

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Angeborene und adaptive Immunreaktionen in der
Frühphase der Epstein-Barr-Virus-Infektion**



von

Stefanie Iskra

aus

Bobingen

2010

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. W. Hammerschmidt betreut und von Herrn Prof. Dr. H. Domdey vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 29. 01. 2010

Stefanie Iskra

Dissertation eingereicht am	29. 01. 2010
1. Gutachter	Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt
2. Gutachter	Prof. Dr. Horst Domdey
Mündliche Prüfung am	10. 05. 2010

Teile dieser Arbeit werden wie folgt veröffentlicht:

Stefanie Iskra, Markus Kalla, Henri-Jacques Delecluse, Wolfgang Hammerschmidt, Andreas Moosmann. **Toll-like receptor agonists synergistically increase proliferation and activation of b cells by Epstein-Barr virus.** J Virol. accepted for publication.

Stefanie Iskra, Simon Jochum, Reinhard Zeidler, Wolfgang Hammerschmidt, Andreas Moosmann. **Epstein-Barr virus lytic antigen-specific CD8+ t-cells detect early infection of b cells.** In Arbeit.

FÜR MICH.....

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1. ABKÜRZUNGEN.....	10
2. EINLEITUNG	13
2.1 Das Epstein-Barr-Virus	13
2.1.1 Infektion mit EBV	13
2.1.2 Wachstumstransformation durch EBV	15
2.1.3 Lytische Replikation von EBV	18
2.1.4 EBV-assoziierte Lymphome.....	19
2.2 EBV-T-Zell-Interaktion – Mechanismen der EBV-Erkennung durch die adaptive Immunität.....	20
2.2.1 T-Zell-Kontrolle der PTLD	21
2.2.2 EBV-spezifische CD8+ T-Zell-Erkennung	21
2.2.3 Dominanz spezifischer T-Zellen gegen lytische IE- und E-EBV-Antigene.....	22
2.3 Mechanismen der Erkennung von Bakterien und Viren bei der angeborenen Immunität	25
2.3.1 Toll-like-Rezeptoren	25
2.3.2 Virale Erkennung im Zytosol	31
2.4 Virale Ausnutzung der antiviralen PRR-Signale	34
2.5 Zielsetzungen	38
2.5.1 Zielsetzung: T-Zellerkennung EBV-infizierter B-Zellen früh nach der Infektion.....	38
2.5.2 Zielsetzung: Einfluss der TLR-Aktivierung auf die EBV-Infektion.....	38
3. MATERIAL UND METHODEN	41
3.1. Geräte und technisches Zubehör	41
3.2 Material.....	41
3.2.1 Blutspender	41
3.2.2 Zelllinien	42
3.2.3 Toll-like-Rezeptor-Liganden	43
3.2.4 T-Zellklone	43
3.3 Methoden	44
3.3.1 Kultivierung von Zellen	44
3.3.2 Ermittlung der Zellzahl	44
3.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	45
3.3.4 Reinigung primärer humaner Lymphozyten.....	45
3.3.5 Generierung und Kultivierung von T-Zellklonen.....	46
3.3.6 Peptidtitration und Erkennungssassay	46
3.3.7 ELISA	47
3.3.8 Färbungen für die Durchflußzytometrie	48
3.3.9 Apoptose Messung	50
3.3.10 Isolation und Depletion von B- und T-Zellpopulationen.....	50
3.3.11 Methoden zur Gewinnung und Quantifizierung von Viren und Pseudovirionen.....	52
3.3.12 Infektions- und Pseudoinfektionsansätze.....	54
3.3.13 Zeitlicher Verlauf der T-Zell-Erkennung (pseudo-)infizierter B-Zellen in der frühen Phase nach der Infektion	55
3.3.14 Zytotoxizitätsanalyse.....	56
3.3.15 Regressionsassays	56
3.3.16 MTT-Test.....	56
3.3.17 Quantifizierung der EBV-Freisetzung durch CpG-DNA-stimulierte LCL	57
3.3.18 Graphische und statistische Auswertung	57
4. ERGEBNISSE	59
T-Zellerkennung EBV-infizierter B-Zellen früh nach der Infektion	59

Inhaltsverzeichnis

4.1 Quantifizierung von Viren	59
4.2 Quantifizierung und Normierung von Pseudovirionen	63
4.3 Primärinfektion mit EBV	64
4.4 Charakterisierung der generierten EBV-spezifischen CD8+ T-Zellklone	66
4.5 Erkennung von IE-Antigenen früh nach der EBV-Infektion.....	69
4.6 Erkennung von Latenzantigenen in der Frühphase der Infektion.....	71
4.7 Beginn der Erkennung von IE- und Latenzantigenen.....	73
4.8 Proliferation IE-antigen-spezifischer T-Zellen früh nach Infektion	74
4.9 Late-Antigen-Erkennung in der Frühphase der Infektion	76
4.10 E-Antigenerkennung in der frühen EBV-Infektion	78
4.11 Charakteristika der frühen Antigenpräsentation	79
4.12 Inhibition der EBV-Transformation durch IE-antigen-spezifische CD8+ T-Zellen	81
4.13 Lyse kurzzeit-infizierter B-Zellen durch primäre IE-antigen-spezifische CD8+ T-Zellen	82
Zusammenfassung der Ergebnisse des 1. Teils	85
Einfluss der TLR-Aktivierung auf die EBV-Infektion	87
4.14 Gesteigerte B-Zell-Transformation in Anwesenheit von CpG-DNA während einer EBV-Infektion	87
4.15 Gründe für eine gesteigerte Transformation in Anwesenheit von CpG-DNA	92
4.16 Einfluss von CpG-DNA auf die Transformation von naiven B-Zellen und Gedächtnis-B-Zellen	98
4.17 Pro-virale Effekte weiterer B-Zell-spezifischer TLR-Agonisten	100
4.18 T-Zell-Erkennung der in Anwesenheit von CpG-DNA infizierten B-Zellen	103
4.19 Einfluss von CpG-DNA auf etablierte LCL	108
Zusammenfassung der Ergebnisse des 2. Teils	110
5. DISKUSSION	113
T-Zellerkennung EBV-infizierter B-Zellen früh nach der Infektion	113
5.1 Erklärungsmodelle der Immundominanz IE-antigen-spezifischer CD8+ T-Zellen in der akuten IM und im gesunden Träger	117
5.2 Anwendungsmöglichkeit der frühen Antigenerkennung in der Therapie gegen PTLD.....	120
Einfluss der TLR-Aktivierung auf die EBV-Infektion	122
5.3 Gesteigerte B-Zell-Transformation in Anwesenheit von CpG-DNA während einer EBV-Infektion	123
5.4 Pro-virale Effekte weiterer TLR-Agonisten.....	126
5.5 Modell: TLR-Signale in der Ausbildung der IM.....	127

Inhaltsverzeichnis

5.6 Modell: TLR9-induzierte Reaktivierung und PTLD	129
5.7 Modell: TLR9-Signale in der Ausbildung des endemischen BL.....	130
6. AUSBLICK	135
T-Zellerkennung EBV-infizierter B-Zellen früh nach der Infektion	135
Einfluss der TLR-Aktivierung auf die EBV-Infektion	135
7. ZUSAMMENFASSUNG.....	138
T-Zellerkennung EBV-infizierter B-Zellen früh nach der Infektion	138
Einfluss der TLR-Aktivierung auf die EBV-Infektion	138
8. LITERATURVERZEICHNIS	141
9. LEBENSLAUF.....	155

Abkürzungen

1. Abkürzungen

Hier sind nur die wichtigsten, für das Verständnis notwendigen Abkürzungen aufgenommen. Über Spender-Codierungen (2-Buchstaben-Code) informiert 3.2.1, zu T-Zell-Epitopen (3-Buchstaben-Code) siehe 3.2.4.

APC	Antigen-präsentierende Zelle / Allophycocyanin
CFSE	5,6-di-Carboxyfluoresceindiacetat
CpG-DNA	5'- TCG-TCG-TTT-TGT-CGT-TTT-GTC-GTT-3' – TLR9-Ligand
CsA	Cyclosporin A
CMV	Cytomegalovirus, ein Herpesvirus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpc	days post CpG-DNA treatment – Tage nach Behandlung mit CpG-DNA
dpi	days post infection – Tage nach der Infektion
ds	doppelsträngig
E	early
EBV	Epstein-Barr-Virus, Bezeichnung für die Viren
GFP	green fluorescent protein
FACS	Durchflußzytometrie
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
IE	immediate early
IL	Interleukin
IFN	Interferon
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Lipoteichonsäure
M	Molar
min	Minute – minütiger
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
Pam3CSK4	Synthetisches Lipoprotein, Palmitoyl-3-Cysteinyl-Seryl-Lysin

Abkürzungen

PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PE	Phycoerythrin
PECy5	Phycoerythrin Cy5
PRR	pattern recognition receptors
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonucleinsäure
TE	Transformierende Einheit
TLR	Toll-like-Rezeptor
TLRL	Toll-like-Rezeptor-Ligand
TR-	Bezeichnung für genomleere Pseudovirionen, produziert durch 293/TR-
<i>S. aureus</i>	Staphylococcus aureus
ss	Einzelstrang
SSC	Seitwärtsstreulicht
U	Unit
U/min	Umdrehung pro Minute

Einleitung

2. Einleitung

2.1 Das Epstein-Barr-Virus

Das Epstein-Barr-Virus (EBV), eines der acht humanen Herpesviren, wurde 1964 von Tony Epstein und der Doktorandin Yvonne Barr aus den Zellen eines Burkitt-Lymphoms (BL) isoliert (Epstein, Achong, and Pope, 1967). Es besitzt ein doppelsträngiges, lineares DNA-Genom von 172 Kilobasen, das etwa 80 - 100 verschiedene Proteine kodiert. Wie andere Herpesviren weist das EBV-Viruspartikel einen typischen Aufbau aus Lipidhülle, Tegument, ikosaedrischem Kapsid und DNA-haltigem Core auf. Es infiziert überwiegend B-Zellen und etabliert nach der Primärinfektion eine lebenslange Latenz im Träger. In der Latenz vermehrt sich das Virus in der Regel synchron mit dem Zellzyklus der Wirtszelle. Erfolgt eine Reaktivierung des Virus aus dieser Phase, tritt die infizierte Zelle in die lytische Vermehrungsphase mit Virusneubildung ein (Kieff, 2001).

2.1.1 Infektion mit EBV

EBV infiziert naive und Gedächtnis-B-Zellen über die direkte Bindung des Glykoproteins gp350/220 an den Komplementrezeptor CD21 (Nemerow et al., 1987). Die Interaktion des gp42 mit dem MHC-II-Molekül auf der B-Zelloberfläche führt zur Aufnahme des Virus (Silva et al., 2004). Nach der Aufnahme zirkularisiert die lineare, virale DNA und wird in den Zellkern transportiert. Die Bindung von EBV an die B-Zelle induziert verschiedene Signalwege, welche zum einen wichtig für die effiziente Transkription des viralen Genoms sind (Sinclair and Farrell, 1995) und zum anderen zur Expression des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 führen (D'Addario et al., 2001). IL-6 ist ein essentieller Faktor für die finale Reifung der B-Zelle zu antikörper-produzierenden Plasmazelle und wirkt, zusammen mit IL-2, bei der Differenzierung der T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen mit. Auch ist IL-6 ein wichtiger Regulator der Akute-Phase-Reaktion und stimuliert in diesem Zusammenhang die Synthese und Freisetzung der Akute-Phase-Proteine (Kishimoto, 1989). Weiter wirkt IL-6 als potenter Kofaktor in der Expansion der hämatopoetischen Vorläuferzellen (Bernad et al., 1994).

Der Ort der Primärinfektion ist vermutlich das lymphatische Gewebe des Hals-Nasen-Rachenraums. Die Primärinfektion mit dem Virus ereignet sich gewöhnlich im frühen Kindesalter über Schleimhautkontakt und bleibt oft symptomlos. Dagegen kann eine Verzögerung bis ins Jugendliche- oder Erwachsenenalter in 50 % der Fälle zu einer

Einleitung

Infektiösen Mononukleose (IM) führen. Diese Krankheit äußert sich durch Fieber, Mandelentzündung und geschwollene Lymphknoten. Durch Beobachtungen des Krankheitsverlaufs dieser Patienten konnte ein Modell für die Primärinfektion und die Etablierung der Latenz im Träger erarbeitet werden (Young and Rickinson, 2004).

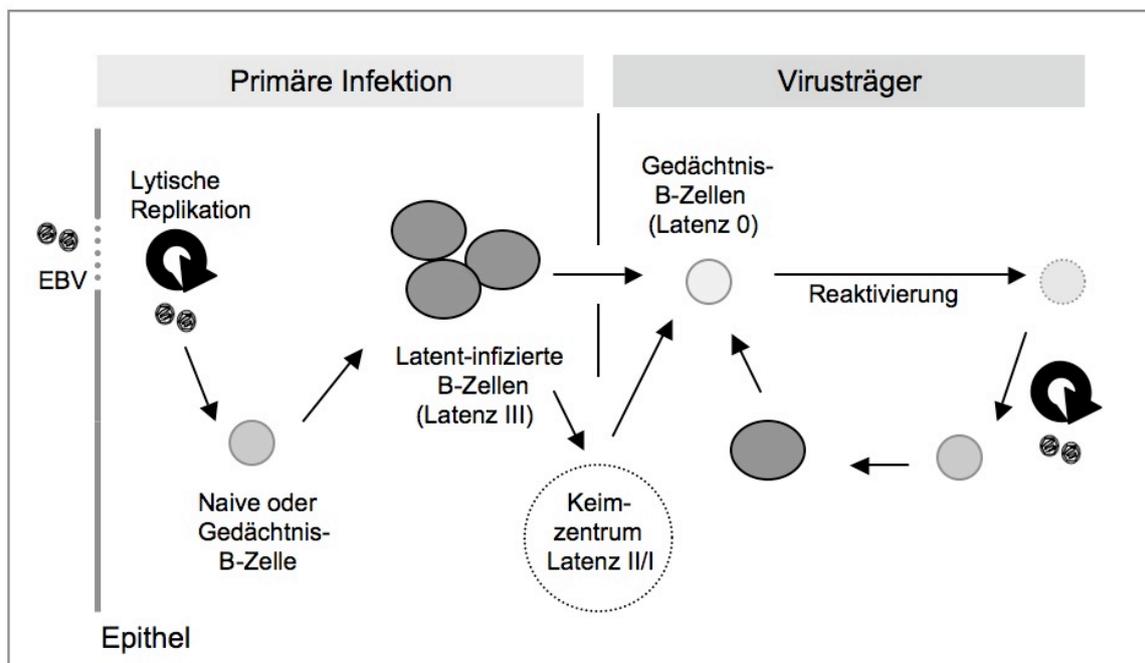


Abbildung 2.1: Modell der Interaktionen von EBV mit dem Wirt. Nach der Infektion repliziert das Virus in einem permissiven Zelltyp im Rachenraum, wahrscheinlich in Epithelzellen. Das in den Rachenraum abgegebene Virus infiziert B-Zellen in der Nähe des Epithels. Diese Zellen exprimieren Latenz-III-Proteine von EBV und können durch spezifische T-Zellen erkannt und eliminiert werden. Im Virusträger befinden sich die infizierten B-Zellen im ruhenden Zustand und weisen Marker von Gedächtnis-Zellen auf. In diesen ruhenden Latenz-0-Zellen werden keine Proteine exprimiert und es kommt zu keiner Immunantwort. Eine Reaktivierung des Virus in den ruhenden Zellen kann unter anderem durch Antigenbindung an den B-Zell-Rezeptor und der Aktivierung der B-Zelle erfolgen und Virusproduktion und Neuinfektion starten. Naive, infizierte B-Zellen differenzieren im Keimzentrum zu Gedächtnis-B-Zellen. (Rickinson, 2001; Thorley-Lawson and Gross, 2004; Young and Rickinson, 2004).

Die Symptome einer IM treten 4 - 6 Wochen nach der Infektion auf. Zu diesem Zeitpunkt tragen Patienten eine hohe Virusmenge im Speichel (Gerber et al., 1972). Es wird daher angenommen, dass das Virus aus lytisch-gewordenen Epithelzellen oder aus B-Zellen stammt, die sich in der Nähe des Epithels befinden (Anagnostopoulos, Hummel, and Stein, 1995; Rickinson, 2001). Neben der Virusreplikation im Speichel werden auch infizierte B-Zellen in der Peripherie von IM-Patienten gefunden (Pope, 1967). Während der akuten IM kann eine

Zelle in 10^4 B-Zellen mit EBV infiziert sein (Hislop et al., 2007b; Yao et al., 1989). Diese B-Zellen exprimieren latente Antigene von EBV (Latenz III) (Lewin et al., 1990; Tierney et al., 1994) und können so durch eine primäre, spezifische T-Zell-Antwort eliminiert werden. Diese Elimination scheint offenbar unvollständig zu sein, da im Virusträger einige latent-infizierte B-Zellen weiterhin detektierbar bleiben (Nilsson et al., 1971). Hier findet sich noch eine infizierte Zelle unter 10^6 B-Zellen (Miyashita et al., 1995). Im Gegensatz zu dem in der IM-Situation festgestellten aktivierten Latenz-III-Phänotyp liegen die infizierten B-Zellen des asymptomatischen Trägers in der nicht-zirkulierenden G0-Phase vor und besitzen Oberflächenmarker einer Gedächtnis-B-Zelle (Babcock et al., 1998; Miyashita et al., 1995). Diese ruhenden B-Zellen exprimieren keine EBV-Proteine, man spricht daher von der Latenz 0. Denkbar ist, dass diese Zellen vor der Erkennung durch spezifische T-Zellen geschützt sind und das stabile Virusreservoir des Trägers darstellen (Rickinson, 2001). Da auch im gesunden Träger konstant kleine Mengen an Virus gebildet werden, wird davon ausgegangen, dass Latenz-0-Zellen reaktiviert werden und neue Infektionsherde bilden können (Al Tabaa et al., 2009). Ein Wiedereinstieg in die Latenz ist wahrscheinlich (Rickinson, 2001). Im Zuge der Keimzentrumsreaktion werden für die infizierten, naiven B-Zellen die Latenzen II und I diskutiert (Babcock and Thorley-Lawson, 2000; Küppers, 2003). Gegenüber der Latenz III wird in diesen Phasen ein reduziertes Proteinspektrum gefunden (siehe 2.1.4). In Abbildung 2.1 ist ein graphisches Modell der Abläufe einer EBV-Infektion und die Situation im Träger dargestellt (Hadinoto et al., 2008; Rickinson, 2001; Young and Rickinson, 2004).

2.1.2 Wachstumstransformation durch EBV

Lymphoblastoide Zelllinien (LCL) entstehen durch die *in vitro* Infektion von B-Zellen mit EBV. LCL weisen eine gesteigerte Expression von Aktivierungsmarkern (wie CD23) und Adhäsionsmolekülen (wie ICAM1, LFA1, -3) auf (Young and Rickinson, 2004). Sie exprimieren bis zu 9 latente EBV-Proteine (Latenz III). Diese sind die Epstein-Barr-nukleären Proteine EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C und EBNA-LP sowie die latenten Membranproteine LMP1, LMP2A und LMP2B. Zusätzlich werden nicht-kodierende kleine RNA detektiert (Transkripte der BamHI-A-Region und die (Epstein-Barr-) exprimierten RNAs EBER1 und EBER2) (Rickinson, 2001).

EBNA2 wird von der infizierten Zelle als eines der ersten EBV-Proteine gebildet (Alfieri, Birkenbach, and Kieff, 1991) und aktiviert zelluläre Gene wie das mit der B-Zellaktivierung assoziierte Oberflächenmolekül CD23 und virale Gene, welche für LMP1 und LMP2 kodieren

Einleitung

(Kieff, 2001). Neben EBNA1, das für den Erhalt des viralen Genoms in der Zelle zuständig ist, zählen EBNA2 und LMP1 zu den Schlüsselproteinen für die Wachstumstransformation der infizierten B-Zelle (Wang et al., 1990).

LMP1 ist ein funktionales Homolog zu CD40 (Kilger et al., 1998). CD40 ist ein Schlüsselrezeptor auf B-Zellen, welcher im Keimzentrum bei der Interaktion mit CD154 auf der T-Helferzelle Überlebenssignale in die B-Zelle weiterleiten kann. Es stellt ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie dar. Über eine TNF-Bindedomäne kann CD40 mit einer Vielzahl an Mitgliedern dieser Familie interagieren und aktiviert so den *signal transducer and activator of transcription* (STAT), das *activator protein-1* (AP-1) und den *nuclear factor- κ B* (NF κ B).

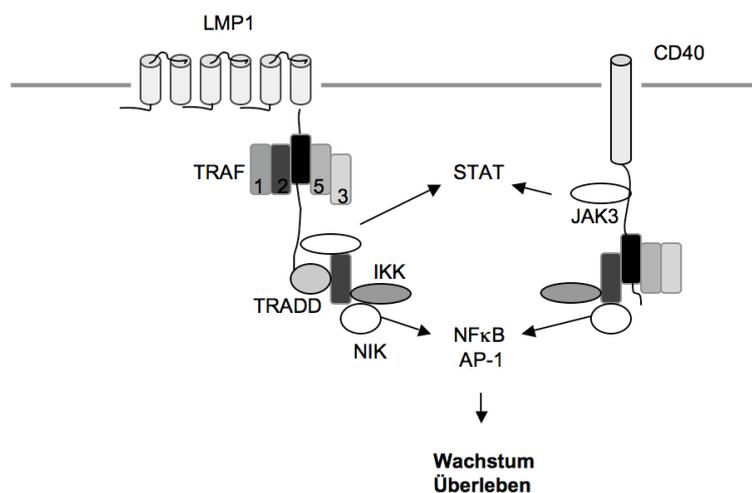


Abbildung 2.2 : Homologie in der Signalgebung zwischen LMP1 und CD40. Das konstitutiv aktive LMP1 ist ein funktionales Homolog zu CD40. Beide interagieren über eine TRAF-Bindedomäne mit Mitgliedern der TRAF-Familie. Signalgebung durch LMP1 und CD40 aktiviert STAT, NF κ B und AP-1 und induziert so Wachstum und Überleben. *Inhibitory κ B kinase*: IKK; *NF- κ B-inducing kinase*: NIK; Schwarze Vierecke: PXQXT, TRAF-Bindedomäne, angelehnt an Thorley-Lawson, 2001.

LMP1 ist ein Membranprotein mit einem kurzen aminoterminalen Ende, sechs hydrophoben, membrandurchspannenden Domänen und einem zytosolischen Carboxy-Terminus. Es enthält ebenfalls eine TRAF-Bindedomäne im zytosolischen Bereich. So kann LMP1, ähnlich CD40, mit Signalmolekülen der TRAF-Familie wechselwirken und Wachstum und Überleben der infizierten Zelle steuern (Dirmeier et al., 2003; Uchida et al., 1999). Anders als

Einleitung

CD40 ist LMP1 jedoch konstitutiv aktiv (Gires et al., 1997; Mosialos et al., 1995). Abbildung 2.2 zeigt schematisch die CD40-Signalnachahmung durch LMP1.

Auch das latente Membranprotein LMP2 spielt eine wichtige Rolle bei der Sicherung des Überlebens der infizierten Zelle und steuert somit indirekt einen wichtigen Anteil zur Transformation und Etablierung der infizierten Zelle bei. Die zytoplasmatischen N- und C-terminalen Domänen von LMP2A sind durch 12 Transmembran-Durchgänge verbunden. Die C-terminale Domäne des LMP2A enthält dieselben *immunoreceptor tyrosin-based activation* - (ITAM)-Motive, wie sie in der α - und β -Untereinheit des B-Zell-Rezeptors (BCR) vorkommen (Beaufils et al., 1993).

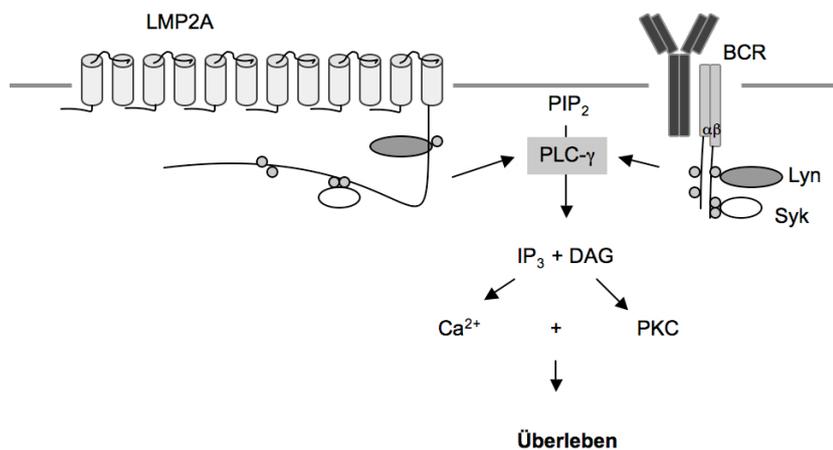


Abbildung 2.3: Homologie in der Signalgebung zwischen LMP2A und dem BCR. LMP2A setzt sich aus 12 membrandurchspannenden Domänen zusammen, die die zytoplasmatischen Domänen miteinander verbinden. Am Carboxy-Terminus von LMP2A sind ähnlich der α - und β -Untereinheit des BCR ITAM-Motive vorhanden (graue Kreise). Lyn assoziiert mit LMP2A und mit dem BCR, und es kommt zur Phosphorylierung der ITAM. Syk wird rekrutiert und die BCR-Signalkaskade mit der Aktivierung von PLC- γ und der Spaltung von Phosphatidylinositolbiphosphat (PIP₂) in Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃) initiiert. Weiter kommt es durch DAG und Ca²⁺ zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) mit der anschließenden Aktivierung von NF κ B. Über die gesteigerte Ca²⁺-Konzentration kommt es weiter zur Aktivierung von Calcineurin und NFAT. BCR-Signale induzieren die Transkription von Genen, die zur Proliferation und Differenzierung der B-Zellen führen. LMP2A-Signale wirken allerdings nicht proliferativ, sie steigern das Überleben der Zelle. Abbildung und Erklärung teilweise übernommen aus Janeway et al. 2001 und Thorley-Lawson 2001.

Wird der BCR einer B-Zelle durch die Bindung eines Antigens stimuliert, induziert dies die Aktivierung und das Wachstum der B-Zelle. In der Abwesenheit von Antigen wird vom BCR

Einleitung

ein Überlebenssignal gesendet. Dieses Signal wird von LMP2A nachgeahmt. LMP2A wie auch der BCR können die Tyrosinkinase Lyn binden (Kurosaki, 1999; Miller et al., 1995), welche die Tyrosine im ITAM-Motiv phosphoryliert, was wiederum zur Rekrutierung von Syk-Tyrosin-Kinasen führt. Die so durch LMP2A eingeleiteten Signale sichern das Überleben der infizierten B-Zelle (Caldwell et al., 1998)(Abbildung 2.3).

2.1.3 Lytische Replikation von EBV

Im Zuge der lytischen Replikation kommt es in der infizierten B-Zelle zur Expression einer Vielzahl an lytischen Proteinen. Die Einteilung dieser lytischen EBV-Proteine erfolgt nach ihrem zeitlichen Auftreten im lytischen Zyklus. Die Benennung der Gene basiert auf Größe und Orientierung der bei der Restriktion mit der Restriktionsendonuklease BamH1 entstandenen Fragmente. Die Fragmente werden ihrer Größe nach alphabetisch benannt und die einzelnen Leserahmen den Fragmenten, auf denen sie liegen, zugeordnet und durchnummeriert. Bei der Nomenklatur wird die Leserichtung berücksichtigt. So liegt z.B. das Gen von BZLF1 im ersten nach links orientierten offenen Leserahmen des nach der Restriktion durch BamH1 entstandenen Z-Fragments. Die Benennung der Proteine entspricht gewöhnlich dem des Gens. Des Weiteren werden Glykoproteine unter Verwendung ihres Molekulargewichts benannt (z.B. gp350).

Immediate early-(IE)-Proteine sind die ersten induzierten Proteine. Zu ihnen wird das BZLF1 und BRLF1 Protein gezählt. BZLF1 kann unter anderem als Transaktivator von BRLF1 wirken und zusammen mit BRLF1 die Transkription der späteren *early*-Proteine steuern (Feederle et al., 2000; Kenney et al., 1989).

Zu den *early*-(E)-Proteinen von EBV zählen BMRF1 und BMLF1. BMRF1 spielt im Zuge der viralen Replikation bei der Bildung einer aktiven EBV-DNA-Polymerase eine Rolle (Kiehl and Dorsky, 1991). BMLF1 gilt als EBV-mRNA-Transportfaktor. Über die Bindung an mRNA, kann der nukleäre Export der late-mRNA stattfinden. BMLF1 ist somit essentiell für die Virionenbildung in der lytischen Phase (Batisse et al., 2005; Gruffat et al., 2002; Semmes et al., 1998).

Die lytischen *late*-(L)-Proteine sind zum größten Teil Strukturproteine des Virus und für das erfolgreiche Verpacken der viralen DNA und der Bildung von Virionen notwendig. Ein

wichtiger Vertreter der L-Proteine ist das Hüllprotein gp350, über das die Bindung der Viruspartikel an die zu infizierende B-Zelle erfolgt (Fingeroth et al., 1984).

2.1.4 EBV-assoziierte Lymphome

EBV wird von der WHO als Karzinogen eingestuft. Dies bedeutet, dass Tumore gefunden wurden, deren Entstehung mit einer EBV-Infektion in Verbindung stehen. Tatsache ist, dass für jede Latenzstufe von EBV (außer Latenz 0) EBV-assoziierte Lymphome auftreten können.

Latenz I

Wie eingangs beschrieben wurde EBV erstmals aus einer BL-Zelllinie isoliert. Dieser Entdeckung war die Beschreibung eines neuen B-Zell-Lymphoms (heute bekannt als BL) durch den Chirurgen Dennis Burkitt vorausgegangen (Burkitt, 1958). Dieses maligne Lymphom manifestiert sich bevorzugt bei Kindern, primär im Hals-Nasen-Rachenraum oder im Abdomen. Die endemische Form des Lymphoms ist zu 95 % mit EBV-assoziiert und findet sich überwiegend in den Gebieten Äquatorialafrikas mit holoendemischem Malariavorkommen. Dies legt die Vermutung nahe, dass bei der Entstehung dieser BL-Form Malaria als Kofaktor wirkt (Chêne et al., 2007). Die sporadische Form der BL findet sich dagegen in der westlichen Welt und stellt ein zunehmendes Problem bei einer HIV-Infektion dar. Auch hier kann EBV zu 8 - 17 % in den Lymphomen gefunden werden. Eine charakteristische, chromosomale Veränderung des BL ist die Translokation t(8,14) oder t(2,8). Betroffen hierbei ist das c-myc Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 8 und ein Teil der schweren oder leichten Kette der Immunglobuline. Durch die Translokation gelangt c-myc unter die transkriptionelle Kontrolle des Immunglobulins, was zu einer Fehlregulation des c-myc und infolgedessen zu einer unkontrollierten Zellteilung führt (Klein, 1983). Die Zellen des BL exprimieren neben den EBER als einziges EBV-Protein EBNA1 (Latenz I).

Latenz II

Im Hodgkin Lymphom, das zu 40 % (Westliche Welt) und 99 % (Lateinamerika) mit EBV-assoziiert ist, werden die für die Transformation wichtigen Proteine LMP1, LMP2A aber auch EBNA1 exprimiert. Dieses Expressionsmuster wird mit Latenz II beschrieben.

Latenz III

Besonders in Fällen geschwächter Immunität, wie sie im immunsupprimierten Patienten nach einer allogenen Knochenmarkstransplantation auftritt, kann EBV eine wesentliche Rolle bei

der Ausbildung der sogenannten „*post-transplant lymphoproliferative disease*“ (PTLD) spielen. PTLD ist eine lebensbedrohliche Krankheit und kann sich noch bis ein Jahr nach der Transplantation entwickeln (Gottschalk, Rooney, and Heslop, 2005). Die Mehrheit der PTLD sind B-Zell-Lymphome und mit bis zu 90 % mit EBV-assoziiert (Snow and Martinez, 2007). Man geht davon aus, dass sie durch die Verschiebung der Balance von EBV-infizierten B-Zellen und spezifischen T-Zellen unter Immunsuppression entstehen. Diese Verschiebung führt dann zu einer unkontrollierten Expansion der EBV-infizierten B-Zellen im Transplantatempfänger (Babcock et al., 1999; Zutter et al., 1988).

2.2 EBV-T-Zell-Interaktion – Mechanismen der EBV-Erkennung durch die adaptive Immunität

Zu den wichtigsten Effektorzellen des adaptiven Immunsystems gehören die zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen. Diese Zellen sind in der Lage, virusinfizierte Zellen zu erkennen und zu eliminieren, indem sie über spezifische Antigen-Rezeptoren (TCR) virale, also zellfremde, durch *major histocompatibility complex I* (MHC I) Moleküle präsentierte Peptide auf der Zelloberfläche der infizierten Zelle detektieren.

Peptide, die durch MHC-I-Moleküle präsentiert werden, stammen in der Regel von intrazellulären Antigenen. Diese Antigene wurden durch das Proteasom und weitere Proteasen im Zytosol abgebaut und die generierten Peptide über die „Transporter assoziiert mit Antigenpräsentation“ (TAP1 und -2) in das endoplasmatische Retikulum transportiert. Dort bilden sie Komplexe mit den in der ER-Membran synthetisierten MHC-Molekülen. An der Zelloberfläche werden die Peptid/MHC-I-Komplexe den spezifischen CD8⁺ T-Zellen präsentiert. Nach Erkennung des Peptid/MHC-I-Komplexes kommt es zur Lyse der infizierten Zelle durch Freisetzung von Perforin und Granzym sowie zur Expansion der spezifischen Lymphozytenpopulation. Alternativ kann die Expression des Fas-Liganden induziert werden. Dieser bindet Fas auf der infizierten Zelle und leitet deren Apoptose ein. Unterstützung bekommen die CD8⁺ T-Zellen von CD4⁺ T-Zellen, welche Peptide exogener Pathogene auf MHC II erkennen und als CD4⁺ T-Helfer-(T_H)-Zellen, Makrophagen und B-Zellen zur Reaktion auf Antigene aktivieren und CD8⁺ T-Zellen bei ihrer Funktion durch verschiedene Mechanismen unterstützen können (Janeway et al., 2001; Vyas, Van der Veen, and Ploegh, 2008).

Einleitung

Nach erfolgreicher Elimination des Pathogens nimmt die Anzahl der antigen-stimulierten, expandierten, spezifischen T-Zellen wieder ab. Einige Effektorzellen bleiben erhalten und bilden ein immunologisches Gedächtnis. Dies ermöglicht eine schnelle Reaktion des Immunsystems auf eine erneute Infektion mit dem Erreger.

2.2.1 T-Zell-Kontrolle der PTLD

Bei frühzeitiger Diagnose der PTLD kann den Patienten (1 - 20 %) durch die Infusion von EBV-spezifischen T-Zellen des Transplantatspenders geholfen werden. Dies ist möglich, da die Zellen des Lymphoms vom Spender des Transplantats herrühren und das Latenz-III-Protein-Spektrum (Young et al., 1989) wie auch lytische EBV-Proteine (Montone et al., 1996) exprimieren und somit durch die infundierten EBV-spezifischen T-Zellen eliminiert werden können. Die Wichtigkeit der T-Zellen in der Kontrolle der EBV-assoziierten PTLD wurde durch die Arbeiten von Rooney et al. erstmals in klinischen Studien verifiziert. Die Transfusion von EBV-spezifischen, zytotoxischen T-Zellen als adoptive Immuntherapie wurde hier zum einen bei Transplantatempfängern mit hohem Risiko, an einer PTLD zu erkranken eingesetzt, und zum anderen zur Behandlung der akuten Erkrankung herangezogen. Die Hochrisikopatienten zeigten 2 - 3 Wochen nach Infusion der T-Zellen eine Abnahme der Virus-DNA im Blut, es konnte auch kein Auswachsen transformierter B-Zellen *in vitro* beobachtet werden. Keiner der behandelten Patienten erkrankte daraufhin an PTLD. Für zwei Patienten mit akuter PTLD konnte ein Rückgang des Lymphoms erzielt werden. Die PTLD-Biopsie eines dieser beiden Patienten zeigte sogar die Einwanderung der transferierten T-Zellen in das Lymphom. Dieser Patient erfuhr eine vollständige Elimination des Lymphoms (Rooney et al., 1998). Ähnliche Erfolge in der PTLD-Therapie konnten von Gottschalk et al, Papadopoulos et al. und Moosmann et al. beschrieben werden (Gottschalk, Heslop, and Rooney, 2005; Moosmann et al., 2010; Papadopoulos et al., 1994).

2.2.2 EBV-spezifische CD8+ T-Zell-Erkennung

Wie bereits angesprochen kann die Primärinfektion mit EBV im Jugendlichen- und Erwachsenenalter zu einer Infektiösen Mononukleose (IM) führen. IM ist eine selbstlimitierende Krankheit und geht einher mit Fieber, Mandelentzündung, geschwollenen Lymphknoten und einer untypisch hohen Anzahl an mononukleären Zellen wie CD8+ T-Zellen, CD4+ T-Zellen und natürliche Killer-(NK)-Zellen im Blut (Young and Rickinson, 2004). Während einer IM sind die spezifischen CD8+ T-Zellen aktiviert und exprimieren

CD38 und CD45RO auf der Oberfläche, weiter besitzen diese Zellen zytotoxische Funktion (Callan et al., 2000).

In vivo Untersuchungen des TCR-Repertoires der CD8⁺ T-Zellen im Blut von IM-Patienten konnten eine klonale oder oligoklonale Expansion EBV-antigen-aktivierter T-Zellen zeigen (Callan et al., 1996). Dies zeigt, dass es in der primären Antwort auf EBV zu einem starken Anstieg an EBV-spezifischen T-Zellen kommt und diese von einer oder mehreren Epitop-Spezifitäten dominiert werden. Frühe Studien dieser T-Zell-Antwort waren auf die spezifische CD8⁺ T-Zell-Antwort gegen latente Proteine von EBV fokussiert. Hierbei wurden verstärkt spezifische T-Zellen gegen die EBNA3 Proteine und gegen das LMP2 Protein gefunden (Lee et al., 1993; Murray et al., 1992). Die EBV-T-Zell-Antwort gegen Proteine des lytischen Zyklus wurde erstmals 1995 beschrieben. Scotet et al. klonierten aus der Gelenksflüssigkeit von Arthritispatienten T-Zellen, die spezifisch für das IE-Antigen BZLF1 und das E-Antigen BMLF1 von EBV waren und somit für die Kontrolle der reaktivierten B-Zelle wichtig sind (Scotet et al., 1996). Da Arthritispatienten eine erhöhte EBV-Viruslast zeigen, steht EBV im Verdacht, an der Ausbildung der chronischen Arthritis beteiligt zu sein (Balandraud, Roudier, and Roudier, 2004). Ein Jahr später wurden aus dem Blut von IM-Patienten CD8⁺ T-Zellen kloniert, die Peptide von lytischen Proteinen auf autologen Zielzellen erkannten (Steven et al., 1997). T-Zellen dieser Spezifität wurden auch im gesunden EBV-Träger gefunden (Tan et al., 1999).

2.2.3 Dominanz spezifischer T-Zellen gegen lytische IE- und E-EBV-Antigene

Die Quantifizierung der in der Primärphase der Infektion expandierten (oligo-)klonalen CD8⁺ T-Zellen wurde mit Hilfe von Peptid-HLA-Tetrameren untersucht. Entgegen der Vermutung, dass durch die Existenz der Latenz-III-Protein-exprimierenden B-Zellen im IM-Patienten die CD8⁺ T-Zell-Antwort gegen latente Antigene dominieren sollten, zeigte diese direkte Visualisierung eine Dominanz der CD8⁺ T-Zellen gegen lytische IE- und E-Proteine von EBV auf. So wurden beispielsweise von Callan et al. 2003 bei der Untersuchung von IM-Blut, bei einzelnen Patienten bis zu 44 % BZLF1-spezifische CD8⁺ T-Zellen (IE) und 12 % BMLF1-spezifische CD8⁺ T-Zellen (E) gefärbt (Callan, 2003). Parallelfärbungen der TCR konnten zeigen, dass diese stark expandierten CD8⁺ T-Zellpopulationen die Verschiebung des TCR-Repertoires zu (oligo-)klonalen CD8⁺ T-Zellen induzierten (Callan, 2003; Callan et al., 2000). Die Untersuchung der CD8⁺ T-Zell-Antwort gegen latente EBV-Proteine in IM ergab, dass

Einleitung

nur 0,1 bis 5 % aller CD8⁺ T-Zellen in der akuten Phase der Infektion gegen latente Epitope aus der Proteinfamilie der EBNA3A, B und C gerichtet waren (Hislop et al., 2007b).

IM-T-Zellen sterben in der Abwesenheit von stimulierendem Antigen ab (Callan et al., 2000). Vereinzelt kann es sogar vorkommen, dass dominante Spezifitäten der Primärantwort im gesunden Träger nicht mehr auffindbar sind (Steven et al., 1996). Im Regelfall entspricht die Abnahme der in der Vergleichsstudie von Callan et al. beobachteten Verläufe. Stark expandierte T-Zellen gegen lytische EBV-Antigene nahmen dabei stärker in ihrer Anzahl ab als T-Zellen gegen latente Antigene von EBV. Zum Zeitpunkt der akuten Phase einer IM zeigten die spezifischen CD8⁺ T-Zellen gegen lytische Antigene eine Häufigkeit von 30 %. Ein Jahr nach der Primärinfektion konnten nur noch 3 % spezifische T-Zellen festgestellt werden. Hingegen nahmen die spezifischen CD8⁺ T-Zellen gegen latente Antigene von EBV beim Übergang von der akuten in die Trägerphase weniger stark ab. Hier lag der gemessene Anteil während der IM bei 1 %, d.h. die T-Zellen gegen latente Antigene waren subdominant, und reduzierte sich nach der IM leicht auf 0,8 % (Callan, 2003). Somit bleibt die Dominanz von CD8⁺ T-Zellen gegen lytische EBV-Antigene auch im gesunden Virusträger in der Regel erhalten. Das starke Häufigkeitsgefälle zwischen lytischen-antigen-spezifischen T-Zellen und T-Zellen gegen latente Antigene reduziert sich jedoch.

Im Zuge der Genesung nehmen die EBV-spezifischen Zellen einen ruhenden Zustand ein und CD38 wird nun nicht mehr exprimiert. T-Zellen gegen lytische Antigene bleiben CCR7-negativ und CD45RO-positiv. Sie bilden somit Effektor-Gedächtnis-Zellen. T-Zellen gegen latente Antigene des Virus exprimieren wieder CCR7 und CD62L und bilden Zentral-Gedächtnis-T-Zellen (Catalina et al., 2002; Hislop et al., 2005).

Die CD4⁺ T-Zellantwort wird durch EBV-Strukturproteine wie gp350 dominiert. Diese werden nach der Bindung des Virus und Aufnahme durch die B-Zelle über MHC II präsentiert und durch spezifische CD4⁺ T-Zellen erkannt und eliminiert (Adhikary et al., 2006). Auch wurden IE- und E-Proteine von EBV als Ziel in der CD4⁺ T-Zell-Antwort identifiziert (Amyes et al., 2003). Diese scheinen hier, entgegen der CD8⁺ T-Zell-Antwort allerdings nur eine untergeordnete Rolle in der Ausbildung der Dominanzhierarchien zu spielen.

In Tabelle 2.1 ist eine schematische Zusammenfassung der Häufigkeiten von T-Zellen während einer EBV-Infektion gezeigt.

EBV-Programm	Antigen (Beispiele)	Häufigkeit von CD8+ T-Zellen	Häufigkeit von CD4+ T-Zellen
IE	BZLF1 / BRLF1	++++	+
E	BMLF1	++	+
Late	gp350	+	++
Latent	EBNA3A / LMP2	++	+

Tabelle 2.1: Zusammenfassung der Häufigkeiten EBV-spezifischer T-Zellen. IE-antigen-spezifische CD8+ T-Zellen dominieren die Immunantwort in der akuten Infektion wie auch im gesunden Träger. Bei den CD4+ T-Zellen wurden vermehrt T-Zellen gegen die Strukturproteine des Virus entdeckt. ++++: sehr häufig; ++: häufig; +: selten.

Eine mögliche Erklärung dafür, dass die lytischen Antigene aus der Untergruppe der IE- und E-Proteine dominante CD8+ T-Zell-Antworten hervorrufen, wurde durch Pudney et al. erarbeitet. Dabei wurde die spezifische T-Zell-Antwort gegen IE, E und L-Proteine von EBV an in der Kultur vorkommenden lytischen LCL getestet. Dabei zeigte sich eine Hierarchie in der Erkennung der Antigene. Spezifische T-Zellen gegen frühe Antigene reagierten stärker auf LCL im lytischen Zyklus als die im lytischen Zyklus folgenden E-antigen-spezifischen T-Zellen und viel stärker als L-antigen-spezifischen T-Zellen. Diese Reihenfolge ergab sich, obwohl die L-antigen-spezifischen T-Zellklone in der Peptidtitration eine größere Avidität aufzeigten als die IE-antigen-spezifischen T-Zellen. Daraus schlossen die Autoren, dass die dominierende T-Zell-Antwort der IE-antigen-spezifischen CD8+ T-Zellen durch die höhere Effizienz der Präsentation ihrer Zielantigene verursacht wird. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass für den lytischen Zyklus permissiv gewordene B-Zellen im Rachenraum für das direkte „Priming“ dieser charakteristischen Immunantwort verantwortlich sein könnten (Keating et al., 2002; Pudney et al., 2005). Die Abnahme der Antigenpräsentation lässt sich durch die Funktion immunevasiver Proteine erklären, die EBV im Zuge des lytischen Zyklus exprimiert. So wird unter anderem das Protein BILF1 gebildet, welches eine gesteigerte Degradation von MHC I induziert. Dadurch kommt es zur Reduktion des Moleküls auf der Oberfläche (Keating et al., 2002; Zuo et al., 2009). Neben BILF1 wird auch BNLF2a exprimiert. Dieses Protein inhibiert die Translokation der Peptide durch den TAP-Transporter und führt somit ebenfalls zu einer Abnahme der Antigenpräsentation auf der infizierten B-Zelle (Hislop et al., 2007a).

2.3 Mechanismen der Erkennung von Bakterien und Viren bei der angeborenen Immunität

Bei der angeborenen Immunität werden Mikroorganismen durch Rezeptoren erkannt, die man als *pattern recognition receptors* (PRR) bezeichnet. Jeder dieser PRR erkennt dabei eine oder mehrere molekulare Strukturen (*pathogen-associated molecular patterns* - PAMPs), die bei verschiedenen Mikroorganismen vorkommen und oft ganz grundlegende Elemente des mikrobiellen Bauplans oder Lebenszyklus sind wie zum Beispiel die Lipoteichonsäure der Zellmembran gram-positiver Bakterien. Diese Fokussierung auf lebensnotwendige Grundstrukturen macht es den Erregern schwer, einer Erkennung auszuweichen.

2.3.1 Toll-like-Rezeptoren

Wichtige Vertreter der PRR sind die Toll-like-Rezeptoren (TLR). Das namensgebende Protein Toll wurde in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt. Dort übernimmt es zwei völlig verschiedene Aufgaben. Während der Embryonalentwicklung sorgt Toll für die Etablierung der dorsoventralen Polarität (Hashimoto, Hudson, and Anderson, 1988) und übernimmt bei der Abwehr von Pilzinfektionen eine wichtige Funktion (Ligoxygakis et al., 2002). Die TLR, die bei Säugetieren vorkommen, gehören zusammen mit den IL-1 Rezeptoren in die IL-1-Rezeptor-Superfamilie. Alle Mitglieder dieser Familie enthalten eine konservierte Toll/IL-1R-(TIR)-Domäne. Durch gezielte Punktmutation im konservierten Bereich konnte die TIR-Domäne als direkter Kontaktpunkt zu Molekülen der Signaltransduktion identifiziert werden (Poltorak et al., 1998b). Der extrazelluläre Bereich der TLR setzt sich aus 19-25 Leucin-reichen Repetitionen (LRR) zusammen. Jede LRR besteht aus 24-29 Aminosäuren und enthält die Sequenz XLXXLX sowie die konservierte Sequenz X ϕ XX ϕ X₄FXXLX, wobei X eine beliebige und ϕ eine hydrophobe Aminosäure darstellt. Die LRR-Domäne bildet eine hufeisenförmige Struktur aus und ist an der Erkennung des Liganden beteiligt (Bell et al., 2003).

2.3.1.1 Signalgebung durch TLRs

Nach der Erkennung eines Liganden kommt es zur Dimerisierung des TLR. Eine anschließende Konformationsänderung ermöglicht es, Signalmoleküle wie das *myeloid differentiation primary-response protein 88* (MyD88) zu rekrutieren. MyD88 besitzt am C-Terminus eine TIR-Domäne, welche mit der TIR-Domäne des Rezeptors assoziieren kann und

Einleitung

an seinem N-terminalen Ende eine *death domain* (DD), über die DD-haltige Signalmoleküle gebunden werden können. Der MyD88-Signalweg induziert eine schnelle NF κ B-Aktivierung. Dies führt zur Bildung pro-inflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin (IL)-1 β , IL-6 und IL-12 (siehe Abbildung 2.4) (Akira and Takeda, 2004).

