

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Induktion Epstein-Barr Virus-spezifischer Immunantworten durch Exosomen und Virus-like Particles



von

Romana Ruiss

München, November 2009

Erstgutachter: PD Dr. Bettina Kempkes

Zweitgutachter: Prof. Elisabeth Weiß

Drittgutachter: Prof. Angelika Böttger

Viertgutachter: Prof. Martin Parniske

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Juli 2010

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Induktion EBV-spezifischer Immunantworten durch Exosomen und Virus-like Particles“

von mir ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt wurde und ich mich dabei nur der ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe. Diese Arbeit wurde weder in der jetzigen noch in einer abgewandelten Form einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

München, November 2009

Romana Ruiss

Teile dieser Arbeit wurden auf Kongressen präsentiert:

Deutscher Krebskongress (Februar 2008, Berlin)

Vortrag

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (März 2008, Heidelberg)

Poster

International Herpesviral Workshop (Juli 2008, Estoril, Portugal)

Poster und Vortrag

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	8
1.1 EXOSOMEN	9
1.1.1 Biogenese von Exosomen	9
1.1.2 Sortierung von Proteinen in MVBs	12
1.1.3 Molekulare Zusammensetzung von Exosomen	12
1.4 Die Funktion von Exosomen und ihre immuntherapeutische Anwendung	13
1.2 VIRUS-LIKE-PARTICLES	16
1.3 DAS EPSTEIN-BARR VIRUS	17
1.3.1 Pathologie EBV-assoziiierter Erkrankungen	19
1.3.2 EBV-spezifische Immunantworten	23
1.3.3 Bisherige Ansätze zur Entwicklung eines EBV-Vakzins	25
1.3.4 Das MHV-68-Modell	27
1.4 DIE CHRONISCH-LYMPHATISCHE B-ZELL-LEUKÄMIE	28
1.4 AUFGABENSTELLUNG	32
2. MATERIAL	33
2.1 ANTIKÖRPER	34
2.2 OLIGONUKLEOTIDE	35
2.3 PLASMIDE	35
2.4 ZELLINIEN UND ANDERE ZELLEN	36
2.5 CHEMIKALIEN, ENZYME, GERÄTE UND SONSTIGES	37
3. METHODEN	41
3.1. BAKTERIENKULTUR	42
3.1.1 Amplifikation und Lagerung von Bakterien	42
3.1.2 Transformation von Bakterien	42
3.2. ZELLKULTUR UND ANALYSE VON ZELLEN	42
3.2.1 Zellkulturbedingungen	42
3.2.2 Aufbewahrung von Zellen	43
3.2.3 Präparation primärer PBMCs	43
3.2.4 Bestimmung der Zellzahl	43
3.2.5 Stimulation von T-Zellklonen	44
3.2.6 PEI-Transfektion und Herstellung von Exosomen	44
3.2.7 Das Maxi-EBV-System und die Herstellung von Virus-like-Particles	45
3.2.8 Iodixanol-Gradient	48
3.2.9 FACS-Analysen	48

3.2.10 Calcein-Freisetzungs-Assay zur Messung der Zytotoxizität von T-Zellen	49
3.2.11 Stimulationsversuche mit PBMCs	49
3.2.12 Isolierung von B-Zellen aus PBMCs mit Hilfe der MACS-Technologie	49
3.2.13 Tierexperimentelle Methoden.....	50
3.3. DNA-ARBEITSTECHNIKEN	51
3.3.1 Präparative Plasmidreinigung	52
3.3.2 Bestimmung der DNA-Konzentration	52
3.3.3 PCR-Analysen.....	52
3.4 PROTEIN- UND IMMUNOLOGISCHE ARBEITSTECHNIKEN	54
3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	54
3.4.2 Dot Blot	54
3.4.3 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot.....	54
3.4.4 ELISAs und Elispots.....	55
3.5 MIKROSKOPIE	56
3.5.1 Elektronenmikroskopische Aufnahmen.....	56
3.5.2 Immunfluoreszenzaufnahmen im Konfokalmikroskop.....	57

4. ERGEBNISSE **58**

4.1 HERSTELLUNG UND ANALYSE VON EXOSOMEN UND VIRUS-LIKE-PARTICLES IN 293-BASIERTEN ZELLINIEN	59
4.1.1 Die Inkubation von Raji-Zellen mit Kulturüberstand dieser Zelllinie resultiert in einem GFP-Fluoreszenzshift der Raji-Zellen im Durchflusszytometer	59
4.1.2 Die Fluoreszenz der B-Zellen beruht auf einem GFP-Transfer, welcher durch Induktion des lytischen EBV-Zyklus verstärkt werden kann	60
4.1.3 Vergleich zweier Methoden zur Konzentrierung von Partikeln aus dem Zellkulturüberstand	63
4.1.4 Morphologische Charakterisierung der Exosomen durch Elektronenmikroskopie.....	66
4.1.5 EBV-Proteine vermitteln die selektive Bindung von VLPs an B-Zellen	68
4.1.6 Herstellung einer Zelllinie, bei der die Induktion des lytischen EBV-Zyklus durch Zugabe von Doxyzyklin erfolgt.....	71
4.2 UNTERSUCHUNG DES IMMUNOGENEN POTENTIALS VON 293-EXOSOMEN UND VLPs IN HINSICHT AUF EINE PRINZIPIELLE EIGNUNG ALS EBV-IMPfstOFF	74
4.2.1 In Vitro-Versuche	74
4.2.1.1 Stimulation von EBV-spezifischen CD4 ⁺ -T-Zellklonen.....	74
4.2.1.2 Reaktivierung von T-Zellen aus PBMCs	81
4.2.2 In vivo-Versuche	87
4.2.2.1 Immunisierung von immunkompetenten Wildtyp-Mäusen	87
4.2.2.2 Untersuchung einer durch Virus-like-Particles induzierten Immunantwort im hu-PBMC- Rag2 ^{-/-} γc ^{-/-} -Mausmodell	90

4.2.2.3 Untersuchung einer durch Exosomen induzierten Immunantwort im MHV-68-Mausmodell	96
4.3 EXOSOMEN UND VIRUS-LIKE-PARTICLES ALS BASIS EINES NEUARTIGEN IMMUNTHERAPEUTISCHEN ANSATZES ZUR BEHANDLUNG DER CHRONISCH LYMPHATISCHEN LEUKÄMIE	109
4.3.1 Vorversuche mit B-Blasten und PBMCs gesunder Blutspender	110
4.3.1.1 Der CD40-Ligand wird in Exosomen transportiert und effizient auf B-Zellen übertragen	110
4.3.1.2 Die Übertragung des CD40L mittels Exosomen und VLPs auf B-Zellen verbessert deren Potential, T-Zellen aus PBMCs zu reaktivieren	111
4.3.2 Versuche mit PBMCs von CLL-Patienten	113
4.3.2.1 Die exosomale Übertragung des CD40-Liganden auf CLL-Zellen führt zu einer verstärkten Expression von Aktivierungsmarkern	113
4.3.2.2 Die exosomale Übertragung des CD40-Liganden führt zu einer verbesserten antigenpräsentierenden Funktion der CLL-Zellen	116
<u>5. DISKUSSION</u>	123
5.1 HERSTELLUNG UND ANALYSE VON EXOSOMEN UND VIRUS-LIKE-PARTICLES IN 293-BASIERTEN ZELLINIEN	125
5.2 DAS IMMUNOGENE POTENTIAL VON EBV-HALTIGEN, 293-BASIERTEN EXOSOMEN UND VIRUS-LIKE-PARTICLES	126
5.3 DIE EIGNUNG VON HEK-BASIERTEN EXOSOMEN UND VIRUS-LIKE-PARTICLES ALS IMPFSTOFF GEGEN EBV	131
5.4 EXOSOMEN UND VIRUS-LIKE-PARTICLES FÜR DIE IMMUNTHERAPIE DER B-CLL	136
5.5 AUSBLICK	138
<u>6. ZUSAMMENFASSUNG</u>	140
<u>7. ABKÜRZUNGEN</u>	143
<u>8. LITERATUR</u>	147
LEBENS LAUF	167
DANKSAGUNG	168

1. Einleitung

1.1 Exosomen

1.1.1 Biogenese von Exosomen

Der Begriff Exosomen tauchte in der Literatur zum ersten Mal im Jahr 1987 auf. Damit wurden sekretorische Vesikel beschrieben, die durch Ultrazentrifugation bei 100.000 g pelletiert werden konnten (Johnstone et al., 1987). Ihre Entdeckung als transferrinhaltige Vesikel, die während der Reifung von Retikulozyten zu Erythrozyten entstehen, fand allerdings schon einige Jahre früher statt (Pan und Johnstone, 1983; Harding et al., 1984). Der Transferrinrezeptor, welcher sich auf der Plasmamembran von Retikulozyten befindet, wird normalerweise durch clathrinvermittelte Endozytose ständig recycelt. Einhergehend mit der Reifung der Retikulozyten verschwindet der Rezeptor von der Plasmamembran. Sein Abbau erfolgt dabei nicht über Lysosomen, sondern durch Ausschleusung in 30-100 nm großen Exosomen (Johnstone et al., 1987). Damit wurde ein neuer Mechanismus gefunden, mit dem sich Zellen überschüssiger und nicht mehr benötigter Proteine entledigen.

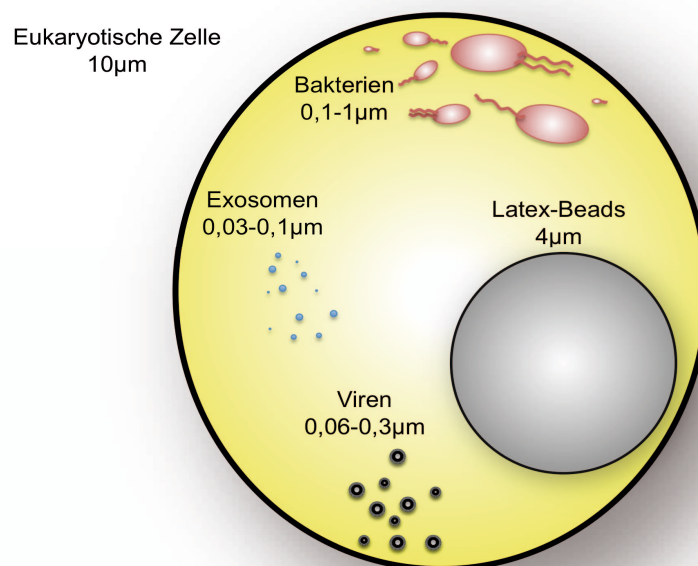


Abb. 1.1: Größenvergleich zwischen einer Zelle, Bakterien, Viren und Exosomen im Vergleich zu Latex-Beads, die zur Immobilisierung von Exosomen benutzt werden

Exosomen weisen eine durchschnittliche Größe von 70 nm auf und sind damit etwa 150-mal kleiner als eine typische Lymphozytenzelle (7-20 μm) und 10-mal kleiner als Bakterien (700 nm, siehe Abb. 1.1). Innerhalb der Zelle werden Exosomen im endosomalen System generiert, welches sich aus primären endozytotischen Vesikeln, frühen und späten Endosomen sowie Lysosomen zusammensetzt (Mellman, 1996). Erstere entstehen durch clathrinvermittelte Endozytose an der Plasmamembran (Abb. 1.2). Von dort gelangen sie zu frühen Endosomen, mit denen sie verschmelzen. Durch einen Reifungsprozess entstehen aus den frühen späte Endosomen. Hierbei verändert sich der Inhalt und auch die Fusionsbereitschaft mit Vesikeln, die von der Plasmamembran bzw. vom Trans-Golgi-Netzwerk abstammen (Stoorvogel et al., 1991). Während frühe Endosomen nur wenige Vesikel im endosomalen Lumen enthalten, kommt es in späten Endosomen zur Abschnürung von Teilen der limitierenden endosomalen Membran, welche als intraluminale Vesikel bezeichnet und im Inneren der Endosomen gespeichert werden. Im Gegensatz zu frühen, an der Zellperipherie lokalisierten Endosomen, sind späte Exosomen v.a. in der Nähe des Zellkerns zu finden (Mellman, 1996). Sie können mehrere Hundert interne Vesikel enthalten und werden infolgedessen auch als *Multivesicular Bodies* (MVB) bezeichnet (Fevrier und Raposo, 2004).

Es gibt eine Reihe verschiedener physiologischer Prozesse, an denen MVBs beteiligt sind. So werden sie häufig als Speicherort für Membranproteine genutzt, aus denen die Proteine bei Bedarf wieder zurück in die Plasmamembran rekrutiert werden. Unreife dendritische Zellen speichern dort beispielsweise MHC II-Proteine. Werden die Zellen aktiviert, verschmelzen die Vesikel mit der Endosomenmembran und die Proteine werden mit Peptiden beladen (Kleijmeer et al., 2001). Anschließend werden die beladenen MHC-Moleküle zur Plasmamembran transportiert, wo sie präsentiert werden und eine Immunreaktion auslösen können.

Des Weiteren können MVBs mit Lysosomen fusionieren, was zum Abbau der Vesikel und ihrer assoziierten Proteine führt (Futter et al., 1996; Mullock et al., 1998). Dieser Vorgang spielt eine wichtige Rolle bei der Herunterregulierung von aktivierten Oberflächenrezeptoren, beispielsweise dem EGF-Rezeptor. Nach ligandinduzierter Endozytose wird er in die internen Vesikel von MVBs sortiert, so dass seine zytoplasmatische Tyrosinkinase nicht mehr mit dem Zytoplasma in Verbindung steht und die Signalübertragung unterbrochen wird.

Ein dritte Möglichkeit ist die Fusion der MVBs mit der Plasmamembran. Dies führt zur Freisetzung der intraluminalen Vesikel in den extrazellulären Raum, wo sie nach ihrer Sekretion als Exosomen bezeichnet werden. Ihr Inneres ist gefüllt mit Zytosol und zytoplasmatischen Proteinen und auf ihrer Oberfläche enthalten sie Transmembranmoleküle, die dieselbe Topologie aufweisen wie in der Plasmamembran (They et al., 2002; Raposo et al., 1996; They et al., 2009). Damit unterscheiden sie sich in ihrer Orientierung wesentlich von anderen zellulären Vesikeln, wie z. B. Transportvesikeln.

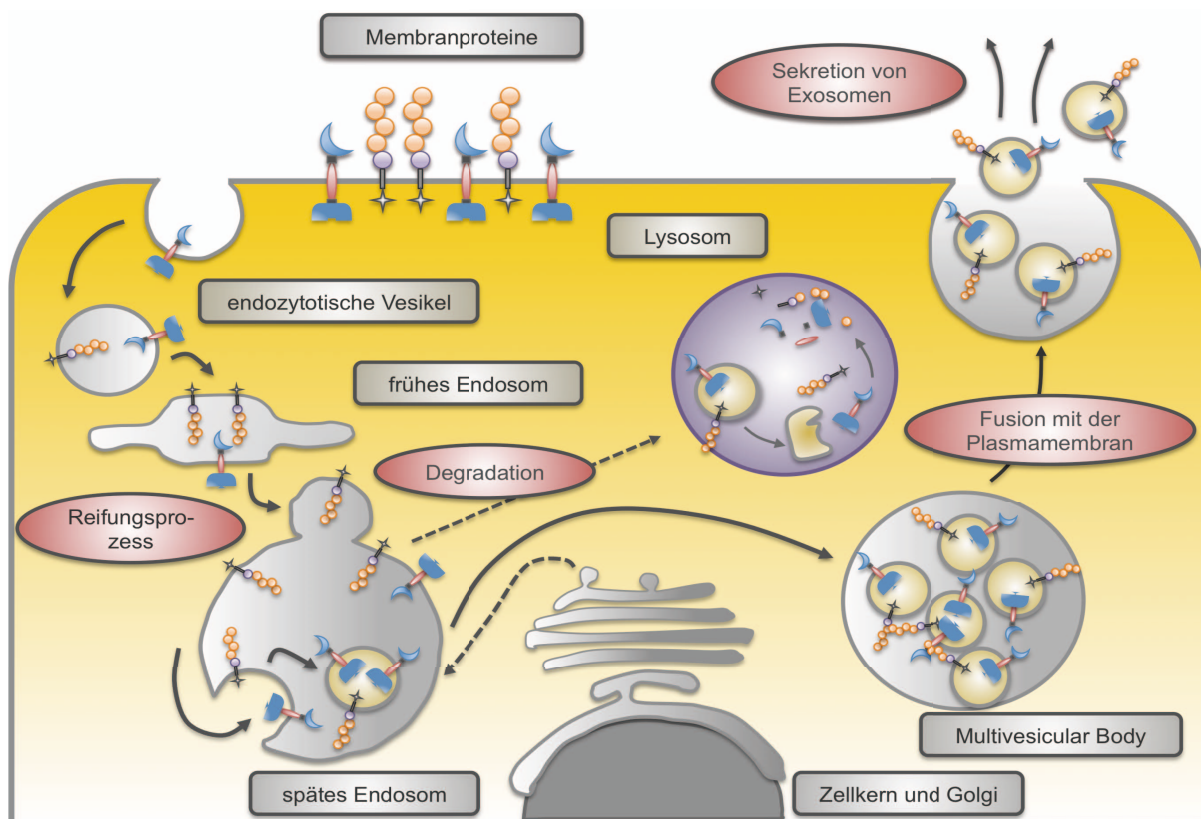


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Biogenese von Exosomen

Durch clathrinvermittelte Endozytose werden Membranproteine in endozytotischen Vesikeln internalisiert. Diese entwickeln sich zu frühen Endosomen, aus denen, nach einem Reifungsprozess, in dem außerdem neusynthetisierte Proteine vom Golgi-Apparat bzw. dem Trans-Golgi-Netzwerk aufgenommen werden, späte Endosomen hervorgehen. Durch Einstülpung der limitierenden Membran werden zahlreiche intraluminalen Vesikel generiert. Die nun als *Multivesicular Bodies* bezeichneten Vesikel können, wie auch schon die späten Endosomen, wenn die assoziierten Proteine für den Abbau bestimmt sind, mit Lysosomen verschmelzen. Fusionieren sie stattdessen mit der Plasmamembran, kommt es zur Freisetzung der internen Vesikel als Exosomen in den extrazellulären Raum.

1.1.2 Sortierung von Proteinen in MVBs

Noch ist nicht gänzlich geklärt, welche Signale die Translokation von Proteinen in MVBs veranlassen. Offenbar beeinflussen aber mehrere Modifikationen diesen Prozess. Wichtig hierbei ist vor allem die Sortierung der Proteine in die Bereiche der Endosomenmembran, die später nach innen eingestülpt werden. Verantwortlich für diesen Schritt ist eine Maschinerie aus drei Proteinkomplexen, die ESCRT I, II und III (*endosomal sorting complex required for transport*) genannt werden (Babst et al., 2002a; Babst et al., 2002b; Katzmann et al., 2001). Ein wichtiges Signal hierbei ist die Ubiquitinierung. Sie reguliert den Transport zwischen Membrankompartimenten, indem es als Sortierungssignal der zu befördern Proteine dient und die Aktivität der Transportmaschinerie kontrolliert (Hicke und Dunn, 2003). Ubiquitin bindende Proteine erkennen monoubiquitinierte Membranproteine und ordnen sie innerhalb bestimmter Sortierungsstationen der endosomalen Membran an. Gleichzeitig rekrutieren sie den ESCRT I-Komplex aus dem Zytoplasma. Dieser übernimmt die Proteine, welche für den Transport in die internen Vesikel bestimmt sind. Durch den gebildeten Komplex wird ESCRT II aktiviert, der wiederum die Bildung von ESCRT III induziert. Anschließend wird Doa4, ein deubiquitinierendes Protein durch ALIX zu diesem Komplex rekrutiert, welches die Ubiquitin-domäne vor der Sortierung in die MVBs entfernt (Amerik et al., 2000). In einem weiteren Schritt wird ESCRT III durch die ATPase Vps4 abgebaut und so die Vesikelformation eingeleitet (Babst et al., 1997). Welche Komponenten im Abschnürungsprozess der Vesikel eine Rolle spielen, ist allerdings noch unklar (Babst, 2005).

1.1.3 Molekulare Zusammensetzung von Exosomen

Exosomen werden von vielen verschiedenen Zellen gebildet. Da die Proteinzusammensetzung stark von der Art der sezernierenden Zelle abhängt, ist auch diese nie gleich. Ihre molekulare Zusammensetzung reflektiert ihre Herkunft als intraluminale Vesikel aus Endosomen. So sind die meisten Proteine, die innerhalb der letzten Jahre durch zahlreiche proteomische Analysen identifiziert werden konnten, zytosolischen Ursprungs oder stammen aus endozytischen Kompartimenten oder der Plasmamembran. Bei der Untersuchung der Exosomen, die aus verschiedenen Körperflüssigkeiten wie Urin (Pisitkun et al., 2004), malignem Aszites (Andre et al., 2002b; Koga et al., 2005), Fruchtwasser (Keller et al., 2007), Blutplasma (Caby et al.,

2005), Milch (Admyre et al., 2007) und bronchoalveolärer Flüssigkeit (Prado et al., 2008) aufgereinigt worden waren, stellte sich allerdings heraus, dass einige Moleküle auf praktisch allen Exosomenarten zu finden waren. Sie werden deshalb als Markerproteine für Exosomen bezeichnet. Dazu gehören Aktin und Tubulin, Annexine, Rab-Proteine (Thery et al., 2002), Proteine, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, wie Protein-Kinasen und heterotrimere G-Proteine und metabolische Enzyme wie Peroxydase, Pyruvat- oder Lipid-Kinasen. Häufig vorkommend sind auch Moleküle, die in der Antigenpräsentation involviert sind, beispielsweise MHC I-Proteine (in Exosomen von APCs außerdem MHC II- und die kostimulatorischen Moleküle CD80 und 86), die an deren Beladung beteiligten Hitzeschockproteine Hsp70 und Hsp90 (Thery et al., 2001), und Proteine der Tetraspaninfamilie (CD9, CD63, CD81 und CD82) (Bard et al., 2004; Escola et al., 1998).

Vor einigen Jahre gelang es einer schwedischen Arbeitsgruppe außerdem, zum ersten Mal RNAs, sowohl mRNAs als auch miRNAs, in Exosomen nachzuweisen. Diese, gewonnen aus Exosomen von Mastzelllinien, waren funktionell aktiv und kodierten für über 1300 Gene. Diese Gruppe konnte zeigen, dass die RNAs durch Verschmelzung der Exosomen mit der Membran von Empfängerzellen in diese übertragen und dort auch translatiert wurden. Auf diesen Umstand lässt sich auch ihr Name, esRNAs (für exosomale Shuttle-RNAs) zurückführen (Valadi et al., 2007).

1.4 Die Funktion von Exosomen und ihre immuntherapeutische Anwendung

Die physiologische Rolle von Exosomen *in vivo* ist immer noch nicht vollständig geklärt. Neben ihrer Funktion als Ausschleusevehikel für nicht mehr benötigte Proteine lässt die Tatsache, dass sie sich nicht nur in Körperflüssigkeiten wie Serum, Urin oder Fruchtwasser, sondern auch in mit Krebs assoziierten Flüssigkeitsansammlungen wie malignem Aszites finden lassen, darauf schließen, dass sie sowohl in normalen, als auch in pathologischen Situationen eine Rolle spielen.

Exosomen tragen funktionelle MHC Klasse I und II- sowie Adhäsions- und kostimulatorische Moleküle. Deshalb war es nicht überraschend, dass in den letzten Jahren mehrere Studien zeigten, dass sie auch in immunmodulatorischer Hinsicht von Bedeutung sind. Bereits im Jahr 1996 konnte von Raposo et al. nachgewiesen

werden, dass Exosomen aus B-Zellen eine antigenspezifische Immunantwort in T-Zellen auslösen können (Raposo et al., 1996). Die Stimulation erfolgt allein durch Exosomen, ohne dass diese von professionellen APCs aufgenommen und präsentiert werden müssen. Auch andere APCs sezernieren Exosomen, die unmittelbar T-Zellen reaktivieren können. So wurden von dendritischen Zellen (DCs) gebildete Exosomen (DEX) bereits verschiedentlich zur Induktion oder Reaktivierung spezifischer Immunantworten in klinischen Studien getestet: Mit MAGE-Peptiden beladene DEX führten sowohl bei Melanompatienten (Escudier et al., 2005) als auch bei Patienten mit fortgeschrittenem nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (Morse et al., 2005) zu spezifischen Immunantworten.

Es wurde schnell klar, dass auch Exosomen aus Tumorzellen (TEX) zu einer Interaktion mit dem Immunsystem führen. Die Identifikation einer Vielzahl von Tumorantigenen auf Exosomen, wie Melan A/Mart-1, CEA oder Her2/neu unterstützt die Funktion der Vesikel als eine zellfreie Quelle von Tumorantigenen zur Aktivierung von T-Zellen (Andreola et al., 2002; Huber et al., 2005). Pionierarbeit leistete hierbei die Arbeitsgruppe um L. Zitvogel, die zeigen konnte, dass Exosomen aus Tumorzellen nach Aufnahme durch DCs spezifische T-Zellantworten induzieren können, die in einem Mausmodell zuverlässig zu einer Tumorabstoßung führten (Wolfers et al., 2001). Die dadurch induzierte Immunantwort war dabei vergleichbar mit derjenigen, die durch reife DCs selbst hervorgerufen wurde. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dendritische Zellen peptidbeladene MHC-Komplexe durch die Abgabe von Exosomen und deren Fusion mit anderen DCs auf diese übertragen, was die Zahl an Zellen, die diese Antigene dem Immunsystem präsentieren, noch potenzieren kann (Segura et al., 2005). Aufgrund dieser Ergebnisse wird derzeit untersucht, ob Exosomen aus Tumorzellen als Adjuvans in der Immuntherapie von Krebserkrankungen eingesetzt werden können (Mignot et al., 2006).

Neben Tumorantigenen besitzen TEX aber noch weitere Proteine, die das Immunsystem modulieren und dabei häufig auch das Tumorstadium fördern können (Whiteside, 2005; Taylor und Gercel-Taylor, 2005). So führte die Vorbehandlung von Mäusen mit Exosomen eines murinen Mammakarzinoms Anschließend zu einem verstärkten Tumorstadium. Die Tumorexosomen unterdrückten die zytolytische Aktivität von NK-Zellen, indem sie über einen posttranslationalen Regulationsmechanismus die Perforinkonzentration in diesen Zellen reduzierten (Liu et al., 2006). Exosomen beeinflussen jedoch nicht nur die

Effektorfunktion von NK-Zellen. TEX enthalten auch TRAIL und Fas-Ligand und induzieren dadurch Apoptose in aktivierten T-Zellen (Andreola et al., 2002; Huber et al., 2005). Des Weiteren stören TEX die Differenzierung von dendritischen Zellen, so dass anomale Zellen entstehen, die myeloide Marker wie CD14 und CD11b, aber keine oder nur wenige kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 exprimieren. Solche Zellen wurden bereits in verschiedenen Mausmormodellen gefunden, wo ihre Zahl mit einer verstärkten Progression korrelierte (Serafini et al., 2006). Auch in Melanompatienten wird diese Zellpopulation mit einer schlechteren Immunantwort der betroffenen Patienten auf den Tumor assoziiert (Filipazzi et al., 2007). Diese Studien zeigen, dass die therapeutische Anwendung von Tumorexosomen bei Krebserkrankungen gründlich gegen eventuell auftretende und gegensätzliche Wirkungen abgewogen werden muss.

Exosomen scheinen aber nicht nur bei Krebserkrankungen eine Rolle zu spielen, sondern auch bei Allergien (Admyre et al., 2008) und Infektionen, z. B. mykobakterieller Art (Beatty et al., 2000). Ebenso sind sie in der Verbreitung von Krankheitserregern involviert. Von Prionprotein exprimierenden Kaninchen-Epithelzellen sezernierte Exosomen enthalten sowohl die natürlich vorkommende Form des Prionproteins PrP^C als auch infektiöse PrP^{Sc}-Prionen. Beide Formen können auf diese Weise auf andere Zellen übertragen und diese damit „infiziert“ werden (Fevrier et al., 2004). Mit großer Wahrscheinlichkeit tragen Exosomen damit zur Verbreitung der Prionen auch bei der Kreuzfeld-Jakob Krankheit beim Mensch, der bovinen spongiformen Enzephalopathie beim Rind und der Scrapie bei Schafen bei.

Auch Retroviren, wie das HI-Virus, nutzen die intrazellulären Komponenten für die Bildung von Exosomen (Jouve et al., 2007). Nach Interaktion des gag-Proteins mit dem zellulären Tsg101, einem Bestandteil des ESCRT I-Komplexes, akkumulieren die viralen Partikel in MVBs (Nguyen et al., 2003; Garrus et al., 2001). Deshalb ist es nicht überraschend, dass man in ihnen nach ihrer Freisetzung eine Reihe verschiedener exosomaler Markerproteine finden kann (Pelchen-Matthews et al., 2004).

1.2 Virus-like-Particles

Virus-like-Particles (VLPs) sind Partikel, die sich aus viralen Strukturproteinen (je nach Art des Virus mit oder ohne Hülle) zusammensetzen. Von infizierten Zellen freigesetzt, ähneln sie in morphologischer Hinsicht Viruspartikeln, selbst wenn sie nur selten alle viralen Strukturproteine aufweisen. Die Tatsache, dass VLPs die Struktur authentischer Viruspartikel aufweisen und alle Proteine in ihrer nativen Form vorkommen, macht sie zu potenten Induktoren von Antikörpern. Gleichzeitig stimulieren sie wirksam die Proliferation von $CD4^+$ -, wie auch $CD8^+$ -T-Zellen (Murata et al., 2003; Paliard et al., 2000; Schirmbeck et al., 1996).

