

**Aus dem Department für
Diagnostische Labormedizin der Universität Tübingen**

**Institut für Medizinische Virologie und
Epidemiologie der Viruskrankheiten**

**Identifikation neuer CD8⁺ T-Zellepitope
des Respiratorischen Synzytial-Virus
zur Anwendung in der Immuntherapie**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Burbulla, Daniel

2018

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. G. Jahn
2. Berichterstatterin:	Privatdozentin Dr. H. Häberle
3. Berichterstatter:	Professor Dr. T. Herrmann
Tag der Disputation:	03.08.2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	9
1.1 Respiratorisches Synzytial-Virus	9
1.1.1 Epidemiologie	9
1.1.2 Virale Struktur	9
1.1.3 Replikationszyklus	10
1.1.4 Klinik	11
1.1.5 Immunpathologie	11
1.2 Immunsystem	13
1.2.1 Angeborenes und adaptives Immunsystem	13
1.2.2 Haupthistokompatibilitätskomplex	14
1.2.3 T-Zellen	15
1.3 Therapie und Prävention einer RSV-Infektion	19
1.3.1 Therapie	19
1.3.2 Passive Immunisierung	19
1.3.3 Entwicklung einer aktiven Immunisierung	20
1.3.4 Peptid-basierte RSV-Impfstoffe	22
1.4 Zielsetzung der Arbeit	24
2 Material und Methoden	25
2.1 Material	25
2.1.1 Antibiotika	25
2.1.2 Antikörper	25
2.1.3 Bakterien	26
2.1.4 Blutspender	26
2.1.5 Chemikalien und Reagenzien	27
2.1.6 Enzyme	28
2.1.7 Geräte	29
2.1.8 Kommerzielle Kits	30
2.1.9 Onlinetools	30
2.1.10 Peptide	30
2.1.11 Polynukleotide	31
2.1.12 Primer	32
2.1.13 Puffer und Lösungen	32
2.1.14 Software	34
2.1.15 Standards	34
2.1.16 Streptamere	34
2.1.17 Vektoren	34
2.1.18 Verbrauchsmaterialien	35
2.1.19 Virussequenz	35
2.1.20 Zelllinien	36
2.1.21 Zytokine	36

2.2	Methoden	37
2.2.1	Software-basierte Methoden	37
2.2.2	Herstellung von Vektoren zur retroviralen Transduktion	38
2.2.3	Kultivierung von Zelllinien	42
2.2.4	Kultivierung von PBMCs	44
2.2.5	SDS-PAGE	47
2.2.6	Western Blot	48
2.2.7	Durchflusszytometrie	49
2.2.8	IFN- γ ELISPOT Assay	50
2.2.9	Polymerase-Kettenreaktion	51
3	Ergebnisse	53
3.1	Auswahl vorhergesagter RSV-Peptidpitope	53
3.2	Stabilisierung von HLA-Molekülen durch potenzielle RSV-Peptidpitope	54
3.2.1	Stabilisierung von Peptid-HLA-Multimeren	54
3.2.2	Expression transduzierter Peptid-HLA-Single-Chain-Moleküle auf K15-Zellen	56
3.3	Durchflusszytometrische Analyse RSV-spezifischer T-Zellen	58
3.3.1	Identifikation RSV-spezifischer T-Zellen	58
3.3.2	Detektion RSV-spezifischer T-Gedächtniszellen	60
3.4	Funktionelle Analyse peptid-spezifischer T-Zellen	62
3.4.1	Freisetzung von IFN- γ durch RSV-spezifische T-Zellen	62
3.4.2	Funktionelle Analyse von HCMV-seronegativen und -seropositiven Spendern	63
4	Diskussion	65
4.1	Überblick	65
4.2	Detektion RSV-spezifischer T-Zellen mittels Peptid-HLA-Multimeren . .	66
4.3	Phänotypisierung RSV-spezifischer T-Gedächtniszellen	67
4.4	Funktionelle Charakterisierung RSV-spezifischer T-Zellen	68
4.5	Ausblick	69
5	Zusammenfassung	70
6	Literaturverzeichnis	71
7	Erklärung zum Eigenanteil	80
8	Veröffentlichungen	81
9	Danksagung	82
10	Anhang	83

Abkürzungsverzeichnis

β_2 m	β_2 -Mikroglobulin
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
ddH ₂ O	2-fach deionisiertes Wasser
deut.	deutsch
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii
FCS	Fetales Kälberserum
FI-RSV	Formalin-inaktivierte RSV-Virionen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter
g	Gramm
h	Stunde
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HF	High-Fidelity
HLA	Human Leukocyte Antigen
HRP	Meerrettichperoxidase
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
K15	K562-mbIL-15-4-1BBL
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Lysogeny broth
m/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MCS	Multiple Cloning Site
MFI	Mean Fluorescence Intensity

Abkürzungsverzeichnis

mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
min.	mindestens
min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
ml	Milliliter
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mol	Mol
NaN ₃	Natriumazid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
nmol	Nanomol
ORF	Open Reading Frame
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohemagglutinin
pmol	Picomol
RNA	Ribonukleinsäure
RSV	Respiratorisches Synzytial-Virus
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SFCs	Spot Forming Cells
sog.	sogenannt
SSC	Side Scatter
T _{CM}	zentrale T-Gedächtniszellen
T _{EM}	Effektor-T-Gedächtniszellen
T _{H1} -Zellen	T-Helferzellen Typ 1
T _{H2} -Zellen	T-Helferzellen Typ 2
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor- β
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
u.a.	und andere
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
x g	Vielfaches der Fallbeschleunigung

Abkürzungsverzeichnis

z.B. zum Beispiel
°C Grad Celsius

1. Einleitung

1.1 Respiratorisches Synzytial-Virus

1.1.1 Epidemiologie

Das humane Respiratorische Synzytial-Virus (RSV) ist der häufigste Auslöser einer unteren Atemwegsinfektion bei Kindern und Neugeborenen sowie eine weit verbreitete Krankheitsursache bei Immungeschwächten und älteren Erwachsenen (Falsey *et al.*, 2005; Nair *et al.*, 2010; Resch *et al.*, 2009). Das Virus wurde erstmals 1955 bei Schimpansen mit Erkältungssymptomen isoliert und kurz darauf ebenfalls als Krankheitserreger beim Menschen identifiziert (Blount *et al.*, 1956; Chanock *et al.*, 1957). Die Übertragung erfolgt typischerweise durch Tröpfchen- bzw. Schmierinfektion, wobei die meisten Infektionen während der kalten Wintermonate stattfinden und fast jedes Kind innerhalb der ersten beiden Lebensjahre mindestens einmal mit RSV infiziert wird. Das Virus vermittelt dabei keine dauerhafte Immunität und Reinfektionen sind bereits nach kurzer Zeit erneut möglich (Glezen *et al.*, 1986; Hall, Walsh *et al.*, 1991; Handforth *et al.*, 2004). Obwohl die meisten RSV-Infektionen mild verlaufen, treten regelmäßig schwerwiegende Krankheitsverläufe auf, die eine stationäre Behandlung der Patienten erforderlich machen. Weltweit erkranken pro Jahr mehr als 33 Millionen Kinder unter 5 Jahren an einer RSV-assoziierten Infektion der unteren Atemwege, wobei ca. 3,4 Millionen stationär behandelt werden müssen und bis zu 199 000 versterben - 99 % davon in Ländern der dritten Welt (Nair *et al.*, 2010). In der älteren Bevölkerung (> 65 Jahre) erkranken jährlich 3–7 % der gesunden Erwachsenen und 4–10 % der Erwachsenen mit Vorerkrankungen an einer RSV-Infektion (Falsey *et al.*, 2005). Die wichtigsten Risikofaktoren stellen dabei insbesondere Frühgeburtlichkeit, ein Alter jünger als 6 Monate, angeborene Herz-, Lungen- oder Neuromuskuläre Erkrankungen sowie Immunsuppression dar (Resch *et al.*, 2009; Hall, Weinberg *et al.*, 2009). Die Zulassung des monoklonalen Antikörpers Palivizumab im Jahr 1998 ermöglichte bei Kindern mit erhöhten Risikofaktoren eine Reduktion der RSV-assoziierten Krankenhauseinweisungen um bis zu 55 % (IMPact-RSV Study Group, 1998).

1.1.2 Virale Struktur

RSV ist ein behülltes, einzelsträngiges, negativ-orientiertes RNA-Virus aus der Familie der Paramyxoviridae. Ein Virion besteht aus einem Nukleokapsid sowie einer von der Wirtszelle abstammenden Lipidmembran, die das Nukleokapsid umhüllt. RSV-Virionen sind unregelmäßig sphärisch bzw. filamentös geformt, besitzen einen Durchmesser von 100 bis 350 nm und können eine Länge von bis zu 10 µm aufweisen. Die Virushülle ist

1. Einleitung

auf der Innenseite eng mit dem Matrixprotein M assoziiert und enthält außerdem drei als Oligomere vorliegende Transmembranproteine: das Fusionsprotein F, das Glykoprotein G sowie das Small Hydrophobic-Protein SH. Aufgrund der ausgeprägten genetischen Variabilität des G-Proteins werden zwei Subtypen, A und B, unterschieden. Das Genom des Virus besitzt ca. 15,2 kbp und enthält 10 linear angeordnete Gene, die für 11 virale Proteine kodieren. Es ist vollständig an das Nukleoprotein N gebunden und bildet in Assoziation mit dem Phosphoprotein P, dem M2-1 Protein sowie der Polymerase L das Nukleokapsid des Virus. Die Nicht-Strukturproteine NS1 und NS2 sowie das M2-2 Protein besitzen eine immunmodulatorische Wirkung (Knipe *et al.*, 2013).

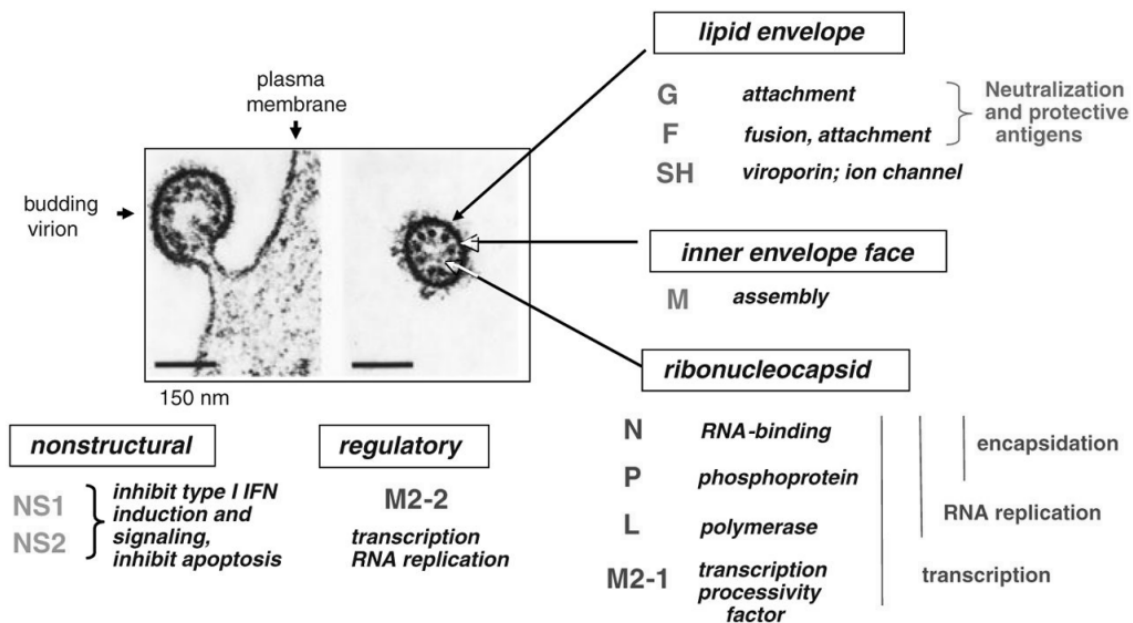


Abb. 1.1: Elektronenmikroskopische Darstellung eines ausknospenden (a) und eines freien (b) RSV-Virions

Angegeben ist die jeweilige Funktion bzw. Lokalisation der RSV-Proteine. Veränderte Abbildung nach Collins *et al.* (2013).

1.1.3 Replikationszyklus

Die Replikation von RSV findet in der obersten Zellschicht des respiratorischen Lungenepithels statt und wird durch die Anheftung des Virions an die Wirtszellmembran eingeleitet. Dies geschieht vorzugsweise durch F- bzw. G-Protein vermittelte Bindung von zellulären Glykosaminglykanen und membranständigem Nukleolin (Tayyari *et al.*, 2011; Hallak *et al.*, 2000). Durch F-Protein induzierte Fusion der Lipidmembranen von Virion und Wirtszelle bzw. durch Clathrin-vermittelte Endozytose gelangt das Nukleokapsid anschließend in die Wirtszelle (Kolokoltssov *et al.*, 2007). Die im Zytosol der Wirtszelle

stattfindende Transkription des viralen Genoms wird durch einen einzelnen am 3'-Ende des Genoms lokalisierten Promoter initiiert. Jedes Gen wird dabei in eine separate mRNA transkribiert. Bedingt durch Reinitiationsfehler der Polymerase weist die Transkription mit zunehmendem Abstand vom Promoter einen leichten Expressionsgradienten auf (Collins *et al.*, 1983). Die Translation der 11 viralen mRNAs findet an den Ribosomen der Wirtszelle statt. Als Transkriptionvorlage für die negativ-orientierten Tochter-Genome fungiert ein positiv-orientiertes Anti-Genom des Virus, welches durch die virale Polymerase synthetisiert wird. Der Assembling-Prozess findet bei polarisierten Zellen an der apikalen Zellmembran statt und geht mit einer lokalen Anreicherung Membran-assoziiierter Virusproteine in der Lipidmembran einher. Die Ausknospung reifer Virionen findet unter Ausbildung viraler Filamente statt und beginnt ca. 10–12 h nach der Wirtszellinfektion (Knipe *et al.*, 2013).

1.1.4 Klinik

Die klinischen Symptome einer RSV-Infektion sind äußerst vielfältig und reichen von einer einfachen Erkältung bis hin zu einer lebensgefährlichen Infektion der unteren Atemwege. Neben unspezifischen Symptomen wie Fieber, Dehydratation und Lethargie treten abhängig von der Lokalisation weitere Symptome auf. Bei Kindern sind RSV-Infektionen meist auf die oberen Atemwege begrenzt und führen typischerweise zu Symptomen wie Schnupfen, Husten und Heiserkeit, gelegentlich treten auch eine Pharyngitis oder Mittelohrentzündung auf. Sind die unteren Atemwege betroffen, stehen Symptome der respiratorischen Insuffizienz wie Atemnot, Tachypnoe, Zyanose, thorakale Einziehungen und periphere Lungenüberblähung im Vordergrund. Der Übergang zwischen Bronchitis, Bronchiolitis und viraler Pneumonie ist fließend (Tregoning *et al.*, 2010).

1.1.5 Immunpathologie

Die Entwicklung eines sicheren und effektiven RSV-Impfstoffs wurde maßgeblich durch das Auftreten RSV-assoziiierter Immunpathologien erschwert, welche sowohl bei einer natürlichen RSV-Infektion als auch bei frühen Impfstoffen auftreten können (Graham *et al.*, 1991; Ostler, Davidson *et al.*, 2002; Openshaw *et al.*, 2013). Erstmals beschrieben wurde die Immunpathologie in den 1960er Jahren bei Kindern, die mit Formalin-inaktivierten, vollständigen RSV-Virionen (FI-RSV) geimpft wurden und bei einer darauffolgenden natürlichen RSV-Infektion einen unerwartet schweren Krankheitsverlauf aufwiesen. 80 % der geimpften Kinder mussten stationär behandelt werden, zwei starben (Kim *et al.*, 1969). Typische Merkmale der Immunpathologie stellen dabei insbesondere Ödeme, Nekrosen sowie zelluläre Infiltrationen des Lungengewebes dar (Openshaw *et al.*, 2013). T-Zellen

sind sowohl beim Menschen als auch im Mausmodell von entscheidender Bedeutung für die Elimination einer RSV-Infektion (Cannon *et al.*, 1988; Graham *et al.*, 1991). So sind beispielsweise Kinder mit gestörter T-Zellfunktion häufiger von schwerwiegenden RSV-Infektionen betroffen und ein Mangel an zytotoxischen T-Zellen in der Lunge geht mit einer erhöhten Letalität einher (Hall, Powell *et al.*, 1986; Welliver *et al.*, 2007). Trotz der zentralen Rolle bei der Viruselimination sind CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen ebenfalls mit dem Auftreten von Immunpathologien assoziiert (Cannon *et al.*, 1988; Graham *et al.*, 1991; Ostler, Davidson *et al.*, 2002; Simmons *et al.*, 2001). Insbesondere bei Mäusen scheint dabei eine T_H2-vermittelte Aktivierung CD4⁺ T-Zellen mit dem Auftreten einer Immunpathologie und einer damit einhergehenden pulmonalen Eosinophilie verbunden zu sein (Alwan *et al.*, 1992; Connors *et al.*, 1992). Obwohl CD8⁺ T-Zellen ebenso mit einer immunpathologischen Wirkung assoziiert sind, haben Versuche im Mausmodell gezeigt, dass eine T_H1-vermittelte Aktivierung CD8⁺ T-Zellen vor dem Auftreten einer Immunpathologie schützen kann (Hussell *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2012; Olson *et al.*, 2008).

1.2 Immunsystem

1.2.1 Angeborenes und adaptives Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen hat die Aufgabe, diesen vor Mikroorganismen, giftigen Substanzen sowie pathologisch veränderten Körperzellen zu schützen und wird in das angeborene sowie das adaptive Immunsystem eingeteilt. Die Zellen des angeborenen Immunsystems, zu denen u.a. Makrophagen, neutrophile und dendritische Zellen gehören, vermitteln einen schnellen und wirksamen Schutz gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Krankheitserreger. Pathogene Erreger werden dabei beispielsweise durch Rezeptoren erkannt, die gegen repetitive Strukturen, sog. Pathogen-assoziierte molekulare Muster, gerichtet sind und auf der Oberfläche der meisten Erreger vorkommen. Auf diese Weise identifizierte Erreger werden anschließend von phagozytierenden Abwehrzellen aufgenommen und zerstört. Durch Sekretion immunmodulatorischer Chemokine und Zytokinen kommt es gleichzeitig zu einer lokalen Entzündungsreaktion, welche mit der Einwanderung weiterer Leukozyten sowie dem Einstrom von Lymphflüssigkeit einhergeht. Letzteres ist insbesondere für den Transport von Pathogenen und Antigen-präsentierenden Zellen in die Lymphknoten von Bedeutung und ermöglicht die Aktivierung des adaptiven Immunsystems.

Anders als das angeborene Immunsystem verfügt das adaptive Immunsystem über die Fähigkeit, Krankheitserreger spezifisch zu erkennen und auch ein langfristiges, immunologisches Gedächtnis aufzubauen. Die Zellen des adaptiven Immunsystems gehen aus einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle hervor und werden in B- bzw. T-Zellen eingeteilt. B-Zellen sind Teil des humoralen Immunsystems und wandern nach ihrer Differenzierung im Knochenmark in die peripheren lymphatischen Organe des Körpers. Erkennt eine B-Zelle mittels B-Zell-Rezeptor ihr spezifisches Antigen, wird diese aktiviert und differenziert zu einer Vielzahl identischer Plasmazellen. Die von Plasmazellen produzierten und in den extrazellulären Raum sekretierten Antikörper besitzen dabei dieselbe Spezifität wie der Rezeptor der B-Zelle. Antikörper vermitteln ihre Wirkung im Organismus durch Neutralisation und Opsonierung pathogener Erreger sowie durch Aktivierung des Komplementsystems. Im Rahmen der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität werden sie außerdem durch Fc-Rezeptoren erkannt, welche u.a. auf NK-Zellen exprimiert werden. Mit dem Ende einer Infektion sterben die meisten Plasmazellen durch Einleiten der Apoptose ab und nur wenige differenzieren zu langlebigen B-Gedächtniszellen, welche das immunologische Gedächtnis des Körpers vermitteln (Murphy *et al.*, 2009).

Die Entwicklung und Funktion von T-Zellen ist in Kap. 1.2.3 dargestellt.

1.2.2 Haupthistokompatibilitätskomplex

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex, MHC) ist ein auf Chromosomen 6 lokalisierter Genlocus, welcher für die α -Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls sowie die α - und β -Kette des MHC-Klasse-II-Moleküls kodiert. MHC-Moleküle sind eine Gruppe von Glykoproteinen, deren Aufgabe darin besteht, sowohl körpereigene als auch körperfremde Peptide zu binden und diese in Form von Peptid:MHC-Komplexen auf der Zelloberfläche zu präsentieren. Die auf diese Weise präsentierten Peptide können anschließend von T-Zellen mittels T-Zell-Rezeptor gebunden und erkannt werden. MHC-Moleküle unterliegen einer ausgeprägten Polymorphie und Polygenie, wodurch die Präsentation einer Vielzahl unterschiedlicher Peptidantigene möglich ist. Neben den beiden Hauptklassen, MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II, werden innerhalb des HLA-Systems (Human Leukocyte Antigen) weitere Unterklassen unterschieden.

MHC-Klasse-I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen des Körpers exprimiert und von $CD8^+$ T-Zellen mittels T-Zell-Rezeptor erkannt. Strukturell bestehen die Moleküle aus zwei heterogenen Polypeptidketten, einer großen, transmembranären α -Kette sowie dem kleineren, nicht polymorphen β_2 -Mikroglobulin (β_2m) (Abb. 1.2). Die α -Kette wird in drei Domänen (α_1 bis α_3) eingeteilt und bildet auf der Membran-abgewandten Seite einen peptid-bindenden Spalt. Die auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentierten Peptide besitzen eine Länge von 8-11 Aminosäuren und können sowohl von der Wirtszelle selbst als auch von intrazellulär lebenden Viren und Bakterien stammen.

Die typischerweise nur auf B-Zellen, Makrophagen sowie dendritischen Zellen exprimierten MHC-Klasse-II-Moleküle werden von $CD4^+$ T-Zellen erkannt. Im Gegensatz zu MHC-Klasse-I-Molekülen bestehen MHC-Klasse-II-Moleküle aus zwei, etwa gleich großen, transmembranären Glykoproteinen, welche beide an der Bildung des peptid-bindenden Spalts beteiligt sind (Abb. 1.2). Die auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentierten Peptide können eine Länge von 13 oder mehr Aminosäuren aufweisen und stammen überwiegend aus intrazellulären Vesikeln, die durch Phagozytose aus dem extrazellulären Raum aufgenommen worden sind (Murphy *et al.*, 2009).

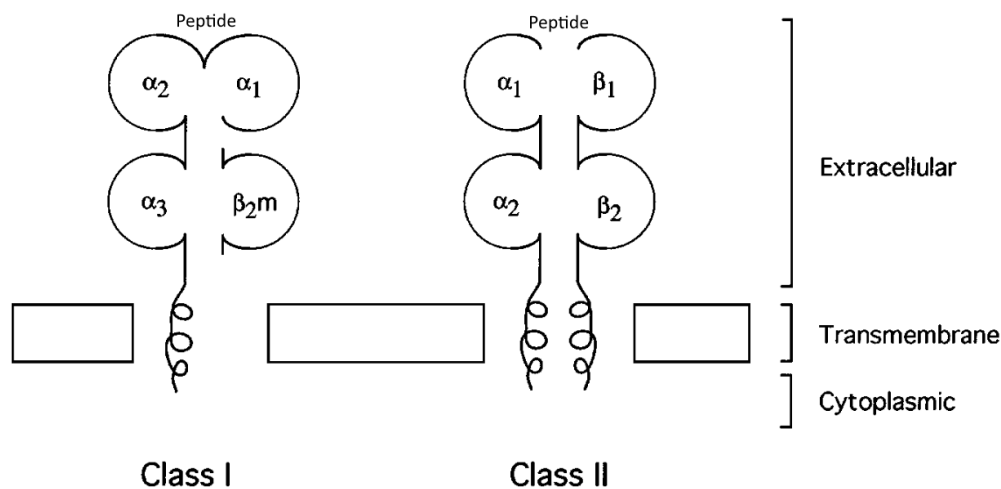


Abb. 1.2: Schematische Darstellung eines MHC-Klasse-I- bzw. MHC-Klasse-II-Moleküls

β_{2m} = β_2 -Mikroglobulin. Veränderte Abbildung nach Hughes *et al.* (1998).

1.2.3 T-Zellen

1.2.3.1 Entwicklung und Differenzierung

Die Entwicklung von T-Zellen beginnt im Knochenmark, wo diese, ebenso wie B-Zellen, aus einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle hervorgehen. Die noch unreifen Zellen wandern anschließend zur Reifung und Differenzierung über die Blutbahn in den Thymus und werden deshalb auch als Thymus-abhängige (T-) Zellen bezeichnet. Im Thymus erhalten die T-Vorläuferzellen ein vom Thymusstroma ausgehendes Signal, welches die Differenzierung zu einer der drei T-Zell-Linien, $\alpha:\beta$ -, $\gamma:\delta$ - sowie NK-T-Zellen, einleitet. Die Population der $\alpha:\beta$ -T-Zellen stellt dabei die größte Subpopulation dar und kann im weiteren Verlauf zusätzlich in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen unterteilt werden. Zentraler Bestandteil der weiteren Entwicklung ist die Umlagerung der Gene des T-Zell-Rezeptors, welche in mehreren Stadien abläuft und dem adaptiven Immunsystem ermöglicht eine Vielzahl unterschiedlicher Peptidantigene spezifisch zu erkennen. War die Umlagerung erfolgreich, beginnen die T-Vorläuferzellen den entsprechenden T-Zell-Rezeptor zu exprimieren und durchlaufen einen zweistufigen Prozess der Antigen-abhängigen Selektion. So erhalten bei der positiven Selektion nur jene Zellen ein Überlebenssignal, welche vom Thymus exprimierte Selbst-Peptid:Selbst-MHC-Komplexe erkennen können. Die zu diesem Zeitpunkt noch doppelt-positiven ($CD4^+$, $CD8^+$) T-Zellen stellen anschließend die Expression von einem der beiden Corezeptormoleküle ein und werden zu einfach-positiven $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen. In der darauffolgenden negativen Selektion überleben wiederum nur jene T-Zellen, welche eine ausreichende Immuntoleranz gegenüber präsentierten

Autoantigenen besitzen. Insgesamt überleben nur knapp 2 % der doppelt-positiven T-Zellen diesen zweifachen Selektionsprozess. Die reifen, naiven T-Zellen verlassen anschließend den Thymus und bilden in den peripheren lymphatischen Organen das T-Zell-Repertoire des Körpers (Murphy *et al.*, 2009).