Diese gebildeten Zytokine besitzen ein breites biologisches Wirkungsspektrum und ermöglichen Reaktionen des Körpers früh nach der Erkennung eines Pathogens. So kommt es durch TNF und IL-1 β zur Aktivierung des Endothels am Entzündungsort. Blutgefäße werden erweitert und deren Durchlässigkeit verbessert, mit dem Resultat einer erhöhten Flüssigkeitsableitung zu den Lymphknoten und einer verstärkten Wanderung von Leukozyten an den Ort der Entzündung. Weiter werden Koagulationsfaktoren induziert, welche eine lokale Gerinnung bewirken und so eine Verbreitung der Mikroorganismen durch das Blut stoppen. Hepatozyten produzieren nach Aktivierung durch IL-1 β und IL-6 Akute-Phase-Proteine, welche ihrerseits Komplement-Proteine aktivieren. Opsonierung und Phagozytose von Pathogenen durch Makrophagen ist die Folge (Medzhitov, 2007). Auch kommt es durch IL-1, IL-6 und TNF zu einer Erhöhung der Körpertemperatur. Dieser systemische Effekt vermindert die virale und bakterielle Replikation, steigert die Antigenverarbeitung und verstärkt spezifische Immunreaktionen. Monozyten, Makrophagen, aber auch B-Zellen produzieren IL-12, welches die Vermehrung von T- und NK-Zellen nach einer Antigen-vermittelten Aktivierung sowie deren lytische Aktivität reguliert. IL-12 beeinflusst auch die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu T_H1-Zellen (Janeway et al., 2001). T_H1-Zellen wiederum sind an der Aktivierung von Makrophagen beteiligt (Romani, Bistoni, and Puccetti, 1997).

Einleitung

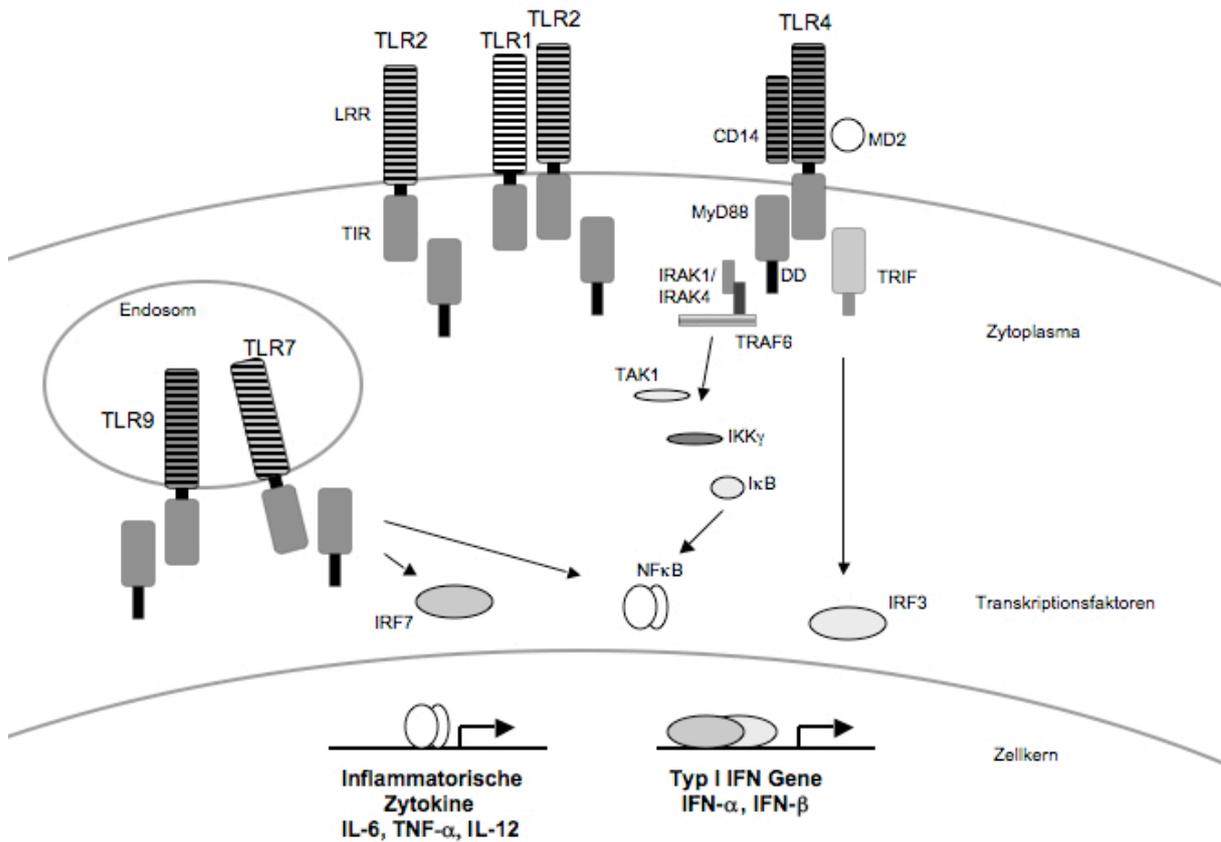


Abbildung 2.4: TLR-Signalwege. TLR-Signalwege werden durch die zytoplasmatische TIR-Domäne der Rezeptoren initiiert. Nach der Bindung des Liganden assoziiert das TIR-Domäne-tragende Adaptermolekül MyD88 mit der TIR-Domäne der TLR und rekrutiert IRAK1 und -4 und TRAF6 zum Rezeptor, welches zur Aktivierung der TAK1 führt. TAK1 aktiviert den kanonischen IKK-Komplex und die IKK γ -Untereinheit phosphoryliert I κ B. TAK1 kann auch MAP-Kinasen aktivieren. Die Transkriptionsfaktoren NF κ B sowie AP-1 translokieren in den Zellkern, und pro-inflammatorische Zytokingene wie IL-6, TNF- α und IL-12 werden transkribiert. Neben dem MyD88-abhängigen Signalweg existiert ein Signalweg, der über das TIR-haltige Adaptermolekül IRF3 Typ-I-IFN induziert. MyD88-abhängige Signalwege werden von TLR1, 2, 4 – 11 aktiviert, TRIF-assozierte Signalgebung erfolgt über die TLR3 und 4. *death domain (DD)*; *interleukin receptor-associated kinase 1 and 4 (IRAK 1 und 4)*; *tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6)*; *transforming growth factor- β -activated kinase 1 (TAK1)*; *I κ B-Kinase (IKK)*; angelehnt an Akira and Takeda, 2004.

Neben der MyD88-abhängigen NF κ B-Aktivierung und der Bildung pro-inflammatorischer Zytokine kann eine Aktivierung der TLR3 und TLR4 zu einem MyD88-unabhängigen, TRIF-abhängigen Signalweg führen. Dabei kommt es zur Aktivierung des *interferon regulatory factor*-(IRF)-3. Die IRF sind Transkriptionsfaktoren und sind für die Induktion von Typ-I-Interferonen (IFN) verantwortlich, den Schlüsselzytokinen in der antiviralen Immunantwort.

Einleitung

Typ-I-IFN werden von einem IFN- β , IFN- κ , IFN- ϵ , IFN- ω , IFN- τ , IFN- δ und mehr als 13 IFN- α Genen kodiert. IRF3 vermittelt die initiale IFN-Induktion während einer viralen Infektion (Abbildung 2.4). Neben IRF3 gelten IRF5 und IRF7 als direkte Mittler der antiviralen Immunantwort (Uematsu and Akira, 2007). Das so sezernierte Typ-I-IFN bindet an einen heterodimeren IFN-Rezeptor auf der Zelloberfläche. Dieser wird aktiviert und initiiert einen Signalweg, welcher über 300 durch IFN-stimulierte Gene induziert (Der et al., 1998). Bei infizierten Zellen haben diese Gene direkten Einfluss auf das Abschalten der Proteinsynthese und steuern die Apoptosesensibilisierung der Zelle. Durch Induktion von Effektorproteinen führt Typ-I-IFN zur Reifung von dendritischen Zellen und erhöht deren Fähigkeit zur Antigenaufnahme und Präsentation gegenüber CD8⁺ T-Zellen. Weiter werden mittels produzierter Chemokine durch die dendritische Zelle, Monozyten und Lymphozyten an den Ort der Entzündung rekrutiert. Auch wird die Antikörperproduktion durch B-Zellen sowie die Differenzierung und die Effektorfunktionen von NK- und T-Zellen gegenüber infizierten Zellen gesteigert (Akira and Takeda, 2004; Sadler and Williams, 2008; Uematsu and Akira, 2007).

Es wird deutlich, dass die Erkennung von Pathogenen durch TLR ein ganzes Arsenal an Mechanismen zur Abwehr von Bakterien und Viren eröffnet.

2.3.1.2 TLR und ihre Liganden

Mittlerweile wurden 10 verschiedene TLR beim Menschen und 11 bei der Maus identifiziert. TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 und 11 befinden sich in der Plasmamembran (Sandor and Buc, 2005). Verankert auf der Oberfläche von Zellen erkennen sie, wie in Tabelle 2.2 zu sehen ist, eine Vielzahl wichtiger Strukturbausteine von Pathogenen. Auf die Zielstrukturerkennung von TLR4 und TLR2 soll etwas näher eingegangen werden, da sie für diese Arbeit relevant sind.

TLR4

TLR4 wurde als erster humaner TLR entdeckt und ist auf die Erkennung von Lipopolysacchariden (LPS) aus der Wand gram-negativer Bakterien spezialisiert (Poltorak et al., 1998a). Zum Erreichen der Funktionalität geht TLR4 einen Komplex mit dem Oberflächenmolekül CD14 und dem extrazellulären Adapterprotein MD2 ein. Gelangt im Rahmen einer bakteriellen Infektion LPS ins Serum, so wird es über das LPS-bindende Protein gebunden und so durch CD14 erkannt. MD2 ist mit dem TLR4 über dessen extrazelluläre Region assoziiert und bindet ebenfalls LPS. Das so an den Rezeptor herangeführte LPS wird

von diesem gebunden und die Signalgebung über NFκB initiiert (Jiang et al., 2005; Manukyan et al., 2005).

TLR2

Anders als TLR4 weist TLR2 ein breites Erkennungsspektrum pathogener Strukturen auf. So werden Peptidoglykane und Lipoteichonsäuren von gram-positiven Bakterien (Schwandner et al., 1999) wie auch Lipoproteine und –peptide gram-negativer Bakterien erkannt (Brightbill et al., 1999). Auch Parasiten wie *Trypanosoma cruzi* oder Hefen (Zymosan) werden durch TLR2 erkannt (Campos et al., 2001; Underhill et al., 1999). Diese komplexe Zielstrukturerkennung wird dadurch erleichtert, dass TLR2 Heterodimere mit TLR1 und TLR6 bildet (Ozinsky et al., 2000; Takeuchi et al., 2002). Auch eine Beteiligung von TLR2 an der Erkennung einiger Viren konnte aufgezeigt werden. Zum Beispiel reagieren humane Monozyten nach der TLR2-vermittelten Erkennung des H-Proteins des Masernvirus mit der Induktion von IL-6 (Bieback et al., 2002).

TLR	Ligand	Herkunft des Liganden
TLR1	Triacyllipopeptide	Bakterien, Mykobakterien
TLR2	Lipoteichonsäure	Gram-positive Bakterien
	Lipopeptide	Gram-negative Bakterien
TLR4	Virale Proteine	Virus (HSV-1, CMV)
	Lipopolysaccharide	Gram-negative Bakterien
TLR5	Flagellin	Bakterien
TLR6	Virale Proteine	Virus (RSV, MMTV)
	Lipoteichonsäure	Gram-positive Bakterien
TLR10	Zymosan	Hefe
TLR11	N.b.	N.b.
	N.b.	Uropathogene Bakterien

Tabelle 2.2: Extrazelluläre Toll-like-Rezeptoren und ihre Liganden. N.b.: nicht bekannt. Tabelle teilweise übernommen aus Barton et al. 2007 und Akria and Takeda, 2004.

Einleitung

Im Gegensatz zu TLR4 und 2 befinden sich TLR3, 7, 8 und 9 im Inneren der Zelle. Sie erkennen virale RNA und virale und bakterielle Nukleinsäuren in der sauren Umgebung des späten Endosoms und Lysosoms. Die intrazelluläre Lokalisation ist dabei für die Unterscheidung von fremd und selbst und der damit verbundenen Verhinderung von Autoimmunkrankheiten essentiell (Barton, Kagan, and Medzhitov, 2006). Tabelle 2.3 zeigt die endosomalen TLR mit ihren Liganden.

TLR	Ligand	Herkunft des Liganden
TLR3	dsRNA	Viren (Reovirus)
TLR7/8	Imidazochinoline (z.B. Imiquimod)	Synthetische Verbindung
	ssRNA	Viren (Influenza, HIV)
TLR9	CpG-haltige DNA	Bakterien
		Viren (HSV-2, CMV)

Tabelle 2.3: Endosomale Toll-like-Rezeptoren und ihre Liganden. Tabelle teilweise übernommen aus Barton et al. 2007 und Akria and Takeda, 2004.

TLR3

TLR3 wurde als erster TLR mit der Erkennung von Viren in Verbindung gebracht. TLR3 erkennt Doppelstrang-RNA (dsRNA), welche durch eine Virusinfektion in die Zelle gelangt. Auch wird dsRNA oft bei der Replikation von ssRNA-Viren produziert. DsRNA induziert eine starke Typ-I-IFN-Antwort (Tytell et al., 1967). Synthetisch generierte dsRNA wie (poly I:C) wird entsprechend über TLR3 erkannt und induziert ebenfalls eine antivirale Immunantwort (Alexopoulou et al., 2001). Weiter können humane dendritische Zellen heterologe mRNA, welche aus nekrotischen Zellen freigesetzt wurde, über TLR3 erkennen. TLR3-Aktivierung von NK-Zellen steigert deren IFN- γ -Freisetzung (Schmidt et al., 2004).

TLR7 und 8

TLR7 und 8 binden einzelsträngige RNA (ssRNA) und Imidazochinoline wie Imiquimod (R-837). Diese wirken als Virostatika und werden in der Therapie gegen oberflächlichen Hautkrebs eingesetzt (Schön and Schön, 2008). Influenzavirus- und HIV-ssRNA liefern nach der Erkennung durch TLR7, Signale für eine antivirale und pro-inflammatorische Immunantwort (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004).

TLR9

B-Zellen und plasmazytoide dendritische Zellen exprimieren TLR9. TLR9 bindet DNA, die unmethylierte Cytosin-Guanin-Dinukleotide (CpG) enthält, wie sie unter anderem im Bakteriengenom vorkommen. Die Tatsache, dass CpG-Dinukleotide im Säugetiergenom im Vergleich zum bakteriellen Genom unterdrückt und an der 5'-Position im Cytosin meist methyliert sind, erlaubt die Unterscheidung zwischen selbst und fremd (Bird et al., 1987). CpG-DNA wird von der Zelle über unspezifische Endozytose aufgenommen und in das Lysosom transportiert. Die Aufnahme löst den Transport von endoplasmatischem TLR9 zum CpG-DNA-haltigem Lysosom aus. Dort kommt es zur Bindung von CpG-DNA an TLR9 und zur Induktion eines MyD88-abhängigen Signalwegs (Ahmad-Nejad et al., 2002; Latz et al., 2004). Auch synthetische, unmethylierte CpG-haltige Oligodesoxyribonukleotide (ODN) können durch TLR9 gebunden werden und eine Immunantwort induzieren (Krieg, 2002). Ein weiterer Ligand ist die an das Häm-Verdauungsprodukt Hemozoin gekoppelte CpG-haltige DNA des Malaria-Erregers (Coban et al., 2005; Parroche et al., 2007; Schumann, 2007). Neben Bakterien werden auch verschiedene Viren, deren Genom CpG-DNA enthält, durch TLR9 erkannt (Krug et al., 2004; Tabeta et al., 2004).

2.3.2 Virale Erkennung im Zytosol

Neben der Erkennung durch TLR, die in Membranen verankert sind, existieren Verteidigungsmechanismen, die virale Nukleinsäuren im Zytoplasma der Zelle detektieren und eine antivirale Immunantwort einleiten können. Diese zytosolischen, antiviralen PRR erkennen durch Viren-generierte RNA-Spezies. Auch hier ist die Unterscheidung zwischen zelleigener und viraler RNA essentiell.

2.3.2.1 PKR

Als erster zytosolischer, viraler PRR wurde die dsRNA-detektierende Proteinkinase R (PKR) beschrieben. Die aus 551 Aminosäuren bestehende humane PKR ist eine Serin-Threonin-Kinase mit zwei dsRNA-Bindestellen und einer konservierten Kinasedomäne. PKR ist in allen Geweben konstitutiv exprimiert und gehört zu den durch Typ-I-IFN-induzierten Genen (Ank et al., 2006). Unter Normalbedingungen liegt PKR als inaktives Monomer vor. Nach der Bindung von dsRNA kommt es zu einer Dimerisierung und zur Autophosphorylierung der Kinase (Romano et al., 1998). Die so aktivierte PKR phosphoryliert Substrate wie den *eukaryotic initiation factor 2* α (EIF2 α), was wiederum eine Neubeladung von Ribosom und

Einleitung

tRNA verhindert (Abbildung 2.2 links) (Dey et al., 2005; García, Meurs, and Esteban, 2007). Die Translation und Replikation des Virus wird so effektiv gehemmt. FasL, Caspase-1 und p53 werden NFκB-abhängig exprimiert und die Apoptose eingeleitet (Gil and Esteban, 2000; Srivastava, Kumar, and Kaufman, 1998; Yeung and Lau, 1998).

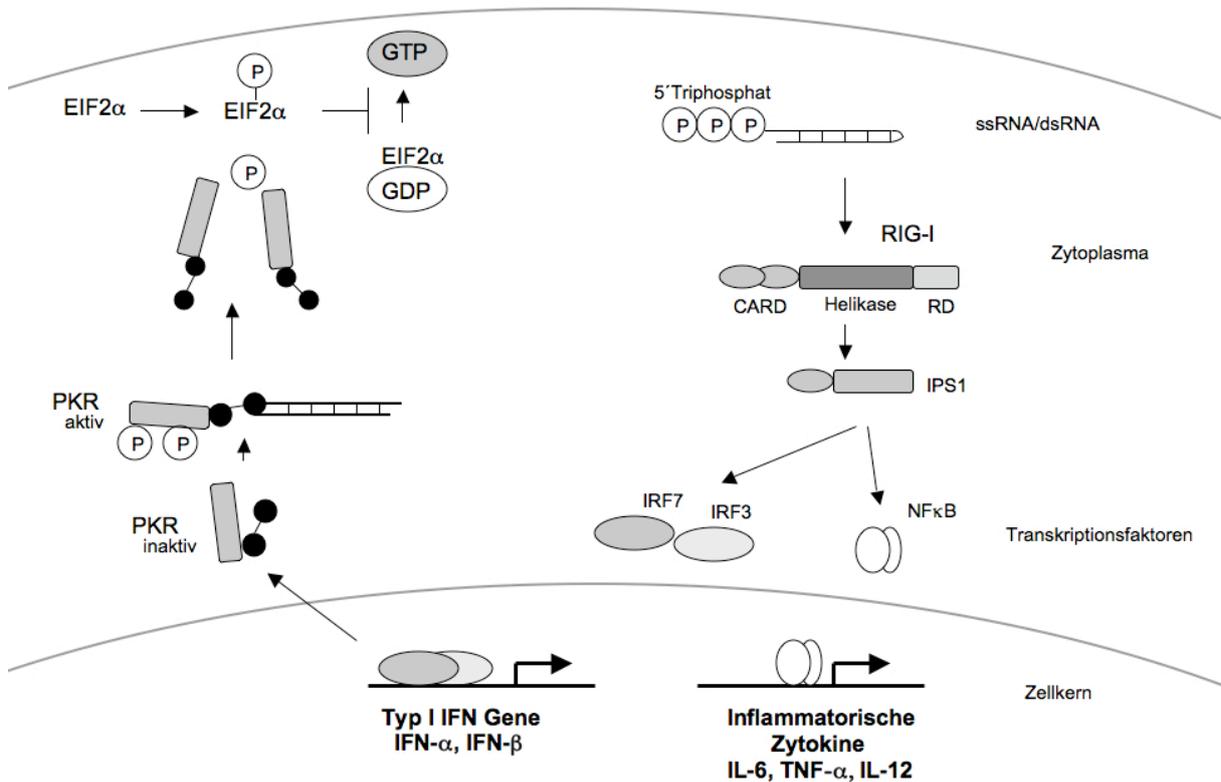


Abbildung 2.2: Zytosolische PRR. (links) Mechanismus der PKR Aktivierung. PKR ist in der Zelle konstitutiv exprimiert und kann durch Typ-I-IFN aktiviert werden. Bis zur Aktivierung durch dsRNA liegt PKR inaktiv in der Zelle vor. Nach der Erkennung von viraler RNA erfolgt eine Konformationsänderung, die die Bindung von ATP ermöglicht. Autophosphorylierung tritt ein und das aktive Enzym bildet Dimere. Durch Phosphorylierung des EIF2α kommt es zur effizienten Inhibition der Translation und zur Apoptose. Graues Viereck: Kinase Domäne; schwarze Kreise: RNA-bindende Domäne. **(rechts)** RIG-I-vermittelte virale RNA-Erkennung. RIG-I erkennt 5'-Triphosphat ssRNA zusammen mit dsRNA im Zytoplasma der infizierten Zelle. Über einen IPS1-vermittelten Signalweg kommt es zur MyD88-abhängigen Aktivierung von NFκB und zur Induktion von Typ-I-IFN. Abbildung angelehnt an Takeuchi and Akira, 2009 und Sadler and Williams, 2008.

2.3.2.2 RIG-I

Eine zweite Gruppe der zytosolischen, viralen PRR sind die *RIG-I-like receptors*. Zu diesen RNA-Helikasen gehören neben RIG-I die Proteine Mda5 und LGP2. RIG-I (*retinoic acid-induced gene 1*) besitzt am N-terminalen Ende zwei für die Signalgebung essentielle CARD-

ähnliche Domänen. CARD-tragende Proteine können so mit RIG-I interagieren. Am C-terminalen Ende der Helikase-Domäne sitzt die Repressor-Domäne, durch die eine Inhibierung der Signalweiterleitung erfolgen kann. Helikase- und Repressor-Domäne wirken bei der Erkennung von dsRNA und ssRNA zusammen. Die Unterscheidung zwischen zelleigener und viraler ssRNA erfolgt dabei durch Erkennung einer in der viralen ssRNA enthaltenen freien 5'-Triphosphat-Gruppe nebst Doppelstrang-Sequenz (Schmidt et al., 2009). Nach der Erkennung der RNA kommt es in Anwesenheit von ATP zu einer Konformationsänderung des RIG-I-Moleküls. Dies ermöglicht es der CARD-Domäne, mit Molekülen wie IPS1 zu interagieren und eine Signalkaskade auszulösen. Wie beim TLR-Signalweg kommt es im RIG-I-Signalweg zur IRF-3- und IRF-7-vermittelten Expression von Typ-I-IFN-induzierten Genen und zur NFκB-vermittelten Induktion von proinflammatorischen Zytokinen (Abbildung 2.2 rechts) (Takeuchi and Akira, 2009). RIG-I ist unter anderem für die Erkennung des Hepatitis-C-Virus oder auch des japanischen Enzephalitis-Virus wichtig (Kato et al., 2006; Sumpter et al., 2005).

2.3.2.3 PRR-Erkennung von Herpesviren

Herpes-Simplex-Virus

Ähnlich EBV sind Herpes-Simplex-Viren (HSV) weit verbreitete humane Pathogene. Nach erfolgreicher Primärinfektion (bei HSV-1 im Mundbereich, bei HSV-2 im Genitaltrakt) tritt das Virus über sensorische Nervenenden in periphere Ganglien über und etabliert eine latente Infektion. Bei der Erkennung einer HSV-Infektion und der Einleitung einer Immunantwort spielt der TLR2 eine wichtige Rolle. So wird HSV-1 über den TLR2 auf peritonealen Makrophagen erkannt und induziert die Induktion von IL-6 und *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1). Beide Moleküle spielen eine Rolle bei der Rekrutierung von Monozyten an den Infektionsort (Kurt-Jones et al., 2004). Im humanen System binden die Virionen an den TLR2. Im murinen System wird die Erkennung über TLR9 vermittelt (Krug et al., 2004). Die Erkennung erfolgt dabei über die CpG-reiche DNA im Virusgenom und führt zu einem MyD88-abhängigen Signal und der Expression des kostimulatorischen Oberflächenmoleküls CD86 (Lund et al., 2003). Untersuchungen an dendritischen Zellen konnten ein Zusammenspiel der beiden viralen Rezeptoren TLR2 und TLR9 bei der Erkennung von HSV zeigen (Sato, Linehan, and Iwasaki, 2006) und neueste Veröffentlichungen sehen sogar eine Kooperation von TLR9 und der zytosolischen RIG-I in der HSV-induzierten antiviralen Immunantwort (Rasmussen et al., 2009).

EBV

Die Interaktion von EBV mit PRR ist bisher weniger umfassend untersucht worden als die von HSV. Es gibt aber bereits Hinweise, dass EBV mit verschiedenen PRR wechselwirkt. EBV infiziert am effizientesten humane B-Zellen, aber auch Monozyten sind in gewissem Grad permissiv für die Infektion mit EBV. Bei der Bindung von EBV an den TLR2 auf Monozyten wird eine CD14-unabhängige pro-inflammatorische Immunantwort über NF κ B ausgelöst, die zur MCP-1-Expression führt (Gaudreault et al., 2007). Kürzlich wurde sogar ein Enzym des viralen Nukleotid-Stoffwechsels, die virale Desoxyuridin-Triphosphat-Nukleotid Phosphatase (dUTPase), als ein Agonist von TLR2 in Monozyten beschrieben (Ariza et al., 2009). Dabei könnte es sich aber um ein Artefakt der experimentellen Prozedur handeln, da ausschließlich in Bakterien rekombinant produzierte dUTPase verwendet wurde, deren Reinheit unvollständig untersucht wurde (Glaser et al., 2006).

Die in allen Latenzstadien von EBV im Zytosol exprimierten nicht-kodierenden RNA (EBER1 und 2) können von der PKR erkannt werden (Kieff, 2001). Die EBER RNA bildet in vielen Bereichen eine dsRNA aus und besitzt eine 5'-Triphosphat-Gruppe (Takada and Nanbo, 2001). EBER stellen mit 10^7 Kopien/Zelle (Arrand and Rymo, 1982) die am meisten exprimierten viralen Moleküle dar. Die EBER werden nicht translatiert und stehen in Verdacht, zur Onkogenese von EBV beizutragen. Sie spielen eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps der BL-Zellen. Hier induzieren EBER die Transkription des Wachstumsfaktors IL-10 (Kitagawa et al., 2000). Auch zeigten EBER-transfizierte BL-Zellen gesteigerte Tumorigenität in Mäusen (Laing et al., 2002; Ruf et al., 2000). Eine wichtige Rolle in der Produktion von Wachstumsfaktoren für die *in vitro* transformierten Zellen wurde für EBER2 gefunden. Das anti-inflammatorische IL-6 steigerte hier die Proliferation von LCL (Wu et al., 2007).

2.4 Virale Ausnutzung der antiviralen PRR-Signale

Zytosolische PRR

Über die EBER hat EBV einen Mechanismus zur Umgehung der antiviralen PRR-Erkennung etabliert. In BL-Zellen kann die PKR die EBER binden, es kommt aber zu keiner Aktivierung. So wurde EIF2 α nicht phosphoryliert und demnach wurde auch keine IFN- α -vermittelten Apoptose eingeleitet (Clarke et al., 1991; Nanbo et al., 2002; Sharp et al., 1993).

Einleitung

Die Struktur der EBER kann auch zur Erkennung durch die RIG-I führen. Dies resultiert in BL-Zellen in einer NFκB- und IRF-3-Aktivierung (Samanta et al., 2006). Letztere induziert die Bildung von IL-10 (Samanta, Iwakiri, and Takada, 2008). Mittlerweile ist bekannt, dass IL-10 von B-Zellen, Monozyten, dendritischen Zellen sowie von T_H2-Zellen produziert werden kann (Moore et al., 2001). T_H2-Zellen produziertes IL-10 unterdrückt in T_H1-Zellen die Freisetzung von Zytokinen wie IFN-γ. Dadurch wird auch die IFN-γ-abhängige NK-Zell-Aktivierung unterdrückt. IL-10 kann auch die NFκB-Aktivierung in Monozyten und Makrophagen und die Synthese pro-inflammatorischer Zytokine sowie die Expression von MHC II und der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 hemmen (de Waal Malefyt et al., 1991). Dies führt indirekt zu einer reduzierten Aktivierung antigen-spezifischer T-Zellen. Auch kann IL-10 den T-Zell-Wachstumsfaktor IL-2 inhibieren (Taga, Mostowski, and Tosato, 1993).

Interessanterweise hat IL-10 auf B-Zellen einen aktivierenden Effekt, MHC-II-Expression und Antikörperproduktion sind gesteigert. Auch induziert IL-10 in B-Zellen deren Differenzierung und Vermehrung (Burdin et al., 1995; Rousset et al., 1992). In Zusammenhang mit einer EBV-Infektion wird IL-10 als autokriner Wachstumsfaktor für die infizierte B-Zelle angesehen. Neben der Induktion des zelleigenen IL-10 exprimiert EBV nach der Infektion auch ein virales IL-10 (Miyazaki, Cheung, and Dosch, 1993). Das virale IL-10 wie auch das zelleigene IL-10 sind Zytokine, mit deren Hilfe der antiviralen Abwehr ausgewichen werden kann, da beide das TAP1-Protein des TAP-Transporters herunterregulieren können. Dies erschwert den Transport der Peptide, deren Beladung auf MHC I und die Translokation zur Zelloberfläche; mit dem Ergebnis einer Reduktion der MHC-I-Moleküle auf der Zelloberfläche. Die Antigenpräsentation gegenüber T-Zellen ist somit reduziert (Zeidler et al., 1997). Mit der Entdeckung des BNLF2a, welches ebenfalls auf die TAP-abhängige Antigenpräsentation negativ einwirkt und des BILF1, welches an MHC I bindet und dessen Halbwertszeit herabsetzt, wurde die Liste der immunevasiven Proteine von EBV erweitert (Hislop et al., 2007a; Zuo et al., 2009).

Membranständige PRR

Auch TLR-vermittelte Signale können von Viren für die Etablierung der Infektion ausgenutzt werden. Ein interessantes Beispiel hierfür liefert das Maus-Mammatumovirus (MMTV), ein Retrovirus. Dieses Virus benötigt zur erfolgreichen Integration in das Wirtsgenom eine sich teilende Zelle (Harel, Rassart, and Jolicoeur, 1981). Das MMTV infiziert lymphoide Zellen.

Einleitung

Durch die Bindung des Viruspartikels an TLR2 und TLR4 wird die für die Integration ins Genom benötigte Proliferation der Zelle induziert. Die TLR-Erkennung resultiert jedoch auch in einer NF κ B-vermittelten antiviralen Aktivität. Das so in MMTV-aktivierten B-Zellen induzierte IL-10 fördert wiederum die Vermehrung der virus-infizierten Zelle (Rassa and Ross, 2003).

Wie das MMTV hat auch EBV Strategien entwickelt, TLR-Signalwege zu unterlaufen oder zur Vermehrung auszunutzen. Martin et al. zeigten kürzlich, dass der Kontakt mit EBV-Partikeln die Expression des TLR7 in naiven B-Zellen steigerte. Wurde nun der TLR7 parallel zu einer EBV-Infektion stimuliert, ergab sich eine Steigerung des Auswachsens infizierter B-Zellen (Martin et al., 2007). Auch für TLR9 gibt es bereits einen ersten Hinweis auf die Rolle bei der Unterstützung der EBV-Infektion. Traggiai et al. beobachteten bei der Kokultivierung des TLR9-Agonisten CpG-DNA mit EBV-infizierten B-Zellen eine Steigerung der Transformation zu LCL (Traggiai et al., 2004). Da bei dieser Kokultivierung zusätzlich noch mononukleäre Zellen eingesetzt wurden, bleibt die direkte Wirkung von CpG-DNA auf die Steigerung des Auswachsens EBV-infizierter Zellen allerdings noch zu untersuchen.

Zielsetzungen

2. 5 Zielsetzungen

2.5.1 Zielsetzung: T-Zellerkennung EBV-infizierter B-Zellen früh nach der Infektion

T-Zellen spielen in der Immunabwehr von EBV eine essentielle Rolle. Sie können die infizierte B-Zelle erkennen und die Transformation kontrollieren. Neben den CD8⁺ T-Zellen gegen latente Proteine von EBV spielen dabei CD8⁺ T-Zellen gegen lytische Proteine und darunter die immundominanten IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle. Bei einer akuten EBV-Infektion können letztere bis zu 40 % der gesamten T-Zellantwort gegen EBV ausmachen. Zu der Gruppe der IE-Proteine von EBV gehören die beiden Transaktivatoren des lytischen Zyklus, BZLF1 und BRLF1. Für diese beiden Proteine wurde erst kürzlich gezeigt, dass sie bereits wenige Stunden nach einer EBV-Infektion in der infizierten Zelle exprimiert werden. Es kommt allerdings in dieser Frühphase der Infektion nicht zur Transaktivierung nachfolgender lytischer Gene und so wird auch kein lytischer Zyklus mit Virusproduktion induziert (Wen et al., 2007) (Kalla et al., 2010). Stattdessen hat BZLF1 in dieser frühen Phase der Infektion offensichtlich die Aufgabe, die virale Latenz und Transformation zu etablieren (Kalla et al., 2010). Unbekannt war, ob BZLF1 und auch BRLF1 von spezifischen CD8⁺ T-Zellen zu diesem frühen Zeitpunkt nach Infektion erkannt werden und dies vielleicht direkt die starke Vermehrung der IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in der Primärinfektion und ihre Dominanz im gesunden Virusträger erklären könnte.

Als erstes Ziel meiner Arbeit sollte die Erkennung der frühinfizierten B-Zelle durch antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen untersucht werden. Der Zeitverlauf der IE-Antigenpräsentation gegenüber spezifischen CD8⁺ T-Zellen sollte früh nach der Infektion ermittelt werden und untersucht werden, ob die Reihenfolge der Erkennung verschiedener Klassen von EBV-Antigenen (IE, E und latente) durch spezifische CD8⁺ T-Zellen mit der Immundominanz dieser T-Zellen korreliert und sie erklären könnte.

2.5.2 Zielsetzung: Einfluss der TLR-Aktivierung auf die EBV-Infektion

Das angeborene Immunsystem erkennt Pathogene wie EBV durch die zytosolischen und membranständigen Rezeptoren (PRR). Pathogene haben zur Vermeidung dieser Erkennung Mechanismen zum Unterlaufen der Immunantwort entwickelt. Besonders interessant sind solche Mechanismen im Zusammenhang mit Viren, die einen Tropismus für Immunzellen besitzen. Bei der Erkennung der Infektion durch die Immunzelle kommt es hier zu einem

Zielsetzung

paradoxen Effekt. Das Virus nutzt die Aktivierung der Zielzelle durch PRR für seine eigene Etablierung oder Vermehrung aus. So induziert die Erkennung des EBV durch die zytosolischen PRR eine antivirale Zytokinproduktion die, die Proliferation der infizierten Zelle induziert. Auch membranständige PRR können die EBV-Infektion erkennen und EBV kann diese Reaktion für seine Zwecke umfunktionieren. So induziert die EBV-Bindung an die Zelle die TLR7-Expression und eine parallele Stimulation des TLR7 während einer EBV-Infektion steigert die Proliferation der transformierten Zellen (Martin et al., 2007). B-Zellen exprimieren auch die TLR1, 2, 9 und TLR10 (Månsson et al., 2006), und so ist es interessant, mögliche TLR-induzierte pro-virale Effekte, über den TLR7 hinaus, aufzuzeigen. TLR9 mit seinem Liganden CpG-DNA weckt dabei besonderes Interesse, da CpG-DNA alleine oder in Kombination mit CD40-Stimulation (ein durch EBV nachgeahmtes Signal), die Aktivierung und die Proliferation von B-Zellen steigern kann (Bernasconi, Onai, and Lanzavecchia, 2003; Hartmann and Krieg, 2000; Wagner et al., 2004).

Ziel des zweiten Teils der Arbeit war es nun, den direkten Einfluss von CpG-DNA auf die B-Zell-Transformation zu untersuchen und zu erklären, wie die EBV-Infektion durch TLR-Aktivierung beeinflusst werden könnte. Auch die Effekte anderer TLR-Agonisten – und dadurch auch anderer Pathogene – auf die EBV-Transformation sollte untersucht werden.

Material und Methoden

3. Material und Methoden

3.1. Geräte und technisches Zubehör

Pipetten:	10 - 1000 µl Gilson, Paris, Frankreich
Pipettenspitzen:	10 - 1000 µl refill units, Gilson; 2 - 25 ml Greiner cellstar® bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Sterilbänke:	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Waagen:	Kern und Sohn, Balingen, Deutschland
Zellkultur	Nunc, Roskilde, Dänemark

3.2 Material

3.2.1 Blutspender

Als Blutspender wurden gesunde Erwachsene mit bekannter HLA-Restriktion und bekanntem EBV-Status herangezogen.

Spender	HLA-Restriktion (soweit bestimmt)	EBV-Status
MD	A*01,11; B*0801,1501; C*03,07; DRB1*03,11; DQB1*02,03	positiv
JN	A*01,0201; B*0702,4001; C*03,07	positiv
ST	A*0201; B*08,4001; C*03,07; DRB1*03,04; DQB1*02,03	positiv
BF	A*02,03; B*3501,4001; C*03,15	positiv
RR	A*01,0201; B*1501,37; DRB1*1301, 16; DQB1*05,06	positiv
AM	A*01,26; B*3501,57; C*04; DRB1*07, 11; DQB1*02,03	negativ
JG	A*0201; B*3502,57; C*04,06; DRB1*07, 11; DQB1*03,03	positiv

3.2.2 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien stammen aus der Sammlung der Abteilung Genvektoren von Prof. Dr. W. Hammerschmidt oder wurden im Rahmen der Arbeit teilweise etabliert (*).

B95.8	Lymphoblastoide Krallenaffenzelllinie, latent und lytisch EBV-infiziert; geben ständig infektiöse B95.8 Viren in den Überstand ab (Miller et al., 1972)
Lymphoblastoide Zelllinien (LCL)	mit B95.8 infizierte, transformierte humane B-Zellen *
Mini-LCL	mit dem mini-EBV (Kempkes et al., 1995) transformierte B-Zellen, Expression aller latenten Proteine von EBV, keine Expression lytischer EBV- Proteine
HEK293	humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie, die durch die Gene E1a und E1b von Adenovirus Typ 5 transformiert wurden (Graham et al., 1977)
2089/293	mit dem EBV/GFP Genom stabil transfizierte humane Nierenzelllinie, auf Basis eines F-Plasmids, Produzenten für EBV/GFP (Delecluse et al., 1998)
TR-/293	mit dem TR-/GFP stabil transfizierte humane Nierenzelllinie, auf Basis eines F-Plasmids, Produzenten für TR-/GFP (Delecluse et al., 1999)
Raji	EBV-positive humane Burkitt-Lymphom-Zelllinie zur Einstellung von EBV/GFP und TR-/GFP (Pulvertaft, 1964)
B-Blasten	mittels CD40-Stimulation konditional immortalisierte humane B-Zellen (Wiesner et al., 2008)
LL8	L929, stabil transfiziert mit humanem CD40L, „Feeder“ für B-Zellimmortalisierung (Leah Schirrmann und A. Moosmann)
K562	Humane chronisch, myelogene Leukämie (CML)-Zelllinie aus dem Knochenmark, NK-Zell-Target (Lozzio and Lozzio, 1975)

3.2.3 Toll-like-Rezeptor-Liganden

TLR-Ligand	TLR	Konzentration *	Lieferant
CpG-DNA / ODN 2006 **	TLR9	4 µg/ml	Metabion, Martinsried, Deutschland / Invivogen, San Diego, CA
Pam3CSK4	TLR2	1 µg/ml	Invivogen
Lipoteichonsäure (LTA) von S. aureus	TLR2	1 µg/ml	Invivogen
Lipopolysaccharide (LPS) von Salmonella minnesota	TLR4	1 µg/ml	Invivogen
Imiquimod	TLR7	0,5 µg/ml	Invivogen
Pansorbin® Zellen		4 µg/ml	Calbiochem, La Jolla, CA

* Standardkonzentration. In einigen Experimenten wurden zusätzliche Konzentrationen eingesetzt.

** Sequenz: 5'-TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT-3'; synthetisiert als Phosphothioat-ODN.

3.2.4 T-Zellklone

EBV Antigen	Epitopsequenz / Peptidsequenz *	HLA-Restriktion	Name des T-Zellklons	Bezeichnung	Avidität log**
CD8+ T-Zellen gegen latente Antigene von EBV					
EBNA3A	QAKWRLQTL	B*0801	LSK-QAK#15	QAK	7,1
EBNA3A	RPPIFIRRL	B*0702	JN-RPP#26	RPP	8,8
LMP2	IEDPPFNSL	B*4001	JN-IED#16	IED	7,6
LMP2	CLGGLTMV	A*0201	JG-CLG#18	CLG	8,9
CD8+ T-Zellen gegen lytische Antigene von EBV					
BMLF1	GLCTLVAML	A*0201	MA-GLC#14	GLC	7
BRLF1	YVLDHLIVV	A*0201	MA-YVL#1	YVL	8,2
BZLF1	EPLPQGQLTAY	B*3501	BF-EPL#4	EPL	7
BZLF1	RAKFKQLL	B*0801	LSK-RAK#17	RAK	7,1
CD4+ T-Zellen gegen lytische Antigene von EBV					
BLLF1	FGQLTPHTKAVYQPR	DRB1*1301	BLLF-1D6	gp350	8,1

* Peptidsequenzen wurden der Veröffentlichung (Khanna and Burrows, 2000) entnommen und von der Firma JPT, Berlin, Deutschland synthetisiert.

** Funktionelle Avidität des T-Zellklons. EC₅₀ = 50 % der effektiven Konzentration bei der Peptidtitration.

3.3 Methoden

3.3.1 Kultivierung von Zellen

Alle Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) kultiviert. Als Standardmedium wurde RPMI 1640 (high glutamine, Invitrogen, Carlsbad, CA) unter Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (FCS) (PAA, Pasching, Österreich), 1 % Penicillin/Streptomycin (Invitrogen) und 100 nM Natriumselenit (ICN, Biochemicals, Aurora, OH) verwendet.

LCL, B95.8 und Raji wurden in Suspensionskulturen von 10 - 20 ml Volumen (25 cm² Flasche) kultiviert und zweimal wöchentlich subkultiviert. Dabei wurden diese resuspendiert, durch Abgießen das Volumen verkleinert und mit frischem Medium aufgefüllt. Die entstandene Verdünnung war bei LCL dreifach und bei B95.8 und Raji zehnfach. Die Erneuerung der Zellkulturflasche erfolgte alle 4 Wochen. In einigen Experimenten wurden LCL unter dem Zusatz von 4 µg/ml des TLR Liganden CpG-DNA (siehe Tabelle 3.2.3) kultiviert.

Für die Kultivierung EBV-negativer B-Blasten wurde das Medium mit IL-4 (2 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN) versetzt. Die B-Blasten wurden in 12-well-(Einzelgefäß)-Platten auf, durch Gammastrahlung (50 Gy) wachstumsarretierten CD40L-Mausfibroblasten (LL8) (10⁶/Platte) ausplattiert. Alle 7 Tage wurde 2/3 des Mediums abgenommen, die Zellen im Rest resuspendiert und auf neue LL8-Platten, je nach Wachstum 1:2 oder 1:3 aufgeteilt und mit IL-4-haltigem Medium aufgefüllt. Die Kultur von T-Zelllinien sowie die Kultivierung der adhärennten 2089/293 und TR-/293 werden weiter unten beschrieben.

Zum Waschen oder Konzentrieren der Zellen wurden diese in 15- oder 50 ml Einmal-Zentrifugenröhrchen (Falcons; Becton Dickinson, San José, CA) überführt und wenn nichts anderes vermerkt, für 10 min bei 1200 U/min und RT zentrifugiert (Heraeus Instruments).

3.3.2 Ermittlung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer (Marienfeld, Deutschland) ermittelt. Die resuspendierten Zellen wurden dafür 1:1 mit einer Trypanblau-Lösung (0,2 % Trypanblau, Merck, Darmstadt, Deutschland; 0,1 % Natriumazid, Merck) in PBS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) gemischt und lebende, nicht gefärbte Zellen gezählt. Die Zellzahl wurde in

10^6 /ml ermittelt. Für die Färbung von mononukleären Zellen wurde, zum Sichtbarmachen der Erythrozyten, Türk's-Lösung (Fertiglösung, Merk) verwendet.

3.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die einzufrierenden Zellen wurden zentrifugiert und das Zellpellet in kaltem Einfriermedium (70 % Medium, 20 % FCS und 10 % DMSO (Roth)) aufgenommen und in gekühlte Kryoröhrchen (Nunc) überführt. Diese wurden zur langsamen Abkühlung in einem allseitig verschlossenen Styroporbehälter bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen zur Dauerlagerung in die Gasphase über flüssigem Stickstoff überführt. Zur Rekultivierung eingefrorener Zellen wurden die Röhrchen aus dem Stickstofftank genommen, auf Trockeneis transportiert und in ein mit angewärmtem Medium gefülltes Zentrifugenröhrchen überführt, durch Zentrifugation vom DMSO gesäubert und die pelletierten Zellen in frischem Medium resuspendiert und in Kultur genommen.

3.3.4 Reinigung primärer humaner Lymphozyten

Als Quelle für humane Lymphozyten dienten (1) Adenoidproben aus Patienten des Klinikums Dritter Orden in München, (2) frisch abgenommenes mit Heparin (Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) versetztes Vollblut freiwilliger Spender mit bekannten HLA-Restriktionen oder (3) Leukozytenkonzentrate anonymer Spender (Buffy Coats) des Instituts für Transfusionsmedizin, Klinikum Ulm. Für die Reinigung primärer Lymphozyten wurden bei (1) die Adenoide mit Skalpell zerkleinert und unter Waschen mit PBS durch ein Zellsieb (100 μm , Becton-Dickinson) passiert. Die so entstandenen Einzelzell-Konzentrate wurden mit PBS auf 40 ml aufgefüllt und mit 10 ml Ficoll-Trennlösung der Dichte 1,07 (Biocoll, Biochrom, Berlin, Deutschland) unterschichtet. Im Falle der Blut- (2) und Buffy Coat-Konzentrate (3) wurden je 25 ml Blut und Buffy Coat-Konzentrat in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 15 ml PBS gemischt und mit 10 ml Ficoll-Trennlösung unterschichtet.

Mittels einer anschließenden 20 min Zentrifugation (2000 U/min, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und kleinster Bremse) wurden mononukleären Zellen (Monozyten, B- und T-Zellen im Grenzbereich zwischen schwerer und leichter Flüssigkeitsschicht) angereichert. Die so aufgetrennte Lymphozytenschicht (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) wurde in ein neues, mit 40 ml PBS gefülltes Zentrifugenröhrchen überführt und dreimal mit PBS gewaschen und das Zellpellet abschließend im Medium aufgenommen.

3.3.5 Generierung und Kultivierung von T-Zellklonen

Die in dieser Arbeit verwendeten T-Zellklone wurden mittels EBV-Peptidstimulation generiert und die polyklonalen EBV-spezifischen T-Zelllinien wurden anschließend durch Verdünnung (Einzelzellklonierung) zu spezifischen monoklonalen EBV-T-Zelllinien vereinzelt.

5×10^6 /ml PBMC von Spendern mit bekanntem EBV T-Zell-Repertoire wurden mit 5 µg/ml synthetischem EBV-Peptid (JPT, Berlin, Deutschland; Peptidsequenzen siehe Tabelle 3.2.4) versetzt, für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die peptid-beladenen PBMC wurden mit 5×10^6 /ml unbeladenen PBMC gemischt und zu 1,5 ml auf 24-well-Platten ausplattiert. Vier Tage nach dem Ansatz wurden die Kulturen mit IL-2-haltigem Medium (50 U/ml) (Proleukin S, Novartis, Nürnberg, Deutschland) kultiviert. Ab Tag 8 wurde die IL-2-Menge auf 1000 U/ml angehoben. Die Einzelzellklonierung erfolgte am Tag 22 nach dem Ansatz. Dazu wurden Verdünnungen von 3 Zellen/well und 0,6 Zellen/well auf bestrahlte (50Gy) PBMC dreier Spender (10^6 /ml) und 10^5 /ml bestrahlte LCL (autolog oder HLA-kompatibel) in 96-well-Rundbodenplatten in 1000 U/ml IL-2-haltigem Medium restimuliert. Nach weiteren 14 bis 21 Tagen wurden die gewachsenen Einzelzellklone mittels Pentamerfärbung (siehe 3.3.8.2) und Erkennungsassay (siehe 3.3.6) untersucht, spezifische T-Zellklone identifiziert und diese wie oben beschrieben restimuliert. Die Restimulation der T-Zellklone erfolgte alle 14 Tage. T-Zellklone wurden je nach Proliferation bis zu einem Verhältnis von 1:3 expandiert. Dazu wurden alle wells eines T-Zellklons in einem Zentrifugenröhrchen vereinigt, abzentrifugiert und das Pellet in IL-2-supplementiertem Medium auf bestrahlten PBMC und LCL in 96-well-Rundbodenplatten ausplattiert.

3.3.6 Peptidtitration und Erkennungsassay

Peptidtitration

Die Peptidtitration ermittelt die Avidität eines T-Zellklons für das präsentierte Antigen. 10^5 /ml spezifische T-Zellen und 2×10^5 /ml autologe oder HLA-kompatible B-Blasten wurden mit Verdünnungen synthetischer EBV-Peptide (siehe Tabelle 3.2.4; Endkonzentrationen von 10^{-5} bis 10^{-14} M) bei 37 °C über Nacht in 96-well-Spitzbodenplatten kokultiviert. CD8⁺ T-Zellen produzieren nach der Antigenerkennung IFN-γ in den Überstand. Dieser wurde am nächsten Tag im ELISA (siehe 3.3.7) gemessen.