Im Gegensatz zu vollständigen Viren enthalten sie keine virale DNA und sind daher nicht infektiös. Vermutlich eigentlich dafür gedacht, das Immunsystem des infizierten Wirts von infektiösen Virionen anzulenken, macht man sich heute die hohe Immunogenität von Virus-like-Particles zunutze, um sie als DNA-freie *Subunit*-Vakzine einzusetzen (Ludwig et al., 2007). Besonderes Interesse der Öffentlichkeit erregte im September 2006 die EU-weite Marktzulassung des ersten, ebenfalls auf VLPs basierenden, Impfstoffes gegen das humane Papillomvirus (HPV). Das von Sanofi Pasteur entwickelte *Subunit*-Vakzin mit dem Namen *Gardasil* schützt effizient vor der Entstehung bestimmter Vorstufen von Gebärmutterhalskrebs, verursacht durch die HPV-Typen 6, 11, 16 und 18 (Garland et al., 2007). Das Vakzin basiert auf dem viralen Hauptstrukturprotein L1, welches sich spontan zu leeren Virus-like-Particles zusammenfügt. Diese bestehen aus 72 L1-Pentameren und ähneln in Form und Größe nativen Virionen (Schädlich et al., 2009). Ein weiteres bekanntes Beispiel eines VLP-Impfstoffes ist das Vakzin gegen das Hepatitis B-Virus (HBV; Blumberg et al., 1985). Obwohl HBV-VLPs ebenfalls nur aus einer einzigen Art von Oberflächenproteinen (HBsAgs) bestehen und damit recht einfach aufgebaut sind, haben sie sich bei der Induktion einer Immunantwort als wirksame Antigenträger erwiesen. Die Herstellung rekombinanter Virus-like-Particles eröffnet außerdem die Möglichkeit, bivalente Vakzine zu entwickeln. So wird derzeit untersucht, ob sich mit dem Einbringen von Epitopen aus dem humanen Hepatitis C- (HCV) oder dem humanen Hepatitis E-Virus (HEV) in das HBsAg Immunantworten gegen diese Viren auslösen lassen (Li et al., 2004; Vietheer et al., 2007).

1.3 Das Epstein-Barr Virus

Das Epstein-Barr Virus (EBV, Abb. 1.3 und 1.4) wurde 1964 von Anthony Epstein und Yvonne Barr in Zelllinien eines Burkitt-Lymphoms zum ersten Mal elektronenmikroskopisch nachgewiesen (Epstein et al., 1964). EBV ist ein Mitglied der Familie der Herpesviren, welche man bei vielen Wirbeltierarten findet. Allen Herpesviren gemeinsam ist die Fähigkeit, nach der Primärinfektion eine latente Infektion im Körper zu etablieren. Im Gegensatz zur lytischen Vermehrung, in deren Verlauf die infizierten Zellen absterben, überleben latent infizierte Wirtszellen, da in diesem Stadium keine Nachkommenviren produziert werden und die latenten Zellen für das Immunsystem nicht oder nur schwer erkennbar sind. Wie für fast alle anderen Herpesviren gibt es auch gegen das Epstein-Barr Virus noch keinen geeigneten Impfstoff.

Das Virus besitzt ein lineares, doppelsträngiges, je nach Stamm 172-186 kb großes Genom, das für ca. 100 Proteine codiert (Baer et al., 1984). Innerhalb der Virionen liegt die DNA um einen Proteinkern gewickelt vor und ist von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben, welches aus drei Kapsomermolekülen gebildet wird und einen Durchmesser von etwa 100 nm besitzt. Zwischen dem Kapsid und der Hüllmembran, in die virale Glykoproteine eingelagert sind, befindet sich das Tegument, dessen Funktion nach wie vor unklar ist.

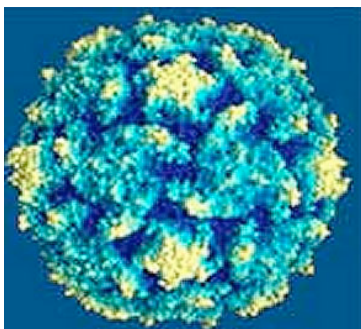


Abb. 1.3 Elektronenmikroskopische Aufnahme des Epstein-Barr-Virus

(http://spaceresearch.nasa.gov/research_projects/ros/eb.html)

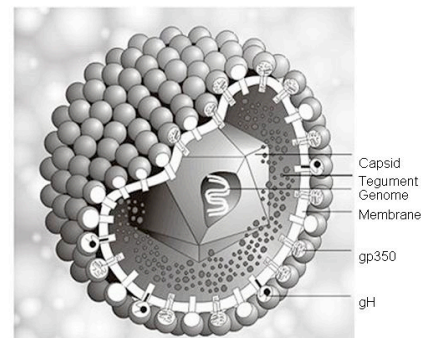


Abb. 1.4 Aufbau eines EBV-Partikels

Das doppelsträngige DNA-Genom wird von einem ikosaedrischen Nukleokapsid aus 162 Kapsomeren, einem Proteintegument und einer Hülle umgeben.

Das Virus wird durch Speichel mittels Tröpfcheninfektion übertragen und infiziert im Oropharynxbereich Epithel- oder B-Zellen. In seltenen Fällen können auch T-Zellen

infiziert werden. Die Adsorption der viralen Partikel an B-Lymphozyten erfolgt über das membranständige virale Glykoprotein gp350/220, das an den zellulären Oberflächen-Rezeptor CD21 bindet (Nemerow und Cooper, 1984). An der Aufnahme von EBV sind weitere Korezeptoren beteiligt. Eine wichtige Rolle spielt hier die Interaktion von MHC-Klasse II-Molekülen mit einem Komplex der viralen Proteine gp42 (BZLF2), gH und gL (BKRF2) (Li et al., 1995; Molesworth et al., 2000).

EBV besitzt einen zweiphasigen Infektionszyklus, der aus einer latenten und einer replikativen lytischen Phase besteht. Bisher ist über die Ereignisse, die in den ersten Stunden und Tagen der EBV-Infektion geschehen, noch relativ wenig bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass in dieser ersten Phase einige lytische Gene exprimiert werden, obwohl es nicht zur Synthese von Nachkommenviren kommt (Altmann und Hammerschmidt, 2005; Sugden, 1984; Wen et al., 2007; Zeidler et al., 1997). Durch unsere Arbeitsgruppe wurde kürzlich herausgefunden, dass es sich um einen abortiven lytischen Zyklus handelt, in dessen Verlauf es zur Expression einiger, längst aber nicht aller lytischen Gene kommt. Obwohl die beiden frühen Schalterproteine des viralen Zyklus, BZLF1 und BRLF1, gebildet werden, findet direkt nach der Infektion keine Virusproduktion statt (Kalla et al., 2009; Manuskript eingereicht). Die Zellen werden also latent infiziert. Dadurch werden sie transformiert, was während einer Primärinfektion in einer massiven Proliferation der infizierten Zellen resultiert. Durch die Präsentation von latenten EBV-Antigenen auf der Oberfläche wird eine starke T-Zellantwort eingeleitet, die die weitere Proliferation der B-Zellen limitiert. Wenn naive B-Lymphozyten durch EBV transformiert werden, differenzieren sie im Keimzentrum zu Gedächtnis-B-Zellen. In diesen persistiert EBV dann ein Leben lang in latenter Form (Babcock et al., 1998; Miyashita et al., 1995). In gesunden EBV-seropositiven Personen sind dabei durchschnittlich 1-50 von 10^6 B-Zellen infiziert. Das Expressionsmuster in diesen Zellen entspricht dabei der Latenz 0, einer von vier Latenzformen von EBV (Young und Rickinson, 2004). Außer LMP2A werden keine viralen Proteine mehr exprimiert. Auf diese Weise erreicht das Virus sein Reservoir der lebenslangen Persistenz, in dem es nicht mehr vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden kann (Kuppers et al., 2003). Bei immunkompetenten Virusträgern findet im Bereich des Oropharynx von Zeit zu Zeit immer wieder eine Reaktivierung statt und damit eine aktive lytische Vermehrung des Virus mit Ausschüttung infektiöser Partikel. Die Induktion der lytischen Phase beginnt, wie zuvor schon erwähnt, mit der Expression der beiden viralen Schlüsselgene BZLF1

und BRLF1, welche zur Klasse der sehr frühen Gene gehören. Sie kodieren für Transkriptionsfaktoren, die sowohl virale als auch bestimmte zelluläre Promotoren aktivieren können. In Folge dessen kommt es zur Aktivierung der frühen Gene, deren Produkte an der Replikation der viralen DNA beteiligt sind und zur Expression der späten, v.a. für virale Strukturproteine codierenden Gene (Yates et al., 1984). BZLF1, welches das Zta-Protein codiert, wird den bZIP (für *basic leucine zipper*) -Proteinen zugeordnet und bindet als Dimer an sogenannte Z-responsive Elemente (ZREs, Farrell et al., 1989). Auf diese Weise kann es die Transkription viraler und zellulärer DNAs initiieren. Auch seine eigene Transkription kann es aktivieren, indem es an ZREs in seinem Promotor Zp bindet. Ein wichtiges Gen, dessen transkriptionelle Aktivierung durch BZLF1 erfolgt, ist BRLF1, welches für das Protein Rta codiert. Auch dieses, ebenfalls als Transkriptionsfaktor wirkende Protein, ist, zusammen mit Zta, für die vollständige Induktion des lytischen Zyklus unbedingt erforderlich (Shimizu et al., 1989). Ein wichtiges zelluläres Zielgen von BRLF1 ist z.B. der Transkriptionsfaktor Sp1, welcher in der Regulation verschiedener zellulärer Gene eine Rolle spielt (Chang et al., 2005).

Bis heute ist noch nicht vollständig geklärt, ob für die Virusneusynthese Epithelzellen benötigt werden, oder ob diese ausschließlich in B-Zellen der Mukosa stattfindet. Zwar gibt es bestimmte Hinweise auf eine lytische Vermehrung von EBV in Epithelzellen (Shannon-Lowe et al., 2009; Sixbey et al., 1983), diese konnten aber bislang *in vivo* nicht mit Sicherheit bestätigt werden, wohingegen die Vermehrung in B-Zellen eindeutig belegt ist (Anagnostopoulos et al., 1995; Karajannis et al., 1997; Niedobitek et al., 1997; Tao et al., 1995).

1.3.1 Pathologie EBV-assoziiierter Erkrankungen

Infektiöse Mononukleose

In mehr als 95% der Erwachsenen in Deutschland können Antikörper gegen EBV nachgewiesen werden. Die Primärinfektion mit EBV erfolgt in der Regel im Kindesalter. Dabei treten zumeist keine oder nur leichte unspezifische Symptome auf. Mit steigendem hygienischen Standard verzögert sich der Zeitpunkt der Infektion. Findet diese erst im Jugend- oder Erwachsenenalter statt, führt sie bei 35-50% der Fälle zur Entwicklung einer Infektiösen Mononukleose (IM, Pfeiffersches Drüsenfieber) (Henle et al., 1968). Die Krankheit äußert sich zunächst in grippeähnlichen Symptomen wie Fieber, Kopfschmerzen und Müdigkeit.

Charakteristisch ist auch eine Schwellung der Lymphknoten infolge der massiven Proliferation von B- und T-Zellen (Young und Rickinson, 2004). Bei Personen mit einer intakten Immunabwehr werden dabei die infizierten, sich vermehrenden B-Zellen durch spezifische T-Zellen weitgehend beseitigt, sodass es nach einigen Wochen wieder zur Genesung kommt. In seltenen Fällen kann es nach einer infektiösen Mononukleose zu monate- oder jahrelangem Anhalten der Symptome kommen, was als chronisch-aktive Infektion bezeichnet wird.

Eine weitere schwerwiegende Komplikation bei der Primärinfektion mit EBV wird als *X-linked lymphoproliferative syndrome* bezeichnet. Es tritt ausschließlich bei Männern auf und ist mit Gendefekten auf dem X-Chromosom korreliert (Morra et al., 2001).

EBV-assoziierte Tumorerkrankungen

Bereits kurz nach seiner Identifizierung wurde klar, dass EBV B-Zellen *in vitro* mit einer hohen Effizienz transformieren kann. Es wurde als erstes humanes Tumorstoff eingestuft und gilt heute in der WHO-Einteilung als Karzinogen der höchsten Gefahrenklasse. Ätiologisch ist EBV nicht nur mit dem Burkitt-Lymphom eng assoziiert, sondern mit einer ganzen Reihe von Krebserkrankungen (Thompson und Kurzrock, 2004).

Burkitt-Lymphom (BL)

Das Burkitt-Lymphom ist als hochgradiges, niedrig differenziertes, monoklonales Non-Hodgkin B-Zell-Lymphom definiert, das v.a. in der Kieferregion, aber auch im Gehirn oder den Ovarien auftreten kann. Burkitt-Lymphome zeichnen sich durch spezifische chromosomale Translokationen zwischen dem Chromosom 8 und den Chromosomen 14, 2 oder 22 aus, durch die das Gen *c-myc* unter die Kontrolle eines Immunglobulinenhancers gelangt und so konstitutiv aktiv ist.

Neben der sporadischen Form des BL, bei der EBV nur in 10-25% der Tumoren auftritt, findet man in Neuguinea und Zentralafrika die endemische Form, die in mehr als 90% der Fälle mit EBV assoziiert ist. Diese Form tritt bevorzugt bei Kindern auf und steht in engem Zusammenhang mit dem Verbreitungsgebiet des Malariaerregers *Plasmodium falciparum*. Die aus dieser Infektion resultierende Stimulation des Immunsystems hat wahrscheinlich eine Reaktivierung der latenten EBV-Infektion zur Folge.

Nasopharynxkarzinom (NPC)

Das Nasopharynxkarzinom ist ein Tumor des Nasen-Rachenraums. In nahezu allen Fällen von undifferenziertem NPC lässt sich EBV in den Tumorzellen nachweisen (Levine, 1978). Während Karzinome dieser Art in den meisten Teilen der Erde sehr selten sind, treten sie in China und Taiwan gehäuft auf. Die Verbreitung lässt eine zusätzliche genetische (HLA-Typ) oder umweltbedingte Komponente (Verzehr von gesalzenem Fisch und Rauchexposition) vermuten (Henderson et al., 1976; Simons et al., 1976).

Morbus Hodgkin

Unter dem Begriff Morbus Hodgkin wird eine heterogene Gruppe von lymphoproliferativen Erkrankungen zusammengefasst. In, je nach Subtyp, 10-95% der während der Krankheit auftretenden Tumoren kann EBV nachgewiesen werden, hauptsächlich in sogenannten Reed-Sternberg-Zellen. Diese für Hodgkin-Lymphome charakteristischen Zellen sind extrem groß, mit zwei oder mehr Kernen, die sehr große Kernkörperchen enthalten. Sie machen jedoch nur einen sehr geringen Anteil des Tumors aus, dessen Masse zu über 90% aus infiltrierenden, nicht transformierten Zellen besteht. In der westlichen Welt ist Morbus Hodgkin die häufigste Lymphom-Erkrankung in Jugendlichen und jungen Erwachsenen (Ambinder, 2003; Hjalgrim et al., 2003).

Post-Transplantations-Lymphome

Bei der Etablierung und Aufrechterhaltung einer latenten Infektion spielt die Balance zwischen der viralen Aktivität und dem Immunsystem eine entscheidende Rolle. Eine geringe Menge latent infizierter Gedächtnis-B-Zellen garantiert das Überleben des Virus, ohne jedoch den Träger zu schädigen. In immunsupprimierten Personen, z. B. nach Organ- oder Stammzelltransplantationen, ist diese Balance durch die Suppression der T-Zellen gestört, so dass es durch EBV, wie auch durch andere Herpesviren, zu schwerwiegenden Komplikationen kommen kann. Diese werden unter dem Begriff PTLD (*posttransplantation lymphoproliferative disease*) zusammengefasst und zeichnen sich durch lymphoproliferative Erkrankungen, welche mit einer hohen Mortalität einhergehen, aus. Sie sind assoziiert mit einer massiven Proliferation von B-Zellen (Hsieh et al., 1999). Die durchschnittliche Wahrscheinlichkeit des Auftretens liegt bei der Transplantation eines soliden Organs bei ca. 2-10 % (Burney et al., 2006), wobei aber sehr große Unterschiede zwischen

den einzelnen Organen bestehen. So erfordert die Transplantation der Lunge oder des Herzens eine deutlich stärkere Immunsuppression als beispielsweise die einer Niere, was das Risiko einer PTLD erhöht. Auch nach Stammzelltransplantationen im Rahmen der Therapie maligner Erkrankungen des blutbildenden Systems ist die Wahrscheinlichkeit einer PTLD vergleichsweise hoch. Risikofaktoren sind dabei eine nicht vollständige HLA-Kompatibilität des Spenders (bedingt eine stärkere Immunsuppression) oder eine vorausgehende T-Zelldepletion des Transplantats, um einer *Graft-versus-Host-Disease* vorzubeugen (Curtis et al., 1999). In solchen Fällen kann die Inzidenz von PTLD auf über 20% steigen (Weinstock et al., 2006).

Tritt eine PTLD auf, wird im Normalfall die Immunsuppression drastisch reduziert; dadurch steigt jedoch die Gefahr einer Abstoßungsreaktion. Darum werden neben der Reduktion der Immunsuppression auch andere therapeutische Maßnahmen wie antivirale Medikamente (Aciclovir, Ganciclovir) oder Antikörper (anti-CD20) angewandt. Weitere Behandlungsmöglichkeiten stellen Chemotherapien nach dem sogenannten CHOP-21-Schema (eine Kombination aus Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vinkristin und Prednison; Choquet et al., 2007) oder adoptive Immuntherapie durch Transfer EBV-spezifischer T-Zellen dar (Merlo et al., 2008). Eine Vakzinierung, sowohl vor, als auch nach der Transplantation als Stärkung der schon bestehenden EBV-Immunität EBV-infizierter Patienten oder aber die Serokonversion naiver Patienten könnte eventuell eine Reduktion der Symptome oder ihr gänzliches Ausbleiben bewirken.

Neben den beschriebenen Tumoren, deren Assoziation mit EBV bewiesen ist, wurden in den letzten Jahren auch andere Tumorerkrankungen mit EBV in Verbindung gebracht. Während eine ursächliche Beteiligung von EBV an Magenkarzinomen (Shibata und Weiss, 1992; Tokunaga et al., 1993) und Leiomyosarkomen (Hsu et al., 2000) mittlerweile als gesichert angesehen werden kann, wird diese im Zusammenhang mit Karzinomen der Leber und der Brust nach wie vor kontrovers diskutiert (Bonnet et al., 1999; Sugawara et al., 1999; Thompson und Kurzrock, 2004).

EBV-assoziierte Erkrankungen bei HIV-Infektion

Auch bei HIV-bedingter Immundefizienz treten gehäuft EBV-assoziierte Krankheiten auf. Dazu zählen Burkitt- und Hodgkin-Lymphome, diffus großzellige B-Zell-Lymphome mit immunoblastischer Morphologie (Carbone et al., 2009), Haarzelleukoplakien (Walling et al., 2004) und Lymphome des zentralen

Nervensystems. Eine Lymphomart, die praktisch ausschließlich bei HIV-infizierten Personen auftritt, ist das plasmablastische Lymphom der Mundhöhle (Delecluse et al., 1997; Carbone et al., 1999).

1.3.2 EBV-spezifische Immunantworten

Die humorale Immunantwort

Die Primärinfektion ist charakterisiert durch die Bildung von IgM- und IgG-Antikörpern gegen Kapsidproteine sowie einer geringen Konzentration an IgG gegen Membranantigene (v.a. spezifisch für die Glykoproteine gp350/220 und gp85). Antikörper gegen die EBNA-Proteine sind nicht nachweisbar. Während der persistenten Phase lassen sich dann stabile IgG-Titer gegen Kapsidantigene, Membranantigene und die EBNA-Proteine (*EBV nuclear antigens*), nicht aber spezifisch gegen die frühen Antigene, detektieren (Henle et al., 1974, 1979 und 1987). Es wird vermutet, dass die humorale Immunantwort alleine keine sonderlich große Rolle bei der Kontrolle einer bereits etablierten EBV-Infektion mehr spielt. Sie könnte aber den Virusträger vor einer erneuten Infektion z.B. mit einem anderen Stamm, schützen. Dies trifft v.a. auf neutralisierende Antikörper gegen gp350/220 und gp85 zu (Hoffman et al., 1980; Thorley-Lawson und Geilinger, 1980; Quattiere et al., 1982). Bei einer Reaktivierung werden erneut IgM-Antikörper gebildet. Die unterschiedlichen Antikörper-Konstellationen erlauben die serologische Unterscheidung von Primärinfektion, latenter Infektion und Reaktivierung.

Die zelluläre Immunantwort

Erste Hinweise, dass das zelluläre Immunsystem eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von EBV-Infektionen spielt, lieferte die Beobachtung, dass in Lymphozytenkulturen EBV-positiver Spender immortalisierte B-Zellen zunächst auswachsen, dann jedoch wieder verschwinden. Dieses Phänomen wird als "Regression" bezeichnet (Pope et al., 1978; Rickinson et al., 1979) und durch zytotoxische T-Zellen vermittelt. Während einer infektiösen Mononukleose kommt es zu einer starken Expansion von CD8⁺-T-Zellen mit zahlreichen Spezifitäten. Einzelne können dabei eine Größenordnung von 1-40% der gesamten CD8⁺-T-Zellpopulation ausmachen, wobei Reaktivitäten gegen sehr frühe und frühe Antigene des lytischen Zyklus gewöhnlich dominieren (Steven et al., 1997; Callan et al., 1998; Hislop et al.,

2005). Die CD8-Antwort gegen latente Proteine fällt geringer aus und richtet sich vor allem gegen die Proteine der EBNA 3-Familie. Nach Ablauf der primären Infektion kommt es zu einer Reduktion der EBV-spezifischen T-Zellen. In latent infizierten Trägern können lebenslang T-Zellen gegen latente und lytische Antigene nachgewiesen werden. Während der Latenz wird in ruhenden B-Zellen als einziges virales Protein EBNA1 exprimiert. Dieses Protein enthält eine Wiederholungssequenz der Aminosäuren Glycin und Alanin, die den Abbau des Proteins über Proteasomen und somit die Präsentation viraler Peptide auf MHC-Klasse I-Molekülen verhindert (Levitskaya et al., 1997). Latent infizierte B-Zellen können also von CD8⁺-T-Zellen nicht erkannt und eliminiert werden. Kommt es jedoch zur Expression anderer latenter Proteine oder zur Reaktivierung und damit zur Expression lytischer Antigene, erkennen und eliminieren zytotoxische CD8⁺-T-Zellen infizierte Lymphozyten. Sie spielen somit eine wichtige Rolle bei der immunologischen Kontrolle der EBV-Infektion.

Die Rolle von CD4⁺-T-Zellen bei der EBV-Infektion ist weit weniger gut geklärt. Ihren Anteil an den EBV-spezifischen T-Zellen kann man nur sehr schwierig systematisch untersuchen, was vor allem daran liegt, dass bis jetzt nur sehr wenige CD4-Epitope identifiziert und auch keine Tetramere erhältlich sind. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass CD4⁺-T-Zellen während der Primärinfektion nur in sehr geringem Ausmaß expandieren (Maini et al., 2000), diese Zellen jedoch spezifisch auf Stimulation mit EBV-Antigenen reagieren. Ähnlich wie bei CD8⁺-T-Zellen nimmt auch die Zahl der CD4⁺-T-Zellen nach der primären Infektion ab, spezifische T-Zellen bleiben jedoch detektierbar (Adhikary et al., 2006; Amyes et al., 2003).

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind eine Schlüsselkomponente des frühen angeborenen Immunsystems. In *in vitro*-Studien konnte demonstriert werden, dass NK-Zellen, zum Teil durch die Freisetzung von Interferon- γ , eine EBV-induzierte Transformation von ruhenden B-Zellen verhindern können (Lotz et al., 1985). Auch im Blut von Patienten mit akuter infektiöser Mononukleose kommt es zu einer Expansion von NK-Zellen, wobei ihre Zahl invers korreliert mit der Viruslast (Williams et al., 2005). Darüber, welche Rolle sie bei der Kontrolle von EBV *in vivo* genau spielen, herrscht aber weiterhin Unklarheit.

1.3.3 Bisherige Ansätze zur Entwicklung eines EBV-Vakzins

Obwohl seit fast 20 Jahren an verschiedenen Ansätzen zur Entwicklung eines Impfstoffes gegen EBV geforscht wird, hat bis heute noch kein Vakzin die Marktzulassung erhalten. Mit einem geeigneten Impfstoff könnte in zum Zeitpunkt der Erstinfektion erwachsenen Personen einer Infektiösen Mononukleose und den damit verbundenen Komplikationen vorgebeugt werden. In immunsupprimierten Personen, insbesondere in Transplantatempfängern, kommt es häufig zur Entstehung lymphoproliferativer Erkrankungen (Cohen et al., 2008), welche mit einer vorherigen selektiven Immunisierung eventuell ebenfalls verhindert werden könnten.

Die ersten Ansätze zur Entwicklung eines Vakzins beruhten auf der Tatsache, dass gp350, das Hauptmembranprotein von EBV, Ziel neutralisierender Antikörper ist.

Die ersten Impfversuche mit rekombinanten, gp350 exprimierenden, viralen Vektoren wurden in Affen durchgeführt. Bei der Verwendung von Vaccinia-Viren konnte in den damit immunisierten Krallenaffen die EBV-Viruslast im Vergleich zur unvakzinierten Kontrollgruppe deutlich gesenkt werden (Mackett et al., 1996). In einem weiteren Versuch kamen replikationsdefekte Adenoviren zum Einsatz. Die dadurch gebildeten gp350-spezifischen Antikörper stellten sich zwar *in vitro* als nicht-neutralisierend heraus. Trotzdem erwiesen sich die geimpften Affen nach Verabreichung einer zu 100% tumorigenen EBV-Dosis als geschützt und entwickelten keine EBV-assoziierten Lymphome (Ragot et al., 1993).

1995 wurden in China die ersten klinischen Versuche zur Evaluierung eines gp350-exprimierenden MVA-Vakzins an Menschen durchgeführt. Obwohl die Ergebnisse vielversprechend waren und bei allen EBV-negativen Testpersonen eine Serokonversion nachgewiesen werden konnte, wurden die Versuche weder ausgeweitet noch weiterverfolgt (Gu et al., 1995). Eine vor kurzem veröffentlichte Phase II-Studie bestätigte den Erfolg von gp350-basierten Vakzinierungsstrategien. Nach Immunisierung mit einem rekombinanten *Subunit*-Vakzin in Kombination mit dem Adjuvans AS04 wiesen die Versuchspersonen über den Versuchszeitraum von 18 Monaten hinweg hohe spezifische Antikörpertiter auf und das Auftreten von Mononukleose-Symptomen wurde fast vollständig verhindert (Sokal et al., 2007). Impfstoffe mit gp350 als alleinigem EBV-Antigen zielen v.a. auf eine effektive Induktion neutralisierender Antikörper ab.

Alternative Strategien für ein Vakzin gegen EBV basieren auf der Induktion zytotoxischer T-Zellen (Moss et al., 1996; Rickinson und Moss, 1997). Anstatt die Primärinfektion zu verhindern, geht es hierbei vielmehr darum, klinischen Symptomen vorzubeugen. Die Bedeutung von T-Zellen bei der Kontrolle EBV-assoziiierter Erkrankungen wird bei der Behandlung von PTLD-Patienten deutlich. Hier kann häufig nach adoptivem Transfer zytotoxischer T-Zellen, welche *in vitro* mit LCLs stimuliert worden waren, ein Rückgang der Lymphome beobachtet werden (Rooney et al., 1995).

Versuche zur Induktion zellulärer Immunantworten wurden beispielsweise mit Peptidimpfstoffen unternommen. Unter Verwendung eines HLA-B7-restringierten EBNA3-Epitops konnten damit in gesunden EBV-negativen Personen peptidspezifische Immunantworten erzeugt werden (Moss et al., 1996). Da Epitope immer im Kontext bestimmter HLA-Moleküle präsentiert werden, müssten allerdings für ein anwendbares Vakzin viele verschiedene Epitope unterschiedlicher Restriktion kombiniert werden, um eine möglichst große Breite unterschiedlicher HLA-Typen abzudecken. Neben peptidbasierten Ansätzen sind derzeit weitere, auf viralen Vektoren basierende Immunisierungsstrategien, in der Erprobung. Ermutigende Resultate konnten dabei mit einem tetrameren Vaccinia-Virus erreicht werden. Die kombinierte Expression zweier latenter (EBNA2 und EBNA3C) und zweier lytischer Proteine (gp110 und gp350) führte in Mäusen zur Bildung sowohl von Antikörpern als auch T-Zellen gegen jedes der vier Proteine (Lockey et al., 2008).

Auch an der Induktion von Immunantworten gegen EBNA1, LMP1 und LMP2 wird derzeit geforscht. Impfstrategien, die auf diesen Proteinen basieren, zielen v.a. darauf ab, die Entwicklung von Burkitt- und Hodgkin-Lymphomen und von Nasopharynxkarzinomen zu vermeiden (Depil et al., 2007; Talyor et al., 2004).

Da in den letzten Jahren auf Virus-like-Particles basierende Vakzine immer mehr an Bedeutung gewonnen haben, sollte nun im Zuge dieser Doktorarbeit untersucht werden, ob sich in HEK 293-Zellen hergestellte EBV-VLPs prinzipiell zur Auslösung von EBV-spezifischen Immunantworten eignen und damit als Grundlage eines Impfstoffs gegen EBV-assoziierte Erkrankungen Verwendung finden könnten.

1.3.4 Das MHV-68-Modell

Die Forschung am Menschen und an Primaten ist aus offensichtlichen ethischen und praktischen Gründen schwierig. Da EBV aber nur Zellen dieser beiden Spezies infiziert, ist man häufig auf *in vitro*-Versuche beschränkt, denen die Komponenten und die Komplexität eines lebenden Organismus fehlen. Um trotzdem Studien darüber durchführen zu können, wie sich eine Vakzinierung mit Exosomen *in vivo* eventuell auswirken könnte, wurde in dieser Doktorarbeit auf das MHV-68-Modell zurückgegriffen.

