

**Neue Komponenten zur Erforschung  
der HLA-B18-restringierten CD8+ T-Zell-Antwort  
gegen das Epstein-Barr-Virus**

**Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Julia Makowski  
aus Tuchola (Polen)

Tübingen  
2011

Tag der mündlichen Qualifikation:

26.09.2011

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dominik Hartl

## Vorwort

Die vorliegende Arbeit zum Thema „Neue Komponenten zur Erforschung der HLA-B18-restringierten CD8+ T-Zell-Antwort gegen das Epstein-Barr-Virus“ beschäftigt sich mit der Etablierung eines Systems für die Analyse der HLA-B18-restringierten CD8+ T-Zell-Antwort. Das MHC-Molekül HLA-B18 wird bis heute in der Literatur kontrovers diskutiert und ist dennoch im Vergleich mit anderen HLA-Molekülen wenig erforscht. Es wird unter anderem als ein Prädispositionsfaktor für einige Krankheiten diskutiert. Die Idee für die Untersuchung der HLA-B18-restringierten CD8+ T-Zell-Antwort gegen das Epstein-Barr-Virus wurde durch die überraschenden Ergebnisse der Analyse vom IFN $\gamma$ -ELISPOT mit vorhergesagten Peptiden für das Allel HLA-A\*0101 bereits in meiner Diplomarbeit gegeben. Ein Zusammenhang zwischen HLA-B18 und den positiven Ergebnissen kristallisierte sich bald heraus. Mein grundsätzliches Interesse an der Entwicklung von individuellen Immuntherapien hat mich auf dieses Thema gebracht.

Die Daten aus dieser Arbeit und der Diplomarbeit sind noch nicht veröffentlicht worden.

Für die Unterstützung und Ermutigung möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie bedanken.

Sigmaringen, 2011

# **Neue Komponenten zur Erforschung der HLA-B18-restringierten CD8+ T-Zell-Antwort gegen das Epstein-Barr-Virus**

## **Kurzfassung**

EBV führt oft zum Tod von immunsupprimierten Transplantationspatienten oder HIV-infizierten Personen und ist mit mehreren Tumorerkrankungen assoziiert. Der Einsatz einer neuen Therapie, der adoptive Transfer von zytotoxischen T-Zellen, ist unter anderem abhängig von der individuellen Epitopmuster-modulierenden HLA-Molekül-Kombination. Das Arbeitsziel ist eine Grundlage für die Untersuchung der HLA-B18-restringierten CD8+ T-Zell-Antwort zu schaffen. Die Analysen umfassen Peptide aus 18 EBV-Antigenen. Im ELISPOT, darunter im neu etablierten Pool-single peptide-ELISPOT, wurden IFN $\gamma$ -Antworten gegen multiple Epitopkandidaten, unter anderem gegen das neue Epitop SESGQFHAF, beobachtet. Um die HLA-B18-restringierte CD8+ T-Zell-Antwort zu studieren, wurden geeignete Komponenten, die transfektante Zelllinie K562-B18 und das HLA-B18-Tetramer, generiert. Das dominante Epitop SELEIKRY und der Epitopkandidat NEIHVYNDY liegen in funktionellen Proteindomänen. Das Epitop SELEIKRY ruft *ex vivo* eine polyfunktionale T-Zell-Antwort hervor. Epitop-spezifische T-Zellen wurden mit dem HLA-B18-SELEIKRY-Tetramer detektiert. Der modifizierte Vital-Assay bestätigte die Zytotoxizität von SELEIKRY- und SESGQFHAF-spezifischen CD8+ T-Zellen. Die durchgeführten Untersuchungen können als Grundlage bei weiterer Erforschung der HLA-B18-restringierten CD8+ T-Zell-Antwort helfen.

## **Schlüsselwörter:**

HLA-B18-Tetramer

transfektante Zelllinie K562-B18

polyklonale T-Zellen

Polyfunktionalität

Pool-single peptide-IFN $\gamma$ -ELISPOT

Vital-Assay

---

# New components for investigation of the HLA-B18 restricted CD8<sup>+</sup> T cell response against Epstein-Barr virus

## Abstract

EBV is frequently cause of death of immunosuppressed transplant patients or HIV-infected persons and is associated with several tumor diseases. The use of a new therapy, the adoptive transfer of cytotoxic T cells, depends inter alia from the epitope-modulating HLA molecule combination. The aim of the work is to provide a basis for the investigation of the HLA-B18 restricted CD8<sup>+</sup> T cell response. Peptides from 18 EBV antigens were investigated in the analysis. In the ELISPOT assay, thereunder in the newly established pool-single peptide-ELISPOT, IFN $\gamma$ -responses to multiple epitope candidates, among others against the new epitope SESGQFHAF, were observed. Appropriate components, the transfectant cell line K562-B18 and HLA-B18-tetramer, were generated to study HLA-B18 restricted CD8<sup>+</sup> T cell response. The dominant epitope SELEIKRY and the epitope candidate NEIHVYNDY are located in functional protein domains. The epitope SELEIKRY elicits *ex vivo* a polyfunctional T cell response. Epitope specific T cells were detected with the HLA-B18-SELEIKRY-tetramer. The modified Vital Assay confirmed the cytotoxicity of SELEIKRY- and SESGQFHAF-specific CD8<sup>+</sup> T cells. The performed investigations can assist as basis in further research of the HLA-B18 restricted CD8<sup>+</sup> T cell response.

## Keywords:

HLA-B18 tetramer

transfectant cell line K562-B18

polyclonal T cells

polyfunctionality

Pool-single peptide-IFN $\gamma$ -ELISPOT

Vital Assay

## Abkürzungsverzeichnis und Schreibweise

### A

- Abb. - Abbildung  
 APC - Allophycocyanin  
 AS - Aminosäure

### B

- Biotinylierung - siehe Beckett D, Kovaleva E, Schatz PJ, 1999  
 Biotinylierungssequenz - Linkersequenz + Biotinylierungserkennungssequenz (BirA Ligase)  
 BCIP - 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat  
 BDmix - aus BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit  
 BSA - Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)  
 bzw. - beziehungsweise

### C

- CC - Cystein-Cystein (Nomenklatur der Chemokine)  
 CD107a - Cluster of Differentiation 107a (Unterscheidungsgruppen 107a)  
 cDNA - komplementäre Desoxyribonukleinsäure  
 „CFSE“ - 5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (Kap. 2.21, S.52)  
 CMV - Zytomegalievirus  
 comp. cells - kompetente Bakterien  
 CTL - zytotoxische T-Zellen

### D

- ddH<sub>2</sub>O - doppelt destilliertes H<sub>2</sub>O  
 DMSO - Dimethylsulfoxid  
 DNA - Desoxyribonukleinsäure  
 dNTPs - Desoxyribonukleosid-Triphosphate  
 DTT - Dithiothreitol

### E

- EBER(s) - EBV encoded RNA(s) (nicht-kodierende RNA(s) aus EBV)  
 EBNA - EBV nuclear antigen (nukleäres Antigen von EBV)  
 EBV - Epstein-Barr-Virus  
 EDTA - Ethylendiamintetraessigsäure  
 ELISPOT - Enzyme Linked Immuno Spot Technique  
 E:T - Effektor zu Zielzellen-Verhältnis  
 etc. - und so weiter

### F

- FACS - fluorescence activated cell sorting  
 FACSCanto II/Calibur - Durchflusszytometer, keine Zellsorter  
 „FarRed“ - CellTrace™ Far Red DDAO-SE (Kap. 2.21, S.52)  
 FCS - fetal calf serum (Fötales Kälberserum)  
 FITC - Fluoresceinisothiocyanat

### G

- g - Gramm

### H

- h - Stunde  
 HIV - Human Immunodeficiency Virus (humanes Immundefizienz-Virus)  
 HLA - Human Leukocyte Antigen (humanes Leukozytenantigen)  
 HPV - Humanes Papillomavirus  
 HSCT - hematopoietic stem cell transplantation (hämatopoetische Stammzelltransplantation)

### I

- IFN $\gamma$  - Gamma-Interferon  
 Ig - Immunglobulin  
 IL-2,4,7 - Interleukin-2,4,7  
 IMDM - Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium  
 IPTG - Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid

### K

- Kap. - Kapitel  
 kbp - Kilo-Basenpaare  
 K562-B18 Transfektanten - K562 transfiziert mit HLA-B\*1801<sup>W486C→G</sup>-pIRES puro 2 Vektor

<b>L</b>	
l	- Liter
LB	- lysogeny broth
LCL(s)	- Lymphoblastoide Zelllinie(n)
LSRII	- Durchflusszytometer
<b>M</b>	
(m)M	- (Milli)Mol pro Liter
µm	- Mikrometer
mg	- Milligramm
MHC	- Haupthistokompatibilitätskomplex
min	- Minute
MIP-1β	- macrophage inflammatory protein 1 beta (CCL4)
ml	- Milliliter
µl	- Mikroliter
MW (Mittelwert)	- arithmetische Mittel
<b>N</b>	
n	- Anzahl der Testproben
NBT	- Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
<i>Nested</i> -PCR	- verschachtelte Polymerase-Kettenreaktion
ng	- Nanogramm
N-/C-terminal	- Amino-/Carboxy-terminal
<b>P</b>	
(a)PBMCs	- (autologe) mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	- phosphatgepufferte Salzlösung
PC7	- Phycoerythrin-Cy7
PE	- Phycoerythrin
PE-Cy7	- Phycoerythrin-Cy7
PHA-L	- Phytohämagglutinin-L
PMA	- Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	- Phenylmethylsulfonylfluorid
psi	- Pound-force per square inch
PTLD	- Posttransplantations-Lymphoproliferative Erkrankung
<b>R</b>	
ρ	- Rho (Massenkonzentration)
RCC	- renal cell carcinoma
rcf	- relative centrifugal force (relative Zentrifugalbeschleunigung)
RNA	- Ribonukleinsäure
rpm	- revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
PRMI	- Roswell Park Memorial Institute
RT	- Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
<b>S</b>	
s	- Sekunde
sddH <sub>2</sub> O	- steril filtriertes doppelt destilliertes H <sub>2</sub> O
SD	- Standardabweichung
SDS-PAGE	- Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOT	- solid organ transplantation (Organtransplantation)
<b>T</b>	
Tab.	- Tabelle
TCR	- T-Zell-Rezeptor
TE	- TRIS/EDTA
Temed	- N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNFα	- Tumornekrosefaktor-Alpha
Transformation ( <i>E. coli</i> )	- Transformation von freier DNA (Plasmid) in kompetente Bakterienzellen
Transformation (EBV)	- durch EBV <i>in vitro</i> : Immortalisierung von B-Zellen (LCL)
TRIS	- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>V,W,X</b>	
VCA	- virale Capsid-Antigene
W486C→G	- Wobble 486C nach G
XGal	- 5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

---

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Liste der verwendeten Buffy Coat- und Leukapherese-Proben.....	16
Tab. 2:	Testpeptide für die Untersuchung der HLA-B18-restringierten CD8+ T-Zell-Antwort.....	18
Tab. 3:	Fortsetzung Tab.2.....	18
Tab. 4:	Fortsetzung Tab.2.....	19
Tab. 5:	Fortsetzung Tab.2.....	19
Tab. 6:	Liste der Antikörper, die für die Tetramerfärbungen verwendet wurden.....	37
Tab. 7:	Liste der Antikörper, die für die intrazelluläre Zytokinfärbung verwendet wurden.....	40
Tab. 8:	Stimulationsprotokoll für die Sortierung von IFN $\gamma$ +CD8+ T-Zellen.....	42
Tab. 9:	Schema für Restriktionsverdau von Klon 3 und 9.....	48
Tab. 10:	Auswertung des Pool-single peptide-ELISPOTs.....	57
Tab. 11:	Zusammenstellung von HLA-B18 Epitopkandidaten aus dem EBV.....	58
Tab. 12:	Analyse vom <i>ex vivo</i> IFN $\gamma$ -ELISPOT für das HLA-B18-restringierte CD8+ T-Zell-Epitop SELEIKRY.....	59
Tab. 13:	HLA-B18-Monomere.....	70
Tab. 14:	Standardabweichungen für Vital-Assay (SELEIKRY).....	82
Tab. 15:	Standardabweichungen für Vital-Assay (SESGQFHAF).....	83
Tab. 16:	Reverse Verteilung von HLA-B18 Epitopkandidaten bei lytischen und latenten Antigenen.....	85
Tab. 17:	Zusammenfassung der Experimente.....	87

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schema der Untersuchung der HLA-B18-restringierten CD8+ T-Zell-Antwort gegen Epitope aus EBV.....	13
Abb. 2:	Ursprüngliche Sequenz für die rekombinante $\alpha$ -Kette HLA-B18 (HLA-B1801 expression_opt pET3a).....	27
Abb. 3:	Der Pool-single peptide-ELISPOT.....	56
Abb. 4:	<i>Ex vivo</i> IFN $\gamma$ -ELISPOT für den HLA-B18 Epitopkandidat NEIHVYNDY.....	60
Abb. 5:	<i>Ex vivo</i> IFN $\gamma$ -ELISPOT für den HLA-B18 Epitopkandidat RPSPTVFYNIPPMPL.....	60
Abb. 6:	IFN $\gamma$ -ELISPOT nach Pool-Stimulation mit dem Epitopkandidat SESGQFHAF.....	61
Abb. 7:	<i>Ex vivo</i> Detektion von seltenen SESGQFHAF-spezifischen IFN $\gamma$ -Antworten.....	61
Abb. 8:	Prozentuale Verteilung der positiv und negativ getesteten Peptide.....	62
Abb. 9:	Kartierung von HLA-B18 Epitopkandidaten.....	63
Abb. 10:	Verkürzte Darstellung der Arbeitsschritte bei der Konstruktion des HLA-B18 pET3a Vektors.....	64
Abb. 11:	DNA- und Aminosäuresequenz für <i>inclusion bodies</i> der rekombinanten $\alpha$ -Kette HLA-B18.....	65
Abb. 12:	Induktionstests für <i>inclusion bodies</i> der rekombinanten $\alpha$ -Kette HLA-B18... ..	65
Abb. 13:	Tetramertitration vom HLA-B18-SELEIKRY-Tetramer.....	67
Abb. 14:	Tetramerfärbung mit dem HLA-B18-SELEIKRY-Tetramer.....	67
Abb. 15:	Herabregulation des T-Zell-Rezeptors.....	68
Abb. 16:	Bestimmung des Phänotyps Tetramer-positiver CD8+ T-Zellen.....	69
Abb. 17:	Erster FPLC-Auftrennungsschritt von HLA-B18-Monomeren.....	70
Abb. 18:	<i>Ex vivo</i> Tetramerfärbung mit weiteren HLA-B18-Tetrameren.....	71
Abb. 19:	Repräsentative Darstellung für unterschiedliche T-Zell-Funktionen.....	73
Abb. 20:	Funktionsmuster Epitop-spezifischer CD8+ T-Zellen.....	74
Abb. 21:	Prozentuale Verteilung der multifunktionalen Zellen anhand der Anzahl von Funktionen.....	75
Abb. 22:	HLA-B18-Epitopsuche mit intrazellulärer Zytokinfärbung für IFN $\gamma$ .....	76
Abb. 23:	Schematische Darstellung der Arbeitsschritte bei der Konstruktion des HLA-B*1801 <sup>W486C→G</sup> pIRES puro2 Vektors.....	77

---

Abb. 24:	HLA-B*1801 <sup>W486C→G</sup> cDNA-Sequenz für den HLA-B*1801 <sup>W486C→G</sup> pIRES puro2 Vektor.....	78
Abb. 25:	Schematische, vereinfachte Darstellung des HLA-B*1801 <sup>W486C→G</sup> pIRES puro2 Vektors.....	78
Abb. 26:	Die K562-B18 Transfektanten.....	79
Abb. 27:	Intrazelluläre Zytokinfärbung für IFN $\gamma$ von polyklonalen CD8+ T-Zellen.....	80
Abb. 28:	Der Vital-Assay.....	81
Abb. 29:	Vorschläge für weitere Untersuchungen der HLA-B18-restringierten CD8+ T-Zell-Antwort.....	94

# Inhaltsverzeichnis

Vorwort.....	III
Titel, Kurzfassung und Schlüsselwörter.....	IV
Titel, Kurzfassung und Schlüsselwörter in englischer Sprache.....	V
Abkürzungsverzeichnis und Schreibweise.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abbildungsverzeichnis.....	IX
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Immunologie der Epstein-Barr-Virus (EBV)-Infektion.....	1
1.1.1 Hauptmerkmale des EBV.....	1
1.1.2 Latente und lytische Proteine des EBV und ihre Funktionen.....	2
1.1.3 Einfluss von viralen Proteinen des EBV auf die Antigen-Präsentation der Zelle.....	4
1.1.4 Erworbene Immunantwort gegen das EBV.....	5
1.1.4.1 CD8+ T-Zell-Antwort gegen das EBV.....	6
1.1.4.2 Rolle von polyfunktionalen CD8+ T-Zellen.....	7
1.2 Immuntherapie bei EBV-assoziierten Erkrankungen.....	8
1.2.1 Adoptiver T-Zell-Transfer bei der Posttransplantations- Lymphoproliferativen Erkrankung.....	8
1.2.2 Adoptiver T-Zell-Transfer bei EBV-assoziierten Tumorerkrankungen.....	10
1.3 Fragestellung, Ziel und Verlauf der Arbeit.....	11
1.3.1 Fragestellung der Arbeit.....	11
1.3.2 Ziel der Arbeit.....	12
1.3.3 Verlauf der Arbeit.....	12
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
2.1 Buffy Coats und Leukaphereseprodukte.....	15
2.2 Zelllinien.....	17
2.3 <i>E.coli</i> -Stämme.....	17
2.4 Vektoren.....	17
2.5 Synthetische Peptide.....	17
2.6 Isolierung von PBMCs mittels der Dichtegradientenzentrifugation.....	19
2.7 Kryokonservierung von PBMCs und Zelllinien.....	20

2.8	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	20
2.9	<i>Ex vivo</i> IFN $\gamma$ -ELISPOT.....	21
2.10	Zellkultur mit Stimulation von PBMCs mit synthetischen Peptiden für den IFN $\gamma$ -ELISPOT (Expansionskultur).....	22
2.11	IFN $\gamma$ -ELISPOT nach Zellkultur mit Stimulation von PBMCs mit synthetischen Peptiden.....	23
2.12	Der HLA-B18 pET3a Vektor.....	24
2.13	Rückfaltung von HLA-B18 MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexen.....	31
2.13.1	<i>Inclusion bodies</i> (rekombinante $\alpha$ -Kette HLA-B18).....	31
2.13.2	HLA-B18 MHC-Klasse-I-Peptid-Tetramere.....	33
2.13.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	35
2.14	<i>Ex vivo</i> Tetramerfärbung (MHC-Klasse-I).....	36
2.15	Expansion von Epitop-spezifischen T-Zellen durch Stimulation mit synthetischen Peptiden für die Untersuchung mittels intrazellulärer Zytokinfärbung.....	37
2.16	Intrazelluläre Zytokinfärbung.....	38
2.17	Expansion von Epitop-spezifischen T-Zellen durch Stimulation mit synthetischen Peptiden für die Sortierungen von IFN $\gamma$ +CD8+ T-Zellen.....	41
2.18	Färbung für Sortierung von IFN $\gamma$ +CD8+ T-Zellen.....	42
2.19	Expansion von sortierten IFN $\gamma$ +CD8+ T-Zellen.....	43
2.20	K562-B18 Transfektanten.....	44
2.20.1	RNA-Isolierung und cDNA-Herstellung.....	46
2.20.2	Der HLA-B*1801 <sup>W486C→G</sup> pGEM T Easy Vektor.....	48
2.20.3	Der HLA-B*1801 <sup>W486C→G</sup> pIRES puro2 Vektor.....	50
2.20.4	Transfektion von K562 mit dem linearisierten HLA-B*1801 <sup>W486C→G</sup> pIRES puro2 Vektor.....	51
2.20.5	Selektion von HLA-positiven K562-B18 Transfektanten.....	51
2.20.6	Bestätigung der HLA-B*1801 <sup>W486C→G</sup> -RNA in K562-B18 Transfektanten.....	52
2.21	Der Vital-Assay.....	52
2.22	Andere Geräte.....	54
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>55</b>
3.1	Identifikation von HLA-B18-restringierten CD8+ T-Zell- Epitopkandidaten mit dem IFN $\gamma$ -ELISPOT.....	55
3.2	Kartierung von HLA-B18 Epitopkandidaten in EBV-Proteinen.....	62

3.3	Die rekombinante MHC-Klasse-I $\alpha$ -Kette HLA-B18 für die Herstellung von MHC-Peptid-Komplexen.....	64
3.4	Detektion von Epitop-spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen mit HLA-B18-Tetrameren.....	66
3.4.1	Das HLA-B18-SELEIKRY-Tetramer.....	66
3.4.2	Weitere HLA-B18-Tetramere.....	69
3.5	Polyfunktionalität SELEIKRY-spezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	72
3.6	Detektion von IFN $\gamma$ -produzierenden CD8 <sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit weiteren HLA-B18 Epitopkandidaten.....	75
3.7	Zytotoxizität von Epitop-spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	77
3.7.1	Der HLA-B*1801 <sup>W486C→G</sup> pIRES puro2 Vektor.....	77
3.7.2	Die Generierung von K562-B18 Transfektanten.....	78
3.7.3	Der Vital-Assay.....	79
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>84</b>
4.1	Erweiterte Möglichkeiten bei der Untersuchung der HLA-B18-restringierten CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Antwort.....	84
4.2	Immunologische Aspekte der HLA-B18-restringierten CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Antwort und Aspekte der angewandten Methoden.....	84
4.2.1	Variabilität der Dominanz von HLA-B18-restringierten CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Epitopkandidaten.....	84
4.2.2	Verfahren zum Ausschluss von anderen HLA-Restriktionen bei HLA-B18 Epitopkandidaten.....	86
4.2.3	Zwei dominante HLA-B18-restringierte CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Epitopkandidaten sind in funktionellen Proteindomänen positioniert.....	88
4.2.4	Das dominante HLA-B18-restringierte CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Epitop SELEIKRY.....	88
4.2.5	Effektive Auslese von HLA-B18 Epitopkandidaten mit dem Pool-single peptide-ELISPOT.....	89
4.2.6	Möglichkeiten und Grenzen der Färbung mit HLA-B18-Tetrameren.....	90
4.2.7	Die Detektion von multiplen T-Zell-Funktionen bei geringen Epitop-spezifischen Zellpopulationen.....	91
4.2.8	Der Vital-Assay als zuverlässige Alternative zu herkömmlichen Zytotoxizitäts-Assays.....	93

4.3	Erweitertes Modell für die Untersuchung der HLA-B18-restringierten CD8+ T-Zell-Antwort gegen das Epstein-Barr-Virus.....	93
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung der Arbeitsergebnisse und Schlussfolgerungen.....</b>	<b>96</b>
5.1	Zusammenfassung der Arbeitsergebnisse.....	96
5.2	Schlussfolgerungen.....	97
<b>6</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis.....</b>	<b>98</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>112</b>

---

# 1. Einleitung

## 1.1 Immunologie der Epstein-Barr-Virus (EBV)-Infektion

### 1.1.1 Hauptmerkmale des EBV

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) gehört zur Familie der Gammaherpesviren und ist ein lymphotropes Virus [1]. EBV etabliert nach der Infektion eine lebenslange Persistenz im Menschen. Der virale Mantel mit vielen viralen Glykoproteinen bildet die äußere Hülle, darunter befindet sich ein Proteintegument, welches das Nukleokapsid mit der darin enthaltenen viralen DNA umgibt [1]. Das EBV-Genom besteht aus einer linearen, doppelsträngigen DNA von der multiple Proteine kodiert werden. Die DNA-Sequenz vom EBV-Stamm B95-8 ist 172 kbp lang [2]. Man unterscheidet zwischen lytischen und latenten Proteinen. Mehr als 95% der gesamten erwachsenen Bevölkerung sind weltweit mit EBV infiziert [9]. Eine Infektion der Epithelzellen im Oropharynx führt zur lytischen Phase des Virus und damit verbundener Produktion von Viruspartikeln [3]. Eine Infektion von ruhenden B-Zellen führt normalerweise zu einer latenten Phase, in der das Virus in der Zelle persistiert [4]. Obwohl fast ausschließlich B-Zellen mit EBV infiziert werden können, können auch andere Zellen, wie T-Zellen oder natürliche Killerzellen (NK-Zellen) infiziert werden [5,6]. Der Rezeptor für EBV auf der Oberfläche von B-Zellen ist CD21 [7]. Durch die Bindung von dem viralen Glykoprotein gp350 an diesen Rezeptor kann das EBV in die B-Zelle eindringen. Als Corezeptor bei der Infektion dient für EBV das MHC-Klasse-II-Molekül, welches vom viralen Glykoprotein gp42 gebunden wird [8]. Bei der latenten Infektion unterscheidet man hauptsächlich zwischen drei Latenztypen, genannt Latenz I bis III. Latenz III wird in EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen und in *in vitro* EBV-transformierten B-Zellen beobachtet [9]. Es wurde auch ein viertes Expressionsmuster bei B-Zellen, die im peripheren Blut zirkulieren, und in manchen gesunden Trägern detektiert wird (EBER1, LMP2A- und gegebenenfalls EBNA1-mRNA), beschrieben [10]. Eine Reihe von Strategien auf der Seite von EBV einerseits und der des menschlichen Immunsystems andererseits ermöglicht eine ausgeglichene Co-Existenz in gesunden Trägern. Gerät das Gleichgewicht zwischen dem Virus und dem Wirt aufgrund unterschiedlicher Faktoren ins Schwanken, kommt es zum Ausbruch von Krankheiten. Eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus verläuft in den meisten Fällen symptomlos und geschieht in der Regel sehr früh in der Kindheit. Der Hauptübertragungsweg ist der Speichel [26]. Verzögert sich die Erstinfektion ins jugendliche Alter oder noch später kann das Epstein-Barr-Virus die infektiöse Mononukleose hervorrufen [11]. Die infektiöse Mononukleose wird auch Pfeiffersches Drüsenfieber genannt. 1889 beschrieb Pfeiffer die klinischen Symptome der infektiösen Mononukleose. Die Hauptmerkmale dieser Erkrankung sind unter anderem Fieber, Halsschmerzen und Lymphadenopathie [26].

Hämatologisch ist die Erkrankung durch Expansion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen gekennzeichnet [12]. Unter bestimmten Umständen spielt EBV möglicherweise bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen eine Rolle [13] und ist mit Tumorerkrankungen wie dem Burkitt-Lymphom [14], dem Nasopharynxkarzinom (NPC) [15] und dem Hodgkin-Lymphom [16] assoziiert. EBV verursacht gefährliche Komplikationen in Form von Lymphoproliferativen Erkrankungen bei immunsupprimierten Patienten nach Transplantationen [134] und bei Personen mit einer HIV-Infektion [17]. Sie entstehen aufgrund einer eingeschränkten T-Zell-Funktionalität. Solche Lymphome bestehen aus Zellen, welche EBV-transformierten LCLs ähneln, die virale Proteine der latenten Phase exprimieren [18,19,20]. Die erste Assoziation des EBV mit einer malignen Erkrankung kristallisierte sich in den 60er Jahren heraus. Denis Burkitt untersuchte intensiv maligne Lymphome bei Kindern in Afrika. 1958 und 1961 veröffentlichte er Publikationen, die diese maligne Erkrankung näher beschreiben [21,22]. Epstein, Achong und Barr konnten 1964 mit Hilfe der Elektronenmikroskopie Virenpartikel in kultivierten Lymphoblasten aus einem Burkitt Lymphom nachweisen [23].

### **1.1.2 Latente und lytische Proteine des EBV und ihre Funktionen**

Annähernd 100 Gene werden durch die doppelsträngige DNA von EBV kodiert [24]. Während die meisten Proteine in der lytischen Phase exprimiert werden, beschränkt sich die Expression der latenten Phase auf wenige Gene. Dies sind die Proteine EBNA 1, EBNA 2, EBNA 3A, EBNA 3B, EBNA 3C, EBNA LP, die Membranproteine LMP 1 und LMP 2A, LMP 2B, zwei kleine RNAs (EBER1 und EBER2) und Transkripte aus der *Bam*HI-A Region [25]. Ihre Funktionen und Wechselwirkungen werden intensiv erforscht. Die Expression von EBNA-1 ist in EBV-assoziierten Tumoren nachweisbar und wird für die Immortalisierung von B-Zellen durch EBV benötigt [26,27]. Das Protein EBNA-1 bindet an die Sequenz oriP auf dem EBV-Genom und assoziiert mit mitotischen Chromosomen der Zelle. Dies ermöglicht der EBV-DNA sich während der Zellteilung zu erhalten [28,29,30]. EBNA-2 wird ebenfalls für die Transformation von B-Zellen benötigt [31,32]. EBNA-2 reguliert die Expression von viralen Proteinen, wie dem LMP-1 [33] und induziert die Expression von zellulären Proteinen, darunter CD23 und c-myc [34,35]. EBNA2 interagiert mit zellulären Proteinen, wie CBF1 (C-promoter binding factor 1) [36]. 1989 zeigte man, dass Zellen durch eine Deletion im Gen für ein weiteres latentes Protein, das EBNA LP, nur in Anwesenheit von Feederzellen immortalisiert werden können [37]. Wenn Zelllinien etabliert waren, gab es keinen signifikanten Unterschied im Wachstum von Zellen, die mit der Wildtyp- oder der deletierten Form des Gens transformiert worden sind [38]. Das Protein EBNA-LP bindet an eine Reihe von zellulären Proteinen, wie p53, Retinoblastomprotein (Rb) oder Hitzeschockprotein 70 [39,40]. Die EBNA3-Proteine regulieren die Expression von viralen und einigen zellulären Genen. Man unterscheidet bei den EBNA3-Proteinen, zwischen EBNA3A,

EBNA3B und EBNA3C. EBNA3a und EBNA3C werden für die Immortalisierung von B-Zellen benötigt [41,42]. EBNA-3C induziert die Expression von CD21 und verstärkt die Expression von LMP [43,44], EBNA3B verstärkt die Expression von Vimentin und die Expression von CD40 auf der Zelloberfläche [45]. LMP1 wird ebenfalls wie EBNA1 bei latenter und lytischer Infektion von B-Zellen exprimiert [46,47]. LMP1 wird für die Transformation von B-Zellen durch EBV benötigt [48]. Das Protein LMP1 ist mit dem Zytoskelett der Zelle durch eine TRAF-interagierende Domäne assoziiert und besitzt Transmembrandomänen, die in den „Lipid Rafts“ in der Membran der Zelle verankert sind [49]. LMP1 imitiert eine konstitutiv aktivierte Form von CD40 [50]. CD40 gehört zur Tumor Nekrosefaktor (TNF) Rezeptorfamilie und das virale funktionelle Homolog hat mehrere anti-apoptotische Effekte. LMP1 induziert die Expression von A20, Mcl-1 (myeloid cell leukemia) und Bcl-2 [51,52,53]. Eine alternative Splice-Form des Proteins BARF0, die RK-BARF0, bewirkt die Induktion der Expression von LMP1 [54]. Ein weiteres Membranprotein, das nicht für die Transformation von B-Zellen benötigt wird, ist LMP2 [55]. Es werden zwei Formen von LMP2 in EBV-infizierten B-Zellen exprimiert, das LMP-2A und das LMP-2B [56]. Die Reaktivierung von EBV in latent infizierten B-Zellen wird durch LMP2 verhindert. Eine Kreuzvernetzung von Immunglobulin auf der Oberfläche von EBV-transformierten LCLs, in der Abwesenheit von LMP2 (Deletionsmutante), kann die lytische Replikation von EBV induzieren. Die Expression von LMP2A blockiert diesen Effekt [57]. In latent infizierten EBV-transformierten B-Zellen werden zwei polyadenylierte, nicht translatierte RNAs (EBER 1, EBER 2) exprimiert. Beide RNAs sind nicht notwendig für die Transformation von B-Zellen [58]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Transfektion mit den EBER-RNAs die Expression von IL-10 heraufreguliert [59]. Eine Publikation aus dem Jahr 2005 schreibt den beiden EBERs eine wichtige Rolle bei effizienter Transformation von B-Zellen zu [60]. Der größte Anteil von Genen wird in der lytischen Phase exprimiert. Sie werden in „late“ (L)-, „early“ (E)- und „immediate-early“ (IE)-Gene klassifiziert [177]. Die L-Gene kodieren Strukturproteine des Virus. Die E-Gene kodieren Proteine, die unter anderem für die DNA-Replikation wichtig sind. Die IE-Gene regulieren hauptsächlich die Genexpression im Virus [177]. Die IE-Proteine BZLF1 und BRLF1 aktivieren die Transkription von lytischen viralen Genen [61,62]. Die Interaktion von der Untereinheit p65 aus NF- $\kappa$ B mit BZLF1 verhindert die Fähigkeit von BZLF1 virale Genexpression von einigen EBV-Promotern zu transaktivieren [63]. Die Überexpression von p53 verhindert die Fähigkeit von BZLF1 die Induktion von der latenten zur lytischen Phase einzuleiten [64]. Beispiele für E-Proteine sind die virale DNA-Polymerase (BALF5), „DNA polymerase processivity faktor“ (BMRF1) und „single stranded DNA-binding protein homolog“ (BALF2) [65]. Virale Glykoproteine, Proteine des Nukleokapsids und ein virales Zytokin werden als L-Proteine klassifiziert [177]. Das Protein, welches durch das Gen BCRF1 kodiert wird, ist ein Beispiel für ein L-Protein. Dieses zeigt eine große Übereinstimmung der Aminosäuresequenz

mit dem humanen IL-10 [66]. Die Expression von vIL-10 (kodiert von BCRF1) spielt eine Rolle bei der Transformation von B-Zellen [67]. Die Kenntnis der Funktionen und Interaktionen von EBV-Proteinen mit humanen Proteinen ist wichtig für das Verständnis der EBV-assoziierten Tumorgenese. Latente Proteine spielen eine Rolle bei der Entstehung von EBV-assoziierten Tumorerkrankungen [68,69,70]. Die Relevanz von lytischen Proteinen für Tumorerkrankungen ist nicht geklärt. Eine neuere Forschungsarbeit deutet darauf hin, dass das lytische Protein Zta ebenfalls von Bedeutung sein könnte [148].

### 1.1.3 Einfluss von viralen Proteinen des EBV auf die Antigen-Präsentation der Zelle

Die Präsentation von Epitopen aus endogen exprimierten Antigenen auf den MHC-Klasse-I-Molekülen benötigt die Degradation der Antigene im Cytosol und den Transport von den erzeugten Peptiden in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) durch den TAP1/TAP2 (transporters associated with antigen processing)-Komplex [71,83]. In der ER assoziieren die durch das Proteasom erzeugten Peptide mit der MHC-Klasse-I schweren Kette und dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin. Dieser Komplex wird an die Zelloberfläche transportiert und zytotoxischen T-Zellen präsentiert [72,73]. Das 26S-Proteasom besteht aus einer 20S proteolytischer Einheit und zwei 19S regulatorischen Einheiten [74]. Das 26S-Proteasom baut Ubiquitin-markierte Proteine ab. Die Aufklärung der Mechanismen, die zur Modulation des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) durch Viren führen, spielt zunehmend eine Rolle beim Verständnis der Pathogenese der assoziierten Erkrankungen [75]. Die Modulation des UPS durch das Virus hat Einfluss auf Antigen-Präsentation von T-Zell-Epitopen. Nicht zuletzt wurden Kandidaten für Ubiquitin-spezifische Proteasen von EBV identifiziert [76]. Das latente Protein EBNA1 interagiert mit der zellulären Ubiquitin-spezifischen Protease USP7. EBNA1 bindet die N-terminale Domäne von USP7 mit einer 10-fach stärkeren Affinität als p53. EBNA1 könnte deshalb die Funktion von p53 *in vivo* durch Konkurrenz mit USP7 beeinflussen [77]. Außerdem können EBV-Proteine wie EBNA3C mit zellulären Ubiquitin-Ligasen interagieren. EBNA3C rekrutiert den SCF<sup>Skp2</sup>-Ubiquitin-Ligase-Komplex, welches die Ubiquitylierung und Degradation des zellulären Proteins Rb vermittelt [78]. Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Funktion des Proteins LMP-1. Einerseits bewirkt dieses Protein eine Heraufregulation des TAP und der *trans*-Präsentation von MHC-Klasse-I-restringierten Epitopen in B-Zellen [79], andererseits kann dieses Protein der eigenen *cis*-Präsentation auf dem MHC-Klasse-I-Molekül entgegen ohne die eigene Fähigkeit der *trans*-Präsentation von CD8+ T-Zell-Epitopen einzuschränken [80]. Beim lytischen Protein BZLF1 konnte man eine Rolle bei dem Protein-assoziierten ECS (Elongin B/C-Cul2/5-SOCS-box protein)-Ligase-Komplex in der Regulation von phosphoryliertem p53 während der lytischen Infektion demonstrieren [81]. Für das Protein BILF1, welches ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor ist, konnte gezeigt werden, dass jenes auf

dem exozytotischen und endozytotischen Weg die Präsentation auf MHC-Klasse-I-Molekülen beeinflusst. Dies wiederum beeinträchtigt die Erkennung durch T-Zellen [82]. Auf der anderen Seite findet man Mechanismen in der Zelle, die den Mechanismen des Virus entgegenwirken. Ein Beispiel hierfür ist der Proteasom-abhängige und TAP-unabhängige Weg der Antigenpräsentation [83]. Die Kenntnis solcher Mechanismen kann bei der Entwicklung neuer Therapien helfen.

#### **1.1.4 Erworbene Immunantwort gegen das EBV**

Es ist noch nicht endgültig geklärt, wie groß die Rolle der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) als Teil der angeborenen Immunität bei der Kontrolle von EBV-Infektionen ist. Das Risiko bei Patienten an PTLD zu erkranken ist größer, wenn das Stammzellentransplantat entweder von T-Zellen oder T-Zellen und NK-Zellen abgereichert ist [84]. Aufgrund der Herabregulation von HLA-Klasse-I-Molekülen, spielen vermutlich NK-Zellen eine Rolle bei der Kontrolle der lytischen Infektion von Zellen [85]. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass EBV durch den Toll-like-Rezeptor 2 erkannt wird. EBV induziert bei Monozyten die Sekretion von MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1) [86]. Viel detaillierteres Wissen existiert über die humorale und zelluläre erworbene Immunantwort gegen das Epstein-Barr-Virus. Die ersten Untersuchungen der Immunantwort gegen EBV konzentrierten sich auf die Serologie und die zelluläre adaptive Immunantwort. EBNA-1 IgG ist bei gesunden Trägern, bei denen die EBV-Infektion länger zurück liegt, detektierbar. Bei IM-Patienten sind diese Antikörper nicht detektierbar, erst im Verlauf von Monaten nach der IM sind diese nachweisbar [87]. Erhöhte Werte für Antikörper, die gegen VCA gerichtet sind (serologische Titer für VCA/IgA), sind mit einem höherem Risiko verbunden an NPC zu erkranken [88]. Bei der akuten infektiösen Mononukleose (IM) werden atypische Lymphozyten beobachtet, die keine Virus-infizierte B-Zellen sind. Dies führte zu der Vermutung, dass die zelluläre Immunantwort bei der Kontrolle der EBV-Infektion eine große Rolle spielt. Moss et al. zeigte, dass das Wachstum von EBV-transformierten B-Zellen durch T-Zellen inhibiert wird [89]. Bei IM-Patienten handelt es sich hierbei um eine größtenteils stark expandierte HLA-Klasse-I-restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort [90,102]. Die CD4<sup>+</sup> T-Zell-Antwort gegen EBV ist nicht so gut erforscht wie die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort. Es sind weitaus mehr CD8<sup>+</sup> als CD4<sup>+</sup> T-Zell-Epitope bekannt [91,177]. CD4<sup>+</sup> T-Zell-Antworten gegen einzelne lytische und latente Antigene, wie BZLF-1, BMLF-1, EBNA-3A und EBNA-1 sind detektiert worden [92]. Weitere Arbeiten führten zur Identifizierung von CD4<sup>+</sup> T-Zell-Epitopen aus EBNA- und LMP-Proteinen [93]. Aber auch gegen ein L-Protein, das gp340, sind CD4<sup>+</sup> T-Zell-Antworten gefunden worden [94]. Da Tumorerkrankungen HLA-Klasse-I-defizient sein können [95], werden CD4<sup>+</sup> T-Zellen als eine Möglichkeit für den adoptiven T-Zell-Transfer nicht ausgeschlossen [9]. Da EBNA1 in den Latenztypen I bis III von EBV exprimiert wird, konzentrieren sich viele Arbeiten auf die Determination von Epitopen aus diesem Protein [96,97,98].

#### 1.1.4.1 CD8+ T-Zell-Antwort gegen das EBV

Bei IM-Patienten beobachtet man eine Expansion von EBV-spezifischen CD8+ T-Zellen [99]. Zahlreiche Untersuchungen der CD8+ T-Zell-Antwort von IM-Patienten zeigen eine Fülle von Epitopen [100,101,106]. Individuelle Epitop-spezifischen Populationen in IM-Patienten können bei lytischen Antigenen bis 44% der gesamten CD8+ T-Zell-Population betragen. T-Zellen gegen latente Epitope hingegen können 2,2%, bei bestimmten Epitopen bis zu 5% der CD8+ T-Zell-Population ausmachen [102,113]. Individuelle Epitop-spezifische CD8+ T-Zell-Populationen für lytische Epitope und für latente Epitope in gesunden Virus-Trägern sind weit aus geringer [103]. In älteren gesunden Trägern (über 60 Jahre alt) können jedoch individuelle EBV-spezifische Antworten bis zu 14% der CD8+ T-Zellen erreichen [104]. Die ersten Klone für Antigen-spezifische CD8+ T-Zellen gegen lytische Epitope wurden aus entzündeten Gelenken von Patienten mit rheumatoider Arthritis generiert [105]. Die Screening-Arbeit mit IM-Klonen enthüllte CD8+ T-Zell-Antworten gegen lytische Antigene, die durch eine Breite von HLA-A, -B und -C Allelen restringiert sind. Die meisten Antworten konzentrieren sich auf zwei IE-Proteine, BZLF1 und BRLF1, und wenige Antworten wurden gegen L-Proteine detektiert [106,161,162]. Eine interessante Beobachtung wurde in einer weiteren Arbeit gemacht. Es wurde festgestellt, dass die Expression von HLA-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche der Zelle ab einem bestimmten Zeitpunkt in der frühen lytischen Phase zu sinken beginnt und bei allen spät-lytischen Zellen niedrig bleibt [107]. Neure Arbeiten zeigen, dass ein lytisches E-Protein, BNLF2a, die Präsentation auf HLA-Klasse-I-Molekülen inhibiert indem es die Funktion des TAP1/TAP2-Peptid-Transporters blockiert [108]. Für latente CD8+ T-Zell-Epitope gilt, dass die T-Zell-Antworten sich vorzugsweise gegen Epitope aus den Proteinen EBNA 3A, EBNA 3B und EBNA 3C richten. In bestimmten HLA-Kontext werden auch CD8+ T-Zell-Antworten gegen Proteine aus LMP 2 und EBNA 2 detektiert. Wenige Antworten werden gegen EBNA LP und LMP 1 beobachtet [109,110,177]. Gelegentlich ist zu beobachten, dass im bestimmten HLA-Allel-Kontext ein Epitop aus einem subdominanten Antigen frequent von CD8+ T-Zellen erkannt werden kann [111]. Erste Untersuchungen am Protein EBNA1 haben keine CD8+ T-Zell-Antworten hervorgebracht [109,110]. Es konnte gezeigt werden, dass die interne 250 Aminosäure große Glycin-Alanin-Repeat(GAr)-Domäne das Protein EBNA1 vor CD8+ T-Zell-Erkennung schützt [112]. Spätere Arbeiten konnten zeigen, dass im Zusammenhang mit bestimmten HLA-Allelen, wie dem HLA-B\*3501, auch dominante CD8+ T-Zell-Epitope aus EBNA1 detektiert werden [113]. Die Epitope lösen IFN $\gamma$ -Antworten aus, und die spezifischen CD8+ T-Zellen schränken das LCL-Wachstum stark ein [114]. Nur bei gesunden Trägern befinden sich Antigen-spezifische CD8+ T-Zellen gegen lytische und latente Antigene, stärker in den Tonsillen als im Blut [115,116]. Zusätzlich akkumulieren CD8+ T-Zellen, die gegen latente Epitope gerichtet sind, stärker in den Tonsillen, als CD8+ T-Zellen, die lytische Epitope erkennen. Dies

korreliert mit einer höheren Expression von „lymphoid homing“ Markern CCR7 und CD62L bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut, die latente Epitope erkennen [116]. In gesunden EBV-Trägern ist der Phänotyp der Gedächtnis-T-Zellen von der Identität des spezifischen Antigens abhängig. Daher tendieren hauptsächlich Epitop-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die gegen lytische Antigene gerichtet sind, einen Effektor/Gedächtnis-Phänotyp (CCR7<sup>-</sup> CD45RO<sup>+</sup>) zu haben. CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die gegen latente Epitope gerichtet sind, überspannen die Zentral/Gedächtnis- und Effektor/Gedächtnis-Kompartimente (CD45RO<sup>+</sup>) [117,118,177].

#### **1.1.4.2 Rolle von polyfunktionalen CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

Polyfunktionale T-Zellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle von viralen Infektionen. Besonders die Produktion von IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2, CD107a und MIP-1 $\beta$  durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei Virus-Infektionen werden zunehmend untersucht [129,131,133]. Während einer Immunantwort induziert die Antigenbindung an den T-Zell-Rezeptor mit Beteiligung von kostimulierenden Molekülen die Produktion von Interleukin-2 (IL-2) [120]. 72 Gene in PBMCs, 27 ausschließlich in T-Zellen werden durch IL-2 reguliert. IL-2 beeinflusst somit das Wachstum und die Differenzierung aber auch das Überleben von Antigen-spezifischen zytotoxischen T-Zellen. [119,120,121]. IFN $\gamma$ , ein wichtiges Zytokin bei viralen Infektionen, hat immunoregulatorische Funktionen und Anti-Tumor-Eigenschaften [122] und nimmt Einfluss auf die Komposition und Funktion des Proteasoms [122,123,124]. CD107a wird als Degranulationsmarker verwendet, da gezeigt wurde, dass die Expression von CD107a mit der lytischen Kapazität von zytotoxischen T-Zellen korreliert [125]. Neben direkten cytolytischen Mechanismen können CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch durch nicht cytolytische Mechanismen mit Hilfe von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  eine Virusinfektion kontrollieren [126]. Ein weiteres Beispiel für einen nicht cytolytischen Mechanismus von CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist unter anderem die Produktion von MIP-1 $\beta$  [127]. MIP-1 $\beta$  ist ein CC-Chemokin und als solches ein Attractant für eine Reihe von Immunzellen [128]. Nicht nur in HIV-infizierten Personen [129], sondern auch in Transplantationspatienten nehmen polyfunktionale T-Zellen Einfluss auf den Verlauf der Infektion [130]. Eine Publikation aus 2010 suggeriert, dass der Verlust von polyfunktionalen T-Zellen und ein Anstieg der monofunktionalen HIV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit einer Progression der Erkrankung, unabhängig von der HLA-Restriktion (HLA-B und HLA-C), assoziiert ist [131]. Eine Untersuchung von gesunden EBV-Trägern zeigte, dass T-Zellen, die gegen EBNA3-6 und lytische Antigene gerichtet sind, eine größere polyfunktionale T-Zell-Antwort hervorbringen, gegenüber von T-Zellen, die gegen LMP1, LMP2 und EBNA1 gerichtet sind. Diese zeigten ein defizientes polyfunktionales Profil. Man nimmt deshalb an, dass diese Unterschiede bei Tumorerkrankungen, wie dem Hodgkin-Lymphom, Einfluss haben könnten [132]. Gasser et al. beobachtete, dass der Verlust von polyfunktionalen T-Zellen in HIV-positiven

Transplantationspatienten mit einer Reaktivierung von EBV assoziiert ist [133]. Makedonas et al. schlägt vor, dass sich die Definition „polyfunktional“ nicht nur anhand der Anzahl von T-Zell-Funktionen festlegen sollte [197].