Erkennungssassay

Um zu klären, ob die T-Zellklone EBV-infizierte Zellen erkennen, wurden 10^5 /ml spezifische T-Zellen mit 2×10^5 /ml autologen LCL, HLA-kompatiblen LCL, allogenen LCL, B-Blasten oder K562 bei 37 °C über Nacht in 96-well-Spitzbodenplatten inkubiert und die Überstände auf IFN- γ -Produktion im ELISA (siehe 3.3.7) hin untersucht. Eine Übersicht über die T-Zellklone ist unter 3.2.4 gezeigt.

3.3.7 ELISA

Zur Untersuchung der Zytokinproduktion von B- oder T-Zellen wurden ELISA durchgeführt. Die ELISA wurden im Wesentlichen gemäß Herstellerprotokoll (Mabtech, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Neben der IFN- γ Produktion wurde IL-6 und IL-10 im ELISA untersucht. Beispielhaft ist hier die Vorgehensweise für einen IFN- γ ELISA beschrieben. ELISA-Platten (Nunc) wurden mit 50 μ l/well des monoklonalen Antikörpers 1-D1K (2 μ g/ml in PBS pH 7,4) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Am nächsten Tag wurde zweimal mit 200 μ l/well PBS gewaschen und mit 200 μ l/well Medium für 1 h, bei RT blockiert. Die Platten wurden fünfmal mit PBS/Tween 5 % (Roth) gewaschen. Der IFN- γ -Standard wurde in Medium in Form von Verdünnungen von 20000 bis 0 pg/ml angesetzt und in Duplikaten zu je 50 μ l/well aufgetragen. Die Proben wurden in Triplikaten zu je 50 μ l/well eingesetzt. Die Platten wurden 2 h bei RT inkubiert und anschließend fünfmal gewaschen. Das gebundene IFN- γ wurde durch 50 μ l/well des monoklonalen Antikörpers 7-B6-1-biotin (1 μ g/ml) markiert und 1 h bei RT inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen erfolgte die Detektion des Biotin-markierten IFN- γ durch Streptavidin-ALP (1:1000, 50 μ l/well). 1 h nach Inkubation bei RT wurde erneut gewaschen und das so produzierte IFN- γ direkt über die Umsetzung von p-Nitrophenyl-Phosphat (Roth) durch die Phosphatase sichtbar gemacht (75 μ l/well). Die Auswertung erfolgte bei 405 nm im ELISA-Reader (Univeral Microplate Reader EL 800, Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland). Die Platten wurden bis zur vollständigen Umsetzung von p-Nitrophenyl-Phosphat in zeitlichen Abständen mehrmals hintereinander gemessen. Durch das umgesetzte p-Nitrophenyl-Phosphat in den Standardwerten wurden die Menge an sezerniertem IFN- γ bestimmt.

3.3.8 Färbungen für die Durchflußzytometrie

Einzelzellen können anhand ihrer Lichtstreuungseigenschaften und emittierten Fluoreszenzlicht mittels Durchflußzytometrie (FACS) analysiert werden. Die Zellen werden hierbei mit monoklonalen Antikörpern markiert. Diese sind direkt oder über sekundäre Antikörper an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt. Beim Passieren des Lasers werden die Fluorochrome zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt. Zusätzlich wird das auftreffende Licht von den Zellen in zwei unterschiedliche Winkel gestreut. Das so erhaltene Vorwärtsstreulicht (FSC) korreliert mit der Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht (SSC) zeigt die Granularität der Einzelzelle an. Die Daten wurden in zweidimensionalen Punkt-Diagrammen, in denen jeder Punkt eine Zelle repräsentiert, oder in eindimensionalen Histogrammen dargestellt. Durch definierte Analysefenster konnte so eine bestimmte Population untersucht werden. Die Analyse erfolgte im FACScalibur (Becton Dickinson) ausgestattet mit CellQuest-Software (Becton Dickinson). Neben der CellQuest-Software wurde FlowJo (<http://www.flowjo.com/>) zur Auswertung der Daten benutzt.

In meiner Arbeit wurden FACS-Analysen zur Untersuchung des Expressionsniveaus eines bestimmten Proteins (auf der Zelloberfläche) herangezogen. Weiter wurde die Existenz epitop-spezifischer T-Zellen in einer PBMC-Population ermittelt, Proliferation und Apoptose gemessen sowie Zellzyklusanalysen durchgeführt.

3.3.8.1 FACS-Färbungen

200000 Zellen pro Färbung wurden mit PBS/FCS 2 % gewaschen, in 20 µl Antikörpermix (1 µl pro Antikörper in 20 µl PBS/FCS 2 %) resuspendiert und auf Eis 20 min inkubiert. Alle verwendeten Antikörper wurden von Becton Dickinson bezogen. Die Färbung wurde mit 1 ml PBS/FCS 2 % gewaschen, der Überstand dekantiert und das Pellet mit 200 µl PBS /Formaldehyd 1 % fixiert. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei 4 °C. Als Kontrolle dienten ungefärbte Zellen.

3.3.8.2 Multimerfärbungen epitop-spezifischer T- Zellen

Für die HLA/Peptid-Pentamerfärbung der spezifischen T-Zellen wurden die Zellen mit 0,5 µl EBV-epitop-spezifischem Pentamer (ProImmune, Oxford, England) für 10 min bei RT gefärbt. Nach dem Waschen erfolgte die FACS-Färbung mit CD8-APC und 2 µl PE-markiertem Fluorotag spezifisch für Pentamere (ProImmune). Als Negativ-Kontrolle wurden

Zellen anstelle des spezifischen Pentamers nur mit CD8-APC und PE-markiertem Fluorotag gefärbt.

Für die direkt-markierte HLA/Peptid-Tetramerfärbung der spezifischen T-Zellen wurden die Zellen mit 0,5 µl EBV-epitop-spezifischem Tetramer (ProImmune) ebenfalls für 10 min bei RT gefärbt, gewaschen und anschließend mit CD8-APC gegen gefärbt. Als Negativ-Kontrolle wurden hier Zellen nur mit CD8-APC gefärbt.

3.3.8.3 Zellzyklusanalyse – PI-Färbung

Der DNA-Gehalt von Zellen wurde durch Anfärben mit Propidiumjodid (PI) gemessen. Diese Substanz interkaliert zwischen die Basen der DNA. Bevor eine Zelle sich teilt, durchläuft sie die Phasen G1, S und G2. Zellen in der G1-Phase haben einen diploiden Chromosomensatz. Tritt eine Zelle in die S-Phase ein, wird die DNA neu synthetisiert. In der G2-Phase besitzen die Zellen einen tetraploiden Chromosomensatz, welcher dann in der Mitose auf die zwei Tochterzellen aufgeteilt wird. Durch die stöchiometrische Interkalierung von PI ist eine klare Unterscheidung von G2- und G1-Phase möglich. Zellen der S-Phase befinden sich zwischen den beiden Bereichen. Zunächst wurden die Zellen im FACS als Punktdiagramm von FL2-A (y-Achse, bezeichnet die totale Fluoreszenz der Zellen) und FL2-W (x-Achse, bezeichnet die Zeit, die von der Zelle für den Durchlauf durch den Laser benötigt wird) dargestellt. Die zu analysierende Population erstreckte sich dabei nahezu parallel zu FL2-A und zeigte eine geringe FL2-W Verschiebung. Die auf der FL2-W-Achse verschobenen Punkte sind Zellaggregate. Um diese Zellen aus der Messung auszuschließen, wurde um die zu analysierende Population ein Analysefenster gelegt und diese dann als Histogramm von FL2-A aufgetragen. Die entstandene Verteilung ermöglichte die Separation in die verschiedenen Phasen und die Anzahl der Zellen in G1-, S- und der G2-Phase konnte bestimmt werden.

Die Proben für die Zellzyklus-Analyse wurden mit PBS gewaschen, das Pellet in 200 µl PBS resuspendiert und tropfenweise in ein, mit 4 ml eiskaltem 70 % Ethanol gefülltem Zentrifugenröhrchen unter leichtem Mischen (Vortex Mixer, Neolab, Heidelberg, Deutschland) eingebracht und 12 h bei – 20 °C gelagert. Die Zentrifugenröhrchen wurden bei 460 g, 10 min und 4 °C zentrifugiert, die Überstände vorsichtig entfernt und mit 4 % PI (2 mg/ml, Sigma-Aldrich, München, Deutschland), 1 % RNaseA (10 mg/ml, Sigma-Aldrich) und 95 % PBS gemischt und 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Proben wurden erneut zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in 200 µl PBS aufgenommen und im FACS analysiert.

3.3.8.4 Zellzyklusanalyse – CFSE-Färbung

5,6-di-Carboxyfluoresceindiacetat (CFSE) kann passiv in die Zelle diffundieren und wird dort von intrazellulären Esterasen in das fluoreszierende CFSE umgewandelt. Bei der Mitose wird das fluoreszierende CFSE auf die Tochterzellen verteilt. Die Markierungsintensität wird somit mit jeder durchlaufenen Zellteilung ungefähr halbiert. Dieser Vorgang kann im FITC-Kanal des FACS verfolgt werden. Zellen wurden mit 1 μ M CFSE (Molecular Probes, Invitrogen) für 30 min bei 37 °C inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen, gezählt und in den Versuch eingesetzt. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurde die absolute Zellzahl durch Zugabe von APC-gefärbten Kalibrierungs-Kügelchen als Volumenstandard (CaliBRITE, Becton Dickinson) im FACS gemessen. Dazu wurden 20000 Kalibrierungs-Kügelchen zu jedem Ansatz gegeben. In der FACS-Messung befinden sich diese Kalibrierungs-Kügelchen am oberen linken Bereich der FSC- und SSC-Darstellung und können so mit einem Analysefenster markiert und die genaue Anzahl gemessen werden. Von den 20000 enthaltenen Kalibrierungs-Kügelchen wurden 5000 gemessen, somit $\frac{1}{4}$ der Gesamtkultur.

3.3.9 Apoptose Messung

Apoptotische Zellen wurden mittels FACS ermittelt. Apoptotische Zellen besitzen im FACS eine sehr geringe Vorwärtsstreuung. Die entsprechende Population wurde durch ein Analysefenster markiert und die absolute Anzahl mittels Kalibrierungs-Kügelchen im Ansatz quantifiziert. Die Berechnung des relativen Überlebens y/x erfolgte über die Bestimmung von $x = \text{lebend}/\text{tot}_{\text{EBV}}$ und $y = \text{lebend}/\text{tot}_{\text{EBV} + \text{CpG-DNA}}$.

3.3.10 Isolation und Depletion von B- und T-Zellpopulationen

3.3.10.1 B-Zell-Isolation

Unberührte humane B-Zellen wurden durch immun-magnetische Separation gewonnen. (Negativ Isolationskit II, Miltenyi Biotech). Für die Aufreinigung wurden 10^8 frisch präparierte PBMC gewaschen und anschließend in 400 μ l Clinimacs-Puffer (Miltenyi Biotech) resuspendiert. Zur magnetischen Markierung aller Zelltypen, außer B-Zellen wurden 100 μ l Biotin-Antikörper-Cocktail zugegeben und die Zellen 10 min bei 4 °C inkubiert. 300 μ l Puffer wurden zugegeben und die Biotin-markierten Zellen mit 200 μ l Anti-Biotin-Micro-Beads 10 min bei 4 °C gegengefärbt. 20 ml Puffer wurden zugegeben, abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 500 μ l Puffer aufgenommen. Eine LS-Säule wurde in den

Magneten eingesetzt, dreimal mit Puffer equilibriert und die Zellsuspension auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde dreimal mit Puffer gespült und die durchfließenden nicht-markierten B-Zellen in einem gekühlten Zentrifugenröhrchen aufgefangen, abzentrifugiert und in Medium aufgenommen. Die Reinheit der B-Zellen wurde mittels FACS bestimmt. Sie betrug > 98 %. Dazu wurden B-Zellen gewaschen und mit CD19-FITC, CD3-PECy5 und CD8-APC Antikörpern markiert und im FACS analysiert.

3.3.10.2 CD27-Isolation

Anhand ihrer Expression von CD27 können B-Zellen in Subtypen eingeteilt werden (Klein, Rajewsky, and Kuppers, 1998). Naive B-Zellen exprimieren kein CD27, Gedächtnis-B-Zellen sind hingegen CD27 positiv. Für die Separation von CD27-negative und CD27-positive B-Zellen wurden die gereinigten B-Zellen zentrifugiert und der Überstand entfernt. 10^7 Zellen wurden in 80 μ l Clinimacs-Puffer aufgenommen und mit 20 μ l CD27-Microbeads (Miltenyi Biotech) gemischt und 15 min bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. 1000 μ l Puffer wurden zum Ansatz gegeben und der Überstand nach erneuter Zentrifugation abgenommen. Das Pellet wurde in 500 μ l Puffer aufgenommen und auf eine mit 500 μ l Puffer equilibrierte MS-Säule aufgebracht. Naive B-Zellen bildeten die unmarkierte Fraktion. Sie wurden durch dreimaliges Waschen der Säule mit 500 μ l Puffer gewonnen. CD27-positive, magnetisch-markierte Gedächtnis-B-Zellen binden an die Säule und wurden nach dem Waschen, außerhalb des magnetischen Feldes, mit 1 ml Puffer von der Säule gespült. Zur Steigerung der Reinheit wurde eine zweite Säulenpassage mit neuen MS-Säulen durchgeführt. Zur Bestimmung der Reinheit wurden die CD27-negativen und CD27-positiven Zellen mit CD27-PE Antikörpern gefärbt, fixiert und im FACS gemessen. Es ergab sich eine mittlere Reinheit von 81 % für die CD27-negativen naiven B-Zellen und 98 % für die CD27-positiven Gedächtnis-B-Zellen.

3.3.10.3 Depletion epitop-spezifischer CD8+ T-Zellen und CD8+ T-Zell-Isolation

Für die epitop-spezifische CD8+ T-Zell-Depletion wurden PBMC von Spendern mit bekanntem EBV CD8+ T-Zell-Repertoire eingesetzt. Mittels epitop-spezifischer Pentamerfärbung und immun-magnetischer Separation wurden einzelne Epitopspezifitäten aus dem CD8+ T-Zellrepertoire depletiert. Im Einzelnen wurde so vorgegangen, dass zunächst pentamerbeladene T-Zellen aus dem Gesamt-PBMC depletiert wurden und anschließend die CD8+ T-Zellen aus der pentamer-negativen Fraktion positiv isoliert wurden.

Je 4×10^6 PBMC wurden mit entsprechenden epitop-spezifischem Pentamer gefärbt, gewaschen und mit 2 μ l paramagnetischen anti-PE Mikropartikeln (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland) für 15 min bei 4 °C inkubiert, gewaschen, der Überstand dekantiert und das Pellet in 500 μ l Clinimacs Puffer aufgenommen. Anschließend erfolgte die Depletion der magnetisch-markierten T-Zellen. Dazu wurden paramagnetische Säulen (MS) in einen MACS Magneten (beide von Miltenyi Biotech) eingesetzt und mit 500 μ l Puffer equilibriert. Die resuspendierten Zellen wurden auf die Säule aufgebracht und diese dreimal mit 500 μ l Puffer gewaschen. Dabei wurden die markierten CD8⁺ T-Zellen in der mit paramagnetischer Matrix ausgekleideten Säule festgehalten, unmarkierte CD8⁺ T-Zellen passierten die Säule. Im Anschluss wurden CD8⁺ T-Zellen des Durchflusses, mit CD8 Microbeads paramagnetisch isoliert. Mit einer Pentamer-unmarkierten Kontrolle wurde entsprechend vorgegangen. Um die Depletion der epitop-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zu kontrollieren, wurden diese erneut mit CD8-APC gefärbt, fixiert und mittels FACS analysiert.

3.3.11 Methoden zur Gewinnung und Quantifizierung von Viren und Pseudovirionen

Für diese Arbeit wurden EBV Viren und TR– Pseudovirionen verwendet. Die hierzu vorausgegangenen Arbeiten umfassen die Generierung von GFP-codierendem EBV und der stabil transfizierten 2089/293 Zelllinie als Virenproduzent (Delecluse et al., 1998) sowie die darauf aufbauende GFP-codierende TR– Mutante, bei der die für das Verpacken des Virusgenoms in die Kapside essentiellen *terminal repeats* (TR) von EBV deletiert wurden (Delecluse et al., 1999), mit der entsprechenden TR–/293 Zelllinie für die Produktion von genomfreien Pseudovirionen (Feederle et al., 2005). Beide Produzentenzelllinien wurden zum Erhalt des rekombinanten EBV-Genoms unter 75 μ g/ml Hygromycin (PAA) Selektionsdruck kultiviert. Zum Passagieren der adhärennten Zellen wurden diese alle 3 bis 4 Tage vom Boden der Kulturflasche durch Klopfen abgelöst und 1:10 in neuem Hygromycin-haltigem Medium ausplattiert. Die Zellkulturflasche wurde nach einer Woche erneuert.

3.3.11.1 Transfektion und Gewinnung von EBV und TR–

Die Zelllinien 2089/293 und TR–/293 werden durch die Induktion des lytischen Zyklus mittels transienter Transfektion des BZLF1-Expressionsplamid p509 (Hammerschmidt and Sugden, 1988) zu Virus- (EBV) oder Pseudovirionen- (TR–) Produzenten. Dafür wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 50 % in Medium ohne Hygromycin kultiviert. Zum Zeitpunkt der

Transfektion wurde das Medium abgenommen und durch frisches, Hygromycin-freies Medium ersetzt. Die Transfektion erfolgte mit Metafectene (Biontex, Martinsried, Germany). Für eine 75 cm² Flasche wurden (A) 15 µg p509 in 1,5 ml Medium (ohne Antibiotikazusatz) und (B) 60 µl Metafectene in 1,5 µl Medium (ohne Antibiotikazusatz) angesetzt und A und B ohne Mischen zusammengegeben. Nach 20 min Inkubation bei RT erfolgte die tropfenweise Überführung auf die Zellen. Am nächsten Tag wurde das Medium erneuert und 3 Tage nach Transfektion der EBV bzw. der TR- enthaltende Kulturüberstand abgenommen, vorhandene Zellen abzentrifugiert und die Überstände filtriert (0,8 µm, Millipore Cooperation, Bedford, MA). Die Viren (EBV) und Pseudovirionen (TR-) Überstände wurden für bis zu 3 Monate bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. In einigen Experimenten diente zentrifugiertes, filtriertes Kulturmedium der parentalen 293-Nierenzelllinie als zusätzliche Kontrolle.

Wildtyp-EBV wurde direkt von unbehandelten B95.8-Zellen geerntet, zentrifugiert, filtriert und ebenfalls bei 4 °C gelagert.

3.3.11.2 Quantifizierung und Normierung von EBV und TR-

3.3.11.2.1 Gentransfer zur Bestimmung der transformierenden EBV-Einheiten

Zur Bestimmung der transformierenden Einheiten wurden frisch isolierte B-Zellen oder Raji Zellen mit EBV infiziert. 2×10^5 /ml Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen an EBV-haltigem Zell-Überstand infiziert und 3 Tage nach Infektion mittels FACS analysiert. Ab Tag 3 nach Infektion wurde erstmals eine diskrete „lymphoblastoide“ Zellpopulation detektierbar, die an ihrer GFP-Fluoreszenz sowie an der Vergrößerung der Zellen (stärkere Vorwärts- und Seitwärtsstreuung) erkannt werden konnte.

Die absolute Zahl „lymphoblastoide“ Zellen wurde im FACS ermittelt. Zur Normierung des Messvolumens wurden zu jedem FACS-Ansatz 20000 Kalibrierungs-Kügelchen sowie 1 µM TOPRO3 (Invitrogen) in PBS zugegeben und 5000 Kalibrierungs-Kügelchen pro Ansatz gemessen. Es wurde angenommen, dass eine grün-fluoreszierende, lymphoblastoide Zelle einer transformierenden Einheit EBV entsprach. Bis zu 0,1 transformierenden Einheiten/B-Zelle (TE) wurde ein linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl der lymphoblastoiden Zellen und der zur Infektion verwendeten Menge an EBV gefunden. Basierend auf dieser Quantifizierung wurde in der EBV-Infektionsexperimenten eine TE von 0,1 eingesetzt. Für die Normierung der B95.8 Überstände wurde, über eine Verdünnungsreihe, die Anzahl

lymphoblastoider Zellen an Tag 3 nach Infektion ermittelt, die einer TE von 0,1 des EBV Überstandes entsprach.

3.3.11.2 Schneller GFP-Proteintransfer zur Quantifizierung und Normierung von TR–

Der GFP-Transfer auf B-Zellen oder Raji-Zellen wurde zur Normierung der TR– Überstände verwendet. Dies wird dadurch ermöglicht, dass man bereits kurze Zeit nach Infektion mit EBV oder Pseudoinfektion mit TR– einen Transfer von GFP-Fluoreszenz auf B-Zellen oder Raji-Zellen beobachtete. Dieser Transfer von GFP als Protein ist von GFP-Genexpression in der infizierten Zelle dadurch zu unterscheiden, dass er (1) die gesamte B-Zellpopulation umfasst, (2) bereits wenige Stunden nach (Pseudo-)infektion beobachtet wird und (3) die damit verbundene GFP-Fluoreszenzintensität eine Größenordnung unter der Intensität liegt, die in der EBV-GFP-tragenden Subpopulation ab Tag 3 beobachtet wird.

2×10^5 /ml B-Zellen oder Raji-Zellen wurden mit EBV (TE von 0,1) infiziert. Parallel wurden B-Zellen oder Raji-Zellen mit verschiedenen Verdünnungen von TR– Überstand pseudo-infiziert. Einen Tag nach der (Pseudo-)infektion wurde der GFP-Transfer durch die mittlere grüne Fluoreszenzintensität der gesamten Population im FACS ermittelt. Die TR– Verdünnung, die zur gleichen GFP-Fluoreszenz-Intensität führten wie in der EBV-Infektion bei einer TE von 0,1, wurde für die experimentelle Pseudoinfektion von B-Zellen verwendet.

3.3.12 Infektions- und Pseudoinfektionsansätze

Die Infektion (EBV) und die Pseudoinfektion (TR–) von gereinigten B-Zellen erfolgte in 48-well-Platten. Dazu wurden 2×10^5 /ml gereinigte B-Zellen mit EBV oder B95.8 bei einer TE von 0,1 infiziert oder mit der normierten Kontrollmenge von TR– pseudo-infiziert. Als weitere Kontrolle wurden Überstände der unmodifizierten 293-Zellen verwendet. Das Volumen entsprach dem Volumen der eingesetzten TE von 0,1. Die (Pseudo-)infektionen wurden ohne oder mit Zugabe von TLR-Liganden durchgeführt (Liste der Liganden siehe 3.2.3). Bei Ansäuerung des Mediums wurde den Zellen frisches Medium zugegeben. Dies war nie in der ersten Woche nach Infektion notwendig. Für die Infektion vom PBMC wurde ein B-Zellanteil von 10 % angenommen. So wurde für die Infektion von 2×10^6 /ml PBMC eine TE von 0,1 verwendet. Die Ansätze wurden in An- und Abwesenheit der TLR-Agonisten und des T-Zell-Inhibitors Cyclosporin A (CsA) (1µg/ml, Sigma Aldrich) in 6-well-Platten angesetzt.

3.3.13 Zeitlicher Verlauf der T-Zell-Erkennung (pseudo-)infizierter B-Zellen in der frühen Phase nach der Infektion

Infektions- und Pseudoinfektionsansätze wurden wie beschrieben angesetzt und die antigenspezifische T-Zell-Erkennung der frühinfizierten B-Zellen mittels IFN- γ -ELISA ermittelt. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Vorgehensweisen angewendet.

Virusnormierter Ansatz

Bei diesem Ansatz war die EBV-induzierte B-Zellproliferation integraler Teil des Experiments. Zunächst (Tag 0) wurden in etlichen Replika-Kulturen immer 50000 humane B-Zellen (in 500 μ l) mit EBV infiziert (TE von 0,1). In Parallelansätzen diente TR-, B95.8 oder parentaler 293-Überstand als Kontrolle. An jedem Analysetag wurde ein immer gleiches Volumenaliquot von 100 μ l der resuspendierten B-Zellkultur entnommen. Dieses Aliquot enthielt also jeweils die Zellen, die sich aus der (Pseudo-)infektion von 100000 primären B-Zellen mit einer TE von 0,1 oder dem Volumen der Kontrollen (TR-, EBV und 293) entwickelt hatten. Die am Analysetag vorhandene B-Zellzahl konnte demnach gleich (um die Tage 2 und 3) oder höher (etwa ab Tag 5) sein als die Ausgangspopulation an Tag 0 oder, wie im Falle der Kontrollen, abnehmen. Da jedoch stets der biologische Effekt der gleichen Virusdosis untersucht wurde, konnte man diesen Ansatz als „virusnormiert“ bezeichnen. Das B-Zell-Aliquot wurde für 16 h mit 10000 EBV-spezifischen T-Zellen in insgesamt 200 μ l in 96-well-Spitzbodenplatten bei 37 °C koinkubiert. Danach wurden die Kulturüberstände abgenommen und im IFN- γ -ELISA analysiert.

Zellnormierter Ansatz

Auch bei diesem Ansatz wurden B-Zellen an Tag 0 mit EBV infiziert und am jeweiligen Analysetag mit EBV-spezifischen T-Zellen kokultiviert, anders als im vorigen Ansatz jedoch an jedem Analysetag gewaschen und einheitlich 20000 B-Zellen mit 10000 T-Zellen konfrontiert. Hier wurde also die B-Zellzahl am Analysetag konstant gehalten, es handelt sich daher bei den B-Zellen um das biologische Resultat, das aus der Infektion entstanden ist und welches die T-Zelle nun erkennen kann. Dieser Ansatz wurde als „zellnormiert“ bezeichnet. B- und T-Zellen wurden wiederum in 96-well-Spitzbodenplatten für 16 h koinkubiert und anschließend die IFN- γ -Menge im Überstand mittels ELISA analysiert.

3.3.14 Zytotoxizitätsanalyse

Zur Messung der Zytotoxizität EBV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen gegenüber verschiedenen Zielzellen wurden die Zielzellen mit Calceinacetoxymethylester (Calcein AM, Molecular Probes) markiert. Diese nicht-fluoreszierende, hydrophobe Substanz kann in intakte, lebende Zellen eindringen und wird dort durch zelleigene Esterasen in fluoreszierendes Calcein umgewandelt, das mehrfach negativ geladen und daher schlecht membrangängig ist. Bei der CD8⁺ T-Zell-vermittelten Lyse geben die Zielzellen das Calcein in den Überstand ab. Dessen Emission kann bei einer Wellenlänge von 535 nm im Plattenfluorimeter (Victor, Wallac, Turku, Finnland) gemessen werden. Die infizierten B-Zellen wurden geerntet und mit 10 µg/ml Calcein AM für 30 min bei 37 °C inkubiert und dreimal mit PBS gewaschen. Durch die Markierung mit Calcein ergab sich ein grünliches Pellet. Je 200 µl Replikat wurden 5000 B-Zellen mit unterschiedlichen Zahlen spezifischer CD8⁺ T-Zellen in 96-well-Spitzbodenplatten für 3 h kultiviert. Für die maximale Lyse wurden die gefärbten B-Zellen mit 0,5 % Triton X 100 (Roth) versetzt. Die minimale Lyse zeigten in Medium kultivierte gefärbte B-Zellen. 80 µl Überstand wurden blasenfrei in neue 96-well-Flachbodenplatten überführt und im Fluorimeter gemessen.

3.3.15 Regressionsassays

Um die T-Zell-vermittelte Inhibierung des Auswuchses infizierter B-Zellen zu lymphoblastoiden Zellen zu untersuchen, wurden infizierte PBMC oder B-Zellen in serieller Verdünnung (PBMC: 400000 bis 39000 Zellen; B-Zellen: 10000 bis 100 Zellen) und im Falle der B-Zellen mit und ohne einer konstanten Anzahl von 10000 EBV-spezifischen T-Zellen in 96-well-Rundbodenplatten bei 37 °C kokultiviert. Nach 4 - 6 Wochen wurde die Anwesenheit vitaler Zellen durch einen MTT-Test quantifiziert.

3.3.16 MTT-Test

Rückschlüsse auf die Vitalität und Proliferation einer Zellpopulation können mittels MTT-Test gezogen werden (Mosmann, 1983). Lebende Zellen reduzieren MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) mit Hilfe von mitochondrialen Dehydrogenasen zu einem Formazan. Für den Test wurden die zu analysierenden Zellkulturen in 96-well-Flachbodenplatten resuspendiert und 50 µl je Ansatz in eine neue 96-well-Flachbodenplatte überführt. 10 µl einer MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS, Thiazolylblau, Sigma-Aldrich) und 40 µl Medium wurden zugegeben und 3 h bei 37 °C inkubiert. Bei Anwesenheit vitaler Zellen

zeigte sich ein violetter Niederschlag. Durch Zugabe von 100 μ l SDS 10 % (Roth) und Über-Nacht-Inkubation bei RT wurden das violette Formazan in Lösung gebracht. Am nächsten Tag wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Kulturen ohne lebende Zellen zeigten eine Absorption von $< 0,3$ in diesem Test und Kulturreplikate mit lebenden Zellen zeigten eine Absorption von $> 0,7$. Alle Replikate, die eine Absorption von mehr als 0,8 zeigten, wurden als „ausgewachsen“ gewertet.

3.3.17 Quantifizierung der EBV-Freisetzung durch CpG-DNA-stimulierte LCL

1×10^7 LCL wurden in 25 ml Medium in An- und Abwesenheit von 4 μ g/ml CpG-DNA für einen Tag kultiviert. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen und 5×10^6 LCL des jeweiligen Ansatzes in frischem Medium für einen weiteren Tag bzw. bis zum Tag 5 kultiviert. Die Überstände wurden bei 300 g für 10 min zentrifugiert und zum Entfernen möglicher restlicher Zellen noch einmal bei 1600 g für 15 min zentrifugiert. Der jeweilige Überstand wurde zu $4,8 \times 10^6$ L5178Y B-Blasten zugegeben und die B-Blasten zu je 1×10^5 Zellen pro 96-well-Rundbodenplatte für sechs Wochen kultiviert. Jede Woche wurden 50 μ l des Mediums durch neues Medium ersetzt. Die proliferierenden Wells der durch EBV-transformierten B-Blasten wurden mit dem MTT-Test bestimmt. Als Kontrolle wurden die B-Blasten mit Medium alleine kultiviert oder mit EBV infiziert.

3.3.18 Graphische und statistische Auswertung

Das Programm Graphpad Prism 4 wurde für die Erstellung von Graphen und statistischen Auswertungen verwendet. FACS-Daten wurden zunächst mittels Microsoft Excel ausgewertet und zur graphischen Auswertung in Graphpad Prism 4 überführt.

Ergebnisse

4. Ergebnisse

T-Zellerkennung EBV-infizierter B-Zellen früh nach der Infektion

Die Immundominanz der IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen ist ein auffälliges Merkmal der Immunantwort gegen EBV. Im ersten Teil meiner Arbeit sollte die Hypothese untersucht werden, ob eine mögliche Präsentation und Erkennung von früh in der Infektion exprimierten IE-Proteinen zu der Dominanz der IE-antigen-spezifischen T-Zellen führen könnte. Dafür wurden folgende Fragen gestellt:

- (1) Gibt es eine Präsentation von IE-Antigenen früh nach der Infektion gegenüber spezifischen CD8⁺ T-Zellen?
- (2) Tritt diese mögliche Antigenerkennung vielleicht sogar früher ein als die Erkennung von latenten Proteinen durch spezifische CD8⁺ T-Zellen?
- (3) Kann eine Erkennung der IE-Antigene zu einer, gegenüber den Latenzantigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, gesteigerten Proliferation der IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen führen?

Für die Beantwortung dieser Fragen wurden in allen Fällen B-Zellen mit EBV infiziert oder mit TR⁻ pseudoinfiziert und entweder die Antigenpräsentation gegenüber generierten, spezifischen CD8⁺ T-Zellklonen mittels IFN- γ -Effektorfunktion im ELISA untersucht oder die Proliferation spezifischer T-Zellen der PBMC-Gesamtpopulation früh nach Infektion mittels Tetramerfärbung im FACS sichtbar gemacht.

Für die Versuche wurde rekombinantes EBV verwendet, das nach der Induktion des lytischen Zyklus in 2089/293 Zellen entsteht (siehe 3.3.11.1). Merkmal dieser Viren ist, dass die virale DNA neben den EBV-Proteinen auch für das GFP kodiert (Delecluse et al., 1998). TR⁻ wird nach der Induktion des lytischen Zyklus in TR⁻/293 Zellen gebildet. Das entstandene TR⁻ Viruspartikel enthält keine EBV-DNA (Delecluse et al., 1999; Feederle et al., 2005).

4.1 Quantifizierung von Viren

Für die Quantifizierung der Viren wurde angenommen, dass die mit EBV infizierten B-Zellen zum Zeitpunkt der Transformation das EBV-Genom exprimierten und neben den transformierenden EBV-Proteinen auch GFP produzierten. Dadurch sollte es möglich sein,

Ergebnisse

diese transformierten Zellen im FACS durch die Expression des GFP von nicht-infizierten Zellen zu unterscheiden. Zur Bestimmung dieses Zeitpunkts wurden gereinigte B-Zellen mit EBV infiziert und die Gesamtpopulation der B-Zellen an verschiedenen Tagen nach der Infektion auf ihre GFP-Fluoreszenz im FACS hin untersucht (Abbildung 4.1).

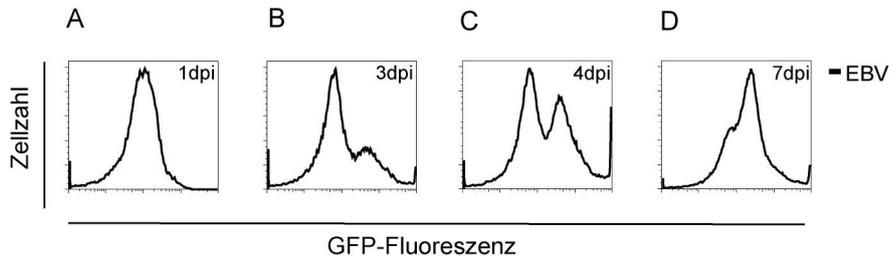


Abbildung 4.1: Die Transformation von B-Zellen war erstmals 3 Tage nach Infektion sichtbar. B-Zellen wurden mit EBV infiziert und die GFP-Fluoreszenz an verschiedenen Tagen im FACS bestimmt. Die ersten GFP-exprimierenden, transformierten B-Zellen konnten am 3. Tag nach Infektion detektiert werden. Am 4. Tag nach Infektion exprimierten nahezu 50 % der Zellen das EBV-Genom, und eine Woche nach Infektion waren von der uninfizierten Ausgangspopulation nur noch wenige Zellen übrig.

Deutlich ist zu erkennen, dass 3 Tage nach der Infektion der transformierte Phänotyp der B-Zellen erstmals sichtbar wurde. Zu diesem Zeitpunkt trat eine GFP-exprimierende zweite Population auf. Die Transformation befähigt die infizierten Zellen zu proliferieren. Dies wurde 4 Tage nach der Infektion dadurch sichtbar, dass sich die Menge der GFP-exprimierenden Zellen auf fast 50 % der Gesamtpopulation gesteigert hatte. Sieben Tage nach der Infektion bestand die gemessene Kultur fast ausschließlich aus transformierten, GFP-exprimierenden Zellen. Zur Quantifizierung von EBV wurde daher angenommen, dass eine transformierte Zelle an Tag 3 durch die Infektion mit einem Viruspartikel entstanden war und wurde als eine transformierende Einheit pro B-Zelle (TE) definiert. Um herauszufinden, bei welcher eingesetzten Virusmenge die meisten Transformanden an Tag 3 sichtbar waren, wurden B-Zellen mit unterschiedlichen Verdünnungen des Virus infiziert und die Menge an GFP-exprimierenden Zellen an Tag 3 bestimmt. Für die Ermittlung der absoluten Zellzahl wurde, neben der GFP-Expression als weiteres Kriterium der Transformation, der Übergang der Zellen in den aktivierten, lymphoblastoiden Zustand herangezogen, der durch mehr Zellkern und mehr Granula charakterisiert ist. Diese Eigenschaften können im Vorwärtsstreulicht (FSC) und im Seitwärtsstreulicht (SSC) im FACS untersucht werden. An Tag 3 nach Infektion konnten im markierten Bereich (Analysefenster) die durch die Infektion vergrößerten und

Ergebnisse

granuläreren transformierten Zellen deutlich von den nicht-infizierten Zellen unterschieden werden (Abbildung 4.2).

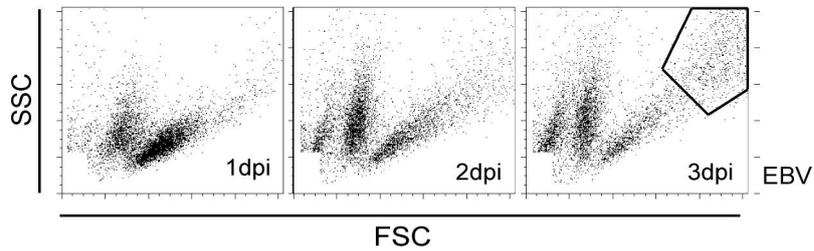


Abbildung 4.2: Die Transformation mit EBV resultierte in einer morphologischen Veränderung der Zellen.

Die Steigerung der Größe und der Granularität der infizierten B-Zelle ermöglichte es, diese Kriterien neben der GFP-Expression für die Quantifizierung der Viren heranzuziehen. Infizierte Zellen wurden im FACS im FSC und SSC analysiert. Zeitgleich mit der GFP-Expression konnte auch der veränderte Phänotyp im FACS 3 Tage nach Infektion gesehen werden. Das Analysefenster umfasst diese transformierte Population.

Die absolute Anzahl der transformierten Zellen wurde nun durch Zugabe von fluoreszenzmarkierten Kalibrierungs-Kügelchen in einer bestimmten Konzentration als Volumenstandard gemessen. Als Vitalitätsmarker wurde der Fluoreszenzfarbstoff TOPRO3 den Kulturen bei der FACS-Messung zugegeben. Gewertet wurden nur lebende, GFP-positive Zellen, die sich im markierten Bereich der FSC-/SSC-Darstellung befanden (lymphoblastoide Zellen).

Beispielhaft ist die so ermittelte absolute Anzahl an infizierten Zellen aus den eingesetzten Verdünnungen in Abbildung 4.3 gezeigt. Die TE der jeweiligen Verdünnung wurden aus der ermittelten absoluten Anzahl lymphoblastoider Zellen durch Division mit der eingesetzten Gesamtzellzahl ermittelt. Deutlich ist zu sehen, dass eine zu hohe Konzentration von EBV eine toxische Wirkung auf die Zellen hatte und es nur zu einer geringen Anzahl an lymphoblastoiden Zellen kam. Die maximale Infektion ohne toxische Wirkung zeigte sich in diesem Beispiel bei einer TE von 0,07. Für die weiteren Infektionen in meiner Arbeit wurde eine einheitliche TE von 0,1 gewählt.

Ergebnisse

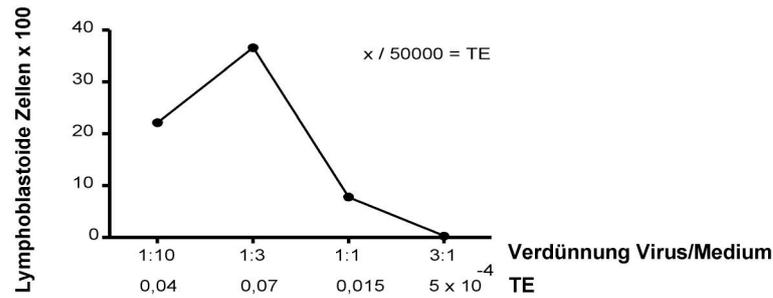


Abbildung 4.3: Die Ermittlung der für die Versuche verwendeten TE des Virus. B-Zellen wurden mit verschiedenen Verdünnungen des Virus infiziert und die absoluten, transformierten Zellzahlen im FACS ermittelt. Wurde die TE an Tag 3 für jede Verdünnung ermittelt, so zeigte sich, dass bis zu einer TE von ungefähr 0,1 ein linearer Anstieg der Zahl lymphoblastoider Zellen gemessen werden konnte. Höhere Konzentrationen von EBV besaßen eine toxische Wirkung auf die B-Zellen, so dass die Zahl der ermittelten Zellen abnahm. TE: transformierende Einheit pro B-Zelle, x: Anzahl der lymphoblastoiden Zellen an Tag 3 nach Infektion.

Die Bindung des Viruspartikels an die B-Zelle führt zu einer Aktivierung der Zelle (D'Addario et al., 2001). Um die Aktivierung der B-Zelle durch die bloße Bindung des Partikels von den Effekten, die durch die Transformation mit EBV entstehen, abgrenzen zu können, wurde das durch Delecluse et al. in unserer Abteilung entwickelte TR⁻/293 System verwendet (Delecluse et al., 1999). TR⁻/293 Zellen tragen stabil das TR⁻ deletierte EBV-Genom, welches ebenfalls für GFP kodiert. Durch die Deletion der *terminal repeats* (TR) kann das Virusgenom nicht in die Viruspartikel verpackt werden, und so werden von den TR⁻/293 Zellen nach der Induktion des lytischen Zyklus überwiegend EBV-DNA-leere Viruspartikel (TR⁻) produziert (Feederle et al., 2005). Mit diesem TR⁻ pseudoinfizierte B-Zellen werden durch CD4⁺ T-Zellen, die spezifisch für Hüllproteine des Viruspartikels sind, nach wie vor erkannt und eliminiert (Adhikary et al., 2006). Dies zeigt, dass solche Pseudovirionen an die B-Zelle binden, aufgenommen, prozessiert und effektiv auf MHC II präsentiert werden.

Das vom transgenen EBV-Genom kodierte GFP wird auch in den Verpackungszelllinien TR⁻/293 und 2089/293 exprimiert. Denkbar ist nun, dass nach Induktion des lytischen Zyklus bei der Bildung der Viruspartikel oder Pseudovirionen GFP mit aufgenommen wird. Wäre das der Fall, so sollte ein möglicher Transfer von GFP auf die EBV oder TR⁻ (pseudo-)infizierte B-Zelle erkennbar sein. Dies würde es ermöglichen, einen solchen GFP-Proteintransfer für die Quantifizierung und Normierung der Pseudovirionen heranzuziehen.

4.2 Quantifizierung und Normierung von Pseudovirionen

Um diese Hypothese zu testen, wurden zunächst B-Zellen mit einer TE von 0,1 infiziert und einen Tag nach Infektion auf einen möglichen GFP-Proteintransfer im FACS untersucht. Parallel dazu wurden B-Zellen mit dem Überstand von 293-Zellen als Kontrolle behandelt. Deutlich konnte einen Tag später eine gegenüber der Kontrolle um eine Größenordnung gesteigerte GFP-Fluoreszenz der infizierten B-Zellpopulation auf der logarithmischen GFP-Fluoreszenzachse ermittelt werden (Abbildung 4.4 A). Auch mit TR⁻ pseudoinfizierte B-Zellen zeigten gegenüber der Kontrolle einen Übertrag von GFP (Abbildung 4.4 B).

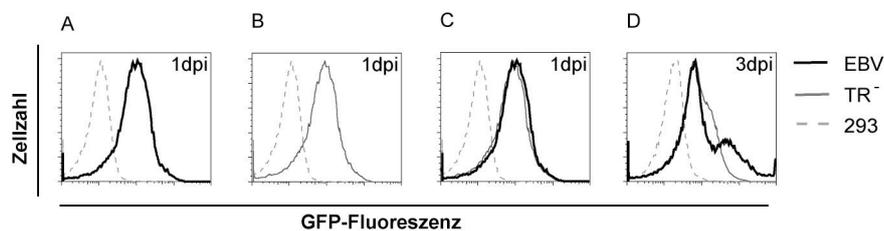


Abbildung 4.4: (A bis C) Der GFP-Transfer auf B-Zellen ermöglichte die Quantifizierung und Normierung der Pseudovirionen und (D) die GFP-Fluoreszenz des TR⁻ GFP-Transfer unterschied sich von der endogen exprimierten EBV-GFP-Fluoreszenz der transformierten Zelle. B-Zellen wurden mit einer TE von 0,1 infiziert und im FACS einen Tag nach Infektion auf einen möglichen GFP-Transfer auf die infizierte Zelle untersucht. (C) zeigt die Überlagerung von (A) und (B).

Für die Normierung der Pseudovirionen wurden nun B-Zellen mit verschiedenen Verdünnungen der Pseudovirionen für einen Tag kultiviert. Der Transfer von GFP auf die B-Zelle wurde anschließend im FACS untersucht und diejenige Verdünnung ermittelt, die den gleichen GFP-Transfer induzierte wie vorher die EBV-Infektion mit einer TE von 0,1. Abbildung 4.4 C zeigt diese Verdünnung.

Dieser frühe von EBV und TR⁻ induzierte GFP-Transfer unterschied sich von der endogenen Expression des GFP in der EBV-infizierten Zelle. Die endogen exprimierte GFP-Fluoreszenz der an Tag 3 nach Infektion auftretenden transformierten Population war um eine Größenordnung gegenüber der GFP-Fluoreszenz des GFP-Transfers von Tag 1 nach Infektion gesteigert (Abbildung 4.4 D). So konnten transformierte B-Zellen (EBV) deutlich von nicht-transformierten B-Zellen (TR⁻ und Kontrolle) unterschieden werden.

4.3 Primärinfektion mit EBV

IM-Patienten zeigen eine deutlich gesteigerte Anzahl transformierter B-Zellen im Blut (Yao et al., 1989). Um eine Vorstellung zu entwickeln, wie sich die Proliferation der B-Zellen nach der Primärinfektion verhielt, wurden diese mit EBV und TR– (pseudo-)infiziert und die absolute Anzahl der transformierten B-Zellen in einem Zeitverlauf im FACS ermittelt. Die FSC-/SSC-Darstellungen dieser Aufnahmen sind in Abbildung 4.5 A zu sehen. Die gemessene absolute Anzahl lymphoblastoider Zellen wurde in Abbildung 4.5 B zusammengefasst. Hier ist deutlich zu erkennen, dass nach dem Auftreten der ersten sichtbaren Transformanden an Tag 3 nach der Infektion die Proliferation einsetzte (entspricht Ergebnis 4.1 C und D). Die Anzahl der transformierten Zellen hatte sich 4 Tage nach dem Beginn der Proliferation bereits um das 6-fache gesteigert (EBV). Pseudoinfizierte B-Zellen (TR–) zeigten keine Proliferation und gingen in die Apoptose. Apoptotische Zellen sind als separate Population in der FSC-/SSC-Darstellung sichtbar, da sie eine geringere Vorwärtsstreuung als lebende und/oder aktivierte/transformierte Zellen besitzen. Mit beginnender Transformation an Tag 3 nach Infektion wurde im EBV-Ansatz eine Zunahme der Expression des Oberflächenmarkers CD86 beobachtet. Dieses in der T-Zell-Aktivierung essentielle Molekül nahm im Zeitverlauf zu und wurde auch noch 20 Tage nach der Infektion von den lymphoblastoiden Zellen verstärkt exprimiert. Die Pseudoinfektion erreichte keine nennenswerte Steigerung der CD86-Expression. Zwanzig Tage nach der Infektion waren die pseudoinfizierten B-Zellen gestorben (erschließt sich aus Abbildung 4.5 A und B) und somit war eine CD86-Fluoreszenz nicht mehr bestimmbar (n.d.) (Abbildung 4.5 C). Entsprechendes galt für den Oberflächenmarker CD80 (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend soll gesagt werden, dass die Bindung und ggf. Aufnahme des Viruspartikels einen Tag nach Infektion mittels GFP-Transfer auf die infizierte B-Zelle sichtbar wurde und die etablierte Transformation der infizierten Zelle an Tag 3 nach Infektion phänotypisch erkennbar wurde (gesteigerte GFP-Expression, Zellgröße und CD86-Induktion). Ab diesem Zeitpunkt vermehrten sich die infizierten Zellen.

Ergebnisse

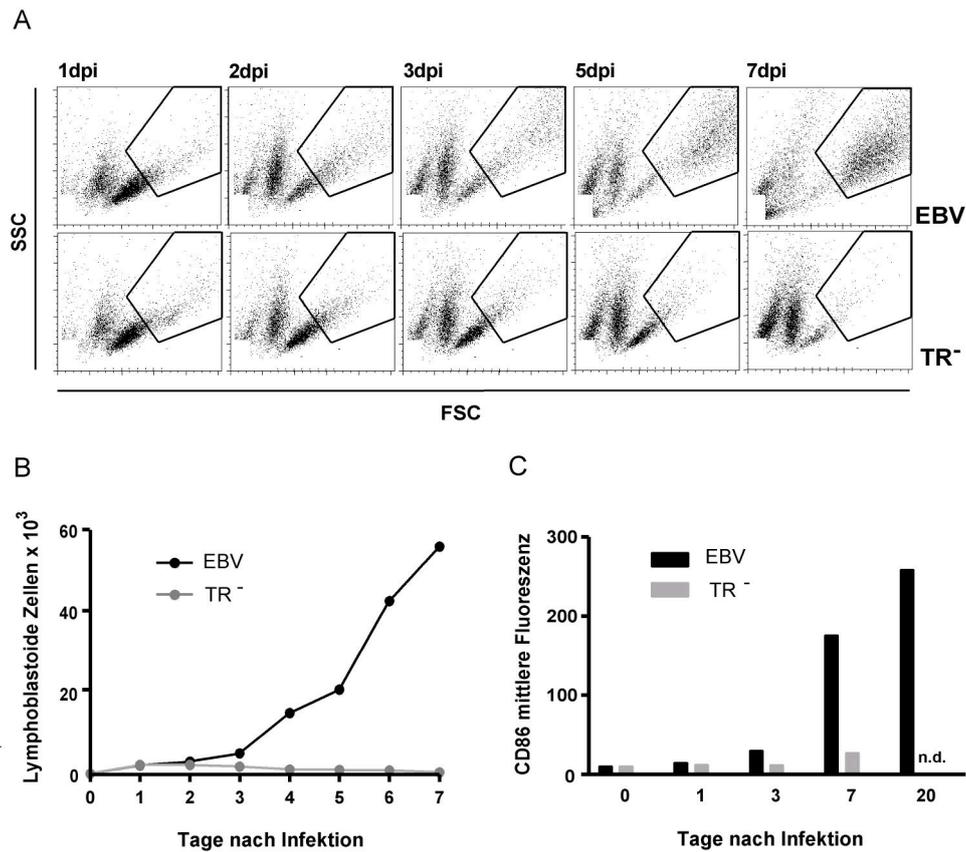


Abbildung 4.5 Die erstmals sichtbare Transformation an Tag 3 nach Infektion initiierte (A und B) das Auswachsen lymphoblastoider Zellen und (C) steigerte die Aktivierungsmarker-Expression der infizierten Zelle. (A) Die Zeitverläufe von EBV und TR⁻ (pseudo-)infizierten B-Zellen wurden im FACS auf die (B) absolute Anzahl von lymphoblastoiden Zellen hin untersucht. Dabei zeigten die infizierten B-Zellen eine gesteigerte Proliferation ab Tag 3. (C) Die B-Zellen wurden parallel mit Antikörper gegen CD86 gefärbt und im FACS auf die mittlere CD86-Fluoreszenz hin untersucht. Die Transformation der B-Zelle an Tag 3 nach der Infektion induzierte die Expression dieses Markers. Pseudoinfizierte B-Zellen zeigten nur eine transiente Aktivierung auf. N.d.: Nicht detektierbar.

