capsid antigen</i>
VLP	<i>virus like particles</i>
wt	wildtyp
XLP	X-chromosomale lymphoproliferative Erkrankung

Im Rahmen der Arbeit verwendete Begriffe aus dem Englischen wurden durch kursive Schreibweise gekennzeichnet.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.2-1: Schematische Darstellung des linearen EBV- Genoms.....	7
Abbildung 1.3-1 Das episodale EBV-Genom	11
Abbildung 1.3-2: Zeitlicher Ablauf des lytischen Zyklus von EBV	14
Abbildung 1.6-1: Antikörpertiter nach EBV-Infektion	21
Abbildung 1.6-2: Spezifität und Häufigkeit von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen für lytische und latente EBV-Antigene	23
Abbildung 1.6-3: Dynamik der peripheren CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zell-Antwort nach EBV-Primärinfektion	25
Abbildung 4.2-1: Repräsentative Gating-Strategie für die Analyse der T-Zell-Antwort aus kryokonservierten PBMC im EBV-Effektor-Panel	51
Abbildung 5.1-1 GFP-Expression in Suspensions-HEK293T-Zellen in Abhängigkeit von Serumkonzentration und zu verschiedenen Zeiten nach Transfektion.....	63
Abbildung 5.1-2 GFP-Expression in Suspensions-HEK293T-Zellen unter unterschiedlichen Kulturbedingungen und zu unterschiedlichen Zeiten	64
Abbildung 5.2-1 Analyse der rekombinant exprimierten und aufgereinigten EBV Proteine	66
Abbildung 5.2-2 T-Zellerkennung rekombinanter EBV-Proteine nach LCL-Beladung.....	67
Abbildung 5.2-3 T-Zellerkennung rekombinanter EBV-Proteine nach PBMC-Beladung.....	68
Abbildung 5.3-1: Vergleich der T-Zell-Immunogenität von VLP und wt-EBV.....	70
Abbildung 5.3-2 Überprüfung der Bindungseigenschaften der VLP an B-Zellen.	71
Abbildung 5.3-3 Bestimmung der VLP-Konzentration durch Vergleich mit wt-EBV	71
Abbildung 5.4-1 Durchflusszytometrie-basierte Analyse der EBV-spezifischen T-Zell-Antwort.....	72
Abbildung 5.4-2 Gesamtzytokinantwort der CD4 ⁺ T-Zellen von drei verschiedenen Spendergruppen nach Stimulation mit VLP	74
Abbildung 5.4-3 Zytokinantwort der CD4 ⁺ T-Zellen von drei verschiedenen Spendergruppen nach VLP-Stimulation	75
Abbildung 5.4-4 Individuelle Zusammensetzung der Gesamtzytokinantworten der CD4 ⁺ T-Zellen nach VLP-Stimulation	76
Abbildung 5.4-5 Gesamtzytokinantwort der CD8 ⁺ T-Zellen der unterschiedlichen Spendergruppen nach VLP-Stimulation	77
Abbildung 5.4-6 Gesamtzytokinantworten der CD4 ⁺ (A) und CD8 ⁺ (B) T-Zellen der unterschiedlichen Spendergruppen nach LCL(Z-)-Stimulation	80
Abbildung 5.4-7 Zytokinantworten der CD4 ⁺ T-Zellen der unterschiedlichen Spendergruppen nach LCL(Z-)-Stimulation	81
Abbildung 5.4-8 Zytokinantworten der CD8 ⁺ T-Zellen der unterschiedlichen Spendergruppen nach LCL(Z-)-Stimulation	82
Abbildung 5.4-9 Individuelle Zusammensetzung der Gesamtzytokinantworten der CD4 ⁺ (A) und CD8 ⁺ (B) T-Zellen nach LCL(Z-)-Stimulation.....	83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.3-1: Expressionsmuster der EBV-Latenzproteine in den verschiedenen Latenzformen und Erkrankungen:	9
Tabelle 3.1-1: Verwendete lymphoplastoide Zelllinien (LCL) und deren HLA-Genotyp	31
Tabelle 3.1-2: EBV-spezifische T-Zellklone	32
Tabelle 3.3-1: Verwendete Plasmide und deren Eigenschaften.	33
Tabelle 3.4-1: Verwendete Primärantikörper (IgG)	33
Tabelle 3.4-2: Verwendete Sekundärantikörper	34
Tabelle 3.4-3: Antikörper für die Durchflusszytometrie (IgG)	34
Tabelle 3.5-1: Verwendete Chemikalien	35
Tabelle 3.6-1: Verwendete Verbrauchsmaterialien	36
Tabelle 3.7-1: Allgemein verwendete Medien, Puffer, Lösungen.....	37
Tabelle 3.8-1: Verwendete Zellkulturmedien	37
Tabelle 3.9-1: Verwendete Geräte.....	38
Tabelle 4.1-1: Transfektionsmix für adhärente und in Suspension wachsende HEK293T-Zellen sowie für HEK293/2089.17- und HEK293/TR-Zellen	42
Tabelle 4.2-1: Antikörper-Mix zur Oberflächen- und intrazellulären Färbung der PBMC	47
Tabelle 4.2-2: Schema für das Pipettieren der Kompensationsantikörper und der Proben.....	47
Tabelle 4.4-1: Reaktionsansatz für den DNA-Verdau mittels Restriktionsendonukleasen	54
Tabelle 4.5-1: Konzentration der Primärantikörper im Western Blot	59
Tabelle 5.4-1: T-Zell-Antwort nach VLP-Stimulation (Gesamtzytokinantwort)	73
Tabelle 5.4-2: T-Zell-Antwort nach LCL(Z-)-Stimulation (Gesamtzytokinantwort)	78