## **1.2 Immuntherapie bei EBV-assoziierten Erkrankungen**

### **1.2.1 Adoptiver T-Zell-Transfer bei der Posttransplantations-Lymphoproliferativen Erkrankung**

Die Posttransplantations-Lymphoproliferative Erkrankung (PTLD) umfasst ein breites Spektrum von benignen Erkrankungen mit Vermehrung von Zellen bis hin zu malignen Lymphomen. Sie tritt bei Patienten nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) oder Organtransplantationen (SOT) auf [25]. PTLD-Erkrankungen sind mit einer hohen Sterblichkeitsrate verbunden [134]. Man erkannte, dass diese Erkrankung mit einer Erstinfektion mit EBV oder der Reaktivierung von EBV im Zusammenhang steht [135]. Darüber hinaus konnte man in folgenden Arbeiten die Expression von viralen Genen im Gewebe von Patienten nachweisen [136]. Viele Faktoren, wie der Grad der Immunsuppression oder die Art des Transplantats, beeinflussen das Risiko an PTLD zu erkranken [9]. Die Beeinträchtigung der Funktion von T-Zellen führt zur unkontrollierten EBV-induzierten Vermehrung von B-Zellen. Durch Reduktion der Immunsuppression kann die Erkrankung bekämpft werden, jedoch birgt dies die Gefahr der Transplantatabstoßung [9]. Der adoptive Transfer von zytotoxischen T-Zellen ist eine neuartige Therapie, die das unkontrollierte Wachstum von EBV-infizierten Zellen eindämpfen soll. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Einsatz von zytotoxischen T-Zellen in der Behandlung von PTLD-Patienten ein Langzeitgedächtnis und Schutz vor erneuten Krankheitsausbrüchen bieten kann [137]. Hauptsächlich CD8+, aber auch CD4+ T-Zellen, sind an der Kontrolle der EBV-Infektion beteiligt [177]. Dieses Wissen wird beim adoptiven CTL-Transfer verwendet, um gezielt Virus-infizierte Zellen beim Ausbruch der Krankheit zu bekämpfen. Ein eingesetztes Protokoll für die Generierung von T-Zellen für den adoptiven Transfer verwendet lymphoblastoide Zelllinien (LCLs) [138]. Dabei werden PBMCs mit LCLs wiederholt stimuliert, um so Antigen-spezifische T-Zellen anzureichern. Die Generierung von CTLs bei HSCT-Patienten bereitet in der Regel keine Probleme, da die T-Zellen aus den PBMCs des Donors gewonnen werden können. Die Generierung von CTLs im Falle eines SOT-Patienten nach der Transplantation ist schwieriger, dennoch möglich [139]. Bei Transplantationspatienten, die anschließend immunsuppressive Medikamente erhielten, wurde untersucht, ob zytotoxische T-Zellen auch bereits zur Prophylaxe eingesetzt werden können, um das Risiko vom Ausbruch einer PTLD-Erkrankung zu minimieren [140]. Eine erst kürzlich vorgeschlagene Methode zur Generierung von T-Zellen für ein breites Spektrum von latenten Epitopen, ist der Einsatz von LCLs, die mit Formaldehyd behandelt werden, wodurch unerwünschte Kontaminationen

minimiert werden, gleichzeitig aber die Generierung von T-Zellen gewährleistet wird, die gegen latente Epitope gerichtet sind [141]. Der große Nachteil bei Generierung von CTLs sind lange Wartezeiten, die bei akutem Verlauf der Krankheit den rechtzeitigen Einsatz der Therapie verhindern. Man ist ebenfalls bemüht neue Strategien für den akuten Krankheitsverlauf zu entwickeln, indem man die Antigen-spezifischen T-Zellen mit Hilfe eines IFN $\gamma$ -Catch-Verfahrens innerhalb von wenigen Tagen gewinnt und dem Patienten verabreichen kann [142,143]. Das Protokoll für die Isolierung von Virus-spezifischen T-Zellen aus PBMCs von gesunden Individuen ist auch am Beispiel vom CMV erprobt worden [144]. Eine alternative Option zu LCLs für eine gezielte Anreicherung von Epitop-spezifischen Zellen gegen EBV ist die Stimulation mit definierten Epitopen. Der Nachteil dieser Vorgehensweise ist aber, dass diese T-Zellen ein schmales Spektrum von Epitopen abdecken, und somit Tumorzellen durch bestimmte Mutationen der viralen DNA der Immunantwort leichter entgehen können. Selbst beim adoptiven Transfer von polyklonalen CTLs können solche Mutationen im Virus fatale Folgen haben [145]. Es ist immer noch nicht endgültig geklärt, in wieweit T-Zellen gegen lytische Antigene beim Einsatz von adoptiven T-Zell-Transfer beitragen können. Beobachtungen in Tiermodellen lassen darauf schließen, dass lytisch infizierte Zellen beim Wachstum von EBV-assoziierten malignen Tumoren mitwirken könnten [146,147]. Eine neuere Studie zeigte, dass das lytische Protein BZLF1 die Expression von IL-13 induziert und somit eine Rolle bei EBV-assoziierten Erkrankungen, wie der PTL, spielen könnte [148]. Deshalb könnte der Einsatz von T-Zellen, die gegen EBV-Epitope aus lytischen Antigenen stammen, einen positiven Effekt haben und Anwendung bei der Behandlung von PTL finden. Während beim HSCT-Patienten EBV-spezifische T-Zellen beim Donor leicht zugänglich sind, ist bei SOT-Patienten die Generierung von CTLs schwieriger, vor allem dann, wenn der Patient zum Zeitpunkt der Transplantation EBV-seronegativ ist. Nur eine schnelle Detektion der Infektion bei jungen seronegativen Transplantationspatienten ermöglicht auch einen schnelleren Beginn einer Therapie. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Detektion von EBV-spezifischen CTLs in PBMCs ein verlässlicherer Indikator für eine Erstinfektion in Patienten sein kann, als die Detektion von EBV-spezifischen Antikörpern [149]. Transplantationen, bei denen der Spender EBV-Seropositivität und der Patient Seronegativität aufweist, sind mit einem höheren Risiko der Entstehung von PTL verbunden [150]. Die Entwicklung von Vakzinierungsstrategien mit Proteinen (erwähnt in [151]) oder mit ausgewählten Peptiden, als genau definierte T-Zell-Epitope, könnte eine Möglichkeit zur Prävention bei sehr jungen seronegativen Transplantationspatienten bieten [151]. Bei einer Studie mit EBV-seronegativen gesunden Erwachsenen hat ein Impfpeptid gegen ein HLA-B8-restringiertes dominantes Epitop eine EBV-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort gegen jenes induziert. In der gleichen Studie wurde geschätzt, dass eine Zusammensetzung aus 25 verschiedenen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Epitopen benötigt werden müsste, um die Vielfalt der HLA-Gene der

Bevölkerung in westlichen Ländern zu >90% abzudecken [151]. Eine genaue Kartierung von T-Zell-Epitopen mit dem zugehörigen HLA-Hintergrund würde eine gezieltere Auswahl von Epitopen ermöglichen, um dem Ziel einer individuellen und gezielten Therapie näher zu kommen.

### **1.2.2 Adoptiver T-Zell-Transfer bei EBV-assoziierten Tumorerkrankungen**

Ein generelles Problem bei der Behandlung von Tumorerkrankungen ist es, Angriffspunkte der Krebszelle ausfindig zu machen, die nur die Tumorzellen betreffen und nicht das gesunde Gewebe. Das Vorhandensein eines Virus in der Zelle kann eine solche Schwachstelle der Tumorzelle bedeuten. Produkte aus dem Virus, die von den Tumorzellen präsentiert werden, können vom Immunsystem als fremd erkannt werden. Der tragende Kern neuer Behandlungsmethoden für Virus-assoziierte Tumorerkrankungen baut auf diesem Prinzip auf. Unter den Behandlungsmethoden ist der adoptive Transfer von Antigen-spezifischen T-Zellen, der ein viel versprechender Ansatz, nicht nur für Behandlung von Patienten mit Lymphoproliferativen Erkrankungen nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) oder Organtransplantation (SOT) ist, sondern auch eine Möglichkeit zur Behandlung von NPC-Patienten darstellt [152,153]. Tumorerkrankungen in frühen Stadien, wie im Fall von Nasopharynxkarzinom, können mit Chemotherapie, Strahlentherapie und durch operative Eingriffe behandelt werden. Die Behandlung von Patienten mit Metastasen und fortgeschrittener Erkrankung hat jedoch schlechte Prognosen. Außerdem sind diese Therapien generell mit sehr großen Nebenwirkungen verbunden [9]. Während die Behandlung mit EBV-spezifischen T-Zellen bei Lymphoproliferativen Erkrankungen nach Transplantation erste positive Erfolge aufweist, gestaltet sich die Behandlung von anderen EBV-assoziierten Tumorerkrankungen wie Hodgkin-Lymphom, Nasopharynxkarzinom, und Burkitt-Lymphom schwieriger. Zwei limitierende Hauptfaktoren dieser Behandlungsmethode sind die Antigenexpression und Präsentation auf der Oberfläche der Tumorzelle, welches vom Typus der Latenz der transformierten Zelle und der individuellen Mutationsgeschichte des Tumors abhängt (inhibitorische Zytokine) [9]. Drei Expressionsmuster der Latenz, genannt Latenz I bis III, kommen bei Tumorerkrankungen vor [154]. Das Expressionsmuster der Latenz I tritt bei Burkitt-Lymphom auf, wobei nur EBER und BamHI-A Transkripte, sowie EBNA1 exprimiert werden. Latenz II wird im Nasopharynxkarzinom und Hodgkin-Lymphom beobachtet. Hier werden die Proteine EBNA1, LMP1 und LMP2 zusammen mit den EBER und BamHI-A Transkripten exprimiert [9,26]. Viele Details der zellulären Immunantwort sind heute bekannt. Man konnte dabei eine Immundominanz unter den latenten Antigenen beobachten. Viele der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten sind gegen Epitope aus den EBNA3-Proteinen gerichtet, danach folgen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten gegen Epitope aus LMP2 und nur wenige T-Zell-Antworten sind gegen Epitope aus EBNA2 und LMP1 gerichtet. Sehr wenige Epitope, die aus EBNA1 stammen, sind bekannt. Allerdings existieren auch

Ausnahmen hierzu [155,177]. Um die Limitationen der Expression von Antigenen in der Latenz I und II zu umgehen, ist man bemüht Strategien zu entwickeln, um die Tumorzelle zu einem mehr zugänglichem Ziel für CTLs zu machen. Neuere Arbeiten untersuchen dabei intensiver T-Zellen, die gegen Epitope aus latenten Antigenen der Latenzphase I und II gerichtet sind [156,157]. Studien, wie die Publikation von Leen et al. 2001, konnten zeigen, dass EBNA1 eine bessere Quelle für CD4+ T-Zell-Epitope darstellt als andere latente Antigene [93,177]. Andere Studien schließen CD8+ T-Zell-Antworten gegen EBNA1 nicht aus, da EBNA1-spezifische CD8+ T-Zellen detektierbar sind [113,114]. Das Epstein-Barr-Virus gehört zur Reihe der meist untersuchten menschlichen Viren, dennoch existieren immer noch unerforschte Bereiche im komplexen Zusammenspiel zwischen dem Virus und dem Immunsystem bei der Entstehung von EBV-assoziierten Krankheiten. Bessere Kenntnis von Risikofaktoren, das Verständnis des viralen Lebenszyklus und der Immunantwort gegen EBV ist die Basis der Weiterentwicklung von Behandlungsmethoden und Prävention von EBV-assoziierten Erkrankungen.

### **1.3 Fragestellung, Ziel und Verlauf der Arbeit**

#### **1.3.1 Fragestellung der Arbeit**

Faktoren wie chemische Substanzen, radioaktive Strahlung, Infektionen und genetischer Hintergrund der betroffenen Personen können bei der Entstehung von Erkrankungen eine Rolle spielen. Einige Beobachtungen deuten darauf hin, dass bestimmte HLA-Allele mit einem erhöhten Risiko für Tumorerkrankungen assoziiert sind. Bei der Gruppe der EBV-assoziierten Tumorerkrankungen, wie dem Nasopharynxkarzinom, wird das relativ wenig erforschte MHC-Klasse-I-Allel HLA-B18 als ein möglicher Marker für ein erhöhtes Risiko erwogen [158,159]. Eine Untersuchung von klinischen Fällen der PTLD-Erkrankung im Bezug auf EBV-Positivität kam zu dem Ergebnis, dass HLA-B18 in höherer Frequenz bei EBV-negativer PTLD anzutreffen ist [160]. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass andere genetische Faktoren, zum Beispiel nicht-HLA-kodierende Gene innerhalb des MHC, die Entwicklung der Krankheit begünstigen [160]. Das Resultat mehrerer Publikationen liefert drei EBV-Epitope, die durch HLA-B18 restringiert werden [161,162,163]. Ein viertes Epitop wird in der Literatur kontrovers beschrieben [110,178]. Ein Zusammenwirken von anderen genetischen Faktoren mit einer möglicherweise schwachen Präsentation auf HLA-B18 kann nicht ausgeschlossen werden. Ältere Publikationen aus den Jahren 1998 und 2000, zeigen einige HLA-B18-restringierte Peptide aus anderen Viren, wie dem CMV oder HPV [164,165]. In einer neueren Untersuchung im Zusammenhang mit HIV wurde das HLA-B18 als ein Prädispositionsallel bezeichnet [166]. Die HLA-B18-restringierte CD8+ T-Zell-Antwort ist somit relativ wenig erforscht und wird im Zusammenhang mit einigen Viren, darunter auch EBV, bis heute kontrovers in der Literatur diskutiert. Bis heute existiert

weder eine Untersuchung von T-Zell-Antworten gegen EBV-Antigene ausschließlich mit dem Fokus auf HLA-B18, noch existiert eine Veröffentlichung, die eine Färbung mit einem HLA-B18-Tetramer zeigt. Geeignete Grundbausteine bei der Erforschung von CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten sind zum einen der Zytotoxizitäts-Assay und die HLA-Klasse-I-Tetramertechnik. Die Tetramertechnik ermöglicht die Untersuchung und Charakterisierung von Antigen-spezifischen T-Zellen [167]. Tetramere werden auch zur Isolierung von Epitop-spezifischen T-Zellen für Therapien mit adoptiven Transfer von CTLs eingesetzt [168]. Die Herstellung einer unausschöpflichen Antigen-präsentierenden Zelllinie, wie am Beispiel einer HLA-A\*0201-transfektanten K562 untersucht, erleichtert den experimentellen Zugang bei limitierten Zellzahlen [169]. So ist es möglich erste Aussagen über die Effektivität der T-Zellen zu machen. Auf der anderen Seite ermöglichen HLA-Klasse-I-Tetramere die Detektion, Charakterisierung und Sortierung von einzelnen Epitop-spezifischen T-Zellen. Da Allel-Frequenzen in Populationen variieren, liegt auch eine unterschiedliche individuelle Betonung bei Patienten vor, die Epitop-spezifische T-Zellen im Rahmen eines adoptiven Transfers benötigen. Der effektive Einsatz von zytotoxischen T-Zellen bei individuellen Therapien, wie dem adoptiven T-Zell-Transfer, ist abhängig von vielen Parametern, darunter auch von der HLA-Restriktion, die das Muster von Epitopen, welche aus dem Virus stammen, moduliert. Die Ergänzung von Wissenslücken über virale Epitope, die auf wenig erforschten MHC HLA-Allelen, wie dem HLA-B18, präsentiert werden, kann eine Verbesserung von bestehenden Therapien gegen EBV-assoziierte Erkrankungen, die Patienten-individuell ausgerichtet sind, unterstützen. Es stellte sich die Frage, welche Schritte eingeleitet werden müssen, um die Erforschung der HLA-B18-restringierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort zu erleichtern.

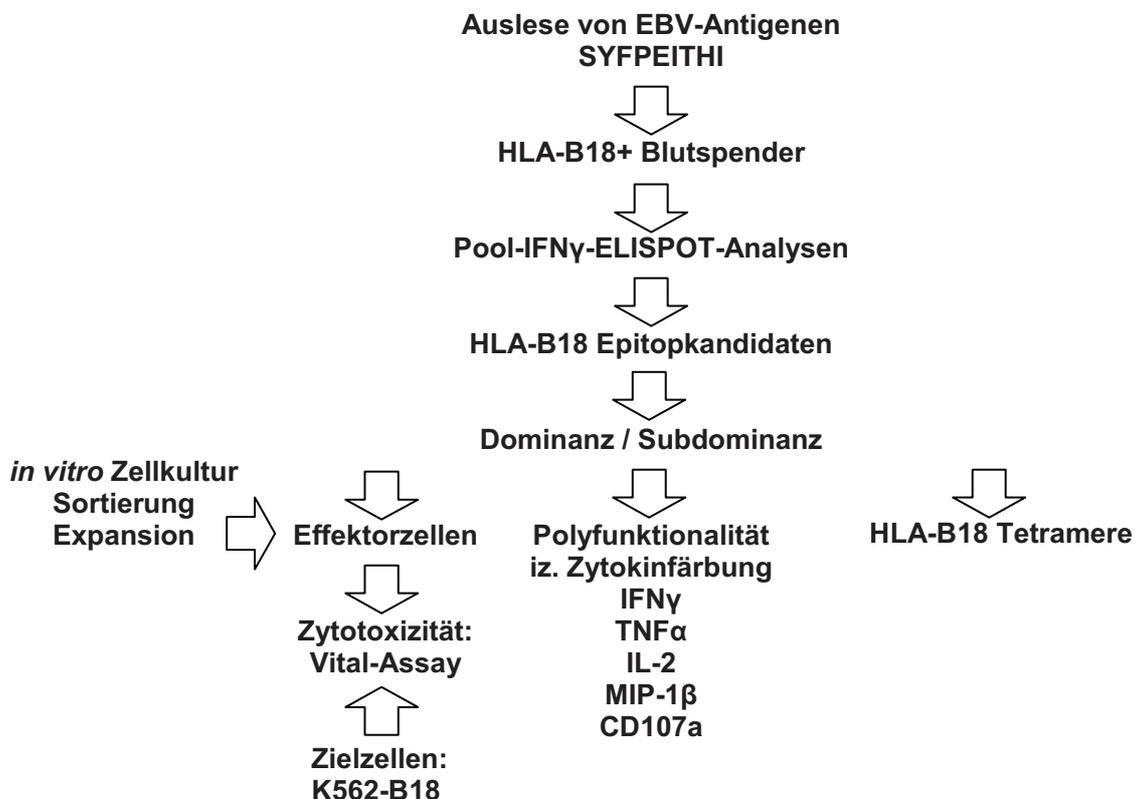
### **1.3.2 Ziel der Arbeit**

Das Ziel dieser Arbeit ist eine Grundlage für die Untersuchung der HLA-B18-restringierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort gegen Epitope aus EBV-Antigenen zu schaffen. Zuerst soll eine einleitende Orientierung über die Epitopkandidaten und ihre Erkennungsfrequenz unter HLA-B18-positiven gesunden EBV-Trägern geschaffen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird, eine geeignete Antigen-präsentierende Zelllinie für Untersuchungen der Zytotoxizität und Tetramere zur spezifischen Detektion von T-Zellen, generiert. Parallel dazu soll das methodische Vorgehen weiterentwickelt werden.

### **1.3.3 Verlauf der Arbeit**

Die Initiation für diese Untersuchung haben Analysen der Ergebnisse aus einem IFN $\gamma$ -ELISPOT in meiner Diplomarbeit gegeben, bei der eine Assoziation von IFN $\gamma$ -Antworten mit HLA-B18 entdeckt wurde. Um die HLA-B18-restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort zu untersuchen, wurde der

Schwerpunkt auf die Suche nach dominanten und subdominanten Epitopkandidaten aus einer breiten Plattform von lytischen und latenten Antigenen des Epstein-Barr-Virus ausgerichtet, welche von HLA-B18-positiven EBV-Trägern erkannt werden. Die Strategie zur Erforschung der HLA-B18-restringierten CD8+ T-Zell-Antwort ist in mehrere Schritte gegliedert worden. Um mögliche CD8+ T-Zell-Epitope zu bestimmen, wurde die Betonung auf die Charakterisierung der Dominanz, die Detektion von Antigen-spezifischen T-Zellen mit Tetrameren und den Nachweis der Zytotoxizität von T-Zellen gegen HLA-B18-restringierte Epitope gelegt. Abb. 1 stellt schematisch den Verlauf der Arbeit, welcher für die Untersuchung der HLA-B18-restringierten CD8+ T-Zell-Antwort gegen EBV-Antigene gewählt wurde, dar.



**Abb. 1:** Schema der Untersuchung der HLA-B18-restringierten CD8+ T-Zell-Antwort gegen Epitope aus EBV. iz. = intrazelluläre.

Ein Teilanliegen dieser Arbeit war auch die Verbesserung einiger bereits bestehender Methoden, um die Effizienz und Qualität von Screenarbeiten zu steigern. Durch die Kombination von mehreren Methoden wurde das Vorhandensein einer HLA-B18-restringierten CD8+ T-Zell-Antwort und die Polyfunktionalität und Zytotoxizität der Epitop-spezifischen T-Zellen bei einem Epitopkandidaten in allen Punkten, bei einigen weiteren zum Teil, untersucht. Um einen umfangreicheren Überblick über die CD8+ T-Zell-Antwort gegen HLA-B18 Epitopkandidaten zu erhalten, wurden Vorhersagen für insgesamt zehn lytische und acht latente EBV-Antigene erstellt. Die Vorhersagen wurden mit Hilfe des Programms SYFPEITHI [170] gemacht. Die Peptide wurden synthetisch hergestellt. Die Experimente wurden hauptsächlich von drei Varianten des

IFN $\gamma$ -ELISPOTs (*in vitro*, *in vitro pool*, *ex vivo*) getragen. Bei dem *in vitro* Pool-Test wurde ein neues Verfahren, der Pool-single peptide-ELISPOT, etabliert. Mit den Epitopkandidaten wurde eine Kartierung durchgeführt, bei der untersucht werden sollte, ob diese in Epitop-reichen Proteinbereichen des Virus liegen. In dieser Arbeit wurden HLA-B18-Tetramere hergestellt. Darüber hinaus sollte mit Hilfe der intrazellulären Zytokinfärbung die Polyfunktionalität von Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde für die Untersuchung der Zytotoxizität eine transfektante Zelllinie, die K562-B18, generiert. Die Zelllinie K562-B18 kann in weiterführenden Experimenten der HLA-B18-restringierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort gegen virale Antigene eingesetzt werden. In einer Publikation wurde eine HLA-B\*1801-transfektante B-Zelllinie 721.221 generiert, um das HLA-B\*1801-Ligandom zu erforschen [171]. Die Auskunft über das Ligandom ermöglicht zum einen die Untersuchung von Veränderungen der Präsentation auf MHC-Molekülen durch multiple Faktoren [171], zum anderen erleichtert ein erweitertes Wissen über das Liganden-Repertoire die Verbesserung von Programmen zur Vorhersage von MHC-Liganden. Die hier generierte K562-B18 kann ebenfalls in anderen Forschungsrichtungen eingesetzt werden. 2004 wurde eine alternative Methode zur Bestimmung der Zytotoxizität, der Vital-Assay, beschrieben [172]. Um die Zytotoxizität der HLA-B18-restringierten Epitop-spezifischen T-Zellen zu bestimmen, wurde eine modifizierte Form dieses Assays entwickelt, der sich als eine unkomplizierte und verlässliche Methode zur Bestimmung der spezifischen Lyse bestätigt hat und bei der keine Radioaktivität eingesetzt werden muss. Die hieraus gewonnene Kenntnis der T-Zell-Antwort gegen HLA-B18-restringierte Epitope in gesunden EBV-Trägern ist die erste Basis für vergleichende Untersuchungen mit Krankheiten, die sowohl mit dem Epstein-Barr-Virus als auch mit dem Allel HLA-B18 selbst assoziiert sind. Die Komplexität von T-Zell-Antworten erfordert eine modifizierte und erweiterte Vorgehensweise bei der Screenarbeit. Zur umfangreichen Untersuchung der Immunantwort wurde ein Modell vorgestellt (Abb. 29). Das Modell beinhaltet eine Kombination bisher bekannter Methoden, die zum Teil bei Untersuchungen in großen Maßstäben systematisch eingesetzt werden, die hier modifiziert wurden. Unter anderem wird in dieser Arbeit eine neue Vorgehensweise beim ELISPOT, der Pool-single peptide-ELISPOT, zur Auslese von Epitopkandidaten aus einer großen Anzahl von Testpeptiden vorgestellt. Das Untersuchungsmodell wird am Beispiel der gezielten Suche von HLA-B18 Epitopkandidaten diskutiert.

---

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Buffy Coats und Leukaphereseprodukte

Für diese Dissertation wurden Buffy Coats und Leukapheresen aus der Abteilung Transfusionsmedizin des Universitätsklinikum Tübingen erhalten, siehe Tab. 1. Die HLA-Typisierungen für die Proben 803-1548 und 1079-1562 wurden der PBMC-Bank der Abteilung Immunologie, Auf der Morgenstelle 15 in Tübingen, entnommen. Die HLA-Typisierung der übrigen Proben wurde den Beschriftungen erhaltener Proben entnommen.

Die Verwendung von Buffy Coats von freiwilligen Spendern, die für Experimente in dieser Arbeit verwendet wurden, wurde durch die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Tübingen genehmigt. Die Verwendung von Leukapheresen von freiwilligen Spendern, die für Experimente in dieser Arbeit verwendet wurden, wurde ebenfalls von der lokalen Ethik-Kommission genehmigt.

#### **Proben, die für *in vitro* und *ex vivo* ELISPOT-Experimente verwendet wurden:**

A1, A3, A6, A7, A8, A9, B1, B2, B3, B4, B5, B6, B8, B10, B11, B12, 1288, B018, B020, B025, B027, B029, Leuka02, B14, B16, B08, B017, Leuka04, 1042, 945, 1291, 1069, 1082, 1087, 1074, B026, B033, B029, B034, B022, B023, B032, B015, B09, 1151, 1042, B011, B010, 1482, 834, 996, 1052, 1057, 848, 803, 895.

#### **Proben, die für HLA-B18 Tetramerfärbungen verwendet wurden:**

Leuka02, 1487, 1500, B034, 1482, 1465, 1373, 1247, 1273, 1092, 1526, 1527, 1523, 1522, 1520, 1079, 1100, 1311, 1310, 1384, 1548, 1069, B022, B025

#### **Proben, die für intrazelluläre Zytokinfärbungen verwendet wurden:**

B3, B034, 1482, 1562, 1042, 1052, 1312, 1473, 1292, 1057, 1273, 1288, 1403, 1239, 1092, Klone: B11, B4, B10

#### **Proben, die für Klonierung verwendet wurden:**

B11, B4, B10

Die Zellen wurden bei der Flow Cytometry Core Facility in Universitätsklinikum Tübingen am BD FACSAria Zellsorter gesortet.

Tab. 1: Liste der verwendeten Buffy Coat- und Leukapherese-Proben

Spender-Nr.	HLA				Spender-Nr.	HLA			
HLA-B18+									
B1	A2	A23	B18	B35	1069	A1	-	B7	B18
B2	A2	A25	B18	B7	1074	A2	-	B13	B18
B3	A2	A25	B18	B27	1082	A2	A24	B27	B18
B4	A3	A11	B18	B35	1087	A2	A25	B7	B18
B5	A29	A31	B18	B44	1092	A2	A25	B18	B27
B6	A24	A32	B18	B44	1151	A1	A3	B7	B18
B8	A25	A32	B18	B44	1239	A2	A24	B7	B18
B10	A2	A25	B18	B7	1247	A2	A25	B7	B18
B11	A24	A25	B18	B61	1273	A11	A30	B7	B18
B12	A24	A28	B18	B44	1288	A2	A25	B18	B51
B14	A2	A3	B18	B7	1291	A1	A25	B7	B18
B16	A2	A25	B18	B44	1292	A2	A24	B7	B18
B08	A25	A32	B18	B8	1312	A2	A11	B18	B35
B09	A11	A25	B18	B60	1373	A2	-	B7	B18
B010	A3	A28	B13	B18	1384	A1	A2	B8	B18
B011	A2	A30	B7	B18	1403	A2	A29	B18	B44
B015	A2	A30	B18	B62	1465	A2	-	B18	B65
B017	A2	A3	B18	B7	1473	A11	A25	B7	B18
B018	A26	A30	B18	B38	1482	A2	A25	B13	B18
B020	A2	A-	B18	B35	1487	A2	A24	B18	B50
B022	A24	A29	B18	B44	1500	A2	-	B18	B44
B023	A3	-	B7	B18	1548	A1	A2	B7	B18
B025	A3	A24	B18	B35	HLA-B18-				
B026	A25	A26	B18	B49	A1	A1	A24	B7	-
B027	A11	A24	B18	B51	A3	A1	A2	B8	B27
B029	A3	A25	B61	B18	A6	A1	A2	B8	B62
B032	A2	A25	B51	B18	A7	A1	A26	B8	B39
B033	A3	A30	B35	B18	A8	A1	A3	B7	B8
B034	A24	A28	B35	B18	A9	A1	A24	B7	B62
Leuka02	A2	A25	B41	B18	1079	A2	A66	B7	B41
Leuka04	A2	A24	B18	B38	1100	A2	A11	B7	-
803	A3	A30	B18	B41	1310	A3	A28	B7	B51
834	A1	A3	B7	B18	1311	A1	A2	B8	B60
848	A2	-	B18	B44	1520	A3	A28	B7	B51
945	A1	A24	B18	B57	1522	A2	A28	B44	B51
996	A11	A30	B7	B18	1523	A3	-	B7	B35
1042	A3	A25	B7	B18	1526	A1	A26	B38	B55
1052	A2	A24	B18	B50	1527	A1	-	B8	B44
1057	A2	A3	B7	B18	1562	A1	A2	B8	B60

Angegeben ist die HLA-Typisierung für HLA-A und -B. Proben, die ausschließlich mit einer Nummer gekennzeichnet sind, stammen aus der PBMC-Bank der Abteilung Immunologie, Auf der Morgenstelle 15 in Tübingen.

## 2.2 Zelllinien

1. K562 [173], humane chronische myeloische Leukämie-Zelllinie: HLA-A\*-, B\*-, C\*-, E\*- negativ
2. LG2-EBV, humane LCL: HLA-A\*24, A\*32, B\*35, B\*44, DQB1\*02, DQB1\*05, DRB1\*07, DRB1\*14, DRB3 (Kap. 6, S. 111, Nr. 1)
3. RCC-115-EBV, humane LCL aus RCC-115: HLA-A\*02, A\*03, B\*15, B\*18 (Kap. 6, S. 111, Nr. 2)
4. K562-B18

## 2.3 *E.coli*-Stämme

XL-1 Blue supercompetent cells (Stratagene), BL21(DE3) pLysS, DH5 $\alpha$ , XL-1 blue MRF` comp. cells, Aufbewahrung aller *E.coli*-Stämme bei -80°C

## 2.4 Vektoren

HLA-B1801 expression\_opt pET3a Vektor (Entelechon), pGEM T Easy Vektor und pGEM T Easy Vektor System (Promega), pIRES puro2 (Clontech), HLA-B18 pET3a Vektor und HLA-B\*1801<sup>W486C→G</sup> pIRES puro2 Vektor

## 2.5 Synthetische Peptide

Für diese Arbeit benötigte Peptide wurden in der Abteilung Immunologie, Auf der Morgenstelle 15 in Tübingen hergestellt.

Die Peptide wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml in sddH<sub>2</sub>O 10% DMSO gelöst und als Aliquots bei -80°C und -20°C aufbewahrt. Für die Rückfaltung von HLA-Monomer-Peptid-Komplexen wurden die Peptide in DMSO in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Die Peptide wurden mit Hilfe der Epitopvorhersage SYFPEITHI (Kap. 6, S. 111, Nr. 3) aus den Sequenzen verschiedener EBV-Proteine (EBV-Stamm B95-8) ausgewählt, Tab. 2 bis Tab. 5. Die Tabellen beinhalten auch Peptide aus Veröffentlichungen und aus der HLA-A\*0101 Vorhersage. Die Sequenzen von EBV-Proteinen wurden der Datenbank Swissprot (Kap. 6, S. 111, Nr. 4) entnommen. Für die Bezeichnung von EBV-Proteinen wurde die Gen-Bezeichnung gewählt. Das Peptid RAKFKQLL [174] aus dem Protein BZLF1 (EBV) wurde als ein Vergleichsepitop eingesetzt. Als Negativkontrollen wurden synthetische Peptide aus HIV-Proteinen, für HLA-A01 GSEELRSly (gag p17, HIV-1), HLA-A02 ILKEPVHGV (RT, HIV-1), HLA-A32 RIKQIINMW

(gp120, HIV-1), HLA-B18 FRDYVDRFYK (p23, HIV-1) und für HLA-B44 das Peptid EEGPSTSCIL aus MAGE-1 verwendet. Für HIV-Peptide siehe (Kap. 6, S. 111, Nr. 3) und [199].

**Tab. 2: Testpeptide für die Untersuchung der HLA-B18-restringierten CD8+ T-Zell-Antwort**

Protein	BZLF1	BRLF1	BMLF1	BMRF1	BHRF1
AS 8	SELEIKRY ● SENDRLRL PENAYQAY FDQATRVY LEECDSEL	VEITLRSY NEILDFTL LESMTEDL DEETSQAV	EETGNSSY VETLSSSY LEPIQDPF LEETIFWL KELAPCFL QERSQRPL	VEQASLQF PDLVTTY PEFVKLTM	TEHVDLDF IERNSETF EDTVVLRV
AS 9	SENDRLRL DSELEIKRY AFDQATRVY	KEGLLSSKF SESGQFHAF QESDERPIF DELESPLSP DERPIFPH SVEITLRSY	DEVEFLGHY* KEETGNSSY DEDEKEETG LEPIQDPFL QEITYHGDL DEDPTPAHA VVETLSSSY	EEAPAAVSF LERPLAVQL NEQMIGQVL VEQASLQFY NPDLYVTTY GEACTLDY METTQTLRF	PEDTVVLRV LELAARETP
AS >9		LVSDYCNVL- NKEFT**	HDEVEFLGHY	AVEQASLQFY SGEACTLDY	

\* = [162], \*\* = das Peptid LVSDYCNVLNKEFT ist als LVSDYCNVLNKEFTA [161] veröffentlicht worden,

● = SELEIKRY ist als DSELEIKRYKNR [163] veröffentlicht worden.

**Tab. 3: Fortsetzung Tab. 2**

Protein	BHLF1	BALF2	BcRF1	BLLF1	BALF4
AS 8	PERQEPRL PERGSGPA	KESLFNSF EEYSDLAL AEYLLGRF PEWLKGHY HEALYTGL PEARVAAL TEAFKERL IENIRAGL YENDNPGL AEAARDFL DDEPRYTY DEPRYTYW	RENRSGVF EESERRDA	CENISGAF SENATNLF VEIPEFPF GEEQQVSL	LEGIFREY TEGLLMVF YEAVQDRY TELQAIML RENHTEGL PETAAALL DEGTSSFV DELAQQHA KDGLTRVY
AS 9	QEPRLPQDL DELQDQASG	PEGLDPSAY NETDFLGNF FEGPGLEAL EEYSDLALF KESLFNSFY REVFYDAY RESSKPGDF TEAFKERLY VELLEKQSL HETPASLNY GETREVFY KERLYSGNL KEPHGPRDF AEEYSDLAL	REARLKFHF KETAFTVSL RENRSGVFW DEESERRDA	LELLGAGEL AEMQNPVYL VEIPEFPFY SENATNLF TETDFKCKW PETVPYIKW MEAALLVCQ DEIPASQDM PEFPFYPTC	DEQRASNVF EEKFSVDSY TETGKSIHF NEIHVYNDY IELDGIATL CELSSHGDL IENIDFASL RENHTEGLL TELYDAPGW DEGTSSFVT

Beim Peptid KEPHGPRDF war keine genaue Gewichtsabmessung möglich.

**Tab. 4:** Fortsetzung **Tab. 2**

Protein	EBNA1	EBNA2	EBNA3	EBNA4
AS 8	RESIVCYF GEADYFEY FENIAEGL AEVLKDAI	DESWDYIF	VEVQPPQL PEPPTIHL TEQGKEVL DATEVLDL TEVLDLSI DEDLPCIV	NEEIDLAY AERYTLFF QERDMLGL PEIGPFEL TEPVHDQL EEFIWMCM
AS 9	DGVDLPPWF DEGTWVAGV	PEPRSPTVF QEQLSDTPL PELSPVLGL	LEKARGSTY RERWRPAPW SEPCEALDL TEGEHVEGA	MEQRVMATL DEEEDKSGM TEPVHDQLL PETAAPRQW LERQAAAGW QEPGPVGPL DEPASTEPV DEVMEQRVM
AS >9		PRSPTVFYN- IPMPL ***		

\*\*\* = [110]

**Tab. 5:** Fortsetzung **Tab. 2**

Protein	EBNA6	EBNA5	LMP1	LMP2
AS 8	REAEVRFL TEENLLDF VEMPMVIL LESSDDEL	PEGPLGQL	NEGRHLL	EERPPTY TEFIPNLF NEEPPPY
AS 9	KEHVIQNAF TEDNVPPWL	PEGPLGQLL	DEHHHDDSL	SEERPPTY IEDPPFNSL DAVLQLSPL
AS >9				ESEERPPTY LTEWGS GNRT- Y

## 2.6 Isolierung von PBMCs mittels der Dichtegradientenzentrifugation

Medien: Lymphozytenseparationsmedium (PAA), PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  (Lonza)

sonstiges Material: Zellkulturflaschen 550 ml/250 ml/50 ml (Greiner Bio-One), 50 ml/15 ml Röhren (Falcon)

Die zu isolierenden Blutprodukte stammen aus zwei Quellen, zum einem aus Erythrozyten angereichertem, peripherem heparinisiertem Blut (Buffy Coat) oder aus durch Leukaphese Leukozyten angereichertem Blutprodukt. Die Blutprodukte wurden mit PBS (ca. 1 zu 5) gemischt

und über Lymphozytenseparationsmedium gegeben. Durch Zentrifugation (20 min, 2000 rcf, Raumtemperatur) erhielt man eine Schichtung. Die PBMC-Schicht wurde vorsichtig abgenommen. Die PBMCs wurden mit PBS zweimal gewaschen und zentrifugiert (einmal 1800 rcf, einmal 1600 rcf, beides 10 min bei Raumtemperatur). Die PBMCs wurden entweder direkt in Kulturmedium aufgenommen und in Experimenten eingesetzt, oder kryokonserviert.

## 2.7 Kryokonservierung von PBMCs und Zelllinien

Einfriermedium:	90% FCS (PAA) 30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert, 10% DMSO (Merck), steril filtriert
sonstiges Material:	Einfrierbox „Cryo Freezing Container“ (Nalgane) mit Isopropylalkohol (Merck), 2 ml Cryoröhrchen (Greiner Bio-One), Spritze 50 ml (Becton Dickinson), Sterilfilter 0,22 µm (Corning)

Die PBMC-Proben wurden zu  $2 \times 10^7$  in 1 ml oder  $10^8$  Zellen in 2 ml Einfriermedium kryokonserviert. Die Zellen wurden in Einfriermedium aufgenommen und bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Zur Kryokonservierung von Zelllinienproben von K562, K562-B18 und LG2-EBV wurden die Zellen ebenfalls mit PBS gewaschen. Es wurde das gleiche Einfriermedium wie bei PBMC-Proben verwendet. Bei der Kryokonservierung der Zelllinien betrug die Zellanzahl maximal ca.  $2 \times 10^7$  pro 1 ml Einfriermedium. Bei kurzfristiger Aufbewahrung wurden die Zelllinien bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Proben bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren und anschließend in einen  $\text{N}_2$ -Tank überführt.

## 2.8 Bestimmung der Lebendzellzahl

Trypanblaulösung:	0,05% Trypanblau (Merck), 0,01% Natriumazid (Merck) in ddH <sub>2</sub> O
sonstiges Material:	Zählkammer (Neubauer)

Der Hämozytometer wurde mit 70% Ethanol gereinigt, abgetrocknet und angefeuchtet. Das Deckgläschen wurde auf die Zählkammer gepresst, so dass sie auf der Zählkammer haften blieb (Newtonsche Ringe). Die Zellen wurden mit der Trypanblaulösung verdünnt. Ca. 10 µl der Verdünnung wurden vorsichtig am Rand des Deckgläschens pipettiert, so dass die Lösung unter das Deckgläschen gesogen wird. Durch die Aufnahme des Farbstoffs Trypanblau erscheinen tote Zellen blau. Die Lebendzellzahl wurde wie folgt berechnet:

Zellzahl pro ml = Durchschnittliche Zellzahl (ungefärbte Zellen) pro großes Quadrat  
 $\times$  Verdünnungsfaktor  $\times 10^4$ .

Gesamtzellzahl = Zellzahl pro ml  $\times$  Ausgangsvolumen der Zellsuspension, der die Probe entnommen wurde.

## 2.9 *Ex vivo* IFN $\gamma$ -ELISPOT

Kulturgefäße und Platten:	25 cm <sup>2</sup> Kultur-Röhrchen (Greiner Bio-One), 15 ml Röhrchen (Falcon), 96-Well-Platte MSHAS4510 clear (Millipore)
Antikörper und Enzyme:	1-D-1k (anti-IFN- $\gamma$ ) 1 mg/ml (MabTech), 7-B6-1 biotin (anti-IFN- $\gamma$ ) 1 mg/ml (MabTech), ExtrAvidin-Alkaline Phosphatase (Sigma-Aldrich)
Sonstiges Material:	SIGMA <i>FAST</i> <sup>TM</sup> BCIP/NBT Tabletten (Sigma-Aldrich), PHA-L (Roche), synthetische Peptide (1 mg/ml) in ddH <sub>2</sub> O und 10% DMSO (Merck), PBS ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> (Lonza), Spritze 50 ml (Becton Dickinson), Sterilfilter 0,22 $\mu$ m (Corning), Stericup 500 ml (Millipore)
PBS-Tween:	PBS Dulbecco's 0,05% Tween 20 (Merck), filtriert
PBS-BSA:	PBS Dulbecco's 0,5% BSA (Sigma-Aldrich), filtriert
Kulturmedium: (10%)	IMDM-Medium (Lonza), 10% Humanserum (Lonza) 30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert, 1% Pen-Strep (10000 U/ml, Lonza), 25 $\mu$ g/ml Gentamicin Sulfate (Lonza), 50 $\mu$ M $\beta$ -Mercaptoethanol (Roth), steril filtriert
Kulturmedium: (2%)	IMDM-Medium (Lonza), 2% Humanserum (Lonza) 30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert, 1% Pen-Strep (10000 U/ml, Lonza), 25 $\mu$ g/ml Gentamicin Sulfate (Lonza), 50 $\mu$ M $\beta$ -Mercaptoethanol (Roth), steril filtriert
Programme:	Immunospot 4.0 Academic und Immuno capture 6.1, Microsoft Excel
Geräte:	ELISPOT Reader Immunospot (Cellular Technologies Ltd.)

Die ELISPOT-Platten wurden mit dem 1-D-1k (anti-IFN- $\gamma$  Antikörper 1) beschichtet, indem der Antikörper in PBS 1:200 verdünnt und pro Well 100  $\mu$ l pipettiert wurden. Die Platten wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Gleichzeitig wurden PBMC-Proben mit PBS aufgetaut und gewaschen, in 10% Kulturmedium aufgenommen (maximal 10<sup>7</sup> Zellen pro ml), in Kultur-Röhrchen überführt und über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die ELISPOT-Platten mit IMDM-Medium gewaschen. 50  $\mu$ l 2% Kulturmedium wurden pro ein Well pipettiert und die Platten wurden mindestens 1 h bei 37°C inkubiert. Pro Well wurden 50  $\mu$ l der Peptidlösungen pipettiert (gewünschte Endkonzentration von 1  $\mu$ g/ml in einem Endvolumen von 150  $\mu$ l pro Well). Die Zellen wurden gewaschen, gezählt, und auf eine Konzentration von 2 bis 5x10<sup>5</sup> Zellen pro 50  $\mu$ l eingestellt. 50  $\mu$ l der Zellsuspension wurden in die entsprechenden Wells pipettiert. Als Positivkontrolle wurde PHA-L in einer

Endkonzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Als Negativkontrollen dienten synthetisches HIV-Peptid und Kulturmedium. Die Tests wurden als Triplikate, die Positivkontrollen als Einfachtest durchgeführt. Anschließend wurden die Platten über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Hiernach wurden die Platten mit PBS-Tween und ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Der zweite Antikörper 7-B6-1, wurde in PBS-BSA 1:3000 verdünnt, mit 100 µl pro Well pipettiert und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten mehrmals mit PBS-Tween gewaschen. Das Enzym ExtrAvidin-Alkaline Phosphatase wurde in PBS-BSA 1:1000 verdünnt. Davon wurden pro Well 100 µl gegeben und mindestens 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgten mehrere Waschschrte mit PBS-Tween. Das Substrat BCIP/NBT wurde in ddH<sub>2</sub>O gelöst (1 Tablette pro 10 ml) und mit 50 µl pro Well pipettiert, anschließend 7 bis 10 min im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde unter fließendem Wasser gestoppt und die Platten getrocknet. Die Aufnahme der erhaltenen Daten erfolgte durch ein automatisiertes ELISPOT-Lesegerät und speziell dafür entwickelte Programme Immunospot 4.0 und Immuno capture 6.1. Für die erhaltenen Daten wurde der arithmetische Mittel und die Standardabweichung (Microsoft Excel) berechnet.

## 2.10 Zellkultur mit Stimulation von PBMCs mit synthetischen Peptiden für den IFN $\gamma$ -ELISPOT (Expansionskultur)

Kulturplatten:	12-Well-Flachbodenplatte (Costar), 6-Well-Flachbodenplatte (Falcon)
Zytokine:	IL-2 (Novartis (U/ml), R&D (ng/ml)), IL-4 (PromoKine, R&D), IL-7 (PromoKine), Lagerung bei -20°C
Sonstiges Material:	synthetische Peptide (1 mg/ml) in ddH <sub>2</sub> O 10% DMSO (Merck), PBS ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> (Lonza), Sterilfilter 0,22 µm (Corning), Spritze 50 ml (Becton Dickinson), 15 ml Röhrchen (Falcon)
Kulturmedium: (10%)	IMDM-Medium (Lonza), 10% Humanserum (C·C·Pro, Lonza) oder Plasma 30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert, 1% Pen-Strep (10000 U/ml, Lonza), 25 µg/ml Gentamicin Sulfate (Lonza), 50 µM $\beta$ -Mercaptoethanol (Roth), steril filtriert
Kulturmedium: (2%)	IMDM-Medium (Lonza), 2% Humanserum (C·C·Pro, Lonza) oder Plasma 30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert, 1% Pen-Strep (10000 U/ml, Lonza), 25 µg/ml Gentamicin Sulfate (Lonza), 50 µM $\beta$ -Mercaptoethanol (Roth), steril filtriert

Die PBMC-Proben wurden aufgetaut und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden gezählt und in 10% Kulturmedium aufgenommen. Die Zellanzahl betrug ca. 1 bis 1,5x10<sup>7</sup> pro Stimulation. Das

Medium enthielt IL-4 und IL-7 mit der Endkonzentration von jeweils 5 ng/ml. Am nächsten Tag wurden Peptide zu den Zellen zugegeben mit einer Endkonzentration von maximal 1 µg/ml pro Peptid sowie IL-4 und IL-7 mit der Endkonzentration von 5 ng/ml. Bei Pool-Stimulationen bestanden die Peptid-Pools aus zwei, drei oder fünf Peptiden. Die Konzentration für jedes einzelne Peptid betrug 1 µg/ml. Der Pool (zwei, drei bzw. fünf Peptide) wurde folglich mit der Endkonzentration von 2 µg/ml, 3 µg/ml bzw. 5 µg/ml Peptid bei der Stimulation und bei den hierauf anschließenden Pool-ELISPOT-Experimenten eingesetzt. Am Tag vier oder fünf wurde mit der IL-2-Gabe begonnen. Es erfolgten drei IL-2-Gaben jeden zweiten Tag mit der Endkonzentration von 10 ng/ml bzw. 25 U/ml. Am Tag 12 wurden die Zellen aus der Kultur genommen, gewaschen und gezählt sowie auf die gewünschte Zellkonzentration mit 2% Kulturmedium für ELISPOT eingestellt und in ELISPOT-Experimenten verwendet.

### **Stimulation für Frequenzbestimmung von einzelnen Epitopkandidaten**

Für die Bestimmung der Erkennungsfrequenz von einzelnen Epitopkandidaten wurden Stimulationen mit einzelnen Peptiden oder mit zwei (selten drei) Peptiden nach dem oben aufgeführten Protokoll durchgeführt.

## **2.11 IFN $\gamma$ -ELISPOT nach Zellkultur mit Stimulation von PBMCs mit synthetischen Peptiden**

Kulturgefäße und Platten:	15 ml Rörchen (Falcon), 96-Well-Platte MSIPN4B50 opaque (Millipore), 96-Well-Platte MSHAS4510 clear (Millipore), 96-Well-Rundbodenplatte (Corning)
Antikörper und Enzyme:	1-D-1k (anti-IFN- $\gamma$ ) 1 mg/ml (MabTech), 7-B6-1 biotin (anti-IFN- $\gamma$ ) 1 mg/ml (MabTech), ExtrAvidin-Alkaline Phosphatase (Sigma-Aldrich)
Sonstiges Material:	SIGMA <i>FAST</i> <sup>TM</sup> BCIP/NBT Tabletten (Sigma-Aldrich), PHA-L (Roche), synthetische Peptide (1 mg/ml) in sddH <sub>2</sub> O und 10% DMSO (Merck), PBS ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> (Lonza), Spritze 50 ml (Becton Dickinson), Sterilfilter, 0,22 µm (Corning), Stericup 500 ml (Millipore), Ethanol pro Analisis (Merck)
PBS-Tween:	PBS Dulbecco's 0,05% Tween 20 (Merck), filtriert
PBS-BSA:	PBS Dulbecco's 0,5% BSA (Sigma-Aldrich), filtriert
Kulturmedium:	IMDM-Medium (Lonza), 2% humanes Plasma oder 2%
(2%)	Humanserum (C·C·Pro, Lonza) 30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert, 1% Pen-Strep (10000 U/ml, Lonza), 25 µg/ml Gentamicin Sulfate (Lonza), 50 µM $\beta$ -Mercaptoethanol (Roth), steril filtriert

---

Peptid-Platte:	96-Well-Rundbodenplatte (Corning) mit Peptidaliquots (2% Kulturmedium mit 3 µg/ml Peptid pro Well), Aufbewahrung bei -80°C
Programme:	Immunospot 4.0 Academic und Immuno capture 6.1, Microsoft Excel, StarOffice 7
Geräte:	ELISPOT Reader Immunospot (Cellular Technologies Ltd.)

Die ELISPOT-Platten wurden mit dem 1-D-1k (anti-IFN- $\gamma$  Antikörper 1) beschichtet, indem der Antikörper in PBS 1:200 verdünnt und pro Well 100 µl pipettiert wurde. Bei den 96-Well-Platten (MSIPN4B50 opaque) erfolgte eine kurze Inkubation mit 35% Ethanol. Die Platte wurde zwei- bis dreimal mit PBS gewaschen und wie oben beschrieben mit dem Antikörper 1-D-1k beschichtet. Die Platten inkubierten über Nacht bei 4°C. Die ELISPOT-Platten wurden am nächsten Tag mit IMDM-Medium gewaschen. 50 µl Kulturmedium wurden pro ein Well pipettiert und die Platten wurden mindestens 1 h bei 37°C inkubiert. 50 µl der Peptidlösungen wurde pro Well pipettiert (gewünschte Endkonzentration von 1 µg/ml in einem Endvolumen von 150 µl, bei Pool Endkonzentration von jedem Peptid ebenfalls 1 µg/ml). Die Endkonzentration für Pools mit fünf Peptiden betrug somit 5 µg/ml. Für die Negativkontrollen wurden die entsprechenden Konzentrationen eingesetzt. Die Zellen wurden aus der Kultur genommen, mit PBS gewaschen, gezählt, und auf eine Konzentration von ca. 1,5 bis  $2 \times 10^5$  Zellen (abhängig von vorhandener Zellzahl) pro 50 µl eingestellt. Ebenfalls 50 µl der Zellproben wurden in die entsprechenden Wells pipettiert. Als Positivkontrollen wurden PHA-L in einer Endkonzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Als Negativkontrollen dienten synthetische HIV-Peptide und Kulturmedium. Die Tests wurden als Triplikate, die Positivkontrollen als Einfachtest durchgeführt. Beim Pool-single peptide-ELISPOT wurden die Zellen auf eine Pool-Platte (Peptid-Pools und Negativkontrollen als Triplikate, Positivkontrolle als Einfachtest) und auf eine Peptid-Platte (jedes Peptid als einzelnes Well) pipettiert (Abb. 3). Für die Bestimmung der Erkennungsfrequenz von einzelnen Epitopkandidaten durch HLA-B18-positive Individuen wurden die Peptide einzeln mit den entsprechenden Negativkontrollen (HIV-Peptid und Medium) als Triplikate auf der ELISPOT-Platte pipettiert. Anschließend wurden die Platten für 19 bis 26 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Hiernach wird, wie oben beschrieben verfahren (Kap. 2.9, S. 21).