Im folgenden Abschnitt sollte nun die Erkennung der infizierten B-Zellen durch spezifische CD8⁺ T-Zellen untersucht werden. Dafür war es nötig, spezifische CD8⁺ T-Zellklone gegen latente und lytische Antigene des Virus zu generieren.

4.4 Charakterisierung der generierten EBV-spezifischen CD8+ T-Zellklone

Die antigen-spezifischen CD8+ T-Zellklone wurden aus dem Blut von gesunden EBV-positiven Spendern mittels spezifischer EBV-Peptide generiert. PBMC von Spendern mit bekannter HLA-Restriktion und bekanntem EBV-spezifischem CD8+ T-Zellrepertoire wurden isoliert und mit den entsprechenden synthetischen Peptiden aus latenten Antigenen sowie aus IE- und E-Antigenen von EBV kokultiviert (siehe 3.3.5). Nach vierzehntägiger Inkubation wurden die Zellen einzellkloniert. Es wurden insgesamt 4 Latenzantigen-spezifische CD8+ T-Zellklone, ein E-antigen-spezifischer CD8+ T-Zellklon sowie 3 IE-antigen-spezifische CD8+ T-Zellklone erhalten. Der Ausschnitt der unter 3.2.4 bereits beschriebenen Tabelle fasst diese T-Zellklone noch einmal zusammen.

EBV Antigen	Epitopsequenz / Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Bezeichnung	Avidität log	
CD8+ T-Zellen gegen latente Antigene von EBV					
EBNA3A	QAKWRLQTL	B*0801	QAK	7,1	
EBNA3A	RPPIFIRRL	B*0702	RPP	8,8	
LMP2	IEDPPFNSL	B*4001	IED	7,6	
LMP2	CLGGLTMV	A*0201	CLG	8,9	
CD8+ T-Zellen gegen lytische Antigene von EBV					
BMLF1	GLCTLVAML	A*0201	E	GLC	7
BRLF1	YVLDHLIVV	A*0201	IE	YVL	8,2
BZLF1	EPLPQGQLTAY	B*3501	IE	EPL	7
BZLF1	RAKFKQLL	B*0801	IE	RAK	7,1

Die gewachsenen T-Zellklone wurden mittels Tetramerfärbung (siehe 3.3.8.2), Peptidtitration und Erkennungssassay (siehe 3.3.6) charakterisiert. Repräsentativ für alle generierten T-Zellklone (siehe 3.2.4) sind im Folgenden die Charakterisierungsergebnisse des RAK- und QAK-spezifischen CD8+ T-Zellklons (beide besitzen die Restriktion HLA B*0801) beschrieben.

Zunächst wurden die generierten T-Zellklone mit spezifischen Tetrameren und mit Antikörper gegen CD4 und CD8 gefärbt. Als Kontrolle wurden T-Zellen nur mit CD4 und CD8-Antikörper gefärbt. Anschließend wurden alle Proben in einer Drei-Farben-FACS-Analyse gemessen. In Abbildung 4.6 A sind die drei Färbeergebnisse für den RAK-spezifischen T-Zellklon in der oberen Reihe dargestellt. Die untere Reihe zeigt die CD8-Kontrollfärbung. Deutlich war zu erkennen, dass es sich bei dem gefärbten T-Zellklon um einen monoklonalen

Ergebnisse

CD8⁺ T-Zellklon mit der RAK-Spezifität handelte. Entsprechendes zeigten die FACS-Analysen für den QAK-spezifischen CD8⁺ T-Zellklon (Abbildung 4.6 B). Die Färbung RAK-spezifischer Klone mit RAK-Tetramer war schwächer als die Färbung QAK-spezifischer Klone mit QAK-Tetramer. Dies war jedoch typisch für verschiedene Klone jeder dieser Spezifitäten.

Für die Analyse der funktionellen Avidität der T-Zellklone wurden die spezifischen T-Zellen mit einer konstanten Menge an HLA B*0801-positiven B-Blasten kokultiviert. Zu diesem Ansatz wurden unterschiedliche Konzentrationen von Peptid zugegeben, um die B-Blasten mit Peptid zu beladen. Die Ansätze wurden für eine Nacht kultiviert und die IFN- γ -Produktion als Maß der Erkennung am nächsten Tag im ELISA gemessen. Beide T-Zellklone zeigten dabei eine ähnlich gute Erkennung der peptid-beladenen Zielzellen, mit einer halbmaximalen Aktivität bei $10^{-7,1}$ M Peptid (Abbildung 4.6 C).

Zur Untersuchung, ob die T-Zellen ihr spezifisches Zielantigen auch auf der infizierten B-Zelle erkannten, wurde die Erkennung von HLA-kompatiblen (MDB) und HLA-inkompatiblen LCL (JNB) sowie HLA-kompatiblen mini-LCL (F45W) getestet. Mini-LCL tragen ein so genanntes mini-EBV, in welchem die lytischen Gene von EBV deletiert wurden. Damit exprimiert F45W ausschließlich latente EBV-Antigene. Wie erwartet, wurde F45W nur durch den QAK-spezifischen T-Zellklon erkannt. Die HLA-kompatible LCL MDB wurden von beiden spezifischen T-Zellklonen maximal erkannt, wohingegen die HLA-inkompatible LCL JNB von beiden T-Zellen nicht erkannt wurde (Abbildung 4.6 D). Weiter reagierten die generierten T-Zellklone nicht gegen K562-Zellen und besaßen somit keine NK-Zell-Aktivität (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

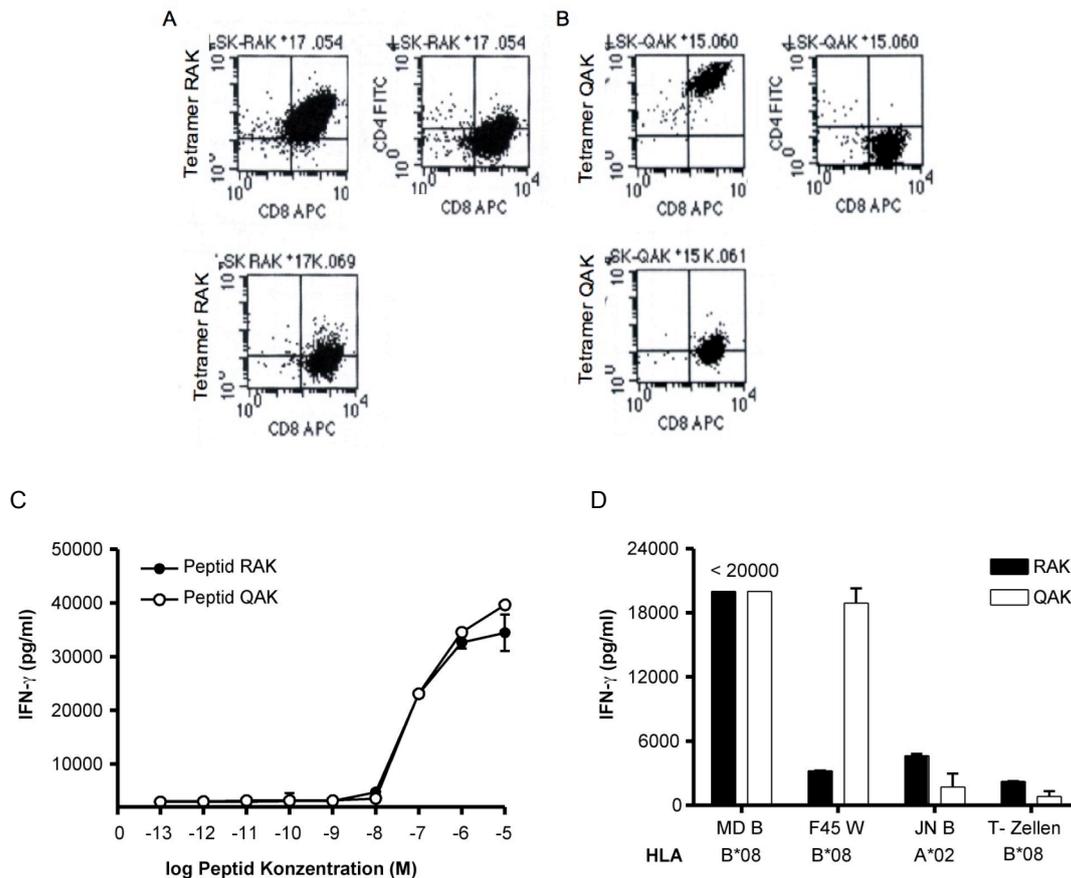


Abbildung 4.6: Die Charakterisierung der T-Zellklone umfasste (A und B) Tetramerfärbungen der T-Zellkulturen, Peptidtitrationen zur Messung der Avidität eines T-Zellklons und (D) Erkennungsassays mit unterschiedlichen Zielzellen. (A und B) Die generierten T-Zellklone wurden mit dem jeweils spezifischen Tetramer gefärbt und mit Antikörper gegen CD8 und CD4 gegengefärbt. Als Kontrolle wurden Zellen der Kultur nur gegen CD8 und CD4 gefärbt. Die obere Reihe zeigt die Ergebnisse der Drei-Farben-Analyse für die Tetramer-positive Färbungen, die untere Reihe zeigt die entsprechenden CD8-Kontrollfärbungen. Deutlich konnten die generierten T-Zellklone als monoklonale (A) RAK- und (B) QAK-spezifische CD8⁺ T-Zellen identifiziert werden. (C) Spezifische T-Zellklone wurden mit einer konstanten Anzahl an HLA-kompatiblen B-Blasten kokultiviert. Diese waren mit unterschiedlichen Konzentrationen an Peptid beladen. Die Erkennung der präsentierten Peptide wurde am nächsten Tag mittels IFN- γ -ELISA ermittelt. Die RAK- und QAK-spezifischen T-Zellklone erkannten ihr Zielantigen mit gleicher Avidität. (D) Die RAK- und QAK-spezifischen T-Zellen wurden mit HLA-kompatiblen LCL und mini-LCL wie auch mit HLA-inkompatiblen LCL kokultiviert und die IFN- γ -Produktion am nächsten Tag mittels ELISA gemessen. Die RAK-spezifischen T-Zellen erkannten die HLA-kompatiblen LCL, die QAK-spezifischen T-Zellen, zusätzlich noch die nur latente Antigene von EBV präsentierende HLA-kompatible mini-LCL F45W. Die HLA-inkompatiblen LCL wurde nicht erkannt. T-Zellen: Der Hintergrund war bei beiden T-Zellen gering.

Für die Untersuchung der Antigenerkennung wurden mit so genannten virusnormierten Ansätzen gearbeitet. Dies bedeutet, dass je Zeitpunkt 50000 B-Zellen mit EBV infiziert, mit TR- pseudoinfiziert oder gegebenenfalls mit dem Überstand von 293-Zellen kultiviert wurden. Am entsprechenden Analysetag nach der (Pseudo-)infektion wurde für jedes Replikat des Versuchsansatzes ein immer gleiches Volumenaliquot von 100 µl der resuspendierten Zellen entnommen und mit 10000 spezifischen T-Zellen über Nacht kokultiviert. Dieses Aliquot enthielt somit immer eine Anzahl an Zellen, die sich aus der gleichen Zahl von initial eingesetzten, (pseudo-)infizierten B-Zellen zum Zeitpunkt der Analyse entwickelt hatte. Die Erkennung der infizierten Zellen wurde im ELISA durch die Messung des in den Überstand abgegebenen IFN- γ bestimmt.

4.5 Erkennung von IE-Antigenen früh nach der EBV-Infektion

Nachdem die CD8⁺ T-Zellklone gegen lytische und latente Antigene von EBV generiert und auf ihre Eigenschaften untersucht worden waren, sollte nun die Frage beantwortet werden, ob die in der kurzzeit-infizierten B-Zelle exprimierten IE-Proteine BZLF1 und BRLF1 von dieser präsentiert werden und von spezifischen CD8⁺ T-Zellen erkannt werden können. Die dazu durchgeführten Versuche wurden unter virusnormierten Bedingungen (siehe oben) angesetzt. Eine graphische Auswertung der Erkennung der IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellklone ist in der folgenden Abbildung 4.7 dargestellt.

Die Erkennung des HLA B*3501-restringierten BZLF1-Epitops EPL konnte an Tag 5 nach der Infektion erstmals detektiert werden. Bis Tag 10 bewegte sich die Erkennung um den Wert der Anfangserkennung und ab dem 12 Tag nach der Infektion steigerte sich die T-Zell-Erkennung (Abbildung 4.7 A). Das HLA B*0801-restringierte BZLF1 Epitop RAK wurde von spezifischen CD8⁺ T-Zellen 6 Tage nach der Infektion erkannt. Der Anstieg der Erkennung dieses Epitops vollzog sich in zwei Phasen: einer ersten ab Tag 6 und einer zweiten ab Tag 12 nach Infektion (Abbildung 4.7 B). Neben BZLF1 wurde auch die CD8⁺ T-Zellerkennung des BRLF1-Proteins untersucht, und zwar mit Hilfe des generierten HLA A*0201-restringierten YVL-spezifischen T-Zellklons. Auch dieser erkannte das Epitop auf kurzzeit-infizierten B-Zellen. Hier erfolgte die Erkennung bereits 3 Tage nach Infektion, blieb am 4 Tag konstant zur Anfangserkennung und steigerte sich über Tag 5 und 6. Tag 7 zeigte einen Rückgang der BRLF1-Antigenerkennung (Abbildung 4.7 C). In allen Fällen wurden TR- pseudoinfizierte und mit 293-Kulturüberstand kokultivierte B-Zellen nicht erkannt.

Ergebnisse

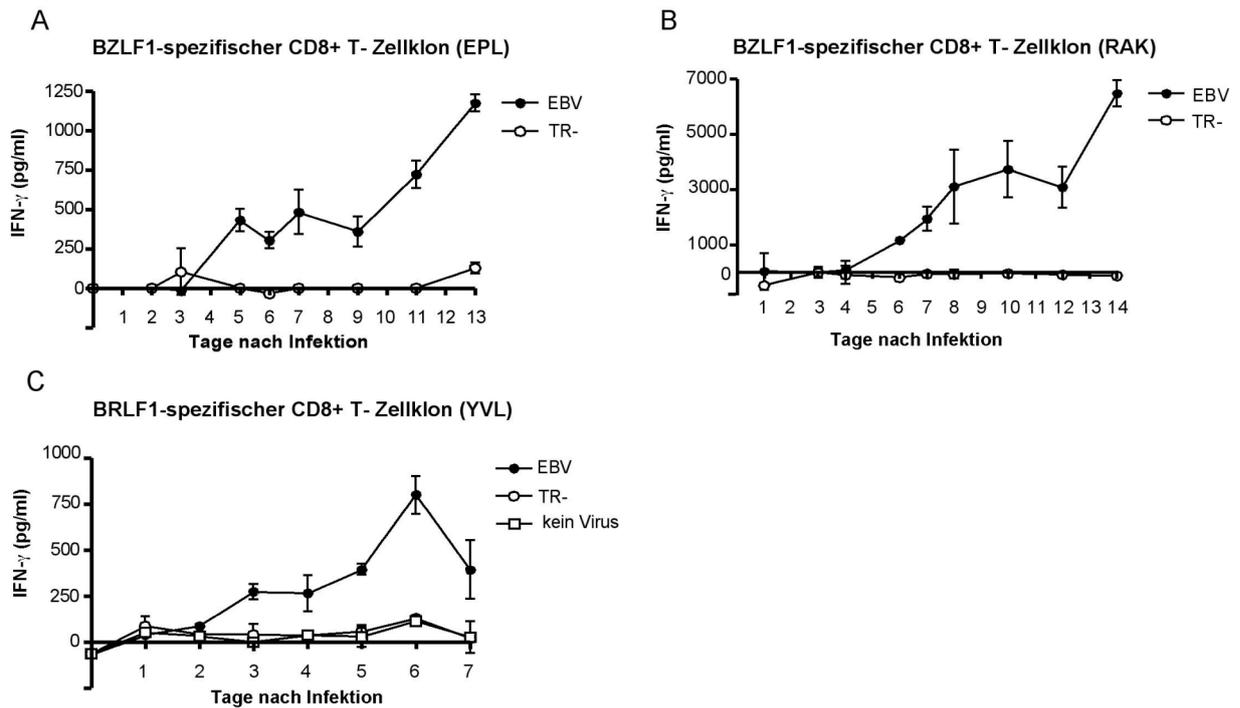


Abbildung 4.7: Kurzzeit-infizierte B-Zellen präsentierten die IE-Proteine BZLF1 (A und B) und BRLF1 (C) antigen-spezifischen CD8+ T-Zellen. Die B-Zellen wurden (pseudo-)infiziert oder mit 293-Kulturüberstand (kein Virus) kultiviert. Die T-Zell-Erkennungsanalysen erfolgten unter virusnormierten Bedingungen. (A) EPL-spezifische CD8+ T-Zellen erkannten ab dem Tag 5 und (B) RAK-spezifische CD8+ T-Zellen erkannten ab Tag 6 die Epitope aus BZLF1 auf der Oberfläche der infizierten B-Zelle. (C) YVL-spezifische CD8+ T-Zellen erkannten ab Tag 3 nach Infektion ihr Antigen.

Diese Versuche zeigten, dass die in der frühinfizierten B-Zelle vorhandenen IE-Proteine BZLF1 und BRLF1 von den B-Zellen prozessiert und IE-antigen-spezifischen CD8+ T-Zellen präsentiert wurden. Die Erkennung der Antigene erfolgte in den ersten 3 bis 6 Tagen nach der Infektion. Trotz einer steigenden Anzahl an transformierten B-Zellen in den virusnormierten Ansätzen blieb die Intensität der T-Zell-Erkennung über mehrere Tage hinweg relativ stabil hoch. Erst danach nahm die Erkennung nochmals deutlich zu.

4.6 Erkennung von Latenzantigenen in der Frühphase der Infektion

Die kurzzeit-infizierten B-Zellen präsentierten die in der Frühphase der Infektion exprimierten IE-Proteine BZLF1 und BRLF1 spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Es stellte sich die Frage, ob diese IE-Antigenerkennung durch spezifische CD8⁺ T-Zellen vielleicht sogar früher eintrat als die Erkennung von latenten Proteinen. Zur Beantwortung wurde die Erkennung frühinfizierter B-Zellen durch CD8⁺ T-Zellen spezifisch für die Latenzantigene EBNA3A und LMP2 von EBV ebenfalls in Zeitverlaufsstudien untersucht. Diese entsprachen in der Durchführung den Untersuchungen zur Antigenerkennung durch IE-antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen. In einigen Experimenten wurde zusätzlich noch das Wildtyp-EBV B95.8 zur Infektion der B-Zellen verwendet.

Die Erkennung des HLA B*0702-restringierten EBNA3A Epitops RPP konnte ab dem 4 Tag nach Infektion detektiert werden und stieg im Verlauf von einer Woche stetig an (Abbildung 4.8 A). Das HLA B*0801-restringierte Epitop aus EBNA3A, QAK, wurde von den spezifischen CD8⁺ T-Zellen ab dem 7 Tag nach der Infektion erkannt und auch hier steigerte sich die Erkennung jeden weiteren Analysetag. Ähnlich der Infektion mit dem rekombinanten EBV wurden die mit B95.8 infizierten B-Zellen von den QAK-spezifischen T-Zellen ab Tag 7 nach Infektion erkannt, allerdings etwas stärker, und diese Erkennung blieb auch am folgenden Tag gegenüber der Erkennung der mit EBV-infizierten B-Zelle leicht gesteigert (Abbildung 4.8 B). Pseudoinfizierte B-Zellen wie auch nur mit 293-Kulturüberstand kultivierte B-Zellen wurden nicht erkannt. Für die LMP2-spezifische Erkennung wurde zum einen der HLA A*0201-restringierte CLG-spezifische CD8⁺ T-Zellklon und zum anderen der HLA B*4001-restringierte IED-spezifische CD8⁺ T-Zellklon eingesetzt (Abbildung 4.8 C und D). Die Erkennung durch den CLG-spezifischen CD8⁺ T-Zellklon konnte am 4 Tag nach Infektion erstmals ermittelt werden und steigerte sich kontinuierlich bis 14 Tage nach Infektion. Dagegen begann die Erkennung durch den IED-spezifischen CD8⁺ T-Zellklon erst an Tag 9 nach Infektion. In der B95.8-Infektion konnte gegenüber der Infektion mit rekombinantem EBV wieder eine leichte Steigerung der Erkennung gemessen werden. In beiden Ansätzen kam es am 11 Tag nach Infektion zu einer leichten Abnahme der Erkennung. Die sehr deutliche Verzögerung der Erkennung des LMP2 Epitops IED könnte damit in Zusammenhang stehen, dass für die beiden LMP2-Epitope unterschiedliche Wege der Prozessierung existieren. Im Zusammenhang mit der jeweiligen Hydrophobizität der Epitope kommt es zur TAP-abhängigen oder TAP-unabhängigen Antigen-Prozessierung. Das IED-Peptid besitzt eine Hydrophobizität von -0,59 und kann nur über einen TAP-abhängigen Weg

Ergebnisse

auf MHC I präsentiert werden. Dagegen kann das CLG-Peptid, mit einer Hydrophobizität von 4,14 TAP-unabhängig auf MHC I geladen werden (Lautscham et al., 2001). Dadurch ist eine schnellere Präsentation und damit schnellere Erkennung seitens der CLG-spezifischen CD8+ T-Zelle durchaus denkbar. Ab Tag 9 war die Erkennung der infizierten B-Zellen gleich hoch. Pseudoinfizierte B-Zellen wurden nicht erkannt.

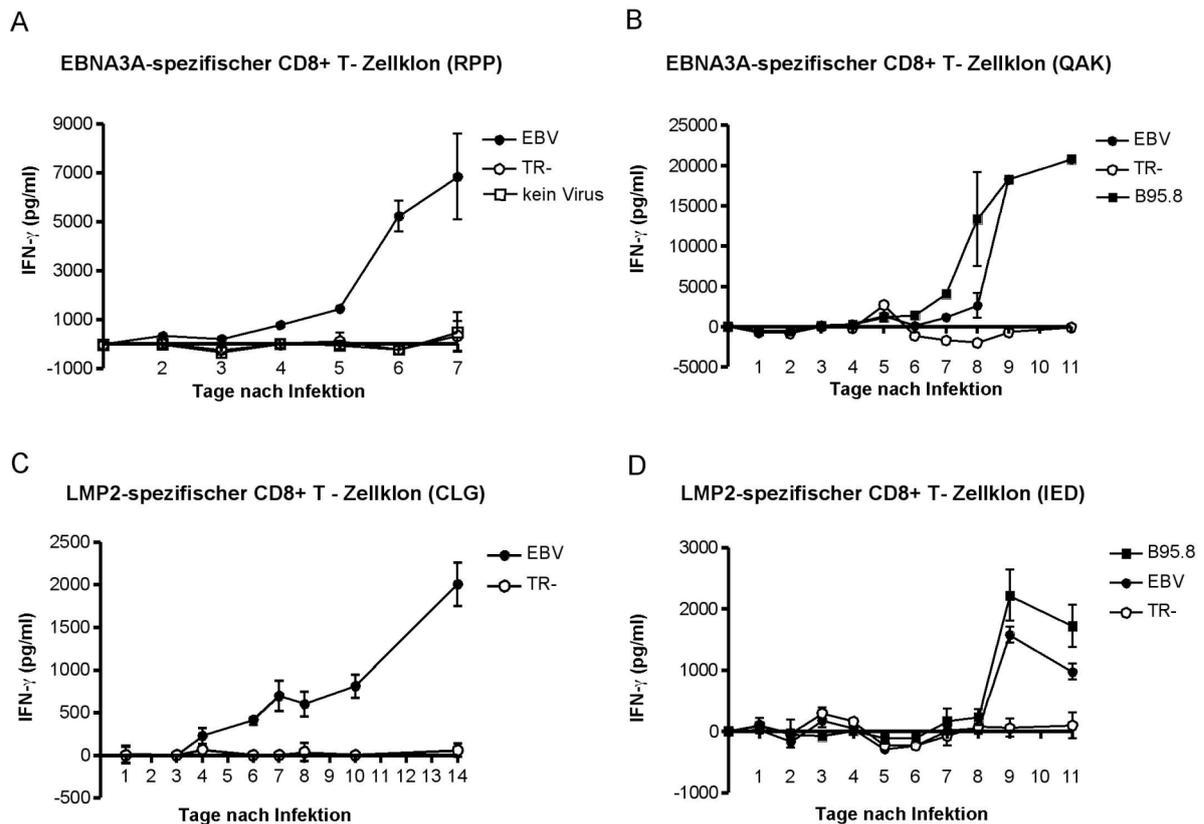


Abbildung 4.8 A bis D: Die Erkennung der Antigene EBNA3A (A und B) und LMP2 (C und D) durch die spezifischen CD8+ T-Zellen. Primäre B-Zellen wurden mit EBV oder B95.8 infiziert, mit TR- pseudoinfiziert oder mit 293-Kulturmedium (kein Virus) kultiviert. Die T-Zell-Erkennungsanalysen erfolgten unter virusnormierten Bedingungen. **(A)** Die Erkennung der kurzzeit-infizierten B-Zellen durch RPP-spezifische CD8+ T-Zellen nahm im Laufe der Analyse zu. **(B)** Die QAK-spezifischen CD8+ T-Zellen erkannten EBV-infizierte B-Zellen ab dem 7 Tag nach Infektion. **(C)** CLG-spezifische CD8+ T-Zellen erkannten LMP2 ab dem Tag 4 nach Infektion. **(D)** Die Antigenerkennung durch den IED-spezifischen CD8+ T-Zellklon war bis zum 9 Tag nach Infektion verzögert.

Diese Versuche zeigten, dass die Erkennung der Latenzantigene EBNA3A und LMP2 durch die spezifischen CD8+ T-Zellen zwischen den Tagen 4 und 9 nach Infektion begann und die Erkennung danach stetig zunahm. Diese Latenzantigenerkennung war gegenüber der Erkennung der IE-Antigene gesteigert. So zeigte der HLA B*0801-restringierte QAK-

Ergebnisse

spezifische CD8+ T-Zellklon eine maximale Erkennung von 22000 pg/ml IFN- γ an Tag 11 nach der Infektion, wohingegen der HLA B*0801-restringierte IE-antigen-spezifische CD8+ T-Zellklon gegen das RAK-Epitop nur eine maximale Erkennung von 7000 pg/ml IFN- γ an Tag 14 nach Infektion erreichte. Dies galt auch für die HLA A*0201-restringierten CLG-spezifischen CD8+ T-Zellen und für die HLA A*0201-restringierten IE-antigen-spezifischen CD8+ T-Zellen gegen das YVL-Epitop.

4.7 Beginn der Erkennung von IE- und Latenzantigenen

Der zeitliche Beginn der Antigenerkennung von BZLF1 und BRLF1 durch die spezifischen CD8+ T-Zellen wurden nun mit dem Beginn der Antigenerkennung von EBNA3A und LMP2 verglichen. Als willkürliches Kriterium für die Erkennung wurde ein Grenzwert von 200 pg/ml IFN- γ gewählt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.9 aufgetragen. Im Mittel wurden die IE-Antigene früher erkannt als die Latenzantigene von EBV. Die früheste Antigenerkennung erfolgte dabei in beiden Gruppen durch die T-Zellklone mit der/den höchsten Avidität(en).

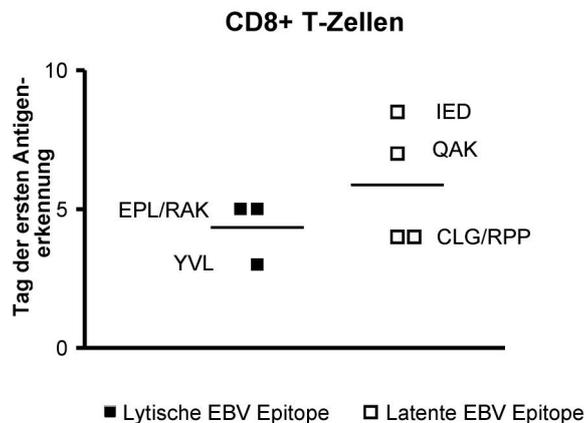


Abbildung 4.9: IE-Antigene wurden im Mittel früher erkannt als Latenzantigene. Der erste Wert über 200 pg/ml IFN- γ ergab den Tag der ersten Antigenerkennung.

4.8 Proliferation IE-antigen-spezifischer T-Zellen früh nach Infektion

Konnte nun diese frühere Erkennung der IE-Antigene zu einer verstärkten Proliferation der IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen früh nach der Infektion führen? Zur Bearbeitung dieser Frage wurden gereinigte PBMC eines Spenders mit bekanntem CD8⁺ T-Zell-Repertoire isoliert und die B-Zellen in der PBMC-Population mit EBV infiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Zahl der spezifischen CD8⁺ T-Zellen mittels Tetramer-färbung im FACS gemessen.

In Abbildung 4.10 ist das Ergebnis für Spender ST gezeigt. Die EBV-Infektion der B-Zellen in der PBMC-Gesamtpopulation bewirkte, dass sich die in den PBMC vorhandenen IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen während der ersten 12 Tage nach der Infektion um den Faktor 4,3 steigerten, wohingegen die Latenzantigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen sich nur um einen Faktor von 2,5 vermehrten. In TR– pseudoinfizierten Ansätzen kam es zu keiner Proliferation von CD8⁺ T-Zellen der beiden Spezifitäten früh nach Infektion (Daten nicht mit in das Diagramm aufgenommen).

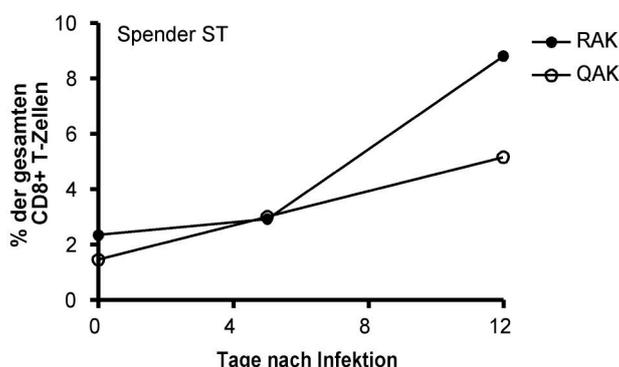


Abbildung 4.10: Die Erkennung des präsentierten IE-Antigens auf den frühinfizierten B-Zellen induzierte eine gegenüber der Vermehrung der Latenzantigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen gesteigerte Proliferation der IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Die PBMC eines Spenders mit bekanntem CD8⁺ T-Zell-Repertoire wurden infiziert und die Entwicklung der Proliferation durch Tetramerfärbungen der RAK- und QAK-spezifischen CD8⁺ T-Zellen an unterschiedlichen Tagen im FACS untersucht.

Dieses Ergebnis zeigte, dass die kurzzeit-infizierten B-Zellen von primären CD8⁺ T-Zellen gegen das IE-Antigen BZLF1 und das Latenzantigen EBNA3A von EBV erkannt wurden. Dabei zeigten die IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (RAK) eine gegenüber den Latenzantigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (QAK) gesteigerte Proliferation. Somit induzierte die IE-Antigenpräsentation der frühinfizierten B-Zelle neben einer früheren IFN- γ -Produktion

Ergebnisse

auch eine gesteigerte Proliferation der IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Dies könnte zur Ausbildung der Dominanzhierarchie der IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im CD8⁺ T-Zell-Repertoire eines IM-Patienten in der akuten Phase wie auch im gesunden Träger führen.

Neben der T-Zell-Proliferation könnte die Antigenerkennung die Lyse der frühinfizierten B-Zelle durch die aktivierten CD8⁺ T-Zellen induzieren. Damit wären weniger infizierte B-Zellen für die Erkennung durch die Latenzantigen-spezifischen CD8⁺T-Zellen vorhanden und durch die zeitlich verzögerte Antigenerkennung käme es hier zu einer späteren Aktivierung der T-Zellen und damit zu einer geringeren Anzahl an spezifischen T-Zellen am Tag der Analyse.

4.9 Late-Antigen-Erkennung in der Frühphase der Infektion

Da T-Zellen gegen Strukturproteine des Virus innerhalb der CD4+ T-Zellantwort gegen EBV dominant vertreten sind, wurde zum Vergleich mit den CD8+ T-Zelldaten die CD4+ T-Zellantwort auf das gp350-Hüllprotein von EBV im Zeitverlauf untersucht. Sollte die zeitliche Erkennung der Antigene eine Rolle in der Bildung der Dominanzhierarchien während der Primärantwort und im gesunden Träger spielen, so müsste auch für die Erkennung der Hüllproteine von EBV eine schnelle Antwort zu finden sein. Entsprechend der vorausgegangen T-Zellexperimente wurden die CD4+ T-Zell-Studien unter virusnormierten Bedingungen angesetzt. B-Zellen wurden dafür mit EBV und TR– (pseudo-)infiziert oder mit den Kulturüberständen von 293-Zellen kultiviert.

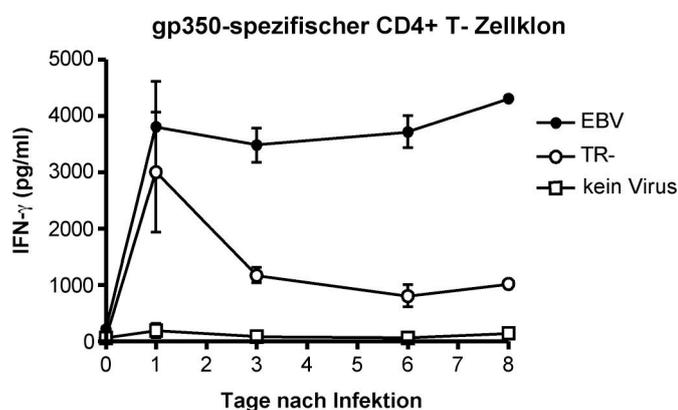


Abbildung 4.11: Hüllprotein-spezifische CD4+ T-Zellen erkannten EBV-infizierte oder mit TR– pseudoinfizierte B-Zellen bereits einen Tag nach der Infektion. B-Zellen wurden (pseudo-)infiziert oder mit 293-Kulturüberstand (kein Virus) kultiviert und die T-Zellerkennung in virusnormierten Ansätzen durch die IFN- γ -Produktion im ELISA untersucht. Die B-Zellen wurden bereits einen Tag nach der (Pseudo-)infektion von den gp350-spezifischen CD4+ T-Zellen mit maximaler Intensität erkannt. Die EBV-Infektion resultierte in einer stabilen Erkennung über mehrere Tage hinweg, wohingegen die TR– pseudoinfizierten Zellen zu späteren Zeitpunkten eine weniger starke Reaktion bewirkten.

In Abbildung 4.11 ist die Antigenerkennung durch den gp-350-spezifischen CD4+ T-Zellklon dargestellt. Eine maximale Erkennung des Antigens konnte hier schon einen Tag nach der Infektion gesehen werden. Über die folgenden sieben Analysetage blieb diese Erkennung bei hohen IFN- γ -Werten konstant. Die TR– Pseudoinfektion hatte am ersten Tag nach Infektion eine nahezu ebenso starke Erkennung zur Folge, allerdings nahm diese bereits am 2 Tag nach Infektion deutlich ab. Dies steht in Zusammenhang mit der Abnahme der Zellzahl in TR– pseudoinfizierten Zellkulturen (siehe Abbildung 4.5 B). B-Zellen, die nur mit 293-Kulturüberstand kultiviert wurden, wurden von dem spezifischen T-Zellklon nicht erkannt.

Ergebnisse

Somit wurde auch für die dominanten gp350-spezifischen CD4⁺ T-Zellen eine sehr schnelle Erkennung gemessen. Es ist auffallend, dass die EBV-infizierten B-Zellen über die gesamte Messzeit von 8 Tagen maximal erkannt wurden. Da gp350 in der Frühphase der Infektion nicht *de novo* exprimiert wird (Kalla et al., 2010; Wen et al., 2007) ist das gp350-Protein aus dem Viruspartikel die einzige Quelle für die Antigenpräsentation. Dieses Ergebnis deutet demnach auf sehr stabile gp350-Peptid-MHC-Komplexe hin.

4.10 E-Antigenerkennung in der frühen EBV-Infektion

Die IE-Proteine BZLF1 und BRLF1 sind Transaktivatoren des lytischen Zyklus und steuern die Transkription des E-Proteins BMLF1 (Feederle et al., 2000; Kenney et al., 1989). Im Folgenden sollte die spezifische CD8⁺ T-Zellerkennung des BMLF1-Proteins untersucht werden. Dazu wurden erneut virusnormierte Zeitverlaufsstudien mit EBV und TR⁻ (pseudo-) infizierten HLA-kompatiblen B-Zellen und mit dem BMLF1-spezifischen CD8⁺ T-Zellklon GLC durchgeführt. Parallel wurde die Antigenerkennung des T-Zellklons mittels peptid-beladener, HLA-kompatibler B-Blasten kontrolliert.

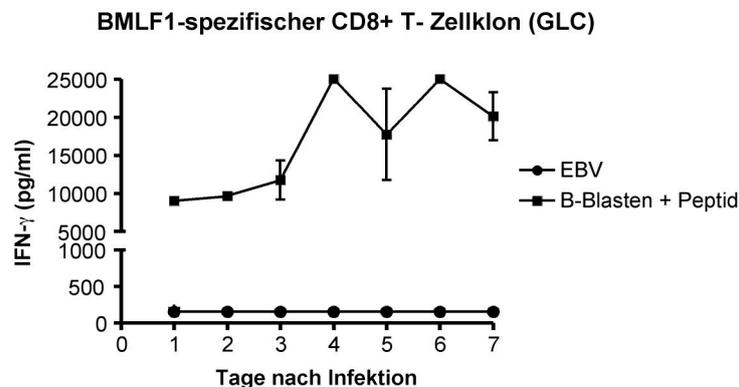


Abbildung 4.12: BMLF1 wurde früh nach Infektion nicht durch spezifische CD8⁺ T-Zellen erkannt. Virusnormierte Zeitverlaufsstudien wurden durchgeführt und das produzierte IFN- γ im ELISA gemessen. Frühinfizierte B-Zellen konnten von GLC-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nicht erkannt werden. GLC-peptid-beladene, HLA-kompatible B-Blasten wurden von den spezifischen T-Zellen zu jedem Zeitpunkt der Analyse mit starker IFN- γ -Sekretion erkannt.

In Abbildung 4.12 ist das Ergebnis eines Experiments gezeigt. Es ist zu sehen, dass sich keine Erkennung der kurzzeit-infizierten B-Zellen durch den BMLF1-spezifischen CD8⁺ T-Zellklon ergab. Auch wurden TR⁻ pseudoinfizierte B-Zellen nicht erkannt (nicht im Graph gezeigt). Der BMLF1-spezifische CD8⁺ T-Zellklon war jedoch zum Zeitpunkt der Analyse funktionell, da der Klon zu jedem Messzeitpunkt GLC-peptid-beladene B-Blasten erkannte. Offenbar war in den frühinfizierten B-Zellen das BMLF1 zu niedrig exprimiert oder wurde zu ineffizient prozessiert und präsentiert. Dies deckt sich mit der Vorstellung eines so genannten „abortiv-lytischen“ Zyklus in der Frühphase der Infektion (Kalla et al., 2010; Wen et al., 2007), in dem das IE-Protein BZLF1 für die Etablierung der Latenz und nicht für die Induktion des lytischen Zyklus mit Virenbildung verantwortlich ist.

4.11 Charakteristika der frühen Antigenpräsentation

An dieser Stelle sollte noch einmal genauer auf die relativ konstante Antigenerkennung des IE-Antigens BZLF1 in der Frühphase der Infektion eingegangen werden. Wodurch könnte sich nun diese konstante Erkennung der infizierten B-Zelle durch die RAK- und EPL-antigen-spezifischen CD8⁺ Zellen erklären? Zur Beantwortung dieser Frage wurde der Versuchsaufbau verändert. Es wurden so genannte zellnormierte Ansätze verwendet (siehe auch 3.3.13). Anders als bei den virusnormierten Ansätzen wurden die T-Zellen nicht mit den „Nachkommen“ der infizierten Ausgangszellen zum entsprechenden Zeitpunkt konfrontiert, sondern die (pseudo-)infizierten B-Zellen wurden zu jedem Messzeitpunkt gezählt und die spezifischen T-Zellen zu jedem Zeitpunkt mit der gleichen Zahl infizierter B-Zellen kokultiviert. Dies sollte die Erkennung einer Änderung in der Antigenpräsentation ermöglichen. Die IFN- γ -Produktion wurde wie gewöhnlich am nächsten Tag im ELISA gemessen. Die pseudoinfizierten B-Zellen wurden nicht erkannt.

BZLF1-spezifischer CD8⁺ T- Zellklon (RAK)

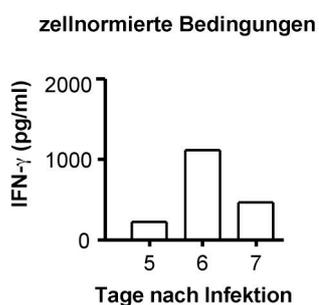


Abbildung 4.13: In zellnormierten Ansätzen kommt es früh nach der Infektion zu einer abortiven Erkennung des BZLF1-Proteins durch RAK-spezifische CD8⁺ T-Zellen. Die Antigen-erkennung der frühinfizierten B-Zellen wurde in zellnormierten Ansätzen über die IFN- γ -Produktion im ELISA gemessen.

In Abbildung 4.13 ist die Antigenerkennung der frühinfizierten B-Zelle durch den RAK-spezifischen CD8⁺ T-Zellklon zu sehen. Im zellnormierten Ansatz konnte am Tag 5 nach der Infektion eine Erkennung des Antigens durch die spezifischen CD8⁺ T-Zellen gemessen werden. Diese nahm an Tag 6 deutlich zu und fiel am darauf folgenden Tag wieder ab. Es wurde somit weniger BZLF1-Antigen den T-Zellen präsentiert.

Da es zu einem abortiv-lytischen Zyklus in der frühinfizierten Zelle kommt, sind die im vollständigen lytischen Zyklus von EBV exprimierte evasiven Proteine (BNLF2a oder das virale IL-10) möglicherweise nicht funktionell exprimiert und daher nicht der Grund für die Abnahme der Antigenpräsentation. Daher deutet dies eher auf ein transientes Vorkommen des

Ergebnisse

BZLF1-Proteins in der Frühphase der Infektion hin. Kalla et al. zeigten eine erste Welle von BZLF1-Expression früh nach der Infektion mit einer anschließenden Reduktion des Proteins (Kalla et al., 2010). Die konstante BZLF1-Erkennung der frühen EBV-Infektion in den virusnormierten Experimenten resultierte damit aus einer größer werdenden Anzahl an transformierten Zellen, die weniger Antigen den T-Zellen zur Erkennung präsentierten.

Im Gegensatz dazu konnte im zellnormierten Ansatz zur Untersuchung der EBNA3A-Antigenerkennung eine kontinuierlich ansteigende Erkennung durch den QAK-spezifischen CD8⁺ T-Zellklon gemessen werden (Abbildung 4.14). Demnach nahm die Prozessierung des Latenzproteins und Präsentation des Antigens nach der Transformation der B-Zelle stetig zu.

EBNA3A-spezifischer CD8⁺ T- Zellklon (QAK)

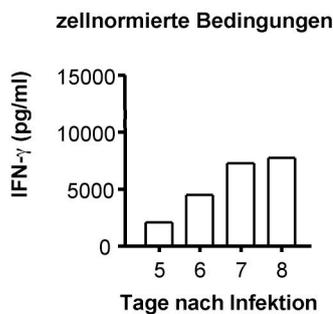


Abbildung 4.14: Frühinfizierte B-Zellen steigerten kontinuierlich die EBNA3A-Antigenpräsentation gegenüber QAK-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Die QAK-Antigenerkennung der frühinfizierten B-Zellen wurde in zellnormierten Ansätzen über die IFN- γ -Produktion im ELISA gemessen.

4.12 Inhibition der EBV-Transformation durch IE-antigen-spezifische CD8+ T-Zellen

Kann nun eine Erkennung von IE-Antigenen durch spezifische CD8+ T-Zellen früh nach der Infektion zu einer Lyse der infizierten B-Zelle und zu einer Kontrolle der Infektion führen? B-Zellen wurden mit EBV infiziert und die Zellen am 8, 14 und 23 Tag nach Infektion in serielleren Verdünnungen ohne T-Zellen (Kontrolle) oder mit RAK- oder QAK-spezifischen CD8+ T-Zellklonen für 4 - 6 Wochen kokultiviert (siehe 3.3.15). In Abbildung 4.15 ist der Anteil der EBV-infizierten Kulturen angegeben, die unter diesen Bedingungen zu transformierten Zelllinien auswachsen.



Abbildung 4.15: Transformationskontrolle der kurzzeit-infizierten B-Zellen durch die IE-antigen-spezifischen CD8+ T-Zellen. Infizierte B-Zellen wurden an den Tagen 8 (A), 14 (B) oder 23 (C) nach der Infektion ohne T-Zellen (Kontrolle) oder mit RAK- oder QAK-spezifischen CD8+ T-Zellen für 4 - 6 Wochen kokultiviert und der Anteil vitaler Kulturen im MTT-Test (siehe 3.3.16) bestimmt. Die Erkennung der frühinfizierten B-Zelle bis 2 Wochen nach der Infektion durch die IE-antigen-spezifischen CD8+ T-Zellen reduzierte das Auswachsen zu LCL.

Verglichen mit dem Kontrollansatz (ohne T-Zellen) führte die Anwesenheit der RAK-spezifischen CD8+ T-Zellen zu einer moderaten Auswuchsinhibition in den Ansätzen mit 8 Tage (Abbildung 4.15 A) und 14 Tage (Abbildung 4.15 B) kurzzeit-infizierten B-Zellen. Dagegen führte die Erkennung der infizierten B-Zelle durch den QAK-spezifischen CD8+ T-Zellklon zu einer vollständigen Inhibition des Auswuchses der 8 Tage infizierten B-Zellen. 14 Tage infizierte B-Zellen zeigten allerdings, ab einer Verdünnung von 0,1 B-Zellen/T-Zellen aufwärts, einige wenige ausgewachsene Kulturen. Bei späterer Zugabe des RAK-spezifischen T-Zellklons (Tag 23) konnte dieser die infizierten B-Zellen nicht mehr am Auswachsen hindern. Unerklärlich hierbei war, dass ab einer Verdünnung von 0,1 B-Zellen/T-Zellen abwärts, die Ansätze mit dem RAK-spezifischen CD8+ T-Zellklon mehr ausgewachsene Kulturen aufwiesen als die Kontrolle ohne T-Zellen. Besonders stark war dieser Effekt bei

dem kleinsten B-Zell/T-Zell-Verhältnis. Auch der QAK-spezifische CD8⁺ T-Zellklon verlor bei 23 Tage infizierten B-Zellen an Kontrollfunktion. Im Vergleich mit der Kontrolle waren nahezu die Hälfte der Kulturen zu LCL ausgewachsen (Abbildung 4.15 C). Dies könnte bedeuten, dass die infizierten B-Zellen an Tag 23 bereits aus der Latenzphase reaktiviert wurden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass IE-antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellklone die Transformation begrenzt kontrollieren können und dass diese Kontrolle nur bei frühem Kontakt von infizierten B-Zellen mit IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen möglich ist.

4.13 Lyse kurzzeit-infizierter B-Zellen durch primäre IE-antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen

Bei den vorausgegangenen Experimenten wurden zur Analyse der IE-Antigenpräsentation kultivierte T-Zellklone verwendet. Da deren inhibitorischer Effekt auf das Auswachsen von B-Zellen aber relativ schwach waren (siehe 4.12), stellte sich die Frage, ob primäre antigen-spezifische T-Zellen vielleicht stärkere Effekte haben könnten. Um die primären CD8⁺ T-Zellen nicht durch die Isolationsmethode bereits vor dem eigentlichen Experiment zu aktivieren, wurden die spezifischen T-Zellen nicht positiv selektioniert. Stattdessen wurden PBMC von Spendern mit bekanntem T-Zellrepertoire entweder die EBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen gegen IE-Proteine oder die T-Zellen gegen latente Proteine des Virus depletiert (siehe 3.3.10.3). Mit anschließend durchgeführten Zytotoxizitätsanalysen (siehe 3.3.14) gegen kurzzeit-infizierte B-Zellen wurde die Lysefähigkeit der depletierten CD8⁺ T-Zellpopulation mit der undepletierten Kontrolle verglichen.