1.2.3.2 Priming

Der Begriff Priming (deut. Prägung) bezeichnet die Differenzierung reifer, naiver T-Zellen zu T-Effektorzellen, wenn diese zum ersten Mal auf ihr spezifisches Antigen treffen und durch eine Antigen-präsentierende Zelle korrekt aktiviert werden. Reife, naive T-Zellen wandern auf der Suche nach ihrem spezifischen Antigen durch die lymphatischen Organe des Körpers und binden vorübergehend an jede Antigen-präsentierende Zelle, der sie begegnen. Erkennt eine naive T-Zelle ihr spezifisches, auf einem Peptid:MHC-Komplex präsentiertes Antigen, bleibt die Bindung bestehen und der Prozess des Primings wird eingeleitet. Neben der Interaktion des T-Zell-Rezeptors sowie der Corezeptormoleküle CD4 bzw. CD8 mit dem entsprechenden Peptid:MHC-Komplex spielen dabei weitere costimulatorische Reize eine entscheidende Rolle. In dieser Hinsicht am besten untersucht ist die Interaktion des B7-Moleküls mit dem auf der T-Zelloberfläche exprimierten Molekül CD28. B7-Moleküle werden ausschließlich auf Zellen exprimiert, die für die Proliferation von T-Zellen verantwortlich sind und vermitteln eine vermehrte Synthese des T-Zell-Wachstumsfaktors Interleukin (IL)-2 durch die T-Zellen selbst. Während korrekt aktivierte T-Zellen anschließend eine Phase der Proliferation durchlaufen, gehen die nicht korrekt aktivierten T-Zellen zum Schutz vor Autoimmunerkrankungen durch Apoptose unter (Murphy *et al.*, 2009).

1.2.3.3 CD4⁺ T-Zellen

CD4⁺ T-Zellen sind eine heterogene Gruppe von T-Zellen, die durch die Expression des Corezeptormoleküls CD4 definiert sind. Die Zellen erkennen auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentierte Peptide und können anhand der Sekretion unterschiedlicher Zytokine in vier große Subpopulationen eingeteilt werden.

Die Aufgabe von T-Helferzellen Typ 1 (T_H1-Zellen) besteht darin, Makrophagen bei der Zerstörung phagozytierter Erreger zu unterstützen und die Produktion von Antikörpern zu stimulieren, welche gegen extrazelluläre Erreger gerichtet sind. T_H1-Zellen vermitteln ihre Wirkung insbesondere durch Freisetzung von Interferon- γ (IFN- γ) und IL-2. Die Differenzierung zu T-Helferzellen Typ 2 (T_H2-Zellen) wird maßgeblich durch IL-4 begünstigt, wobei T_H2-Zellen selbst, durch die Freisetzung von IL-4 und -5 charakterisiert sind. T_H2-Zellen sind von entscheidender Bedeutung bei der Aktivierung naiver B-Zellen sowie für die Produktion von IgE-Antikörpern, welche neben der Abwehr von Parasiten, auch

für das Auftreten von Allergien verantwortlich sind. $CD4^+$ T-Zellen, die zwar IL-17, aber weder $IFN-\gamma$ noch IL-4 freisetzen, werden als T_H17 -Zellen bezeichnet und spielen eine zentrale Rolle beim Anlocken neutrophiler Granulozyten zum Ort einer Entzündung. Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) stellen die vierte große Subpopulation $CD4^+$ T-Effektorzellen dar und bewirken im Gegensatz zu den anderen $CD4^+$ T-Effektorzellen keine Aktivierung, sondern eine Hemmung der Immunreaktion. Sie vermitteln ihre Wirkung u.a. durch Freisetzung inhibitorischer Zytokine wie IL-10 sowie dem transformierenden Wachstumsfaktor- β (TGF- β) (Murphy *et al.*, 2009).

1.2.3.4 $CD8^+$ T-Zellen

$CD8^+$ T-Effektorzellen differenzieren im Rahmen des Primings aus reifen, naiven $CD8^+$ T-Zellen und werden auch als zytotoxische T-Zellen bezeichnet. Sie sind gegen Peptide gerichtet, die auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden und beispielsweise von Viren oder anderen intrazellulär lebenden Erregern abstammen. Anders als naive $CD8^+$ T-Zellen sind differenzierte T-Effektorzellen in der Lage, auch ohne costimulatorische Signale ihre zytotoxische Wirkung zu entfalten. Diese besteht insbesondere aus der gezielten Freisetzung zytotoxischer Effektormoleküle wie Granzym, Perforin und Granulysin sowie der Sekretion immunmodulatorischer Zytokine wie $IFN-\gamma$ und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Letztere vermitteln ihre Wirkung insbesondere durch Hemmung der viralen Replikation sowie durch Aktivierung umliegender Makrophagen (Murphy *et al.*, 2009).

1.2.3.5 T-Gedächtniszellen

Die Entwicklung von T-Gedächtniszellen ermöglicht dem adaptiven Immunsystem schneller und effektiver auf Pathogene zu reagieren, mit denen es bereits einmal konfrontiert wurde. Mit dem Ende einer Infektion gehen die meisten T-Effektorzellen durch Apoptose unter und nur einige wenige Antigen-spezifische T-Zellen bleiben als langlebige T-Gedächtniszellen erhalten. T-Gedächtniszellen sind von costimulatorischen Signalen weitgehend unabhängig und können anhand spezifischer Oberflächenmoleküle sowie der sekretierten Zytokine in Subgruppen eingeteilt werden. Zentrale T-Gedächtniszellen (T_{CM}) exprimieren typischerweise den Oberflächenmarker CD45RO sowie die Rezeptoren CCR7 und CD62L, welche für die Wanderung der Zellen in die sekundären lymphatischen Organe von Bedeutung sind. Unmittelbar nach erneutem Antigenkontakt vermitteln T_{CM} keine oder nur eine sehr geringe Immunität und produzieren, nach ihrer Wanderung in die sekundären lymphatischen Organe, hauptsächlich IL-2. Erst nach einer Phase der erneuten Differenzierung zu T-Effektorzellen sind T_{CM} in der Lage, größere Mengen an $IFN-\gamma$ ($CD8^+$) bzw. IL-4 ($CD4^+$) freizusetzen. Anders als T_{CM} können Effektor-T-Gedächtniszellen (T_{EM}) schneller auf eine erneute Infektion reagieren und wandern zu

1. Einleitung

diesem Zweck in das entzündlich veränderte Gewebe ein. Vor Ort vermitteln T_{EM} ihre Wirkung insbesondere durch Freisetzung von IFN- γ , IL-4 sowie IL-5. Die Expression der Oberflächenmoleküle CD27 und CD28 ermöglicht einen Rückschluss auf den Grad der Differenzierung unterschiedlicher T-Zellpopulationen. Während CD28 sowohl auf naiven T-Zellen als auch einigen T-Gedächtniszellen exprimiert wird, ist die vermehrte Expression von CD28 mit einer reduzierten zytolytischen Aktivität assoziiert (Appay *et al.*, 2002; Murphy *et al.*, 2009; Sallusto *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 2007).

1.3 Therapie und Prävention einer RSV-Infektion

1.3.1 Therapie

Die Therapie einer RSV-Infektion erfolgt abhängig von den Symptomen bzw. dem Allgemeinzustand des Patienten. Da bis heute keine effektive kausale Therapie zur Verfügung steht, kommt der supportativen Therapie eine besondere Bedeutung zu. Patienten mit milden Symptomen wie Schnupfen, Husten und Heiserkeit können ambulant betreut werden und benötigen keine spezifische Therapie. Durch abschwellende Nasentropfen sowie entzündungshemmende Schmerzmittel kann das subjektive Krankheitsgefühl reduziert und eine ausreichende orale Nahrungs- bzw. Flüssigkeitszufuhr erleichtert werden. Mit dem Auftreten einer respiratorischen Insuffizienz, Dehydratation oder Lethargie sollte eine stationäre Aufnahme und engmaschige Überwachung in Betracht gezogen werden. Abhängig vom klinischen Verlauf kann u.a. die Gabe von Sauerstoff, eine mechanische Atemwegsicherung sowie die intravenöse Flüssigkeitszufuhr notwendig werden (Tregoning *et al.*, 2010; Knipe *et al.*, 2013). Eine routinemäßige Anwendung inhalativer Bronchodilatoren oder systemischer bzw. inhalativer Kortikosteroide wird nicht empfohlen, kann allerdings im Rahmen individueller Therapieversuche, insbesondere bei Patienten mit erhöhten Risikofaktoren, erwogen werden. Auch die Gabe von Antibiotika sollten nur bei gesicherter bakterieller Koinfektion erfolgen (Turner *et al.*, 2014). Das einzige kausal gegen RSV wirksame Medikament ist das Virostatikum Ribavirin. Ribavirin hemmt die virale RNA-Replikation und kann sowohl intravenös als auch inhalativ verabreicht werden. Obwohl die Anwendung von Ribavirin einen positiven Einfluss auf die Beatmungsdauer bzw. Liegezeit der Patienten aufwies, bleibt die Therapie, nicht zuletzt aufgrund der potenziellen Nebenwirkungen, einer komplexen inhalativen Applikation sowie der hohen Kosten, umstritten (Turner *et al.*, 2014; Ventre *et al.*, 2010). Die Anwendung des monoklonalen Antikörpers Palivizumab zur Therapie einer bestehenden RSV-Infektion wurde in Einzelfällen, insbesondere bei Patienten mit erhöhten Risikofaktoren und persistierender RSV-Infektion, erfolgreich durchgeführt (Santos *et al.*, 2012). Eine generelle Empfehlung zur Anwendung von Palivizumab zur Therapie zwecken liegt jedoch nicht vor (Hu *et al.*, 2010; Turner *et al.*, 2014).

1.3.2 Passive Immunisierung

Eine Möglichkeit, das Risiko einer RSV-Infektion zu senken, ist die passive Immunisierung mit RSV-spezifischen Antikörpern. Der erste Impfstoff dieser Art wurde 1996 unter dem Namen RSV-IGIV (RespiGam, MedImmune) auf den Markt gebracht und aus dem Blut gesunder Spender mit hohen RSV-Antikörpertitern gewonnen. Die passive Immu-

nisierung wurde Kindern mit Frühgeburtlichkeit oder chronischen Lungenerkrankungen während der RSV-Saison monatlich intravenös verabreicht und führte zu einer Reduktion RSV-assoziiertes Krankenhausesweisungen um 41–63 % (Groothuis *et al.*, 1993; The PREVENT Study Group, 1997). Trotz guter Wirksamkeit wies der Impfstoff einige Nachteile auf, darunter Interaktionen mit parallel verabreichten Lebendimpfstoffen, das Risiko einer Übertragung von Infektionskrankheiten sowie eine aufwendige intravenöse Applikationsweise. Die Anwendung von RSV-IGIV wurde mit der Zulassung von Palivizumab obsolet (Meissner *et al.*, 2003). Palivizumab (Synagis, MedImmune) ist ein im Jahr 1998 zugelassener, monoklonaler Antikörper, der gegen das virale Fusionsprotein gerichtet ist und sowohl intravenös als auch intramuskulär appliziert werden kann. Die passive Immunisierung mit Palivizumab reduzierte das Risiko einer RSV-assoziierten Krankenhausesweisung bei Neugeborenen und Kindern um 55 % (IMpact-RSV Study Group, 1998). Bedingt durch die monatlich erforderlichen Auffrischungen sowie die damit verbundenen Kosten, bleibt die Immunisierung mit Palivizumab zur Zeit Kindern mit erhöhten Risikofaktoren vorbehalten (Roedl-Wiedmann *et al.*, 2003; Isaacs, 2013). Der durch 13 Punktmutationen aus Palivizumab hervorgegangene monoklonale Antikörper Motavizumab (MedImmune) wurde ebenfalls zur Prophylaxe einer RSV-Infektion entwickelt und zeigte *in vitro* eine 70-fach stärkere Proteinbindung sowie *in vivo* eine bessere Effektivität bei niedriger Dosierung (Wu *et al.*, 2007). In einer durchgeführten Phase-III-Studie wies die Immunisierung mit Motavizumab eine mit Palivizumab vergleichbare Wirksamkeit bei der Reduzierung RSV-assoziiertes Krankenhausesweisungen auf (Weisman, 2009). Bedingt durch einen 3-fach höheren Anteil nicht-lebensbedrohlicher Hypersensitivitätsreaktionen und einer nicht überlegenen Wirksamkeit wurde die Zulassung von Motavizumab in den USA abgelehnt (Lowry, 2010). Ziel neuerer Studien ist u.a. die Entwicklung protektiver Antikörper wie MEDI8897, welche gegen das virale Pre-Fusionprotein gerichtet sind und eine verlängerte Halbwertszeit aufweisen (Griffin *et al.*, 2017).

1.3.3 Entwicklung einer aktiven Immunisierung

In der Vergangenheit wurde die Entwicklung eines aktiven Impfstoffs gegen RSV durch verschiedene Gründe erschwert, sodass bis heute keine aktive Immunisierung zur Verfügung steht (Anderson *et al.*, 2013; Graham, 2011; Murata, 2009; Openshaw *et al.*, 2013). Zum einen vermittelt RSV, im Gegensatz zu vielen anderen Viren, keine dauerhafte Immunität und Reinfektionen sind bereits nach kurzer Zeit erneut möglich (Glezen *et al.*, 1986; Hall, Walsh *et al.*, 1991). Zwar können RSV-spezifische Antikörper vor einer Infektion schützen, dieser Schutz bleibt allerdings unvollständig und nicht alle Menschen mit hohen Antikörpertitern sind zuverlässig vor einer RSV-Infektion geschützt, während einige mit niedrigen Antikörpertitern immun sind (DeVincenzo *et al.*, 2010; Hall, Walsh *et al.*,

1991; Openshaw *et al.*, 2013). Die Entwicklung wurde außerdem durch das Auftreten einer Impfstoff-assoziierten Immunpathologie erschwert, welche erstmals in den 1960er Jahren bei Kindern beobachtet wurde, die mit Formalin-inaktivierten, vollständigen RSV-Virionen (FI-RSV) geimpft wurden (Kim *et al.*, 1969). Insbesondere bei Neugeborenen und Säuglingen stellt das noch unreife Immunsystem sowie im kindlichen Blut vorhandene mütterliche Antikörper eine zusätzliche Herausforderung dar. Von besonderem Interesse ist die Entwicklung eines aktiven RSV-Impfstoffs insbesondere für Schwangere, RSV-naive Kinder sowie ältere Erwachsene (Anderson *et al.*, 2013; Graham, 2016; Murata, 2009). Bis heute wurden eine Vielzahl unterschiedlicher Impfstrategien gegen RSV entwickelt und erprobt, darunter u.a. inaktivierte Totimpfstoffe, attenuierte bzw. chimäre Lebendimpfstoffe, Subunit-Impfstoffe sowie Vektor- und Partikel-basierte Impfstoffe (Graham, 2016). Zur Zeit befinden sich mehrere Impfstoffe in unterschiedlichen Phasen der klinischen Entwicklung (Rezaee *et al.*, 2017). Eine Möglichkeit, insbesondere RSV-naive Kinder vor einer RSV-Infektion zu schützen, stellt die Immunisierung mit attenuierten bzw. chimären Lebendimpfstoffen dar. Diese aus genetisch modifizierten, replikationsfähigen Viren bestehenden Impfstoffe werden sowohl vom angeborenen als auch adaptiven Immunsystem erkannt und weisen insgesamt eine gute Verträglichkeit auf. Obwohl Lebendimpfstoffe nicht mit dem Auftreten Impfstoff-assoziierten Immunpathologien verbunden sind, stellt die Balance zwischen Immunogenität und Grad der Attenuierung nach wie vor eine Herausforderung dar (Anderson *et al.*, 2013; Karron *et al.*, 2013). Ein zur Zeit viel beachtetes Forschungsfeld ist die maternale Immunisierung, welche das Ziel verfolgt, Neugeborene und Säuglinge während der ersten Lebensmonate durch diaplazentare Übertragung mütterlicher Antikörper vor einer RSV-Infektion zu schützen (Mullard, 2016; Stensballe *et al.*, 2009). Der zu diesem Zweck bereits bei gesunden, gebärfähigen Frauen getestete Nanopartikel-basierte Impfstoff RSV-F (Novavax) zeigte einen signifikanten Anstieg protektiver Antikörper und wies insgesamt eine gute Verträglichkeit auf (Glenn *et al.*, 2016). Die Durchführung einer entsprechenden Phase-III-Studie an gesunden, schwangeren Frauen zur maternalen Immunisierung findet zur Zeit statt (Novavax Clinical Stage Pipeline, 2017). Derselbe Impfstoff zeigte in einer Phase-II-Studie bei älteren Erwachsenen ebenfalls vielversprechende Ergebnisse. Im Rahmen einer Phase-III-Studie verfehlte der Impfstoff allerdings die primären und sekundären Ziele zur Prävention einer RSV-assoziierten Atemwegsinfektion (Johnson, 2016). Die Anwendung von Vektor-basierter Impfstoffen stellt eine weitere mögliche Impfstrategie dar und wird aktuell u.a. auf Basis attenuierter Pockenimpfviren (Green *et al.*, 2015) sowie modifizierten Adenoviren des Schimpansen (ChAd155-RSV, GlaxoSmithKline) erprobt.

1.3.4 Peptid-basierte RSV-Impfstoffe

Eine Möglichkeit, eine protektive Immunität gegen RSV zu induzieren, stellt die selektive Aktivierung RSV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen durch einen peptid-basierten RSV-Impfstoff dar. CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen spielen sowohl im Mausmodell als auch beim Menschen eine zentrale Rolle bei der Elimination von RSV und können eine langfristige Immunität vermitteln (Cannon *et al.*, 1988; Graham *et al.*, 1991; Jozwik *et al.*, 2015; Ostler und Ehl *et al.*, 2002). Parallel dazu sind beispielsweise Kinder mit gestörter T-Zellfunktion häufiger von schwerwiegenden RSV-Infektionen betroffen und ein Mangel an zytotoxischen T-Zellen in der Lunge geht mit einer erhöhten Letalität einher (Hall, Powell *et al.*, 1986; Welliver *et al.*, 2007). In Analogie dazu, kann eine persistierende RSV-Infektion bei Mäusen durch adaptiven T-Zelltransfer beendet werden (Cannon *et al.*, 1988; Ostler, Davidson *et al.*, 2002). Obwohl CD8⁺ T-Zellen ebenfalls eine immunpathologische Wirkung vermitteln können, scheint im Mausmodell eine T_H1-vermittelte Aktivierung CD8⁺ T-Zellen das Auftreten einer Immunpathologie zu verhindern (Hussell *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2012; Olson *et al.*, 2008; Srikiatkachorn *et al.*, 1997). So wiesen BALB/c-Mäusen, welche u.a. mit dem immundominanten RSV-Peptid SYIGSINNI geimpft wurden, eine signifikant höhere Frequenz RSV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen auf und waren sowohl vor eine RSV-Infektion als auch vor dem Auftreten einer Immunpathologie geschützt (Lee *et al.*, 2012; Shao *et al.*, 2011). Von besonderer Bedeutung für eine effiziente virale Elimination scheint außerdem eine hohe Affinität der Peptidepitope zu den entsprechenden MHC-Molekülen zu sein, während gleichzeitig eine niedrige Affinität mit dem Auftreten von Immunpathologien assoziiert ist (Jessen *et al.*, 2011). Bedingt durch die mit inaktivierten Totimpfstoffen assoziierte Immunpathologie, welche bei RSV-naiven Kindern und Neugeborenen auftreten kann, sowie dem Fehlen einer Antikörper-vermittelten Immunität steht die Anwendung eines peptid-basierten RSV-Impfstoffs insbesondere bei der Immunisierung älterer Erwachsener im Vordergrund (Anderson *et al.*, 2013). Um bei der Verwendung von Subunit-basierten Impfstoffen eine ausreichende Aktivierung des Immunsystems hervorzurufen ist meist die Kombination mit immunstimulatorischen Adjuvantien erforderlich (Bastola *et al.*, 2017). Von besonderer Bedeutung ist hierbei die Aktivierung Antigen-präsentierender Zellen und eine damit verbundene Induktion der zell-vermittelte Immunität (Plummer *et al.*, 2011). Bereits zugelassene Adjuvantien, welche auf diese Weise u.a. zu einer Aktivierung von T_H1- und zytotoxischen T-Zellen führen, sind u.a. Öl/Wasser-Emulsionen sowie Virus-ähnliche Partikel (VLPs) (Bastola *et al.*, 2017; Mohsen *et al.*, 2017). Im Rahmen von Tierversuchen und klinischen Studien wurde außerdem Erfahrung wie TLR-Liganden, QS21, ISCOMs, Liposomen und Virus-basierten Nanopartikeln gesammelt (Barrios *et al.*, 2012; McKee *et al.*, 2010; Plummer *et al.*, 2011; Uchida, 2011). Bis heute wurden nur wenige MHC-Klasse-I-restringierte Peptidepitope

1. Einleitung

des Respiratorisches Synzytial-Virus beschrieben (Brandenburg *et al.*, 2000; Goulder *et al.*, 2000; Heidema *et al.*, 2004; Rock *et al.*, 2003; Terrosi *et al.*, 2007; Venter *et al.*, 2003). Die Identifikation und Charakterisierung neuer RSV-Peptidepitope stellt daher die Grundlage zur Entwicklung eines peptid-basierten RSV-Impfstoffs dar.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das humane Respiratorische Synzytial-Virus ist der häufigste Auslöser einer unteren Atemwegsinfektion bei Kindern und Neugeborenen sowie eine weit verbreitete Krankheitsursache bei Immungeschwächten und älteren Erwachsenen. Obwohl seit 1998 eine passive Immunisierung mit dem monoklonalen Antikörper Palivizumab möglich ist, bleibt die Entwicklung neuer Therapie- und Präventionsmaßnahmen gegen RSV von hoher medizinischer Bedeutung. Die Entwicklung eines aktiven RSV-Impfstoffs wurde in Vergangenheit maßgeblich durch das Fehlen einer dauerhaften Immunität sowie dem Auftreten einer Impfstoff-assoziierten Immunpathologie erschwert. Zytotoxische T-Zellen sind sowohl im Mausmodell als auch beim Menschen von zentraler Bedeutung für die Elimination einer RSV-Infektion und können das Auftreten einer RSV-assoziierten Immunpathologie verhindern. Eine Möglichkeit, eine langfristige, protektive Immunität gegen RSV zu vermitteln, stellt die selektive Aktivierung RSV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen durch einen peptid-basierten RSV-Impfstoff dar. Bis heute wurden nur wenige MHC-Klasse-I restrizierte Peptidepitope des Virus beschrieben. Ziel dieser Arbeit ist daher die Identifikation und Charakterisierung neuer Peptidepitope des Respiratorischen Synzytial-Virus, die zur Anwendung in einem peptid-basierten RSV-Impfstoff in Frage kommen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antibiotika

Bezeichnung	Hersteller
Ampicillin, 100 mg/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin, 10000 Units/ μ l / Streptomycin, 10 mg/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Puromycin, 10 mg/ml	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

2.1.2 Antikörper

Tab. 2.1: Antikörper - Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Klon	Herkunft	Fluorochromfarbstoff	Hersteller
Anti-Human CD3	HIT3a	Maus	APC	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Anti-Human CD28	CD28.2	Maus	FITC	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Anti-Human CD45RO	UCHL1	Maus	APC	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Anti-Human HLA-ABC	W6/32	Maus	PE	eBioscience Inc., San Diego, USA
IgG2a κ Isotyp	eBM2a	Maus	–	eBioscience Inc., San Diego, USA

Tab. 2.2: Antikörper - Westernblot

Bezeichnung	Klon	Herkunft	Konjugat	Hersteller
Anti-Maus IgG	polyklonal	Ziege	HRP	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA

Tab. 2.3: Antikörper - ELISPOT

Bezeichnung	Klon	Herkunft	Konjugat	Hersteller
Anti-IFN- γ Primärantikörper	1-D1K	Maus	–	Mabtech AB, Nacka Strand, Schweden
Anti-IFN- γ Sekundärantikörper	7-B6-1	Maus	Biotin	Mabtech AB, Nacka Strand, Schweden

2. Material und Methoden

Tab. 2.4: Antikörper - gekoppelt mit MicroBeads

Bezeichnung	Hersteller
CD45RO MicroBeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland

2.1.3 Bakterien

Bezeichnung	Herkunft / Zur Verfügung gestellt von:
One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Mykoplasma-positiver Zellkulturüberstand	Elke Straub, Universität Tübingen, Deutschland

2.1.4 Blutspender

Die in dieser Arbeit verwendeten Buffy Coats wurden aus dem Blut gesunder Blutspender gewonnen und vom Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Tübingen zur Verfügung gestellt. Dasselbe Institut führte auch eine low-resolution HLA-Typisierung und HCMV-Serotypisierung aller Spender durch. Die Verwendung menschlicher Blutprodukte erfolgte mit Genehmigung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Tübingen (Günther, 2016).