MHV-68 wurde ursprünglich aus Gelbhalsmäusen (*Apodemus flavicollis*) und Rötelmäusen (*Clethrionomys glareolus*) isoliert (Blaskovic et al., 1980), kann aber auch Hausmäuse (*Mus musculus*) infizieren und verhält sich in ihnen wie ein natürlicher Erreger. Das komplette Genom des Virus wurde sequenziert (Virgin et al., 1997) und etwa 80% der MHV-68-Gene sind homolog zu EBV (Efstathiou et al., 1990, Virgin et al., 1997). So weist beispielsweise gp150 eine signifikante Homologie zu gp350 auf und wird deshalb häufig als Modell zur Untersuchung einer potentiellen Schutzwirkung von gp350 gegen EBV verwendet (Gillet et al., 2007). Es wird durch das M7-Gen codiert, welches sich an derselben relativen Position im Genom befindet wie gp350 (Stewart et al., 1996). Genau wie dieses handelt es sich auch bei gp150 um ein Typ I-Transmembranprotein mit einer O-glykosilierten Domäne, welche prolinreiche Wiederholungseinheiten enthält (de Lima et al., 2004). gp150 galt bis vor einigen Jahren als Ziel neutralisierender Antikörper (Stewart et al., 1996) und es konnte gezeigt werden, dass eine Vakzinierung mit gp150 zu einer achtfachen Reduktion der latenten Virustiter führt (Stewart et al., 1999). In neueren Untersuchungen konnten die neutralisierenden Eigenschaften gp150-spezifischer Antikörper allerdings widerlegt werden (Gill et al., 2006; Stevenson et al., 2009).

Die natürliche Route, auf der MHV-68 in seinen murinen Wirt gelangt ist nicht bekannt. Im Labor wird das Virus meist intranasal verabreicht. Bei dieser Art der Inokulation liegt die primäre Stelle der Virusinfektion in den Epithelzellen und mononukleären Zellen der Lunge und die Mäuse erkranken an Lungenentzündung (Pneumonie). Die akute Infektion der Lunge dauert 8-10 Tage und wird von einer persistierenden, latenten Infektion der B-Zellen abgelöst. In der Milz erreicht die Menge an latenten Viren am Tag 17 ihren Höhepunkt, es kommt zur Vergrößerung der Milz und den Lymphknoten. Dann nimmt die Virusmenge schnell ab und bleibt

anschließend lebenslang stabil (Cardin et al., 1996, Sunil-Chandra et al., 1992).

Eine Infektion mit MHV-68 induziert in Mäusen Krankheitssymptome, die sehr ähnlich der durch EBV im Menschen ausgelösten infektiösen Mononukleose sind (Dogherty et al., 1997). Neben der Vergrößerung von Lymphknoten, ist auch die Anwesenheit einer großen Zahl von aktiven CD8+ T-Zellen in den peripheren, lymphatischen Organen charakteristisch (Stevenson et al., 1999). Es kommt zu einer massiven Proliferation von Lymphozyten, hauptsächlich von CD8+ T-Zellen, aber auch CD4+ und B220+ Zellen tragen zu der Vergrößerung der Milz und der Lymphknoten bei (Tripp et al., 1997, Usherwood et al., 1996).

Das MHV-68-System stellt ein gutes Tiermodell dar, um sowohl die grundlegende Biologie von Gammaherpesviren zu untersuchen, als auch Vakzinierungsstudien durchzuführen.

1.4 Die chronisch-lymphatische B-Zell-Leukämie

Die chronisch-lymphatische Leukämie (B-CLL) ist ein leukämisches Non-Hodgkin-Lymphom der B-Zellreihe. Mit einer Inzidenz von 3/100.000 Einwohner ist sie die häufigste Leukämie in den westlichen Ländern (Hallek et al., 2002). Das mediane Erkrankungsalter beträgt 65 bis 70 Jahre. Die Erkrankungshäufigkeit nimmt mit steigendem Lebensalter zu, wobei Männer häufiger als Frauen erkranken. Die Ätiologie der B-CLL ist unklar, genetische Faktoren scheinen aber eine Rolle zu spielen: Kinder von B-CLL-Patienten haben im Vergleich zur Normalbevölkerung ein erhöhtes Risiko an einer B-CLL oder einer anderen lymphatischen Neoplasie zu erkranken (Yuille et al., 2000). Auch der Einfluss von Umweltfaktoren wird diskutiert, ist aber nicht gesichert.

In den frühen Stadien ist die B-CLL meist asymptomatisch. Die mittlere Überlebenszeit ab dem Diagnosezeitpunkt variiert abhängig vom Stadium zwischen zwei und mehr als zehn Jahren. Mit fortschreitender Erkrankung entwickeln die Patienten eine Lymphadenopathie, Müdigkeit und leiden häufig unter Infekten. Aufgrund von zunehmender Knochenmarksinfiltration entwickeln sich eine Anämie und eine Thrombozytopenie. Die klinische Stadieneinteilung erfolgt nach Binet et al. 1981 und stützt sich auf das Blutbild und die Erfassung befallener Lymphknoten.

Nicht selten wird die B-CLL zufällig diagnostiziert, weil im Blutausstrich eine Vermehrung der Lymphozyten auf 60% bis annähernd 100% der gesamten Leukozyten erkennbar ist. Im Unterschied dazu beträgt der Anteil im gesunden Menschen etwa 30%. Dagegen ist die Zahl der Erythrozyten verringert und die der Thrombozyten sogar deutlich reduziert (Diehl et al., 1999). Die Zunahme der Lymphozyten liegt weniger an der schnellen Teilungsrate der CLL-Zellen, als vielmehr an ihrer ausgeprägten Resistenz gegenüber Apoptose und, daraus resultierend, ihrer verlängerten Lebenszeit. Charakteristisch für CLL-Zellen ist die Expression von CD5, CD19 und CD23 und einer schwachen bis fehlenden Expression von CD22, FMC7, CD79b und der Immunglobulin-Oberflächenmoleküle IgM und IgD. Häufig findet man Deletionen auf den Chromosomen 6 (6q21), 11 (11q22-q23), 13 (13q14) und 17 (17p13), sowie eine Trisomie des Chromosoms 12. Die Ursache dieser Mutationen ist jedoch unbekannt (Stilgenbauer et al., 2000).

Immunzelluläre Defekte der Chronisch-Lymphatischen Leukämie

Naïve B-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche Immunglobuline. Bindet daran ein Antigen, wird der Antigen-Immunglobulin-Komplex internalisiert und das Antigen prozessiert und im Kontext von HLA-Molekülen präsentiert. Eine für das Antigen spezifische T-Zelle bindet an die B-Zelle, wobei die ersten Wechselwirkungen durch Adhäsionsmoleküle herbeigeführt und durch die Antigenerkennung stabilisiert werden. Letztere erfolgt durch die Bindung des T-Zellrezeptors an den peptidbeladenen MHC-Komplex. Für eine Aktivierung ist auch die Bindung von CD80 und CD86 auf der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zelle an ihren Rezeptor auf der T-Zelle (CD28) von grosser Bedeutung. Erst dieses Doppelsignal löst in der T-Zelle die Bildung von IL-2 aus, das eigentliche Signal für die klonale Expansion der Zelle. Bei einer Antigenbindung ohne Kostimulation durch die B7-Proteine CD80 und CD86 wird die T-Zelle dagegen inaktiviert. Diese periphere Immuntoleranz wird auch als Anergie bezeichnet (Grewal und Flavell, 1996; Magott Procelewska, 2004).

Ein ebenso wichtiges kostimulatorisches Signal stellt die Bindung des CD40-Liganden auf T-Zellen an seinen Rezeptor auf der Oberfläche von B-Zellen dar (Banchereau et al., 1994). Die daraus resultierende Signaltransduktionskaskade induziert die Expression einer großen Zahl von Genen, welche an der Abwehr von Pathogenen beteiligt sind. Eine wichtige Rolle hierbei spielen verschiedene TRAF-Proteine (*TNF receptor associated factor*; Brown et al., 2001). Während TRAF2,

TRAF3 und TRAF6 direkt mit dem CD40-Rezeptor interagieren, wird TRAF1 durch Heterodimerisierung mit TRAF 2 rekrutiert. Auch die Rekrutierung von TRAF5 verläuft indirekt durch Bindung an TRAF3 (Pype et al., 2000). Letztendlich werden durch CD40-vermittelte Signaltransduktion verschiedene Signalwege aktiviert, darunter NF κ B (*nuclear factor κ B*), MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) und STAT3 (*signal transducers and activators of transcription*). Sie regulieren die Genexpression durch Aktivierung von Proteinen wie den AP1-Komponenten cJun und ATF2 (*activating transcription factor-2*) oder Rel-Transkriptionsfaktoren (Dadgostar et al., 2002).

Der CD40-Ligand wird nach Aktivierung der T-Zelle besonders stark exprimiert und induziert wiederum die Expression von kostimulatorischen und Adhäsionsmolekülen auf der antigenpräsentierenden Zelle (McDyer et al., 2002). Erst dieses zweite Signal und die Sezernierung von Interleukin-4 (IL-4) und Interferon- γ durch die T-Zelle aktiviert die B-Zelle und löst deren klonale Selektion, die Sekretion von IgM sowie die Differenzierung zu Plasmazellen aus (Shinde et al., 1996; Roy et al., 1995).

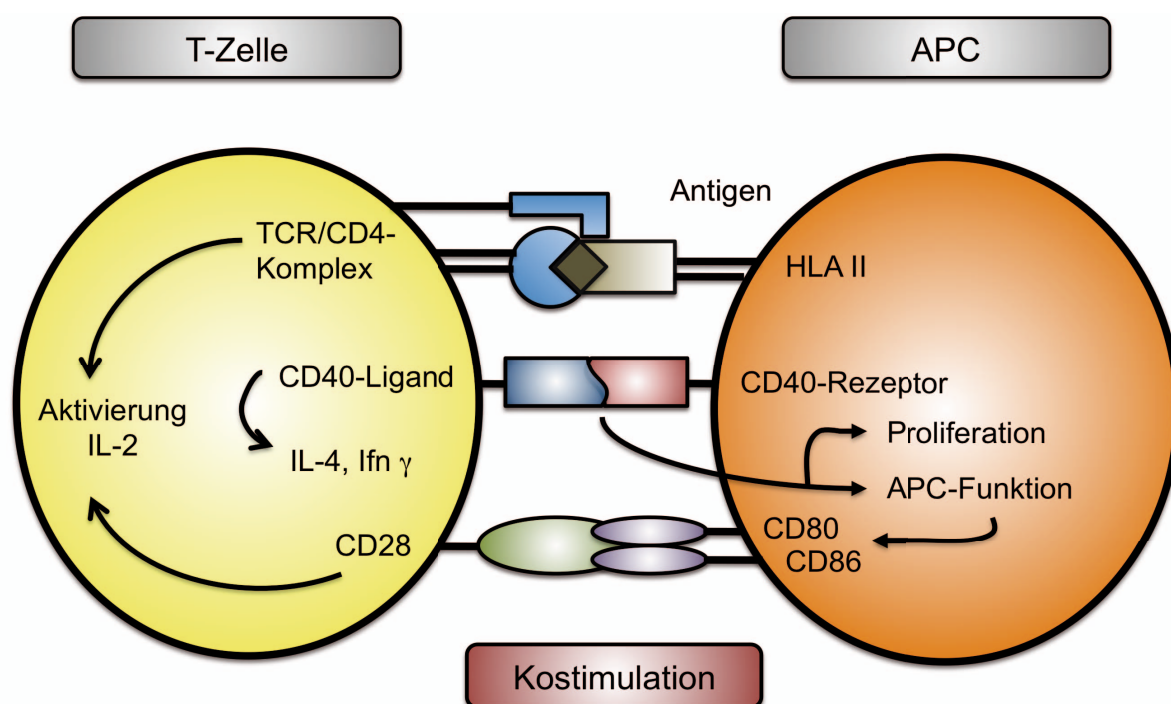


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Rolle der kostimulatorischen Moleküle bei der Aktivierung von antigenpräsentierender und T-Zelle

Bei B-CLL-Zellen sind diese Signalwege teilweise gestört, so dass sie in einer gemischten Lymphozytenreaktion selbst allogene T-Zellen nicht stimulieren (Wolos et

al., 1979). Dies hat mehrere Ursachen: So werden Immunglobuline auf CLL-Zellen schwächer exprimiert als auf gesunden Zellen. Die kostimulatorischen B7-Moleküle sind ebenfalls herunterreguliert, was zu einer verminderten Produktion aktivierender Zytokine und zur Anergisierung der T-Zellen führt (Dazzi et al., 1995). Hinzu kommt, dass sie aktiv immuninhibitorische Zytokine wie IL-10 und TGF- β sezernieren, welche negativ regulierend auf antigenspezifische Immunantworten wirken. Vor allem aber exprimieren T-Zellen von CLL-Patienten den CD40L auch nach Aktivierung nur in geringsten Mengen, so dass eine effiziente B-Zellaktivierung ausbleibt (Kipps et al., 2000b; Van den Hove et al., 1997).

Schon seit längerem wird daher untersucht, wie die Unempfänglichkeit der T-Zellen von CLL-Patienten gegenüber immunstimulatorischen Signalen überwunden werden kann. Der Fokus liegt dabei eindeutig auf der Aktivierung des CD40-Rezeptors der Leukämiezellen. Ranheim und seine Gruppe waren die ersten, die zeigen konnten, dass eine CD40-Stimulation zu einer verstärkten Expression der B7-Moleküle auf B-CLL-Zellen führt und dass diese Zellen Alloantigene deutlich besser präsentierten als unstimulierte CLL-Zellen (Ranheim et al., 1993). Buhmann et al. bestätigten diese Daten und demonstrierten zusätzlich, dass auch Adhäsionsmoleküle besser exprimiert wurden, was zu einer Erkennung der CLL-Zellen durch autologe T-Zellen führte (Buhmann et al., 1999).

Bereits einige Jahre später wurde der erste Versuch einer Gentherapie unternommen. In einer klinischen Phase I wurden Patienten autologe CLL-Zellen verabreicht, die mit einem replikationsdefekten, den murinen CD40L exprimierenden adenoviralen Vektor infiziert worden waren. Schon eine einzige Infusion dieser Zellen führte zu einem Anstieg an T-Zellen und einer gleichzeitigen Reduktion der CLL-Zellen. Die infizierten CLL-Zellen waren *in vitro* sogar dazu in der Lage, zytotoxische T-Lymphozyten gegen nicht infizierte CLL-Zellen zu induzieren. Man spricht hier von einem *bystander*-Effekt (Wierda et al., 2000; Chu et al., 2002). In den nachfolgenden Jahren wurden ähnliche Versuche zur Übertragung des CD40L, CD80 und CD86 unternommen, wobei sowohl adenoassoziierte als auch Herpes-Simplex- oder Lentivirale Vektoren zum Einsatz kamen (Wendtner et al., 2002; Tolba et al., 2001; Bonamino et al., 2004).

Im Zuge dieser Doktorarbeit sollte nun untersucht werden, ob ein derartiger CD40L-Transfer auch durch Exosomen möglich ist.

1.4 Aufgabenstellung

Exosomen haben sich in den letzten Jahren als wirksame Induktoren spezifischer Immunantworten erwiesen. Exosomen von dendritischen Zellen (DEX) wurden sogar schon in klinischen Studien getestet. Die Behandlung von Melanompatienten (Escudier et al., 2005) sowie von Patienten mit fortgeschrittenem nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (Morse et al., 2005) zeigte vielversprechende Ergebnisse. Auch Virus-like-Particles werden schon seit längerem als wirksame Impfstoffe gegen verschiedene Erreger herangezogen, so z. B. bei Hepatitis B und Papillomviren (Roy und Noad, 2008).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte untersucht werden, ob sich HEK 293-Zellen und ein in unserem Labor etabliertes, auf diesen Zellen basierendes Verpackungssystem für EBV-Vektoren für die Herstellung von Exosomen und Virus-like-Particles eignet. Da mehrere Methoden zur Aufreinigung der Partikel aus Zellkulturüberstand in Frage kamen, sollte diese evaluiert, die Exosomen und Virus-like-Particles charakterisiert und die Partikel Anschließend auf ihr immunstimulatorisches Potential hin untersucht werden. Dies geschah anhand EBV-spezifischer T-Zellklone, durch Reaktivierung EBV-spezifischer T-Zellen aus peripheren Blutzellen sowie *in vivo*-Reaktivierungsversuchen. Auf diese Weise sollte ihre Eignung für einen zellfreien EBV-Impfstoff getestet werden, da gegen dieses Virus bislang kein wirksames Vakzin existiert und gerade bei immunsupprimierten Patienten gehäuft EBV-assoziierte Erkrankungen auftreten.

In einem zweiten Projekt sollte geklärt werden, ob sich mit Hilfe von Exosomen und Virus-like-Particles funktionelle Proteine auf B-CLL-Zellen übertragen lassen. In diesen sollte durch Stimulation des CD40-Rezeptors die Induktion der im Normalfall nur sehr schwach exprimierten kostimulatorischen Moleküle bewirkt werden. Im Anschluss daran sollte die Frage beantwortet werden, ob es mit derart vorstimulierten CLL-Zellen möglich ist, autologe Immunantworten zu generieren. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob neben der Möglichkeit der Verwendung viraler Vektoren zum Transfer des CD40L auch Exosomen bzw. Virus-like-Particles als Alternativen für eine Anwendung in der Immuntherapie der CLL in Frage kommen könnten.

2. Material

2.1 Antikörper

<u>Spezifität</u>	<u>Markierung</u>	<u>Spezies</u>	<u>Bezugsquelle</u>
α -gp350	keine	Maus	E. Kremmer (72A1), HMGU
α -gp140	keine	Maus	B. Neuhierl, DKFZ
α -gp125	keine	Maus	Chemicon
α -MHC I	keine	Maus	BD Pharmingen
α -MHC II	keine	Maus	BD Pharmingen
α -CD21	keine	Maus	BD Pharmingen
α -Maus	FITC	Ratte	BD Pharmingen
α -Maus	Cy5	Ratte	Dianova
α -CD3, CD4, CD5	FITC, PE, APC	Maus	Immunotools
α -Zta (BZLF1)	keine	Maus	E.Kremmer (BZ1), HMGU
α -Rta (BRLF1)	keine	Maus	E.Drouet, Grenoble
α -CD8	FITC, PE	Maus	Immunotools
α -CD19	FITC, PE, PE-Cy5	Maus	Immunotools, BD Pharmingen
α -CD21	FITC	Maus	Immunotools
α -CD45	FITC	Maus	Immunotools
α -CD54	FITC	Maus	Immunotools
α -CD80	FITC, PE	Maus	BD Pharmingen
α -CD86	APC	Maus	BD Pharmingen
α -CD95	FITC	Maus	Immunotools
α -CD154 (CD40L)	FITC	Maus	BD Pharmingen
α -CD14	FITC	Maus	Immunotools
α -Maus	HRP	Ratte	Promega
α -Her2/neu	keine	Maus	Invitrogen

2.2 Oligonukleotide

Aktin1: 5`-CAC CCT GTG CTG CTC ACC GAG GCC-3`

Aktin2: 5`-ACC GCT CGT TCG CAA TAG TGA TGA-3`

→ Nachweis des Housekeeping-Gens für β -Aktin

GFP F4: 5`-GCA GTG CTT CAG CCG CTA CC-3`

GFP B3: 5`-GCT TGT GCC CCA GGA TGT TG-3`

→ Nachweis des GFP-Gens

2.3 Plasmide

Die meisten der verwendeten Plasmide waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden oder wurden freundlicherweise von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt. Die mit einem Stern (*) gekennzeichneten Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Die folgende Auflistung gibt alle verwendeten Plasmide als Auszug aus der Datenbank der Abteilung Genvektoren wieder.

<u>Plasmidname</u>	<u>Beschreibung</u>
p509	pCMV: BZLF1 (Hammerschmidt und Sugden, 1988)
p2670	pCMV: BALF4 (Delecluse et al., 2005)
p3303	pCMV: RFP
p1925	pCMV: GFP
p2385	pCMV: BLLF1 (Janz et al., 2000)
p2406	pCMV: BNRF1 (Feederle et al., 2006)
p2209	pCMV: gp42
p2868	pCMV: CD40L
p2089	Wildtyp Maxi-EBV: F-Plasmid (pMBO131) mit eGFP und Hygromycinresistenzgen in B95.8 (Delecluse et al. 1998)

p2114 (TR ⁻)	p2089 mit deletierten Verpackungssignalen (Delecluse et al., 1999)
pRTS-1	Vektor mit bidirektionalem Promotor zur doxycylinabhängigen Genexpression (Bornkamm et al., 2005)
p3989*	pRTS-Vektor zur doxzyklininduzierten Expression von BZLF1 und BRLF1
p3661/gp150*	pCMV: gp150
pVaxErb2	pCMV:Her2/neu (Helga Bernhard, Klinikum rechts der Isar)

2.4 Zelllinien und andere Zellen

Die verwendeten Zelllinien stammen, wenn nicht anders vermerkt, aus der Sammlung der Abteilung Genvektoren oder wurden im Rahmen dieser Arbeit etabliert (*).

HEK 293	Humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie, die durch die Gene E1a und E1b von Adenovirus Typ 5 transformiert wurde (Graham et al., 1977)
Raji	Humane EBV-positive Burkitt-Lymphom-Zelllinie (Pulvertaft, 1964)
B-Blasten	Wachstumstransformierte EBV-negative B-Zellen, aus PBMCs gesunder humaner Spender durch Stimulation mit CD40L-Fibroblastenzellen und 2ng/ml IL-4 generiert (freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Moosmann zur Verfügung gestellt; Wiesner et al., 2008)
LCL	durch B95.8 transformierte lymphoblastoide Zelllinie
miniLCL	mit Mini-EBV (p1478) immortalisierte lymphoblastoide Zelllinie (Moosmann et al., 2002)
1H7	CD4 ⁺ -T-Zellklon, der spezifisch ein Epitop (LGGLNFDVNDLSPV, AS 548-561) des EBV-Proteins gp140 erkennt, Restriktion über HLA DR1 (zur Verfügung gestellt von Josef Mautner; Adhikary et al., 2008)
1D6	CD4 ⁺ -T-Zellklon, der spezifisch ein Epitop (FGQLTPHTKAVYQPR, AS 65-79) des EBV-Proteins gp350 erkennt, Restriktion über HLA DR13 (zur Verfügung gestellt von Josef Mautner; Adhikary et al., 2008)

FDC-1	aus humanem Tonsillengewebe etablierte FDC-Zelllinie (Clark et al., 1995)
PBMC	periphere mononukleäre Zellen; durch Gradientenzentrifugation aus Blut gewonnen

293-Zelllinien, stabil transfiziert mit Maxi-EBV Plasmiden

HEK 293/2089	HEK 293-Zellen, stabil transfiziert mit dem Wildtyp-Maxi-EBV-Plasmid p2089 (Delecluse et al., 1998)
HEK 293/TR	HEK 293-Zellen, stabil transfiziert mit dem Maxi-EBV-Plasmid p2114 (Delecluse et al., 1999), Deletion in den Verpackungssignalen (TR); produziert nach Induktion des lytischen EBV-Zyklus Virus-like-Particles
HEK 293/VII	HEK 293-Zellen, stabil transfiziert mit dem Maxi-EBV-Plasmid p2831 (Hettich et al., 2006), Deletion in TR, LMP1, EBNA2, BZLF1 und EBNA 3A-C; produziert nach Induktion des lytischen EBV-Zyklus Virus-like-Particles
HEK 293/3989*	HEK 293-Zellen, stabil transfiziert mit den Plasmiden p2114 und p3989; der lytische Zyklus kann durch Doxyzyklin induziert werden

2.5 Chemikalien, Enzyme, Geräte und Sonstiges

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, in reinster Form bezogen.

Beckmann, Heidelberg

Avanti J25 Zentrifuge, L7-55 Ultrazentrifuge, 10x60mm UZ-Röhrchen

BectonDickinson GmbH, Heidelberg

Kunststoff-Reagenzgefäße, Zellkulturflaschen, FACS Calibur, Antikörper, TMB Substrat, Calcein AM

BioCat, Heidelberg

AnnexinV-Kit

Bio-Rad Lab., Richmond, Calif., USA

Elispot Detektions Kit

Calbiochem GmbH, Frankfurt/Main

Dithiothreitol (DTT), Hygromycin B

Coulter Electronics GmbH, Krefeld

"Particle Counter", Z Serie

Diamedix, Miami, Florida

EBV-VCA-IgG-ELISA-Kit, EBV-EA-D-IgG-ELISA-Kit

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

Bacto-Agar, Hefeextrakt, Trypton

eBiosciences, San Diego

Maus Interferon- γ Elispot Kit

Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y., USA

Röntgenfilme XAR5

Eppendorf Gerätebau, Hamburg

Tischzentrifuge 5415, Reaktionsgefäße verschiedener Größe, BioPhotometer

Eurogentec, Seraing

Goldstar-Polymerase

Genomed, Bad Oeynhausen

Maxi-Präparations-Kit für Plasmidpräparationen (Jetstar)

General Electric Healthcare, München

Hybond-ECL-Zellulosemembran

Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA

Mighty Small II Gel Elektrophorese Einheit, SemiPhor, Semidry Blottingsystem

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Amphotericin B (Fungizone), fötales Kälberserum, HEPES, 1 kb DNA-Leiter, L-Glutamin, Lipofectamin Transfektionsreagenz, Natrium-Pyruvat, Optimem I, Penicillin, Streptomycin, Trypsin-EDTA (1x), Trypton, Zellkulturmedium RPMI 1640, Superscript™III-Reverse Transkriptase Kit, BenchMark Prestained Protein Ladder, Surfactant-Free Aldehyde/Sulfate-Latex Beads

Macherey-Nagel, Düren

Nucleobond AX500 Säulen, NucleoSpin Extract II Kit

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Restriktionsenzyme

Merck-Eurolab GmbH

Glyzerin, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Ammoniumperoxodisulfat (APS), Essigsäure, Ethidiumbromid, Ethanol, Glucose, Glyzin, Glyzylglyzin, Isopropanol, Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Lithiumchlorid, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumdodecylsulfat (SDS), Natrium-Orthovanadat, Salzsäure, Saccharose, Tetramethylethylendiamin (TEMED), Triton-X-100

Millipore GmbH, Schwalbach

Centriprep-50 Zentrifugeneinheiten

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

MACS Antikörper, MACS Separationseinheiten

Nunc GmbH, Wiesbaden

Cryotubes 3 ml, Impfösen, Plastikpetrischalen, Zellkulturflaschen, Zellkulturschalen, 96-48-, 24- und 6-Well-Platten

New England Biolabs, Schwalbach

Restriktionsenzyme, DNA modifizierende Enzyme

Pall Gelman Sciences, Dreieich

Acrodisc Syringe Filter, 0,8 µm

PE Biosystems, Weiterstadt

PCR-Reaktionsgefäße

Peqlab, Erlangen

Reaktionsgefäße, Elektroporationsküvetten, Elektrophorese-Kammern, dNTPs

Pierce, Rockford

BCA Protein Assay

Promega, Mannheim

Taq-Polymerase, Taq-Puffer, dNTPs

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), alkalische Phosphatase, DNase I, RNase I, Klenow-Fragment, Restriktionsenzyme

Roth, Karlsruhe

Natriumdodecylsulfat, Phenol, Roti-Block, Acrylamid

Qiagen, Hilden

RNAeasy Kit, QiaAmp DNA Kit

Sigma Chemie, München

Ampicillin, Bromphenolblau, DMSO, Dithiothreitol (DTT), Glyzin, HEPES, Harnstoff, Lysozym, Natriumfluorid, Natriummolybdat, Natriumorthovanadat, Natriumpyrophosphat, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), TritonX-100, Monolaurat (Tween-20), Prestained SDS Molecular Weight Marker, Rinderserumalbumin (BSA)

Stratagene, Heidelberg

Robocycler

Schleicher & Schuell, Dassel

Filtereinheit 1,2 µm

Zeiss, Göttingen

Axiovert 10 Fluoreszenzmikroskop, Axiovert 40C

2.6 Verwendete Software

DNA-Analyse-Software: MacVector 10.5

FACS-Software: FlowJo 8.8.6

Bildbearbeitungsprogramm zur Bearbeitung von mikroskopischen Aufnahmen: Huygens Essential Suite der Firma Scientific Volume Imaging

3. Methoden

3.1. Bakterienkultur

3.1.1 Amplifikation und Lagerung von Bakterien

Bakterien wurden als Suspensionskultur in LB-Medium oder zur Vereinzelnung von Kolonien auf LB-Agar-Platten kultiviert. Bei Selektion auf Resistenz gegen ein oder mehrere Antibiotika wurde dem LB-Medium Ampicillin (100 µg/ml), Chloramphenicol (30 µg/ml) oder Kanamycin (30 µg/ml) zugegeben. Zur Lagerung von Bakterien über längere Zeiträume wurde eine über Nacht gewachsene Suspensionskultur mit 16% Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

LB-Medium: 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl

LB-Agar-Platten: 4 % w/v Bacto-Agar

3.1.2 Transformation von Bakterien

Transformationskompetente Bakterien-Stämme wurden nach dem Protokoll von Hanahan hergestellt (Hanahan, 1983) und bei -80°C aufbewahrt. Für eine Transformation wurden 200 µl dieser Bakterien mit der DNA des Ligationsansatzes und sieben µl DMSO vermischt und für 90 Sekunden bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Die Zellen wurden kurz auf Eis abgekühlt, mit 4 ml SOC-Medium versetzt und einer 60-minütigen phänotypischen Expression bei 37°C ausgesetzt. Die Zellsuspension wurde dann auf LB-Agarplatten unter entsprechender Selektion ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.2. Zellkultur und Analyse von Zellen

3.2.1 Zellkulturbedingungen

Alle Zellen und Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Kulturmedium RPMI 1640 wurde mit 10 % Kälberserum, 100 µg/ml Streptomycin, 100 IE/ml Penicillin, 1 mM Natriumpyruvat und 20 µM Bathocuproindisulfonsäure (BCS) und 0,433 % α-Thioglycerol versetzt. Der Selektion und Kultur von stabilen Maxi-EBV 293-Zelllinien wurde 80 µg/ml Hygromycin zur Aufrechterhaltung des episomalen EBV-Plasmids zugesetzt.