Zunächst wurden EBV-spezifische CD8⁺ T-Zellen in den PBMC mit spezifischen Pentameren und CD8-Antikörpern gefärbt und im FACS analysiert. Der Spender zeigte zwei dominante CD8⁺ EBV-T-Zellspezifitäten, nämlich IE-antigen-spezifische T-Zellen gegen ein Epitop aus BZLF1, welche 0,14 % der gesamten T-Zellen ausmachten, und QAK-spezifischen T-Zellen gegen ein Epitop aus dem EBNA3A-Protein mit 0,01 % der gesamten T-Zellen (Abbildung 4.16 A). B-Zellen dieses Spenders wurden isoliert, mit EBV infiziert und für 7 Tage kultiviert. Am 7 Tag wurden aus frischen PBMC des Spenders die RAK- oder QAK-spezifischen CD8⁺ T-Zellen depletiert und die verbleibende CD8⁺-T-Zell-Population im Zytotoxizitätsassay eingesetzt. Zur Kontrolle der Depletion wurden die T-Zellfraktionen im FACS analysiert. Vor

Ergebnisse

Separation wurden in den PBMC 2,9 % RAK-spezifische CD8+ T-Zellen und 2,5 % QAK-spezifische CD8+ T-Zellen gemessen. Durch die Depletion wurde der größte Teil der T-Zellen mit der jeweiligen Spezifität entfernt (Abbildung 4.16 B). Die 7 Tage infizierten B-Zellen wurden mit Calceinacetoxy-methylester gefärbt und mit den nicht-depletierten CD8+ T-Zellen, RAK- oder QAK-depletierten CD8+ T-Zellen für 3 h kokultiviert. In der undepletierten Kontrolle konnte eine Lyse der kurzzeit-infizierten B-Zellen von 75 % ermittelt werden. Waren die QAK-spezifischen CD8+ T-Zellen depletiert und nur noch die RAK-spezifischen CD8+ T-Zellen vorhanden (Δ QAK) kam es lediglich zu einer geringen Verringerung der Lyse der frühinfizierten B-Zelle. Wurden hingegen die RAK-spezifischen T-Zellen depletiert (Δ RAK), so ergab sich eine starke Reduktion der Lyse (Abbildung 4.16 C).

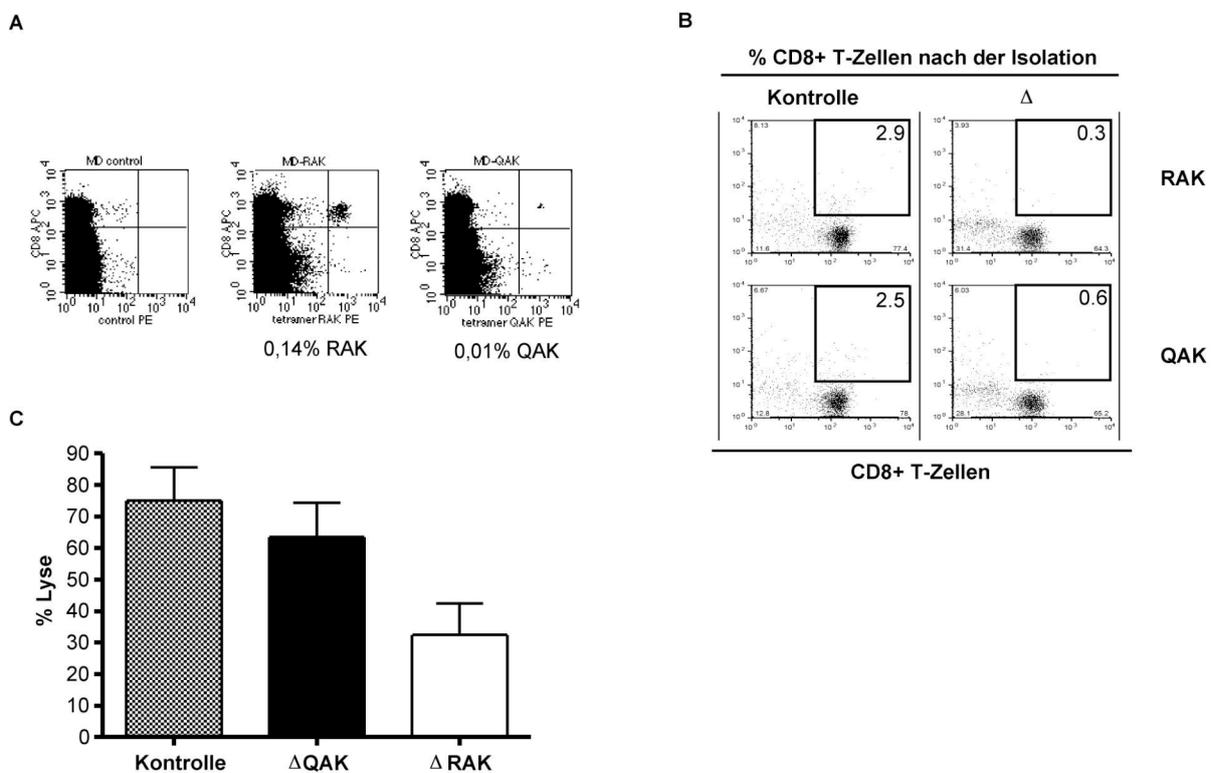


Abbildung 4.16: Lyse frühinfizierter B-Zellen durch primäre T-Zellen. (A) Ermittlung der immundominanten EBV-spezifischen CD8+ T-Zellspezifitäten des Spenders MD mittels Pentamerfärbung und FACS-Analyse. (B) Depletion der jeweiligen dominanten RAK- oder QAK-spezifischen CD8+ T-Zellpopulation. (C) Lyse von 7 Tage infizierten B-Zellen durch primäre Gesamt-CD8+ T-Zellen (Kontrolle), RAK-depletierte und QAK-depletierte CD8+ T-Zellen des Spenders.

Dieses Experiment zeigte eine klare Beteiligung der primären IE-antigen-spezifischen CD8+ T-Zellen an der Kontrolle der B-Zellen in der Frühphase der EBV-Infektion. Darüber hinaus

Ergebnisse

zeigte dieses Experiment, dass die IE-spezifischen CD8⁺ T-Zellen gegen das RAK-Epitop aus BZLF1 zum Analysezeitpunkt einen höheren Anteil an der Kontrolle der frühinfizierten B-Zelle besaßen als die Latenzantigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen gegen das QAK-Epitop aus EBNA3A. Diese unerwartet starke Lyse der frühinfizierten B-Zelle durch die primären IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen könnte bedeuten, dass weitere Typen von Effektorzellen mit den IE-antigen-spezifischen T-Zellen bei der Lyse der Zielzelle kooperieren.

Zusammenfassung der Ergebnisse des 1. Teils

Frühe EBV-Infektion

- Der Übertrag von GFP-Protein wurde einen Tag nach Infektion für die Quantifizierung und Normierung der TR-Überstände verwendet.
- Die EBV-transformierten B-Zellen waren 3 Tage nach Infektion erstmals sichtbar.
- Die EBV-induzierte Proliferation begann unmittelbar nach dem Auftreten lymphoblastoider Zellen und die Anzahl der transformierten Zellen steigerte sich im Verlauf der Infektion stark.
- Gleichzeitig mit der B-Zell-Transformation wurden die für die T-Zell-Aktivierung wichtigen Oberflächenmoleküle CD80 und 86 verstärkt von der infizierten B-Zelle exprimiert.

Erkennung der frühinfizierten B-Zelle durch spezifische CD8+ T-Zellen

- Epitope aus den IE-Antigenen BZLF1 und BRLF1 wurden von den frühinfizierten B-Zellen präsentiert und von spezifischen CD8+ T-Zellen erkannt.
- Die CD8+ T-Zell Erkennung der IE-Antigene BZLF1 und BRLF1 erfolgte im Mittel vor der Erkennung der Latenzantigene von EBV.
- Die frühe(re) Erkennung der IE-Antigene führte bei primären IE-antigen-spezifischen CD8+ T-Zellen zu einer gegenüber den Latenzantigen-spezifischen CD8+ T-Zellen gesteigerten Proliferation.
- Auch CD4+ T-Zellen gegen Hüllproteine des Virus erkannten sehr schnell die infizierten B-Zellen.
- Es konnte keine spezifische Erkennung des E-Proteins BMLF1 in früher Infektionsphase festgestellt werden.
- Die Erkennung des IE-Proteins BZLF1 erreichte einige Tage nach Infektion ein Maximum und nahm danach wieder ab.
- Die Erkennung des Latenzantigens EBNA3A nahm dagegen kontinuierlich zu.

Kontrolle der frühinfizierten B-Zelle durch spezifische CD8+ T-Zellen

- Ein IE-antigen-spezifischer CD8+ T-Zellklon konnte die Etablierung infizierter B-Zellkulturen in geringem Maß unterdrücken. Im Gegensatz dazu konnte der

Ergebnisse

Latenzantigen-spezifische T-Zellklon die LCL-Generierung der kurzzeit-infizierten B-Zelle nahezu vollständig inhibieren.

- Hingegen führte die Untersuchung der Lysekapazität der frühinfizierten B-Zelle durch primäre IE- und Latenzantigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen dazu, dass der größte Anteil der Lyse der kurzzeit-infizierten B-Zelle durch die IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen erfolgte.

Einfluss der TLR-Aktivierung auf die EBV-Infektion

EBV kann TLR-7-Signale induzieren und für eine gesteigerte Proliferation der infizierten B-Zelle und die damit verbundene eigene Etablierung ausnutzen (Martin et al., 2007). Im Mittelpunkt des zweiten Teils meiner Doktorarbeit stand die Untersuchung TLR-induzierter pro-viraler Effekte über den TLR7 hinaus. Dafür wurden folgende Fragen gestellt:

- (1) Kann eine TLR9-Koaktivierung der primären B-Zelle während der EBV-Infektion die B-Zell-Transformation beeinflussen?
- (2) Haben andere TLR-Agonisten – und dadurch auch andere Pathogene – einen Einfluss auf die B-Zell-Transformation?

Für die Beantwortung der Fragen wurden frisch isolierte B-Zellen oder B-Zellen aus Adenoidproben in An- und Abwesenheit von TLR-Agonisten, wie des TLR9-Liganden CpG-DNA, mit EBV infiziert oder mit TR– pseudoinfiziert und die transformierten Zellen im FACS analysiert und quantifiziert.

Neben dem TLR-induzierten Effekt auf die EBV-Transformation primärer B-Zellen wurde auch die Wirkung der TLR9-Aktivierung auf die Induktion des lytischen Zyklus in etablierten LCL untersucht.

4.14 Gesteigerte B-Zell-Transformation in Anwesenheit von CpG-DNA während einer EBV-Infektion

Die Etablierung des transformierenden EBV-Programms an Tag 3 nach der EBV-Infektion induziert die Vermehrung der infizierten B-Zelle. Da die Stimulation durch den TLR9-Agonisten CpG-DNA ausreicht, um eine transiente Proliferation der B-Zelle zu erzielen, sollte im Folgenden untersucht werden, wie sich dieser zusätzliche Proliferationsstimulus auf das Wachstum der infizierten B-Zelle auswirkt. Dazu wurde das Proliferationsverhalten von B-Zellen in Anwesenheit des TLR-Agonisten während der Infektion untersucht. B-Zellen wurden in An- und Abwesenheit von CpG-DNA mit EBV infiziert oder mit TR– pseudoinfiziert und die unterschiedlichen Zellzyklusphasen durch Anfärben der Zellen 4 Tage nach der Infektion mit PI analysiert. Durch die Interkalierung von PI zwischen die Basen der

Ergebnisse

DNA kann der diploide Chromosomensatz der G1-Phase von dem tetraploiden Chromosomensatz der G2-Phase und den Zwischenstufen (S-Phase) bei einer FACS-Messung unterschieden werden (siehe 3.3.8.3). Als Kontrolle wurden unbehandelte B-Zellen verwendet. Ohne Aktivierungsstimulus war nur eine sehr geringe Anzahl an Zellen in der G2- und S-Phase vorhanden. Entsprechendes zeigten die TR- pseudoinfizierte B-Zellen. Deutlich konnte eine CpG-DNA-induzierte Aktivierung der B-Zellen gesehen werden. Ähnlich einer aktivierenden EBV-Infektion konnte hier eine Zunahme der DNA-synthetisierenden Zellen gemessen werden. Waren nun die B-Zellen in Anwesenheit des TLR-Agonisten CpG-DNA infiziert worden, so konnte eine synergistisch gesteigerte Zunahme der Zellen in der S- und G2-Phase ermittelt werden. Ähnliche Zellzahlen wurden in diesen beiden Phasen für die proliferierende LCL (LSK-B) gemessen (Abbildung 4.17).

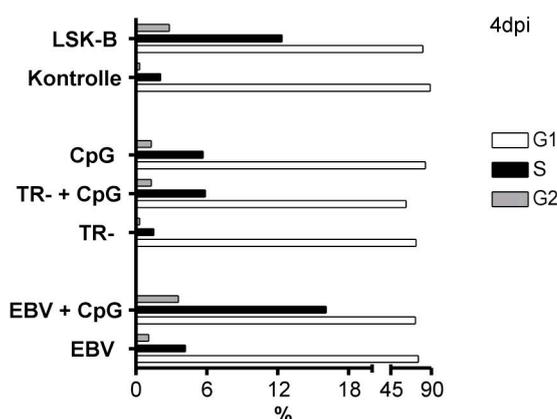


Abbildung 4.17: Die Untersuchung der Zellzyklusphasen zeigte in der Infektion in Gegenwart von CpG-DNA eine deutlich gesteigerte Proliferation gegenüber der EBV-Infektion oder der CpG-DNA-Stimulation alleine. Eine etablierte LCL, nicht-proliferierende B-Zellen und in An- und Abwesenheit von CpG-DNA (pseudo-)infizierte B-Zellen wurden 4 Tage nach Infektion mit PI gefärbt und die Phasen des Zellzyklus im FACS gemessen. Deutlich zeigte sich eine gesteigerte Proliferation in der Infektion zusammen mit CpG-DNA. CpG-DNA mit TR- Pseudoinfektion wie auch EBV konnten die Proliferation gegenüber der Negativ-Kontrolle leicht steigern. Positive Wachstumskontrolle: LSK-B, negative Wachstumskontrolle: B-Zellen.

Wurde nun der Auswuchs an lymphblastoiden Zellen in volumennormierten Ansätzen im FACS 7 Tage nach Infektion gemessen, so konnten in dem TR- pseudoinfizierten Ansatz keine lymphblastoiden Zellen ermittelt werden. Die CpG-DNA-haltige Pseudoinfektion zeigte zu diesem Zeitpunkt noch die durch den GFP-Proteintransfer grünen, durch das Einwirken des TLR-Agonisten, aktivierten B-Zellen der Anfangspopulation. Die EBV-Infektion alleine induzierte eine Verdopplung der Anzahl an lymphblastoiden Zellen. Unter

Ergebnisse

der Anwesenheit von CpG-DNA während der EBV-Infektion konnte eine Steigerung der Ausgangszellzahl um einen Faktor von 7 ermittelt werden. Diese Steigerung war deutlich signifikant ($p = 0,0012$) (Abbildung 4.18).

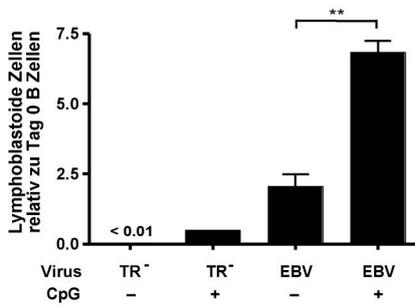


Abbildung 4.18: Die Zugabe von CpG-DNA während einer EBV-Infektion steigerte signifikant die Ausbildung von lymphoblastoiden Zellen. B-Zellen wurden in An- und Abwesenheit von CpG-DNA mit EBV infiziert oder mit TR⁻ pseudoinfiziert und die Anzahl an lymphoblastoiden Zellen 7 Tage nach der Infektion im FACS unter Volumennormierung ermittelt. ** $p = 0,0012$.

Die Anwesenheit von CpG-DNA während einer EBV-Infektion induzierte somit eine synergistische Steigerung der Anzahl an lymphoblastoiden B-Zellen in der Frühphase der Infektion.

Bei den durchgeführten Experimenten wurden die CpG-DNA und die EBV bzw. TR⁻ Überstände während der gesamten Versuchsdauer auf den B-Zellen belassen. Um sicherzugehen, dass die gesteigerte Transformation ein durch die CpG-DNA induzierter direkter Effekt war und nicht durch ein Zusammenwirken des TLR-Agonisten mit unbekanntem Bestandteilen des Überstandes hervorgerufen wurde, wurden B-Zellen vor der CpG-DNA Zugabe mit EBV nach verändertem Protokoll infiziert. Die Infektion erfolgte nun bei 4 °C für eine Stunde. Anschließend wurden die infizierten Zellen gut gewaschen und in An- und Abwesenheit von CpG-DNA kokultiviert. An Tag 2 und 7 nach der Infektion wurde die Anzahl an lymphoblastoiden Zellen im FSC/SSC bestimmt. Zwei Tage nach der Infektion zeigte die (Pseudo-)infektion eine CpG-DNA-induzierte Aktivierung der Zellen, mit der Übertragung von GFP-Protein auf die B-Zelle grünen, aktivierten Zellen. Die im FSC/SSC aktivierten, vergrößerten Zellen der CpG-DNA-haltigen Pseudoinfektion nahmen allerdings am Tag 7 deutlich ab. Zu diesem Zeitpunkt konnten nur noch transformierte Zellen gemessen werden. So konnte auch unter diesen Versuchsbedingungen eine synergistisch gesteigerte Anzahl an lymphoblastoiden Zellen in der CpG-DNA-haltigen Infektion ermittelt werden (Abbildung 4.19).

Ergebnisse

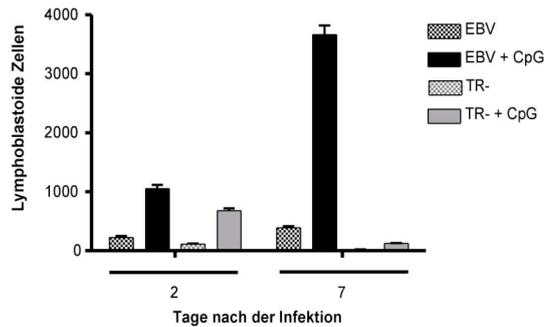


Abbildung 4.19: Die synergistisch gesteigerte Transformation ist ein durch CpG-DNA direkt induzierter Effekt. B-Zellen wurden mit EBV infiziert oder mit TR- pseudoinfiziert, gewaschen und anschließend mit CpG-DNA kokultiviert. Die lymphoblastoiden Zellen wurden an Tag 2 und 7 nach Infektion im FSC/SSC im FACS gemessen. Dabei induzierte CpG-DNA alleine eine transiente Aktivierung der B-Zellen. Die Kombination von EBV und CpG-DNA resultierte in einer synergistisch gesteigerten Anzahl an lymphoblastoiden Zellen.

Dies demonstrierte, dass die CpG-DNA direkt auf die B-Zellen wirkte und der gesehene Effekt aus der Kombination von EBV-Infektion und zusätzlichem TLR-Stimulus herrührte und nicht durch Einwirken von löslichen Faktoren in der Viruspräparation beeinflusst wurde.

Die TLR9-Aktivierung während einer EBV-Infektion hatte somit eine gesteigerte Anzahl an frühinfizierten B-Zellen zur Folge. Da die CpG-DNA-Stimulation allein nur zu einem transient aktivierten Phänotyp führt, stellte sich die Frage, ob die nach der TLR-Aktivierung gesteigerte Anzahl an B-Zellen nun permanent transformiert waren und zum Auswachsen von LCL führten. Zur Beantwortung dieser Frage wurden frisch isolierte B-Zellen in An- und Abwesenheit von CpG-DNA mit EBV infiziert und die Ansätze eine Woche nach der Infektion gewaschen und die Zellen in serieller Verdünnung für weitere 4 - 6 Wochen kultiviert. Die Vitalität der einzelnen Ansätze wurde durch einen MTT-Test bestimmt.

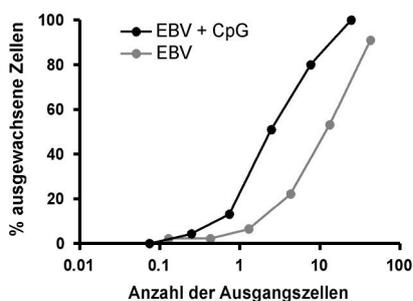


Abbildung 4.20: Die Zugabe von CpG-DNA während einer EBV-Infektion steigerte die Ausbildung von LCL. B-Zellen wurden in An- und Abwesenheit von CpG-DNA infiziert und nach 7 Tagen die Zellen gewaschen und in serieller Verdünnung für 6 Wochen kultiviert. Der MTT-Test zeigte, dass im EBV + CpG-DNA-Ansatz in jeder Verdünnung mehr Zellen zu LCL ausgewachsen waren.

Ergebnisse

Es zeigte sich, dass die durch die zusätzliche Aktivierung des TLR9 während der EBV-Infektion gesteigerte Anzahl an lymphoblastoiden Zellen zu einem entsprechenden Anstieg der Zahl permanent transformierter LCL führte (Abbildung 4.20). Die transiente CpG-DNA-Aktivierung über den TLR9 auf der infizierten B-Zelle führte also in Anwesenheit einer EBV-Infektion zu einem Anstieg der Langzeitetablirung von EBV-infizierten B-Zellen.

Welchen Einfluss hatte nun die Menge der eingesetzten CpG-DNA an diesem Effekt? Hierzu wurde die Konzentration der in den bisherigen Infektionen beigefügten CpG-DNA von 4 µg/ml bis auf eine Konzentration von 0,125 µg/ml verdünnt und das Auswachsen lymphoblastoider Zellen an Tag 5 nach Infektion bestimmt. Abbildung 4.21 zeigt, dass schon die kleinste eingesetzte Menge an CpG-DNA diesen, gegenüber der EBV-Infektion deutlich gesteigerten Auswuchs lymphoblastoider Zellen erzeugen konnte. Bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml war der maximale Effekt bereits erreicht.

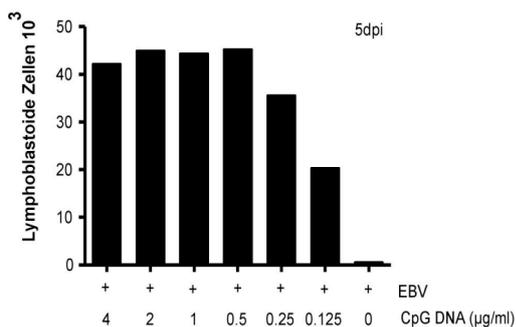


Abbildung 4.21: Relativ geringe Mengen des TLR-Agonisten induzierten das synergistisch gesteigerte Auswachsen von lymphoblastoiden Zellen. Die CpG-DNA Konzentration während einer EBV-Infektion wurde variiert und die Anzahl an lymphoblastoiden Zellen 5 Tage nach der Infektion im FACS gemessen.

Dieses Ergebnis ließ somit darauf schließen, dass vergleichsweise geringe Mengen während einer EBV-Infektion ausreichen, um zu einem synergistisch gesteigerten Auswuchs von permanent transformierten B-Zellen zu führen.

4.15 Gründe für eine gesteigerte Transformation in Anwesenheit von CpG-DNA

Zunächst stellte sich die Frage, ob die Zeitkomponente der CpG-DNA-Zugabe entscheidend für den Auswuchs der lymphoblastoiden Zellen war. Da bei den bisherigen Untersuchungen die CpG-DNA-Zugabe immer zeitgleich zur Infektion stattfand, wurden nun zwei Szenarien untersucht. Einmal wurde die CpG-DNA nach der Infektion und einmal vor der Infektion eingesetzt.

Der Auswuchs an lymphoblastoiden Zellen bei verspäteter CpG-DNA-Zugabe zeigte deutlich, dass die zeitgleiche Anwesenheit von CpG-DNA während einer EBV-Infektion zum Auswuchs der meisten transformierten Zellen führte. Schon eine nach der Infektion um 12 Stunden verzögerte CpG-DNA-Zugabe halbierte die Anzahl an lymphoblastoiden Zellen. Erfolgte die Zugabe des TLR-Agonisten noch später, so wurde auch sein Effekt immer geringer, bis er bei 62 Stunden nach der Infektion nicht mehr messbar war (Abbildung 4.22).

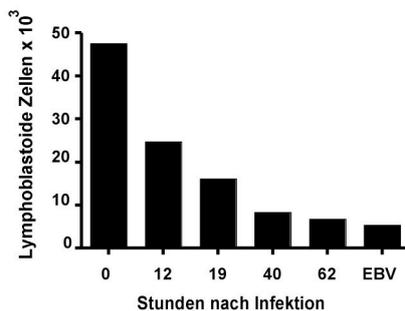


Abbildung 4.22: Eine zeitlich verzögerte Stimulation des TLR9 während einer EBV-Infektion resultierte in einem verringerten Auswuchs lymphoblastoider Zellen. Die B-Zellen wurden infiziert und die CpG-DNA in zeitlichen Abständen später zum Ansatz zugegeben. An Tag 7 nach Infektion wurde die Anzahl an lymphoblastoiden Zellen unter Volumenkontrolle im FACS gemessen.

Daraus konnte geschlossen werden, dass die durch den TLR9-induzierten Signale noch bis zu 19 Stunden nach der Infektion mit EBV ausreichen, um eine deutliche Steigerung der lymphoblastoiden Zellen zu erzeugen. Bei weitem der stärkste Effekt ergab sich jedoch bei gleichzeitiger Zugabe.

Im nächsten Versuch wurden die B-Zellen an Tag 0 mit der CpG-DNA stimuliert und die EBV-Infektion in zeitlichen Abständen von 6 Stunden, 1 Tag sowie 3 Tagen durchgeführt. Die Anzahl lymphoblastoider Zellen wurde 6 Tage nach der CpG-DNA-Stimulation untersucht. Die meisten Transformanden konnten bei gleichzeitiger Anwesenheit des TLR-Stimulus und der Infektion gemessen werden. Auch hier führte ein zeitlicher Abstand von TLR-Stimulation und Infektion zu einer Verringerung der lymphoblastoiden Zellzahl. Interessanterweise konnte der CpG-DNA-Stimulus das Auswachsen einiger B-Zellen zu lymphoblastoiden Zellen auch

Ergebnisse

dann noch retten, wenn die Infektion erst 3 Tage später durchgeführt wurde. Da Zellen, die in Abwesenheit des CpG-DNA-Stimulus an diesem Tag infiziert wurden, keine Transformanden an Tag 6 zeigten hatte also auch eine, mehrere Tage vor der Infektion stattfindende Stimulation der TLR-Signalsysteme einen positiven Effekt auf die Latenzetablierung von EBV (Abbildung 4.23).

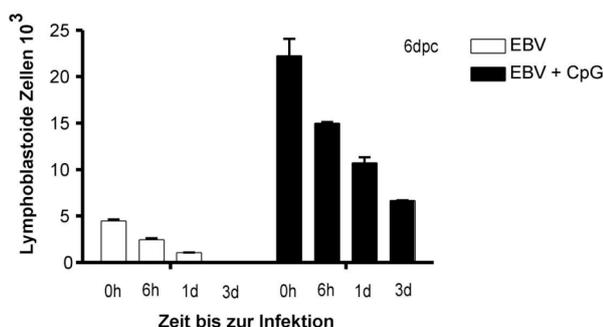


Abbildung 4.23: Eine CpG-DNA-Vorinkubation rettete die B-Zellen über einen Zeitraum von 3 Tagen hinweg und induzierte eine gesteigerte Transformation. Die B-Zellen wurden mit CpG-DNA an Tag 0 stimuliert. Die Infektion mit EBV erfolgte in Abständen von 6 h, 1 d und 3 d. An Tag 6 nach Infektion wurde die Anzahl an lymphoblastoiden Zellen unter Volumenkontrolle im FACS gemessen. Es kam bei der Kombination der Stimuli zum gesteigerten Auswachsen transformierter Zellen. Auch eine Infektion 3 Tage nach der CpG-DNA-Stimulation führte noch zu transformierten Zellen.

Die Anwesenheit von CpG-DNA konnte B-Zellen offenbar über 3 Tage hinweg vor dem Zelltod retten und nahm so Einfluss auf das Ausmaß an transformierten Zellen. Um den Einfluss des TLR-Agonisten auf die Apoptose der B-Zellen in der frühen Phase der EBV-Infektion direkter zu untersuchen, wurde die Induktion der Apoptose in den Ansätzen von EBV und EBV + CpG-DNA miteinander verglichen. Dazu wurde im FACS das Verhältnis der lebenden zu den apoptotischen Zellen im jeweiligen Ansatz ermittelt und das durch CpG-DNA-verbesserte „relative Überleben“ errechnet (siehe 3.3.9). Deutlich ist zu erkennen, dass bei Anwesenheit von CpG-DNA im Ansatz bereits am ersten Tag mehr Zellen überlebten. Dieser Effekt war an Tag 3 nach Infektion, dem Zeitpunkt des Auftretens des transformierten Phänotyps, besonders stark ausgeprägt. Die Zellen zeigten hier ein über fünfmal besseres Überleben als im EBV-Vergleichsansatz. An Tag 7 war dieser Effekt fast nicht mehr zu messen, was darauf schließen ließ, dass das Überleben durch die in der latent infizierten B-Zelle exprimierten EBV-Proteine gesichert wurde und das TLR9-Signal damit an Wichtigkeit verlor (Abbildung 4.24).

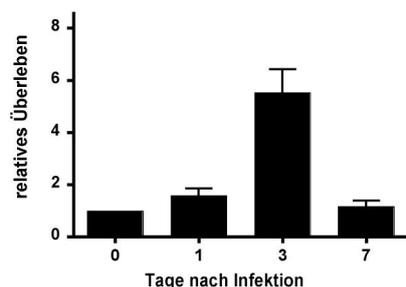


Abbildung 4.24: Die Anwesenheit von CpG-DNA während der Infektion schützte die Zellen besonders ausgeprägt an Tag 3 nach Infektion vor Apoptose. Im FACS wurden die lebenden und die toten Zellen ermittelt und das relative Überleben errechnet. Das relative Überleben war bei einer Infektion in Anwesenheit von CpG-DNA gesteigert. An Tag 3 der Infektion waren fünfmal mehr Zellen im Ansatz von CpG-DNA und EBV-Infektion enthalten als bei einer reinen EBV-Infektion.

Der zusätzliche Stimulus über den TLR9 induzierte somit einen erhöhten Schutz der B-Zellen ab dem Tag der Infektion bis zur Etablierung der Transformation und der Expression der Latenzproteine. Die durch TLR-Aktivierung gelieferten anti-apoptotischen Signale gehen offenbar über die Effekte von EBV selbst exprimierten anti-apoptotischen Genprodukten deutlich hinaus (Altmann and Hammerschmidt, 2005).

Der Einfluss von CpG-DNA auf die Geschwindigkeit der Proliferation wurde in CFSE-Verdünnungsexperimenten untersucht. Bei der Teilung CFSE-markierter Zellen wird der Farbstoff auf die Tochterzellen verteilt. So können im FITC-Kanal des FACS die proliferierenden Zellen durch Abnahme der Anfangsfluoreszenz bestimmt werden. Die Geschwindigkeit der Proliferation wurde durch die Ermittlung der Differenz zwischen der mittleren CFSE-Fluoreszenz der Ausgangskultur (div0) und der geteilten Zellen (div \geq 1) ermittelt. Je größer diese ausfiel desto stärker wurde die CFSE-Fluoreszenz verdünnt und umso mehr Tochtergenerationen wurden gebildet. B-Zellen wurden mit dem fluoreszierenden CFSE gefärbt und in An- und Abwesenheit von CpG-DNA infiziert und die Ansätze 120 Stunden nach Infektion im FACS analysiert. Die CFSE-Histogramme sind in Abbildung 4.25 dargestellt. Als Kontrollen dienten CFSE-gefärbte unbehandelte sowie nur mit CpG-DNA kultivierte B-Zellen. In der unstimulierten Kontrolle konnte nur die CFSE-stark-gefärbte Ausgangspopulation gemessen werden. Es hatten keine Zellteilungen stattgefunden (Abbildung 4.25 A). Die mit CpG-DNA alleine stimulierten B-Zellen proliferierten etwas schneller als die mit EBV infizierten B-Zellen. Die mittlere CFSE-Fluoreszenz zeigte hier Werte von CpG-DNA = 143 und EBV = 131 (Abbildung 4.25 B und C). Die in Anwesenheit von CpG-DNA infizierten B-Zellen wies mit 154 die größte Differenz zwischen der CFSE-Fluoreszenz der Ausgangskultur und der proliferierten Population auf und zeigte damit die

Ergebnisse

meisten Zellteilungen (Abbildung 4.25 D). Somit steigerte die Anwesenheit der CpG-DNA während der Infektion die Proliferationsgeschwindigkeit der B-Zellen.

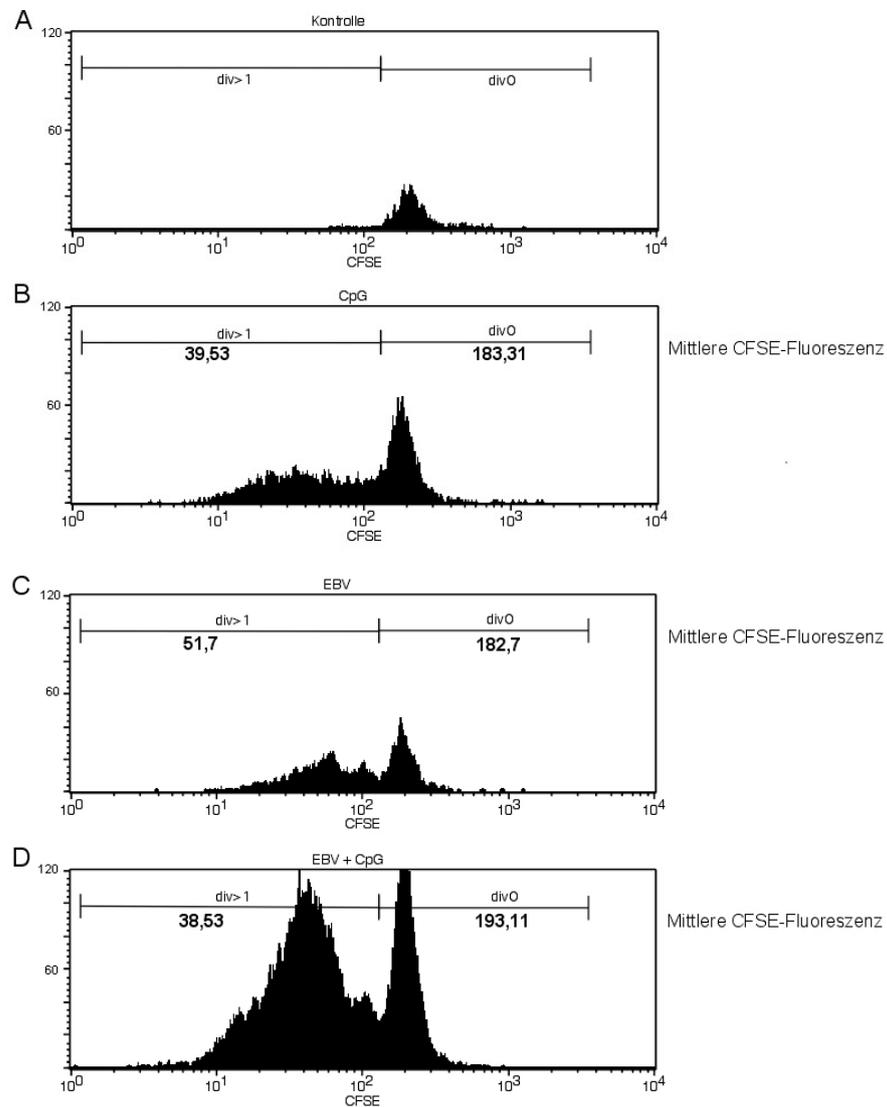


Abbildung 4.25: Die Anwesenheit von CpG-DNA während einer EBV-Infektion steigerte die Anzahl der Zellteilungen. B-Zellen wurden mit CFSE gefärbt und in An- und Abwesenheit von CpG-DNA mit EBV infiziert. 120 Stunden nach der Infektion wurden die proliferierende Population im FACS durch die Abnahme der CFSE-Fluoreszenz bestimmt und die Spanne zwischen der CFSE-Fluoreszenz der proliferierenden und der ungeteilten Population ermittelt. **(A)** Die unbehandelte Kontrolle zeigte keine Zellteilungen an Tag 5 nach Infektion. **(B)** CpG-DNA-stimulierte B-Zellen zeigten mehr Zellteilungen als **(C)** transformierte Zellen. **(D)** Die Anwesenheit von CpG-DNA beschleunigte die Proliferation der transformierten B-Zellen.

So schützte die Stimulation des TLR während der Infektion die Zelle vor dem frühen Zelltod und steigerte in der Frühphase der Infektion die Proliferationsgeschwindigkeit der infizierten B-Zelle. Beide Effekte gemeinsam erklären die gesteigerte Anzahl lymphoblastoider Zellen als Resultat einer EBV-Infektion in Anwesenheit von CpG-DNA.

Ergebnisse

Die Sekretion der beiden Zytokine IL-6 und IL-10 durch die aktivierte B-Zelle kann durch CD40-Stimulation oder die Bindung von CpG-DNA ausgelöst werden. Kommen beide Stimuli kombiniert vor, so kommt es zu einer synergistisch gesteigerten Produktion dieser Zytokine (Wagner et al., 2004; Wiesner et al., 2008). Beide Zytokine nehmen Einfluss auf das Wachstum und die Differenzierung der B-Zelle und stellen im Falle von EBV Wachstumsfaktoren dar (Beatty, Krams, and Martinez, 1997; Burdin et al., 1993; Tosato et al., 1990; Yokoi et al., 1990). So stellte sich die Frage, ob es im Zuge einer EBV-Infektion in Anwesenheit des CpG-DNA-Signals ebenfalls zu einer synergistischen Steigerung der Zytokinausschüttung seitens der infizierten Zelle kam und ob diese Wachstumsfaktoren zur Ausbildung des gesteigerten Auswuchses beitrugen. Zur Beantwortung wurden B-Zellen in An- und Abwesenheit von CpG-DNA mit EBV infiziert oder mit TR- pseudoinfiziert und die von den (pseudo-)infizierten Zellen sezernierte Zytokinmenge mittels ELISA bestimmt. Abbildung 4.26 zeigt die gemessenen Werte. Bereits einen Tag nach Infektion kam es bei der Kombination von CpG-DNA und EBV zu einer gesteigerten IL-6-Produktion. Die sezernierte IL-6-Menge stieg bis Tag 7 nach Infektion an und blieb dann konstant. An Tag 21 nach Infektion konnte kein IL-6 mehr gemessen werden. In der Pseudoinfektion konnte ein vergleichsweise schwacher, durch CpG-DNA induzierter IL-6-Anstieg während der ersten 4 Tage nach Infektion gemessen werden (Abbildung 4.26 A). IL-10 wurde von den infizierten B-Zellen erst ab Tag 4 sezerniert und stieg mit steigender Anzahl an aktivierten B-Zellen in der EBV- und in der CpG-DNA-haltigen Infektion an. Eine synergistische Steigerung der IL-10-Produktion wurde nur an Tag 4 und 7 nach Infektion bei der Infektion in Anwesenheit von CpG-DNA beobachtet (Abbildung 4.26 B). Durch spezifische IL-6- und IL-10-Antikörper, welche an Tag 0 den Ansätzen zugegeben wurden, wurde im Anschluß untersucht, ob die gesteigerte IL-6- und IL-10-Produktion in Anwesenheit von CpG-DNA während der Infektion einen Anteil an dem synergistisch gesteigerten Auswuchs an lymphoblastoiden Zellen früh nach der Infektion hatte. Dazu wurde die Anzahl an lymphoblastoiden Zellen an Tag 4 (IL-6) und an Tag 7 (IL-10) nach Infektion unter Volumenkontrolle im FACS gemessen. Für IL-6 konnte keine Veränderung im Auswachsen von lymphoblastoiden Zellen durch Blockierung der Zytokine früh nach Infektion gemessen werden. Die IL-10-Blockade zeigte an Tag 7 einen leichten Rückgang der transformierten Zellen. Dies entspricht dem Ergebnis von Burdin et al., bei denen eine Inhibierung von IL-10 mittels Antiserum zu einer leichten Reduktion der transformierten B-Zellen führte. In seinem Experiment konnte eine deutliche IL-10-induzierte Proliferation der lymphoblastoiden Zellen erst ab dem Tag 12 nach Infektion gemessen werden (Burdin et al., 1993). Somit trugen diese beiden Wachstumsfaktoren von EBV nicht

Ergebnisse

zum gesteigerten Auswuchs der lymphoblastoiden Zellen in Anwesenheit von CpG-DNA in der frühen Phase der Infektion bei.

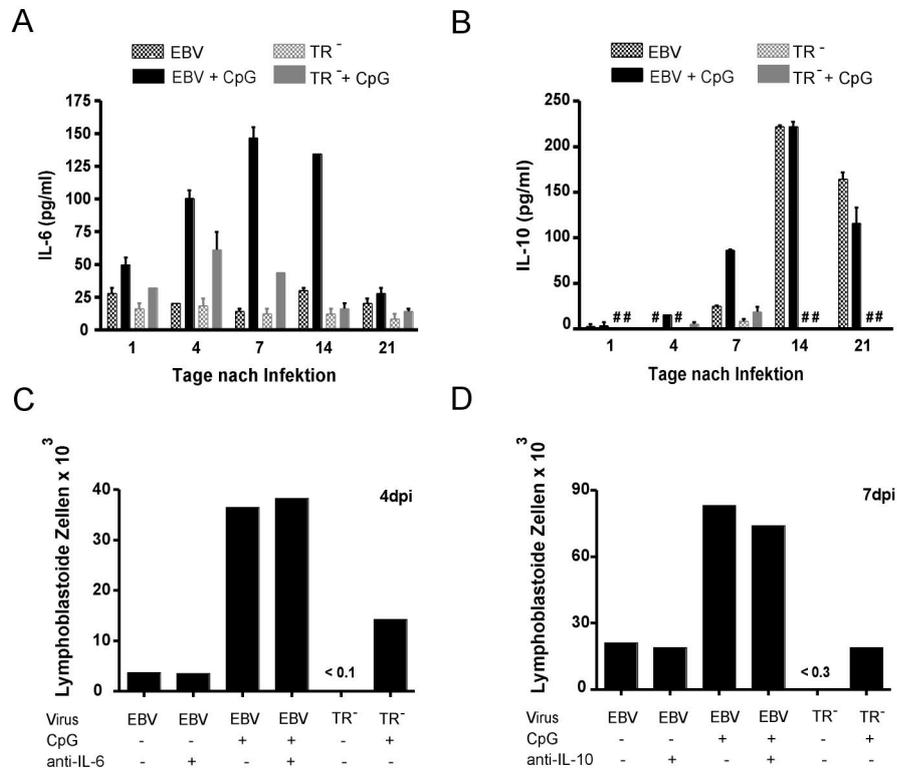


Abbildung 4.26: Die Anwesenheit von CpG-DNA während einer EBV-Infektion steigerte die IL-6- und IL-10-Zytokinproduktion. B-Zellen wurden in An- und Abwesenheit von CpG-DNA (pseudo-)infiziert und die Zytokinproduktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten im ELISA gemessen. **(A)** Eine synergistisch gesteigerte IL-6-Produktion konnte ab dem ersten Tag nach Infektion im CpG-DNA-haltigen Ansatz gemessen werden. **(B)** Die IL-10-Produktion ergab an Tag 4 und 7 nach Infektion ein synergistisch gesteigertes Ausmaß. **(C und D)** Bei Zugabe von IL-6 (C) und IL-10 (D) spezifischen Antikörpern zu den Reaktionen konnte an den Tagen mit synergistisch gesteigerter Zytokinmenge keine Reduktion in der Anzahl an lymphoblastoiden Zellen gemessen werden. #: Zytokinmenge unter dem Detektionslimit.

4.16 Einfluss von CpG-DNA auf die Transformation von naiven B-Zellen und Gedächtnis-B-Zellen

Die bis jetzt verwendeten peripheren B-Zellen waren ein Gemisch aus naiven und Gedächtnis-B-Zellen. Nun stellte sich die Frage, ob B-Zellen beider Differenzierungsstadien ähnlich auf eine Infektion in Anwesenheit von CpG-DNA reagieren. Diese Frage ist berechtigt, da beide B-Zellsubtypen sich in ihrer Expression von TLR9 unterscheiden. So exprimieren naive B-Zellen weniger TLR9 als aktivierte und Gedächtnis-B-Zellen und proliferieren nach Stimulation des TLR9 mit dem Agonisten weit weniger ausgeprägt als Gedächtnis-B-Zellen (Bernasconi, Onai, and Lanzavecchia, 2003). Gibt es nun Unterschiede im Transformationsverhalten von naiven und Gedächtnis-B-Zellen bei einer CpG-DNA-haltigen EBV-Infektion? Mittels immun-magnetischer Isolation wurden Gedächtnis-B-Zellen (CD27-positiv) und naive B-Zellen (CD27-negativ) aus der Gesamtheit der peripheren B-Zellen isoliert (siehe 3.3.10.2). Anschließend erfolgte die EBV-Infektion oder die TR-Pseudoinfektion in An- und Abwesenheit von CpG-DNA. Die CpG-DNA-aktivierten und lymphoblastoiden Zellen wurden 1, 4, 7 und 14 Tage nach der Infektion unter Volumenkontrolle im FACS ermittelt (Abbildung 4.27).

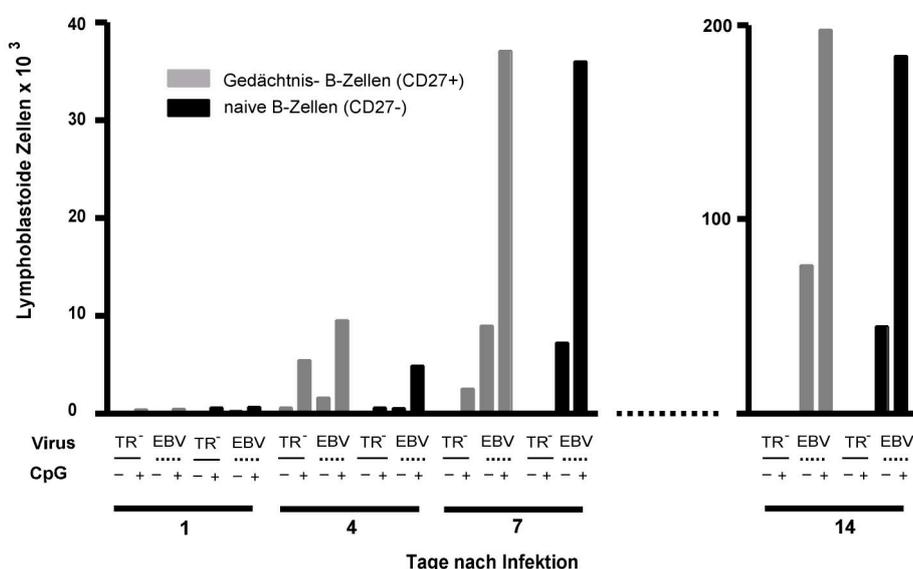


Abbildung 4.27: Die Subtypen von B-Zellen zeigten eine gleich starke synergistisch gesteigerte Transformation bei einer Infektion in Anwesenheit von CpG-DNA. Naive und Gedächtnis-B-Zellen wurden isoliert und in An- und Abwesenheit von CpG-DNA (pseudo-)infiziert und der Auswuchs zu lymphoblastoiden Zellen unter Volumenkontrolle im FACS ermittelt.

Ergebnisse

Naive B-Zellen benötigten für die maximale Aktivierung und Proliferation alle drei, für die physiologische B-Zell-Aktivierung, essentiellen Signale. Diese bestanden aus dem BCR-Stimulus nachahmenden LMP2A, die T-Zell-Hilfe simulierenden LMP1 sowie dem Signal über den TLR (Ruprecht and Lanzavecchia, 2006). Im Gegensatz dazu erreichte die TLR-Aktivierung eine transiente Aktivierung und Proliferation der Gedächtnis-B-Zellen. Die Kombination der EBV-Proliferationssignale mit dem TLR-Signal erreichte auch hier eine maximale Aktivierung und Proliferation. Sieben und 14 Tage nach der Infektion zeigten beide B-Zell-Subtypen gleiches Auswuchsverhalten der in An- und Abwesenheit infizierten B-Zellen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die durch die CpG-DNA-induzierten Signale die B-Zellen vor dem frühen Zelltod retteten und infizierte B-Zellen so in den ersten Tagen nach der Infektion bis zum Erreichen der Transformation vor Apoptose geschützt wurden. Weiter führte die Kombination der durch EBV und CpG-DNA-induzierten B-Zell-Aktivierung zu einer stabilen Proliferationssteigerung der infizierten Zelle.