2.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Acrylamidlösung Rotiphorese Gel30	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Agarose, SeaKem LE	Lonza Rockland, Inc., Rockland, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ampuwa (ddH ₂ O)	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland
BCIP/NBT-Tablette	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Coomassie-Brillant-Blau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Essigsäure	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
FugeneHD	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Glycerin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
LB-Agar, Luria/Miller	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium, Lennox	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Methanol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver, fettarm	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Protein A/G UltraLink Resin	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Hexadimethrin-bromid (Polybrene)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ponceau S	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

2. Material und Methoden

2.1.6 Enzyme

Bezeichnung		Konjugat	Hersteller
Alkaline Phosphatase	(700–2300 Units/mg)	Streptavidin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BamHI	(10000 Units/ml)	–	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
EcoRI-HF	(20000 Units/ml)	–	New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
SbfI-HF	(20000 Units/ml)	–	New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
T4 DNA Ligase	(5000 Units/ml)	–	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
XhoI	(10000 Units/ml)	–	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

2. Material und Methoden

2.1.7 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Bakterienschüttelinkubator, Certomat IS	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Dampfsterilisator, Systec 2540EL	Tuttnauer Europe B.V., Breda, Niederlande
Durchflusszytometer, FACSCalibur	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Eismaschine, Scotsman AF 100	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
Elektrophorese-System, EasyCast B1A	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
ELISPOT-Lesegerät, Immunospot	Cellular Technology Limited, Shaker Heights, USA
Eppendorfszentrifuge, MinispinPlus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Feinwaage, KERN GJ	KERN & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Fotospektrometer, NanoDrop1000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Fluoreszenzmikroskop, Axiovert 200	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Flüssigstickstoffgefriertruhe, Taylor-Wharton Type M505CE	Taylor Wharton Germany GmbH, Minnetonka, USA
Gammacell 1000 Elite	Nordion Inc., Ottawa, Kanada
Gefrierschrank, HERAfreeze –86 °C	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Gel iX Imager	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Heraeus CO ₂ Inkubator BBD 6220	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Heraeus Inkubator 6000	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Inkubationsbad 1002	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Mikrowelle, Micromat	Electrolux Hausgeräte GmbH, Nürnberg, Deutschland
Netzgerät, POWERPAC 3000	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Neubauer-Zählkammer	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Pipetboy acu	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
QuadroMACS Separator	Miltenyi Biotec Inc., Auburn, USA
Schüttelbrett, UNIMAX 1010	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
SDS-Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Sicherheitsarbeitsbank, HERAsafe	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Thermozykler, PTC-200	MJ Research Inc., St. Bruno, Kanada
Tischheizblock, Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Überkopfschüttler, Reax 2	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
UV-Strahler, NU-72 KL	Benda Konrad Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland
Vakuumbaabsaugsystem, VACUSAFE	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Vortexgerät, Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA
Wasseraufbereiter, Milli-Q UF Plus	EMD Millipore, Billerica, USA
Western Blot-Lesegerät, Odyssey Fc	LI-COR Biotechnology, Lincoln, USA
Western Blot-Transferkammer, Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Zentrifuge, Rotina 48R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland

2. Material und Methoden

2.1.8 Kommerzielle Kits

Bezeichnung	Hersteller
GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
NucleoSpin Plasmid	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Pierce TMB Substrate Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

2.1.9 Onlinetools

Bezeichnung	URL
Addgene Analyze Sequence	http://www.addgene.org/analyze-sequence
NCBI tblastn	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=tblastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
NetMHC 3.4 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/
OligoAnalyzer 3.1	http://eu.idtdna.com/calc/analyzer
SMS Protein Molecular Weight	http://www.bioinformatics.org/sms2/protein_mw.html

2.1.10 Peptide

HLA-Restriktion	Peptidsequenz	Konzentration	Lösungsmittel
HLA-A*01	FSECNALGSY	20 mg/ml	DMSO
	ISDYFHNTY	20 mg/ml	DMSO
	STELNYNHLY	10 mg/ml	1:1 DMSO/ddH ₂ O
HLA-A*02	FLTEAIVHSV	20 mg/ml	DMSO
	NLVPMVATV	40 mg/ml	DMSO
	YLLPAIVHI	20 mg/ml	DMSO
	YLSELLNSL	20 mg/ml	DMSO
HLA-B*07	KPNYQRKPL	20 mg/ml	DMSO
	MPVYNRQVL	20 mg/ml	DMSO
	YPASIKKVL	20 mg/ml	DMSO

Das Peptid YLLPAIVHI wurde freundlicherweise von der AG Stevanović, Institut für Immunologie, Universität Tübingen zur Verfügung gestellt. Alle anderen Peptide wurden von der Firma GeneCust Europe S.A., Dudelange, Luxemburg bezogen. Die Lagerung erfolgte in Aliquots bei -80°C .

2. Material und Methoden

2.1.11 Polynukleotide

Tab. 2.5: Polynukleotidsequenzen potenzieller HLA-A*01 restringierter RSV-Peptidepitope. Die Linkersequenzen zur Ligation in Peptid-HLA-Multimer-Konstrukte sind fett dargestellt.

Peptid	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
FSECNALGSY	FSECfor	TCGAGGCT TTTCTCAGAATGTAATGCTTTAGGAAGTTAT GGAGGTG
	FSECrev	GATCCACCTCC ATAA CTT CCTAAAGCATTACATTCTGAGAA AGCC
FTGLIGMLY	FTGLfor	TCGAGGCT TTTCACTGGGTTAATAGGTATGTTATAT GGAGGTG
	FTGLrev	GATCCACCTCC ATATAACATACCTATTAACCCAGTGAA AGCC
ISDYFHNTY	ISDYfor	TCGAGGCT TATATCTGACTATTTTCATAATACTTAC GGAGGTG
	ISDYrev	GATCCACCTCC GTAAGTATTATGAAAATAGTCAGATAT AGCC
LSDSTMTNY	LSDSfor	TCGAGGCT CTAAGCGATTCAACAATGACCAACTAT GGAGGTG
	LSDSrev	GATCCACCTCC ATAGTTGGTCATTGTTGAATCGCTTAG AGCC
STELNYNHLY	STELfor	TCGAGGCT TTCAACAGA ACT AAACTATAACCATTTATAT GGAGGTG
	STELrev	GATCCACCTCC ATATAAATGGTTATAGTTT AGTTCTGTTGAAGCC
VTDNKGAFKY	VTDNfor	TCGAGGCT GTGACTGATAATAAAGGAGCATTCAAATAC GGAGGTG
	VTDNrev	GATCCACCTCC GTATTTGAATGCTCCTTTATTATCAGTCAC AGCC

Tab. 2.6: Polynukleotidsequenzen potenzieller HLA-A*02 restringierter RSV-Peptidepitope. Die Linkersequenzen zur Ligation in Peptid-HLA-Multimer-Konstrukte sind fett dargestellt.

Peptid	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
FLTEAIVHSV	FLTEfor	TCGAGGCT TTTTTTGACAGAGGCTATAGTTCATAGTGTA GGAGGTG
	FLTErev	GATCCACCTCC TACACTATGAACTATAGCCTCTGTCAAAAA AGCC
KLSEILGML	KLSEfor	TCGAGGCT TAAATTAAGTGAAATACTAGGAATGCTT GGAGGTG
	KLSErev	GATCCACCTCC AAGCATTCTAGTATTTCACTTAATTT AGCC
YLSELLNSL	YLSEfor	TCGAGGCT TATCTAAGTGAATTGTTAAACAGCTT GGAGGTG
	YLSErev	GATCCACCTCC CAAGCTGTTTTAACAATTCACCTAGATA AGCC
YMLTNSSELL	YMLTfor	TCGAGGCT TACATGCTAACAAACAGTGAGTTACTAG GGAGGTG
	YMLTrev	GATCCACCTCC TAGTAACTCACTGTTTGTTAACATGTA AGCC

Tab. 2.7: Polynukleotidsequenzen potenzieller HLA-B*07 restringierter RSV-Peptidepitope. Die Linkersequenzen zur Ligation in Peptid-HLA-Multimer-Konstrukte sind fett dargestellt.

Peptid	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
KPNYQRKPL	KPNYfor	TCGAGGCT AAGCCCAATTATCAAAGAAAACCGCTAG GGAGGTG
	KPNYrev	GATCCACCTCC TAGCGGTTTTCTTTGATAAATGGGCTT AGCC
LPRFMNYTL	LPRFfor	TCGAGGCT CTACCAAGGTTTATGAATTATACTCTG GGAGGTG
	LPRFrev	GATCCACCTCC CAGAGTATAATTCATAAACCTTGGTAG AGCC
MPVYNRQVL	MPVYfor	TCGAGGCT ATGCCAGTTTACAATAGACAAGTTTTAG GGAGGTG
	MPVYrev	GATCCACCTCC TAAACTTGTCTATTGTAAACTGGCAT AGCC
YPASIKKVL	YPASfor	TCGAGGCT TATCCTGCAAGTATCAAGAAAGTCCTAG GGAGGTG
	YPASrev	GATCCACCTCC TAGGACTTTCTTGATACTTGCAGGATA AGCC

2. Material und Methoden

Alle Polynukleotide wurden von der Firma Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, Deutschland hergestellt. Die Polynukleotide wurden in ddH₂O zu einer Konzentration von 100 pmol/μl resuspendiert und in Aliquots bei –20 °C gelagert.

2.1.12 Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Hersteller
MW28	CCAGACTCCTACGGGAGGCA	Biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
MW29	TGCGAGCATACTACTCAGGC	Biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
PSI-forward	CACGTGAAGGCTGCCGACC	Biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland

Alle Primer wurden in ddH₂O zu einer Konzentration von 100 pmol/μl gelöst und in Aliquots bei –20 °C gelagert.

2.1.13 Puffer und Lösungen

Tab. 2.8: Fertige Puffer und Lösungen

Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CutSmart Puffer, 10X	New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
DNA-Ladepuffer, 6X	VWR International GmbH, Erlangen, Deutschland
Dulbecco's modified Eagle Medium, GlutaMAX (DMEM)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Dulbecco's phosphate-buffered saline, ohne Ca ²⁺ , ohne Mg ²⁺ (DPBS)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
FACS-Clean, -Rinse, -Flow	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
T4 DNA Ligase Puffer, 10X	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Tango Puffer, 10X	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
TBE, Gelelektrophorese-Puffer, 10x	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
TBS (Tris Buffered Saline) 10x, pH 7,5	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2. Material und Methoden

Tab. 2.9: Hergestellte Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Anealingpuffer	2 mmol/l Tris-HCl in 50 mmol/l NaCl, pH 7,5
Coomassie-Lösung	10 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 1 % (m/v) Coomassie-Brillant-Blau in ddH ₂ O
DMEM ⁺	10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin in DMEM
DPBS + BSA 0,5 %	0,5 % (v/v) BSA in DPBS
DPBS _{NaN₃}	10 mmol/l NaN ₃ in DPBS
DPBS + Tween20 0,01 %	0,01 % (v/v) Tween20 in DPBS
DPBS + Tween20 0,05 %	0,05 % (v/v) Tween20 in DPBS
Gefriermedium, 1X	10 % (v/v) DMSO in FCS
Gefriermedium, 2X	20 % (v/v) DMSO in FCS
LB-Medium	20 g/l LB-Medium, Lennox in dH ₂ O
LB-Agar	40 g/l LB-Agar, Luria/Miller in dH ₂ O
Milchpulverlösung	100 g/l Milchpulver in dH ₂ O
Ponceau S-Lösung	5 % (v/v) Essigsäure, 0,1 % (m/v) Ponceau S in ddH ₂ O
SDS-Laufpuffer	192 mmol/l Glycin, 25 mmol/l Tris-HCl, 0,1 % (m/v) SDS in ddH ₂ O, pH 8,3
SDS-Reduzierungspuffer	125 mmol/l Tris-HCl, 20 % (v/v) Glycerin, 10 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, pH 6,8, 4 % (m/v) SDS, 0,005 % (m/v) Bromphenolblau in ddH ₂ O
SDS-Sammelgelpuffer	0,5 mol/l Tris-HCl in ddH ₂ O, pH 6,8
SDS-Trenngelpuffer	1,5 mol/l Tris-HCl in ddH ₂ O, pH 8,8
SDS-Waschlösung	10 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure in ddH ₂ O
Western Blot-Transferpuffer	240 mmol/l Glycin, 25 mmol/l Tris-HCl, 20 % (v/v) Methanol in dH ₂ O

2. Material und Methoden

2.1.14 Software

Bezeichnung	Hersteller
Adobe Photoshop CS 8.0.1	Adobe Systems Inc., San Jose, USA
CellQuest Pro 6.0	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
GATCViewer 1.00	GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland
GraphPad Prism 4	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
Image Studio Software 1.0.17	LI-COR Biotechnology, Lincoln, USA
Immunospot 3.2	Cellular Technology Limited, Shaker Heights, USA
JabRef Version 2.10	JabRef Development Team
L ^A T _E X 2 _ε	LaTeX Project Team
Microsoft Office 2007	Microsoft Corp., Redmond, USA

2.1.15 Standards

Bezeichnung	Hersteller
DNA-Marker, peqGOLD, 100–10000 bp	VWR International GmbH, Erlangen, Deutschland
Proteinmarker, PageRuler, ungefärbt, 10–200 kDa	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

2.1.16 Streptamere

Bezeichnung	Fluorochromfarbstoff	Hersteller
Strep-Tactin	PE	IBA GmbH, Göttingen, Deutschland

2.1.17 Vektoren

Bezeichnung	Zur Verfügung gestellt von:
pMXsIPmultiNLVPa1	AG Dennehy, Universität Tübingen, Deutschland
pMXsIPmultiNLVPa2	AG Dennehy, Universität Tübingen, Deutschland
pMXsIPmultiNLVPb7	AG Dennehy, Universität Tübingen, Deutschland
pMXsIPscNLVPa2	AG Dennehy, Universität Tübingen, Deutschland

2. Material und Methoden

2.1.18 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
6-Well-Zellkulturplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
24-Well-Zellkulturplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
96-Well ELISpot-Platte	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Braunüle, Microlance 26G	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Falcon, 5 ml (FACS-Röhrchen)	Corning Inc., Corning, USA
Gefrieröhrchen, 2 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Laborflasche, 200 ml	DURAN Group GmbH, Mainz, Deutschland
Laborflasche, 500 ml	DURAN Group GmbH, Mainz, Deutschland
Laborflasche, 1000 ml	DURAN Group GmbH, Mainz, Deutschland
MACS Säule LS	Miltenyi Biotec Inc., Auburn, USA
Mikroreaktionsgefäß, 1,5 ml, Safe-lock (Eppendorfgefäß)	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Mikro-Röhrchen, 0,5 ml, SafeSeal (PCR-Reaktionsgefäß)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Petrischale 94x16 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Serologische Pipette, 2 ml	Corning Inc., Corning, USA
Serologische Pipette, 5 ml	Corning Inc., Corning, USA
Serologische Pipette, 10 ml	Corning Inc., Corning, USA
Serologische Pipette, 25 ml	Corning Inc., Corning, USA
Skalpell	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Spritze, 1 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Spritze, 5 ml	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Zellfilter, 0,45 µm	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Zellkulturflasche, 25 cm ² , 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflasche, 75 cm ² , 250 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflasche, 175 cm ² , 550 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugen-Filtereinheit, 100 kDa	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Zentrifugen-Röhrchen, 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugen-Röhrchen, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

2.1.19 Virussequenz

Bezeichnung	GenBank Accession Number:
RSV-rA2cp	AF035006.1

2. Material und Methoden

2.1.20 Zelllinien

Bezeichnung	Zur Verfügung gestellt von:
J558L	Wolfgang Schamel, Universität Freiburg, Deutschland
J558L HLA-A*01-LTDLGQNLLY	AG Dennehy, Universität Tübingen, Deutschland
J558L HLA-A*02-YLLPAIVHI	AG Dennehy, Universität Tübingen, Deutschland
J558L HLA-B*07-VPATGRTLVL	AG Dennehy, Universität Tübingen, Deutschland
K15 (Fujisaki <i>et al.</i> , 2009)	Dario Campana, St. Judes Children's Research Hospital, Memphis, USA
K15 HLA-B*07-VPATGRTLVL	AG Dennehy, Universität Tübingen, Deutschland
Phoenix-AMPHO	The Nolan Laboratory, Universität Stanford, USA

2.1.21 Zytokine

Bezeichnung	Hersteller
Interleukin-2	PeproTech Inc., Rocky Hill, USA

Alle Zytokine wurden in Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) zu einer Konzentration von 10 µg/ml gelöst und in Aliquots bei –80 °C gelagert.

2.2 Methoden

2.2.1 Software-basierte Methoden

2.2.1.1 Vorhersage potenzieller RSV-Peptidepitope

Zur Identifikation potenzieller RSV-Peptidepitope wurde das Onlinetool *NetMHC 3.4 Server* verwendet. Als Ausgangssequenz für die 11 Proteine des Virus diente das Genom des RSV-Stamms A2, basierend auf dem rekombinanten Stamm rA2cp (GenBank Accession Number: AF035006.1). Peptide mit einer Länge von 9 bzw. 10 Aminosäuren sowie einer theoretischen Bindungsaffinität von < 50 nmol/l zu einem der drei MHC-Klasse-I-Moleküle HLA-A*01, HLA-A*02 oder HLA-B*07 erfüllten die Auswahlkriterien (Burbulla *et al.*, 2016).

2.2.1.2 Modifikation der Polynukleotidsequenzen potenzieller RSV-Peptidepitope

Die kodierende Polynukleotidsequenz der potenziellen RSV-Peptidepitope wurde unter Anwendung des Onlinetools *NCBI tblastn* aus der Virussequenz RSV-rA2cp ermittelt. Zur Bestimmung der komplementären Polynukleotidsequenz wurde das Onlinetool *Addgene Analyze Sequence* verwendet. Um eine Ligation der Polynukleotidsequenzen in das entsprechende Peptid-HLA-Multimer-Konstrukt zu ermöglichen, wurden die Sequenzen in 5'- bzw. 3'-Richtung erweitert und mit Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *XhoI* und *BamHI* versehen (siehe Tab. 2.10). Intramolekulare Haarnadelstrukturen wurden mit dem Onlinetool *OligoAnalyzer 3.1* identifiziert und durch gezielte stille Mutationen im Bereich der Peptidsequenzen verhindert. Die Synthese aller Polynukleotide erfolgte durch die Firma Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, Deutschland (Greten *et al.*, 2002; Günther, 2016).

Tab. 2.10: Modifikation der Polynukleotidsequenzen potenzieller RSV-Peptidepitope

Die Polynukleotidsequenz eines potenziellen RSV-Peptidepitops ist zentral dargestellt und wurde in 5'- bzw. 3'-Richtung mit Linkersequenzen erweitert (Fett). Am 5'-Ende der kodierenden Nukleotidsequenz befindet sich die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *XhoI* bzw. am 3'-Ende für das Restriktionsenzym *BamHI* (Unterstrichen).
Tabelle modifiziert nach Günther (2016).

Bezeichnung	5'-Linker	Peptidsequenz	3'-Linker
XXXXfor	TCGAGGCT	kodierende Nukleotidsequenz	GGAGGTG
XXXXrev	GATCCACCTCC	komplementäre Nukleotidsequenz	AGCC

2.2.2 Herstellung von Vektoren zur retroviralen Transduktion

2.2.2.1 Grundlagen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Originalvektoren wurden von der AG Dennehy, Universität Tübingen, Deutschland hergestellt (Günther *et al.*, 2015) und basieren auf dem retroviralen Vektor pMXsIP, welcher vom murinen Leukämievirus (MMLV) abgeleitet wurde (Kitamura *et al.*, 2003). Zur Herstellung von Peptid-HLA-Multimer-Vektoren (Abb. 2.1, Abb. 2.2) wurde der Ausgangsvektor pMXsIP in der Multiple Cloning Site (MCS) um die Sequenz Peptid- β_2m -HLA-A*02-IgG1 erweitert (Greten *et al.*, 2002) und am C-terminalen Ende eine Twin Strep-tag-Region angefügt (Schmidt *et al.*, 2013). Vektoren, welche für membran-gebundene Single-Chain-Moleküle kodieren (Abb. 2.1, Abb. 2.2) enthalten die Sequenz Peptid- β_2m -HLA-A*02 (Greten *et al.*, 2002; Obermann *et al.*, 2007). Um einen einfachen Austausch der auf den MHC-Molekülen präsentierten Peptide zu ermöglichen, wurden die Peptidsequenzen von Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *XhoI* und *BamI* flankiert. Eine Restriktion mit den Enzymen *EcoRI* und *SbfI* ermöglicht einen Austausch der Peptid-HLA-Sequenzen zwischen Peptid-HLA-Multimer-Vektoren und Peptid-HLA-Single-Chain-Vektoren (Günther, 2016).

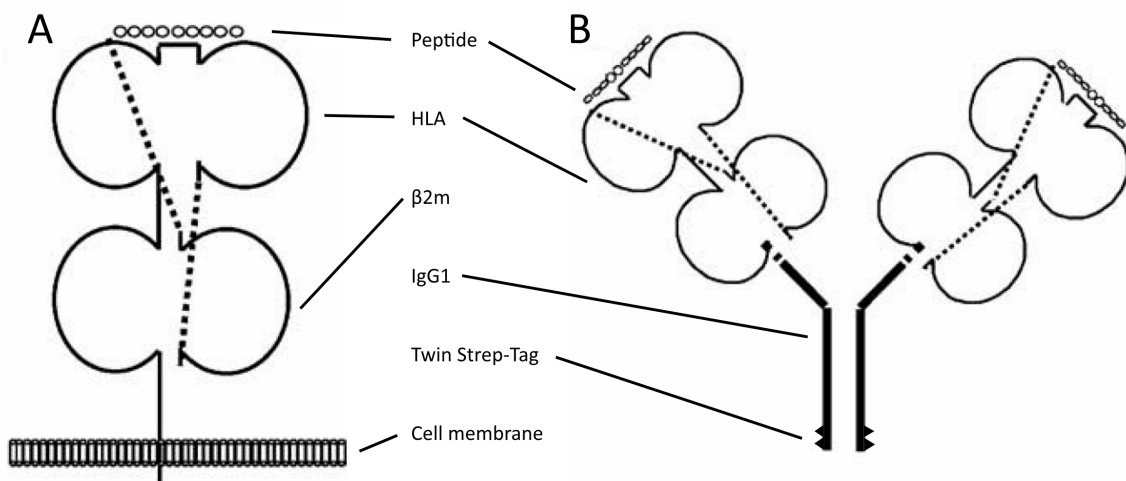


Abb. 2.1: Schematische Darstellung eines Peptid-HLA-Single-Chain-Moleküls (A) bzw. Peptid-HLA-Multimers (B)

Peptide = präsentiertes Peptidepitop; HLA = HLA-A*01, HLA-A*02 oder HLA-B*07; β_2m = β_2m , IgG1 = schwere IgG-Kette der Maus. Darstellung nicht maßstabsgetreu. Veränderte Abbildung nach Greten *et al.* (2002) und Günther (2016).

2. Material und Methoden

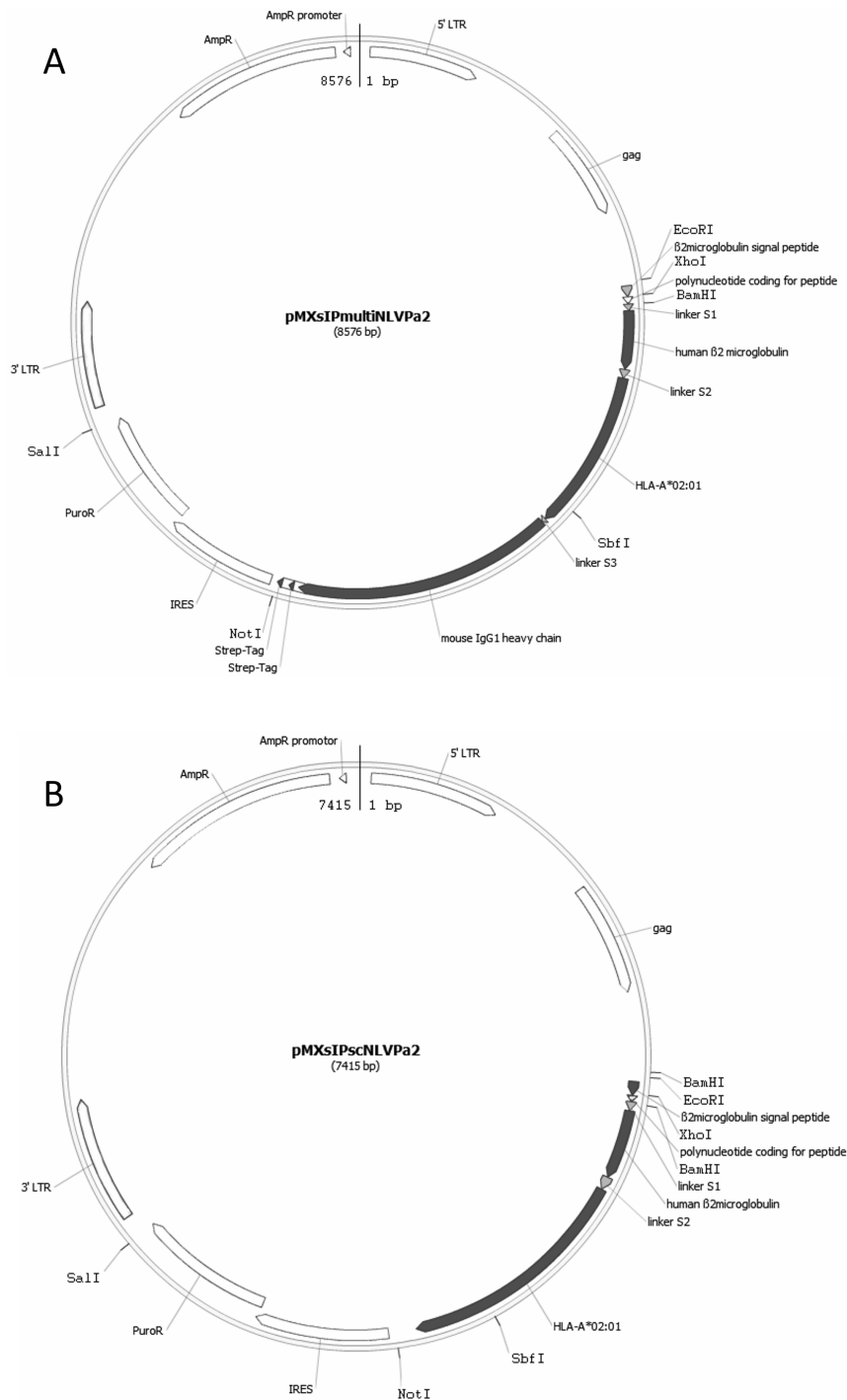


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Vektoren zur retroviralen Transduktion

(A) Originalvektor pMXsIPmultiNLVpa2, welcher zur Expression von Peptid-HLA-Multimeren verwendet wurde. (B) Originalvektor pMXsIPscNLVpa2, welcher zur Expression von membran-gebundenen Peptid-HLA-Single-Chain-Molekülen auf K15-Zellen verwendet wurde. Veränderte Abbildung nach Günther (2016).