Adhärente Zelllinien

Die adhärente Zelllinie HEK 293 wurde in RPMI 1640 Kulturmedium mit den

angegebenen Zusätzen kultiviert und alle zwei bis drei Tage 1:6 verdünnt. Zum Ablösen von adhärennten Zellen wurde diesen 2 ml Trypsin zugesetzt. Nach kurzer Inkubation wurden die Zellen abgespült und (ein Teil) in frisches Vollmedium überführt.

Suspensionszellen

Suspensionszellen, wie LCLs oder miniLCLs wurden alle drei bis vier Tage, je nach Wachstum, 1:3 bis 1:6 gesplittet.

3.2.2 Aufbewahrung von Zellen

Zellen können in einem Gemisch aus 10% DMSO und 90% FCS in flüssigem Stickstoff eingefroren und unbegrenzt gelagert werden. Um die Zellen (10^7 Zellen pro 2 ml-Gefäß) schonend abzukühlen, wurden sie in einer Einfrierbox (NUNC) mit Isopropanolmantel auf -80°C abgekühlt. Die dauerhafte Lagerung der Röhrchen erfolgte in flüssigen Stickstoff. Zur Wiederverwendung wurden die Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad schnell aufgetaut, in 30 ml vorgewärmtem Kulturmedium gewaschen und in ein Kulturgefäß mit frischem Medium überführt.

3.2.3 Präparation primärer PBMCs

Humane primäre PBMCs wurden aus Blut gesunder Spender oder aus CLL-Patienten gewonnen, das aus Routineentnahmen stammte. Dafür wurde das Blut 1:1 mit PBS verdünnt. Anschließend wurden 15 ml 30 %-igen Ficolls (Ficoll-Dichte 1.077) mit 35 ml der Blutsuspension überschichtet. Die PBMCs wurden durch Dichtegradientenzentrifugation bei 1850 rpm (750 g) für 45 min bei 15°C aufgereinigt. Die Interphase des Gradienten, welche die PBMCs enthielt, wurde abgenommen und Ficollreste durch dreimaliges fraktioniertes Waschen der Zellen (Zentrifugationen: 1700 rpm, 1500 rpm, 1200 rpm, je 7 min bei 15°C) mit PBS entfernt. Anschließend wurden die primären Zellen in Kulturmedium resuspendiert und meist direkt verwendet. Die Zellen können auch über Nacht auf Eis (in 50 % FCS / 50 % Kulturmedium) aufbewahrt und am nächsten Tag für Experimente eingesetzt werden.

3.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe eines Partikelzählers der Firma Coulter nach Angaben des Herstellers. Eine sehr genaue und konstante Messung der Zellzahl erfolgte alternativ mit Hilfe von Kalibrations-Kügelchen (BD Pharmingen) im

Durchflusszytometer. Einem definierten Zellvolumen wurde eine konstante Menge APC-gekoppelter Kalibrierungs-Kügelchen zugegeben, die im FACS-Gerät anhand ihrer Größe, Granularität und der APC-Färbung von Zellen unterschieden werden konnten. Das Gerät wurde so eingestellt, dass die Messung nach Durchfluss der Hälfte der eingesetzten Kügelchen stoppte. Die Anzahl der im Lymphozyten-Fenster gezählten Zellen ergab sich als prozentualer Anteil der absoluten Zellzahl der entnommenen Population.

3.2.5 Stimulation von T-Zellklonen

Die T-Zellklone wurden alle 14 Tage mit folgendem Stimulationsgemisch restimuliert: 10^5 autologe oder HLA-gematchte LCLs/ml, 10^6 PBMCs/ml (Mix von drei allogenen Spendern), 1000U/ml IL-2, 100ng/ml PHA. LCLs und PBMCs wurden zuvor mit 50Gy bestrahlt. 5×10^6 T-Zellen wurden in 10ml des Stimulationsgemisches aufgenommen und auf eine halbe 96-Well-Platte ausplattiert.

3.2.6 PEI-Transfektion und Herstellung von Exosomen

293-Zellen wurden chemisch mit Polyethylenimin (PEI) transfiziert. Dazu wurden 3×10^5 Zellen pro Well in einer 6-Well-Platte in Medium ohne Selektionszusätze ausplattiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und 2 ml Optimem (ohne Zusätze) zugegeben. Pro Well wurde folgender Ansatz verwendet:

Lösung A: 100 μ l Optimem + 1 μ g zu transfizierende DNA

Lösung B: 100 μ l Optimem + 4 μ l PEI (1 mg / ml)

Beide Lösungen wurden gemischt, für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf die Zellen gegeben. Nach vier bis sechs Stunden wurde das Transfektionsreagenz abgesaugt und durch drei ml frisches Medium (ohne Selektionszusätze) ersetzt.

Erstellung stabiler Zelllinien

Zur Doxycyclinabhängigen Induktion des lytischen Zyklus in TR⁻-Zellen wurde eine Zelllinie etabliert, die BZLF1 und BRLF1 auf einem episomalen Vektor mit bidirektionalem Promotor nach Doxycyclinzugabe stabil exprimiert (3989). Dafür wurden die Zellen, wie unter Punkt 3.2.6 aufgeführt, gemäß des Standardprotokolls transfiziert. Nach 48 h wurde dem Medium Puromycin in der Konzentration 250 ng/ml und nach weiteren 72 h zusätzlich Hygromycin in der Konzentration 80 μ g/ml

zugesetzt. Auswachsende Kolonien wurden mit kleinen, in Trypsin getränkten Stückchen Whatman-Papier in je ein Well einer 6-Well-Platte transferiert. Sobald die Klone sich weitervermehrt hatten, wurden sie in entsprechend größeren Platten weiterkultiviert. Die Expression der Proteine BZLF1 und BRLF1 wurde mittels Western Blot überprüft. Klone, die ein positives Resultat zeigten, wurden zur weiteren Verwendung weiterkultiviert.

Herstellung von Exosomen

Für die Herstellung von Exosomen wurden 293-Zellen in einer Dichte von 5×10^6 pro 14 cm-Platte ausplattiert und, wie oben beschrieben, mit Expressionsplasmiden (z. B. codierend für gp350) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen drei Tage in Medium kultiviert, aus dem zuvor durch zweistündige Ultrazentrifugation bei 100.000 g die FCS-Exosomen abgetrennt worden waren. Die Aufkonzentrierung der Partikel aus dem Zellkulturüberstand erfolgte durch reverse Zentrifugation in Centripreps (nach Angaben des Herstellers) oder aber durch differentielle Ultrazentrifugation in sterilen Gefäßen. Hierfür wurden Zentrifugationsschritte mit ansteigender Beschleunigung durchgeführt, wobei in den ersten Schritten (300 g für 10 min und 5000 g für 30 min) Zellen und Zellbruchstücke abgetrennt und im letzten Schritt (100.000 g für 2h) Exosomen pelletiert wurden. Die Partikel wurden in 1 ml PBS mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und für 1 h in den Zentrifugenbechern geschüttelt, um alle Partikel vom Boden abzulösen. Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

3.2.7 Das Maxi-EBV-System und die Herstellung von Virus-like-Particles

Bis vor einigen Jahren war es noch nicht möglich, das EBV-Genom gezielt genetisch zu manipulieren. Neben Wildtyp-EBV-Stämmen gab es nur zwei spontan entstandene EBV-Mutanten, die sich für genetische Experimente prinzipiell eigneten: P3HR1 und Raji. Der EBNA2-defiziente EBV-positive Laborstamm P3HR1 ermöglichte zwar das Einbringen von einzelnen mutierten Genen in Kombination mit dem EBNA2-Gen in das EBV-Genom, es entstand dabei aber auch intaktes, immortalisierendes EBV (Hammerschmidt und Sugden, 1989). Darüberhinaus war die Generierung von Mutanten ausschließlich in den eukaryontischen P3HR1-Zellen möglich (Tomkinson et al., 1993). Problematisch und aufwendig blieb auch der Aufreinigungsschritt der rekombinanten Viren, um Wildtyp-Kontaminationen auszuschließen. Idealerweise

sollte die Konstruktion von viralen Vektoren jedoch in Bakterien vollzogen werden, da diese viel einfacher genetisch zu manipulieren sind.

Aus diesem Grund wurde von H.J. Delecluse und W. Hammerschmidt das sogenannte Maxi-EBV-System entwickelt (Delecluse et al., 1998). Durch die Integration eines bakteriellen F-Faktor-Replikons in das Genom des EBV-Stammes B95.8 wurde das gesamte virale Genom des EBV erstmals für jede genetische Manipulation in *E. coli* zugänglich. Mit diesem Vorgehen wurden in den Bereich der prokaryontischen DNA-Abschnitte zusätzlich die Gene für die Chloramphenicol-Acetyltransferase zur Selektion in *E. coli*, sowie die Hygromycin-Phosphotransferase zur Selektion in eukaryontischen Zellen eingebracht. Dieses Plasmid mit einer Größe von ca. 180 kb ist der Prototyp, der als Maxi-EBV-Plasmid 2089 dem Wildtyp-EBV-Genom entspricht. Dieses Maxi-EBV-Plasmid trägt auch das Gen für das grün-fluoreszierende Protein (GFP) unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Durch die GFP-vermittelte Fluoreszenz ist eine einfache Identifizierung von erfolgreich transfizierten bzw. infizierten Zellen möglich.

Stabil mit p2089 transfizierte HEK293-Zellen ermöglichen die Virusproduktion nach Induktion des lytischen Zyklus von EBV durch die transiente Transfektion von Expressionsplasmiden für BZLF1 und BRLF1. Die dabei entstehenden Viruspartikel infizieren und immortalisieren effizient primäre, humane B-Lymphozyten. Es konnte gezeigt werden, dass das 2089-Virus alle Eigenschaften von Wildtyp-EBV besitzt (Delecluse et al., 1998).

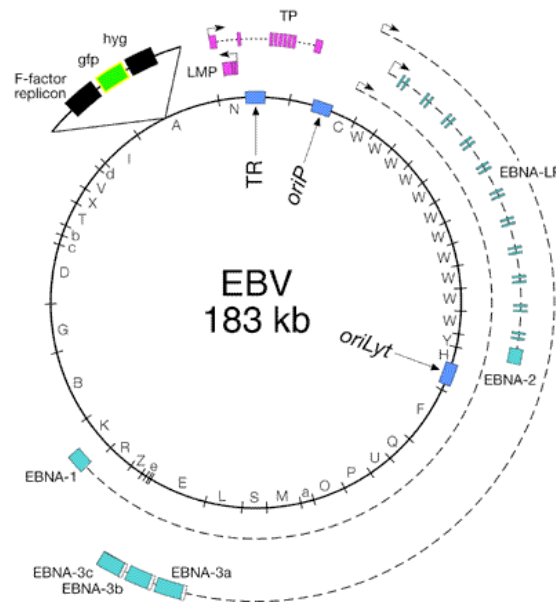


Abb. 3.1 Schematische Darstellung des Maxi-EBV-Plasmids p2089

Das Maxi-EBV-Plasmid p2089 basiert auf dem EBV-Stamm B95.8. Das gesamte Genom wurde auf ein F-Faktor-Plasmid kloniert. Dies erlaubt die Amplifikation des viralen Genoms in *E. coli* und die Mutation von jedem Locus durch homologe Rekombination. Das zirkuläre Episom ist mit seinen durch BamHI-Spaltung erzeugten Fragmenten gezeigt (innerer Kreis). Von den elf viralen Proteinen, die während der Latenz (Typ III) exprimiert werden, werden neun Gene gemeinsam mit ihren primären Transkripten gezeigt (EBNA1, 2, 3A-C, und EBNA-LP als türkise, die LMPs als pinkfarbene Kästchen). Der hinzugefügte prokaryontische Anteil mit den eingefügten Genen zur Detektion und Selektion ist vorgelagert dargestellt. Die Replikationsursprünge *oriP* bzw. *oriLyt* sowie das Verpackungssignal (*TR*) sind in blau zu sehen.

p2089 dient als Ausgangsplasmid für alle EBV-Mutanten auf der Basis des Maxi-EBV-Systems. Zur Herstellung der Verpackungszelllinien wurden daraus die *terminal repeats* (im Fall der Zelllinie HEK 293/TR⁻) oder aber zusätzlich neben diesen noch die für LMP1, EBNA2, BZLF1 und EBNA3A-C codierenden Gene (im Fall der Zelllinie HEK 293/VII⁻) deletiert. Durch das Fehlen der als virale Verpackungssignale fungierenden *terminal repeats* können diese Zelllinien zwar lytisch induziert werden, infektiöse Viruspartikel werden aber nicht freigesetzt (Delecluse et al., 1999; Hettich et al., 2006).

Die beiden Zelllinien HEK 293/TR⁻ und HEK 293/VII⁻ wurden zur Produktion von Virus-like-Particles herangezogen.

Die Zellen wurden dafür in einer Dichte von 5×10^6 Zellen pro 14 cm-Platte ausplattiert. Für die Induktion des lytischen Zyklus war die Transfektion eines BZLF1-

Expressionsplasmides nötig. Sowohl die Transfektion als auch die anschließende Aufbereitung der Virus-like-Particles erfolgte nach dem unter Punkt 3.2.6 aufgeführten Protokoll.

3.2.8 Iodixanol-Gradient

Die weitere Aufreinigung von Exosomen oder Virus-like-Particles erfolgte über einen Iodixanolgradienten (Handelsname: Optiprep). Dafür wurden 380 µl der Exo -oder VLPs mit 520 µl Optiprep (60%, mit Proteaseinhibitoren versetzt) gemischt. Die Mischung wurde auf den Boden eines 10x60mm PA UZ-Röhrchens pipettiert und mit 2,5 ml 30%igem Optiprep (in PBS) und 0,6 ml PBS überschichtet. Die Ultrazentrifugation erfolgte in einem Beckmann SW60 Ti-Rotor für 4h 20 min bei 39.000 rpm (160.000 g). Anschließend wurden von oben nach unten acht Fraktionen à 500 µl abgenommen.

3.2.9 FACS-Analysen

Nachweis von Oberflächenmolekülen

Für die Detektion von Oberflächenmolekülen wurden die Zellen, wenn nicht anders angegeben, in PBS/2 % FCS gewaschen und in 50 µl PBS/2 % FCS resuspendiert. Die Färbung mit den jeweiligen Antikörpern (primäre Antikörper 1:50 verdünnt; sekundäre Antikörper 1:150 verdünnt) erfolgte für 15 min auf Eis im Dunkeln. Danach wurden die Zellen gewaschen und für die Messung in 300 µl PBS resuspendiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen anstelle des spezifischen Primärantikörpers mit einem irrelevanten Antikörper gleichen Isotyps oder nur mit Sekundärantikörper inkubiert.

Untersuchung von Zellen auf Annexin Cy5/PI-Positivität zur Bestimmung apoptotischer Zellen

Die Zellen wurden nach Probennahme abzentrifugiert, in 300 µl Annexin V-Bindepuffer (im verwendeten Annexin-Cy5-Apoptosis Detection Kit enthalten) resuspendiert und nach Zugabe von je drei µl Annexin-Cy5 und PI (finale Konzentration: 5ng) für fünf Minuten im Dunkeln inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit Propidium Iodid (PI) gefärbt. In toten Zellen kommt es zu einem Zusammenbrechen des Membranpotentials, woraufhin die Zellen durchlässig für PI werden. Dieses interkaliert in DNA und kann durch Licht geeigneter Wellenlänge zum Fluoreszieren angeregt werden. Ein sehr früher Schritt während der Einleitung der Apoptose ist die Translokation von Phosphatidylserin, zu dem AnnexinV eine hohe

Affinität besitzt, von der Innenseite der Zellmembran an die Außenseite. Diese tritt lange vor der für die Apoptose charakteristischen DNA-Fragmentation auf, so dass über die Annexinbindung in den Messungen auch die frühapoptotischen Zellen erfasst werden konnten.

3.2.10 Calcein-Freisetzungs-Assay zur Messung der Zytotoxizität von T-Zellen

Calcein-AM (Acetoxymethylester) kann zur kurzzeitigen Markierung lebender Zellen verwendet werden. 5×10^5 Zellen wurden hierfür 30 min in 0,5 ml einer 1%igen Calcein-AM-Lösung inkubiert. Der überschüssige und nicht aufgenommene Farbstoff wurde durch dreimaliges Waschen in PBS entfernt, bevor die Zellen über Nacht mit Exosomen oder VLPs inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurden die Zellen erneut gewaschen und zu den Effektorzellen gegeben (6h, E:T-Verhältnis 1:20). Kam es zur Lyse von Zellen, wurde Calcein in den Überstand freigesetzt und konnte mit Hilfe eines Wallac Viktor 2 (Wellenlänge 405 nm) detektiert werden. Die prozentuale Zelllyse wurde anhand der Messergebnisse errechnet, wobei für unbehandelten Zellen 0% und für mit 0,2% TritonX-100 inkubierte Zellen 100% Lyse angenommen wurde.

3.2.11 Stimulationsversuche mit PBMCs

Nach ihrer Isolierung aus Blut wurden $2-5 \times 10^6$ PBMCs pro Well auf einer 24-Well-Platte ausplattiert. Die Stimulierungen erfolgten, wenn nicht anders angegeben, alle drei Tage mit jeweils 50 μ g Exosomen oder VLPs. Zum Teil wurden dabei auch frische PBMCs (oder aber die daraus isolierte B-Zellpopulation) zugegeben. Diese wurden zuvor einer Strahlendosis von 50 Gy ausgesetzt. Je nach Bedarf wurde ein Teil des Mediums durch frisches ersetzt oder die Stimulationsansätze auf eine größere Anzahl an Wells ausgeweitet.

3.2.12 Isolierung von B-Zellen aus PBMCs mit Hilfe der MACS-Technologie

Um aus PBMCs B-Zellen zu isolieren, wurden die Zellen durch „Magnetic Cell Sorting“ (MACS)-Separation (Miltenyi Biotec) fraktioniert. Dabei werden die Zellen an magnetische, mit spezifischen Antikörpern gekoppelte, Kügelchen gebunden und auf eine Säule geladen, die sich in einem starken magnetischen Feld befindet. Gebundene Zellen werden durch das Magnetfeld angezogen und bleiben in der

Säule, während die ungebundenen Zellen die Säule passieren können. Nach Entfernen des Magnetfeldes können die auf der Säule gebundenen Zellen eluiert werden. Für die Isolation der B-Zellen wurden α -CD19-Antikörper- bzw. α -IgM-Antikörper-gekoppelte „MicroBeads“ von Miltenyi Biotec verwendet und die Zellen nach Herstellerprotokoll isoliert.

3.2.13 Tierexperimentelle Methoden

Immunisierung von Mäusen mit Exosomen oder Virus-like-Particles

Jeweils 10 μ g Exosomen bzw. Virus-like-Particles pro Maus wurden in 200 μ l PBS aufgenommen und den Mäusen intraperitoneal injiziert. Nach 14 Tagen wurden die Mäuse auf die gleiche Weise ein zweites Mal immunisiert. Bei der Immunisierung von Rag2^{-/-}γc^{-/-}-Mäusen wurden bei der ersten Injektion gleichzeitig mit den Exosomen bzw. VLPs 3x10⁷ PBMCs verabreicht. Als Adjuvantien wurden für die Versuche mit Rag2^{-/-}γc^{-/-}-Mäusen inkomplettes Freund'sches Adjuvanz und für die MHV-68-Versuche CpG-Oligodesoxynukleotide (CpG 1668, Sequenz: 5'-TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT-3', 10nmol/Maus) verwendet.

Die Immunisierungen der Mäuse wurden freundlicherweise von Dr. Gilbert Reisbach (Rag-Mäuse) bzw. PD Dr. Heiko Adler (MHV-68-Mäuse) durchgeführt.

Intranasale Infektion von Versuchstieren

Das zur Infektion eingesetzte MHV-68 wurde in sterilem PBS auf die gewünschte Viruskonzentration (5x10⁴ PFU) eingestellt. Vor der intranasalen Infektion wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Injektion von Ketamin/Xylazin (50/15 mg/kg) anästhesiert. Die Virussuspension wurde in einem Volumen von 30 μ l mit einer 200 μ l-Pipettenspitze auf die Nasenöffnung der Maus gegeben und durch Einatmen aufgenommen. Alle Arbeiten mit MHV-68, das Öffnen der individuell belüfteten Käfige, die Euthanasie der Tiere mittels CO₂ sowie die Organentnahmen fanden innerhalb einer Sterilbank statt.

Die Infektion der Mäuse wurde, wie die Immunisierungen, von PD Dr. Heiko Adler durchgeführt.

Präparation muriner Splenozyten oder Thymozyten

Entnommene Milzen bzw. Thymusdrüsen wurden mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und mit dem Stempel einer 20 ml-Spritze vorsichtig durch ein Zellsieb

gedrückt (100 µm Porengröße). Zwischendurch wurde das Sieb mehrmals mit Medium gespült. Anschließend wurden die Splenozyten in einer Dichte von 5×10^7 -Zellen/ml in Medium aufgenommen und direkt verwendet.

Bestimmung der MHV-68-Viruslast in der Milz durch quantitative Realtime-PCR

Die Milzen der Mäuse wurden homogenisiert und mit Hilfe eines Zellsiebs (100 µm Porengröße) wurde daraus eine Einzelzellsuspension hergestellt. Anschließend wurde die DNA unter Verwendung des Qiaamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) extrahiert und die Konzentration bestimmt. Die Viruslast in der Milz infizierter Mäuse wurde mittels Realtime-PCR unter Verwendung des ABI 7300 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA) quantifiziert. Die Amplifikation erfolgte mit dem *Taqman universal PCR Master Mix* in 40 Zyklen. Pro Reaktion wurden 100 ng DNA eingesetzt. Die Kopienzahl der viralen DNA wurde durch Amplifikation einer 70 bp langen Region innerhalb des MHV-68 gB-Gens ermittelt (forward primer: 5'-GGCCCAAATTCAATTTGCCT-3'; reverse primer: 5'-CCCTGGACAACCTCAAGC-3'). Das murine ribosomale Protein L8 wurde ebenfalls amplifiziert (forward primer: 5'-CATCCCTTTGGAGGTGGTA-3'; reverse primer: 5'-ACCACAGCACCATTTGGCAAACC-3') und zur Normalisierung der Proben herangezogen.

Die Bestimmung der MHV-68-Viruslast erfolgte freundlicherweise durch PD Dr. Heiko Adler.

3.3. DNA-Arbeitstechniken

Die Anwendung allgemein üblicher Techniken, die im Umgang mit Nukleinsäuren benutzt wurden, wie z.B. DNA-Konzentrationsbestimmungen im Spektralphotometer, Ethanolpräzipitation, Auftrennung bzw. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, Phenolextraktion, enzymatische Restriktionshydrolyse, Behandlung von DNA-Fragmenten mit Klenow-Polymerase oder T4-DNA-Polymerase, Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase, Ligierung freier DNA-Enden oder Präparation von Plasmid-DNA über alkalische Lyse erfolgte in Anlehnung an Standardprotokolle (Sambrook et al., 1989).

3.3.1 Präparative Plasmidreinigung

TENS-Lyse: Aufreinigung von Plasmiden aus kleinen Kulturvolumina

Diese Methode liefert schnell DNA in einer Qualität, die eine Sequenzierung erlaubt. Zwei ml einer stationär gewachsenen Bakterienkultur wurden bei 1500 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µl TENS-Puffer resuspendiert und Anschließend mit 150 µl 3 M NaAc (pH 5,0) neutralisiert. Zelltrümmer wurden bei 16000 g abzentrifugiert, um den plasmidhaltigen Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen zu können. Die Plasmid-DNA wurde mit 900 µl Ethanol (96 - 100 %) gefällt und in 80%-igem Ethanol gewaschen. Überschüssiges Ethanol wurde in der Vakuumentrifuge für drei bis vier min verdampft. Das DNA-Pellet wurde in 50 µl TE + RNase A (10 µg/ml) gelöst.

TENS-Puffer: 10 mM Tris (pH 8); 1 mM EDTA; 100 mM NaOH; 0,5 % SDS

Aufreinigung von Plasmiden aus großen Kulturvolumina

Die präparative Plasmidreinigung aus einer stationär gewachsenen 400 ml Bakterienkultur erfolgte mit Hilfe von DNA-Adsorptionssäulen nach Angabe des Herstellers (Genomed). Die eluierte DNA wurde in 0,7 Vol Isopropanol gefällt und in TE-Puffer aufgenommen.

Endotoxin-freie Plasmide

Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS) aus E. coli kann sowohl die Transfektionseffizienz in einigen Zelllinien signifikant reduzieren als auch unspezifische Immunantworten in B-Zellen auslösen. Aus diesem Grund wurden Plasmide, die für Transfektionen vorgesehen waren, aus 400 ml Kulturvolumen mit Hilfe des Endofree Pasmid Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers präpariert.

3.3.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der DNA wurde mit einem BioPhotometer der Firma Eppendorf gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

3.3.3 PCR-Analysen

Taq-DNA-Polymerase und der dazugehörige Puffer wurden von der Firma Promega bezogen und die PCR-Analysen nach Angaben des Herstellers in einem Robocycler

Gradient 96 durchgeführt. Dabei richtete sich das Temperaturprofil der PCR nach den Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotide und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Für problematische PCR-Produkte wurde die optimale Schmelztemperatur mittels der Temperaturgradientenfunktion des Robocyclers ermittelt. Der Reaktionsansatz für eine PCR setzte sich wie folgt zusammen:

Reagenz	Volumen
DNA (50 ng/µl)	1 µl
Taq-Polymerase-Puffer (10x)	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	5 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µl
Primer (20 mM)	Je 0,5 µl
Taq-DNA-Polymerase (5 U/ml)	0,2 µl

Mit H₂O auf 50 µl Endvolumen auffüllen

PCR-Programm:

Temperatur und Zeit	Reaktion
95°C (5 min)	Denaturierung
Die folgenden Schritte wurden 30-35 mal wiederholt	
95°C (1 min)	Denaturierung
50-65°C (1 min)	Annealing
72°C (1 min)	Elongation
72°C (10 min)	Elongation
4°C	

3.4 Protein- und immunologische Arbeitstechniken

3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration von Proteinlysaten wurde gemäß des Protokolls nach Bradford durchgeführt (Bradford, 1976). Die Proteinkonzentration in exosomalen oder VLP-Konzentraten wurden mittels der BCA-Methode nach Pierce ermittelt.

3.4.2 Dot Blot

Exosomen und Virus-like-Particles wurden routinemäßig mittels eines Dot Blots auf das Vorhandensein von gp350 überprüft, um ihre Qualität und die Menge abschätzen zu können. Dafür wurden von den Exosomen- bzw. VLP-Konzentraten jeweils 1-2 µl auf Hybond ECL-Membran (Amersham) aufgebracht. Nachdem die Flüssigkeit vollständig getrocknet war, wurde sie für eine Stunde in 5% Milchpulver in TBS/Tween geblockt und Anschließend über Nacht, ebenfalls in dieser Blocklösung, mit α -gp350-Antikörper (Verdünnung: 1:200) bei 4°C auf einer Rollmaschine inkubiert. Nach drei Waschschritten in TBS/0,05% Tween für je 5min erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (α -Maus, HRP-gekoppelt, 1:10.000) für 1 h bei Raumtemperatur. Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen in PBS entfernt. Da dieser direkt mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war, konnte der Blot nach Benetzung mit ECL-Reagens direkt entwickelt werden (ECL-Reagens, Amersham).

3.4.3 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

5×10^6 Zellen bzw. 30 µg Exosomen oder VLPs wurden in 50 µl eiskaltem RIPA-Puffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (16.000 g, 4°C) und das Zell-/Exosomenlysate wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 200 mM Dithiothreitol (DTT) versetzt. Vor dem Laden auf ein Acrylamid-Gel (je nach Größe des nachzuweisenden Proteins 7-12%ig; Lademenge: 30 µg Protein/Spur) wurde das Lysat mit SDS-Probenpuffer vermengt und 5 min aufgeköcht. Die aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe eines „SemiPhor“-Elektroblotsystems auf eine Hybond-ECL-Membran transferiert. Der Transfer erfolgte bei 300 mA und 18 V innerhalb von 42 min. Die Membran mit den gebundenen Proteinen wurde eine Stunde lang in 5% Milchpulver in TBS/Tween geschwenkt, um

unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Inkubationen mit Primär- und Sekundärantikörper, sowie diverse Waschschriffe, erfolgten wie in 3.4.2 beschrieben.

RIPA-Puffer: 1mM EDTA; 150 mM NaCl; 0,1 % SDS; 0,5 % DOC; 1 % TritonX-100; 50 mM Tris pH 8,0

SDS-Probenpuffer 2x: 2,5% SDS; 20% Glycerin; 0,12 M Tris pH 6,8

3.4.4 ELISAs und Elispots

Die Ifn- γ - und GM-CSF-ELISA-Kits wurden von der Firma Mabtech bezogen und nach Herstellerangaben durchgeführt. Bei Versuchen mit T-Zellklonen wurden üblicherweise 10^4 T-Zellen und 5×10^4 antigenpräsentierende Zellen/96-Well verwendet. In ELISAs mit PBMCs als Effektorzellen wurden, wenn nicht anders angegeben, 5×10^5 Zellen verwendet.

Auch die ELISAs zur Detektion von Antikörpern gegen EA-D und p18 wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Anstelle des mitgelieferten Detektionsantikörpers wurde jedoch ein α -Maus-Antikörper, gekoppelt mit HRP, herangezogen. Als Substrat wurde dementsprechend TMB (Tetramethylbenzidin) verwendet.

