

Aus dem Interfakultären Institut für Zellbiologie
der Universität Tübingen
Abteilung Immunologie

**Charakterisierung
HLA-A*01- sowie HLA-A*26-restringierter
EBV-Epitope - Implikationen für den Supertyp**

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

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

vorgelegt von

Gabriel, geb. Barsaume, Elina

2019

Dekan: Professor Dr. Ingo B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Stevanović

2. Berichterstatter: Professorin Dr. K. Schilbach-Stückle

Tag der Disputation: 12.12.2019

**Meinem Ehemann, meinen beiden Töchtern
und meinen Eltern gewidmet**

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Das Epstein-Barr Virus	1
1.1.1. Klinische Manifestation.....	2
1.1.2. EBV-assoziierte Malignome.....	3
1.1.3. Posttransplantationslymphome.....	4
1.2. Grundlagen des Immunsystems	6
1.2.1. Angeborenes Immunsystem.....	7
1.2.2. Adaptives Immunsystem.....	7
1.3. T-Zellen	9
1.3.1. Entwicklung und Selektion im Thymus.....	9
1.3.2. Subpopulationen.....	10
1.3.3. <i>Priming</i> – Mechanismen der T-Zellaktivierung.....	10
1.3.4. Funktionsweise zytotoxischer T-Zellen – immunologische Synapse....	12
1.3.5. T-Gedächtniszellen.....	12
1.4. Humane Leukozytenantigene (HLA)	13
1.4.1. HLA Klasse I.....	14
1.4.1.1. Aufbau und Peptidbindung.....	14
1.4.1.2. Antigenprozessierung.....	16
1.4.1.3. Nomenklatur.....	17
1.4.2. HLA Klasse II.....	17
1.4.3. HLA-Supertypen und peptidbasierte Impfstoffe.....	18
1.5. Möglichkeiten der Immuntherapie	19

1.6. Ziele und Konzeption der Arbeit.....	20
2. MATERIAL UND METHODEN.....	21
2.1. Material.....	21
2.1.1. Spenderzellen.....	21
2.1.2. Geräte.....	22
2.1.3. Chemikalien, Lösungen, Puffer.....	23
2.1.4. Puffer und Medien.....	25
2.1.5. Zytokine.....	26
2.1.6. Antikörper und Farbstoffe.....	26
2.1.7. IFN γ -ELISpot Kontrollpeptide.....	27
2.2. Methoden.....	29
2.2.1. Peptide.....	29
2.2.1.1. Selektion.....	29
2.2.1.2. Synthese und Aufbereitung.....	31
2.2.2. PBMCs.....	32
2.2.2.1. Isolierung der PBMCs aus <i>Buffy Coats</i> und Kryokonservierung.....	32
2.2.2.2. Zellzahlbestimmung.....	34
2.2.2.3. Auftauen.....	34
2.2.3. T-Zellexperimente.....	34
2.2.3.1. 12-Tages-Prästimulation.....	35
2.2.3.2. IFN γ -ELISpot.....	35
2.2.3.3. Durchflusszytometrie.....	38
2.2.3.3.1. Intrazelluläre Zytokinfärbung.....	39

2.2.3.4. HLA-Tetramerfärbung	41
2.2.3.4.1. MHC-Monomer-Synthese.....	42
2.2.3.4.2. Tetramerisierung.....	44
2.2.3.4.3. HLA-Tetramerfärbung.....	44
2.2.3.5. <i>Gating</i> -Strategie.....	45
2.2.4. Kreuzreaktionen im HLA-A*01-Supertyp.....	45
3. ERGEBNISSE.....	45
3.1. Positivkontrollen.....	45
3.1.1. Positivmix für HLA-A*01.....	45
3.1.2. Positivmix für HLA-A*26.....	48
3.2. Epitopscreening.....	49
3.2.1. PeptidAuswahl für HLA-A*01 und HLA-A*26.....	49
3.2.2. Ergebnisse des ersten Epitopscreenings für HLA-A*01.....	50
3.2.3. Ergebnisse des ersten Epitopscreenings für HLA-A*26.....	53
3.3. Durchflusszytometrische Verifizierung und Charakterisierung der zytotoxischen T-Zellreaktion auf Epitopkandidaten.....	56
3.3.1. HLA-A*01: T-Zellidentität und Funktionalität.....	59
3.3.2. HLA-A*26: T-Zellidentität und Funktionalität.....	61
3.3.3. Ergebnisse der intrazellulären Zytokinfärbung für HLA-A*01- sowie HLA-A*26-Peptide im Vergleich.....	63
3.4. Spezifität der CD8⁺ T-Zellreaktion gegen zwei HLA-A*01-Epitope.....	65
3.5. Zweites Epitopscreening – Kreuzreaktionen im HLA-A*01-Supertyp..	66
3.5.1. Vergleich der Aminosäuresequenzen natürlicher Liganden der HLA-Moleküle A*01 und A*26.....	67

3.5.2. Kreuzreaktivität im HLA-A*01-Supertyp.....	69
4. DISKUSSION.....	70
4.1. Immundominanz und Erkennungsfrequenz.....	70
4.2. Positivmix.....	71
4.2.1. HLA-A*01.....	71
4.2.2. HLA-A*26.....	72
4.3. PeptidAuswahl.....	72
4.4. Epitopscreening.....	74
4.4.1. HLA-A*01.....	74
4.4.2. HLA-A*26.....	75
4.5. Charakterisierung der zytotoxischen T-Zellantwort.....	77
4.5.1. HLA-A*01.....	78
4.5.2. HLA-A*26.....	79
4.6. Supertypen und ihre Relevanz für die Entwicklung peptidbasierter Impfstoffe.....	81
4.6.1. HLA-A*01-Supertyp – Vergleich der Aminosäuresequenzen natürlicher Liganden für A*01 und A*26 und Kreuzreaktivität innerhalb des Supertypen.....	82
4.6.2. Kreuzreaktivität außerhalb des HLA-A*01-Supertypen.....	84
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	85
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	86
7. ANHANG.....	95
ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL.....	101
DANKSAGUNG.....	102

Abkürzungsverzeichnis

ADV	Adenovirus
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
APC	Antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
β-ME	β-Mercaptoethanol
BSA	Bovines Serumalbumin
CAEBV	Chronisch aktive EBV-Infektion
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CMV	Zytomegalievirus
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
DC	Dendritische Zelle
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DKMS	Deutsche Knochenmarkspenderdatei
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISpot	<i>enzyme-linked immunospot</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fötale Kälberserum
Flu	Influenzavirus
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
GvHD	<i>graft-versus-host disease</i>
HCl	Salzsäure
HEV	Hochendotheliale Venule
HHV	Humanes Herpesvirus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus

HLA	Humanes Leukozytenantigen
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
ICS	Intrazelluläre Zytokinfärbung
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
LT	Lymphotoxin
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
NK	Natürliche Killerzelle
NKT	Natürliche T-Killerzelle
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PHA	Phytohämagglutinin
PTLD	<i>posttransplant lymphoproliferative disorder</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
RR	Reaktionsrate
SSC	<i>side scatter</i>
T _{CM}	<i>central memory T cell</i>
T _H	T-Helferzelle
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
T _{RM}	<i>tissue-resident memory T cell</i>
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TCM	T-Zellmedium
TCR	T-Zellrezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TSB	<i>Tetramer staining buffer</i>

1. EINLEITUNG

1.1. Das Epstein-Barr Virus

Das Epstein-Barr Virus ist ein γ -Herpesvirus und gehört als humanes Herpesvirus 4 (HHV-4) zur Familie der insgesamt acht humanen Herpesviren. Es weist wie alle Herpesviren eine lineare, doppelsträngige DNA auf, welche im Fall des Epstein-Barr Virus fast 100 Gene codiert (de Jesus et al., 2003), und persistiert nach einer anfänglichen Phase der lytischen Infektion lebenslang in den B-Zellen seines Wirts als latente Infektion. Infolge meist oraler Übertragung durch Speichel vermehrt sich das Virus nach Befall von B-Lymphozyten und Epithelzellen im Oropharynx. Dieser lytischen Replikation liegen Proteine zugrunde, die nach dem Zeitpunkt ihres Auftretens in drei Klassen eingeteilt werden: Die sehr frühen Proteine (*immediate early proteins, IE*) aktivieren die lytische Replikation, die frühen Proteine (*early proteins, E*) sind unter anderem für die virale DNA-Replikation sowie die Blockade der Antigenprozessierung verantwortlich und die späten Proteine (*late proteins, L*) bilden strukturelle Bestandteile des Virus (Odumade et al., 2011). Der Befall der B-Lymphozyten führt zudem zu einer latenten Infektion und somit lebenslangen Persistenz des EBV in diesen Zellen, indem das Virus die normale Physiologie der B-Zellen ausnutzt, langlebige B-Gedächtniszellen zu bilden. Von der nun episomalen DNA (Ambinder and Lin, 2005) des Virus werden nur noch wenige, latente Gene exprimiert: darunter die sechs EBNAs (*EBV nuclear antigens*) EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B (EBNA4), EBNA3C (EBNA6) und EBNA-LP (EBNA5) sowie die zwei latenten Membranproteine LMP1 und LMP2. Die virale Genexpression durchläuft dabei je nach Lokalisation der Zelle und ihrer Differenzierung verschiedene Latenzprogramme (Thorley-Lawson, 2001; Speck, 2005) (Tabelle 1). Nach der Infektion naiver B-Zellen im Oropharynx erfolgt zunächst deren Aktivierung und Wachstum zu proliferierenden Lymphoblasten, was dem Latenztyp III (*growth programme*) entspricht. Eine *in vitro* Infektion ruhender B-Lymphozyten führt ebenfalls zur Aktivierung der Zellen entsprechend des Latenztyp III und zur Bildung immortalisierter lymphoblastoider Zelllinien (LCL)(Rickinson and Moss, 1997). *In vivo* finden sich diese LCL-ähnlichen B-Zellen nur in den Lymphknoten (Babcock et al., 2000). Es werden alle latenten

Gene exprimiert, wodurch viele der infizierten Zellen noch vom Immunsystem erkannt werden. Die Genexpression dieser Zellen wird beim Latenztyp II (*default programme*) herunterreguliert und die B-Zellen differenzieren über die Keimzentrumsreaktion zu langlebigen B-Gedächtniszellen. Im folgenden Latenztyp 0 werden keine Gene mehr exprimiert und die infizierten Gedächtniszellen rezirkulieren lebenslang im peripheren Blutkreislauf (Odumade et al., 2011). Erfolgt eine Zellteilung, schaltet die virale Genexpression in den Latenztyp I (*latency programme*) und es wird ein Protein (EBNA 1) gebildet, dass es der viralen DNA ermöglicht, repliziert zu werden (Thorley-Lawson and Gross, 2004). Wird die Gedächtniszelle durch ein Antigen aktiviert und differenziert sich infolgedessen zu einer Plasmazelle, kommt es zu einer Reaktivierung des darin befindlichen latenten Virus und es tritt erneut in den lytischen Zyklus zur Replikation infektiöser Virionen ein (Hislop et al., 2007). Die Anzahl latent infizierter B-Gedächtniszellen bleibt nach Abheilen der Primärinfektion über Jahre relativ stabil (je nach Individuum 1-50 / 10^6 B-Zellen) (Khan et al., 1996) und auch gesunde EBV-Träger schütten aufgrund wiederkehrender Reaktivierungen in geringem Maße infektiöse Virionen in den Speichel aus (Landais et al., 2003).

1.1.1. Klinische Manifestation

Das EBV ist weltweit verbreitet mit einer Durchseuchungsrate von bis zu 95 % in der erwachsenen Bevölkerung. Die Primärinfektion erfolgt in den meisten Ländern im Kindesalter und ist für gewöhnlich asymptomatisch oder verursacht unspezifische Symptome eines gewöhnlichen Virusinfektes (Sumaya et al., 1975). Die in westlichen Ländern eher im Jugend- oder Erwachsenenalter auftretende Primärinfektion manifestiert sich in mindestens 25 % der Fälle (Crawford et al., 2006) als Infektiöse Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber, *kissing disease*), eine selbstlimitierende Erkrankung mit fieberhafter Pharyngitis, Lymphadenopathie und atypischen Lymphozyten. Die meisten dieser atypischen Lymphozyten sind EBV-spezifische CD8⁺ T-Zellen, die gegen lytische und latente EBV-Proteine gerichtet sind und deren überschießende Proliferation und

Aktivierung (Lymphozytose) unter anderem zu den meisten Symptomen der Infektiösen Mononukleose führen (Silins et al., 2001). Andererseits spielen die CD8⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der akuten sowie bei der Überwachung der persistierenden EBV-Infektion (Young and Rickinson, 2004).

Die Immunreaktion gegen die Primärinfektion beinhaltet sowohl eine Aktivität natürlicher Killerzellen als Bestandteil der angeborenen Immunität als auch die Antikörperbildung und die Aktivierung CD4⁺ und vor allem CD8⁺ T-Zellen als Vertreter der erworbenen Immunität. Dabei richtet sich die zytotoxische CD8⁺ T-Zellaktivität sowohl gegen Epitope aus dem lytischen als auch dem latenten EBV-Zyklus. Im weiteren Verlauf wird das Virus nur unter Kontrolle gehalten und nicht eliminiert, da es sich verschiedener Strategien bedient, sich einer Erkennung durch das Immunsystem zu entziehen (Hatton et al., 2014).

1.1.2. EBV-assoziierte Malignome

Das Epstein-Barr Virus ist das erste humane Virus, dem eine Verbindung zur Entstehung menschlicher Tumoren nachgewiesen werden konnte (Miller et al., 1977; Thompson and Kurzrock, 2004). Es wurde 1964 durch elektronenmikroskopische Untersuchung kultivierter Zellen des Burkitt-Lymphoms entdeckt (Epstein, 1964), einem der häufigsten malignen Tumore bei Kindern in bestimmten Gebieten Afrikas. Aufgrund klimatischer und geografischer Besonderheiten im Auftreten wurde bereits zuvor eine virale Genese vermutet (Burkitt, 1962). Wenige Jahre nach der Entdeckung des EBV wurde die ätiologische Verbindung zur Infektiösen Mononukleose hergestellt (Henle et al., 1968). Die Mehrheit der Infektionen verläuft asymptomatisch und auch wenn es zu Symptomen einer Infektiösen Mononukleose kommt, entwickeln die meisten EBV-Träger keine Langzeitschäden infolge der lebenslang persistierenden Infektion (Odumade et al., 2011). In seltenen Fällen kommt es jedoch zu Komplikationen wie der Chronisch Aktiven EBV-Infektion (CAEBV). Diese geht mit einer Krankheitsdauer von mindestens sechs Monaten und einer erhöhten Morbidität und Mortalität einher (Odumade et al., 2011; Okano et al., 1991). Das EBV besitzt die Fähigkeit, die Proliferation und das Wachstum latent

infizierter B-Lymphozyten zu induzieren, was es zu einem potentiellen Karzinogen macht (Thorley-Lawson and Gross, 2004). So kann eine Immunschwäche mit beeinträchtigter T-zellvermittelter Immunreaktion – diese spielt sonst eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der persistierenden Infektion – zur Entwicklung maligner Tumoren beitragen (Münz and Moormann, 2008). Dabei lassen sich alle EBV-assoziierten Malignome dem latenten Zyklus und genauer noch einem der vier Latenztypen zuordnen (Tabelle 1); während sich das Virus bei gesunden Trägern in ruhenden B-Gedächtniszellen im Latenztyp 0 befindet und nur LMP2 exprimiert wird, weisen die viralen Genexpressionsmuster in den assoziierten Malignomen jeweils einen der übrigen drei Latenztypen auf (Thompson and Kurzrock, 2004).

Tabelle 1: EBV-Latenztypen und Auswahl assoziierter Malignome. EBNA: *Epstein-Barr virus nuclear antigen*; LMP: *latent membrane protein*; PTLD: Posttransplantationslymphome.

Latenztyp	Virale Genexpression	Assoziiertes Malignom
Latenztyp I <i>latency programme</i>	EBNA1	Burkitt-Lymphom (endemisch)
Latenztyp II <i>default programme</i>	EBNA1, LMP1, LMP2	Hodgkin-Lymphom Nasopharynx-Karzinom
Latenztyp III <i>growth programme</i>	alle latenten Gene*	PTLD

*EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B (EBNA4), EBNA3C (EBNA6), EBNA-LP (EBNA5), LMP1 und LMP2.

1.1.3. Posttransplantationslymphome

Da die meisten EBNA-Proteine immunogen sind, befinden sich die EBV-positiven Lymphomzellen bei immunkompetenten Trägern meist im Latenztyp I oder II, um einer Erkennung und Eliminierung durch das Immunsystem zu entgehen (Cesarman and Mesri, 1999). Der Latenztyp III, bei dem alle latenten Gene exprimiert werden, findet sich im Gegensatz dazu hauptsächlich bei immungeschwächten Trägern, deren Immunsystem durch eine unzureichende T-Zellaktivität die Kontrolle über das Virus verliert.

Ein Beispiel hierfür sind Posttransplantationslymphome (*posttransplant lymphoproliferative disorder*, PTLD), eine heterogene Gruppe lymphoproliferativer Erkrankungen (meist der B-Zellen), die eine lebensgefährliche Komplikation nach iatrogenen Immunsuppression im Rahmen einer Stammzell- oder Organtransplantation darstellen. Ca. 90 % der PTLD sind EBV-assoziiert (Lim et al., 2006). Dabei kann es zur Reaktivierung einer latenten Infektion des Empfängers oder zu einer primären EBV-Infektion des zuvor seronegativen Empfängers durch ein EBV⁺-Spenderorgan gekommen sein (Thompson and Kurzrock, 2004). Die Inzidenz variiert unter anderem in Abhängigkeit von der Art der Spende, einer vorangegangenen T-Zelldepletion des Spenderknochenmarks, der Intensität der Immunsuppression sowie dem EBV-Status des Spenders und Empfängers und beträgt zwischen 0,5 und 30 % (Thompson and Kurzrock, 2004). PTLD gehen mit erhöhter Morbidität und Mortalität einher und sind die häufigste maligne Erkrankung bei Kindern nach einer Transplantation (Lim et al., 2006). Die Therapie beinhaltet eine Reduktion der Immunsuppression zur Steigerung der T-Zellaktivität oder Unterdrückung der B-Zellproliferation durch den monoklonalen CD20-Antikörper Rituximab und eventuell eine ergänzende Chemotherapie nach dem CHOP-Schema (**C**yclophosphamid, **H**ydroxydaunorubicin bzw. Doxorubicin, **O**ncovin bzw. Vincristin und **P**rednison). Diese Therapieoptionen beinhalten jedoch Komplikationsrisiken. Die verminderte Immunsuppression führt selten zur Wiederherstellung der EBV-spezifischen Immunität und kann viel eher das Auftreten einer *graft-versus-host disease* (GvHD) begünstigen. Die Immunchemotherapie setzt die Expression des CD20-Moleküls voraus, was nicht bei jedem Tumor gegeben ist, und kann durch eine zusätzliche immunsuppressive Wirkung das Infektionsrisiko noch erhöhen (Bollard et al., 2012; Paya et al., 1999). Eine gezielte Prophylaxe- sowie Therapiemöglichkeit bietet der adoptive Transfer EBV-spezifischer T-Zellen, der in den letzten Jahren deutliche Fortschritte verzeichnet hat (Heslop et al., 2010; Icheva et al., 2013; Rooney et al., 1998).

Peptidimpfstoffe stellen eine weitere präventive Option dar, wie eine im Jahr 2008 von Elliott et al. veröffentlichte Phase I-Studie zeigt, in der Probanden gegen die Infektiöse Mononukleose immunisiert wurden (Elliott et al., 2008).

1.2. Grundlagen des Immunsystems

Der Mensch steht in ständigem Kontakt mit seiner Umwelt und ist dadurch verschiedensten Einflüssen, Organismen und Erregern ausgesetzt. Diese können dem menschlichen Körper durch toxische oder allergische Substanzen Schaden zufügen und zu Krankheiten führen. Um das zu vermeiden, bietet das Immunsystem durch vielfältige Abwehrmechanismen Schutz. Hierzu gehören physikalische Barrieren wie die Haut und die Schleimhäute mit ihrer jeweiligen Bakterienflora, biochemische Barrieren wie die Magensäure, Lysozym und Defensine sowie Immunglobuline in Körperflüssigkeiten wie Speichel oder der Tränenflüssigkeit. Daneben existieren weitere spezifischere Abwehrmechanismen, die sich in eine angeborene und eine erworbene (adaptive) Immunität aufteilen lassen. Sie unterscheiden sich in ihrer Reaktionsgeschwindigkeit sowie Spezifität, es finden sich aber einige Überschneidungen. Diese spezifischen Abwehrmechanismen können jeweils weiter in eine humorale und eine zelluläre Komponente unterteilt werden.

Bei der Ausübung seiner Funktion ist es wichtig, dass das Immunsystem zwischen „eigen“ und „fremd“ unterscheiden kann und folglich nur das „Fremde“ abwehrt. Es sollte in entsprechendem Maße auf den Eindringling reagieren und auch Entartungen körpereigener Zellen erkennen und bekämpfen. Bei diesen komplexen Abläufen ist ein funktionierendes Zusammenspiel der einzelnen Bestandteile des Immunsystems von entscheidender Bedeutung. Kommt es hierbei nämlich zu Problemen, kann sich dies in verschiedensten Erkrankungen äußern. So führen eine herabgesetzte Toleranz eigener Strukturen zu Autoimmunerkrankungen, eine übersteigerte Reaktion gegenüber harmlosen Antigenen zu Allergien und eine zu hohe Toleranz gegenüber eigenen, jedoch entarteten Zellen zu Krebserkrankungen. Bei allogenen Organtransplantationen wird zwar das Spenderorgan richtigerweise als „fremd“ erkannt, in diesem

speziellen Fall ist dies aber aus therapeutischer Sicht nicht gewünscht. Um eine Abstoßungsreaktion zu vermeiden, wird daher das Immunsystem iatrogen supprimiert.

1.2.1. Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem funktioniert von Geburt an und ist der evolutionär ältere Teil der Immunabwehr. Hierzu gehören als zelluläre Bestandteile Granulozyten, Mastzellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sowie antigenpräsentierende Zellen (APC), darunter die dendritischen Zellen (DC), Makrophagen und Monozyten. Humorale Bestandteile sind das Komplementsystem sowie Zytokine. Es gewährleistet als initiale Immunantwort eine schnelle, aber unspezifische Abwehr allgemein pathogener Strukturen. Außerdem unterstützt es die Aktivierung des adaptiven Immunsystems mit Hilfe der APC sowie der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Sind die Pathogene im weiteren Verlauf erfolgreich abgewehrt worden, werden diese schließlich durch die Zellen des angeborenen Immunsystems beseitigt.

1.2.2. Adaptives Immunsystem

Die Reaktion des erworbenen (adaptiven) Immunsystems auf ein Pathogen entwickelt sich über Tage, ist aber durch eine hohe Antigenspezifität und die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses gekennzeichnet. Antigene werden über APC präsentiert und meist im lymphatischen Gewebe von antigenspezifischen Rezeptoren auf den T- und B-Zellen erkannt. Dies führt zum *Priming*, zur Aktivierung und Proliferation sowie zur Differenzierung der jeweiligen Zelle (Parkin and Cohen, 2001). Das erworbene Immunsystem greift daher erst mit etwas Verzögerung, da nach dem Eindringen des Pathogens die Migration der antigenpräsentierenden DC in die Lymphknoten Zeit benötigt und anders als beim angeborenen Immunsystem die spezifischen Zellen zunächst aktiviert werden und proliferieren müssen, um eine ausreichende Zellzahl für eine effektive Abwehr zu erreichen (Chaplin, 2010).

In einem nächsten Schritt kommt es zur gezielten Immunabwehr. Die humorale Immunantwort trägt zur Bekämpfung extrazellulärer Erreger im Blut und anderen Gewebeflüssigkeiten bei. Spezifische Antikörper (dabei handelt es sich vor allem um die Klassen IgG, IgA und IgE), die von aktivierten B-Zellen, den Plasmazellen, sezerniert werden, binden an ein Antigen und können es je nach Subtyp opsonieren und so zur Phagozytose markieren, es neutralisieren sowie durch Aktivierung des Komplementsystems zur Lyse des Antigens beitragen. Die anderen zwei Antikörperklassen IgM und IgD finden sich eher membrangebunden als Antigenrezeptoren auf naiven B-Zellen. Außerdem sind die B-Zellen in der Funktion einer APC in der Lage, das Pathogen über diese membrangebundenen Antikörper zu binden, aufzunehmen und anderen Zellen zu präsentieren.

In körpereigene Zellen aufgenommene oder eingedrungene Krankheitserreger werden mit Hilfe der zellulären Immunabwehr erkannt und bekämpft. Träger dieser Immunantwort sind $CD3^+$ T-Zellen, die sich anhand ihrer Oberflächenproteine in verschiedene Typen unterteilen lassen: die $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen (CTL), die $CD4^+$ T-Helferzellen (T_{H1} und T_{H2} sowie die weiteren Subtypen T_{H17} und T_{FH}) und die ebenso $CD4^+$ regulatorischen T-Zellen (T_{reg}). T-Zellen unterliegen einer MHC-Restriktion (*major histocompatibility complex*), was bedeutet, dass sie Antigene über ihren T-Zellrezeptor (TCR) nur erkennen, wenn sie ihnen nach intrazellulärer Prozessierung als lineare Fragmente über ein MHC-Molekül präsentiert werden (Davis and Bjorkman, 1988; Zinkernagel and Doherty, 1975).

Eine wichtige Funktion des adaptiven Immunsystems ist die Bildung langlebiger Gedächtniszellen, die bei einer zweiten Infektion mit dem gleichen Antigen aktiviert werden und zu einer schnelleren und effektiveren Antwort des Immunsystems beitragen.

1.3. T-Zellen

1.3.1. Entwicklung und Selektion im Thymus

Die T- und B-Lymphozyten reifen aus Vorläuferzellen im Knochenmark. Während die B-Zellen bis zu ihrer Reifung im Knochenmark verweilen, wandern die noch unreifen Vorläufer der T-Zellen in den Thymus, wo durch weitere Reifungs- und Selektionsschritte der Thymozyten selbsttolerante naive T-Lymphozyten entstehen.

Die große Vielfalt spezifischer Rezeptoren zur Antigenerkennung bei beiden Zelltypen ist Folge eines Rearrangements der Gensegmente, die für die antigenbindenden Bereiche dieser Rezeptoren codieren (Parkin and Cohen, 2001). Bei den T-Zellen handelt es sich hierbei um Genabschnitte für die α -Kette (V- und J-Gensegmente) und β -Kette (V-, D- und J-Gensegmente) des $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptors. Als vorherrschender Rezeptortyp befindet er sich auf über 90 % der zirkulierenden T-Zellen; die restlichen ca. 10 % sind Träger des $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptors, auf den hier nicht näher eingegangen wird (Chaplin, 2010).

Die anschließenden Selektionsmechanismen ermöglichen es, T-Zellen mit nicht funktionellen TCR auszusortieren: Bei der positiven Selektion im Kortex des Thymus wird die Affinität des TCR zu körpereigenen MHC-Molekülen getestet. Fällt diese zu gering aus, wird die jeweilige Zelle zerstört. Die zu diesem Zeitpunkt doppelt positiven T-Zellen ($CD4^+$ und $CD8^+$) reifen dabei zu $CD4^- CD8^+$ T-Zellen, wenn MHC Klasse I-Moleküle gebunden werden, und zu $CD4^+ CD8^-$ T-Zellen, wenn MHC Klasse II-Moleküle erkannt werden. Bei der anschließenden negativen Selektion im Mark werden zur Vermeidung einer Autoreaktivität die Zellen durch Apoptose beseitigt, die durch körpereigene Peptide aktiviert werden. Weniger als 5 % der zuvor gebildeten T-Zellen verlassen als reife, aber noch naive T-Zellen den Thymus (Chaplin, 2010). Bedingt durch verschiedene Milieus innerhalb des Thymus entstehen weitere Subpopulationen wie die natürlichen T-Killerzellen (NKT), die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) und $\gamma\delta$ -T-Zellen (Ladi et al., 2006).

1.3.2. Subpopulationen

Die Mehrheit der im Thymus gebildeten T-Zellen sind $\alpha\beta$ -T-Zellen. Während ihrer Reifung entwickeln sie sich zu verschiedenen Subpopulationen, von denen die zwei Hauptgruppen jeweils den Korezeptor CD4 oder CD8 exprimieren. $CD4^+$ T-Zellen sind größtenteils T-Helferzellen (T_H), die sich nach Aktivierung durch ein spezifisches Antigen zu den T-Effektorzellen T_{H1} , T_{H2} , T_{H17} und T_{FH} differenzieren, je nachdem welche Zytokine am Aktivierungsort vorherrschen. Sie unterscheiden sich durch die jeweils ausgeschütteten Zytokine, mit denen sie die Funktion anderer Zellen regulieren. T_{H1} sind wichtig für die zellvermittelte Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene, spielen aber auch eine Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen; T_{H2} unterstützen die humorale Immunantwort gegen extrazelluläre Parasiten und wirken bei allergischen Reaktionen mit; T_{H17} verstärken Mechanismen der angeborenen Immunreaktion und unterstützen wie vor allem die T_{FH} die humorale Immunantwort (Parkin and Cohen, 2001; Chaplin, 2010). Die ebenfalls $CD4^+$ regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) hemmen im Gegensatz dazu die T-zellvermittelte Immunantwort und beugen so Autoimmunerkrankungen vor.

$CD8^+$ T-Zellen differenzieren sich nach Kontakt mit dem spezifischen Antigen zu CTL, die bei der Abwehr intrazellulärer Viren und der Bekämpfung entarteter Zellen relevant sind. Sie zerstören nach Aktivierung durch ein spezifisches Antigen die Zelle durch Apoptose.

1.3.3. *Priming* - Mechanismen der T-Zellaktivierung

Eine T-zellvermittelte Immunreaktion kann erst ablaufen, wenn die reife naive T-Zelle auf eine dendritische Zelle trifft, die ihr spezifisches Antigen präsentiert. Dadurch wird sie aktiviert und differenziert sich zu einer der verschiedenen Effektorzellen. Dieser Vorgang wird als *Priming* bezeichnet.

Nach abgeschlossener Reifung verlassen die noch naiven T-Zellen den Thymus und rezirkulieren zwischen Blutkreislauf und sekundären lymphatischen Organen wie Lymphknoten, der Milz oder dem Mukosa-assoziierten lymphatischen

Gewebe (MALT). Mit Hilfe von Zelladhäsionsmolekülen treten die T-Zellen per Diapedese meist über hochendotheliale Venulen (HEV) in das lymphatische Gewebe ein (*Homing*) und bilden hier die T-Zellzonen, in denen die Wahrscheinlichkeit, auf das spezifische Antigen zu treffen, höher ist. Ermöglicht wird dieser Vorgang durch die Chemokine CCL21 und CCL19, die von den Stromazellen der T-Zellzonen, in den HEV (CCL21) und von DC (CCL19) exprimiert werden. Sie sind Liganden des Rezeptors CCR7, der sich unter anderem auf naiven T-Zellen und DC befindet (Luther et al., 2000; Sallusto et al., 2000). Dadurch wandern neben den T-Zellen auch antigenbeladene und aktivierte DC über die Lymphe in diese Zonen, wo sie von den naiven T-Zellen nach ihrem spezifischen Antigen abgetastet werden. Trifft die T-Zelle nicht auf das passende Antigen, verlässt sie als naive T-Zelle einem Sphingosin 1-Phosphat-Gradienten folgend das lymphatische Gewebe und tritt erneut in den Blutkreislauf entweder über efferente Lymphbahnen oder von der Milz aus direkt. Trifft eine naive T-Zelle auf ihren spezifischen Peptid-MHC-Komplex, wird sie aktiviert und verbleibt im lymphatischen Gewebe; sie proliferiert und differenziert sich in wenigen Tagen zu T-Effektorzellen und T-Gedächtniszellen (*Priming*). Für die Aktivierung und Differenzierung sind neben der Interaktion zwischen T-Zellrezeptor und Antigen-MHC-Komplex weitere Signale notwendig: Kostimulation durch die Bindung des B7-Moleküls (CD80 und CD86) auf den DC und CD28 auf den T-Zellen fördert die klonale Expansion, Zytokine steuern die Differenzierung in die verschiedenen Subpopulationen der Effektorzellen. Die Aktivierung der naiven T-Zelle bewirkt zudem die Produktion des Interleukins IL-2, das autokrin wirkend die Zellproliferation, die Differenzierung und das Überleben steigert, sowie die Synthese des höher affinen IL-2-Rezeptors. Die T-Effektorzellen wandern schließlich zurück in den Blutstrom und üben nun beim Aufeinandertreffen mit ihrem spezifischen Antigen ihre jeweilige Funktion aus ohne auf eine Kostimulation angewiesen zu sein. Eine Veränderung der Zelladhäsionsmoleküle führt außerdem dazu, dass die Effektorzellen weniger im lymphatischen Gewebe rezirkulieren als eher am Entzündungsort.