2.2.2.2 Herstellung von Peptid-HLA-Multimer-Vektoren

Die Hybridisierung komplementärer Polynukleotide, welche für potenzielle RSV-Peptidepitope kodieren, erfolgte in einem Eppendorfgefäß bei 96 °C und einer Inkubationszeit von 5 min. Der zu diesem Zweck angesetzte Hybridisierungsansatz bestand aus jeweils 98 µl der in ddH₂O zu einer Konzentration von 100 pmol/µl resuspendierten Polynukleotide sowie 4 µl Analingpuffer, bestehend aus 2 mmol/l Tris-HCl in 50 mmol/l NaCl, pH 7,5. Der Ansatz wurde in einem Tischheizblock inkubiert und anschließend langsam abgekühlt. Die in den Originalvektoren vorhandenen Peptidsequenzen wurden durch restriktionsenzymatischen Verdau mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *BamHI* entfernt. Der Restriktionsansatz wurde in einem Eppendorfgefäß angesetzt und bestand bei einem Gesamtvolumen von 20 µl aus ca. 5 µg des entsprechenden Peptid-HLA-Multimer-Vektors, je 1000 Units/ml der Restriktionsenzyme *XhoI* und *BamHI* sowie 1x konzentriertem Puffer Tango. Die Inkubation fand für 90 min bei 37 °C statt. Zur Separation der Restriktionsprodukte mittels Gelelektrophorese wurde ein Agarose-Gel, bestehend aus 1 % (m/v) Agarose sowie 0,3 µg/ml Ethidiumbromid gelöst in 0,5x TBE-Puffer, verwendet. Die Elektrophorese der mit 1x konzentriertem DNA-Ladepuffer gemischten Restriktionsprodukte erfolgte für 90 min bei 90 V. Als Standard dienten 10 µl DNA-Marker. Die geschnittenen HLA-Multimer-Vektoren wiesen eine Größe von ca. 8500 kbp auf und wurden unter UV-Licht aus dem Gel herausgetrennt. Die Aufbereitung erfolgte unter Anwendung des *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up-Kits*, welches, mit Ausnahme der abschließenden Elution in 30 µl ddH₂O, gemäß dem Protokoll des Herstellers verwendet wurde. Die Ligation der hybridisierten Polynukleotide in den jeweiligen HLA-Multimer-Vektor erfolgte bei einem Gesamtvolumen von 30 µl in einem Eppendorfgefäß. Der Ligationsansatz bestand aus ca. 250 ng des aufgereinigten HLA-Multimer-Vektors, ca. 1 µg der hybridisierten Polynukleotide, 3 µl T4 Ligationspuffer sowie 3 µl T4 Ligase und wurde entweder für 90 min bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C inkubiert (Günther, 2016).

2.2.2.3 Herstellung von Peptid-HLA-Single-Chain-Vektoren

Die Herstellung von Peptid-HLA-Single-Chain-Vektoren, welche für potenzielle RSV-Peptidepitope kodieren, erfolgte durch Klonierung eines Insert des jeweiligen Peptid-HLA-Multimer-Vektors in den zuvor präparierten Peptid-HLA-Single-Chain-Vektor pMX-sIPscNLVpa2. Das Insert, bestehend aus Signalpeptid-Linker-Peptidsequenz-Linker-β2m-Linker-HLA, wurde durch restriktionsenzymatischen Verdau mit den flankierenden Enzymen *EcoRI* und *SbfI* aus dem Peptid-HLA-Multimer-Vektor herausgeschnitten. Der Restriktionsansatz, bestehend aus ca. 5 µg des entsprechenden Peptid-HLA-Multimer-Vektors, je 1000 Units/ml der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *SbfI* sowie 1x konzentriertem CutSmart Puffer, wurde bei einem Gesamtvolumen von 20 µl in einem Eppendorfgefäß

angesetzt und für 90 min bei 37 °C inkubiert. Die Auftrennung der Restriktionsprodukte erfolgte mittels Gelelektrophorese und wurde in einem Agarose-Gel, bestehend aus 1 % (m/v) Agarose sowie 0,3 µg/ml Ethidiumbromid gelöst in 0,5x TBE-Puffer, durchgeführt. Die Elektrophorese der mit 1x konzentriertem DNA-Ladepuffer gemischten Restriktionsprodukte erfolgt für 90 min bei 90 V. Als Standard dienten 10 µl DNA-Marker. Das Insert wies eine Größe von ca. 1200 kbp auf und wurde unter UV-Licht aus dem Gel herausgetrennt. Die Aufbereitung des Originalvektors pMXsIPscNLVpa2 erfolgte analog des Inserts, wobei der geschnittene Single-Chain-Vektor eine Größe von ca. 6200 kbp aufwies. Die Aufreinigung der Restriktionsprodukte erfolgte unter Anwendung des *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up*-Kits, welches, mit Ausnahme der abschließenden Elution in 30 µl ddH₂O, gemäß dem Protokoll des Herstellers verwendet wurde. Die Ligation des jeweiligen Inserts in den aufgereinigten Single-Chain-Vektor erfolgte bei einem Gesamtvolumen von 30 µl in einem Eppendorfgefäß. Der Ligationsansatz bestand aus ca. 250 ng des aufgereinigten Single-Chain-Vektors, ca. 1 µg des jeweiligen Inserts, 3 µl T4 Ligationspuffer sowie 3 µl T4 Ligase und wurde entweder für 90 min bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C inkubiert (Günther, 2016).

2.2.2.4 Amplifikation retroviraler Vektoren

Die Amplifikation retroviraler Vektoren erfolgte unter Anwendung von *One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli*. Ein Aliquot der bei –80 °C gelagerten Bakterien wurde auf Eis aufgetaut und mit ca. 300 ng des Ligationsprodukts versetzt. Die Transformation erfolgte mittels Hitzeschock bei 42 °C für eine Dauer von 90 s und anschließendem Abkühlen auf Eis. Zur Amplifikation wurde der Transformationsansatz in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 1 ml Lysogeny broth (LB)-Medium, bestehend aus 20 g/l LB-Medium in dH₂O, gemischt und für 1 h bei 37 °C und 200 min⁻¹ im Schüttelinkubator inkubiert. 200 µl der Bakteriensuspension wurden anschließend auf einer vorgewärmten Agarplatte, bestehend aus 40 g/l LB-Agar und 100 µg/ml Ampicillin in dH₂O, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden jeweils 5 ml LB-Medium, versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin, mit einzelnen von der Agarplatte gepickten Bakterienkolonien beimpft und erneut für eine Nacht bei 37 °C und 200 min⁻¹ inkubiert.

Die Aufbereitung der amplifizierten Vektoren erfolgte unter Anwendung des *NucleoSpin Plasmid*-Kits. Abweichend vom Protokoll des Herstellers wurde der Überstand zweimal auf die Kieselgel-Membran geladen und die abschließende Elution mit 100 µl ddH₂O durchgeführt (Günther, 2016).

2.2.2.5 Sanger-Sequenzierung

Mit dem Ziel durch die DNA-Polymerase verursachte Replikationsfehler und evtl. vorhandene Original-Inserts zu identifizieren, wurden alle amplifizierten Vektoren vor der Transduktion mittels Sanger-Sequenzierung analysiert. Die DNA-Konzentration der Vektoren wurde unter Anwendung des Fotospektrometers NanoDrop bestimmt. Für die Sequenzierung wurden die zu analysierenden Vektoren bei einer Konzentration von 90 ng/μl in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Als Primer diente *PSI-forward* in einer Konzentration von 10 pmol/μl. Alle Proben wurden zur Sequenzierungen an GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland verschickt (Günther, 2016).

2.2.3 Kultivierung von Zelllinien

2.2.3.1 Passagieren von Zelllinien

Alle Zelllinien wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit in 25 cm², 75 cm² oder 175 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Als Nährmedium diente DMEM⁺, bestehend aus DMEM mit 10 % (v/v) FCS und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin.

Die adhärent wachsende Zelllinie Phoenix-Ampho wurden bei einer Konfluenz von ca. 80 % passagiert. Zu diesem Zweck wurde das Kulturmedium abgenommen und adhärente Zellen durch Zugabe von 5–7 ml Trypsin-EDTA (37 °C) und einer Inkubation von 3–5 min abgelöst. Resuspendiert im zuvor abgenommenen Kulturmedium wurden die abgelösten Zellen in ein 50 ml Zentrifugen-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (280 × g; 5 min). Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Zellen bei einer Konzentration von ca. 5 × 10⁵ Zellen/ml in DMEM⁺ kultiviert.

Das Passagieren der in Suspension wachsenden Zelllinien J558L und K15 erfolgte bei einer Zelldichte von ca. 1 × 10⁶ Zellen/ml. Adhärente Zellen wurden durch vorsichtiges Klopfen gelöst und die Zellsuspension in einem 50 ml Zentrifugen-Röhrchen abzentrifugiert (280 × g; 5 min). Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in DMEM⁺ zu einer Konzentration von ca. 5 × 10⁵ Zellen/ml resuspendiert und kultiviert (Günther, 2016).

2.2.3.2 Auftauen und Einfrieren von Zelllinien

Eingefrorene Zelllinien wurden in Aliquots bei –180 °C gelagert und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden anschließend in einem 50 ml Zentrifugen-Röhrchen mit 10 ml DMEM⁺ (4 °C) verdünnt, abzentrifugiert (280 × g, 5 min) und der Überstand abgenommen. Dieser Vorgang wurde mit 10 ml DMEM⁺ (37 °C) wiederholt. Die gewaschenen Zellen wurden danach in DMEM⁺ (37 °C) resuspendiert und bei einer Konzentration von ca. 5 × 10⁵ Zellen/ml kultiviert.

Zum Einfrieren einer Zelllinie wurde die entsprechende Zellkultur ausgezählt (siehe Kap. 2.2.3.3) und die Zellen in einem 50 ml Zentrifugen-Röhrchen abzentrifugiert ($280 \times g$, 5 min). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet zu einer Konzentration von ca. 5×10^6 Zellen/ml in 1X Gefriermedium (4°C), bestehend aus FCS mit 10 % (v/v) DMSO, resuspendiert. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in ein Gefrier Röhrchen pipettiert und dieses bei -80°C eingefroren. Nach 24 h erfolgte die Umlagerung in die Gasphase von flüssigem Stickstoff (-180°C) (Günther, 2016).

2.2.3.3 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte einer Zellkultur wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Vor Gebrauch wurde das Deckglas auf die Zählkammer aufgesetzt und angedrückt, bis Newton'sche Ringe sichtbar waren. Je $10 \mu\text{l}$ der zuvor gründlich gemischten Zellsuspension wurden seitlich in die Zählkammer pipettiert und, nach dem Auszählen von zwei großen Eckquadraten, die Zelldichte nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zelldichte} = \frac{\text{Zellzahl von zwei Eckquadraten}}{2} \cdot 1 \times 10^4 \text{ Zellen/ml}$$

2.2.3.4 Retrovirale Transduktion von Zelllinien

Zur retroviralen Transduktion der Zelllinien J558L und K15 wurde das retrovirale Verpackungssystem Phoenix-AMPHO, basierend auf der humanen, embryonalen Nierenzelllinie 293T, verwendet (Pear *et al.*, 1993; Kitamura *et al.*, 2003).

Tag 1: Ansetzten einer 1:1 Verdünnungsreihe in 6-Well-Zellkulturplatten mit dem Ziel, eine für die Transduktion optimale Konfluenz von ca. 66 % zu erreichen. Die Anfangskonzentration der vorkultivierten Phoenix-Ampho-Zellen betrug, bei einem Volumen von jeweils 3 ml pro Well, ca. 5×10^5 Zellen/ml.

Tag 2: Zur transienten Transfektion der Phoenix-Ampho-Zellen mit retroviralen Vektoren wurde in einem 15 ml Zentrifugen-Röhrchen eine Transfektionsansatz angesetzt. Dieser bestand aus $190 \mu\text{l}$ DMEM (37°C) ohne Zusätze, $4 \mu\text{g}$ des entsprechenden Vektors sowie $12 \mu\text{l}$ FugeneHD (37°C). Der gevortexte Ansatz wurde anschließend für 20 min im Wasserbad (37°C) inkubiert und tropfenweise in jenes Well pipettiert, welches eine für die Transfektion optimale Konfluenz von ca. 66 % aufwies.

Tag 4: Nach einer Inkubation von 48 h wurde der virushaltige Überstand transfizierter Phoenix-Ampho-Zellen abgenommen und mittels 5 ml Spritze durch einen $0,45 \mu\text{m}$ Zellfilter filtriert. Der in einem 50 ml Zentrifugen-Röhrchen aufgefangene Überstand wurde anschließend mit $8 \mu\text{g/ml}$ Polybrene versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Transduktion wurden ca. 3×10^5 J558L- bzw. K15-Zellen in einem Well einer

6-Well-Platte vorgelegt und vorsichtig mit dem aufbereiteten Überstand versetzt. Die Inkubation erfolgte für 90 min bei 37 °C und $790 \times g$ in einer vorgewärmten Zentrifuge mit deaktivierten Bremsen und anschließend für weitere 2 h im Inkubator. Zuletzt wurden 2 ml des Überstands vorsichtig abgenommen und durch 9 ml DMEM⁺ ersetzt.

Tag 8: Erfolgreich transduzierte Zellen wurden durch Zugabe von 10 µg/ml Puromycin selektiert. Als Negativkontrolle dienten nicht-transduzierte, parentale Zellen derselben Zelllinie und -konzentration. Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte abhängig von der Proliferationsgeschwindigkeit der jeweiligen Zelllinie, wobei jeweils 5 ml des Mediums abgenommen und durch 5 ml DMEM⁺, versetzt mit 20 µg/ml Puromycin, ersetzt wurden (Günther, 2016).

2.2.3.5 Produktion von Peptid-HLA-Multimer-haltigem Überstand durch retroviral transduzierte J558L-Zellen

J558L-Zellen, die mit Peptid-HLA-Multimer-Vektoren transduziert wurden, exprimieren in den Kulturüberstand Peptid-HLA-Multimere, welche zur durchflusszytometrischen Färbung peptid-spezifischer T-Zellen verwendet werden können. Zur Gewinnung von Peptid-HLA-Multimer-haltigem Überstand wurden transduzierten J558L-Zellen bei einer Anfangskonzentration von ca. 5×10^5 Zellen/ml und einem Volumen von 35 ml in 175 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Bei einer Konzentration von ca. 2×10^6 Zellen/ml wurde das Kulturmedium abgenommen und in einem 50 ml Zentrifugen-Röhrchen zentrifugiert ($280 \times g$; 5 min). Der Peptid-HLA-Multimer-haltige Überstand wurde anschließend abgenommen und in einem 50 ml Zentrifugen-Röhrchen bei 4 °C im Dunkeln gelagert (Günther, 2016).

2.2.4 Kultivierung von PBMCs

2.2.4.1 Isolierung von PBMCs

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) stammen von gesunden Blutspendern und wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Zu diesem Zweck wurde jeweils die Hälfte eines Buffy Coats (Gesamtvolumen ca. 20 ml) in ein 50 ml Zentrifugen-Röhrchen gefüllt und mit 20 ml DPBS (25 °C) verdünnt. Parallel dazu wurden 15 ml Ficoll-Paque PLUS in ein mit fetalem Kälberserum (FCS) benetztes 50 ml Zentrifugen-Röhrchen pipettiert und jeweils ein halber, verdünnter Buffy Coat vorsichtig aufgeschichtet. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation ($790 \times g$, 30 min) mit deaktivierten Bremsen. Die PMBC-haltige Phase zwischen Ficoll-Paque PLUS und Blutplasma wurde anschließend mit einer serologischen Pipette vorsichtig abgenommen und in einem mit FCS benetzten 50 ml Zentrifugen-Röhrchen zentrifugiert

(500 × g, 5 min). Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 50 ml DPBS (25 °C) wurden die PBMCs entweder kultiviert oder kryokonserviert (Günther, 2016).

2.2.4.2 Auftauen und Einfrieren von PBMCs

Eingefrorene PBMCs wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und der Inhalt eines Aliquots in einem 50 ml Zentrifugen-Röhrchen zweimal mit jeweils 10 ml DMEM⁺ (4 °C bzw. 37 °C) gewaschen (500 × g, 5 min). Die Kultivierung der aufgetauten PBMCs erfolgte wie in Kap. 2.2.4.6 beschrieben.

Zum Einfrieren von PBMCs wurden die ca. 5×10^8 aus einem Buffy Coat isolierten PBMCs in ein 50 ml Zentrifugen-Röhrchen pipettiert und abzentrifugiert (500 × g, 5 min). Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 5 ml DMEM⁺ (4 °C) resuspendiert. Unter ständigen Schwenkbewegungen wurden tropfenweise 5 ml 2X Gefriermedium, bestehend aus FCS mit 20 % DMSO zugegeben. Je 1 ml der Suspension wurde in ein Gefrier Röhrchen pipettiert und diese bei –80 °C eingefroren. Die Überführung in die Gasphase von flüssigem Stickstoff (–180 °C) erfolgte nach 24 h (Günther, 2016).

2.2.4.3 Magnetische Zellseparation von CD45RO⁺ T-Gedächtniszellen

Die aus einem Buffy Coat isolierten PBMCs wurden in einem mit FCS benetzten 50 ml Zentrifugen-Röhrchen mit 200 µl DPBS (4 °C) und 100 µl CD45RO MicroBeads versetzt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 4 °C unter Lichtabschluss, wobei die PBMCs alle 15 min gevortext wurden. Anschließend wurden die PBMCs mit 50 ml DPBS (4 °C) gewaschen (500 × g, 5 min) und der Überstand abgenommen. Die magnetische Zellseparation erfolgte in MACS-Säulen LS, welche in einem QuadroMACS Separator positioniert und mit 6 ml DPBS (4 °C) vorgespült wurden. Die abzentrifugierten PBMCs wurden in 7 ml DPBS (4 °C) resuspendiert, auf die Säule gegeben und die Säule anschließend passiv mit 6 ml DPBS (4 °C) nachgespült. Der Durchfluss wurde verworfen. Nachdem die Säule aus dem magnetischen Feld des QuadroMACS Separators entfernt wurde, wurden die positiv-selektierten CD45RO⁺ Zellen mit 6 ml DPBS (4 °C) eluiert und in einem FCS benetzten 50 ml Zentrifugen-Röhrchen aufgefangen. Abschließend wurden die CD45RO⁺ Zellen abzentrifugiert (500 × g, 5 min), der Überstand abgenommen und wie in Kap. 2.2.4.5 beschrieben expandiert (Günther, 2016).

2.2.4.4 Expansion RSV-spezifischer CD3⁺ T-Zellen

Die Expansion RSV-spezifischer CD3⁺ T-Zellen erfolgte in 6-Well-Platten bei einer Zellkonzentration von ca. 1×10^7 Zellen/ml und einem Volumen von 10 ml pro Well. Als Medium diente DMEM⁺, versetzt mit 2 ng/ml IL-2. Am 1. Tag der Expansion wurden

die isolierten PBMCs durch Zugabe von 1 µg/ml des zu untersuchenden Peptids stimuliert. Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte 3x wöchentlich, wobei jeweils 5 ml des Mediums abgenommen und durch 5 ml DMEM⁺, versetzt mit der doppelten IL-2 Konzentration, ersetzt wurden. Am 8. und 15. Tag der Expansion erfolgte die Stimulation peptid-spezifischer T-Zellen durch Zugabe von ca. 2×10^5 Zellen/ml transduzierter und bestrahlter (100 Gy) K562-mbIL-15-4-1BBL (K15)-Zellen, welche das entsprechende Peptid-HLA-Single-Chain-Molekül auf der Zelloberfläche exprimierten. Die durchflusszytometrische Analyse der expandierten T-Zellen erfolgte zum 21. Tag der Expansion (Günther, 2016).

2.2.4.5 Expansion RSV-spezifischer T-Gedächtniszellen

Die mittels magnetischer Zellseparation aufgereinigten CD45RO⁺ T-Gedächtniszellen eines Spenders wurden in 3 ml DMEM⁺, versetzt mit 2 ng/ml IL-2, resuspendiert und je 1 ml der Suspension in ein 24-Well pipettiert. Zur Stimulation peptid-spezifischer T-Zellen wurden am 1. und 8. Tag der Expansion ca. 2×10^5 Zellen/ml transduzierte und bestrahlte (100 Gy) K15-Zellen zugegeben, welche das entsprechende Peptid-HLA-Single-Chain-Molekül auf der Zelloberfläche exprimierten. Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte 3x wöchentlich, wobei jeweils 500 µl des Mediums abgenommen und durch 500 µl DMEM⁺, versetzt mit der doppelten IL-2 Konzentration, ersetzt wurden. Die durchflusszytometrische Analyse der expandierten T-Gedächtniszellen erfolgte zum 14. Tag der Expansion (Günther, 2016).

2.2.4.6 Expansion peptid-spezifischer T-Zellen zur funktionellen Analyse

Die Expansion peptid-spezifischer T-Zellen zur funktionellen Analyse erfolgte aus kryokonservierten PBMCs, welche wie in Kap. 2.2.4.2 beschrieben aufgetaut und in DMEM⁺ resuspendiert wurden. Die Kultivierung erfolgte in 24-Well-Platten bei einer Konzentration von ca. 2×10^7 Zellen/ml und einem Anfangsvolumen von jeweils 400 µl/Well. Durch Zugabe von 5 µg/ml des zu untersuchenden Peptids, gelöst in 100 µl DMEM⁺, wurde am 2. Tag der Expansion die peptid-spezifische Stimulation eingeleitet. Am 3., 5. und 7. Tag wurden jeweils 100 µl, 200 µl bzw. 400 µl DMEM⁺, versetzt mit IL-2 (Endkonzentration von 2 ng/ml), zugegeben. Ab dem 8. Tag der Expansion erfolgte der Wechsel des Kulturmediums abhängig von der Proliferationsgeschwindigkeit des jeweiligen Spenders. Dabei wurden bei Bedarf abwechselnd entweder 500 µl DMEM⁺, versetzt mit IL-2, zugegeben oder zuerst 800 µl Kulturmedium abgenommen und durch 500 µl DMEM⁺, versetzt mit IL-2, ersetzt. Die funktionelle Analyse der expandierten T-Zellen erfolgte zum 13. Tag der Expansion mittels IFN-γ ELISPOT Assay (Peper, 2015).

2.2.5 SDS-PAGE

Um zu überprüfen, ob die ausgewählten RSV-Peptidpitope auf den entsprechenden Peptid-HLA-Multimeren präsentiert und diese ausreichend stabilisiert wurden, erfolgte mittels SDS-PAGE eine Analyse der in den Überstand transduzierter J558L-Zellen exprimierten Peptid-HLA-Multimere. Zu diesem Zweck wurden in einem Eppendorfgesäß 80 µl Protein A/G mit 1 ml DPBS (4 °C) verdünnt, abzentrifugiert (660 × g, 30 s) und der Überstand abgenommen. In das Eppendorfgesäß wurden anschließend 1,5 ml des zu analysierenden Überstands (siehe Kap. 2.2.3.5) gegeben und die Probe über Nacht bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert.

Am folgenden Tag wurde das Trenngel (siehe Tab. 2.11) in einem 50 ml Zentrifugen-Röhrchen angesetzt, in die vorbereitete Gelkammer pipettiert und unter Luftabschluss für 1 h ausgehärtet. Das Sammelgel (siehe Tab. 2.11) wurde nach demselben Prinzip angesetzt, auf das Trenngel pipettiert und nach blasenfreiem Einsetzen des Kamms erneut für 1 h ausgehärtet. Die über Nacht mit Protein A/G inkubierten Proben wurden auf Eis gelagert und 4x mit jeweils 1 ml DPBS (4 °C) gewaschen (660 × g, 3 min). Nach dem letzten Waschschrift wurde der in den Proben verbliebene Überstand mit einer Braunüle restlos aspiriert. Jede Probe wurde mit 50 µl SDS-Reduzierungspuffer versetzt, zur Denaturierung für 5 min bei 95 °C inkubiert und unmittelbar danach erneut auf Eis gelagert. Der zu diesem Zweck verwendete SDS-Reduzierungspuffer bestand aus 125 mmol/l Tris-HCl, 20 % (v/v) Glycerin, 10 % (v/v) 2-Mercaptoethanol (pH 6,8), 4 % (m/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) sowie 0,005 % (m/v) Bromphenolblau gelöst in ddH₂O. Nach erneuter Zentrifugation (660 × g, 3 min) wurden jeweils 20 µl des denaturierten Überstands in eine Tasche der SDS-PAGE geladen. Als Standard dienten 15 µl Proteinmarker. Die Elektrophorese erfolgte in SDS-Laufpuffer, bestehend aus 192 mmol/l Glycin, 25 mmol/l Tris-HCl und 0,1 % (m/v) SDS gelöst in ddH₂O (pH 8,3), bei 140 V für 90 min.

Zur Markierung der aufgetrennten Proteine wurde die SDS-Page für 2 min in Coomassie-Lösung, bestehend aus 1 % (m/v) Coomassie Brilliant Blue, 10 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure gelöst in ddH₂O, gefärbt. Überschüssige Coomassie-Lösung wurde durch dreimaliges Waschen in SDS-Waschlösung, bestehend aus 10 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure gelöst in ddH₂O, für jeweils ca. 30 min auf dem Schüttelbrett entfernt. Die Dokumentation erfolgt mittels Gel iX Imager (Günther, 2016).

2. Material und Methoden

Tab. 2.11: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel der SDS-PAGE
Tabelle modifiziert nach Günther (2016).

Bezeichnung	10 % Trenngel	4 % Sammelgel
ddH ₂ O	4 ml	7,4 ml
Acrylamidlösung	3,33 ml	1,3 ml
Trenngelpuffer pH 8,8	2,5 ml	–
Sammelgelpuffer pH 6,8	–	1,25 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl
10 % APS	50 µl	50 µl
10 % TEMED	10 µl	20 µl

2.2.6 Western Blot

Die Identifikation der Peptid-HLA-Multimer auf dem Gel der SDS-PAGE erfolgte mittels Western Blot. Die Durchführung des Western Blots erfolgte bis zur Elektrophorese analog der SDS-PAGE. Anschließend wurde das Gel der SDS-PAGE in ungefärbtem Zustand blasenfrei auf eine Nitrozellulose-Membran gelegt, beidseits mit Filterpapier umgeben und, mit der SDS-PAGE zur Kathodenseite, zwischen zwei Schwämmen in die Transferkammer des Western Blots eingespannt. Der Transferprozess wurde in Transferpuffer, bestehend aus 240 mmol/l Glycin, 25 mmol/l Tris-HCl und 20 % (v/v) Methanol gelöst in dH₂O, bei einer Spannung von 100 V für 90 min durchgeführt. Durch reversible Färbung der Nitrozellulose-Membran mit Ponceau S-Lösung, bestehend aus 5 % (v/v) Essigsäure und 0,1 % (m/v) Ponceau S gelöst in dH₂O, für 1 min, wurde der Proteintransfer kontrolliert. Der Farbstoff wurde durch wiederholte Waschschriffe in dH₂O ausgewaschen. Die Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen auf der entfärbten Nitrozellulose-Membran erfolgte durch Inkubation in Milchpulverlösung, bestehend aus 100 g/l Milchpulver gelöst in dH₂O. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttelbrett.