## 2.12 Der HLA-B18 pER3a Vektor

Marker:	Marker SeeBlue Pre-Stained Standard (Invitrogen), Marker SmartLadder (Eurogentec)
---------	-----------------------------------------------------------------------------------

---

Ladepuffer:	5 ml Glycerol (Roth), 200 µl 50x TAE-Puffer, 0,25% Bromphenol-Blau (Sigma), 0,25% Xylencyanol-Blau (Sigma), mit H <sub>2</sub> O auf 10 ml aufgefüllt
Enzyme und Puffer:	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase 10000 U/ml (New England Biolabs), T4 DNA-Ligase (New England Biolabs), Reprofast-DNA Polymerase (Genaxxon BioScience), Sma I (New England BioLabs) 20000 U/ml, Nde I (New England BioLabs) 20000 U/ml, 10x Puffer 4 (New England BioLabs), 10x T4 DNA-Ligase Puffer (New England Biolabs)
Kits:	QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen), Agarose Gel DNA Extraction Kit (Roche), QuickChange II Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene), QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), illustra Autoseq™ G-50 columns (GE Healthcare), BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
LB-Medium:	10 g/l Trypton Pepton (Difco), 5 g/l Bacto Yeast Extract (Difco), 10 g/l NaCl (Merck), autoklaviert
Antibiotika:	Ampicillin (Amp) 100 mg/ml (Roth) in ddH <sub>2</sub> O, Chloramphenicol (Camp) 34 mg/ml (Sigma-Aldrich) in Ethanol pro Analysis (Merck)
LB-Agar-Platten:	LB-Amp-Agar-Platten: 15 g Bacto Agar (Difco) + 1 l LB-Medium, autoklaviert, + 1 ml Ampicillin 100 mg/ml (Roth) in ddH <sub>2</sub> O, LB-Amp-Camp-Agar-Platten: LB-Amp-Platten + 25 µl Chloramphenicol (Sigma-Aldrich) 34 mg/ml in Ethanol pro Analysis (Merck)
Sonstiges Material:	SeaKem LE Agarose (Lonza), Ethidiumbromid (Roth), 0,5 ml Reaktionsgefäße (Biozym) und 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf), 1 M IPTG (Peqlab) in H <sub>2</sub> O
Vektoren:	HLA-B1801 expression_opt pET3a Vektor (Entelechon), pGEM T Easy Vektor und pGEM T Easy Vektor System (Promega)
<i>E.coli</i> -Stämme:	XL-1 Blue supercompetent cells (Stratagene), Aufbewahrung bei -80°C, BL21(DE3) pLysS, Aufbewahrung bei -80°C
Programme:	HUSAR Bioinformatic Lab, DKFZ Heidelberg, Sequencing Analysis 3.4.11, ABI Prism™ 310 Collection
Geräte:	ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), Mini-Protean 2 Electrophoresis System (Bio-Rad), Electrophoresis Power Supply Ebs 3500 (Amersham), Gel documentation system

(Vilber Lourmat), Mastercycler gradient (Eppendorf), Primus 96 plus Thermal Cycler (MWG-Biotech)

### Primer für Sequenzierung

T7: 5`- taa tac gac tca cta tag gg -3`

T7term: 5`- tgc tag tta ttg ctc agc gg -3`

SP6: 5`-att tag gtg aca cta tag -3`

### Folgende Primer wurden bei der Firma **biomers.net** hergestellt:

#### Primer für *Nested-PCR*

B18ib for 01: 5`-aca tat ggg ctc cca ctc cat gcg cta ctt tea cac gtc cgt ttc tcg-3`

B18ib rev 01: 5`-cgc tgc tcc tcg cca gac ggt act aca aca gcg gcc cat ttc tgg aag g-3`

B18ib rev 02: 5`-cgg cag acc ctc atg ctg tac atg gca agt gta agg ctg ctc ctc gcc aga cgg -3`

B18ib rev 03: 5`-acc cgg gtc cca acg cag ggt cag cgg ttt cgg cag acc ctc atg ctg tac atg gc-3`

#### Primer für Mutagenese (Kap. 6, S. 111, Nr. 7)

mut01B18ibfor: 5`-cat gta tgg ctg tga cgt tgg ccc gga tg-3`

mut01B18ibrev: 5`-cat ccg ggc caa cgt cac agc cat aca tg-3`

mut02B18ibfor: 5`-ctg gcg agg agc agc gtt aca ctt gcc atg-3`

mut02B18ibrev: 5`-cat ggc aag tgt aac gct gct cct cgc cag-3`

### SDS-PAGE

18% Trenngel:	1,9 ml 1 M Tris-HCl pH 8,8, 50 µl SDS 10% (Roth), 2 ml Rotiphorese Acryl 30%-Bisacryl 0,8% (Roth), 7,5 µl Temed (Fluka BioChemika) 5%, 30 µl Ammoniumperoxidsulfat 10% (Sigma)
6% Sammelgel:	250 µl 1 M Tris-HCl pH 6,8, 25 µl SDS 10% (Roth), 400 µl Rotiphese, Acryl 30% - Bisacryl 0,8% (Roth), 3,5 µl Temed (Fluka BioChemika) 5%, 1,3 ml ddH <sub>2</sub> O, 17,5 µl Ammoniumperoxidsulfat 10% (Sigma)
10x Elektrophorese-Puffer:	144 g Glycin (Roth), 30,3 g Trizma Base (Sigma), 100 ml SDS 10% (Roth), auf 1 l mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen. (1x: 1:10 mit ddH <sub>2</sub> O)
1 M Tris-HCl:	60,55 g Trizma base (Sigma), 500 ml ddH <sub>2</sub> O, pH 6,8 bzw. 8,8
Ladepuffer:	50 mM Tris-HCl pH 6,8, 6 M Urea (AppliChem), 6 % β-Mercaptoethanol (Roth), 0,003 % Bromphenol-Blau (Sigma), 3 % SDS (Roth), 25 % Glycerol (Roth), 0,125 M EDTA (Roth), in 100 ml ddH <sub>2</sub> O
Gel-Entfärbung:	58 ml Essigsäure (Merck), 192 ml Methanol 99% (Merck), 250 ml ddH <sub>2</sub> O

Coomassie-Lösung:	1,25 g Brillant Blue R (Sigma-Aldrich), 225 ml Methanol 99% (Merck), 50 ml Essigsäure 99% (Merck), 225 ml ddH <sub>2</sub> O
Harnstoffpuffer:	8 M Harnstoff (Roth), 10 mM Tris pH 8,0 (Sigma-Aldrich), 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck), 0,1 mM EDTA (Roth), 0,1 mM DTT (Sigma-Aldrich)
50x TAE-Puffer:	242 g Tris (Sigma-Aldrich), 57,1 ml Eisessig (Merck), 100 ml EDTA 0,5 M (Roth), auf 1 l mit ddH <sub>2</sub> O. (1x: 1:50 mit ddH <sub>2</sub> O)

Um die vollständige rekombinante HLA-B18-Sequenz für *inclusion bodies* zu erhalten wurde der HLA-B1801 expression\_opt pET3a Vektor (Entelechon) verwendet. Dieser enthielt einen Teil der HLA-B\*180101-cDNA-Sequenz sowie eine Biotinylierungssequenz (siehe Kap. VI). Die gesamte Sequenz dieses Konstruktes war zur Expression in *E.coli* optimiert. Zur Hilfe bei der Konstruktion wurde HUSAR Bioinformatic Lab verwendet. Mit Hilfe des Optimierungsreports für den HLA-B1801 expression\_opt pET3a Vektor wurde die neu angefügte Sequenz für die Proteinexpression in *E.coli* optimiert. Die Sequenz für das synthetische Gen im ursprünglichen HLA-B1801 expression\_opt pET3a Vektor ist dargestellt (Abb. 2).

```

ATG CGT GTF ACT GCT CCA CGT ACG CTG CTG CTG CTC CTG TGG GGT GCT GTT GCT CTG
ACT GAA ACC TGG GCA GGC TCC CAC TCC ATG CGC TAC TTT CAC ACG TCC GTT TCT CGT
CCG GGT CGT GGT GAA CCG CGT TTC ATC TCC GTT GGC TAC GTG GAC GGT ACC CAG TTC
GTC CGC TTT GAC TCT GAC GCC GCA TCT CCG CGT ACT GAA CCA CGT GCC CCG TGG ATC
GAA CAG GAA GGT CCG GAA TAC TGG GAC CGC AAC ACC CAG ATC AGC AAA ACC AAC ACC
CAG ACC TAC CGT GAG TCT CTG CGC AAC CTG CGT GGT TAC TAC AAC CAG AGC GAA GCG
GGT AGC CAC ACT CTG CAG CGC ATG TAT GGC TGT GAC GTT GGC CCG GAT GGT CGT CTG
CTG CGT GGT CAC GAT CAG TCT GCC TAC GAC GGC AAA GAC TAC ATC GCG CTC AAC GAG
GAC CTG TCT AGC TGG ACT GCA GCT GAT ACG GCT GCG CAG ATC ACC CAG CGT AAA TGG
GAA GCG GCA CGT GTT GCT GAA CAG CTG CGT GCT TAC CTG GAG GGT ACT TGC GTG GAA
TGG CTG CGT CGT CAC CTG GAG AAC GGC AAA GAA ACC CTG CAG CGT GCA GAT CCA CCG
AAA ACC CAC GTT ACG CAC CAC CCG ATC TCC GAT CAT GAG GCA ACT CTG CGT TGC TGG
GCA CTG GGC TTC TAT CCG GCA GAG ATT ACC CTG ACC TGG CAG CGT GAT GGT GAA GAC
CAG ACC CAG GAC ACC GAA CTG GTA GAA ACT CGT CCG GCG GGT GAT CGT ACC TTC CAG
AAA TGG GCC GCT GTT GTA GTA CCG XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX
XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GAC CCG GGT TCT GGC TCT
CTG CAC CAC ATC TTC GAA GCG CAG AAA ATC GAA TGG CGT CAT CGC TAA

```

**Abb. 2: Ursprüngliche Sequenz für die rekombinante  $\alpha$ -Kette HLA-B18 (HLA-B1801 expression\_opt pET3a Vektor).** Sequenzen, die N-terminal entfernt wurden, sind durchgestrichen. Rot = neue Position für Startcodon, XXX = Sequenz, die C-terminal hinzugefügt worden ist, grau = Biotinylierungssequenz (siehe Kap. VI), schwarz = Stopcodon.

Die Verlängerung der Sequenz um 24 AS am C-Terminus hat sich an der HLA-B\*180101-cDNA-Sequenz orientiert. Die Informationen für die Sequenz von HLA-B\*180101 wurden der IMGT/HLA Database entnommen (Kap. 6, S. 111, Nr. 5). Zusätzlich wurde N-terminal ein Teil der bestehenden Sequenz entfernt. Die neue Sequenz für HLA-B18 *inclusion bodies* wurde mit Hilfe des Programms GenScript's OptimumGene<sup>TM</sup> codon optimization tool (Kap. 6, S. 111, Nr. 6) auf den Codon Adaptation Index (CAI)-Wert geprüft. Um ausreichend Plasmid-DNA für folgende Experimente zu erhalten, wurden 50  $\mu$ l XL1 Blue Bakterien mit 1  $\mu$ l HLA-B1801 expression\_opt

pET3a Vektors (Entelechon) wie folgt transformiert: Inkubation auf Eis (20 min), Hitzeschock bei 42°C (45 s), Inkubation auf Eis (2 min), Zugabe von 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotika), Inkubation bei 37°C (30 min), Zentrifugation (1500 rcf, 3 min, bei Raumtemperatur), Abnehmen vom Überstand, Ausplattieren von ca. 50 µl Bakteriensuspension auf LB-Amp-Agar-Platte, Inkubation über Nacht (17 h bei 37°C). Zweimal 5 ml LB-Medium + je 5 µl Ampicillin (100 mg/ml) wurden mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Plasmidpräparation (Minipräp) durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde mit je 30 µl autoklaviertem ddH<sub>2</sub>O (addH<sub>2</sub>O) eluiert. Darauf folgend wurden drei *Nested-PCRs* durchgeführt.

### ***Nested-PCR I***

10 µl 10x Puffer + 2 µl dNTP Mix (10 mM) + 2 µl B18ib for 01 (20 µM) + 2 µl B18ib rev 01 (20 µM) + 1 µl Reprofast-DNA Polymerase + 81 µl addH<sub>2</sub>O. Pro Ansatz 49 µl + 1 µl Plasmid-DNA (1:100 mit addH<sub>2</sub>O verdünnt). Zykluszahl = Zz.

PCR-Programm:

94°C, 5 min
94°C, 30 s (Zz: 29)
65°C, 30 s (Zz: 29)
72°C, 1 min (Zz: 29)
94°C, 30 s
72°C, 10 min
4°C ∞

Produkt *nPCR01*

### ***Nested-PCR II***

10 µl 10x Puffer + 2 µl dNTP Mix (10 mM) + 2 µl B18ib for 01 (20 µM) + 2 µl B18ib rev 02 (20 µM) + 1 µl Reprofast-DNA Polymerase + 81 µl addH<sub>2</sub>O. Pro Ansatz 49 µl + 1 µl Produkt *nPCR01* (1:100, siehe *Nested-PCR I*)

PCR-Programm, siehe *Nested-PCR I*, Produkt *nPCR02*

### ***Nested-PCR III***

10 µl 10x Puffer + 2 µl dNTP Mix (10 mM) + 2 µl B18ib for 01 (20 µM) + 2 µl B18ib rev 03 (20 µM) + 1 µl Reprofast-DNA Polymerase + 81 µl addH<sub>2</sub>O. Pro Ansatz 49 µl + 1 µl Produkt *nPCR02* (1:100/1000 siehe *Nested-PCR I*)

PCR-Programm, siehe *Nested-PCR I*.

Produkt *nPCR03* wurde bei -20°C eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt auf einem 0,8% Agarosegel aufgetragen. Das entsprechende Fragment wurden nach dem Protokoll (QIAquick GelExtraktion Kit) aus dem Gel extrahiert und in 50 µl addH<sub>2</sub>O eluiert. Anschließend wurde das Fragment in den pGEM T Easy Vektor ligiert.

**Ligationsansatz (HLA-B18 Fragment pGEM T Easy Vektor)**

1 µl T4 DNA-Ligase (Promega) + 3 µl PCR Produkt (HLA-B18 Fragment) + 1 µl pGEM T Easy Vektor (Promega) + 5 µl 2x Puffer (Promega): 1 h Inkubation bei Raumtemperatur.

**Transformation von XL-1 Blue**

25 µl Bakteriensuspension (Stratagene) wurden zum Ligationsansatz (10 µl) gegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden Hitze-geschockt (45 s, 42°C) und 2 min auf Eis inkubiert. 1 ml LB-Medium wurde zum Ansatz gegeben. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurden die Bakterien abzentrifugiert und auf einer LB-Amp-Agar-Platte ausplattiert. Am nächsten Tag wurden Kulturen von 10 Klonen in jeweils 5 ml LB-Medium + je 5 µl Ampicillin angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Plasmid-DNA isoliert (Minipräp). Die Sequenzierung wurde durch die Firma Eurofins MWG Operon durchgeführt (T7 und SP6 Primer). Aufgrund von Punktmutationen wurden Mutagenesen mit QiaChange II Site-Directed Mutagenesis Kit durchgeführt.

**Mutagenese I**

13,8 µl Mut01B18ibfor Primer (≈ 125 ng) + 14,3 µl Mut01B18ibrev Primer (≈ 125 ng) + 5,0 µl 10x Puffer + 2,0 µl Plasmid-DNA (1:100) + 1,0 µl dNTP Mix (Stratagene) + 14,0 µl addH<sub>2</sub>O + 1,0 µl PfuUltra (Stratagene). Zykluszahl = Zz.

Programm:

- 95°C, 30 s
- 95°C, 30 s (Zz: 20)
- 55°C, 1 min (Zz: 20)
- 68°C, 8 min 20 s (Zz: 20)
- 4°C ∞
- 2 min auf Eis
- + 1 µl Dpn I (Stratagene), mischen

1 h Inkubation bei 37°C, es folgte eine Transformation (siehe oben) von 50 µl XL-1 Blue mit 1 µl vom Dpn I Verdau. Die Bakterien wurden anschließend auf einer LB-Amp-Agar-Platte ausplattiert. Für eine erneute Plasmid-Isolierung wurden Bakterienkulturen, wie oben bei Transformation von XL-1 Blue *E.coli* beschrieben, von mehreren Klonen angesetzt. Für fünf Klone wurden Sequenzierungen mit dem Primern T7 und SP6 durchgeführt.

**Sequenzierung**

T7 Mastermix: 3 µl T7 Primer (10 µM) + 30 µl addH<sub>2</sub>O + 12 µl BDmix

SP6 Mastermix: 6 µl SP6 Primer (5 µM) + 27 µl addH<sub>2</sub>O + 12 µl BDmix

Je 7,5 µl von jedem Mastermix (für T7 und SP6 getrennte Ansätze) und je 2,5 µl von der jeweiligen Plasmid-DNA wurden pro Tube pipettiert. Zykluszahl = Zz.

Programm: Deckel: 110°C  
 95°C, 30 s (Zz: 35)  
 55°C, 30 s (Zz: 35)  
 60°C, 4 min (Zz: 35)  
 8°C ∞

Die Produkte wurden aufgereinigt (illustra Autoseq™ G-50 columns), Denaturierung der DNA erfolgte bei 95°C (2 min), danach ca. 5 min auf Eis, es folgte die Sequenzierung. Ein positiver Klon wurde in Mutagenese II verwendet.

### **Mutagenese II**

13,6 µl Mut02B18ibfor Primer (≈ 125 ng) + 13,6 µl Mut02B18ibrev Primer (≈ 125 ng) + 5,0 µl 10x Puffer + 2,0 µl Plasmid-DNA (1:100) + 1,0 µl dNTP Mix (Stratagene) + 14,8 µl addH<sub>2</sub>O + 1,0 µl PfuUltra (Stratagene)

Programm, siehe Mutagenese I

2 min auf Eis

+ 1,0 µl Dpn I (Stratagene), mischen

1 h Inkubation bei 37°C, es folgte eine Transformation von XL-1 Blue mit 1 µl vom Dpn I Verdau. Die Bakterien wurden anschließend auf einer LB-Amp-Agar-Platte ausplattiert. Für eine erneute Plasmid-Isolierung wurden Bakterienkulturen angesetzt. Für fünf Klone wurden Sequenzierungen mit dem Primern T7 und SP6 durchgeführt.

### **Verdau vom HLA-B18 Fragment pGEM T Easy Vektor und pET3a Vektor (Entelechon)**

Für jedes Plasmid gilt:

20 µl Plasmid-DNA + 60 U Sma I + 3 µl Puffer 4 + 4 µl addH<sub>2</sub>O, 2,5 h Inkubation bei Raumtemperatur, danach + 6 µl addH<sub>2</sub>O + 20 U Nde I jede 0,5 h zugeben, insgesamt viermal. Nach dem Restriktionsverdau wurde beim pET3a Vektor zusätzlich 1 µl Calf Intestinal Alkaline Phosphatase zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde ein 0,9% Agarosegel vorbereitet und die beiden Proben wurden aufgetragen. Die entsprechenden Fragmente wurden aus dem Gel isoliert und aufgereinigt (Agarose Gel DNA Extraction Kit, Roche). Die jeweiligen Fragmente wurden in jeweils 10 µl (HLA-B18-Fragment) bzw. 20 µl (pET3a-Fragment) Elutionspuffer (Agarose Gel DNA Extraction Kit, Roche) eluiert.

### **Ligationsansatz für HLA-B18 pET3a**

1 µl T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) + 1 µl 10x T4 DNA-Ligase Puffer (New England Biolabs) + 5 µl HLA-B18-Fragment + 1 µl pET3a-Fragment + 2 µl addH<sub>2</sub>O.

Der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin bei -20°C eingefroren. XL1 Blue Bakterien wurden mit dem Ligationsansatz transformiert. Es wurden Bakterienkulturen angesetzt und die Plasmid-DNA isoliert (Minipräp) mit anschließenden Sequenzierungen mit dem

T7 (10  $\mu\text{M}$ ) und T7term (10  $\mu\text{M}$ ) Primern. Die Plasmid-DNA (HLA-B18 pET3a) von einem positiven Klon wurde im Induktionstest verwendet.

### Induktionstest

Um die Induktion und Produktion von *inclusion bodies* zu testen, wurden Induktionstests durchgeführt. Der HLA-B18 pET3a Vektor wurde zur Transformation von BL21(DE3) pLysS *E.coli* verwendet. Dazu wurden 50  $\mu\text{l}$  Bakteriensuspension mit 1  $\mu\text{l}$  vom HLA-B18 pET3a Vektor transformiert und auf einer LB-Amp-Camp-Agar-Platte ausplattiert. Es wurden Bakterienkulturen angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 240 rpm und 36,5°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde mit den Kulturen Minipräp durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde in 50  $\mu\text{l}$  addH<sub>2</sub>O eluiert. Das ausgefallene Protein-Pellet für einen *E.coli*-Klon (transformiert mit HLA-B18 pET3a) wurde aufgehoben (Negativkontrolle). Ein kleiner Anteil dieser Bakterienkultur (0,75 ml) wurde in ein neues Gefäß überführt und es wurden weitere 4,25 ml LB-Medium zugegeben. Die OD<sub>600</sub> betrug 0,503. Diese Kultur wurde mit 1,25  $\mu\text{l}$  IPTG (1 M) induziert und 5 h im Schüttler bei 36,5°C inkubiert. Anschließend wurde mit dieser Probe ein Minipräp durchgeführt. Das Protein-Pellet wurde aufgehoben. Beide Pellets wurden über Nacht in 100  $\mu\text{l}$  Harnstoffpuffer bei 4°C inkubiert. Eine weitere Bakterienkultur für den gleichen Klon wurde angesetzt. Es wurde erneut ein Induktionstest, wie oben beschrieben (hier IPTG-Zugabe bei OD<sub>600</sub> = 0,490) durchgeführt. Die Bakterien wurden zentrifugiert und in 30  $\mu\text{l}$  PBS aufgenommen. Es wurde ein SDS-PAGE vorbereitet und jeweils 10  $\mu\text{l}$  der in Harnstoffpuffer gelösten Proben sowie 3  $\mu\text{l}$  vom Bakterienpellet mit jeweils 10  $\mu\text{l}$  Ladepuffer 5 min bei 95°C erhitzt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Proteinproben wurden ca. 1,5 h bei 200 V und 50 mA aufgetrennt und das Gel über Nacht in Coomassie R gefärbt. Am folgenden Tag wurde das Gel entfärbt.

## 2.13 Rückfaltung von HLA-B18 MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexen

### 2.13.1 *Inclusion bodies* (rekombinante $\alpha$ -Kette HLA-B18)

Küvetten, Glasgefäße:	Plastikmikroküvetten (Sarstedt), Quarzmikroküvette (Hellma), Glashomogenisator mit Kolben, Glasflaschen (Schott)
Marker, Enzyme:	SmartLadder (Eurogentec), DNase I 10 mg/ml (Roche)
Kit:	Qiaprep spin Miniprep Kit (Qiagen)
Sonstiges Material:	1 M IPTG (Peqlab) in H <sub>2</sub> O, Aufbewahrung bei -20°C, 1 M MgCl <sub>2</sub> (Merck) in ddH <sub>2</sub> O, Reaktionsgefäße (Eppendorf)
Antibiotika:	1000x Ampicillin (Amp) (Roth) 100 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O, 1000x Chloramphenicol (Camp) (Sigma-Aldrich) 34 mg/ml in 99% Ethanol (Merck), bei beiden Aufbewahrung bei -20°C
LB-Agar-Platten:	LB-Amp-Camp-Agar-Platten (Kap. 2.12, S. 25)

<i>E. coli</i> -Stämme:	BL21(DE3) pLysS, für Transformation mit dem Expressionsvektor HLA-B18 pET3a
Vektor:	HLA-B18 pET3a. Bei dem zu exprimierenden Protein handelt es sich um eine modifizierte Form der HLA- $\alpha$ -Kette HLA-B*1801 (Methionin + $\alpha_1$ - $\alpha_3$ ohne AS 275-338, mit Biotinylierungssequenz (siehe Kap. VI) am Carboxy-Terminus).
LB-Medium:	10 g/l Trypton Pepton (Difco), 5 g/l Bacto Yeast Extract (Difco), 10 g/l NaCl (Merck), autoklaviert
Triton-Waschpuffer (TWP):	50 mM Tris pH 8,0 (Sigma-Aldrich), 100 mM NaCl (Merck), 0,5% Triton X 100 (Roth), 1 mM DTT (Sigma-Aldrich), 1 mM EDTA (Roth), 0,01% Natriumazid (Merck)
Resuspensionspuffer (RP):	50 mM Tris pH 8,0 (Sigma-Aldrich), 100 mM NaCl (Merck), 1 mM DTT (Sigma-Aldrich), 1 mM EDTA (Roth), 0,01% Natriumazid (Merck)
Harnstoffpuffer (HP):	8 M Harnstoff (Roth), 10 mM Tris pH 8,0 (Sigma-Aldrich), 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck), 0,1 mM EDTA (Roth), 0,1 mM DTT (Sigma-Aldrich), Aufbewahrung als Stammlösung mit „Duolite“ Indikatorharz (Merck), Filtration direkt vor Gebrauch.
Geräte:	UV/Visible Spektrometer Ultraspec 3000 (Pharmacia, Biotech), Schüttler (Infors), Ultraschallgerät (Branson Sonifier 250), Zentrifuge Sorvall RC 5C Plus mit Rotor SS-34 und SLA 3000, N <sub>2</sub> -Druckgasflasche (AGA Gas GmbH)

BL21(DE3) pLysS *E. coli* wurden mit dem HLA-B18 pET3a Vektor transformiert und auf eine LB-Amp-Camp-Agar-Platte ausplattiert. Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C. Die Platte wurde bis zum Animpfen der Vorkultur bei 4°C aufbewahrt. Eine kleine Vorkultur mit 5 ml LB-Medium (+ 5  $\mu$ l 1000x Amp + 5  $\mu$ l 1000x Camp) wurde mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 36,5°C und 250 rpm im Schüttler inkubiert. Die kleine Vorkultur wurde in ein größeres Vorkulturgefäß mit 500 ml LB-Medium (+ 0,5 ml 1000x Amp + 0,5 ml 1000x Camp) überführt. Inkubation erfolgte im Erlenmeyerkolben über Nacht bei 36,5°C im Schüttler bei 180 rpm. 4 l LB-Medium (Großkultur) wurden in Erlenmeyerkolben verteilt und es wurde Antibiotika zugegeben (+ 4 ml 1000x Amp + 4 ml 1000x Camp). Aus der Vorkultur (500 ml) wurde die Großkultur mit je 15 ml angeimpft und weiter bei 36,5°C, 180 rpm im Schüttler inkubiert. Zur OD<sub>600</sub>-Messung wurden Proben aus der Großkultur entnommen. Die Inkubation wurde unterbrochen als die OD<sub>600</sub> = 0,804 betrug. 0,5 ml IPTG (1 M) wurde pro 1 l in jedes Gefäß gegeben und 4 h bei gleichen Bedingungen weiter inkubiert. Die Bakterienkultur wurde bei 4°C

20 min lang bei 5000 rpm abzentrifugiert (Rotor SLA 3000). Das Bakterienpellet wurde in PBS aufgenommen. Der Probe wurde DNase I (Endkonzentration: 10 µg/ml) und MgCl<sub>2</sub> (Endkonzentration: 10 mM) zugegeben. Lagerung erfolgte bei -80°C. Zur weiteren Bearbeitung wurde die Probe aufgetaut, DNase I und MgCl<sub>2</sub> zugegeben, ca. 2 min mit Ultraschall (Einstellung Output 5, Cycle 50%) behandelt. Dieser Vorgang wurde wiederholt (+ weitere 2 min Ultraschall). Die Bakterienlysate werden bei 15000 rpm und 4°C 20 min lang zentrifugiert (Sorvall SS-34). Die Pellets wurden zweimal mit TWP resuspendiert, im Glashomogenisator homogenisiert und 20 min lang und 15000 rpm bei 4°C zentrifugiert, bis das Pellet eine weiße Farbe erhielt. Die *inclusion bodies* wurden in kaltem RP aufgenommen und wieder homogenisiert und abzentrifugiert. Jedes Mal wurde die dunkle Schicht entfernt. Die zwei Pellets wurden in jeweils 10 ml HP aufgenommen. Anschließend wurden die Proben über Nacht im Kühlraum rotiert. Am nächsten Tag erfolgte eine erneute Zentrifugation. Die Proben wurden in einen 50 ml Röhren gesammelt. Mit Hilfe des Bradford-Tests (Kap. 2.13.3, S. 35) wurde die Proteinkonzentration ermittelt und die Lösung mit 8 mg Protein pro Röhren aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

### 2.13.2 HLA-B18 MHC-Klasse-I-Peptid-Tetramere

Röhren:	1,5 ml Lichtschutz-Reaktionsgefäß (Eppendorf)
Filtration:	Amicon 400 ml Rührzelle (Millipore), Amicon Ultra-15 Ultrafiltrationseinheit Ultracel-10K mit regenerierter Cellulose (Millipore), Membran für Rührzelle 76 mm Dia NMWL 10000 mit regenerierter Cellulose (Millipore), Steritop 250 ml (Millipore)
Enzyme, Proteine:	α-Kette HLA-B18 (8 mg Aliquots), β <sub>2</sub> -Mikroglobulin (7 mg Aliquots), synthetisches Peptid (ca. 2-8 mg) 10 mg/ml in DMSO (Merck), Streptavidin-PE 1 mg/ml (Invitrogen), BirA Ligase
Sonstiges Material:	1000x Leupeptin (Roche) 1 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O als 250 µl-Aliquots bei -80°C, 1000x Pepstatin (Roche) 0,7 mg/ml in Methanol (Merck), 250 µl-Aliquots bei -80°C, 1000x PMSF (Sigma-Aldrich) 200 mM in Methanol (Merck), 250 µl-Aliquots bei -80°C, oxidiertes Glutathion (Sigma-Aldrich), reduziertes Glutathion (Sigma-Aldrich), ATP (Sigma-Aldrich) 100 mM in H <sub>2</sub> O (eingestellt auf pH 7,0, 300 µl-Aliquots bei -80°C), D-Biotin (Sigma-Aldrich) 100 mM in 200 mM Tris Base als 250 µl-Aliquots bei -80°C, 1 M MgCl <sub>2</sub> (Merck), 10% Natriumazid (Merck), 1 M Tris (Sigma-Aldrich) pH 8,0 bei 25°C eingestellt, Roti-Nanoquant (Roth) als Arbeitslösung frisch 1:5 in ddH <sub>2</sub> O verdünnt, 1/10 ml Spritze (Becton Dickinson), Kanülen 26G (Braun)

---

TBS:	20 mM Tris (Sigma-Aldrich), 150 mM NaCl (Merck) auf pH 8,0 eingestellt mit HCl (Merck) bei 10°C, Sterilfiltration und Autoklavierung
Rückfaltungspuffer:	17,42 g L-Arginin freie Base (Sigma-Aldrich), 5,95 g HEPES (Roth), 1 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 (Roth), 21 ml ddH <sub>2</sub> O lösen mit einem Magnetrührer bei 10°C wurde mit konzentrierter HCl ein pH-Wert von 7,76 eingestellt, anschließend mit ddH <sub>2</sub> O auf 250 ml aufgefüllt, steril filtriert und autoklaviert, Lagerung im Kühlraum
Injektionspuffer (IP):	3 M Guanidinium HCl (Fluka), 10 mM Natriumacetat (Sigma-Aldrich), 10 mM EDTA (Roth) mit HCL auf pH 4,2 eingestellt und aliquotiert, bei -20°C gelagert
Harnstoffpuffer (HP):	8 M Harnstoff (Roth), 10 mM Tris pH 8,0 (Sigma-Aldrich), 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck), 0,1 mM EDTA (Roth), 0,1 mM DTT (Sigma-Aldrich), Aufbewahrung als Stammlösung mit „Duolite“ Indikatorharz (Merck), Filtration vor Gebrauch
Programme:	Unicorn 4.00
Geräte:	ÄKTA purifier (Unicorn) mit Säule HiLoad, 26/60 Superdex 200 prep grade (Biotech), Fraktionssammler Frac-950 (Amersham Pharmacia Biotech) und UV-Detektor (Pharmacia)

Unter Rühren wurden 385 mg reduziertes Glutathion, 77,7 mg oxidiertes Glutathion und 250 µl 1000x PMSF, die Peptidlösung, 8 mg MHC  $\alpha$ -Kette (auf 20 mg/ml mit HP verdünnt + 700 µl IP), 7 mg  $\beta_2$ -Mikroglobulin (+ 780 µl IP) dem Rückfaltungspuffer zugegeben. Es folgten zwei Zugaben 8 mg der MHC  $\alpha$ -Kette in Abständen von 4,5 bis 24 h. Der Rückfaltungspuffer wurde im Schüttler bei 100 rpm (Multitron, Infors) im Kühlraum geschüttelt. Die Lösung wurde durch einen Vakuumfilter filtriert. Eine Amicon-Rührzelle mit einer Membran aus regenerierter Cellulose wurde vorbereitet. Die filtrierte Lösung wurde auf ca. 20 ml bei ca. 60 psi aufkonzentriert. Das Retentat und das Permeat wurden gesammelt. Die Aufbewahrung erfolgte im Kühlraum/Kühlschrank. Mit dem Permeat wird eine zweite Rückfaltungsphase durchgeführt. Die oben beschriebene Prozedur des ersten Rückfaltungsabschnitts wurde wiederholt (ohne Zugabe von Peptid sowie der beiden Formen von Glutathion). Eine zweite Aufkonzentrierung folgte. Das Retentat wurde bei 4°C für 5 min bei 4000 rcf zentrifugiert und in einer Amicon Ultra-15 Ultrafiltrationseinheit auf ca. 5 ml bei 4°C und 4000 rcf aufkonzentriert. Optimalerweise wurde das Retentat nochmals bei 4°C, 4000 rcf für 5 min zentrifugiert bevor die Probe zur Auftrennung der Fraktionen auf eine Säule (HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade) gegeben wurde. Die Auftrennung erfolgte mit einem ÄKTASystem bei einer Flussrate von 3 ml/min. Die Fraktionen

zwischen 100 ml und 200 ml wurden im Fraktionssammler eingefangen. Der Monomer-Peak (ca. 40 bis 50 ml Gesamtvolumen) wurde gesammelt. Bei 40 ml Volumen wurden je 40 µl von 1000x PMSF, 1000x Leupeptin und 1000x Pepstatin der Probe zugegeben. Die Lösung wurde in einer Amicon Ultra-15 Ultrafiltrationseinheit auf 5 ml aufkonzentriert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 4°C und 4000 rcf. Bei einem Volumen von 5 ml wurden 400 µl Tris (1 M) pH 8,0 (25°C), 25 µl MgCl<sub>2</sub> (1 M), 250 µl ATP (100 mM), 9,3 µl BirA Ligase (1 mg/ml) und 28,5 µl D-Biotin (100 mM) zugegeben. Die Lösung wurde gut durchgemischt. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Wasserbad bei 27°C. Hiernach wurde die Probe bei 4000 rcf und 4°C für 5 min zentrifugiert und eine zweite Auftrennung mit Hilfe eines ÄKTASystems durchgeführt. Der Peak für das biotinylierte Monomer wurde gesammelt. Bei einem Volumen von 45 ml wurde 45 µl 1000x PMSF, 45 µl 1000x Leupeptin und 45 µl 1000x Pepstatin, sowie 360 µl Natriumazid (10%) und 180 µl EDTA (500 mM) zugegeben. Das biotinylierte Monomer wurde in einer Amicon Ultra-15 Ultrafiltrationseinheit auf 200 bis 700 µl aufkonzentriert. Mit einer Proteinbestimmung nach Bradford ermittelte man die Proteinkonzentration der Probe. Die Monomer aliquots wurden zu je 25 µg oder 50 µg in gekennzeichneten Lichtschutz-Röhrchen aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. Für eine Tetramerisierung wurde die gewünschte Menge an MHC-Peptid-Monomer aufgetaut und im Kühlraum mit Streptavidin-PE-Konjugat (10 Zugaben) versetzt. Bei 50 µg Monomer wurden insgesamt 78,5 µg Streptavidin-PE eingesetzt.

### 2.13.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Platten:	96-Well-Flachbodenplatte (Greiner Bio-One)
Protein-Assay:	Roti-Nanoquant (Roth), BSA (Sigma-Aldrich) als „BSA <sub>1</sub> “: 0-100 µg/ml in 8 M Harnstoffpuffer bzw. „BSA <sub>2</sub> “: 0-80 µg/ml in TBS-0,01% Natriumazid, aliquotiert und bei -20°C gelagert
Programme:	Softmax Pro 2.1.0
Geräte:	Spectra Max 340 (Molecular Devices),

Um den Bradford-Test durchzuführen, wurde eine 96-Well-Flachbodenplatte mit Standard- und Probenlösungen vorbereitet. Die Probenlösung wurde 1:50 und 1:100 in der entsprechenden Lösung verdünnt. In die ersten sechs Wells wurden die Standardlösungen von (0, 20, 40, 60, 80 und 100) µg/ml BSA<sub>2</sub> mit je 50 µl pipettiert. Die vorbereiteten Verdünnungen der zu untersuchten Probe wurden als Triplikate (50 µl pro Well) pipettiert. Mit einer Multikanalpipette wurden 200 µl der Roti-Nanoquant-Lösung (1:5 mit ddH<sub>2</sub>O) in alle Wells pipettiert und kurz gemischt. Luftblasen wurden gegebenenfalls entfernt. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur folgte die Messung. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration von *inclusion bodies* der rekombinanten α-Kette HLA-B18 wurde die Probe 1:200 und 1:400 verdünnt. Für die

entsprechende Standard-Regressionsgerade wurden Standardlösungen von (0, 20, 40, 60 und 80)  $\mu\text{g/ml}$  BSA<sub>1</sub> mit je 50  $\mu\text{l}$  pipettiert.

## 2.14 *Ex vivo* Tetramerfärbung (MHC-Klasse-I)

Platten:	96-Well-Rundbodenplatte (Corning)
Sonstiges Material:	FACS-Flow, FACS-Safe, FACS-Rinse, 5 ml FACS-Röhrchen (Becton Dickinson), Spritze 50 ml (Becton Dickinson), Sterilfilter 0,22 $\mu\text{m}$ (Corning)
FACS-Fix:	FACS-Puffer PFEA mit 1% Formaldehyd (Fluka)
BSA-FACS-Puffer (PBEA):	PBS mit 0,5% BSA (Sigma-Aldrich), 2 mM EDTA (Roth), 0,01% Natriumazid (Merck)
Tetramer-Färbepuffer:	50% PBS Dulbecco's, 50% FCS (PAA) 30 min bei 56°C Hitzeinaktiviert, 2 mM EDTA (Roth), 0,01% Natriumazid (Merck), filtriert
FACS-Puffer (PFEA):	PBS Dulbecco's, 2% FCS (PAA) 30 min bei 56°C Hitzeinaktiviert, 2 mM EDTA (Roth), 0,01% Natriumazid (Merck)
Programme:	FACS Diva und FlowJo 7.6.1, StarOffice 7, SigmaPlot 2001
Geräte:	FACSCanto II (BD Biosciences)

Die Färbung wurde *ex vivo* auf Eis in 96-Well-Rundbodenplatten durchgeführt. Alle Zentrifugationsschritte waren identisch (3 min bei 2100 rcf und 4°C). Die Proben wurden aufgetaut und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit  $5 \times 10^6$  Zellen pro Well verteilt. Hiernach erfolgte eine Färbung mit Aqua Life/Dead zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen. Der Farbstoff wurde in PBS verdünnt. Die Zellen wurden in 75  $\mu\text{l}$  dieser Lösung resuspendiert und für 20 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Antikörpern gegen Oberflächenmarker gefärbt. Die Antikörper wurden entsprechend den Angaben in Tab. 6 in PBEA verdünnt. 50  $\mu\text{l}$  der Lösung wurde pro Probe zur Färbung eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 4°C, 15 min lang. Die Zellen wurden mit PBEA gewaschen. PE-Tetramere wurden in Tetramer-Färbepuffer auf 5  $\mu\text{g/ml}$  verdünnt (berechne aus  $\rho$  Monomer) und 1 min bei 14000 rpm (Zentrifuge 5417C) abzentrifugiert. Pro Färbung wurden 50  $\mu\text{l}$  Tetramerlösung verwendet. Die Inkubation erfolgte 30 bis 35 min bei 4°C. Danach wurden die Zellen mit PFEA gewaschen und in FACS-Fix-Lösung aufgenommen. Die Messung erfolgte entweder im Anschluss an die Färbung oder innerhalb der nächsten Woche (Aufbewahrung bei 4°C). Die Messungen wurden am FACSCanto II durchgeführt. Für die Kompensation wurden ungefärbte und einfach gefärbte Zellen oder spezielle Beads (Kap. 2.16, S. 38) verwendet. Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms FlowJo 7.6.1.

**Tab. 6: Liste der Antikörper, die für die Tetramerfärbungen verwendet wurden**

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-Human CD8 PC7	737661, Beckman Coulter	1:100
Anti-Human CD8 PerCP	345774, Becton Dickinson	3 µl pro test
Anti-Human CD8 PE	21270084, Immunotools	1:200
Anti-Human CD3 Pacific Blue	300417, Biolegend	1:100
Anti-Human CD4 APCCy7	557871, BD Pharmingen	1:100
Anti-Human CD4 FITC	Klon HP2/6 *	1:200
Anti-Human CD45RO FITC	555492, BD Pharmingen	1:5
Anti-Human CCR7 AF647	5577334, BD Pharmingen	1:20
Aqua Live/Dead	L34957, Invitrogen	1:200 oder 1:400

\* = [198]

### Tetramerfärbung zur Detektion der Herabregulation vom TCR

Die kryokonservierte Probe Leuka02 wurde am Vortag aufgetaut und zweimal mit PBS gewaschen und in 10% Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden pro Well mit  $2 \times 10^7$  Zellen und 2 ml in einer 6-Well-Platte verteilt und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen aus der Kultur genommen und zweimal mit PBS gewaschen und gezählt. Die Zellen wurden in 2% Kulturmedium aufgenommen und mit 200 µl und ca.  $5 \times 10^6$  Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte verteilt. Jede 0,5 h wird 1 µl von der Peptidlösung (SELEIKRY), 1 mg/ml, zugegeben. Die Endkonzentration betrug 5 µg/ml. Als Kontrollen wurden HIV-Peptid und DMSO-Lösung (Endkonzentration wie bei Peptidaliquots) eingesetzt. Die Zellen wurden bei Peptidgabe kurz gemischt und bei 1500 rcf, 4°C, 2 min lang zentrifugiert. Anschließend wurde eine Tetramerfärbung durchgeführt. Außer HLA-B18-SELEIKRY-PE wurden bei der Färbung CD8 PC7, CD4 FITC und CD3 PacificBlue und Aqua Live/Dead eingesetzt. Für Messung und Analyse siehe S. 36.

## 2.15 Expansion von Epitop-spezifischen T-Zellen durch Stimulation mit synthetischen Peptiden für die Untersuchung mittels intrazellulärer Zytokinfärbung

Platten: 96-Well-Rundbodenplatte (Costar)  
 Zytokine: IL-2 (Novartis), Lagerung bei -20°C

Sonstiges Material:	synthetische Peptide (1 mg/ml) in ddH <sub>2</sub> O 10% DMSO (Merck), PBS ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> (Lonza), PBMC-Proben, Spritze 50 ml (Becton Dickinson), Sterilfilter 0,22 µm (Corning)
Peptid-Platte:	96-Well-Rundbodenplatte (Corning) mit Peptidaliquots (5% Kulturmedium mit 3 µg/ml Peptid pro Well), Aufbewahrung bei -80°C und -20°C
Kulturmedium: (5%)	IMDM-Medium (Lonza), 5% Humanserum (Lonza) 30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert, 1% Pen-Strep (10000 U/ml, Lonza), 25 µg/ml Gentamicin Sulfate (Lonza), 50 µM β-Mercaptoethanol (Roth), steril filtriert

Die PBMC-Proben wurden aufgetaut und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden gezählt und in 5% Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden zu 3 bis 5x10<sup>5</sup> Zellen pro Well bei 96-Well-Platten verteilt. Das Medium enthielt IL-2 zu einer Endkonzentration von 300 U/ml und das Peptid wurde zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben. Eine erneute Stimulation erfolgte einmal pro Woche mit den gleichen Endkonzentrationen für IL-2 und den in der Stimulation eingesetzten Peptiden. Nach drei erfolgten Stimulationen wurde ca. eine Woche später eine intrazelluläre Zytokinfärbung durchgeführt.

## 2.16 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Platten und Röhrchen:	5 ml FACS-Röhrchen (Becton Dickinson), 0,5 ml FACS-Röhrchen (Greiner Bio-One), 96-Well-Rundbodenplatte (Corning), 6-Well-Flachbodenplatte (Falcon)
Sonstiges Material:	synthetische Peptide gelöst in ddH <sub>2</sub> O mit 10% DMSO (Merck) 1 mg/ml, Lagerung bei -80°C oder -20°C, 10 µg/ml PMA (Sigma-Aldrich), 1 mM Ionomycin (Sigma-Aldrich), Brefeldin A (Sigma-Aldrich) 1 mg/ml in IMDM-Medium (Lonza) 20% Ethanol pro Analysis (Merck), BD GolgiStop <sup>TM</sup> (BD Biosciences), Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences), Anti-Rat Ig, κ / Anti-Mouse Ig, κ / Negative Control (FBS*) Compensation Particle Set (BD Biosciences), ArC reactive beads Component A (Invitrogen), Live/Dead Fixable Dead Cells Stain Kit (Invitrogen), PBS Dulbecco's, FACS-Clean, FACS-Rinse, FACS-Flow, Sterilfilter 0,22 µm (Corning), Spritze 50 ml (Becton Dickinson)
Kulturmedium: (10%)	IMDM-Medium (Lonza), 10% Humanserum (Lonza) 30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert, 1% Pen-Strep (10000 U/ml, Lonza),

	25 µg/ml Gentamicin Sulfate (Lonza), 50 µM β-Mercaptoethanol (Roth), steril filtriert
Kulturmedium: (2%)	IMDM-Medium (Lonza), 2% Humanserum (Lonza) 30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert, 1% Pen-Strep (10000 U/ml, Lonza), 25 µg/ml Gentamicin Sulfate (Lonza), 50 µM β-Mercaptoethanol (Roth), steril filtriert
Perm/Waschlösung:	PBS Dulbecco`s, 0,1% Saponin (Sigma-Aldrich), 0,5% BSA (Sigma-Aldrich), 0,01% Natriumazid (Merck)
FACS-Puffer 1 (PFEA):	PBS Dulbecco`s, 2% FCS (PAA), 30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert, 2 mM EDTA (Roth), 0,01% Natriumazid (Merck)
FACS-Puffer 2 (PBEA):	PBS Dulbecco`s, 0,5% BSA (Sigma-Aldrich), 2 mM EDTA (Roth), 0,01% Natriumazid (Merck)
FACS-Fix:	FACS-Puffer PFEA mit 1% Formaldehyd (Fluka)
Programme:	FACS Diva und FlowJo 7.6.1, Cell Quest Pro / Pro II, StarOffice 7, Microsoft Excel
Geräte:	FACSCanto II (BD Biosciences), FACSCalibur (BD Biosciences)

Die Färbungen wurden entweder nach einer Stimulation oder direkt *ex vivo* durchgeführt. Für die *ex vivo* Färbung wurden die Zellen am Vortag aufgetaut, mit PBS gewaschen und in 10% Kulturmedium mit  $10^7$  Zellen pro 1 ml in 6-Well-Flachbodenplatten aufgenommen. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit IMDM-Medium gewaschen und bei 1600 rcf, 6 min, bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Zellen wurden in 2% Kulturmedium aufgenommen und mit 100 µl und maximal ca.  $4 \times 10^6$  Zellen pro Well verteilt. Danach wurden Peptide (Endkonzentration 1 µg/ml) sowie die Negativ- und die Positivkontrolle (HIV-Peptid, PMA-Ionomycin) mit 50 µl pro Well zugegeben. Dabei wurde 1,5 µl von Ionomycin und 7,5 µl PMA in 0,5 ml Kulturmedium pipettiert. Von diesem Ansatz wurde 50 µl pro Well für Positivkontrollen pipettiert. In jedes Well wurde der CD107a FITC Antikörper und Brefeldin A (1,5 µl pro 150 µl Finalvolumen) pipettiert. Danach wurden die Proben gut durchgemischt und die Platte bei 1500 rcf und Raumtemperatur 2 min lang zentrifugiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 4 bis 5 h. Hiernach erfolgte die Zugabe von 50 µl PBS und die Platte wurde 3 min bei 2100 rcf und 4°C zentrifugiert. Die folgenden Zentrifugationsschritte waren identisch. Die Zellen wurden nochmals mit PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine Färbung mit Aqua Life/Dead zur Unterscheidung von toten und lebenden Zellen. Der Farbstoff wurde in PBS verdünnt. Die Zellen wurden in 75 µl dieser Lösung resuspendiert und für ca. 20 min bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden mit PBS gewaschen und anschließend erfolgte eine Färbung gegen Oberflächenmarker. Die Antikörper wurden in PBEA verdünnt. 50 µl der Lösung wurde pro Probe zur Färbung eingesetzt. Die

Inkubation erfolgte wieder bei 4°C, 15 min lang. Die Zellen wurden mit PBEA gewaschen und mit 100 µl Cytofix/Cytoperm pro Well gemischt. Inkubationsdauer betrug 20 bis 30 min bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen mit Perm/Waschlösung gewaschen und mit Antikörpern gegen intrazelluläre Marker gefärbt. Alle Marker wurden in Perm/Waschlösung entsprechend der Tab. 7 verdünnt und mit 50 µl der Lösung pro Probe eingesetzt. Inkubation dauerte 30 min bei 4°C. Danach wurden die Proben einmal mit Perm/Waschlösung und einmal mit PFEA gewaschen. Anschließend wurden die Zellpellets für die Messung in 200 µl FACS-Fix aufgenommen.