Literaturverzeichnis

- Abbot, S. D., Rowe, M., Cadwallader, K., Ricksten, A., Gordon, J., Wang, F., . . . Rickinson, A. B. (1990). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces expression of the virus-encoded latent membrane protein. *J Virol*, *64*(5), 2126-2134.
- Abbott, R. J., Pachnio, A., Pedroza-Pacheco, I., Leese, A. M., Begum, J., Long, H. M., . . . Bell, A. I. (2017). Asymptomatic Primary Infection with Epstein-Barr Virus: Observations on Young Adult Cases. *J Virol*, *91*(21). doi:10.1128/jvi.00382-17
- Abbott, R. J., Quinn, L. L., Leese, A. M., Scholes, H. M., Pachnio, A., & Rickinson, A. B. (2013). CD8+ T cell responses to lytic EBV infection: late antigen specificities as subdominant components of the total response. *J Immunol*, *191*(11), 5398-5409. doi:10.4049/jimmunol.1301629
- Adhikary, D., Behrends, U., Boerschmann, H., Pfunder, A., Burdach, S., Moosmann, A., . . . Mautner, J. (2007). Immunodominance of lytic cycle antigens in Epstein-Barr virus-specific CD4+ T cell preparations for therapy. *PLoS One*, *2*(7), e583. doi:10.1371/journal.pone.0000583
- Adhikary, D., Behrends, U., Feederle, R., Delecluse, H. J., & Mautner, J. (2008). Standardized and highly efficient expansion of Epstein-Barr virus-specific CD4+ T cells by using virus-like particles. *J Virol*, *82*(8), 3903-3911. doi:10.1128/jvi.02227-07
- Adhikary, D., Behrends, U., Moosmann, A., Witter, K., Bornkamm, G. W., & Mautner, J. (2006). Control of Epstein-Barr virus infection in vitro by T helper cells specific for virion glycoproteins. *J Exp Med*, *203*(4), 995-1006. doi:10.1084/jem.20051287
- Allday, M. J., Bazot, Q., & White, R. E. (2015). The EBNA3 Family: Two Oncoproteins and a Tumour Suppressor that Are Central to the Biology of EBV in B Cells. *Curr Top Microbiol Immunol*, *391*, 61-117. doi:10.1007/978-3-319-22834-1_3
- Almeida, C. A., Roberts, S. G., Laird, R., McKinnon, E., Ahmed, I., Pfafferott, K., . . . John, M. (2009). Automation of the ELISpot assay for high-throughput detection of antigen-specific T-cell responses. *J Immunol Methods*, *344*(1), 1-5. doi:10.1016/j.jim.2009.02.007
- Amyes, E., Hatton, C., Montamat-Sicotte, D., Gudgeon, N., Rickinson, A. B., McMichael, A. J., & Callan, M. F. (2003). Characterization of the CD4+ T cell response to Epstein-Barr virus during primary and persistent infection. *J Exp Med*, *198*(6), 903-911. doi:10.1084/jem.20022058
- Ascherio, A., & Munger, K. L. (2010). 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: epidemiological evidence. *Clin Exp Immunol*, *160*(1), 120-124. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04121.x
- Aslan, N., Watkin, L. B., Gil, A., Mishra, R., Clark, F. G., Welsh, R. M., . . . Selin, L. K. (2017). Severity of Acute Infectious Mononucleosis Correlates with Cross-Reactive Influenza CD8 T-Cell Receptor Repertoires. *mBio*, *8*(6). doi:10.1128/mBio.01841-17
- Attarbaschi, T., Willheim, M., Ramharter, M., Hofmann, A., Wahl, K., Winkler, H., . . . Winkler, S. (2003). T cell cytokine profile during primary Epstein-Barr virus infection (infectious mononucleosis). *Eur Cytokine Netw*, *14*(1), 34-39.
- Azzi, T., Lunemann, A., Murer, A., Ueda, S., Beziat, V., Malmberg, K. J., . . . Nadal, D. (2014). Role for early-differentiated natural killer cells in infectious mononucleosis. *Blood*, *124*(16), 2533-2543. doi:10.1182/blood-2014-01-553024
- Baer, R., Bankier, A. T., Biggin, M. D., Deininger, P. L., Farrell, P. J., Gibson, T. J., . . . et al. (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, *310*(5974), 207-211.
- Balfour, H. H., Jr., Holman, C. J., Hokanson, K. M., Lelonek, M. M., Giesbrecht, J. E., White, D. R., . . . Brundage, R. C. (2005). A prospective clinical study of Epstein-Barr virus and host interactions during acute infectious mononucleosis. *J Infect Dis*, *192*(9), 1505-1512. doi:10.1086/491740
- Balfour, H. H., Jr., Odumade, O. A., Schmeling, D. O., Mullan, B. D., Ed, J. A., Knight, J. A., . . . Hogquist, K. A. (2013). Behavioral, virologic, and immunologic factors associated with acquisition and severity of

-
- primary Epstein-Barr virus infection in university students. *J Infect Dis*, 207(1), 80-88. doi:10.1093/infdis/jis646
- Barabas, S., Gary, R., Bauer, T., Lindner, J., Lindner, P., Weinberger, B., . . . Deml, L. (2008). Urea-mediated cross-presentation of soluble Epstein-Barr virus BZLF1 protein. *PLoS Pathog*, 4(11), e1000198. doi:10.1371/journal.ppat.1000198
- Ben-Sasson, S. A., & Klein, G. (1981). Activation of the Epstein-Barr virus genome by 5-aza-cytidine in latently infected human lymphoid lines. *Int J Cancer*, 28(2), 131-135.
- Bhende, P. M., Dickerson, S. J., Sun, X., Feng, W. H., & Kenney, S. C. (2007). X-box-binding protein 1 activates lytic Epstein-Barr virus gene expression in combination with protein kinase D. *J Virol*, 81(14), 7363-7370. doi:10.1128/jvi.00154-07
- Bornkamm, G. W., Behrends, U., & Mautner, J. (2006). The infectious kiss: newly infected B cells deliver Epstein-Barr virus to epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(19), 7201-7202. doi:10.1073/pnas.0602077103
- Borza, C. M., & Hutt-Fletcher, L. M. (2002). Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat Med*, 8(6), 594-599. doi:10.1038/nm0602-594
- Borza, C. M., Morgan, A. J., Turk, S. M., & Hutt-Fletcher, L. M. (2004). Use of gHgL for attachment of Epstein-Barr virus to epithelial cells compromises infection. *J Virol*, 78(10), 5007-5014.
- Buettner, M., Lang, A., Tudor, C. S., Meyer, B., Cruchley, A., Barros, M. H., . . . Niedobitek, G. (2012). Lytic Epstein-Barr virus infection in epithelial cells but not in B-lymphocytes is dependent on Blimp1. *J Gen Virol*, 93(Pt 5), 1059-1064. doi:10.1099/vir.0.038661-0
- Burkitt, D. (1958). A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg*, 46(197), 218-223.
- Burkitt, D., & O'Connor, G. T. (1961). Malignant lymphoma in African children. I. A clinical syndrome. *Cancer*, 14, 258-269.
- Busse, C., Feederle, R., Schnolzer, M., Behrends, U., Mautner, J., & Delecluse, H. J. (2010). Epstein-Barr viruses that express a CD21 antibody provide evidence that gp350's functions extend beyond B-cell surface binding. *J Virol*, 84(2), 1139-1147. doi:10.1128/jvi.01953-09
- Calarota, S. A., Aberle, J. H., Puchhammer-Stockl, E., & Baldanti, F. (2015). Approaches for monitoring of non virus-specific and virus-specific T-cell response in solid organ transplantation and their clinical applications. *J Clin Virol*, 70, 109-119. doi:10.1016/j.jcv.2015.07.299
- Carbone, A. (2003). Emerging pathways in the development of AIDS-related lymphomas. *Lancet Oncol*, 4(1), 22-29.
- Casalegno-Garduno, R., Schmitt, A., Yao, J., Wang, X., Xu, X., Freund, M., & Schmitt, M. (2010). Multimer technologies for detection and adoptive transfer of antigen-specific T cells. *Cancer Immunol Immunother*, 59(2), 195-202. doi:10.1007/s00262-009-0778-4
- Cassaniti, I., Cavagna, L., Calarota, S. A., Adzasehoun, K. M. G., Comolli, G., Montecucco, C., & Baldanti, F. (2019). Evaluation of EBV- and HCMV-Specific T Cell Responses in Systemic Lupus Erythematosus (SLE) Patients Using a Normalized Enzyme-Linked Immunospot (ELISPOT) Assay. *J Immunol Res*, 2019, 4236503. doi:10.1155/2019/4236503
- Catalina, M. D., Sullivan, J. L., Bak, K. R., & Luzuriaga, K. (2001). Differential evolution and stability of epitope-specific CD8(+) T cell responses in EBV infection. *J Immunol*, 167(8), 4450-4457.
- Chesnokova, L. S., Nishimura, S. L., & Hutt-Fletcher, L. M. (2009). Fusion of epithelial cells by Epstein-Barr virus proteins is triggered by binding of viral glycoproteins gHgL to integrins alphavbeta6 or alphavbeta8. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(48), 20464-20469. doi:10.1073/pnas.0907508106
- Cheung, A., & Kieff, E. (1982). Long internal direct repeat in Epstein-Barr virus DNA. *J Virol*, 44(1), 286-294.
- Chijioke, O., Muller, A., Feederle, R., Barros, M. H., Krieg, C., Emmel, V., . . . Munz, C. (2013). Human natural killer cells prevent infectious mononucleosis features by targeting lytic Epstein-Barr virus infection. *Cell Rep*, 5(6), 1489-1498. doi:10.1016/j.celrep.2013.11.041