1.3.4. Funktionsweise zytotoxischer T-Zellen – immunologische Synapse

CTL tasten mit ihrem TCR die MHC I-Moleküle der Körperzellen nach ihrem spezifischen Antigen ab. Trifft ein CTL auf eine Zielzelle mit dem passenden Peptid-MHC-Komplex, bildet sich die immunologische Synapse (Huppa and Davis, 2003; Huse et al., 2008). Dies ist ein Cluster aus peripher liegenden Adhäsionsmolekülen und zentral gelegenen TCRs sowie deren Korezeptoren, das den CTL aktiviert und durch dessen Polarisierung die zielgerichtete Zerstörung der Zielzelle ermöglicht. Nur im Bereich der immunologischen Synapse werden zytotoxische Granula freigesetzt, die vor allem Perforin, Granzyme und Granulysin enthalten und innerhalb weniger Minuten den apoptotischen Zelltod auslösen. Zusätzlich werden Zytokine wie IFN γ , TNF α oder LT α freigesetzt; ersteres reguliert die Expression der MHC Klasse I-Moleküle hoch, hemmt die Virusreplikation und aktiviert Makrophagen, die anderen beiden können neben der Aktivierung von Makrophagen die Apoptose der Zielzelle bewirken.

1.3.5. T-Gedächtniszellen

Einige der aktivierten Zellen bilden T-Gedächtniszellen, die dafür sorgen, dass bei einer zweiten Infektion mit dem gleichen Pathogen eine schnellere Immunantwort zustande kommt. Sie werden am Entzündungsort durch proinflammatorische Zytokine aktiviert und übernehmen Effektorfunktionen. Basierend auf *homing*-Rezeptoren lassen sich T-Gedächtniszellen in drei Subtypen einteilen: T_{CM} (*central memory T cells*) weisen sowohl den Chemokin-Rezeptor CCR7 als auch das Selektin CD62L auf und befinden sich ähnlich den naiven T-Zellen vor allem im lymphatischen Gewebe, wo sie bei Antigenkontakt auch zunächst proliferieren und sich zu Effektorzellen differenzieren; T_{EM} (*effector memory T cells*) tragen weder CCR7 noch CD62L, patrouillieren hauptsächlich im peripheren Gewebe und wandern zum Entzündungsort (Woodland and Kohlmeier, 2009). Sie übernehmen bei Kontakt mit dem Antigen schneller Effektorfunktionen als T_{CM}. T_{RM} (*tissue-resident memory T cells*) exprimieren kein CCR7 und nur wenig CD62L, weisen aber das

Oberflächenmolekül CD69 auf, weshalb sie nach einer Infektion als Gedächtniszellen im jeweiligen Gewebe verbleiben. Hier können sie bei einer Reinfektion sofort reagieren (Schenkel and Masopust, 2014).

1.4. Humane Leukozytenantigene (HLA)

Befällt ein Erreger Körperzellen, um die wirtseigenen Replikationsstrukturen zur Vermehrung zu nutzen, reicht eine Bekämpfung des Pathogens im Extrazellularraum nicht aus. Hier spielen die T-Zellen eine wichtige Rolle, da sie infizierte Zellen erkennen und beseitigen. Außerdem erkennen sie Peptidfragmente aus Antigenen, die von APC nach erfolgter Phagozytose oder Pinozytose präsentiert werden. Die Strukturen, die es den T-Zellen ermöglichen, bei diesen Vorgängen sowohl die wirtseigene Zelle als auch das fremde Peptid zu erkennen und somit eine Immunreaktion auszulösen, sind die Moleküle des *major histocompatibility complex* (MHC, Haupthistokompatibilitätskomplex). Dabei handelt es sich um Glykoproteine auf der Zelloberfläche einer jeden kernhaltigen Zelle, deren genetische Information im MHC codiert ist. Beim Menschen befindet sich diese Gengruppe auf Chromosom 6 und wird als HLA (humane Leukozytenantigene, *human leukocyte antigen*) bezeichnet, da sie wegen ihrer antigenen Eigenschaften zunächst auf Leukozyten entdeckt wurden (Dausset, 1958). Die für die Antigenpräsentation zuständigen MHC-Moleküle werden in zwei Klassen unterteilt: Die MHC Klasse I-Moleküle kommen auf allen kernhaltigen Zellen vor und werden durch zytotoxische T-Zellen (CTL, CD8⁺) erkannt. Sie präsentieren Peptide, die in der Zelle synthetisiert wurden. Die MHC Klasse II-Moleküle finden sich vor allem auf APC und sind Liganden des TCR der T-Helferzellen (T_H-Zellen, CD4⁺). Sie präsentieren Peptide, die in der Zelle durch endosomale Verdauungsprozesse pino- oder phagozytierter Organismen und Proteine entstanden sind, unabhängig davon, ob es sich um körperfremde oder körpereigene Strukturen handelt.

Die MHC-Moleküle zeichnen sich durch ihre polygenen und höchst polymorphen Eigenschaften aus (Tabelle 2), welche zu individuell unterschiedlichen Immunreaktionen führen. Außerdem werden die HLA-Gene kodominant vererbt.

Durch die Vielfalt an HLA-Molekül-Kombinationen kann eine große Zahl an Peptiden präsentiert werden, die es dem Immunsystem ermöglicht, auf eine Vielzahl von Erregern zu reagieren. Dabei unterscheiden sich die Häufigkeitsverteilung der HLA-Allele und ihre Zusammenstellung als Haplotypen in den Bevölkerungsgruppen sehr (Cao et al., 2001). Die genannten Eigenschaften bieten somit der Gesamtbevölkerung einen weitgehenden Schutz vor vielen Pathogenen.

Tabelle 2: Anzahl der bekannten HLA-Allele des Menschen.

HLA-Gene	Anzahl der HLA-Allele	Proteine
HLA Klasse I	15 586	10 477
HLA Klasse II	5 913	4 022

Stand: Januar 2019, ImMunoGeneTics/HLA Database.
(<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>)

Da es sich bei den HLA-Molekülen um körpereigene Antigene handelt, die individuell sehr unterschiedlich ausgeprägt sein können, ist ihre Bestimmung bei Transplantationen von großer Bedeutung, um das Risiko einer Abstoßung zu verringern (Opelz et al., 1999).

1.4.1. HLA Klasse I

1.4.1.1. Aufbau und Peptidbindung

HLA-Moleküle der Klasse I sind Heterodimere auf der Oberfläche kernhaltiger Zellen, die aus einer transmembranären polymorphen α -Kette (schwere Kette) und einer nicht-polymorphen β -Kette (β_2 -Mikroglobulin, leichte Kette) bestehen (Stern and Wiley, 1994; Chaplin, 2010). Während die Gene für das β_2 -Mikroglobulin auf Chromosom 15 codiert sind, befinden sich die Gene für die α -Kette auf Chromosom 6. Da verschiedene Gene für die α -Kette existieren, lassen sich anhand dieser Kette drei HLA Klasse I-Moleküle unterscheiden: HLA-A, HLA-B und das im Vergleich weniger exprimierte HLA-C (McCutcheon et al., 1995).

Die α -Kette besteht aus drei extrazellulären (α_1 , α_2 , α_3), einer transmembranären und einer kurzen intrazellulären Domäne. Die α_3 -Domäne formt membranah mit dem β_2 -Mikroglobulin über eine nichtkovalente Bindung eine immunglobulinähnliche Struktur, an die die α_1 - und α_2 -Domäne anschließen. Diese bilden gemeinsam die peptidbindende Furche bestehend aus zwei separaten α -Helices, die sich über eine Formation aus acht nebeneinanderliegenden β -Faltblättern positionieren (Abbildung 1). Der Polymorphismus betrifft vor allem Aminosäuren der peptidbindenden Furche, wodurch sich die verschiedenen Peptidbindungseigenschaften der jeweiligen HLA Klasse I-Moleküle erklären (Chaplin, 2010).

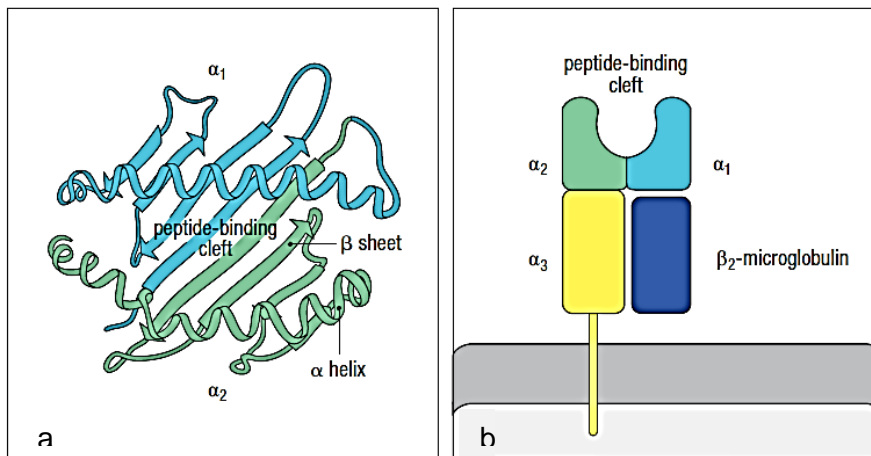


Abbildung 1: MHC Klasse I-Molekülstruktur basierend auf der Röntgenkristallographie. a) Aufsicht auf die Peptidbindungsfurche als Bändermodell. b) Schematische Darstellung. (Murphy and Weaver, 2016)

Die Bindung zwischen MHC-Molekül und Peptid wird ermöglicht durch Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Kräfte zwischen den Gerüstatomen und den Seitenketten des Peptids auf der einen Seite und den Seitenketten der α -Helices auf der anderen Seite. Gebunden werden Peptide mit einer Länge von meist acht bis elf Aminosäuren. Die Interaktion ist gleichzeitig promiskuitiv und stabil (Madden, 1995). Die promiskuitiven Eigenschaften erlauben es dem HLA-Molekül, eine Vielzahl von Peptiden zu binden. Stabilität wird durch konservierte Aminosäurereste in zwei Taschen am jeweiligen Ende

der peptidbindenden Furche erreicht, die den N- sowie C-Terminus des Peptids binden. Wichtig für die Bindung und die Spezifität sind außerdem weitere polymorphe Taschen im Verlauf der peptidbindenden Furche. Mit ihrer allelspezifischen Präferenz für bestimmte Aminosäureseitenketten besteht an bestimmten Positionen im Peptid eine Aminosäureselektivität. Ist die Selektivität stark ausgeprägt, hat das zur Folge, dass die von einer HLA-Molekülvariante gebundenen Peptide die gleichen oder ähnliche Aminosäurereste (Anker- bzw. Hilfsankerreste) an diesen Stellen aufweisen müssen (Murphy and Weaver, 2016). Je nach Variante des HLA-Moleküls unterscheiden sich die Position des Ankers und der hier präferierte Aminosäurerest. Das konnte anhand der Elution von HLA-Liganden festgestellt werden und machte die Definition eines allelspezifischen Bindungsmotivs für die verschiedenen HLA-Moleküle möglich (Engelhard, 1994; Falk et al., 1991). Auf solchen Motiven basieren die Vorhersagen frei zugänglicher Datenbanken für HLA-Liganden und T-Zellepitope (Rammensee et al., 1999).

1.4.1.2. Antigenprozessierung

Bei den gebundenen Peptiden handelt es sich um endogene, das heißt in der Zelle synthetisierte, Antigene. Diese entstammen körpereigenen Proteinen oder stellen virale Peptide infizierter Zellen bzw. tumorspezifische Peptide entarteter Zellen dar. Durch eine Stimulation mit IFN γ wird in den Zellen die Bildung von Immunproteasomen induziert, die endogene Proteine zu solchen Peptiden prozessieren, die über die geeignete Länge und Ladung verfügen, um über HLA Klasse I-Moleküle präsentiert zu werden. Diese Peptide werden mit Hilfe des TAP (Antigenpeptid-Transporter, *transporter associated with antigen processing*) zum endoplasmatischen Retikulum transportiert. Hier wird die α -Kette eines HLA Klasse I-Moleküls mit dem Peptid beladen und verknüpft sich mit der β_2 -Mikroglobulin-Untereinheit. Das fertige und beladene HLA Klasse I-Molekül wandert über den Golgi-Apparat in exozytotischen Vesikeln an die Zelloberfläche, wo es das gebundene Peptid zytotoxischen T-Zellen präsentiert.

Die an diesen Vorgängen beteiligten Strukturen weisen dabei eine hoch konservierte Spezifität auf (Falk et al., 1992).

1.4.1.3. Nomenklatur

Die Nomenklatur des HLA-Systems basierte zunächst auf der serologischen Bestimmung der HLA-Antigene. Mit der Entwicklung molekulargenetischer Nachweismethoden konnten Unterschiede zwischen den Allelen festgestellt werden, die über die bisherigen Antikörperreaktionen nicht erfasst wurden und den starken Polymorphismus der HLA-Allele aufzeigten (Tait, 2011). Das machte Anpassungen in der Nomenklatur notwendig. Nach der Nennung des Genorts (für HLA Klasse I-Moleküle -A, -B oder -C) folgen für die eindeutige Bezeichnung zwei Zahlen, die durch einen Doppelpunkt getrennt sind: z.B. HLA-A*01:02. Die erste Zahl beschreibt die Allelgruppe, die zweite Zahl den Subtypen. Weitere Zahlen können angehängt werden, die Unterschiede in der Nukleotidsequenz ohne Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz aufzeigen. Stumme Mutationen in codierenden Bereichen werden mit der dritten Zahl beschrieben, Unterschiede in nicht-codierenden Bereichen mit der vierten Zahl.

1.4.2. HLA Klasse II

Die HLA Klasse II-Moleküle finden sich hauptsächlich auf antigen-präsentierenden Zellen (B-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen). Sie bestehen aus zwei MHC-codierten Polypeptidketten, einer α - und einer β -Kette. Beide durchziehen die Zellmembran und besitzen jeweils zwei extrazelluläre Domänen (α_1 und α_2 , β_1 und β_2). Sie bilden eine den HLA Klasse I-Molekülen ähnliche Struktur, aber zum einen wird die peptidbindende Furche bei den HLA Klasse II-Molekülen von den membrandistalen Domänen beider Ketten (α_1 und β_1) gebildet und zum anderen ist die peptidbindende Furche an den Enden offen, während sie bei den HLA Klasse I-Molekülen geschlossen ist. Dies ermöglicht die Bindung längerer Peptide mit 13 bis 17 Aminosäuren, deren N- und C-Terminus nicht in der peptidbindenden Furche fixiert werden und

überstehen können (Murphy and Weaver, 2016). Das Peptidgerüst wird stattdessen über konservierte Aminosäurereste und die Peptidanker in polymorphen Taschen entlang der peptidbindenden Furche gebunden (Stern et al., 1994). Da die gebundenen Peptide zudem unterschiedlich lang sind, befinden sich die Ankerreste an verschiedenen Positionen. Im Gegensatz zu den HLA Klasse I-Molekülen besteht unter den HLA Klasse II-Molekülen eine höhere Promiskuität bei der Peptidbindung (Panina-Bordignon et al., 1989).

Präsentiert werden Peptide aus dem endosomalen Abbau extrazellulärer Pathogene oder Proteine, die von den Zellen durch Pino- oder Phagozytose aufgenommen wurden. Die Peptide binden dann im MHC II-Beladungskompartiment an ein HLA Klasse II-Molekül und werden an die Zelloberfläche transportiert, wo sie von T_H-Zellen erkannt werden (Pieters, 1997; Chaplin, 2010).

Aufgrund der evolutionären Entwicklung der Antigenpräsentation und der daraus resultierenden zellulären Immunabwehr erfolgte im Laufe der Zeit eine Selektion infektiöser Organismen mit Strategien, einer Kontrolle durch das Immunsystem zu entgehen (*immune escape*) (Früh et al., 1999). Beispiele für solche Strategien sind Latenzmechanismen oder das Eingreifen viraler Proteine in den Ablauf der Antigenprozessierung und -präsentation.

1.4.3. HLA-Supertypen und peptidbasierte Impfstoffe

HLA Klasse I-Moleküle sind höchst polymorph, weisen aber allelspezifische Peptidbindungsmotive auf (Falk et al., 1991). Anhand dieser Motive lassen sich verschiedene HLA-Moleküle aufgrund eines ähnlichen Peptidbindungsverhaltens in Supertypen gruppieren (Sidney et al., 1995). Das bedeutet, dass manche HLA-Liganden von mehreren verschiedenen HLA-Molekülen dieses Supertyps präsentiert werden (Kreuzreaktivität; promiskuitive Peptide). 1999 wurden neun HLA Klasse I-Supertypen definiert (A1, A2, A3, A24, B7, B27, B44, B58, B62), denen die bis dato bekannten HLA-Allotypen zugeordnet werden konnten (Sette and Sidney, 1999). Es wurde festgestellt, dass die Häufigkeitsverteilung dieser

Supertypen in den verschiedenen Populationen auffallend konstant ist und sie zusammengenommen über 99,6 % der untersuchten Personen umfassen (Sette and Sidney, 1999; Lund et al., 2004). 2008 wurde eine überarbeitete und aktualisierte Klassifikation veröffentlicht (Sidney et al., 2008).

Die Einteilung in Supertypen macht den komplexen Polymorphismus der HLA-Allele übersichtlicher. Durch die Freizügigkeit mancher Epitope wird die Entwicklung von Peptidimpfstoffen vereinfacht und es kann mit einer Impfung eine größere Bevölkerungsbreite abgedeckt werden. Schipper et al. stellten 1996 eine Methode vor, mit der eine maximale Abdeckung einer Bevölkerungsgruppe mit einer minimalen Anzahl an Peptiden erreicht wird (Schipper et al., 1996).

Tabelle 3 gibt die Häufigkeit der Antigene des HLA-A*01-Supertypen in Deutschland an, deren Werte auf einer zwischen 2005 und 2008 erfolgten Erhebung bei der Deutschen Knochenmarkspenderdatei (DKMS) basieren und etwa 320 000 Knochenmarkspenderdaten umfassen (Schmidt et al., 2010). Schätzungen zur Frequenz des HLA-A*01-Supertyps in der Gesamtbevölkerung liegen bei über 35 % (Sidney et al., 2005).

Tabelle 3: Häufigkeiten der HLA-Antigene des HLA-A*01-Supertyps in Deutschland, entnommen aus Schmidt et al. 2010; Häufigkeiten gerundet auf zwei Dezimalen.

HLA-Antigen	A*01	A*25	A*26	A*32	A*36	A*43	A*80	A*29	A*30
Häufigkeit (%)	16,66	2,48	3,22	3,61	< 0,01	< 0,01	0,02	2,60	2,01

1.5. Möglichkeiten der Immuntherapie

Erkrankungen, die durch eine fehlerhafte oder unzureichende Funktion des Immunsystems entstehen, können inzwischen oft mit Hilfe einer Immuntherapie behandelt werden. Diese greift in bestimmte Zielstrukturen der Immunantwort ein und verstärkt oder vermindert die Immunreaktion. Manche Formen der Immuntherapie haben sich bereits etabliert wie die Gabe von Immunsuppressiva bei Autoimmunerkrankungen, der Einsatz von Zytokinen wie Interferon oder monoklonaler Antikörper beispielsweise gegen TNF α (Infliximab) oder CD20

(Rituximab). Immuntherapeutische Methoden, die vor allem die zelluläre Abwehr modulieren, sind noch nicht so lange im Einsatz. Dabei wird sich die Kenntnis von Immun-*Checkpoints* zu Nutze gemacht, welche eine regulierende Wirkung auf die T-zellvermittelte Immunantwort haben, und über *Checkpoint*-Inhibitoren bzw. -Antikörper die T-Zellaktivität gesteigert (Kyi and Postow, 2014; Villadolid and Amin, 2015). Ein Beispiel für solch einen *Checkpoint* ist CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*), das die T-Zellaktivität herunterreguliert und durch dessen Hemmung mit Hilfe von *Checkpoint*-Antikörpern (Ipilimumab) eine verbesserte Tumorbehandlung möglich ist (Leach et al., 1996; Hodi et al., 2010). Neben dem adoptiven Transfer von T-Zellen zur Behandlung von Krebserkrankungen (van der Bruggen et al., 1991) oder Virusinfektionen unter Immunsuppression (Riddell et al., 1992; Icheva et al., 2013) gibt es den Ansatz der Aktivierung körpereigener T-Zellen durch die Applikation spezifischer Peptidimpfstoffe. Dabei handelt es sich um virus- oder tumorspezifische Antigene, die das Immunsystem gezielt aktivieren und so eine Behandlung der Erkrankung ermöglichen (Marchand et al., 1995; Li et al., 2014).

1.6. Ziele und Konzeption der Arbeit

Das Epstein-Barr Virus trägt als onkogenes Virus vor allem bei Menschen mit supprimiertem Immunsystem zur Entwicklung maligner Tumoren bei. Die Mehrzahl der PTLD nach Transplantationen wird durch EBV verursacht, es spielt eine Rolle bei der Entstehung von Tumorerkrankungen bei AIDS und ist auch bei nicht offensichtlich immungeschwächten Menschen mit dem Nasopharynxkarzinom oder lymphoproliferativen Erkrankungen wie dem Hodgkin-Lymphom oder dem Burkitt-Lymphom assoziiert. Da virale Antigene exprimiert werden, ist der Einsatz des adoptiven T-Zelltransfers möglich, vor allem bei der Behandlung der PTLD. Die Herstellung der spezifischen T-Zellen ist jedoch meist zeitaufwendig und kostenintensiv und das Verfahren nicht flächendeckend verfügbar (Ottaviano et al., 2019). Eine andere Möglichkeit ist der Einsatz einer Peptidimpfung bestehend aus verschiedenen spezifischen T-

Zellepitopen, die die genannten Nachteile nicht aufweist und durch eine Stimulation körpereigener T-Zellen das Risiko einer GvHD vermeidet.

Das Ziel dieser Arbeit basiert auf der Identifizierung HLA-A*01- und HLA-A*26-restringierter T-Zellepitope des Epstein-Barr Virus, die von der Mehrzahl der Menschen mit diesen HLA-Restriktionen erkannt werden und für die Entwicklung einer Vakzine genutzt werden können. Außerdem besteht die Annahme, dass sich HLA-A*26 dem HLA-A*01-Supertypen zuordnen lässt. Kreuzreagierende Epitope könnten so die zielgerichtete Immuntherapie mit Hilfe einer Impfung vereinfachen. Für eine gezielte Therapie ist es grundlegend, die Zielstrukturen der T-Zellen sowie die T-Zellantwort zu charakterisieren. Hierfür werden in dieser Arbeit die anhand des Epitopvorhersageprogramms SYFPEITHI erhaltenen Peptide aus den EBV-Antigenen BZLF1, BRLF1, BMRF1, BMLF1, BALF2, BNRF1, BLLF1, EBNA3, EBNA4, EBNA6, LMP1 und LMP2 jeweils mit Leukozyten gesunder HLA-A*01- und HLA-A*26-Spender per ELISpot getestet. Identifizierte T-Zellepitope sollen anschließend per durchflusszytometrischen Analysen auf Funktionalität und Spezifität untersucht werden. Ergänzend werden die gefundenen Epitope im Hinblick auf eine Kreuzreaktivität jeweils auf Spendern des anderen HLA-Typen getestet und so wird geprüft, ob die Zuordnung von HLA-A*26 zum HLA-A*01-Supertypen nachvollzogen werden kann.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Spenderzellen

Für die Suche und Analyse HLA-A*01- und HLA-A*26-restringierter T-Zellepitope des Epstein-Barr Virus wurden Spenderzellen verwendet, die positiv für die jeweilige genannte Restriktion waren. Um Kreuzreaktionen im Supertyp zu vermeiden bzw. im weiteren Verlauf näher untersuchen zu können, sollten die Spenderzellen zudem negativ für die jeweils andere HLA-Restriktion sein. Das Ausgangsmaterial bildeten *Buffy Coats* aus heparinisiertem Vollblut gesunder

Spender vom Zentrum für Klinische Transfusionsmedizin Tübingen. Die HLA-Typisierung dieser Spender erfolgte in niedriger Auflösung (*low resolution*).

2.1.2. Geräte

Laborfuge 400	Heraeus Instruments
Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments
Vortexer MS 1	IKA-Werke
Wasserbad	GFL
Biologische Sicherheitswerkbank	Holten Lamin Air
Neubauer Zählkammer, Tiefe 0,1 mm	LO-Laboroptik
Kühlschrank (4°C)	Liebherr
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr
Gefrierschrank (-80°C)	Sanyo
Einfrierbehälter für Kryoröhrchen <i>Mr. Frosty</i>	Thermo Scientific Nalgene
Lichtmikroskop DM IL	Leica Microsystems
Inkubator (37°C, 5 % CO ₂)	Heraeus Instruments
Analysenwaage (1 mg - 210 g)	Sartorius
ELISPOT Reader ImmunoSpot S5 Core mit Software Immuno Capture 6.1 und ImmunoSpot 4.0 Academic	C.T.L.
Dampfsterilisator 11-6-9 HS1-FD	Sauter
Peptide Synthesizer EPS 221	Abimed
Peptide Synthesizer ABI 433A	Applied Biosystems
FACS-Canto II mit Software FACSDiva	Becton Dickinson (BD)

Magnetrührer	IKA Labortechnik
0,22 µm-Vakuumfilter	Millipore
Amicon-Rührzelle mit PBTK Membran	Millipore
FPLC-System (fast protein liquid chromatography) mit Superdex 75 HiLoad-Säule, 26/60	Pharmacia
Roti-Nanoquant Proteinassay	Roth
ELISA-Reader Spectramax 340	Molecular Devices

2.1.3. Chemikalien, Lösungen, Puffer

Ficoll (Lymphozytenseparationsmedium)	PAA Laboratories
Phosphat-gepufferte Salzlösung, PBS (ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	Gibco / Lonza
Dimethylsulfoxid, DMSO	Merck
Fötale Kälberserum, FCS (hitzeinaktiviert, 30' bei 56°C)	BioWhittaker
Trypanblau	Merck
Natriumazid, NaN ₃	Merck
Iscove's Modified Dulbecco's Medium, IMDM	Gibco / Lonza
Penicillin/Streptomycin, Pen/Strep (100x)	PAA Laboratories
Gentamicin, Gent (50 mg/ml)	Lonza
β-Mercaptoethanol, β-ME (0,1 mol/l)	Sigma
DNase I (3 µg/ml)	Roche
Bovines Serumalbumin, BSA	Sigma
Humanserum (gepoolt aus Vollblutspenden, hitzeinaktiviert)	selbst hergestellt
Tween 20	Merck

Phytohämagglutinin, PHA	Roche
ddH ₂ O (doppelt destilliert)	Heraeus Destamat Bi 18 E
ExtrAvidin Alkalische Phosphatase	Sigma
Phorbol-12-myristat-13-acetat, PMA	Sigma
Ionomycin	Sigma
Brefeldin A	Sigma
GolgiStop	Becton Dickinson
Cytofix/Cytoperm	Becton Dickinson
Ethylendiamintetraacetat, EDTA	Roth, Sigma
Saponin S7900	Sigma
L-Arginin	Fluka
HEPES	Roth
Salzsäure, HCl	
Glutathion, reduziert und oxidiert	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF	Sigma
Guanidiniumchlorid	Fluka
Natriumacetat	Sigma
Harnstoff	UCB
TRIS	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat, NaH ₂ PO ₄	Merck
Dithiothreitol, DTT	Sigma
Natriumhydroxid, NaOH	
Natriumhypochlorit, NaOCl	

Natriumchlorid, NaCl	Merck
Natriumazid, NaN ₃	Sigma, Merck
Leupeptin	Roche
Pepstatin	Roche
Magnesiumchlorid, MgCl ₂	
Adenosintriphosphat, ATP	

2.1.4. Puffer und Medien

Puffer und Waschpuffer

PBS/BSA	PBS mit 0,5 % BSA
PBS/Tween20	PBS mit 0,05 % Tween20
PBSE	PBS mit 2 mM EDTA
Standard-FACS-Puffer PFEA	PBS mit 2 % FCS, 2 mM EDTA, 0,01 % NaN ₃
Permwash	PBS mit 0,1 % Saponin, 0,5 % BSA, 0,02 % NaN ₃
FACS-Fix	FACS Puffer PFEA mit 1 % Formaldehyd
Rückfaltungspuffer	17,42 g L-Arginin, 5,95 g HEPES, 1 ml EDTA 0,5 M pH 8, 200 ml ddH ₂ O; gekühlt auf 10°C, mit HCl auf pH 7,76; mit ddH ₂ O auf 250 ml aufgefüllt; Lagerung bei 4°C
Injektionspuffer	3 M Guanidiniumchlorid, 10 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA; mit HCl auf pH 4,2; Lagerung bei -80°C

Harnstofflösung	8 M Harnstoff, 10 mM TRIS pH 8, 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTT
Regenerationspuffer	0,1 M NaOH, 100 ppm NaOCl
TBS-Puffer	20 mM TRIS pH 8 gekühlt auf 4°C, 150 mM NaCl; mit HCl auf pH 8; gefiltert und autoklaviert; 0,5 % NaN ₃ vor Gebrauch
Tetramer-Staining-Buffer (TSB)	50 % PBS, 50 % FCS, 2 mM EDTA

Medien

Einfriermedium	FCS mit 10 % DMSO
Auftaumedium	IMDM mit 3 µg/ml DNase I, 1 % Pen/Strep, 25 µg/ml Gentamycin, 5 x 10 ⁻⁵ mol/l β-ME
T-Zell-Medium	IMDM mit 5 % Humanserum, 1 % Pen/Strep, 25 µg/ml Gentamycin, 5 x 10 ⁻⁵ mol/l β-ME

2.1.5. Zytokine

hIL-2	Promokine
-------	-----------

2.1.6. Antikörper und Farbstoffe

ELISpot

αIFN-γ Erstantikörper 1-D1K [1 mg/ml]	Mabtech
αIFN-γ Sekundärantikörper 7-B6-1 Biotin [1 mg/ml]	Mabtech
BCIP/NBT SIGMAFAST	Sigma

FACS

Farbstoff

Amine Aqua (1:400)

Invitrogen

Extrazelluläre Antikörper

CD3-FITC 1:50

laborintern

CD4-APC-Cy7 1:100

BD

CD8-PerCP 1:25

BD

Intrazelluläre Antikörper

IFN- γ -PE 1:200

BD

TNF- α Pacific Blue 1:120

Biolegend

2.1.7. IFN γ -ELISpot Kontrollpeptide

Da für beide hier untersuchten HLA-Typen kein immundominantes EBV-Epitop bekannt ist, das mit einer hohen Frequenz erkannt wird, wurde für die Positivkontrolle jeweils ein Mix aus verschiedenen Peptiden zusammengestellt (Tabellen 4 und 5), die als Liganden auf der jeweiligen HLA-Restriktion gelten, um die Wahrscheinlichkeit einer Reaktion der Spenderzellen zu erhöhen.

Für HLA-A*01

Tabelle 4: Peptide der Positiv- und Negativkontrolle für die HLA-A*01-ELISpots. Die Peptide für die Positivkontrolle sind nachweislich HLA-A*01-Liganden. CMV: Zytomegalievirus; Flu: Influenzavirus A; ADV: Adenovirus; HIV: Humanes Immundefizienz-Virus.

Peptid	Antigen (Quelle)	Peptid-nummer	Referenz
<i>Positivkontrolle (Mix)</i>			
YSEHPTFTSQY	pp65 (CMV)	3052	(Hebart et al., 2002)
CTELKLSDY	Protein N (Flu_1)	91060	(DiBrino et al., 1993)
VSDGGPNLY	PB 1 (Flu_2)	60209	(DiBrino et al., 1993)
LTDLGQNLLY	Hexon protein (ADV)	60385	(Günther et al., 2015)
<i>Negativkontrolle</i>			
GSEELRSLY	gag p17 (HIV)	80247, 110056	

Für HLA-A*26

Tabelle 5: Peptide der Positiv- und Negativkontrolle für die HLA-A*26-ELISpots. Fett markiert sind die fünf Peptide, die anfänglich als Mix in sieben IFN γ -ELISpots zur Anwendung kamen. Die spätere Positivkontrolle bildete der erweiterte Mix aus 26 EBV-Peptiden, die über MHC-Klasse I präsentiert werden.