**Tab. 7: Liste der Antikörper, die für die intrazelluläre Zytokinfärbung verwendet wurden**

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-Human CD8 PerCP	345774, Becton Dickinson	3 µl pro test
Anti-Human CD8 PC7	737661, Beckman Coulter	1:100
Anti-Human CD4 APCCy7	557871, BD Pharmingen	1:100
Anti-Human IFN $\gamma$ PECy7	557844, BD Pharmingen	1:400
Anti-Human IFN $\gamma$ FITC	554700, BD Pharmingen	1:200
Anti-Human TNF $\alpha$ Pacific Blue	502920, BioLegend	1:120
Anti-Human MIP-1 $\beta$ APC	560686, BD Pharmingen	1:100
Anti-Human IL-2 PE	554566, Becton Dickinson	1:130
Anti-Human CD107a FITC	555800, BD Pharmingen	1:100
Aqua Live/Dead	L34957, Invitrogen	1:200 oder 1:400

### Färbung von T-Zell-Klonen

Bei der Testung von Klonen wurden nur geringe Zellzahlen (50 µl aus 96-Well pro Test) eingesetzt. Es folgte ein Waschschrift mit IMDM-Medium (2100 rcf, 3 min, Raumtemperatur). Die Inkubationszeit mit Peptid betrug 5 bis 6 h. Bei diesen Färbungen, wurden nur die IFN $\gamma$  FITC und CD8 PC7 Antikörper eingesetzt. Es wurde keine Aqua Life/Dead Färbung durchgeführt. Bei einigen Färbungen wurde neben Brefeldin A auch BD GolgiStop<sup>TM</sup> (1:1500) eingesetzt. Zur Messung wurden die Zellen in 100 bis 150 µl FACS-Fix aufgenommen.

### Färbung nach Expansion durch Stimulation mit synthetischen Peptiden

Pro Test wurden 50 µl der Zellen in Kultur in eine neue 96-Well-Platte überführt. Die Proben wurden mit PBS gewaschen. Die Proben wurden abzentrifugiert (2100 rcf, 3 min,

Raumtemperatur). Der Überstand wurde verworfen. Die Zellpellets wurden in 50 µl 2% Kulturmedium aufgenommen. Es wurden 50 µl von der Peptidlösung (Peptid-Platte, 5% Kulturmedium) zugegeben. Als Negativkontrolle wurde Medium verwendet. Pro Well wurden 1,5 µl Brefeldin A eingesetzt. Zusätzlich wurden 50 µl IMDM-Medium zugesetzt. Die Peptidkonzentration betrug pro Test 1 µg/ml. Die Inkubationszeit betrug 3,5 bis 4 h. Aufgrund geringer Zellanzahl wurde bei der Aqua Life/Dead Färbung auch 45 µl, bei Färbungen mit den Antikörpern 35 µl und bei der Inkubation mit Cytotfix/Cytoperm 45 µl pro Well eingesetzt. Nach der intrazellulären Färbung mit IFN $\gamma$  FITC wurden die Zellen nur mit Perm/Waschlösung gewaschen. Zur Messung wurden die Zellen in 150 µl FACS-Fix aufgenommen. Färbungen nach Stimulationsprotokoll für ELISPOT: siehe *ex vivo* Färbung ohne Anti-MIP-1 $\beta$  APC-Antikörper, Stimulation mit Peptiden in 10% oder 2% Kulturmedium mit BD GolgiStop<sup>TM</sup> und Brefeldin A, 6 bis 7 h.

Kompensation: ungefärbte, einfach gefärbte Zellen, spezielle Beads. Die Analyse der Daten (*ex vivo* Färbung, Bulk-Kultur) erfolgte mit Hilfe des Programms FlowJo 7.6.1. Für einfache Analysen von Daten, die mit Hilfe des FACSCalibur aufgenommen wurden, wurde das Programm CellQuest Pro / CellQuest Pro II verwendet. Die Auswertung der erhaltenen Daten für *ex vivo* Färbungen wurden mit dem Programm StarOffice 7 und Microsoft Excel durchgeführt.

## 2.17 Expansion von Epitop-spezifischen T-Zellen durch Stimulation mit synthetischen Peptiden für die Sortierungen von IFN $\gamma$ +CD8+ T-Zellen

Platten:	6-Well-Flachbodenplatte (Corning), 12-Well-Flachbodenplatte (Costar)
Zytokine:	IL-2 (Novartis (U/ml), R&D (ng/ml)), IL-4 (PromoKine, R&D), IL-7 (PromoKine), Lagerung aller Zytokine bei -20°C
Sonstiges Material:	synthetische Peptide (1 mg/ml) in ddH <sub>2</sub> O 10% DMSO (Merck), Spritze 50 ml (Becton Dickinson), Sterilfilter 0,22 µm (Corning)
Kulturmedium: (10%)	IMDM-Medium (Lonza), 10% Humanserum (C·C·Pro, Lonza) 30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert, 1% Pen-Strep (10000 U/ml, Lonza), 25 µg/ml Gentamicin Sulfate (Lonza), 50 µM $\beta$ -Mercaptoethanol (Roth), steril filtriert

Die PBMC-Proben wurden aufgetaut und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden gezählt, in 10% Kulturmedium mit 10<sup>7</sup> Zellen pro 1 ml aufgenommen und auf Wells verteilt (1 ml pro 12-Well, 2 ml pro 6-Well). Das Medium enthielt IL-4 und IL-7 mit der Endkonzentration von jeweils 5 ng/ml. Am nächsten Tag wurden Peptide zugegeben mit einer Endkonzentration von 1 µg/ml

sowie IL-4 und IL-7 mit der Endkonzentration von 5 ng/ml. Für die Epitopkandidaten SELEIKRY und SESGQFHAF wurde zwei- bis dreimal jeden zweiten bis dritten Tag IL-2 zugegeben. Bei dem Epitop DEVEFLGHY wurde ein längeres Stimulationsprotokoll mit einer zusätzlichen Restimulation mit Peptid verwendet, siehe dazu Tab. 8. Zur Sortierung wurden die Zellen aus der Kultur genommen, gewaschen, gezählt und zur IFN $\gamma$ -Catch-Färbung vorbereitet.

**Tab. 8: Stimulationsprotokoll für die Sortierung von IFN $\gamma$ +CD8+ T-Zellen**

SELEIKRY	SESGQFHAF	DEVEFLGHY
Auftauen & Kultur	Auftauen & Kultur	Auftauen & Kultur
Peptidzugabe	Peptidzugabe	Peptidzugabe
IL-2 (25 U/ml)	IL-2 (75 U/ml)	IL-2 (10 ng/ml)
IL-2 (25 U/ml)	IL-2 (75 U/ml)	IL-2 (10 ng/ml)
IL-2 (25 U/ml)	Sortierung	IL-2 (10 ng/ml)
Sortierung		Peptidzugabe
		IL-2 (10 ng/ml)
		IL-2 (10 ng/ml)
		IL-2 (10 ng/ml)
		Sortierung

## 2.18 Färbung für Sortierung von IFN $\gamma$ +CD8+ T-Zellen

Platten und Röhren:	15 ml Röhren (Falcon), 5 ml FACS-Röhren (Becton Dickinson), 48-Well-Flachbodenplatte (Greiner Bio-One) etc.
Antikörper:	IFN $\gamma$ Catch Reagent (Miltenyi Biotec), IFN $\gamma$ Detection Antibody konjugiert mit PE (Miltenyi Biotec), CD8 FITC (OKT8, O.P. Corporation)
Zytokine:	IL-2 (Lagerung bei -20°C, Novartis)
Sonstiges Material:	PHA-L (Roche), synthetisches Peptid (1 mg/ml) in sddH <sub>2</sub> O 10% DMSO (Merck) Sterilfilter 0,22 $\mu$ m (Corning), Spritze 50 ml (Becton Dickinson)
Zelllinien und PBMCs:	siehe Kap. 2.19
Kulturmedium:	IMDM-Medium (Lonza), 5% Humanserum (C·C·Pro, Lonza 30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert, 1% Pen-Strep (10000 U/ml, (5%)

	Lonza), 25 µg/ml Gentamicin Sulfate (Lonza), 50 µl β-Mercaptoethanol (Roth), steril filtriert
Waschpuffer:	PBS ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> (Lonza), 0,5% BSA (Sigma-Aldrich), 2 mM EDTA (Roth), steril filtriert

Die Zellen wurden aus der Kultur genommen und mit IMDM-Medium gewaschen und gezählt, anschließend in 5% Kulturmedium aufgenommen und auf eine Konzentration von 10<sup>7</sup> Zellen pro 1 ml eingestellt. Die Stimulationen wurden mit einzelnen Peptiden durchgeführt. Abhängig von der Zellanzahl wurden für die Inkubation verschiedene Platten verwendet (siehe Angaben Miltenyi Biotec). Die Peptide für die Stimulationen wurden zu einer Endkonzentration von 1 bis 2 µg/ml zugegeben. Die Proben wurden gemischt und 5 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Ablauf der Stimulation wurden die Zellen gesammelt und mit kaltem Waschpuffer bei 4°C gewaschen und abzentrifugiert (1600 rcf, 10 min, 4°C). Die Zellpellets wurden in 80 µl kaltem 5% Kulturmedium pro 10<sup>7</sup> Zellen resuspendiert. 20 µl vom IFN-γ Catch Reagent pro 10<sup>7</sup> Zellen wurden zugegeben. Die Proben wurden gut durchgemischt und 5 min bei 4°C inkubiert. Warmes 5% Kulturmedium (37°C) wurde zugegeben, so dass die Zellen auf eine Konzentration von 10<sup>6</sup> Zellen pro 1 ml verdünnt wurden. Die Proben wurden für 45 min bei 37°C inkubiert. Die Röhrchen wurden jede 5 min invertiert. Die Röhrchen wurden mit kaltem Puffer aufgefüllt und zentrifugiert. Der Waschschrift wurde wiederholt. Die Pellets wurden in 80 µl Waschpuffer (kalt) resuspendiert. 20 µl vom IFNγ Detection Antibody und ein CD8 FITC Antikörper (1:50 bis 1:100) wurden zugegeben, die Proben wurden gemischt und 15 min bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden mit kaltem Waschpuffer gewaschen und erneut in 2 ml Waschpuffer aufgenommen und zur Sortierung auf Eis gelagert. Es wurden 96-Well/48-Well-Kulturplatten vorbereitet (Kap. 2.19).

## 2.19 Expansion von sortierten IFN<sub>γ</sub>+CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Platten:	96-Well-Rundbodenplatte (Corning), 48-Well-Flachbodenplatte (Greiner Bio-One)
Zytokine:	IL-2 (Novartis), Lagerung bei -20°C
Sonstiges Material:	PHA-L (Roche), Sterilfilter 0,22 µm (Corning), Spritze 50 ml (Becton Dickinson)
Zelllinien und PBMCs:	LG2-EBV (30 min bestrahlt), kryokonservierte oder frisch isolierte PBMCs (10 min bestrahlt)
Kulturmedium: (7,5%)	IMDM-Medium (Lonza), 7,5% Humanserum (Lonza) 30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert, 1% Pen-Strep (10000 U/ml, Lonza), 25 µg/ml Gentamicin Sulfate (Lonza), 50 µM β-Mercaptoethanol (Roth), steril filtriert

Kulturmedium, LG2-EBV:	IMDM-Medium (Lonza), 10% FCS (PAA) 30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert, 1% Pen-Strep (10000 U/ml, Lonza), steril filtriert
Geräte:	Gammazelle (Caesiumquelle, Gammacell 1000 Elite Nordion International Inc)

Für die Sortierung von Zellen wurden 96-Well-Rundbodenplatten und 48-Well-Flachbodenplatten vorbereitet. Es wurde darauf geachtet, dass zumindest die bestrahlten PBMCs, IL-2 und PHA-L bereits in den Platten für Sortierung gegeben wurden. Zwischen  $1,2$  bis  $1,5 \times 10^5$  bestrahlte PBMCs und  $0,6$  bis  $1,5 \times 10^4$  bestrahlte LG2-EBV Zellen wurden in die Platte zu den sortierten Zellen pro 96-Well und Stimulation gegeben. Bei Bulk-Kulturen (48-Well-Flachbodenplatte) wurden bis fünfmal so viele bestrahlte Zellen pro 48-Well zugegeben. IL-2 wurde zu einer Endkonzentration von 150 U/ml und PHA-L zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben. Optimalerweise wurde diese Prozedur der Stimulation mit Feederzellen jede zweite Woche wiederholt. Zwischen diesen Schritten erfolgte eine Expansion mit IL-2 zu einer Endkonzentration im Well von 150 U/ml ein- bis zweimal pro Woche. Die Restimulation erfolgte mit PBMCs und LG2-EBV Zellen oder mit PBMCs alleine. Falls keine frischen PBMC vorhanden waren, wurden am Vortag kryokonservierte PBMCs aufgetaut und in Kultur genommen und am nächsten Tag bestrahlt. Diese Prozedur wiederholte sich wie oben beschrieben oder es wurde weiter mit IL-2 ein- bis zweimal wöchentlich expandiert, bis frische PBMC-Proben erhältlich waren. Zur Auslese von positiven Klonen wurde eine intrazelluläre Zytokinfärbung für IFN $\gamma$  durchgeführt. Für die Analysen von Daten, die mit Hilfe des FACSCalibur aufgenommen wurden, wurde das Programm CellQuest Pro/ CellQuest Pro II sowie FlowJo 7.6.1 verwendet.

## 2.20 K562-B18 Transfektanten

Platten und Küvetten:	96-Well-Rundbodenplatte (Coster), Elektroporationsküvetten 4 mm (Peqlab)
Kits:	QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen), QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), Nucleospin Extract II (Macherey Nagel), QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen), BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
Antikörper:	FITC goat anti-mouse 115-095-006 (Jackson Immuno Research), B1.23.2 Anti-human HLA-B,-C [175], W6/32 Anti-human HLA-A,-B,-C [176], $\alpha$ -NP IgG2a mAb (b Allel) Isotyp-Kontrolle (Kap. 6, S. 111, Nr. 8)

---

Ladepuffer:	5 ml Glycerol (Roth), 200 µl 50x TAE-Puffer, 0,25% Bromphenol-Blau (Sigma), 0,25% Xylencyanol-Blau (Sigma), mit H <sub>2</sub> O auf 10 ml aufgefüllt
Enzyme und Puffer:	DNase (Promega), RNAsin (Promega), Taq Hotstart (Qiagen), T4 DNA-Ligase mit 10x Puffer (Roche), M-MLV Transkriptase (Promega), T4 DNA-Ligase (New England BioLabs) mit 10x Puffer, Not I (New England BioLabs) 10000 U/ml, Nhe I (New England BioLabs) 10000 U/ml, Pvu I (New England BioLabs) 10000 U/ml, Sal I (New England BioLabs) 20000 U/ml, Bgl II (New England BioLabs) 10000 U/ml, 10x Puffer 2 (New England BioLabs), 10x Puffer 3 (New England BioLabs), 100x BSA-Puffer (New England BioLabs)
Vektoren:	pIRES puro2 (Clontech), pGEM T Easy Vektor und pGEM-T Easy Vector System (Promega)
<i>E.coli</i> -Stämme:	DH5α, XL-1 blue MRF' comp. cells
Zelllinien:	RCC-115-EBV, K562
Sonstiges Material:	Puromycin dihydrochloride (Sigma-Aldrich) 50 mg/ml in sddH <sub>2</sub> O, 10% XGal (Peqlab), 0,1 M IPTG (Peqlab), DNase Stopp Solution (Promega), random Primer (Promega), dNTP Mix 10 mM (Peqlab), TRIZOL (Peqlab), Chloroform (Merck,Sigma), Isopropylalkohol (Merck), Ethanol pro Analysis (Merck), Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) (Roth), RNase-freies H <sub>2</sub> O, 3 M Natriumacetat, Zellkulturflaschen 250 ml (Greiner Bio-One), FACS-Clean u. FACS-Rinse u. FACS-Flow (Becton Dickinson), Spritze 50 ml (Becton Dickinson), Sterilfilter 0,22 µm (Corning)
K562-B18 Kulturmedium:	RPMI-Medium (Gibco), 10% FCS (PAA) 30 min bei 56°C Hitzeinaktiviert, 1% Pen-Strep (10000 U/ml, Lonza), 1 µg/ml Puromycin dihydrochloride (Sigma-Aldrich), steril filtriert
K562 Kulturmedium:	RPMI-Medium (Gibco), 10% FCS (PAA) 30 min 56°C Hitzeinaktiviert, 1% Pen-Strep (10000 U/ml, Lonza), steril filtriert
RCC-115-EBV Medium:	siehe K562 Kulturmedium
FACS-Fix:	FACS-Puffer PFEA mit 1% Formaldehyd (Fluka)
Programme:	HUSAR Bioinformatic Lab / DKFZ Heidelberg, Sequencing Analysis 3.4.11, ABI Prism™ 310 Collection, CellQuest Pro, NanoDrop 1000 3.7.1

Geräte: ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems), GENE Pulser II, Capacitance Extender Plus (BioRad), FACSCalibur (BD Biosciences), NanoDrop 1000 (PqLab), Electrophoresis Power Supply Ebs 3500 (Amersham), Gel documentation system (Vilber Lourmat), Zentrifuge 5415R (Eppendorf)

**Primer für Sequenzierung:**

M13 rev: 5`-gga aac agc tat gac cat g-3`

**Folgende Primer wurden von biomers.net hergestellt**

**Verwendete Primer für cDNA-Herstellung:**

B18for: 5`-agc tag cat gcg ggt cac ggc ggc ccg aac cct cct cc-3`

B18rew: 5`-tgc ggc cgc tca agc tgt gag aga cac atc aga gcc ctg ggc ac-3`

**Verwendete Primer für Mutagenese:**

mut01for: 5`-ggg agg cgg ccc gtg tgg cgg agc agc tga gag cct acc tgg ag-3`

mut01rev: 5`-ctc cag gta ggc tct cag ctg ctg cgc cac acg ggc cgc ctg cc-3`

mut02for: 5`-gag cct acc tgg agg gca cgt gcg tgg agt ggc tc-3`

mut02rev: 5`-gag cca ctg cac gca cgt gcc ctg cag gta ggc tc-3`

mut03for: 5`-gag tgg ctg cgc aga cac ctg gag aac ggg-3`

mut03rev: 5`-ccc gtt ctg cag gtg tct gcg gag cca ctg-3`

**Zusätzliche interne Primer für Sequenzierungen:**

B18intern: 5`-gcc tgc gga acc tgc gcg gc-3`

B18internrev: 5`-ggc acc acc aca gct gcc c-3`

**2.20.1 RNA-Isolierung und cDNA-Herstellung**

Für die Herstellung einer K562-B18 Transfektante (siehe auch Kap. VI) wurde die HLA-B18-positive Zelllinie RCC-115-EBV aus der Zelllinienbank der Abteilung Immunologie, Auf der Morgenstelle 15 in Tübingen verwendet. Um die RNA zu isolieren wurden ca.  $3 \times 10^6$  Zellen in 1 ml TRIZOL resuspendiert und bei Raumtemperatur mindestens 5 min inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit 200 µl Chloroform. Die Probe wurde kurz geschüttelt und ca. 3 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend 15 min bei 12000 rcf und 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 500 µl Isopropylalkohol wurden zugegeben. Die Probe wurde bei Raumtemperatur 10 min inkubiert und weitere 10 min bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt. Das RNA Pellet wurde mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen. Die Probe wurde nochmals 5 min bei 7500 rcf bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Das RNA-Pellet wurde in 50 µl RNase-freies H<sub>2</sub>O aufgenommen.



### 2.20.2 Der HLA-B\*1801<sup>W486C→G</sup> pGEM T Easy Vektor

#### Ligationsansatz

1 µl T4 DNA Ligase + 1 µl pGEM T Easy Vektor + 5 µl 2x Puffer + 3 µl HLA-B18-cDNA, 1 h Inkubation bei Raumtemperatur. Danach wurde der *E.coli*-Stamm DH5α (100 µl) mit dem Ligationsansatz transformiert und mit XGal (20 µl 10% XGal + 20 µl 0,1 M IPTG) auf LB-Amp-Agar-Platten selektioniert. Es wurden Sequenzierungen der Minipräps der Bakterienklone mit den Primern M13 rev, T7 und SP6 durchgeführt.

Mastermix für Sequenzierung: 6 µl M13 rev Primer (10 µM) + 24 µl DBmix + 60 µl addH<sub>2</sub>O, je 7,5 µl vom Mastermix wurden pro 2,5 µl Plasmid-DNA pipettiert.

#### Restriktionsverdau von Klon 3 und Klon 9 mit Sal I und Bgl II

Da kein Bakterienklon die vollständige HLA-B18-cDNA-Sequenz enthielt, wurde nach Klonen gesucht, aus denen die vollständige HLA-B18-cDNA-Sequenz zusammengefügt werden konnte. Zwei Klone (Klon 3 und 9) enthielten solche Teilsequenzen und die entsprechenden Vektoren (Minipräps) wurden mit Restriktionsenzymen Sal I und Bgl II verdaut (Tab. 9), die entsprechenden Stücke aus einem 0,6% Agarosegel isoliert und zu einem neuen Vektor ligiert.

**Tab. 9: Schema für Restriktionsverdau von Klon 3 und 9**

Klon 3	Klon 9
10 µl Plasmid-DNA	5 µl Plasmid-DNA
+ 10 U Sal I	+ 10 U Sal I
+ 0,5 µl BSA Puffer (100x)	+ 0,5 µl BSA Puffer (100x)
+ 5 µl Puffer 3 (10x)	+ 5 µl Puffer 3 (10x)
+ 34 µl ddH <sub>2</sub> O	+ 39 µl ddH <sub>2</sub> O
1,5 Stunde bei 37°C	
je + 30 U Sal I	
30 min bei 37°C	
je + 20 U Bgl II	
1 Stunde bei 37°C	
	+ 10 U Bgl II
	30 min bei 37°C

**Ligationsansatz**

0,5 µl T4 DNA-Ligase + 1,0 µl 10x Ligasepuffer + 2,0 µl Klon 3 (C-Terminus HLA-B18-Sequenz + pGEM T Easy Vektor (kleiner Bereich)) + 0,7 µl Klon 9 (N-Terminus HLA-B18-Sequenz + pGEM T Easy Vektor) + 5,8 µl addH<sub>2</sub>O. Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert. 200 µl XL-1 blue MRF<sup>+</sup> comp. cells wurden mit diesem Ligationsansatz transformiert.

**Transformation von XL-1 blue MRF<sup>+</sup> Bakterien**

200 µl XL-1 blue MRF<sup>+</sup> comp. cells + 10 µl Ligationsansatz, 15 min auf Eis, 30 s Hitzeschock bei 42°C, 2 min auf Eis, + 1 ml LB-Medium, Inkubation 30 min bei 37°C, Zentrifugation (1500 rcf, 3 min, 22°C). Die Bakterien wurden auf einer LB-Amp-Agar-Platte ausplattiert. Es wurden Bakterienkulturen von Klonen angesetzt und anschließend wurden Minipräps und Sequenzierung durchgeführt. Das neue Konstrukt enthielt Punktmutationen, die mit Hilfe des QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kits entfernt wurden.

**Mutagenese I**

9,08 µl mut01for Primer (≈ 125 ng) + 9,39 µl mut01rev Primer (≈ 125 ng) + 5,0 µl 10x Puffer + 2,0 µl Klon 10 Plasmid-DNA (1:100) + 1,0 µl dNTP Mix + 23,53 µl addH<sub>2</sub>O + 1 µl PfuUltra HF DNA Polymerase

Programm, siehe (Kap. 2.12, S. 29)

+ 1 µl Dpn I

Inkubation 1 h bei 37°C, danach erfolgte Transformation von XL-1 Blue *E.coli*, siehe (Kap. 2.12, S. 29, Mutagenese); Änderung: nach Zugabe von 1 ml LB-Medium, Inkubation maximal 1 h bei 37°C. Ausplattierung auf LB-Amp-Agar-Platten sowie Bakterienkultur, Isolierung der Plasmid-DNA (Minipräp) und Sequenzierung.

**Mutagenese II**

11,6 µl mut02for Primer (≈ 125 ng) + 11,8 µl mut02rev Primer (≈ 125 ng) + 5,0 µl 10x Puffer + 2,0 µl Klon 2 (Mutagenese I) Plasmid-DNA (1:100) + 1,0 µl dNTP Mix + 18,6 µl addH<sub>2</sub>O + 1,0 µl PfuUltra HF DNA Polymerase

Programm, siehe (Kap. 2.12, S. 29), +1,0 µl Dpn I

Inkubation 1 h bei 37°C, danach erfolgte Transformation von XL-1 Blue *E.coli*, wie oben beschrieben. Ausplattierung auf LB-Amp-Agar-Platten sowie Bakterienkultur, Isolierung der Plasmid-DNA (Minipräp) und Sequenzierung.

**Mutagenese III**

13,4 µl mut03for Primer (≈ 125 ng) + 13,7 µl mut03rev Primer (≈ 125 ng) + 5,0 µl 10x Puffer + 2,0 µl Klon 1 (Mutagenese II) Plasmid-DNA (1:100) + 1,0 µl dNTP Mix + 14,9 µl addH<sub>2</sub>O + 1,0 µl PfuUltra HF DNA Polymerase

Programm, siehe (Kap. 2.12, S. 29), + 1,0 µl Dpn I

Inkubation 1 h bei 37°C, danach erfolgte Transformation von XL-1 Blue *E.coli*, wie oben beschrieben, Ausplattierung auf LB-Amp-Agar-Platten sowie Kultur, Isolierung der Plasmid-DNA (Minipräp) und Sequenzierung. Die Sequenzierung von Klon 2 war erfolgreich. Die HLA-B\*1801<sup>W486C→G</sup>-Sequenz wurde aus dem pGEM T Easy Vektor mit den Restriktionsenzymen Not I und Nhe I geschnitten und auf 0,8% Agarosegel aufgetrennt, aus dem Gel isoliert, in 30 µl EB-Puffer aufgenommen und in den neuen Vektor pIRES puro2 ligiert.

### **2.20.3 Der HLA-B\*1801<sup>W486C→G</sup> pIRES puro2 Vektor**

#### **Doppelverdau von pGEM T Easy-HLA-B\*1801<sup>W486C→G</sup> (Klon 2, Mut III)**

Für je drei Ansätze wurde folgendermaßen pipettiert:

10,0 µl Plasmid-DNA + 0,5 µl 100x BSA Puffer + 5,0 µl 10x Puffer 2 + 25 U Not I + 25 U Nhe I + 29,5 µl addH<sub>2</sub>O, Inkubation ca. 2,5 h bei 37°C. Das Fragment wurde aus dem Agarosegel mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen) extrahiert.

#### **Ligation von HLA-B\*1801<sup>W486C→G</sup> Fragment mit pIRES puro2**

12 µl HLA-B\*1801<sup>W486C→G</sup> Fragment + 5 µl Vektor pIRES puro2 (offen) + 1 µl 10x Puffer (Roche) + 1 µl T4 DNA-Ligase (Roche) + 1 µl ddH<sub>2</sub>O

Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C. Die XL-1 Blue *E.coli* wurden mit dem Ligationsansatz (10 µl) für das neue Konstrukt HLA-B\*1801<sup>W486C→G</sup> pIRES puro2 transformiert. Es wurde eine Großkultur zur Amplifikation und Isolierung des Vektors durchgeführt.

#### **Linearisierung von HLA-B\*1801<sup>W486C→G</sup> pIRES puro2**

160 U Pvu I + 40 µl 10x Puffer 3 + 4 µl 100x BSA + 80 µl Plasmid-DNA (3,7 µg/µl) + 256 µl addH<sub>2</sub>O. Die Probe wurde mit je 50 µl pro 0,5 ml Reaktionsgefäß verteilt und bei 37°C über Nacht inkubiert.

#### **Phenol-Chloroform Extraktion der DNA**

400 µl vom verdauten HLA-B\*1801<sup>W486C→G</sup> pIRES puro2 wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylethanol und 400 µl Chloroform zugegeben, die Probe wurde gut gemischt und kurz abzentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt. Es wurde nochmals 400 µl Chloroform zugegeben und die Prozedur wiederholt. Der gesammelte Überstand wurde kurz zentrifugiert. Chloroform, welches sich unten angesammelt hat, wurde mit der Pipette entfernt. Es wurde 40 µl 3 M Natriumacetat und 1,1 ml 99% Ethanol zugegeben. Die Probe wurde kurz gemischt und bei -80°C eingefroren. Am folgenden Tag wurde die Probe 1 h bei 4°C und 13000 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und das Pellet an Luft getrocknet (steril). Das Pellet wurde in 40 µl steril filtriertes

ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und bei Raumtemperatur 30 min lang inkubiert, danach zur Aufbewahrung eingefroren. Am folgenden Tag wurde damit die Transfektion von K562 durchgeführt.

#### **2.20.4 Transfektion von K562 mit dem linearisierten HLA-B\*1801<sup>W486C→G</sup> pIRES puro2 Vektor**

Die Zellen der Zelllinie K562 aus der Zelllinienbank der Abteilung Immunologie, Auf der Morgenstelle 15 in Tübingen wurden für die Transfektion verwendet. Die Zellen wurden in Kultur genommen. Für die Transfektion wurden diese zweimal mit RPMI gewaschen und gezählt.  $1,2 \times 10^7$  Zellen wurden entnommen nochmals mit RPMI gewaschen und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 300 µl RPMI aufgenommen und in eine Elektroporationsküvette überführt. 20 µl des linearisierten HLA-B\*1801<sup>W486C→G</sup> pIRES puro2 wurde zu den Zellen gegeben, gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 0,17 kV und 975 µF. Die Zellen wurden sofort in 12 ml RPMI (10% FCS, 1% Pen-Strep) überführt. Eine Verdünnungsreihe aus sieben Röhrchen wurde mit einer fortlaufenden 1:2 Verdünnung erstellt. Aus jeder Verdünnungsreihe wurde eine 96-Well-Platte mit je 50 µl pro Well pipettiert. Am Tag drei wurde zur Selektion pro Well 50 µl RPMI 10% FCS 1% Pen-Strep mit Puromycin ( $\rho = 2 \mu\text{g/ml}$ ) zugegeben. Die Endkonzentration von Puromycin betrug 1 µg/ml. Wachsende Kulturen wurden in größere Kulturgefäße (48-, 12-, 6-Well-Flachbodenplatten), später in Kulturflaschen überführt.

#### **2.20.5 Selektion von HLA-positiven K562-B18 Transfektanten**

Für diese Färbung wurde die Zelllinie K562 als Negativkontrolle verwendet. Zur Selektion von HLA-positiven K562-B18 Transfektanten wurden ca. 200 µl Zellen pro Test aus der Kultur genommen und zweimal mit 10 ml PBS gewaschen (1600 rcf, einmal 10 min, einmal 3 min, 4°C). Die Zellen wurden in 400 µl PBS resuspendiert und in einer 96-Well-Platte mit 100 µl pro Test verteilt. Es wurden 100 µl PBS pro Well zugegeben. Hierauf wurde die Platte bei 2100 rcf, 3 min, 4°C zentrifugiert. Für alle folgenden Schritte wurde PBS-FCS 2,5% verwendet. Als Primärantikörper wurden entweder B1.23.2 ( $\rho = 3,82 \text{ mg/ml}$ ) oder W6/32 ( $\rho = 0,1 \text{ mg/ml}$ ) sowie als Isotyp-Kontrolle  $\alpha$ -NP IgG2a mAb (b Allel) ( $\rho = 0,85 \text{ mg/ml}$ ) eingesetzt. Als Zweitantikörper wurde der FITC goat anti-mouse Antikörper (1:200) eingesetzt. Der Erstantikörper wurde mit PBS-FCS 2,5% auf eine Konzentration von 10 µg/ml verdünnt. Die Zellpellets wurden in jeweils 50 µl vom Erstantikörper-Ansatz resuspendiert und bei 4°C ca. 30 min inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte und schließlich die Färbung mit dem Zweitantikörper. Dieser wurde 1:200 ebenfalls in PBS-FCS 2,5% verdünnt. Die Proben wurden in 50 µl vom Zweitantikörper-Ansatz resuspendiert. Die Zellen wurden ca. 30 min bei 4°C inkubiert. Nach zwei Waschschrten wurden die Zellen in 200 µl FACS-Fix aufgenommen. Die Messung erfolgte am FACSCalibur und die Auswertung der Daten mit der Software CellQuest Pro.

### 2.20.6 Bestätigung der HLA-B\*1801<sup>W486C→G</sup>-RNA in K562-B18 Transfektanten

Zur Kontrolle einer gelungenen Transfektion wurde die RNA aus K562-B18 Transfektanten (Klon I-5-14) nach der oben aufgeführten Methode isoliert. Zusätzlich vor dem DNase Verdau wurde die RNA-Konzentration gemessen. In der Reaktion wurde 4 µg RNA eingesetzt. Die cDNA wurde anschließend in den pGEM T Easy Vektor ligiert und sequenziert.

## 2.21 Der Vital-Assay

Platten:	96-Well-Rundbodenplatten (Costar)
Zelllinien:	K562, K562-B18 (I-5-14)
Waschmedium1:	IMDM-Medium (Lonza), 10% FCS (Lonza) 30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert, steril filtriert
Waschmedium2:	IMDM-Medium (Lonza)
Kulturmedium: (5%)	IMDM-Medium (Lonza), 5% Humanserum (Lonza) 30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert, 25 µg/ml Gentamicin Sulfate (Lonza), 1% Pen-Strep (10000 U/ml, Lonza), 50 µM β-Mercaptoethanol (Roth), steril filtriert
Kulturmedium: (10%)	IMDM-Medium (Lonza), 10% Humanserum (Lonza) 30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert, 25 µg/ml Gentamicin Sulfate (Lonza), 1% Pen-Strep (10000 U/ml, Lonza) 50 µM β-Mercaptoethanol (Roth), steril filtriert
Sonstiges Material:	FCS (PAA) 30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert, 1 mM „CFSE“ (C1157, Invitrogen), „FarRed“ (C34553, Invitrogen) 5 µg/µl in DMSO (Merck), Propidiumiodid (PI) (Sigma) 50 µg/ml in PBS, synthetische Peptide 1 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O 10% DMSO, Spritze 50 ml (Becton Dickinson), Sterilfilter 0,22 µm (Corning)
Programme:	FACS Diva und FlowJo 7.6.1, StarOffice 7, SigmaPlot 2001
Geräte:	FACSCanto II (BD Biosciences)

Die K562-B18 Transfektanten wurden aus der Kultur genommen und zweimal bei 1400 rcf 8 min lang bei Raumtemperatur mit Waschmedium2 gewaschen. Die Zellen wurden gezählt und pro Röhrchen mit ca.  $2 \times 10^6$  Zellen in 2 ml 5% Kulturmedium verteilt. Es wurden die entsprechenden Peptide inklusive Negativkontrolle zugegeben. Die Endkonzentration der Peptide betrug 10 µg/ml. Die Zellen wurden über Nacht mit den Peptiden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Zentrifugation erfolgte bei 1600 rcf, 6 min und Raumtemperatur. Die Zellen wurden in je 500 µl PBS pro Probe resuspendiert. Der Farbstoff wurde folgendermaßen zu den entsprechenden Zellen zugegeben:

- K562-B18 Medium: 500 µl PBS + 0,5 µl „FarRed“ (2,5 µg)
- K562-B18 HIV-Peptid: 500 µl PBS + 0,3-0,6 µl 1 mM „CFSE“ (0,3-0,6 µM)
- K562-B18 EBV-Peptid: 500 µl PBS + 21 µl 1 mM „CFSE“ (21 µM)

Bei Experimenten mit dem HLA-B18-restringiertem CD8<sup>+</sup> T-Zell-Epitop DEVEFLGHY wurde ebenfalls die Zelllinie K562 eingesetzt. Hier wurde zusätzlich eine Konzentration von 3 µM „CFSE“ zur Auftrennung von drei „CFSE“-gefärbten Zielpopulationen eingesetzt. Die Proben wurden 10 min bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss inkubiert, danach wurde 1 ml FCS pro Probe zugegeben und weitere 20 min bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss inkubiert. Die Proben wurden viermal mit Waschmedium1 gewaschen (1300 rcf, 9 min, Raumtemperatur). Die Zellen wurden auf eine Konzentration von  $6 \times 10^5$  pro 1 ml mit 10% Kulturmedium eingestellt. Die Effektorzellen wurden zweimal mit Waschmedium2 gewaschen (1400 rcf, 8 min, Raumtemperatur), gezählt und auf die Konzentration von  $10^6$  Zellen pro 1 ml mit 10% Kulturmedium eingestellt. In die erste Reihe einer 96-Well-Rundbodenplatte werden pro Well 90 µl Effektoren gegeben (30:1). Die Proben wurden in Triplikaten ausplattiert. In die übrigen Reihen wurde 60 µl vom 10% Kulturmedium (10 bis 0,01:1) pipettiert. Es wurde eine 1:3 Verdünnung mit 30 µl aus der ersten Reihe fortlaufend durch sieben Reihen durchgeführt. Von jeder Zielzellpopulation wurden 10 µl (bei einer Zellkonzentration von  $6 \times 10^5$  pro 1 ml) pro Well pipettiert. Als Kontrolle wurden nur Zielzellen pipettiert (Reihe neun, nicht bei DEVEFLGHY). Jedem Well wurde eine entsprechende Menge 10% Kulturmedium zugegeben um ein Volumen von 200 µl zu erhalten. Ca. 200 µl jeder Probe (CFSE high, CFSE low, FarRed, ungefärbt, Probe ungefärbt für Hitzeschock am folgenden Tag (mindestens 10 min bei 56°C, danach Färbung mit Propidiumiodid) wurden für die Kompensation in der Platte aufbewahrt. Die Platte wurde bei 1500 rcf und Raumtemperatur 2 min lang zentrifugiert, und über Nacht bei 37°C (19 bis 21 h) und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Messung durchgeführt. Vor jeder Messung wurde 7 µl Propidiumiodid (50 µg/ml) zugeben und kurz gemischt. Bei dem Epitopkandidat SESGQFHAF wurde für Peptidbeladung und den Vital-Assay 5% Kulturmedium verwendet. Alle Proben der Experimente für die Epitopkandidaten SELEIKRY und SESGQFHAF wurden bei gleicher Messgeschwindigkeit und gleicher Aufnahmezeit aufgenommen. Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms FlowJo 7.6.1. Für die erhaltenen Daten wurde der arithmetische Mittel und die Standardabweichung berechnet. Die spezifische Lyse von Zielzellen wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\% \text{ überlebende Zellen} = 100 \times \frac{MW_{\text{Population X}}}{MW_{\text{Population X (Kontrollreihe)}}$$

$$\% \text{ Lyse} = 100\% - \% \text{ überlebende Zellen}$$

## 2.22 Andere Geräte

Destamat Bi 18 E (Heraeus)

Heizblock (Eppendorf Thermomixer 5436)

Inkubator für Agarplatten (Heraeus B6)

Inkubator für Gewebekulturen (Heraeus) mit 5% CO<sub>2</sub>-Begasung (Messer)

Inkubator für Schüttelkulturen Multitron (Infors)

Lichtmikroskop (Leica DMIL)

Magnetrührer (IKA Labortechnik RCT basic)

Megafuge (Heraeus)

Membran-Vakuumpumpe (Vacubrand)

pH-Meter (Knick 765)

Rotator mit Drehteller und Klammern (Bachofer)

Sterilbank (Technoflow Integra Biosciences)

UV/Vis-Spektrometer Ultraspec 3000 (Pharmacia)

Vortex-Gerät (Vortex-2 Genie)

Schüttelwasserbad GFL 1083 (Gemini BV)

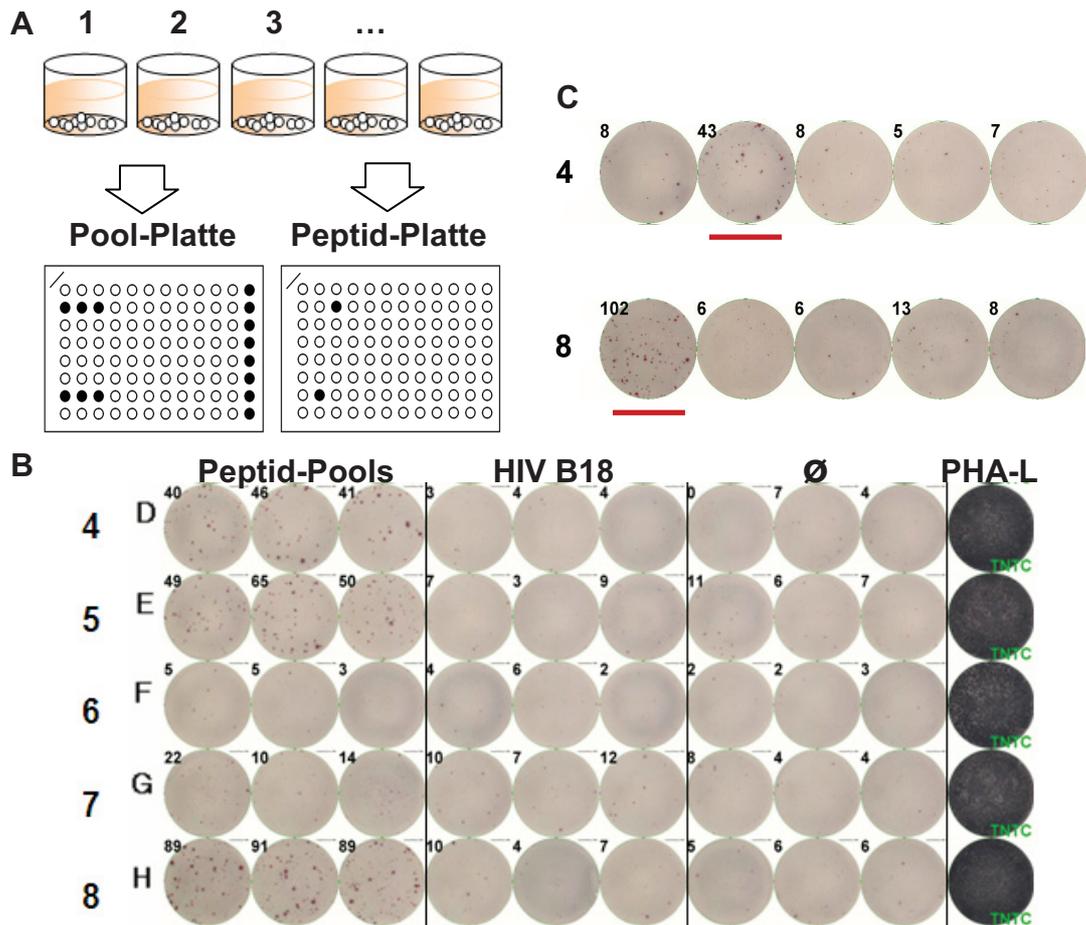
Wasserstrahlpumpe (Brand)

Zentrifuge 5417C (Eppendorf)

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Identifikation von HLA-B18-restringierten CD8+ T-Zell-Epitopkandidaten mit dem IFN $\gamma$ -ELISPOT

Um eine umfassende Übersicht über die HLA-B18-restringierte CD8+ T-Zell-Antwort zu erhalten, wurden mit Hilfe des Programms SYFPEITHI (Kap. 6, S. 111, Nr. 3) Vorhersagen für Liganden der Restriktion HLA-B\*1801 aus zehn lytischen und acht latenten Antigenen des Epstein-Barr-Virus erstellt. Für die lytischen Proteine wurden BZLF1, BRLF1, BMRF1, BMLF1, BALF2, BHLF1, BHRF1, BcRF1, BALF4, BLLF1, für latente Proteine EBNA1, EBNA2, EBNA3, EBNA4, EBNA6, EBNA5, LMP1 und LMP2 ausgewählt. In die Untersuchung wurden auch Peptide aus der HLA-A\*0101 Vorhersage aufgenommen, die positive IFN $\gamma$ -Antworten bei HLA-B18-positiven Blutspendern in früheren Analysen ergeben haben, sowie Peptide aus Veröffentlichungen. Für die Peptide aus der HLA-A\*0101 Vorhersage sind die gewichtigen AS-Sequenzen DSELEIKRY, AFDQATRVY, HDEVEFLGHY, VVETLSSSY, KEETGNSSY, NPDLYVTTY, AVEQASLQFY, ESSERPPTY und LTEWGSGNRTY. Insgesamt umfasst die Untersuchung 171 Peptide, wobei 118 Peptide auf lytische und 53 Peptide auf latente Antigene entfallen. Die untersuchten Peptide sind in Tab. 2 bis Tab. 5 zusammengestellt. Der erste Schritt zur Bestimmung von potentiellen CD8+ T-Zell-Epitopkandidaten für weiterreichende Untersuchungen von T-Zell-Antworten, wurde durch zwei Testverfahren ausgetragen. Der größte Anteil der vorläufigen Selektionsarbeit wurde mit Hilfe des IFN $\gamma$ -ELISPOTs durchgeführt. Ein kleinerer Anteil von Peptiden wurde mit Hilfe der intrazellulären Zytokinfärbung analysiert. Das zweite Verfahren lieferte nur wenige Ergebnisse. Beiden Testverfahren gingen Peptidstimulationen voraus, die in Material und Methoden (Kap. 2, S. 22 und S. 37) näher erläutert wurden. Um möglichst viele Peptide gleichzeitig zu testen, wurden im ELISPOT Peptid-Pools zur Stimulation von PBMCs in *in vitro* Zellkulturen eingesetzt, die maximal aus fünf Peptiden bestanden. Ein kleinerer Anteil von Peptiden wurde in Pools untersucht, die zwei bis drei Peptide enthielten. Zur Auflösung der reagierenden Peptide, wurden die Peptide einzeln getestet. Der größere Anteil von Peptiden wurde mit dem Pool-single peptide (Pool/sp)-ELISPOT ausgetragen. Um in einem Experiment die Peptide sofort bestimmen zu können, wurden die Zellen aus der Pool-Stimulation für den ELISPOT von Peptid-Pools und einzelnen Peptiden (Pool/sp) gleichzeitig verwendet (Abb. 3). Die Peptide laufen zwei Selektionen durch. Bei der ersten Vorselektion wurden nur Tests betrachtet, die sowohl im Pool als auch auf der Peptid-Platte positive Ergebnisse geliefert haben. Als mögliche Kandidaten wurden Peptide auf der Peptid-Platte betrachtet, bei denen mindestens 10 Spots gezählt wurden und der Wert mindestens den dreifachen Mittelwert der Negativkontrolle (Pool-Platte) aufwies (Kriterium für Pool-MW gleich).



**Abb. 3: Der Pool-single peptide-ELISPOT.** **A:** Zellen aus der gleichen Stimulation werden auf eine Peptid-Platte und eine Pool-Platte gegeben. In der Abbildung werden zwei reagierende Pools auf der Pool-Platte gezeigt. Die entsprechenden Peptide sind Peptid Nr. 3 für Pool 2 und Peptid Nr. 2 für Pool 7. **B:** Teilansicht einer automatisch ausgewerteten Pool-Platte mit fünf Pools. HIV B18 = FRDYVDRFYK aus p23, HIV (HLA-B18), Ø = Medium, PHA-L = Positivkontrolle, TNTC = too numerous to count. **C:** Ausschnitte aus der Peptid-Platte des gleichen Experiments mit positiv getesteten Peptiden (rot) siehe hierzu auch **B**. Die Zahlen 4 und 8 kennzeichnen Pools. (MSHAS4510 clear-Platte).

Hierbei wurde zur Analyse der größere Wert der beiden Negativkontrollen herangezogen. Die Werte der selektierten Kandidaten (Peptid-Platte) wurden zu den Pool-Werten addiert. Es wurde der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet. Ergebnisse, die weniger als 20 Spots für den Mittelwert (aufgerundet) ergaben, wurden aus weiteren Analysen ausgeschlossen. Die Tab. 10 zeigt die Auswertung von drei Pool-Experimenten für jeweils 90 Peptide. Nur die vorselektierten Peptide werden in der Tabelle aufgeführt. Die gefundenen Epitopkandidaten wurden zur genaueren Bestimmung der Erkennungsfrequenz unter HLA-B18-positiven Individuen in zusätzlichen  $\text{IFN}\gamma$ -ELISPOTs nach Stimulationen mit Peptiden getestet. Da die ersten Epitopkandidaten durch Untersuchungen mit Peptiden aus der SYFPEITHI HLA-A\*0101 Vorhersage gefunden wurden, wurden für alle  $\text{IFN}\gamma$ -ELISPOTs HLA-B18-positive/HLA-A1-negative Blutspender ausgewählt. Dabei wurden entweder zwei (selten drei) Peptide gleichzeitig oder einzelne Peptide in der Stimulation eingesetzt. Die Peptide wurden einzeln im  $\text{IFN}\gamma$ -

ELISPOT als Triplikate untersucht. Medium und HIV-Peptide wurden als Kontrollen eingesetzt. Als positiv wurden Ergebnisse gewertet, die den dreifachen Wert der Negativkontrolle (HIV-Peptid) aufwiesen und gleichzeitig ein Mittelwert von mindestens 10 Spots ermittelt wurde. Die folgende Tab. 11 stellt alle Epitopkandidaten mit den zugehörigen Erkennungsfrequenzen unter HLA-B18-positiven Individuen zusammen. Das Peptid ESEERPPTY wurde auch im IFN $\gamma$ -ELISPOT mit HLA-A1-positiven/HLA-B18-negativen Spendern getestet. Eine positive IFN $\gamma$ -Antwort gegen ESEERPPTY wurde hierbei detektiert. Die meisten der gefundenen Epitopkandidaten gehören zur Gruppe der lytischen Antigene. Bei der Analyse wurden ebenfalls Epitopkandidaten gefunden, deren Ursprung latente Proteine sind. Insgesamt wurden 19 Peptide identifiziert, darunter sind drei Peptide aus Veröffentlichungen eingeschlossen.