Am folgenden Tag wurde die Milchpulverlösung unter fließendem dH₂O abgewaschen und 1 mg des gefriergetrockneten Anti-Maus IgG-Antikörpers, konjugiert mit Meerrettichperoxidase (HRP), in jeweils 750 µl dH₂O bzw. Glycerin zu einem Endvolumen von 1,5 ml resuspendiert. Der Antikörper wurde erneut 1:5000 in DPBS verdünnt und die Nitrozellulose-Membran in 50 ml der Antikörperlösung für 1 h (4 °C) auf dem Schüttelbrett inkubiert. Die Membran wurde anschließend 3x für jeweils 3 min in ca. 50 ml DPBS + Tween20 0,01 % gewaschen. Zur Entwicklung wurde die Nitrozellulose-Membran zwischen zwei Folien gelegt und mit 1 ml TMB-Substrat, bestehend aus 0,5 ml TMB-Lösung und 0,5 ml Peroxid-Lösung, versetzt. Die Dokumentation erfolgte bei einer Belichtungszeit von 1 h im Chemilumineszenz-Kanal des Western Blot-Lesegeräts Odyssey Fc (AG Dennehy, Universität Tübingen, Deutschland).

2.2.7 Durchflusszytometrie

2.2.7.1 Detektion von Peptid-HLA-Single-Chain-Molekülen auf transduzierten K15-Zellen

Zur durchflusszytometrischen Färbung wurden ca. 2×10^5 transduzierte K15-Zellen in ein FACS-Röhrchen pipettiert und die zelluläre Atmungskette durch Zugabe von 2 ml $\text{DPBS}_{\text{NaN}_3}$, bestehend aus DPBS mit 10 mmol/l Natriumazid, blockiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden die Zellen abzentrifugiert ($280 \times g$, 5 min) und der Überstand dekantiert. Die Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen auf der Zelloberfläche erfolgte durch Zugabe von 10 μl IgG2a-Antikörper, Vortexen und Inkubation für 10 min. Zur Färbung der transduzierten Peptid-HLA-Single-Chain-Moleküle wurden 10 μl HLA-ABC Antikörper W6/32 verwendet und die Zellen anschließend unter Lichtabschluss für 30 min inkubiert. Nicht-gebundene Antikörper wurden durch Waschen mit 2 ml $\text{DPBS}_{\text{NaN}_3}$ und anschließender Zentrifugation ($280 \times g$, 5 min) entfernt. Nach Dekantierung des Überstands und Resuspendierung des Zellpellets in 400 μl $\text{DPBS}_{\text{NaN}_3}$ wurden die gefärbten Zellen mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur analysiert. Als Negativkontrolle dienten parentale, nicht-transduzierte K15-Zellen. Von jeder Probe wurden mindestens 5000 Events ausgewertet (Günther, 2016).

2.2.7.2 Färbung expandierter Peptid-HLA-Multimer positiver T-Zellen

Die zur durchflusszytometrischen Färbung expandierter PBMCs verwendeten Peptid-HLA-Multimere wurden wie in Kap. 2.2.3.5 beschrieben aus dem Überstand transduzierter J558L-Zellen gewonnen und nach folgendem Schema aufgereinigt:

Jeweils 15 ml des entsprechenden Überstandes wurden in eine Zentrifugen-Filtereinheit (100 kDa) pipettiert und für 1 h zentrifugiert ($3160 \times g$, 4°C). Der Überstand wurde anschließend mit 15 ml DPBS (4°C) verdünnt und erneut für ca. 1 h zentrifugiert, bis das Volumen des konzentrierten Überstands weniger als 200 μl betrug. Der Überstand wurde anschließend in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 10 μl Strep-Tactin PE versetzt, gevortext und über Nacht im Dunkeln bei 4°C inkubiert.

Zur Analyse wurden ca. 1×10^6 expandierte PBMCs (siehe Kap. 2.2.4.4) in ein FACS-Röhrchen pipettiert und die zelluläre Atmungskette mit 2 ml $\text{DPBS}_{\text{NaN}_3}$, bestehend aus DPBS mit 10 mmol/l Natriumazid, blockiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden die Zellen abzentrifugiert ($500 \times g$, 5 min) und der Überstand dekantiert. Die Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen auf der Zelloberfläche erfolgte durch Zugabe von 10 μl IgG2a-Antikörper, Vortexen und Inkubation für 10 min. Zur Färbung expandierter CD3^+ T-Zellen wurden jeweils 80 μl Peptid-HLA-Multimer, gekoppelt mit Strep-Tactin PE, sowie 10 μl des CD3 -Antikörpers HIT3a verwendet und die Zellen unter Lichtab-

schluss für 40 min inkubiert. Peptid-HLA-Multimer positive T-Gedächtniszellen wurden zuerst für 15 min mit jeweils 80 µl Peptid-HLA-Multimer, gekoppelt mit Strep-Tactin PE, vorinkubiert. Anschließend wurden jeweils 15 µl des CD45RO-Antikörpers UCHL1 sowie 20 µl des CD28-Antikörpers CD28.2 zugegeben und die Proben für weitere 30 min unter Lichtabschluss inkubiert. Nicht-gebundene Antikörper wurden durch Waschen mit 2 ml DPBS_{NaN₃} und anschließender Zentrifugation (500 × g, 5 min) entfernt. Nach Dekandierung des Überstands und Resuspendierung des Zellpellets in 400 µl bzw. 500 µl DPBS_{NaN₃} wurden die gefärbten Zellen mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur analysiert. Die Negativkontrolle wurden mit Peptid-HLA-Multimeren durchgeführt, welche das autologe Peptid YLLPAIVHI präsentieren. Von jeder Probe wurden mindestens 5000 Events ausgewertet (Günther, 2016).

2.2.8 IFN- γ ELISPOT Assay

Die funktionelle Aktivität RSV- bzw. HCMV-spezifischer T-Zellen wurde mittels IFN- γ ELISpot Assay überprüft. Alle Waschschritte wurden mit einem Volumen von 200 µl/Well (25 °C) durchgeführt, die Platten anschließend geflickt und mehrfach auf Zellstofftüchern trocken geklopft.

Zur Beschichtung der Nitrozellulose-Membran in den 96-Well ELISpot-Platten wurde der IFN- γ -Primärantikörper 1-D1K, Endkonzentration 4 µg/ml in DPBS, verwendet. In jedes Well wurden 100 µl der Antikörperlösung pipettiert und die Platten für 1 h bei 4 °C inkubiert. Nachdem die Platten 2x mit DMEM ohne Zusätze gewaschen wurden, erfolgte die Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen durch Zugabe von 50 µl/Well DMEM⁺ sowie blasenfreier Inkubation für 2 h bei 37 °C.

Die expandierten PBMCs (siehe Kap. 2.2.4.6) wurden in 50 ml Zentrifugen-Röhrchen überführt, abzentrifugiert (500 × g, 5 min) und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde anschließend in 10 ml DPBS (25 °C) resuspendiert, die Zellen ausgezählt (siehe Kap. 2.2.3.3) und erneut abzentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstands wurden die Zellen zu einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml in DMEM⁺ resuspendiert und jeweils 50 µl der Zellsuspension in ein Well der ELISpot-Platten pipettiert. Zur Stimulation wurden 50 µl/Well DMEM⁺, versetzt mit 1 µg/ml des entsprechenden Peptids, verwendet. Als Positivkontrolle diente Phytohemagglutinin (PHA) mit einer Endkonzentration von 10 µg/ml. Das autologe Peptid YLLPAIVHI diente als Negativkontrolle. Alle Versuche wurden in Duplets durchgeführt. Die Inkubation erfolgte in waagrechttem, blasen- und erschütterungsfreiem Zustand bei 37 °C, 7,5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit für eine Dauer von 20 h.

Nach der Inkubation wurde die Platten geflickt und 2x mit DPBS + Tween20 0,05 %, 2x mit ddH₂O sowie erneut 3x mit DPBS + Tween20 0,05 % gewaschen. Von T-Zellen

freigesetztes IFN- γ wurde durch Zugabe von jeweils 100 μ l/Well des biotinylierten IFN- γ -Sekundärantikörpers 7-B6-1, Endkonzentration 0,3 μ g/ml in DPBS + BSA 0,5 %, sowie blasenfreie Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur (RT) markiert. Anschließend wurden die Platten geflickt, 6x mit DPBS + Tween20 0,05 % gewaschen und pro Well 100 μ l der mit Streptavidin konjugierten Alkalinphosphatase, 1:1000 verdünnt in DPBS + BSA 0,5 %, zugegeben. Nachdem die Platten für 1 h bei RT inkubiert wurden, wurden die Platten 3x mit DPBS + Tween20 0,05 % und 3x mit DPBS gewaschen. Als Enzymsubstrat dient 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) / Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT), hergestellt aus 1 Tablette BCIP / NBT gelöst in 10 ml ddH₂O. Zur Entwicklung wurden in jedes Well 100 μ l des Enzymsubstrats pipettiert und die Platte unter Lichtabschluss für 7–10 min bei RT inkubiert. Die Entwicklungsreaktion wurde unter fließendem Wasser gestoppt und die Platten bei RT im Dunkeln getrocknet. Die Auswertung erfolgte mittels ELISPOT Reader. Eine Immunantwort wurde als positiv gewertet, wenn die durchschnittliche Anzahl der Spot Forming Cells (SFCs) mindestens 20 Spots/Well betrug und mindestens dem dreifachen Wert der entsprechenden Negativkontrolle entsprach. Spender mit einer Negativkontrolle von mehr als 120 Spots/Well wurden ausgeschlossen (Peper, 2015).

2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion

Die Analyse der Zellkulturen auf eine Kontamination mit Mycoplasmen erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und wurde unter Anwendung des *GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase*-Kits durchgeführt. Als Untersuchungsmaterial wurde Kulturmedium verwendet, das für mindestens 48 h mit der entsprechenden Zelllinie kultiviert wurde. 50 μ l des Kulturmediums wurden abgenommen, in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß erhitzt (95 °C, 10 min) und abzentrifugiert (660 \times g, 3 min). Die PCR-Ansätze wurden in 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäßen nach dem in Tab. 2.12 beschriebenen Schema angesetzt. Als Positivkontrolle diente Mykoplasma-positiver Zellkulturüberstand, die Negativkontrolle bestand aus ddH₂O. Zur Amplifikation wurde der im kalkulierten Modus betriebene Thermozykler PTC-200 verwendet. Die initiale Denaturierung fand für 1 min bei 96 °C statt. Im Anschluss daran erfolgten 30 Amplifikationszyklen, bestehend aus jeweils 15 s bei 96 °C, 80 s bei 55 °C sowie 90 s bei 72 °C. Nach einem abschließenden Amplifikationsschritt bei 72 °C für 120 s wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese, wobei ein Agarosegel, bestehend aus 1 % (m/v) Agarose und 0,3 μ g/ml Ethidiumbromid gelöst in 0,5x TBE-Puffer verwendet wurde. Die Elektrophorese wurde mit 20 μ l des PCR-Produkts bei 90 V und für eine Dauer von 90 min durchgeführt. Proben, die unter UV-Licht ein 580 bp großes PCR-Produkt aufwiesen, wurden als positiv bewertet (Spergser *et al.*, 2002).

2. Material und Methoden

Tab. 2.12: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes
Tabelle modifiziert nach Spargser *et al.* (2002).

Bezeichnung	Volumen
Primer MW28 (10 pmol/ μ l)	2,5 μ l
Primer MW29 (10 pmol/ μ l)	2,5 μ l
MgCl ₂ (25 mmol/l)	4 μ l
dNTP (10 mmol/l)	1 μ l je Nukleotid
GoTaq DNA Polymerase	0,25 μ l
Green GoTaq Flexi Puffer (5X)	10 μ l
DNA-Probe	1 μ l
Gesamtvolumen	50 μ l in ddH ₂ O

3. Ergebnisse

3.1 Auswahl vorhergesagter RSV-Peptidpitope

Mit dem Ziel, potenzielle Peptidpitope des Respiratorischen Synzytial-Virus zu identifizieren, wurden die Proteine des Virus unter Anwendung des Onlinetools *NetMHC 3.4 Server* analysiert. Insgesamt wurden 13 HLA-A*01 restringierte, 101 HLA-A*02 restringierte und 19 HLA-B*07 restringierte Epitope mit einer theoretischen Bindungsaffinität < 50 nmol/l identifiziert. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Peptidpitope sind in Tab. 3.1 aufgelistet (Burbulla *et al.*, 2016).

Tab. 3.1: Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten, potenziellen RSV-Peptidpitope
Tabelle modifiziert nach Burbulla *et al.* (2016).

HLA-Restriktion	Peptidsequenz	RSV-Protein	Länge	Theoretische Affinität (nmol/l)
A*01:01	FSECNALGSY	Polymerase	10	12
	FTGLIGMLY	Nukleokapsidprotein	9	9
	ISDYFHNTY	Polymerase	9	9
	LSDSTMTNY	Nicht-Strukturprotein 1	9	8
	STELNYNHLY	Polymerase	10	20
	VTDNKGAFKY	Matrixprotein	10	24
A*02:01	FLTEAIVHSV	Polymerase	10	6
	KLSEILGML	Phosphoprotein	9	27
	YLSELLNSL	Polymerase	9	4
	YMLTNSELL	Fusionsprotein	9	9
B*07:02	KPNYQRKPL	Phosphoprotein	9	8
	LPRFMNYTL	Fusionsprotein	9	9
	MPVYNRQVL	Polymerase	9	12
	YPASIKKVL	Polymerase	9	16

3.2 Stabilisierung von HLA-Molekülen durch potenzielle RSV-Peptidpitope

3.2.1 Stabilisierung von Peptid-HLA-Multimeren

Bereits im Vorfeld wurde gezeigt, dass alle ausgewählten RSV-Peptidpitope die entsprechenden HLA-Moleküle stabilisieren können (Rock *et al.*, 2011). Um zu überprüfen, ob die ausgewählten Peptide auch auf Peptid-HLA-Multimeren präsentiert und diese ausreichend stabilisiert werden, wurden die entsprechenden Peptid-HLA-Multimere mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.1). Die Peptid-HLA-Multimere wurden mittels Klonierung hergestellt und anhand der erwarteten molekularen Masse von 98 kDa sowie mittels Western Blot (Abb. 3.2) identifiziert (Greten *et al.*, 2002). Auf der SDS-PAGE sind außerdem das bovine Serumalbumin (BSA, 66 kDa) sowie die schwere (50 kDa) und leichte (25 kDa) Kette boviner Immunglobuline dargestellt. Außerdem ist bekannt, dass die Zelllinie J558L leichte Ig λ Ketten (ca. 25 kDa) der Maus exprimiert (Oi *et al.*, 1983). Die adenoviralen Peptide LTDLGQNLLY (HLA-A*01) und VPATGRTLVL (HLA-B*07) sowie das autologe, HLA-A*02 restringierte Peptid YLLPAIVHI dienten als Positivkontrolle. Mit Ausnahme des HLA-A*01 restringierten Peptids FTGLIGMLY wurden alle Peptide auf den entsprechenden Peptid-HLA-Multimeren stabilisiert. Dabei wiesen die HLA-A*01 restringierten Peptide FSECNALGSY und ISDYFHNTY, das HLA-A*02 restringierte Peptid YLSELLNSL sowie alle HLA-B*07 restringierten Peptide eine, mit den Positivkontrollen vergleichbar gute, Peptid-HLA-Multimer stabilisierende Wirkung auf (Burbulla *et al.*, 2016).

3. Ergebnisse

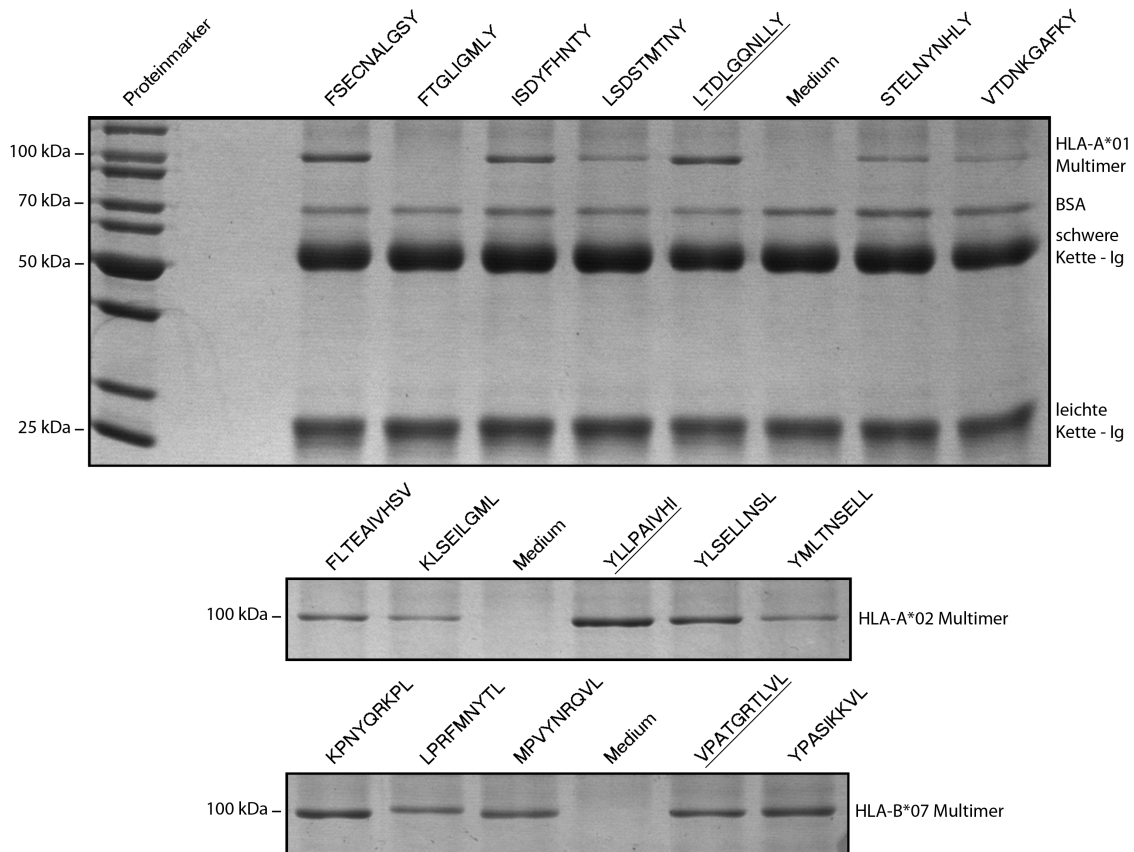


Abb. 3.1: Stabilisierung von Peptid-HLA-Multimeren durch potenzielle RSV-Peptidepitope

J558L-Zellen wurden retroviral mit Peptid-HLA-Multimer-Konstrukt transduziert und die in den Überstand exprimierten Peptid-HLA-Multimere mit Protein A/G aufgereinigt. Nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Die auf den jeweiligen Peptid-HLA-Multimeren präsentierten Peptide sind über der jeweiligen Spur angegeben. Die adenoviralen Peptide LTDLGQNLLY und VPATGRTLVL sowie das autologe Peptid YLLPAIVHI dienten als Positivkontrollen (unterstrichen), Medium als Negativkontrolle. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Abbildung der im Duplikat durchgeführten Experimente. Veränderte Abbildung nach Burbulla *et al.* (2016).

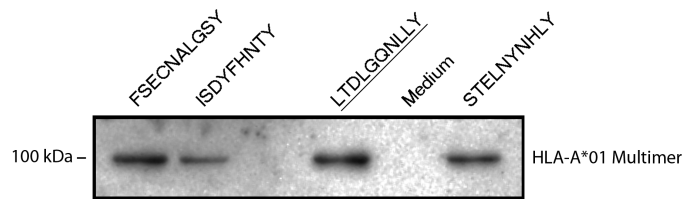


Abb. 3.2: Western Blot HLA-A*01 restringierter Peptid-HLA-Multimere

J558L-Zellen wurden retroviral mit dem jeweiligen Peptid-HLA-Multimer-Vektor transduziert und die in den Überstand exprimierten Peptid-HLA-Multimere mit Protein A/G aufgereinigt. Nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE und dem darauffolgenden Blotting wurden die vorhandenen Peptid-HLA-Multimere durch einen maus-spezifischen IgG1-Antikörper detektiert. Die auf den jeweiligen Peptid-HLA-Multimeren präsentierten Peptide sind über der jeweiligen Spur angegeben. Das adenovirale Peptid LTDLGQNLLY diente als Positivkontrolle (unterstrichen), Medium als Negativkontrolle. Der Versuch wurde als Unikat durchgeführt. Eigene, bisher unveröffentlichte Daten.

3.2.2 Expression transduzierter Peptid-HLA-Single-Chain-Moleküle auf K15-Zellen

Aufgrund der geringen Frequenz RSV-spezifischer T-Zellen im Blut gesunder Blutspender (Heidema *et al.*, 2004) wurden die peptid-spezifischen T-Zellen vor der Analyse mit K15-Zellen, welche retroviral mit dem jeweiligen Peptid-HLA-Single-Chain-Molekül-Vektor transduziert wurden, expandiert. Die Zelllinie K15 wurde ursprünglich als "K562-mb15-41BBL" bezeichnet und stellt eine Modifikation der Zelllinie K562 dar, welche neben einer membrangebundenem Form von IL-15 auch das costimulatorische Molekül 4-1BBL exprimiert (Fujisaki *et al.*, 2009). Um den Erfolg der retroviralen Transduktion zu kontrollieren und auf quantitative Weise die Expression der Peptid-HLA-Single-Chain-Moleküle zu bestimmen, erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der mit HLA-ABC Antikörpern gefärbten Zellen (Abb. 3.3). Eine hohe Expression der entsprechenden Peptid-HLA-Single-Chain-Moleküle auf der Zelloberfläche wurde dabei als Marker für eine effektive Stabilisierung betrachtet. Es zeigte sich, dass die Peptid-HLA-Single-Chain-Moleküle des HLA-A*01 restringierten Peptids FSECNALGSY (Δ MFI 778), vergleichbar gut wie die der Positivkontrolle LTDLGQNLLY (Δ MFI 944), stabilisiert wurden. Peptid-HLA-Single-Chain-Moleküle, welche die ebenfalls HLA-A*01 restringierten Peptide ISDYFHNTY (Δ MFI 89) und STELNYNHLY (Δ MFI 244) präsentierten, wiesen eine schwächere Expression auf der Zelloberfläche auf. Beide analysierten HLA-A*02 restringierten Peptide, FLTEAIVHSV (Δ MFI 1220) und YLSELLNSL (Δ MFI 753) sowie das Kontrollpeptid YLLPAIVHI (Δ MFI 1423) zeigten eine gute stabilisierende Wirkung der entsprechenden Peptid-HLA-Single-Chain-Moleküle. Den höchsten gemessenen Δ MFI-Wert wies das HLA-B*07 restringierte Peptid KPNYQRKPL (Δ MFI 1835) auf, welcher dem dreifachen

3. Ergebnisse

Wert der Positivkontrolle VPATGRTLVL (Δ MFI 579) entsprach. Die übrigen HLA-B*07 restringierten Peptide, MPVYNRQVL (Δ MFI 189) und YPASIKKVL (Δ MFI 169), wiesen eine schwächere Peptid-HLA-Single-Chain-Molekül stabilisierende Wirkung auf (Burbulla *et al.*, 2016).

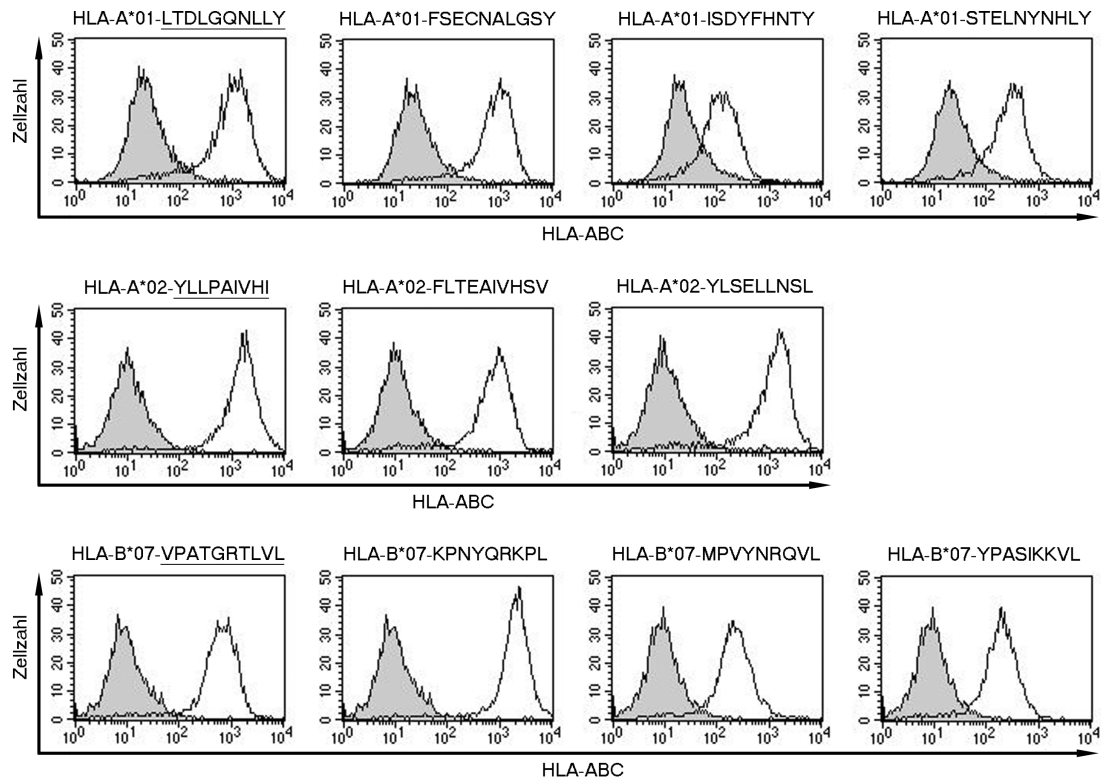


Abb. 3.3: Expression transduzierter Peptid-HLA-Single-Chain-Moleküle auf K15-Zellen

Durchflusszytometrische Analyse retroviral mit Peptid-HLA-Single-Chain-Molekül-Konstrukt transduzierter und mit HLA-ABC Antikörpern gefärbter K15-Zellen (Weiß). Als Kontrolle dienten gefärbte, nicht-transduzierte K15-Zellen (Grau). Die auf den Peptid-HLA-Single-Chain-Molekülen präsentierten Peptide sind über dem jeweiligen Diagramm angegeben. Die adenoviralen Peptide LTDLGQNLLY und VPATGRTLVL, sowie das autologe Peptid YLLPAIVHI dienen als Positivkontrollen (unterstrichen). Dargestellt sind repräsentative Daten des doppelt durchgeführten Experiments. Veränderte Abbildung nach Burbulla *et al.* (2016).