HLA	Peptid	Antigen	Position	Peptid-nummer	Referenz
<i>Positivkontrolle (Mix)</i>					
A*02:01	YVLDHLIVV	BRLF1	109-117	111068	(Saulquin et al., 2000)
A*02:01	GLCTLVAML	BMLF1	259-267	91123	(Scotet et al., 1996)
A*02:01	FLYALALLL	LMP2	356-364	100046	(Lautscham et al., 2003)
A*02:01	LLWTLVVLL	LMP2	329-337	60181	(Lee et al., 1997)
A*02:01	CLGGLLTMV	LMP2	426-434	111082	(Lee et al., 1993)
A*02:01	YLLEMLWRL	LMP1	125-133	8427	(Khanna et al., 1998)
A*02:01	LLDFVRFMGV	EBNA6	284-293	101071	(Kerr et al., 1996)
A*03	RLRAEAQVK	EBNA3	471-479	80365	(Hill et al., 1995)
A*11:01	AVFDRKSDAK	EBNA4	399-408	71279	(Steven et al., 1996)
A*11:01	IVTDFSVIK	EBNA4	416-424	100008	(Gavioli et al., 1993)
B*07:02	RPPIFIRRL	EBNA3	247-255	91067	(Hill et al., 1995)

B*07:02	WPMGYRTAT	EBNA6	180-188	91106	unpubl.*
B*08	RAKFKQLL	BZLF1	190-197	91212	(Bogedain et al., 1995)
B*08	FLRGRAYGL	EBNA3	193-201	91215	(Burrows et al., 1992)
B*15:01	VQTAADVVF	BZLF1	122-130	110091	(Feger 2007)
B*15:01	LLAAVASSY	LMP2	163-171	71159	(Feger 2007)
B*15:01	GQGGSPAM	EBNA4	831-839	51023	(Rickinson and Moss, 1997)
B*27:02	RRIYDLIEL	EBNA6	258-266	50424	(Brooks et al., 1993)
B*35:01	NPRTLSSLL	BMLF1	430-438	100185	(Audehm 2010)
B*35:01	EPLPQGQLTAY	BZLF1	54-64	101049	(Saulquin et al., 2000)
B*35:01	APENAYQAY	BZLF1	81-89	80067	(Redchenko and Rickinson, 1999)
B*35:01	HPVGEADYFEY	EBNA1	407-417	100182	(Blake et al., 1997)
B*40:01	IEDPPFNSL	LMP2	200-208	71106	(Lee et al., 1997)
B*44	VEITPYKPTW	EBNA4	657-666	90258	(Rickinson and Moss, 1997)
B*44:03	AEGGVGWRHW	EBNA6	162-171	110168	(Morgan et al., 1996)
B*57:01	IALLYLQQNW	LMP1	156-164	100045	(Duraishwamy et al., 2003)

Negativkontrolle

ETFNTPAMY	Actin B	7499
-----------	---------	------

* unpubl: nicht veröffentlicht

2.2. Methoden

2.2.1. Peptide

2.2.1.1. Selektion

Grundlage für die Auswahl der Peptide bildeten zwölf Antigene aus dem EBV-Erregerstamm B95-8 (Tabelle 6), deren Aminosäuresequenzen über die Datenbank UniProtKB (www.uniprot.org) ermittelt wurden. Aus diesen immunogenen Antigenen konnten mittels SYFPEITHI (www.syfpeithi.de) nach Eingabe der jeweiligen FASTA-Sequenz Epitope vorhergesagt werden, die am ehesten als Liganden für die Moleküle HLA-A*01 und HLA-A*26 in Frage kommen. Hierbei erfolgte die Vorhersage für HLA-A*26 für Peptide mit neun und

zehn Aminosäuren (Nona-/Dekamere), für HLA-A*01 zusätzlich für Peptide mit elf Aminosäuren (Endekamere).

Tabelle 6: Verwendete EBV-Antigene, sieben aus dem lytischen und fünf aus dem latenten Zyklus. IE: immediate early; E: early; L: late.

	Gen-Name	Protein-Name	
Lytische Phase	IE	BZLF1	Trans-activator protein BZLF1 (EB1)
		BRLF1	Replication and transcription activator (Rta)
	E	BMRF1	DNA polymerase processivity factor BMRF1 (EA-D)
		BMLF1	mRNA export factor ICP27 homolog (Mta)
		BALF2	Single-stranded DNA-binding protein (DNBI)
	L	BNRF1	Major tegument protein (MTP)
		BLLF1	Envelope glycoprotein GP350 (MA)
Latente Phase	EBNA3	Epstein-Barr nuclear antigen 3 (EBNA3)	
	EBNA4	Epstein-Barr nuclear antigen 4 (EBNA4)	
	EBNA6	Epstein-Barr nuclear antigen 6 (EBNA6)	
	LMP1	Latent membrane protein 1 (LMP1)	
	LMP2	Latent membrane protein 2 (LMP2)	

SYFPEITHI (Rammensee et al., 1999) ist eine Datenbank für MHC Klasse I-, MHC Klasse II-Liganden und T-Zellepitope basierend auf Veröffentlichungen. Darüber hinaus ermöglicht das Programm die Vorhersage HLA-restringierter T-Zellepitope bei Kenntnis der Proteinsequenz und des Peptidmotives natürlicher Liganden (Abbildung 2). Anhand dieses Motives wird die gesamte Proteinsequenz über eine Aminosäurematrix analysiert. Dabei wird mithilfe eines Algorithmus zur Punktevergabe die Position der Aminosäuren im Peptid bewertet, ein score berechnet und eine Rangliste der möglichen T-Zellepitope erstellt. Die 2 % der am höchsten bewerteten Peptide gelten hierbei als gute Kandidaten und wurden soweit möglich im Rahmen dieser Arbeit für die Analysen synthetisiert.

Motiv HLA-A*01:									Motiv HLA-A*26:01:								
Position									Position								
1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
anchors or auxiliary anchors									anchors or auxiliary anchors								
<u>I</u>	D					<u>L</u>		Y	V		<u>I</u>						Y
<u>S</u>	E								T		<u>L</u>						F
									I		<u>V</u>						
									L								
									F								

Abbildung 2: Motive für HLA-A*01 und HLA-A*26. Dargestellt sind die präferierten Anker- und Hilfsanker-Aminosäuren und ihre jeweilige Position im Peptid. Beide HLAs binden Peptide mit aromatischen, hydrophoben Aminosäuren am C-Terminus; A*01: An der Ankerposition 3 werden saure Aminosäuren bevorzugt; A*26: An der Ankerposition 2 binden hydrophobe Aminosäuren. (www.syfpeithi.de)

2.2.1.2. Synthese und Aufbereitung

Die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Peptide erfolgte im eigenen Labor per Festphasensynthese unter Anwendung der Standard-Fmoc-Chemie.

Bei diesem Verfahren wird die Fmoc-Schutzgruppe am N-Terminus der Aminosäure mit Piperidin abgespalten (Entschützung) und im basischen Milieu mit der nächsten per HBTU/HOBt oder PyBOP am C-Terminus aktivierten Aminosäure gekoppelt. Die Schutzgruppen der Aminosäureseitenketten, die dementsprechend nicht basenlabil sein dürfen, werden am Ende durch Säureeinwirkung (TFA) abgespalten, ebenso wie das fertige Peptid vom Harz (Festphase).

Nach der Charakterisierung und Reinigung auf > 90 % mittels HPLC (*high performance liquid chromatography*) und Massenspektrometrie wurden die Peptide lyophilisiert und bei 4°C aufbewahrt. Für die weitere Verwendung der Lyophilisate wurden 0,4-1,2 mg Peptid eingewogen, in 10 % DMSO gelöst und mit steril filtriertem ddH₂O so aufgefüllt, dass eine Konzentration von 1 mg/ml erreicht wurde. Die gelösten Peptide konnten entweder sofort eingesetzt oder bei -80°C eingefroren werden.

2.2.2. PBMCs

2.2.2.1. Isolierung der PBMCs aus *Buffy Coats* und Kryokonservierung

Zur Gewinnung von *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) wurden *Buffy Coats* gesunder Blutspender verwendet, die freundlicherweise vom Zentrum für Klinische Transfusionsmedizin Tübingen kontinuierlich zur Verfügung gestellt wurden.

Ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Tübingen liegt unter der Projektnummer 432/2012B02 vor.

Als *Buffy Coat* wird die Zwischenschicht aus Leukozyten und Thrombozyten bezeichnet, die sich durch Zentrifugation heparinisierten Vollblutes zur Gewinnung von Erythrozytenkonzentraten und Plasmaprodukten zwischen diesen beiden Schichten bildet. Hierbei lagern sich die schweren Erythrozyten unten ab und das Plasma wird als Überstand gewonnen.

Die Isolierung der PBMCs erfolgte unter sterilen Bedingungen und bei Raumtemperatur per Dichtegradienten-Zentrifugation. Zunächst wurden pro *Buffy Coat* vier 50 ml-Röhrchen mit jeweils 15 ml Lymphozytenseparationsmedium (Ficoll) vorbereitet. Die *Buffy Coats* wurden in Zellkulturflaschen überführt und mit PBS auf 125 ml aufgefüllt. 30 ml des verdünnten Blutproduktes wurden nun auf Ficoll geschichtet und 30 min bei 2000 rpm mit ausgeschalteter Bremse zentrifugiert (Megafuge 1.0 R). Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen setzen sich aufgrund ihrer höheren Dichte als Sediment ab. Die mononukleären Zellen sammeln sich als Interphasen-Ring zwischen der Ficoll-Schicht darunter und dem Plasma mit den Thrombozyten darüber (Abbildung 3).

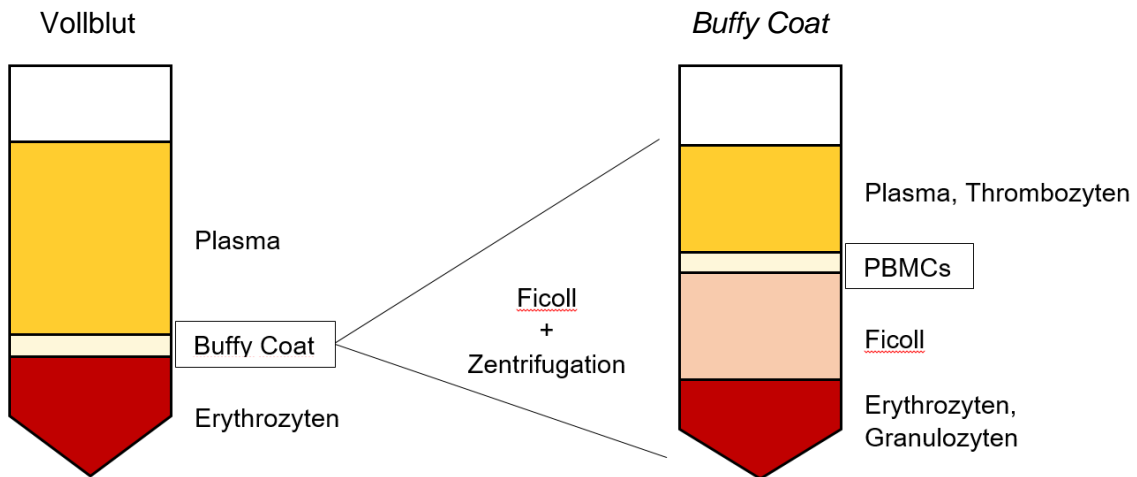


Abbildung 3: PBMC-Isolierung aus *Buffy Coats*. Die *Buffy Coats* wurden vorher durch Zentrifugation aus Vollblut gewonnen. Durch Zugabe eines Lymphozytenseparationsmediums (Ficoll) und anschließende Zentrifugation bildet sich die PBMC-Schicht als Interphasenring. PBMC: *peripheral blood mononuclear cell*.

Der Interphasen-Ring wurde vorsichtig abpipettiert, die Fraktionen aus zwei Röhrcchen in einem gesammelt und anschließend zur Entfernung von Ficoll-Rückständen und Thrombozyten gewaschen. Die Röhrcchen wurden mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und zentrifugiert (1500 rpm, 10 min), der Überstand verworfen und das Zellpellet gelöst. In einem weiteren Waschschrift mit 50 ml PBS wurde die Zentrifugationsgeschwindigkeit herabgesetzt (1300 rpm, 10 min), das Dekantat verworfen, die Pellets aus beiden Röhrcchen in einem gesammelt und wieder mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Hiervon wurde eine Probe zur Bestimmung der Zellzahl entnommen und das Röhrcchen erneut zentrifugiert (1100 rpm, 10 min), sodass das Zellpellet in Einfriermedium (4°C) aufgenommen werden konnte. Daraus wurden Aliquots zu je 10^8 Zellen pro 2 ml hergestellt, wobei die letzte Einheit an 10^8 Zellen pro 2 ml wiederum mit 3 ml Einfriermedium verdünnt und in fünf Aliquots mit 2×10^7 Zellen pro 1 ml verteilt wurde. Die anschließende Kryokonservierung in der PBMC-Bank des Labors erfolgte bei -80°C in vorgekühlten, mit Isopropanol gefüllten Einfrierboxen, wodurch ein gleichmäßiges Abkühlen von -1°C / min erreicht wird.

2.2.2.2. Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau vermischt. Trypanblau dringt durch die defekte Membran toter Zellen, bindet an Proteine und färbt diese blau. Somit lässt sich lichtmikroskopisch die Vitalität der Zellen beurteilen, da lebende Zellen nicht angefärbt werden und hell aufleuchten. Aufgrund der Zytotoxizität von Trypanblau erfolgte die Zählung unmittelbar nach Zugabe des Farbstoffs zur Zellsuspension. Ausgezählt wurden vier Großquadrate mit einem Kammervolumen von jeweils 10^{-4} ml (Seitenlänge 1 mm, Tiefe 0,1 mm). Die Zellzahl ergibt sich aus folgender Berechnung:

Gesamtzellzahl = mittlere Zellzahl pro Großquadrat / 10^{-4} [ml] x Verdünnungsfaktor x Gesamtvolumen [ml].

2.2.2.3. Auftauen

Der Inhalt eines Kryoröhrchens wurde in 10 ml Auftaumedium überführt. Dazu wurde zunächst Auftaumedium zu den gefrorenen Aliquots pipettiert, anschließend die aufgetauten Zellen zum restlichen Auftaumedium zugegeben und zentrifugiert (1400 rpm, 7 min, 20°C). Das Dekantat wurde verworfen, das Zellpellet in 10 ml Auftaumedium resuspendiert und erneut zentrifugiert (1400 rpm, 7 min, 20°C). Es erfolgte eine Resuspendierung der Zellen in 6 ml des vorgewärmten T-Zell-Mediums (TCM) (37°C) und die Überführung auf drei Wells einer 6-Well-Platte zu je 2 ml.

2.2.3. T-Zell-Experimente

Die in dieser Arbeit verwendeten Spenderzellen waren je nach zu testenden Peptiden entweder positiv für HLA-A*01 oder HLA-A*26. Der jeweilig genaue HLA-Haplotyp konnte aus der niedrigauflösenden serologischen HLA-Typisierung nicht bestimmt werden. Anhand der Homepage www.allelefrequencies.net, die auf Populationsstudien basiert und die Häufigkeit

der verschiedenen Haplotypen in den großen Populationen auflistet, kann darauf geschlossen werden, dass HLA-A*01:01 und HLA-A*26:01 jeweils deutlich dominieren und mit hoher Wahrscheinlichkeit die Haplotypen der hier untersuchten Spenderzellen darstellen (Stand Juni 2018).

2.2.3.1. 12-Tages-Prästimulation

Zur Vermehrung peptidspezifischer T-Zellen und dadurch besseren Detektionsmöglichkeit wurden die Spenderzellen vor Durchführung der T-Zell-Experimente stimuliert. Die am Tag 1 aufgetauten Zellen in den 6-Well-Platten wurden zunächst über Nacht im Inkubator (37°C, 5 % CO₂) kultiviert und anschließend über zwölf Tage prästimuliert. Am zweiten Tag erfolgte die Poolstimulation mit den zu testenden Peptiden so, dass eine finale Peptidkonzentration von 1 µg/ml erreicht wurde. An den Tagen 3, 6 und 8 wurde der Wachstumsfaktor Interleukin 2 (IL-2) mit einer Endkonzentration von 20 U/ml hinzugegeben. Dies ergab sich aus einer Untersuchung von Lutzky et al. als optimale Konzentration zur Expansion antigenspezifischer T-Zellen (Lutzky et al., 2009). Am zehnten Tag erfolgte nur die Zugabe von TCM. An Tag 13 konnten die Zellen für die weiteren Untersuchungen verwendet werden.

2.2.3.2. IFN γ -ELISpot

Der *enzyme-linked immunospot assay* (ELISpot) ist ein *in vitro*-Verfahren zur Detektion und quantitativen Bestimmung von Zytokinen oder Antikörpern, die nach Stimulation durch Antigene von den Immunzellen sezerniert werden. Die Zytokine werden von membrangebundenen spezifischen Antikörpern gebunden und im weiteren Verlauf durch Hinzufügen eines Zweitantikörpers sowie über eine enzymatische Umsetzung eines Farbstoffs als *spot* sichtbar gemacht. Dementsprechend stellt jeder *spot* eine sezernierende Zelle dar, die Größe und Intensität jedes *spots* die produzierte Menge. In dieser Arbeit wurde anhand des ELISpots die IFN γ -Produktion der T-Zellen nach Zugabe eines spezifischen Antigens untersucht.

Die 96-Well-Mikrotiterplatten wurden unter sterilen Bedingungen zunächst mit dem Erstantikörper 1-D1K Anti-human-IFN γ (4 $\mu\text{g/ml}$ in PBS) beladen (100 $\mu\text{l/Well}$) und über Nacht bei 4°C inkubiert. In zwei Waschvorgängen mit jeweils 200 μl IMDM pro Well wurden die Antikörper entfernt, die nicht an die Membran gebunden waren. Es erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt mit 50 μl TCM pro Well für 2 h bei 37°C.

Für die sterile Beladung der Platten wurden die prästimulierten Zellen aus den 6-Well-Platten in ein 50 ml-Falconröhrchen überführt und für 7 min bei 1400 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml TCM resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und die Platten mit 5×10^5 Zellen/Well (50 $\mu\text{l/Well}$) und 1 $\mu\text{g/ml}$ Peptid (50 $\mu\text{l/Well}$) beladen, sodass sich ein Gesamtvolumen von 150 μl pro Well ergab. Für die Positivkontrolle mit Phytohämagglutinin (PHA, 10 $\mu\text{g/ml}$) wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen/Well angesetzt. PHA ist ein Lektin, das an die T-Zellmembran bindet und unter anderem die Zellteilung sowie die metabolische Aktivität der Zelle anregt. Es wurde zusätzlich zum Positivmix als unspezifische Kontrolle eingesetzt.

Die Beladung der ELISpot-Platten erfolgte nach folgendem Schema:

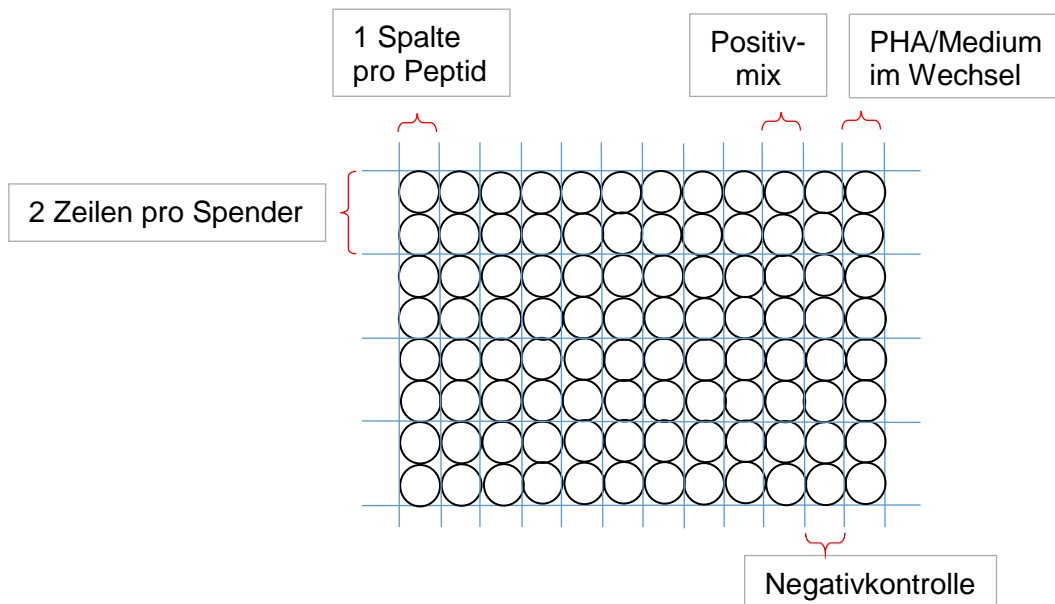


Abbildung 4: Beladungsschema der ELISpot-Platten: Für jedes Peptid, den Positivmix, die Negativkontrolle und die PHA-/Mediumkontrolle wurden jeweils zwei Wells pro Spender angesetzt. PHA diente als unspezifische Kontrolle, die Wells für die Mediumkontrolle für den Hintergrund. PHA: Phytohämagglutinin.

Die Inkubation erfolgte für 22 bis 26 h bei 37°C im waagerechten und erschütterungsfreien Zustand, um ein Verrücken der Zellen zu vermeiden und somit die Auswertung zu erleichtern. Im Anschluss wurden die Platten in sieben Schritten mit 200 µl/Well der folgenden Substanzen gewaschen: zweimal mit PBS/Tween20, zweimal mit ddH₂O und dreimal wieder mit PBS/Tween20, um die Zellen zu lysieren und Rückstände zu entfernen. Nach jedem Waschschrift wurden die Platten auf Zellstoffpapier ausgeklopft, sodass die Komplexe aus Erstantikörper und IFN γ am Boden der Wells zurückblieben. Um diese sichtbar zu machen, erfolgte eine Immunfärbung, bei der zunächst der Zweitantikörper 7-B6-1 Biotin Anti-human-IFN γ (0,3 µg/ml in PBS/BSA) zugegeben (100 µl/Well), die Platten 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und erneut sechsmal mit PBS/Tween20 nach obigem Schema gewaschen wurden. Der biotinylierte Zweitantikörper bindet an ein anderes Epitop des Zytokins IFN γ . In einem nächsten Schritt wurden 100 µl/Well ExtrAvidin alkalische Phosphatase (1:1000 in PBS/BSA) zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Das Protein ExtrAvidin ist eine modifizierte Form des biotinbindenden Glykoproteins Avidin mit weniger unspezifischen Bindungen aufgrund der fehlenden Kohlenhydratreste. Es bindet mit hoher Affinität an das Biotin des Zweitantikörpers und katalysiert über das gekoppelte Enzym alkalische Phosphatase die Umsetzung des Farbstoffs BCIP/NBT, was als blauer *spot* sichtbar wird. Während der Inkubationszeit wurde der Farbstoff in dH₂O aufgelöst und bis zum Einsatz im Dunkeln gelagert. Nachdem die Platten je dreimal mit 200 µl PBS/Tween20 sowie 200 µl PBS gewaschen worden waren, wurden je 50 µl des Farbstoffs BCIP/NBT pro Well zugegeben und die Reaktion nach 7 min Einwirkzeit im Dunkeln mit fließendem Wasser gestoppt, der Plastikrücken der Platten entfernt und diese zum Trocknen wiederum im Dunkeln aufbewahrt. Die Auszählung der *spots* erfolgte mit dem ELISPOT-Reader.

Die Kriterien für ein positives Ergebnis wurden laborintern festgelegt und beinhalten folgende Bedingungen: In jedem der beiden Wells müssen mindestens zehn *spots* vorliegen und ihre Anzahl muss mehr als das Dreifache der *spots* der Negativkontrolle betragen (positiv bei ≥ 10 *spots* sowie $> 3 \times$ *spots* Negativkontrolle). Diese angepassten Kriterien stützen sich auf die empirische

Regel zur Definition einer positiven Reaktion, wie sie bereits 2007 von Dubey et al. beschrieben wurde und bei Moodie et al. in ähnlicher Form zwar eine relativ geringe Detektionsrate, jedoch sehr geringe Rate an falsch-positiven Ergebnissen erzielte (Dubey et al., 2007; Moodie et al., 2010).

Peptide, die zu mindestens einer positiven Reaktion geführt hatten, wurden ein zweites Mal an weiteren acht Spendern getestet. Die Epitope, die in mehr als der Hälfte der insgesamt 16 getesteten Spender ein positives Ergebnis erzielten (Reaktionsrate $RR > 8/16$ bzw. $> 50\%$), gelten als Epitope mit hoher Erkennungsfrequenz.

2.2.3.3. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS, *Fluorescence Activated Cell Sorting*) ist ein Verfahren zur Charakterisierung von Zellen und quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulärer Strukturen in Einzelzellsuspension auf der Grundlage von Streulicht und Fluoreszenz. Die gefärbten Zellen passieren einzeln in einem dünnen Flüssigkeitsstrom einen Laserstrahl (hydrodynamische Fokussierung). Das dabei emittierte Streu- und Fluoreszenzlicht wird mittels Detektoren (Photomultiplier) registriert und ermöglicht aufgrund der hohen Analysegeschwindigkeit in kurzer Zeit eine Aussage über die Zelleigenschaften.

Bei der Lichtstreuung wird zwischen dem Vorwärtsstreulicht (FSC, *forward scatter*), das ein Maß für die Größe der Zelle ist, und dem Seitwärtsstreulicht (SSC, *side scatter*), das ein Maß für die Granularität bzw. Komplexität der Zelle ist, unterschieden, wodurch auch ohne Färbung bereits Aussagen über bestimmte Zelleigenschaften möglich sind.

Um darüber hinaus weitere Zelleigenschaften (z.B. Subpopulationen, Funktionen) zu untersuchen, können bestimmte Zellbestandteile mit Hilfe von an Antikörper konjugierten Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Die Farbstoffe werden durch die Lichtenergie des Laserstrahls in einem für sie charakteristischen Wellenlängenbereich (Absorptionsspektrum) angeregt und emittieren beim Zurückfallen auf den Ausgangszustand ein fluoreszierendes

Licht in einem wiederum für sie charakteristischen Wellenlängenbereich (Emissionsspektrum), welches herausgefiltert und detektiert wird.

Durch den Einsatz mehrerer Laser unterschiedlicher Wellenlänge sowie verschiedener Fluoreszenzmarker mit unterschiedlichem Emissionsspektrum lassen sich in einer Messung mehrere Zelleigenschaften erfassen. Die Signale werden von verschiedenen Detektoren registriert und mittels Gerätesoftware grafisch entweder als Histogramm oder als Dotplot dargestellt.

In dieser Arbeit wurden die T-Zellen, die auf Epitope mit einer $RR \geq 2/16$ reagiert hatten, durch anschließende FACS-Analysen hinsichtlich ihrer Identität durch Markierung von Oberflächenstrukturen (CD4-/CD8-Rezeptor) untersucht. Als dominant gelten hierbei die Epitope, die zur Aktivierung des Großteils der T-Effektorzellen führen. Zudem wurden sie nach intrazellulärer Zytokinfärbung auf ihre Zytokinsekretion (IFN γ , TNF α) hin untersucht.

2.2.3.3.1. Intrazelluläre Zytokinfärbung

Der ELISpot ermöglicht es lediglich die Häufigkeit zytokinproduzierender Zellen zu bestimmen. Mit Hilfe der intrazellulären Zytokinfärbung kann zusätzlich zur intrazellulären Färbung der produzierten Zytokine eine genaue Bestimmung der Subtypen aktivierter T-Zellen durch Färbung charakteristischer Oberflächenmoleküle vorgenommen werden.

In dieser Arbeit sollte die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen (CD3⁺, CD8⁺) untersucht werden, weshalb neben der Färbung der Zytokine IFN γ und TNF α eine Markierung der Oberflächenmoleküle CD3, CD4 und CD8 vorgenommen wurde. Grundlage für diese Untersuchung waren Epitope, die bei mindestens zwei der insgesamt 16 getesteten Spender zu positiven Ergebnissen geführt hatten.

Die PBMCs, die auf das jeweilige Epitop reagiert hatten, wurden über zwölf Tage mit dem jeweiligen Peptid und der Negativkontrolle prästimuliert, die Zellen gezählt und in 100 μ l TCM mit jeweils 1×10^6 , mindestens jedoch $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Well einer 96-Well-Platte vorgelegt. Pro Peptid wurden Duplikate angelegt

und pro Spender außerdem zwei Wells für die Negativkontrolle und ein Well für die Positivkontrolle mit PMA und Ionomycin. Pro Färbung wurden zusätzlich drei Kontroll-Wells mit ungefärbten Zellen belegt, um die Eigenfluoreszenz der Zellen zu messen.

Für alle Wells wurde eine Brefeldin A-Lösung in TCM mit finaler Konzentration von 10 µg/ml hergestellt und 50 µl pro Well zugefügt. In die Peptid-Wells wurde das jeweilige Peptid mit einer Zielkonzentration von 1 µg/ml und 50 µl TCM pipettiert. Für die Wells der Positivkontrolle wurden PMA (final: 50 ng/ml) und Ionomycin (final: 1 µM) in TCM gelöst und ebenfalls zu 50 µl pro Well zugegeben. In die Wells der ungefärbten Kontrolle wurden nur 50 µl TCM pipettiert. Es erfolgte die Inkubation für 6 h bei 37°C im Brutschrank.

Durch die Stimulation und infolgedessen Aktivierung der T-Zellen werden Zytokine produziert und ausgeschüttet. Brefeldin A hemmt die Proteinsekretion, indem es den vesikulären Transport der Proteine vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat blockiert, und bewirkt dadurch eine Akkumulation der Zytokine in der Zelle (Klausner et al., 1992).

Bei allen folgenden Waschvorgängen wurde die Platte jeweils zentrifugiert (1800 rpm, 2 min, 4°C), der Überstand abgeklopft und die Zellen in den Wells mit dem jeweiligen Waschpuffer wieder gelöst. Ebenso wurde in die Wells für die ungefärbten Kontrollen statt des jeweiligen Farbstoffes das jeweilige Waschmedium in entsprechender Menge hinzugefügt. Die Inkubation während der Färbeschritte erfolgte jeweils für 20 min bei 4°C im Dunkeln.

Nach der Inkubationszeit erfolgten zwei Waschvorgänge mit 200 µl PBSE pro Well. Die Zellen wurden danach mit je 50 µl Aqua Live/Dead (1:400 in PBSE) pro Well resuspendiert und inkubiert. Der Fluoreszenz-Farbstoff Aqua Live/Dead ist aminreaktiv und bindet sowohl intra- als auch extrazelluläre freie Amine. In toten Zellen mit defekten Zellmembranen werden anders als bei lebenden Zellen auch die Amine im Zellinneren angefärbt, wodurch die Fluoreszenz etwa 50-fach intensiver ist und eine Unterscheidung ermöglicht wird. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Wells mit 150 µl PBSE aufgefüllt, zentrifugiert und zweimal mit 200 µl FACS-Puffer (PFEA) pro Well gewaschen. Es erfolgte die

Färbung der Oberflächenstrukturen CD3, CD4 und CD8 durch in PFEA verdünnte extrazelluläre Antikörper (Tabelle 7). Die Zellen wurden in 50 µl/Well dieser Lösung resuspendiert, erneut inkubiert und zwei Mal mit PFEA gewaschen. Um die intrazellulären Strukturen IFN γ und TNF α anfärben zu können, wurden die Zellen permeabilisiert und hierfür mit 100 µl/Well Cytotfix/Perm inkubiert. Nach weiteren zwei Waschvorgängen mit Permwash wurden die Zellen in einer Lösung aus Permwash mit den darin verdünnten intrazellulären Antikörpern (Tabelle 7) resuspendiert und inkubiert. Abschließend wurden die Zellen noch zweimal mit Permwash gewaschen und für spätere Analysen in 200 µl/Well FACS Fix fixiert.

Tabelle 7: Farbstoffe für die intrazelluläre Zytokinfärbung mit der jeweiligen Spezifität, der Verdünnung, dem Hersteller, den Exzitationsmaxima (Ex_{max}) sowie Emissionsmaxima (Em_{max}). *Becton Dickinson.