**Tab. 10: Auswertung des Pool-single peptide-ELISPOTs**

BS	PN	Epitopkandidat		HIV B18		Medium	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
B08	3-1	12	4	2	2	4	2
	4-2	43	3	4	1	4	4
	5-3	55	7	6	3	8	3
	8-1	93	6	7	3	6	1
	11-5	50	4	9	2	5	5
	13-1	202	124	2	3	3	2
	13-3	226	77	2	3	3	2
	16-3	68	5	7	2	5	3
B14	5-3	23	9	5	2	4	2
	11-5	21	9	2	0	4	1
	13-4	21	10	3	1	1	1
	15-1	17	6	4	3	2	2
	17-2	108	18	8	2	5	4
B16	7-3	16	5	3	1	1	1
	11-5	20	4	4	2	3	2
	13-1	99	39	4	1	7	6
	13-4	93	49	4	1	7	6

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, BS = Blutspender. PN = Peptidnummerierung (erste Zahl = Pool, zweite Zahl = Peptidnummer), HIV B18 = FRDYVDRFYK aus p23, HIV (HLA-B18), Grau = Peptide, die unter 20 Spot formierende Einheiten fallen.

Das Peptid SELEIKRY wurde in einer längeren Form veröffentlicht (DSELEIKRYKNR) und wurde in dieser Arbeit auf die Länge von acht Aminosäuren bestimmt (Tab. 11). Bei IFN $\gamma$ -ELISPOT-Experimenten, nach Stimulationen mit Peptiden, war eine hohe Frequenz von IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen (SFE) in positiv-getesteten PBMC-Proben nur bei wenigen HLA-B18 Epitopkandidaten anzutreffen. Die Erkennungsfrequenzen für die Epitopkandidaten reichen von 6 bis nahezu 100%. Bereits *ex vivo* IFN $\gamma$ -ELISPOT-Experimente in der Diplomarbeit lieferten nur bei einigen Blutspendern moderate IFN $\gamma$ -Antworten (~200 IFN $\gamma$ -formierende Einheiten pro 500.000 eingesetzte PBMCs) gegen vier Epitopkandidaten (VVETLSSSY, KEETGNSSY, AFDQATRVY, ESEERPPTY), die ebenfalls in dieser Arbeit untersucht wurden.

**Tab. 11: Zusammenstellung von HLA-B18 Epitopkandidaten aus dem EBV**

Sequenz	Protein	Position	Frequenz
SELEIKRY	BZLF1	173-180	17/17
AFDQATRVY	BZLF1	25-33	3/17
SESGQFHAF	BRLF1	293-301	5/17 <sup>o</sup>
LVSDYCNVLNKEFT	BRLF1	25-38	1/6
DEV EFLGHY	BMLF1	417-425	4/17
VVETLSSSY	BMLF1	381-389	5/17
KEETGNSSY	BMLF1	114-122	1/17
NPDLYVTTY	BMRF1	192-200	8/17
AVEQASLQFY	BMRF1	105-114	1/17
IERNSETF	BHRF1	58-65	1/7
KESLFNSFY	BALF2	355-363	1/3 P
(A)EEYSDLAL	BALF2	795-803	3/3 P $\diamond$
DEQRASNVF	BALF4	647-655	2/7
NEIHVYNDY	BALF4	600-608	4/7
TETGKSIHF	BALF4	309-317	1/7
PRSP TVFY NIPMPL	EBNA2	276-290	-
DEVMEQRV(M)	EBNA4	513-521	1/7
TEENLLDF	EBNA6	280-287	1/3 P
ESEERPPTY*	LMP2	484-493	7/17

Peptide sind mit dem entsprechenden Protein aus EBV und der Aminosäureposition im Protein dargestellt. Rot = veröffentlichte Epitope, P = in Pool/sp-Experimenten zu der angegebenen Frequenz positiv getestet, \* = Epitopkandidat, der positive IFN $\gamma$ -Antworten bei einem HLA-B18-negativen Blutspender liefert, o = sechs Spender in Pool-Experimenten (Pool = 3 Peptide) negativ getestet,  $\diamond$  = lange Form, (A)EEYSDLAL = lange und kurze Peptidvariante ruft IFN $\gamma$ -Antworten hervor. DEVMEQRV(M) = lange Form zu der angegebenen Frequenz getestet. Kurze Form in Pool/sp-Experiment detektiert. AS-Positionen sind den Sequenzen aus (Kap. 6, S. 111, Nr. 4) entnommen worden. Für Peptid LVSDYCNVLNKEFT siehe Tab. 2, S. 18 und S. 63.

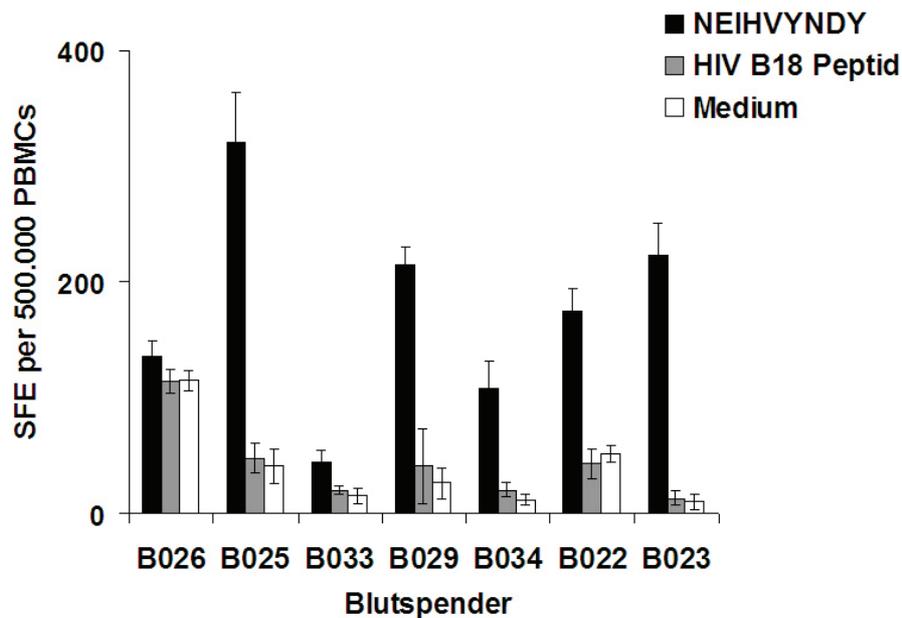
**Tab. 12: Analyse vom *ex vivo* IFN $\gamma$ -ELISPOT für das HLA-B18-restringierte CD8+ T-Zell-Epitop SELEIKRY**

BS	SELEIKRY		HIV B18		Medium	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
B015	882	14	3	1	0	1
B09	677	24	3	2	6	2
1151	461	29	3	4	2	1
1042	290	29	23	11	19	9
1074	517	37	0	1	1	1
1069	592	10	16	1	18	3
1052	261	45	2	2	2	1
1057	103	56	0	1	1	1
1291	310	9	2	1	2	2
1082	562	17	1	0	5	8
848	237	14	1	2	0	1
803	121	12	1	1	3	2
895	1023	49	3	2	2	2
B011	204	2	331	161	217	73
B010	903	56	1	0	1	2
1482	1575	88	11	16	3	2
B034	1849	50	5	3	0	0
834	1104	103	0	1	1	1
996	258	22	1	1	0	1

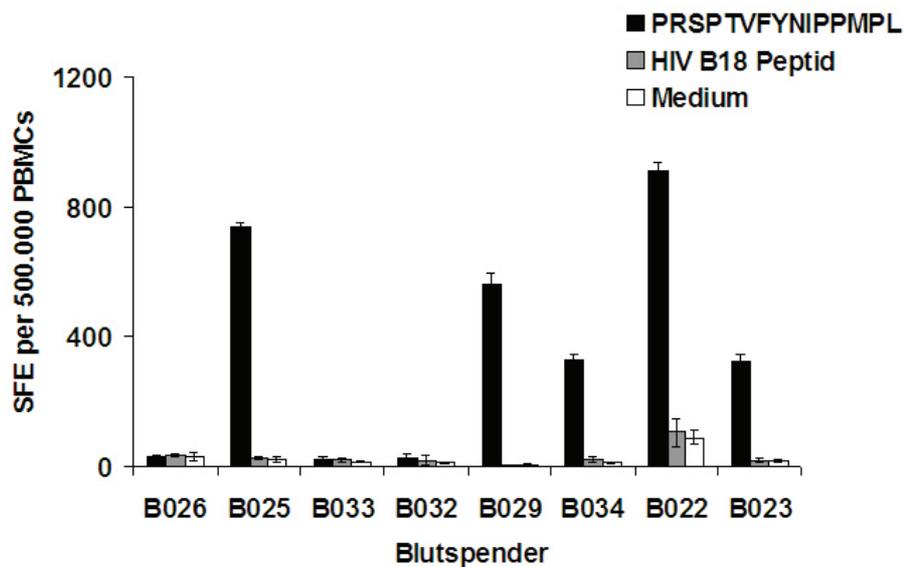
Dargestellt sind Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) aus Triplikaten für Peptid SELEIKRY, einem HIV-Peptid und Medium. HIV B18 = FRDYVDRFYK aus p23 HIV (HLA-B18). Die Werte wurden aufgerundet.

Auch bei den Analysen der Diplomarbeit dominierten starke IFN $\gamma$ -Antworten (SFE) gegen das Peptid DSELEIKRY, die längere Form des HLA-B18-restringierten CD8+ T-Zell-Epitops SELEIKRY. Somit sind *ex vivo* Untersuchungen nur eingeschränkt möglich. Die SELEIKRY-spezifische Antwort weist eine Kombination aus einer hohen Frequenz von IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen in PBMCs und der ausgeprägten Dominanz unter HLA-B18-positiven Trägern, selbst in *ex vivo* Untersuchungen, auf (Tab. 12). *Ex vivo* IFN $\gamma$ -ELISPOT-Experimente mit den Epitopkandidaten SESGQFHAF, NPDLYVTTY, NEIHVYNDY, PRSPTVFYNIPPMPL und ESEERPPTY, lieferten nur zwei Beispiele für eine moderate bis starke IFN $\gamma$ -Antwort (Abb. 4

und Abb. 5). Für das Peptid SESGQFHAF aus dem lytischen Protein BRLF1 wurden nach vorhergehender Stimulation von PBMCs wenige Individuen gefunden, die hohe Frequenzen von IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen aufweisen (Tab. 11). Aus fünf positiven Reaktionen sind nur zwei sehr stark gewesen. Die IFN $\gamma$ -Antworten sind vergleichbar mit der Reaktion der PBMCs in der Positivkontrolle (PHA-L) mit 10  $\mu$ g/ml (Abb. 6). Die IFN $\gamma$ -Antwort (SFE) in *ex vivo* Untersuchungen ist für dieses Peptid schwach (Abb. 7).

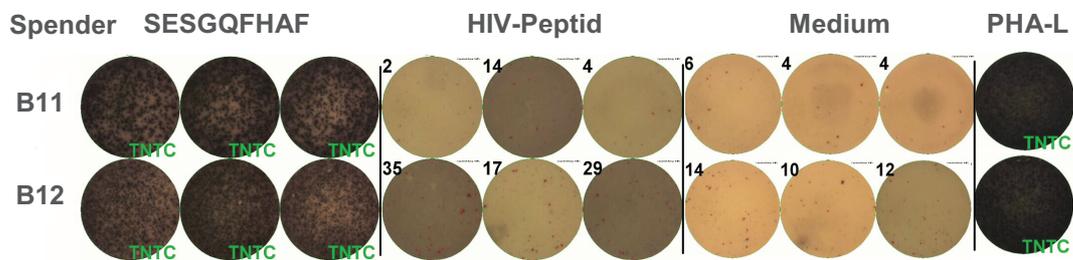


**Abb. 4:** *Ex vivo* IFN $\gamma$ -ELISPOT für den HLA-B18 Epitopkandidat NEIHVYNDY. Im Balkendiagramm sind Standardabweichungen eingetragen. HIV B18 = FRDYVDRFYK aus p23, HIV (HLA-B18). SFE = Spot-formierende Einheiten, es wurde der Mittelwert aus Triplikaten ermittelt.



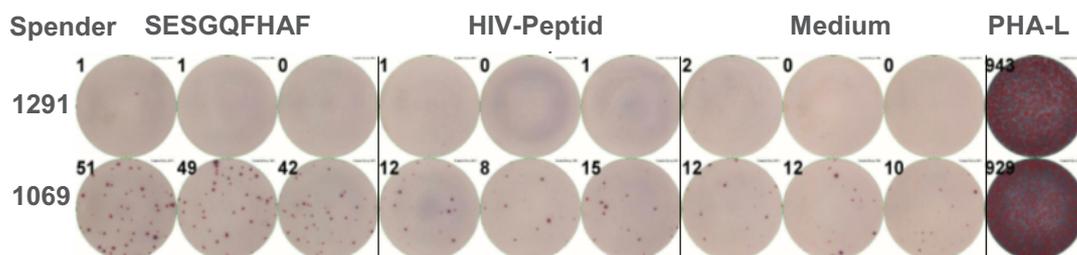
**Abb. 5:** *Ex vivo* IFN $\gamma$ -ELISPOT für den HLA-B18 Epitopkandidat RPSPTVFNIPPMPL. Im Balkendiagramm sind Standardabweichungen eingetragen. HIV B18 = FRDYVDRFYK aus p23, HIV (HLA-B18). SFE = Spot-formierende Einheiten, es wurde der Mittelwert aus Triplikaten ermittelt.

11% der getesteten Peptide rufen IFN $\gamma$ -positive Antworten hervor (Abb. 8A). Traten positive IFN $\gamma$ -Antworten in den *in vitro* ELISPOTS gegen ein bestimmtes Peptid bei gleich oder mehr als 50% der untersuchten Blutspender auf, so wurde das Peptid als dominant eingestuft. Wurden IFN $\gamma$ -Antworten bei weniger als 50% der getesteten Individuen detektiert, so wurde das Peptid als subdominant gewertet. Das Epitop PRSPTVFNIPPMPL aus dem latenten Protein EBNA2, welches nur in einer *ex vivo* Untersuchung getestet wurde (Abb. 5), wurde aufgrund der dominanten Erkennung unter HLA-B18-positiven Individuen, in die Reihe der dominanten Peptide aufgenommen. Besonders bei den Blutspendern B025 und B022 sind hohe Frequenzen von IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen detektiert worden (Abb. 5). Die Bestimmung hoher Frequenzen von reagierenden Zellen ist mit automatischer Auswertung begrenzt möglich. Daher sind oft solche Antworten (B025, B022) ähnlich wie in Abb. 6 zu bewerten.

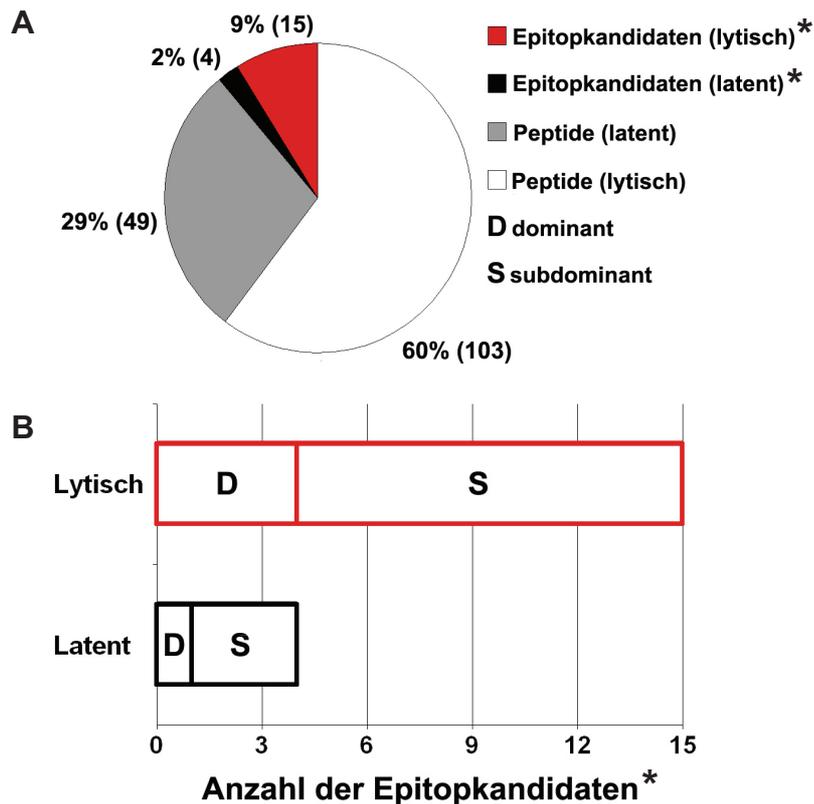


**Abb. 6: IFN $\gamma$ -ELISPOT nach Pool-Stimulation mit dem Epitopkandidat SESGQHAF.** Die entsprechenden PBMC-Proben wurden mit einem Test-Pool von drei Peptiden, darunter dem Peptid SESGQHAF stimuliert. Im anschließenden ELISPOT wurden die Peptide einzeln als Triplikate pipettiert. Gezeigt sind nur Ausschnitte für das Peptid SESGQHAF und Negativ- und Positivkontrollen. HIV-Peptid und Medium dienen als Negativkontrollen. HIV-Peptid = FRDYVDRFYK aus p23, HIV (HLA-B18). PHA-L = Positivkontrolle. TNTC = too numerous to count. (MSIPN4B50 opaque-Platte).

Diese Unterteilung der Epitopkandidaten in eine dominante und subdominante Gruppe hat ergeben, dass die Mehrheit der detektierten Antworten als subdominant kategorisiert wurde. Daneben sind mehr dominante Antworten gegen Epitope aus lytischen Antigenen von EBV gerichtet (Abb. 8B). Das Verhältnis von dominant zu subdominant ist in beiden Gruppen (lytisch und latent) annähernd gleich.



**Abb. 7: Ex vivo Detektion von seltenen SESGQHAF-spezifischen IFN $\gamma$ -Antworten.** Ausschnitt einer ELISPOT-Platte, hier am Beispiel einer positiv (untere Zeile) und einer negativ (obere Zeile) getesteten Probe. HIV-Peptid und Medium dienen als Negativkontrollen. HIV-Peptid = FRDYVDRFYK aus p23, HIV (HLA-B18). PHA-L = Positivkontrolle. (MSHAS4510 clear-Platte).



**Abb. 8: Prozentuale Verteilung der positiv und negativ getesteten Peptide.** A: Anzahl der positiven und negativen Peptide ist in Klammern angegeben. Diagramm zeigt alle Peptide, die in die Analyse eingeschlossen wurden (Tab. 2 bis Tab. 5). B: Dominanzverteilung (Tab. 11). \* = Analyse beinhaltet veröffentlichte HLA-B18-restringierte CD8+ T-Zell-Epitope

### 3.2 Kartierung von HLA-B18 Epitopkandidaten in EBV-Proteinen

Alle HLA-B18 Epitopkandidaten sollten in Relation zu veröffentlichten HLA-B18-restringierten CD8+ T-Zell-Epitopen dargestellt werden. Für die Darstellung (Abb. 9) und Beschreibung wurden eigene Daten und Daten über CD8+ und CD4+ T-Zell-Epitope aus [177] verwendet. Zur Ergänzung von fehlenden oder abweichenden Daten wurden Informationen aus (Kap. 6, S. 111, Nr. 4) entnommen. Insgesamt verteilen sich die 19 Peptide auf 11 EBV-Proteine. Einige der HLA-B18 Epitopkandidaten, wie zum Beispiel das Peptid TEENLLDF (EBNA6, AS 280-287) liegen in Epitop-reichen Proteinregionen. Im Bereich (EBNA6, AS 271-293) liegen vier weitere CD8+ T-Zell-Epitope. Das Epitop SELEIKRY (BZLF1, AS 173-180) ist am Rande eines Clusters mit CD8+ und CD4+ T-Zell-Epitopen (AS 174-221) positioniert. Der dominante Epitopkandidat NEIHVYNDY (AS 600-608) aus dem lytischen Protein BALF4 liegt allerdings in der Umgebung von nur einem CD4+ T-Zell-Epitop (AS 575-589). Der Epitopkandidat SESGQFHAF (BRLF1, AS 293-301), im Vital-Assay als ein neues Epitop bestätigt, hat keine T-Zell-Epitope in der unmittelbaren Nähe. Das Peptid (A)EEYSDLAL (BALF2, AS 795-803) liegt in einer Proteinregion, für die keine CD8+ T-Zell-Epitope bekannt sind. Für das Protein BHRF1 sind keine CD8+ T-Zell-Epitope bekannt. Jedoch liegt der Epitopkandidat IERNSETF (BHRF1, AS





Im Fall der Induktionsproben waren deutliche Banden im Vergleich zu den entsprechenden Negativkontrollen sichtbar (Abb. 12). Anschließend wurden die *inclusion bodies* für die rekombinante  $\alpha$ -Kette HLA-B18 hergestellt. Aus knapp 4,5 l Bakterienkultur wurden 2,06 g Protein erhalten. Für die Herstellung eines MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexes benötigt man 48 mg der rekombinanten  $\alpha$ -Kette. Die Menge reicht demnach für die Generierung von MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexen in 42 Rückfaltungen und verdeutlicht die Effizienz dieses Systems.

**A** ATG GGC TCC CAC TCC ATG CGC TAC TTT CAC ACG TCC GTT TCT CGT CCG  
GGT CGT GGT GAA CCG CGT TTC ATC TCC GTT GGC TAC GTG GAC GGT ACC  
CAG TTC GTC CGC TTT GAC TCT GAC GCC GCA TCT CCG CGT ACT GAA CCA  
CGT GCC CCG TGG ATC GAA CAG GAA GGT CCG GAA TAC TGG GAC CGC AAC  
ACC CAG ATC AGC AAA ACC AAC ACC CAG ACC TAC CGT GAG TCT CTG CGC  
AAC CTG CGT GGT TAC TAC AAC CAG AGC GAA GCG GGT AGC CAC ACT CTG  
CAG CGC ATG TAT GGC TGT GAC GTT GGC CCG GAT GGT CGT CTG CTG CGT  
GGT CAC GAT CAG TCT GCC TAC GAC GGC AAA GAC TAC ATC GCG CTC AAC  
GAG GAC CTG TCT AGC TGG ACT GCA GCT GAT ACG GCT GCG CAG ATC ACC  
CAG CGT AAA TGG GAA GCG GCA CGT GTT GCT GAA CAG CTG CGT GCT TAC  
CTG GAG GGT ACT TGC GTG GAA TGG CTG CGT CGT CAC CTG GAG AAC GGC  
AAA GAA ACC CTG CAG CGT GCA GAT CCA CCG AAA ACC CAC GTT ACG CAC  
CAC CCG ATC TCC GAT CAT GAG GCA ACT CTG CGT TGC TGG GCA CTG GGC  
TTC TAT CCG GCA GAG ATT ACC CTG ACC TGG CAG CGT GAT GGT GAA GAC  
CAG ACC CAG GAC ACC GAA CTG GTA GAA ACT CGT CCG GCG GGT GAT CGT  
ACC TTC CAG AAA TGG GCC GCT GTT GTA GTA CCG TCT GGC GAG GAG CAG  
CGT TAC ACT TGC CAT GTA CAG CAT GAG GGT CTG CCG AAA CCG CTG ACC  
CTG cgt TGG GAC CCG GGT TCT GGC TCT CTG CAC CAC ATC TTC GAA GCG  
CAG AAA ATC GAA TGG CGT CAT CGC TAA

**B** MGSMSRYFHTSVSRPGRGEPRFISVGYVDGTQFVRFDSDAASPRTEPRAPWIEQEGPEYWDR  
NTQISKTNQTYRESLRNLRGYNQSEAGSHTLQRMYGCDVGPDRLLRGRHDQSAYDQKDYIA  
LNEDLSSWTAADTAAQITQRKWEAARVAEQRLRAYLEGTCEWLRRLHLENGKETLQRADPPKTH  
VTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTDTELVETRPAGDRTFQKWAAVVPS  
GEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWDPGSGSLHHIFEAQKIEWRHR

Abb. 11: DNA- und Aminosäuresequenz für *inclusion bodies* der rekombinanten  $\alpha$ -Kette HLA-B18. A: DNA-Sequenz. Rot = Startcodon, grau = Biotinylierungssequenz (siehe Kap. VI), schwarz = Stopcodon. B: Aminosäuresequenz für *inclusion bodies*. Siehe auch Abb. 2, Abb. 10 und Kap. 2.13.1, S. 32.

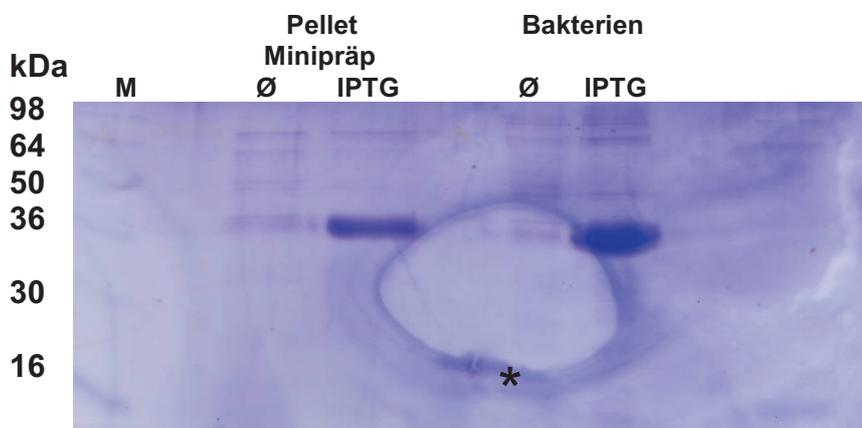


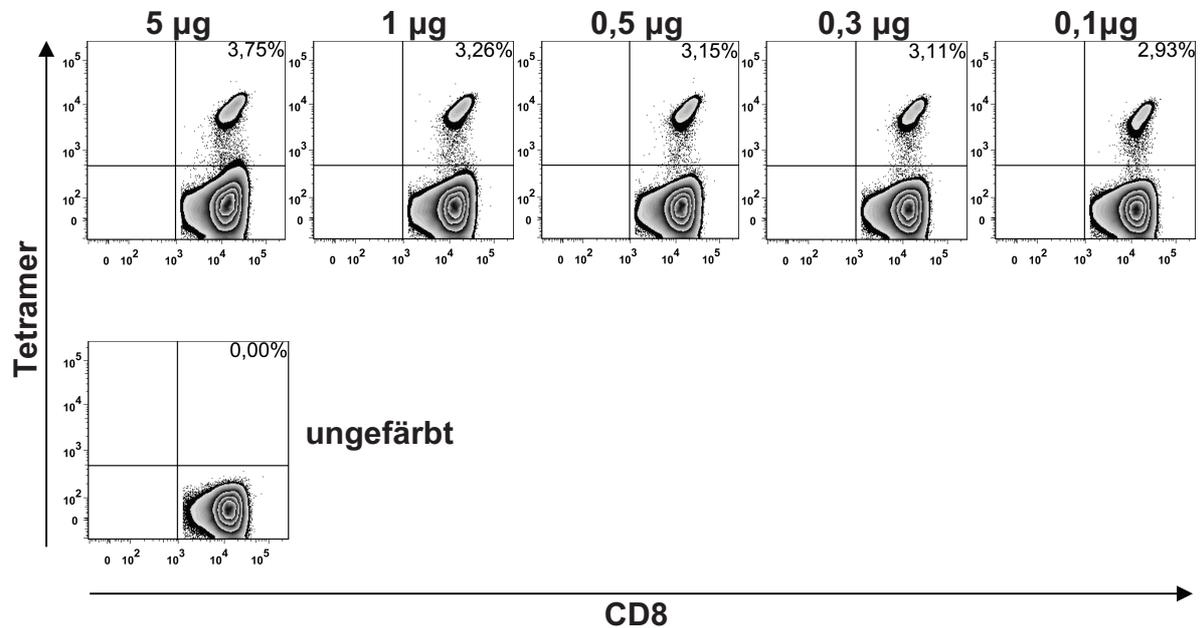
Abb. 12: Induktionstests für *inclusion bodies* der rekombinanten  $\alpha$ -Kette HLA-B18. SDS-PAGE mit Proben beider Tests einschließlich der entsprechenden Negativkontrollen. M = Marker SeeBlue Pre-Stained Standard, Ø = Negativkontrolle, \* = Kreis-Artefakt bei Gelentfärbung.

### 3.4 Detektion von Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit HLA-B18-Tetrameren

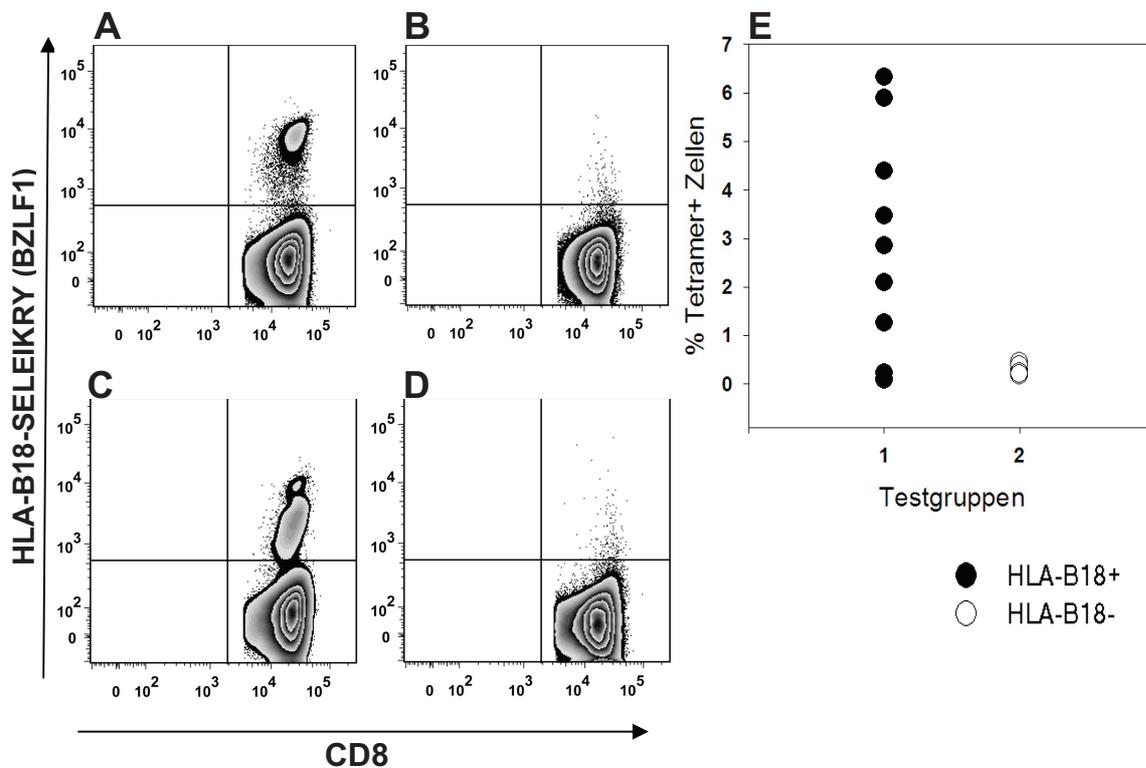
#### 3.4.1 Das HLA-B18-SELEIKRY-Tetramer

Um Antigen-spezifische T-Zellen untersuchen, charakterisieren oder isolieren zu können, wurden HLA-B18 MHC-Peptid-Komplexe hergestellt. Das Gewicht für folgende Untersuchungen wurde auf das dominante lytische Epitop SELEIKRY gelegt. Abb. 13 zeigt die Titration mit dem HLA-B18-SELEIKRY-Tetramer an einer SELEIKRY-positiv getesteten PBMC-Probe. Beim Einsatz von  $\sim 0,3$   $\mu\text{g}$  MHC-Peptid-Monomer bleibt die Hintergrundfärbung vergleichbar mit  $\sim 0,1$   $\mu\text{g}$  eingesetztem MHC-Peptid-Monomer. Die Tetramer-positive Population nimmt jedoch bei  $\sim 0,1$   $\mu\text{g}$  ab. Deshalb beträgt die Menge von HLA-B18-SELEIKRY-Monomer, die pro Probe eingesetzt werden kann,  $\sim 0,3$   $\mu\text{g}$ . Als negative Kontrollgruppe in der Tetramerfärbung wurden HLA-B18-negative Individuen gewählt. Abb. 13E zeigt den prozentualen Anteil von Tetramer-positiven Zellen in der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Population von HLA-B18-positiven und HLA-B18-negativen Blutspendern. T-Zellen, die spezifisch das HLA-B18-restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Epitop SELEIKRY aus dem lytischen Protein BZLF1 erkennen, können durch eine klar abtrennbare Population, innerhalb der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Population detektiert werden (Abb. 14A und Abb. 14C). Unter HLA-B18-positiven Individuen wurden auch Tetramer-negative Blutspender gefunden (Abb. 14B). Die Kontrollgruppe der HLA-B18-negativen Blutspender zeigt keine größere unspezifische Färbung (Abb. 14D). Solche Färbungen können jedoch bis ca. 0,5% der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zell-Population betragen. Im Gegensatz zu HLA-B18-positiven Proben sind hier aber keine Populationformationen sichtbar. Die Funktion der T-Zelle wird durch die Regulation der Expression des T-Zell-Rezeptors beeinflusst. Durch die Stimulation des T-Zell-Rezeptors mit dem Liganden wird der T-Zell-Rezeptor schnell internalisiert (Valitutti et al., 1997, *J Exp Med.*). Um die spezifische Herabregulation des T-Zell-Rezeptors zu beobachten, wurde ein Tetramer-positiver Spender mit dem synthetischen Peptid SELEIKRY unterschiedlich lange stimuliert (Abb. 15). Anschließend wurden diese Proben zusammen mit den Kontrollproben mit dem HLA-B18-SELEIKRY-Tetramer gefärbt. Nach 30 min Stimulation mit dem spezifischen Peptid SELEIKRY sind ca. 37% Tetramer-positiver Zellen (der ursprünglichen Populationsgröße) im betrachteten Fenster (oberer Quadrant, rechts) zu detektieren (Abb. 15A und Abb. 15D). Die Intensität des PE-Signals nimmt kontinuierlich mit der Zeit ab (Abb. 15C, A). Die Stimulation mit dem Peptid SELEIKRY führt zur spezifischen Herabregulation des T-Zell-Rezeptors, einem essentiellen Vorgang bei einer adäquaten Funktion der T-Zelle. Das HLA-B18-SELEIKRY-Tetramer wurde ebenfalls zur Bestimmung des Phänotyps der Epitop-spezifischen T-Zellen aus PBMCs eingesetzt (Abb. 16A und Abb. 16B). Der dominante Anteil von Tetramer-positiven Zellen ist CD45RO-positiv und CCR7-negativ, gehört folglich der Effektor/Gedächtnis T-Zell-

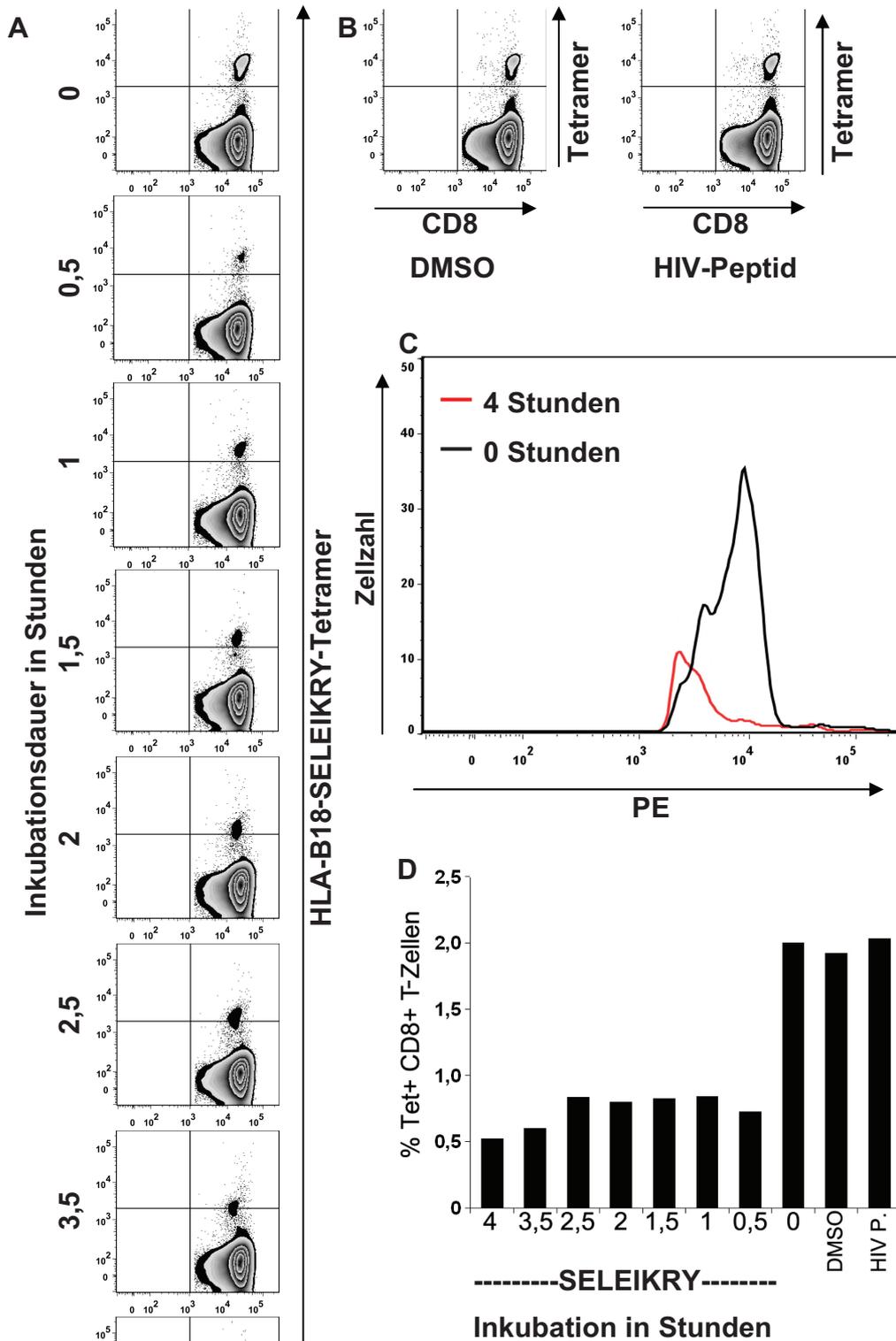
Population an. Dies bestätigt die allgemeine Beobachtung für CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die gegen lytische Antigene aus EBV gerichtet sind. Ein ähnliches Ergebnis lieferte auch eine vergleichende Färbung eines HLA-B8-positiven Spenders mit dem HLA-B8-RAKFKQLL-Tetramer.



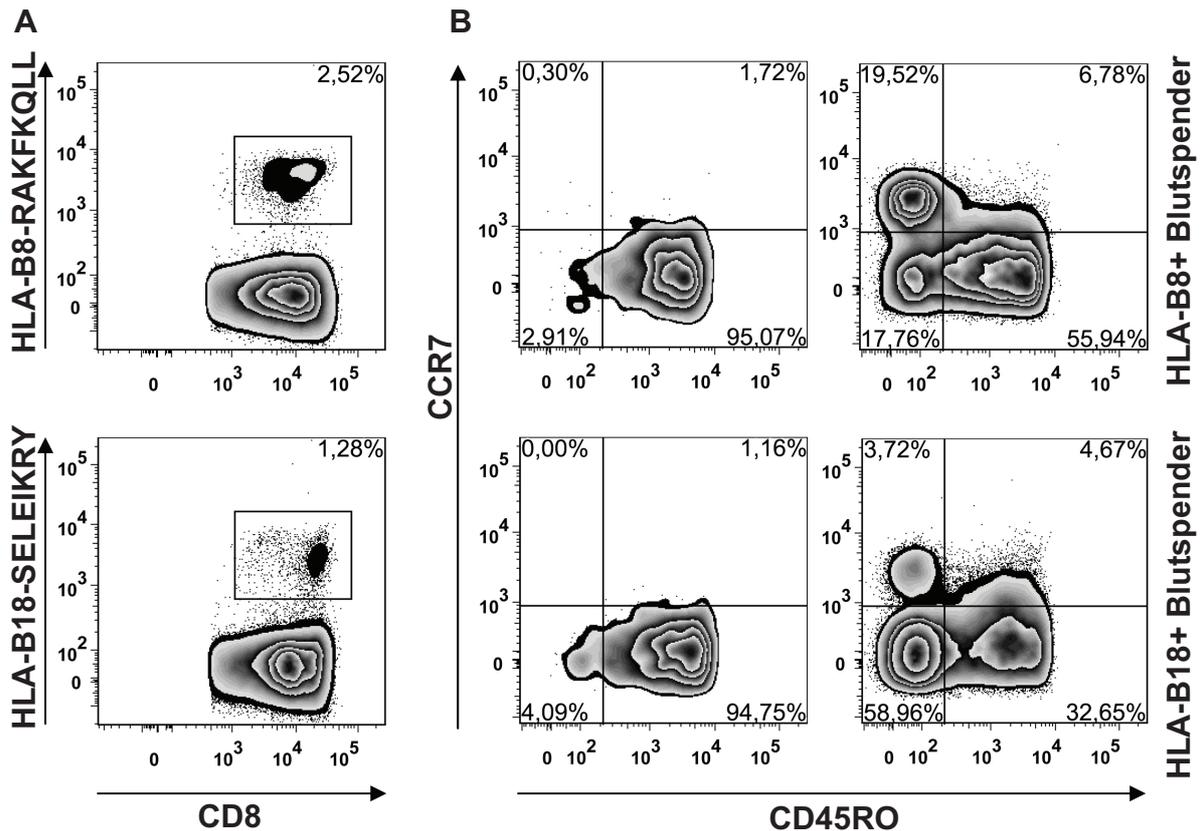
**Abb. 13: Tetramertitration vom HLA-B18-SELEIKRY-Tetramer.** Die optimale Menge von eingesetztem SELEIKRY-HLA-B18-Monomer beträgt  $\sim 0,3 \mu\text{g}$  pro Test.



**Abb. 14: Tetramerfärbung mit dem HLA-B18-SELEIKRY-Tetramer.** A, C: Deutlich sichtbare Tetramer-positive T-Zell-Populationen, die spezifisch für das HLA-B18-restringierte Epitop SELEIKRY sind. B: Tetramer-negativ getestete PBMCs eines HLA-B18-positiven Blutspenders. D: HLA-B18-negative PBMCs wurden als Kontrollgruppe eingesetzt. E: Tetramerfärbung zweier Testgruppen: HLA-B18<sup>+</sup> (n = 10) und HLA-B18<sup>-</sup> (n = 9).



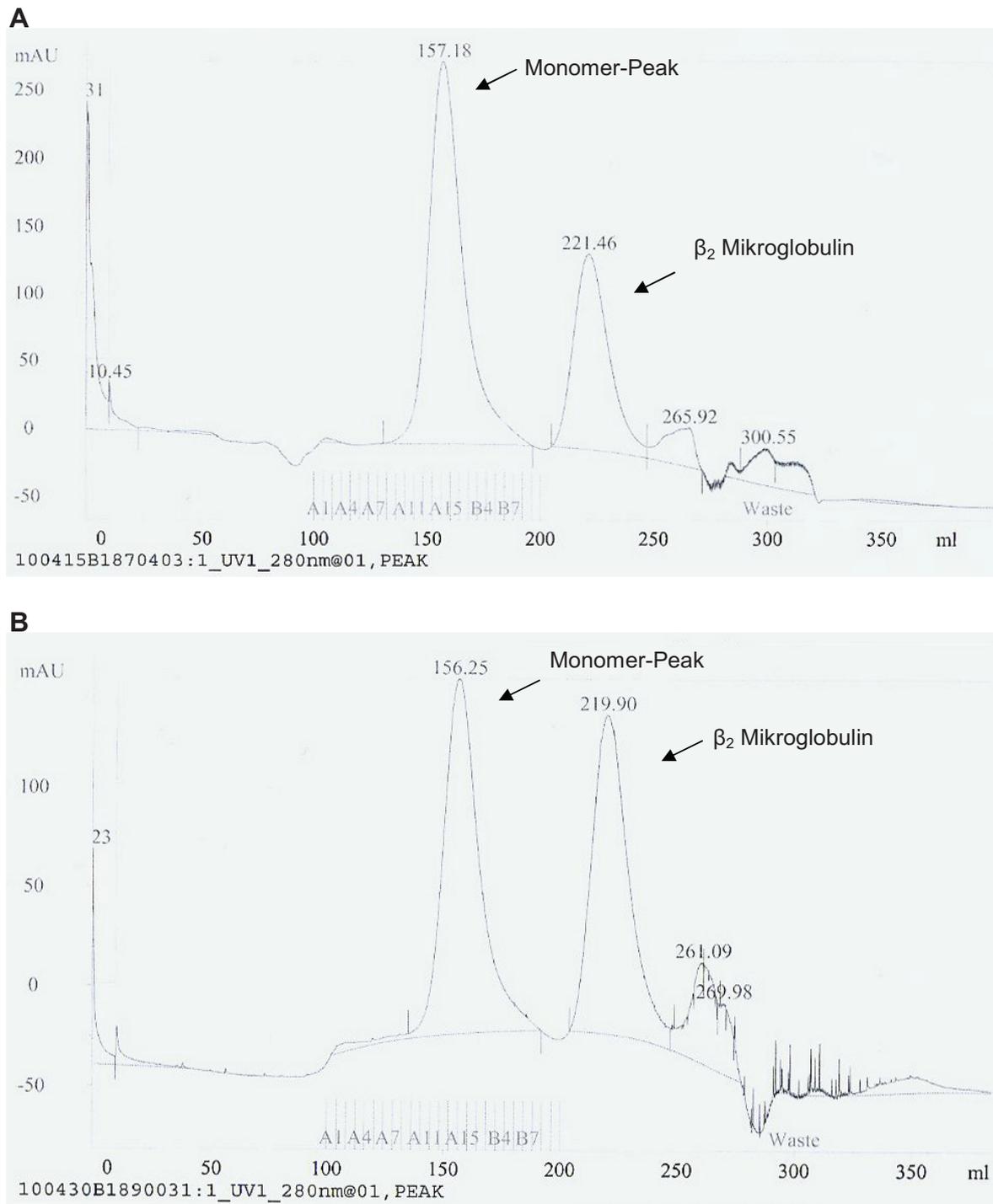
**Abb. 15: Herabregulation des T-Zell-Rezeptors.** **A:** Die PBMCs wurden im angegebenen Zeitintervall mit dem synthetischen Peptid SELEIKRY stimuliert und anschließend mit dem HLA-B18-SELEIKRY-Tetramer gefärbt. **B:** Kontrollen, HIV-Peptid und DMSO. HIV-Peptid bzw. HIV P. = FRDYVDRFYK aus p23, HIV (HLA-B18). **C, A:** Die Intensität des PE-Signals nimmt kontinuierlich ab. **D:** Der Prozentanteil der Tetramer-positiven Zellen (CD3+/CD4-/CD8+) nimmt rasch ab und bleibt annähernd konstant im Zeitfenster von 2,5 h, ab 3,5 h leicht fallend.



**Abb. 16: Bestimmung des Phänotyps Tetramer-positiver CD8+ T-Zellen.** **A:** Tetramerfärbung mit HLA-B8-RAKFKQLL und HLA-B18-SELEIKRY. Angegeben ist der prozentuale Anteil Tetramer-positiver Zellen in der CD3+/CD4-/CD8+ T-Zell-Population. **B:** Phänotyp der Tetramer-positiven T-Zellen (links) aus A im Vergleich zur CD3+/CD4-/CD8+ Population (rechts). RAKFKQLL ist ein veröffentlichtes CD8+ T-Zell-Epitop aus EBV.

### 3.4.2 Weitere HLA-B18-Tetramere

Als nächster Schritt sollte untersucht werden, ob weitere HLA-B18 Epitopkandidaten sich zusammen mit der  $\alpha$ -Kette HLA-B18 und dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin zu einem MHC-Peptid-Komplex falten lassen. Neben dem Peptid SELEIKRY wurden die Peptide SESGQFHAF (BRLF1), DEVEFLGHY (BMLF1), NPDLYVTTY (BMRF1), EEYSDLAL (BALF2), NEIHVYNDY (BALF4), ESEERPPTY (LMP2) und TEENLLDF (EBNA6) bei Rückfaltungen eingesetzt. Bei den entsprechenden Fraktionsauftrennungen waren Komplexe sichtbar (Abb. 17). Tab. 13 zeigt die gewonnene Menge einer Auswahl von biotinylierten Monomeren. Die folgende Abb. 18 zeigt *ex vivo* Tetramerfärbungen mit dem HLA-B18-Tetrameren für die Peptide SESGQFHAF, NEIHVYNDY und TEENLLDF. Im Vergleich zur Färbung mit dem HLA-B18-SELEIKRY-Tetramer, das als Positivkontrolle eingesetzt wurde, sind keine eindeutigen Tetramer-positiven Populationen sichtbar. Bei dieser Färbung wurde für alle in Abb. 18 aufgeführten Tetramere die gleiche Verdünnung, wie bei HLA-B18-SELEIKRY, eingesetzt. Kontrollfärbungen mit dem HLA-B18-SELEIKRY-Tetramer bei HLA-B18-negativen Blutspendern zeigen Hintergrundfärbungen bis zu ca. 0,5% der CD3+/CD4-/CD8+ T-Zell-Population.