3.3 Durchflusszytometrische Analyse RSV-spezifischer T-Zellen

3.3.1 Identifikation RSV-spezifischer T-Zellen

Zur weiteren Analyse wurden acht Peptid-HLA-Multimere ausgewählt, die gut stabilisiert wurden und damit zur durchflusszytometrischen Detektion peptid-spezifischer T-Zellen geeignet waren. Aufgrund der geringen Frequenz RSV-spezifischer T-Zellen im Blut gesunder Blutspender (Heidema *et al.*, 2004) und einer, mit unseren Multimeren auftretenden, relativ hohen Hintergrundfärbung (Günther *et al.*, 2015), wurden die peptid-spezifischen T-Zellen vor der Analyse expandiert. Die aus dem Blut gesunder Blutspender isolierten PBMCs wurden mit IL-2, Peptid und bestrahlten K15-Zellen, welche das jeweilige Peptid-HLA-Single-Chain-Molekül exprimierten, expandiert. Die Auswertung der mit dem jeweiligen Peptid-HLA-Multimer und CD3-Antikörpern gefärbten Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie (Abb. 3.4 und Abb. 3.5). Für alle drei HLA-A*01 restringierten Peptide sowie das HLA-A*02 restringierte Peptid FLTEAIVHSV konnten Peptid-HLA-Multimer positive CD3⁺ T-Zellen identifiziert werden. Der durchschnittliche Anteil Peptid-HLA-Multimer positiver Zellen an der Gesamtzahl aller CD3⁺ T-Zellen lag für FSECNALGSY bei $5,5 \pm 2,0$ % (4/4 Spender), für ISDYFHNTY bei $10,7 \pm 4,4$ % (10/11 Spender) und für STELNYNHLY bei $6,4 \pm 3,6$ % (4/9 Spender). Durchschnittlich $3,2 \pm 1,0$ % aller CD3⁺ T-Zellen waren spezifisch für FLTEAIVHSV (4/5 Spender). Keine peptid-spezifischen T-Zellen konnten für das HLA-A*02 restringierte Peptid YLSELLNSL oder eines der drei HLA-B*07 restringierten Peptide nachgewiesen werden. Färbungen mit dem Kontrollpeptid YLLPAIVHI (HLA-A*02) zeigten lediglich eine Hintergrundfärbung. Die Experimente wurden jeweils mit mindestens drei unabhängigen Spendern durchgeführt (Burbulla *et al.*, 2016).

3. Ergebnisse

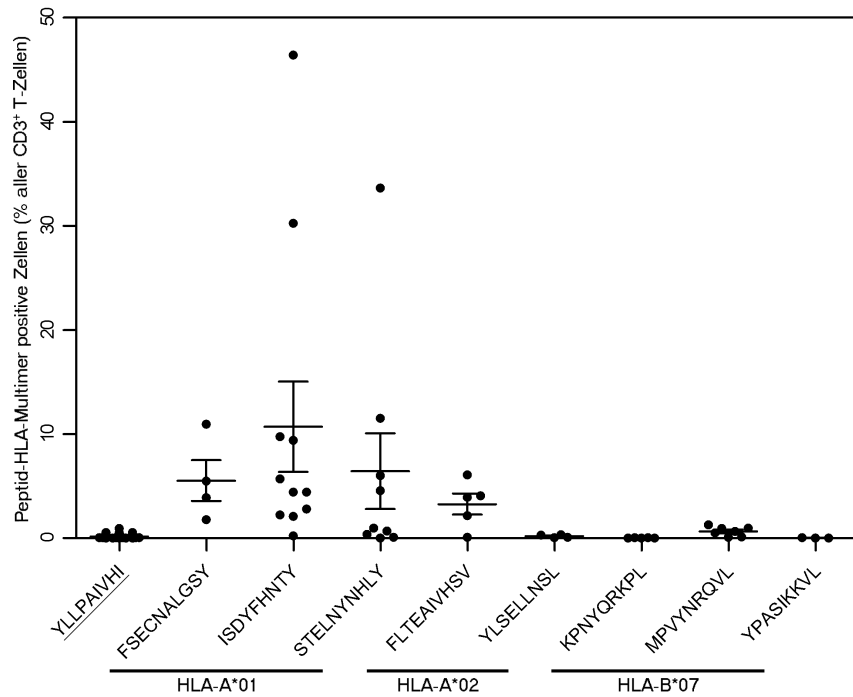


Abb. 3.4: Prozentualer Anteil RSV-spezifischer CD3⁺ T-Zellen nach Expansion

Durchflusszytometrische Analyse aus dem Blut gesunder Blutspender isolierter PBMCs, die mit IL-2, Peptid sowie bestrahlten, das jeweilige Peptid-HLA-Single-Chain-Molekül exprimierenden, K15-Zellen expandiert wurden. Die Färbung erfolgte mit dem jeweiligen Peptid-HLA-Multimer sowie CD3-Antikörpern. YLLPAIVHI diente als Negativkontrolle (unterstrichen). Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardfehler. Jeder Punkt entspricht einem einzelnen Spender. Veränderte Abbildung nach Burbulla *et al.* (2016).

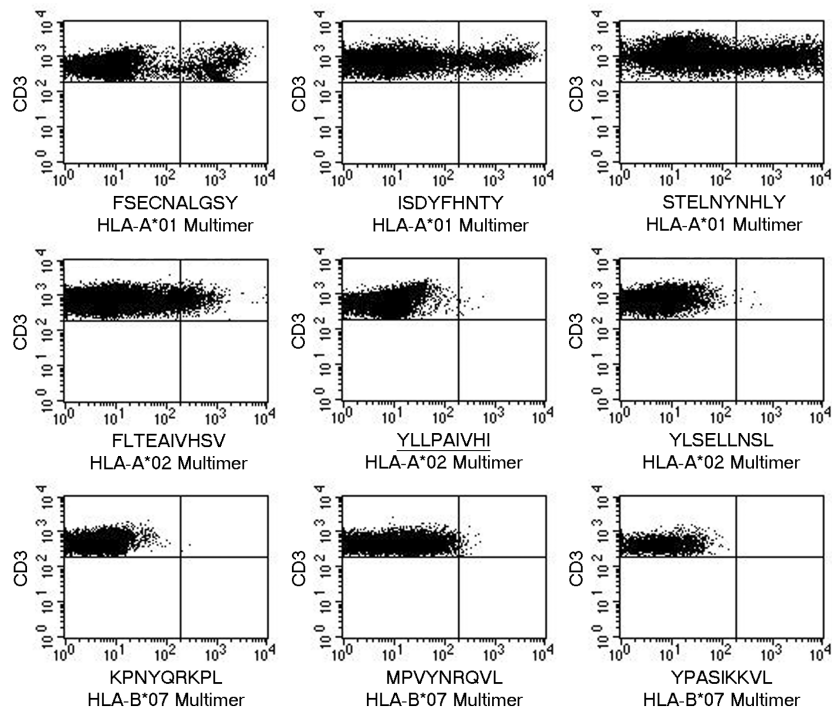


Abb. 3.5: Repräsentative, expandierte PBMCs, die mit dem jeweiligen RSV-spezifischen Peptid-HLA-Multimer gefärbt wurden

Durchflusszytometrische Analyse aus dem Blut gesunder Blutspender isolierter PBMCs, die mit IL-2, Peptid sowie bestrahlten, das jeweilige Peptid-HLA-Single-Chain-Molekül exprimierenden, K15-Zellen expandiert wurden. Die Färbung erfolgte mit dem jeweiligen Peptid-HLA-Multimer sowie CD3-Antikörpern. YLLPAIVHI diente als Negativkontrolle (unterstrichen). Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Messung von mindestens drei unabhängigen Spendern. Veränderte Abbildung nach Burbulla *et al.* (2016).

3.3.2 Detektion RSV-spezifischer T-Gedächtniszellen

Unter der Annahme, dass jeder Mensch mindestens einmal mit RSV infiziert wird (Glezen *et al.*, 1986; Hall, Walsh *et al.*, 1991), wurde bestimmt, ob peptid-spezifische T-Zellen bereits *ex vivo* einen Gedächtnisphänotyp aufweisen (Günther *et al.*, 2015). Dazu wurden aus dem Blut gesunder Blutspender CD45RO⁺ T-Gedächtniszellen isoliert und mit IL-2, sowie bestrahlten, das jeweilige Peptid-HLA-Single-Chain-Molekül exprimierenden, K15-Zellen expandiert. Nach Färbung mit dem entsprechenden Peptid-HLA-Multimer, sowie Antikörpern gegen CD45RO und CD28, fand die durchflusszytometrische Analyse statt (Abb. 3.6, Tab. 10.3). Die Messungen ergaben, dass für die drei HLA-A*01 restringierten Peptide FSECNALGSY, ISDYFHNTY und STELNYNHLY, sowie für das HLA-A*02 restringierte Peptid FLTEAIVHSV Peptid-HLA-Multimer positive Zellen identifiziert wurden, welche sowohl CD45RO⁺ als auch CD28⁺ waren. Das legt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei entweder um Zentrale oder Effektor-T-Gedächtniszellen handelt (Sallusto *et*

3. Ergebnisse

al., 2004; Romero *et al.*, 2007). Gleichzeitig wurden bei sechs von neun HLA-A*01 restringierten Spendern ein hoher prozentualer Anteil CD28⁻ T-Gedächtniszellen nachgewiesen, was wiederum dafür spricht, dass es sich bei diesen Populationen um stärker differenzierte T-Zellen handelt (Sallusto *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu wiesen FLTEAIVHSV (HLA-A*02) spezifische T-Gedächtniszellen bei allen drei Spendern einen fast vollständig CD28⁺ Phänotyp auf. Für das HLA-A*02 restringierte Peptid YLSELLNSL konnten keine peptid-spezifischen T-Gedächtniszellen nachgewiesen werden (Burbulla *et al.*, 2016).

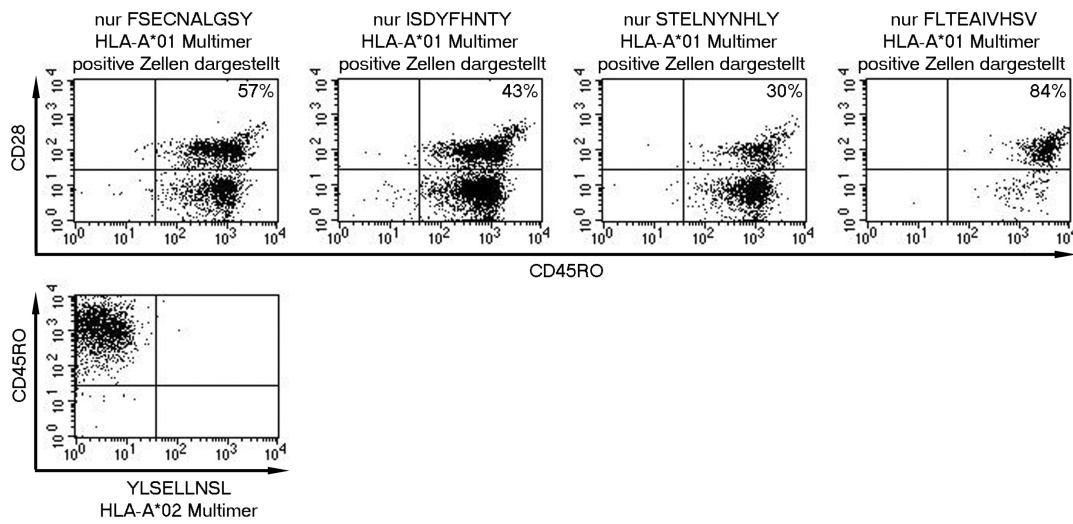


Abb. 3.6: Repräsentative Messungen RSV-spezifischer T-Gedächtniszellen

Durchflusszytometrische Analyse aus dem Blut gesunder Blutspender isolierter CD45RO⁺ T-Gedächtniszellen, welche mit IL-2, sowie bestrahlten, das jeweilige Peptid-HLA-Single-Chain-Molekül exprimierenden, K15-Zellen expandiert wurden. Die Färbung der Zellen erfolgte mit dem entsprechenden Peptid-HLA-Multimer sowie Antikörpern gegen CD45RO und CD28. Angegeben ist der prozentuale Anteil CD28⁺, CD45RO⁺ Zellen. Für das Peptid YLSELLNSL (HLA-A*02) konnten keine peptid-spezifischen T-Gedächtniszellen nachgewiesen werden. Dargestellt sind repräsentative Daten von jeweils drei unabhängigen Spendern. Veränderte Abbildung nach Burbulla *et al.* (2016).

3.4 Funktionelle Analyse peptid-spezifischer T-Zellen

3.4.1 Freisetzung von IFN- γ durch RSV-spezifische T-Zellen

Aufgrund des differenzierten Phänotyps RSV-spezifischer T-Gedächtniszellen besteht die Möglichkeit, dass diese nicht auf eine erneute RSV-Infektion reagieren (Speiser *et al.*, 2014). Um die funktionelle Aktivität dieser Zellen zu prüfen, wurden aus dem Blut gesunder Blutspender isolierte PBMCs mit IL-2 sowie dem jeweiligen Peptid stimuliert und anschließend mittels IFN- γ ELISpot Assay analysiert (Abb. 3.7). Jeweils zwei von acht Spendern wiesen eine, durch die beiden HLA-A*01 restringierten Peptide ISDYFHNTY und STELNYNHLY hervorgerufene, IFN- γ Sekretion auf. Dabei reagierte ein Spender sowohl auf ISDYFHNTY als auch auf STELNYNHLY und je ein weiterer Spender entweder auf ISDYFHNTY oder STELNYNHLY (Tab. 10.4). Das HLA-A*02 restringierte Peptid FLTEAIVHSV wurde von zwei der sechs untersuchten Spender erkannt. Bei einem von acht Spendern rief das Peptid FSECNALGSY (HLA-A*01) eine erhöhte IFN- γ Freisetzung hervor, welche jedoch nicht den dreifachen Wert der entsprechenden Negativkontrolle überschritt und deshalb als negativ gewertet wurde (Burbulla *et al.*, 2016).

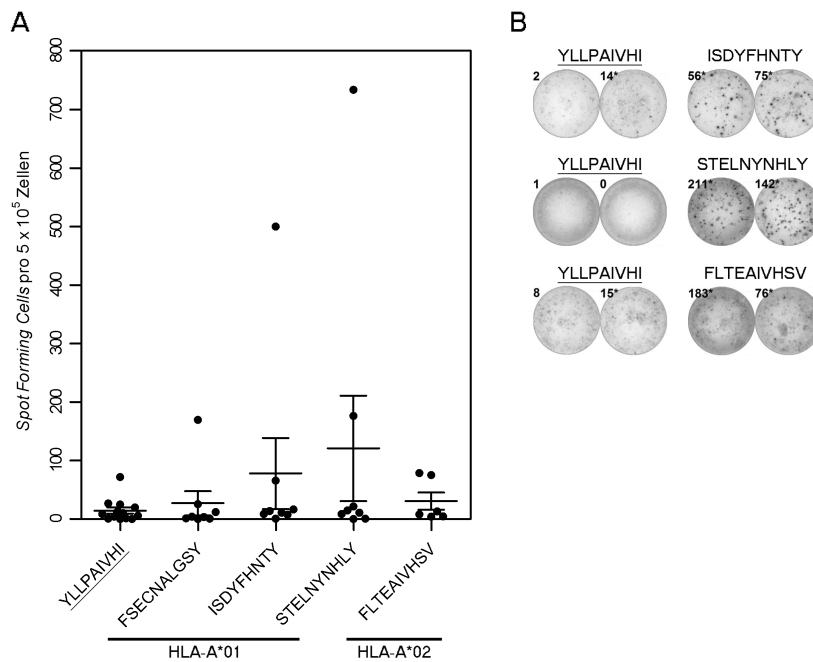


Abb. 3.7: Funktionelle Analyse RSV-spezifischer T-Zellen

IFN- γ ELISpot Assay HLA-A*01 oder HLA-A*02 positiver PBMCs, die zuvor mit IL-2 sowie dem jeweiligen Peptid expandiert wurden. Das autologe HLA-A*02 restringierte Peptid YLLPAIVHI diente als Negativkontrolle (unterstrichen). Der Versuch wurde in Duplikaten mit jeweils mindestens sechs unabhängigen Spendern durchgeführt. (A) Jeder Punkt repräsentiert einen Spender. Angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler aller Spot Forming Cells pro Well. (B) Repräsentative Spender die eine positive Immunantwort aufwiesen. Jede Reihe entspricht einem Spender. Die angegebenen Zahlen entsprechen den Spot Forming Cells pro Well. Veränderte Abbildung nach Burbulla *et al.* (2016).

3.4.2 Funktionelle Analyse von HCMV-seronegativen und -seropositiven Spendern

Um zu überprüfen, ob die funktionelle Immunantwort RSV-spezifischer T-Zellen durch eine Reaktivierung bereits *in vivo* differenzierter T-Gedächtniszellen vermittelt wurde oder im Rahmen des Expansionsprozess ein Priming naiver T-Zellen stattgefunden hat, wurde die Methode mit einem HCMV-Peptid evaluiert. Zu diesem Zweck wurden sowohl HCMV-seronegative als auch -seropositive Spender mit dem HLA-A*02 restringierten HCMV-Peptid NLVPMVATV stimuliert (Wills *et al.*, 1996) und anschließend mittels IFN- γ ELISpot Assay analysiert (Abb. 3.8). Die Auswertung zeigte, dass zwei von zwei HCMV-seropositiven Spendern mit einer signifikanten Sekretion von IFN- γ auf das HCMV-Peptid NLVPMVATV reagierten. Keiner der drei HCMV-seronegativen Spender wies nach Stimulation mit NLVPMVATV eine IFN- γ -vermittelte Immunantwort auf. Die Ergebnisse

3. Ergebnisse

weisen daher darauf hin, dass während des Expansionsprozesses kein Priming naiver peptid-spezifischer T-Zellen stattgefunden hat und die Freisetzung von IFN- γ durch eine Reaktivierung bereits vorhandener T-Effektorzellen vermittelt wurde (Burbulla *et al.*, 2016).

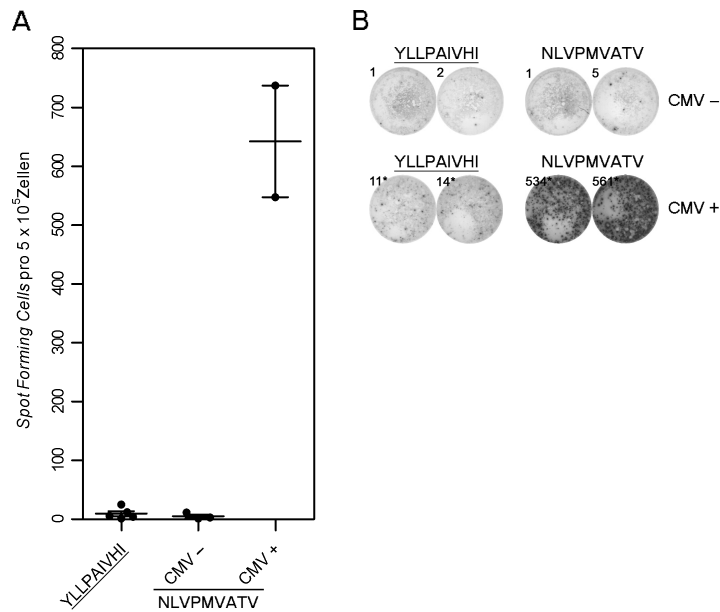


Abb. 3.8: IFN- γ ELISpot Assay HCMV-seropositiver und -seronegativer Spender HCMV-seropositive (CMV+) und -seronegative (CMV-) PBMCs wurden mit dem HLA-A*02 restringierten HCMV-Peptid NLVPMVATV oder der autologen Negativkontrolle YLLPAIVHI (unterstrichen) stimuliert und mittels IFN- γ ELISpot Assay analysiert. Der Versuch wurde in Duplikaten mit zwei bzw. drei unabhängigen Spendern durchgeführt. (A) Angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler aller Spot Forming Cells pro Well. Jeder Punkt repräsentiert einen Spender. (B) Repräsentative Messungen HCMV-seropositiver wie -seronegativer Spender. Jede Reihe entspricht einem Spender. Die angegebenen Zahlen entsprechen den Spot Forming Cells pro Well. Veränderte Abbildung nach Burbulla *et al.* (2016).

4. Diskussion

4.1 Überblick

Das humane Respiratorische Synzytial-Virus ist der häufigste Auslöser einer unteren Atemwegsinfektion bei Kindern und Neugeborenen sowie eine weit verbreitete Krankheitsursache bei Immungeschwächten und älteren Erwachsenen (Falsey *et al.*, 2005; Nair *et al.*, 2010; Resch *et al.*, 2009). Die Entwicklung neuer Therapie- und Präventionmaßnahmen ist von hoher medizinischer Bedeutung und wurde in der Vergangenheit maßgeblich durch das Fehlen einer dauerhaften Immunität (Glezen *et al.*, 1986; Hall, Walsh *et al.*, 1991) sowie dem Auftreten virus-assoziiierter Immunpathologien erschwert (Anderson *et al.*, 2013; Graham, 2011; Murata, 2009; Openshaw *et al.*, 2013). Seit 1998 steht eine passive Immunisierung mit dem monoklonalen Antikörper Palivizumab zur Verfügung (IMpact-RSV Study Group, 1998). Aufgrund der hohen Kosten sowie einer monatlich erforderlichen Auffrischung bleibt die Immunisierung allerdings Kindern mit erhöhten Risikofaktoren vorbehalten (Roeckl-Wiedmann *et al.*, 2003; Isaacs, 2013). RSV-spezifische CD8⁺ T-Zellen besitzen sowohl beim Menschen als auch im Mausmodell eine zentrale Rolle bei der Elimination des Virus und können das Auftreten einer RSV-assoziierten Immunpathologie verhindern (Cannon *et al.*, 1988; Graham *et al.*, 1991; Hussell *et al.*, 1997; Olson *et al.*, 2007). Eine Möglichkeit, eine protektive Immunität gegen RSV zu induzieren, stellt die selektive Aktivierung RSV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen durch einen peptid-basierten RSV-Impfstoff dar (Jessen *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012; Shao *et al.*, 2011; Srikiatkachorn *et al.*, 1997). Zur Zeit ist dieser Ansatz jedoch aufgrund der begrenzten Anzahl bekannter MHC-Klasse-I restringierter Peptidepitope begrenzt (Brandenburg *et al.*, 2000; Goulder *et al.*, 2000; Heidema *et al.*, 2004; Rock *et al.*, 2003; Terrosi *et al.*, 2007; Venter *et al.*, 2003). Ziel dieser Arbeit ist daher die Identifikation und Charakterisierung neuer Peptidepitope des Respiratorischen Synzytial-Virus, welche zur Anwendung in einem peptid-basierten RSV-Impfstoff in Frage kommen.

4.2 Detektion RSV-spezifischer T-Zellen mittels Peptid-HLA-Multimeren

Die im Rahmen dieser Arbeit analysierten, potenziellen RSV-Peptidepitope wurden durch software-basierte Methoden aus den Proteinen des Virus identifiziert. Die Vorhersage erfolgte dabei für MHC-Klasse-I-Moleküle, welche innerhalb der deutschen Bevölkerung besonders häufig vertreten sind. So wird HLA-A*01 von 15,6 %, HLA-A*02 von 29,7 % und HLA-B*07 von 13,9 % der deutschen Bevölkerung exprimiert (Schmidt *et al.*, 2010). Wie bereits von Rock *et al.* (2011) beschrieben, konnte, mit Ausnahme von FTGLIGMLY (HLA-A*01), die Stabilisierung der Peptid-HLA-Multimere durch die entsprechenden RSV-Peptide bestätigt werden (Abb. 3.1). Obwohl die Peptide LSDSTMTNY und VTDNKGAFKY (beide HLA-A*01), KLSEILGML und YMLTNSELL (beide HLA-A*02) sowie das HLA-B*07 restringierte Peptid LPRFMNYTL ebenfalls eine gute Stabilisierung der entsprechenden Peptid-HLA-Multimere aufwiesen, wurden diese Peptide nicht näher analysiert und sollten im Rahmen weiterer Studien genauer charakterisiert werden. Bedingt durch die niedrige Frequenz RSV-spezifischer T-Zellen im Blut gesunder Blutspender wurden die peptid-spezifischen T-Zellen vor der durchflusszytometrischen Analyse expandiert (Heidema *et al.*, 2004). Eine deutliche Abgrenzung Peptid-HLA-Multimer positiver bzw. negativer CD3⁺ T-Zellpopulationen war trotz vorangegangener Expansion nicht bei allen Spendern sicher möglich (Abb. 3.5). Eine mögliche Ursache des fließenden Übergangs könnte eine unspezifische Bindung der verwendeten Peptid-HLA-Multimere an das Corezeptormolekül CD8 sein, welches eng mit dem Peptid-MHC:T-Zell-Rezeptor-Komplex assoziiert ist (Bodinier *et al.*, 2000). Von besonderem Interesse erwiesen sich die Spender Nr. 324 und 677, welche mit 30,27 % bzw. 46,34 % für ISDYFHNTY und 33,65 % für STELNYNHLY eine überdurchschnittlich hohe Frequenz Peptid-HLA-Multimer positiver CD3⁺ T-Zellen aufwiesen (Tab. 10.2). Unter Berücksichtigung der ansonsten durchgehend niedrigen Frequenz Peptid-HLA-Multimer positiver CD3⁺ T-Zellen liegt die Vermutung nahe, dass diese Spender erst kürzlich auf natürliche Weise mit RSV infiziert wurden. Obwohl alle Spender positiv auf die entsprechenden HLA-Moleküle getestet wurden, zeigten nach Expansion nicht alle Spender eine positive Reaktion auf die entsprechenden Peptid-HLA-Multimere (Abb. 3.4). Dies lässt vermuten, dass die analysierten Peptide während einer natürlichen RSV-Infektion entweder subdominant sind oder die Frequenz Peptid-HLA-Multimer positiver CD3⁺ T-Zellen für die verwendete Messmethode zu niedrig war (Heidema *et al.*, 2004). Bedingt durch die wiederholt negativen durchflusszytometrischen Ergebnisse der HLA-B*07 restringierten Peptide KPNYQRKPL, MPVYNRQVL und YPASIKKVL sowie des HLA-A*02 restringierten Peptids YLSELLNSL konnten diese nicht als Ziel RSV-spezifischer T-Zellen bestätigt

werden (Abb. 3.4). Die Peptide scheinen trotz einer guten Stabilisierung auf den entsprechenden Peptid-HLA-Multimeren entweder nicht-immunogen oder subdominant zu sein (Burbulla *et al.*, 2016).