-
- Clute, S. C., Watkin, L. B., Cornberg, M., Naumov, Y. N., Sullivan, J. L., Luzuriaga, K., . . . Selin, L. K. (2005). Cross-reactive influenza virus-specific CD8+ T cells contribute to lymphoproliferation in Epstein-Barr virus-associated infectious mononucleosis. *J Clin Invest*, *115*(12), 3602-3612. doi:10.1172/jci25078
- Cohen, J. I. (2000). Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*, *343*(7), 481-492. doi:10.1056/nejm200008173430707
- Cohen, J. I. (2009). Optimal treatment for chronic active Epstein-Barr virus disease. *Pediatr Transplant*, *13*(4), 393-396. doi:10.1111/j.1399-3046.2008.01095.x
- Cohen, J. I. (2015). Primary Immunodeficiencies Associated with EBV Disease. *Curr Top Microbiol Immunol*, *390*(Pt 1), 241-265. doi:10.1007/978-3-319-22822-8_10
- Cohen, J. I. (2018). Vaccine Development for Epstein-Barr Virus. *Adv Exp Med Biol*, *1045*, 477-493. doi:10.1007/978-981-10-7230-7_22
- Cohen, J. I., Wang, F., Mannick, J., & Kieff, E. (1989). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *86*(23), 9558-9562.
- Cooper, A., Johannsen, E., Maruo, S., Cahir-McFarland, E., Illanes, D., Davidson, D., & Kieff, E. (2003). EBNA3A association with RBP-Jkappa down-regulates c-myc and Epstein-Barr virus-transformed lymphoblast growth. *J Virol*, *77*(2), 999-1010.
- Cordier, M., Calender, A., Billaud, M., Zimmer, U., Rousselet, G., Pavlish, O., . . . Lenoir, G. M. (1990). Stable transfection of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 in lymphoma cells containing the EBV P3HR1 genome induces expression of B-cell activation molecules CD21 and CD23. *J Virol*, *64*(3), 1002-1013.
- Crawford, D. H., & Ando, I. (1986). EB virus induction is associated with B-cell maturation. *Immunology*, *59*(3), 405-409.
- Crawford, D. H., Macsween, K. F., Higgins, C. D., Thomas, R., McAulay, K., Williams, H., . . . Swerdlow, A. J. (2006). A cohort study among university students: identification of risk factors for Epstein-Barr virus seroconversion and infectious mononucleosis. *Clin Infect Dis*, *43*(3), 276-282. doi:10.1086/505400
- Crisci, E., Barcena, J., & Montoya, M. (2012). Virus-like particles: the new frontier of vaccines for animal viral infections. *Vet Immunol Immunopathol*, *148*(3-4), 211-225. doi:10.1016/j.vetimm.2012.04.026
- Daikoku, T., Kudoh, A., Fujita, M., Sugaya, Y., Isomura, H., Shirata, N., & Tsurumi, T. (2005). Architecture of replication compartments formed during Epstein-Barr virus lytic replication. *J Virol*, *79*(6), 3409-3418. doi:10.1128/jvi.79.6.3409-3418.2005
- De Paschale, M., & Clerici, P. (2012). Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. *World J Virol*, *1*(1), 31-43. doi:10.5501/wjv.v1.i1.31
- Delecluse, H. J., Pich, D., Hilsendegen, T., Baum, C., & Hammerschmidt, W. (1999). A first-generation packaging cell line for Epstein-Barr virus-derived vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(9), 5188-5193.
- Dunmire, S. K., Hogquist, K. A., & Balfour, H. H. (2015). Infectious Mononucleosis. *Curr Top Microbiol Immunol*, *390*(Pt 1), 211-240. doi:10.1007/978-3-319-22822-8_9
- Epstein, M. A., Achong, B. G., & Barr, Y. M. (1964). VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *Lancet*, *1*(7335), 702-703.
- Fafi-Kremer, S., Morand, P., Brion, J. P., Pavese, P., Baccard, M., Germe, R., . . . Seigneurin, J. M. (2005). Long-term shedding of infectious Epstein-Barr virus after infectious mononucleosis. *J Infect Dis*, *191*(6), 985-989. doi:10.1086/428097
- Fahmi, H., Cochet, C., Hmama, Z., Opolon, P., & Joab, I. (2000). Transforming growth factor beta 1 stimulates expression of the Epstein-Barr virus BZLF1 immediate-early gene product ZEBRA by an indirect mechanism which requires the MAPK kinase pathway. *J Virol*, *74*(13), 5810-5818.
- Faint, J. M., Annels, N. E., Curnow, S. J., Shields, P., Pilling, D., Hislop, A. D., . . . Salmon, M. (2001). Memory T cells constitute a subset of the human CD8+CD45RA+ pool with distinct phenotypic and migratory characteristics. *J Immunol*, *167*(1), 212-220.

-
- Faulkner, G. C., Burrows, S. R., Khanna, R., Moss, D. J., Bird, A. G., & Crawford, D. H. (1999). X-Linked agammaglobulinemia patients are not infected with Epstein-Barr virus: implications for the biology of the virus. *J Virol*, *73*(2), 1555-1564.
- Feederle, R., Kost, M., Baumann, M., Janz, A., Drouet, E., Hammerschmidt, W., & Delecluse, H. J. (2000). The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operative functions of two transactivators. *Embo j*, *19*(12), 3080-3089. doi:10.1093/emboj/19.12.3080
- Fiola, S., Gosselin, D., Takada, K., & Gosselin, J. (2010). TLR9 contributes to the recognition of EBV by primary monocytes and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*, *185*(6), 3620-3631. doi:10.4049/jimmunol.0903736
- Fiorentino, D. F., Bond, M. W., & Mosmann, T. R. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*, *170*(6), 2081-2095. doi:10.1084/jem.170.6.2081
- Fixman, E. D., Hayward, G. S., & Hayward, S. D. (1995). Replication of Epstein-Barr virus oriLyf: lack of a dedicated virally encoded origin-binding protein and dependence on Zta in cotransfection assays. *J Virol*, *69*(5), 2998-3006.
- Fox, C. P., Burns, D., Parker, A. N., Peggs, K. S., Harvey, C. M., Natarajan, S., . . . Chaganti, S. (2014). EBV-associated post-transplant lymphoproliferative disorder following in vivo T-cell-depleted allogeneic transplantation: clinical features, viral load correlates and prognostic factors in the rituximab era. *Bone Marrow Transplant*, *49*(2), 280-286. doi:10.1038/bmt.2013.170
- Gaudreault, E., Fiola, S., Olivier, M., & Gosselin, J. (2007). Epstein-Barr virus induces MCP-1 secretion by human monocytes via TLR2. *J Virol*, *81*(15), 8016-8024. doi:10.1128/jvi.00403-07
- Given, D., Yee, D., Griem, K., & Kieff, E. (1979). DNA of Epstein-Barr virus. V. Direct repeats of the ends of Epstein-Barr virus DNA. *J Virol*, *30*(3), 852-862.
- Glaser, S. L., Lin, R. J., Stewart, S. L., Ambinder, R. F., Jarrett, R. F., Brousset, P., . . . Claviez, A. (1997). Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data. *Int J Cancer*, *70*(4), 375-382.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, *36*(1), 59-74. doi:10.1099/0022-1317-36-1-59
- Gratama, J. W., Oosterveer, M. A., Zwaan, F. E., Lepoutre, J., Klein, G., & Ernberg, I. (1988). Eradication of Epstein-Barr virus by allogeneic bone marrow transplantation: implications for sites of viral latency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *85*(22), 8693-8696.
- Greenspan, J. S., Greenspan, D., Lennette, E. T., Abrams, D. I., Conant, M. A., Petersen, V., & Freese, U. K. (1985). Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "hairy" leukoplakia, an AIDS-associated lesion. *N Engl J Med*, *313*(25), 1564-1571. doi:10.1056/nejm198512193132502
- Grierson, H., & Purtilo, D. T. (1987). Epstein-Barr virus infections in males with the X-linked lymphoproliferative syndrome. *Ann Intern Med*, *106*(4), 538-545.
- Grogan, E., Jenson, H., Countryman, J., Heston, L., Gradoville, L., & Miller, G. (1987). Transfection of a rearranged viral DNA fragment, WZhet, stably converts latent Epstein-Barr viral infection to productive infection in lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *84*(5), 1332-1336.
- Grose, C. (1985). The Many Faces of Infectious Mononucleosis: The Spectrum of Epstein-Barr Virus Infection in Children. *Pediatrics in Review*, *7*(2), 35.
- Gulley, M. L. (2001). Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases. *J Mol Diagn*, *3*(1), 1-10. doi:10.1016/s1525-1578(10)60642-3
- Halprin, J., Scott, A. L., Jacobson, L., Levine, P. H., Ho, J. H., Niederman, J. C., . . . Milman, G. (1986). Enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to Epstein-Barr virus nuclear and early antigens in patients with infectious mononucleosis and nasopharyngeal carcinoma. *Ann Intern Med*, *104*(3), 331-337.