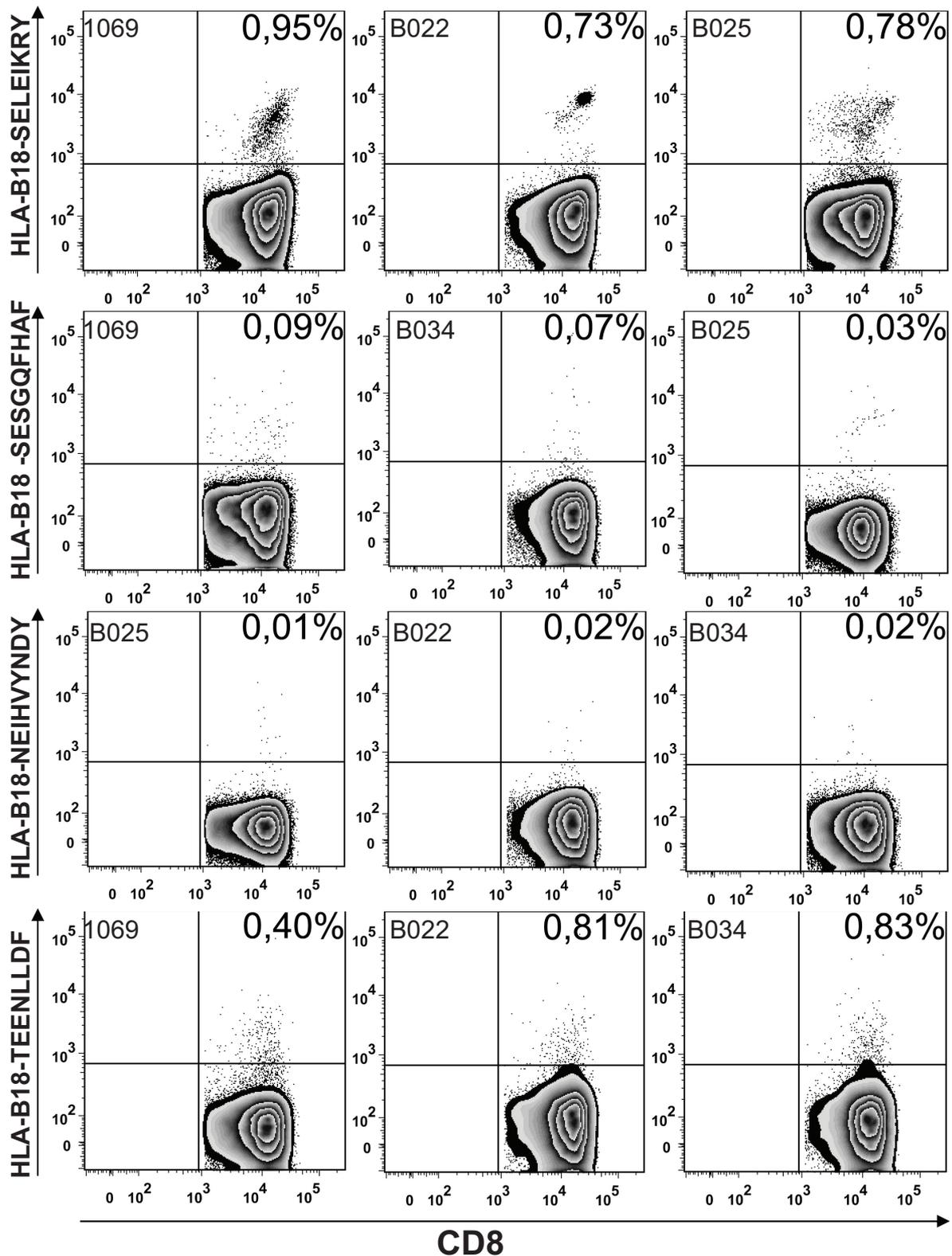


**Abb. 17: Erster FPLC-Auftrennungsschritt von HLA-B18-Monomeren. A:** Monomer für Epitopkandidat SEGQFHAF. **B:** Monomer für Epitopkandidat NEIHVYNDY. Elution vor dem Biotinylierungsschritt.

**Tab. 13: HLA-B18-Monomere**

Sequenz	SELEIKRY	SEGQFHAF	NPDLYVTTY	EEYSDLAL	NEIHVYNDY	TEENLLDF
Protein	BZLF1	BRLF1	BMRF1	BALF2	BALF4	EBNA6
biot. Monomer	1,19 mg	2,55 mg	1,02 mg	0,78 mg	1,15 mg	0,80 mg

Gezeigt sind die erhaltenen Mengen von biotinylierten HLA-B18-Monomeren für die potentiellen, neuen HLA-B18 Epitopkandidaten. biot. = biotinyliert.

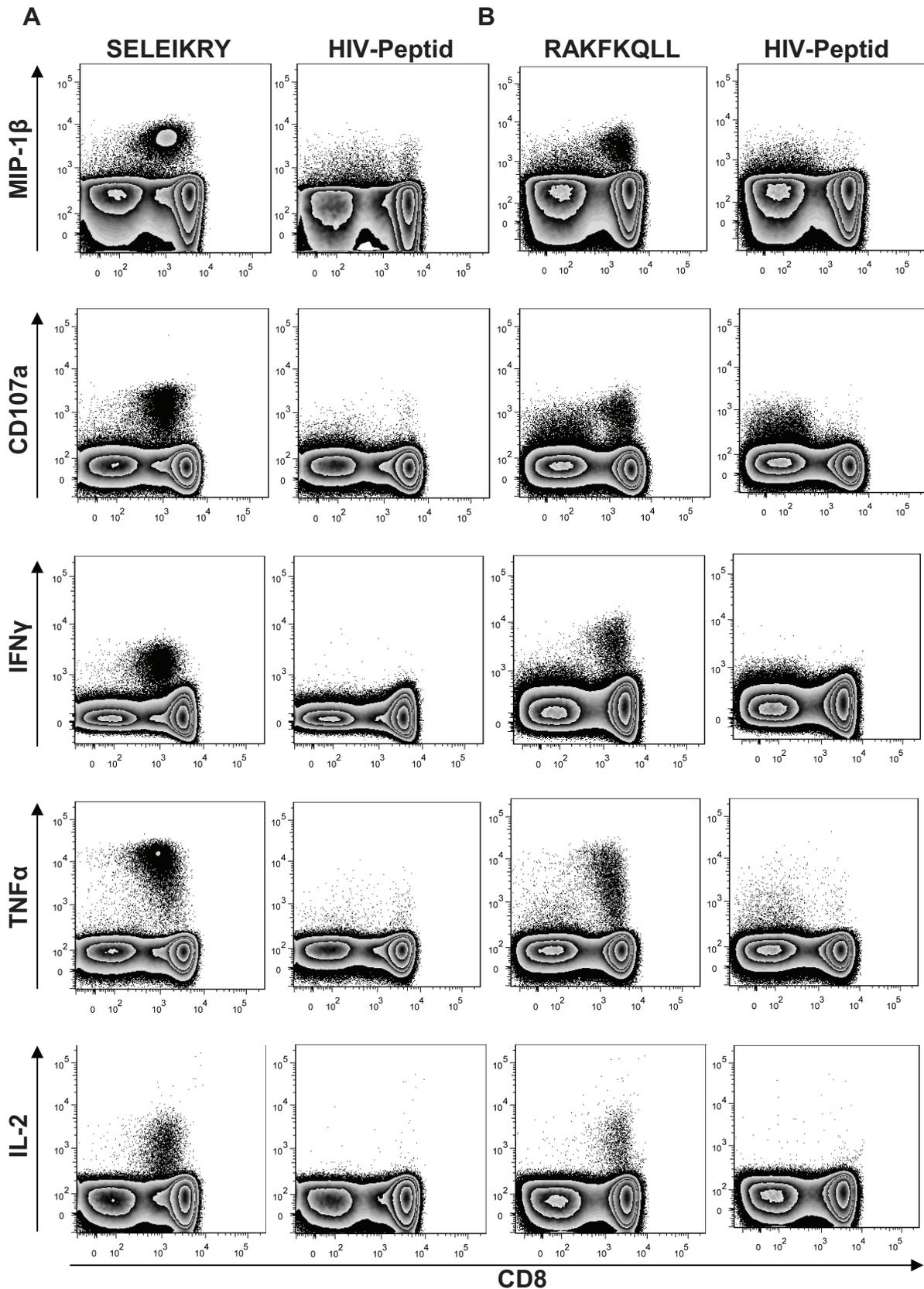


**Abb. 18: Ex vivo Tetramerfärbung mit weiteren HLA-B18-Tetrameren.** Gezeigt sind jeweils drei verschiedene PBMC-Proben für drei weitere HLA-B18-Tetramere für die Epitopkandidaten SESGQFHAF (BRLF1), NEIHVYNDY (BALF4) und TEENLLDF (EBNA6). Obere Zeile zeigt zum Vergleich die Färbung mit dem HLA-B18-SELEIKRY-Tetramer. In den Abbildungen ist der prozentuale Anteil der Tetramer-positiven Zellen aus der CD3+/CD4-/CD8+ T-Zell-Population angegeben (rechter Quadrant). Im oberen linken Quadranten ist die Spender-Nr. eingetragen. Siehe auch für das Peptid NEIHVYNDY (BALF4) Abb. 4 und für das Peptid SESGQFHAF (BRLF1) Abb. 7.

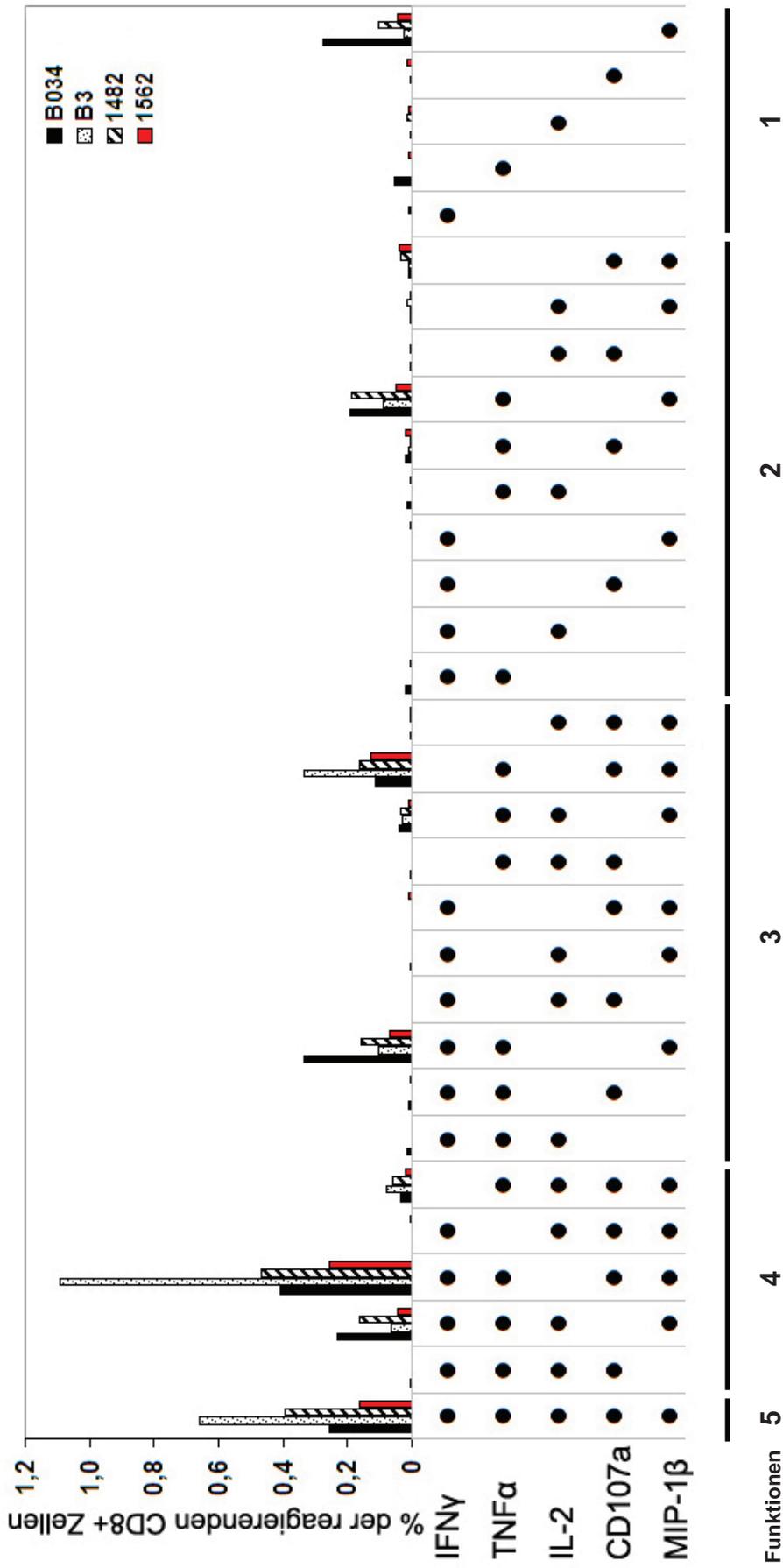
Betrachtet man in Abb. 18 Spender B025 (HLA-B18-NEIHVYNDY) beträgt die Tetramer-positive Population 0,01% der CD3+/CD4-/CD8+ T-Zellen. In Abb. 4 wurde der gleiche Spender für das Peptid auf IFN $\gamma$ -Antwort im *ex vivo* ELISPOT getestet. In diesem Assay wurden 500.000 PBMCs eingesetzt. Durchschnittlich reagierten ca. 350 Zellen auf das Peptid NEIHVYNDY mit IFN $\gamma$ -Produktion. In der Tetramerfärbung wurden eine Million Zellen gezählt, davon waren ca. 130.000 Zellen CD3+/CD4-/CD8+. Demnach müsste die Tetramer-positive Population einen größeren Wert als 0,01% betragen. Für die neuen HLA-B18-Tetramere werden Tetramertitrationen erforderlich sein. Auf die Ergebnisse der Tetramertitration mit dem HLA-B18-SESGQFHAF-Tetramer wird in der Diskussion näher eingegangen.

### 3.5 Polyfunktionalität SELEIKRY-spezifischer CD8+ T-Zellen

An dieser Stelle wird am dominanten HLA-B18-restringierten CD8+ T-Zell-Epitop SELEIKRY aus BZLF1 untersucht, ob Epitop-spezifische T-Zellen ein polyfunktionales Funktionsmuster aufweisen. Für dieses Experiment wurde als Vergleichsepitop das dominante veröffentlichte HLA-B8-restringierte Epitop RAKFKQLL gewählt. Dieses Peptid stammt ebenfalls aus dem lytischen EBV-Antigen BZLF1. Als Negativkontrolle wurde ein HIV-Peptid gewählt. Um die Komplexität der SELEIKRY-spezifischen CD8+ T-Zell-Antwort mit dem Muster gegen ein bisher bekanntes lytisches Epitop aus EBV zu untersuchen, wurden fünf CD8+ T-Zell-Funktionen ausgewählt. Diese sollten einen ersten Einblick in die Produktion von Chemokinen (MIP-1 $\beta$ ), die Fähigkeit zur Degranulation (CD107a) und die Zytokinproduktion (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2) geben. Abb. 19A zeigt ein generelles Bild für alle Funktionen anhand eines HLA-B18-positiven Individuums, dessen PBMCs mit dem Peptid SELEIKRY stimuliert wurden, im Vergleich mit der Stimulation eines HLA-B8-positiven Blutspenders mit dem Peptid RAKFKQLL in Abb. 19B. Die SELEIKRY-spezifische CD8+ T-Zell-Antwort beinhaltet sowohl eine IL-2-, IFN $\gamma$ - und TNF $\alpha$ -, als auch eine MIP-1 $\beta$ - und CD107a-Antwort. Die Komplexität der Funktionen ist in Abb. 20 dargestellt. Die Werte für die jeweiligen Funktionsmuster wurden für die beiden Epitope und die Negativkontrollen bestimmt. In der Abb. 20 wurden die Werte der Negativkontrollen von den Werten nach der Stimulation mit den EBV-Epitopen subtrahiert. Falls das Ergebnis einen negativen Wert aufwies, wurde das Ergebnis gleich null gesetzt. Vergleicht man die Signatur für die stärksten Subpopulationen in der Abb. 20, so besteht kein wesentlicher Unterschied in der Musterverteilung zwischen der SELEIKRY- und der RAKFKQLL-spezifischen CD8+ T-Zell-Antwort. Spender B3 hat einen besonders hohen Anteil von reagierenden CD8+ T-Zellen. Die individuellen Funktionsmuster wurden schließlich in Gruppen zusammengefasst, die entweder fünf, vier, drei, zwei oder nur eine Funktion tragen.



**Abb. 19: Repräsentative Darstellung für unterschiedliche T-Zell-Funktionen. A:** Stimulation mit dem HLA-B18-restringierten Epitop SELEIKRY aus dem lytischen Protein BZLF1 (links) und einem irrelevantem Peptid aus HIV, FRDYVDRFYK aus p23, (rechts). **B:** Stimulation mit dem bekannten T-Zell-Epitop RAKFKQLL, ebenfalls aus BZLF1 (links), und einem irrelevanten Peptid aus HIV (rechts), siehe A.



**Abb. 20: Funktionsmuster Epitop-spezifischer CD8+ T-Zellen.** Gezeigt ist die Komplexität der CD8+ T-Zell-Antwort gegen das HLA-B18-restringierte Epitop SELEIKRY aus BZLF1 im Vergleich mit der T-Zell-Antwort gegen das CD8+ T-Zell-Epitop RAKFKQLL. Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil der spezifisch reagierenden CD8+ T-Zellen nach Abzug der Negativkontrolle, FRDYVDRFYK aus p23 (HIV-Peptid). Die Kombinationen der entsprechenden Funktionen sind mit Punkten gekennzeichnet.

Der größte Anteil wird von Zellen getragen, die vier Funktionen gleichzeitig innehaben. Eine individuelle Schwankung unter HLA-B18-positiven Individuen in der prozentualen Verteilung für die unterschiedlichen Gruppen ist vorhanden. Der Blutspender B3 hat den niedrigsten Prozentanteil an monofunktionalen Zellen (1%) und den höchsten Prozentanteil an polyfunktionalen Zellen (26%, fünf Funktionen). Je höher der Anteil an Zellen, die vier bis fünf Funktionen aufweisen, desto niedriger ist der Anteil der monofunktionalen Zellen. Dies ist bei allen getesteten Individuen zu verzeichnen, einschließlich der Vergleichsprobe für das Epitop RAKFKQLL (Abb. 21).

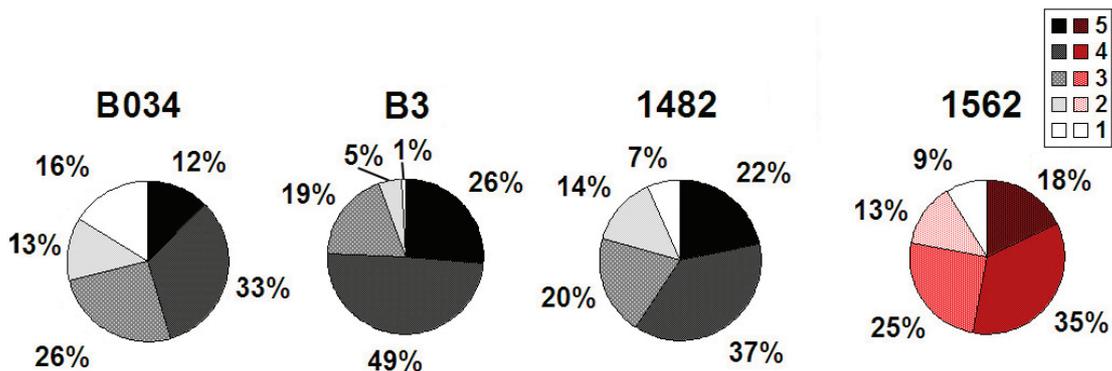


Abb. 21: Prozentuale Verteilung der multifunktionalen Zellen anhand der Anzahl von Funktionen. Die Abbildung zeigt die gleichen Blutspender aus Abb. 20.

### 3.6 Detektion von $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden $\text{CD8}^+$ T-Zellen nach Stimulation mit weiteren HLA-B18 Epitopkandidaten

Ein kleinerer Anteil von Peptiden wurde mit der intrazellulären Zytokinfärbung untersucht. Die PBMCs wurden mehrmals mit Peptid stimuliert (Kap. 2.15, S. 37) und zu einem späteren Zeitpunkt getestet. Positive Ergebnisse sind in Abb. 22 dargestellt. Im Rahmen der Screenarbeit wurden keine getrennten Negativkontrollen für jeden Test verwendet, sondern es wurden aus einer beliebigen Stimulationsprobe Zellen des gleichen getesteten Spenders entnommen. Als Negativkontrolle wurde Kulturmedium verwendet. Es sind eindeutig  $\text{IFN}\gamma$ -Antworten in der Fraktion der  $\text{CD8}^+$  T-Zellen für drei der fünf aufgeführten Peptide nachweisbar. Positive  $\text{IFN}\gamma$ -Antworten aus diesem Experiment bestätigen die bereits im ELISPOT gefundenen Epitopkandidaten. Für das Peptid EEYSDLALF siehe auch Kap. 4.2.7, S. 92. Nach einer weiteren Stimulationsrunde des hier aufgeführten Experiments (Abb. 22) wurden bei einigen der aufgeführten Epitopkandidaten (PRSPTVFYNIPPMPL, KESLFNSFY, und EEYSDLALF) auch andere Funktionsmarker, wie  $\text{CD107a}$  und  $\text{TNF}\alpha$ , in der  $\text{CD4}^-/\text{CD8}^+$  T-Zell-Population detektiert. Darüber hinaus konnte bei Proben nach Prästimulation (Stimulationsprotokoll für ELISPOT) mit weiteren HLA-B18 Epitopkandidaten (AFDQATRVY, VVETLSSSY) ebenfalls

die Produktion von CD107a und TNF $\alpha$ , in einem Fall (SESGQFHAF) auch die Produktion von IL-2, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ , in der CD4-/CD8+ T-Zell-Population nachgewiesen werden.

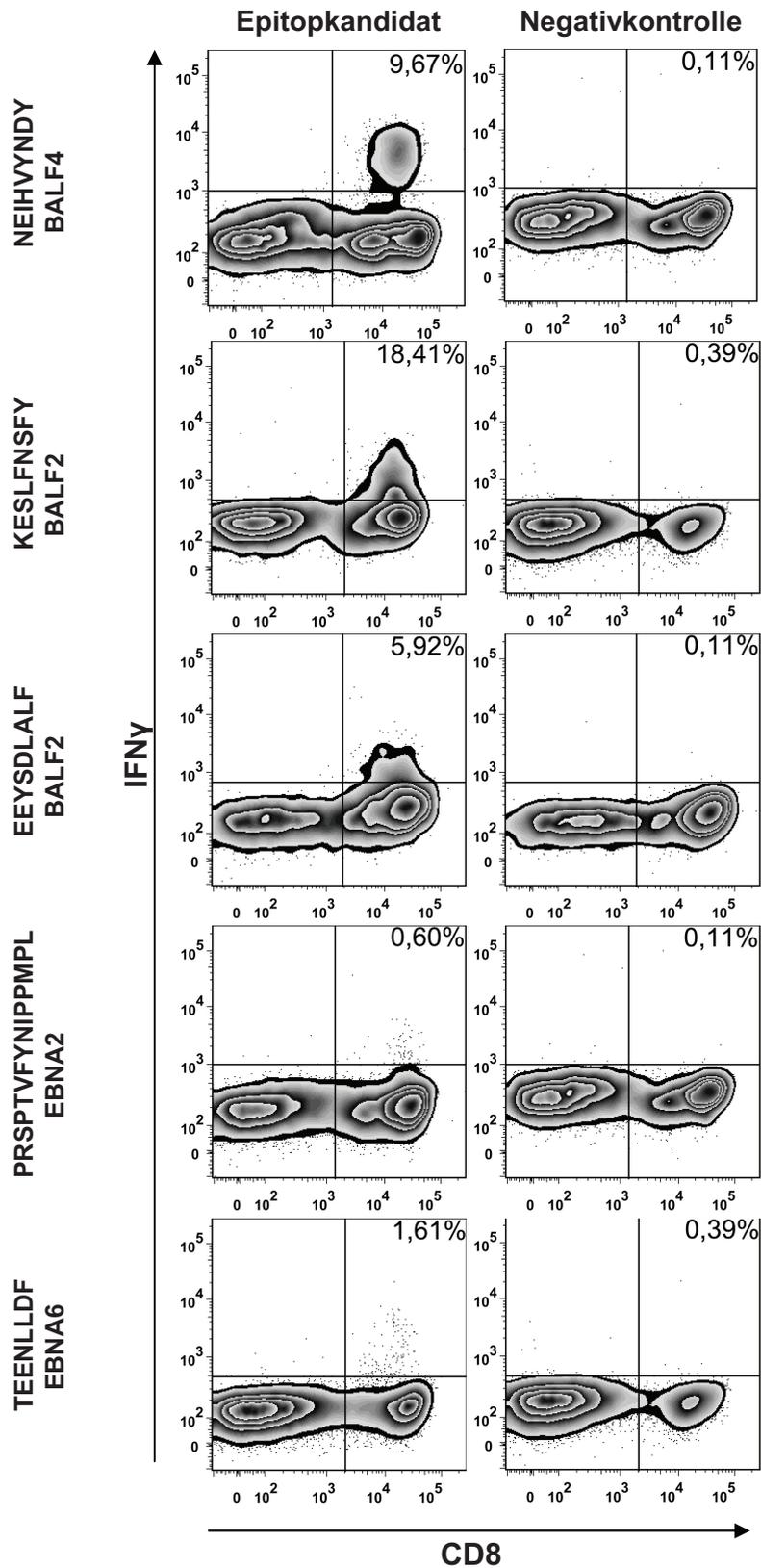
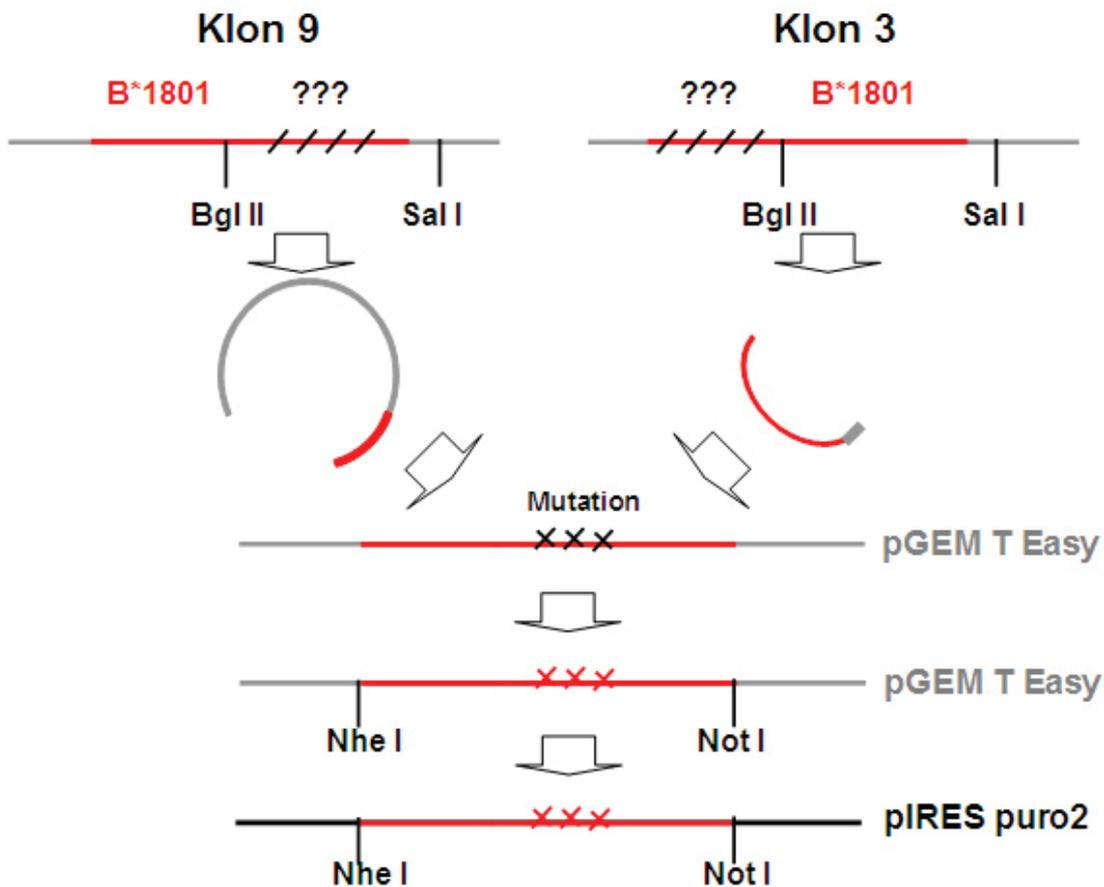


Abb. 22: HLA-B18-Epitopsuche mit intrazellulärer Zytokinfärbung für IFN $\gamma$ . Als Negativkontrolle wurde Medium verwendet.

### 3.7 Zytotoxizität von Epitop-spezifischen CD8+ T-Zellen

#### 3.7.1 Der HLA-B\*1801<sup>W486C→G</sup> pIRES puro2 Vektor

Die RNA wurde aus einer HLA-B18-positiven Zelllinie extrahiert, um anschließend die cDNA für HLA-B18 herzustellen, die mit dem pGEM T Easy Vektor ligiert wurde. Die HLA-B\*1801<sup>W486C→G</sup>-cDNA-Sequenz wurde schließlich in den pIRES puro2 Vektor kloniert. Das experimentelle Vorgehen für den HLA-B\*1801<sup>W486C→G</sup> pIRES puro2, ausgehend von den beiden Klonen mit den Teilsequenzen für HLA-B18-cDNA, ist in Abb. 23 graphisch dargestellt. Abb. 24 zeigt die vollständige HLA-B\*1801<sup>W486C→G</sup>-cDNA-Sequenz. Die Position der Sequenz in dem pIRES puro2 Vektor ist in Abb. 25 dargestellt.



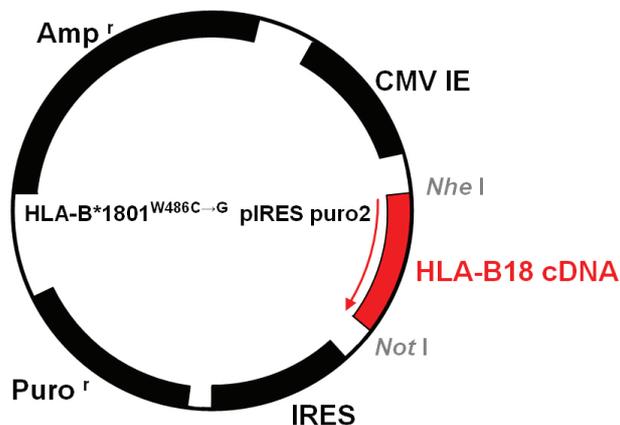
**Abb. 23: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte bei der Konstruktion des HLA-B\*1801<sup>W486C→G</sup> pIRES puro2 Vektors.** (siehe Tab. 9 und Kap. 2.20.2, S. 48 und 2.20.3, S. 50). Ausgehend von zwei Klonen mit Teilsequenzen für HLA-B18 im pGEM T Easy Vektor, wurden Teilstücke nach einem Verdau mit den Restriktionsenzymen Bgl II und Sal I zu einem Vektor mit der HLA-B18-cDNA-Sequenz ligiert. Durch Mutagenese wurden Punktmutationen, die die Aminosäuresequenz verändern würden, beseitigt. Die HLA-B\*1801<sup>W486C→G</sup>-cDNA-Sequenz wurde durch die Restriktionsenzyme Nhe I und Not I aus dem pGEM T Easy Vektor geschnitten und in den pIRES puro2 Vektor kloniert, siehe auch Abb. 24 und Abb. 25.

```

ATGCGGGTCACGGCGCCCCGAACCCTCCTCCTGCTGCTCTGGGGGGCAGTGGCCCTGACCGAGACCTGGGCTGGC
TCCCCTCCATGAGGTATTTCCACACCTCCGTGTCCCGGCCCGGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCTCAGTGGGC
TACGTGGACGGCACCCAGTTTCGTGAGGTTTCGACAGCGACGCCGCGAGTCCGAGGACGGAGCCCCGGGCGCCGTGG
ATAGAGCAAGAGGGGCCGGAGTATTGGGACCGGAACACACAGATCTCCAAGACCAACACACAGACTTACCGAGAG
AGCCTGCGGAACCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCGGGTCTCACACCCTCCAGAGGATGTACGGCTGC
GACGTGGGGCCGGACGGGGCGCCTCCTCCGCGGGCATGACCAGTCCGCCCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTG
AACGAGGACCTGAGCTCCTGGACCGCGGGACACGGCGGCTCAGATCACCAGCGCAAGTGGGAGGCGGCCCGT
GTGGCGGAGCAGCTGAGAGCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCGCGAGACACCTGGAGAACGGGAAG
GAGACGCTGCAGCGCGCGGACCCCCCAAAGACACATGTGACCCACCACCCCATCTCTGACCATGAGGCCACCCTG
AGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGCGAGGACCAAACCTCAG
GACACCGAGCTTGTGGAGACCAGACCAGCAGGAGATAGAACCTTCCAGAAGTGGGCAGCTGTGGTGGTGCCTTCT
GGAGAAGAGCAGAGATACACATGCCATGTACAGCATGAGGGGGCTGCCGAAGCCCCCTCACCCTGAGATGGGAGCCA
TCTTCCCAGTCCACCATCCCCATCGTGGGCATTGTTGCTGGCCTGGCTGTCTTAGCAGTTGTGGTTCATCGGAGCT
GTGGTTCGCTACTGTGATGTGTAGGAGGAAGAGCTCAGGTGAAAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCGTCCAGC
GACAGTGCCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTCACAGCTTGA

```

**Abb. 24:** HLA-B\*1801<sup>W486C→G</sup>-cDNA-Sequenz für den HLA-B\*1801<sup>W486C→G</sup> pIRES puro2 Vektor. Die Sequenz enthält eine Punktmutation (grau), ändert jedoch die Aminosäure an der betroffenen Position nicht (Wobble).

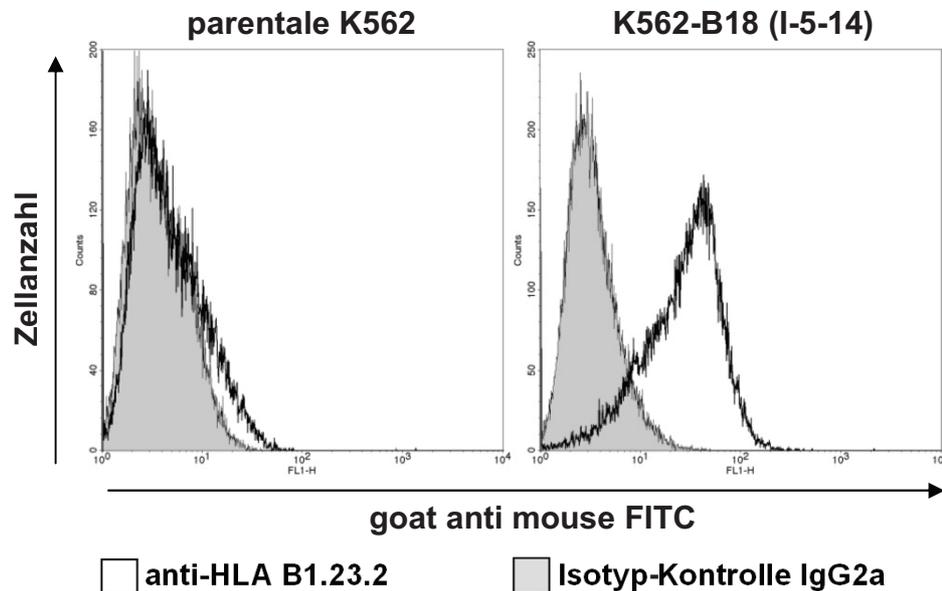


**Abb. 25:** Schematische, vereinfachte Darstellung des HLA-B\*1801<sup>W486C→G</sup> pIRES puro2 Vektors. Amp<sup>r</sup> = Ampicillinresistenz (β-Lactamase)-Gen, Puro<sup>r</sup> = Puromycinresistenz (Puromycin-N-acetyl-Transferase), CMV IE = Humanes Zytomegalievirus (CMV) „major immediate early“ Promotor, IRES = Attenuierte interne ribosomale Eintrittsstelle aus Enzephalomyokarditis-Virus (ECMV), Nhe I, Not I = Restriktionsenzyme, über die HLA-B18-cDNA kloniert wurde. Informationen zur Darstellung der Abb. 25 wurden (Kap. 6, S. 111, Nr. 9) entnommen.

### 3.7.2 Die Generierung von K562-B18 Transfektanten

Um die zytotoxische Kapazität von Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die sich gegen HLA-B18 Epitopkandidaten richten, zu untersuchen, wurde eine K562-Transfektante, die K562-B18, generiert. Mit dem neuen Konstrukt HLA-B\*1801<sup>W486C→G</sup> pIRES puro2 wurde die Transfektion der K562-Zellen durchgeführt. Der linearisierte Vektor wurde mit Hilfe der Elektroporation in die Zelllinie K562 eingeschleust. Der pIRES puro2 Vektor enthält eine Resistenz gegen Puromycin. Zur Auslese der positiven Klone wurde im Medium Puromycin in einer Endkonzentration von 1 µg/ml eingesetzt. Färbungen mit Anti-human HLA-A,-B,-C und Anti-human HLA-B,-C Antikörpern ergaben multiple positive Proben. Für weitere Experimente wurden HLA-B\*1801<sup>W486C→G</sup>-transfektante K562 mit der Bezeichnung I-5-14 ausgewählt. Zur Bestätigung einer erfolgreichen Transfektion wurde die RNA aus den transfektanten Zellen isoliert, cDNA generiert und anschließend eine Sequenzierung durchgeführt, die die Sequenz für HLA-B\*1801<sup>W486C→G</sup> bestätigte (Kap. 2.20.6, S. 52). Abb. 26 zeigt die Färbung der parentalen

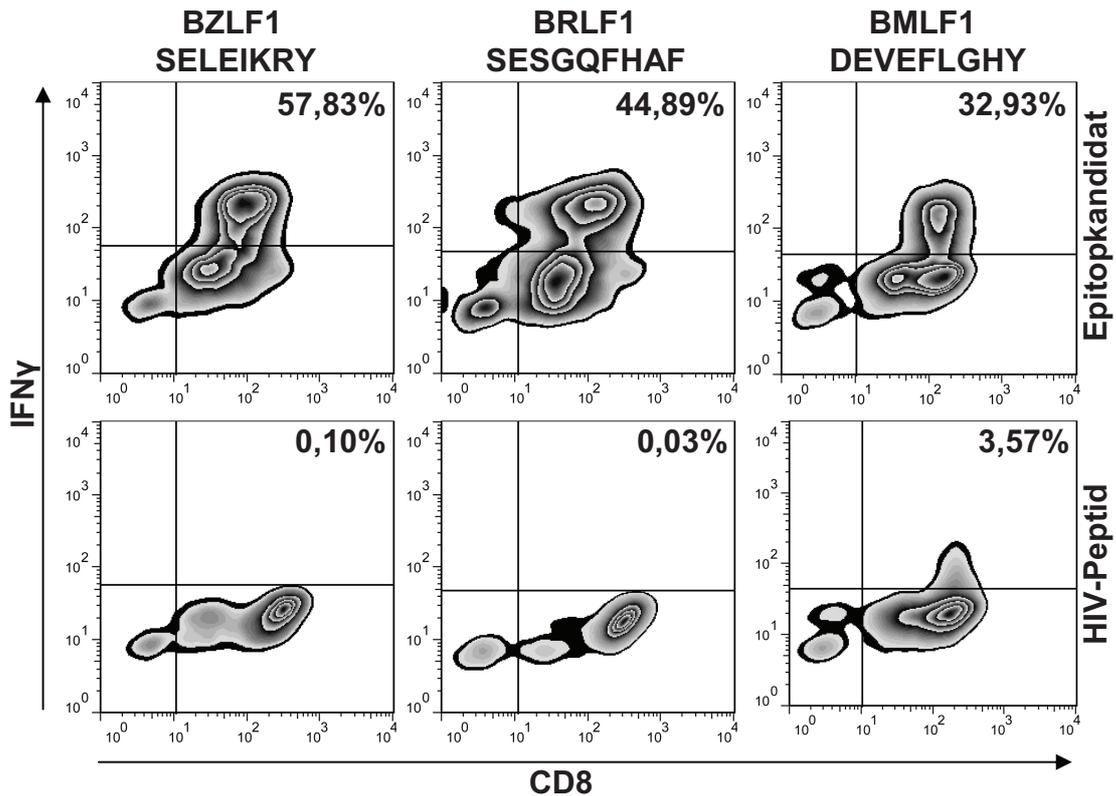
K562 und der K562-B18 Transfektanten mit einem Anti-human HLA-B,-C Antikörper (B1.23.2) und der Isotyp-Kontrolle. Die Transfektanten zeigen eine klare Expression von HLA-Molekülen auf der Zelloberfläche.



**Abb. 26: Die K562-B18 Transfektanten.** Parentale K562 (links), und K562-B18 Transfektanten (rechts). Gezeigt ist die Färbung mit dem Anti-human HLA-B,-C Antikörper B1.23.2 und der Isotyp-Kontrolle für beide Zelllinien mit anschließender Färbung mit einem goat anti mouse FITC Antikörper.

### 3.7.3 Der Vital-Assay

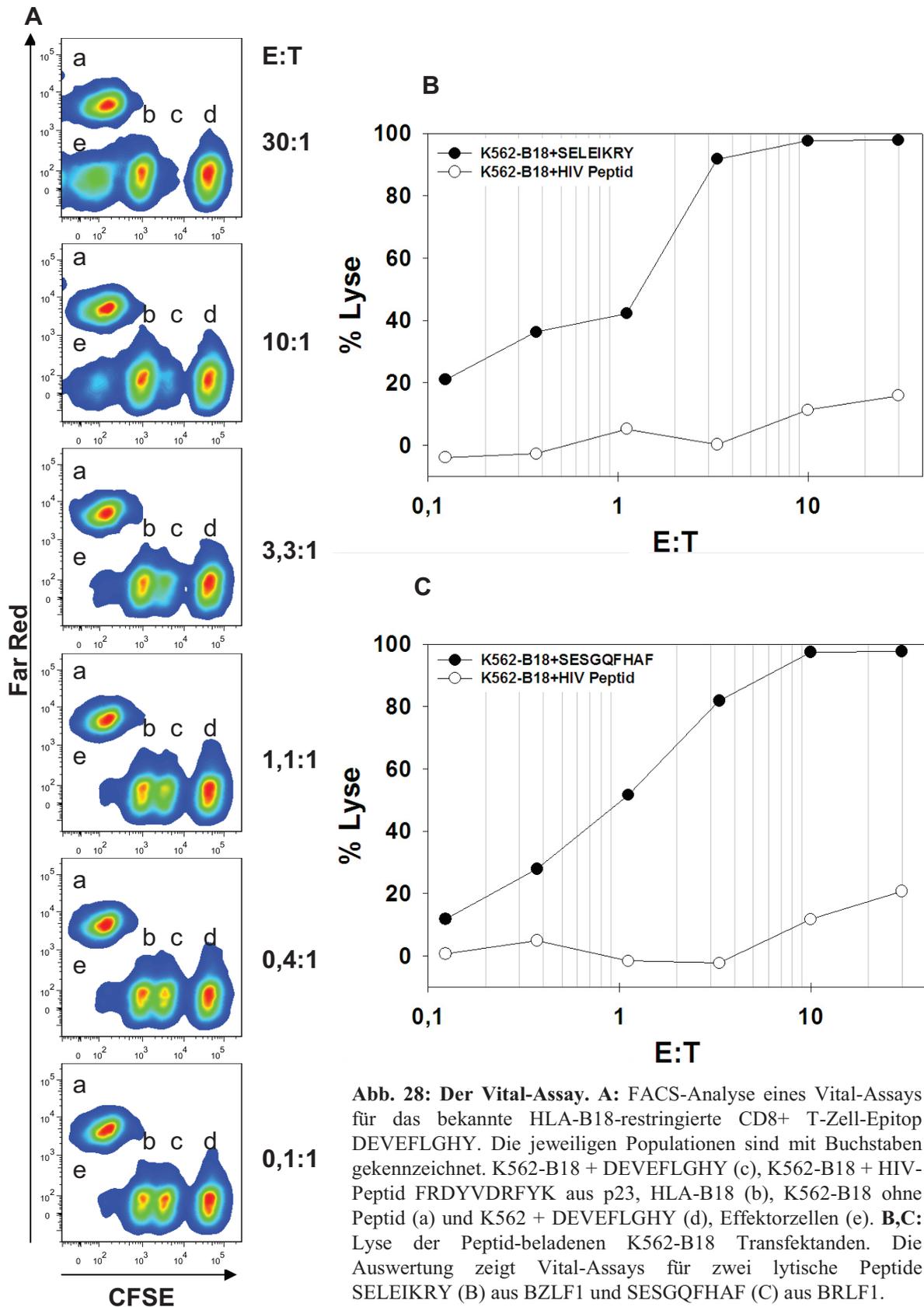
Zur Bestätigung der zytotoxischen Kapazität der Peptid-spezifischen T-Zellen der HLA-B18-restringierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort, wurden Vital-Assays mit polyklonalen T-Zellen und den Peptid-beladenen K562-B18 Transfektanten als Zielzellen durchgeführt. Zur Gewinnung einer ausreichenden Menge von Epitop-spezifischen T-Zellen wurden hierzu die PBMCs von Peptid-positiv getesteten Individuen durch Stimulation mit dem entsprechenden Peptid und Zugabe von IL-2 expandiert. Bei dem HLA-B18-restringierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Epitop DEVEFLGHY wurden die Zellen zweimal mit dem Peptid stimuliert, die Expansion dauerte folglich ca. einen Monat, bevor die Zellen zur Sortierung vorbereitet wurden. Anschließend wurden die Peptid-spezifischen Zellen mit dem IFN $\gamma$ -Catch-Verfahren gefärbt und bei der FACS Core Facility des Universitätsklinikums Tübingen sortiert. In Abb. 27 wird ein Beispiel für positive polyklonale Kulturen (Bulk-Kultur) für drei verschiedene lytische Peptide präsentiert. Neben Bulk-Kulturen wurden auch einzelne IFN $\gamma$ <sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zellen in 96-Well-Rundbodenplatten (1 bis 10 Zellen pro Well) sortiert. Die wachsenden Kulturen wurden ebenfalls auf IFN $\gamma$ -Produktion nach Stimulation mit dem entsprechenden Peptid mit Hilfe der intrazellulären Zytokinfärbung getestet. Positive Klone wurden gepoolt und in Vital-Assays als Effektorzellen eingesetzt.



**Abb. 27: Intrazelluläre Zytokinfärbung für IFN $\gamma$  von polyklonalen CD8<sup>+</sup> T-Zellen.** Die Zellen wurden mit dem spezifischen (wie in Abb. angegeben) und einem unspezifischen Kontrollpeptid (HIV-Peptid FRDYVDRFYK aus p23, HLA-B18) stimuliert. Der Prozentanteil der reagierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist im oberen rechten Quadranten angegeben.

Abb. 28A zeigt die FACS-Analyse eines Vital-Assays, der mit T-Zellen durchgeführt wurde, die für das veröffentlichte HLA-B18-restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Epitop DEVEFLGHY spezifisch sind. Zur besseren Visualisierung der Zielpopulationen wurde die so genannte „Smooth“-Funktion von FlowJo 7.6.1 verwendet. Mit zunehmendem Effektor zu Zielzelle Verhältnis ist eine deutliche Abnahme der K562-B18 Population, die mit dem Peptid DEVEFLGHY beladen wurde (im Bild als Population c gekennzeichnet), zu verzeichnen. Die Zellen wurden somit von Peptid-spezifischen T-Zellen lysiert und werden automatisch durch das Propidiumiodid-negative Analysefenster ausgeschlossen. Die Kontrollpopulationen weisen keine drastische Größenabnahme auf. Abb. 28B und Abb. 28C zeigt die Auswertung von zwei Vital-Assays für zwei unterschiedliche HLA-B18 Epitopkandidaten. Eine starke Lyse der Peptid-beladenen Zielzellen durch Epitop-spezifische T-Zellen für das HLA-B18-restringierte Epitop SELEIKRY und den Epitopkandidaten SESGQFHAF ist nachweisbar. Die Ergebnisse in Abb. 28C sprechen dafür, dass SESGQFHAF ein weiteres HLA-B18-restringiertes Epitop aus EBV ist. Die ursprüngliche Form des Vital-Assays wurde bei diesen zwei Messungen verändert. Anders als bei dem präliminären Experiment mit dem veröffentlichten HLA-B18-restringiertem CD8<sup>+</sup> T-Zell-Epitop DEVEFLGHY (Abb. 27A) war die Aufnahmezeit bei der Messung für alle Proben

identisch. Das Probenvolumen war bei allen Proben gleich und die Messgeschwindigkeit war während der Messung konstant und wurde bei allen Proben beibehalten.



Des Weiteren wurden aus jeder Verdünnungsreihe und der Kontrollreihe, die nur Zielzellen enthielt, die Mittelwerte (MW) errechnet. Der prozentuale Anteil der lebenden Zellen und folglich auch der Lyse der jeweiligen Population wurde anhand der entsprechenden Population der Kontrollreihe errechnet. Die Formel zur Berechnung der Lyse, die hier verwendet wird, ist in Kap. 2.21, S. 53, erläutert. Während bei der Negativkontrolle (K562-B18, die mit HIV-Peptid (HLA-B18) beladen wurden) maximal 20,78% der Zellen lysiert wurden, war eine stärkere Lyse der unbeladenen K562-B18-Zellen zu verzeichnen (nicht in Abb. 28B und Abb. 28C dargestellt). Dieser Effekt ist zu erwarten, da man davon ausgehen kann, dass Peptide aus endogenen Proteinen auf der Oberfläche präsentiert werden und von T-Zellen erkannt werden können (Alloantigene). Um die Qualität dieser neuen Vorgehensweise zu prüfen, wurden außer den Mittelwerten auch die Standardabweichungen für beide Experimente berechnet, die in den Tab. 14 und Tab. 15 dargestellt sind. Die Werte verdeutlichen ebenfalls die spezifische Lyse. Außerdem ist zu sehen, dass während die Zellzahl für Epitop-beladene K562-B18 in beiden Experimenten mit zunehmenden E:T-Verhältnis abnimmt, bleiben die Werte für die Negativpopulationen annähernd konstant mit Abnahme der Zellzahlen bei höherem E:T-Verhältnis.