Antigen	Farbstoff	Verdünnung	Hersteller	Ex_{max}	Em_{max}
<i>Extrazelluläre Antikörper</i>					
CD3	FITC	1:50	BD*	494 nm	520 nm
CD8	PerCP	1:25	BD*	482 nm	678 nm
CD4	APC-Cy7	1:100	BD*	650 nm	785 nm
<i>Intrazelluläre Antikörper</i>					
IFN γ	PE-Cy7	1:400	BioLegend	496 nm	785 nm
IFN γ	PE	1:200	BioLegend	496 nm	578 nm
TNF α	Pacific Blue	1:120	BioLegend	401 nm	452 nm
Spezifität					
Amine	Aqua Live/Dead	1:400	Invitrogen	367 nm	526 nm

2.2.3.4. HLA-Tetramerfärbung

Zur Bestimmung der Spezifität detektierter CD8⁺ T-Zellen kam die HLA-Tetramerfärbung zum Einsatz. Bei diesem Verfahren werden MHC-Monomere hergestellt, bestehend aus β 2-Mikroglobulin und einer biotinylierten schweren Kette des jeweiligen HLA, die durch Rückfaltungsprozesse mit einem Peptid verbunden werden. Diese MHC-Monomere formen nach Zugabe eines farbstoffgekoppelten Streptavidin über das angehängte Biotin Tetramere. CD8⁺

T-Zellen mit dem passenden TCR binden an diese Tetramere und können so sichtbar gemacht und ihre Antigenpezifität nachgewiesen werden.

2.2.3.4.1. MHC-Monomer-Synthese

In den ersten fünf Tagen erfolgten der Rückfaltungsprozess und die anschließende Konzentrierung, danach weitere Konzentrierungsschritte, die Chromatographie, Biotinylierung und Proteinbestimmung.

Die schwere und die leichte Kette des jeweiligen HLA wurden aus *inclusion bodies* aufgereinigt und der Rückfaltungspuffer angesetzt. Alle folgenden Schritte fanden im Kühlraum bei 4°C statt. Am ersten Tag wurden zum Rückfaltungspuffer unter ständigem Rühren 385 mg reduziertes und 77,5 mg oxidiertes Glutathion, 250 µl PMSF (Proteaseinhibitor) und 8 mg des jeweiligen Peptids (in DMSO gelöst, 10 mg/ml) zugegeben. 8 mg der schweren Kette, mit einer Harnstofflösung auf eine Konzentration von 20 mg/ml gebracht, wurden mit 700 µl Injektionspuffer und 7 mg der leichten Kette mit 780 µl Injektionspuffer versetzt und beides strudelnah injiziert. Danach erfolgte eine Inkubation über zwölf Stunden unter Rütteln im Kühlraum. Am zweiten Tag wurden morgens und abends 8 mg der schweren Kette wie oben beschrieben hinzugefügt.

Der erste Konzentrierungsschritt folgte an Tag 3. Die Lösung wurde zuerst mit Hilfe eines 0,22 µm-Vakuumfilters filtriert, um mögliche Aggregate abzutrennen, und das Pellet verworfen. Das Permeat wurde dann in eine mit 200 ml ddH₂O vorgespülte Amicon-Rührzelle gegeben und bei 60 psi unter Rühren filtriert, bis ca. 25 ml Retentat übrig waren. Das Retentat, welches fertig rückgefaltete MHC-Monomere konzentriert hat, wurde in ein Falconröhrchen überführt und im Kühlschrank gelagert. Die Membran der Rührzelle wurde mit Regenerationspuffer ausgewaschen und in TBS gelagert. Zum Permeat wurden erneut PMSF, die schwere und die leichte Kette hinzugefügt und in einer zweiten Rückfaltung zwölf Stunden bei 4°C unter Schütteln inkubiert. An Tag 4 wurde wieder nur die schwere Kette morgens und abends wie beschrieben zugegeben. Nach der nächsten Konzentrierung am 5. Tag wurden die Retentate von Tag 3

und 5 in einem Zentrifugenröhrchen zusammengeführt und bei 4000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Mit Hilfe von Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten, die zuvor mit TBS präequilibriert (Zentrifugation bei 4000 rpm, 4°C, 5 min) wurden, wurde im Anschluss der Überstand mit den MHC-Monomeren schrittweise durch Einfüllen und Zentrifugieren auf eine Menge von 4-5 ml eingedickt. Am 6. Tag erfolgte nach einer weiteren Zentrifugation eine FPLC (*fast protein liquid chromatography*) in Form einer Größenausschluss-Chromatographie, um die Monomer-Lösung von den noch vorhandenen anderen Bestandteilen zu trennen. Unter spektroskopischer Kontrolle bei 280 nm wurden 5 ml-Fractionen gesammelt. Die Fractionen mit den Monomeren wurden gesammelt und sofort mit den Proteaseinhibitoren PMSF, Leupeptin und Pepstatin versetzt (jeweils 1:1000), um einen Abbau der Komplexe zu verhindern. Im Anschluss wurden Aggregate abzentrifugiert und die Monomer-Lösung erneut mit Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten auf 5 ml konzentriert. Die darin enthaltenen Monomere konnten nun im nächsten Schritt über Biotinylierungssequenzen an der schweren Kette biotinyliert werden. Hierfür wurden zunächst 400 µl TRIS (1 M, pH 8), 25 µl MgCl₂ (1 M) und 250 µl ATP (Adenosintriphosphat, 100 mM) sowie anschließend 10-20 µg des BirA-Enzyms und 28,5 µl Biotin (100 mM) als Substrat zugegeben, gut vermischt und über Nacht im Wasserbad bei 27°C inkubiert. Am 7. Tag wurde der Biotinylierungsansatz wieder zentrifugiert (4000 rpm, 5 min, 4°C) und es erfolgte eine weitere Größenausschluss-Chromatographie mit Sammlung der biotinylierten Monomer-Fraktion und Zugabe der Proteaseinhibitoren (s.o.). Nach einer weiteren Konzentrierung auf 250-350 µl wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt, um die hergestellten Monomere in bestimmter Konzentration einfrieren zu können. Dazu wurde eine Standardlösung (Roti-Nanoquant Proteinassay) verwendet, die BSA in verschiedenen Konzentrationen enthält (0, 20, 40, 60, 80 und 100 µg/ml). Zunächst wurden 50 µl jeder BSA-Konzentration in die Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Danach wurden 50 µl der mit TBS in den Verdünnungen 1:200 und 1:500 hergestellten Probe jeweils als Triplets in die Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend die Wells der Standards und Proben mit 200 µl Bradford-Reagenz (1,2 ml Nanoquant und 4,8

ml ddH₂O) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min erfolgte die Messung im ELISA-Reader Spectramax 340. Über die Standardkurve konnte die Konzentration der Monomere ermittelt werden, sodass die Proben mit TBS auf eine Konzentration von 2 mg/ml verdünnt und als Aliquots zu jeweils 50 µg pro 25 µl bei -80°C gelagert werden konnten.

2.2.3.4.2. Tetramerisierung

Die eingefrorenen Monomere wurden bei 4°C aufgetaut. Zur Tetramerisierung der biotinylierten Monomere wurde mit R-Phycoerythrin konjugiertes Streptavidin (Strep-PE) verwendet (Molecular Probes S-866, 1 mg/ml). Ein Molekül Streptavidin kann vier Biotineinheiten binden (1:4) und um eine gleichmäßige Verteilung des Farbstoffs zu gewährleisten, wurden 50 µg des Monomers (45 kDa) unter konstantem Schütteln schrittweise mit insgesamt 83,3 µl des Strep-PE (60 kDa, 240 kDa) versetzt: In 30-minütigen Intervallen wurden jeweils 10 % der Gesamtmenge des Fluoreszenzfarbstoffs Strep-PE hinzugefügt. Die einzelnen Schritte und die jeweilige Inkubation erfolgten lichtgeschützt bei 4°C.

2.2.3.4.3. HLA-Tetramerfärbung

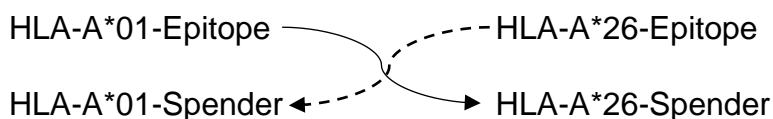
Die Zellen wurden entsprechend der intrazellulären Zytokinfärbung durch Färbung mit Aqua Live/Dead und mit den extrazellulären Antikörpern gegen CD4 und CD8 vorbereitet. Anschließend wurden sie zweimal mit *Tetramer-Staining-Buffer* (TSB) gewaschen. Die Tetramere wurden in TSB auf eine Konzentration von 5 µg/ml verdünnt und 5 min bei 13 000 rpm und 4°C zentrifugiert. 50 µl des Überstands wurden pro Well zu den Zellen hinzugefügt und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Nach einem Waschvorgang mit 200 µl/Well PFEA wurden die Zellen für die spätere durchflusszytometrische Analyse in FACS-Fix aufgenommen und bei 4°C gelagert.

2.2.3.5. Gating-Strategie

Die Populationen wurden schrittweise analysiert. Zuerst erfolgte die Auswahl der Lymphozyten (SSC-A vs. FSC-A Dotplot), dann der Einzelzellen (FSC-H vs. FSC-A Dotplot) und anschließend die Aussortierung der toten Zellen (Aqua Live/Dead vs. SSC-A Dotplot). Zur Identifizierung der CD3⁺ Lymphozyten wurde ein Histogramm erstellt. Danach wurden die Subpopulationen der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in einem Dotplot dargestellt. Für die Intrazellulärfärbung wurde nach Auswahl der jeweiligen Subpopulation diese auf ihre jeweilige Zytokinproduktion untersucht (INF γ vs. TNF α). Bei der Tetramerfärbung erfolgte die Auswahl der gesamten CD3⁺ T-Zellpopulation.

2.2.4. Kreuzreaktionen im HLA-A*01-Supertyp

Dominante Epitope, die zu einer messbaren Zytokinproduktion durch CD8⁺ T-Zellen geführt hatten, wurden im weiteren Verlauf in einem zweiten ELISpot-Screening getestet. Bei diesem zweiten Screening wurden PBMCs verwendet, die negativ für das eigentliche HLA, jedoch positiv für einen verwandten Allotypen aus dem HLA-A*01-Supertypen sind (Sette and Sidney, 1999), um eine mögliche Kreuzreaktivität zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden A*01-Epitope auf PBMCs HLA-A*26⁺ Spender und A*26-Epitope auf PBMCs HLA-A*01⁺ Spender getestet:



3. ERGEBNISSE

3.1. Positivkontrollen

3.1.1. Positivmix für HLA-A*01

Um neben PHA eine geeignete spezifische Positivkontrolle für HLA-A*01 in den ELISpots einsetzen zu können, wurden die vier als Liganden von HLA-A*01

bekanntes Peptid YSEHPTFTSQY (CMV), CTELKLSYD (Influenza A), VSDGGPNLY (Influenza A) und LTDLGQNLLY (ADV) hier nochmals auf ihre Immunogenität untersucht (Tabelle 8). Dazu wurden acht HLA-A*01⁺ und acht HLA-A*01⁻-Spender mittels ELISpot hinsichtlich einer Reaktion auf diese Peptide getestet (Abbildung 5).

Tabelle 8: Peptidkandidaten für den HLA-A*01-Positivmix und die Anzahl positiver Reaktionen bei HLA-A*01⁺ und HLA-A*01⁻ Spendern. Die Peptide stammen aus Antigenen weit verbreiteter Viren und werden alle über HLA-A*01 präsentiert. CMV: Zytomegalievirus; Flu: Influenzavirus A; ADV: Adenovirus. *RR: Reaktionsrate.

Peptidsequenz	Antigen (Referenz)	Peptidnummer	RR*	
			A*01 ⁺	A*01 ⁻
YSEHPTFTSQY	pp65 (CMV) (Hebart et al., 2002)	3052	8/8	1/8
CTELKLSYD	Protein N (Flu_1) (DiBrino et al., 1993)	91060	3/8	0/8
VSDGGPNLY	PB 1 (Flu_2) (DiBrino et al., 1993)	60209	4/8	0/8
LTDLGQNLLY	Hexon protein (ADV) (Günther et al., 2015)	60385	7/8	0/8

Das CMV-Peptid führte bei allen HLA-A*01⁺ Spendern zu einer IFN γ -Produktion und ist somit ein hochfrequentes Epitop, ebenso wie das ADV-Peptid mit einer Reaktionsrate von 7/8. Damit stellen beide geeignete Peptide für den Positivmix dar. Die Influenzavirus A-Peptide erwiesen sich als niedrigfrequente Epitope (Flu_1: RR 3/8, Flu_2: RR 4/8), die in den Mix aufgenommen wurden, um die Reaktionswahrscheinlichkeit unter den Spendern zu erhöhen.

Die HLA-A*01⁺ Spender 608 und 709 zeigten durch ihre positive Reaktion auf alle vier getesteten Epitope ausgeprägte Kodominanzeffekte. In beiden Fällen war die Spotanzahl beim CMV-Peptid am höchsten. Beim HLA-A*01⁻ Spender 728, der Träger der HLA-Typen A*03, A*29, B*07 und B*44 ist, fand ebenfalls eine Aktivierung der T-Zellen durch das CMV-Peptid statt.

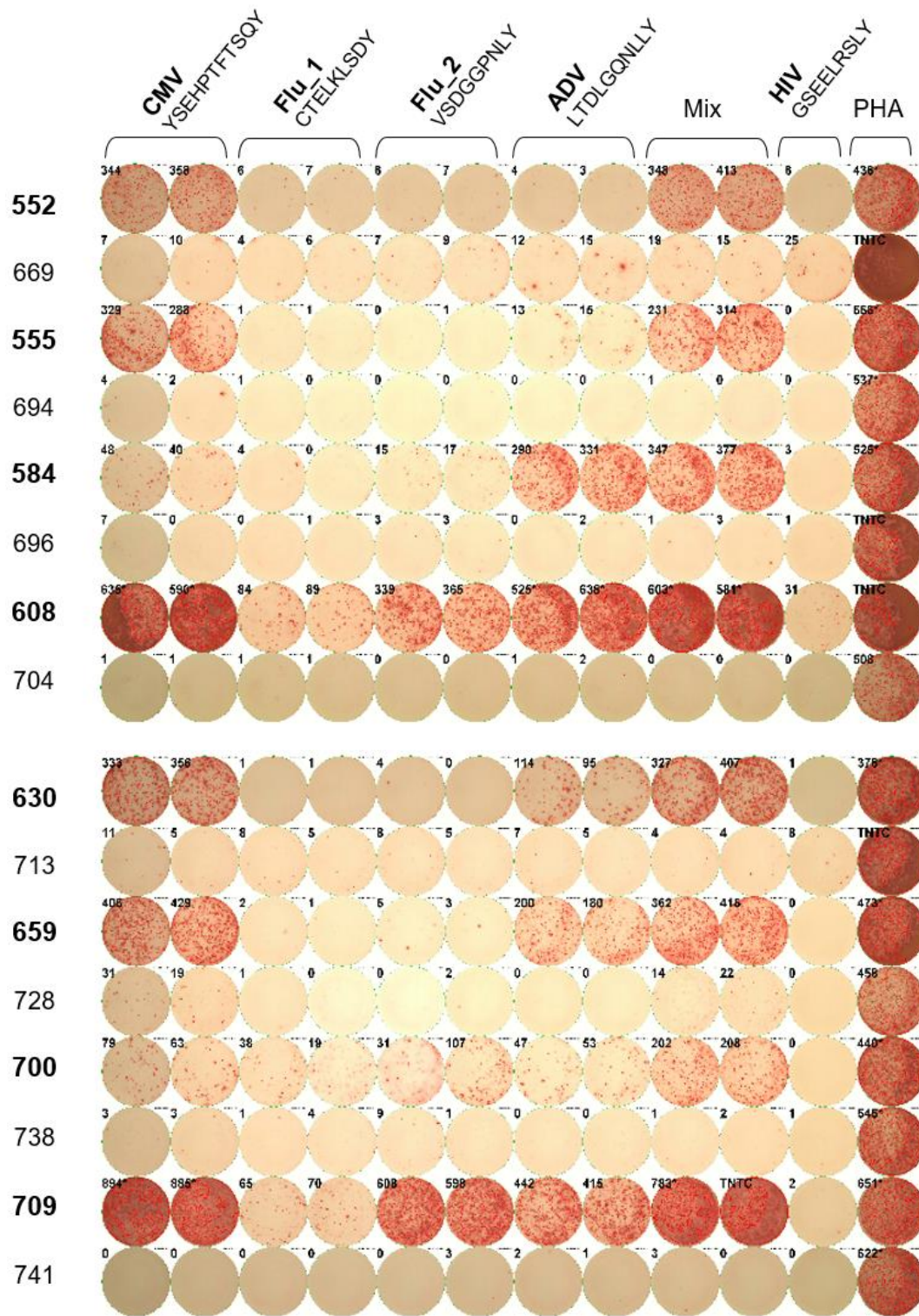


Abbildung 5: ELISpot: Vergleich der Reaktionen acht HLA-A*01⁺ Spender (Nummern fett markiert) und acht HLA-A*01⁻ Spender auf vier als HLA-A*01-Liganden geltende Epitope aus CMV, Influenzavirus A und ADV. Pro Spender sind Duplikate für jedes Peptid und für den Mix der vier Peptide dargestellt, außerdem ein Well für das HIV-Negativpeptid und eine PHA-Positivkontrolle. HLA-A*01⁺ und HLA-A*01⁻ Spender sind im Wechsel angeordnet. Vereinzelte positive Reaktionen HLA-A*01⁺ Spender finden sich bei den Flu_1- und Flu_2-Peptiden. Dagegen reagieren alle HLA-A*01⁺ Spender

positiv auf das CMV-Peptid und bis auf Spender 552 auch auf das ADV-Peptid. CMV: Zytomegalievirus; Flu: Influenzavirus A; ADV: Adenovirus; HIV: Humanes Immundefizienz-Virus; PHA: Phytohämagglutinin; TNTC: *too numerous to count*; *: geschätzter Wert.

3.1.2. Positivmix für HLA-A*26

Da für HLA-A*26 noch keine hochfrequenten Epitope bekannt waren, wurde für die Positivkontrolle ein Positivmix aus EBV-Peptiden mit anderen anerkannten HLA-Restriktionen eingesetzt. Der anfängliche Mix aus fünf Peptiden (Mix 1), der bei vielen der getesteten Spender zu keiner T-Zellreaktion geführt hatte, wurde im Verlauf der Arbeit durch weitere 21 Peptide ergänzt (Mix 2). Wie in den folgenden Abbildungen dargestellt, erhöhte sich dadurch die Wahrscheinlichkeit für eine positive Reaktion.

Auf den Mix 1 reagierten 22 von 37 Spendern (ca. 59 %) und auf den Mix 2 26 von 33 Spendern (ca. 79 %) jeweils positiv (Abbildung 6). Darunter sind 24 Spender, die bei beiden Positivmix-Varianten zum Einsatz kamen.

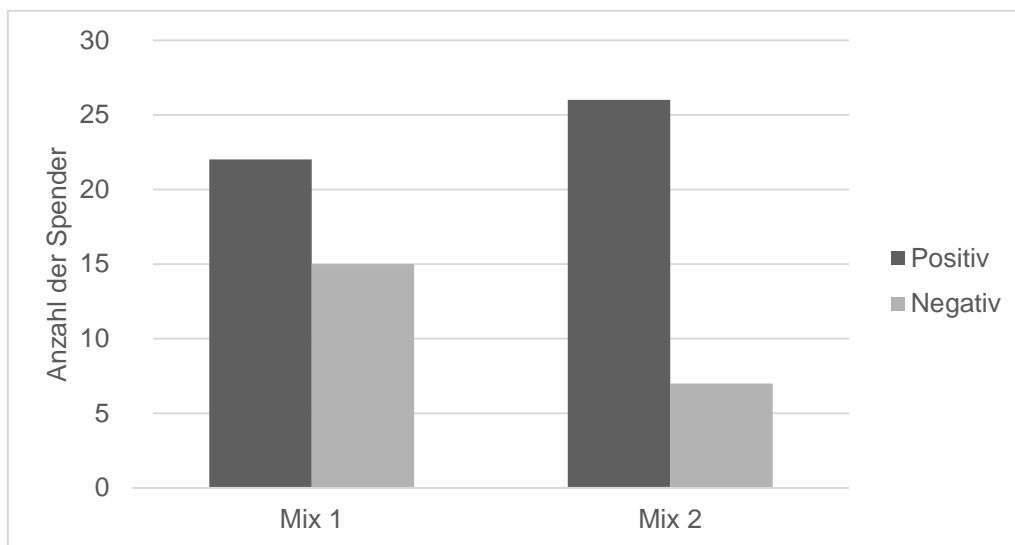


Abbildung 6: Vergleich der Häufigkeiten positiver und negativer Spenderreaktionen auf den HLA-A*26-Positivmix 1 und 2. Bei Mix 1 reagierte fast die Hälfte der Spender nicht, bei Mix 2 zeigte etwa ein Fünftel der Spender keine positive Reaktion. 24 Spender kamen dabei bei beiden Positivmix-Varianten zum Einsatz.

Zur besseren Vergleichbarkeit werden im Folgenden nur die 24 Reaktionen der Spender gegenübergestellt, die sowohl bei Mix 1 als auch Mix 2 eingesetzt wurden (Abbildung 7). Mix 1 führte bei zwölf dieser Spender zu einer positiven Reaktion (50 %). Mix 2 bewirkte darüber hinaus bei acht weiteren Spendern eine positive Reaktion (83 %).

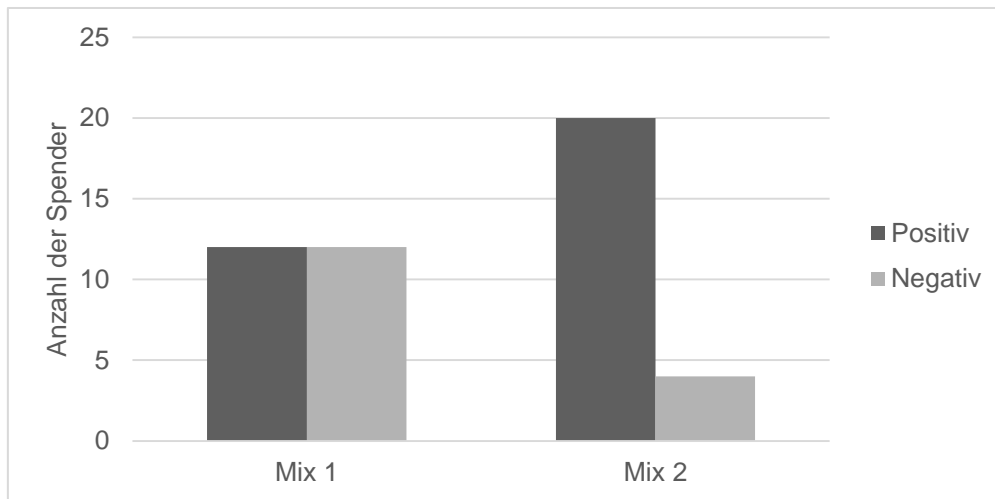


Abbildung 7: Vergleich der Häufigkeiten positiver und negativer Spenderreaktionen bei denselben Spendern auf den HLA-A*26-Positivmix 1 und 2. Von 24 Spendern reagierten bei Mix 1 zwölf Spender nicht, bei Mix 2 zeigten vier Spender keine positive Reaktion.

3.2. Epitopscreening

3.2.1. PeptidAuswahl für HLA-A*01 und HLA-A*26

Aus den Sequenzen der in dieser Arbeit untersuchten zwölf EBV-Antigene (siehe Tabelle 6) wurden mit Hilfe des Programms SYFPEITHI Epitopvorhersagen getätigt und daraus die 2 % der am besten bewerteten Peptide für weitere Untersuchungen ausgewählt. Hierbei wurden für HLA-A*01 Peptide mit einer Länge von neun, zehn und elf Aminosäuren, für HLA-A*26 Peptide mit neun und zehn Aminosäuren in die Auswahl einbezogen. Somit ergaben sich für HLA-A*01 648 und für HLA-A*26 386 „Epitopkandidaten“, woraus in dieser Arbeit insgesamt 81 „Epitopkandidaten“ für HLA-A*01 und 120 für HLA-A*26 mittels IFN γ -ELISpot getestet wurden (Tabelle 9, siehe Anhang). Beispielhaft ist in Abbildung 8 ein ELISpot für HLA-A*26 dargestellt. Darin wird die reaktive IFN γ -Produktion der

PBMC-Kultur 1059 auf die Peptide DVVPGNLVTY und EVATLGTGY durch die hohe Spotanzahl deutlich.

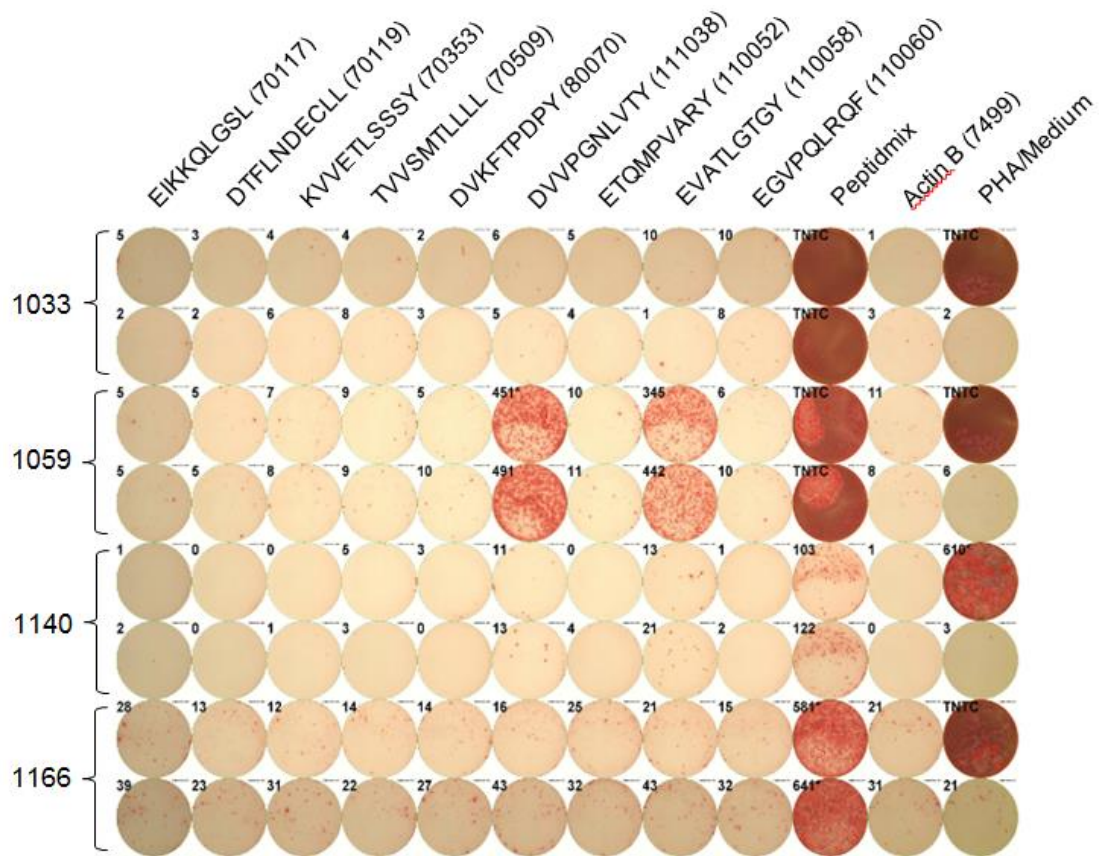


Abbildung 8: HLA-A*26-ELISpot. Die Spender sind in jeweils zwei Reihen horizontal angeordnet, die Peptide und die Kontrollen vertikal. Die Peptidnummer ist in der Klammer hinter dem Peptid vermerkt. Der Peptidmix (fünf EBV-Peptide verschiedener HLA-Restriktion) diente als Positiv-, Actin B als Negativkontrolle. PHA und Medium wurden als unspezifische Kontrollen im Wechsel angeordnet. PBMCs aus Spender 1059 weisen zwei positive Reaktionen auf die Peptide DVVPGNLVTY und EVATLGTGY auf. PHA: Phytohämagglutinin. EBV: Epstein-Barr Virus. PBMC: *peripheral blood mononuclear cell*; TNTC: *too numerous to count*.

3.2.2. Ergebnisse des ersten Epitopscreenings für HLA-A*01

Beim diesem ersten Screening mit Hilfe des IFN γ -ELISpots gingen aus den 81 getesteten Peptiden für HLA-A*01 insgesamt 18 immunogene Peptide mit mindestens einer positiven Spenderreaktion hervor (Tabelle 10). Diese stammen aus zehn der zwölf untersuchten Antigene. 14 dieser Peptide sind Epitope aus Antigenen des lytischen Zyklus, vier aus Antigenen des latenten Zyklus des Epstein-Barr Virus (Abbildung 9). Unter den sechs Peptiden mit einer höheren

Reaktionsrate ($\geq 2/16$), die im Folgenden betrachtet werden, ist das Epitop ESEERPPTY als Bestandteil des Antigens LMP2 das einzige aus dem latenten Zyklus, die restlichen Peptide sind Epitope aus den Antigenen der verschiedenen lytischen Phasen. Unter diesen sechs Peptiden befinden sich drei Endkamere (CSIACPIVMRY, GTDAWRFAMNY und GGDSTTPRPRY), ein Dekamer (ESEERPPTY) und zwei Nonamere (IACPIVMRY und VSVPIILRFY). Davon haben das Nonamer IACPIVMRY und das Dekamer ESEERPPTY die höchste Reaktionsrate mit 5/16. Somit handelt es sich bei den A*01-Peptiden um Epitope mit einer niedrigen Erkennungsfrequenz. Bei diesen sechs Epitopen findet sich Tyrosin (Y) als aromatische, hydrophobe Aminosäure am C-Terminus. An der Ankerposition 3 weisen vier davon saure (Glutamat, E; Aspartat, D) bzw. schwach saure (Cystein, C) Aminosäuren auf. Die anderen zwei Peptide CSIACPIVMRY und VSVPIILRFY haben zwar an der Ankerposition 3 eine neutrale Aminosäure (Isoleucin, I; Valin, V), aber Serin als Hilfsanker an Position 2. Die Endkamere GTDAWRFAMNY (*score* 31, RR 3/16) und GGDSTTPRPRY (*score* 27, RR 2/16) haben einen hohen SYFPEITHI-*score*, ihre Reaktionsrate fällt aber geringer aus als die des Nonamers IACPIVMRY (*score* 18, RR 5/16) und des Endkamers CSIACPIVMRY (*score* 20, RR 4/16) mit einem jeweils geringeren *score*.

Die zwei Peptide ALEASGNNYVY (RR 2/8) und TLPYNPTVY (RR 1/8) wurden im Rahmen dieser Arbeit bisher nur auf acht Spendern getestet. Damit ist noch keine ausreichende Aussage über die Höhe ihrer Erkennungsfrequenz möglich.

Tabelle 10: HLA-A*01-Screening: Auflistung der Peptide mit mindestens einer positiven Spenderreaktion. Peptide mit einer höheren Reaktionsrate sind fett markiert und die jeweiligen Ankeraminosäuren unterstrichen. RR: Reaktionsrate.