-
- Hammerschmidt, W., & Sugden, B. (1988). Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell*, *55*(3), 427-433.
- Haque, T., Wilkie, G. M., Jones, M. M., Higgins, C. D., Urquhart, G., Wingate, P., . . . Crawford, D. H. (2007). Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood*, *110*(4), 1123-1131. doi:10.1182/blood-2006-12-063008
- Harada, S., & Kieff, E. (1997). Epstein-Barr virus nuclear protein LP stimulates EBNA-2 acidic domain-mediated transcriptional activation. *J Virol*, *71*(9), 6611-6618.
- Harrington, D. S., Weisenburger, D. D., & Purtilo, D. T. (1987). Malignant lymphoma in the X-linked lymphoproliferative syndrome. *Cancer*, *59*(8), 1419-1429.
- Harris, N. L., Ferry, J. A., & Swerdlow, S. H. (1997). Posttransplant lymphoproliferative disorders: summary of Society for Hematopathology Workshop. *Semin Diagn Pathol*, *14*(1), 8-14.
- Hatta, K., Morimoto, A., Ishii, E., Kimura, H., Ueda, I., Hibi, S., . . . Imashuku, S. (2007). Association of transforming growth factor-beta1 gene polymorphism in the development of Epstein-Barr virus-related hematologic diseases. *Haematologica*, *92*(11), 1470-1474. doi:10.3324/haematol.11147
- Helminen, M., Lahdenpohja, N., & Hurme, M. (1999). Polymorphism of the interleukin-10 gene is associated with susceptibility to Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis*, *180*(2), 496-499. doi:10.1086/314883
- Henle, G., Henle, W., & Diehl, V. (1968). Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *59*(1), 94-101.
- Henle, W., Henle, G., Andersson, J., Ernberg, I., Klein, G., Horwitz, C. A., . . . 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *84*(2), 570-574.
- Heslop, H. E. (2009). How I treat EBV lymphoproliferation. *Blood*, *114*(19), 4002-4008. doi:10.1182/blood-2009-07-143545
- Hislop, A. D., Annels, N. E., Gudgeon, N. H., Leese, A. M., & Rickinson, A. B. (2002). Epitope-specific evolution of human CD8(+) T cell responses from primary to persistent phases of Epstein-Barr virus infection. *J Exp Med*, *195*(7), 893-905.
- Hislop, A. D., Kuo, M., Drake-Lee, A. B., Akbar, A. N., Bergler, W., Hammerschmitt, N., . . . Rickinson, A. B. (2005). Tonsillar homing of Epstein-Barr virus-specific CD8+ T cells and the virus-host balance. *J Clin Invest*, *115*(9), 2546-2555. doi:10.1172/jci24810
- Hislop, A. D., & Taylor, G. S. (2015). T-Cell Responses to EBV. *Curr Top Microbiol Immunol*, *391*, 325-353. doi:10.1007/978-3-319-22834-1_11
- Hislop, A. D., Taylor, G. S., Sauce, D., & Rickinson, A. B. (2007). Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol*, *25*, 587-617. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141553
- Hjalgrim, H., Friborg, J., & Melbye, M. (2007). The epidemiology of EBV and its association with malignant disease. In A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P. S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, & K. Yamanishi (Eds.), *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press
- Copyright (c) Cambridge University Press 2007.
- Hjalgrim, H., Smedby, K. E., Rostgaard, K., Molin, D., Hamilton-Dutoit, S., Chang, E. T., . . . Melbye, M. (2007). Infectious mononucleosis, childhood social environment, and risk of Hodgkin lymphoma. *Cancer Res*, *67*(5), 2382-2388. doi:10.1158/0008-5472.can-06-3566
- Ho, M., Miller, G., Atchison, R. W., Breinig, M. K., Dummer, J. S., Andiman, W., . . . et al. (1985). Epstein-Barr virus infections and DNA hybridization studies in posttransplantation lymphoma and lymphoproliferative lesions: the role of primary infection. *J Infect Dis*, *152*(5), 876-886.

-
- Hopwood, P., & Crawford, D. H. (2000). The role of EBV in post-transplant malignancies: a review. *J Clin Pathol*, *53*(4), 248-254.
- Hurt, C., & Tamaro, D. (2007). Diagnostic evaluation of mononucleosis-like illnesses. *Am J Med*, *120*(10), 911.e911-918. doi:10.1016/j.amjmed.2006.12.011
- Hutt-Fletcher, L. M. (2007). Epstein-Barr Virus Entry. *J Virol*, *81*(15), 7825-7832. doi:10.1128/JVI.00445-07
- Hwang, A. E., Hamilton, A. S., Cockburn, M. G., Ambinder, R., Zadnick, J., Brown, E. E., . . . Cozen, W. (2012). Evidence of genetic susceptibility to infectious mononucleosis: a twin study. *Epidemiol Infect*, *140*(11), 2089-2095. doi:10.1017/s0950268811002457
- IARC. (1997). Proceedings of the IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Epstein-Barr Virus and Kaposi's Sarcoma Herpesvirus/Human Herpesvirus 8. Lyon, France, 17-24 June 1997. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, *70*, 1-492.
- Icheva, V., Kayser, S., Wolff, D., Tuve, S., Kyzirakos, C., Bethge, W., . . . Feuchtinger, T. (2013). Adoptive transfer of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1-specific T cells as treatment for EBV reactivation and lymphoproliferative disorders after allogeneic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol*, *31*(1), 39-48. doi:10.1200/jco.2011.39.8495
- Iwakiri, D., Zhou, L., Samanta, M., Matsumoto, M., Ebihara, T., Seya, T., . . . Takada, K. (2009). Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from Toll-like receptor 3. *J Exp Med*, *206*(10), 2091-2099. doi:10.1084/jem.20081761
- Jaffe, E. S. (2009). The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 523-531. doi:10.1182/asheducation-2009.1.523
- James, J. A., & Robertson, J. M. (2012). Lupus and Epstein-Barr. *Curr Opin Rheumatol*, *24*(4), 383-388. doi:10.1097/BOR.0b013e3283535801
- Janz, A., Oezel, M., Kurzeder, C., Mautner, J., Pich, D., Kost, M., . . . Delecluse, H. J. (2000). Infectious Epstein-Barr virus lacking major glycoprotein BLLF1 (gp350/220) demonstrates the existence of additional viral ligands. *J Virol*, *74*(21), 10142-10152.
- Jayasooriya, S., de Silva, T. I., Njie-jobe, J., Sanyang, C., Leese, A. M., Bell, A. I., . . . Flanagan, K. L. (2015). Early virological and immunological events in asymptomatic Epstein-Barr virus infection in African children. *PLoS Pathog*, *11*(3), e1004746. doi:10.1371/journal.ppat.1004746
- Jing, L., Laing, K. J., Dong, L., Russell, R. M., Barlow, R. S., Haas, J. G., . . . Koelle, D. M. (2016). Extensive CD4 and CD8 T Cell Cross-Reactivity between Alphaherpesviruses. *J Immunol*, *196*(5), 2205-2218. doi:10.4049/jimmunol.1502366
- Jones, J. F., Shurin, S., Abramowsky, C., Tubbs, R. R., Sciotto, C. G., Wahl, R., . . . Sklar, J. (1988). T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. *N Engl J Med*, *318*(12), 733-741. doi:10.1056/nejm198803243181203
- Karpova, M. B., Schoumans, J., Ernberg, I., Henter, J. I., Nordenskjold, M., & Fadeel, B. (2005). Raji revisited: cytogenetics of the original Burkitt's lymphoma cell line. *Leukemia*, *19*(1), 159-161. doi:10.1038/sj.leu.2403534
- Kenagy, D. N., Schlesinger, Y., Weck, K., Ritter, J. H., Gaudreault-Keener, M. M., & Storch, G. A. (1995). Epstein-Barr virus DNA in peripheral blood leukocytes of patients with posttransplant lymphoproliferative disease. *Transplantation*, *60*(6), 547-554.
- Kenney, S. C., & Mertz, J. E. (2014). Regulation of the latent-lytic switch in Epstein-Barr virus. *Seminars in cancer biology*, *0*, 60-68. doi:10.1016/j.semcancer.2014.01.002
- Khan, G., Miyashita, E. M., Yang, B., Babcock, G. J., & Thorley-Lawson, D. A. (1996). Is EBV Persistence In Vivo a Model for B Cell Homeostasis? *Immunity*, *5*(2), 173-179. doi:https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80493-8