**Tab. 14: Standardabweichungen für Vital-Assay (SELEIKRY)**

Probe	SELEIKRY	HIV B18	%SD Lyse	
			SELEIKRY	HIV B18
30-1	85	2867		
30-2	40	2476		
30-3	74	3293	0,77	11,93
10-1	75	3290		
10-2	81	3082		
10-3	60	2741	0,35	8,09
3,3-1	305	3409		
3,3-2	247	3618		
3,3-3	203	3220	1,67	5,81
1,1-1	1863	3252		
1,1-2	1812	3316		
1,1-3	1633	3167	3,94	2,18
0,4-1	1771	3241		
0,4-2	2146	3820		
0,4-3	1935	3491	6,14	8,48
0,1-1	2169	3330		
0,1-2	2794	3808		
0,1-3	2289	3539	10,83	7,00
targets1	2980	3323		
targets2	3099	3665		
targets3	3110	3284	2,35	6,12
MW targets	3063	3424		

Dargestellt sind Zellzahlen und Standardabweichungen für K562-B18 + SELEIKRY, sowie K562-B18 + HIV-Peptid (HLA-B18). Der Mittelwert für beide Negativkontrollen ist grau hervorgehoben.

**Tab. 15: Standardabweichungen für Vital-Assay (SESGQFHAF)**

Probe	SESGQFHAF	HIV B18	%SD Lyse	
			SESGQFHAF	HIV B18
30-1	86	2692		
30-2	75	2940		
30-3	62	2819	0,37	3,49
10-1	72	3256		
10-2	102	3179		
10-3	75	2979	0,51	4,02
3,3-1	571	3340		
3,3-2	654	4108		
3,3-3	541	3461	1,80	11,61
1,1-1	1546	3473		
1,1-2	1530	3618		
1,1-3	1647	3749	1,95	3,88
0,4-1	2236	3345		
0,4-2	2274	3454		
0,4-3	2532	3344	4,95	1,78
0,1-1	2548	3216		
0,1-2	2869	3726		
0,1-3	3194	3650	9,92	7,74
targets1	2803	3216		
targets2	3511	4007		
targets3	3455	3445	12,09	11,45
MW targets	3256	3556		

Dargestellt sind Zellzahlen und Standardabweichungen für K562-B18 + SESGQFHAF, sowie K562-B18 + HIV-Peptid (HLA-B18). Der Mittelwert für beide Negativkontrollen ist grau hervorgehoben.

Dies spricht für keine größere Pipettierfehler bei der Vorbereitung und bei der Messung der Experimente. Daten für das E:T-Verhältnis von 0,03:1 und 0,01:1 wurden ebenfalls analysiert (in Abb. 28, Tab. 14 und Tab. 15 nicht dargestellt). Alle Werte für die Lyse (ohne SD) der Negativkontrollen (HIV-Peptid, HLA-B18) lagen unterhalb der maximalen Werte für die entsprechenden Negativkontrollen für das E:T-Verhältnis von 30:1.

## **4. Diskussion**

### **4.1 Erweiterte Möglichkeiten bei der Untersuchung der HLA-B18-restringierten CD8+ T-Zell-Antwort**

Die Charakterisierung von T-Zell-Epitopen, die auf wenig erforschten HLA-Allelen präsentiert werden, erweitert das Gesamtbild der Wechselwirkung zwischen dem Virus und dem Wirt und unterstützt individuelle Behandlungsmethoden, wie den adoptiven T-Zell-Transfer. Methoden, wie der in dieser Arbeit etablierte Pool-single peptide-ELISPOT erleichtert die Suche nach T-Zell-Epitopen. In den IFN $\gamma$ -ELISPOTs wurden IFN $\gamma$ -Antworten gegen 19 Peptide beobachtet. Mit dem HLA-B18-SELEIKRY-Tetramer ist es zum ersten Mal gelungen CD8+ T-Zellen für ein HLA-B18-restringiertes Epitop direkt zu detektieren. Zusammen mit den K562-B18 Transfektanten vereinfacht es den Zugang bei Untersuchungen der HLA-B18-restringierten CD8+ T-Zell-Antwort. Die K562-B18 kann nicht nur als eine unausschöpfliche Zielzelllinie im Vital-Assay eingesetzt werden, sondern kann auch beispielsweise bei der Charakterisierung von weiteren zelleigenen und zellfremden HLA-B18-Liganden Anwendung finden.

### **4.2 Immunologische Aspekte der HLA-B18-restringierten CD8+ T-Zell-Antwort und Aspekte der angewandten Methoden**

#### **4.2.1 Variabilität der Dominanz von HLA-B18-restringierten CD8+ T-Zell-Epitopkandidaten**

Multiple HLA-B18 Epitopkandidaten wurden in dieser Arbeit sowohl von lytischem als auch von latentem Antigenursprung detektiert. Unterteilt man diese T-Zell-Antworten in die Kategorie dominant und subdominant, indem man alle Peptide, die bei gleich oder mehr als 50% der getesteten Individuen positive Ergebnisse geliefert haben, als dominant einstuft, sieht man, dass die Mehrheit der Peptide Subdominanz aufweist (Abb. 8B). Wie bereits früher erwähnt, ist die Mehrheit der dominanten T-Zell-Antworten gegen Peptide aus lytischen Antigenen gerichtet. Wobei hier anzumerken ist, dass ca. 2/3 der getesteten Peptide aus lytischen Proteinen stammen, was diesen Effekt erklären könnte. Ein interessanter Aspekt, ist die Beobachtung, dass die Mehrheit der veröffentlichten CD8+ T-Zell-Epitope aus EBV einen latenten Antigenursprung besitzt. Vergleicht man die in dieser Arbeit erhaltenen Epitopkandidaten (darunter auch die veröffentlichten HLA-B18-restringierten Epitope) der hier untersuchten EBV-Antigene mit den veröffentlichten CD8+ T-Zell-Epitopen, gilt dies kumulativ für multiple HLA-Klasse-I-Restriktionen (A und B), aber auch in der HLA-A- und HLA-B-Gruppe getrennt (Tab. 16). Für die Bearbeitung der Tab. 16 wurden eigene Daten und Daten aus [177] verwendet. BHRF1 wurde ausgeschlossen, da in [177] keine CD8+ T-Zell-Epitope für dieses Protein angegeben werden.

**Tab. 16: Reverse Verteilung von HLA-B18 Epitopkandidaten bei lytischen und latenten Antigenen**

Protein		ohne B18			
		HLA-B18	HLA-A	HLA-B	HLA-A u. B
BZLF1	lytisch	2	0	5	5
BRLF1		2	7	2	9
BMLF1		3	1	1	2
BMRF1		2	2	3	5
BALF2		2	0	1	1
BALF4		3	2	2	4
EBNA2	latent	1	1	2	3
EBNA4		1	3	5	8
EBNA6		1	1	10	11
LMP2		1	14	6	20
$\Sigma$	lytisch	14	12	14	26
$\Sigma$	latent	4	19	23	42

Rot = höhere Anzahl von Epitopen bzw. Epitopkandidaten. Spalte für HLA-B18: Analyse beinhaltet veröffentlichte HLA-B18-restringierte CD8+ T-Zell-Epitope.

Weitere Untersuchungen müssen jedoch durchgeführt werden, um die Restriktion von den übrigen HLA-B18 Epitopkandidaten, die nur zum Teil in allen Punkten untersucht wurden, zu bestätigen, um diese Beobachtungen richtig interpretieren zu können. Außerdem werden hier IFN $\gamma$ -Antworten betrachtet, die in PBMCs detektiert wurden. Ein vollständiges Bild der Immunantwort gegen EBV-Antigene ist somit nicht gegeben. Die Erkennungsfrequenz von Epitopkandidaten liefert einen indirekten Hinweis für eine größere oder geringere Wahrscheinlichkeit, dass das untersuchte HLA-Molekül die Peptide präsentiert. Zu dominanten Peptiden zählen, außer dem Epitop SELEIKRY, die Peptide NPDLYVTTY, NEIHVYNDY und (A)EEYSDLAL. Alle oben aufgeführten Peptide gehören zu Proteinen des lytischen Zyklus. Subdominanz schließt jedoch nicht aus, dass ein gegebener Epitopkandidat HLA-B18-restringiert ist. Das veröffentlichte HLA-B18-restringierte CD8+ T-Zell-Epitop DEVEFLGHY zeigt in einer Veröffentlichung eine subdominante Erkennung unter gesunden EBV-Trägern [91]. Woodberry et al. untersuchte wenige Individuen. Eine subdominante Erkennung von diesem Epitop wurde in dieser Arbeit ebenfalls beobachtet. Vermutlich wird jedoch das Epitop DEVEFLGHY in Mononukleosepatienten dominant erkannt. Der frequent erkannte HLA-B18-assoziierte Epitopkandidat ESEERPPTY aus dem Protein LMP2, der bei 41% der HLA-B18-positiven Individuen positive Ergebnisse liefert, ruft selten positive Reaktionen in HLA-B18-negativen Individuen hervor. Deshalb ist bei diesem Peptid eine andere HLA-Restriktion nicht endgültig auszuschließen. Ein weiteres veröffentlichtes, latentes Peptid PRSPTVFYNIPMPL aus EBNA2 zeigte in *ex vivo*

ELISPOT-Experimenten eine dominante Erkennungsfrequenz unter HLA-B18-positiven Individuen. Dieses Peptid wird in einer Veröffentlichung als ein HLA-B18-restringiertes Epitop [110], in einer weiteren Veröffentlichung als ein Klasse-II-Epitop angegeben [178]. In einer weiteren Publikation vom 2005 wird von einer promiskuitiven Präsentation des Peptids PRSPTVFYNIIPPMPLPSQL auf mehreren Klasse-II-Molekülen berichtet [179]. Dies könnte bedeuten, dass dieses Epitop eventuell auch auf HLA-Klasse-I-Molekülen präsentiert wird. Eine weitere Möglichkeit diese Beobachtungen zu erklären wäre, dass dieses Peptid für mehrere unterschiedliche Restriktionen Epitope beinhaltet. Eine solche Beobachtung wurde zum Beispiel in einer Publikation von 2010 beschrieben [180]. Dieses könnte sowohl bei dem Peptid ESEERPPTY als auch bei dem Peptid PRSPTVFYNIIPPMPL zutreffen. Aufgrund der Erkennungsfrequenz sind diese Epitopkandidaten viel versprechend, da die Epitop-spezifischen Zellen transformierte Zellen des Latenztyps III erkennen könnten. T-Zellen, die spezifisch auf das Peptid ESEERPPTY reagieren, könnten auch transformierte Zellen des Latenztyps II erkennen. Die zytotoxische Effizienz dieser Zellen im Zusammenhang mit HLA-B18 muss jedoch noch bestätigt werden. Weitere Epitopkandidaten aus EBNA-Antigenen zeigen eine subdominante Erkennung unter HLA-B18-positiven Trägern, können aber sobald ihre Restriktion bestätigt wird, als potentielle Kandidaten bestehen. Ein interessantes Beispiel für HLA-B18 Epitopkandidaten ist das Peptid SESGQFHAF. Die Erkennung unter HLA-B18-positiven Individuen ist subdominant, jedoch sind gelegentlich nach vorhergehender Stimulation auch sehr starke IFN $\gamma$ -Antworten (SFE) zu detektieren. Die eindeutige Lyse von Zielzellen im Vital-Assay, die vergleichbar mit der Lyse im Assay für das dominante HLA-B18-restringierte Epitop SELEIKRY ist, zeigt, dass weitere HLA-B18-restringierte T-Zell-Epitope existieren. Es stellt sich die Frage, ob die HLA-B18-restringierte T-Zell-Antwort dem angenommenen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort-Muster gleicht? Weitere Experimente müssen folgen, um die HLA-B18-restringierte T-Zell-Antwort mit der so genannten „Immundominanz“ von bestimmten EBV-Antigenen vergleichen zu können. Die Tatsache, dass bestimmte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen schwer zu detektieren sind, schließt ihre Existenz nicht aus. Vielmehr stellt sich die Frage welche Aufgabe dieser Teil der adaptiven Immunität innehat?

#### **4.2.2 Verfahren zum Ausschluss von anderen HLA-Restriktionen bei HLA-B18 Epitopkandidaten**

Eine einfache Methode andere HLA-Restriktionen als HLA-B18 auszuschließen, ist die Betrachtung der HLA-Allele von positiv-reagierenden Individuen. Falls eine weitere Restriktion bei 100% der getesteten Proben auftritt, ist das ein möglicher Hinweis auf die Präsentation des entsprechenden Peptids auf dem gegebenen Allel. Für diese Analyse wurden auch positiv reagierende Individuen aus den *ex vivo* ELISPOTs der Diplomarbeit eingeschlossen und sind in

der Tab. 17 in den drei letzten Spalten berücksichtigt worden. Ein Ausschluss von anderen HLA-A, -B, oder -C Restriktionen anhand der vorhandenen Daten bei HLA-B18-positiven Spendern ist außer bei SELEIKRY nur für die Peptide AFDQATRKY, VVETLSSSY, KEETGNSSY und AVEQASLQFY möglich.

**Tab. 17: Zusammenfassung der Experimente**

Sequenz	Protein	Tetramer	VitA	Dominanz	ICS			Allele		
					ELISPOT	CD8+	kein A	kein B	kein C	
SELEIKRY	BZLF1	●	●	●	●	✓	✓	✓		
AFDQATRKY	BZLF1				●	✓	✓	✓		
SESGQFHAF	BRLF1	✕	●		●	✓	✓			
LVSDYCNVLNKEFT	BRLF1									
DEVEFLGHY	BMLF1	✕	●		●	✓	✓			
VVETLSSSY*	BMLF1				●	✓	✓	✓		
KEETGNSSY*	BMLF1				○	✓	✓	✓		
NPDLYVTTY*	BMRF1	✕		●	○	✓	✓			
AVEQASLQFY	BMRF1				○	✓	✓		✓	
IERNSETF	BHRF1				○	✓	✓			
KESLFNSFY	BALF2				●	✓	✓			
(A)EEYSDLAL(F)	BALF2	✕		●	●	✓	✓			
DEQRASNVF	BALF4					✓	✓			
NEIHVYNDY	BALF4	✕	+	●	●	✓	✓			
TETGKSIHF	BALF4					✓	✓			
PRSPTVFYNIPTMPL	EBNA2			●	●	✓	✓			
DEVMEQRV(M)	EBNA4									
TEENLLDF	EBNA6	✕			●					
ESEERPPTY*	LMP2	✕				✓	✓			

Alle positiv getesteten Peptide, die in dieser Arbeit untersucht worden sind, sind aufgeführt. VitA = Vital-Assay, ICS = *in vitro* Zytokinförderung für mindestens eine Funktion (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2, MIP-1 $\beta$ , CD107a), ✕ = MHC-Peptid-Komplexe, + = pos. VitA mit aPBMCs als Zielzellen und Zellen aus Expansionskultur ( $2 \times 10^7$  in 6-Well-Platte (siehe Kap. 2.15, S.38) als Effektoren. \* = Bei diesen Peptiden wurden auch positive IFN $\gamma$ -Antworten bei HLA-B18-negativen Blutspendern detektiert (VV, KE, NP: *ex vivo* IFN $\gamma$ -ELISPOT in der Diplomarbeit). ● = positive Ergebnisse. ○ = geringe % IFN $\gamma$ + CD8+ T-Zellen. Die letzten drei Spalten zeigen HLA-Exklusion. ✓ = Kennzeichnung vom Ausschluss einer anderen HLA-A, -B oder -C Restriktion. Für (A)EEYSDLAL(F) siehe Kap. 4.2.7, S. 92, für DEVMEQRV(M) siehe Tab. 11, S. 58.

Durch Testung von HLA-B18-negativen Blutspendern im *ex vivo* IFN $\gamma$ -ELISPOT in der Diplomarbeit wurden jedoch auch einzelne HLA-B18-negative Spender gefunden, die auf die Peptide VVETLSSSY, KEETGNSSY, NPDLYVTTY und ESEERPPTY mit einer positiven IFN $\gamma$ -Antwort reagierten. Zwar sind solche Antworten selten anzutreffen, dennoch kann zu

diesem Zeitpunkt bei zwei Peptiden eine andere HLA-Restriktion noch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Ein weiterer interessanter Punkt ist die Feststellung, dass alle diese HLA-B18-negativen Spender HLA-A1-positiv sind. Zu einem späteren Zeitpunkt war eine Typisierung von HLA-C-Allelen bei den PBMC-Proben nicht mehr gegeben, wodurch bei den meisten der restlichen Peptide dieses Kriterium nicht betrachtet werden kann.

#### **4.2.3 Zwei dominante HLA-B18-restringierte CD8+ T-Zell-Epitopkandidaten sind in funktionellen Proteindomänen positioniert**

Bereiche in Proteinen, die für den Virus wichtige Funktionen tragen, können nicht so stark Mutationen ausgesetzt werden, welche die Aminosäuren an diesen Positionen nachteilig verändern, so dass die Funktion verloren geht. Bei Untersuchungen der Immunantwort gegen das HIV-Virus, hat man festgestellt, dass T-Zell-Epitope sich in konservierten Proteinbereichen häufen [181]. Interessant ist, dass das dominante Epitop SELEIKRY aus BZLF1 am Rande einer Epitop-reichen Region des Proteins liegt. Dies gilt nicht für den dominanten Epitopkandidat NEIHVYNDY aus BALF4. In zwei Zeitschriftenartikeln werden für die Proteine BZLF1 und BALF4 Proteindomänen beschrieben, die für die Funktionen der Proteine essenziell sind [182,183]. Im Fall vom Epitop SELEIKRY, mit der Position (AS 173-180), überlappt dieses mit drei AS mit der DNA-Bindungsdomäne des Proteins, die im Bereich (AS 178-195) liegt. Das Peptid NEIHVYNDY mit der Position (AS 600-608) liegt im Bereich einer Oligomerisationsdomäne, die sich im Bereich (AS 561-620) erstreckt. Die beiden Beispiele für HLA-B18-restringierte CD8+ T-Zell-Antworten verdeutlichen die Koevolution von EBV und dem Immunsystem. Dominante T-Zell-Antworten richten sich vorzugsweise gegen Epitope aus konservierten Proteinregionen mit relevanten Aufgaben. Der effektive Einsatz von T-Zellen, die gegen Epitope aus Proteinregionen gerichtet sind, welche für das Virus eine wichtige Rolle spielen, könnte in der Immuntherapie von entscheidender Bedeutung sein.

#### **4.2.4 Das dominante HLA-B18-restringierte CD8+ T-Zell-Epitop SELEIKRY**

Der Schwerpunkt bei der Erforschung der CD8+ T-Zell-Antworten gegen HLA-B18 Epitopkandidaten lag in erster Linie auf der Charakterisierung der Dominanz und der Zytotoxizität von Antigen-spezifischen T-Zellen. Mit Hilfe der Kombination von mehreren Methoden konnte in dieser Arbeit das Vorhandensein einer HLA-B18-restringierten CD8+ T-Zell-Antwort im Fall des lytischen Epitops SELEIKRY aus BZLF1 in breiterem Umfang bestätigt werden. Bei dem dominanten Epitop SELEIKRY mit einer Erkennung von nahezu 100% unter HLA-B18-positiven Trägern sind detailreiche Untersuchungen durchgeführt worden. Dieses Peptid ist in einer längeren Aminosäuresequenz DSELEIKRYKNR [163] veröffentlicht worden und konnte in dieser Arbeit auf die Epitoplänge von acht Aminosäuren bestimmt werden. Der

Schlüssel zur direkten Untersuchung von Epitop-spezifischen Zellen ist die Tetramerfärbung. Deshalb war eines der Ziele die Herstellung eines Tetramers für ein dominantes HLA-B18-restringiertes CD8<sup>+</sup> T-Zell-Epitop. Dieses Ziel ist am Beispiel des Epitops SELEIKRY in dieser Arbeit verwirklicht worden. Bis zum heutigen Zeitpunkt existiert keine Veröffentlichung, in der eine Tetramerfärbung mit einem HLA-B18-Tetramer gezeigt wird. Die Herabregulation des TCR kann im zeitlichen Verlauf beobachtet werden [184]. CD8<sup>+</sup> T-Zellen verlieren kurz nach der Aktivierung durch ein Antigen die Kapazität effektiv MHC-Peptid-Tetramer-Komplexe zu binden [185]. Bereits nach einer 30-minütigen Stimulation von PBMCs mit dem Peptid SELEIKRY konnte in dieser Arbeit ebenfalls die Herabregulation des T-Zell-Rezeptors gezeigt werden. Somit ist eine direkte Detektion von HLA-B18-restringierten Epitop-spezifischen T-Zellen möglich. In Zukunft kann dieses Tetramer zur Detektion, Charakterisierung und Isolierung von Epitop-spezifischen T-Zellen in HLA-B18-positiven Individuen eingesetzt werden. Da dieses Tetramer zytotoxische T-Zellen gegen ein Epitop aus einem Protein, dass sehr früh in der lytische Phase exprimiert wird, detektiert, kann es bei der Früherkennung von EBV-Infektionen bei HLA-B18-positiven PTLD-Patienten eingesetzt werden, sofern dieses Epitop im Patienten erkannt wird. In der Literatur existieren Hinweise darauf, dass das Protein BZLF1 eine Rolle bei der Entstehung von EBV-assoziierten Erkrankungen spielen könnte [148]. Das CD8<sup>+</sup> T-Zell-Epitop SELEIKRY und auch das HLA-B18-SELEIKRY-Tetramer könnte somit zur Isolierung von Epitop-spezifischen T-Zellen bei Therapien mit CTLs Anwendung finden. Auch weitere Forschungsarbeit am HLA-B18-SELEIKRY-Tetrameren kann das Wissen über die HLA-B18-restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort bereichern. Die Kristallstruktur von MHC-Peptid-Komplexen, wie zum Beispiel HLA-B8-FLRGRAYGL, geben unter anderem Auskunft über die Rolle von Ankeraminosäuren [186]. Trotz der kontroversen Diskussion im Bereich EBV-assoziiierter Krankheiten wurde von T-Zell-Epitopen aus anderen Viren berichtet, die von HLA-B18 restringiert werden. Deshalb kann die Herstellung eines funktionierenden HLA-B18-Tetramers als erster Schritt anderen Forschungsgebieten von Nutzen sein. Mit Hilfe des Vital-Assays konnte die Zytotoxizität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die das dominante lytische EBV-Epitop SELEIKRY erkennen, nachgewiesen werden.

#### **4.2.5 Effektive Auslese von HLA-B18 Epitopkandidaten mit dem Pool-single peptide-ELISPOT**

Die Hauptmethode zur schnellen Bestimmung von Epitopkandidaten wurde zum größten Teil mit dem IFN $\gamma$ -ELISPOT ausgetragen. Bei einer großen Anzahl der zu testenden Peptide wurden in Publikationen Peptid-Pools eingesetzt, bei denen man das positiv reagierende Peptid durch eine erneute Stimulation der positiven Probe mit einzelnen Peptiden herausfilterte [187]. Eine andere Variante verwendete Peptid-Pools [188,189], in denen ein Peptid in zwei Pools vorhanden war.

Mit zwei positiv getesteten Pools konnte man das entsprechende Peptid identifizieren. In dieser Arbeit wurde die Vorgehensweise des Pool-single peptide-ELISPOTs etabliert, um das positive Peptid mit einer Stimulation und einer Untersuchung direkt sichtbar zu machen, ohne eine wiederholte Stimulation und ohne das indirekte Pool-System zu verwenden. Bei dem ELISPOT wurde eine zusätzliche ELISPOT-Platte mitgetestet, auf der alle Peptide aus den Pools einzeln pro Well pipettiert wurden. Die Zellen aus der entsprechenden Pool-Stimulation wurden auf die Platte mit Pools samt den dazugehörigen Kontrollen sowie auf die Platte mit einzelnen Peptiden pipettiert. Der Vorteil gegenüber den oben aufgeführten Methoden ist die sofortige Detektion von positiven Antworten. Die Methode liefert somit bei umfangreichen Tests rasch Ergebnisse und unterliegt nicht wie andere Verfahren Schwankungen der Reproduzierbarkeit von Ergebnissen. Darüber hinaus können auf diese Weise PBMC-Proben effizienter genutzt werden, da keine erneute Auftau- und Stimulationsabläufe benötigt werden. In der Literatur habe ich eine solche Vorgehensweise nicht gefunden. Ein nachteiliger Punkt bei dieser Methode ist, dass Peptide als einzelne Test-Wells und nicht als Triplikate untersucht werden, und somit sehr schwache positive Antworten nicht eindeutig von den negativen differenziert werden können. Durch Testung von mehreren Individuen, welche zur Detektion von subdominanten Antworten erforderlich ist, kann dieser Effekt minimiert werden. Schließlich werden die so erhaltenen Kandidaten in neuen Stimulationen eingesetzt, durch Testung mit einzelnen Peptiden bestätigt und ihre Erkennungsfrequenz bestimmt. Schon die Testung von einigen wenigen Individuen brachte multiple IFN $\gamma$ -Antworten hervor. Die meisten dieser Antworten waren sehr schwach. Für die Suche nach schwachen IFN $\gamma$ -Antworten (SFE) eignet sich der IFN $\gamma$ -ELISPOT als eine sehr sensitive Methode. Die Proben werden nur mit dem zu untersuchenden Peptid inkubiert, anders als bei einer intrazellulären Zytokinfärbung, bei der Substanzen wie Golgi-Stop<sup>TM</sup> und Brefeldin A eingesetzt werden müssen, um die Produktion des zu untersuchenden Zytokins auf der Ebene der einzelnen Zelle nachweisen zu können. Der ELISPOT ist in diesen Punkten gegenüber der zweiten Methode überlegen.

#### **4.2.6 Möglichkeiten und Grenzen der Färbung mit HLA-B18-Tetrameren**

Das einzige positiv-getestete Tetramer enthält das dominante Epitop SELEIKRY. Auffällig neben der hohen Erkennungsfrequenz des CD8<sup>+</sup> T-Zell-Epitops unter HLA-B18-positiven Individuen, ist auch bei vielen der untersuchten PBMC-Proben eine hohe Frequenz von IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen im *ex vivo* IFN $\gamma$ -ELISPOT. Die *ex vivo* Tetramerfärbungen, die mit weiteren HLA-B18-Tetrameren durchgeführt wurden, konnten keine eindeutigen Populationen nachweisen (Abb. 17). Zwar sind positive IFN $\gamma$ -Antworten in ELISPOT-Analysen für einige der getesteten Proben, zum Beispiel Probe 1069 (*ex vivo* SESGQFHAF), detektiert worden, die Tetramerfärbung für die gleiche Probe zeigt jedoch keine Formung einer Tetramer-positiver Population. Dies kann zum

Teil bei *ex vivo* Färbungen darauf zurückzuführen sein, dass die Frequenz der spezifischen Zellen viel zu niedrig ist. Ein weiterer Grund für die negativen Ergebnisse kann die subdominante Erkennung von Epitopen sein. Hier müssen noch mehr Spender getestet werden. Eine weitere Ursache könnte eine zu schwache Affinität des T-Zell-Rezeptors zum MHC-Peptid-Komplex sein. Um diese Möglichkeit auszuschließen müssen in Zukunft Titrations mit den HLA-B18-Tetrameren durchgeführt werden. Eine Tetramer-Titration mit dem HLA-B18-SESGQFHAF-Tetramer wurde bereits anhand einer stark positiven PBMC-Probe, die nach langer Stimulation mit Peptid und Expansion mit IL-2 erhalten wurde, durchgeführt. Bei dieser Tetramerfärbung konnte man mit höherer Konzentration eine größere Tetramer-positive Population beobachten. Jedoch muss man beachten, dass mit einer höheren Tetramerkonzentration auch eine höhere unspezifische Färbung verbunden ist (Abb. 13). Die HLA-B18-SESGQFHAF-Tetramer-positive Population zeigte keine Abtrennung von der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Population. Lissana et al. 2009, konnte zeigen, dass die Inkubation von PBMCs mit dem Proteinkinase-Inhibitor Dasatinib vor der Tetramerfärbung die Visualisierung von T-Zellen mit sehr niedrigen Affinitäten „TCR/pMHC“ verstärkt [190]. Diese Methode sollte bei den HLA-B18-Tetrameren getestet werden. Eine Möglichkeit die Tetramere auf ihre Spezifität zu testen, wäre die Tetramer-positiven Zellen, auch wenn sie keine eindeutige Population aufweisen oder diese sehr klein ist (Abb. 18) zu sortieren und zu expandieren. Die wachsenden Kulturen könnten auf IFN $\gamma$ -Produktion nach Stimulation mit dem entsprechenden Peptid getestet werden. Als Positivkontrolle kann man das HLA-B18-SELEIKRY-Tetramer verwenden. Des Weiteren ist die Tetramertechnik nicht in allen Fällen ein Ersatz für eine *in vivo* Faltung des MHC-Peptid-Komplexes, eines komplexen Vorgangs, bei dem Chaperone eine wichtige Rolle spielen. Wie man anhand von HLA-B\*4402 zeigen konnte, haben Proteine wie Tapasin eine große Bedeutung [191].

#### **4.2.7 Die Detektion von multiplen T-Zell-Funktionen bei geringen Epitop-spezifischen Zellpopulationen**

So sensitiv der ELISPOT ist, ist bis zum heutigen Zeitpunkt die Untersuchung von mehreren T-Zell-Funktionen mit Hilfe des ELISPOTs sehr schwierig. Zwar entwickelt sich diese Methode in die erwähnte Richtung, dennoch ermöglicht der Fortschritt auf dem Gebiet der Durchflußzytometrie eine weit aus differenziertere Analyse von multiplen Parametern. Deshalb ist die intrazelluläre Färbung bei komplexeren Analysen der T-Zell-Funktionalität unabdingbar. Bei der Untersuchung wurde auch darauf geachtet, zwischen toten und lebenden Zellen zu differenzieren [192]. Der Schwerpunkt bei der Untersuchung der Polyfunktionalität wurde auf die Zytokinproduktion (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2), Chemokinproduktion (MIP-1 $\beta$ ) und Degranulation (CD107a) gelegt. Aufgrund der wichtigen Rolle bei der Kontrolle von viralen Infektionen, wie am Beispiel von HIV-Infektionen deutlich wird [193], wurde MIP-1 $\beta$  in die Untersuchung

eingeschlossen. Bei der SELEIKRY-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort wurde eine sehr starke MIP-1 $\beta$ -Antwort beobachtet. Bereits in den frühen 90er Jahren wurde die Lokalisation von CD107a an der Granula-abgrenzenden Membran von T-Zellen gezeigt [194]. Der Degranulationmarker wurde ebenfalls in der Untersuchung der SELEIKRY-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort detektiert. Die zytotoxische Kapazität wurde bei dem HLA-B18-restringierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Epitop SELEIKRY im Vital-Assay zusätzlich bestätigt. Anhand von HIV-spezifischen T-Zellen, die TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  gleichzeitig produzieren, konnte gezeigt werden, dass diese T-Zell-Subpopulation mit einem stärkerem Potential zur Lyse assoziiert ist [195]. Dies ist für die protektive Immunität von Bedeutung. Da die SELEIKRY-spezifische Zellpopulation polyfunktionale Zellen (MIP-1 $\beta$ , CD107a, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL-2) beinhaltet, wie in *ex vivo* Experimenten gezeigt werden konnte, spricht dies für die Funktionstüchtigkeit der SELEIKRY-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in gesunden EBV-Trägern. Darüber hinaus gleicht das Funktionsmuster dem Muster für das CD8<sup>+</sup> T-Zell-Epitop RAKFKQLL. Derartig tiefere *ex vivo* Untersuchungen für die restlichen Epitopkandidaten, wie bei der SELEIKRY-spezifischen T-Zell-Antwort, stehen noch aus. Auf den in Abb. 22 dargestellten Experimenten konnte eine IFN $\gamma$ <sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zell-Population für weitere HLA-B18 Epitopkandidaten NEIHVYNDY, KESLFNSFY, EEYSDLALF, PRSPTVFYNIPPMPL und TEENLLDF detektiert werden. Für das Peptid EEYSDLALF sei zu vermerken, dass in ELISPOT-Experimenten IFN $\gamma$ -Antworten gegen die Peptide AEEYSDLAL und EEYSDLAL detektiert wurden. Das Peptid EEYSDLAL wurde zur Herstellung eines MHC-Peptid-Komplexes eingesetzt. Ein Komplex wurde isoliert. Somit ist sehr wahrscheinlich die kurze Form des Peptids (EEYSDLAL) ein HLA-B18-restringiertes Epitop. HLA-B18 Epitopkandidaten zeigen in den hier aufgeführten ELISPOT-Experimenten die Tendenz zur schwachen IFN $\gamma$ -Antworten (SFE). Die Detektion solcher Antworten mit der intrazellulären Zytokinfärbung ist *ex vivo* in den meisten Fällen noch schwieriger als mit dem ELISPOT. Bei weiteren Analysen der intrazellulären Zytokinfärbung für den Epitopkandidat SESGQFHAF nach Expansionskultur mit Peptid-Stimulation wurde, neben der Produktion von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  auch IL-2 in der CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zell-Population nachgewiesen. Die Produktion von CD107a konnte nicht untersucht werden. Aufgrund von positivem Ergebnis im Vital-Assay, ist die Zytotoxizität von SESGQFHAF-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen demonstriert worden. Ebenso wurde bei den Peptiden PRSPTVFYNIPPMPL, KESLFNSFY, AFDQATRVY, VVETLSSSY und EEYSDLALF die Produktion von CD107a und TNF $\alpha$  in der CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zell-Population beobachtet. Die Intensität der Reaktionen war eindeutig von den Reaktionen auf Stimulationen mit HIV-Peptiden zu unterscheiden. Dies liefert gute Hinweise darauf, dass solche zum Teil schwer detektierbaren Immunantworten ausfindig gemacht werden können. Die Untersuchung von HLA-B18 Epitopkandidaten sollte TNF $\alpha$  als zusätzliche zu detektierende Funktion neben IFN $\gamma$  bereits in die ELISPOT-Untersuchung aufnehmen.

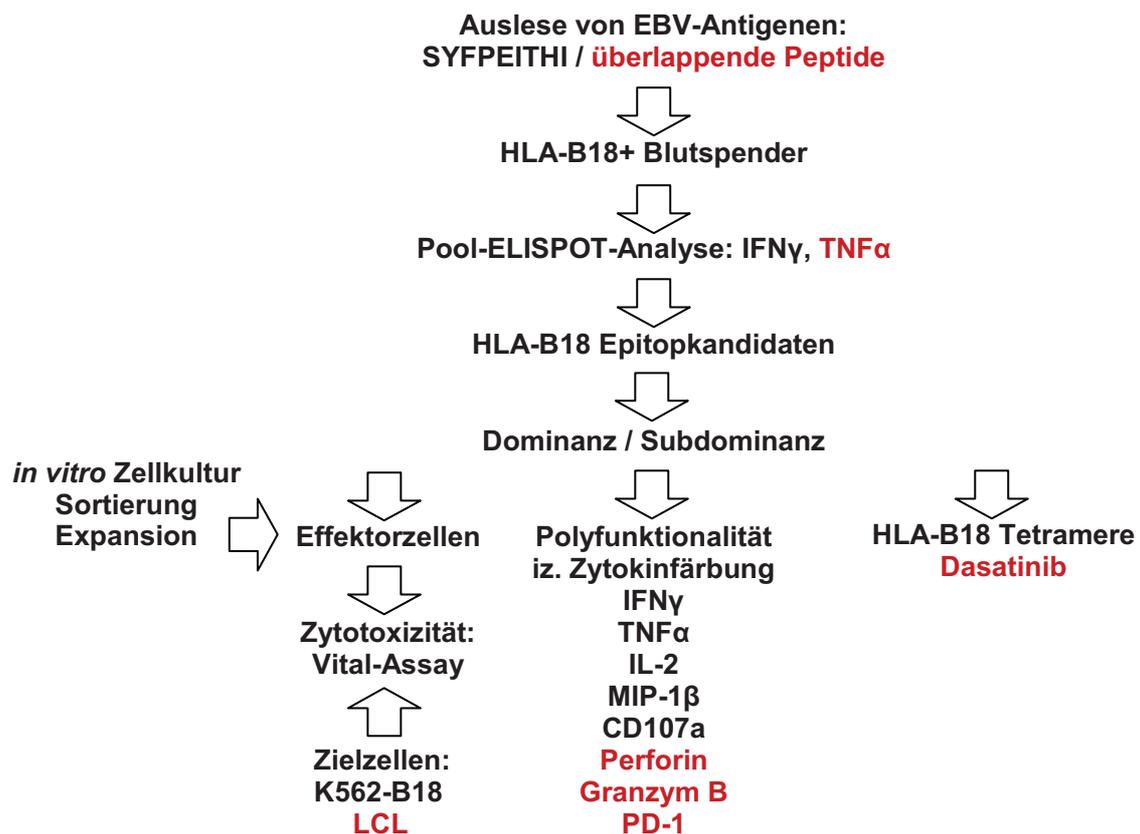
#### **4.2.8 Der Vital-Assay als zuverlässige Alternative zu herkömmlichen Zytotoxizitäts-Assays**

Der Vital-Assay hat sich als eine unkomplizierte Form zur Messung der Zytotoxizität durch direkte Visualisierung von Effektor- und Zielzellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie erwiesen. Durch die hier neu eingeführten Modifikationen, unter anderem gleicher Zeitmessung aller Proben und veränderter Kalkulation bei der Berechnung der spezifischen Lyse, kann die Formel bei jeder Population (Ziel- und Kontrollpopulation) angewendet werden. Außerdem bleibt diese Methode eine gute Alternative zu den herkömmlichen Zytotoxizitäts-Assays mit dem Gebrauch von radioaktiven Isotopen. Als Zielzellen wurden Peptid-beladene K562-B18 Transfektanten eingesetzt, die hierfür generiert wurden. Mit dieser Methode konnte man die Zytotoxizität von SELEIKRY-spezifischen T-Zellen nachweisen. Darüber hinaus konnte auch die Zytotoxizität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegen ein weiteres Peptid (SESGQFHAF aus BRLF1), welches in dieser Arbeit gefunden wurde, gezeigt werden. Trotz der geringen Erkennungsfrequenz von dem Peptid SESGQFHAF unter HLA-B18-positiven Individuen bestätigen diese Daten die Restriktion HLA-B18 für dieses neue Epitop.

#### **4.3 Erweitertes Modell für die Untersuchung der HLA-B18-restringierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort gegen das Epstein-Barr-Virus**

Das Modell einer erweiterten Untersuchung von HLA-B18-restringierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Epitopen kann aufgrund der hier gewonnen Erkenntnisse, wie in Abb. 29 dargestellt, gestaltet werden. Programme, die Epitopvorhersagen erstellen, können im gegebenen Rahmen zur ersten Auslese von Epitopkandidaten dienen. Jedoch können vermutlich nicht alle potentiellen Epitopkandidaten auf diese Weise erfasst werden. Bei HLA-Restriktionen, wie dem HLA-B18, sind auch Peptide unter den Liganden aus dem Proteinrepertoire der Zelle zu finden, die größer als 10 Aminosäuren sind [171]. Dieses könnte für Epitopkandidaten wie das Peptid PRSPTVFYNIIPPMPL aus EBNA2 gelten. Um längere Epitope zu erfassen, wird es deshalb auch nötig sein, längere überlappende Peptidsequenzen zu verwenden. Die Screenarbeit sollte sich ebenfalls auf TNF $\alpha$  stützen. Die so gewonnenen Epitopkandidaten könnten in weiteren dualen IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ -Tests mit Stimulation für einzelne Peptide auf Dominanz unter HLA-B18-positiven Individuen untersucht werden. Die dabei anzutreffenden stärkeren Antworten (SFE) können dann bereits in *ex vivo* Untersuchungen auf Polyfunktionalität mit einem erweiterten Umfang von Funktionen getestet werden. Durch die Peptid-Prästimulation ist es möglich schwache T-Zell-Antworten (SFE) zu expandieren und mit der intrazellulären Zytokinfärbung zu detektieren. Dennoch birgt ein solches Eingreifen auch die Gefahr mit sich das ursprüngliche Antwortmuster der Zelle zu verändern. Die Durchflußzytometrie ermöglicht die Klonierung von Epitop-spezifischen Zellen, die differenziell (zum Beispiel IFN $\gamma$ <sup>+</sup>/TNF $\alpha$ <sup>+</sup>) sortiert und in Vital-Assays analysiert werden können. Gelingt eine

*ex vivo* Detektion nicht, können schwache T-Zell Antworten (SFE), wie im Fall von dem HLA-B18-restringiertem Epitop DEVEFLGHY, mit Hilfe einer Expansionskultur innerhalb von vier Wochen expandiert werden. Die so gewonnenen Zellen können gesortet und in weiterführenden Experimenten, wie dem Vital-Assay, eingesetzt werden. Die Untersuchung von T-Zellen gegen lytische Antigene ist schwieriger als die Untersuchung von T-Zellen für latente Antigene. Die K562-B18 Transfektante kann auch zur Generierung von doppelt-transfektanten Zellen mit EBV-Antigenen verwendet werden. Der Vital-Assay ist eine unkomplizierte Methode, die flexibel gestaltet werden kann. Systeme, die der biologischen Situation näher kommen, sind artifiziellen Systemen vorzuziehen. Für latente Antigene sollten deshalb nach Möglichkeit autologe LCLs generiert werden. Die so generierten Zielzellen können in weiteren Variationen der hier verwendeten Methoden, wie dem oben erwähnten Vital-Assay oder als Antigen-präsentierende Zellen bei dem ELISPOT und der intrazellulären Zytokinfärbung, eingesetzt werden.



**Abb. 29:** Vorschläge für weitere Untersuchungen der HLA-B18-restringierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort. Rot = weitere Vorschläge, iz = intrazelluläre.

In weiterführenden Experimenten sollte die Untersuchung der Polyfunktionalität von Epitop-spezifischen T-Zellen auf einer breiteren Basis mit zusätzlichen Markern wie PD-1, Perforin und Granzym B untersucht werden. Harari et al. 2007, zeigte, dass polyfunktionale T-Zellen für HLA-B-restringierte Epitope weniger PD-1 exprimieren [196]. Dieses wurde parallel zu der

Beobachtung festgestellt, dass T-Zellen für HLA-B-restringierte Epitope eine niedrigere Avidität haben im Vergleich zu T-Zellen gegen Epitope, die von HLA-A-Allelen restringiert sind [196]. Es wurde deshalb vorgeschlagen, dass HLA-B-Allele einen protektiven Effekt haben könnten, da die entsprechenden T-Zellen bei hoher Antigenlast nicht so stark einer Ausschöpfung unterliegen würden [196]. Die Untersuchung zeigte auf der einen Seite einen generellen Trend für T-Zell-Epitope in den jeweiligen Gruppen (HLA-A versus HLA-B), auf der anderen Seite wurde ebenfalls eine Hierarchie unter HLA-B-Allelen selbst im Bezug auf polyfunktionale T-Zell-Antworten festgestellt [196]. Solche Unterschiede können vermutlich in pathologischen Situationen bei gleichzeitigem Vorhandensein von anderen genetischen Eigenschaften zu kumulativ-negativen Effekten führen. Eine Publikation aus dem Jahr 2010 weist auf das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen polyfunktionalen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Populationen hin, mit der Unterscheidung einer (IL-2<sup>+</sup>/IFN $\gamma$ <sup>+</sup>/andere Funktionen)-Population, gegenüber einer Population, die (Perforin<sup>+</sup>/IFN $\gamma$ <sup>+</sup>/andere Funktionen)-produzierende Zellen beinhaltet [197]. Die Untersuchungen von Makedonas et al. 2010, ergaben auch, dass die EBV-spezifischen T-Zell-Antworten in gesunden Individuen hauptsächlich dem ersten Muster entsprechen und es wurde vorgeschlagen, dass sich die Definition „polyfunktional“ nicht nur anhand der Anzahl von T-Zell-Funktionen sondern auch an deren Kombinationen festlegen sollte [197]. Eine derart komplexe Analyse mit einer Erweiterung der untersuchten Funktionen könnte man in Zukunft mit Hilfe des LSRII durchführen. Die spezifische Detektion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die gegen HLA-B18-restringierte Epitope gerichtet sind, wie am Beispiel des Epitops SELEIKRY gezeigt wurde, ist möglich. Dennoch müssen noch weitere Untersuchungen folgen, um außer den Epitop SELEIKRY-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch andere HLA-B18 Epitopkandidaten auf diese Weise untersuchen zu können. Die Wirkung von Dasatinib auf die HLA-B18-Tetramerfäbung sollte getestet werden.

## 5. Zusammenfassung der Arbeitsergebnisse und Schlussfolgerungen

### 5.1 Zusammenfassung der Arbeitsergebnisse

Grundlegende Arbeiten zur Auslese von HLA-B18 T-Zell-Epitopkandidaten wurden mit dem IFN $\gamma$ -ELISPOT durchgeführt. Das vorgestellte Pool-single peptide-System liefert bei der Untersuchung von HLA-B18-restringierten T-Zell-Antworten rasch Ergebnisse zur Auslese von Epitopkandidaten. Neben dem prominentesten HLA-B18-restringierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Epitop SELEIKRY, welches in dieser Arbeit detailreich untersucht werden konnte, wurden auch weitere lytische HLA-B18 Epitopkandidaten wie z.B. SESGQFHAF, NEIHVYNDY und (A)EEYSDLAL, gefunden.

Es konnten multiple IFN $\gamma$ -Antworten gegen HLA-B18 Epitopkandidaten detektiert werden. Die meisten Epitopkandidaten stammen aus lytischen EBV-Antigenen. Es liegt eine stark variierende IFN $\gamma$ -Antwort (SFE) und Dominanz innerhalb der gefundenen Epitopkandidaten unter HLA-B18-positiven Individuen vor. Aus 171 getesteten Peptiden wurden IFN $\gamma$ -Antworten gegen 13 lytische und drei latente neue Epitopkandidaten detektiert. Zwei Epitope aus Veröffentlichungen wurden ebenfalls detektiert. Ein veröffentlichtes längeres Peptid DSELEIKRYKNR konnte auf die gekürzte Epitop-Sequenz SELEIKRY definiert werden.

Die Peptide SELEIKRY und NEIHVYNDY liegen in funktionellen Proteindomänen. Zusätzlich besteht eine ausgeprägte Dominanz bei der Erkennung dieser Epitope durch HLA-B18-positive Individuen. Darüber hinaus liegt das Epitop SELEIKRY am Rand eines T-Zell-Epitop-Clusters.

Die Expression des HLA-B18 pET3a Vektors ist sehr effizient. Die erhaltenen *inclusion bodies* für die rekombinante  $\alpha$ -Kette HLA-B18 wurden zur Herstellung von HLA-B18-Tetrameren verwendet. Das HLA-B18-SELEIKRY-Tetramer ermöglicht eine *ex vivo* Detektion, Charakterisierung und Isolierung von HLA-B18-restringierten Epitop-spezifischen T-Zellen für das dominante HLA-B18-restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Epitop.

Das HLA-B18-restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Epitop SELEIKRY ruft *ex vivo* eine polyfunktionale (IFN $\gamma$ +/IL-2+/TNF $\alpha$ +/MIP-1 $\beta$ +/CD107a+) CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort hervor. Das Funktionsmuster gleicht dem Muster für das veröffentlichte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Epitop RAKFKQLL.

Um eine geeignete Zielzelle für die Untersuchung der HLA-B18-restringierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort zu erhalten, wurde die HLA-B\*1801<sup>W486C→G</sup>-cDNA in den pIRES puro2 Vektor kloniert. Die generierten K562-B18 Transfektanten wurden im Vital-Assay eingesetzt.

Der Vital-Assays ermöglicht direkte Visualisierung von Effektorzellen und Zielzellen sowie Quantifizierung der Lyse. Die in dieser Arbeit modifizierte Form des Vital-Assays konnte die Lyse der Zielzellen durch SELEIKRY- und SESGQFHAF-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachweisen.

Bei schwachen IFN $\gamma$ -Antworten (SFE) können die T-Zellen durch mehrfache Stimulation mit Peptid und IL-2-Gabe, wie am Beispiel von dem HLA-B18-restringierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Epitop DEVEFLGHY, expandiert werden. Dies ermöglicht die Sortierung und Klonierung von schwer zu detektierenden T-Zellen aus dem peripheren Blut, die im Vital-Assay und anderen Untersuchungen, wie der intrazellulären Zytokinfärbung, analysiert werden können.

## 5.2 Schlussfolgerungen

1. Das gekürzte Peptid SELEIKRY, das als DSELEIKRYKNR veröffentlicht worden ist, wurde in allen hier durchgeführten Experimenten als ein dominantes HLA-B18-restringiertes CD8<sup>+</sup> T-Zell-Epitop bestätigt.
2. Weitere Peptide, unter anderem NEIHVYNDY, sind mit hoher Wahrscheinlichkeit HLA-B18-restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Epitope. SESGQFHAF ist ein neues Epitop.
3. Das HLA-B18-SELEIKRY-Tetramer erweitert die Möglichkeiten der Erforschung der HLA-B18-restringierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort.
4. Zum ersten Mal wird am definierten HLA-B18-restringierten Epitop SELEIKRY eine umfangreiche polyfunktionale CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort gezeigt. Dies spricht für protektive Eigenschaften der Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei der Immunantwort in gesunden EBV-Trägern.
5. Die K562-B18 Transfektanten erleichtern die Untersuchung von HLA-B18-restringierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten.
6. Die hier neu eingeführten Modifikationen von Methoden (ELISPOT und Vital-Assay) haben sich als nützlich bestätigt.
7. Die erzielten Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen, die in dieser Arbeit besprochen wurden, können bei weiterer Erforschung der HLA-B18-restringierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort gegen das Epstein-Barr-Virus und auch andere Pathogene helfen.