Für ELISAs zum Nachweis von Antikörpern gegen MHV-Antigene wurden Maxisorp-Platten über Nacht mit 55 μ l/Well MHV-68-Viruslysate beschichtet (3 μ g/ml) bevor, nach drei Waschschriffen mit PBS/Tween, 55 μ l des zu untersuchenden Mausserums (1:50 verdünnt) zugegeben wurde. Nach zwei Stunden wurde die Platte erneut gewaschen, für eine Stunde mit HRP-gekoppeltem α -Maus-Antikörper inkubiert, und wieder gewaschen. Nach Zugabe von TMB konnte der Farbumschlag mittels eines Wallac Viktor 2 (450 nm) gemessen werden.

Elisot-Kits zum Nachweis von humanem Ifn- γ wurden ebenfalls von Mabtech, die für die Detektion von murinem Ifn- γ von eBiosciences und die Elisot Platten von Millipore bezogen. Für Assays mit humanen Zellen wurden pro Well einer 96-Well-Platte 1×10^5 T-Zellen und 5×10^4 antigenpräsentierende Zellen ausplattiert und für 24 h inkubiert. Bei der Reaktivierung von MHV-68- oder EBV- spezifischen T-Zellen aus Maussplenozyten wurden von diesen 1×10^6 Zellen/Well ausplattiert und mit je 10 μ g Exosomen- oder Viruslysate, bzw. je nach Experiment, 1×10^5 Effektorzellen (B-Blasten

oder LCLs) inkubiert. Die weitere Durchführung der Elispot-Assays erfolgte nach Angaben der Hersteller.

3.5 Mikroskopie

3.5.1 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden vom Anatomischen Institut der LMU (Professor Welsch) durchgeführt.

Exosomen:

Exosomen wurden durch Ultrazentrifugation (siehe 3.2.6) aus Zellkulturüberstand gewonnen und mittels eines Optiprep-Gradienten, wie unter 3.2.8 erläutert, weiter aufgereinigt. Die Gradientenfraktion, die der Dichte der Exosomen (1,05- 1,07 g/ml) entsprach, wurde durch Ultrazentrifugation in einer Tischultrazentrifuge (2 h, 100.000 g) noch einmal um den Faktor 30 aufkonzentriert. Das Exosomenpellet wurde in 30 µl Sörensenpuffer aufgenommen. 20 µl dieses Exosomenkonzentrats wurden auf Kohlenstoffgitter aufgetropft, für 1 h getrocknet und für eine weitere Stunde in 2,2% Paraformaldehyd und 0,1% Glutaraldehyd fixiert. Anschließend erfolgte eine zweiminütige Kontrastierung in Phosphorwolframsäure, nach der die Exosomen direkt mikroskopiert werden konnten. Wurden die Partikel immungefärbt, wurden sie nach der Fixierung erst in PBS/ 2% BSA (10 min) und dann in Aurion-Block für 30 sek geblockt. Anschließend wurden sie für 2 h bei RT und dann über Nacht bei 4°C mit den Antikörpern inkubiert (α -gp350: unverdünnt; α -Her2/neu: 1:50 in Aurion Block). Nach drei Waschschritten in PBS/BSA erfolgte die Inkubation der Grids in Sekundärantikörper (α -Maus gekoppelt mit Immungoldpartikeln der Größe 10 nm; 90 min bei RT; Verdünnung 1:40). Im Anschluss folgten vier Waschrritte, zwei in PBS/BSA und zwei in PBS, ein weiterer Fixierungsschritt in 2%igem Glutaraldehyd für 10 min, drei Spülgänge in H₂O und 2 min Kontrastierung in Phosphorwolframsäure.

Sörensen-Puffer, pH 7,4: 1:5-Lösung von 0,07 M KH₂PO₄ and 0,07 M Na₂HPO₄-2H₂O

HEK 293-Zellen:

Die Zellen wurden in Agar eingebettet, dieser wurde klein geschnitten, mit 3% Glutaraldehyd fixiert, mit Osmiumtetroxid behandelt, in 100%igem Ethanol entwässert, in Intermedium Propylenoxid inkubiert, in Araldit eingebettet und dann in Ultradünnschnitte geschnitten. Die Schnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat nach der Reynoldsmethode kontrastiert.

Die Aufnahmen erfolgten in einem Philips CM10 Elektronenmikroskop. Zur Darstellung von Zellen wurden Vergrößerungen zwischen 6600 und 11500 x und für Exosomen zwischen 39000-52000 x verwendet.

3.5.2 Immunfluoreszenzaufnahmen im Konfokalmikroskop

5×10^6 Zellen wurden in einem Well einer 6-Well-Platte auf einem Deckglas ausplattiert und für einige Stunden bei 37°C inkubiert. Das Deckglas wurde mit 2% PFA für 15 min fixiert und je drei mal mit PBS/0,15% TritonX-100 und PBS/1% BSA gewaschen. Anschließend wurden erst 75 µl Primärantikörper (72A1 gegen gp350 1:1 und α -CD21-Antikörper-FITC 1:1000 in PBS/BSA verdünnt, 1h) und nach drei Waschschritten in PBS 75 µl Sekundärantikörper (α -Maus-Cy5, 1:200 in PBS/BSA verdünnt, 45 min) zugegeben. Nach einer 90 sekundigen Inkubation in DAPI-Lösung (1:10.000 in PBS) zur Gegenfärbung der DNA wurde das Deckglas mit acht µl Vectashield auf einen Objektträger aufgebracht und mit Nagellack versiegelt.

Die mikroskopischen Aufnahmen wurden an einem Leica TCS SP2 Konfokal-System mit einem Ölimmersionsobjektiv (HCX PI APO ldb. Blue 63x 1.4) bei einer Scangeschwindigkeit von 800 mW aufgenommen. Es wurden die Laserlinien 405 nm (Dioden-Laser), 488 nm (Argon-Laser), und 633 nm (Helium-Neon-Laser) verwendet. Nachdem die Aufnahmen der Zellen mit dem Mikroskop gemacht worden waren, wurden die Bilder mit dem Bildbearbeitungsprogramm Huygens Essential Suite der Firma Scientific Volume Imaging dekonvolutiert. Im Anschluss daran wurden die aufgenommenen Zellen mit Hilfe des Programmes 3D-rekonstruiert.

4. Ergebnisse

4.1 Herstellung und Analyse von Exosomen und Virus-like-Particles in 293-basierten Zelllinien

4.1.1 Die Inkubation von Raji-Zellen mit Kulturüberstand dieser Zelllinie resultiert in einem GFP-Fluoreszenzshift der Raji-Zellen im Durchflusszytometer

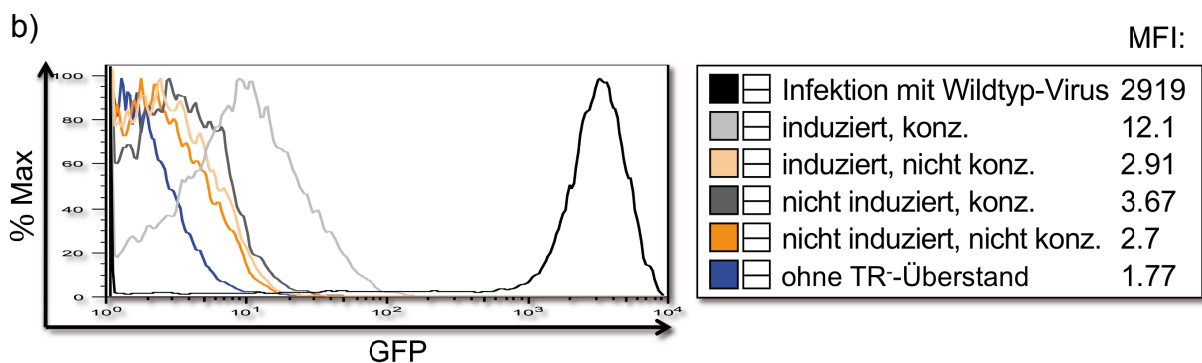
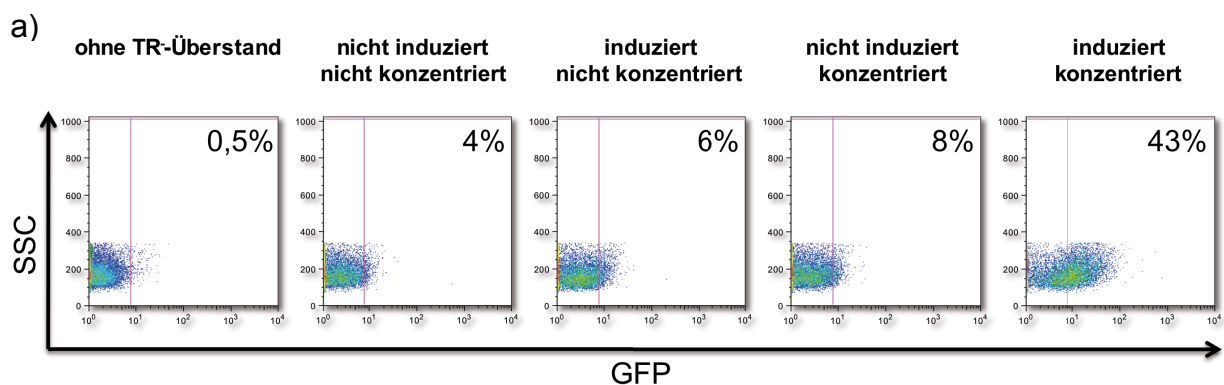
Vor einiger Zeit wurde in unserer Arbeitsgruppe eine Zelllinie entwickelt, die zur Verpackung von EBV-abgeleiteten viralen Vektoren verwendet werden kann (TR⁻/293, kurz TR⁻). Basierend auf HEK 293-Zellen ist sie stabil transfiziert mit einer Mutante des Maxi-EBV-Genoms, die sich vom Wildtypvirus durch das Fehlen der terminalen repetitiven Enden (*terminal repeats*, TR⁻) unterscheidet. Diese sind die viralen Verpackungssignale und üben eine wichtige Funktion aus beim Zerschneiden der viralen Vorläufer-DNAs in die einzelnen linearen Genome und deren Verpackung in die neu synthetisierten viralen Kapside. Die Zelllinie unterstützt den produktiven Zyklus von EBV und stellt in *trans* alle Proteine zur Verfügung, die für den Zusammenbau rekombinanter Viruspartikel nötig sind. Zusätzlich wird vom Maxi-EBV-Genom konstitutiv das verstärkt grün fluoreszierende Protein (eGFP) exprimiert. Durch transiente Expression des Transaktivators BZLF1, der die lytische Phase von EBV induziert, können transfizierte Plasmide, die sowohl die Verpackungssignale als auch den lytischen Replikationsursprung *oriLyt* tragen, verpackt und somit rekombinante Viren hergestellt und ins Medium freigesetzt werden (Delecluse et al., 1999).

Die so hergestellten Virusüberstände können mit Hilfe des Systems der "Green Raji-Units" quantifiziert werden. Dabei werden bestimmte Mengen des zu testenden Überstandes mit Raji-Zellen (eine Burkitt-Lymphom Zelllinie) inkubiert und diese drei Tage später im Durchflusszytometer auf die Expression von eGFP untersucht, die bei infizierten Zellen vorhanden sein sollte. Hierbei fiel auf, dass die Raji-Zellen nach Inkubation mit Zellkulturüberstand der Verpackungszelllinie immer eine gewisse Fluoreszenz zeigten und zwar unabhängig davon, ob in die Verpackungszellen ein verpackbares Plasmid transfiziert worden war oder nicht. Dieses Phänomen sollte nun näher untersucht werden.

4.1.2 Die Fluoreszenz der B-Zellen beruht auf einem GFP-Transfer, welcher durch Induktion des lytischen EBV-Zyklus verstärkt werden kann

Es ist bekannt, dass die Induktion des lytischen Zyklus in der Verpackungszelllinie TR/293 zur Produktion großer Mengen von leeren Viruspartikeln, sog. Virus-like-Particles (VLPs), führt. Da dem Virusgenom die sogenannten *terminal repeats fehlen*, wird nach der viralen Replikation die Virus-DNA nicht in die Kapside verpackt. In Folge dessen werden DNA-freie VLPs freigesetzt, welche in morphologischer Hinsicht vollständigen Viruspartikeln ähneln (Feederle et al., 2005). Die Vermutung lag nahe, dass die Fluoreszenz der mit dem Kulturüberstand dieser Zelllinie inkubierten Raji-Zellen auf solche Partikel zurückzuführen ist.

Aus diesem Grund wurden Raji-Zellen erneut mit Überständen der Verpackungszelllinie inkubiert, sowohl von nicht induzierten, wie auch von induzierten TR-Zellen. Des Weiteren wurde ein Teil der Überstände per Ultrazentrifugation aufkonzentriert.



c)

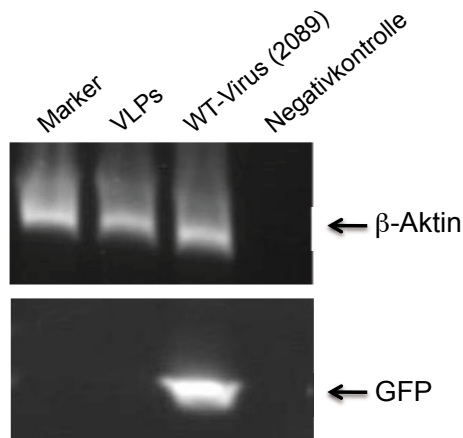


Abb. 4.1 : Bei diesem Experiment wurde die Induktion des lytischen Zyklus in der Verpackungszelllinie durch transiente Expression eines für BZLF1 codierenden Plasmids ausgelöst. Nach drei Tagen wurde der Überstand geerntet und restliche sich darin befindende Zellen durch Zentrifugation bei 300 g abgetrennt. Jeweils die Hälfte des Überstandes wurde Anschließend für 2 h bei 100.000 g zentrifugiert, um eine Anreicherung der darin enthaltenen Partikel um den Faktor 15 zu erreichen (konz. = konzentriert).

Je 3×10^5 Raji-Zellen wurden mit 300 μ l Zellkulturüberstand für 24 h inkubiert und Anschließend im FACS auf Grünfluoreszenz analysiert (a und b). Als Vergleichskontrolle dienten Raji-Zellen, die für 36 h mit infektiösem Wildtyp-Maxi-EBV-Virus (2089) inkubiert worden waren (b). Angegeben sind unter 4.1 a die Prozentsätze GFP-positiver Zellen und unter 4.1 b die jeweiligen Mittelwerte, bezogen auf die GFP-Fluoreszenz (MFI = mean fluorescence intensity). Die Y-Achsen-Skalierung % Max gibt die Zahl der Zellen der jeweiligen betrachteten Fluoreszenzintensität an, geteilt durch die Zahl der Zellen mit der Fluoreszenzintensität, die die meisten Zellen aufweisen. Diese Art der Skalierung normalisiert die Graphen so, dass sie alle die selbe Höhe aufweisen.

Abbildung 4.1 c zeigt die Ergebnisse einer Reversen Transkriptase-PCR. Hierbei wurden Raji-Zellen, die für 24 h mit VLPs inkubiert worden waren und im Durchflusszytometer Grünfluoreszenz zeigten, auf für das GFP-Protein codierende cDNA hin untersucht. Im Gegensatz zu mit dem Wildtyp-Maxi-EBV infizierten Zellen, welche GFP exprimieren und deshalb als Positivkontrolle herangezogen wurden, konnte in mit VLPs inkubierten Raji-Zellen keine GFP-cDNA nachgewiesen werden. Zur Kontrolle der cDNA-Qualität wurde das Housekeepinggen β -Aktin ebenfalls amplifiziert.

Nach 24 h wurden die Zellen im Durchflusszytometer auf ihre GFP-Fluoreszenz hin untersucht. Hier waren, je nach verwendetem Zellkultur-Überstand, klare Unterschiede ersichtlich. Wenn in den Verpackungszellen der lytische EBV-Zyklus eingeleitet worden war, zeigten Raji-Zellen, die mit Kulturüberstand dieser Zellen inkubiert worden waren, eine deutliche Grünfärbung (Abb. 4.1b, hellgrau). Diese ließ sich vermutlich auf die Freisetzung großer Mengen GFP-Protein enthaltender Partikel zurückführen. Die Partikel adhärten an Raji-Zellen, was zu einer Zunahme deren GFP-Fluoreszenz führte. Bei diesen Partikeln handelt es sich wahrscheinlich einerseits um die schon erwähnten leeren Virus-like-Particles (VLPs), andererseits ist ein derartiger Proteintransfer auch über Exosomen möglich. Seit mittlerweile knapp 20 Jahren ist bekannt, dass fast alle Zellarten Exosomen sezernieren, darunter auch Epithelzellen. Wenn die Zellen GFP in hoher Konzentration exprimieren, sollte dieses nach dem Zufallsprinzip auch in Exosomen verpackt werden. Die Grünfärbung der Raji-Zellen ist vermutlich auf beide Partikelarten zurückzuführen.

Darauf deutet die Beobachtung, dass sich bei Raji-Zellen, die mit Kulturüberstand nicht induzierter TR⁻-Zellen inkubiert worden waren, auch eine, wenn auch sehr schwach ausfallende, Fluoreszenz erkennen ließ (Abb. 4.1b, dunkelgrau). Da hier von den Verpackungszellen keinerlei virale Strukturproteine und damit auch keine VLPs gebildet werden, muss er allein auf die Bindung von Exosomen zurückzuführen sein.

Dass es sich um eine Übertragung von GFP-Protein handelte und nicht um GFP-codierende DNA konnte mit Hilfe einer RT-PCR gezeigt werden (Abb.4.1 c). So wurde GFP-cDNA in den mit dem Wildtyp-Virus inkubierten Rajis nachgewiesen, die als Folge der Infektion GFP aktiv exprimierten. Dies war bei den mit den TR⁻-Überständen inkubierten Zellen nicht der Fall. Dieser Umstand spiegelte sich auch in der Intensität der GFP-Fluoreszenz wieder, welche in den infizierten Zellen um ein Vielfaches stärker ausgeprägt war.

Aber auch die Intensität der Protein-vermittelten GFP-Fluoreszenz konnte durch Aufkonzentrieren der Zellkulturüberstände teilweise deutlich gesteigert werden. Dies erfolgte in dem gezeigten Versuch durch Ultrazentrifugation bei 100.000 g. Bei dieser Beschleunigung sedimentieren sowohl Exosomen als auch Virus-like-Particles, sodass sie im Anschluss in einem kleineren Volumen wieder aufgenommen werden können. So war im Falle der induzierten Überstände eine Erhöhung von sechs auf 43% grüner Rajis messbar, was mit einer Steigerung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI, *mean fluorescence intensity*) von 2,9 auf 12,1 einherging. Auch bei den nicht induzierten Kulturüberständen war dies der Fall, wenn sich hier die Zahl GFP-positiver Rajis auch nur um den Faktor 2 und die MFI von 2,7 auf 3,7 verbesserte. Auf diese Weise wurde auch deutlich, dass der Proteinübertrag nicht durch Bindung von löslichem GFP herrühren konnte, da in diesem Fall zur Aufkonzentrierung 100.000 g nicht ausgereicht hätten.

In späteren Versuchen wurden neben Überständen der Verpackungszelllinie auch solche aus normalen 293-Zellen hergestellt, in denen sich demzufolge nur Exosomen und keine Virus-like-Particles befanden. Zum besseren Verständnis wurden Partikel, welche von normalen 293-Zellen sezerniert wurden, im Folgenden als Exosomen, und solche, die von den Verpackungszelllinien nach Induktion des lytischen Zyklus freigesetzt wurden, als Virus-like-Particles bezeichnet. Trotzdem schließen Überstände mit VLPs aber immer auch Exosomen mit ein.

4.1.3 Vergleich zweier Methoden zur Konzentrierung von Partikeln aus dem Zellkulturüberstand

Die etablierte und in der Literatur beschriebene Vorgehensweise zur Aufreinigung von Exosomen ist die differenzielle Ultrazentrifugation. Auch Virus-like-Particles sollten bei dieser Methode mit aufkonzentriert werden (Théry et al., 2001).

Sie beruht auf einer Reihe von Zentrifugationsschritten des Zellkulturüberstandes mit steigender Beschleunigung, wobei in den ersten Schritten (300 g, 7000 g) verbliebene Zellen und Zellfragmente abgetrennt und im finalen Schritt (100.000 g) Exosomen und VLPs pellettiert werden. Eine weitere Möglichkeit zur Konzentration stellt die inverse Filtration dar, die den Ultrazentrifugationsschritt ersetzt. Um herauszufinden, welche Methode besser geeignet war, wurden TR⁻-Überstände zum Vergleich auf beide Weisen aufkonzentriert. Beiden Methoden gemeinsam sind die ersten Zentrifugationsschritte zur Eliminierung von Zellen bzw. Zellfragmenten sowie eine anschließende Filtration durch einen 0,8- μ m-Filter. Dann wurde der Überstand aufgeteilt und eine Hälfte mit Hilfe eines SW28-Rotors für 2 h bei 100.000 g unter sterilen Bedingungen zentrifugiert. Danach wurde das Pellett in 1 ml PBS, welches mit Proteaseinhibitoren aus Roche Mini Complete-Tabletten versetzt war, aufgenommen. Die zweite Hälfte wurde mittels Centriprep-Gefäßen mit einer Ausschlussgröße von 50 kDa so lange bei 1500 g zentrifugiert, bis das Suspensionsvolumen im äußeren Behälter auf 1 ml reduziert war. Auf diese Weise wurde durch beide Methoden eine Volumenreduktion von 15 ml auf 1 ml erzielt.

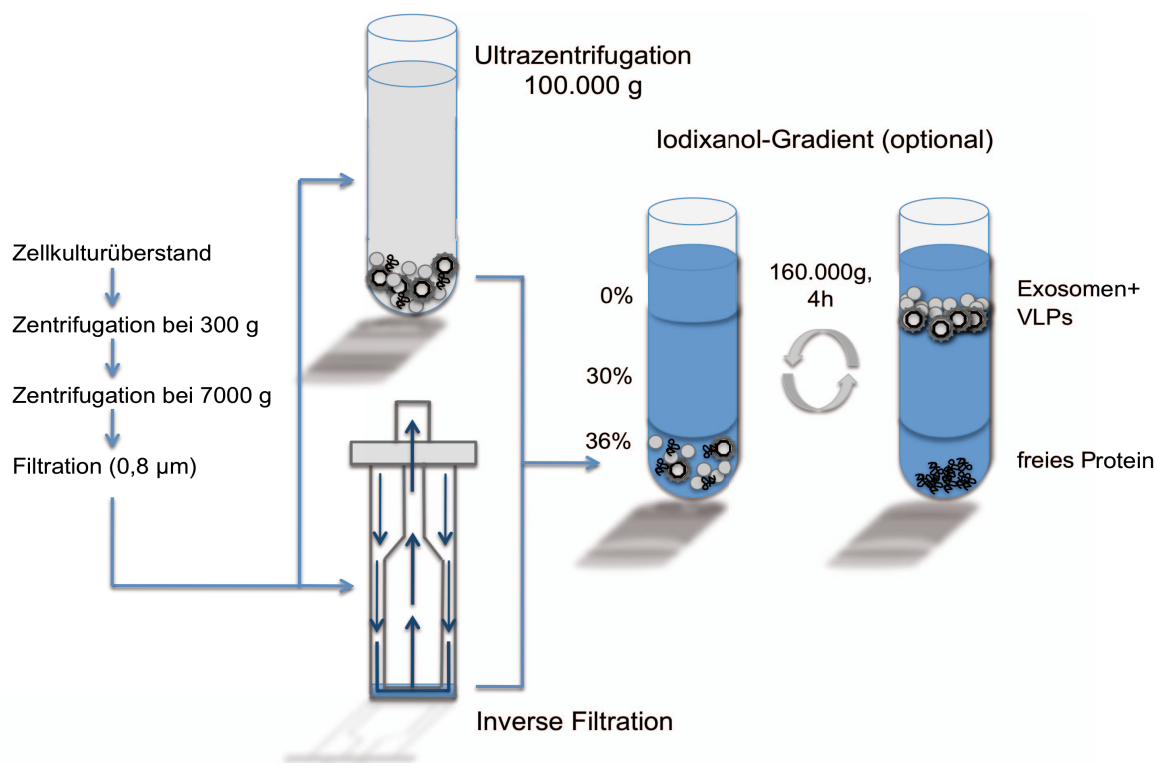


Abb. 4.2: Isolation von Exosomen und Virus-like-Particles aus Zellkulturüberstand

Drei Tage nach Induktion des lytischen Zyklus in TR⁻-Zellen (2×10^7) wurde der Zellkulturüberstand geerntet und zur Abtrennung von Zellen und Zellbruchstücken erst 10 min. bei 300 g und anschließend 30 min. bei 7000 g abzentrifugiert und filtriert. Im Anschluss daran wurden jeweils 15 ml durch Ultrazentrifugation für 2 h bei 100.000 g bzw. durch inverse Filtration in einem Centriprep-Gefäß 15-fach aufkonzentriert. Wenn eine hohe Reinheit vonnöten war, wurde die Exosomen/VLP-Suspension zusätzlich über einen Iodixanol-Gradienten aufgereinigt. Dabei wurden die konzentrierten Exosomen/VLPs mit 60%iger Optiprep-Lösung gemischt (36% Endkonzentration) und auf den Boden eines Ultrazentrifugationsröhrchens pipettiert. Dann wurde erst mit 2,5 ml 30%iger Optiprep-Lösung (in PBS) und dann mit 0,5 ml reinem PBS überschichtet. Nach zweistündiger Ultrazentrifugation bei 160.000 g befanden sich die sehr lipidreichen Exosomen aufgrund ihrer geringen Dichte in der obersten Phase, während sich die VLPs im Bereich der mittleren Phase ansammelten. Freies Protein weist eine hohe Dichte auf und blieb damit in der untersten Phase.

Um zu testen, in welchem der VLP-Konzentrate sich mehr Partikel befanden, sollte zuerst mittels der BCA-Methode nach Pierce deren Proteinkonzentrationen bestimmt werden. Hierbei wurde sehr schnell ein Nachteil der Centriprep-Konzentrierungsmethode deutlich. Da die Filter nur mit einer maximalen Ausschlussgrenze von 50 kDa erhältlich sind, wurden nicht nur Exosomen und VLPs aufkonzentriert, sondern auch große Proteine, wie z. B. Albumin. Dieser Umstand führte dazu, dass die durch die Filtration erhaltene VLP-Suspension sehr viskös war und die Konzentration an darin enthaltenem Protein teilweise mehr als 5 mg/ml

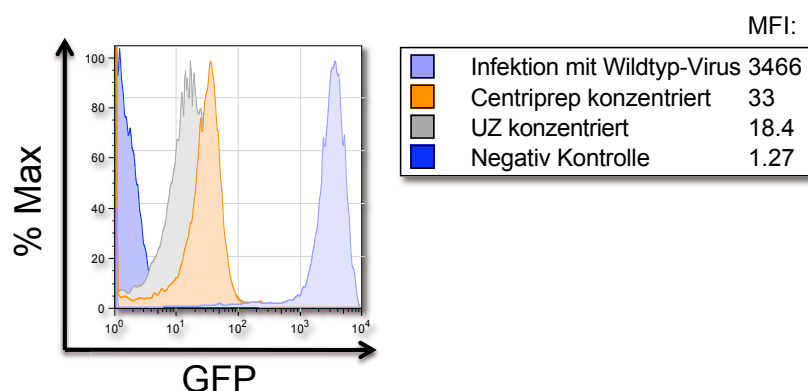
betrug, was demzufolge einer Proteinausbeute von 5 mg aus 1×10^7 Zellen entsprach. Dabei ließ sich nicht bestimmen, welchen Anteil daran exosomale Proteine bzw. Proteine aus Virus-like-Particles darstellten und welcher auf freies Protein zurückzuführen war.

Im Vergleich dazu handelte es sich bei dem mittels Ultrazentrifugation entstandenen Konzentrat um eine relativ reine VLP-Suspension in PBS, da das lösliche Protein im Überstand zurückblieb und damit abgetrennt wurde. Die durchschnittliche Ausbeute an VLPs betrug dabei 0,82 mg Protein pro 1×10^7 Zellen bei einer Standardabweichung von 0,36 mg. Da aus oben genanntem Grund kein Vergleich über die Proteinausbeute erfolgen konnte, wurde jeweils das gleiche Volumen (250 μ l) der Konzentrate mit 3×10^5 Raji-Zellen inkubiert und diese am darauf folgenden Tag im Durchflusszytometer auf GFP-Fluoreszenz untersucht.

Prinzipiell schienen beide Methoden zur Aufkonzentrierung von derartigen Partikeln aus Zellkulturüberstand geeignet zu sein. Die Grün-Fluoreszenz stellte sich als etwas stärker heraus in den Zellen, die mit den durch Centripreps aufkonzentrierten VLPs inkubiert worden waren (Abb. 4.3 a). Diese Methode hat gegenüber der Ultrazentrifugation den Vorteil, dass sie schneller ist (20 min im Vergleich zu ca. 3,5h) und weniger aufwändig, da dafür keine Zentrifugenbehälter sterilisiert werden müssen. Die Centriprep-Röhrchen selbst sind steril. Als äußerst nachteilig erwies sich aber die Tatsache, dass man keine reinen VLPs erhält, sondern das Konzentrat stark mit freiem Protein verunreinigt ist, so dass immer eine weitere Aufreinigung über einen Iodixanol-Gradienten nötig wird. Damit werden sämtliche Vorteile dieser Methode wieder zunichte gemacht. Aus diesem Grunde wurde im Folgenden zugunsten der Ultrazentrifugation als Methode der Wahl entschieden.

a)

b)



b)

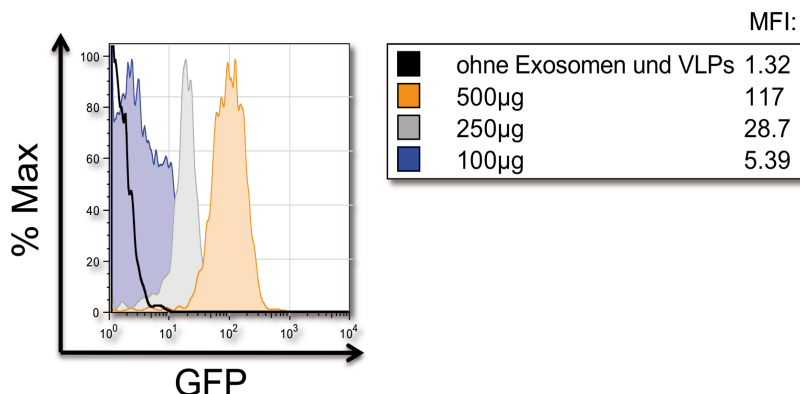


Abb. 4.3: Vergleich zweier Methoden zur Aufkonzentrierung von Exosomen und Virus-like-Particles

- a) Je 3×10^5 Raji-Zellen wurden mit 300 μ l Virus-like-Particles, die entweder durch Ultrazentrifugation (UZ konzentriert) oder mittels reverser Filtration (Centriprep konzentriert) aufkonzentriert worden waren, inkubiert. Nach 24 h wurden sie auf GFP-Fluoreszenz im Durchflusszytometer untersucht. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Raji-Zellen. Es ist zu erkennen, dass die gleiche Menge an Centriprep-Konzentrat zu einer stärkeren Anfärbung der Raji-Zellen führt als das durch Ultrazentrifugation entstandene und demnach vermutlich mehr GFP-positive VLPs enthält. Zum Vergleich ist wieder die Fluoreszenz von mit dem WT-Maxi-EBV-Virus infizierten Zellen gezeigt (MFI= *mean fluorescence intensity*)
- b) Inkubiert man steigende Mengen an VLP-Konzentrat (im oben gezeigten Beispiel erfolgte die Aufkonzentrierung durch Ultrazentrifugation) mit Raji-Zellen resultiert dies in einer immer stärker werdenden GFP-Fluoreszenz der Zellen. Bei den angegebenen Zahlen handelt es sich um die mittleren Fluoreszenzintensitäten.