4.3 Phänotypisierung RSV-spezifischer T-Gedächtniszellen

Die Phänotypisierung RSV-spezifischer T-Gedächtniszellen ermöglichte einen Rückschluss darauf, ob die untersuchten RSV-Peptid-epitope während einer natürlichen RSV-Infektion präsentiert und von peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen erkannt wurden. Der Versuch zeigte, dass für alle vier untersuchten Peptide FSECNALGSY, ISDYFHNTY, STELNYNHLY und FLTEAIVHSV Peptid-HLA-Multimer positive T-Gedächtniszellen identifiziert werden konnten, welche sowohl CD45RO als auch CD28 exprimierten (Abb. 3.6). Die Expression der beiden Oberflächenmoleküle CD45RO und CD28 lässt dabei darauf schließen, dass es sich entweder um T_{CM} oder T_{EM} handelt (Sallusto *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 2007). Während alle Spender Peptid-HLA-Multimer positive CD28⁺ T-Gedächtniszellen aufwiesen, wiesen die meisten Spender ebenfalls T-Gedächtniszellen mit CD28⁻ Phänotyp auf. Die Ergebnisse stehen damit in Kontrast zu den Ergebnissen von Heidema *et al.* (2004), wo alle fünf analysierten Spender einen durchgehend CD28⁺ Phänotyp YLEKESIYY-spezifischer T-Gedächtniszellen besaßen. Während dies möglicherweise auf unterschiedliche Expansionsmethoden zurückzuführen sein könnte, wiesen nach derselben Methode expandierte Adenovirus-spezifische T-Gedächtniszellen ebenfalls einen einheitlichen CD28⁺ Phänotyp auf (Günther *et al.*, 2015). Eine mögliche Erklärung für diesen Sachverhalt wäre, dass RSV-spezifische T-Gedächtniszellen schneller und stärker differenzieren als Adenovirus-spezifische T-Gedächtniszellen (Appay *et al.*, 2002; de Bree *et al.*, 2005). Nach demselben Schema expandierte Spender für das nicht-immunogene adenovirale Peptid EYLSPGLVQF (HLA-A*24) bzw. das RSV-spezifische Peptid YLSELLNSL (HLA-A*02) zeigten keine Peptid-HLA-Multimer positiven CD45RO⁺ T-Gedächtniszellen (Burbulla *et al.*, 2016; Günther *et al.*, 2015).

4.4 Funktionelle Charakterisierung RSV-spezifischer T-Zellen

Die funktionelle Analyse peptid-spezifischer T-Zellen mittels IFN- γ ELISpot Assay ermöglichte eine Peptid-HLA-Multimer-unabhängige Bestimmung der Immunogenität von Peptidepitopen. Trotz des differenzierten Phänotyps expandierter RSV-spezifischer T-Gedächtniszellen konnte für die HLA-A*01 restringierten Peptide ISDYFHNTY und STELNYNHLY sowie das HLA-A*02 restringierte Peptide FLTEAIVHSV eine funktionelle Immunantwort nachgewiesen werden (Abb. 3.7). Unter Berücksichtigung dessen, dass jeweils nur zwei von acht bzw. zwei von sechs Spendern eine positive Immunreaktion auf die Peptide ISDYFHNTY und STELNYNHLY bzw. FLTEAIVHSV aufwiesen, liegt die Vermutung nahe, dass die Peptide entweder subdominant sind oder die Frequenz peptid-spezifischer T-Zellen im Blut der Spender zu gering war (Tab. 10.4). Die Expansion HCMV-seronegativer wie -seropositiver Spender mit dem immundominanten HCMV-Peptid NLVPMVATV weist darauf hin, dass im Rahmen der Expansion kein Priming naiver T-Zellen stattgefunden hat (Abb. 3.8). Aus diesem Grund liegt der Schluss nahe, dass es sich bei der durch RSV-Peptidepitope hervorgerufenen Immunreaktion um eine Reaktivierung bereits vorhandener T-Gedächtniszellen handelt und diese bereits *in vivo* während einer natürlichen RSV-Infektion differenziert sind. Vergleicht man die Anzahl der Spot Forming Cells für HCMV- und RSV-spezifische Peptide, weisen RSV-spezifische Peptide eine signifikant schwächere Immunogenität auf als das HCMV-spezifische Peptid. Auch im Vergleich mit adenoviralen Peptiden blieb die Sekretion von IFN- γ durch RSV-spezifische T-Zellen hinter der von Adenovirus-spezifischen T-Zellen zurück (Geyeregger *et al.*, 2013). Bedingt durch wiederholt negative Ergebnisse im IFN- γ ELISpot Assay (Abb. 3.7) konnte das HLA-A*01 restringierte Peptid FSECNALGSY, trotz positiver Ergebnisse in der durchflusszytometrischen Analyse (Abb. 3.5, Abb. 3.6), nicht als Ziel peptid-spezifischer T-Zellen bestätigt werden (Burbulla *et al.*, 2016). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte eine unspezifische Bindung der Peptid-HLA-Multimere an das Corezeptormolekül CD8 darstellen, welche durch gezielte Mutation (A245V) der mit dem CD8-Molekül interagierenden Multimer-Domäne reduziert werden kann (Bodinier *et al.*, 2000). In Übereinstimmung dessen, zeigten durchflusszytometrische Analysen expandierter PBMCs, welche mit modifizierten Peptid-HLA-Multimeren gefärbt wurden, keine FSECNALGSY-spezifischen Peptid-HLA-Multimer positiven CD3⁺ T-Zellpopulationen (unveröffentlichte Ergebnisse, Lena Thiess, Universität Tübingen, Deutschland).

4.5 Ausblick

Obwohl in der Vergangenheit eine Vielzahl unterschiedlicher RSV-Impfstoffe entwickelt und erprobt wurden, steht eine aktive Immunisierung gegen RSV bis heute nicht zur Verfügung. Aufgrund der unterschiedlichen Anforderungen an einen RSV-Impfstoff, scheint die Entwicklung mehrerer Impfstoffe, welche individuell auf die Bedürfnisse von RSV-naiven Kindern und Neugeborenen, Schwangeren sowie älteren Erwachsenen angepasst sind, sinnvoll (Anderson *et al.*, 2013). Am weitesten fortgeschritten ist zur Zeit die Entwicklung des nanopartikel-basierten Impfstoffs RSV-F, welcher bereits bei jungen, gebärfähigen Frauen getestet wurde und dort eine gute Wirksamkeit und Verträglichkeit aufgewiesen hat (Glenn *et al.*, 2016). Die Durchführung einer entsprechenden Phase-III-Studie an gesunden, schwangeren Frauen zur maternalen Immunisierung findet zur Zeit statt (Novavax Clinical Stage Pipeline, 2017). Im Gegensatz dazu, scheint RSV-F bei älteren Erwachsenen eine geringere Immunogenität zu besitzen und verfehlte im Rahmen einer Phase-III-Studie die primären und sekundären Ziele zur Prävention einer RSV-assozierten Atemwegsinfektion (Johnson, 2016).

Die Anwendung eines peptid-basierten RSV-Impfstoffs steht, aufgrund der Assoziation mit Immunpathologien bei RSV-naiven Kindern und Neugeborenen sowie dem Fehlen einer Antikörper-vermittelten Immunität, insbesondere bei der Immunisierung älterer Erwachsener im Vordergrund. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die Peptidepitope ISDYFHNTY, STELNYNHLY und FLTEAIVHSV während einer natürlichen RSV-Infektion von peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen erkannt werden und diese eine funktionelle Aktivität vermitteln können. Eine weitere Charakterisierung der Peptidepitope, insbesondere im Bezug auf die zytotoxische Aktivität der entsprechenden CD8⁺ T-Zellen, wäre wünschenswert. Die Durchführung von Impfstudien am Tiermodell und beim Menschen könnte die Frage beantworten, ob die Peptide auch *in vivo* für eine Reaktivierung peptid-spezifischer T-Gedächtniszellen geeignet sind und diese eine langfristige, protektive Immunität vermitteln können. Neben der Identifikation und Charakterisierung weiterer Peptidepitope des Virus stellt die Entwicklung neuer Adjuvantien, welche eine effektive Präsentation der Peptidepitope auf Antigen-präsentierenden Zellen vermitteln sollten, einen potenziellen Ansatzpunkt zur Entwicklung eines peptid-basierten RSV-Impfstoffs dar.

5. Zusammenfassung

Das humane Respiratorische Synzytial-Virus ist der häufigste Auslöser einer unteren Atemwegsinfektion bei Kindern und Neugeborenen sowie eine weit verbreitete Krankheitsursache bei Immungeschwächten und älteren Erwachsenen. Obwohl seit 1998 eine passive Immunisierung mit dem monoklonalen Antikörper Palivizumab möglich ist, bleibt die Entwicklung neuer Therapie- und Präventionsmaßnahmen von hoher medizinischer Bedeutung. Eine effektive, kausale Therapie gegen RSV steht bis heute nicht zur Verfügung. Die Entwicklung eines aktiven RSV-Impfstoffs wurde in der Vergangenheit maßgeblich durch das Fehlen einer dauerhaften Immunität sowie dem Auftreten Impfstoff-assoziiierter Immunpathologien erschwert. Eine Möglichkeit, eine langfristige, protektive Immunität gegen RSV zu induzieren, stellt die selektive Aktivierung RSV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen durch einen peptid-basierten RSV-Impfstoff dar. Bis heute wurden nur wenige MHC-Klasse-I restringierte RSV-Peptidepitope beschrieben. Ziel dieser Arbeit war daher die Identifikation und Charakterisierung neuer Peptidepitope des Virus, welche zur Anwendung in einem peptid-basierten RSV-Impfstoff in Frage kommen. Die Identifikation potenzieller Peptidepitope wurden mittels *in silico* Epitopvorhersage durchgeführt und die Stabilisierung der Peptid-HLA-Multimere durch die entsprechenden RSV-Peptide mittels SDS-PAGE kontrolliert. Die Detektion und Phänotypisierung peptid-spezifischer T-Zellen erfolgte mittels durchflusszytometrischer Analyse expandierter PBMCs, welche zuvor mit den entsprechenden Peptid-HLA-Multimeren gefärbt wurden. Zur funktionellen Charakterisierung der peptid-spezifischen T-Zellen wurden diese mittels IFN- γ ELISpot Assay analysiert. Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei HLA-A*01 restringierte Peptidepitope (ISDYFHNTY und STELNYNHLY) sowie ein HLA-A*02 restringiertes Peptidepitop (FLTEAIVHSV) als Ziel RSV-spezifischer T-Zellen identifiziert. Alle Peptide stammen aus der Polymerase des Virus. Die Peptide stellen damit potenzielle Kandidaten zur Anwendung in einem peptid-basierten RSV-Impfstoff dar, welcher zur selektiven Aktivierung CD8⁺ T-Zellen verwendet werden könnte.

6. Literaturverzeichnis

Alwan, W. H., Record, F. M. & Openshaw, P. J. (1992). CD4+ T cells clear virus but augment disease in mice infected with respiratory syncytial virus. Comparison with the effects of CD8+ T cells. *Clinical and experimental immunology* 88 (3), S. 527–536. PMID: 1351433.

Anderson, L. J., Dormitzer, P. R., Nokes, D. J., Rappuoli, R., Roca, A. & Graham, B. S. (2013). Strategic priorities for respiratory syncytial virus (RSV) vaccine development. *Vaccine* 31 Suppl 2, B209–B215. PMID: 23598484.

Appay, V., Dunbar, P. R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G. M. A., Papagno, L., Ogg, G. S., King, A., Lechner, F., Spina, C. A., Little, S., Havlir, D. V., Richman, D. D., Gruener, N., Pape, G., Waters, A., Easterbrook, P., Salio, M., Cerundolo, V., McMichael, A. J. & Rowland-Jones, S. L. (2002). Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nature medicine* 8 (4), S. 379–385. PMID: 11927944.

Barrios, K. & Celis, E. (2012). TriVax-HPV: an improved peptide-based therapeutic vaccination strategy against human papillomavirus-induced cancers. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 61 (8), S. 1307–1317. PMID: 22527249.

Bastola, R., Noh, G., Keum, T., Bashyal, S., Seo, J.-E., Choi, J., Oh, Y., Cho, Y. & Lee, S. (2017). Vaccine adjuvants: smart components to boost the immune system. *Archives of pharmacal research*. PMID: 29027637.

Blount, R., Morris, J. A. & Savage, R. E. (1956). Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med* 92, Nr. 3, S. 544–549. PMID: 13359460.

Bodinier, M., Peyrat, M. A., Tournay, C., Davodeau, F., Romagne, F., Bonneville, M. & Lang, F. (2000). Efficient detection and immunomagnetic sorting of specific T cells using multimers of MHC class I and peptide with reduced CD8 binding. *Nature medicine* 6 (6), S. 707–710. PMID: 10835691.

Brandenburg, A. H., Waal, L., Timmerman, H. H., Hoogerhout, P., Swart, R. L. & Osterhaus, A. D. (2000). HLA class I-restricted cytotoxic T-cell epitopes of the respiratory syncytial virus fusion protein. *Journal of virology* 74 (21), S. 10240–10244. PMID: 11024156.

Burbulla, D., Günther, P. S., Peper, J. K., Jahn, G. & Dennehy, K. M. (2016). Human CD8(+) T Cells Target Multiple Epitopes in Respiratory Syncytial Virus Polymerase. *Viral Immunology* 29 (5), S. 307–314. PMID: 27070377.

Cannon, M. J., Openshaw, P. J. & Askonas, B. A. (1988). Cytotoxic T cells clear virus but augment lung pathology in mice infected with respiratory syncytial virus. *J Exp Med* 168, Nr. 3, S. 1163–1168. PMID: 3262705.

Chanock, R., Roizman, B. & Myers, R. (1957). Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. *Am J Hyg* 66, Nr. 3, S. 281–290. PMID: 13478578.

Collins, P. L., Fearn, R. & Graham, B. S. (2013). Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 372, S. 3–38. PMID: 24362682.

Collins, P. L. & Wertz, G. (1983). cDNA cloning and transcriptional mapping of nine polyadenylated RNAs encoded by the genome of human respiratory syncytial virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (11), S. 3208–3212. PMID: 6190173.

Connors, M., Kulkarni, A. B., Firestone, C. Y., Holmes, K. L., Morse, H. C., Sotnikov, A. V. & Murphy, B. R. (1992). Pulmonary histopathology induced by respiratory syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV-immunized BALB/c mice is abrogated by depletion of CD4+ T cells. *Journal of virology* 66 (12), S. 7444–7451. PMID: 1433525.

de Bree, G. J., van Leeuwen, E. M. M., Out, T. A., Jansen, H. M., Jonkers, R. E. & van Lier, R. A. W. (2005). Selective accumulation of differentiated CD8+ T cells specific for respiratory viruses in the human lung. *J Exp Med* 202, Nr. 10, S. 1433–1442. PMID: 16301748.

DeVincenzo, J. P., Wilkinson, T., Vaishnav, A., Cehelsky, J., Meyers, R., Nochur, S., Harrison, L., Meeking, P., Mann, A., Moane, E., Oxford, J., Pareek, R., Moore, R., Walsh, E., Studholme, R., Dorsett, P., Alvarez, R. & Lambkin-Williams, R. (2010). Viral load drives disease in humans experimentally infected with respiratory syncytial virus. *American journal of respiratory and critical care medicine* 182 (10), S. 1305–1314. PMID: 20622030.

Falsey, A. R., Hennessey, P. A., Formica, M. A., Cox, C. & Walsh, E. E. (2005). Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Engl J Med* 352, Nr. 17, S. 1749–1759. PMID: 15858184.

Fujisaki, H., Kakuda, H., Shimasaki, N., Imai, C., Ma, J., Lockey, T., Eldridge, P., Leung, W. H. & Campana, D. (2009). Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res* 69, Nr. 9, S. 4010–4017. PMID: 19383914.

Geyeregger, R., Freimüller, C., Stevanovic, S., Stemberger, J., Mester, G., Dmytrus, J., Lion, T., Rammensee, H.-G., Fischer, G., Eiz-Vesper, B., Lawitschka, A., Matthes, S. & Fritsch, G. (2013). Short-term in-vitro expansion improves monitoring and allows affordable generation of virus-specific T-cells against several viruses for a broad clinical application. *PloS one* 8 (4), e59592. PMID: 23630567.

Glenn, G. M., Fries, L. F., Thomas, D. N., Smith, G., Kpamegan, E., Lu, H., Flyer, D., Jani, D., Hickman, S. P. & Piedra, P. A. (2016). A Randomized, Blinded, Controlled, Dose-Ranging Study of a Respiratory Syncytial Virus Recombinant Fusion (F) Nanoparticle Vaccine in Healthy Women of Childbearing Age. *The Journal of infectious diseases* 213 (3), S. 411–422. PMID: 26259809.

Glezen, W. P., Taber, L. H., Frank, A. L. & Kasel, J. A. (1986). Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am J Dis Child* 140, Nr. 6, S. 543–546. PMID: 3706232.

Goulder, P. J., Lechner, F., Klenerman, P., McIntosh, K. & Walker, B. D. (2000). Characterization of a novel respiratory syncytial virus-specific human cytotoxic T-lymphocyte epitope. *Journal of virology* 74 (16), S. 7694–7697. PMID: 10906229.

Graham, B. S. (2011). Biological challenges and technological opportunities for respiratory syncytial virus vaccine development. *Immunological reviews* 239 (1), S. 149–166. PMID: 21198670.

Graham, B. S. (2016). Vaccines against respiratory syncytial virus: The time has finally come. *Vaccine* 34 (30), S. 3535–3541. PMID: 27182820.

Graham, B. S., Bunton, L. A., Wright, P. F. & Karzon, D. T. (1991). Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice. *The Journal of clinical investigation* 88 (3), S. 1026–1033. PMID: 1909350.

Green, C. A., Scarselli, E., Sande, C. J., Thompson, A. J., Lara, C. M., Taylor, K. S., Hawthorn, K., Del Sorbo, M., Angus, B., Siani, L., Di Marco, S., Traboni, C., Folgori, A., Colloca, S., Capone, S., Vitelli, A., Cortese, R., Klenerman, P., Nicosia, A. & Pollard, A. J. (2015). Chimpanzee adenovirus- and MVA-vectored respiratory syncytial virus vaccine is safe and immunogenic in adults. *Science translational medicine* 7 (300), 300ra126. PMID: 26268313.

Greten, T. F., Korangy, F., Neumann, G., Wedemeyer, H., Schlote, K., Heller, A., Scheffer, S., Pardoll, D. M., Garbe, A. I., Schneck, J. P. & Manns, M. P. (2002). Peptide-beta2-microglobulin-MHC fusion molecules bind antigen-specific T cells and can be used for multivalent MHC-Ig complexes. *Journal of immunological methods* 271 (1-2), S. 125–135. PMID: 12445736.

Griffin, M. P., Khan, A. A., Esser, M. T., Jensen, K., Takas, T., Kankam, M. K., Villafana, T. & Dubovsky, F. (2017). Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of MEDI8897, the Respiratory Syncytial Virus Prefusion F-Targeting Monoclonal Antibody with an Extended Half-Life, in Healthy Adults. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 61 (3). PMID: 27956428.

Groothuis, J. R., Simoes, E. A., Levin, M. J., Hall, C. B., Long, C. E., Rodriguez, W. J., Arrobio, J., Meissner, H. C., Fulton, D. R. & Welliver, R. C. (1993). Prophylactic administration of respiratory syncytial virus immune globulin to high-risk infants and young children. The Respiratory Syncytial Virus Immune Globulin Study Group. *The New England journal of medicine* 329 (21), S. 1524–1530. PMID: 8413475.

Günther, P. S. (2016). Identification of Novel Human Leukocyte Antigen Class I-Restricted Adenoviral Peptide Epitopes and Evaluation of their Suitability for Adoptive T-Cell Transfer Therapy. Univ., Diss., Eberhard Karls Universität Tübingen.

Günther, P. S., Peper, J. K., Faist, B., Kayser, S., Hartl, L., Feuchtinger, T., Jahn, G., Neuenhahn, M., Busch, D. H., Stevanović, S. & Dennehy, K. M. (2015). Identification of a Novel Immunodominant HLA-B*07: 02-restricted Adenoviral Peptide Epitope and Its Potential in Adoptive Transfer Immunotherapy. *J Immunother* 38, Nr. 7, S. 267–275. PMID: 26261890.

Hall, C. B., Powell, K. R., MacDonald, N. E., Gala, C. L., Menegus, M. E., Suffin, S. C. & Cohen, H. J. (1986). Respiratory syncytial viral infection in children with compromised immune function. *N Engl J Med* 315, Nr. 2, S. 77–81. PMID: 3724802.

Hall, C. B., Walsh, E. E., Long, C. E. & Schnabel, K. C. (1991). Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 163, Nr. 4, S. 693–698. PMID: 2010624.

Hall, C. B., Weinberg, G. A., Iwane, M. K., Blumkin, A. K., Edwards, K. M., Staat, M. A., Auinger, P., Griffin, M. R., Poehling, K. A., Erdman, D., Grijalva, C. G., Zhu, Y. & Szilagyi, P. (2009). The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *The New England journal of medicine* 360 (6), S. 588–598. PMID: 19196675.

- Hallak, L. K., Collins, P. L., Knudson, W. & Peeples, M. E. (2000).** Iduronic acid-containing glycosaminoglycans on target cells are required for efficient respiratory syncytial virus infection. *Virology* 271 (2), S. 264–275. PMID: 10860881.
- Handforth, J., Sharland, M. & Friedland, J. S. (2004).** Prevention of respiratory syncytial virus infection in infants. *BMJ (Clinical research ed.)* 328 (7447), S. 1026–1027. PMID: 15117767.
- Heidema, J., de Bree, G. J., De Graaff, P. M. A., van Maren, W. W. C., Hoogerhout, P., Out, T. A., Kimpen, J. L. L. & van Bleek, G. M. (2004).** Human CD8(+) T cell responses against five newly identified respiratory syncytial virus-derived epitopes. *J Gen Virol* 85, Nr. Pt 8, S. 2365–2374. PMID: 15269378.
- Hu, J. & Robinson, J. L. (2010).** Treatment of respiratory syncytial virus with palivizumab: a systematic review. *World journal of pediatrics : WJP* 6 (4), S. 296–300. PMID: 21080142.
- Hughes, A. L. & Yeager, M. (1998).** Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. *Annual review of genetics* 32, S. 415–435. PMID: 9928486.
- Hussell, T., Baldwin, C. J., O’Garra, A. & Openshaw, P. J. (1997).** CD8+ T cells control Th2-driven pathology during pulmonary respiratory syncytial virus infection. *European journal of immunology* 27 (12), S. 3341–3349. PMID: 9464822.
- Impact-RSV Study Group, (1998).** Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. The Impact-RSV Study Group. *Pediatrics* 102, Nr. 3 Pt 1, S. 531–537. PMID: 9738173.
- Isaacs, D. (2013).** Should respiratory care in preterm infants include prophylaxis against respiratory syncytial virus? The case against. *Paediatr Respir Rev* 14, Nr. 2, S. 128–129. PMID: 23422687.
- Jessen, B., Faller, S., Krempl, C. D. & Ehl, S. (2011).** Major histocompatibility complex-dependent cytotoxic T lymphocyte repertoire and functional avidity contribute to strain-specific disease susceptibility after murine respiratory syncytial virus infection. *Journal of virology* 85 (19), S. 10135–10143. PMID: 21795345.
- Johnson, M. (2016).** *Why Novavax (NVAX) Stock Plunged 83% in After-Hours.* URL: <http://www.nasdaq.com/article/why-novavax-nvax-stock-plunged-83-in-after-hours-trading-cm680294> (Abgerufen am 22.10.2017).
- Jozwik, A., Habibi, M. S., Paras, A., Zhu, J., Guvenel, A., Dhariwal, J., Almond, M., Wong, E. H. C., Sykes, A., Maybeno, M., Del Rosario, J., Trujillo-Torralbo, M.-B., Mallia, P., Sidney, J., Peters, B., Kon, O. M., Sette, A., Johnston, S. L., Openshaw, P. J. & Chiu, C. (2015).** RSV-specific airway resident memory CD8+ T cells and differential disease severity after experimental human infection. *Nature communications* 6, S. 10224. PMID: 26687547.
- Karron, R. A., Buchholz, U. J. & Collins, P. L. (2013).** Live-attenuated respiratory syncytial virus vaccines. *Current topics in microbiology and immunology* 372, S. 259–284. PMID: 24362694.
- Kim, H. W., Canchola, J. G., Brandt, C. D., Pyles, G., Chanock, R. M., Jensen, K. & Parrott, R. H. (1969).** Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *American journal of epidemiology* 89 (4), S. 422–434. PMID: 4305198.

Kitamura, T., Koshino, Y., Shibata, F., Oki, T., Nakajima, H., Nosaka, T. & Kumagai, H. (2003). Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. *Exp Hematol* 31, Nr. 11, S. 1007–1014. PMID: 14585362.

Knipe, D. M. & Howley, P. M. (2013). Fields Virology, Vol. 1, 6th Edition. Lippincott Williams & Wilkins.

Kolokoltsov, A. A., Deniger, D., Fleming, E. H., Roberts, N. J., Karpilow, J. M. & Davey, R. A. (2007). Small interfering RNA profiling reveals key role of clathrin-mediated endocytosis and early endosome formation for infection by respiratory syncytial virus. *Journal of virology* 81 (14), S. 7786–7800. PMID: 17494077.

Lee, S., Stokes, K. L., Currier, M. G., Sakamoto, K., Lukacs, N. W., Celis, E. & Moore, M. L. (2012). Vaccine-elicited CD8+ T cells protect against respiratory syncytial virus strain A2-line19F-induced pathogenesis in BALB/c mice. *J Virol* 86, Nr. 23, S. 13016–13024. PMID: 23015695.

Lowry, F. (2010). FDA Panel Nixes Licensing Request for Motavizumab. *Medscape - Jun 03, 2010*.