## 6. Literatur- und Quellenverzeichnis

### Bücher und Zeitschriftenartikel

1. Liu F, Hong Zhou Z. Comparative virion structures of human herpesviruses. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K, editors. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. Chapter 3.
2. Baer R, Bankier AT, Biggin MD, Deininger PL, Farrell PJ, Gibson TJ, Hatfull G, Hudson GS, Satchwell SC, Séguin C, et al. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*. 1984; 310(5974):207-11.
3. Sixbey JW, Nedrud JG, Raab-Traub N, Hanes RA, Pagano JS. Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl J Med*. 1984; 310(19):1225-30.
4. Miyashita EM, Yang B, Babcock GJ, Thorley-Lawson DA. Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a resting B cell. *J Virol*. 1997; 71(7):4882-91.
5. Matsuo Y, Drexler HG. Immunoprofiling of cell lines derived from natural killer-cell and natural killer-like T-cell leukemia-lymphoma. *Leuk Res*. 2003; 27(10):935-45.
6. Kanegane H, Bhatia K, Gutierrez M, Kaneda H, Wada T, Yachie A, Seki H, Arai T, Kagimoto S, Okazaki M, Oh-ishi T, Moghaddam A, Wang F, Tosato G. A syndrome of peripheral blood T-cell infection with Epstein-Barr virus (EBV) followed by EBV-positive T-cell lymphoma. *Blood*. 1998; 91(6):2085-91.
7. Fingerroth JD, Weis JJ, Tedder TF, Strominger JL, Biro PA, Fearon DT. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984; 81(14):4510-4.
8. Li Q, Spriggs MK, Kovats S, Turk SM, Comeau MR, Nepom B, Hutt-Fletcher LM. Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes. *J Virol*. 1997; 71(6):4657-62.
9. Straathof KC, Bollard CM, Rooney CM, Heslop HE. Immunotherapy for Epstein-Barr virus-associated cancers in children. *Oncologist*. 2003; 8(1):83-98.
10. Tierney RJ, Steven N, Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus latency in blood mononuclear cells: analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state. *J Virol*. 1994; 68(11):7374-85.
11. Henle G, Henle W, Diehl V. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes- $\gamma$  type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1968; 59(1):94-101.
12. Callan MF, Steven N, Krausa P, Wilson JD, Moss PA, Gillespie GM, Bell JI, Rickinson AB, McMichael AJ. Large clonal expansions of CD8<sup>+</sup> T cells in acute infectious mononucleosis. *Nat Med*. 1996; 2(8):906-11.
13. Dror Y, Blachar Y, Cohen P, Livni N, Rosenmann E, Ashkenazi A. Systemic lupus erythematosus associated with acute Epstein-Barr virus infection. *Am J Kidney Dis*. 1998; 32(5):825-8.
14. Neri A, Barriga F, Inghirami G, Knowles DM, Neequaye J, Magrath IT, Dalla-Favera R. Epstein-Barr virus infection precedes clonal expansion in Burkitt's and acquired immunodeficiency syndrome-associated lymphoma. *Blood*. 1991; 77(5):1092-5.
15. Wolf H, zur Hausen H, Becker V. EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. *Nat New Biol*. 1973; 244(138):245-7.

16. Mueller N, Evans A, Harris NL, Comstock GW, Jellum E, Magnus K, Orentreich N, Polk BF, Vogelstein J. Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus. Altered antibody pattern before diagnosis. *N Engl J Med.* 1989; 320(11):689-95.
17. MacMahon EM, Glass JD, Hayward SD, Mann RB, Becker PS, Charache P, McArthur JC, Ambinder RF. Epstein-Barr virus in AIDS-related primary central nervous system lymphoma. *Lancet.* 1991; 338(8773):969-73.
18. Rowe M, Young LS, Crocker J, Stokes H, Henderson S, Rickinson AB. Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoproliferative disease in the SCID mouse model: implications for the pathogenesis of EBV-positive lymphomas in man. *J Exp Med.* 1991; 173(1):147-58.
19. Thomas JA, Hotchin NA, Allday MJ, Amlot P, Rose M, Yacoub M, Crawford DH. Immunohistology of Epstein-Barr virus-associated antigens in B cell disorders from immunocompromised individuals. *Transplantation.* 1990; 49(5):944-53.
20. Gratama JW, Zutter MM, Minarovits J, Oosterveer MA, Thomas ED, Klein G, Ernberg I. Expression of Epstein-Barr virus-encoded growth-transformation-associated proteins in lymphoproliferations of bone-marrow transplant recipients. *Int J Cancer.* 1991; 47(2):188-92.
21. Burkitt D. A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg.* 1958; 46(197):218-23.
22. Burkitt D, O'Connor GT. Malignant lymphoma in African children. I. A clinical syndrome. *Cancer.* 1961; 14:258-69.
23. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet.* 1964; 1(7335): 702-3.
24. Delecluse HJ, Hammerschmidt W. The genetic approach to the Epstein-Barr virus: from basic virology to gene therapy. *Mol Pathol.* 2000; 53(5):270-9.
25. Rezk SA, Weiss LM. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. *Hum Pathol.* 2007; 38(9):1293-304.
26. Eligio P, Delia R, Valeria G. EBV Chronic Infections. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2010; 2(1):e2010022.
27. Lee MA, Diamond ME, Yates JL. Genetic evidence that EBNA-1 is needed for efficient, stable latent infection by Epstein-Barr virus. *J Virol.* 1999; 73(4):2974-82.
28. Lupton S, Levine AJ. Mapping genetic elements of Epstein-Barr virus that facilitate extrachromosomal persistence of Epstein-Barr virus-derived plasmids in human cells. *Mol Cell Biol.* 1985; 5(10):2533-42.
29. Yates J, Warren N, Reisman D, Sugden B. 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.* 1984; 81(12):3806-10.
30. Marechal V, Dehee A, Chikhi-Brachet R, Piolot T, Coppey-Moisan M, Nicolas JC. Mapping EBNA-1 domains involved in binding to metaphase chromosomes. *J Virol.* 1999; 73(5):4385-92.
31. Cohen JJ, Wang F, Mannick J, Kieff E. Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86(23):9558-62.
32. Hammerschmidt W, Sugden B. Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature.* 1989; 340(6232):393-7.

33. Johannsen E, Koh E, Mosialos G, Tong X, Kieff E, Grossman SR. Epstein-Barr virus nuclear protein 2 transactivation of the latent membrane protein 1 promoter is mediated by J kappa and PU.1. *J Virol.* 1995; 69(1):253-62.
34. Wang F, Gregory CD, Rowe M, Rickinson AB, Wang D, Birkenbach M, Kikutani H, Kishimoto T, Kieff E. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 specifically induces expression of the B-cell activation antigen CD23. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84(10):3452-6.
35. Kaiser C, Laux G, Eick D, Jochner N, Bornkamm GW, Kempkes B. The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol.* 1999; 73(5):4481-4.
36. Henkel T, Ling PD, Hayward SD, Peterson MG. Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa. *Science.* 1994; 265(5168):92-5.
37. Hammerschmidt W, Sugden B. Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature.* 1989; 340(6232):393-7.
38. Allan GJ, Inman GJ, Parker BD, Rowe DT, Farrell PJ. Cell growth effects of Epstein-Barr virus leader protein. *J Gen Virol.* 1992; 73 (6):1547-51.
39. Szekely L, Selivanova G, Magnusson KP, Klein G, Wiman KG. EBNA-5, an Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(12):5455-9.
40. Han I, Harada S, Weaver D, Xue Y, Lane W, Orstavik S, Skalhegg B, Kieff E. EBNA-LP associates with cellular proteins including DNA-PK and HA95. *J Virol.* 2001; 75(5):2475-81.
41. Kempkes B, Pich D, Zeidler R, Sugden B, Hammerschmidt W. immortalization of human B lymphocytes by a plasmid containing 71 kilobase pairs of Epstein-Barr virus DNA. *J Virol.* 1995; 69(1):231-8.
42. Maruo S, Wu Y, Ito T, Kanda T, Kieff ED, Takada K. Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA3C residues critical for maintaining lymphoblastoid cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(11):4419-24.
43. Wang F, Gregory C, Sample C, Rowe M, Liebowitz D, Murray R, Rickinson A, Kieff E. Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J Virol.* 1990; 64(5):2309-18.
44. Allday MJ, Crawford DH, Thomas JA. Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 6 induces expression of the EBV latent membrane protein and an activated phenotype in Raji cells. *J Gen Virol.* 1993; 74 ( Pt 3):361-9.
45. Silins SL, Sculley TB. Modulation of vimentin, the CD40 activation antigen and Burkitt's lymphoma antigen (CD77) by the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-4. *Virology.* 1994; 202(1):16-24.
46. Chang Y, Lee HH, Chang SS, Hsu TY, Wang PW, Chang YS, Takada K, Tsai CH. Induction of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 by a lytic transactivator Rta. *J Virol.* 2004; 78(23):13028-36.
47. Lear AL, Rowe M, Kurilla MG, Lee S, Henderson S, Kieff E, Rickinson AB. The Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1 BamHI F promoter is activated on entry of EBV-transformed B cells into the lytic cycle. *J Virol.* 1992; 66(12):7461-8.
48. Kaye KM, Izumi KM, Kieff E. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(19):9150-4.

49. Higuchi M, Izumi KM, Kieff E. Epstein-Barr virus latent-infection membrane proteins are palmitoylated and raft-associated: protein 1 binds to the cytoskeleton through TNF receptor cytoplasmic factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(8):4675-80.
50. Uchida J, Yasui T, Takaoka-Shichijo Y, Muraoka M, Kulwichit W, Raab-Traub N, Kikutani H. Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science*. 1999; 286(5438):300-3.
51. Fries KL, Miller WE, Raab-Traub N. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 blocks p53-mediated apoptosis through the induction of the A20 gene. *J Virol*. 1996; 70(12):8653-9.
52. Wang S, Rowe M, Lundgren E. Expression of the Epstein Barr virus transforming protein LMP1 causes a rapid and transient stimulation of the Bcl-2 homologue Mcl-1 levels in B-cell lines. *Cancer Res*. 1996; 56(20):4610-3.
53. Henderson S, Rowe M, Gregory C, Croom-Carter D, Wang F, Longnecker R, Kieff E, Rickinson A. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell*. 1991; 65(7):1107-15.
54. Kusano S, Raab-Traub N. An Epstein-Barr virus protein interacts with Notch. *J Virol*. 2001; 75(1):384-95.
55. Longnecker R, Miller CL, Tomkinson B, Miao XQ, Kieff E. Deletion of DNA encoding the first five transmembrane domains of Epstein-Barr virus latent membrane proteins 2A and 2B. *J Virol*. 1993; 67(8):5068-74.
56. Sample J, Liebowitz D, Kieff E. Two related Epstein-Barr virus membrane proteins are encoded by separate genes. *J Virol*. 1989; 63(2):933-7.
57. Miller CL, Lee JH, Kieff E, Longnecker R. An integral membrane protein (LMP2) blocks reactivation of Epstein-Barr virus from latency following surface immunoglobulin crosslinking. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(2):772-6.
58. Swaminathan S, Huneycutt BS, Reiss CS, Kieff E. Epstein-Barr virus-encoded small RNAs (EBERs) do not modulate interferon effects in infected lymphocytes. *J Virol*. 1992; 66(8):5133-6.
59. Kitagawa N, Goto M, Kurozumi K, Maruo S, Fukayama M, Naoe T, Yasukawa M, Hino K, Suzuki T, Todo S, Takada K. Epstein-Barr virus-encoded poly(A)(-) RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction. *EMBO J*. 2000; 19(24):6742-50.
60. Yajima M, Kanda T, Takada K. Critical role of Epstein-Barr Virus (EBV)-encoded RNA in efficient EBV-induced B-lymphocyte growth transformation. *J Virol*. 2005; 79(7):4298-307.
61. Chevallier-Greco A, Manet E, Chavrier P, Mosnier C, Daillie J, Sergeant A. Both Epstein-Barr virus (EBV)-encoded trans-acting factors, EB1 and EB2, are required to activate transcription from an EBV early promoter. *EMBO J*. 1986; 5(12):3243-9.
62. Feederle R, Kost M, Baumann M, Janz A, Drouet E, Hammerschmidt W, Delecluse HJ. The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operative functions of two transactivators. *EMBO J*. 2000; 19(12):3080-9.
63. Gutsch DE, Holley-Guthrie EA, Zhang Q, Stein B, Blonar MA, Baldwin AS, Kenney SC. The bZIP transactivator of Epstein-Barr virus, BZLF1, functionally and physically interacts with the p65 subunit of NF-kappa B. *Mol Cell Biol*. 1994; 14(3):1939-48.
64. Zhang Q, Gutsch D, Kenney S. Functional and physical interaction between p53 and BZLF1: implications for Epstein-Barr virus latency. *Mol Cell Biol*. 1994; 14(3):1929-38.

65. Fixman ED, Hayward GS, Hayward SD. trans-acting requirements for replication of Epstein-Barr virus ori-Lyt. *J Virol.* 1992; 66(8):5030-9.
66. Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan TA, Mosmann TR. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science.* 1990; 248(4960):1230-4.
67. Miyazaki I, Cheung RK, Dosch HM. Viral interleukin 10 is critical for the induction of B cell growth transformation by Epstein-Barr virus. *J Exp Med.* 1993; 178(2):439-47.
68. Kelly GL, Milner AE, Baldwin GS, Bell AI, Rickinson AB. Three restricted forms of Epstein-Barr virus latency counteracting apoptosis in c-myc-expressing Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(40):14935-40.
69. Chew MM, Gan SY, Khoo AS, Tan EL. Interleukins, laminin and Epstein - Barr virus latent membrane protein 1 (EBV LMP1) promote metastatic phenotype in nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer.* 2010; 10:574.
70. Bieging KT, Swanson-Mungerson M, Amick AC, Longnecker R. Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma: a role for latent membrane protein 2A. *Cell Cycle.* 2010; 9(5):901-8.
71. Townsend A, Trowsdale J. The transporters associated with antigen presentation. *Semin Cell Biol.* 1993; 4(1):53-61.
72. Michalek MT, Grant EP, Gramm C, Goldberg AL, Rock KL. A role for the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class I-restricted antigen presentation. *Nature.* 1993; 363(6429):552-4.
73. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell.* 1994; 78(5):761-71.
74. Lupas A, Koster AJ, Baumeister W. Structural features of 26S and 20S proteasomes. *Enzyme Protein.* 1993; 47(4-6):252-73.
75. Masucci MG. Epstein-Barr virus oncogenesis and the ubiquitin-proteasome system. *Oncogene.* 2004; 23(11):2107-15.
76. Sompallae R, Gastaldello S, Hildebrand S, Zinin N, Hassink G, Lindsten K, Haas J, Persson B, Masucci MG. Epstein-barr virus encodes three bona fide ubiquitin-specific proteases. *J Virol.* 2008; 82(21):10477-86.
77. Holowaty MN, Sheng Y, Nguyen T, Arrowsmith C, Frappier L. Protein interaction domains of the ubiquitin-specific protease, USP7/HAUSP. *J Biol Chem.* 2003; 278(48):47753-61.
78. Knight JS, Sharma N, Robertson ES. Epstein-Barr virus latent antigen 3C can mediate the degradation of the retinoblastoma protein through an SCF cellular ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(51):18562-6.
79. Rowe M, Khanna R, Jacob CA, Argat V, Kelly A, Powis S, Belich M, Croom-Carter D, Lee S, Burrows SR, et al. Restoration of endogenous antigen processing in Burkitt's lymphoma cells by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1: coordinate up-regulation of peptide transporters and HLA-class I antigen expression. *Eur J Immunol.* 1995; 25(5):1374-84.
80. Smith C, Wakisaka N, Crough T, Peet J, Yoshizaki T, Beagley L, Khanna R. Discerning regulation of cis- and trans-presentation of CD8+ T-cell epitopes by EBV-encoded oncogene LMP-1 through self-aggregation. *Blood.* 2009; 113(24):6148-52.

81. Sato Y, Kamura T, Shirata N, Murata T, Kudoh A, Iwahori S, Nakayama S, Isomura H, Nishiyama Y, Tsurumi T. Degradation of phosphorylated p53 by viral protein-ECS E3 ligase complex. *PLoS Pathog.* 2009; 5(7):e1000530.
82. Zuo J, Quinn LL, Tamblyn J, Thomas WA, Feederle R, Delecluse HJ, Hislop AD, Rowe M. The Epstein-Barr virus-encoded BILF1 protein modulates immune recognition of endogenously processed antigen by targeting major histocompatibility complex class I molecules trafficking on both the exocytic and endocytic pathways. *J Virol.* 2011; 85(4):1604-14.
83. Lautscham G, Mayrhofer S, Taylor G, Haigh T, Leese A, Rickinson A, Blake N. Processing of a multiple membrane spanning Epstein-Barr virus protein for CD8(+) T cell recognition reveals a proteasome-dependent, transporter associated with antigen processing-independent pathway. *J Exp Med.* 2001; 194(8):1053-68.
84. Curtis RE, Travis LB, Rowlings PA, Socié G, Kingma DW, Banks PM, Jaffe ES, Sale GE, Horowitz MM, Witherspoon RP, Shriner DA, Weisdorf DJ, Kolb HJ, Sullivan KM, Sobocinski KA, Gale RP, Hoover RN, Fraumeni JF Jr, Deeg HJ. Risk of lymphoproliferative disorders after bone marrow transplantation: a multi-institutional study. *Blood.* 1999; 94(7):2208-16.
85. Pappworth IY, Wang EC, Rowe M. The switch from latent to productive infection in Epstein-Barr virus-infected B cells is associated with sensitization to NK cell killing. *J Virol.* 2007; 81(2):474-82.
86. Gaudreault E, Fiola S, Olivier M, Gosselin J. Epstein-Barr virus induces MCP-1 secretion by human monocytes via TLR2. *J Virol.* 2007; 81(15):8016-24.
87. Henle W, Henle G, Andersson J, Ernberg I, Klein G, Horwitz CA, Marklund G, Rymo L, Wellinder C, Straus SE. Antibody responses to Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen (EBNA)-1 and EBNA-2 in acute and chronic Epstein-Barr virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84(2):570-4.
88. Cao SM, Liu Z, Jia WH, Huang QH, Liu Q, Guo X, Huang TB, Ye W, Hong MH. Fluctuations of Epstein-Barr virus serological antibodies and risk for nasopharyngeal carcinoma: a prospective screening study with a 20-year follow-up. *PLoS One.* 2011; 6(4):e19100.
89. Moss DJ, Rickinson AB, Pope JH. Long-term T-cell-mediated immunity to Epstein-Barr virus in man. I. Complete regression of virus-induced transformation in cultures of seropositive donor leukocytes. *Int J Cancer.* 1978; 22(6):662-8.
90. Maini MK, Gudgeon N, Wedderburn LR, Rickinson AB, Beverley PC. Clonal expansions in acute EBV infection are detectable in the CD8 and not the CD4 subset and persist with a variable CD45 phenotype. *J Immunol.* 2000; 165(10):5729-37.
91. Woodberry T, Suscovich TJ, Henry LM, Davis JK, Frahm N, Walker BD, Scadden DT, Wang F, Brander C. 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.* 2005; 192(9):1513-24.
92. Precopio ML, Sullivan JL, Willard C, Somasundaran M, Luzuriaga K. Differential kinetics and specificity of EBV-specific CD4+ and CD8+ T cells during primary infection. *J Immunol.* 2003; 170(5):2590-8.
93. Leen A, Meij P, Redchenko I, Middeldorp J, Bloemena E, Rickinson A, Blake N. Differential immunogenicity of Epstein-Barr virus latent-cycle proteins for human CD4(+) T-helper 1 responses. *J Virol.* 2001; 75(18):8649-59.
94. Wallace LE, Wright J, Ulaeto DO, Morgan AJ, Rickinson AB. Identification of two T-cell epitopes on the candidate Epstein-Barr virus vaccine glycoprotein gp340 recognized by CD4+ T-cell clones. *J Virol.* 1991; 65(7):3821-8.

95. Khanna R, Burrows SR, Thomson SA, Moss DJ, Cresswell P, Poulsen LM, Cooper L. Class I processing-defective Burkitt's lymphoma cells are recognized efficiently by CD4<sup>+</sup> EBV-specific CTLs. *J Immunol.* 1997; 158(8):3619-25.
96. Voo KS, Fu T, Heslop HE, Brenner MK, Rooney CM, Wang RF. Identification of HLA-DP3-restricted peptides from EBNA1 recognized by CD4(+) T cells. *Cancer Res.* 2002; 62(24):7195-9.
97. Tsang CW, Lin X, Gudgeon NH, Taylor GS, Jia H, Hui EP, Chan AT, Lin CK, Rickinson AB. CD4<sup>+</sup> T-cell responses to Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA1 in Chinese populations are highly focused on novel C-terminal domain-derived epitopes. *J Virol.* 2006; 80(16):8263-6.
98. Paludan C, Bickham K, Nikiforow S, Tsang ML, Goodman K, Hanekom WA, Fonteneau JF, Stevanović S, Münz C. Epstein-Barr nuclear antigen 1-specific CD4(+) Th1 cells kill Burkitt's lymphoma cells. *J Immunol.* 2002; 169(3):1593-603.
99. Hoshino Y, Morishima T, Kimura H, Nishikawa K, Tsurumi T, Kuzushima K. Antigen-driven expansion and contraction of CD8<sup>+</sup>-activated T cells in primary EBV infection. *J Immunol.* 1999; 163(10):5735-40.
100. Steven NM, Leese AM, Annels NE, Lee SP, Rickinson AB. Epitope focusing in the primary cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus and its relationship to T cell memory. *J Exp Med.* 1996; 184(5):1801-13.
101. Steven NM, Annels NE, Kumar A, Leese AM, Kurilla MG, Rickinson AB. Immediate early and early lytic cycle proteins are frequent targets of the Epstein-Barr virus-induced cytotoxic T cell response. *J Exp Med.* 1997; 185(9):1605-17.
102. Callan MF, Tan L, Annels N, Ogg GS, Wilson JD, O'Callaghan CA, Steven N, McMichael AJ, Rickinson AB. Direct visualization of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus *In vivo*. *J Exp Med.* 1998; 187(9):1395-402.
103. Benninger-Döring G, Pepperl S, Deml L, Modrow S, Wolf H, Jilg W. Frequency of CD8(+) T lymphocytes specific for lytic and latent antigens of Epstein-Barr virus in healthy virus carriers. *Virology.* 1999; 264(2):289-97.
104. Ouyang Q, Wagner WM, Walter S, Müller CA, Wikby A, Aubert G, Klatt T, Stevanovic S, Dodi T, Pawelec G. An age-related increase in the number of CD8<sup>+</sup> T cells carrying receptors for an immunodominant Epstein-Barr virus (EBV) epitope is counteracted by a decreased frequency of their antigen-specific responsiveness. *Mech Ageing Dev.* 2003; 124(4):477-85.
105. Scotet E, David-Ameline J, Peyrat MA, Moreau-Aubry A, Pinczon D, Lim A, Even J, Semana G, Berthelot JM, Breathnach R, Bonneville M, Houssaint E. T cell response to Epstein-Barr virus transactivators in chronic rheumatoid arthritis. *J Exp Med.* 1996; 184(5):1791-800.
106. Pudney VA, Leese AM, Rickinson AB, Hislop AD. CD8<sup>+</sup> immunodominance among Epstein-Barr virus lytic cycle antigens directly reflects the efficiency of antigen presentation in lytically infected cells. *J Exp Med.* 2005; 201(3):349-60.
107. Keating S, Prince S, Jones M, Rowe M. The lytic cycle of Epstein-Barr virus is associated with decreased expression of cell surface major histocompatibility complex class I and class II molecules. *J Virol.* 2002; 76(16):8179-88.
108. Hislop AD, Rensing ME, van Leeuwen D, Pudney VA, Horst D, Koppers-Lalic D, Croft NP, Neefjes JJ, Rickinson AB, Wiertz EJ. A CD8<sup>+</sup> T cell immune evasion protein specific to Epstein-Barr virus and its close relatives in Old World primates. *J Exp Med.* 2007; 204(8):1863-73.

109. Murray RJ, Kurilla MG, Brooks JM, Thomas WA, Rowe M, Kieff E, Rickinson AB. Identification of target antigens for the human cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus (EBV): implications for the immune control of EBV-positive malignancies. *J Exp Med.* 1992; 176(1):157-68.
110. Khanna R, Burrows SR, Kurilla MG, Jacob CA, Misko IS, Sculley TB, Kieff E, Moss DJ. Localization of Epstein-Barr virus cytotoxic T cell epitopes using recombinant vaccinia: implications for vaccine development. *J Exp Med.* 1992; 176(1):169-76.
111. Lee SP, Tierney RJ, Thomas WA, Brooks JM, Rickinson AB. Conserved CTL epitopes within EBV latent membrane protein 2: a potential target for CTL-based tumor therapy. *J Immunol.* 1997; 158(7): 3325-34.
112. Levitskaya J, Coram M, Levitsky V, Imreh S, Steigerwald-Mullen PM, Klein G, Kurilla MG, Masucci MG. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature.* 1995; 375(6533):685-8.
113. Blake N, Haigh T, Shaka'a G, Croom-Carter D, Rickinson A. The importance of exogenous antigen in priming the human CD8+ T cell response: lessons from the EBV nuclear antigen EBNA1. *J Immunol.* 2000; 165(12):7078-87.
114. Lee SP, Brooks JM, Al-Jarrah H, Thomas WA, Haigh TA, Taylor GS, Humme S, Schepers A, Hammerschmidt W, Yates JL, Rickinson AB, Blake NW. CD8 T cell recognition of endogenously expressed Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *J Exp Med.* 2004; 199(10):1409-20.
115. Woodberry T, Suscovich TJ, Henry LM, August M, Waring MT, Kaur A, Hess C, Kutok JL, Aster JC, Wang F, Scadden DT, Brander C. Alpha E beta 7 (CD103) expression identifies a highly active, tonsil-resident effector-memory CTL population. *J Immunol.* 2005; 175(7):4355-62.
116. Hislop AD, Kuo M, Drake-Lee AB, Akbar AN, Bergler W, Hammerschmitt N, Khan N, Palendira U, Leese AM, Timms JM, Bell AI, Buckley CD, Rickinson AB. Tonsillar homing of Epstein-Barr virus-specific CD8+ T cells and the virus-host balance. *J Clin Invest.* 2005; 115(9):2546-55.
117. Catalina MD, Sullivan JL, Brody RM, Luzuriaga K. Phenotypic and functional heterogeneity of EBV epitope-specific CD8+ T cells. *J Immunol.* 2002; 168(8):4184-91.
118. Hislop AD, Gudgeon NH, Callan MF, Fazou C, Hasegawa H, Salmon M, Rickinson AB. EBV-specific CD8+ T cell memory: relationships between epitope specificity, cell phenotype, and immediate effector function. *J Immunol.* 2001; 167(4):2019-29.
119. Stern JB, Smith KA. Interleukin-2 induction of T-cell G1 progression and c-myb expression. *Science.* 1986; 233(4760):203-6.
120. Beadling C, Johnson KW, Smith KA. Isolation of interleukin 2-induced immediate-early genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(7):2719-23.
121. Beadling C, Smith KA. DNA array analysis of interleukin-2-regulated immediate/early genes. *Med Immunol.* 2002; 1(1):2.
122. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004; 75(2):163-89.
123. Van den Eynde BJ, Morel S. Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome. *Curr Opin Immunol.* 2001; 13(2):147-53.
124. Kloetzel PM. Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2(3):179-87.
125. Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, Koup RA. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods.* 2003; 281(1-2):65-78.

126. Phillips S, Chokshi S, Riva A, Evans A, Williams R, Naoumov NV. CD8(+) T cell control of hepatitis B virus replication: direct comparison between cytolytic and noncytolytic functions. *J Immunol.* 2010; 184(1):287-95.
127. Yang OO, Kalams SA, Trocha A, Cao H, Luster A, Johnson RP, Walker BD. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by CD8+ cells: evidence for HLA class I-restricted triggering of cytolytic and noncytolytic mechanisms. *J Virol.* 1997; 71(4):3120-8.
128. Bystry RS, Aluvihare V, Welch KA, Kallikourdis M, Betz AG. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat Immunol.* 2001; 2(12):1126-32.
129. Almeida JR, Price DA, Papagno L, Arkoub ZA, Sauce D, Bornstein E, Asher TE, Samri A, Schnuriger A, Theodorou I, Costagliola D, Rouzioux C, Agut H, Marcelin AG, Douek D, Autran B, Appay V. Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J Exp Med.* 2007; 204(10):2473-85.
130. Zhou W, Longmate J, Lacey SF, Palmer JM, Gallez-Hawkins G, Thao L, Spielberger R, Nakamura R, Forman SJ, Zaia JA, Diamond DJ. Impact of donor CMV status on viral infection and reconstitution of multifunction CMV-specific T cells in CMV-positive transplant recipients. *Blood.* 2009; 113(25):6465-76.
131. Mkhwanazi N, Thobakgale CF, van der Stok M, Reddy S, Mncube Z, Chonco F, Walker BD, Altfeld M, Goulder PJ, Ndung'u T. Immunodominant HIV-1-specific HLA-B- and HLA-C-restricted CD8+ T cells do not differ in polyfunctionality. *Virology.* 2010; 405(2):483-91.
132. Smith C, Beagley L, Khanna R. Acquisition of polyfunctionality by Epstein-Barr virus-specific CD8+ T cells correlates with increased resistance to galectin-1-mediated suppression. *J Virol.* 2009; 83(12):6192-8.
133. Gasser O, Bihl F, Sanghavi S, Rinaldo C, Rowe D, Hess C, Stablein D, Roland M, Stock P, Brander C. Treatment-dependent loss of polyfunctional CD8+ T-cell responses in HIV-infected kidney transplant recipients is associated with herpesvirus reactivation. *Am J Transplant.* 2009; 9(4):794-803.
134. Halkos ME, Miller JI, Mann KP, Miller DL, Gal AA. Thoracic presentations of posttransplant lymphoproliferative disorders. *Chest.* 2004; 126(6):2013-20.
135. Purtilo DT. Epstein-Barr-virus-induced oncogenesis in immune-deficient individuals. *Lancet.* 1980; 1(8163):300-3.
136. Young L, Alfieri C, Hennessy K, Evans H, O'Hara C, Anderson KC, Ritz J, Shapiro RS, Rickinson A, Kieff E, et al. Expression of Epstein-Barr virus transformation-associated genes in tissues of patients with EBV lymphoproliferative disease. *N Engl J Med.* 1989; 321(16):1080-5.
137. Heslop HE, Slobod KS, Pule MA, Hale GA, Rousseau A, Smith CA, Bollard CM, Liu H, Wu MF, Rochester RJ, Amrolia PJ, Hurwitz JL, Brenner MK, Rooney CM. Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood.* 2010; 115(5):925-35.
138. Bollard CM, Cooper LJ, Heslop HE. Immunotherapy targeting EBV-expressing lymphoproliferative diseases. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2008; 21(3):405-20.
139. Khanna R, Bell S, Sherritt M, Galbraith A, Burrows SR, Rafter L, Clarke B, Slaughter R, Falk MC, Douglass J, Williams T, Elliott SL, Moss DJ. Activation and adoptive transfer of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cells in solid organ transplant patients with posttransplant lymphoproliferative disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(18):10391-6.
140. Comoli P, Labirio M, Basso S, Baldanti F, Grossi P, Furione M, Viganò M, Fiocchi R, Rossi G, Ginevri F, Gridelli B, Moretta A, Montagna D, Locatelli F, Gerna G, Maccario R. Infusion of autologous Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T cells for prevention of EBV-related lymphoproliferative

disorder in solid organ transplant recipients with evidence of active virus replication. *Blood*. 2002; 99(7):2592-8.

141. Hammer MH, Brestrich G, Mittenzweig A, Roemhild A, Zwinger S, Subklewe M, Beier C, Kurtz A, Babel N, Volk HD, Reinke P. Generation of EBV-specific T cells for adoptive immunotherapy: a novel protocol using formalin-fixed stimulator cells to increase biosafety. *J Immunother*. 2007; 30(8):817-24.

142. Moosmann A, Bigalke I, Tischer J, Schirrmann L, Kasten J, Tippmer S, Leeping M, Prevalsek D, Jaeger G, Ledderose G, Mautner J, Hammerschmidt W, Schendel DJ, Kolb HJ. Effective and long-term control of EBV PTLD after transfer of peptide-selected T cells. *Blood*. 2010; 115(14):2960-70.

143. Feuchtinger T, Richard C, Joachim S, Scheible MH, Schumm M, Hamprecht K, Martin D, Jahn G, Handgretinger R, Lang P. Clinical grade generation of hexon-specific T cells for adoptive T-cell transfer as a treatment of adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *J Immunother*. 2008; 31(2):199-206.

144. Rauser G, Einsele H, Sinzger C, Wernet D, Kuntz G, Assenmacher M, Campbell JD, Topp MS. Rapid generation of combined CMV-specific CD4+ and CD8+ T-cell lines for adoptive transfer into recipients of allogeneic stem cell transplants. *Blood*. 2004; 103(9):3565-72.

145. Gottschalk S, Ng CY, Perez M, Smith CA, Sample C, Brenner MK, Heslop HE, Rooney CM. An Epstein-Barr virus deletion mutant associated with fatal lymphoproliferative disease unresponsive to therapy with virus-specific CTLs. *Blood*. 2001; 97(4):835-43.

146. Hong GK, Gulley ML, Feng WH, Delecluse HJ, Holley-Guthrie E, Kenney SC. Epstein-Barr virus lytic infection contributes to lymphoproliferative disease in a SCID mouse model. *J Virol*. 2005; 79(22):13993-4003.

147. Hong GK, Kumar P, Wang L, Damania B, Gulley ML, Delecluse HJ, Polverini PJ, Kenney SC. Epstein-Barr virus lytic infection is required for efficient production of the angiogenesis factor vascular endothelial growth factor in lymphoblastoid cell lines. *J Virol*. 2005; 79(22):13984-92.

148. Tsai SC, Lin SJ, Chen PW, Luo WY, Yeh TH, Wang HW, Chen CJ, Tsai CH. EBV Zta protein induces the expression of interleukin-13, promoting the proliferation of EBV-infected B cells and lymphoblastoid cell lines. *Blood*. 2009; 114(1):109-18.

149. Davis JE, Sherritt MA, Bharadwaj M, Morrison LE, Elliott SL, Kear LM, Maddicks-Law J, Kotsimbos T, Gill D, Malouf M, Falk MC, Khanna R, Moss DJ. Determining virological, serological and immunological parameters of EBV infection in the development of PTLD. *International immunology*. 2004; 16(7): 983-9.

150. Sundin M, Le Blanc K, Ringdén O, Barkholt L, Omazic B, Lergin C, Levitsky V, Remberger M. The role of HLA mismatch, splenectomy and recipient Epstein-Barr virus seronegativity as risk factors in post-transplant lymphoproliferative disorder following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2006; 91(8):1059-67.

151. Elliott SL, Suhrbier A, Miles JJ, Lawrence G, Pye SJ, Le TT, Rosenstengel A, Nguyen T, Allworth A, Burrows SR, Cox J, Pye D, Moss DJ, Bharadwaj M. Phase I trial of a CD8+ T-cell peptide epitope-based vaccine for infectious mononucleosis. *J Virol*. 2008; 82(3):1448-57.

152. Comoli P, Pedrazzoli P, Maccario R, Basso S, Carminati O, Labirio M, Schiavo R, Secondino S, Frasson C, Perotti C, Moroni M, Locatelli F, Siena S. Cell therapy of stage IV nasopharyngeal carcinoma with autologous Epstein-Barr virus-targeted cytotoxic T lymphocytes. *J Clin Oncol*. 2005; 23(35):8942-9.

153. Straathof KC, Bollard CM, Papat U, Huls MH, Lopez T, Morriss MC, Gresik MV, Gee AP, Russell HV, Brenner MK, Rooney CM, Heslop HE. Treatment of nasopharyngeal carcinoma with Epstein-Barr virus--specific T lymphocytes. *Blood*. 2005;105(5):1898-904.

154. Landais E, Saulquin X, Houssaint E. The human T cell immune response to Epstein-Barr virus. *Int J Dev Biol.* 2005; 49(2-3):285-92.
155. Davis JE, Moss DJ. Treatment options for post-transplant lymphoproliferative disorder and other Epstein-Barr virus-associated malignancies. *Tissue Antigens.* 2004; 63(4):285-92.
156. Li J, Zeng XH, Mo HY, Rolén U, Gao YF, Zhang XS, Chen QY, Zhang L, Zeng MS, Li MZ, Huang WL, Wang XN, Zeng YX, Masucci MG. Functional inactivation of EBV-specific T-lymphocytes in nasopharyngeal carcinoma: implications for tumor immunotherapy. *PLoS One.* 2007; 2(11):e1122.
157. Jones K, Nourse JP, Morrison L, Nguyen-Van D, Moss DJ, Burrows SR, Gandhi MK. Expansion of EBNA1-specific effector T cells in posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Blood.* 2010; 116(13):2245-52.
158. Li X, Ghandri N, Piancatelli D, Adams S, Chen D, Robbins FM, Wang E, Monaco A, Selleri S, Bouaouina N, Stroncek D, Adorno D, Chouchane L, Marincola FM. Associations between HLA class I alleles and the prevalence of nasopharyngeal carcinoma (NPC) among Tunisians. *J Transl Med.* 2007; 5:22.
159. Dardari R, Khyatti M, Jouhadi H, Benider A, Ettayebi H, Kahlain A, Mansouri A, El Gueddari B, Benslimane A. Study of human leukocyte antigen class I phenotypes in Moroccan patients with nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer.* 2001; 92(2):294-7.
160. Subklewe M, Marquis R, Choquet S, Leblond V, Garnier JL, Hetzer R, Swinnen LJ, Oertel S, Papp-Vary M, Gonzalez-Barca E, Hepkema BG, Schoenemann C, May J, Pezzutto A, Riess H. Association of human leukocyte antigen haplotypes with posttransplant lymphoproliferative disease after solid organ transplantation. *Transplantation.* 2006; 82(8):1093-100.
161. Pepperl S, Benninger-Döring G, Modrow S, Wolf H, Jilg W. Immediate-early transactivator Rta of Epstein-Barr virus (EBV) shows multiple epitopes recognized by EBV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Virol.* 1998; 72(11):8644-9.
162. Steven NM, Annels NE, Kumar A, Leese AM, Kurilla MG, Rickinson AB. Immediate early and early lytic cycle proteins are frequent targets of the Epstein-Barr virus-induced cytotoxic T cell response. *J Exp Med.* 1997; 185(9):1605-17.
163. Saulquin X, Ibisch C, Peyrat MA, Scotet E, Hourmant M, Vie H, Bonneville M, Houssaint E. A global appraisal of immunodominant CD8 T cell responses to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus by bulk screening. *Eur J Immunol.* 2000; 30(9):2531-9.
164. Retière C, Prod'homme V, Imbert-Marcille BM, Bonneville M, Vié H, Hallet MM. Generation of cytomegalovirus-specific human T-lymphocyte clones by using autologous B-lymphoblastoid cells with stable expression of pp65 or IE1 proteins: a tool to study the fine specificity of the antiviral response. *J Virol.* 2000; 74(9):3948-52.
165. Bourgault Villada I, Bénétou N, Bony C, Connan F, Monsonogo J, Bianchi A, Saiag P, Lévy JP, Guillet JG, Choppin J. Identification in humans of HPV-16 E6 and E7 protein epitopes recognized by cytolytic T lymphocytes in association with HLA-B18 and determination of the HLA-B18-specific binding motif. *Eur J Immunol.* 2000; 30(8):2281-9.
166. Kiepiela P, Leslie AJ, Honeyborne I, Ramduth D, Thobakgale C, Chetty S, Rathnavalu P, Moore C, Pfafferoth KJ, Hilton L, Zimbwa P, Moore S, Allen T, Brander C, Addo MM, Altfeld M, James I, Mallal S, Bunce M, Barber LD, Szinger J, Day C, Klenerman P, Mullins J, Korber B, Coovadia HM, Walker BD, Goulder PJ. Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature.* 2004; 432(7018):769-75.
167. Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science.* 1996; 274(5284): 94-6.

168. Cobbold M, Khan N, Pourgheysari B, Tauro S, McDonald D, Osman H, Assenmacher M, Billingham L, Steward C, Crawley C, Olavarria E, Goldman J, Chakraverty R, Mahendra P, Craddock C, Moss PA. Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J Exp Med*. 2005; 202(3):379-86.
169. Britten CM, Meyer RG, Kreer T, Drexler I, Wölfel T, Herr W. The use of HLA-A\*0201-transfected K562 as standard antigen-presenting cells for CD8(+) T lymphocytes in IFN-gamma ELISPOT assays. *J Immunol Methods*. 2002; 259(1-2):95-110.
170. Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanović S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*. 1999; 50(3-4):213-9.
171. Hickman HD, Luis AD, Buchli R, Few SR, Sathiamurthy M, VanGundy RS, Giberson CF, Hildebrand WH. Toward a definition of self: proteomic evaluation of the class I peptide repertoire. *J Immunol*. 2004; 172(5):2944-52.
172. Hermans IF, Silk JD, Yang J, Palmowski MJ, Gileadi U, McCarthy C, Salio M, Ronchese F, Cerundolo V. The VITAL assay: a versatile fluorometric technique for assessing CTL- and NKT-mediated cytotoxicity against multiple targets in vitro and in vivo. *J Immunol Methods*. 2004; 285(1):25-40.
173. Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*. 1975; 45(3):321-34.
174. Bogedain C, Wolf H, Modrow S, Stuber G, Jilg W. Specific cytotoxic T-lymphocytes recognize the immediate-early transactivator ZTA of Epstein-Barr virus. *J Virol*. 1995; 68:4872-79.
175. Rebaï N, Malissen B. Structural and genetic analyses of HLA class I molecules using monoclonal xenoantibodies. *Tissue Antigens*. 1983; 22(2):107-17.
176. Barnstable CJ, Bodmer WF, Brown G, Galfre G, Milstein C, Williams AF, Ziegler A. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell*. 1978; 14(1):9-20.
177. Hislop AD, Taylor GS, Sauce D, Rickinson AB. Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol*. 2007; 25:587-617.
178. Amyes E, Hatton C, Montamat-Sicotte D, Gudgeon N, Rickinson AB, McMichael AJ, Callan MF. Characterization of the CD4+ T cell response to Epstein-Barr virus during primary and persistent infection. *J Exp Med*. 2003; 198(6):903-11.
179. Long HM, Haigh TA, Gudgeon NH, Leen AM, Tsang CW, Brooks J, Landais E, Houssaint E, Lee SP, Rickinson AB, Taylor GS. CD4+ T-cell responses to Epstein-Barr virus (EBV) latent-cycle antigens and the recognition of EBV-transformed lymphoblastoid cell lines. *J Virol*. 2005; 79(8):4896-907.
180. Lutzky VP, Corban M, Heslop L, Morrison LE, Crooks P, Hall DF, Coman WB, Thomson SA, Moss DJ. Novel approach to the formulation of an Epstein-Barr virus antigen-based nasopharyngeal carcinoma vaccine. *J Virol*. 2010; 84(1):407-17.
181. Yusim K, Kesmir C, Gaschen B, Addo MM, Altfeld M, Brunak S, Chigaev A, Detours V, Korber BT. Clustering patterns of cytotoxic T-lymphocyte epitopes in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) proteins reveal imprints of immune evasion on HIV-1 global variation. *J Virol*. 2002; 76(17): 8757-68.
182. Packham G, Economou A, Rooney CM, Rowe DT, Farrell PJ. Structure and function of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein. *J Virol*. 1990; 64(5):2110-6.
183. Reimer JJ, Backovic M, Deshpande CG, Jardetzky T, Longnecker R. Analysis of Epstein-Barr virus glycoprotein B functional domains via linker insertion mutagenesis. *J Virol*. 2009; 83(2):734-47.

184. Itoh Y, Hemmer B, Martin R, Germain RN. Serial TCR engagement and down-modulation by peptide:MHC molecule ligands: Relationship to the quality of individual TCR signaling events. *J Immunol.* 1999; 162(4):2073-80.
185. Drake DR, Ream RM, Lawrence CW, Braciale TJ. Transient loss of MHC class I tetramer binding after CD8+ T cell activation reflects altered T cell effector function. *J Immunol.* 2005; 175(3):1507-15.
186. Kjer-Nielsen L, Clements CS, Brooks AG, Purcell AW, Fontes MR, McCluskey J, Rossjohn J. The structure of HLA-B8 complexed to an immunodominant viral determinant: peptide-induced conformational changes and a mode of MHC class I dimerization. *J Immunol.* 2002; 169(9):5153-60.
187. Steele JC, Roberts S, Rookes SM, Gallimore PH. Detection of CD4(+)- and CD8(+)-T-cell responses to human papillomavirus type 1 antigens expressed at various stages of the virus life cycle by using an enzyme-linked immunospot assay of gamma interferon release. *J Virol.* 2002; 76(12):6027-36.
188. Brookes RH, Hill PC, Owiafe PK, Ibanga HB, Jeffries DJ, Donkor SA, Fletcher HA, Hammond AS, Lienhardt C, Adegbola RA, McShane H, Hill AV. Safety and immunogenicity of the candidate tuberculosis vaccine MVA85A in West Africa. *PLoS One.* 2008; 3(8):e2921.
189. Addo MM, Yu XG, Rathod A, Cohen D, Eldridge RL, Strick D, Johnston MN, Corcoran C, Wurcel AG, Fitzpatrick CA, Feeney ME, Rodriguez WR, Basgoz N, Draenert R, Stone DR, Brander C, Goulder PJ, Rosenberg ES, Altfeld M, Walker BD. Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *J Virol.* 2003; 77(3):2081-92.
190. Lissina A, Ladell K, Skowera A, Clement M, Edwards E, Seggewiss R, van den Berg HA, Gostick E, Gallagher K, Jones E, Melenhorst JJ, Godkin AJ, Peakman M, Price DA, Sewell AK, Wooldridge L. Protein kinase inhibitors substantially improve the physical detection of T-cells with peptide-MHC tetramers. *J Immunol Methods.* 2009; 340(1): 11-24.
191. Williams AP, Peh CA, Purcell AW, McCluskey J, Elliott T. Optimization of the MHC class I peptide cargo is dependent on tapasin. *Immunity.* 2002; 16(4):509-20.
192. Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Lamoreaux L, Nguyen R, Ambrozak D, Koup RA, Roederer M. Amine reactive dyes: an effective tool to discriminate live and dead cells in polychromatic flow cytometry. *J Immunol Methods.* 2006; 313(1-2):199-208.
193. Cocchi F, DeVico AL, Yarchoan R, Redfield R, Cleghorn F, Blattner WA, Garzino-Demo A, Colombini-Hatch S, Margolis D, Gallo RC. Higher macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta levels from CD8+ T cells are associated with asymptomatic HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(25):13812-7.
194. Peters PJ, Borst J, Oorschot V, Fukuda M, Krähenbühl O, Tschopp J, Slot JW, Geuze HJ. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med.* 1991; 173(5):1099-109.
195. Lichterfeld M, Yu XG, Waring MT, Mui SK, Johnston MN, Cohen D, Addo MM, Zaunders J, Alter G, Pae E, Strick D, Allen TM, Rosenberg ES, Walker BD, Altfeld M. HIV-1-specific cytotoxicity is preferentially mediated by a subset of CD8(+) T cells producing both interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Blood.* 2004; 104(2):487-94.
196. Harari A, Celleraï C, Enders FB, Köstler J, Codarri L, Tapia G, Boyman O, Castro E, Gaudieri S, James I, John M, Wagner R, Mallal S, Pantaleo G. Skewed association of polyfunctional antigen-specific CD8 T cell populations with HLA-B genotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(41):16233-8.

197. Makedonas G, Hutnick N, Haney D, Amick AC, Gardner J, Cosma G, Hersperger AR, Dolfi D, Wherry EJ, Ferrari G, Betts MR. Perforin and IL-2 upregulation define qualitative differences among highly functional virus-specific human CD8 T cells. *PLoS Pathog.* 2010; 6(3):e1000798.
198. Perosa F, Scudeletti M, Imro MA, Dammacco F, Indiveri F. Human CD4-internal antigen anti-idiotypic monoclonal antibody: induction of a CD4-specific response in humans. *J Immunol.* 1996; 156(9):3563-9.
199. Korber BTM, Brander C, Haynes BF, Koup R, Kuiken C, Moore JJ, Walker BD, Watkins DI. HIV molecular immunology 2002. Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics, Group T-10.

### Internetquellen und Hilfsmittel

1. <http://elchtools.de/index.html>; Cell Line Database, Abt. Immunologie, Auf der Morgenstelle 15 in Tübingen, Pierre Van Der Bruggen, LICR Brussels, Material transfer agreement. (Stand 01/2009).
2. <http://elchtools.de/index.html>; Cell Line Database, Abt. Immunologie, Auf der Morgenstelle 15 in Tübingen, Arbeitsgruppe Dr. Cécile Gouttefangeas. (Stand 08/2008).
3. <http://www.syfpeithi.de> (Stand 01/2008-05/2008)
4. <http://expasy.org/sprot> (Stand 01/2008-05/2008) und ( AS-Position, Stand 16.6.2011)
5. <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/allele.html> (Stand 01/2008)
6. <http://www.genscript.com/codon-opt.html> (Stand 14.05.2009)
7. <http://www.bioinformatics.org/primerx/> (Stand 29.06.2009)
8. Antikörper von Arbeitsgruppe Prof. Dr. Alexander Steinle
9. [http://www.clontech.com/images/pt/dis\\_vectors/PT3413-5.pdf](http://www.clontech.com/images/pt/dis_vectors/PT3413-5.pdf) (Stand 20.04.2011)

## Danksagung

Ein großer Dank gilt meinem Doktorvater/Betreuer, Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee, für gute Ratschläge und die Möglichkeit, diese Doktorarbeit am Institut für Zellbiologie in der Abteilung Immunologie durchführen zu können.

Ich danke Frau Prof. Dr. Dorothee Wernet für die Organisation von Buffy Coats und Leukapheresen, Herr Dr. Hans-Jörg Bühring für die Gewährung der FACS Aria und Frau Sabrina Treml für die Sortierung von Proben.

Danke schön an Patricia Hršćić und Nicole Zuschke für die Synthese von Peptiden.

Für Ratschläge bei der molekularbiologischen Arbeit, vielen Dank an Beate Pömmmerl und Dr. Ludger Grosse-Hovest.

Bei Claudia Falkenburger und Oliver Drews möchte ich mich für MS-Kontrollmessungen von Peptidproben und Monomerproben bedanken.

Vielen Dank an Michael Durben für das Korrekturlesen von dem molekularbiologischen Teil im Kapitel Material und Methoden.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für die gute Zusammenarbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei den vielen Blutspendern.

Ich möchte mich bei dem Graduiertenkolleg 794 für die Finanzierung durch ein dreijähriges Stipendium bedanken.