Sequenz	Antigen	Position	score	Peptid- nummer	RR	RR in %	Reaktive Spender
IAC<u>P</u>IVM<u>R</u>Y	BRLF1	101-109	18	70313	5/16	31,25	1470, 1544, 1625, 1658, 1695
ESE<u>E</u>RPPT<u>P</u>Y	LMP2	484-493	27	110293	5/16	31,25	593, 603, 619, 1572, 1585
CSIA<u>C</u>P<u>I</u>VM<u>R</u>Y	BRLF1	99-119	20	100034	4/16	25,00	1470, 1544, 1625, 1658
GTDA<u>D</u>WR<u>F</u>AM<u>N</u>Y	BNRF1	1237-1247	31	110160	3/16	18,75	1470, 1540, 1623
VS<u>V</u>P<u>I</u>LR<u>F</u>Y	BMRF1	260-268	21	70299	3/16	18,75	1668, 1675, 1685
GGD<u>S</u>TT<u>P</u>RP<u>R</u>Y	BLLF1	804-814	27	110185	2/16	12,50	1470, 1540
SHETPASLNY	BALF2	292-301	27	110156	1/16	6,25	1540
DVVPGNLVTY	BALF2	819-828	18	111038	1/16	6,25	1484
ETDFLGNFL	BALF2	499-507	17	110049	1/16	6,25	603
HDEVEFLGHY	BMLF1	416-425	26	110317	1/16	6,25	1732
ETIFWLQEITY	BMLF1	310-320	21	80096	1/16	6,25	1668
RPEFVKLTMEY	BMRF1	122-132	25	110319	1/16	6,25	1732
FLRLLGATY	BNRF1	135-143	17	110175	1/16	6,25	603
YPAPCISGY	BNRF1	434-442	17	101073	1/16	6,25	1675
CTPGDRQWLY	EBNA3	222-231	22	80093	1/16	6,25	1685
LLALLFWLY	LMP1	33-41	21	71166	1/16	6,25	1668
ALEASGNNYVY	BNRF1	105-115	25	110318	2/8	25,00	1675, 1732
TLPYNPTVY	EBNA4	387-395	17	110144	1/8	12,50	1675

3.2.3. Ergebnisse des ersten Epitopscreenings für HLA-A*26

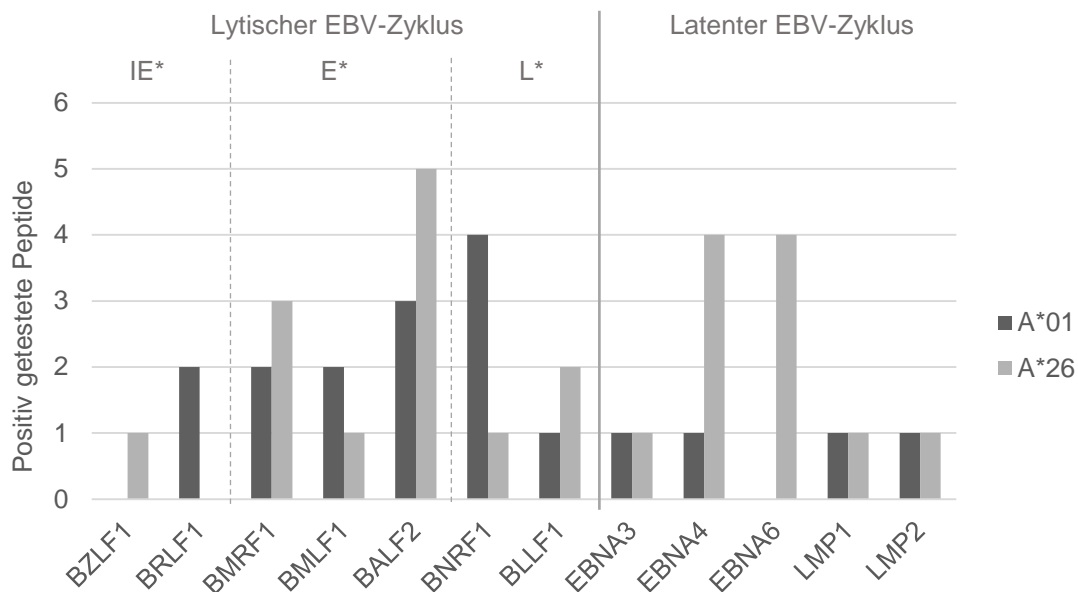
Aus den 120 getesteten Peptiden für HLA-A*26 ergaben sich 24 Peptide mit mindestens einer positiven Spenderreaktion (Tabelle 11).

Beim HLA-A*26-Screening gingen aus elf der zwölf untersuchten Antigene immunogene Peptide mit mindestens einer positiven Spenderreaktion hervor. Von den insgesamt 24 Peptiden stammen 13 aus Antigenen des lytischen EBV-Zyklus und davon neun Peptide aus der frühen Phase. Die restlichen elf Peptide sind Teil der Antigene des latenten Zyklus (Abbildung 9). Neun Peptide erzielten eine Reaktionsrate von $> 1/16$ und werden im Folgenden näher betrachtet. EVVQFMNSM als Peptid mit der höchsten Erkennungsfrequenz bewirkt mit einer RR von 10/16 bei über 50 % der Spender eine positive Reaktion; die übrigen acht Peptide werden mit einer RR von höchstens 5/16 ($< 50\%$) im niedrigfrequenten Bereich erkannt. Mit vier Nonameren und fünf Dekameren sind beide untersuchten Peptidlängen nahezu gleich vertreten. Sechs dieser neun Peptide weisen die für das HLA-A*26-Bindungsmotiv bevorzugte hydrophobe Aminosäure Valin (V) in Ankerposition 2 auf. Bei den restlichen drei Peptiden EEDKSGMESL, EENLLDFVRF und DEGTRHATTY findet sich hier Glutamat (E) als saure Aminosäure, während an der Hilfsankerposition 1 ebenfalls dem Motiv entsprechend eine saure Aminosäure zu finden ist (Glutamat, E; Aspartat, D). Am C-Terminus weisen alle neun Peptide eine hydrophobe aromatische (Tyrosin, Y; Phenylalanin, F) bzw. aliphatische (Methionin, M; Leucin L) Aminosäure auf.

Tabelle 11: HLA-A*26-Screening: Auflistung der Peptide mit mindestens einer positiven Spenderreaktion. Peptide mit einer höheren Reaktionsrate sind fett markiert und die jeweiligen Ankeraminosäuren unterstrichen. RR: Reaktionsrate.

Sequenz	Antigen	Position	score	Peptid- nummer	RR	RR in %	Reaktive Spender
<u>EV</u>VQFMNS<u>M</u>	BALF2	573-821	25	110179	10/16	62,50	1497, 1677, 1686, 1687, 1694, 576, 642, 1673, 1702, 1710
<u>EV</u>ATLG<u>TGY</u>	BALF2	35-43	32	110058	5/16	31,25	1059, 1140, 1674, 1682, 1701
<u>PV</u>RMSKVL<u>ML</u>	BALF2	706-715	24	110253	4/16	25,00	1677, 1702, 1059, 1687
<u>EE</u>DKSGMES<u>L</u>	EBNA4	372-381	19	90173	4/16	25,00	1677, 1694, 1714, 1687
<u>EE</u>NLLDFVR<u>E</u>	EBNA6	281-290	18	71138	4/16	25,00	1677, 1694, 1714, 1724
<u>DV</u>VPGNLV<u>TY</u>	BALF2	819-828	38	111038	4/20	20,00	1059, 1140, 1638, 642
<u>QV</u>NLLSVN<u>Y</u>	BMRF1	34-42	21	70300	2/16	12,50	1682, 1701
<u>LV</u>SSGNTL<u>Y</u>	EBNA4	259-267	21	110163	2/16	12,50	1659, 1687
<u>DE</u>GTRHAT<u>TY</u>	EBNA4	209-218	19	90172	2/16	12,50	1677, 1687
EAALLVCQY	BLLF1	2-10	26	110130	1/16	6,25	1701
YTIQSLIHL	BLLF1	10-18	25	110235	1/16	6,25	1673
ATVALINRF	BALF2	1102-1110	25	110231	1/16	6,25	1673
TVITLGEQGY	BNRF1	704-713	25	111160	1/16	6,25	1673
EITYHGDLPL	BMLF1	317-326	24	70129	1/16	6,25	1497
AVSVPILRFY	BMRF1	259-268	24	71142	1/16	6,25	1673
AVSFRNLAY	BMRF1	83-91	22	71023	1/16	6,25	1701
DSELEIKRY	BZLF1	172-180	22	100035	1/16	6,25	1701
SVRDRLARL	EBNA3	596-604	24	8226	1/16	6,25	1707

DVHTRQPRF	EBNA4	89-97	26	110128	1/16	6,25	1686
DTEDNVPPWL	EBNA6	89-98	25	110236	1/16	6,25	642
EVIDVETTED	EBNA6	512-521	25	110238	1/16	6,25	1673
DPDAPLDLSL	EBNA6	724-733	18	90171	1/16	6,25	1677
ATIWQLLAFF	LMP1	135-144	24	70467	1/16	6,25	1637
LIVDAVLQL	LMP2	257-265	23	60113	1/16	6,25	1673



*IE: intermediate early; E: early; L: late

Abbildung 9: Antigenquelle und jeweilige Anzahl der positiv getesteten Peptide mit einer Reaktionsrate von mindestens 1 von 16 getesteten Spendern für HLA-A*01 und HLA-A*26. Die überwiegende Anzahl der immunogenen Peptide für A*26 entstammt den Antigenen des frühen lytischen und des latenten EBV-Zyklus, für A*01 hauptsächlich dem lytischen EBV-Zyklus. EBV: Epstein-Barr Virus.

Aufgrund der geringen Anzahl an hochfrequenten Epitopen für beide HLA wurden für weitere Analysen mittels ICS und FACS auch niedrigfrequente Peptide mit einer Reaktionsrate von mindestens 2/16 herangezogen und im Folgenden als Epitopkandidaten bezeichnet.

3.3. Durchflusszytometrische Verifizierung und Charakterisierung der zytotoxischen T-Zellreaktion auf Epitopkandidaten

Zur genaueren Analyse der Spenderreaktion wurden die Epitopkandidaten mit einer Reaktionsrate von mindestens 2/16 herangezogen. Die im ELISpot auf diese Epitope reagierenden Spenderzellen wurden erneut über zwölf Tage prästimuliert, dieses Mal jedoch nur mit dem jeweiligen Peptid und der Negativkontrolle. Die Immunantwort der Spenderzellen wurde anschließend mit Hilfe der Durchflusszytometrie näher charakterisiert. Festgestellt wurde die Identität der Leukozyten durch Markierung von Oberflächenstrukturen (CD3,

CD4, CD8) und die Zytokinproduktion durch intrazelluläre Zytokinfärbung (IFN γ , TNF α).

Tabelle 12 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der intrazellulären Zytokinfärbung für die HLA-A*01- sowie HLA-A*26-Peptide.

Tabelle 12: Ergebnisse der intrazellulären Zytokinfärbung für HLA-A*01- und HLA-A*26-Peptide mit mindestens zwei positiven Reaktionen unter 16 getesteten Spendern im ELISpot (Reaktionsrate RR \geq 2/16). Die Zellen eines der positiv reagierenden Spender wurden herangezogen und die Aktivierung CD8⁺ T-Zellen sowie deren IFN γ - und TNF α -Produktion gemessen. Die aktivierten CD8⁺ T-Zellen sind dabei in % der insgesamt gemessenen CD8⁺ T-Zellen angegeben. Angaben nach Abzug des Hintergrunds. neg.: negativ (keine Zytokinausschüttung); RR: Reaktionsrate; ICS: Intrazelluläre Zytokinfärbung.

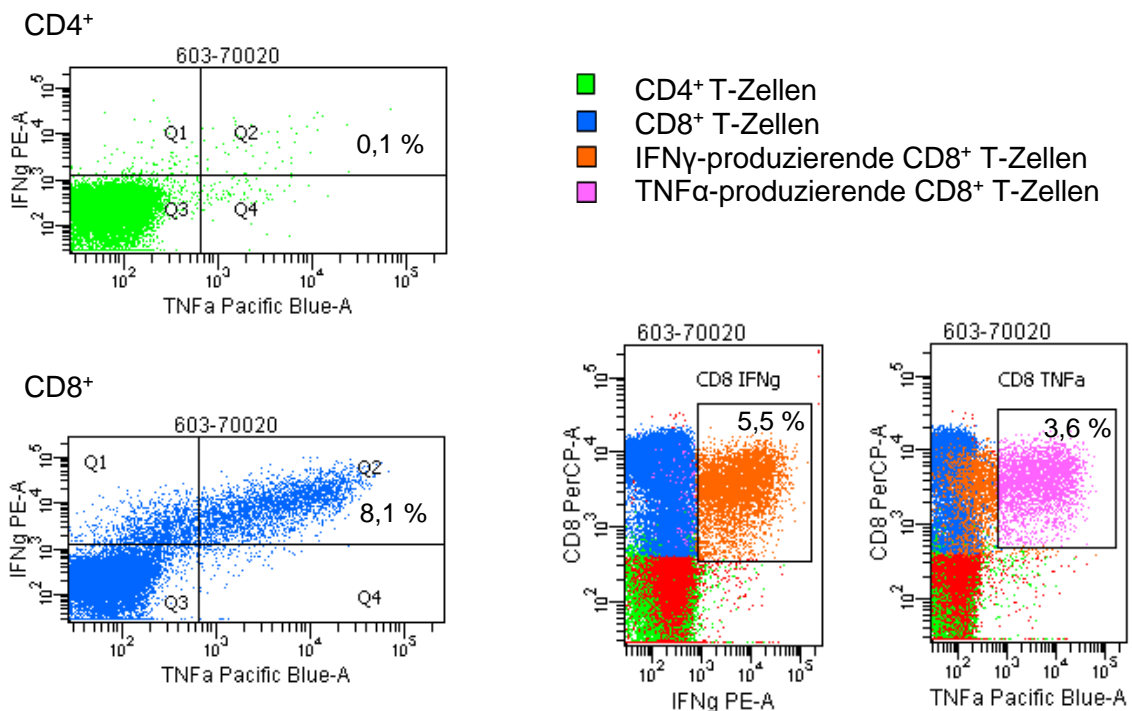
	Sequenz	Antigen	Position	Syfpeithi-score	Peptid-nummer	RR	RR in %	ICS			Spender
								CD8 ⁺ (%)	IFN γ (%)	TNF α (%)	
HLA-A*01	IACPIVMRY	BRLF1	101-109	18	70313	5/16	31,25	7,8	1,7	1,2	1658
	ESEERPPTY	LMP2	484-493	27	70020	5/16	31,25	11,2	4,9	3,5	603
	CSIACPIVMRY	BRLF1	99-110	20	100034	4/16	25,00	27,5	24,0	6,5	1544
	GTDARWFAMNY	BNRF1	1237-1247	31	110160	3/16	18,75	19,2	3,6	2,8	1540
	VSPILRFY	BMRF1	260-268	21	70299	3/16	18,75	0,0	neg.	neg.	1668
	GGDSTTPRPRY	BLLF1	804-814	27	110185	2/16	12,50	0,0	neg.	neg.	1470
HLA-A*26	EVVQFMNSM	BALF2	573-821	25	110179	10/16	62,50	5,6	2,9	0,4	1702
	EVATLGTGY	BALF2	35-43	32	110058	5/16	31,25	3,3	0,8	0,6	1059
	PVRMSKVLML	BALF2	706-715	24	110253	4/16	25,00	6,4	2,1	0,7	1702
	DVVPGNLVTY	BALF2	819-828	38	111038	5/20	25,00	1,0	0,1	0,1	1059
	EEDKSGMESL	EBNA4	372-381	19	90173	4/16	25,00	0,0	neg.	neg.	1687
	EENLLDFVRF	EBNA6	281-290	18	71138	4/16	25,00	0,0	neg.	neg.	1677
	QVNLLSVNY	BMRF1	34-42	21	70300	2/16	12,50	0,0	neg.	neg.	1682
	LVSSGNTLY	EBNA4	259-267	21	110163	2/16	12,50	0,0	neg.	neg.	1659
DEGTRHATTY	EBNA4	209-218	19	90172	2/16	12,50	0,0	neg.	neg.	1677	

3.3.1. HLA-A*01: T-Zellidentität und Funktionalität

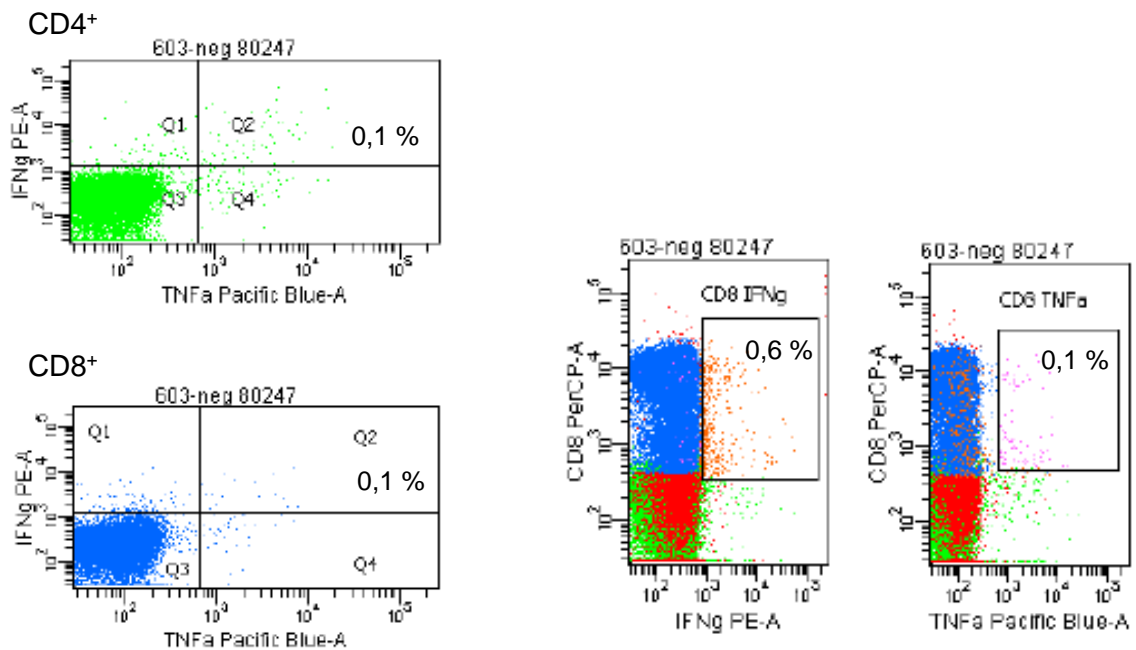
Beim ersten HLA-A*01-Epitopscreening ergaben sechs Peptide im ELISpot eine Reaktionsrate von mindestens 2/16. Trotz der insgesamt niedrigen Erkennungsfrequenz (RR < 50 %) dieser Peptide erwiesen sich vier davon als dominant und führten zu einer deutlichen Produktion der Zytokine IFN γ und TNF α durch CD8 $^+$ T-Zellen (Tabelle 12). Dabei überwog in allen Fällen die IFN γ -Produktion, bei dem Peptid CSIACPVMRY beispielsweise um mehr als das 3,5-fache. Die beiden Peptide CSIACPVMRY (RR 4/16) und GTDAWRFAMNY (RR 3/16) führten trotz der niedrigeren Erkennungsfrequenz als die Peptide IACPVMRY (RR 5/16) und ESEERPPTY (RR 5/16) zu einer Aktivierung von größeren CD8 $^+$ T-Zellpopulationen und im Falle des Peptids CSIACPVMRY auch zu einer höheren Zytokinausschüttung. Bei allen intrazellulären Zytokinfärbungen für HLA-A*01-Peptide wurden keine CD4 $^+$ T-Zellen aktiviert. In Abbildung 10 ist beispielhaft die Reaktion der Lymphozyten des Spenders 603 auf das Peptid ESEERPPTY (RR 5/16) dargestellt. Es ist zu erkennen, dass CD8 $^+$ T-Zellen aktiviert wurden, die sowohl IFN γ als auch TNF α produzierten.

Zwei der dominanten Peptide entstammen dem EBV-Antigen BRLF1 aus der sehr frühen Phase, eins dem Antigen BNRF1 aus der späten Phase des lytischen Zyklus und noch eins dem Antigen LMP2 aus dem latenten Zyklus (Tabelle 12).

Wird die Spotanzahl der ELISpots herangezogen, in denen das jeweilige Peptid zu positiven Reaktionen geführt hatte, und mit den Ergebnissen der intrazellulären Zytokinfärbung verglichen, so zeigt sich eine positive Korrelation zwischen der Höhe der Spotanzahl und der Aktivierung CD8 $^+$ T-Zellen; entsprechend dieser Korrelation führten die Peptide VSVPIILRFY (RR 3/16) und GGDSTTPRPRY (2/16) bei niedriger Spotanzahl in den ELISpots in der intrazellulären Zytokinfärbung zu keiner Aktivierung CD8 $^+$ T-Zellen und zu keiner Zytokin-ausschüttung (nicht abgebildet).



a) Peptid **ESEERPPTY** (Peptidnummer 70020)



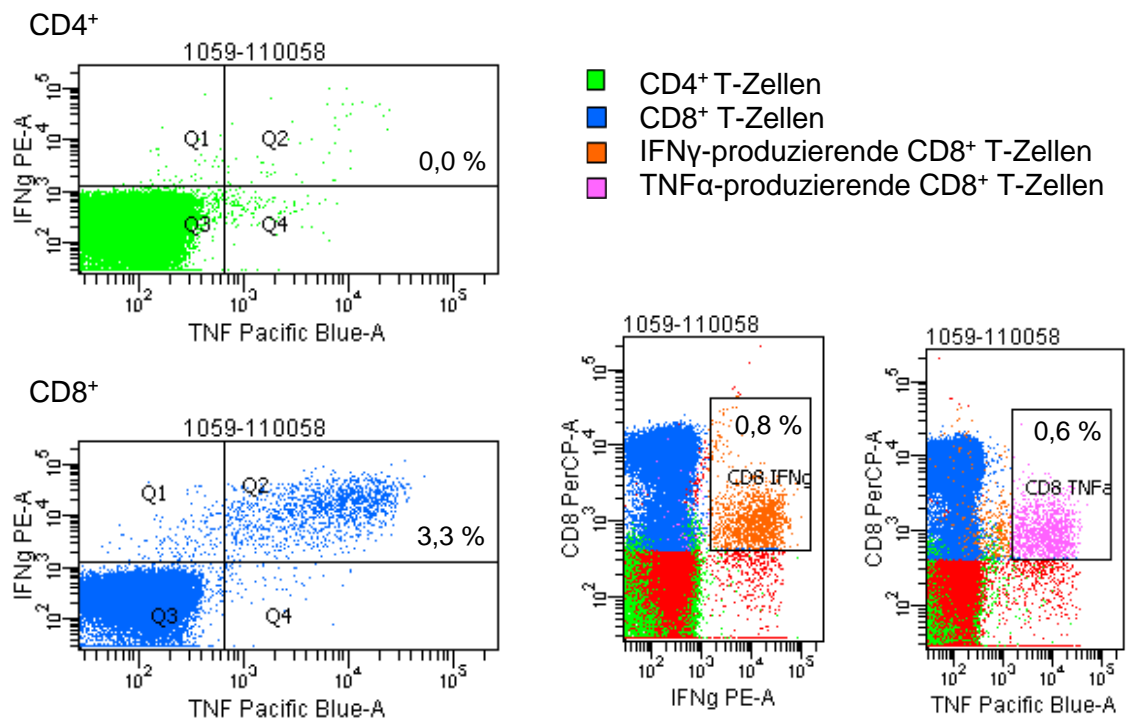
b) **Negativkontrolle, HIV** (Peptidnummer 80247)

Abbildung 10: a) IFN γ - und TNF α -Produktion infolge Aktivierung CD8⁺ T-Zellen des Spenders 603 durch das Peptid ESEERPPTY (Peptidnummer: 70020). b) Im Vergleich dazu keine Aktivierung der Lymphozyten des Spenders 603 sowie keine deutliche Zytokinproduktion in der Negativkontrolle mit dem HIV-Peptid (Peptidnummer 80247).

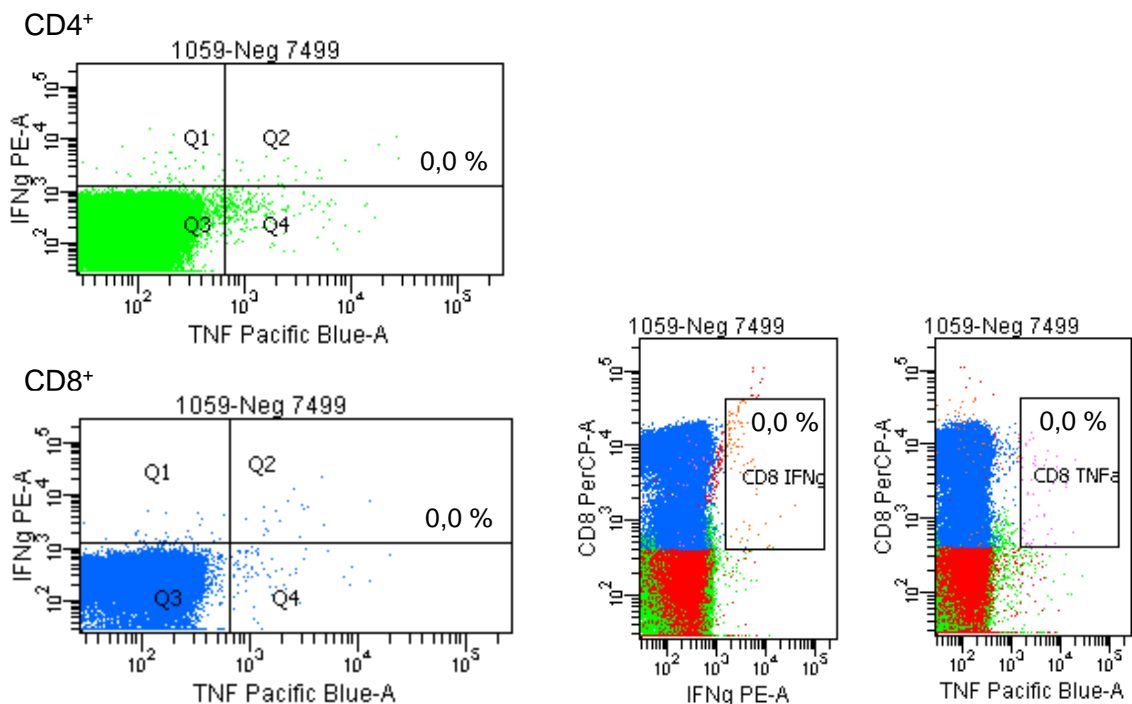
3.3.2. HLA-A*26: T-Zellidentität und Funktionalität

Aus den neun Peptiden mit einer Reaktionsrate von mindestens 2/16 im ELISpot gingen bei der intrazellulären Zytokinfärbung drei dominante Epitope (EVVQFMNSM, EVATLGTTY, PVRMSKVLML) mit einer Aktivierung größerer T-Zellpools und ein subdominantes Epitop (DVVPGNLVTY) mit einer geringen Anzahl aktivierter CTL hervor. Die Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen der jeweiligen Spender ging sowohl mit einer IFN γ - als auch TNF α -Produktion einher. Dabei wurde IFN γ beim hochfrequenten Epitop EVVQFMNSM (RR 10/16) und den beiden Peptiden EVATLGTTY (RR 5/16) und PVRMSKVLML (RR 4/16) in höherem Maße gebildet als TNF α , beim Peptid DVVPGNLVTY (RR 5/20) in gleicher, wenn auch geringer Menge.

Diese vier Peptide stammen aus dem Antigen des frühen lytischen EBV-Zyklus BALF2 (Tabelle 12). CD4⁺ T-Zellen wurden in keinem der Fälle aktiviert. Abbildung 11 zeigt die Reaktion des Spenders 1059 auf das Peptid EVATLGTTY (RR 5/16).



a) Peptid **EVATLGTGY** (Peptidnummer 110058)



b) **Negativkontrolle, Actin B** (Peptidnummer 7499)

Abbildung 11: a) IFNγ- und TNFα-Produktion infolge Aktivierung CD8⁺ T-Zellen des Spenders 1059 durch das Peptid EVATLGTGY (Peptidnummer 110058). b) Im Vergleich dazu keine Aktivierung der Lymphozyten des Spenders 1059 sowie keine Zytokinproduktion in der Negativkontrolle mit dem Actin B-Peptid (Peptidnummer 7499).

Eine Korrelation zwischen der Spotanzahl in den ELISpots und der Aktivierung CD8⁺ T-Zellen sowie der Zytokinausschüttung kann auch hier vermutet werden. Ein Beispiel hierfür ist das Peptid QVNLLSVNY (Peptidnummer 70300), das die ELISpot-Kriterien für ein positives Ergebnis erfüllte, dabei aber eine niedrige Spotanzahl aufwies und durchflusszytometrisch zu keiner detektierbaren Aktivierung CD8⁺ T-Zellen und keiner nachweisbaren IFN γ - oder TNF α -Produktion führte (Abbildung 12).

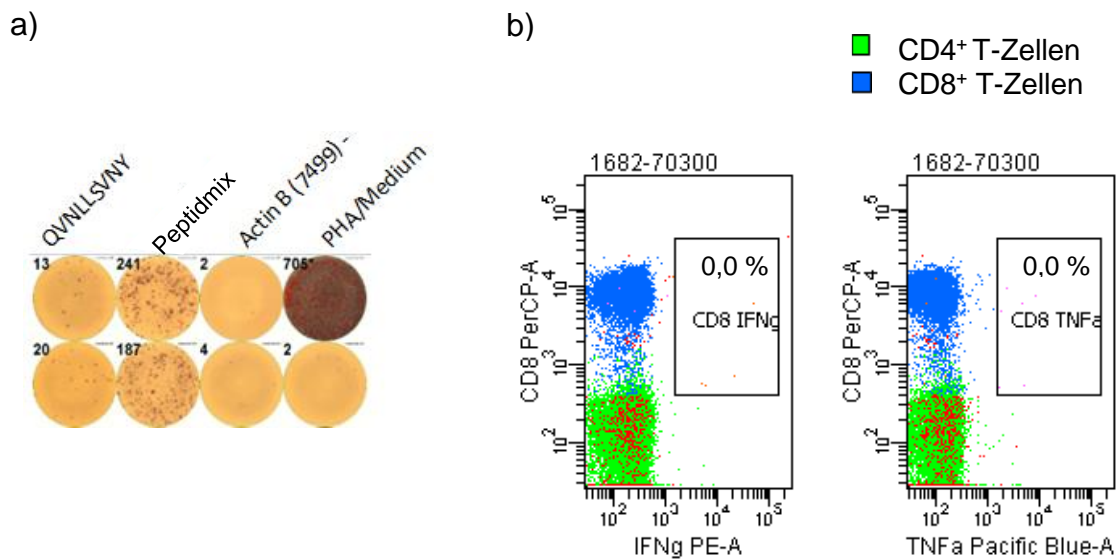
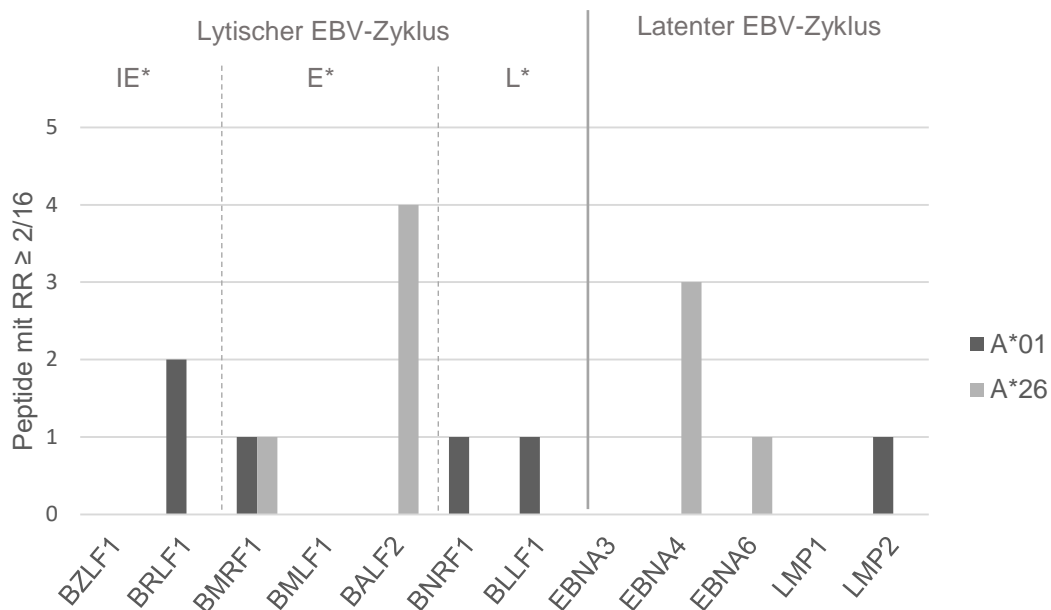


Abbildung 12: Korrelation zwischen a) der Spotanzahl im IFN γ -ELISpot und b) der Zytokinausschüttung durch aktivierte CD8⁺ T-Zellen im ICS am Beispiel des A*26-Peptids QVNLLSVNY (Peptidnummer 70300). Die geringe Spotanzahl im ELISpot weist auf eine geringe Anzahl aktivierter IFN γ -produzierender Lymphozyten hin. Diese Tendenz wird auch im ICS deutlich, bei der weder IFN γ noch TNF α detektiert werden können. ICS: Intrazelluläre Zytokinfärbung. PHA: Phytohämagglutinin.