-
- Kiecker, F., Streitz, M., Ay, B., Cherepnev, G., Volk, H. D., Volkmer-Engert, R., & Kern, F. (2004). Analysis of antigen-specific T-cell responses with synthetic peptides--what kind of peptide for which purpose? *Hum Immunol*, *65*(5), 523-536. doi:10.1016/j.humimm.2004.02.017
- Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M., & Hammerschmidt, W. (1998). Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *Embo j*, *17*(6), 1700-1709. doi:10.1093/emboj/17.6.1700
- Kilger, E., Pecher, G., Schwenk, A., & Hammerschmidt, W. (1999). Expression of mucin (MUC-1) from a mini-Epstein-Barr virus in immortalized B-cells to generate tumor antigen specific cytotoxic T cells. *J Gene Med*, *1*(2), 84-92. doi:10.1002/(sici)1521-2254(199903/04)1:2<84::Aid-jgm21>3.0.Co;2-q
- Kimura, H., Hoshino, Y., Kanegane, H., Tsuge, I., Okamura, T., Kawa, K., & Morishima, T. (2001). Clinical and virologic characteristics of chronic active Epstein-Barr virus infection. *Blood*, *98*(2), 280-286.
- Klein, G., Giovanella, B. C., Lindahl, T., Fialkow, P. J., Singh, S., & Stehlin, J. S. (1974). Direct evidence for the presence of Epstein-Barr virus DNA and nuclear antigen in malignant epithelial cells from patients with poorly differentiated carcinoma of the nasopharynx. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *71*(12), 4737-4741.
- Klein, G., Pearson, G., Henle, G., Henle, W., Diehl, V., & Niederman, J. C. (1968). Relation between Epstein--Barr viral and cell membrane immunofluorescence in Burkitt tumor cells. II. Comparison of cells and sera from patients with Burkitt's lymphoma and infectious mononucleosis. *J Exp Med*, *128*(5), 1021-1030.
- Komano, J., Maruo, S., Kurozumi, K., Oda, T., & Takada, K. (1999). Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J Virol*, *73*(12), 9827-9831.
- Kulwichit, W., Edwards, R. H., Davenport, E. M., Baskar, J. F., Godfrey, V., & Raab-Traub, N. (1998). Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(20), 11963-11968.
- Kutok, J. L., & Wang, F. (2006). Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol*, *1*, 375-404. doi:10.1146/annurev.pathol.1.110304.100209
- Kutscher, S., Dembek, C. J., Deckert, S., Russo, C., Korber, N., Bogner, J. R., . . . Bauer, T. (2013). Overnight resting of PBMC changes functional signatures of antigen specific T- cell responses: impact for immune monitoring within clinical trials. *PLoS One*, *8*(10), e76215. doi:10.1371/journal.pone.0076215
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 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. *Front Microbiol*, *9*, 416. doi:10.3389/fmicb.2018.00416
- Lee, M. A., Diamond, M. E., & Yates, J. L. (1999). Genetic evidence that EBNA-1 is needed for efficient, stable latent infection by Epstein-Barr virus. *J Virol*, *73*(4), 2974-2982.
- Leen, A., Meij, P., Redchenko, I., Middeldorp, J., Bloemena, E., Rickinson, A., & Blake, N. (2001). Differential immunogenicity of Epstein-Barr virus latent-cycle proteins for human CD4(+) T-helper 1 responses. *J Virol*, *75*(18), 8649-8659.
- Leung, C. S., Haigh, T. A., Mackay, L. K., Rickinson, A. B., & Taylor, G. S. (2010). Nuclear location of an endogenously expressed antigen, EBNA1, restricts access to macroautophagy and the range of CD4 epitope display. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(5), 2165-2170. doi:10.1073/pnas.0909448107
- Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A., & Masucci, M. G. (1997). Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(23), 12616-12621.
- Linnerbauer, S., Behrends, U., Adhikary, D., Witter, K., Bornkamm, G. W., & Mautner, J. (2014). Virus and autoantigen-specific CD4+ T cells are key effectors in a SCID mouse model of EBV-associated post-

transplant lymphoproliferative disorders. *PLoS Pathog*, 10(5), e1004068.
doi:10.1371/journal.ppat.1004068

- Long, H. M., Chagoury, O. L., Leese, A. M., Ryan, G. B., James, E., Morton, L. T., . . . Rickinson, A. B. (2013). MHC II tetramers visualize human CD4+ T cell responses to Epstein-Barr virus infection and demonstrate atypical kinetics of the nuclear antigen EBNA1 response. *J Exp Med*, 210(5), 933-949. doi:10.1084/jem.20121437
- Long, H. M., Leese, A. M., Chagoury, O. L., Connerty, S. R., Quarcoopome, J., Quinn, L. L., . . . Rickinson, A. B. (2011). Cytotoxic CD4+ T cell responses to EBV contrast with CD8 responses in breadth of lytic cycle antigen choice and in lytic cycle recognition. *J Immunol*, 187(1), 92-101. doi:10.4049/jimmunol.1100590
- Long, H. M., Meckiff, B. J., & Taylor, G. S. (2019). The T-cell Response to Epstein-Barr Virus-New Tricks From an Old Dog. *Front Immunol*, 10, 2193. doi:10.3389/fimmu.2019.02193
- Longnecker, R. M., Kieff, E. D., & Cohen, J. I. (2007). Epstein-Barr virus. In D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), *Fields virology* (Vol. 6th, pp. 1898-1954). Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Luka, J., Kallin, B., & Klein, G. (1979). Induction of the Epstein-Barr virus (EBV) cycle in latently infected cells by n-butyrate. *Virology*, 94(1), 228-231.
- Lunemann, A., Rowe, M., & Nadal, D. (2015). Innate Immune Recognition of EBV. *Curr Top Microbiol Immunol*, 391, 265-287. doi:10.1007/978-3-319-22834-1_9
- Lunemann, A., Vanoaica, L. D., Azzi, T., Nadal, D., & Munz, C. (2013). A distinct subpopulation of human NK cells restricts B cell transformation by EBV. *J Immunol*, 191(10), 4989-4995. doi:10.4049/jimmunol.1301046
- Macedo, C., Donnenberg, A., Popescu, I., Reyes, J., Abu-Elmagd, K., Shapiro, R., . . . Metes, D. (2005). EBV-specific memory CD8+ T cell phenotype and function in stable solid organ transplant patients. *Transpl Immunol*, 14(2), 109-116. doi:10.1016/j.trim.2005.02.001
- Mannick, J. B., Cohen, J. I., Birkenbach, M., Marchini, A., & Kieff, E. (1991). The Epstein-Barr virus nuclear protein encoded by the leader of the EBNA RNAs is important in B-lymphocyte transformation. *J Virol*, 65(12), 6826-6837.
- Maruo, S., Wu, Y., Ito, T., Kanda, T., Kieff, E. D., & Takada, K. (2009). Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA3C residues critical for maintaining lymphoblastoid cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(11), 4419-4424. doi:10.1073/pnas.0813134106
- Mautner, J., & Bornkamm, G. W. (2012). The role of virus-specific CD4+ T cells in the control of Epstein-Barr virus infection. *Eur J Cell Biol*, 91(1), 31-35. doi:10.1016/j.ejcb.2011.01.007
- Mautner, J., Pich, D., Nimmerjahn, F., Milosevic, S., Adhikary, D., Christoph, H., . . . Behrends, U. (2004). Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 evades direct immune recognition by CD4+ T helper cells. *Eur J Immunol*, 34(9), 2500-2509. doi:10.1002/eji.200324794
- McKenzie, J., & El-Guindy, A. (2015). Epstein-Barr Virus Lytic Cycle Reactivation. *Curr Top Microbiol Immunol*, 391, 237-261. doi:10.1007/978-3-319-22834-1_8
- Meckiff, B. J., Ladell, K., McLaren, J. E., Ryan, G. B., Leese, A. M., James, E. A., . . . Long, H. M. (2019). Primary EBV Infection Induces an Acute Wave of Activated Antigen-Specific Cytotoxic CD4(+) T Cells. *J Immunol*, 203(5), 1276-1287. doi:10.4049/jimmunol.1900377
- Mees, S. T., Keschull, L., Mardin, W. A., Senninger, N., Suwelack, B., Wolters, H., & Haier, J. (2014). Detection of different virus-specific CD8+ T cells after kidney transplantation. *Surg Infect (Larchmt)*, 15(3), 274-282. doi:10.1089/sur.2013.083
- Merchant, M., Caldwell, R. G., & Longnecker, R. (2000). The LMP2A ITAM is essential for providing B cells with development and survival signals in vivo. *J Virol*, 74(19), 9115-9124.
- Middeldorp, J. M. (2015). Epstein-Barr Virus-Specific Humoral Immune Responses in Health and Disease. *Curr Top Microbiol Immunol*, 391, 289-323. doi:10.1007/978-3-319-22834-1_10