4.17 Pro-virale Effekte weiterer B-Zell-spezifischer TLR-Agonisten

Die bisherigen Experimente zeigten einen deutlichen pro-viralen Effekt der TLR9-Aktivierung während einer EBV-Infektion. Die B-Zelle exprimiert neben dem TLR9 noch weitere TLR, darunter die TLR2 und 7 (Månsson et al., 2006). Für den TLR7 wurden bereits pro-virale Effekte auf die EBV-Infektion aufgezeigt (Martin et al., 2007). Um mögliche proliferationsbeeinflussende Effekte des TLR2 und TLR7 auf eine EBV-Infektion zu untersuchen, wurden im Folgenden die TLR2-Agonisten Pam3CSK4 und Lipoteichonsäure (LTA) sowie der TLR7-Agonist Imiquimod während einer EBV-Infektion zum Ansatz gegeben. Auch wurden fixierte *Staphylococcus aureus* und LPS als Stimulatoren eingesetzt. LPS induziert Signale über den TLR4. Dieser TLR wird auf der humanen B-Zelle nur niedrig exprimiert. Frisch isolierte tonsilläre B-Zellen wurden in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen der genannten Agonisten mit EBV infiziert und die Anzahl der lymphoblastoiden Zellen an Tag 7 unter Volumenkontrolle im FACS ermittelt (Abbildung 4.28 A).

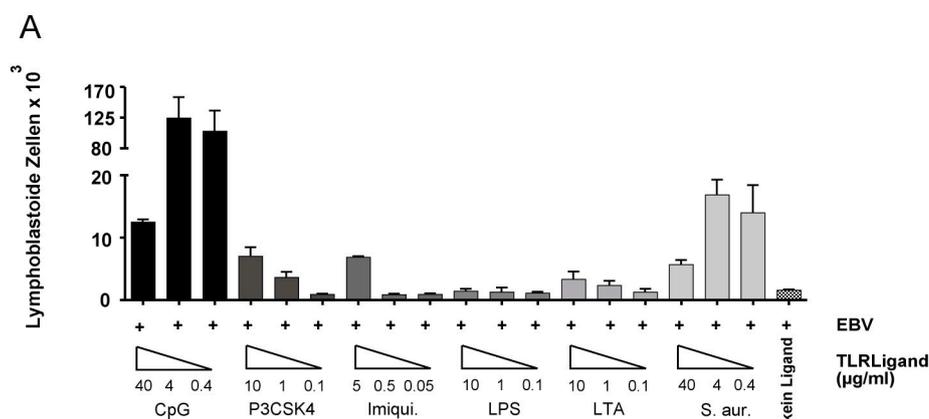


Abbildung 4.28 A: Effekte verschiedener TLR-Agonisten auf den Auswuchs lymphoblastoider B-Zellen. B-Zellen wurden in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von TLR-Agonisten infiziert, und 7 Tage nach der Infektion wurde die Anzahl an transformierten Zellen unter Volumennormierung im FACS bestimmt.

Die CpG-DNA-haltigen Infektionen zeigten eine maximale Steigerung der Zellzahl bei den Konzentrationen 0,4 und 4 µg/ml und eine Abnahme der Zellzahl bei 40 µg/ml. Ein ähnliches, wenn auch reduziertes Auswachsen konnte bei einer Infektion in Anwesenheit von *S. aureus* gemessen werden. Der TLR2-Agonist Pam3CSK4 konnte ab der Konzentration von 1 µg/ml eine synergistisch gesteigerte Anzahl an lymphoblastoiden Zellen induzieren. Die Stimulation des TLR7 durch Imiquimod während der EBV-Infektion begünstigte nur in der höchsten Konzentration einen Zuwachs an transformierten Zellen. LTA steigerte den Auswuchs nur

Ergebnisse

mäßig. LPS zeigte keinen Effekt, was in Einklang mit der geringen TLR4-Expression humaner B-Zellen ist.

Konnten die untersuchten Agonisten die Steigerung der Transformation ähnlich schnell induzieren wie bei der Aktivierung durch CpG-DNA gesehen? Dazu wurden tonsilläre B-Zellen in An- und Abwesenheit der Agonisten (verwendete Konzentration siehe 3.2.3) (pseudo-)infiziert und der Auswuchs an den Tagen 1, 5 und 7 nach der Infektion unter Volumenkontrolle im FACS gemessen (Abbildung 4.28 B).

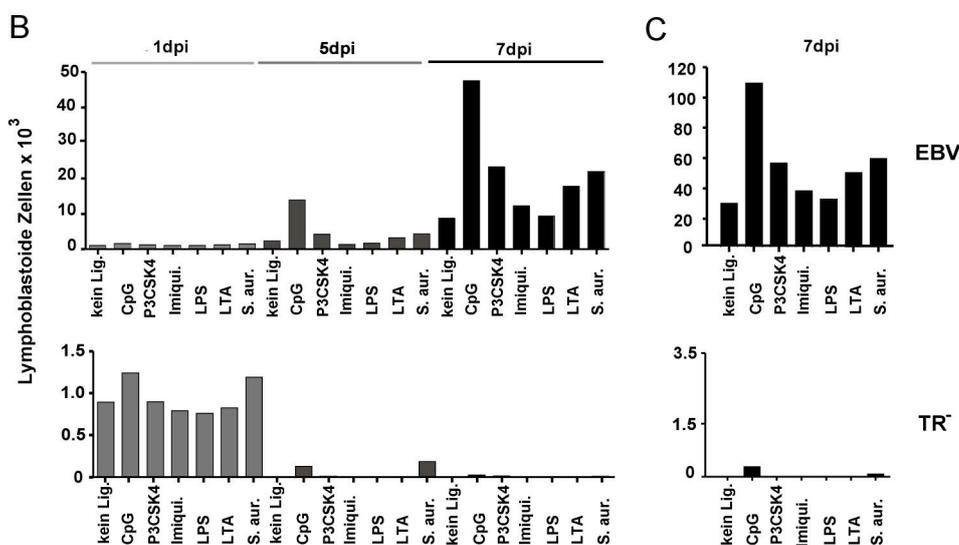


Abbildung 4.28 B und C: Die Anwesenheit verschiedener TLR-Agonisten während der EBV-Infektion induzierte eine synergistisch gesteigerte Transformation (B) tonsillärer und (C) peripherer B-Zellen. B-Zellen wurden in An- und Abwesenheit der TLR-Agonisten CpG-DNA, Pam3CSK4, Imiquimod, LPS, LTA und *S. aureus* für 1, 5 und 7 Tage kokultiviert und die Anzahl lymphoblastoider Zellen im FACS in volumennormierten Ansätzen gemessen.

Einen Tag nach der Infektion konnten in allen Ansätzen keine lymphoblastoiden Zellen ermittelt werden. An Tag 5 nach der Infektion zeigte sich in den Infektionen, welche in Anwesenheit des TLR9-Agonisten CpG-DNA, der TLR2-Agonisten Pam3CSK4 und LTA wie auch in Anwesenheit von *S. aureus* angesetzt wurden, eine synergistisch gesteigerte Anzahl transformierter Zellen. Damit induzierte die Aktivierung von TLR9 und TLR2 wie auch die TLR-Aktivierung durch *S. aureus* eine ähnlich schnelle Steigerung der Transformation. Sieben Tage nach der Infektion zeigte dann auch die in Anwesenheit von Imiquimod kokultivierte Infektion eine synergistisch gesteigerte Anzahl an transformierten Zellen. Die Anwesenheit von LPS führte zu keinem gesteigerten Auswuchs an lymphoblastoiden Zellen. Eine transiente

Ergebnisse

Aktivierung der pseudoinfizierten B-Zelle konnte nur in Anwesenheit von CpG-DNA oder *S. aureus* im Ansatz gemessen werden.

So zeigten neben der Aktivierung des TLR9 und TLR7 auch die Aktivierung des TLR2, wie auch die Anwesenheit „ganzer“ Bakterien einen pro-viralen Effekt auf die Transformation der frühinfizierten B-Zelle. Somit nutzte EBV die über verschiedene TLR-Signalwege induzierte Aktivierung der B-Zelle für seine eigene Etablierung aus. Da TLR2 neben Komponenten gram-negativer Bakterien auch gram-positive Bakterien und wie TLR7 auch virale Proteine erkennen kann, ist es denkbar, dass die Anwesenheit verschiedenster Pathogene am Ort der EBV-Infektion Einfluss auf das Ausmaß der Transformation nehmen kann.

Parallel wurden die Experimente mit peripheren B-Zellen durchgeführt. Diese verhielten sich wie die tonsillären B-Zellen und zeigten bei einer Infektion in der Anwesenheit der verschiedenen TLR-Agonisten gleiches Auswachsen wie tonsilläre B-Zellen (Abbildung 4.28 C). Die für die Infektion von tonsillären B-Zellen erarbeiteten pro-viralen Effekte der verschiedenen TLR-Agonisten sind damit auch auf die peripheren B-Zellen übertragbar. Daher könnten heterologe Pathogene beim Auswachsen von frisch infizierten peripheren B-Zellen im Rahmen einer EBV-Reaktivierung mit Virusfreisetzung und Neuinfektion ebenfalls eine Rolle spielen.

4.18 T-Zell-Erkennung der in Anwesenheit von CpG-DNA infizierten B-Zellen

TLR9-Aktivierung induziert in der B-Zelle die Expression des B-Zell-Aktivierungsmarkers CD86 (Hartmann and Krieg, 2000). Entsprechend reagierte die B-Zelle auf eine EBV-Infektion (siehe Abbildung 4.5 C). Welchen Einfluss hatte nun die Kombination beider Aktivatoren auf die Expression des in der T-Zell-Aktivierung wichtigen Oberflächenmarkers CD80? Dafür wurden B-Zellen in An- und Abwesenheit von CpG-DNA mit EBV infiziert oder mit TR⁻ pseudoinfiziert und die Expression des Moleküls durch spezifische Antikörperfärbung im FACS im Verlauf einer Woche untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.29 gezeigt.

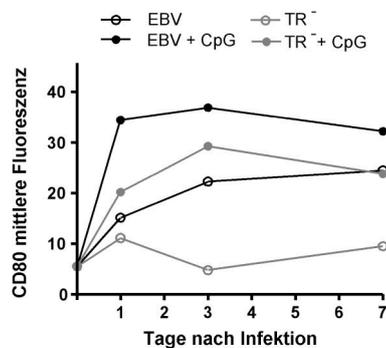


Abbildung 4.29: Die Expression des Oberflächenmoleküls CD80 wurde durch die Anwesenheit von CpG-DNA während der (Pseudo-)infektion induziert. Die B-Zellen wurden in An- und Abwesenheit von CpG-DNA (pseudo-)infiziert und die Expression des Moleküls CD80 durch spezifische Antikörper im FACS untersucht.

Die EBV-Infektion induzierte den Aktivierungsmarker CD80 bereits einen Tag nach der Infektion und führte in den folgenden Tagen zu einem stetigen Anstieg. Die Intensität der TLR9-Aktivierung zeigte sich in der starken Induktion des CD80-Moleküls in den TR⁻pseudoinfizierten B-Zellen. Auch konnte hier durch die Abnahme der Expression der transiente Charakter dieser Aktivierung gesehen werden. Die Kombination von EBV-Infektion und TLR9-Signal erreichte bereits am ersten Tag nach der Infektion die maximale Aktivierung der B-Zelle und blieb stabil hoch. Diese anhaltend hohe Expression eines, für die T-Zell-Aktivierung wichtigen Oberflächenmoleküls auf der B-Zelle sollte demnach die Aktivierung der spezifischen T-Zelle erleichtern.

Wie verhielt sich nun die T-Zell-Erkennung der infizierten B-Zelle, wenn die Infektion in Anwesenheit von CpG-DNA durchgeführt wurde? Frisch isolierte B-Zellen wurden in An-

Ergebnisse

und Abwesenheit von CpG-DNA infiziert und an den Tagen 5 bis 8 nach Infektion mit spezifischen CD8⁺ T-Zellen unter zellnormierten wie auch unter virusnormierten Bedingungen für eine Nacht kokultiviert. Als Maß der Reaktion der T-Zellen wurde das produzierte IFN- γ im ELISA gemessen (Parallelansatz zu den in Abbildung 4.13 und 4.14 beschriebenen Experimenten). Abbildung 4.30 zeigt das Ergebnis für den EBNA3A-spezifischen CD8⁺ T-Zellklon (Epitop QAK) und für den BZLF1-spezifischen CD8⁺ T-Zellklon (Epitop RAK).

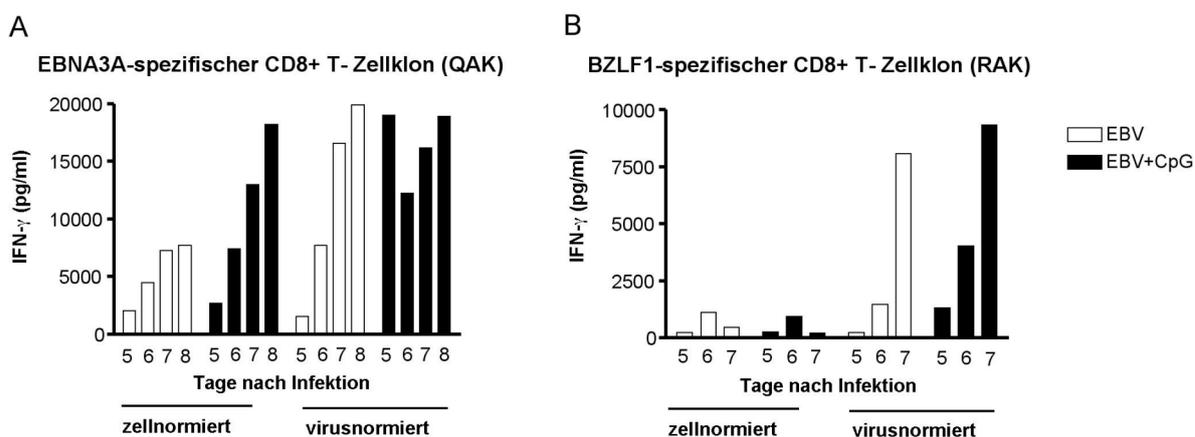


Abbildung 4.30: Die Anwesenheit von CpG-DNA während der Infektion steigerte die Antigenerkennung unter Zellzahlnormierung wie auch unter virusnormierten Bedingungen. B-Zellen wurden in An- und Abwesenheit von CpG-DNA infiziert und die Zellen über Nacht mit spezifischen T-Zellen unter zellnormierten und virusnormierten Bedingungen kokultiviert. Das produzierte IFN- γ wurde im ELISA bestimmt.

Die Anwesenheit von CpG-DNA während der EBV-Infektion führte im zellnormierten Ansatz zu einer effizienteren Erkennung der infizierten B-Zelle durch die QAK-spezifischen T-Zellen besonders an den Tagen 6, 7 und 8 nach der Infektion. Im virusnormierten Ansatz dagegen war die T-Zellerkennung an Tag 5 nach der EBV-Infektion in Anwesenheit von CpG-DNA bereits besonders stark erhöht, an den Tagen 6, 7, 8 glichen sich mit und ohne CpG-DNA dagegen an. Dies legt nahe, dass die CpG-DNA durch zwei unterschiedliche Mechanismen die T-Zellerkennung des Latenzantigens EBNA3A erhöht: (1) durch eine Erhöhung der Zahl infizierter und somit antigen-präsentierender Zellen, dieser Effekt spielt bis Tag 5 eine besonders starke Rolle, und (2) durch die intensivere Präsentation des Antigen EBNA3A in der einzelnen infizierten Zelle, dieser Effekt kommt erst ab Tag 6 nach Infektion zum Tragen (Abbildung 4.30 A). Das BZLF1-Epitop dagegen konnte von antigen-spezifischen T-Zellen in zellnormierten Ansätzen nur bis Tag 6 erkannt werden und steht daher im Einklang mit dem erwarteten Rückgang der Proteinexpression im Rahmen des abortiv-lytischen Zyklus (Kalla et

Ergebnisse

al., 2010). Ein Effekt von CpG-DNA war nicht feststellbar. In virusnormierten Ansätzen dagegen war, ähnlich wie bei EBNA3A, die T-Zellerkennung bis Tag 6 bei Infektion mit CpG-DNA gesteigert (Abbildung 4.30 B). Dieser „Zellzahleffekt“ wirkt sich demnach auf die Präsentation von Latenzantigenen und lytischen Antigenen gleichermaßen aus.

Weiter machten Zeitverlaufsdarstellungen deutlich, dass diese gesteigerte Antigenerkennung der in Anwesenheit von CpG-DNA infizierten B-Zelle zu deren früheren Erkennung führte. Hierbei wurde auch deutlich, dass die durch CpG-DNA aktivierten B-Zellen nach TR–Pseudoinfektion von den CD8⁺ T-Zellen nicht erkannt wurden. In Abbildung 4.30 C ist die Erkennung durch den LMP2-spezifischen CD8⁺ T-Zellklon (Epitop IED) unter virusnormierten Bedingungen gezeigt. Die Erkennung der EBV-infizierten Zelle konnte an Tag 9 nach Infektion erstmals gemessen werden. Die in Anwesenheit von CpG-DNA infizierte B-Zelle wurde bereits an Tag 6 nach Infektion erkannt.

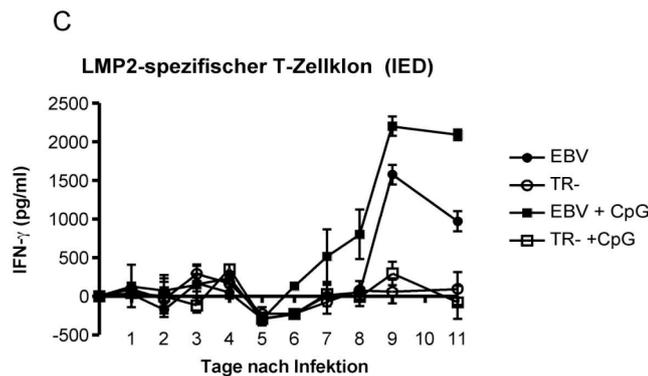


Abbildung 4.30 C: Die Anwesenheit von CpG-DNA während der Infektion resultierte in einer um 3 Tage früheren Erkennung der infizierten B-Zelle durch den LMP2-antigen-spezifischen T-Zellklon. Die B-Zellerkennung wurde unter virusnormierten Bedingungen im Zeitverlauf untersucht und im ELISA die IFN- γ -Produktion gemessen.

Führte diese CpG-DNA-induzierte beschleunigte Erkennung der infizierten B-Zellen zu einer schnelleren Kontrolle der kurzzeit-infizierten B-Zellen? Zur Beantwortung dieser Frage wurden EBV-Infektionen und TR– Pseudoinfektionen von gereinigten PBMC in An- und Abwesenheit von CpG-DNA sowie des T-Zell-Inhibitors CsA durchgeführt. Sieben Tage später wurde die Anzahl an lymphoblastoiden Zellen unter Volumenkontrolle ermittelt.

Ergebnisse

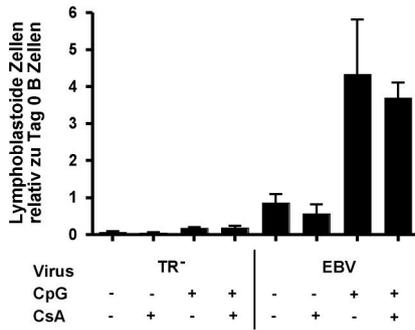


Abbildung 4.31: Sieben Tage nach der Infektion zeigte sich noch keine T-Zell-Kontrolle der infizierten B-Zellen. B-Zellen wurden in An- und Abwesenheit von CpG-DNA und CsA (pseudo-)infiziert und die Anzahl an lymphoblastoiden Zellen relativ zum Tag der Infektion im FACS unter Volumenkontrolle gemessen.

Abbildung 4.31 zeigt, dass eine Zugabe von CpG-DNA zu keiner schnelleren Kontrolle der frühinfizierten B-Zelle führte. Weder in der CpG-DNA-haltigen Infektion noch in der reinen EBV-Infektion hatte eine Kontrolle der infizierten B-Zellen 7 Tage nach der Infektion stattgefunden. Demnach fand unter diesen Bedingungen keine Kontrolle der EBV-Transformation durch periphere Effektorzellen (EBV-spezifische T-Zellen oder sonstige Effektoren) statt, weder ohne noch mit CpG-DNA-vermittelter TLR-Aktivierung. Möglicherweise reicht die Anzahl oder der Differenzierungszustand der EBV-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut für eine schnelle Kontrolle nicht aus. Dadurch kommt die CpG-DNA-vermittelte Steigerung der EBV-Transformationseffizienz voll zum Tragen.

Konnten nun spezifische T-Zellen den Auswuchs von EBV-infizierten B-Zellen in einer späteren Phase der Infektion kontrollieren? Und wie beeinflusste die TLR-induzierte Steigerung der für die T-Zell-Erkennung wichtigen Oberflächenmarker diese Kontrolle? Dazu wurden gereinigte PBMC mit EBV in An- und Abwesenheit von CpG-DNA infiziert und in seriellen Verdünnungen für 6 Wochen kultiviert. Anschließend wurde die Zellvitalität der Ansätze im MTT-Test bestimmt (Abbildung 4.32).

Bis zu einer Verdünnung von 100000 PBMC waren EBV-spezifische T-Zellen im Ansatz vorhanden, die das Auswachsen transformierter B-Zellen inhibierten. Eine weitere Verdünnung der PBMC enthielt keine oder zu wenige spezifische T-Zellen, so dass infizierte Zellen auswachsen konnten. Ab einer Verdünnung auf 6200 PBMC limitierte die Anzahl an transformierten B-Zellen in der Verdünnung das Auswachsen. Treffen somit (ausreichend viele) spezifische T-Zellen auf EBV-infizierte B-Zellen, können diese die Etablierung des Virus unterdrücken. In der Abwesenheit von spezifischen T-Zellen oder bei einer zu geringen Menge an spezifischen T-Zellen können die infizierten B-Zellen ungehindert auswachsen.

Ergebnisse

Im Gegensatz dazu resultierte die Anwesenheit von CpG-DNA während der Infektion bis zu einer Verdünnung von 6200 PBMC/well in einen unkontrollierten Auswuchs der infizierten B-Zellen. Somit führte die CpG-DNA-induzierte Steigerung der Expression kostimulatorischer Moleküle zu keiner effizienteren Kontrolle der infizierten B-Zellen. Die gegenüber der reinen EBV-Infektion gesteigerte Anzahl an transformierten B-Zellen bei der CpG-DNA-Verwendung zeigte sich im Auswachsen von LCL bis hin zu höheren PBMC-Verdünnungen. So scheint die Anwesenheit von CpG-DNA während einer Infektion zu unkontrolliertem Langzeitauswuchs zu führen. Dieser Effekt deutet darauf hin, dass der wachstumsfördernde Effekt von CpG-DNA auf B-Zellen sich stärker auswirkt als der mögliche gegenläufige Effekt einer Verbesserung der T-Zellkontrolle durch gesteigerte Antigenpräsentation. Zumindest gilt dies in der Ausgangssituation, in der EBV-spezifische T-Zellen in der Minderzahl und im ruhenden Zustand sind, wie das bei PBMC von EBV-positiven Spendern der Fall ist.

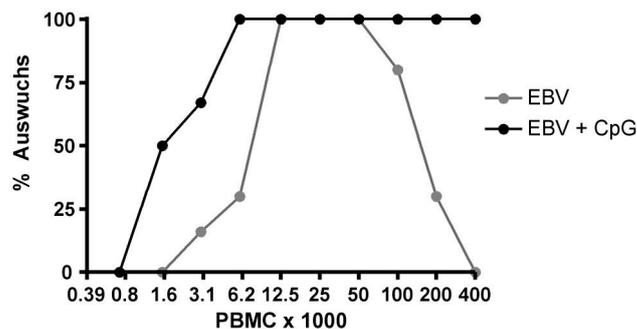


Abbildung 4.32: Kontrolle von Transformation und Auswuchs EBV-spezifischer B-Zellen im Regressionsexperiment. PBMC wurden in An- und Abwesenheit von CpG-DNA mit EBV infiziert und in Verdünnungen kultiviert. Der LCL-Auswuchs wurde 6 Wochen nach der Infektion mittels MTT-Test bestimmt.

4.19 Einfluss von CpG-DNA auf etablierte LCL

Die Ergebnisse zeigten, dass die Aktivierung des TLR9 während einer Infektion mit EBV die Expansion der latent infizierten B-Zellen förderte. Diese Zellen stellen das physiologische EBV-Reservoir dar. Interessanterweise zeigten Veröffentlichungen im murinen System, dass die Aktivierung des TLR9 auch zur Mobilisierung von MHV-68, einem murinen Verwandten von EBV aus diesem Reservoir führt (Gargano, Forrest, and Speck, 2009; Gargano, Moser, and Speck, 2008). Abschließend sollte nun untersucht werden, ob TLR9-Agonisten eine Reaktivierung des lytischen Zyklus von EBV induzieren können. Hierfür wurden LCL in An- oder Abwesenheit von CpG-DNA für einen Tag kokultiviert. Die Zellen wurden gewaschen und für weitere 1 bis 4 Tage in neuem Medium kultiviert. An den Analysetagen wurden die Überstände geerntet und B-Blasten mit dem jeweiligen Überstand für 6 Wochen kultiviert (siehe 3.3.17). Die im MTT-Test ermittelte Zahl der proliferierenden Kulturen ist in der Tabelle 4.1 erfasst. Dieses Experiment zeigte, dass in den Überständen der mit CpG-DNA behandelten LCL nicht aber in den Überständen der unbehandelten LCL, B-Zell-transformierendes Virus vorhanden war. Obwohl die geringe Anzahl an Transformanden darauf hindeutete, dass nur eine geringe Menge an Virus in den Überständen vorlag und die CpG-DNA-Anwesenheit nur zu einer wenig effizienten Reaktivierung führte, ist dieses Ergebnis ein erster Hinweis, dass TLR-Stimulation zur Reaktivierung des lytischen Zyklus von EBV führen kann.

Herkunft des Überstandes	CpG	2dpc	4dpc
EBV	-	48	48
Medium	-	0	0
LT-B	-	0	0
	+	2	1
JN-B	-	0	0
	+	3	0

Tabelle 4.1: TLR9-Stimulation von etablierten LCL induzierte die Freisetzung von EBV. LCL wurden in An- und Abwesenheit von CpG-DNA für einen Tag kultiviert, gewaschen und die Zellen in frischem Medium kultiviert. B-Blasten wurden an den Tagen 1 und 4 mit dem Überstand für weitere 6 Wochen kultiviert und die proliferierenden Kulturen im MTT-Test ermittelt. Dpc: Tage nach der CpG-DNA Zugabe.

Da eine EBV-Reaktivierung in LCL mit der Reduktion des für die Antigenpräsentation wichtigen Oberflächenmoleküls MHC I verbunden sein kann (Keating et al., 2002; Pudney et al., 2005), wurde die MHC-I-Oberflächenexpression nach dem Einwirken der CpG-DNA auf

Ergebnisse

die etablierten LCL im FACS untersucht. Abbildung 4.33 A zeigt, dass die TLR-Aktivierung zu einer signifikanten Reduktion von MHC I führte. Auch die CD86-Expression der LCL wurde durch TLR-Aktivierung reduziert. Die anschließende Untersuchung der EBNA3A-Antigenerkennung durch den QAK-spezifischen CD8+ T-Zellklon zeigte, dass das Einwirken von CpG-DNA auf die LCL Einfluss auf die T-Zell-Erkennung nahm. Es konnte eine Abnahme in der Erkennung der CpG-DNA-aktivierten LCL beobachtet werden (Abbildung 4.33 B). Grund hierfür könnte die Abnahme der Oberflächenmoleküle auf der zu erkennenden LCL sein. Diese Ergebnisse können damit als weiterer Hinweis für die Existenz eines TLR-induzierten lytischen Zyklus in der LCL gedeutet werden.

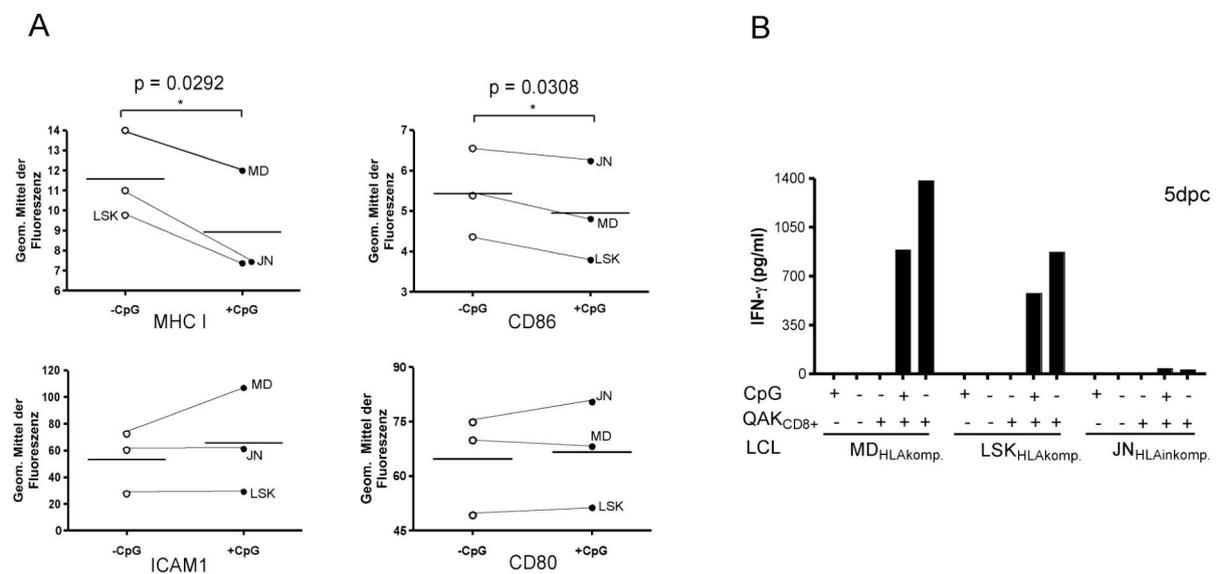


Abbildung 4.33: Die TLR9-Aktivierung induzierte in LCL den Rückgang der für die Antigenerkennung wichtigen Oberflächenmoleküle. (A) Die FACS-Messungen zeigten eine CpG-DNA-induzierte Reduktion der Expression von MHC I und von CD86. **(B)** Die LCL-Erkennung des QAK-spezifischen T-Zellklons nahm nach der Kokultivierung mit CpG-DNA ab.

So verbessern TLR-Signale in infizierten B-Zellen die Etablierung von EBV während einer Erstinfektion und stellen im EBV-Träger einen möglichen Auslöser für die Reaktivierung und Mobilisierung von EBV aus latent infizierten B-Zellen dar.

Zusammenfassung der Ergebnisse des 2. Teils

Einfluss der TLR9-Aktivierung auf die EBV-Infektion

- CpG-DNA während einer Infektion wirkte direkt auf die B-Zelle und steigerte synergistisch die Anzahl transformierter B-Zellen.
- Relativ geringe Mengen an CpG-DNA waren für die Steigerung der Transformation ausreichend.
- Die gesteigerte Transformation früh nach Infektion wurde durch das verbesserte Überleben der Zellen in den ersten 3 Tagen nach der Infektion sowie durch eine schnellere Proliferation der transformierten Zelle begünstigt.
- Die EBV-Wachstumsfaktoren IL-6 und IL-10 waren nicht verantwortlich für die CpG-DNA-induzierte Steigerung der Transformation.
- Der Effekt konnte für naive und Gedächtnis-B-Zellen beobachtet werden.

Pro-virale Effekte weiterer B-Zell-spezifischer TLR-Agonisten

- Neben TLR9 führte auch die Stimulation von TLR2 oder 7 zu einer gesteigerten B-Zell-Transformation.
- Auch inaktivierte Bakterien wirkten proliferationsfördernd auf die EBV-infizierten B-Zellen.
- Tonsilläre und periphere B-Zellen reagierten in gleicher Weise auf die TLR-Stimulation.

T-Zell-Erkennung in der Anwesenheit von CpG-DNA infizierten B-Zellen

- Die CpG-DNA Applikation während der (Pseudo-)infektion induzierte eine gesteigerte Expression des Oberflächenmoleküls CD80 auf der infizierten B-Zelle.
- Die Anwesenheit von CpG-DNA während der Infektion steigerte und beschleunigte die Erkennung der infizierten B-Zelle durch EBV-spezifische T-Zellen.
- In Ansätzen mit PBMC erfolgte in der Frühphase der Infektion keine Kontrolle der in An- oder Abwesenheit von CpG-DNA infizierten B-Zellen durch primäre, periphere T-Zellen.
- Im Regressionsansatz mit PBMC konnten spezifische T-Zellen das Langzeitauswachsen zu LCL in der EBV-Infektion verhindern. Die synergistisch gesteigerte Proliferation der transformierten B-Zellen in der CpG-DNA-haltigen Infektion konnte durch enthaltene T-Zellen nicht kontrolliert werden.

Einfluss von CpG-DNA auf etablierte LCL

- CpG-DNA kann die Freisetzung von transformierendem EBV aus latent infizierten B-Zellen bewirken.

Diskussion

5. Diskussion

T-Zellerkennung EBV-infizierter B-Zellen früh nach der Infektion

CD8⁺ T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Bekämpfung von Virusinfektionen. Diese T-Zellen erkennen virale Peptide auf MHC-I-Molekülen. Virale Peptide werden durch den Abbau von viralen Genprodukten durch das Proteasom und Aminopeptidasen produziert (Saveanu et al., 2005; Strehl et al., 2005). So werden tausende von Peptiden generiert, von denen nur eine sehr geringe Anzahl durch CD8⁺ T-Zellen erkannt werden. Dieses Phänomen wird als Immundominanz bezeichnet (Sercarz et al., 1993). „Immundominante“ Faktoren werden durch die am meisten vertretene spezifische T-Zell-Population erkannt, während „subdominante“ Faktoren von weniger häufigen T-Zell-Populationen erkannt werden (Yewdell, 2006). Die Erkennung ist dabei vom HLA-Typ des Individuums abhängig. EBV, eines der am meisten verbreiteten humanen Herpesviren, infiziert hauptsächlich B-Zellen und etabliert darin eine lebenslange, latente Infektion. Zur Kontrolle dieser infizierten B-Zellen besitzt der EBV-Träger ein bestimmtes Repertoire an EBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Dieses Repertoire wird gewöhnlich von CD8⁺ T-Zellen dominiert, die eine Untergruppe der latenten EBV-Proteine erkennen, aber auch von CD8⁺ T-Zellen, welche spezifisch für die im lytischen Zyklus von EBV exprimierten IE-Proteine sind. Interessant hierbei ist, dass die IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen meist häufiger sind als die dominanten T-Zellen gegen latente Antigene des Virus. Dies ist besonders stark im Falle einer IM ausgeprägt, in der die IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen bis zu 40 % der gesamten T-Zellen ausmachen können (Anteil Latenzantigen-spezifischer T-Zellen maximal 5 %) (Hislop et al., 2007b). Die funktionelle Rolle der CD8⁺ T-Zellen gegen latente Antigene von EBV wurde in der Vergangenheit genauestens untersucht, wohingegen die Rolle der CD8⁺ T-Zellen gegen lytische Antigene und der Grund für ihre Dominanz im EBV-T-Zell-Repertoire durch das Fehlen eines effizienten lytischen *in vitro* Systems schwierig war. Erst kürzlich nutzte ein von Pudney et al. entwickelter Assay, reaktivierte, lytische LCL als System zur Charakterisierung der Immundominanz verschiedener Klassen von lytischen-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (IE, E und L). Diese Studien zeigten, dass die Immundominanz der IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen direkt durch die Effektivität der Antigenerkennung durch die T-Zelle gesteuert wurde. Die IE-Antigene von EBV wurden dabei von den spezifischen T-Zellen besser erkannt, als die im lytischen Zyklus von EBV folgenden E- und L-Antigene (Pudney et al., 2005). Als Erklärung dieses Phänomens diente dabei das während des lytischen Zyklus abnehmende Expressionsniveau der MHC-I-Antigenpräsentationsmoleküle (Keating et al.,

2002). Durch die Abnahme kam es zu einer schlechteren Antigenpräsentation der im lytischen Zyklus später positionierten Antigene. EBV exprimiert im lytischen Zyklus eine Reihe von immunevasiven Proteinen, die zu der Reduktion der MHC-I-restringierten Antigenpräsentation führen können. Unter diesen Proteinen befindet sich das BNLF2a, welches die Translokation der Peptide durch den TAP-Transporter inhibiert (Hislop et al., 2007a). So könnte die Immundominanz der IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen eine Konsequenz der Aktivität der immunevasiven Proteine von EBV sein. Allerdings wird hierfür vorausgesetzt, dass das T-Zell-Repertoire durch reaktivierte, latent infizierte B-Zellen, welche den vollständigen lytischen Zyklus durchlaufen, geformt wird. Aber auch andere Szenarien sind durchaus denkbar. Kürzlich wurde beschrieben, dass das IE-Protein BZLF1, welches bekannt für die Initiation des lytischen Zyklus ist, von der infizierten B-Zelle früh nach der Infektion exprimiert wird (Wen et al., 2007), (Kalla et al., 2010). Paradoxerweise produzieren frühinfizierte B-Zellen kein EBV und so scheint es, dass die ersten Stunden und Tage einer EBV-Infektion mit einem abortiv-lytischen Zyklus, welcher für die Etablierung der Latenz wichtig ist, assoziiert ist (Kalla et al., 2010). Daraus entwickelte sich die Fragestellung des ersten Teils meiner Doktorarbeit: (1) Können diese Antigene erkannt werden? Und (2) kann das die Immundominanz IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen erklären?

Zur Beantwortung wurden zunächst spezifische CD8⁺ T-Zellen gegen die IE-Proteine von EBV, BZLF1 und BRLF1 sowie das E-Protein BMLF1 durch Peptidstimulation mit den Peptiden RAK und EPL (BZLF1) und dem GLC-Peptid (BMLF1) aus PBMC von gesunden EBV-positiven Spendern mit bekannter HLA-Restriktion und bekanntem EBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellrepertoire generiert. Die EBNA3A-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (Peptide QAK und RPP) und die LMP2-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (Peptide IED und CLG) wurden entsprechend hergestellt. Alle generierten T-Zellen konnten als monoklonale, die Zielzellen erkennende und lysierende, epitop-spezifische CD8⁺ T-Zellen identifiziert werden (Abbildung 4.6).

Für die anschließenden Untersuchungen der Antigenerkennung wurden Ansätze unter virusnormierten Bedingungen durchgeführt (siehe 3.3.13). Dies sollte die Situation nachstellen, die eine T-Zelle unter physiologischen Bedingungen im Körper vorfindet. Die Infektion mit EBV bewirkt die Transformation der B-Zelle. Ab dem 3 Tag nach der Infektion ist der transformierte Phänotyp erreicht. Ab diesem Zeitpunkt proliferieren die lymphoblastoiden B-Zellen stark und erhöhen die Anzahl der für die spezifischen T-Zellen sichtbaren Zielzellen am Ort der EBV-Infektion und in der Peripherie. Die gleichzeitige

Diskussion

Induktion der Expression der Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 auf der infizierten B-Zelle steigert weiter die Wahrscheinlichkeit der Aktivierung naiver B-Zellen, was wiederum wichtig in der IM-Situation ist (Abbildung 4.5). Durch die Zugabe eines immer gleichen Volumens des infizierten B-Zell-Ansatzes zu den spezifischen T-Zellen wurde so an den unterschiedlichen Tagen der Analyse diese gesteigerte Erkennungsmöglichkeit der infizierten B-Zelle berücksichtigt.

Die Antigenerkennungsstudien der IE-Proteine BZLF1 und BRLF1 zeigten deutlich, dass das zur Etablierung der Latenz in der frühinfizierten B-Zelle vorhandene BZLF1 von der B-Zelle prozessiert wurde und so von den IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen erkannt werden konnte. Auch zeigte die frühinfizierte B-Zelle eine BRLF1-Antigenpräsentation (Abbildung 4.7). So konnten diese Analysen deutlich die Antigenprozessierung der in der frühen Phase der Infektion in der Zelle vorhandenen IE-Proteine zeigen. Die Proteine schienen in der frühen Phase transient in der Zelle vorzuliegen, da die Antigenpräsentation der IE-Proteine abnahm (Abbildung 4.13), bevor sie in der späten Phase der Infektion wieder zunahm (Abbildung 4.7). Das BMLF1-Protein dagegen zeigte keine spezifische CD8⁺ T-Zellerkennung (Abbildung 4.12). Daraus kann geschlossen werden, dass die beiden in der frühen Infektionsphase vorhandenen Transaktivatoren des lytischen Zyklus BZLF1 und BRLF1 die Expression des E-Proteins BMLF1 nicht induzierten und so nur ein unvollständiger lytischer Zyklus in der frisch infizierten B-Zelle vorlag. Somit ist die Einleitung der frühen Virusproduktion nicht das Ergebnis der Expression der IE-Proteine in dieser frühen Infektionsphase. Vielmehr steht dieses Ergebnis im Einklang mit der von Kalla et al. postulierten Rolle von BZLF1 bei der Etablierung der EBV-Latenz (Kalla et al., 2010). Dieses Ergebnis ermöglichte erstmals ein, wenn auch abortiv-lytisches B-Zell-System, bestehend aus der frühinfizierten B-Zelle, zu etablieren und so zu untersuchen, welche Rolle die T-Zellerkennung von IE-Antigenen bei der Kontrolle der frühen Infektion spielt.

Mit EBV frisch infizierte B-Zellen wurden durch die Präsentation der IE-Antigene durch IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen erkannt. Diese Erkennung führte zu einer unerwartet starken Lyse der frühinfizierten Zelle (Abbildung 4.16). Hingegen wurden latent-infizierte B-Zellen von IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nur schwach im Auswachsen inhibiert (Abbildung 4.15). Mögliche Gründe hierfür könnten gewesen sein: (1) Hier wurde (im Gegensatz zu den in Abbildung 4.16 eingesetzten primären B-Zellen) mit einem T-Zellklon gearbeitet, welcher durch die *in vitro* Kultivierung an Funktionsfähigkeit verloren haben

könnte. (2) Dieser IE-antigen-spezifische T-Zellklon produzierte nach der Antigenerkennung wenig IFN- γ . (3) In einer LCL-Population sind die meisten Zellen latent infiziert und nur wenige dieser Zellen durchlaufen den lytischen EBV-Zyklus und so ist das IE-Antigen für die Erkennung durch die T-Zellen reduziert. In beiden Experimenten zeigte sich, dass IE-antigen-spezifische T-Zellen wichtig für die Lyse und damit Kontrolle der EBV-Infektion sind. Da aber durch IE-antigen-spezifische T-Zellen keine 100 %ige Lyse der infizierten Zellen erfolgte, deutet dies auf ein Zusammenspiel zwischen verschiedenen Effektorzellen, die für das Erreichen des Gleichgewichts zwischen infizierten B-Zellen und T-Zellen wichtig sind, hin.

Latente EBV-Proteine wurden durch die infizierten B-Zellen ebenfalls früh nach der Infektion den spezifischen CD8⁺ T-Zellen präsentiert. Der Erkennungszeitpunkt des LMP2-Proteins war gekennzeichnet durch die unterschiedliche Art der Prozessierung der beiden durch die T-Zellen erkannten Epitope IED und CLG (Lautscham et al., 2001). Das hydrophile Epitop IED wird TAP-abhängig auf MHC I präsentiert und T-Zellen benötigten 9 Tage bis zur effektiven Erkennung, wohingegen das hydrophobe Epitop CLG TAP-unabhängig auf die MHC-I-Moleküle beladen werden konnte und so schon ab Tag 4 nach der Infektion für die Erkennung durch die spezifischen T-Zellen bereit stand (Abbildung 4.8). Nach der Etablierung der Latenz nahmen die Latenzantigene stetig zu und führten zu einer gesteigerten Erkennung durch die spezifischen T-Zellen (Abbildung 4.14). Die Erkennung der Latenzantigene führte zur Lyse der frühinfizierten B-Zelle (Abbildung 4.16) und zur Kontrolle des LCL-Auswuchses (Abbildung 4.15). Im Vergleich mit den IE-antigen-spezifischen T-Zellen zeigte der hierbei verwendete Latenzantigen-spezifische T-Zellklon eine gesteigerte IFN- γ Produktion.

Wurde nun der erste Tag der sichtbaren Antigenerkennung aller untersuchten Proteine ermittelt, konnte eine im Mittel um 2 Tage schnellere Erkennung der IE-Proteine durch „ihre“ spezifischen CD8⁺ T-Zellen gesehen werden (Abbildung 4.9). Die Schnelligkeit der Antigenerkennung hing dabei (unabhängig ob lytisches oder latentes EBV-Protein) von der Avidität der T-Zelle ab, da die hoch-aviden YVL-, CLG- und RPP-spezifischen T-Zellen (halbmaximale Reaktion bei 10^{-8} M) in der Regel die infizierte Zelle um 2 bis 3 Tage schneller erkannten als die weniger aviden T-Zellen der übrigen Spezifitäten (halbmaximale Reaktion bei 10^{-7} M). Allerdings zeigte der YVL-spezifische T-Zellklon gegen das IE-Protein BRLF1 dabei eine schnellere Erkennung als der RPP-spezifische T-Zellklon gegen das Latenzprotein EBNA2A, obwohl dieser die höhere Avidität besaß.

Die Untersuchung der Proliferation der IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach der Infektion in PBMC unterstrich, dass diese frühere Erkennung zu einer gesteigerten Proliferation der IE-spezifischen CD8⁺ T-Zellen führen konnte (Abbildung 4.10) und damit auch ein direkter Zusammenhang von Antigenexpression nach der Infektion und dem Ausmaß der spezifischen CD8⁺ T-Zell-Antwort existiert. Dies zeigt, dass für EBV ein ähnlicher Mechanismus wie bei CMV für die Entstehung der Immundominanz von IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen verantwortlich sein könnte. Die Antigene, die am frühesten von den spezifischen T-Zellen erkannt werden, stellen die dominanten CD8⁺ T-Zellantigene dar. Diese sind in beiden Fällen die IE-Antigene des lytischen Zyklus (Crough and Khanna, 2009). Da auch die dominante CD4⁺ T-Zellantwort gegen die Hüllproteine von EBV eine bereits ab dem ersten Tag nach der Infektion, maximale Erkennung zeigte, bestärkt dies den Zusammenhang zwischen schneller Erkennung durch die dominante T-Zellpopulation (Abbildung 4.11). Dies eröffnet eine zu Pudney et al. alternative Erklärung für das immens gesteigerte Auftreten der IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen während einer akuten IM und auch im gesunden Träger.

5.1 Erklärungsmodelle der Immundominanz IE-antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in der akuten IM und im gesunden Träger

Pudney et al. gehen davon aus, dass B-Zellen in der Nähe des Epithels des Hals-Nasen-Rachenraums für das direkte „Priming“ der primären EBV-T-Zellantwort in der IM-Situation verantwortlich sind (Pudney et al., 2005). Die hier dargelegten Ergebnisse unterstützen diese Hypothese. Die infizierten B-Zellen exprimieren früh nach der Infektion das IE-Protein BZLF1 für die Etablierung der Latenz in der infizierten B-Zelle sowie das IE-Protein BRLF1 (Kalla et al., 2010). Beide IE-Proteine werden von der infizierten B-Zelle früh nach der Infektion auf MHC I spezifischen CD8⁺ T-Zellen präsentiert. Diese erkennen die Antigene, werden aktiviert und beginnen 2 Tage vor den spezifischen CD8⁺ T-Zellen gegen latente Antigene zu proliferieren. Neben der Proliferation wird auch die Lyse der frühinfizierten B-Zelle induziert (Abbildung 4.16) und so nimmt die Anzahl infizierter Zellen ab. Damit sind weniger infizierte B-Zellen für die Erkennung durch die Latenzantigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen vorhanden, und dadurch werden diese in geringerem Maß aktiviert und erreichen nur Subdominanz. Dies kann zur ausgeprägten Immundominanz der IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in der IM-Situation führen. Unterstützt wird dieses Modell durch den Befund, dass ein in der frühen Infektion abortiv-lytischer Zyklus auch auf T-Zellerkennungsebene

existiert. Durch das Ausbleiben der Erkennung des E-Proteins BMLF1 durch die spezifischen CD8+ T-Zellen, fokussiert sich die initiale CD8+ T-Zellantwort auf die Erkennung der, durch die infizierten B-Zellen präsentierten IE-Proteine von EBV (Abbildung 5.1).