4.1.4 Morphologische Charakterisierung der Exosomen durch Elektronenmikroskopie

Zur Visualisierung von multivesikulären Körperchen und Exosomen wurden in Kooperation mit dem Anatomischen Lehrstuhl II der LMU München elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. In Abbildung 4.4 a erkennt man ein multivesikuläres Körperchen aus 293-Zellen. Diese wurden zuvor in Agar eingebettet, fixiert, entwässert und in Araldit eingebettet. Der Aralditblock wurde in Ultradünnschnitte geschnitten und mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert.

Für die Aufnahmen der Exosomen wurden diese aus Zellkulturüberstand von 293-Zellen gewonnen, die mit einem Expressionsplasmid für gp350 (Abb. 4.4, b 1+2) bzw. Her2/neu (c 2+c 3) transfiziert worden waren. Die Exosomen wurden mit Hilfe eines Optiprep-Gradienten weiter aufgereinigt und die Gradientenfraction, deren Dichte der von Exosomen entsprach (1,05-1,07 g/ml) durch Ultrazentrifugation 30-fach

aufkonzentriert und anschließend mittels eines Optiprep-Gradienten weiter aufgereinigt. Die Gradientenfraction, deren Dichte der von Exosomen entsprach (1,05 g/ml) wurde durch eine zweite Ultrazentrifugation noch einmal um das 20-fache aufkonzentriert und in Sörensen-Puffer aufgenommen. Von dieser Suspension wurden jeweils 20 µl per Tröpfelmethode auf Grids aufgebracht und mit gp350- bzw. Her2/neu-spezifischen Antikörpern inkubiert. Zur Detektion wurden 10 nm große, mit α -Maus-spezifischem Antikörper gekoppelte Immungoldkugeln verwendet.

Trotz mehrerer Versuche konnte keine zufriedenstellende Qualität der Immunaufnahmen zur Detektion gp350-positiver Exosomen erreicht werden. Zwar konnten Ansammlungen von Goldpartikeln nachgewiesen werden, welche eine Exosomen entsprechende Größe aufwiesen (Abb. 4.4, b 1+2). Da die Kontrastierung aber nur sehr schlecht funktioniert hatte und keine, mit den Goldpartikeln assoziierte, Membran erkennen ließ, konnte nicht mit Sicherheit bestimmt werden, ob es sich dabei um Exosomen mit anhaftenden Goldkugeln handelte. Aus diesem Grund wurde neben tsg101, einem Molekül, welches an der Sortierung der exosomalen Proteine beteiligt ist und deshalb als Exosomenmarker gilt (Abb 4.4, c4), Her2/neu zur Markierung der Exosomen verwendet, da zur Färbung dieses Proteins bereits ein etabliertes Protokoll zur Verfügung stand. Her2/neu ist sehr häufig auf von Tumorzellen sezernierten Exosomen anzutreffen (Koga et al., 2005) und lässt sich nach Transfektion eines Her2/neu-codierenden Plasmids in 293-Zellen auch in von diesen freigesetzten Exosomen nachweisen. Dies wurde mittels eines Dot Blots auf Her2/neu überprüft (Abb. 4.4, c 4). Auch im Elektronenmikroskop konnten viele Partikel mit einer Exosomen entsprechenden Form und Größe (30-100 nm) detektiert werden, an deren Oberfläche Immungoldkugeln gebunden hatten. Zusammen mit der Tatsache, dass die Partikel die Exosomen entsprechende Dichte aufwiesen, kann mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass es sich wirklich um Exosomen handelte.

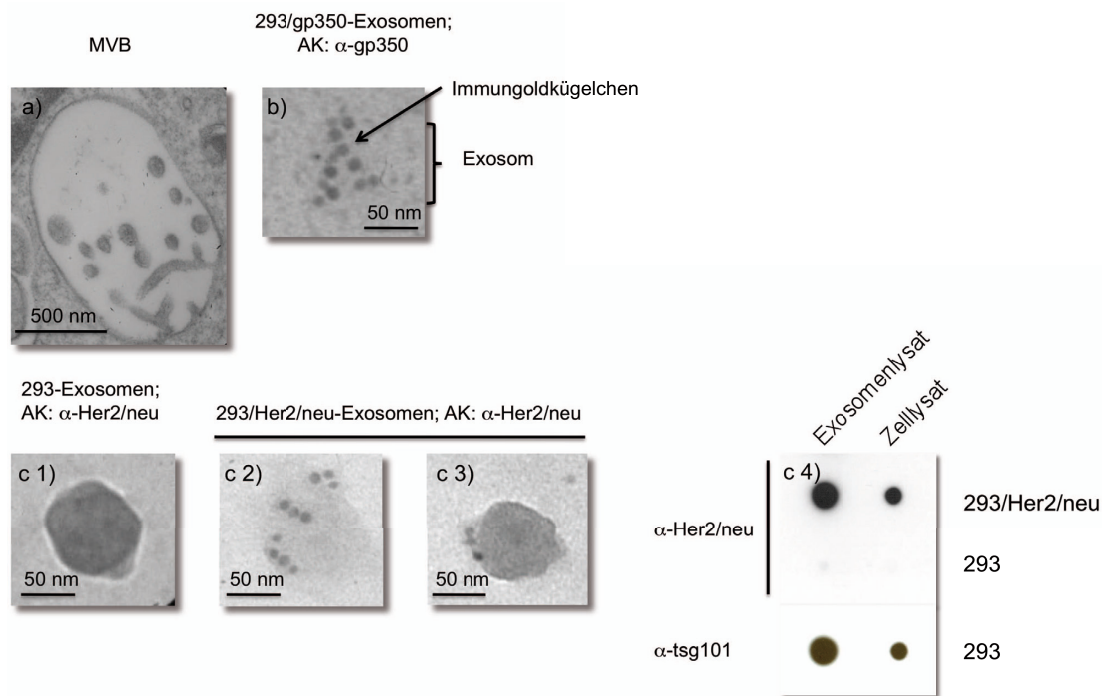


Abb. 4.4: Elektronenmikroskopische Aufnahmen

- Multivesikuläres Körperchen einer nicht vorbehandelten 293-Zelle in der Vergrößerung 6600x (multivesicular body, MVB). Die Zellen wurden für diese Aufnahme in Agar gegossen, mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid behandelt, in Araldit eingebettet und in Ultradünnschnitte geschnitten. Anschließend wurden die Schnitte mit Uranylacetat und Bleicitrat nach der Reynoldsmethode kontrastiert (genaueres Protokoll siehe Methodenteil Punkt 3.5.1).
- 293-Zellen wurden mit einem Plasmid für gp350 transfiziert und die anschließend produzierten Exosomen aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt. Nach Auftröpfeln des Exosomenkonzentrats auf elektronendichte Grids wurden sie mit α -gp350-Antikörper und dann mit α -Maus-Immungoldkugeln inkubiert. Die dunklen Pünktchen könnten an Exosomen gebundene Immungoldpartikel darstellen.
- 293-Zellen wurden mit einem Her2/neu-Expressionsplasmid transfiziert und anschließend die produzierten Exosomen erst im Dot Blot (c 4, als Negativkontrolle untransfizierte 293-Zellen und als Positivkontrolle der Nachweis des exosomalen Markerproteins tsg101) und dann mittels Immunelektronenmikroskopie auf dieses Antigen hin untersucht (c 2 und c 3). Als Negativkontrolle wurden auch 293-Exosomen ohne Her2/neu mit dem α -Her2/neu-Antikörper inkubiert (c 1). Für die Aufnahmen von Exosomen wurden Vergrößerungen zwischen 39.000-fach und 52.000-fach verwendet.

4.1.5 EBV-Proteine vermitteln die selektive Bindung von VLPs an B-Zellen

Da EBV ein B-lymphotropes Virus ist, war es interessant, zu wissen, ob EBV-VLPs ebenso nur selektiv an B-Zellen oder aber auch an andere Zellpopulationen binden. Um dies herauszufinden, wurden Virus-like-Particles mit Gesamt-PBMCs inkubiert und, wiederum nach 24 h, auf eine eventuelle Grünfärbung analysiert.

Hierbei wurde ein klarer B-Zell-Tropismus der VLPs deutlich. Nur CD21-positive Zellen, also B-Lymphozyten, zeigten eine GFP-Fluoreszenz, während die anderen Zellpopulationen nicht angefärbt wurden (Abb. 4.5 b). CD21 wird zwar nicht ausschließlich nur von B-Zellen exprimiert. Auch bestimmte Subpopulationen von T-Zellen exprimieren diesen Rezeptor. Die Expressionsstärke ist im Vergleich zu derjenigen in B-Zellen aber um den Faktor 10 verringert, was sich im Durchflusszytometer aufgrund der deutlich niedrigeren Fluoreszenzintensität bemerkbar gemacht hätte, wären solche Zellen vorhanden gewesen (Fischer et al., 1991). Daneben wird CD21 auch von follikulären dendritischen Zellen gebildet. Da diese in Follikeln sekundärer Lymphorgane zu finden sind, kann man davon ausgehen, daß nur sehr wenig bis gar keine FDCs in den aus Blut gewonnenen PBMCs enthalten sind. Dass alle CD21-positiven Zellen im FACS grün erschienen, weist auf eine sehr hohe Effizienz der VLPs hin.

Da EBV einen ausgeprägten B-Zelltropismus besitzt und keine anderen Zellen des peripheren Blutes infiziert, lag die Vermutung nahe, dass die selektive Bindung durch ein oder mehrere virale Proteine auf der Oberfläche der VLPs vermittelt wird. Am ehesten in Betracht kommen hier die Moleküle gp350 und gp42. Ersteres, das auf der Virushülle am häufigsten vorkommende Glykoprotein, bindet an den CD21-Rezeptor. Zwar ist gp350 nicht essentiell für eine Infektion, gp350-deletierte Virusmutanten weisen aber eine um 90% reduzierte Infektionseffizienz im Vergleich zum Wildtyp auf (Janz et al., 2000). Auch gp42, welches an MHC-Moleküle der Klasse II bindet, spielt eine wichtige Rolle während des Infektionsprozesses.

Um zu untersuchen, welchen Anteil diese Proteine am B-Zelltropismus der VLPs ausmachen, wurden Exosomen hergestellt, welche keines, nur eines oder aber beide Glykoproteine in Kombination auf ihrer Oberfläche trugen. Dies geschah durch Transfektion der jeweiligen Expressionsplasmide in 293- Zellen. Zur Quantifizierung der Bindungseffizienz wurde immer zusätzlich ein GFP-Plasmid mittransfiziert. Die daraufhin produzierten Exosomen bauten die neu synthetisierten Proteine in ihre Membranen ein, bevor sie ins Kulturmedium freigesetzt wurden. Nach Aufkonzentrierung der Exosomen wurden diese wiederum mit Raji-Zellen inkubiert und die Zellen im Durchflusszytometer auf GFP-Fluoreszenz analysiert (Abb. 4.5 a).

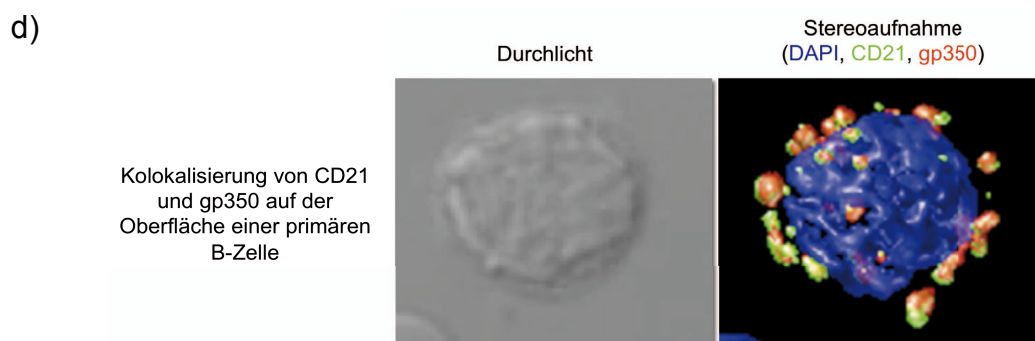
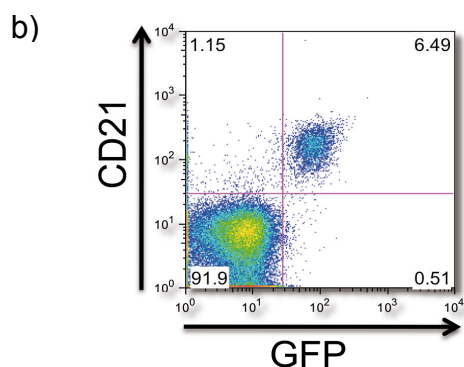
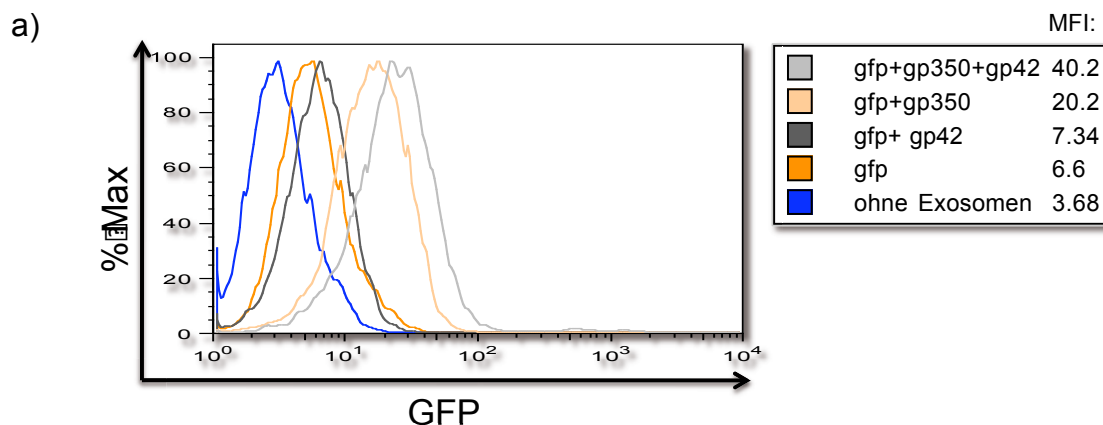


Abb. 4.5: EBV-Proteine vermitteln die selektive Bindung an B-Zellen

- a) Zur Quantifizierung des Anteils der viralen Glykoproteine gp350 und gp42 an der Effizienz der Bindung von VLPs und Exosomen an B-Zellen wurden Exosomenüberstände hergestellt, welche die Proteine jeweils alleine und in Kombination enthielten. Außerdem wurde gleichzeitig immer ein für GFP codierendes Expressionsplasmid transfiziert. Auf diese Weise konnte die Bindung der Exosomen an Raji-Zellen quantifiziert werden. Die Zellen wurden für 24 h mit je 500 μ g Exosomen inkubiert und dann im FACS analysiert (MFI= *mean fluorescence intensity*).
- b) Frisch aus Blut isolierte PBMCs wurden für 24 h mit GFP-positiven VLPs inkubiert und anschließend wurde untersucht, an welche Zellen eine Bindung erfolgte. Eine GFP-Fluoreszenz war ausschließlich bei der CD21-positiven Zellpopulation erkennbar. Keine messbare Bindung erfolgte an CD21-negative Zellen, bei denen es sich v.a. um T-Lymphozyten, Monozyten und NK-Zellen handelt.

- c) 3×10^5 Raji-Zellen wurden über Nacht mit 100 μg VLPs inkubiert, die aus Kulturüberstand von TR⁻-Zellen isoliert worden war, in welchen zuvor der lytische EBV-Zyklus ausgelöst worden war. Im Anschluss daran wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt und im Konfokalmikroskop untersucht, wobei der Laser mit der Wellenlängen 488 nm verwendet wurde. Gezeigt wird eine 2D-Aufnahme aus einer 3D-Rekonstruktion. Die den VLPs entsprechenden grünen Punkte auf der Oberfläche der Zelle sind klar erkennbar.
- d) Für diese Konfokalaufnahme wurden PBMCs für 24 h mit Exosomen inkubiert, die gp350 exprimierten. Anschließend wurde mit DAPI und Antikörpern spezifisch für gp350 (Cy5-markierter Sekundärantikörper, rot) und CD21 (FITC-markiert, grün) gefärbt. Für die Aufnahmen wurden die Laser mit den Wellenlängen 488 nm (FITC) und 633 nm (Cy5) verwendet. Durch Übereinanderlegen mehrerer Aufnahmen wurde wieder ein 3D-Effekt erzeugt. Es ergab sich eine erkennbare Kolo-kalisation der beiden untersuchten Moleküle (gelbe Färbung). Da sich Ersteres auf den Exosomen und CD21 auf der Oberfläche der B-Zelle befindet, lässt dies vermuten, dass die Bindung der Exosomen, ähnlich wie bei EBV selbst, über eine Interaktion zwischen gp350 und CD21 erfolgt.

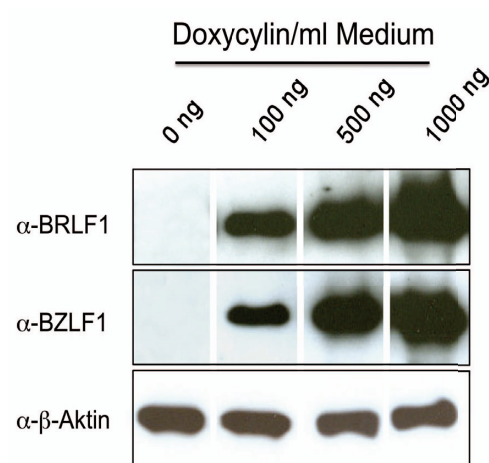
Als Negativkontrolle dienten Exosomen, die nur GFP trugen. Auch bei diesen war eine, wenn auch recht schwache, Bindung an die Raji-Zellen sichtbar (MFI von 6,6). gp42 (MFI 7,34) alleine verbesserte zwar die Affinität der Exosomen minimal, aber längst nicht so deutlich wie gp350 (MFI 20,2). Waren beide Proteine gleichzeitig auf den Exosomen vorhanden, ließ sich eine sehr deutliche Steigerung der Bindungseffizienz nachweisen, erkennbar an der doppelt so hohen Fluoreszenzintensität der Raji-Zellen (MFI 40,2) im Vergleich mit nur gp350-enthaltenden Exosomen. Dass gp350 an der Bindung von Exosomen an B-Zellen beteiligt ist, konnte auch durch die Kolo-kalisation des Moleküls mit dem CD21-Rezeptor mittels Konfokalmikroskopie bestätigt werden (Abb. 4.5 d). Dafür wurden PBMCs für 24 h mit Exosomen aus 293-Zellen, welche zuvor mit einem gp350-Plasmid transfiziert worden waren, inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gegen gp350 (aus der Maus) und den CD21-Rezeptor (direkt FITC-gekoppelt) gefärbt. Als Sekundärantikörper wurde α -Maus-Cy5 verwendet.

4.1.6 Herstellung einer Zelllinie, bei der die Induktion des lytischen EBV-Zyklus durch Zugabe von Doxyzyklin erfolgt

Um die Verpackungszelllinie TR⁻ zur VLP-Produktion anzuregen, musste jedes Mal durch transiente Transfektion eines für BZLF1 codierenden Expressionsplasmids der lytische Zyklus induziert werden. Trotz gleicher Vorgehensweise ergaben sich immer wieder Unterschiede in der Transfektionseffizienz (die Zahl transfizierter Zellen variierte zwischen 60-95%), was wiederum zu sehr variierenden VLP-Ausbeuten führte. Da die Transfektion außerdem vergleichsweise aufwändig ist, sollte der Prozess der Herstellung von Virus-like-Particles vereinfacht werden.

Aus diesem Grund wurde die Zelllinie TR⁻ so verändert, dass sich der lytische Zyklus allein durch Zugabe des Antibiotikums Doxzyklin auslösen ließ. Als Basis diente der episomal replizierende Vektor pRTS-1, welcher via Tet-Regulation (“Tet on“-System) die gleichzeitige konditionelle Expression von zwei Genen ermöglicht (Bornkamm et al., 2005). Dabei werden konstitutiv sowohl ein Tet-responsiver Transkriptionsaktivator als auch dessen Gegenspieler, ein Tet-Repressor, exprimiert. Letzterer bindet in Abwesenheit von Tetrazyklin oder eines Tet-Derivats, wie Doxzyklin, an den bidirektionalen Promotor P_{tet} bi-1 und sorgt für dessen “Silencing”. Die Zugabe von Doxzyklin resultiert in der Dissoziation des Silencers und, durch Bindung an die Tet-Transaktivierungsdomäne, zum Anschalten des P_{tet} bi-1-Promotors. Hinter diesen Promotor wurden, in entgegengesetzter Richtung, die Gene BZLF1 und BRLF1 kloniert und der entstandene Vektor (p3989) stabil in TR⁻-Zellen eingebracht. Dann wurde durch Hinzufügen unterschiedlicher Doxzyklinmengen (100, 500 und 1000 ng/ml) ins Zellkulturmedium die Expression der beiden Gene ausgelöst. Nach 36h wurde diese mittels eines Western Blots überprüft.

a)



b)

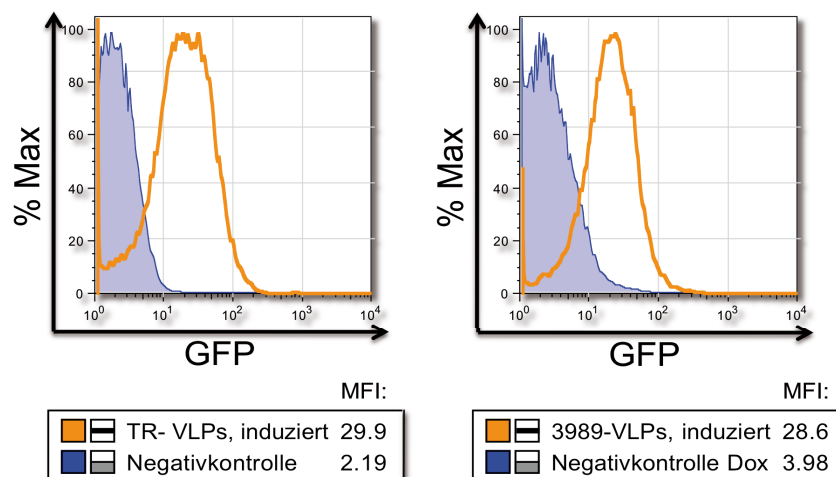


Abb. 4.6: Herstellung einer Zelllinie, bei der die Induktion des lytischen EBV-Zyklus durch Zugabe von Doxzyklin erfolgt (vorherige Seite)

- a) Die Verpackungszelllinie TR⁻ wurde stabil mit dem Plasmid p3989, einem Vektor zur konditionellen Expression der Induktorgene BZLF1 und BRLF1, transfiziert. Die Zugabe von Doxzyklin in unterschiedlichen Mengen ins Medium löste die Aktivierung des bidirektionalen Promotors P_{tet} bi-1 und damit die gleichzeitige Transkription der beiden Gene aus. Die Expressionsstärke wurde anschließend in einem Western Blot ermittelt. Hier ließ sich eine deutliche Graduierung in Abhängigkeit der verwendeten Doxzyklinkonzentration erkennen.
- b) In der stabil transfizierten Zelllinie 3989 wurde durch Zugabe von Doxycylin ins Zellkulturmedium in einer Endkonzentration von 1000ng/ml der lytische EBV-Zyklus und damit die Produktion von VLPs (3989-VLPs) ausgelöst. Dasselbe wurde in TR⁻-Zellen durch transiente Transfektion von BZLF1 und BRLF1 erreicht (TR⁻-VLPs). Die entstandenen VLPs wurden nach drei Tagen aus dem Überstand extrahiert, für 24 h mit Raji-Zellen inkubiert und im Durchflusszytometer auf Grünfluoreszenz untersucht. Als Negativkontrolle wurden Exosomen aus 293-Zellen verwendet, die mit einem gp350-Expressionsplasmid transfiziert worden waren. Die Verwendung von Doxycylin in hohen Konzentrationen führt dazu, dass sich dieses auch in den produzierten VLPs wiederfindet. Da es selbst eine gewisse, im GFP-Kanal detektierbare, Eigenfluoreszenz aufweist, musste diese vom GFP-Signal abgezogen werden. Als Negativkontrolle zu den 3989-VLPs wurden deshalb Partikel aus dem Zellkulturüberstand von 293-Zellen herangezogen, die, nach Transfektion eines gp350-Expressionsplasmids, in Anwesenheit von Doxycylin kultiviert worden waren (1000 ng/ml). Auf diese Weise ergaben sich für die VLPs aus beiden Zelllinien (TR⁻ und 3989) fast die gleichen Werte.

Aus Abbildung 4.6 a) wird ersichtlich, dass das induzierbare Vektorsystem zu funktionieren schien. Wie in der Literatur über diesen Vektor beschrieben, reagierten die Zellen auf die Zugabe einer höheren Doxzyklinkonzentration mit einer gesteigerten Expression der Gene BZLF1 und BRLF1. Nun sollte noch untersucht werden, ob die daraufhin produzierten Virus-like-Particles quantitativ vergleichbar mit denen waren, welche durch transiente Transfektion von BZLF1 und BRLF1 in TR⁻-Zellen entstehen. Das zusätzliche, für das Rta-Protein codierende BRLF1-Gen sollte die Induktion des lytischen EBV-Zyklus noch weiter verstärken.

Nachdem in TR⁻-Zellen und in 3989-Zellen der lytische Zyklus und damit die Produktion von VLPs durch Transfektion eines BZLF1-Plasmids und, zur besseren Vergleichbarkeit, eines BRLF1-Plasmids einerseits (TR⁻) bzw. durch Zugabe von 1000 ng Doxzyklin pro ml Medium (3989) andererseits, ausgelöst worden war, wurden diese wie beschrieben geerntet und aus dem Überstand extrahiert. Anschließend erfolgte, wie üblich, eine Inkubation mit Raji-Zellen und eine Analyse deren Grünfluoreszenz (Abb. 4.6 b).

Ein kleiner Nachteil der Verwendung von Doxzyklin war seine grüne Eigenfluoreszenz. Exosomen und VLPs, welche von Zellen sezerniert wurden, die in Doxzyklin-Medium wuchsen, nahmen dieses ebenfalls auf und leuchteten grün.

Infolgedessen taten dies auch die mit solchen Exosomen bzw. VLPs inkubierten Raji-Zellen, und zwar unabhängig von der Tatsache, ob die Produzentenzellen gleichzeitig noch GFP exprimierten. Dies erschwerte anfangs etwas die Quantifizierung der VLP-Konzentrate. Sie war aber trotzdem möglich, wenn die auf das Doxyzyklin zurückzuführende Fluoreszenz im ersten Kanal des Durchflusszytometers vom GFP-Signal abgezogen wurde. Dafür war es notwendig, als Negativkontrolle Raji-Zellen heranzuziehen, die mit Exosomenkonzentraten von in Doxyzyklinmedium kultivierten 293-Zellen inkubiert worden waren. Die Fluoreszenz dieser Exosomen beruhte also allein auf Doxyzylin, und nicht auf GFP. Damit sie als Kontrolle herangezogen werden konnten, mussten sie eine ähnlich gute Bindungseffizienz an die Raji-Zellen zeigen wie VLPs. Aus diesem Grund wurde in die produzierenden 293-Zellen gp350 transfiziert. Nachdem Raji-Zellen für 24 h mit den Exosomen inkubiert worden waren, wurde deren Fluoreszenz im GFP-Kanal als Nullwert festgelegt. Auf diese Weise konnten die VLP-Überstände der beiden Zelllinien TR⁻ und 3989 verglichen werden. Dabei ergab sich, bei der Verwendung von 1000 ng Doxyzyklin/ml, kaum ein Unterschied, was die VLP-Ausbeute betraf (Abb. 4.6 b). Aus diesem Grund wurde in späteren Versuchen, in denen die vom Doxyzyklin verursachte Hintergrundfluoreszenz für das Experiment selbst nicht störend war, diese Zelllinie für die Produktion von Virus-like-Particles verwendet.

4.2 Untersuchung des immunogenen Potentials von 293-Exosomen und VLPs in Hinsicht auf eine prinzipielle Eignung als EBV-Impfstoff

4.2.1 In Vitro-Versuche

4.2.1.1 Stimulation von EBV-spezifischen CD4⁺-T-Zellklonen

Virus-like-Particles werden schon seit längerem als Immunogene verwendet. Hier sind v.a. die Vakzine gegen humane Papillomviren und das Hepatitis B-Virus zu erwähnen.