-
- Miller, C. L., Burkhardt, A. L., Lee, J. H., Stealey, B., Longnecker, R., Bolen, J. B., & Kieff, E. (1995). Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases. *Immunity*, *2*(2), 155-166.
- Miller, G., El-Guindy, A., Countryman, J., Ye, J., & Gradoville, L. (2007). Lytic cycle switches of oncogenic human gammaherpesviruses. *Adv Cancer Res*, *97*, 81-109. doi:10.1016/s0065-230x(06)97004-3
- Miller, G., Grogan, E., Rowe, D., Rooney, C., Heston, L., Eastman, R., . . . et al. (1987). Selective lack of antibody to a component of EB nuclear antigen in patients with chronic active Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis*, *156*(1), 26-35.
- Milosevic, S., Behrends, U., Adhikary, D., & Mautner, J. (2006). Identification of major histocompatibility complex class II-restricted antigens and epitopes of the Epstein-Barr virus by a novel bacterial expression cloning approach. *J Virol*, *80*(21), 10357-10364. doi:10.1128/jvi.01193-06
- Miyashita, E. M., Yang, B., Babcock, G. J., & Thorley-Lawson, D. A. (1997). Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a resting B cell. *J Virol*, *71*(7), 4882-4891.
- Mockridge, C. I., Rahman, A., Buchan, S., Hamblin, T., Isenberg, D. A., Stevenson, F. K., & Potter, K. N. (2004). Common patterns of B cell perturbation and expanded V4-34 immunoglobulin gene usage in autoimmunity and infection. *Autoimmunity*, *37*(1), 9-15.
- Moore, K. W., O'Garra, A., de Waal Malefyt, R., Vieira, P., & Mosmann, T. R. (1993). Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*, *11*, 165-190. doi:10.1146/annurev.iy.11.040193.001121
- Moosmann, A., Bigalke, I., Tischer, J., Schirrmann, L., Kasten, J., Tippmer, S., . . . Kolb, H. J. (2010). Effective and long-term control of EBV PTLD after transfer of peptide-selected T cells. *Blood*, *115*(14), 2960-2970. doi:10.1182/blood-2009-08-236356
- Moosmann, A., Khan, N., Cobbold, M., Zentz, C., Delecluse, H. J., Hollweck, G., . . . Hammerschmidt, W. (2002). B cells immortalized by a mini-Epstein-Barr virus encoding a foreign antigen efficiently reactivate specific cytotoxic T cells. *Blood*, *100*(5), 1755-1764.
- Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C., & Kieff, E. (1995). The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell*, *80*(3), 389-399.
- Mroczek, E. C., Weisenburger, D. D., Grierson, H. L., Markin, R., & Purtilo, D. T. (1987). Fatal infectious mononucleosis and virus-associated hemophagocytic syndrome. *Arch Pathol Lab Med*, *111*(6), 530-535.
- Munger, K. L., Levin, L. I., O'Reilly, E. J., Falk, K. I., & Ascherio, A. (2011). Anti-Epstein-Barr virus antibodies as serological markers of multiple sclerosis: a prospective study among United States military personnel. *Mult Scler*, *17*(10), 1185-1193. doi:10.1177/1352458511408991
- Muti, G., Mancini, V., Ravelli, E., & Morra, E. (2005). Significance of Epstein-Barr virus (EBV) load and interleukin-10 in post-transplant lymphoproliferative disorders. *Leuk Lymphoma*, *46*(10), 1397-1407. doi:10.1080/10428190500160272
- Mynarek, M., Schober, T., Behrends, U., & Maecker-Kolhoff, B. (2013). Posttransplant lymphoproliferative disease after pediatric solid organ transplantation. *Clin Dev Immunol*, *2013*, 814973. doi:10.1155/2013/814973
- 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 EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J Virol*, *61*(5), 1416-1420.
- Nepom, G. T. (2012). MHC class II tetramers. *J Immunol*, *188*(6), 2477-2482. doi:10.4049/jimmunol.1102398
- Nicholls, J. M., Agathangelou, A., Fung, K., Zeng, X., & Niedobitek, G. (1997). The association of squamous cell carcinomas of the nasopharynx with Epstein-Barr virus shows geographical variation reminiscent of Burkitt's lymphoma. *J Pathol*, *183*(2), 164-168. doi:10.1002/(sici)1096-9896(199710)183:2<164::aid-path919>3.0.co;2-j