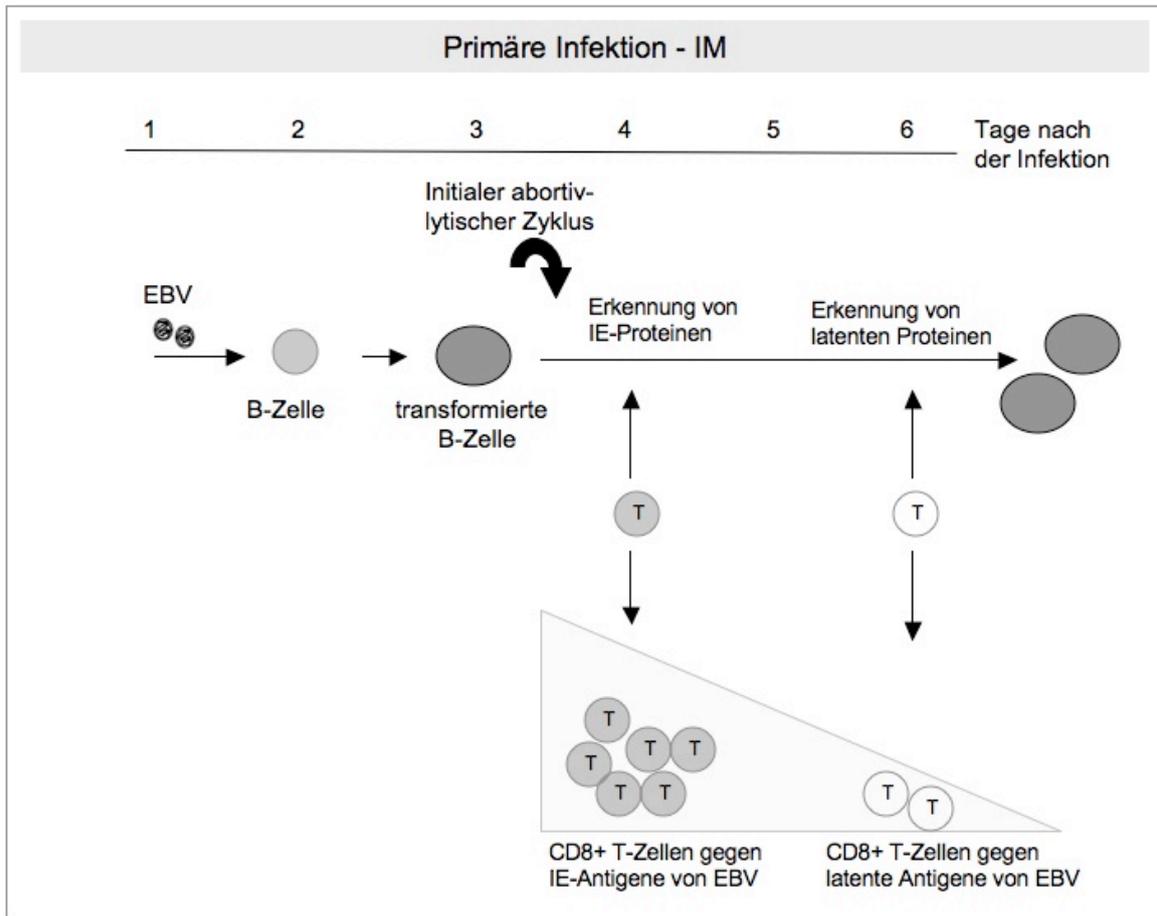


Abbildung 5.1: Die Ausbildung der Dominanz IE-antigen-spezifischer CD8+ T-Zellen kann durch die frühere Präsentation der IE-Antigene induziert sein. IE-antigen-spezifische CD8+ T-Zellen erkennen das Antigen im Mittel 2 Tage früher als die spezifischen CD8+ T-Zellen gegen latente Antigene von EBV. Diese Fokussierung auf die IE-antigen-spezifischen T-Zellen wird durch das Ausbleiben der Antigenpräsentation von E-Proteinen begünstigt. Die frühere Aktivierung führt zu einer gesteigerten Proliferation der IE-antigen-spezifischen CD8+ T-Zellen und der Ausbildung ihrer Dominanz im IM-Patienten.

Nach dem Abklingen der Immunantwort sterben die meisten T-Zellen ab. Ein Virusträger besitzt allerdings in der Regel weiterhin die IE-antigen-spezifischen CD8+ T-Zellen als dominantesten Vertreter der EBV-T-Zellantwort. Im gesunden Träger ist das von Pudney et al. vorgestellte Modell wie auch das oben präsentierte Modell für die Ausbildung der Immundominanz denkbar. So kann es im gesunden Träger zur Reaktivierung der latent infizierten B-Zellen kommen. Die Dominanz der IE-antigen-spezifischen CD8+ T-Zellen

Diskussion

erklärt sich in diesem Fall über das von Pudney et al. für die Reaktivierung von lytisch gewordenen LCL erarbeitete Wissen. Durch den Rückgang der Antigenpräsentation, der im Zuge des lytischen Zyklus später exprimierten Proteine, werden die IE-antigen-spezifischen CD8+ T-Zellen verstärkt aktiviert. Da von diesen reaktivierten B-Zellen Virus produziert wird, kann parallel eine Neuinfektion von B-Zellen stattfinden und das oben beschriebene Szenario zur Ausbildung der Dominanz von IE-antigen-spezifischen CD8+ T-Zellen einleiten (Abbildung 5.2).

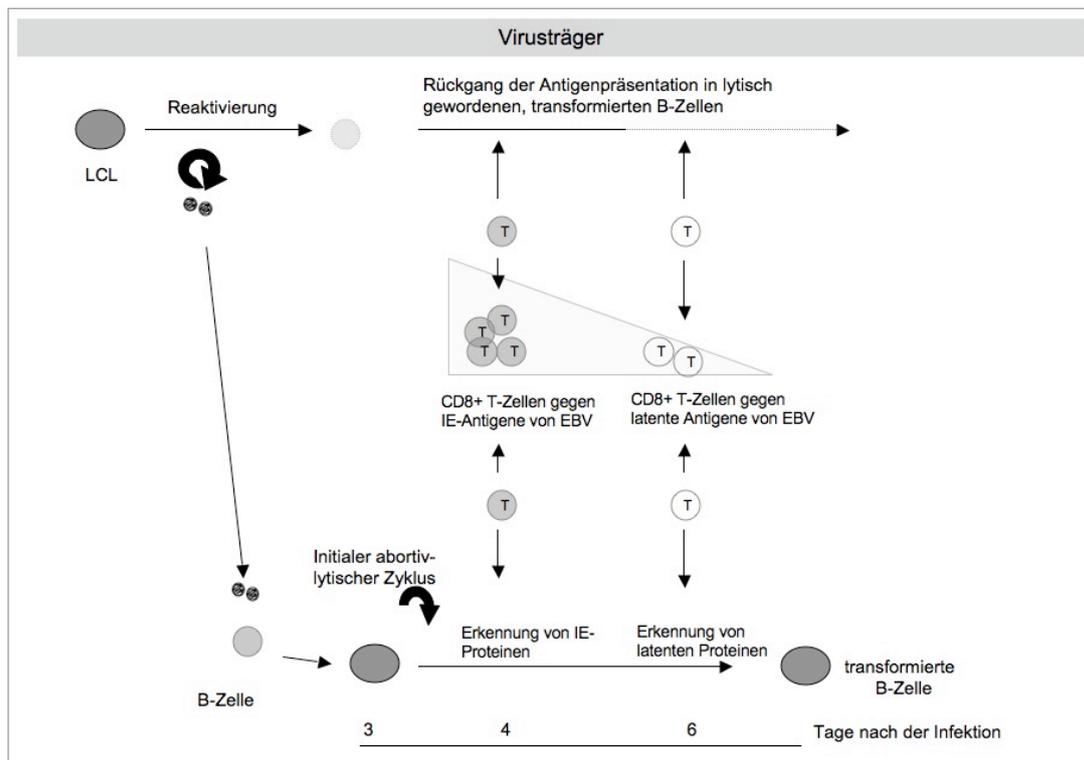


Abbildung 5.2: Im gesunden Virusträger kann die Kombination aus Reaktivierung und Neuinfektion die Dominanzhierarchien formen. Im gesunden Virusträger kann die, durch die Reaktivierung der latent infizierten B-Zelle reduzierte Antigenerkennung, wie auch die frühere Erkennung der neuinfizierten B-Zelle und die Existenz des frühen abortiv-lytischen Zyklus in der infizierten B-Zelle, eine Rolle in der Ausbildung der Immundominanz IE-antigen-spezifischer CD8+ T-Zellen spielen.

5.2 Anwendungsmöglichkeit der frühen Antigenerkennung in der Therapie gegen PTLD

Die allogene hämatopetische Stammzelltransplantation (HSCT) wird für die Behandlung einer Reihe von malignen und nicht-malignen Krankheiten des hämatopoetischen Systems eingesetzt. Eine allogene HSCT beinhaltet den Austausch des hämatopoetischen Systems des Patienten durch das eines anderen Individuums und wird zum Beispiel in der Therapie von Leukämien oder der Sichelzellanämie eingesetzt (Moss and Rickinson, 2005). Dabei kommt es meist zum Transfer von histoinkompatiblem Gewebe in den Patienten. Fremdes Gewebe wird nur im Fall von eineiigen Zwillingen ohne die Gefahr einer Abstoßung vom Immunsystem des Empfängers toleriert. In allen anderen Fällen besteht die Gefahr der Abstoßung, daher wird der Empfänger immunsupprimiert. Wie eingangs beschrieben ist die PTLD eine lebensbedrohliche Krankheit, die in Zusammenhang mit einer starken Immunsuppression und einem EBV-seropositiven Spendertransplantat steht. Die fehlende T-Zell-Kontrolle zerstört die Balance zwischen kontrollierenden T-Zellen und den transformierten B-Zellen und so können diese verstärkt auswachsen. Die treibende Kraft hinter der PTLD-Entstehung ist die Expression der latenten viralen Gene in der EBV-infizierten B-Zelle, darunter die für das Überleben und die Proliferation der Zelle essentiellen Proteine LMP2 und LMP1 (Gottschalk, Heslop, and Rooney, 2005). Auch wird die Expression von lytischen Proteinen in PTLD-Zellen beschrieben (Montone et al., 1996). Damit sind diese Lymphomzellen gute Zielzellen für zytotoxisch wirkende T-Zellen. Da PTLD-Patienten eine hohe Viruslast aufweisen (Stevens et al., 2001) kann es zu Neuinfektion von B-Zellen und der Präsentation von EBV-Antigenen kommen. Als eine der wichtigsten Therapien für die PTLD gilt daher die adoptive T-Zelltherapie mit T-Zellen des Knochenmarkspenders. Der Nutzen einer solchen Therapie wurde durch Rooney et al. aufgezeigt (siehe 2.2.1) (Rooney et al., 1995). Die gängige Vorgehensweise zur Gewinnung der T-Zellen besteht darin, B-Zellen des Spenders mit EBV zu infizieren und diese zu LCL auswachsen zu lassen. Diese werden im Anschluss für die Stimulation von Spender-T-Zellen eingesetzt. Dadurch werden EBV-spezifische T-Zellen in Kultur angereichert. Dieser Vorgang erstreckt sich über mehrere Wochen bis hin zu Monaten. Vorteil dieser Methode ist, dass es zur Generierung von polyklonalen EBV-spezifischen T-Zelllinien kommt, die verschiedene Antigenespezifitäten und CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen enthalten. Die gemeinsame Infusion beider T-Zellpopulationen bietet Vorteile, da (1) die Erkennung einer Vielzahl von Epitopen die PTLD-Elimination begünstigt und eine mögliche Immunevasion des Lymphoms unwahrscheinlicher wird und (2) die Anwesenheit von CD4⁺ T-Zellen das Überleben der CD8⁺ T-Zellen *in vivo* steigert

Diskussion

(Gottschalk, Heslop, and Rooney, 2005). Allerdings überlebt der PTL-D-Patient den langen Zeitraum bis zur Generierung dieser T-Zelllinien oft nicht, falls diese nicht im Voraus hergestellt werden konnten. So liegt das Bestreben nahe, einen schnelleren Zugang zu den therapeutischen T-Zellen zu bekommen. Das Wissen über die frühe Antigenpräsentation lytischer wie auch latenter Antigene gegenüber spezifischen T-Zellen in der frühen Phase der EBV-Infektion kann für diesen Zweck nützlich sein. Die frühinfizierte B-Zelle ist ab einem Zeitpunkt von etwa 3 Tagen nach der Infektion, ähnlich einer LCL, eine effiziente antigenpräsentierende Zelle. Sie exprimiert alle stimulatorischen Signale, die für die Aktivierung und Expansion der spezifischen T-Zellpopulation nötig sind. Und sie präsentiert zeitnah nach der Infektion Antigene, die von zytotoxischen CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen gegen latente Antigene wie auch CD8⁺ T-Zellen gegen lytische Antigene von EBV erkannt werden. Nachdem die spezifischen T-Zellen auf der frühinfizierten B-Zelle „ihr“ Antigen erkennen, produzieren sie IFN- γ und proliferieren. Mittels IFN- γ -Sekretionsassay (Moosmann et al., 2010) können diese Zellen dann zeitnah nach der Aktivierung gewonnen werden und stehen innerhalb von Tagen für den Transfer in den Patienten bereit.

Einfluss der TLR-Aktivierung auf die EBV-Infektion

Das über den TLR9-induzierte Signal wurde kürzlich als essentielles 3. Signal in der physiologischen Aktivierung der naiven B-Zelle identifiziert. Zusammen mit dem Signal 1, welches durch die Antigenbindung an den BCR vermittelt wird und dem Signal 2, welches durch die Interaktion von CD40 mit dem auf der T-Helferzelle exprimierten CD40L induziert wird, kommt es nur in Anwesenheit dieses TLR-vermittelten Signals 3 zu einer vollständigen Aktivierung und maximalen Proliferation der naiven B-Zelle (Ruprecht and Lanzavecchia, 2006). Von EBV ist bekannt, dass es verschiedene Latenzformen im Träger etabliert. In der Latenz III werden mindestens 12 EBV-Proteine, darunter die beiden latenten Membranproteine LMP1 und LMP2A, exprimiert. Diese Latenzform der infizierten B-Zelle wird in der Primärinfektion während einer akuten IM gefunden. Für LMP1 und LMP2A ist bekannt, dass sie die in der physiologischen Aktivierung der naiven B-Zelle im Keimzentrum wichtigen Signale 1 und 2 effizient nachahmen und so konstitutiv einige wichtige Signalwege der B-Zelle induzieren. Sie tragen dadurch zur Aktivierung, Überleben und Proliferation der infizierten B-Zelle bei (Caldwell et al., 1998; Gires et al., 1997). Die Rolle eines TLR-induzierten 3. Signals dagegen ist für die EBV-Infektion noch nicht ausführlich untersucht worden. Anhaltspunkte für eine solche Rolle lieferte die Beobachtung von Martin et al., die eine EBV-induzierte Steigerung der Expression des TLR7 auf der Oberfläche der infizierten B-Zelle sowie eine Steigerung der durch TLR7-induzierten Signalmediatoren zeigen konnten (Martin et al., 2007). Die Beteiligung von TLR2 an der EBV-induzierten Aktivierung wurde bisher nur in Monozyten gezeigt, einem Zelltyp, der für die EBV-Infektion weniger empfänglich ist (Gaudreault et al., 2007). Neben den TLR könnte auch die Aktivierung der zytosolischen PRR-Systeme das 3. Signal in der B-Zellaktivierung liefern (Samanta et al., 2006; Samanta, Iwakiri, and Takada, 2008; Wu et al., 2007). Die so in einer EBV-Infektion sichergestellte maximale Aktivierung und Proliferation der B-Zelle konnte im Falle der TLR7-Aktivierung zu einer gesteigerten Transformation von infizierten B-Zellen führen (Martin et al., 2007). Neben der TLR7-Aktivierung induzierte die Aktivierung des TLR9 durch CpG-DNA während der Etablierung von LCL ein gesteigertes klonales Wachstum der LCL. Da diese Untersuchung bisher nur in Mischkulturen mit PBMC zum Zweck der LCL-Klonierung durchgeführt wurde, war der direkte Einfluss der TLR9-Aktivierung auf die EBV-Infektion allerdings bislang unbekannt. Die Hypothese war jedoch plausibel, dass die TLR-Stimulation das 3. Signal lieferte und so zu einer gesteigerten Transformation und somit zur effizienten Latenzetablierung führte. Im zweiten Teil meiner Doktorarbeit wurde der Einfluß von TLR-Agonisten auf die EBV-Transformation der B-Zelle untersucht.

5.3 Gesteigerte B-Zell-Transformation in Anwesenheit von CpG-DNA während einer EBV-Infektion

Die Infektion mit EBV ist ein starker B-Zellaktivator, was sich darin zeigt, dass EBV nach der etablierten Transformation an Tag 3 nach der Infektion, die Expression der B-Zellaktivierungsmarker CD80 und 86 induziert und zu einer anhaltenden Proliferation der transformierten Zelle führt (Abbildung 4.5). Der direkte Einfluß der Bindung von CpG-DNA an den TLR9 der B-Zelle während einer EBV-Infektion äußerte sich in einer gesteigerten Aktivierung und Proliferation der infizierten Zelle. Schon ab Tag 1 nach der Infektion zeigten die TLR-aktivierten und EBV-infizierten B-Zellen die maximale Expression des Oberflächenmoleküls CD80 (Abbildung 4.29) sowie eine gesteigerte Proliferation früh nach der Infektion (Abbildung 4.17 und 4.18). Die auf die B-Zelle transient wirkenden CpG-DNA-Signale führten in Kombination mit der EBV-Infektion zur Ausbildung von dauerhaft transformierten B-Zellen in erhöhter Zahl (Abbildung 4.20). Die Unabhängigkeit des früh nach der Infektion signifikant gesteigerten B-Zell-Wachstums von der Anwesenheit von Immuneffektorzellen bestätigte, dass dies ein direkter, von CpG-DNA-induzierter Effekt auf die infizierte B-Zelle war (Abbildung 4.31).

Naive und Gedächtnis-B-Zellen exprimieren TLR9. Die naive Population besitzt allerdings weniger TLR9, als die Gedächtnis-B-Zellen und so proliferieren die naiven Zellen nach der Bindung des Agonisten weniger ausgeprägt als die Gedächtnis-B-Zellen (Bernasconi, Onai, and Lanzavecchia, 2003). Bei der Infektion mit EBV werden beide B-Zellen beider Subklassen ähnlich effizient infiziert. Die Gedächtnis-B-Zellen reagierten auf die Stimulation mit CpG-DNA mit der Proliferation der Zellen, wohingegen die naiven B-Zellen nicht auf die Stimulation ansprachen. In Gegenwart von EBV jedoch reagierten beide Klassen von B-Zellen auf eine TLR-Stimulation, und zwar benötigten naive Zellen neben der Aktivierung des TLR9 als 3 Signal offenbar die durch die viralen Proteine LMP1 und LMP2A gelieferten Signale 1 und 2. Erst die Kombination dieser drei Signale erzielte die synergistisch gesteigerte Transformation der infizierten B-Zelle. Gedächtnis-B-Zellen zeigten hierbei auf Grund der erhöhten Menge von TLR9 schon in den Anfängen der Infektion eine gegenüber den naiven B-Zellen gesteigerte Transformation. Dies glich sich jedoch bald aus: eine Woche nach der Infektion konnte in beiden Populationen gleiches Auswachsen der B-Zellen zu lymphoblastoiden Zellen gesehen werden (Abbildung 4.27). Naive B-Zellen sind somit auf die Anwesenheit des signalgebenden TLR-Agonisten für die Ausbildung der gegenüber der reinen EBV-Infektion synergistisch gesteigerten Zahl lymphoblastoider Zellen angewiesen. Aber

Diskussion

auch die bereits in der Vergangenheit durch das 3 Signal initial aktivierten und dadurch zu Gedächtnis-B-Zellen gewordenen Zellen können die Stimulation der angeborenen Signalwege über den TLR9 in einen gesteigerten Auswuchs und die dadurch bewirkte effizientere Etablierung der Infektion einsetzen. All dies beweist, dass die Koaktivierung der B-Zelle während der EBV-Infektion mit dem TLR-Agonisten CpG-DNA zu einer Steigerung der Aktivierung und Proliferation beider B-Zellsubtypen führt und so von EBV für die eigene maximale Etablierung ausgenutzt wird.

B-Zellen, die keine Überlebenssignale von außen oder von einer EBV-Infektion bekommen, proliferieren nicht und sterben gewöhnlich nach kurzer Zeit ab (siehe z.B. die TR-Experimente in Abbildung 4.5 B). Bevor die Transformation der infizierten Zelle an Tag 3 nach der Infektion erstmals phänotypisch etabliert ist, ist die infizierte Zelle gefährdet, in den programmierten Zelltod einzutreten. EBV exprimiert daher in den ersten Stunden nach der Infektion eine ganze Reihe von anti-apoptotisch wirkenden Genprodukten, die direkt oder indirekt der zellulären Apoptose entgegenwirken (Altmann and Hammerschmidt, 2005). EBV nutzt aber auch die externe Anwesenheit des B-Zell-Aktivators CpG-DNA für diesen Zweck, da auch CpG-DNA einen anti-apoptotischen Effekt in der frühen Phase mit einem Maximum bei Tag 3 induziert (Abbildung 4.24). Dieser, auf die B-Zelle wirkende zusätzliche Stimulus, schützt die Zellen demnach vor dem Zelltod, ähnlich einer CD40-Stimulation (Wiesner et al., 2008). Dies kann die gesteigerte Anzahl an transformierten Zellen an Tag 3 der Infektion in der CpG-DNA-beinhaltenen EBV-Infektion erklären (Abbildung 4.23). Zusätzlich führte die Anwesenheit der CpG-DNA im infizierten Ansatz zu einer etwas schnelleren Proliferation der transformierten Zellen, was weiter die Ausbeute an transformierten B-Zellen durch verstärkte EBV-Transformation erhöht (Abbildung 4.25).

Die zeitlich verzögerte Zugabe des TLR-Agonisten zu der EBV-Infektion machte deutlich, dass der maximale pro-virale Effekt der zusätzlichen TLR-induzierten Signale nur in den ersten Stunden nach der Infektion erreicht werden konnte (Abbildung 4.22). Als möglicher Grund hierfür kommt die nach der Infektion induzierte Reduktion der Expression des TLR9 in der infizierten B-Zelle in Frage (Martin et al., 2007).

Die Zytokine IL-6 und IL-10 nehmen beide Einfluß auf die Differenzierung und das Wachstum der B-Zelle und wirken bei EBV-infizierten B-Zellen als Wachstumsfaktoren (Beatty, Krams, and Martinez, 1997; Burdin et al., 1993; Tosato et al., 1990; Yokoi et al.,

1990). CpG-DNA kann die Sekretion dieser Zytokine induzieren. Wirkt die CpG-DNA dabei zusammen mit einer CD40-Stimulation auf die B-Zelle ein, so kommt es zur synergistisch gesteigerten Zytokinausschüttung (Wagner et al., 2004; Wiesner et al., 2008). Interessanterweise induzierte die Kombination aus CpG-DNA und EBV bereits vor der etablierten Transformation an Tag 3 nach der Infektion eine synergistisch gesteigerte IL-6-Ausschüttung durch die infizierte B-Zelle. Dies ist mit der Expression des CD40-nachahmenden EBV-Signalproteins LMP1 ab dem ersten Tag der Infektion zu erklären (Iskra et al., 2010). Mit dem Erreichen des transformierten Phänotyps an Tag 3 nach der Infektion steigerte sich die IL-6-Expression maximal. Eine synergistisch gesteigerte IL-10-Expression der infizierten B-Zellen konnte hingegen nur an Tag 7 nach der Infektion gemessen werden. Dies deutete damit eher darauf hin, dass dafür die durch die TLR-Agonisten induzierte synergistisch gesteigerte B-Zellanzahl verantwortlich war (Abbildung 4.26 A und B). In beiden Fällen zeigte sich, dass die durch die Anwesenheit von CpG-DNA während der Infektion induzierten Zytokinmengen, zumindest nicht in den ersten 7 Tagen, für das gesteigerte Auswachsen der lymphoblastoiden Zellen verantwortlich waren (Abbildung 4.26 C und D). Hier wären Untersuchungen zu späteren Zeitpunkten interessant, die klären, wie sich diese Wachstumsfaktoren auf die durch EBV und CpG-DNA bereits maximal aktivierte B-Zelle auswirken.

Die durch das Einwirken von CpG-DNA erhöhte Oberflächenmarkerexpression (Abbildung 4.29) und Antigenpräsentation (Jahrsdörfer et al., 2002; Jiang et al., 2007) auf der B-Zelle, welche zu einer gesteigerten und damit schnelleren Erkennung der infizierten Zelle durch die spezifischen CD8⁺ T-Zellen führte (Abbildung 4.30), konnte die Etablierung der transformierten B-Zelle in Gegenwart von PBMC des EBV-positiven Spenders in der Frühphase der Infektion nicht beeinflussen (Abbildung 4.31). Auch im Langzeitexperiment führte dieser maximal aktivierte Phänotyp der infizierten B-Zelle nicht dazu, dass die infizierten B-Zellen durch die in den PBMC enthaltenen spezifischen T-Zellen eliminiert wurden (Abbildung 4.32). Hier muss allerdings angemerkt werden, dass durch den Einfluß des TLR-Agonisten auf die infizierte B-Zelle diese maximal proliferierten und so die proliferierenden EBV-spezifischen T-Zellen verdrängen konnten. Ein Effekt, der wahrscheinlich in isolierten Zellkulturen eine größere Rolle spielt als in einem „offenen“ Gewebe im Organismus. Weiter war durch die *in vitro* Versuchsbedingung nicht gewährleistet, dass die, durch die CpG-DNA-induzierte, antivirale Zytokinproduktion Einfluß auf die Rekrutierung und Wirkung von Effektorzellen des Immunsystems nehmen konnte. Es

werden entsprechende Untersuchungen *in vivo* oder in komplexen Kultursystemen nötig sein, um die Wirkung der T-Zellen auf die durch die Kombination von CpG-DNA und EBV-Infektion maximal aktivierten B-Zelle präziser zu ermitteln. Unter *in vivo* Bedingungen, insbesondere bei gesteigerter Rekrutierung von spezifischen T-Zellen, dürfte das Auswachsen transformierter B-Zellen, ähnlich der EBV-Infektion in Abwesenheit des zusätzlichen B-Zellaktivators, durch die T-Zellen kontrolliert werden, sodass sich das im gesunden EBV-Träger vermutete Gleichgewicht zwischen infizierten B-Zellen und spezifischen T-Zellen einstellen kann.

5.4 Pro-virale Effekte weiterer TLR-Agonisten

Das induzierte Signal für eine maximale Aktivierung und Proliferation der EBV-infizierten B-Zelle muss nicht zwingend nur über den TLR9 erfolgen. Vorarbeiten anderer legen nahe, dass eine Aktivierung des auf der B-Zelle vorhandenen TLR7 und womöglich auch des TLR2 ähnlich transformationsunterstützende Signale liefern können (Hanten et al., 2008; Krug et al., 2004; Martin et al., 2007). TLR2 ist an der komplexen Erkennung von Bestandteilen gram-negativer und gram-positiver Bakterien beteiligt und kann auch ähnlich TLR7, B-Zell-aktivierende Signale nach der Erkennung von einigen Viren induzieren. Wurde der TLR2 durch den synthetischen Agonisten Pam3CSK4, welcher bakterielle Lipoproteine nachahmt, wie auch durch die Lipoteichonsäure aktiviert, induzierte dies in der EBV-infizierten B-Zelle ebenfalls die für eine gesteigerte B-Zell-Aktivierung und Proliferation unterstützenden Signale. Diese schienen allerdings deutlich schwächer zu sein, als die durch die Aktivierung des TLR9 erreichten Signale. Sie waren aber dennoch ausreichend für die zusätzliche Aktivierung der infizierten B-Zelle, und so konnte auch hier eine synergistisch gesteigerte Transformation gemessen werden. Auch konnte durch den TLR7-Agonist Imiquimod, wie bereits von Martin et al. an einem einzelnen Experiment beschrieben, eine gesteigerte Proliferation transformierter Zellen induziert werden. Interessant war, dass bei der Aktivierung des TLR2 durch inaktivierte gram-positive *S. aureus*-Bakterien eine ähnlich schnelle und starke Aktivierung der infizierten B-Zelle induzieren konnte wie bei der TLR9-Aktivierung durch die CpG-DNA (Abbildung 4.28). Dies zeigt, dass die Anwesenheit verschiedenster Bakterienbestandteile während einer EBV-Infektion im Zuge der antiviralen Immunantwort des angeborenen Immunsystems Signale über die TLR2, -7 und -9 induzieren, die EBV für seine Etablierung ausnutzen kann. Hervorhebenswert ist weiter, dass eine geringe Menge der TLR-Agonisten unterhalb des experimentell üblichen (Wagner et al., 2004) dabei ausreicht,

um eine maximale Aktivierung der infizierten B-Zelle zu erreichen und eine synergistisch gesteigerte Proliferation der infizierten Zellen zu erzielen (Abbildung 4.21 und 4.28 A).

5.5 Modell: TLR-Signale in der Ausbildung der IM

Die Primärinfektion mit EBV im Jugendlichen- und Erwachsenenalter kann zu einer IM führen. Die IM ist eine gutartige Krankheit, die neben dem gesteigerten Auftreten von EBV-spezifischen T-Zellen durch das Wachstum von EBV-infizierten B-Zellen charakterisiert ist. In der akuten Phase der IM können diese B-Zellen bis zu 10 % der gesamten B-Zellzahl ausmachen (Hislop et al., 2007b; Yao et al., 1989). Typischerweise ist IM mit Fieber, geschwollenen Lymphknoten, Pharyngitis und Tonsillitis assoziiert (Cohen, 2000). Diese in der IM auftretende Tonsillitis ist mit einem starken Anstieg der bakteriellen Besiedlung auf der Oberfläche der Mandeln verbunden (Stenfors and Räisänen, 1993). Die Infektion mit EBV geschieht über den Hals-Nasen-Rachenraum und induziert die Zunahme der intrazellulären Besiedlung der Epithelzellen durch gram-negative Bakterien (Stenfors et al., 2000). Gegen diese gram-negativen Bakterien eingesetzte Antibiotika können die Beschwerden der Tonsillitis mildern und das während der IM auftretende Fieber verkürzen (Brook, 2005a; Brook, 2005b). Dies macht deutlich, dass bakterielle Bestandteile am Ort einer EBV-Infektion zu finden sind, und so scheint es durchaus logisch, dass diese die von der B-Zelle exprimierten TLR während einer primären EBV-Infektion aktivieren und so zur gesteigerten Proliferation der transformierten B-Zellen, wie sie in der IM zu finden ist, beitragen. Die Aktivierung der TLR während einer EBV-Infektion induziert aber auch Effekte, die wichtig für die Kontrolle der infizierten B-Zelle in der IM-Situation sind, aber auch typische Symptome der IM verursachen können. So induziert die TLR-Aktivierung eine gesteigerte Zytokinproduktion, die zum einen Wachstumsfaktoren der B-Zellen darstellen und zum anderen wichtige Aufgaben in der Rekrutierung von Effektorzellen besitzen.

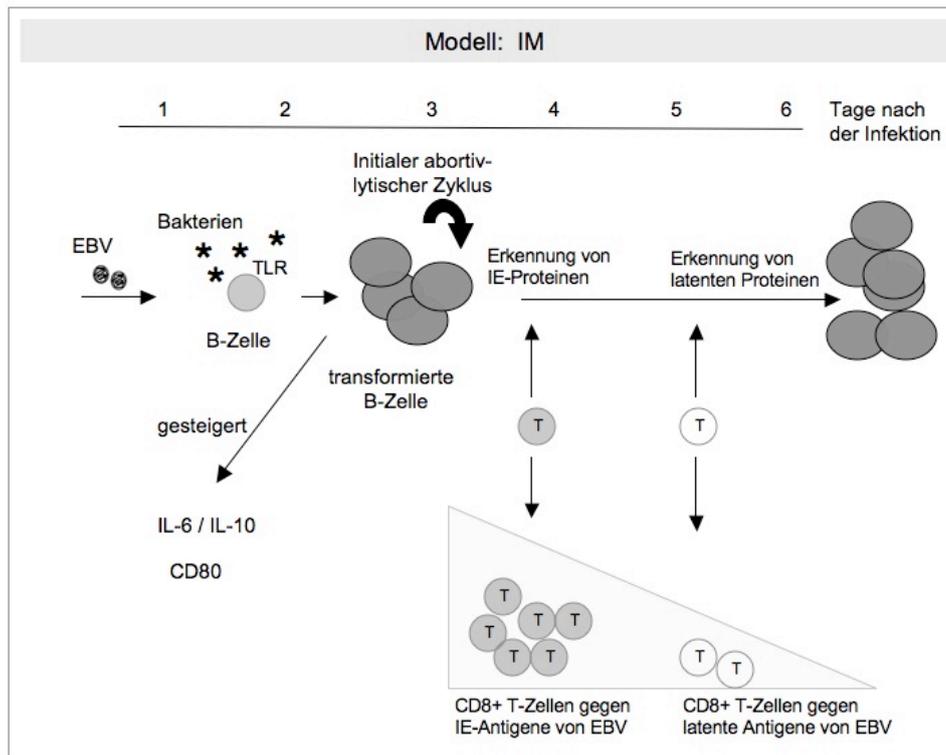


Abbildung 5.3: Bakterielle Koinfektion könnte die Ursache einer IM sein. Bakterien kommen während einer IM im Bereich der EBV-Infektion vor. Diese aktivieren die TLR auf der infizierten B-Zelle und induzieren die gesteigerte Proliferation der B-Zelle. Die TLR-Signale induzieren auch die Expression von CD80 auf der Oberfläche der infizierten B-Zelle und steigern so die Erkennung durch spezifische T-Zellen. In der infizierten Zelle kommt es zum frühen abortiv-lytischen Zyklus und so werden verstärkt IE-antigen-spezifische CD8+ T-Zellen aktiviert und vermehren sich stark. Durch die TLR-induzierte Zytokinproduktion kann es zur Rekrutierung weiterer Effektorzellen kommen die die T-Zellen in der Kontrolle der infizierten B-Zelle unterstützen.

Auch kann eine TLR-Aktivierung eine gesteigerte Expression der für die T-Zellaktivierung wichtigen kostimulatorischen Moleküle wie CD80 induzieren und so die Eliminierung der infizierten B-Zelle durch spezifische T-Zellen begünstigen. In der Frühphase der Infektion führt diese intensivere Präsentation des Antigens auf der infizierten B-Zelle zu einer gesteigerten Erkennung der frühinfizierten B-Zelle durch die Latenzantigen-spezifischen T-Zellen. Die CpG-DNA-induzierte Steigerung der lymphoblastoiden Zellen erhöht weiter die Erkennung (Abbildung 4.30 A). Durch den Rückgang der Expression der IE-Proteine im Rahmen des abortiv-lytischen Zyklus (Kalla et al., 2010) wirkt eine bessere Präsentation der Antigene in der Frühphase der Infektion nicht auf die IE-antigen-spezifischen T-Zellen. Hier kommt es durch die CpG-DNA-induzierte Erhöhung der Zahl infizierter und somit antigen-präsentierender Zellen zu einer gesteigerten Erkennung der kurzzeit-infizierten B-Zelle (Abbildung 4.30 B). Die schnellere Erkennung der frühinfizierten B-Zellen durch die IE-

antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen kann dann zur Vermehrung und Dominanz der IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen führen (Abbildung 5.3).

Bisher ist unbekannt, warum eine Primärinfektion mit EBV im Jugendlichen- und Erwachsenenalter in 50 % der Fälle zu einer IM führt. Die in dieser Arbeit generierten Hinweise auf eine durch Bakterienbestandteile induzierte gesteigerte Transformation der infizierten Zelle könnten eine mögliche Erklärung liefern. So ist anzunehmen, dass die individuelle Bakterienflora am Ort der Infektion, die Wirkung koexistierender Mikroorganismen auf die Immuneffektoren wie auch die direkten Effekte mikrobieller Bestandteile auf die EBV-infizierte B-Zelle zusammenwirken und den Ausschlag für die Ausbildung einer IM geben.

5.6 Modell: TLR9-induzierte Reaktivierung und PTLD

Die abschließenden Versuche meiner Arbeit untersuchten eine über den TLR9-induzierte Reaktivierung von EBV aus der latent infizierten B-Zelle. Ausschlaggebend hierfür waren die Untersuchungen an dem EBV-verwandten Herpesvirus MHV68 der Maus. Hier konnte eine direkte *in vivo* Reaktivierung durch den TLR9-Agonisten festgestellt werden (Gargano, Moser, and Speck, 2008). Meine Arbeit gab einen Hinweis darauf, dass die TLR9-Aktivierung im humanen System die Freisetzung von EBV fördert, bei gleichzeitiger für die Reaktivierung typischer Abnahme des MHC-I-Expressionsniveaus (Tabelle 4.1 und Abbildung 4.33). Somit kann auch eine Aktivierung von TLR9 den lytischen Zyklus von EBV in der latent infizierten B-Zelle induzieren. Daraus entwickelte sich folgende Hypothese:

Die nach einer Knochenmarkstransplantation zu einem geringen Prozentsatz auftretende PTLD resultiert aus dem enormen Auswachsen von EBV-infizierten B-Zellen des Transplantats. EBV persistiert in der latent infizierten B-Zellpopulation, und so ist es denkbar, dass die Krankheit, neben dem Auswachsen der latent infizierten B-Zellen, durch die Reaktivierung dieser B-Zellen induziert wird. Dies ist in Einklang mit der gesteigerten Viruslast in der PTLD (Stevens et al., 2001). Die EBV-Mobilisierung induziert die Neuinfektion und das Auswachsen von frisch infizierten B-Zellen. Durch das Fehlen von spezifischen T-Zellen können diese nicht kontrolliert werden. Im Zuge der Immunsuppression sind bakterielle Infektionen nach einer Transplantation häufige Begleiterscheinungen (Ocheni et al., 2008). So können Bakterien die im Transplantat latent infizierten B-Zellen über die Bindung an die TLR aktivieren und diese Signale können dann zur Reaktivierung dieser Zellen führen. Die Neuinfektion von B-Zellen in Anwesenheit der bakteriellen

kostimulatorischen Signale über die TLR lösen dann, die charakteristische B-Zellsteigerung der PTLD aus. Wenn keine adoptive T-Zelltherapie mit spezifischen T-Zellen zum Wiedererreichen der Balance zwischen infizierten B-Zellen und T-Zellen durchgeführt wird, können diese maximal aktivierten, infizierten B-Zellen ungehindert auswachsen und den Patienten in kürzester Zeit in Lebensgefahr bringen.

5.7 Modell: TLR9-Signale in der Ausbildung des endemischen BL

Die endemische Form des BL ist zu 95 % mit EBV assoziiert (Pope, Horne, and Scott, 1968) und kommt hauptsächlich im tropischen Afrika vor. Es gehört dort bei Kindern zu den am häufigsten vorkommenden Tumoren. Da diese Form in Gebieten mit häufigen Malariaerkrankungen vorkommt und durch eine Malaria-Therapie das Risiko, an einem BL zu erkranken, deutlich reduziert wird, gilt Malaria als Kofaktor bei der Entstehung (Bornkamm, 2009; Pope, Horne, and Scott, 1968; Thorley-Lawson and Allday, 2008). Bisher ist allerdings relativ wenig über die Interaktion dieser beiden Pathogene bei der Entstehung des Lymphoms bekannt.

Durch den Stich der Anopheles-Mücke gelangt der Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum* in die Blutbahn und befällt dort zunächst Hepatozyten. Nach der intrazellulären Vermehrung verlässt der Parasit die Hepatozyten und dringt in die eigentliche Wirtszelle, den Erythrozyten ein. Dort kommt es zum Aufbau der Nahrungsvakuole, über die die Aufnahme von Hämoglobin und dessen Abbau stattfindet. Die so entstandenen Aminosäuren werden sofort für die eigene Proteinsynthese eingesetzt. Durch das Fehlen der Häm-Oxygenase kann der Parasit die im Hämoglobin vorhandene Häm-Gruppe nicht abbauen. Dieses freie Häm ist toxisch für den Parasiten und wird deshalb in der unschädlichen, unlöslichen Form des Hemozins in der Vakuole abgelagert. Bei der Lyse der Wirtszelle kommt es zur Ruptur der Vakuole und zur Freisetzung des Hemozoin. Das Krankheitsbild der Malaria ist durch wiederkehrende Fieberanfälle gekennzeichnet, die parallel mit der Lyse der Wirtszelle auftreten. An der Erkennung des Malaria-Parasiten sind die TLR beteiligt. Die so induzierten anti-inflammatorischen Zytokine können die Thermoregulation des Wirts beeinflussen und Fieber auslösen (Haldar et al., 2007). Coban et al. konnte zeigen, dass das Verdauungsprodukt Hemozoin an den TLR9 binden und dies zur Aktivierung der Wirtszelle führt (Coban et al., 2005). Da TLR9 als Rezeptor für die Erkennung von CpG-DNA-haltigen Bakterien- und Virengenom gilt, war dieses Ergebnis überraschend. Spätere Experimente konnten zur

Diskussion

Klärung dieser Aktivierung beitragen. So zeigte sich, dass die DNA des Plasmodiums unmethylierte CpG-DNA-Motive enthält, durch welche sie über das Hemozoin an den TLR9 transportiert wird und so die effiziente Aktivierung der Wirtszelle induziert (Parroche et al., 2007; Schumann, 2007). Charakteristisch für die endemische Form des BL sind schnell wachsende B-Zellen im Bereich der Ober- und Unterkieferknochen oder des oberen Brustraums. Ähnlich der Annahme einer Beteiligung TLR-induzierter Signale bei der Ausbildung der IM und der PTLD, sind auch im Falle des endemischen BL externe Signale über die Bindung des parasitären DNA_p/Hemozoin-Komplexes an den TLR9 der B-Zelle denkbar. Im Zusammenhang mit einer im Kindesalter auftretenden primären EBV-Infektion über den Hals-Nasen-Rachenraum könnte sich so, die maximale Aktivierung und Proliferation der infizierten B-Zelle im Bereich des EBV-Eintritts erklären.

Ein weiteres Merkmal des BL ist die Ausbildung der c-myc/IgH Translokation. Dabei wird durch die chromosomale Translokation des c-myc-Gens mit dem Locus der schweren oder leichten Kette des Immunglobulins, das c-myc unter die transkriptionelle Kontrolle des Immunglobulins gebracht und verstärkt gebildet. Robbiani et al. zeigten, dass die *activation-induced deaminase* (AID), welche essentiell für die somatische Hypermutation und den Isotypswitch der B-Zelle ist (Muramatsu et al., 2000), für die Ausbildung der c-myc/IgH Translokation benötigt wird (Robbiani et al., 2008). Die konstitutiv aktive Form der AID induziert in Mäusen eine spontane Ausbildung der Translokation (Ramiro A.R 2006). EBV aktiviert die Expression der AID (Epeldegui et al., 2007). Warum es aber im Zusammenhang mit Malaria oder auch im AIDS-BL zu einer Ausbildung der Translokation kommt bedarf weiterer Untersuchungen.

Eine mögliche Rolle bei der Ausbildung der c-myc Translokation könnte die Aktivierung der TLR auf den EBV-infizierten B-Zellen spielen. Im Zuge einer TLR9-Aktivierung durch CpG-DNA konnte gezeigt werden, dass die Bildung von c-myc mRNA gesteigert ist (Hanten et al., 2008). Im Zuge der Transkription ist der Genloкус offen. AID-unabhängig könnten dann mögliche fragile DNA-Segmente von c-myc zur Ausbildung von Doppelstrangbrüchen und zur Translokation des c-myc in den Immunglobulinloкус führen (Reddy and Vasquez, 2005). Die chronische Aktivierung des TLR9 durch den Komplex aus Hemozoin und der DNA des Malaria-Erregers könnte zu einer anhaltend gesteigerten Transkription des c-myc Gens führen und so die Gefahr eines c-myc-Translokationsereignisses drastisch erhöhen. C-myc steuert die Transkription von 15 % aller Gene (Dang et al., 2006), im Besonderen solche Gene, die an

Diskussion

Wachstum, Proliferation und Apoptose beteiligt sind (Zeller et al., 2006). Durch das verstärkte Aufkommen von c-myc in der BL-Zelle kommt es zu einer unkontrollierten Zellteilung und genomischer Instabilität (Wade and Wahl, 2006). Normalerweise wird die proliferative Aktivität von c-myc über die in der Zelle gesteigerte Apoptosesensitivität gesteuert. Für die Entstehung des BL muss daher die Apoptoseeinleitung unterlaufen werden (Thorley-Lawson and Allday, 2008). Die in der BL-Zelle neben EBNA1 vorkommenden EBER-RNAs können die apoptose-induzierende Wirkung der PKR inhibieren und verhindern somit den Eintritt der infizierten Zelle in den programmierten Zelltod (Nanbo et al., 2002). Wie in dieser Arbeit aufgezeigt wurde, kann auch die Aktivierung des TLR9 eine anti-apoptotische Wirkung auf die infizierte Zelle haben. Es ist vorstellbar, dass auch die chronische DNA_p/Hemozoin-induzierte Aktivierung des TLR9, diese Signale in der BL-Zelle induzieren könnte. Dieses Unterlaufen der Apoptose würde es dann ermöglichen, die c-myc Translokation in der infizierten BL-Zelle zu tolerieren und die Zellen würden daraufhin verstärkt proliferieren. Dies könnte zu einer gesteigerten Passage von EBV-infizierten naiven B-Zellen durch das Keimzentrum, dem Ort der AID-vermittelten somatischen Hypermutation, führen. Durch die konstitutive Expression von c-myc können diese Zellen, nach der Passage des Keimzentrums, nicht den Latenz-0-Phänotyp ruhender B-Zellen einnehmen. Diese Zellen könnten dann zu BL-typischen Latenz-I-Zellen werden (angelehnt an (Thorley-Lawson and Allday, 2008)).

Malaria-infizierte Individuen zeigen eine gesteigerte EBV-Viruslast (Moormann et al., 2005). Chêne et al. konnten in diesem Zusammenhang das *Plasmodium falciparum* Erythrozyten-Membranprotein 1 mit seiner cystein-reichen Inter-Domänenregion-1 α (CIDR1 α) als Induktor der lytischen Reaktivierung von latent infizierten B-Zellen identifizieren (Chêne et al., 2007). Durch die Ergebnisse meiner Arbeit ist neben der Reaktivierung der Zelle durch CIDR1 α , auch eine TLR9-induzierte Steigerung der Virusmenge über die Bindung des DNA_p/Hemozoin-Komplexes an den TLR der latent infizierten B-Zelle denkbar. So könnte auch hier die Kombination aus EBV-Neuinfektion und DNA_p/Hemozoin-TLR9-Aktivierung die BL-Zellzahl steigern.

Doch nicht alle BL-Formen sind mit Malaria assoziiert und weisen demnach auch nicht die chronische TLR-Aktivierung der B-Zelle durch den DNA_p/Hemozoin-Komplex auf. Für das mit AIDS in Verbindung stehende sporadische BL steht daher das wiederholte Auftreten opportunistischer Infektionen, als Bindeglied zwischen TLR-Aktivierung und gesteigertem B-Zellauswuchs in Betracht.

Diskussion

Die TLR-Aktivierung könnte somit zur Ausbildung der beiden malignen EBV-assoziierten Lymphome BL und PTLD wie auch zur Ausbildung der benignen IM beitragen. Essentielle Unterschiede könnten allerdings in der Art, Dauer und Kontinuität dieser zusätzlichen B-Zell-Aktivierung sowie im Vorhandensein einer effizienten T-Zell-Kontrolle bestehen (Abbildung 5.4).

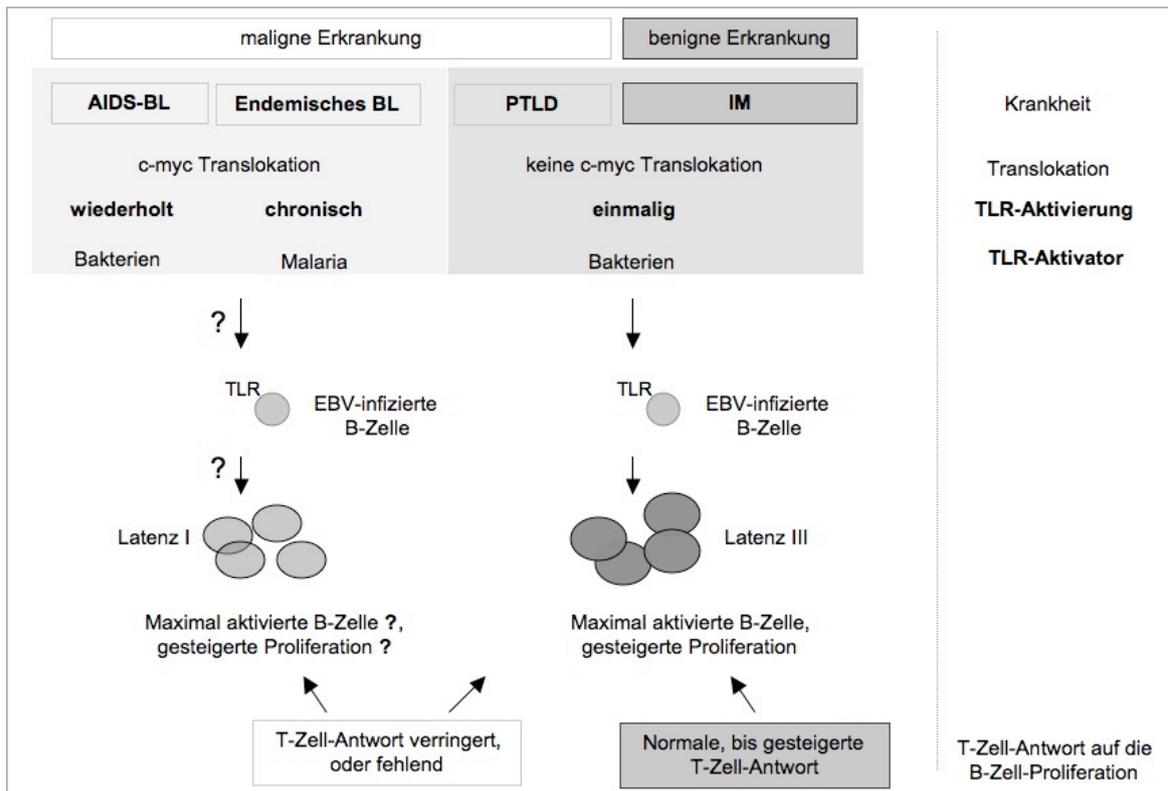


Abbildung 5.4: TLR-Aktivierung könnte zur Ausbildung von BL, PTLD und IM beitragen. Dabei scheint der TLR-Aktivator, die Dauer der Aktivierung und die T-Zell-Antwort eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung des Krankheitsbildes zu nehmen.

Ausblick

6. Ausblick

T-Zellerkennung EBV-infizierter B-Zellen früh nach der Infektion

- Gibt es einen Grund, warum die IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen bei der Erkennung des Antigens niedrigere IFN- γ -Mengen freisetzen als die Latenzantigen-spezifischen T-Zellen?
- Werden IE-antigen-spezifische T-Zellen bei der Lyse der frühinfizierten B-Zelle von weiteren Effektorzellen des Immunsystems (z.B. NK-Zellen oder CD4⁺ T-Zellen) unterstützt?