In den letzten Jahre konnten von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass sich auch Exosomen zur Induktion von spezifischen Immunantworten eignen. Pionierarbeit leistete hierbei die Gruppe um L. Zitvogel, die zeigen konnte, dass Exosomen aus dendritischen Zellen spezifische T-Zellantworten auslösen können,

welche vergleichbar sind mit denjenigen, die durch reife DCs hervorgerufen werden und die in einem murinen Vakzinierungsmodell ebenso zu einer zuverlässigen Tumorabstoßung führten (Wolfers et al., 2001). Mittlerweile wurden schon mehrere klinische Studien durchgeführt, in denen Melanom-, Darm- und Lungenkrebspatienten erfolgreich mit Exosomen immunisiert wurden (Escudier et al., 2005; Morse et al., 2005).

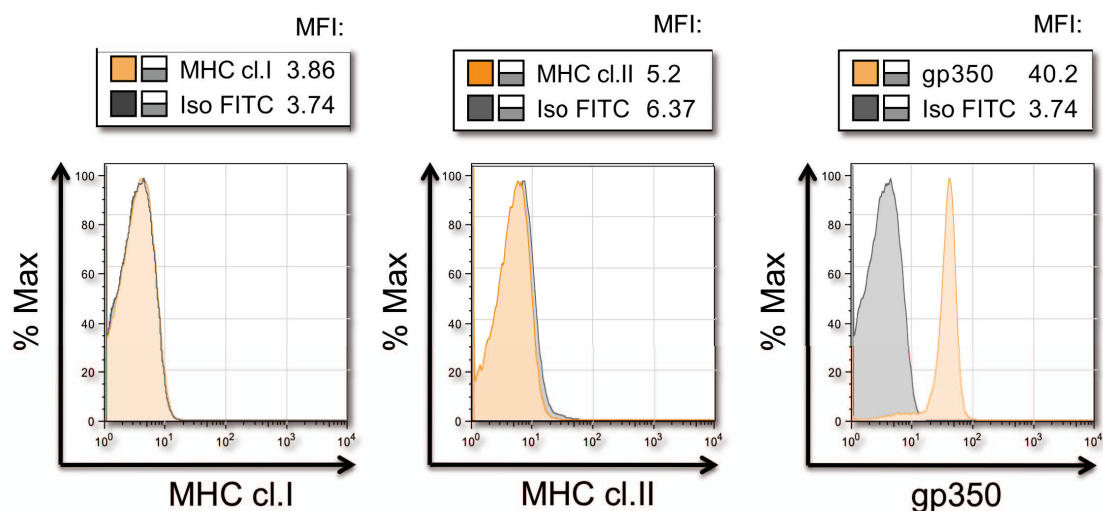
Bei praktisch all diesen Immunisierungsversuchen wurden entweder Exosomen aus Tumorzellen (TEX) oder aber aus antigenpräsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen (DEX) oder B-Zellen, verwendet. Exosomen aus APCs tragen in ihrer Membran sämtliche für die Antigenpräsentation notwendigen Moleküle in hoher Zahl. Deshalb war es nicht überraschend, dass Exosomen aus antigenpräsentierenden Zellen, v. a. aus DCs, nach Beladung mit immunogenen Peptiden T-Zellen direkt stimulieren können, ohne dass eine Aufnahme und Präsentation durch APCs vonnöten ist (Kovar et al., 2006; Admyre et al., 2006).

Die in unseren Experimenten verwendeten Exosomen stammen nicht aus antigenpräsentierenden, sondern aus HEK 293-, und damit Epithelzellen. Sie besitzen bekanntermaßen keine MHC Klasse II-Moleküle, und auch MHC I wird, zumindest von den in unserem Labor verwendeten 293-Linien, praktisch nicht exprimiert (Abb. 4.7 a). Beide Typen von MHC-Molekülen sollten folglich auch nicht auf deren Exosomen anzutreffen sein. Um dies zu testen wurden 293-Zellen mit Plasmiden für gp350 und gp140, dem Haupttegumentprotein von EBV, transfiziert, drei Tage später die sezernierten Exosomen aus dem Überstand extrahiert und an Aldehyd-Latex-Beads gebunden. Dann wurden sie mit Primärantikörpern, spezifisch für MHC I, MHC II oder gp350 und Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern gefärbt und im FACS, zusammen mit den jeweiligen Isotypkontrollen, analysiert.

Wie erwartet und in Abb. 4.7 a dargestellt, wurden keinerlei HLA-Moleküle auf den Exosomen exprimiert. gp350 konnten dagegen nachgewiesen werden. Letzteres konnte auch durch Dot Blots bestätigt werden. Neben gp350 ließ sich so auch gp140, das Haupttegumentprotein von EBV, in Exosomen und VLPs nachweisen. Dabei wurden die in Abb. 5 a verwendeten Exosomen und VLPs, wie in Abb. 2 beschrieben, auf einen diskontinuierlichen Iodixanolgradienten geladen und zentrifugiert. Dann wurden von oben her acht Fraktionen abgenommen, von jeder Fraktion ein Aliquot auf eine Zellulosemembran aufgebracht, mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert und entwickelt. Diejenigen Fraktionen, die die für Exosomen und VLPs spezifische Dichte

aufwiesen, resultierten in Spots, ein Hinweis darauf, dass die Proteine Vesikelassoziiert sind (Abb. 4.7b). Die Anwesenheit von gp140 und gp350 war Voraussetzung für die folgenden Versuche, in denen CD4⁺-T-Zellkone, spezifisch für genau diese Antigene, mit Exosomen und VLPs stimuliert werden sollten.

a)



b)

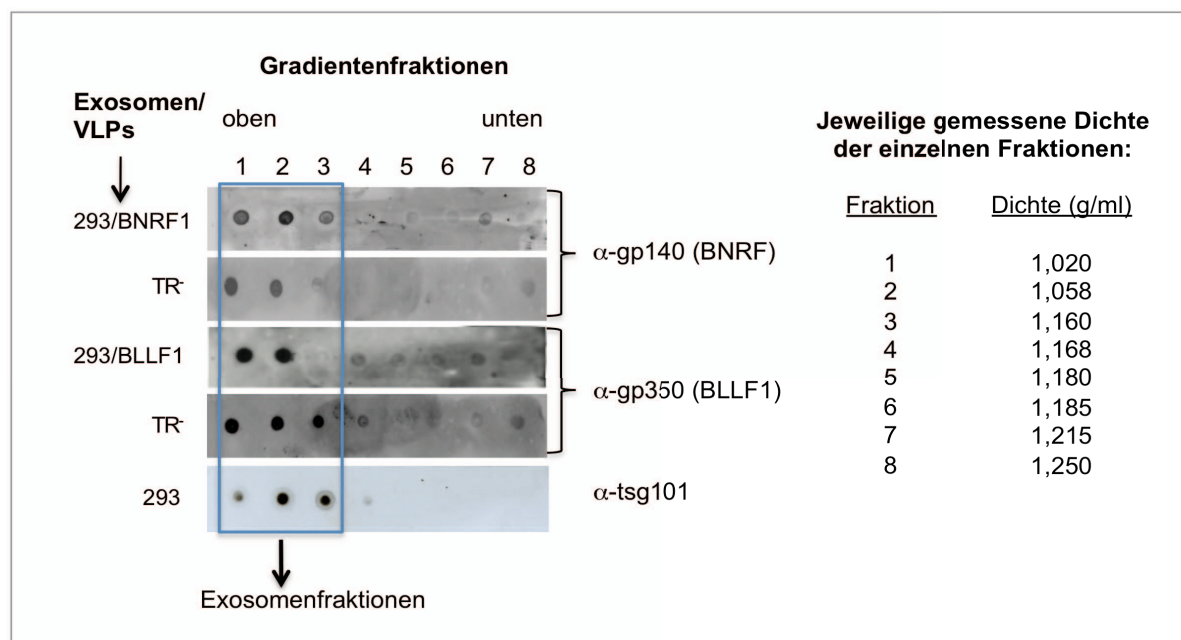


Abb. 4.7:

a) Aus dem Überstand von 293-Zellen, welche mit einem Expressionsplasmid für BLLF1 (gp350) transfiziert worden waren, wurden Exosomen extrahiert, an Sulfat-Aldehyd-Latex-Beads gekoppelt und mit Antikörpern gegen MHC I, MHC II-Moleküle und gp350 gefärbt.

Während die Expression des viralen Glykoproteins in dessen Verpackung in Exosomen resultierte, konnten keine HLA-Moleküle nachgewiesen werden.

- b) Aufkonzentrierte Exosomen aus Zellen, welche unbehandelt oder mit Expressionsplasmiden für BLLF1 und BNRF1 (gp140) transfiziert worden waren, und Virus-like-Particles wurden auf einen Optiprep-Gradient geladen und ultrazentrifugiert (160.000 g). Anschließend wurden von oben her acht Fraktionen abgenommen und im Dot Blot auf gp140, gp350 und tsg101 (als exosomales Markerprotein) hin untersucht. Die Proteine waren vor allem in den Fraktionen 1-3 nachzuweisen, die die Dichten 1,035-1,110 g/ml aufwiesen. Die Tatsache, dass Exosomen mit ihrer charakteristische Dichte von 1,05-1,07 g/ml ebenfalls in diesen Fraktionen flotieren, lässt den Schluss zu, dass die Proteine mit diesen assoziiert sind.

4.2.1.1.1 Keine direkte Stimulation von CD4⁺-T-Zellen durch Exosomen

Um zu untersuchen, ob auch 293-Exosomen T-Zellen direkt stimulieren können, wurde ein Expressionsplasmid für gp140 in 293-Zellen transfiziert. Anschließend wurden die Exosomen isoliert und, alleine oder gekoppelt an Beads, mit jeweils 10⁴ CD4⁺ monoklonalen T-Zellen inkubiert. Diese (Klon 1H7, zur Verfügung gestellt von Dr. Josef Mautner) erkannten spezifisch das Haupttegumentprotein von EBV, gp140. 24 h nach Inkubation der aufkonzentrierten Exosomen mit den T-Zellen wurde mittels eines ELISAs das Vorhandensein von GM-CSF, ein Zytokin, das von aktivierten T-Zellen freigesetzt wird, im Überstand der Zellen gemessen. Wie erwartet erfolgte keine Reaktivierung der T-Zellen durch ungebundene Exosomen ohne Anwesenheit von antigenpräsentierenden Zellen. Eine direkte Stimulation von CD4⁺ -T-Zellen mit Exosomen aus HEK 293-Zellen ist demnach nicht möglich.

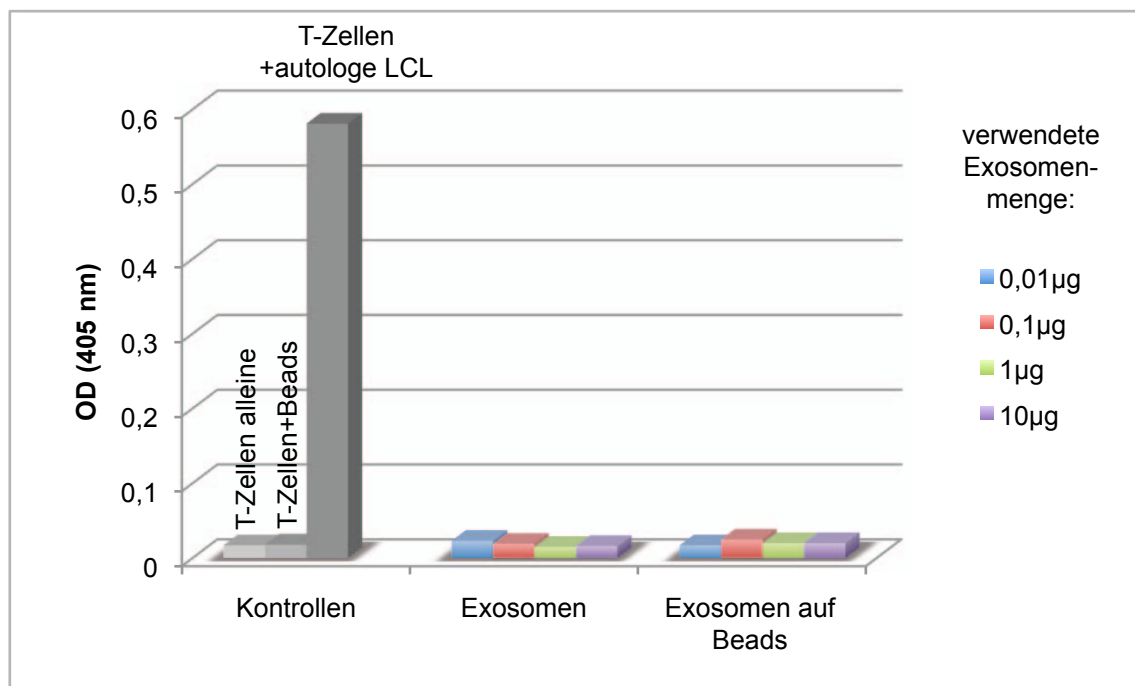


Abb. 4.8: Keine direkte Stimulation von CD4⁺-T-Zellen durch Exosomen oder Exosomen-beladene Beads

293-Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid für BNRF1 (codierend für gp140) transfiziert. Nach drei Tagen wurden die produzierten Exosomen aus dem Überstand isoliert, zum Teil an Aldehyd-Latex-Beads gekoppelt, und die jeweilige angegebene Menge mit je 10^4 CD4⁺ T-Zellen (spezifisch für gp140) inkubiert. Nach 24 h wurde mittels eines ELISAs die Sekretion von GM-CSF in den Überstand gemessen.

4.2.1.1.2 Effiziente Stimulation CD4⁺-T-Zellen nach Aufnahme der Exosomen und VLPs durch antigenpräsentierende Zellen

Als nächstes sollte untersucht werden, ob Exosomen T-Zellen stimulieren können, nachdem sie von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen wurden. Aufgrund des ausgeprägten B-Zelltropismus` EBV-Protein-enthaltender Virus-like-Particles und Exosomen boten sich hierfür B-Lymphozyten an. Die im folgenden Versuch verwendeten Mini-LCLs sind lymphoblastoide B-Zelllinien, die mit einem rekombinanten Mini-EBV transformiert worden waren (Kempkes et al, 1995; Moosmann et al., 2002). Diesem EBV-Genom fehlen fast alle lytischen und strukturellen Proteine (so auch gp350 und gp140), so dass keine Viruspartikel freigesetzt werden können. Eine Stimulation der T-Zellen durch die APCs selbst konnte auf diese Weise ebenso ausgeschlossen werden.

Jeweils 5×10^4 Mini-LCLs wurden über Nacht mit unterschiedlichen Mengen konzentrierter Exosomen und VLPs inkubiert, die gp140 und gp350 trugen. gp350 sollte für einen B-Zell-Tropismus der Partikel sorgen. Die auf diese Weise beladenen Mini-LCLs wurden anschließend mit jeweils 10^4 gp140-spezifischen T-Zellen (Klon 1H7) inkubiert. Mini-LCLs und T-Zellen stammten dabei aus demselben Spender. Die Ermittlung der produzierten Zytokinmenge (GM-CSF) erfolgte wieder nach 24 h mittels eines ELISAs.

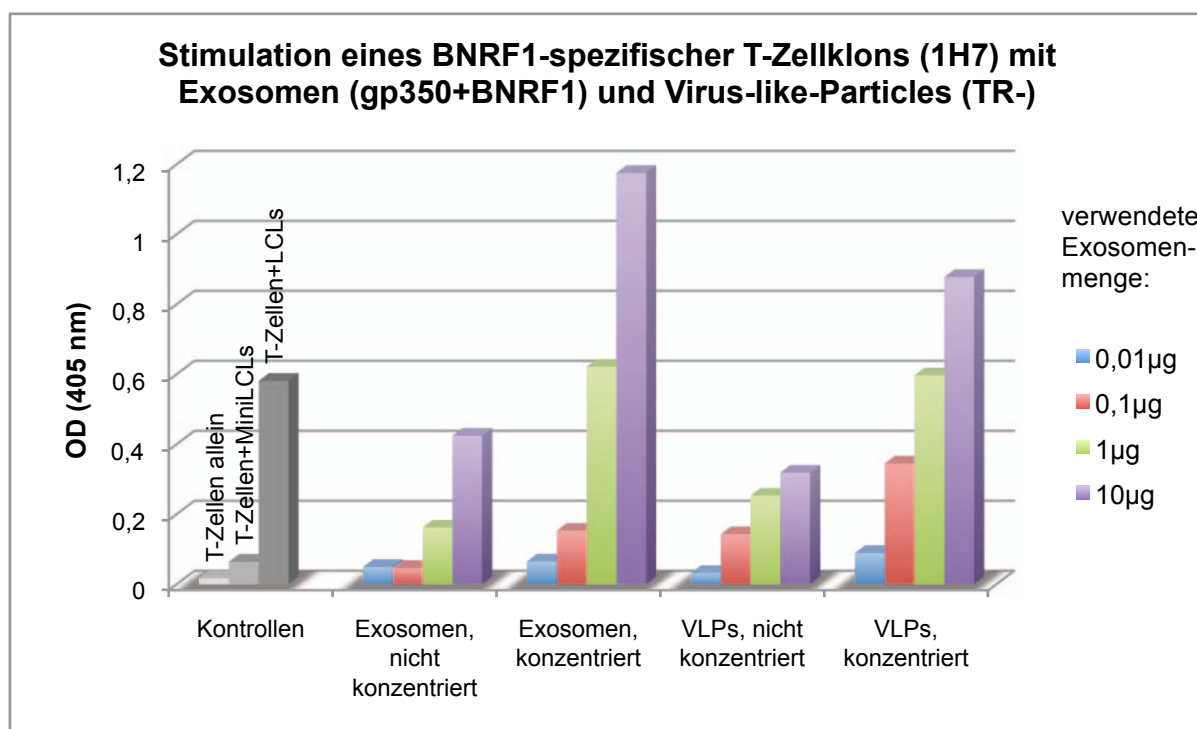


Abb. 4.9: Reaktivierung eines B NRF1-spezifischen CD4+-T-Zellklons durch Exosomen und Virus-like-Particles

Exosomen und Virus-like-Particles wurden mittels Ultrazentrifugation aufkonzentriert und für 24 h mit HLA-gematchten (Restriktion über HLA DR1) Mini-LCL-Zellen inkubiert. Die beladenen B-Zellen wurden dann zu T-Zellen gegeben, welche spezifisch ein Epitop von gp140, dem Haupttegumentprotein von EBV, erkennen. Die erfolgte Stimulation der T-Zellen wurde nach 24 h anhand der GM-CSF-Ausschüttung im ELISA quantifiziert.

Schon kleine Mengen von Exosomen und VLPs führten zu einer Reaktivierung des T-Zellklons. Bei steigender Antigenmenge kam es erwartungsgemäß auch zu einer verstärkten Zytokinproduktion.

Als Positiv-Kontrolle für die Funktionalität der T-Zellen diente eine autologe Wildtyp-LCL. Diese exprimiert spontan geringe Mengen an gp140 und reaktivierte daher den T-Zellklon.

Anders als bei der Inkubation mit Exosomen alleine (oder auch an Beads gekoppelt) war nun eine deutliche Aktivierung der T-Zellen messbar. Die Partikel mussten also von den Mini-LCLs aufgenommen, prozessiert und im Kontext von MHC II-Molekülen den T-Zellen präsentiert worden sein. Eine solche Stimulierung von CD4⁺-T-Zellen mit Virus-like-Particles wurde bereits von Adhikary et al. (Adhikary et al., 2008) beschrieben. Dies geschieht offenbar mit hoher Effizienz, da bereits sehr geringe Mengen an Partikeln eine gute Reaktivierung induzierten (Abb. 4.9). Je mehr Partikel zur Stimulierung verwendet wurden, desto stärker fiel auch die T-Zellantwort aus. Auffallend dabei war, dass die VLP-Überstände bei Konzentrationen zwischen 0,1 und 1 µg eine stärkere Wirkung zeigten als die exosomalen. So konnten hier bei einer verwendeten Konzentration von 0,1 µg GM-CSF-Konzentrationen erreicht werden, die in etwa dem Doppelten der durch die Exosomen ausgelösten entsprachen. Dies relativierte sich wieder bei höheren Konzentrationen. Beim Einsatz von 10 µg Exo- bzw. VLP-Konzentrat riefen Erstere im Vergleich eine deutlich stärkere T-Zellstimulation hervor.

4.2.1.1.3 gp350 und gp42 auf Exosomen erzeugen einen B-Zelltropismus und führen zu einer effizienteren Aufnahme durch antigenpräsentierende B-Zellen

Bereits die beschriebenen Stimulationsversuche beruhten auf der Annahme, dass die Anwesenheit von gp350 auf Exosomen diesen einen B-Zelltropismus vermittelt, die Aufnahme durch Mini-LCLs steigert und die T-Zellreaktivierung verbessert. Um dies nachzuweisen, wurde wieder die Reaktivierung des gp140-spezifischen T-Zellklons gemessen, nachdem jeweils 10⁴ Zellen mit Exosomen inkubiert worden waren. Die Exosomen wurden dabei so generiert, dass sie entweder nur gp140 alleine, zusammen mit gp350 bzw. in Kombination mit gp350 und gp42 exprimierten. Auch hier kamen wieder HLA-gematchte Mini-LCLs als APCs zum Einsatz.

In Abbildung 4.5 wurde schon gezeigt, dass die beiden viralen Glykoproteine gp350 und gp42 die Adhäsion von Exosomen an CD21-positive Zellen bewirken. Befand sich keines der beiden Proteine auf den Exosomen, war die Affinität relativ schlecht. Übertragen auf dieses Experiment würde das bedeuten, dass solche Exosomen nur mit niedriger Effizienz an die antigenpräsentierenden Zellen binden und infolge dessen die stimulatorische Kapazität der APCs vergleichsweise gering wäre. In Abbildung 4.11 kann man genau dies erkennen. Zwar kam es auch durch Exosomen, die keines der beiden Tropismusproteine enthielten, zu einer schwachen Stimulation

der T-Zellen. Diese war aber deutlich stärker, wenn die Exosomen zumindest eines davon (gp350) exprimierten. Wenn beide Glykoproteine vorhanden waren, war die Menge an produziertem Zytokin erwartungsgemäß am höchsten. Die beiden Glykoproteine schienen einen B-Zelltropismus der Exosomen auszulösen, der zu einer effizienteren Aufnahme durch Mini-LCLs und damit zu einer verbesserten Aktivierung der T-Lymphozyten beitrug.

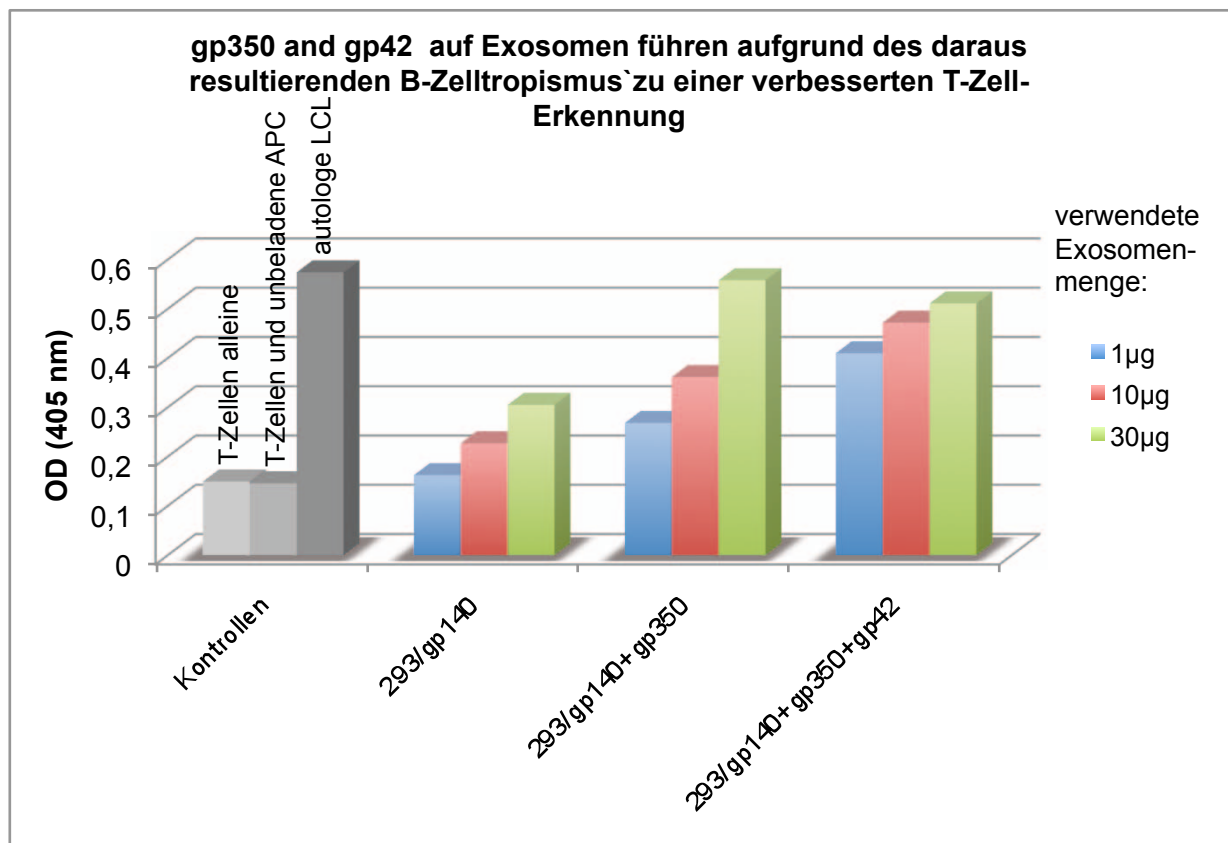


Abb. 4.11: Verbesserte T-Zellreaktivierung durch einen B-Zelltropismus der zur Stimulation verwendeten Exosomen

Für diesen Versuch wurden Exosomen generiert, die entweder gp140 alleine, zusammen mit gp350 oder mit gp350 und gp42 enthielten. Diese wurden, nachdem sie mit je 10^4 Mini-LCLs als APCs inkubiert worden waren, zur Stimulation von jeweils 10^4 gp140-spezifischen CD4⁺-T-Zellen (Klon 1H7) verwendet. Die erfolgte Stimulation der T-Zellen wurde nach 24 h anhand der GM-CSF-Ausschüttung mittels eines ELISAs quantifiziert

4.2.1.2 Reaktivierung von T-Zellen aus PBMCs

Ziel dieses Projekts war es, Exosomen und Virus-like-Particles auf ihre Fähigkeit, Immunantworten auszulösen und damit auf ihre prinzipielle Eignung als Impfstoff gegen EBV zu testen. Nachdem sich gezeigt hatte, dass Exosomen in Kombination

mit Mini-LCLs als antigenpräsentierende Zellen viruspezifische monoklonale T-Zellen stimulieren können, sollte nun untersucht werden, ob es auch gelingt, auf diese Weise Gedächtnis-T-Zellen aus Gesamt-PBMCs zu reaktivieren.

Eigentlich kann davon ausgegangen werden, daß Zellkulturüberstände der Verpackungszelllinie TR⁻, in der durch Transfektion eines BZLF1-Plasmides der lytische Zyklus ausgelöst wird, keine infektiösen Viruspartikel enthalten (Feederle et al., 2005). Dies ist in Anbetracht der Tatsache, dass Virus-like-Particles dieser Zellen eventuell einmal einen Einsatz als Vakzin finden sollen, eine äußerst wichtige Voraussetzung. Da aber nicht gänzlich auszuschließen ist, dass das TR⁻-Genom in sehr seltenen Fällen doch verpackt wird und dadurch transformierende Viren entstehen, wurde in unserem Labor eine zweite, auf dem Maxi-EBV aufbauende Verpackungszelllinie, HEK 293/VII⁻, generiert. Dieser fehlen neben den *terminal repeats* zusätzlich die Gene LMP1, EBNA2 und die der EBNA3-Familie (EBNA 3A-3C) (Hettich et al., 2006). Auch hier kann durch die transiente Transfektion eines für BZLF1-codierenden Expressionsplasmides der lytische EBV-Zyklus induziert werden. Doch selbst in dem äußerst unwahrscheinlichen Fall, daß in freigesetzten Partikeln doch einmal DNA des Helfergenoms verpackt sein sollte, können solche Partikel B-Zellen nicht transformieren. VII⁻-Zellen stellen damit, was die Produktion nicht infektiöser VLPs angeht, eine noch sicherere Alternative zu TR⁻-Zellen dar. Für die im Anschluss angeführten PBMC-Stimulationsversuche und auch für die darauf folgenden *In vivo*-Experimente zur Induktion EBV-spezifischer Immunantworten in Mäusen, wurden deshalb VLPs der Zelllinie 293/VII⁻ verwendet.

In einem ersten Versuch wurden PBMCs aus Blut eines gesunden, EBV positiven Spenders über einen Ficollgradienten aufgereinigt und auf 32 Wells einer 96 Well-Platte verteilt (je 10⁵ Zellen/Well). Die eine Hälfte der Wells wurde daraufhin mit je 25 µg VLPs (VII⁻) inkubiert, die andere mit 293-Exosomen ohne EBV-Proteine, um eine eventuell auftretende Stimulation durch den 293-Hintergrund anzuzeigen. Die Auswertung erfolgte durch einen Interferon-γ-ELISA.

Während in nur einem Well der mit 293-Exosomen inkubierten Zellen eine, darüberhinaus nur sehr geringe, Interferonmenge gemessen werden konnte (Mittelwert aller Wells: 0,01), ergaben sich in allen Wells, in denen Virus-like-Particles zur Stimulation verwendet worden waren, teilweise hohe OD-Werte mit einem

Mittelwert von 0,26. Die Situation in diesem Versuch ist doch eine deutlich andere als im vorausgehenden, weil sich hier VLPs, antigenpräsentierende Zellen und EBV-spezifische T-Zellen erst einmal "finden" müssen. Gerade der Anteil letzterer machen durchschnittlich gerade einmal 0,5-1 % aller PBMCs aus. Da kaum eine Stimulation durch die 293-Exosomen erfolgte, kann man davon ausgehen, dass ein Großteil der durch die VLPs ausgelösten Immunantwort wirklich auf EBV-spezifische T-Zellen zurückzuführen war.