-
- Niedobitek, G., Hansmann, M. L., Herbst, H., Young, L. S., Dienemann, D., Hartmann, C. A., . . . et al. (1991). Epstein-Barr virus and carcinomas: undifferentiated carcinomas but not squamous cell carcinomas of the nasopharynx are regularly associated with the virus. *J Pathol*, *165*(1), 17-24. doi:10.1002/path.1711650105
- Nikiforow, S., Bottomly, K., Miller, G., & Munz, C. (2003). Cytolytic CD4(+)-T-cell clones reactive to EBNA1 inhibit Epstein-Barr virus-induced B-cell proliferation. *J Virol*, *77*(22), 12088-12104.
- Odumade, O. A., Knight, J. A., Schmeling, D. O., Masopust, D., Balfour, H. H., Jr., & Hogquist, K. A. (2012). Primary Epstein-Barr virus infection does not erode preexisting CD8(+) T cell memory in humans. *J Exp Med*, *209*(3), 471-478. doi:10.1084/jem.20112401
- Ohga, S., Nomura, A., Takada, H., Tanaka, T., Furuno, K., Takahata, Y., . . . Hara, T. (2004). Dominant expression of interleukin-10 and transforming growth factor-beta genes in activated T-cells of chronic active Epstein-Barr virus infection. *J Med Virol*, *74*(3), 449-458. doi:10.1002/jmv.20197
- Ohshima, K., Kimura, H., Yoshino, T., Kim, C. W., Ko, Y. H., Lee, S. S., . . . Chan, J. K. (2008). Proposed categorization of pathological states of EBV-associated T/natural killer-cell lymphoproliferative disorder (LPD) in children and young adults: overlap with chronic active EBV infection and infantile fulminant EBV T-LPD. *Pathol Int*, *58*(4), 209-217. doi:10.1111/j.1440-1827.2008.02213.x
- Okano, M. (2002). Overview and problematic standpoints of severe chronic active Epstein-Barr virus infection syndrome. *Crit Rev Oncol Hematol*, *44*(3), 273-282.
- Okano, M., Matsumoto, S., Osato, T., Sakiyama, Y., Thiele, G. M., & Purtilo, D. T. (1991). Severe chronic active Epstein-Barr virus infection syndrome. *Clin Microbiol Rev*, *4*(1), 129-135.
- Orange, J. S. (2013). Natural killer cell deficiency. *J Allergy Clin Immunol*, *132*(3), 515-525; quiz 526. doi:10.1016/j.jaci.2013.07.020
- Orlova, N., Wang, F., & Fogg, M. H. (2011). Persistent infection drives the development of CD8+ T cells specific for late lytic infection antigens in lymphocryptovirus-infected macaques and Epstein-Barr virus-infected humans. *J Virol*, *85*(23), 12821-12824. doi:10.1128/jvi.05742-11
- Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., & Baltimore, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(18), 8392-8396.
- Pohl, D., Krone, B., Rostasy, K., Kahler, E., Brunner, E., Lehnert, M., . . . Hanefeld, F. (2006). High seroprevalence of Epstein-Barr virus in children with multiple sclerosis. *Neurology*, *67*(11), 2063-2065. doi:10.1212/01.wnl.0000247665.94088.8d
- Precopio, M. L., Sullivan, J. L., Willard, C., Somasundaran, M., & Luzuriaga, K. (2003). Differential kinetics and specificity of EBV-specific CD4+ and CD8+ T cells during primary infection. *J Immunol*, *170*(5), 2590-2598.
- Preiksaitis, J. K., Diaz-Mitoma, F., Mirzayans, F., Roberts, S., & Tyrrell, D. L. (1992). Quantitative oropharyngeal Epstein-Barr virus shedding in renal and cardiac transplant recipients: relationship to immunosuppressive therapy, serologic responses, and the risk of posttransplant lymphoproliferative disorder. *J Infect Dis*, *166*(5), 986-994.
- Pudney, V. A., Leese, A. M., Rickinson, A. B., & Hislop, A. D. (2005). CD8+ immunodominance among Epstein-Barr virus lytic cycle antigens directly reflects the efficiency of antigen presentation in lytically infected cells. *J Exp Med*, *201*(3), 349-360. doi:10.1084/jem.20041542
- Quan, T. E., Roman, R. M., Rudenga, B. J., Holers, V. M., & Craft, J. E. (2010). Epstein-Barr virus promotes interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. *Arthritis Rheum*, *62*(6), 1693-1701. doi:10.1002/art.27408
- Quinn, L. L., Zuo, J., Abbott, R. J., Shannon-Lowe, C., Tierney, R. J., Hislop, A. D., & Rowe, M. (2014). Cooperation between Epstein-Barr virus immune evasion proteins spreads protection from CD8+ T cell recognition across all three phases of the lytic cycle. *PLoS Pathog*, *10*(8), e1004322. doi:10.1371/journal.ppat.1004322

-
- Ragoczy, T., Heston, L., & Miller, G. (1998). The Epstein-Barr virus Rta protein activates lytic cycle genes and can disrupt latency in B lymphocytes. *J Virol*, *72*(10), 7978-7984.
- Rawlins, D. R., Milman, G., Hayward, S. D., & Hayward, G. S. (1985). Sequence-specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region. *Cell*, *42*(3), 859-868.
- Rechsteiner, M. P., Berger, C., Zauner, L., Sigrist, J. A., Weber, M., Longnecker, R., . . . Nadal, D. (2008). Latent membrane protein 2B regulates susceptibility to induction of lytic Epstein-Barr virus infection. *J Virol*, *82*(4), 1739-1747. doi:10.1128/jvi.01723-07
- Rickinson, A. B., Long, H. M., Palendira, U., Munz, C., & Hislop, A. D. (2014). Cellular immune controls over Epstein-Barr virus infection: new lessons from the clinic and the laboratory. *Trends Immunol*, *35*(4), 159-169. doi:10.1016/j.it.2014.01.003
- Rickinson, A. B., Young, L. S., & Rowe, M. (1987). Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. *J Virol*, *61*(5), 1310-1317.
- Rist, M. J., Neller, M. A., Burrows, J. M., & Burrows, S. R. (2015). T cell epitope clustering in the highly immunogenic BZLF1 antigen of Epstein-Barr virus. *J Virol*, *89*(1), 703-712. doi:10.1128/jvi.02642-14
- Roederer, M., Nozzi, J. L., & Nason, M. C. (2011). SPICE: exploration and analysis of post-cytometric complex multivariate datasets. *Cytometry A*, *79*(2), 167-174. doi:10.1002/cyto.a.21015
- Rooney, C. M., Leen, A. M., Vera, J. F., & Heslop, H. E. (2014). T lymphocytes targeting native receptors. *Immunol Rev*, *257*(1), 39-55. doi:10.1111/imr.12133
- Rooney, C. M., Smith, C. A., Ng, C. Y., Loftin, S. K., Sixbey, J. W., Gan, Y., . . . Heslop, H. E. (1998). Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood*, *92*(5), 1549-1555.
- Rostgaard, K., Wohlfahrt, J., & Hjalgrim, H. (2014). A genetic basis for infectious mononucleosis: evidence from a family study of hospitalized cases in Denmark. *Clin Infect Dis*, *58*(12), 1684-1689. doi:10.1093/cid/ciu204
- Rowe, M., Rowe, D. T., Gregory, C. D., Young, L. S., Farrell, P. J., Rupani, H., & Rickinson, A. B. (1987). Differences in B cell growth phenotype reflect novel patterns of Epstein-Barr virus latent gene expression in Burkitt's lymphoma cells. *Embo j*, *6*(9), 2743-2751.
- Ruiss, R., Jochum, S., Wanner, G., Reisbach, G., Hammerschmidt, W., & Zeidler, R. (2011). A virus-like particle-based Epstein-Barr virus vaccine. *J Virol*, *85*(24), 13105-13113. doi:10.1128/jvi.05598-11
- Savoie, A., Perpete, C., Carpentier, L., Joncas, J., & Alfieri, C. (1994). Direct correlation between the load of Epstein-Barr virus-infected lymphocytes in the peripheral blood of pediatric transplant patients and risk of lymphoproliferative disease. *Blood*, *83*(9), 2715-2722.
- Sayos, J., Wu, C., Morra, M., Wang, N., Zhang, X., Allen, D., . . . Terhorst, C. (1998). The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature*, *395*(6701), 462-469. doi:10.1038/26683
- Schepers, A., Pich, D., & Hammerschmidt, W. (1996). Activation of oriLyt, the lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus, by BZLF1. *Virology*, *220*(2), 367-376. doi:10.1006/viro.1996.0325
- Scherrenburg, J., Piriou, E. R., Nanlohy, N. M., & van Baarle, D. (2008). Detailed analysis of Epstein-Barr virus-specific CD4+ and CD8+ T cell responses during infectious mononucleosis. *Clin Exp Immunol*, *153*(2), 231-239. doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03699.x
- Sebelin-Wulf, K., Nguyen, T. D., Oertel, S., Papp-Vary, M., Trappe, R. U., Schulzki, A., . . . Subklewe, M. (2007). Quantitative analysis of EBV-specific CD4/CD8 T cell numbers, absolute CD4/CD8 T cell numbers and EBV load in solid organ transplant recipients with PLTD. *Transpl Immunol*, *17*(3), 203-210. doi:10.1016/j.trim.2006.10.006
- Silins, S. L., Sherritt, M. A., Silleri, J. M., Cross, S. M., Elliott, S. L., Bharadwaj, M., . . . 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. *Blood*, *98*(13), 3739-3744.