3.3.3. Ergebnisse der intrazellulären Zytokinfärbung für HLA-A*01- sowie HLA-A*26-Peptide im Vergleich

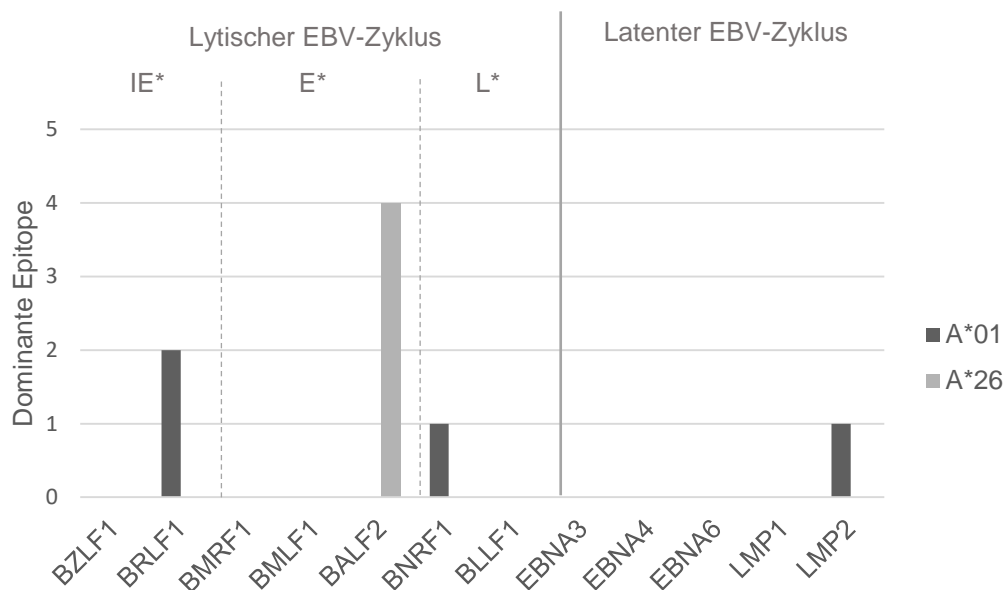
Die mittels intrazellulärer Zytokinfärbung getesteten Peptide stammen bei beiden HLA-Typen aus Antigenen des lytischen und latenten EBV-Zyklus. Es kann aber eine Tendenz bei der HLA-A*01-Restriktion zu Antigenen des lytischen Zyklus und bei der HLA-A*26-Restriktion zum Antigen BALF2 der frühen lytischen Phase sowie zum latenten Zyklus festgestellt werden (Abbildung 13).



*IE: intermediate early; E: early; L: late; RR: Reaktionsrate.

Abbildung 13: Ursprungsantigenen der jeweiligen HLA-A*01- und HLA-A*26-Peptide mit einer Reaktionsrate von mindestens zwei positiven Reaktionen unter 16 getesteten Spendern ($RR \geq 2/16$) im ELISpot. EBV: Epstein-Barr Virus.

Immundominante Epitope mit einer Aktivierung zytotoxischer T-Zellen und der Ausschüttung von $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ gingen für HLA-A*01 aus Antigenen der sehr frühen (BRLF1) und späten (BNRF1) Phase des lytischen EBV-Zyklus sowie aus dem latenten Zyklus (LMP2) hervor. Für HLA-A*26 stammen alle vier dominanten Epitope aus dem Antigen der frühen lytischen Phase BALF2 (Abbildung 14).



*IE: intermediate early; E: early; L: late.

Abbildung 14: Anzahl der immundominanten Epitope für HLA-A*01 und HLA-A*26 nach ihrem Ursprung aus dem jeweiligen EBV-Antigen. Die Epitope führten jeweils zu einer Aktivierung zytokinproduzierender CD8⁺ T-Zellen. EBV: Epstein-Barr Virus.

Trotz teilweise höherer Erkennungsfrequenzen der dominanten HLA-A*26-Peptide fiel die Anzahl aktivierter CD8⁺ T-Zellen sowie die Menge der gebildeten Zytokine niedriger aus als bei den dominanten HLA-A*01-Peptiden (Tabelle 12).

3.4. Spezifität der CD8⁺ T-Zellreaktion gegen zwei HLA-A*01-Epitope

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können die reaktiven zytotoxischen T-Zellen ebenso auf ihre Spezifität hin untersucht werden. Dafür wurde das jeweilige Peptid mit der α - und β -Kette des HLA-A*01-Moleküls zurückgefaltet und anschließend über farbstoffgekoppeltes Streptavidin tetramersiert. Anschließend wurden die Tetramere auf prästimulierten PBMCs HLA-identischer Spender getestet, die bereits zuvor eine positive Reaktion zytotoxischer T-Zellen auf dieses Peptid gezeigt hatten.

Bei den hier verwendeten Peptiden handelt es sich um CSIACPIVMRY (100034, RR 4/16) und GTDAWRFAMNY (110160, RR 3/16), die zwar beide im

niedrigfrequenten Bereich von Spendern erkannt werden (< 50 %), jedoch zu einer Aktivierung größerer CD8⁺ T-Zellpopulationen und vergleichsweise höheren Zytokinausschüttung geführt hatten (siehe Tabelle 12). Die Herstellung der Tetramere für beide Peptide und die anschließende Färbung erfolgten in einem gemeinsamen Versuchsablauf. CSIACPIVMRY wurde mit den PBMCs der Spender 1544, 1658 und 1625, GTDAWRFAMNY mit den PBMCs der Spender 1623 und 1540 getestet. Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung wurden CD8⁺ Populationen verzeichnet, jedoch konnten in keinem der Fälle HLA-Tetramere nachgewiesen werden. Auch in der Positivkontrolle mit einem HLA-spezifischen CMV-Tetramer konnten keine Tetramere festgestellt werden, wie es beispielhaft in Abbildung 15 zu sehen ist. Somit ist der Nachweis spezifischer zytotoxischer T-Zellen fehlgeschlagen, da eine Wiederholung des Versuchs im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr stattgefunden hat. Dem erfolglosen Versuch können Fehler beim Tetramerfärbungsprozess zugrunde liegen.

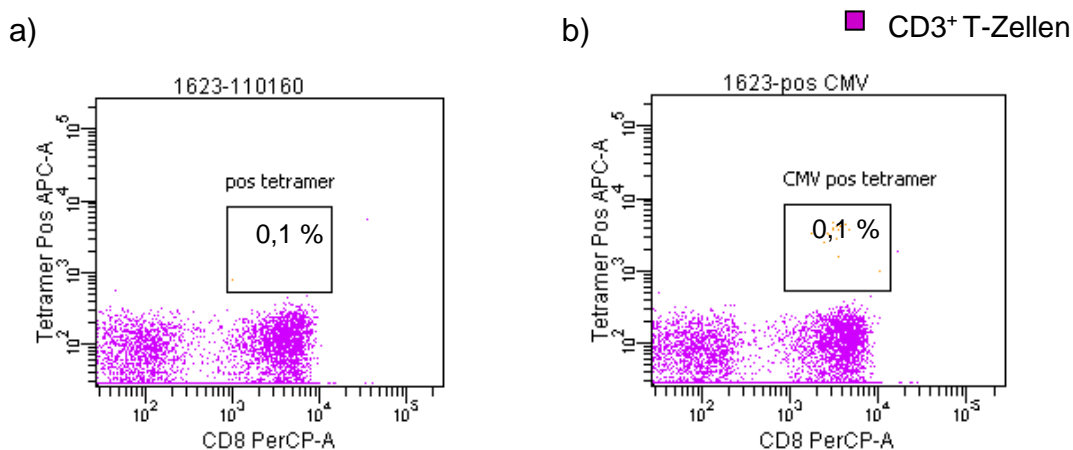


Abbildung 15: a) Spezifität der CD8⁺ T-Zellen des Spenders 1623 in Reaktion auf das Peptid GTDAWRFAMNY (Peptidnummer 110160) getestet mit Hilfe der Tetramerfärbung. Es sind keine HLA-Tetramere nachweisbar. b) Auch die Positivkontrolle weist keine Tetramere auf. Somit ist der Versuch fehlgeschlagen und das Fehlen der Tetramere in a) kein Hinweis auf fehlende Spezifität der CD8⁺ T-Zellen des Spenders.

3.5. Zweites Epitopscreening – Kreuzreaktionen im HLA-A*01-Supertyp

HLA-A*01 und HLA-A*26 werden beide dem „HLA-A*01-Supertypen“ zugerechnet (Sette and Sidney, 1999). Um mögliche Kreuzreaktionen dominanter Epitope auf verwandten Allotypen aufzeigen zu können, wurden

diese in einem zweiten Screening mittels IFN γ -ELISpot auf Spendern des jeweils anderen hier untersuchten HLA-Typen auf Immunogenität hin getestet.

3.5.1. Vergleich der Aminosäuresequenzen natürlicher Liganden der HLA-Moleküle A*01 und A*26

Wichtig für die Bindung eines Antigens an das HLA-Molekül ist das Auftreten bestimmter Aminosäuren an entscheidenden Positionen im Peptid. Die Präferenz dieser bestimmten Aminosäuren an den Anker- und Hilfsankerpositionen sowie dem C-Terminus zeichnet den jeweiligen Supertypen aus. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz natürlicher Liganden von HLA-A*01 und HLA-A*26 (Tabelle 13), der Datenbank SYFPEITHI entnommen (Stand Mai 2018), zeigt, dass Threonin (T) in Position 2 bei beiden HLA-Restriktionen bevorzugt wird. Ebenso weisen die Liganden beider HLAs eine hohe Prävalenz von Tyrosin (Y) am C-Terminus sowie die Präferenz von Leucin (L) in der Hilfsankerposition 6 bzw. 7 auf. Neben diesen Gemeinsamkeiten können auch Unterschiede festgestellt werden: HLA-A*01-Liganden bevorzugen Tyrosin (Y) in Position 1 und Serin (S) in der Hilfsankerposition 2. Außerdem finden sich vor allem Aspartat (D) und in geringerem Maße Glutamat (E) in der Ankerposition 3; diese beiden Aminosäuren tauchen bei den HLA-A*26-Liganden an Position 1 mit hoher und an Position 4 (vergleichbar mit der Ankerposition 3 des A*01) mit etwas geringerer Frequenz auf. Das könnte wiederum eine Kreuzreaktivität begünstigen. Weitere Merkmale der HLA-A*26-Liganden sind das gehäufte Auftreten von Valin (V) in Ankerposition 2, von Isoleucin (I) in Position 3 und Hilfsankerposition 6 sowie die zusätzliche Präferenz von Phenylalanin (F) in Position 9 bzw. am C-Terminus. Tabelle 13 zeigt grafisch die Verteilung der bevorzugten Aminosäuren an den jeweiligen Positionen der HLA-A*01- und HLA-A*26-Liganden.

Tabelle 13: Häufigkeit und Verteilung der Aminosäuren in natürlichen Liganden der HLAs a) A*01 und b) A*26, entnommen aus SYFPEITHI (Stand Mai 2018). Hilfsanker sind hell markiert, Anker dunkel. Die Anzahl der bevorzugten Aminosäuren an den Anker- bzw. Hilfsankerpositionen sind in roter Schrift hervorgehoben, Aminosäuren mit gehäufterem Auftreten außerhalb dieser Positionen sind fett markiert. *: insgesamt ausgewertete Liganden.

a) HLA-A*01

Aminosäure		Peptidposition												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Glycin	G	1	0	0	6	12	5	0	4	2	0	0	0	0
Alanin	A	6	6	2	3	3	2	4	2	0	0	0	0	0
Valin	V	7	4	1	7	5	11	1	5	1	0	1	0	0
Leucin	L	8	9	0	5	7	6	26	13	2	5	0	0	0
Isoleucin	I	4	6	0	4	5	3	4	2	1	0	1	0	0
Methionin	M	1	0	0	2	0	1	3	4	1	0	0	1	0
Prolin	P	1	0	1	8	5	5	1	0	0	0	0	0	0
Phenylalanin	F	3	0	0	2	2	10	3	2	4	0	0	0	0
Tryptophan	W	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Serin	S	7	14	1	5	9	6	3	3	5	0	1	0	0
Threonin	T	7	37	0	1	3	5	3	4	0	0	0	0	0
Cystein	C	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Tyrosin	Y	16	0	0	2	3	0	2	8	47	15	8	2	1
Asparagin	N	1	0	0	0	2	0	0	2	1	1	0	0	0
Glutamin	Q	4	0	3	6	5	2	3	2	0	2	0	0	0
Lysin	K	0	0	0	4	2	3	1	8	3	0	0	0	0
Arginin	R	1	0	1	8	3	8	7	9	1	0	0	0	0
Histidin	H	4	0	0	2	3	4	2	1	1	0	0	0	0
Aspartat	D	3	0	51	6	3	4	6	2	2	2	0	0	0
Glutamat	E	3	1	17	5	5	1	8	5	2	1	0	0	0
Liganden insges.*		77	77	77	77	77	77	77	77	73	26	11	3	1

b) HLA-A*26

Aminosäure		Peptidposition												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Glycin	G	1	1	1	7	7	6	6	6	4	3	0	0	
Alanin	A	1	5	10	7	6	5	6	5	2	1	0	0	
Valin	V	1	46	19	2	6	16	4	4	1	0	0	0	
Leucin	L	1	5	5	1	12	10	14	6	16	2	0	0	
Isoleucin	I	1	7	26	2	7	21	13	8	2	0	1	0	
Methionin	M	1	0	0	0	1	2	3	2	2	1	0	0	
Prolin	P	0	1	2	14	5	3	4	0	0	0	0	0	
Phenylalanin	F	1	1	12	1	5	2	3	0	17	6	3	0	
Tryptophan	W	0	0	0	1	1	2	1	1	0	0	0	0	
Serin	S	8	3	0	5	4	1	10	5	5	0	0	0	
Threonin	T	5	19	4	1	5	5	5	8	1	1	0	0	
Cystein	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Tyrosin	Y	2	0	3	1	2	2	2	2	29	8	7	1	
Asparagin	N	0	0	1	3	5	3	4	4	1	0	0	0	
Glutamin	Q	2	1	1	4	2	0	1	10	2	0	0	0	
Lysin	K	1	0	2	3	9	2	3	11	2	0	1	0	
Arginin	R	1	1	0	3	5	2	4	5	2	5	0	0	
Histidin	H	0	0	0	0	3	1	1	7	0	1	0	0	
Aspartat	D	20	0	4	17	0	3	2	1	0	1	0	0	
Glutamat	E	44	0	0	18	5	4	4	5	3	0	0	0	
Liganden insges.*		90	90	90	90	90	90	90	90	89	29	12	1	

3.5.2. Kreuzreaktivität im HLA-A*01-Supertyp

Vier HLA-A*01- sowie drei HLA-A*26-Peptide, die nachweislich zur Aktivierung zytokinproduzierender CD8⁺ T-Zellen geführt hatten, wurden daraufhin untersucht, ob sie bei einem Spender mit dem jeweils anderen Allotypen aus dem HLA-A*01-Supertypen ebenfalls zu einer Immunreaktion führen (Tabelle 14).

Alle dominanten HLA-A*01-Peptide wurden auf ihrer HLA-Restriktion mit niedriger Frequenz erkannt. Die Rate positiver Spenderreaktionen bewegte sich zwischen 3/16 und 5/16. Unter den dominanten HLA-A*26-Peptiden befindet sich ein hochfrequentes Epitop (EVVQFMNSM), das bei mehr als der Hälfte der Spender mit der anerkannten Restriktion eine Immunreaktion bewirkte. Die anderen beiden Peptide wiesen eine Reaktionsrate von 5/16 und 4/20 auf.

Kreuzreaktivität zwischen den Leukozytenantigenen A*01 und A*26 zeigt sich bei den A*01-Peptiden IACPIVMRY, GTDAWRFAMNY und dem A*26 Peptid DVVPGNLVTY, wobei sie bei GTDAWRFAMNY und DVVPGNLVTY mit einer Reaktionsrate von jeweils 1/16 (6,25 %) im niedrigfrequenten Bereich liegt. IACPIVMRY führte bei der Hälfte der A*26-Spender (RR 4/8, 50 %) zu einer deutlichen IFN γ -Produktion, was prozentual eine höhere Erkennungsfrequenz ergibt als auf der eigentlichen Restriktion mit 31,25 % (5/16). Dies könnte für eine Kreuzreaktivität innerhalb des HLA-A*01-Supertyps sprechen. Das hochfrequente A*26-Peptid EVVQFMNSM (10/16) führte bei keinem A*01-Spender zu einer Immunreaktion und weist somit ebenso wie die restlichen Epitope eine starke Restriktion zum anerkannten HLA auf. Insgesamt zeigte sich keine signifikante Kreuzreaktivität.

PVRMSKVLML, ein HLA-A*26-Epitop, das zur Aktivierung zytokinproduzierender CD8⁺ T-Zellen geführt hatte, wurde in dieser Arbeit nicht mehr auf Kreuzreaktivität innerhalb des HLA-A*01-Supertypen untersucht. Dies sollte noch untersucht werden, da es als dominantes Epitop auf seiner Restriktion zu einer deutlichen Aktivierung zytotoxischer T-Zellen geführt hatte.

Tabelle 14: Erkennungsfrequenz ausgewählter HLA-A*01- und HLA-A*26-Peptide mit positiver zytotoxischer T-Zellreaktion durch Spender des jeweils anderen HLAs aus dem HLA-A*01-Supertyp. Hochfrequente Epitope sind fett markiert. HLA: humanes Leukozyten-Antigen.

Sequenz	Antigen	Peptidnummer	Reaktionsrate	
			HLA-A*01+ Spender	HLA-A*26+ Spender
<i>HLA-A*01-Peptide</i>				
IACPIVMRY	BRLF1	70313	5/16	4/8
ESEERPPTY	LMP2	70020/110293	5/16	0/16
CSIACPIVMRY	BRLF1	100034	4/16	0/8
GTDAWRFAMNY	BNRF1	110160	3/16	1/16
<i>HLA-A*26-Peptide</i>				
EVVQFMNSM	BALF2	110179	0/8	10/16
EVATLGTGY	BALF2	110058	0/8	5/16
PVRMSKVLML	BALF2	110253	n.d.*	4/16
DVVPGNLVTY	BALF2	111038	1/16	4/20

* n.d.: nicht durchgeführt

4. DISKUSSION

4.1. Immundominanz und Erkennungsfrequenz

Im Zusammenhang mit der antigenspezifischen T-Zellantwort wird der Begriff der „Immundominanz“ häufig verwendet. Da die Definition nicht eindeutig ist, existieren in der Literatur verschiedene Verwendungen für den Begriff. Als immundominante Antigene bzw. Epitope werden die beschrieben, die entweder bei der Mehrzahl untersuchter Individuen mit einem bestimmten HLA-Allel eine Immunantwort auslösen (hohe Erkennungsfrequenz) (Brander et al., 1998) oder solche, die die stärkste Immunantwort bei einem einzelnen Individuum auslösen (höchste Anzahl antigenspezifischer Effektorzellen) (Sette and Fikes, 2003). Bihl et al. schlugen 2006 vor, zwischen intraindividuelle und interindividuelle Immundominanz zu unterscheiden; erstere beschreibt spezifische Antigene mit der relativ gesehen stärksten Immunreaktion in einem Individuum, die zweite

bezieht sich auf Antigene mit hoher Erkennungsfrequenz in einer Gruppe von Individuen mit einem bestimmten HLA-Molekül (Bihl et al., 2006). Diese Unterscheidung ermöglicht eine genauere Beschreibung der jeweiligen Immunantworten, was hinsichtlich der therapeutischen Einsatzmöglichkeiten beim adoptiven Zelltransfer oder der epitopbasierten Impfung von Nutzen sein kann. Die genannte Arbeit untersuchte die Immunantwort auf 184 HIV- und 92 EBV-Epitope an über 90 Individuen im Hinblick auf Affinität der Peptid-HLA-Bindung und Avidität dieses Peptid-MHC-Komplexes zum TCR. Dabei wurde festgestellt, dass es eine Korrelation zwischen der Erkennungsfrequenz und der Intensität der Immunantwort gibt. Es wurde vermutet, dass die Peptid-HLA-Affinität für die Entwicklung der Immunantwort bedeutsam ist, während die TCR-Avidität eine größere Rolle für die intraindividuelle Immundominanz spielt (Bihl et al., 2006).

In dieser Arbeit wurde zum einen je nach Erkennungsfrequenz zwischen hoch- und niedrigfrequenten Epitopen und zum anderen je nach Intensität der CTL-Aktivierung zwischen dominanten und subdominanten Epitopen unterschieden.

4.2. Positivmix

4.2.1. HLA-A*01

Der Mix aus vier bekannten HLA-A*01-Epitopen der verbreiteten viralen Erreger CMV, ADV und Influenza A wurde erfolgreich getestet, wodurch er für den Einsatz als Positivkontrolle geeignet war. Alle untersuchten HLA-A*01⁺ Träger produzierten nach einer zwölf-tägigen Stimulation IFN γ und wiesen damit eine positive Reaktion auf (RR 8/8). Es wurden aber keine durchflusszytometrischen Analysen der T-Zellantworten durchgeführt, weshalb nicht sicher gesagt werden kann, ob es sich jeweils um die Generierung einer CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zellantwort handelte. Dass eine Aktivierung von CTLs durch die jeweiligen Epitope stattfindet, wurde jedoch in vorangegangenen Arbeiten gezeigt (Hebart et al., 2002; Günther et al., 2015; DiBrino et al., 1993).

Beim HLA-A*01- Spender 728 kam es ebenfalls zu einer Aktivierung der T-Zellen durch das CMV-Peptid. Die genauere Betrachtung seiner HLA-Merkmale zeigt, dass er Träger der HLA-Moleküle A*03, A*29, B*07 und B*44 ist. Somit weist er keinen der verwandten Allotypen auf. Dies könnte für eine freizügige Reaktion außerhalb des A*01-Supertyps sprechen.

4.2.2. HLA-A*26

Zum Zeitpunkt der Durchführung der Versuche in dieser Arbeit waren noch keine immundominanten HLA-A*26-Epitope bekannt, weshalb der Positivmix 1 aus zunächst fünf EBV-Peptiden anderer HLA-Restriktionen eingesetzt wurde, der im Verlauf durch weitere 21 EBV-Peptide (Positivmix 2) ergänzt wurde, da die Reaktionsrate bei den ersten ELISpots gering ausfiel. Die Eignung als Positivkontrolle sollte dadurch verbessert werden. Die in diesem Mix 2 enthaltenen Peptide stellen immundominante Epitope in Deutschland häufig vertretener HLA-Allotypen dar. Wie der Vergleich der beiden Varianten zeigte, erreichte Mix 2 eine deutlich höhere Rate an positiven Reaktionen und wurde deshalb als Positivkontrolle eingesetzt. Hier wurde ebenso nicht geprüft, welche Subpopulation an T-Zellen aktiviert wurde, den jeweiligen Referenzen nach kann aber angenommen werden, dass es sich um CD8⁺ T-Zellen handelte. Auch wenn die Erweiterung zum Mix 2 eine höhere Antwortfrequenz generierte, ist diese noch ausbaufähig. Die Zusammenstellung einer HLA-A*26-Positivkontrolle, die bei vielen Individuen anschlägt und eine CD8⁺ T-Zellantwort hervorruft, wird weiter angestrebt.

4.3. PeptidAuswahl

Für die Suche nach immundominanten Epitopen aus Antigenen des Epstein-Barr Virus wurden in dieser Arbeit Peptide getestet, die mit Hilfe des Programms SYFPEITHI ermittelt wurden. Es wurde von der Abteilung Immunologie der Universität Tübingen entwickelt und basiert auf der Vorhersage möglicher natürlicher HLA-Liganden anhand von Peptidmotiven, die durch die Analyse

natürlicher HLA-Liganden und T-Zellepitope hervorgegangen sind. Die Beschränkung auf die 2 % der Peptide mit dem höchsten score ermöglicht die Testung einiger weniger Peptide, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit als natürliche Liganden über das entsprechende HLA-Molekül präsentiert werden könnten. Dieses Vorgehen ist weniger aufwendig als Verfahren, bei denen ganze Proteine anhand überlappender Peptide getestet werden (Bleek and Nathenson, 1990). Eine Limitierung von SYFPEITHI und anderer Epitopvorhersageprogramme besteht darin, dass Epitope mit vom Motiv abweichender Sequenz oder Länge die Vorhersagen erschweren können (Stevanovic, 2005). Daneben gibt es integrative Modelle, die sich als erfolgreich herausgestellt haben und neben der MHC I-Bindungsaffinität die Prozessierung der Peptide in die Betrachtung möglicher Epitope einbeziehen (Larsen et al., 2005).

Grundlage für die Untersuchungen in dieser Arbeit waren zwölf von knapp 100 existierenden EBV-Antigenen. Zehn dieser Antigene gelten im Zusammenhang mit der zytotoxischen T-Zellreaktion als besonders immunogen und bringen tendenziell eher immundominante Epitope hervor (Hislop et al., 2007). Dabei handelt es sich vor allem um Antigene der sehr frühen und frühen lytischen Phase sowie der Latenzphase des EBV, da im Verlauf der lytischen Infektion die HLA-Expression herunterreguliert wird; eine Rolle hierbei spielt das sehr frühe Protein BZLF1, welches die Wirkung des während der lytischen Phase exprimierten latenten Proteins LMP1 blockiert, die Anzahl der HLA-Moleküle herauf zu regulieren (Rowe et al., 1992; Keating et al., 2002). Neben der weiteren Untersuchung dieser zwölf EBV-Antigene könnte eine Ausweitung der Analysen auf andere EBV-Antigene zu mehr Ergebnissen in Form dominanter Epitope führen.

HLA-A*01 und HLA-A*26 binden vor allem Peptide mit einer Länge von neun oder zehn Aminosäuren, weshalb in dieser Arbeit Nonamere und Dekamere getestet wurden. Bei HLA-A*01 wurden zudem Endekamere in die Untersuchungen einbezogen. Neuere Studien haben gezeigt, dass auch längere Peptide (≥ 11 Aminosäuren) über HLA I-Moleküle - unter anderem über HLA-A*01 - präsentiert und von T-Zellen erkannt werden können (Burrows et al.,

2006). Es kommt dabei zu einer Vorwölbung des gebundenen Peptids über die peptidbindende Furche, während das N- und C-terminale Ende fixiert sind. Zudem überlappen die Sequenzen mancher langer Peptide die kürzerer Peptide. Die zunehmende Peptidlänge kann aber zu einem Affinitätsverlust führen, da durch die Vorwölbung des Peptids in den mittleren Sequenzpositionen weniger Interaktion mit dem HLA-Molekül möglich ist. Andererseits konnten für HLA-A*02 zwei 15-mere festgestellt werden, die in der Peptid-HLA-Komplexbildung und ihrer Wirkung mit kürzeren Peptiden vergleichbar waren; die Anzahl längerer Peptide sinkt jedoch mit zunehmender Aminosäurezahl, was auf proteolytische Aktivitäten innerhalb der Zelle zurückzuführen sein könnte (Hassan et al., 2015).

4.4. Epitopscreening

4.4.1. HLA-A*01

Das Screening HLA-A*01⁺ Spender erbrachte 18 immunogene EBV-Epitope mit mindestens 1/16 und höchstens 5/16 positiven Spenderreaktionen. Keines dieser Epitope stellte sich als hochfrequent heraus. Das Endekamer CSIACPVMRY mit einer RR von 4/16 beinhaltet das Nonamer IACPVMRY, das sich mit einer RR von 5/16 als „immunogener“ erwies. Es ist am N-Terminus um die zwei Aminosäuren Cystein (C) und Serin (S) verlängert. Eine ähnliche Beobachtung findet sich in einer Studie von Escobar et al. aus dem Jahre 2008, die die Peptidbindung zu HLA I-Molekülen am Beispiel der HLA-B*35-Subtypen untersuchte. Sie fanden heraus, dass Peptide mit > 11 Aminosäuren, die am N-Terminus verlängert sind, aber das jeweilige Motiv enthalten, bei einem Teil der untersuchten Subtypen ebenso an das jeweilige HLA-Molekül binden (Escobar et al., 2008). Auch wenn der Unterschied gering ist, könnte die Peptidlänge ein Grund für die geringere Reaktionsrate sein und das Endekamer proteolytischen Prozessen eher ausgesetzt sein. Das würde auch die niedrigere Erkennungsfrequenz der beiden Endekamere GTDAWRFAMNY (*score* 31, RR 3/16) und GGDSTTPRPRY (*score* 27, RR 2/16) trotz hohem SYFPEITHI-*score* erklären.

Auffallend ist, dass das Nonamer IACPVMRY einen vergleichsweise niedrigen SYFPEITHI-score von 18 aufweist, aber wie das Dekamer ESEERPPTY (score 27) bei 5/16 Spendern eine Reaktion auslöste. Für die beiden Peptide als niedrigfrequente EBV-Epitope spricht, dass beide die für HLA-Liganden häufige Länge von neun und zehn Aminosäuren aufweisen. Auch findet sich bei beiden Peptiden entsprechend dem A*01-Motiv die hydrophobe Aminosäure Tyrosin am C-Terminus (Anker). Position 3 im Peptid bildet einen weiteren Anker, vorzugsweise mit den sauren Aminosäuren Glutamat (E) oder Aspartat (D), da die entsprechende Tasche D im HLA-Molekül drei positiv geladene Aminosäuren enthält (DiBrino et al., 1994). ESEERPPTY weist Glutamat an Position 3 auf, IACPVMRY jedoch nicht. Stattdessen findet sich hier das schwach saure Cystein (C). Die Arbeit von DiBrino et al. deklariert zusätzlich Position 4 als weiteren Anker mit Prolin (P) als Ankeraminosäure. Dies ist bei der Motivsuche über die Datenbank SYFPEITHI nicht der Fall, wo Prolin an Position 4 nur als eine präferierte Aminosäure auftaucht. Die Ankereigenschaft der Position 4 wäre eine Erklärung für die relativ hohe RR des Peptids IACPVMRY.

Die Mehrzahl der immunogenen Epitope entstammt Antigenen des lytischen Zyklus, was auf die verminderte Anzahl und Produktion viraler Antigene und der damit einhergehenden verminderten Präsentation über HLA-Moleküle während der Latenzphase des EBV zurückgeführt werden kann (Münz and Moormann, 2008). Außerdem haben Woodberry et al. in einer Studie 113 EBV-Epitope an 40 Probanden mit akuter oder persistierender EBV-Infektion getestet und herausgefunden, dass unabhängig vom Stadium der Infektion eine Immunantwort gegen Epitope des jeweils anderen Stadiums vorhanden ist (Woodberry et al., 2005).

4.4.2. HLA-A*26

Das Allel HLA-A*26 ist in Deutschland mit einer Häufigkeit von 6,7 % vertreten (www.allelefrequencies.net, Stand Mai 2019). Es kommt im asiatischen Raum viel häufiger vor. Aufgrund der Zuordnung zum HLA-A*01-Supertypen (Sette and

Sidney, 1999) ist es aber insofern von Interesse, als dass immundominante A*26-Epitope kreuzreagierend sein könnten auf anderen Allotypen dieses Supertyps.

Das Screening HLA-A*26⁺ Spender erbrachte 24 immunogene EBV-Epitope mit mindestens 1/16 und höchstens 10/16 positiven Spenderreaktionen, darunter das Peptid EVVQFMNSM (RR 10/16, *score* 25) mit einer hohen Erkennungsfrequenz von 62,5 %. Damit liegt die RR bei > 50 % und es ist unserer Kenntnis nach das erste immundominante EBV-Epitop, das für HLA-A*26 beschrieben ist. Wie die meisten A*26-Liganden ist es ein Nonamer. Entsprechend dem HLA-A*26-Peptidmotiv, wie es von Dumrese et al. 1998 beschrieben wurde, findet sich an Position 1 Glutaminsäure (E) als Hilfsanker, an Position 2 Valin (V) als Anker und Methionin (M) als hydrophobe Aminosäure an Hilfsankerposition 6; nur an Position 9 befindet sich keine der beiden aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (F) oder Tyrosin (Y), sondern Methionin (M). Diese Aminosäure am C-Terminus ist in der genannten Arbeit für die Subtypen HLA-A*26:02 und HLA-A*26:03 beschrieben (Dumrese et al., 1998). Somit wurde dieses Peptid anhand des Motivs über SYFPEITHI vorhergesagt und konnte als immundominantes EBV-Epitop auf HLA-A*26 ausgemacht werden.

Das Peptid EVATLGTGY hat einen hohen SYFPEITHI-*score* von 32, gilt aber mit einer RR von 5/16 als niedrigfrequentes Epitop, ebenso wie das Peptid DVVPGNLVTY (*score* 38, RR 4/20). Calis et al. untersuchten Eigenschaften von über MHC I präsentierten Peptiden, die die Immunogenität verstärken und fanden dabei heraus, dass insbesondere die Positionen 4 bis 6 des Peptids für die Erkennung durch TCRs wichtig sind (Calis et al., 2013). Daneben zeichnete sich in der zitierten Arbeit eine Präferenz der T-Zellen für Aminosäuren mit langen aromatischen Resten ab. Demnach könnte die geringe Erkennungsfrequenz der Epitope EVATLGTGY und DVVPGNLVTY trotz hohem SYFPEITHI-*score* an den aliphatischen und teils kurzen Aminosäureresten liegen.

Betrachtet man die Antigene, aus denen die neun Peptide mit einer $RR \geq 2/16$ stammen, so handelt es sich in vier Fällen um das Antigen BALF2 aus dem frühen lytischen Zyklus und in drei Fällen um das latente Antigen EBNA4. Die

LMP-Antigene und EBNA3 aus dem latenten EBV-Zyklus ergaben sowohl bei HLA-A*26 als auch bei HLA-A*01 jeweils nur ein Epitop. Auf diese Beobachtung wird im nächsten Punkt näher eingegangen.