McKee, A. S., MacLeod, M. K. L., Kappler, J. W. & Marrack, P. (2010). Immune mechanisms of protection: can adjuvants rise to the challenge? *BMC biology* 8, S. 37. PMID: 20385031.

Meissner, H. C., Long, S. S., Pediatrics Committee on Infectious Diseases, A. A., Fetus, C. & Newborn, (2003). Revised indications for the use of palivizumab and respiratory syncytial virus immune globulin intravenous for the prevention of respiratory syncytial virus infections. *Pediatrics* 112 (6 Pt 1), S. 1447–1452. PMID: 14654628.

Mohsen, M. O., Zha, L., Cabral-Miranda, G. & Bachmann, M. F. (2017). Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Seminars in immunology*. PMID: 28887001.

Mullard, A. (2016). Making way for maternal immunization. *Nature reviews. Drug discovery* 15 (1), S. 3–4. PMID: 26718270.

Murata, Y. (2009). Respiratory syncytial virus vaccine development. *Clin Lab Med* 29, Nr. 4, S. 725–739. PMID: 19892231.

Murphy, K., Travers, P., Walport, M., Janeway, C. A., Seidler, L. & Haussler-Siller, I. (2009). Janeway Immunologie, 7. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag.

Nair, H., Nokes, D. J., Gessner, B. D., Dherani, M., Madhi, S. A., Singleton, R. J., O'Brien, K. L., Roca, A., Wright, P. F., Bruce, N., Chandran, A., Theodoratou, E., Sutanto, A., Sedyainingsih, E. R., Ngama, M., Munywoki, P. K., Kartasmita, C., Simões, E. A. F., Rudan, I., Weber, M. W. & Campbell, H. (2010). Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 375, Nr. 9725, S. 1545–1555. PMID: 20399493.

Novavax Clinical Stage Pipeline, (2017). Respiratory Syncytial Virus F-protein nanoparticle vaccine candidate (RSV F Vaccine). URL: <http://novavax.com/page/11/clinical-stage-pipeline> (Abgerufen am 07.10.2017).

- Obermann, S., Petrykowska, S., Manns, M. P., Korangy, F. & Greten, T. F. (2007).** Peptide-beta2-microglobulin-major histocompatibility complex expressing cells are potent antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Immunology* 122, Nr. 1, S. 90–97. PMID: 17472719.
- Oi, V. T., Morrison, S. L., Herzenberg, L. A. & Berg, P. (1983).** Immunoglobulin gene expression in transformed lymphoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (3), S. 825–829. PMID: 6402777.
- Olson, M. R. & Varga, S. M. (2007).** CD8 T cells inhibit respiratory syncytial virus (RSV) vaccine-enhanced disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179 (8), S. 5415–5424. PMID: 17911628.
- Olson, M. R. & Varga, S. M. (2008).** Pulmonary immunity and immunopathology: lessons from respiratory syncytial virus. *Expert review of vaccines* 7 (8), S. 1239–1255. PMID: 18844597.
- Openshaw, P. J. & Chiu, C. (2013).** Protective and dysregulated T cell immunity in RSV infection. *Curr Opin Virol* 3, Nr. 4, S. 468–474. PMID: 23806514.
- Ostler, T., Davidson, W. & Ehl, S. (2002).** Virus clearance and immunopathology by CD8(+) T cells during infection with respiratory syncytial virus are mediated by IFN-gamma. *European journal of immunology* 32 (8), S. 2117–2123. PMID: 12209623.
- Ostler, T. & Ehl, S. (2002).** Pulmonary T cells induced by respiratory syncytial virus are functional and can make an important contribution to long-lived protective immunity. *European journal of immunology* 32 (9), S. 2562–2569. PMID: 12207340.
- Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L. & Baltimore, D. (1993).** Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, Nr. 18, S. 8392–8396. PMID: 7690960.
- Peper, J. K. (2015).** Identification and characterization of naturally presented, immunogenic HLA ligands for establishing a peptide-based anti-tumor vaccination in ovarian cancer. Univ., Diss., Eberhard Karls Universität Tübingen.
- Plummer, E. M. & Manchester, M. (2011).** Viral nanoparticles and virus-like particles: platforms for contemporary vaccine design. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology* 3 (2), S. 174–196. PMID: 20872839.
- Resch, B., Manzoni, P. & Lanari, M. (2009).** Severe respiratory syncytial virus (RSV) infection in infants with neuromuscular diseases and immune deficiency syndromes. *Paediatric respiratory reviews* 10 (3), S. 148–153. PMID: 19651386.
- Rezaee, F., Linfield, D. T., Harford, T. J. & Piedimonte, G. (2017).** Ongoing developments in RSV prophylaxis: a clinician's analysis. *Current opinion in virology* 24, S. 70–78. PMID: 28500974.
- Rock, M. T. & Crowe, J. E. (2003).** Identification of a novel human leucocyte antigen-A*01-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitope in the respiratory syncytial virus fusion protein. *Immunology* 108 (4), S. 474–480. PMID: 12667209.

- Rock, M. T., McKinney, B. A., Yoder, S. M., Prudom, C. E., Wright, D. W. & Crowe, J. E. (2011).** Identification of potential human respiratory syncytial virus and metapneumovirus T cell epitopes using computational prediction and MHC binding assays. *J Immunol Methods* 374, Nr. 1-2, S. 13–17. PMID: 21854782.
- Roeckl-Wiedmann, I., Liese, J. G., Grill, E., Fischer, B., Carr, D. & Belohradsky, B. H. (2003).** Economic evaluation of possible prevention of RSV-related hospitalizations in premature infants in Germany. *Eur J Pediatr* 162, Nr. 4, S. 237–244. PMID: 12647196.
- Romero, P., Zippelius, A., Kurth, I., Pittet, M. J., Touvrey, C., Iancu, E. M., Corthesy, P., Devevre, E., Speiser, D. E. & Rufer, N. (2007).** Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocytes. *J Immunol* 178, Nr. 7, S. 4112–4119. PMID: 17371966.
- Sallusto, F., Geginat, J. & Lanzavecchia, A. (2004).** Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22, S. 745–763. PMID: 15032595.
- Santos, R. P., Chao, J., Nepo, A. G., Butt, S., Stellrecht, K. A., Pearce, J. M. & Lepow, M. L. (2012).** The use of intravenous palivizumab for treatment of persistent RSV infection in children with leukemia. *Pediatrics* 130 (6), e1695–e1699. PMID: 23147965.
- Schmidt, A. H., Solloch, U. V., Baier, D., Stahr, A., Wassmuth, R., Ehninger, G. & Rutt, C. (2010).** Regional differences in HLA antigen and haplotype frequency distributions in Germany and their relevance to the optimization of hematopoietic stem cell donor recruitment. *Tissue antigens* 76 (5), S. 362–379. PMID: 20545902.
- Schmidt, T. G. M., Batz, L., Bonet, L., Carl, U., Holzapfel, G., Kiem, K., Matulewicz, K., Niermeier, D., Schuchardt, I. & Stanar, K. (2013).** Development of the Twin-Strep-tag and its application for purification of recombinant proteins from cell culture supernatants. *Protein expression and purification* 92 (1), S. 54–61. PMID: 24012791.
- Shao, H.-Y., Lin, Y.-W., Yu, S.-L., Lin, H.-Y., Chitra, E., Chang, Y.-C., Sia, C., Chong, P., Hsu, M.-T., Wei, O. L. & Chow, Y.-H. (2011).** Immunoprotectivity of HLA-A2 CTL peptides derived from respiratory syncytial virus fusion protein in HLA-A2 transgenic mouse. *PLoS One* 6, Nr. 9, e25500. PMID: 21980478.
- Simmons, C. P., Hussell, T., Sparer, T., Walzl, G., Openshaw, P. & Dougan, G. (2001).** Mucosal delivery of a respiratory syncytial virus CTL peptide with enterotoxin-based adjuvants elicits protective, immunopathogenic, and immunoregulatory antiviral CD8+ T cell responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 166 (2), S. 1106–1113. PMID: 11145691.
- Speiser, D. E., Utzschneider, D. T., Oberle, S. G., Mänz, C., Romero, P. & Zehn, D. (2014).** T cell differentiation in chronic infection and cancer: functional adaptation or exhaustion? *Nature reviews. Immunology* 14 (11), S. 768–774. PMID: 25257362.
- Spergser, J., Aurich, C., Aurich, J. E. & Rosengarten, R. (2002).** High prevalence of mycoplasmas in the genital tract of asymptomatic stallions in Austria. *Vet Microbiol* 87, Nr. 2, S. 119–129. PMID: 12034540.
- Srikiatkachorn, A. & Braciale, T. J. (1997).** Virus-specific CD8+ T lymphocytes downregulate T helper cell type 2 cytokine secretion and pulmonary eosinophilia during experimental murine

respiratory syncytial virus infection. *The Journal of experimental medicine* 186 (3), S. 421–432. PMID: 9236194.

Stensballe, L. G., Ravn, H., Kristensen, K., Meakins, T., Aaby, P. & Simoes, E. A. F. (2009). Seasonal variation of maternally derived respiratory syncytial virus antibodies and association with infant hospitalizations for respiratory syncytial virus. *The Journal of pediatrics* 154 (2), S. 296–298. PMID: 19150677.

Tayyari, F., Marchant, D., Moraes, T. J., Duan, W., Mastrangelo, P. & Hegele, R. G. (2011). Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nat Med* 17, Nr. 9, S. 1132–1135. PMID: 21841784.

Terrosi, C., Di Genova, G., Savellini, G. G., Correale, P., Bardi, P. & Cusi, M. G. (2007). Immunological characterization of respiratory syncytial virus N protein epitopes recognized by human cytotoxic T lymphocytes. *Viral immunology* 20 (3), S. 399–406. PMID: 17931110.

The PREVENT Study Group, (1997). Reduction of respiratory syncytial virus hospitalization among premature infants and infants with bronchopulmonary dysplasia using respiratory syncytial virus immune globulin prophylaxis. The PREVENT Study Group. *Pediatrics* 99 (1), S. 93–99. PMID: 8989345.

Tregoning, J. S. & Schwarze, J. (2010). Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology. *Clinical microbiology reviews* 23 (1), S. 74–98. PMID: 20065326.

Turner, T. L., Kopp, B. T., Paul, G., Landgrave, L. C., Hayes, D. & Thompson, R. (2014). Respiratory syncytial virus: current and emerging treatment options. *ClinicoEconomics and outcomes research : CEOR* 6, S. 217–225. PMID: 24812523.

Uchida, T. (2011). Development of a cytotoxic T-lymphocyte-based, broadly protective influenza vaccine. *Microbiology and immunology* 55 (1), S. 19–27. PMID: 21175770.

Venter, M., Rock, M., Puren, A. J., Tiemessen, C. T. & Crowe, J. E. (2003). Respiratory syncytial virus nucleoprotein-specific cytotoxic T-cell epitopes in a South African population of diverse HLA types are conserved in circulating field strains. *Journal of virology* 77 (13), S. 7319–7329. PMID: 12805430.

Ventre, K. & Randolph, A. (2010). WITHDRAWN: Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract in infants and young children. *The Cochrane database of systematic reviews* (5), S. CD000181. PMID: 20464715.

Weisman, L. E. (2009). Motavizumab, a second-generation humanized mAb for the prevention of respiratory syncytial virus infection in high-risk populations. *Current opinion in molecular therapeutics* 11 (2), S. 208–218. PMID: 19330726.

Welliver, T. P., Garofalo, R. P., Hosakote, Y., Hintz, K. H., Avendano, L., Sanchez, K., Velozo, L., Jafri, H., Chavez-Bueno, S., Ogra, P. L., McKinney, L., Reed, J. L. & Welliver, R. C. (2007). Severe human lower respiratory tract illness caused by respiratory syncytial virus and influenza virus is characterized by the absence of pulmonary cytotoxic lymphocyte responses. *The Journal of infectious diseases* 195 (8), S. 1126–1136. PMID: 17357048.

Wills, M. R., Carmichael, A. J., Mynard, K., Jin, X., Weekes, M. P., Plachter, B. & Sissons, J. G. (1996). The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol* 70, Nr. 11, S. 7569–7579. PMID: 8892876.

Wu, H., Pfarr, D. S., Johnson, S., Brewah, Y. A., Woods, R. M., Patel, N. K., White, W. I., Young, J. F. & Kiener, P. A. (2007). Development of motavizumab, an ultra-potent antibody for the prevention of respiratory syncytial virus infection in the upper and lower respiratory tract. *Journal of molecular biology* 368 (3), S. 652–665. PMID: 17362988.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Promotion wurde am Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten der Universität Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. med. Gerhard Jahn durchgeführt.

Die Konzeption dieser Arbeit erfolgte durch und in Rücksprache mit Kevin Dennehy, PhD. Die Einarbeitung im Labor erfolgte unter Anleitung von Kevin Dennehy, PhD, Dr. Patrick Günther und Janet Peper, PhD. Mit Ausnahme der Isolation von vier Buffy Coats durch Dr. Patrick Günther sowie dem Auslesen der IFN- γ ELISpot Assays durch Janet Peper, PhD, wurden alle in dieser Arbeit vorkommenden Experimente von mir eigenständig durchgeführt. Die Interpretation der Ergebnisse erfolgte in Rücksprache mit Kevin Dennehy, PhD, der auch das Manuskript dieser Arbeit Korrektur gelesen hat. Rechtschreibung und Satz wurden durch Dietmar und Hanna Burbulla korrigiert. Die aus den Ergebnissen dieser Arbeit hervorgegangene Veröffentlichung wurde von Kevin Dennehy, PhD, verfasst, Tabellen und Diagramme wurden von mir erstellt.

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Tübingen, den 25.11.2017

Daniel Burbulla

8. Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits wie folgt veröffentlicht:

Poster:

Human CD8⁺ T-cells Target Multiple Epitopes in Respiratory Syncytial Virus Polymerase
Daniel Burbulla, Patrick S. Günther, Gerhard Jahn, Janet K. Peper, Stefan Stevanović,
Kevin M. Dennehy
Forschungskolloquium 2016, Medizinische Fakultät Tübingen

Publikationen:

Human CD8(+) T Cells Target Multiple Epitopes in Respiratory Syncytial Virus Polymerase
Burbulla, D., Günther, P. S., Peper, J. K., Jahn, G. & Dennehy, K. M. (2016)
Viral Immunology 29 (5), S. 307-314

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Gerhard Jahn möchte ich ganz herzlich dafür danken, dass er die Betreuung dieser Arbeit übernommen hat und mir durch Bereitstellung des Arbeitsplatzes ermöglicht hat, die vorliegende Arbeit durchzuführen.

Ein besonderer Dank gilt auch Kevin Dennehy, PhD, dem ich für die hervorragende fachliche Betreuung und Unterstützung während der gesamten Zeit danken möchte. Für seine Ausdauer und konstruktive Kritik bei der Anfertigung dieses Manuskripts bin ich ihm sehr zu Dank verpflichtet. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Dr. Patrick Günther, der mir bei der Einarbeitung im Labor eine große Hilfe war und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Mein Dank gilt außerdem Janet Peper, PhD, welche mich bei der Durchführung und Auswertung der IFN- γ ELISpot Assays tatkräftig unterstützt hat.

Ein herzliches Dankeschön gebührt den Mitarbeitern des Instituts für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Tübingen, welche durch Aufbereitung und Typisierung der verwendeten Buffy Coats die Durchführung dieser Arbeit erst möglich gemacht haben. Dem IZKF-Promotionskolleg danke ich herzlich für die organisatorische und finanzielle Unterstützung.

Für die Bereitstellung von Materialien bedanke ich mich außerdem bei:

Dario Campana (St. Judes Children's Research Hospital, Memphis, USA),
Tim Greten (National Institute of Health, Bethesda, USA),
Klaus Hamprecht (Universität Tübingen, Deutschland),
Elizabeth Jaffee (Johns Hopkins University, Baltimore, USA),
Peter Lang (Universität Tübingen, Deutschland),
Wolfgang Schamel (Universität Freiburg, Deutschland),
AG Stevanović (Universität Tübingen, Deutschland),
Elke Straub (Universität Tübingen, Deutschland),
The Nolan Laboratory (Universität Stanford, USA).

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, die mich während des gesamten Studiums unterstützt und ermutigt haben.

10. Anhang

Tab. 10.1: Übersicht aller im Rahmen dieser Arbeit untersuchten RSV-Peptidepitope
Tabelle modifiziert nach Burbulla *et al.* (2016)

HLA-Restriktion	Peptidsequenz	RSV-Protein	Stabilisierung von Peptid-HLA-Multimeren	Peptid-HLA-Multimer positive Spender (%)	Anteil der CD28 ⁺ T-Zellen (% aller Peptid-HLA-Multimer positiven CD45RO ⁺ T-Zellen)	IFN- γ ELISpot Assay (%)
A*01:01	FSECNALGSY	Polymerase	Ja	4/4 Spender (100%)	61,97% \pm 17,75%	0/8 Spender (0%)
	FTGLIGMLY	Nukleokapsidprotein	Nein	NA	NA	NA
	ISDYFHNTY	Polymerase	Ja	10/11 Spender (91%)	54,83% \pm 21,09%	2/8 Spender (25%)
	LSDSTMTNY	Nicht-Strukturprotein 1	Ja	NA	NA	NA
	STELNYNHLY	Polymerase	Ja	4/9 Spender (44%)	51,82% \pm 20,38%	2/8 Spender (25%)
	VTDNKGAFKY	Matrixprotein	Ja	NA	NA	NA
A*02:01	FLTEAIVHSV	Polymerase	Ja	4/5 Spender (80%)	94,00% \pm 4,84%	2/6 Spender (33%)
	KLSEILGML	Phosphoprotein	Ja	NA	NA	NA
	YLSELLNSL	Polymerase	Ja	0/4 Spender (0%)	NA	NA
	YMLTNSSELL	Fusionsprotein	Ja	NA	NA	NA
B*07:02	KPNYQRKPL	Phosphoprotein	Ja	0/5 Spender (0%)	NA	NA
	LPRFMNYTL	Fusionsprotein	Ja	NA	NA	NA
	MPVYNRQVL	Polymerase	Ja	0/7 Spender (0%)	NA	NA
	YPASIKKVL	Polymerase	Ja	0/3 Spender (0%)	NA	NA

NA: Nicht analysiert

Tab. 10.2: Übersicht aller PBMC-Proben, die mit Peptid-HLA-Multimeren gefärbt wurden
 Anteil Peptid-HLA-Multimer positiver Zellen an der Gesamtzahl aller CD3⁺ T-Zellen
 in %, Tabelle modifiziert nach Burbulla *et al.* (2016)

Spender-Nr.	HLA-Restriktion	Kontrollpeptid	Untersuchtes Peptid
050	A*24, A*32, B*07, B*35	YLLPAIVHI	0,04 % KPNYQRKPL 0,02 %
			0,04 % MPVYNRQVL 0,94 %
			0,18 % YPASIKKVL 0,06 %
175	A*01, A*30, B*18, B*35	YLLPAIVHI	0,04 % FSECNALGSY 5,48 %
			0,01 % ISDYFHNTY 0,22 %
305	A*01, A*24, B*35, -	YLLPAIVHI	0,04 % FSECNALGSY 1,79 %
319	A*01, A*11, B*18, B*55	YLLPAIVHI	0,22 % ISDYFHNTY 4,44 %
			0,33 % STELNYNHLY 0,97 %
324	A*01, A*02, B*35, B*61	YLLPAIVHI	0,24 % ISDYFHNTY 30,27 %
332	A*02, -, B*07, -	YLLPAIVHI	0,11 % FLTEAIVHSV 6,09 %
			0,37 % YLSELLNSL 0,08 %
333	A*01, A*03, B*49, B*64	YLLPAIVHI	0,07 % ISDYFHNTY 2,23 %
337	A*03, A*11, B*07, -	YLLPAIVHI	0,07 % KPNYQRKPL 0,04 %
			0,07 % MPVYNRQVL 0,97 %
354	A*02, A*31, B*35, B*60	YLLPAIVHI	0,52 % FLTEAIVHSV 0,10 %
370	A*01, A*02, B*08, B*61	YLLPAIVHI	0,06 % ISDYFHNTY 2,11 %
			0,12 % STELNYNHLY 0,37 %
653	A*01, A*24, B*08, B*62	YLLPAIVHI	0,15 % ISDYFHNTY 9,74 %
			0,23 % STELNYNHLY 6,01 %
656	A*02, A*03, B*51, B*61	YLLPAIVHI	0,55 % FLTEAIVHSV 4,08 %
			0,49 % YLSELLNSL 0,34 %
657	A*01, A*24, B*08, B*57	YLLPAIVHI	0,30 % ISDYFHNTY 5,70 %
			0,29 % STELNYNHLY 0,68 %
677	A*01, A*30, B*08, B*49	YLLPAIVHI	0,12 % ISDYFHNTY 46,43 %
			0,12 % STELNYNHLY 33,65 %
681	A*01, A*02, B*27, B*73	YLLPAIVHI	0,06 % ISDYFHNTY 9,39 %
			0,09 % STELNYNHLY 4,57 %
738	A*02, -, B*07, B*61	YLLPAIVHI	0,54 % FLTEAIVHSV 2,17 %
			0,09 % YLSELLNSL 0,31 %
742	A*01, A*32, B*08, B*51	YLLPAIVHI	0,03 % ISDYFHNTY 2,80 %
			0,01 % STELNYNHLY 0,10 %
758	A*01, A*02, B*08, B*44	YLLPAIVHI	0,09 % ISDYFHNTY 4,43 %
777	A*03, A*11, B*07, B*55	YLLPAIVHI	0,10 % KPNYQRKPL 0,00 %
			0,11 % MPVYNRQVL 0,12 %
800	A*01, A*02, B*07, B*57	YLLPAIVHI	0,04 % FSECNALGSY 3,90 %
			0,03 % STELNYNHLY 0,01 %
804	A*02, A*24, B*07, -	YLLPAIVHI	0,95 % MPVYNRQVL 0,67 %
807	A*02, A*03, B*07, B*39	YLLPAIVHI	0,00 % MPVYNRQVL 1,30 %
			0,00 % YPASIKKVL 0,03 %
869	A*01, -, B*08, B*44	YLLPAIVHI	0,16 % FSECNALGSY 10,96 %
			0,18 % STELNYNHLY 11,52 %
900	A*01, A*03, B*07, B*57	YLLPAIVHI	0,20 % KPNYQRKPL 0,06 %
			0,20 % MPVYNRQVL 0,09 %
908	A*02, -, B*07, B*51	YLLPAIVHI	0,04 % KPNYQRKPL 0,01 %
			0,03 % MPVYNRQVL 0,52 %
			0,04 % YPASIKKVL 0,01 %
992	A*02, A*03, B*08, B*27	YLLPAIVHI	0,04 % FLTEAIVHSV 3,93 %
			0,09 % YLSELLNSL 0,06 %

Tab. 10.3: Übersicht aller durchflusszytometrisch phänotypisierten PBMC-Proben
Tabelle modifiziert nach Burbulla *et al.* (2016)

Spender-Nr.	HLA-Restriktion	Peptid-HLA-Multimer positive CD45RO ⁺ T-Zellen (% aller CD45RO ⁺ Zellen)	davon CD28 ⁺ (%)
022	A*01, A*02, B*38, B*57	FSECNALGSY	4,19 %
		ISDYFHNTY	3,05 %
		STELNYNHLY	1,32 %
299	A*01, A*02, B*39, B*57	FSECNALGSY	1,81 %
		ISDYFHNTY	0,98 %
		STELNYNHLY	0,30 %
555	A*02, A*24, B*07, B*62	FLTEAIVHSV	0,08 %
		YLSELLNSL	0,00 %
557	A*02, A*28, B*07, B*51	FLTEAIVHSV	0,25 %
		YLSELLNSL	0,02 %
617	A*02, A*24, B*07, -	FLTEAIVHSV	0,22 %
		YLSELLNSL	0,03 %
859	A*01, A*02, B*07, B*08	FSECNALGSY	6,38 %
		ISDYFHNTY	3,76 %
		STELNYNHLY	1,71 %

Tab. 10.4: Übersicht aller mittels IFN- γ ELISpot Assay analysierten PBMC-Proben
Tabelle modifiziert nach Burbulla *et al.* (2016)

Spender-Nr.	HLA-Restriktion	CMV	Untersuchtes Peptid	Spot Forming Cells pro $5 \cdot 10^5$ Zellen
026	A*02, A*03, B*07, B*51	+	FLTEAIVHSV	75,25
			NLVPMVATV	547,50
			YLLPAIVHI	12,00
148	A*02, A*26, B*07, B*44	-	FLTEAIVHSV	4,50
			NLVPMVATV	1,50
			YLLPAIVHI	4,50
168	A*02, A*03, B*07, B*41	-	FLTEAIVHSV	13,50
			NLVPMVATV	11,50
			YLLPAIVHI	6,00
203	A*01, A*11, B*18, B*55		FSECNALGSY	25,50
			ISDYFHNTY	11,00
			STELNYNHLY	8,50
			YLLPAIVHI	20,00
235	A*01, A*03, B*07, -		FSECNALGSY	4,00
			ISDYFHNTY	7,50
			STELNYNHLY	11,00
			YLLPAIVHI	8,50
261	A*01, A*24, B*35, B*57		FSECNALGSY	12,00
			ISDYFHNTY	16,50
			STELNYNHLY	15,00
			YLLPAIVHI	27,00
620	A*01, A*03, B*07, B*57		FSECNALGSY	169,50
			ISDYFHNTY	500,00
			STELNYNHLY	733,50
			YLLPAIVHI	72,00
628	A*01, A*31, B*07, B*08		FSECNALGSY	0,50
			ISDYFHNTY	14,00
			YLLPAIVHI	0,50
643	A*01, A*02, B*08, B*60		FSECNALGSY	3,50
			ISDYFHNTY	65,50
			STELNYNHLY	22,00
			FLTEAIVHSV	5,00
719	A*02, A*32, B*51, B*39	-	YLLPAIVHI	10,25
			FLTEAIVHSV	8,00
			NLVPMVATV	3,00
752	A*01, A*32, B*18, B*35		YLLPAIVHI	1,50
			FSECNALGSY	1,50
			ISDYFHNTY	9,00
			STELNYNHLY	0,00
755	A*02, A*25, B*18, B*27	+	YLLPAIVHI	1,00
			FSECNALGSY	78,50
			NLVPMVATV	737,00
			YLLPAIVHI	25,00
785	A*01, A*03, B*07, B*14		FSECNALGSY	1,00
			ISDYFHNTY	1,00
			STELNYNHLY	1,00
			YLLPAIVHI	0,50