Einfluss der TLR-Aktivierung auf die EBV-Infektion

- Die durch Bindung des TLR9-Agonisten induzierten Signale steigerten das Überleben und die Proliferation der mit EBV in früher Phase infizierten B-Zelle. Die Möglichkeit, dass die CpG-DNA-Signale die Expression von für die Transformation wichtigen EBV-Genen wie LMP1, LMP2A und EBNA2 in der infizierten B-Zelle steigern, muss noch ausführlich untersucht werden. Erste Hinweise darauf, dass diese Proteine mit und ohne CpG-DNA-Stimulus gleich stark exprimiert sind, konnten bereits erarbeitet werden (Markus Kalla, AGV Genvektoren, Helmholtz-Zentrum München). Hier zeigten qRT-PCR-Daten der genannten Gene an unterschiedlichen Zeitpunkten der frühen Infektion, keine signifikanten Änderungen (Iskra et al., 2010).
- Um den Mechanismus hinter der verstärkten Aktivierung und Proliferation der in Anwesenheit des TLR9-Agonisten infizierten B-Zelle herauszufinden, sollte der Einfluß von CpG-DNA auf zelluläre Faktoren wie z.B. NF κ B untersucht werden.
- Im Zuge der ersten Hinweise auf eine durch TLR-Signale induzierte Reaktivierung von EBV aus der latent infizierten B-Zelle ist es zukünftig von Interesse, die Expressionsänderungen von Genen des lytischen Zyklus in diesen Zellen zu untersuchen.
- In dieser Arbeit wurde, um die Aktivierung des TLR9 durch Bakterien nachzuahmen, zu der Infektion synthetische unmethylierte CpG-DNA zugegeben. Da auch das EBV-Genom unmethylierte CpG-DNA Sequenzen trägt, wird es interessant sein herauszufinden, ob EBV selbst TLR9 aktivieren kann und so das, für die maximale

Ausblick

Aktivierung und Proliferation wichtige 3 Signal liefert. Mit Hilfe von EBV-Mutanten könnte diese Frage beantwortet werden. Dafür müsste die rekombinante EBV-Mutante ein nicht transformierendes Genom aufweisen. Dies könnte durch die Deletion der beiden, für die Transformation essentiellen Proteine LMP1 und EBNA2, erreicht werden. Mit solchen und ähnlichen Experimenten könnte die Fähigkeit von EBV selbst, TLR9 und weitere Rezeptoren zu aktivieren, näher untersucht werden.

Zusammenfassung

7. Zusammenfassung

T-Zellerkennung EBV-infizierter B-Zellen früh nach der Infektion

CD8⁺ T-Zellen spielen in der Bekämpfung von EBV eine essentielle Rolle. Zur Kontrolle dieser infizierten B-Zellen besitzt der EBV-Träger ein Repertoire an EBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, dessen Zusammensetzung sich oft vorhersagen lässt. Neben den CD8⁺ T-Zellen gegen latente Proteine von EBV spielen dabei CD8⁺ T-Zellen gegen lytische Proteine und darunter die immundominanten IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle. Der Grund für diese Dominanz ist bisher nicht geklärt worden, obwohl es bereits Hypothesen dazu gibt. EBV etabliert über die ersten Tage hinweg die latente Infektion in der B-Zelle und so prozessiert die frühinfizierte B-Zelle latente Antigene, die durch die entsprechenden CD8⁺ T-Zellen erkannt werden. Erst kürzlich wurde bekannt, dass auch die IE-Proteine des lytischen Zyklus von EBV von der frühinfizierten B-Zelle transient exprimiert werden. Ich konnte zeigen, dass die IE-Proteine in dieser frühen Phase der Infektion von der B-Zelle präsentiert und durch IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen erkannt werden. Ein später im lytischen Zyklus erwartetes E-Protein wurde jedoch nicht präsentiert. Dies bestätigt die Annahme eines abortiv-lytischen Zyklus in der frühinfizierten B-Zelle. In dieser Arbeit wurde auch gezeigt, dass die Erkennung der IE-Proteine im Mittel zeitlich vor der Erkennung der latenten Proteine von EBV in der Frühphase der Infektion lag. Da dies mit einer gegenüber den Latenzantigen-spezifischen T-Zellen gesteigerten Proliferation der IE-antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen einherging, stellt eine frühere Antigenerkennung durch die IE-antigen-spezifischen T-Zellen einen plausiblen Grund für die Immundominanz dieser T-Zellen dar.

Einfluss der TLR-Aktivierung auf die EBV-Infektion

Die EBV-Infektion induziert die Vermehrung der infizierten B-Zelle. Diese gesteigerte Proliferation ist ein Merkmal der EBV-assoziierten Krankheiten IM, PTLD und BL. Neben EBV kann die Proliferation der B-Zelle auch durch TLR-Liganden ausgelöst werden. TLR sind membranständige Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, die nach der Bindung des Liganden zu einer Aktivierung der B-Zelle führen können. Bei einer Infektion von EBV kann es zu einem paradoxen Effekt kommen: EBV nutzt die TLR-Aktivierung der B-Zelle für seine eigene Etablierung oder Vermehrung aus. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass die TLR9-Aktivierung in der B-Zelle während einer EBV-Infektion zu einer synergistisch gesteigerten Proliferation, Transformation und Expression von

Zusammenfassung

Effektormolekülen für die T-Zellstimulation sowie zur frühen Produktion von IL-6 führte. Während CpG-DNA alleine nur zur Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen führte, konnte zusammen mit einer EBV-Transformation durch CpG-DNA ein synergistisch gesteigertes Auswachsen von naiven und Gedächtnis-B-Zellen induziert werden. Darüber hinaus unterstützte die Aktivierung des TLR9 die Virusfreisetzung aus etablierten LCL. Da auch die TLR2- oder TLR7-Agonisten wie auch inaktiven Bakterien einen superadditiven Effekt auf die B-Zell-Transformation besaßen, ergibt sich die Hypothese, dass die Proliferation von EBV-infizierten B-Zellen und deren Interaktion mit Immuneffektorzellen durch Komponenten von Bakterien oder anderen Mikroorganismen am Ort der Infektion beeinflusst werden. Es wurden Modelle für den Beitrag von TLR-Signalen an der Entstehung der IM, PTLD sowie dem BL aufgestellt.

Literaturverzeichnis

8. Literaturverzeichnis

- Adhikary, D., Behrends, U., Moosmann, A., Witter, K., Bornkamm, G. W., and Mautner, J. (2006). Control of Epstein-Barr virus infection in vitro by T helper cells specific for virion glycoproteins. *J Exp Med* **203**(4), 995-1006.
- Ahmad-Nejad, P., Hacker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R. M., and Wagner, H. (2002). Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* **32**(7), 1958-68.
- Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**(7), 499-511.
- Al Tabaa, Y., Tuailon, E., Bollore, K., Foulongne, V., Petitjean, G., Seigneurin, J. M., Duperray, C., Desgranges, C., and Vendrell, J. P. (2009). Functional Epstein-Barr virus reservoir in plasma cells derived from infected peripheral blood memory B cells. *Blood* **113**(3), 604-11.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**(6857), 732-8.
- Alfieri, C., Birkenbach, M., and Kieff, E. (1991). Early events in Epstein-Barr virus infection of human B lymphocytes. *Virology* **181**(2), 595-608.
- Altmann, M., and Hammerschmidt, W. (2005). Epstein-Barr virus provides a new paradigm: a requirement for the immediate inhibition of apoptosis. *PLoS Biol* **3**(12), e404.
- Amyes, E., Hatton, C., Montamat-Sicotte, D., Gudgeon, N., Rickinson, A. B., McMichael, A. J., and Callan, M. F. (2003). Characterization of the CD4+ T cell response to Epstein-Barr virus during primary and persistent infection. *J Exp Med* **198**(6), 903-11.
- Anagnostopoulos, I., Hummel, M., and Stein, H. (1995). Frequent presence of latent Epstein-Barr virus infection in peripheral T cell lymphomas. A review. *Leuk Lymphoma* **19**(1-2), 1-12.
- Ank, N., West, H., Bartholdy, C., Eriksson, K., Thomsen, A. R., and Paludan, S. R. (2006). Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. *J Virol* **80**(9), 4501-9.
- Ariza, M. E., Glaser, R., Kaumaya, P. T., Jones, C., and Williams, M. V. (2009). The EBV-encoded dUTPase activates NF-kappa B through the TLR2 and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* **182**(2), 851-9.
- Arrand, J. R., and Rymo, L. (1982). Characterization of the major Epstein-Barr virus-specific RNA in Burkitt lymphoma-derived cells. *J Virol* **41**(2), 376-89.
- Babcock, G. J., Decker, L. L., Freeman, R. B., and Thorley-Lawson, D. A. (1999). Epstein-barr virus-infected resting memory B cells, not proliferating lymphoblasts, accumulate in the peripheral blood of immunosuppressed patients. *J Exp Med* **190**(4), 567-76.
- Babcock, G. J., Decker, L. L., Volk, M., and Thorley-Lawson, D. A. (1998). EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* **9**(3), 395-404.
- Babcock, G. J., and Thorley-Lawson, D. A. (2000). Tonsillar memory B cells, latently infected with Epstein-Barr virus, express the restricted pattern of latent genes previously found only in Epstein-Barr virus-associated tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(22), 12250-5.
- Balandraud, N., Roudier, J., and Roudier, C. (2004). Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* **3**(5), 362-7.
- Barton, G. M., Kagan, J. C., and Medzhitov, R. (2006). Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* **7**(1), 49-56.

- Batisse, J., Manet, E., Middeldorp, J., Sergeant, A., and Gruffat, H. (2005). Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2 is essential for intranuclear capsid assembly and production of gp350. *J Virol* **79**(22), 14102-11.
- Beatty, P. R., Krams, S. M., and Martinez, O. M. (1997). Involvement of IL-10 in the autonomous growth of EBV-transformed B cell lines. *J Immunol* **158**(9), 4045-51.
- Beaufils, P., Choquet, D., Mamoun, R. Z., and Malissen, B. (1993). The (YXXL/I)2 signalling motif found in the cytoplasmic segments of the bovine leukaemia virus envelope protein and Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A can elicit early and late lymphocyte activation events. *Embo J* **12**(13), 5105-12.
- Bell, J. K., Mullen, G. E., Leifer, C. A., Mazzone, A., Davies, D. R., and Segal, D. M. (2003). Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol* **24**(10), 528-33.
- Bernad, A., Kopf, M., Kulbacki, R., Weich, N., Koehler, G., and Gutierrez-Ramos, J. C. (1994). Interleukin-6 is required in vivo for the regulation of stem cells and committed progenitors of the hematopoietic system. *Immunity* **1**(9), 725-31.
- Bernasconi, N. L., Onai, N., and Lanzavecchia, A. (2003). A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* **101**(11), 4500-4.
- Bieback, K., Lien, E., Klagge, I. M., Avota, E., Schneider-Schaulies, J., Duprex, W. P., Wagner, H., Kirschning, C. J., Ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, S. (2002). Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J Virol* **76**(17), 8729-36.
- Bird, A. P., Taggart, M. H., Nicholls, R. D., and Higgs, D. R. (1987). Non-methylated CpG-rich islands at the human alpha-globin locus: implications for evolution of the alpha-globin pseudogene. *Embo J* **6**(4), 999-1004.
- Bornkamm, G. W. (2009). Epstein-Barr virus and its role in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: an unresolved issue. *Semin Cancer Biol* **19**(6), 351-65.
- Brightbill, H. D., Libraty, D. H., Krutzik, S. R., Yang, R. B., Belisle, J. T., Bleharski, J. R., Maitland, M., Norgard, M. V., Plevy, S. E., Smale, S. T., Brennan, P. J., Bloom, B. R., Godowski, P. J., and Modlin, R. L. (1999). Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* **285**(5428), 732-6.
- Brook, I. (2005a). The association of anaerobic bacteria with infectious mononucleosis. *Anaerobe* **11**(6), 308-11.
- Brook, I. (2005b). The role of anaerobic bacteria in tonsillitis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* **69**(1), 9-19.
- Burdin, N., Peronne, C., Banchereau, J., and Rousset, F. (1993). Epstein-Barr virus transformation induces B lymphocytes to produce human interleukin 10. *J Exp Med* **177**(2), 295-304.
- Burdin, N., Van Kooten, C., Galibert, L., Abrams, J. S., Wijdenes, J., Banchereau, J., and Rousset, F. (1995). Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40-activated human B lymphocytes. *J Immunol* **154**(6), 2533-44.
- Burkitt, D. (1958). A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg* **46**(197), 218-23.
- Caldwell, R. G., Wilson, J. B., Anderson, S. J., and Longnecker, R. (1998). Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* **9**(3), 405-11.
- Callan, M. F. (2003). The evolution of antigen-specific CD8+ T cell responses after natural primary infection of humans with Epstein-Barr virus. *Viral Immunol* **16**(1), 3-16.
- Callan, M. F., Fazou, C., Yang, H., Rostron, T., Poon, K., Hatton, C., and McMichael, A. J. (2000). CD8(+) T-cell selection, function, and death in the primary immune response in vivo. *J Clin Invest* **106**(10), 1251-61.

- Callan, M. F., Steven, N., Krausa, P., Wilson, J. D., Moss, P. A., Gillespie, G. M., Bell, J. I., Rickinson, A. B., and McMichael, A. J. (1996). Large clonal expansions of CD8+ T cells in acute infectious mononucleosis. *Nat Med* **2**(8), 906-11.
- Campos, M. A., Almeida, I. C., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E. P., Procopio, D. O., Travassos, L. R., Smith, J. A., Golenbock, D. T., and Gazzinelli, R. T. (2001). Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* **167**(1), 416-23.
- Catalina, M. D., Sullivan, J. L., Brody, R. M., and Luzuriaga, K. (2002). Phenotypic and functional heterogeneity of EBV epitope-specific CD8+ T cells. *J Immunol* **168**(8), 4184-91.
- Chêne, A., Donati, D., Guerreiro-Cacais, A. O., Levitsky, V., Chen, Q., Falk, K. I., Orem, J., Kironde, F., Wahlgren, M., and Bejarano, M. T. (2007). A molecular link between malaria and Epstein-Barr virus reactivation. *PLoS Pathog* **3**(6), e80.
- Clarke, P. A., Schwemmle, M., Schickinger, J., Hilse, K., and Clemens, M. J. (1991). Binding of Epstein-Barr virus small RNA EBER-1 to the double-stranded RNA-activated protein kinase DAI. *Nucleic Acids Res* **19**(2), 243-8.
- Coban, C., Ishii, K. J., Kawai, T., Hemmi, H., Sato, S., Uematsu, S., Yamamoto, M., Takeuchi, O., Itagaki, S., Kumar, N., Horii, T., and Akira, S. (2005). Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* **201**(1), 19-25.
- Cohen, J. I. (2000). Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* **343**(7), 481-492.
- Crough, T., and Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev* **22**(1), 76-98, Table of Contents.
- D'Addario, M., Libermann, T. A., Xu, J., Ahmad, A., and Menezes, J. (2001). Epstein-Barr Virus and its glycoprotein-350 upregulate IL-6 in human B-lymphocytes via CD21, involving activation of NF-kappaB and different signaling pathways. *J Mol Biol* **308**(3), 501-14.
- Dang, C. V., O'Donnell, K. A., Zeller, K. I., Nguyen, T., Osthus, R. C., and Li, F. (2006). The c-myc target gene network. *Semin Cancer Biol* **16**(4), 253-64.
- de Waal Malefyt, R., Haanen, J., Spits, H., Roncarolo, M. G., te Velde, A., Figdor, C., Johnson, K., Kastelein, R., Yssel, H., and de Vries, J. E. (1991). Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* **174**(4), 915-24.
- Delecluse, H. J., Hilsendegen, T., Pich, D., Zeidler, R., and Hammerschmidt, W. (1998). Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(14), 8245-50.
- Delecluse, H. J., Pich, D., Hilsendegen, T., Baum, C., and Hammerschmidt, W. (1999). A first-generation packaging cell line for Epstein-Barr virus-derived vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(9), 5188-93.
- Der, S. D., Zhou, A., Williams, B. R., and Silverman, R. H. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26), 15623-8.
- Dey, M., Cao, C., Dar, A. C., Tamura, T., Ozato, K., Sicheri, F., and Dever, T. E. (2005). Mechanistic link between PKR dimerization, autophosphorylation, and eIF2alpha substrate recognition. *Cell* **122**(6), 901-13.
- Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**(5663), 1529-31.

- Dirmeier, U., Neuhierl, B., Kilger, E., Reisbach, G., Sandberg, M. L., and Hammerschmidt, W. (2003). Latent membrane protein 1 is critical for efficient growth transformation of human B cells by Epstein-Barr virus. *Cancer Res* **63**(11), 2982-9.
- Epeldegui, M., Hung, Y. P., McQuay, A., Ambinder, R. F., and Martinez-Maza, O. (2007). Infection of human B cells with Epstein-Barr virus results in the expression of somatic hypermutation-inducing molecules and in the accrual of oncogene mutations. *Mol Immunol* **44**(5), 934-42.
- Epstein, M. A., Achong, B. G., and Pope, J. H. (1967). Virus in cultured lymphoblasts from a New Guinea Burkitt lymphoma. *Br Med J* **2**(5547), 290-1.
- Feederle, R., Kost, M., Baumann, M., Janz, A., Drouet, E., Hammerschmidt, W., and Delecluse, H. J. (2000). The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the cooperative functions of two transactivators. *Embo J* **19**(12), 3080-9.
- Feederle, R., Shannon-Lowe, C., Baldwin, G., and Delecluse, H. J. (2005). Defective infectious particles and rare packaged genomes produced by cells carrying terminal-repeat-negative Epstein-Barr virus. *J Virol* **79**(12), 7641-7.
- Fingerroth, J. D., Weis, J. J., Tedder, T. F., Strominger, J. L., Biro, P. A., and Fearon, D. T. (1984). Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(14), 4510-4.
- García, M. A., Meurs, E. F., and Esteban, M. (2007). The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie* **89**(6-7), 799-811.
- Gargano, L. M., Forrest, J. C., and Speck, S. H. (2009). Signaling through Toll-like receptors induces murine gammaherpesvirus 68 reactivation in vivo. *J Virol* **83**(3), 1474-82.
- Gargano, L. M., Moser, J. M., and Speck, S. H. (2008). Role for MyD88 signaling in murine gammaherpesvirus 68 latency. *J Virol* **82**(8), 3853-63.
- Gaudreault, E., Fiola, S., Olivier, M., and Gosselin, J. (2007). Epstein-Barr virus induces MCP-1 secretion by human monocytes via TLR2. *J Virol* **81**(15), 8016-24.
- Gerber, P., Lucas, S., Nonoyama, M., Perlin, E., and Goldstein, L. I. (1972). Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis. *Lancet* **2**(7785), 988-9.
- Gil, J., and Esteban, M. (2000). Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis* **5**(2), 107-14.
- Gires, O., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D., and Hammerschmidt, W. (1997). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *Embo J* **16**(20), 6131-40.
- Glaser, R., Litsky, M. L., Padgett, D. A., Baiocchi, R. A., Yang, E. V., Chen, M., Yeh, P. E., Green-Church, K. B., Caligiuri, M. A., and Williams, M. V. (2006). EBV-encoded dUTPase induces immune dysregulation: Implications for the pathophysiology of EBV-associated disease. *Virology* **346**(1), 205-18.
- Gottschalk, S., Heslop, H. E., and Rooney, C. M. (2005). Adoptive immunotherapy for EBV-associated malignancies. *Leuk Lymphoma* **46**(1), 1-10.
- Gottschalk, S., Rooney, C. M., and Heslop, H. E. (2005). Post-transplant lymphoproliferative disorders. *Annu Rev Med* **56**, 29-44.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**(1), 59-74.
- Gruffat, H., Batisse, J., Pich, D., Neuhierl, B., Manet, E., Hammerschmidt, W., and Sergeant, A. (2002). Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2 is essential for production of infectious virus. *J Virol* **76**(19), 9635-44.
- Hadinoto, V., Shapiro, M., Greenough, T. C., Sullivan, J. L., Luzuriaga, K., and Thorley-Lawson, D. A. (2008). On the dynamics of acute EBV infection and the pathogenesis of infectious mononucleosis. *Blood* **111**(3), 1420-7.

- Haldar, K., Murphy, S. C., Milner, D. A., and Taylor, T. E. (2007). Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. *Annu Rev Pathol* **2**, 217-49.
- Hammerschmidt, W., and Sugden, B. (1988). Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell* **55**(3), 427-33.
- Hanten, J. A., Vasilakos, J. P., Riter, C. L., Neys, L., Lipson, K. E., Alkan, S. S., and Birmachu, W. (2008). Comparison of human B cell activation by TLR7 and TLR9 agonists. *BMC Immunol* **9**, 39.
- Harel, J., Rassart, E., and Jolicoeur, P. (1981). Cell cycle dependence of synthesis of unintegrated viral DNA in mouse cells newly infected with murine leukemia virus. *Virology* **110**(1), 202-7.
- Hartmann, G., and Krieg, A. M. (2000). Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* **164**(2), 944-53.
- Hashimoto, C., Hudson, K. L., and Anderson, K. V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* **52**(2), 269-79.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**(5663), 1526-9.
- Hislop, A. D., Kuo, M., Drake-Lee, A. B., Akbar, A. N., Bergler, W., Hammerschmitt, N., Khan, N., Palendira, U., Leese, A. M., Timms, J. M., Bell, A. I., Buckley, C. D., and Rickinson, A. B. (2005). Tonsillar homing of Epstein-Barr virus-specific CD8⁺ T cells and the virus-host balance. *J Clin Invest* **115**(9), 2546-55.
- Hislop, A. D., Rensing, M. E., van Leeuwen, D., Pudney, V. A., Horst, D., Koppers-Lalic, D., Croft, N. P., Neefjes, J. J., Rickinson, A. B., and Wiertz, E. J. (2007a). A CD8⁺ T cell immune evasion protein specific to Epstein-Barr virus and its close relatives in Old World primates. *J Exp Med* **204**(8), 1863-73.
- Hislop, A. D., Taylor, G. S., Sauce, D., and Rickinson, A. B. (2007b). Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol* **25**, 587-617.
- Iskra, S., Kalla, M., Delecluse, H. J., Hammerschmidt, W., and Moosmann, A. (2010). Toll-like receptor agonists synergistically increase proliferation and activation of b cells by Epstein-Barr virus. *J Virol* **in press**.
- Jahrsdörfer, B., Hartmann, G., Racila, E., Jackson, W., Mühlhoff, L., Meinhardt, G., Endres, S., Link, B. K., Krieg, A. M., and Weiner, G. J. (2002). CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens. *J Leukoc Biol* **69**(1), 81-88.
- Janeway, C. W., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. (2001). Immunologie. *Spektrum Verlag* **5. Auflage**.
- Jiang, W., Lederman, M. M., Harding, C. V., Rodriguez, B., Mohner, R. J., and Sieg, S. F. (2007). TLR9 stimulation drives naive B cells to proliferate and to attain enhanced antigen presenting function. *Eur J Immunol* **37**(8), 2205-13.
- Jiang, Z., Georgel, P., Du, X., Shamel, L., Sovath, S., Mudd, S., Huber, M., Kalis, C., Keck, S., Galanos, C., Freudenberg, M., and Beutler, B. (2005). CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat Immunol* **6**(6), 565-70.
- Kalla, M., Schmeinek, A., Bergbauer, M., Pich, D., and Hammerschmidt, W. (2010). The AP-1 homolog BZLF1 of Epstein-Barr virus has two essential functions dependent upon the epigenetic state of the viral genome. *PNAS* **107**(2), in press.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K. J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C. S., Reis e Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T., and Akira, S. (2006). Differential roles of

- MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**(7089), 101-5.
- 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**(16), 8179-88.
- Kempkes, B., Pich, D., Zeidler, R., Sugden, B., and Hammerschmidt, W. (1995). Immortalization of human B lymphocytes by a plasmid containing 71 kilobase pairs of Epstein-Barr virus DNA. *J Virol* **69**(1), 231-8.
- Kenney, S., Holley-Guthrie, E., Mar, E. C., and Smith, M. (1989). The Epstein-Barr virus BMLF1 promoter contains an enhancer element that is responsive to the BZLF1 and BRLF1 transactivators. *J Virol* **63**(9), 3878-83.
- Khanna, R., and Burrows, S. R. (2000). Role of cytotoxic T lymphocytes in Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Microbiol* **54**, 19-48.
- Kieff, E. a. R., A. (2001). Epstein-Barr virus and its replication. *Fields Virology Lippincott - Williams & Wilkins, Philadelphia*, 2511-2573.
- Kiehl, A., and Dorsky, D. I. (1991). Cooperation of EBV DNA polymerase and EA-D(BMRF1) in vitro and colocalization in nuclei of infected cells. *Virology* **184**(1), 330-40.
- Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M., and Hammerschmidt, W. (1998). Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *Embo J* **17**(6), 1700-9.
- Kishimoto, T. (1989). The biology of interleukin-6. *Blood* **74**(1), 1-10.
- Kitagawa, N., Goto, M., Kurozumi, K., Maruo, S., Fukayama, M., Naoe, T., Yasukawa, M., Hino, K., Suzuki, T., Todo, S., and Takada, K. (2000). Epstein-Barr virus-encoded poly(A)(-) RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction. *Embo J* **19**(24), 6742-50.
- Klein, G. (1983). Specific chromosomal translocations and the genesis of B-cell-derived tumors in mice and men. *Cell* **32**(2), 311-5.
- Klein, U., Rajewsky, K., and Kuppers, R. (1998). Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* **188**(9), 1679-89.
- Krieg, A. M. (2002). From A to Z on CpG. *Trends Immunol* **23**(2), 64-5.
- Krug, A., Luker, G. D., Barchet, W., Leib, D. A., Akira, S., and Colonna, M. (2004). Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* **103**(4), 1433-7.
- Küppers, R. (2003). B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol* **3**(10), 801-12.
- Kurosaki, T. (1999). Genetic analysis of B cell antigen receptor signaling. *Annu Rev Immunol* **17**, 555-92.
- Kurt-Jones, E. A., Chan, M., Zhou, S., Wang, J., Reed, G., Bronson, R., Arnold, M. M., Knipe, D. M., and Finberg, R. W. (2004). Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(5), 1315-20.
- Laing, K. G., Elia, A., Jeffrey, I., Matys, V., Tilleray, V. J., Souberbielle, B., and Clemens, M. J. (2002). In vivo effects of the Epstein-Barr virus small RNA EBEB-1 on protein synthesis and cell growth regulation. *Virology* **297**(2), 253-69.
- Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K. A., Monks, B. G., Knetter, C. F., Lien, E., Nilsen, N. J., Espevik, T., and Golenbock, D. T. (2004). TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* **5**(2), 190-8.

- Lautscham, G., Mayrhofer, S., Taylor, G., Haigh, T., Leese, A., Rickinson, A., and Blake, N. (2001). Processing of a multiple membrane spanning Epstein-Barr virus protein for CD8(+) T cell recognition reveals a proteasome-dependent, transporter associated with antigen processing-independent pathway. *J Exp Med* **194**(8), 1053-68.
- 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 LMP2. *J Virol* **67**(12), 7428-35.
- Lewin, N., Aman, P., Akerlund, B., Gustavsson, E., Carenfelt, C., Lejdeborn, L., Klein, G., and Klein, E. (1990). Epstein-Barr virus-carrying B cells in the blood during acute infectious mononucleosis give rise to lymphoblastoid lines in vitro by release of transforming virus and by proliferation. *Immunol Lett* **26**(1), 59-65.
- Ligoxygakis, P., Pelte, N., Hoffmann, J. A., and Reichhart, J. M. (2002). Activation of Drosophila Toll during fungal infection by a blood serine protease. *Science* **297**(5578), 114-6.
- Lozzio, C. B., and Lozzio, B. B. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* **45**(3), 321-34.
- Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R., and Iwasaki, A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* **198**(3), 513-20.
- Månsson, A., Adner, M., Hockerfelt, U., and Cardell, L. O. (2006). A distinct Toll-like receptor repertoire in human tonsillar B cells, directly activated by PamCSK, R-837 and CpG-2006 stimulation. *Immunology* **118**(4), 539-48.
- Manukyan, M., Triantafilou, K., Triantafilou, M., Mackie, A., Nilsen, N., Espevik, T., Wiesmuller, K. H., Ulmer, A. J., and Heine, H. (2005). Binding of lipopeptide to CD14 induces physical proximity of CD14, TLR2 and TLR1. *Eur J Immunol* **35**(3), 911-21.
- Martin, H. J., Lee, J. M., Walls, D., and Hayward, S. D. (2007). Manipulation of the toll-like receptor 7 signaling pathway by Epstein-Barr virus. *J Virol* **81**(18), 9748-58.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* **449**(7164), 819-26.
- Miller, C. L., Burkhardt, A. L., Lee, J. H., Stealey, B., Longnecker, R., Bolen, J. B., and Kieff, E. (1995). Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases. *Immunity* **2**(2), 155-66.
- Miller, G., Shope, T., Lisco, H., Stitt, D., and Lipman, M. (1972). Epstein-Barr virus: transformation, cytopathic changes, and viral antigens in squirrel monkey and marmoset leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**(2), 383-7.
- Miyashita, E. M., Yang, B., Lam, K. M., Crawford, D. H., and Thorley-Lawson, D. A. (1995). A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells in vivo. *Cell* **80**(4), 593-601.
- Miyazaki, I., Cheung, R. K., and Dosch, H. M. (1993). Viral interleukin 10 is critical for the induction of B cell growth transformation by Epstein-Barr virus. *J Exp Med* **178**(2), 439-47.
- Montone, K. T., Hodinka, R. L., Salhany, K. E., Lavi, E., Rostami, A., and Tomaszewski, J. E. (1996). Identification of Epstein-Barr virus lytic activity in post-transplantation lymphoproliferative disease. *Mod Pathol* **9**(6), 621-30.
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., and O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* **19**, 683-765.
- Moormann, A. M., Chelimo, K., Sumba, O. P., Lutzke, M. L., Ploutz-Snyder, R., Newton, D., Kazura, J., and Rochford, R. (2005). Exposure to holoendemic malaria results in elevated Epstein-Barr virus loads in children. *J Infect Dis* **191**(8), 1233-8.

- Moosmann, A., Bigalke, I., Tischler, J., Schirrmann, L., Kasten, J., Tippmer, S., Leeping, M., Prevalsek, D., Jaeger, G., Ledderose, G., Mautner, J., Hammerschmidt, W., Schendel, D. J., and Kolb, H. J. (2010). Effective and long-term control of EBV PTLD after transfer of peptide-selected T cells *Blood in press*.
- Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C., and Kieff, E. (1995). The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* **80**(3), 389-99.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**(1-2), 55-63.
- Moss, P., and Rickinson, A. (2005). Cellular immunotherapy for viral infection after HSC transplantation. *Nat Rev Immunol* **5**(1), 9-20.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* **102**(5), 553-63.
- Murray, R. J., Kurilla, M. G., Brooks, J. M., Thomas, W. A., Rowe, M., Kieff, E., and Rickinson, A. B. (1992). Identification of target antigens for the human cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus (EBV): implications for the immune control of EBV-positive malignancies. *J Exp Med* **176**(1), 157-68.
- Nanbo, A., Inoue, K., Adachi-Takasawa, K., and Takada, K. (2002). Epstein-Barr virus RNA confers resistance to interferon-alpha-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma. *Embo J* **21**(5), 954-65.
- Nemerow, G. R., Mold, C., Schwend, V. K., Tollefson, V., and Cooper, N. R. (1987). Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J Virol* **61**(5), 1416-20.
- Nilsson, K., Klein, G., Henle, W., and Henle, G. (1971). The establishment of lymphoblastoid lines from adult and fetal human lymphoid tissue and its dependence on EBV. *Int J Cancer* **8**(3), 443-50.
- Ocheni, S., Kroeger, N., Zabelina, T., Sobottka, I., Ayuk, F., Wolschke, C., Muth, A., Lellek, H., Petersen, L., Erttmann, R., Kabisch, H., Zander, A. R., and Bacher, U. (2008). EBV reactivation and post transplant lymphoproliferative disorders following allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant* **42**(3), 181-6.
- Ozinsky, A., Smith, K. D., Hume, D., and Underhill, D. M. (2000). Co-operative induction of pro-inflammatory signaling by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* **6**(5), 393-6.
- Papadopoulos, E. B., Ladanyi, M., Emanuel, D., Mackinnon, S., Boulad, F., Carabasi, M. H., Castro-Malaspina, H., Childs, B. H., Gillio, A. P., Small, T. N., and et al. (1994). Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* **330**(17), 1185-91.
- Parroche, P., Lauw, F. N., Goutagny, N., Latz, E., Monks, B. G., Visintin, A., Halmen, K. A., Lamphier, M., Olivier, M., Bartholomeu, D. C., Gazzinelli, R. T., and Golenbock, D. T. (2007). Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(6), 1919-24.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., and Beutler, B. (1998a). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**(5396), 2085-8.
- Poltorak, A., Smirnova, I., He, X., Liu, M. Y., Van Huffel, C., McNally, O., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Du, X., Thompson, P., Chan, E. K., Ledesma, J., Roe, B., Clifton, S., Vogel, S. N., and Beutler, B. (1998b). Genetic and physical mapping of the Lps

- locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol Dis* **24**(3), 340-55.
- Pope, J. H. (1967). Establishment of cell lines from peripheral leucocytes in infectious mononucleosis. *Nature* **216**(5117), 810-1.
- Pope, J. H., Horne, M. K., and Scott, W. (1968). Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. *Int J Cancer* **3**(6), 857-66.
- Pudney, V. A., Leese, A. M., Rickinson, A. B., and Hislop, A. D. (2005). CD8+ immunodominance among Epstein-Barr virus lytic cycle antigens directly reflects the efficiency of antigen presentation in lytically infected cells. *J Exp Med* **201**(3), 349-60.
- Pulvertaft, J. V. (1964). Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma). *Lancet* **1**(7327), 238-40.
- Rasmussen, S. B., Jensen, S. B., Nielsen, C., Quartin, E., Kato, H., Chen, Z. J., Silverman, R. H., Akira, S., and Paludan, S. R. (2009). Herpes simplex virus infection is sensed by both Toll-like receptors and retinoic acid-inducible gene-like receptors, which synergize to induce type I interferon production. *J Gen Virol* **90**(Pt 1), 74-8.
- Rassa, J. C., and Ross, S. R. (2003). Viruses and Toll-like receptors. *Microbes Infect* **5**(11), 961-8.
- Reddy, M. C., and Vasquez, K. M. (2005). Repair of genome destabilizing lesions. *Radiat Res* **164**(4 Pt 1), 345-56.
- Rickinson, A. a. K., E. (2001). Epstein-Barr virus. *Fields Virology Lippincott - Williams & Wilkins, Philadelphia*, 2575-2627.
- Robbiani, D. F., Bothmer, A., Callen, E., Reina-San-Martin, B., Dorsett, Y., Difilippantonio, S., Bolland, D. J., Chen, H. T., Corcoran, A. E., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M. C. (2008). AID is required for the chromosomal breaks in c-myc that lead to c-myc/IgH translocations. *Cell* **135**(6), 1028-38.
- Romani, L., Bistoni, F., and Puccetti, P. (1997). Initiation of T-helper cell immunity to *Candida albicans* by IL-12: the role of neutrophils. *Chem Immunol* **68**, 110-35.
- Romano, P. R., Garcia-Barrio, M. T., Zhang, X., Wang, Q., Taylor, D. R., Zhang, F., Herring, C., Mathews, M. B., Qin, J., and Hinnebusch, A. G. (1998). Autophosphorylation in the activation loop is required for full kinase activity in vivo of human and yeast eukaryotic initiation factor 2alpha kinases PKR and GCN2. *Mol Cell Biol* **18**(4), 2282-97.
- Rooney, C. M., Smith, C. A., Ng, C., Loftin, S., Li, C., Krance, R. A., Brenner, M. K., and Heslop, H. E. (1995). Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet* **345**(8941), 9-13.
- Rooney, C. M., Smith, C. A., Ng, C. Y., 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**(5), 1549-55.
- Rousset, F., Garcia, E., Defrance, T., Peronne, C., Vezzio, N., Hsu, D. H., Kastelein, R., Moore, K. W., and Banchereau, J. (1992). Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(5), 1890-3.
- Ruf, I. K., Rhyne, P. W., Yang, C., Cleveland, J. L., and Sample, J. T. (2000). Epstein-Barr virus small RNAs potentiate tumorigenicity of Burkitt lymphoma cells independently of an effect on apoptosis. *J Virol* **74**(21), 10223-8.
- Ruprecht, C. R., and Lanzavecchia, A. (2006). Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur J Immunol* **36**(4), 810-6.
- Sadler, A. J., and Williams, B. R. (2008). Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* **8**(7), 559-68.

- Samanta, M., Iwakiri, D., Kanda, T., Imaizumi, T., and Takada, K. (2006). EB virus-encoded RNAs are recognized by RIG-I and activate signaling to induce type I IFN. *Embo J* **25**(18), 4207-14.
- Samanta, M., Iwakiri, D., and Takada, K. (2008). Epstein-Barr virus-encoded small RNA induces IL-10 through RIG-I-mediated IRF-3 signaling. *Oncogene* **27**(30), 4150-60.
- Sandor, F., and Buc, M. (2005). Toll-like receptors. II. Distribution and pathways involved in TLR signalling. *Folia Biol (Praha)* **51**(6), 188-97.
- Sato, A., Linehan, M. M., and Iwasaki, A. (2006). Dual recognition of herpes simplex viruses by TLR2 and TLR9 in dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(46), 17343-8.
- Saveanu, L., Carroll, O., Hassainya, Y., and van Endert, P. (2005). Complexity, contradictions, and conundrums: studying post-proteasomal proteolysis in HLA class I antigen presentation. *Immunol Rev* **207**, 42-59.
- Schmidt, A., Schwerdt, T., Hamm, W., Hellmuth, J. C., Cui, S., Wenzel, M., Hoffmann, F. S., Michallet, M. C., Besch, R., Hopfner, K. P., Endres, S., and Rothenfusser, S. (2009). 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(29), 12067-72.
- Schmidt, K. N., Leung, B., Kwong, M., Zarembek, K. A., Satyal, S., Navas, T. A., Wang, F., and Godowski, P. J. (2004). APC-independent activation of NK cells by the Toll-like receptor 3 agonist double-stranded RNA. *J Immunol* **172**(1), 138-43.
- Schön, M. P., and Schön, M. (2008). TLR 7 and TLR 8 as targets in cancer therapy. *Oncogene* **27**(2), 190-199.
- Schumann, R. R. (2007). Malarial fever: hemozoin is involved but Toll-free. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(6), 1743-4.
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., and Kirschning, C. J. (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* **274**(25), 17406-9.
- 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**(5), 1791-800.
- Semmes, O. J., Chen, L., Sarisky, R. T., Gao, Z., Zhong, L., and Hayward, S. D. (1998). Mta has properties of an RNA export protein and increases cytoplasmic accumulation of Epstein-Barr virus replication gene mRNA. *J Virol* **72**(12), 9526-34.
- Sercarz, E. E., Lehmann, P. V., Ametani, A., Benichou, G., Miller, A., and Moudgil, K. (1993). Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants. *Annu Rev Immunol* **11**, 729-66.
- Sharp, T. V., Schwemmle, M., Jeffrey, I., Laing, K., Mellor, H., Proud, C. G., Hilse, K., and Clemens, M. J. (1993). Comparative analysis of the regulation of the interferon-inducible protein kinase PKR by Epstein-Barr virus RNAs EBER-1 and EBER-2 and adenovirus VAI RNA. *Nucleic Acids Res* **21**(19), 4483-90.
- Silva, A. L., Omerovic, J., Jardetzky, T. S., and Longnecker, R. (2004). Mutational analyses of Epstein-Barr virus glycoprotein 42 reveal functional domains not involved in receptor binding but required for membrane fusion. *J Virol* **78**(11), 5946-56.
- Sinclair, A. J., and Farrell, P. J. (1995). Host cell requirements for efficient infection of quiescent primary B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *J Virol* **69**(9), 5461-8.
- Snow, A. L., and Martinez, O. M. (2007). Epstein-Barr virus: evasive maneuvers in the development of PTLD. *Am J Transplant* **7**(2), 271-7.
- Srivastava, S. P., Kumar, K. U., and Kaufman, R. J. (1998). Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis in response to activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **273**(4), 2416-23.

- Stenfors, L. E., Bye, H. M., Räisänen, S., and Myklebust, R. (2000). Bacterial penetration into tonsillar surface epithelium during infectious mononucleosis. *J Laryngol Otol* **114**(11), 848-852.
- Stenfors, L. E., and Räisänen, S. (1993). The membranous tonsillitis during infectious mononucleosis is nevertheless of bacterial origin. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* **26**(2), 149-155.
- Steven, N. M., Annels, N. E., Kumar, A., Leese, A. M., Kurilla, M. G., and Rickinson, A. B. (1997). Immediate early and early lytic cycle proteins are frequent targets of the Epstein-Barr virus-induced cytotoxic T cell response. *J Exp Med* **185**(9), 1605-17.
- 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**(5), 1801-13.
- Stevens, S. J., Verschuuren, E. A., Pronk, I., van Der Bij, W., Harmsen, M. C., The, T. H., Meijer, C. J., van Den Brule, A. J., and Middeldorp, J. M. (2001). Frequent monitoring of Epstein-Barr virus DNA load in unfractionated whole blood is essential for early detection of posttransplant lymphoproliferative disease in high-risk patients. *Blood* **97**(5), 1165-71.
- Strehl, B., Seifert, U., Kruger, E., Heink, S., Kuckelkorn, U., and Kloetzel, P. M. (2005). Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol Rev* **207**, 19-30.
- Sumpter, R., Jr., Loo, Y. M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S. M., and Gale, M., Jr. (2005). Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* **79**(5), 2689-99.
- Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J., Alexopoulou, L., Flavell, R. A., and Beutler, B. (2004). Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(10), 3516-21.
- Taga, K., Mostowski, H., and Tosato, G. (1993). Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth. *Blood* **81**(11), 2964-71.
- Takada, K., and Nanbo, A. (2001). The role of EBEBs in oncogenesis. *Semin Cancer Biol* **11**(6), 461-7.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2009). Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev* **227**(1), 75-86.
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L., and Akira, S. (2002). Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* **169**(1), 10-4.
- Tan, L. C., Gudgeon, N., Annels, N. E., Hansasuta, P., O'Callaghan, C. A., Rowland-Jones, S., McMichael, A. J., Rickinson, A. B., and Callan, M. F. (1999). A re-evaluation of the frequency of CD8+ T cells specific for EBV in healthy virus carriers. *J Immunol* **162**(3), 1827-35.
- Thorley-Lawson, D. A., and Allday, M. J. (2008). The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. *Nat Rev Microbiol* **6**(12), 913-24.
- 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**(13), 1328-37.
- Tierney, R. J., Steven, N., Young, L. S., and Rickinson, A. B. (1994). Epstein-Barr virus latency in blood mononuclear cells: analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state. *J Virol* **68**(11), 7374-85.
- Tosato, G., Tanner, J., Jones, K. D., Revel, M., and Pike, S. E. (1990). Identification of interleukin-6 as an autocrine growth factor for Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *J Virol* **64**(6), 3033-41.

- Traggiai, E., Becker, S., Subbarao, K., Kolesnikova, L., Uematsu, Y., Gismondo, M. R., Murphy, B. R., Rappuoli, R., and Lanzavecchia, A. (2004). An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat Med* **10**(8), 871-5.
- Tytell, A. A., Lampson, G. P., Field, A. K., and Hilleman, M. R. (1967). Inducers of interferon and host resistance. 3. Double-stranded RNA from reovirus type 3 virions (reo 3-RNA). *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**(4), 1719-22.
- Uchida, J., Yasui, T., Takaoka-Shichijo, Y., Muraoka, M., Kulwichit, W., Raab-Traub, N., and Kikutani, H. (1999). Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science* **286**(5438), 300-3.
- Uematsu, S., and Akira, S. (2007). Toll-like receptors and Type I interferons. *J Biol Chem* **282**(21), 15319-23.
- Underhill, D. M., Ozinsky, A., Hajjar, A. M., Stevens, A., Wilson, C. B., Bassetti, M., and Aderem, A. (1999). The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* **401**(6755), 811-5.
- Vyas, J. M., Van der Veen, A. G., and Ploegh, H. L. (2008). The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol* **8**(8), 607-18.
- Wade, M., and Wahl, G. M. (2006). c-Myc, genome instability, and tumorigenesis: the devil is in the details. *Curr Top Microbiol Immunol* **302**, 169-203.
- Wagner, M., Poeck, H., Jahrsdoerfer, B., Rothenfusser, S., Prell, D., Bohle, B., Tuma, E., Giese, T., Ellwart, J. W., Endres, S., and Hartmann, G. (2004). IL-12p70-dependent Th1 induction by human B cells requires combined activation with CD40 ligand and CpG DNA. *J Immunol* **172**(2), 954-63.
- Wang, F., Gregory, C., Sample, C., Rowe, M., Liebowitz, D., Murray, R., Rickinson, A., and Kieff, E. (1990). Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J Virol* **64**(5), 2309-18.
- Wen, W., Iwakiri, D., Yamamoto, K., Maruo, S., Kanda, T., and Takada, K. (2007). Epstein-Barr virus BZLF1 gene, a switch from latency to lytic infection, is expressed as an immediate-early gene after primary infection of B lymphocytes. *J Virol* **81**(2), 1037-42.
- Wiesner, M., Zentz, C., Mayr, C., Wimmer, R., Hammerschmidt, W., Zeidler, R., and Moosmann, A. (2008). Conditional immortalization of human B cells by CD40 ligation. *PLoS ONE* **3**(1), e1464.
- Wu, Y., Maruo, S., Yajima, M., Kanda, T., and Takada, K. (2007). Epstein-Barr virus (EBV)-encoded RNA 2 (EBER2) but not EBER1 plays a critical role in EBV-induced B-cell growth transformation. *J Virol* **81**(20), 11236-45.
- Yao, Q. Y., Ogan, P., Rowe, M., Wood, M., and Rickinson, A. B. (1989). Epstein-Barr virus-infected B cells persist in the circulation of acyclovir-treated virus carriers. *Int J Cancer* **43**(1), 67-71.
- Yeung, M. C., and Lau, A. S. (1998). Tumor suppressor p53 as a component of the tumor necrosis factor-induced, protein kinase PKR-mediated apoptotic pathway in human promonocytic U937 cells. *J Biol Chem* **273**(39), 25198-202.
- Yewdell, J. W. (2006). Confronting complexity: real-world immunodominance in antiviral CD8+ T cell responses. *Immunity* **25**(4), 533-43.
- Yokoi, T., Miyawaki, T., Yachie, A., Kato, K., Kasahara, Y., and Taniguchi, N. (1990). Epstein-Barr virus-immortalized B cells produce IL-6 as an autocrine growth factor. *Immunology* **70**(1), 100-5.
- Young, L., Alfieri, C., Hennessy, K., Evans, H., O'Hara, C., Anderson, K. C., Ritz, J., Shapiro, R. S., Rickinson, A., Kieff, E., and et al. (1989). Expression of Epstein-Barr virus

Literaturverzeichnis

- transformation-associated genes in tissues of patients with EBV lymphoproliferative disease. *N Engl J Med* **321**(16), 1080-5.
- Young, L. S., and Rickinson, A. B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* **4**(10), 757-68.
- Zeidler, R., Eissner, G., Meissner, P., Uebel, S., Tampe, R., Lazis, S., and Hammerschmidt, W. (1997). Downregulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin-10. *Blood* **90**(6), 2390-7.
- Zeller, K. I., Zhao, X., Lee, C. W., Chiu, K. P., Yao, F., Yustein, J. T., Ooi, H. S., Orlov, Y. L., Shahab, A., Yong, H. C., Fu, Y., Weng, Z., Kuznetsov, V. A., Sung, W. K., Ruan, Y., Dang, C. V., and Wei, C. L. (2006). Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(47), 17834-9.
- Zuo, J., Currin, A., Griffin, B. D., Shannon-Lowe, C., Thomas, W. A., Rensing, M. E., Wiertz, E. J., and Rowe, M. (2009). The Epstein-Barr virus G-protein-coupled receptor contributes to immune evasion by targeting MHC class I molecules for degradation. *PLoS Pathog* **5**(1), e1000255.
- Zutter, M. M., Martin, P. J., Sale, G. E., Shulman, H. M., Fisher, L., Thomas, E. D., and Durnam, D. M. (1988). Epstein-Barr virus lymphoproliferation after bone marrow transplantation. *Blood* **72**(2), 520-9.

Herzlichen Dank...

... an alle, die diese Arbeit mit Rat und Tat unterstützt haben.

... an Dr. Andreas Moosmann für die sehr interessante Themenstellung dieser Doktorarbeit, für seine hervorragende Betreuung, unerschöpfliche Hilfsbereitschaft und seine unendliche Geduld.

... an Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt für sein Interesse an meiner Arbeit, anregende Diskussionen und fachliche Ratschläge.

... an Herrn Prof. Dr. Horst Domdey für die freundliche Bereitschaft, diese Arbeit als Gutachter zu betreuen.

... an alle Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Genvektoren für die kollegiale Atmosphäre.

... an all die freiwilligen Blutspender.

9. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Stefanie Iskra
Geburtsdatum: 21.08.1977
Geburtsort: Bobingen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

1984-1988 Besuch der Volksschule Untermeitingen
1988-1997 Besuch des Leonhard-Wagner Gymnasiums in Schwabmünchen
1997-2000 Ausbildung zur pharmazeutisch technischen Assistentin an der privaten Berufsfachschule in Augsburg
2000-2005 Studium der Biologie an der Universität Konstanz
Diplomarbeit in der AG Molekulare Toxikologie bei Prof. Dr. A. Bürkle mit dem Thema: „Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von Tankyrase-1“
01/2006-06/2006 Mitarbeiterin am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg
09/2006-01/2010 Promotion an der Fakultät für Chemie und Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität München, in der AG von Prof. Dr. W. Hammerschmidt am Helmholtz Zentrum München mit dem Thema: „Angeborene und adaptive Immunreaktionen in der Frühphase der Epstein-Barr-Virus-Infektion“

Augsburg, 13.01.2010

Stefanie Iskra