Die Aktivierung der T-Zellen sollte für die HLA-A*01- und HLA-A*26-restringierten Epitope noch mit Hilfe von ELISpots ohne vorangehende Stimulation erfolgen, um das Ausmaß der Immunreaktion *ex vivo* zu prüfen.

4.5. Charakterisierung der zytotoxischen T-Zellantwort

Bei der Betrachtung verschiedener HLA-Allotypen und der jeweiligen EBV-Epitope, die eine CD8⁺ T-Zellantwort induzieren, wird die Tendenz ersichtlich, dass diese Epitope aus den gleichen Gruppen lytischer und latenter Antigene stammen (Hislop et al., 2007). Dementsprechend konzentriert sich die CTL-Antwort auf Epitope aus Antigenen des lytischen Zyklus und hier vor allem aus den Antigenen BZLF1 oder BRLF1 der sehr frühen lytischen Phase oder BMLF1, BMRF1 oder BALF2 der frühen lytischen Phase; CTL-Antworten gegen Antigene aus dem latenten Zyklus fokussieren sich auf EBNA3, EBNA4 und EBNA6, zu einem geringeren Anteil auf LMP2 und noch seltener auf LMP1 (Cohen, 2000; Hislop et al., 2007).

Gallimore et al. haben 1998 an mit lymphozytärem Choriomeningitis-Virus infizierten Mäusen die Reaktion spezifischer zytotoxischer T-Zellen untersucht und dabei herausgefunden, dass die Menge an Peptid mit der Stärke der T-Zellantwort korreliert, jedoch nicht mit der Fähigkeit, die Infektion zu bekämpfen. Die Fähigkeit der CTL vor viralen Erregern zu schützen hängt eher damit zusammen, wie wenig Antigen für die Erkennung des Virus durch CTL nötig ist (Gallimore et al., 1998). Diese Beobachtung deckt sich mit späteren Arbeiten, die die hohe Avidität der CTL als wichtigen Faktor hervorheben, wenn es darum geht, infizierte Zellen bei noch geringer Mengen viraler Antigene früh zu erkennen und schnell zu lysieren (Derby et al., 2001). Dementsprechend wäre für die Bestimmung der Immundominanz nicht nur die quantitative Immunogenität entscheidend, sondern auch die qualitative Eigenschaft der CTL-Antwort.

Außerdem stellten sie fest, dass die protektive Eigenschaft der T-Zellen nicht auf die Ausschüttung von IFN γ zurückzuführen war.

Um die Avidität und die lytische Aktivität der CTL in Reaktion auf die in dieser Arbeit gefundenen Epitope zu verifizieren, sind weitere Untersuchungen in Form von Chromfreisetzungstests notwendig. Zudem sind die HLA-Tetramerfärbungen in dieser Arbeit fehlgeschlagen, wahrscheinlich aufgrund von Fehlern im Färbungsprozess, da auch die Positivkontrolle negativ ausfiel. Um die Spezifität der CTL nachzuweisen, ist eine Wiederholung und Ausweitung der Experimente auf die noch nicht untersuchten Epitope sinnvoll. Ergänzend sollten die spezifischen T-Zellen noch darauf geprüft werden, ob sie EBV-infizierte LCLs und damit endogen prozessiertes Antigen erkennen.

4.5.1. HLA-A*01

Es konnte beim Epitopscreening mittels ELISpot kein hochfrequentes dominantes Epitop gefunden werden. Die T-Zellantwort der niedrigfrequenten Epitope wurde mittels ICS charakterisiert und ergab bei den Peptiden IACPVMRY, ESEERPPTY, CSIACPVMRY und GTDAWRFAMNY eine deutliche Aktivierung CD8⁺ T-Zellen mit ebenso deutlicher Produktion der Zytokine IFN γ und TNF α (Tabelle 12). Dabei konnte eine höhere IFN γ -Produktion detektiert werden. Somit sind diese Epitope als kryptisch einzustufen. Kryptische Epitope weisen keine hohe Erkennungsfrequenz auf und können zu einer dominanten CD8⁺ T-Zellantwort führen, wenn keine immundominanten Epitope vorhanden sind. Damit sind solche Epitope relevant bei Individuen, die keine CTL-Antwort gegen immundominante oder häufig erkannte Epitope generieren, und können hier eine Lücke schließen.

Die Endekamere CSIACPVMRY und GTDAWRFAMNY führten zur Aktivierung eines größeren T-Zellpools, wohingegen das Nonamer IACPVMRY und das Dekamer ESEERPPTY häufiger erkannt wurden. Warum mehr CTL durch die längeren Peptide aktiviert wurden, kann nicht eindeutig gesagt werden. Dazu müsste unter anderem die Spezifität der aktivierten T-Zellen mit Hilfe einer HLA-

Tetramerfärbung bestätigt werden, um auszuschließen, dass die längeren Peptide durch proteolytische Prozesse verändert wurden.

ESEERPPTY wurde von Huisman et al. als HLA-A*01-restringiertes EBV-Epitop bestätigt. Es wurde zwar nur auf sechs Spendern getestet, fünf von ihnen zeigten jedoch eine spezifische T-Zellreaktion mit mittlerer bis hoher Avidität (Huisman et al., 2018). IACPVMRY erscheint ebenso in einer anderen Arbeit (Rist, 2015) als möglicher Ligand für HLA-A*01 und HLA-A*26 (siehe unter 4.6.2.). CSIACPVMRY und GTDAWRFAMNY sind bisher noch nicht als Epitope für HLA-A*01 beschrieben worden. Aufgrund der Beobachtungen der anderen beiden Epitope ESEERPPTY und IACPVMRY ist eine weitere Analyse der T-Zellreaktion zu erwägen.

Wie zu erwarten stammen die vier Epitope mit einer detektierten T-Zellreaktion in drei der Fälle aus Antigenen der lytischen Phase (2 x BRLF1 (IE) und 1 x BNRF1 (L)) und in einem Fall aus einem Antigen der latenten Phase (LMP2).

Die beiden Peptide VSVPIILRFY (RR 3/16) und GGDSTTPRPRY (RR 2/16) lösten keine detektierbare Aktivierung von CD8⁺ der CD4⁺ T-Zellen aus. In den ELISpots bewegte sich die Spotanzahl dieser zwei Peptide im niedrigeren Bereich. Es könnte sich hierbei um subdominante Epitope handeln, die nur einen kleinen T-Zellpool aktivieren.

4.5.2. HLA-A*26

Im Epitopscreening zeigte sich EVVQFMNSM als hochfrequentes Epitop für HLA-A*26 mit einer Erkennungsfrequenz von 62,50 % (RR 10/16). Daher wurde es neben acht weiteren Peptiden, die als niedrigfrequente Epitope eine Reaktionsrate zwischen 2/16 und 5/16 aufwiesen, mittels ICS auf eine Aktivierung CD8⁺ T-Zellen und eine Zytokinausschüttung getestet. Eine Aktivierung CD8⁺ T-Zellen sowie eine Ausschüttung der Zytokine IFN γ und TNF α zeigten sich bei den Peptiden EVVQFMNSM, EVATLGTY, PVRMSKVLML und DVVPGNLVY (Tabelle 12).

Das hochfrequente Epitop EVVQFMNSM zeigte eine deutliche Aktivierung zytotoxischer T-Zellen, weshalb es als dominantes Epitop eingestuft wird. Es wurde bisher noch in keiner anderen Arbeit als dominantes Epitop auf HLA-A*26 beschrieben, weshalb nun ein wichtiger Fortschritt auf der Suche nach dominanten HLA-A*26-Epitopen gemacht wurde. Es wird zusammen mit anderen von weiteren Labormitgliedern erfolgreich getesteten Peptiden anderer HLA-Restriktionen zur pharmazeutischen Zusammenstellung eines Impfstoffes genutzt.

EVATLGTGY und PVRMSKVLML können als niedrigfrequente Peptide mit CTL-Aktivierung als kryptische Epitope angesehen werden. Dafür spricht auch die teilweise hohe Spotanzahl in den ELISpots. Da bei DVVPGNLVTY nur eine geringe Anzahl an T-Zellen detektiert werden konnte und auch kaum eine Zytokinausschüttung festzustellen war, ist es eher als subdominantes Epitop einzustufen. Dies gilt auch für die übrigen fünf getesteten Peptide (EEDKSGMESL, EENLLDFVRF, QVNLLSVNY, LVSSGNTLY, DEGTRHATTY), die zu keiner detektierbaren CTL-Aktivierung führten und zudem niedrigfrequent waren. Ihre Spotanzahl in den ELISpots war auch vergleichsweise geringer. Somit kann eine Korrelation zwischen Spotanzahl und Immundominanz angenommen werden, während die Affinität des Peptids nicht entscheidend zu sein scheint. EENLLDFVRF ist das einzige Peptid in dieser Auflistung, das in der Literatur auftaucht. Es ist bereits als Epitop für HLA-B*44 bzw. den HLA-B*44-Supertypen bekannt (Hillen et al., 2008). Damit besteht eventuell eine Promiskuität für dieses Peptid.

Die CTL-aktivierenden Epitope für HLA-A*26 entstammen alle dem Antigen BALF2 aus der frühen Phase des lytischen EBV-Zyklus. Diese Fokussierung der CD8⁺ T-Zellantwort auf Proteine des frühen lytischen Zyklus deckt sich auch mit den Erkenntnissen vorangegangener Arbeiten (Landais et al., 2003).

4.6. Supertypen und ihre Relevanz für die Entwicklung peptidbasierter Impfstoffe

Die Vorteile epitopbasierter Impfstoffe bestehen unter anderem darin, dass die spezifischen CTL-Antworten auf Epitope stärker ausfallen als auf komplette Antigene und CTL gleichzeitig gegen verschiedene Epitope induziert werden können (Ishioka et al., 1999). Der ausgeprägte Polymorphismus der HLA-Allele stellte aber ein Problem dar, das die Suche nach immundominanten Epitopen erschwerte.

1995 untersuchten Sidney et al. in einem quantitativen *binding* Assay durch kompetitive Hemmung radioaktiv markierter Proben die Bindung bekannter oder natürlich präsentierter Peptide an die Moleküle verschiedener HLA I-Allele (HLA-B und HLA-C). Sie fanden dabei heraus, dass gleichen Peptidbindungsmotiven gleiche Aminosäurereste in der B- und F-Tasche der jeweiligen HLA-Molekülen zugrunde liegen, und definierten diese Gruppe aufgrund überlappender Peptidbindungseigenschaften als HLA-B*07-Supertyp (Sidney et al., 1995). Die Vorhersage, ob ein Peptid mit dem fraglichen Motiv an ein bestimmtes HLA-Molekül bindet, konnte nun durch Analysen der HLA-Molekültaschen und ohne Peptidpoolanalysen erfolgen. Trotz Kreuzreaktivität innerhalb des Supertyps weist aber jedes HLA-Molekül eigene Präferenzen in der Peptidbindung auf. Hier spielen neben den Ankeraminosäuren andere Positionen im Peptid ebenso eine wichtige Rolle hinsichtlich der Bindungsaffinität (Ruppert et al., 1993). Die Entdeckung von HLA I-Supertypen stellt dennoch einen wichtigen Schritt bei der Entwicklung von Peptidimpfstoffen dar, da durch einige kreuzreagierende Peptide innerhalb des Supertyps größere Teile der Bevölkerung abgedeckt werden können.

Die erste Arbeit, die die Zuordnung nahezu aller bekannten HLA I-Allele in neun HLA I-Supertypen (A*01, A*02, A*03, A*24, B*07, B*27, B*44, B*58, B*62) deklarierte und deren Einteilung bis heute Anwendung findet, wurde 1999 von Sette et Sidney veröffentlicht. Diese basiert auf den Peptidmotiven der verschiedenen HLA-Moleküle und der Struktur der B- und F-Tasche. Wie relevant die Erforschung der Supertypen ist, zeigt sich darin, dass die Häufigkeit eines

bestimmten Allels zwischen den Individuen sehr unterschiedlich sein kann, die Gesamthäufigkeit jedes Supertyps in den verschiedenen Populationen hingegen auffallend konstant ist (Sette and Sidney, 1999). Das vereinfacht die Entwicklung von Peptidimpfstoffen und macht sie weithin einsetzbar.

Lund et al. veröffentlichten 2004 eine eigene Einteilung der Supertypen basierend auf stochastischen Modellen, die anhand der Peptidmotive die Bildung von HLA I-Clustern ermöglichen sollen. Ihre Ergebnisse decken sich weitgehend mit der Einteilung von Sette und Sidney (1999), beinhalten aber auch einige Unterschiede. Demnach schlagen sie beispielsweise vor, den HLA-A*01-Supertypen aufzuteilen und einen neuen HLA-A*26-Supertypen zu definieren.

4.6.1. HLA-A*01-Supertyp – Vergleich der Aminosäuresequenzen natürlicher Liganden für A*01 und A*26 und Kreuzreaktivität innerhalb des Supertypen

Der HLA-A*01-Supertyp kann folgendermaßen definiert werden: Position 2: (TSIVLM), C-Terminus: (YWF) (Sette and Sidney, 1999). Für diese Definition dienten auch die Daten aus SYFPEITHI als Grundlage. Dementsprechend zeigen die Ergebnisse in dieser Arbeit aus dem Vergleich der Aminosäuresequenzen natürlicher HLA-A*01- und HLA-A*26-Liganden auch ähnliche Präferenzen beider HLAs. An Position 2 finden sich bei beiden bevorzugt Aminosäuren mit kleinen polaren (T) oder kleinen hydrophoben (V) Resten und am C-Terminus Aminosäuren mit aromatischen Resten (Y, F). Ruppert et al. stellten am Beispiel des HLA-A*02:01 fest, dass die Ankerpositionen für eine hochaffine Bindung notwendig, aber nicht hinreichend sind und durch Hinzunahme der Hilfsanker die Vorhersagbarkeit der Epitope gesteigert werden konnte (Ruppert et al., 1993). Die zusätzliche Betrachtung der Hilfsankerposition 6 (A*26) bzw. 7 (A*01) zeigt, dass auch hier mit der Präferenz für Leucin (L) Ähnlichkeiten zu finden sind. Einen Unterschied stellt die Ankerposition 3 des HLA-A*01-Motivs dar, da hier die sauren Aminosäuren Aspartat (D) und Glutamat (E) dominieren, während diese Aminosäuren beim HLA-A*26-Motiv eher an Position 1 und 4 auftauchen, ohne dabei Anker- oder

Hilfsankerfunktion einzunehmen. Andererseits handelt es sich um einen kleinen Unterschied von einer Peptidposition, der sich wahrscheinlich nicht negativ auswirkt. Ein Vergleich der Bindungstaschen B und F weist auch große Ähnlichkeiten auf: Während sie sich in der B-Tasche an zwei Aminosäurepositionen unterscheiden, stimmen sie in der F-Tasche vollständig überein (Sette and Sidney, 1999). Auf der Grundlage der Ankeraminosäuren und der jeweiligen Taschenstruktur kann eine Zuteilung des HLA-A*26-Moleküls zum HLA-A*01-Supertypen vorgenommen werden. Bei der Untersuchung der Kreuzreaktivität zwischen den HLA-Allotypen A*01 und A*26 zeigten sich jedoch keine signifikanten Kreuzreaktionen als vielmehr eine Restriktion der Peptide zum jeweiligen HLA. Jeweils nur ein niedrigfrequentes Peptid reagierte auf dem verwandten Allotypen mit einer Reaktionsrate von 1/16. Einzig IACPVMRY, das als eigentliches HLA-A*01-Peptid auf HLA-A*26-Spendern zu einer höheren Erkennungsfrequenz geführt hat (A*01: 31,25 %; A*26: 50 %), könnte für eine Kreuzreaktivität sprechen. Es müsste für ein aussagekräftigeres Ergebnis jedoch noch auf weiteren acht Spendern getestet werden. Außerdem weist es auch außerhalb des HLA-A*01-Supertypen eine Kreuzreaktivität auf, die eher für eine Promiskuität des Peptids spricht (siehe unter 4.6.2.).

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Hillen et al. 2008, die innerhalb des HLA-B*44-Supertypen keine Kreuzreaktivität feststellen konnten (Hillen et al., 2008). Demgegenüber stehen andere Arbeiten, die solch eine Kreuzreaktivität innerhalb des jeweiligen Supertypen bestätigen (Khanna et al., 1998; Burrows et al., 2003; Liu et al., 2012).

In Anbetracht dessen, dass in dieser Arbeit keine signifikante Kreuzreaktivität der Peptide zwischen HLA-A*01 und HLA-A*26 festgestellt werden konnte, wäre eine weitere Prüfung der Zugehörigkeit von HLA-A*26 zum HLA-A*01-Supertypen zu prüfen. Eine Analyse der HLA-Molekülbereiche bzw. -taschen für die Hilfsanker könnte noch erwogen werden. Außerdem spielt für die Immunreaktion nicht nur die Bindung des Peptids eine Rolle. Für eine bessere Aussagekraft bezüglich Kreuzreaktivität innerhalb des Supertypen könnte eine Analyse der gefundenen Epitope auf anderen verwandten Allotypen ergänzt werden.

4.6.2. Kreuzreaktivität außerhalb des HLA-A*01-Supertypen

Um Kreuzreaktionen mit nicht verwandten Allotypen zu untersuchen und eventuell promiskuitive Epitope auszumachen, sollten die positiv reagierenden Peptide noch auf Spendern getestet werden mit HLA-Restriktionen, die nicht zum HLA-A*01-Supertypen gezählt werden. Für das Peptid IACPVMRY, das sich auf HLA-A*01-Spendern mit 31,25 % (RR 5/16) und auf HLA-A*26 mit 50 % (RR 4/8) reaktiv zeigte, kann eine mögliche Promiskuität angenommen werden. Es wurde bereits mit einer Reaktivität von 29 % auf HLA-B*57 getestet (Thomas Feger, 2007) und wird zudem als Epitop für HLA-A*29 sowie möglicherweise für HLA-Cw2 und HLA-Cw3 angenommen (Rist, 2015). Nach den neuen Erkenntnissen in dieser Arbeit, wonach IACPVMRY sowohl auf A*01 und A*26 präsentiert wird, ist die Zuordnung zu den Allotypen HLA-Cw2 und HLA-Cw3 jedoch fraglich, da in der Arbeit von Rist die untersuchten Spender jeweils unter anderem Träger der HLA-Allele A*01 oder A*26 waren. Für die Promiskuität spricht auch, dass Alanin (A) in Position 2 auftaucht. Diese Position bildet meist einen Anker bzw. Hilfsanker und der kurze, aliphatische Rest des Alanins ist in dieser Position nicht sehr aussagekräftig. Für eine verlässlichere Aussage ist ein Screening auf weiteren Spendern, die weder positiv für HLA-A*01 noch für HLA-A*26 sind, notwendig.

Die Ergebnisse zusammenfassend wurde ein hochfrequentes und dominantes Epitop für HLA-A*26 gefunden, das für Peptidvakzinen genutzt werden kann. Eine Kreuzreaktivität innerhalb des HLA-A*01-Supertypen ist im Hinblick auf HLA-A*01 und HLA-A*26 auf der Grundlage der Ergebnisse in dieser Arbeit nicht erkennbar. Damit wäre bei der Entwicklung peptidbasierter Impfstoffe hinsichtlich einer Abdeckung breiter Bevölkerungsgruppen kein Vorteil gegeben.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Nahezu 95 % der erwachsenen Population sind mit dem Epstein-Barr Virus (EBV) infiziert. Die Infektion immunkompetenter Individuen verläuft in den meisten Fällen asymptomatisch, das Virus verbleibt als latenter Erreger jedoch im Organismus. Bei einem Zustand der Immunsuppression kann es zur Reaktivierung und damit zu schweren Komplikationen wie der PTLD kommen. Das Wissen um immundominante und häufig erkannte EBV-Epitope, die zu einer Stimulation spezifischer zytotoxischer T-Zellen führen, bildet die Grundlage für die Entwicklung peptidbasierter Impfstoffe und den Einsatz bei der adoptiven Immuntherapie. Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, häufig erkannte und immundominante T-Zellepitope aus Antigenen des EBV zu identifizieren, die über HLA-A*01 und HLA-A*26 präsentiert werden. Dabei handelt es sich um relativ häufige HLA-Allotypen, für die keine verlässlichen T-Zellepitope bekannt waren. Ein Aspekt dieser Arbeit widmet sich dem HLA-A*01-Supertypen, dem diese beiden Allotypen zugeordnet wurden, und untersucht die Kreuzreaktivität gefundener Epitope mit dem Ziel, die Entwicklung von Peptidimpfstoffen zu vereinfachen.

Zu diesem Zweck wurden aus der Sequenz von zwölf EBV-Antigenen mit Hilfe des Epitopvorhersageprogramms SYFPEITHI Peptide für die HLA-Allotypen A*01 und A*26 selektiert. Mononukleäre Blutzellen gesunder HLA-A*01- bzw. HLA-A*26-positiver Spender wurden mit insgesamt 201 Epitopkandidaten über zwölf Tage prästimuliert und anschließend mit Hilfe des IFN γ -ELISpots hinsichtlich einer Reaktion auf die vorhergesagten Peptide untersucht. Für HLA-A*01 ergaben sich sechs und für HLA-A*26 neun immunogene Peptide, darunter ein häufig erkanntes, immundominantes Epitop für HLA-A*26 (EVLQFMNSM). Durchflusszytometrische Analysen ergaben bei jeweils vier Epitopen die Aktivierung bifunktionaler CD8⁺ T-Zellen (IFN γ - und TNF α -Produktion). Es konnte keine signifikante Kreuzreaktivität festgestellt werden. Das hochfrequente und immundominante HLA-A*26-restringierte Epitop kann therapeutisch eingesetzt werden und findet Anwendung in der Entwicklung peptidbasierter Impfstoffe. Durch fehlende Freizügigkeit innerhalb des Supertypen ist eine breite Abdeckung der Bevölkerung nicht gegeben.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Ambinder, R. F. and Lin, L. 2005. Mononucleosis in the laboratory. *J Infect Dis* 192: 1503-1504.
- Babcock, G. J., Hochberg, D. and Thorley-Lawson, D. A. 2000. The expression pattern of epstein-barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected b cell. *Immunity* 13: 497-506.
- Bihl, F., Frahm, N., Di Giammarino, L., Sidney, J., John, M., Yusim, K., Woodberry, T., Sango, K., Hewitt, H. S., Henry, L., Linde, C. H., Chisholm, J. V., Zaman, T. M., Pae, E., Mallal, S., Walker, B. D., Sette, A., Korber, B. T., Heckerman, D. and Brander, C. 2006. Impact of hla-b alleles, epitope binding affinity, functional avidity, and viral coinfection on the immunodominance of virus-specific ctl responses. *J Immunol* 176: 4094-4101.
- Blake, N., Lee, S., Redchenko, I., Thomas, W., Steven, N., Leese, A., Steigerwald-Mullen, P., Kurilla, M. G., Frappier, L. and Rickinson, A. 1997. Human cd8+ t cell responses to ebv ebna1: Hla class i presentation of the (gly-ala)-containing protein requires exogenous processing. *Immunity* 7: 791-802.
- Bleek, G. M. V. and Nathenson, S. G. 1990. Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class i h-2kb molecule. *Nature* 348: 213-216.
- Bogedain, C., Wolf, H., Modrow, S., Stuber, G. and Jilg, W. 1995. Specific cytotoxic t lymphocytes recognize the immediate-early transactivator zta of epstein-barr virus. *J Virol* 69: 4872-4879.
- Bollard, C. M., Rooney, C. M. and Heslop, H. E. 2012. T-cell therapy in the treatment of post-transplant lymphoproliferative disease. *Nat Rev Clin Oncol* 9: 510-519.
- Brander, C., Hartman, K. E., Trocha, A. K., Jones, N. G., Johnson, R. P., Korber, B., Wentworth, P., Buchbinder, S. P., Wolinsky, S., Walker, B. D. and Kalams, S. A. 1998. Lack of strong immune selection pressure by the immunodominant, hla-a*0201-restricted cytotoxic t lymphocyte response in chronic human immunodeficiency virus-1 infection. *J Clin Invest* 101: 2559-2566.
- Brooks, J. M., Murray, R. J., Thomas, W. A., Kurilla, M. G. and Rickinson, A. B. 1993. Different hla-b27 subtypes present the same immunodominant epstein-barr virus peptide. *J Exp Med* 178: 879-887.
- Burkitt, D. 1962. A children's cancer dependent on climatic factors. *Nature* 194: 232-234.
- Burrows, S. R., Elkington, R. A., Miles, J. J., Green, K. J., Walker, S., Haryana, S. M., Moss, D. J., Dunckley, H., Burrows, J. M. and Khanna, R. 2003. Promiscuous ctl recognition of viral epitopes on multiple human leukocyte antigens: Biological validation of the proposed hla a24 supertype. *J Immunol* 171: 1407-1412.
- Burrows, S. R., Rodda, S. J., Suhrbier, A., Geysen, H. M. and Moss, D. J. 1992. The specificity of recognition of a cytotoxic t lymphocyte epitope. *Eur J Immunol* 22: 191-195.

- Burrows, S. R., Rossjohn, J. and McCluskey, J. 2006. Have we cut ourselves too short in mapping ctl epitopes? *Trends Immunol* 27: 11-16.
- Calis, J. J. A., Maybeno, M., Greenbaum, J. A., Weiskopf, D., De Silva, A. D., Sette, A., Keşmir, C. and Peters, B. 2013. Properties of mhc class i presented peptides that enhance immunogenicity. *PLoS Comput Biol* 9: e1003266.
- Cao, K., Hollenbach, J., Shi, X., Shi, W., Chopek, M. and Fernández-Viña, M. A. 2001. Analysis of the frequencies of hla-a, b, and c alleles and haplotypes in the five major ethnic groups of the united states reveals high levels of diversity in these loci and contrasting distribution patterns in these populations. *Hum Immunol* 62: 1009-1030.
- Cesarman, E. and Mesri, E. A. 1999. Virus-associated lymphomas. *Curr Opin Oncol* 11: 322.
- Chaplin, D. D. 2010. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 125: S3-S23.
- Cohen, J. I. 2000. Epstein–barr virus infection. *N Engl J Med* 343: 481-492.
- Crawford, D. H., Macsween, K. F., Higgins, C. D., Thomas, R., McAulay, K., Williams, H., Harrison, N., Reid, S., Conacher, M., Douglas, J. and Swerdlow, A. J. 2006. A cohort study among university students: Identification of risk factors for epstein-barr virus seroconversion and infectious mononucleosis. *Clin Infect Dis* 43: 276-282.
- Dausset, J. 1958. Iso-leuko-antibodies. *Vox Sang* 3: 40-41.
- Davis, M. M. and Bjorkman, P. J. 1988. T-cell antigen receptor genes and t-cell recognition. *Nature* 334: 395-402.
- De Jesus, O., Smith, P. R., Spender, L. C., Elgueta Karstegl, C., Niller, H. H., Huang, D. and Farrell, P. J. 2003. Updated epstein–barr virus (ebv) DNA sequence and analysis of a promoter for the bart (cst, barf0) rnas of ebv. *J Gen Virol* 84: 1443-1450.
- Derby, M. A., Alexander-Miller, M. A., Tse, R. and Berzofsky, J. A. 2001. High-avidity ctl exploit two complementary mechanisms to provide better protection against viral infection than low-avidity ctl. *J Immunol* 166: 1690-1697.
- Dibrino, M., Parker, K. C., Shiloach, J., Turner, R. V., Tsuchida, T., Garfield, M., Biddison, W. E. and Coligan, J. E. 1994. Endogenous peptides with distinct amino acid anchor residue motifs bind to hla-a1 and hla-b8. *J Immunol* 152: 620-631.
- Dibrino, M., Tsuchida, T., Turner, R. V., Parker, K. C., Coligan, J. E. and Biddison, W. E. 1993. Hla-a1 and hla-a3 t cell epitopes derived from influenza virus proteins predicted from peptide binding motifs. *J Immunol* 151: 5930-5935.
- Dubey, S., Clair, J., Fu, T.-M., Guan, L., Long, R., Mogg, R., Anderson, K., Collins, K. B., Gaunt, C., Fernandez, V. R., Zhu, L., Kierstead, L., Thaler, S., Gupta, S. B., Straus, W., Mehrotra, D., Tobery, T. W., Casimiro, D. R. and Shiver, J. W. 2007. Detection of hiv vaccine-induced cell-mediated immunity in hiv-seronegative clinical trial participants using an optimized and validated enzyme-linked immunospot assay. *J Acquir Immune Defic Syndr* 45: 20-27.
- Dumrese, T., Stevanović, S., Seeger, F. H., Yamada, N., Ishikawa, Y., Tokunaga, K., Takiguchi, M. and Rammensee, H.-G. 1998. Hla-a26 subtype a

- pockets accommodate acidic n-termini of ligands. *Immunogenetics* 48: 350-353.
- Duraiswamy, J., Burrows, J. M., Bharadwaj, M., Burrows, S. R., Cooper, L., Pimtanothai, N. and Khanna, R. 2003. Ex vivo analysis of t-cell responses to epstein-barr virus-encoded oncogene latent membrane protein 1 reveals highly conserved epitope sequences in virus isolates from diverse geographic regions. *J Virol* 77: 7401-7410.
- Elliott, S. L., Suhrbier, A., Miles, J. J., Lawrence, G., Pye, S. J., Le, T. T., Rosenstengel, A., Nguyen, T., Allworth, A., Burrows, S. R., Cox, J., Pye, D., Moss, D. J. and Bharadwaj, M. 2008. Phase i trial of a cd8+ t-cell peptide epitope-based vaccine for infectious mononucleosis. *J Virol* 82: 1448-1457.
- Engelhard, V. H. 1994. Structure of peptides associated with mhc class i molecules. *Curr Opin in Immunol* 6: 13-23.
- Epstein, M. A. 1964. Virus particles in cultured lymphoblasts from burkitt's lymphoma. *Lancet* 1: 702-703.
- Escobar, H., Crockett, D. K., Reyes-Vargas, E., Baena, A., Rockwood, A. L., Jensen, P. E. and Delgado, J. C. 2008. Large scale mass spectrometric profiling of peptides eluted from hla molecules reveals n-terminal-extended peptide motifs. *J Immunol* 181: 4874-4882.
- Falk, K., Rötzschke, O. and Rammensee, H. G. 1992. Specificity of antigen processing for mhc class i restricted presentation is conserved between mouse and man. *Eur J Immunol* 22: 1323-1326.
- Falk, K., Rötzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. and Rammensee, H.-G. 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from mhc molecules. *Nature* 351: 290-296.
- Früh, K., Gruhler, A., Krishna, R. M. and Schoenhals, G. J. 1999. A comparison of viral immune escape strategies targeting the mhc class i assembly pathway. *Immunol Rev* 168: 157-166.
- Gallimore, A., Dumrese, T., Hengartner, H., Zinkernagel, R. M. and Rammensee, H.-G. 1998. Protective immunity does not correlate with the hierarchy of virus-specific cytotoxic t cell responses to naturally processed peptides. *J Exp Med* 187: 1647-1657.
- Gavioli, R., Kurilla, M. G., De Campos-Lima, P. O., Wallace, L. E., Dolcetti, R., Murray, R. J., Rickinson, A. B. and Masucci, M. G. 1993. Multiple hla a11-restricted cytotoxic t-lymphocyte epitopes of different immunogenicities in the epstein-barr virus-encoded nuclear antigen 4. *J Virol* 67: 1572-1578.
- Günther, P. S., Peper, J. K., Faist, B., Kayser, S., Hartl, L., Feuchtinger, T., Jahn, G., Neuenhahn, M., Busch, D. H., Stevanovic, S. and 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: 267-275.
- Hassan, C., Chabrol, E., Jahn, L., Kester, M. G., De Ru, A. H., Drijfhout, J. W., Rossjohn, J., Falkenburg, J. F., Heemskerk, M. H. and Gras, S. 2015. Naturally processed non-canonical hla-a* 02: 01 presented peptides. *J Biol Chem* 290: 2593-2603.
- Hatton, O. L., Harris-Arnold, A., Schaffert, S., Krams, S. M. and Martinez, O. M. 2014. The interplay between epstein-barr virus and b lymphocytes:

- Implications for infection, immunity, and disease. *Immunol Res* 58: 268-276.
- Hebart, H., Deginik, S., Stevanovic, S., Grigoleit, U., Dobler, A., Baur, M., Rauser, G., Sinzger, C., Jahn, G., Loeffler, J., Kanz, L., Rammensee, H.-G. and Einsele, H. 2002. Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic t-lymphocyte responses by interferon- γ -enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 99: 3830-3837.
- Henle, G., Henle, W. and Diehl, V. 1968. Relation of burkitt's tumor-associated herpes- γ type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 59: 94-101.
- Heslop, H. E., Slobod, K. S., Pule, M. A., Hale, G. A., Rousseau, A., Smith, C. A., Bollard, C. M., Liu, H., Wu, M.-F., Rochester, R. J., Amrolia, P. J., Hurwitz, J. L., Brenner, M. K. and Rooney, C. M. 2010. Long-term outcome of ebv-specific t-cell infusions to prevent or treat ebv-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood* 115: 925-935.
- Hill, A. B., Lee, S. P., Haurum, J. S., Murray, N., Yao, Q. Y., Rowe, M., Signoret, N., Rickinson, A. B. and McMichael, A. J. 1995. Class i major histocompatibility complex-restricted cytotoxic t lymphocytes specific for epstein-barr virus (ebv)-transformed b lymphoblastoid cell lines against which they were raised. *J Exp Med* 181: 2221-2228.
- Hillen, N., Mester, G., Lemmel, C., Weinzierl, A. O., Müller, M., Wernet, D., Hennenlotter, J., Stenzl, A., Rammensee, H.-G. and Stevanović, S. 2008. Essential differences in ligand presentation and t cell epitope recognition among hla molecules of the hla-b44 supertype. *Eur J Immunol* 38: 2993-3003.
- Hislop, A. D., Taylor, G. S., Sauce, D. and Rickinson, A. B. 2007. Cellular responses to viral infection in humans: Lessons from epstein-barr virus. *Annu Rev Immunol* 25: 587-617.
- Hodi, F. S., O'day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J. C., Akerley, W., Van Den Eertwegh, A. J. M., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J. M., Linette, G. P., Hogg, D., Ottensmeier, C. H., Lebbé, C., Peschel, C., Quirt, I., Clark, J. I., Wolchok, J. D., Weber, J. S., Tian, J., Yellin, M. J., Nichol, G. M., Hoos, A. and Urba, W. J. 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363: 711-723.
- Huisman, W., Van Der Maarel, L. E., Hageman, L., De Jong, R. C. M., Amsen, D., Falkenburg, J. H. F. and Jedema, I. 2018. Isolation and validation of the first functional hla-a*01:01 restricted ebv-imp2 specific t cells for treatment of ebv associated type ii/iii lymphomas. *Blood* 132: 1578-1578.
- Huppa, J. B. and Davis, M. M. 2003. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 3: 973.
- Huse, M., Quann, E. J. and Davis, M. M. 2008. Shouts, whispers and the kiss of death: Directional secretion in t cells. *Nat Immunol* 9: 1105.
- Icheva, V., Kayser, S., Wolff, D., Tuve, S., Kyzirakos, C., Bethge, W., Greil, J., Albert, M. H., Schwinger, W., Nathrath, M., Schumm, M., Stevanovic, S., Handgretinger, R., Lang, P. and Feuchtinger, T. 2013. Adoptive transfer of epstein-barr virus (ebv) nuclear antigen 1-specific t cells as treatment

- for ebv reactivation and lymphoproliferative disorders after allogeneic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 31: 39-48.
- Ishioka, G. Y., Fikes, J., Hermanson, G., Livingston, B., Crimi, C., Qin, M., Del Guercio, M.-F., Oseroff, C., Dahlberg, C., Alexander, J., Chesnut, R. W. and Sette, A. 1999. Utilization of mhc class i transgenic mice for development of minigene DNA vaccines encoding multiple hla-restricted ctl epitopes. *J Immunol* 162: 3915-3925.
- Keating, S., Prince, S., Jones, M. and Rowe, M. 2002. The lytic cycle of epstein-barr virus is associated with decreased expression of cell surface major histocompatibility complex class i and class ii molecules. *J Virol* 76: 8179-8188.
- Kerr, B. M., Kienzle, N., Burrows, J. M., Cross, S., Silins, S. L., Buck, M., Benson, E. M., Coupar, B., Moss, D. J. and Sculley, T. B. 1996. Identification of type b-specific and cross-reactive cytotoxic t-lymphocyte responses to epstein-barr virus. *J Virol* 70: 8858-8864.
- Khan, G., Miyashita, E. M., Yang, B., Babcock, G. J. and Thorley-Lawson, D. A. 1996. Is ebv persistence in vivo a model for b cell homeostasis? *Immunity* 5: 173-179.
- Khanna, R., Burrows, S. R., Nicholls, J. and Poulsen, L. M. 1998. Identification of cytotoxic t cell epitopes within epstein-barr virus (ebv) oncogene latent membrane protein 1 (Imp1): Evidence for hla a2 supertype-restricted immune recognition of ebv-infected cells by Imp1-specific cytotoxic t lymphocytes. *Eur J Immunol* 28: 451-458.
- Klausner, R. D., Donaldson, J. G. and Lippincott-Schwartz, J. 1992. Brefeldin a: Insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* 116: 1071-1080.
- Kyi, C. and Postow, M. A. 2014. Checkpoint blocking antibodies in cancer immunotherapy. *FEBS Lett* 588: 368-376.
- Ladi, E., Yin, X., Chtanova, T. and Robey, E. A. 2006. Thymic microenvironments for t cell differentiation and selection. *Nat Immunol* 7: 338.
- Landais, E., Saulquin, X. and Houssaint, E. 2005. The human t cell immune response to epstein-barr virus. *Int J Dev Biol* 49: 285-292.
- Larsen, M. V., Lundegaard, C., Lamberth, K., Buus, S., Brunak, S., Lund, O. and Nielsen, M. 2005. An integrative approach to ctl epitope prediction: A combined algorithm integrating mhc class i binding, tap transport efficiency, and proteasomal cleavage predictions. *Eur J Immunol* 35: 2295-2303.
- Lautscham, G., Haigh, T., Mayrhofer, S., Taylor, G., Croom-Carter, D., Leese, A., Gadola, S., Cerundolo, V., Rickinson, A. and Blake, N. 2003. Identification of a tap-independent, immunoproteasome-dependent cd8+ t-cell epitope in epstein-barr virus latent membrane protein 2. *J Virol* 77: 2757-2761.
- Leach, D. R., Krummel, M. F. and Allison, J. P. 1996. Enhancement of antitumor immunity by ctla-4 blockade. *Science* 271: 1734-1736.
- Lee, S. P., Thomas, W. A., Murray, R. J., Khanim, F., Kaur, S., Young, L. S., Rowe, M., Kurilla, M. and Rickinson, A. B. 1993. Hla a2.1-restricted cytotoxic t cells recognizing a range of epstein-barr virus isolates through a defined epitope in latent membrane protein Imp2. *J Virol* 67: 7428-7435.

- Lee, S. P., Tierney, R. J., Thomas, W. A., Brooks, J. M. and Rickinson, A. B. 1997. Conserved ctl epitopes within ebv latent membrane protein 2: A potential target for ctl-based tumor therapy. *J Immunol* 158: 3325-3334.
- Li, W., Joshi, M. D., Singhania, S., Ramsey, K. H. and Murthy, A. K. 2014. Peptide vaccine: Progress and challenges. *Vaccines* 2: 515-536.
- Lim, W. H., Russ, G. R. and Coates, P. T. 2006. Review of epstein–barr virus and post-transplant lymphoproliferative disorder post-solid organ transplantation (review article). *Nephrology* 11: 355-366.
- Liu, J., Zhang, S., Tan, S., Yi, Y., Wu, B., Cao, B., Zhu, F., Wang, C., Wang, H., Qi, J. and Gao, G. F. 2012. Cross-allele cytotoxic t lymphocyte responses against 2009 pandemic h1n1 influenza a virus among hla-a24 and hla-a3 supertype-positive individuals. *J Virol* 86: 13281-13294.
- Lund, O., Nielsen, M., Kesmir, C., Petersen, A. G., Lundegaard, C., Worning, P., Sylvester-Hvid, C., Lamberth, K., Røder, G., Justesen, S., Buus, S. and Brunak, S. 2004. Definition of supertypes for hla molecules using clustering of specificity matrices. *Immunogenetics* 55: 797-810.
- Luther, S. A., Tang, H. L., Hyman, P. L., Farr, A. G. and Cyster, J. G. 2000. Coexpression of the chemokines elc and slc by t zone stromal cells and deletion of the elc gene in the plt/plt mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12694-12699.
- Lutzky, V. P., Davis, J. E., Crooks, P., Corban, M., Smith, M. C., Elliott, M., Morrison, L., Cross, S., Tschärke, D., Panizza, B., Coman, W., Bharadwaj, M. and Moss, D. J. 2009. Optimization of Imp-specific ctl expansion for potential adoptive immunotherapy in npc patients. *Immunol Cell Biol* 87: 481-488.
- Madden, D. R. 1995. The three-dimensional structure of peptide-mhc complexes. *Annu Rev Immunol* 13: 587-622.
- Marchand, M., Weynants, P., Rankin, E., Arienti, F., Belli, F., Parmiani, G., Cascinelli, N., Bours, A., Vanwijck, R. and Humblet, Y. 1995. Tumor regression responses in melanoma patients treated with a peptide encoded by gene mage-3. *Int J Cancer* 63: 883-885.
- Mccutcheon, J. A., Gumperz, J., Smith, K. D., Lutz, C. T. and Parham, P. 1995. Low hla-c expression at cell surfaces correlates with increased turnover of heavy chain mrna. *J Exp Med* 181: 2085-2095.
- Miller, G., Shope, T., Coope, D., Waters, L., Pagano, J., Bornkamm, G. and Henle, W. 1977. Lymphoma in cotton-top marmosets after inoculation with epstein-barr virus: Tumor incidence, histologic spectrum antibody responses, demonstration of viral DNA, and characterization of viruses. *J Exp Med* 145: 948-967.
- Moodie, Z., Price, L., Gouttefangeas, C., Mander, A., Janetzki, S., Löwer, M., Welters, M. J. P., Ottensmeier, C., Van Der Burg, S. H. and Britten, C. M. 2010. Response definition criteria for elispot assays revisited. *Cancer Immunol Immunother* 59: 1489-1501.
- Morgan, S. M., Wilkinson, G. W., Floettmann, E., Blake, N. and Rickinson, A. B. 1996. A recombinant adenovirus expressing an epstein-barr virus (ebv) target antigen can selectively reactivate rare components of ebv cytotoxic t-lymphocyte memory in vitro. *J Virol* 70: 2394-2402.

- Münz, C. and Moormann, A. 2008. Immune escape by epstein–barr virus associated malignancies. *Semin Cancer Biol* 18: 381-387.
- Murphy, K. and Weaver, C. 2016. Janeway's immunobiology, New York, USA and Oxford, UK, Garland Science, pp. 156.
- Odumade, O. A., Hogquist, K. A. and Balfour, H. H. 2011. Progress and problems in understanding and managing primary epstein-barr virus infections. *Clin Microbiol Rev* 24: 193-209.
- Okano, M., Matsumoto, S., Osato, T., Sakiyama, Y., Thiele, G. M. and Purtilo, D. T. 1991. Severe chronic active epstein-barr virus infection syndrome. *Clin Microbiol Rev* 4: 129-135.
- Opelz, G., Wujciak, T., Döhler, B., Scherer, S. and Mytilineos, J. 1999. Hla compatibility and organ transplant survival. Collaborative transplant study. *Rev Immunogenet* 1: 334-342.
- Ottaviano, G., Chiesa, R., Feuchtinger, T., Vickers, M. A., Dickinson, A., Gennery, A. R., Veys, P. and Todryk, S. 2019. Adoptive t cell therapy strategies for viral infections in patients receiving haematopoietic stem cell transplantation. *Cells* 8: 47.
- Panina-Bordignon, P., Tan, A., Termijtelen, A., Demotz, S., Corradin, G. and Lanzavecchia, A. 1989. Universally immunogenic t cell epitopes: Promiscuous binding to human mhc class ii and promiscuous recognition by t cells. *Eur J Immunol* 19: 2237-2242.
- Parkin, J. and Cohen, B. 2001. An overview of the immune system. *Lancet* 357: 1777-1789.
- Paya, C. V., Fung, J. J., Nalesnik, M. A., Kieff, E., Green, M., Gores, G., Habermann, T. M., Wiesner, R. H., Swinnen, L. J., Woodle, E. S. and Bromberg, J. S. 1999. Epstein-barr virus-induced posttransplant lymphoproliferative disorders. *Transplantation* 68: 1517-1525.
- Pieters, J. 1997. Mhc class ii restricted antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 9: 89-96.
- Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N. P., Bachor, O. A. and Stevanovic, S. 1999. Syfpeithi: Database for mhc ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50: 213-219.
- Redchenko, I. V. and Rickinson, A. B. 1999. Accessing epstein-barr virus-specific t-cell memory with peptide-loaded dendritic cells. *J Virol* 73: 334-342.
- Rickinson, A. B. and Moss, D. J. 1997. Human cytotoxic t lymphocyte responses to epstein-barr virus infection. *Annu Rev Immunol* 15: 405-431.
- Riddell, S. R., Watanabe, K. S., Goodrich, J. M., Li, C. R., Agha, M. E. and Greenberg, P. D. 1992. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of t cell clones. *Science* 257: 238-241.
- Rist, M. 2015. The adaptive immune response to epstein-barr virus. PhD thesis in medicine, University of Queensland, Brisbane, Australia.
- Rooney, C. M., Smith, C. A., Ng, C. Y. C., Loftin, S. K., Sixbey, J. W., Gan, Y., Srivastava, D.-K., Bowman, L. C., Krance, R. A., Brenner, M. K. and Heslop, H. E. 1998. Infusion of cytotoxic t cells for the prevention and treatment of epstein-barr virus–induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* 92: 1549-1555.

- Rowe, M., Lear, A. L., Croom-Carter, D., Davies, A. H. and Rickinson, A. B. 1992. Three pathways of epstein-barr virus gene activation from ebna1-positive latency in b lymphocytes. *J Virol* 66: 122-131.
- Ruppert, J., Sidney, J., Celis, E., Kubo, R. T., Grey, H. M. and Sette, A. 1993. Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to hla-a2.1 molecules. *Cell* 74: 929-937.
- Sallusto, F., Mackay, C. R. and Lanzavecchia, A. 2000. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 18: 593-620.
- Saulquin, X., Ibisch, C., Peyrat, M. A., Scotet, E., Hourmant, M., Vie, H., Bonneville, M. and Houssaint, E. 2000. A global appraisal of immunodominant cd8 t cell responses to epstein-barr virus and cytomegalovirus by bulk screening. *Eur J Immunol* 30: 2531-2539.
- Schenkel, J. M. and Masopust, D. 2014. Tissue-resident memory t cells. *Immunity* 41: 886-897.
- Schipper, R. F., Van Els, C. A. C. M., D'amaro, J. and Oudshoorn, M. 1996. Minimal phenotype panels: A method for achieving maximum population coverage with a minimum of hla antigens. *Hum Immunol* 51: 95-98.
- Schmidt, A. H., Solloch, U. V., Baier, D., Stahr, A., Wassmuth, R., Ehninger, G. and 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: 362-379.
- Scotet, E., David-Ameline, J., Peyrat, M. A., Moreau-Aubry, A., Pinczon, D., Lim, A., Even, J., Semana, G., Berthelot, J. M., Breathnach, R., Bonneville, M. and Houssaint, E. 1996. T cell response to epstein-barr virus transactivators in chronic rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 184: 1791-1800.
- Sette, A. and Fikes, J. 2003. Epitope-based vaccines: An update on epitope identification, vaccine design and delivery. *Curr Opin Immunol* 15: 461-470.
- Sette, A. and Sidney, J. 1999. Nine major hla class i supertypes account for the vast preponderance of hla-a and -b polymorphism. *Immunogenetics* 50: 201-212.
- Sidney, J., Del Guercio, M.-F., Southwood, S., Engelhard, V. H., Appella, E., Rammensee, H.-G., Falk, K., Rötzschke, O., Takiguchi, M. and Kubo, R. T. 1995. Several hla alleles share overlapping peptide specificities. *J Immunol* 154: 247-259.
- Sidney, J., Peters, B., Frahm, N., Brander, C. and Sette, A. 2008. Hla class i supertypes: A revised and updated classification. *BMC Immunol* 9: 1.
- Sidney, J., Southwood, S. and Sette, A. 2005. Classification of a1- and a24-supertype molecules by analysis of their mhc-peptide binding repertoires. *Immunogenetics* 57: 393-408.
- Silins, S. L., Sherritt, M. A., Silleri, J. M., Cross, S. M., Elliott, S. L., Bharadwaj, M., Le, T. T., Morrison, L. E., Khanna, R. and Moss, D. J. 2001. Asymptomatic primary epstein-barr virus infection occurs in the absence of blood t-cell repertoire perturbations despite high levels of systemic viral load. *Blood* 98: 3739-3744.

- Speck, S. H. 2005. Regulation of ebv latency-associated gene expression, p. 403-427. In Robertson, E. S. (ed.), Epstein-barr virus. Caister Academic Press, Norfolk, England.
- Stern, L. J., Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Urban, R. G., Strominger, J. L. and Wiley, D. C. 1994. Crystal structure of the human class ii mhc protein hla-dr1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 368: 215-221.
- Stern, L. J. and Wiley, D. C. 1994. Antigenic peptide binding by class i and class ii histocompatibility proteins. *Structure* 2: 245-251.
- Stevanovic, S. 2005. Antigen processing is predictable: From genes to t cell epitopes. *Transpl Immunol* 14: 171-174.
- Steven, N. M., Leese, A. M., Annels, N. E., Lee, S. P. and Rickinson, A. B. 1996. Epitope focusing in the primary cytotoxic t cell response to epstein-barr virus and its relationship to t cell memory. *J Exp Med* 184: 1801-1813.
- Sumaya, C. V., Henle, W., Henle, G., Smith, M. H. D. and Leblanc, D. 1975. Seroepidemiologic study of epstein-barr virus infections in a rural community. *J Infect Dis* 131: 403-408.
- Tait, B. D. 2011. The ever-expanding list of hla alleles: Changing hla nomenclature and its relevance to clinical transplantation. *Transplant Rev* 25: 1-8.
- Thompson, M. P. and Kurzrock, R. 2004. Epstein-barr virus and cancer. *Clin Cancer Res* 10: 803-821.
- Thorley-Lawson, D. A. 2001. Epstein-barr virus: Exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol* 1: 75.
- Thorley-Lawson, D. A. and Gross, A. 2004. Persistence of the epstein-barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med* 350: 1328-1337.
- Van Der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van Den Eynde, B., Knuth, A. and Boon, T. 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic t lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254: 1643-1647.
- Villadolid, J. and Amin, A. 2015. Immune checkpoint inhibitors in clinical practice: Update on management of immune-related toxicities. *Transl Lung Cancer Res* 4: 560-575.
- Woodberry, T., Suscovich, T. J., Henry, L. M., Davis, J. K., Frahm, N., Walker, B. D., Scadden, D. T., Wang, F. and Brander, C. 2005. Differential targeting and shifts in the immunodominance of epstein-barr virus-specific cd8 and cd4 t cell responses during acute and persistent infection. *J Infect Dis* 192: 1513-1524.
- Woodland, D. L. and Kohlmeier, J. E. 2009. Migration, maintenance and recall of memory t cells in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol* 9: 153.
- Young, L. S. and Rickinson, A. B. 2004. Epstein-barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 4: 757.
- Zinkernagel, R. M. and Doherty, P. C. 1975. H-2 compatibility requirement for t-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. Different cytotoxic t-cell specificities are associated with structures coded for in h-2k or h-2d. *J Exp Med* 141: 1427-1436.

7. ANHANG

Tabelle 9: Auflistung der per ELISpot getesteten Peptide für HLA-A*01 und HLA-A*26.

a) HLA-A*01

Antigen	Sequenz	Position	score	Peptidnummer
BZLF1	Nonamere			
	AFDQATRVY	25-33	28	8146, 60175, 80090
	DSELEIKRY	172-180	28	100035
	APENAYQAY	81-89	24	80067
	Dekamere			
	PLPQGQLTAY	55-64	18	71140
	Endekamere			
	SEDEVKFTDPY	8-18	27	70132
	EPLPQGQLTAY	54-64	18	101049
	ECDSELEIKRY	170-180	26	110313
BRLF1	Nonamere			
	SVEITLRSY	41-49	24	50357
	HSRVRAYTY	146-154	19	70316
	QLGSLVSDY	21-29	18	70266
	IACPIVMRY	101-109	18	70313
	Dekamere			
	GSVEITLRSY	40-50	21	101029
	YSSHAGQRSY	236-245	20	80078
	VSDYCNVLNK	26-35	17	71036, 101154
	LLKHSRVRAY	143-152	16	71144
	Endekamere			
	CSIACPIVMRY	99-110	20	80080, 100034
	BMRF1	Nonamere		
NPDLYVTTY		192-200	26	91159, 110283
VSPILRFY		260-268	21	70299
AVSFRNLAY		83-91	19	71023
GEACLTDY		203-211	19	70383
ALAVLSKCY		13-21	18	71139
EFVKLTMEY		124-132	17	80060
Dekamere				
SGEACLTDY		202-211	28	50363
AVEQASLQFY		105-114	26	90313, 110316
PEFVKLTMEY		123-132	18	91096
Endekamere				
RPEFVKLTMEY		122-132	25	91162, 110319
KSHHTCALMPY		138-148	21	80095
BMLF1	Nonamere			
	VVETLSSSY	381-389	25	81085
	Dekamere			
HDEVEFLGHY	416-425	26	61077, 110317	

	KQPLCLLAAY	391-400	18	71173
	Endekamere			
	RHDEVEFLGHY	415-425	27	71069
	ETIFWLQEITY	310-320	21	80096
BALF2	Nonamere			
	PDDEPRYTY	519-527	26	111205
	YKDLVKSCY	588-596	26	111206
	PPEWLKGHY	648-656	24	100086
	CPIFTQLFY	611-619	18	100124
	ETDFLGNFL	499-507	17	110049
	Dekamere			
	ITEAFKERLY	153-162	30	110154
	SHETPASLNY	292-301	27	110156
	RPDDEPRYTY	518-527	26	110278
	FPDTKLSSLY	767-776	26	110282
	DVVPGNLVTY	819-828	18	111038
	Endekamere			
	DLDAALQGRVY	691-701	27	110159
BNRF1	Nonamere			
	ALDTRYDY	382-390	28	110142
	LFDNALRKY	175-183	27	110146
	ALELFSALY	426-434	26	110279
	PLDLPLADY	650-658	26	110281
	ETQMPVARY	205-213	23	110052
	FLRLLGATY	135-143	17	110175
	YPAPCISGY	434-442	17	101073
	Dekamere			
	VRDNTFLDKY	1073-1082	28	110180
	ACDMAGCQHY	531-540	26	111230
	DTRYDYGHY	384-394	22	111052
	Endekamere			
	GTDARFAMNY	1237-1247	31	110160
	ALEASGNVYVY	105-115	25	110318
BLLF1	Nonamere			
	VEIPEPFY	28-36	19	90024
	Endekamere			
	GGDSTPRPRY	804-814	27	110185
EBNA3	Nonamere			
	FLQRDLSY	282-290	19	70342
	Dekamere			
	VLEKARGSTY	405-414	25	50359
	PTVALERPVY	541-550	23	80094
	CTPGDRQWLY	222-231	22	80093
	GSQISNTEMY	125-134	20	91151
	ISNTEMYIMY	128-137	20	90298
	VQHQLDALGY	801-810	18	70351
	Endekamere			

	QTLAAGWPMGY	164-174	21	80091
	GTDVVQHQLDA	797-807	20	80092
EBNA4	Nonamere			
	TNEEIDLAY	328-336	26	110285
	LVSSGNTLY	259-267	18	110163
	AVTQAPTEY	843-851	18	110167
	VIQLVHAVY	107-115	17	111116
	TLPYNPTVY	387-395	17	110144
EBNA6	Endekamere			
	ASERLVPEESY	41-51	27	110189
	ELESSDDELPY	382-392	27	110184
LMP1	Nonamere			
	LLALLFWLY	33-41	21	71166
	LLVLGIWIY	117-125	18	71163
	Dekamere			
	DLILLIIALY	150-159	18	70466
LMP2	Nonamere			
	SEERPPTY	485-493	24	90086
	MLVLLILAY	227-235	20	71151
	Dekamere			
	ESEERPPTY	484-493	27	50347, 70020, 110293
	GYDGGNNSQY	22-31	25	70133
	Endekamere			
	LTEWGSGNRTY	410-420	29	110190

b) HLA-A*26

Antigen	Sequenz	Position	score	Peptidnummer
BZLF1	Nonamere			
	DVKFTDPDY	10-18	28	80070
	DVDSIIPRT	226-334	25	80076
	DSELEIKRY	172-180	22	100035
	STAPTGSWF	67-75	20	70327
	Dekamere			
	DVLHEDLLNF	236-245	31	80065
BRLF1	Nonamere			
	DVRALIKTL	223-231	32	71059
	ETSQAVKAL	511-519	31	71060
	DTFLNDECL	579-587	29	71061
	EIKKQLGSL	17-25	28	70117
	ELNEILDTF	573-581	27	70120, 70268
	SVEITLRSY	41-49	26	70317

	PVHEPVGSL	474-482	26	110126
	DDVKDVRAL	219-227	25	111161
	Dekamere			
	DFTLNDECLL	579-588	28	70119, 110088
	EETSQAVKAL	510-519	25	70176
	GSVEITLRSY	40-50	21	101029
	DVKDVRALIK	220-229	20	60003, 101149
BMRF1	Nonamere			
	EFVKLTMEY	124-132	25	80060
	AVSFRNLAY	83-91	22	71023
	QVNLLSVNY	34-42	21	70300
	VSVPIILRFY	260-268	21	70299
	Dekamere			
	EVSPDAVAEW	62-71	25	80062
	AVEQASLQFY	105-114	24	50375, 80088, 90313
	AVSVPIILRFY	259-268	24	71142
BMLF1	Nonamere			
	DEVEFLGHY	417-425	29	111069
	ETIFWLQEI	310-318	26	70127
	VVETLSSSY	381-389	23	81085
	GTGSLGLFF	465-473	20	70329
	Dekamere			
	EVHGCTDESY	132-141	31	70126
	KVVETLSSSY	380-389	28	70353
	KVILTKLKL	342-351	26	70128
	EITYHGDLPL	317-326	24	70129
BALF2	Nonamere			
	EVATLGTGY	35-43	32	110058
	EGVPQLRQF	196-205	28	110060
	ETDFLGNFL	499-507	28	110049
	CVFDVVCNL	1010-1018	27	110095
	VVPGNLVTY	820-828	26	110116
	EVVQFMNSM	573-821	25	110179
	DTKLSSLYL	769-777	25	110178
	EIENIRAGL	990-998	24	110252
	Dekamere			
	EVFPEGVPQL	192-201	38	111064
	DVVPGNLVTY	819-828	38	111038
	YVISGASGSY	488-497	27	111070
	DVVCNLVDAM	1013-1021	27	110096
	PVRMSKVLML	706-715	24	110253
BNRF1	Nonamere			
	ETQMPVARY	205-213	32	110052
	DTRPDLRKL	205-214	30	110140
	AVIEHLGSL	450-459	30	110065
	EVHRSRPSF	156-165	29	111053
	EVNVQRSPL	1157-1165	29	110071

	ETGSSASNF	790-798	28	110075
	ETADTRPDL	202-210	27	111071
	ETLDTWKVL	252-260	27	110105
	EIQQFLRLL	131-139	26	110112
	DTYSGHLVL	240-248	26	110118
	SVGEVLQTL	933-941	26	110120
	EVLQTLRSM	936-944	25	110222
	ATVALINRF	1102-1110	25	110231
	KVSGTVITL	700-708	24	110245
	DPEDVLLTL	741-749	23	100054
	Dekamere			
	DTFVSVALGEL	1125-1135	34	111050
	DTVRYDYGHY	384-394	31	111052
	ETVLRQSLRL	970-980	31	111054
	EVQHGPETVL	964-973	28	110079
	DVLLTLHLHL	744-753	27	110111
	EVEERSVGEV	928-937	27	110129
	TVITLGEQGY	704-713	25	111160
BLLF1	Nonamere			
	DVGGKKHQL	53-61	28	110080
	ETVPYIKWD	155-163	27	110107
	EAALLVCQY	2-10	26	110130
	YTIQSLIHL	10-18	25	110235
	Dekamere			
	ETDFKCKWTL	359-368	27	110125
	RTFDITVSGL	387-396	26	110187
EBNA3	Nonamere			
	DTSEPCEAL	850-858	27	110040
	DTRAIDQFF	116-124	26	111030
	PVSPAVNQY	821-829	26	110041
	SVRDLRLARL	596-604	24	8226
	IVQSCNPRY	239-247	21	70338
	TVALERPVI	542-550	21	70337
	Dekamere			
	DVVQHQLDAL	799-808	35	70460, 110043
	EVPSTSVVQE	18-27	26	110127
	ETAQAWNAGF	184-193	26	70461
	EVQPPQLTQV	616-625	26	110176
	EVLDSLHGR	885-995	25	100243
	EPVPVPTVAL	404-413	24	71090
	PTVALERPVI	541-550	22	80094
EBNA4	Nonamere			
	DVHTRQPRF	89-97	26	110128
	EVPPVPRQR	708-716	22	101200
	LVSSGNTLY	259-267	21	110163
	AVTQAPTEY	843-851	21	110167
	DLRPLGSLF	122-130	20	110170
	TVYGRPAVF	393-401	19	110173

	Dekamere			
	EPISPEIGPF	38-47	28	110076
	EVMEQRVMAT	514-523	27	110139
	DEGTRHATTY	209-218	19	90172
	EEDKSGMESL	372-381	19	90173
EBNA6	Nonamere			
	ETGPPRLQL	856-864	29	110072
	DVIEVIDVE	509-517	28	110085
	EVIDVETTE	512-520	26	110138
	DLIELCGSL	262-270	25	110233
	EPPPPQAPY	765-773	21	101106
	EPPAPQAPY	752-760	20	100059
	Dekamere			
	EENLLDFVRF	281-290	18	71138
	DPDAPLDLSL	724-733	18	90171
	DTEDNVPPWL	89-98	25	110236
	EVIDVETTED	512-521	25	110238
LMP1	Nonamere			
	DLILLIHAL	150-158	27	80053
	ATIWQLLAF	135-143	26	110177
	Dekamere			
	DLILLIHALY	150-159	26	70466
	ATIWQLLAFF	135-144	24	70467
LMP2	Nonamere			
	PVFMCLGGL	422-430	27	70468
	DAVLQLSPL	260-268	25	70494
	TVVSMTLLL	273-281	25	80057
	TVLTAVVTF	183-191	24	70311
	TVCGGIMFL	243-251	23	60110
	LIVDAVLQL	257-265	23	60113
	Dekamere			
	TVVSMTLLLL	273-282	29	70509
	TVVTATGLAL	150-159	26	70507
	VTVLTAVVTF	182-191	25	71238
	ESEERPPTY	484-493	22	50347, 70020, 110293

ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

Die Arbeit wurde am Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Hans-Georg Rammensee und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Stefan Stevanović durchgeführt. Die Konzeption der Arbeit erfolgte durch den Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Stefan Stevanović, die Einarbeitung durch Dr. rer. nat. Christina Kyzirakos.

Die Autorin selbst führte die Epitopvorhersagen, Epitoprecherchen sowie die intrazellulären Zytokinfärbungen und HLA-Tetramerfärbungen durch. Eine Unterstützung bei den ELISpot-Assays erfolgte durch Dipl. biol. Corina Heller. Die Peptidsynthese sowie Peptidaufreinigung wurden zum Teil von Frau Nicole Bauer und Frau Patricia Hrstić durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Bremen, den 11.06.2019

DANKSAGUNG

Zunächst gilt mein herzlicher Dank Prof. Dr. Stefan Stevanović für die Überlassung des Themas, die konstruktive Betreuung, das entgegengebrachte Vertrauen und die Geduld.

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee danke ich für die Aufnahme an sein Institut und die freundliche sowie ermutigende Art.

Außerdem möchte ich Dr. Christina Kyzirakos für die geduldige Einarbeitung in die angewendeten Verfahren sowie die Hilfestellung bei Fragen und Problemen danken.

Des Weiteren danke ich Dipl. biol. Corina Heller für die Unterstützung bei den ELISpot-Assays, sowie Nicole Bauer und Patricia Hrstić für die Hilfe bei der Peptidherstellung.

Mein Dank gilt auch dem Integrierten Graduiertenkolleg „Immuntherapie“ des SFB 685 für das Stipendium und die lehrreichen Veranstaltungen sowie allen Elchen für eine bereichernde Zeit.

Schließlich möchte ich meinen Eltern danken für die Möglichkeiten, die sie mir eröffnet haben, und die Unterstützung, die sie mir immer zuteil haben werden lassen, sowie meinem Ehemann für den positiven Zuspruch.