-
- Sprinzi, M. F., Russo, C., Kittner, J., Allgayer, S., Grambihler, A., Bartsch, B., . . . Bauer, T. (2014). Hepatitis B virus-specific T-cell responses during IFN administration in a small cohort of chronic hepatitis B patients under nucleos(t)ide analogue treatment. *J Viral Hepat*, *21*(9), 633-641. doi:10.1111/jvh.12189
- Steven, N. M., Annels, N. E., Kumar, A., Leese, A. M., Kurilla, M. G., & Rickinson, A. B. (1997). Immediate early and early lytic cycle proteins are frequent targets of the Epstein-Barr virus-induced cytotoxic T cell response. *J Exp Med*, *185*(9), 1605-1617.
- Suzuki, K., Ohshima, K., Karube, K., Suzumiya, J., Ohga, S., Ishihara, S., . . . Kikuchi, M. (2004). Clinicopathological states of Epstein-Barr virus-associated T/NK-cell lymphoproliferative disorders (severe chronic active EBV infection) of children and young adults. *Int J Oncol*, *24*(5), 1165-1174.
- Svahn, A., Magnusson, M., Jagdahl, L., Schloss, L., Kahlmeter, G., & Linde, A. (1997). Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays and two latex agglutination assays for diagnosis of primary Epstein-Barr virus infection. *J Clin Microbiol*, *35*(11), 2728-2732.
- Takada, K. (1984). Cross-linking of cell surface immunoglobulins induces Epstein-Barr virus in Burkitt lymphoma lines. *Int J Cancer*, *33*(1), 27-32.
- Takeuchi, K., Tanaka-Taya, K., Kazuyama, Y., Ito, Y. M., Hashimoto, S., Fukayama, M., & Mori, S. (2006). Prevalence of Epstein-Barr virus in Japan: trends and future prediction. *Pathol Int*, *56*(3), 112-116. doi:10.1111/j.1440-1827.2006.01936.x
- Tan, Q., Ku, W., Zhang, C., Heyilimu, P., Tian, Y., Ke, Y., & Lu, Z. (2018). Mutation analysis of the EBV-lymphoblastoid cell line cautions their use as antigen-presenting cells. *Immunol Cell Biol*, *96*(2), 204-211. doi:10.1111/imcb.1030
- Taylor, G. M., Raghuwanshi, S. K., Rowe, D. T., Wadowsky, R. M., & Rosendorff, A. (2011). Endoplasmic reticulum stress causes EBV lytic replication. *Blood*, *118*(20), 5528-5539. doi:10.1182/blood-2011-04-347112
- Taylor, G. S., Long, H. M., Brooks, J. M., Rickinson, A. B., & Hislop, A. D. (2015). The immunology of Epstein-Barr virus-induced disease. *Annu Rev Immunol*, *33*, 787-821. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112326
- Taylor, G. S., Long, H. M., Haigh, T. A., Larsen, M., Brooks, J., & Rickinson, A. B. (2006). A role for intercellular antigen transfer in the recognition of EBV-transformed B cell lines by EBV nuclear antigen-specific CD4+ T cells. *J Immunol*, *177*(6), 3746-3756.
- Thacker, E. L., Mirzaei, F., & Ascherio, A. (2006). Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Ann Neurol*, *59*(3), 499-503. doi:10.1002/ana.20820
- Tischer, S., Dieks, D., Sukdolak, C., Bunse, C., Figueiredo, C., Immenschuh, S., . . . Eiz-Vesper, B. (2014). Evaluation of suitable target antigens and immunoassays for high-accuracy immune monitoring of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus-specific T cells as targets of interest in immunotherapeutic approaches. *J Immunol Methods*, *408*, 101-113. doi:10.1016/j.jim.2014.05.011
- Uchida, J., Yasui, T., Takaoka-Shichijo, Y., Muraoka, M., Kulwichit, W., Raab-Traub, N., & Kikutani, H. (1999). Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science*, *286*(5438), 300-303.
- van Zyl, D. G., Mautner, J., & Delecluse, H. J. (2019). Progress in EBV Vaccines. *Front Oncol*, *9*, 104. doi:10.3389/fonc.2019.00104
- van Zyl, D. G., Tsai, M. H., Shumilov, A., Schneidt, V., Poirey, R., Schlehe, B., . . . Delecluse, H. J. (2018). Immunogenic particles with a broad antigenic spectrum stimulate cytolytic T cells and offer increased protection against EBV infection ex vivo and in mice. *PLoS Pathog*, *14*(12), e1007464. doi:10.1371/journal.ppat.1007464
- Végso, G., Hajdu, M., & Sebestyén, A. (2011). Lymphoproliferative disorders after solid organ transplantation-classification, incidence, risk factors, early detection and treatment options. *Pathol Oncol Res*, *17*(3), 443-454. doi:10.1007/s12253-010-9329-8

-
- Vollmer-Conna, U., Piraino, B. F., Cameron, B., Davenport, T., Hickie, I., Wakefield, D., & Lloyd, A. R. (2008). Cytokine polymorphisms have a synergistic effect on severity of the acute sickness response to infection. *Clin Infect Dis*, *47*(11), 1418-1425. doi:10.1086/592967
- Vouloumanou, E. K., Rafailidis, P. I., & Falagas, M. E. (2012). Current diagnosis and management of infectious mononucleosis. *Curr Opin Hematol*, *19*(1), 14-20. doi:10.1097/MOH.0b013e32834daa08
- Wang, F., Tsang, S. F., Kurilla, M. G., Cohen, J. I., & Kieff, E. (1990). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivates latent membrane protein LMP1. *J Virol*, *64*(7), 3407-3416.
- Wang, X., & Hutt-Fletcher, L. M. (1998). Epstein-Barr virus lacking glycoprotein gp42 can bind to B cells but is not able to infect. *J Virol*, *72*(1), 158-163.
- Wang, X., Kenyon, W. J., Li, Q., Mullberg, J., & Hutt-Fletcher, L. M. (1998). Epstein-Barr virus uses different complexes of glycoproteins gH and gL to infect B lymphocytes and epithelial cells. *J Virol*, *72*(7), 5552-5558.
- Weiss, L. M., Movahed, L. A., Warnke, R. A., & Sklar, J. (1989). Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N Engl J Med*, *320*(8), 502-506. doi:10.1056/nejm198902233200806
- Woodberry, T., Suscovich, T. J., Henry, L. M., Davis, J. K., Frahm, N., Walker, B. D., . . . Brander, C. (2005). Differential targeting and shifts in the immunodominance of Epstein-Barr virus--specific CD8 and CD4 T cell responses during acute and persistent infection. *J Infect Dis*, *192*(9), 1513-1524. doi:10.1086/491741
- Yao, Q. Y., Ogan, P., Rowe, M., Wood, M., & Rickinson, A. B. (1989). Epstein-Barr virus-infected B cells persist in the circulation of acyclovir-treated virus carriers. *Int J Cancer*, *43*(1), 67-71.
- Yates, J., Warren, N., Reisman, D., & Sugden, B. (1984). A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *81*(12), 3806-3810.
- Young, L. S., & Rickinson, A. B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*, *4*(10), 757-768. doi:10.1038/nrc1452
- Yuan, J., Cahir-McFarland, E., Zhao, B., & Kieff, E. (2006). Virus and cell RNAs expressed during Epstein-Barr virus replication. *J Virol*, *80*(5), 2548-2565. doi:10.1128/jvi.80.5.2548-2565.2006
- Ziegler, J. L., Drew, W. L., Miner, R. C., Mintz, L., Rosenbaum, E., Gershow, J., . . . Yamamoto, K. (1982). Outbreak of Burkitt's-like lymphoma in homosexual men. *Lancet*, *2*(8299), 631-633.
- Zimber, U., Adldinger, H. K., Lenoir, G. M., Vuillaume, M., Knebel-Doeberitz, M. V., Laux, G., . . . et al. (1986). Geographical prevalence of two types of Epstein-Barr virus. *Virology*, *154*(1), 56-66.
- zur Hausen, H., O'Neill, F. J., Freese, U. K., & Hecker, E. (1978). Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumour promotor TPA. *Nature*, *272*(5651), 373-375.
- zur Hausen, H., Schulte-Holthausen, H., Klein, G., Henle, W., Henle, G., Clifford, P., & Santesson, L. (1970). EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature*, *228*(5276), 1056-1058.