Mit einer derartigen Stimulationsweise war es auch möglich, bestimmte T-Zellen aus PBMCs anzureichern. Dafür wurden PBMCs von zwei EBV-positiven Spendern dreimal im Abstand von jeweils vier Tagen mit Exosomen (gp350+gp140) bzw. VLPs stimuliert. Mit 293-Exosomen inkubierte bzw. gänzlich unstimulierte PBMCs stellten die Negativkontrollen dar. An Tag 12, also vier Tage nach der dritten Stimulation, wurden die Zellen gezählt und im Durchflusszytometer auf CD4 und CD8 untersucht. In dem unstimulierten Ansatz waren zu diesem Zeitpunkt nur noch tote Zellen vorhanden. Ganz ähnlich verhielt es mit der 293-Kontrolle. Die Inkubation mit VLPs und Exosomen führte hingegen zu einer Aktivierung von T-Zellen und letztlich zu einer Zunahme der Zellzahl.

Die mit gp350-gp140-Exosomen inkubierten Zellen setzten sich bei beiden Spendern zu über 90% aus CD4⁺-T-Zellen zusammen. Dies war nicht ungewöhnlich, weil Exosomen als exogen aufgenommene Antigene bevorzugt zu einer Reaktivierung von CD4⁺-T-Zellen führen. Da durch 293-Exosomen ohne EBV-Proteine keine Stimulation nachgewiesen werden konnte, bedeutete dies, dass die hier stimulierten Zellen größtenteils gp350- oder gp140-spezifisch sein mussten, da diese beiden die einzigen zusätzlichen Antigene darstellten. Dies ist durchaus möglich, da sowohl gp350, als auch gp140 als typische Zielantigene für CD4⁺-T-Zellen in EBV-infizierten Personen bekannt sind (Hislop et al., 2007). Leider sind bis jetzt noch keine Tetra- oder Pentamere für eine Färbung des T-Zellrezeptors von CD4⁺-T-Zellen mit diesen Spezifitäten erhältlich, so dass dies näher hätte untersucht werden können. Mit dieser Form von löslichen, fluoreszenzgekoppelten MHC-Molekülen ist es möglich, T-Zellen antigenspezifisch zu markieren und im Durchflusszytometer zu analysieren.

Im Unterschied dazu war eine Reaktivierung in den mit VLPs inkubierten Ansätzen nicht nur auf CD4⁺-T-Zellen beschränkt. Bei beiden Spendern waren auch CD8⁺-T-Zellen vorhanden.

a)

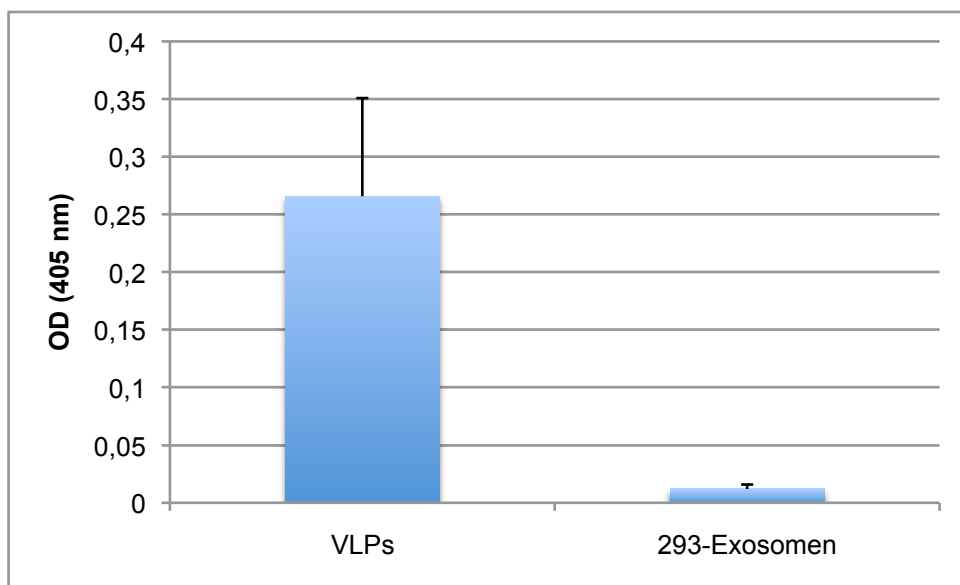
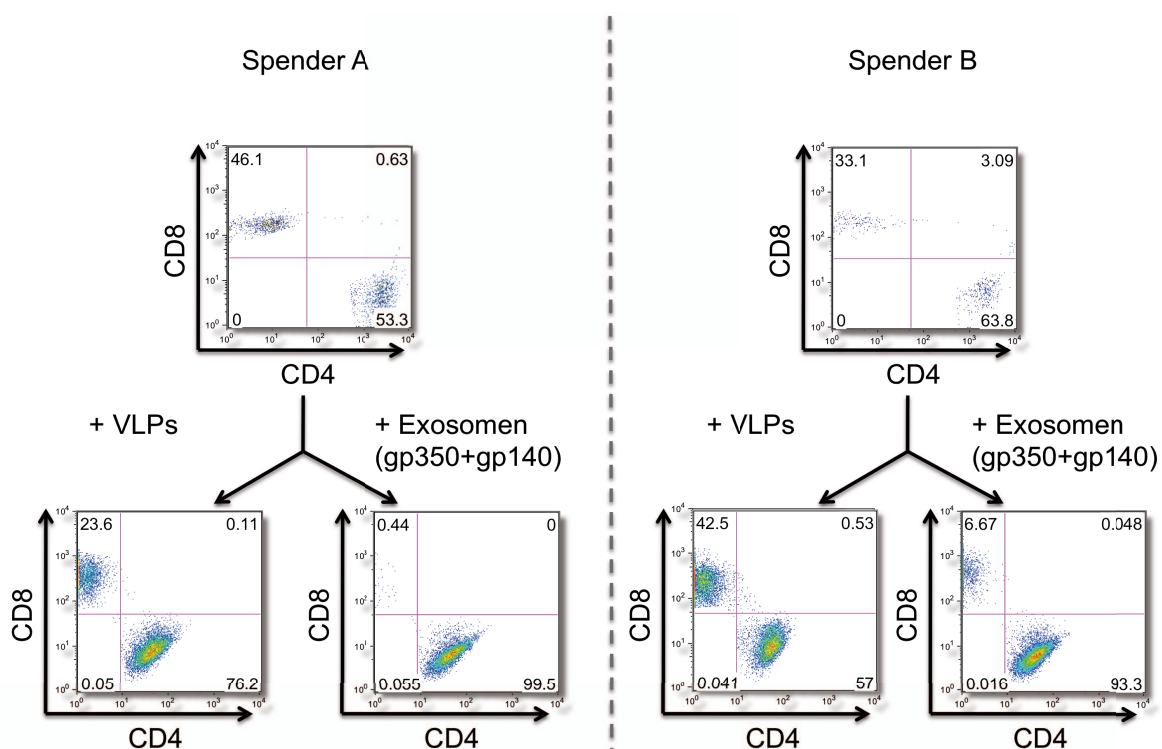


Abb. 4.12 a: Reaktivierung von T-Zellen aus PBMCs

Jeweils 10^6 PBMCs wurden in 16 Wells einer 96-Well-Platte ausplattiert und mit 25 μg VLPs bzw. 293-Exosomen inkubiert. Nach 24 h wurde die Produktion von Interferon- γ mittels eines ELISAs gemessen. Die angegebenen Zahlen entsprechen den durchschnittlich in den Wells ermittelten OD-Werten (die Balken entsprechen der Standardabweichung).

b 1)



b 2)

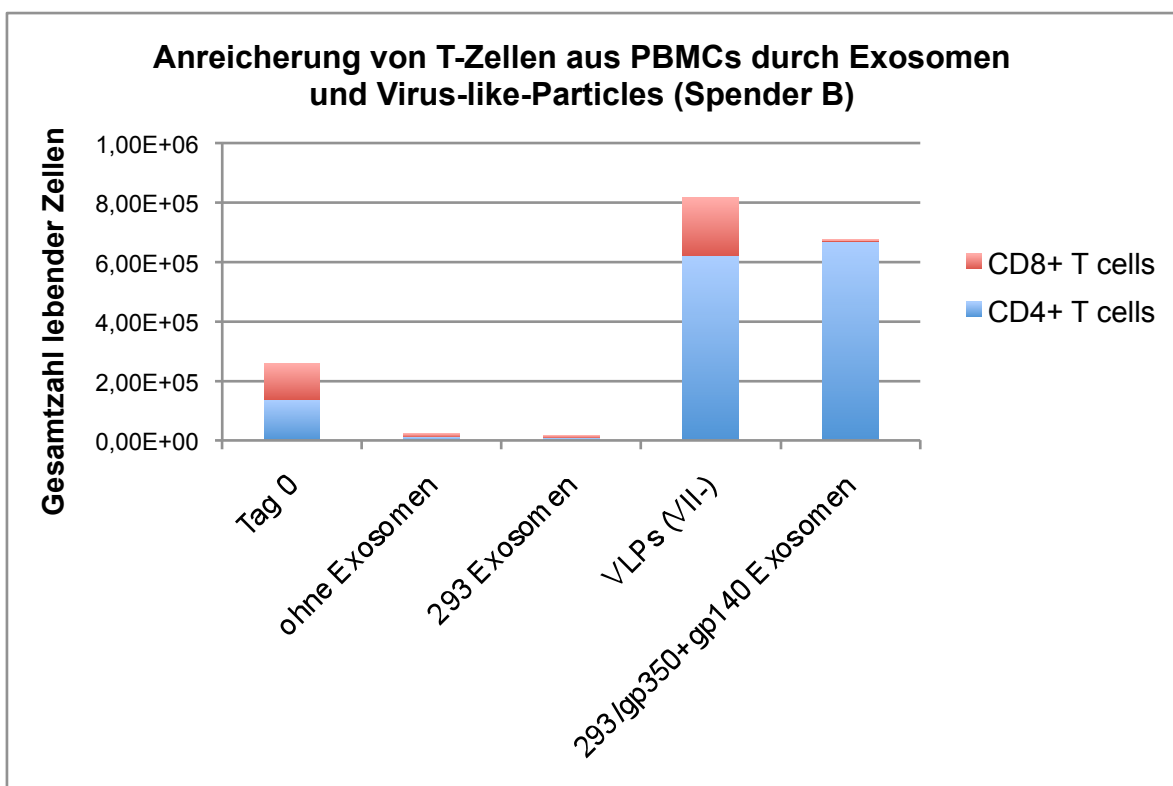
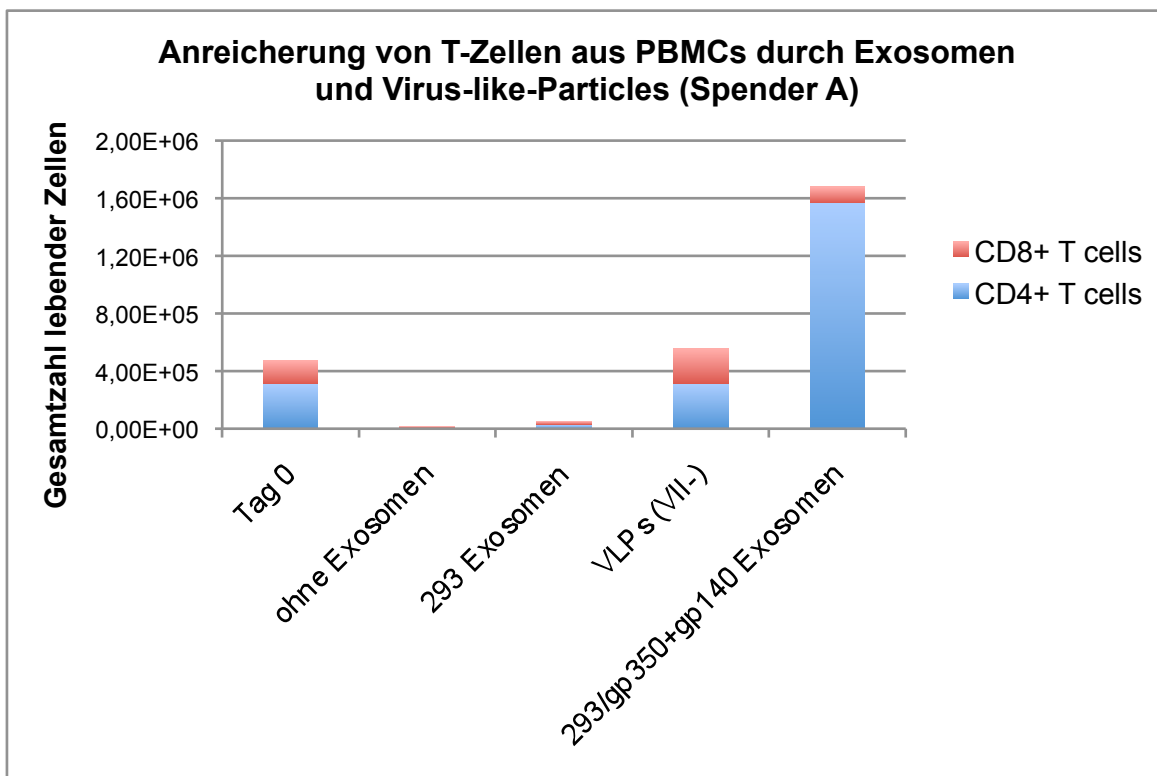


Abb. 4.12 b: Reaktivierung von T-Zellen aus PBMCs

PBMCs zweier Spender wurden dreimal innerhalb von acht Tagen mit Exosomen (ohne EBV-Proteine bzw. mit gp350 und gp140) oder VLPs stimuliert. An Tag 12 erfolgte die

Bestimmung der Zellzahl (b 1) und eine FACS-Analyse auf CD4⁺ und CD8⁺-T-Zellen (b 2). PBMCs, die ohne Exosomen oder mit 293-Exosomen inkubiert worden waren, wurden nicht stimuliert und starben während der Versuchsdauer. gp350+gp140-enhaltende Exosomen lösten eine starke Reaktivierung und Proliferation von CD4⁺ -T-Zellen aus. Im Gegensatz dazu führten VLPs zusätzlich zu einer Stimulation von CD8⁺ -Zellen.

Ein nächster Versuch sollte Klarheit darüber verschaffen, ob B-Zellen für eine *in vitro*-Stimulation von PBMCs die alleinigen APCs darstellen oder ob eine Präsentation auch über andere Zellarten erfolgt.

Hierfür wurden wiederum PBMCs isoliert und aus einem Teil davon mit Hilfe der MACS-Technologie durch CD3- bzw. CD19-Beads die T- bzw. B-Zellen gewonnen. Im Abstand von jeweils vier Tagen wurden 5×10^6 T-Zellen drei mal mit 50 µg VLPs (TR⁻ sowie VII⁻) stimuliert.

Als antigenpräsentierende Zellen wurden den Ansätzen entweder Gesamt-PBMCs, CD19-depletierte PBMCs oder aber die gesortete B-Zellfraktion, jeweils in den Zahlen 10^6 /Well (Gesamt- und CD19-depletierte PBMCs) bzw 10^5 /Well (B-Zellen), zusammen mit den Exosomen/VLPs zugegeben. Die Zellen wurden vorher mit 50 Gray bestrahlt, um ein eventuelles Auswachsen EBV-infizierter B-Lymphozyten zu verhindern. Obwohl die CD19-depletierte Zellfraktion keine B-Zellen enthielt, wurde auch sie bestrahlt, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erzielen. Vor der dritten Stimulation wurde ein Teil der stimulierten T-Zellen mit einer Dichte von 5×10^4 /Well auf einer 96-Well-Elispot-Platte ausplattiert, welche mit Antikörpern gegen Interferon γ beschichtet worden war. Die letzte Stimulierung erfolgte dann direkt auf dieser Platte. Interferon produzierende, und damit aktivierte, Zellen konnten so als einzelne dunkle Punkte sichtbar gemacht werden.

Wie in Abbildung 4.13 zu erkennen, erfolgte durch 293-Exosomen keine messbare T-Zell-Aktivierung. Die mit Virus-like-Particles stimulierten Ansätze jedoch resultierten in zahlreichen, auf Interferon- γ -produzierende Zellen zurückzuführende, Punkten. Dabei war zwischen den VLP-Ansätzen untereinander (TR⁻ und VII⁻) so gut wie kein Unterschied zu erkennen. Keinerlei Punkte entstanden allerdings, wenn in den Wells keine B-Zellen vorhanden waren. Dies wies darauf hin, dass zumindest *in vitro* B-Zellen die einzigen Zellen darstellen, welche exosomale und VLP-Antigene prozessieren und präsentieren. Anschließend wurden Zellen aus den mit VLPs vorstimulierten Ansätzen noch einmal mit einer autologen LCL inkubiert. Ein Auftreten sehr vieler Punkte im darauffolgenden Elispot ließ darauf schließen, dass die durch

VLPs aus PBMCs reaktivierten Zellen vermutlich zum größten Teil EBV-responsiv waren.

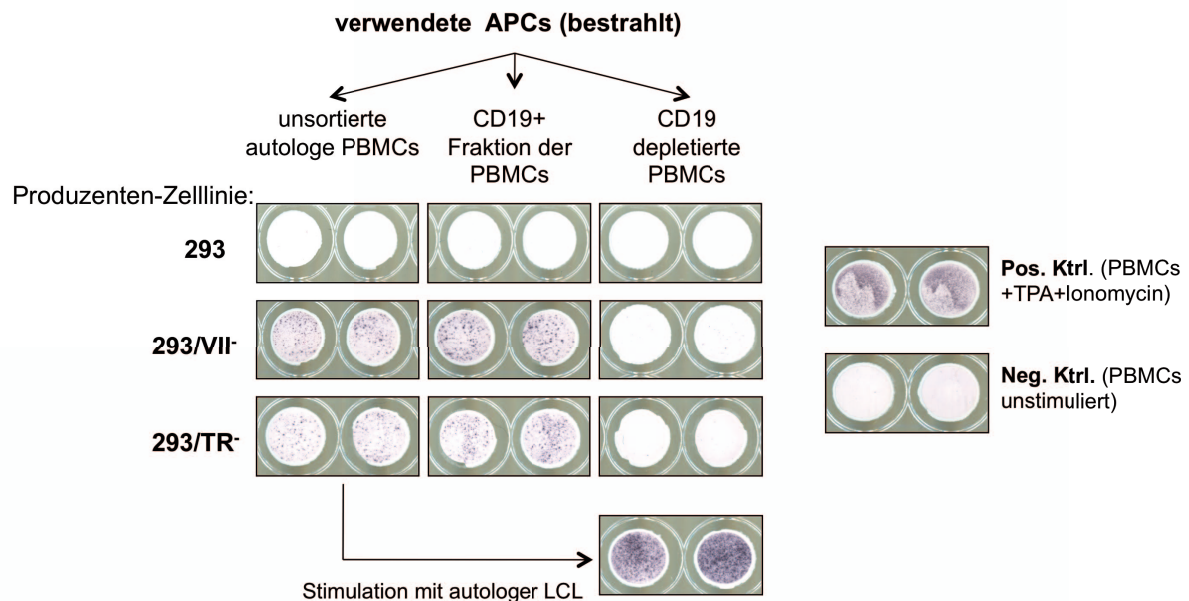


Abb. 4.13: Eine Reaktivierung von T-Zellen aus Spender-PBMCs erfolgt nur bei Anwesenheit von B-Lymphozyten

Aus einem Teil der PBMCs eines EBV-positiven Blutspenders wurden mit Hilfe von magnetischen Beads die T-Zellen bzw. die B-Zellen extrahiert. 5×10^6 T-Zellen wurden drei mal mit je 50 μg Exosomen aus 293-Zellen bzw. VLPs der Zelllinien TR⁻ und VII⁻ stimuliert. Zum Zwecke der Antigenpräsentation wurden unterschiedliche Zellfraktionen zugegeben, entweder Gesamt-PBMCs, CD19-depletierte PBMCs oder nur B-Zellen, jeweils mit 50 Gray bestrahlt. Eine dritte Stimulation mit einem Teil der Zellen erfolgte direkt auf einer Elispot-Platte, welche mit α -Interferon- γ -Antikörper beschichtet war. Dabei wurde wieder deutlich, dass beide Arten von VLPs in der Lage sind, eine effiziente T-Zellreaktivierung auszulösen. Voraussetzung dafür war das Vorhandensein von B-Lymphozyten. Da die reaktivierten T-Zellen auch auf Stimulation mit einer autologen LCL sehr gut ansprachen, lässt dies die Schlussfolgerung zu, dass die durch die VLPs stimulierten Zellen EBV-spezifisch sein müssen.

4.2.2 In vivo-Versuche

4.2.2.1 Immunisierung von immunkompetenten Wildtyp-Mäusen

Nachdem in mehreren *in vitro*-Versuchen gezeigt werden konnte, dass Exosomen und Virus-like-Particles sich gut dafür eignen, Immunreaktionen auszulösen, sollte Selbiges nun *in vivo* untersucht werden. Zuerst sollte festgestellt werden, ob sich damit in Mäusen eine Antikörperbildung gegen EBV-Proteine induzieren lässt. Für sämtliche *in vivo*-Versuche wurden VLPs verwendet, da diese in Bezug auf eine effiziente Vakzinierung gegenüber den Exosomen mehrere Vorteile besitzen: Zum Einen enthalten sie einen Großteil der viralen Proteine, zum anderen stellte sich

heraus, dass durch VLPs nicht nur CD4⁺-, sondern teilweise auch CD8⁺ -T-Zellen reaktiviert werden konnten. Zur Immunisierung wurden zwei Mäusen (C57BL/6) zwei Mal im Abstand von 14 Tagen je zehn µg VLPs der Zelllinie VII⁻, versetzt mit inkomplettem Freud'schen Adjuvans, in 200 µl Gesamtvolumen intraperitoneal injiziert. Eine Kontrollmaus erhielt statt VLPs die gleiche Menge an 293-Exosomen. Zwei Wochen nach der zweiten Injektion wurde das Serum der Mäuse mittels ELISA auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen das frühe Antigen D (EA-D) und das Kapsidantigen p18 untersucht. Beide Antigene werden auch in der humanen EBV-Diagnostik zum Nachweis einer EBV-Infektion herangezogen und die Antikörper sind Teil kommerziell erhältlicher Kits (EBV-VCA-IgG- und EBV-EA-D-IgG-ELISA-Kit von Diamedix).

Die Blutuntersuchung zeigte, dass im Gegensatz zu der Maus, der 293-Exosomen injiziert worden waren, in beiden mit Virus-like-Particles immunisierten Mäuse hohe EA-D- und p18-Antikörper-Titer vorhanden waren. Die Vakzinierung war demnach erfolgreich.

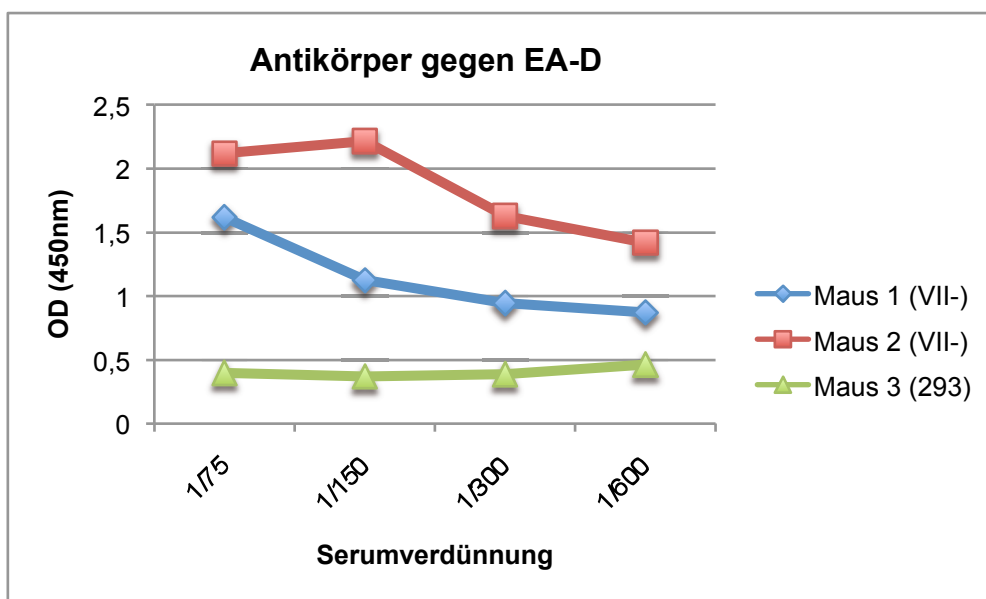
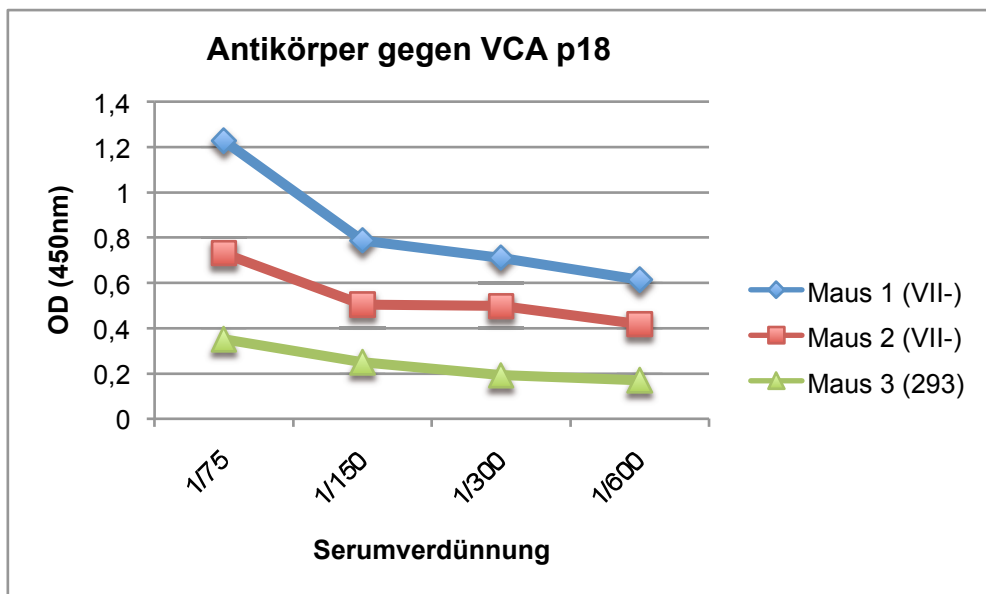


Abb. 4.14: Bildung von Antikörpern gegen EBV EA-D und p18 in Mäusen durch Immunisierung mit VLPs

Mäuse wurden zwei mal mit jeweils 10 µg VLPs immunisiert und nach vier Wochen wurde die Bildung von Antikörpern gegen EBV-Antigene im Serum mittels eines ELISAs untersucht. Einer Maus wurden als Kontrolle 293-Exosomen ohne EBV-Proteine injiziert. Bei beiden immunisierten Mäusen konnten, im Gegensatz zu dieser im ELISA Antikörper gegen die EBV-Antigene EA-D und VCA p18 nachgewiesen werden.

4.2.2.2 Untersuchung einer durch Virus-like-Particles induzierten Immunantwort im hu-PBMC- Rag2^{-/-}γ_c^{-/-}-Mausmodell

Da nun gesichert war, dass Virus-like-Particles auch *in vivo* immunogen sind, sollte ein weiterer Versuch zeigen, ob sich neben der Produktion von Antikörpern auch eine zelluläre Immunantwort auslösen lässt. Für diesen Versuch wurde ein anderes Mausmodell, das hu-PBMC- Rag2^{-/-}γ_c^{-/-}-Modell, ausgewählt. Aufgrund von Deletionen im Rag2-Gen (*recombinase activating gene 2*) und in der γ-Kette des Interleukin 2-Rezeptors kann sich in diesem, auf BALB/c-Hintergrund basierenden Mausstamm kein adaptives Immunsystem ausbilden. Rag2^{-/-}γ_c^{-/-}-Mäuse haben weder B-, T- noch NK-Zellen. Aus diesem Grund bietet sich der Mausstamm an, um durch xenogene Transplantation von humanen PBMCs eine Immunantwort als Folge einer Vakzinierung *in vivo* nachzuverfolgen.

Für die Durchführung des Versuchs wurde drei Spendern Blut abgenommen und daraus die PBMCs gewonnen. Zwei der Spender waren EBV-positiv (RZ und MD), einer EBV-negativ (AM). Auf diese Weise sollte einerseits eine Reaktivierung EBV-spezifischer T-Zellen nachgewiesen werden, da diese ja bereits im Blut der beiden EBV-positiven Spender in Form von Gedächtnis-T-Zellen vorkommen sollten, und andererseits, im Falle des EBV-negativen Spenders, ein mögliche Primäraktivierung (*priming*) von T-Zellen untersucht werden.

Mit den PBMCs jedes Spenders wurden jeweils fünf Mäuse transplantiert, wobei jeder Maus 3×10^7 Zellen in 200 µl PBS intraperitoneal injiziert wurden. Die Mausgruppen untereinander wurden so aufgeteilt, dass jeweils zwei von ihnen Virus-like-Particles bzw. 293-Exosomen, und eine Maus nur PBS erhielt. Um die Anzahl an Injektionen so gering wie möglich zu halten, wurden die Exosomen und VLPs aus VII⁻-Zellen (mit inkomplettem Freud'schen Adjuvans versetzt) direkt vor der Injektion mit den PBMCs gemischt.

Zwei Wochen später wurden die Mäuse ein weiteres Mal immunisiert, um einen möglichen Booster-Effekt zu erreichen.

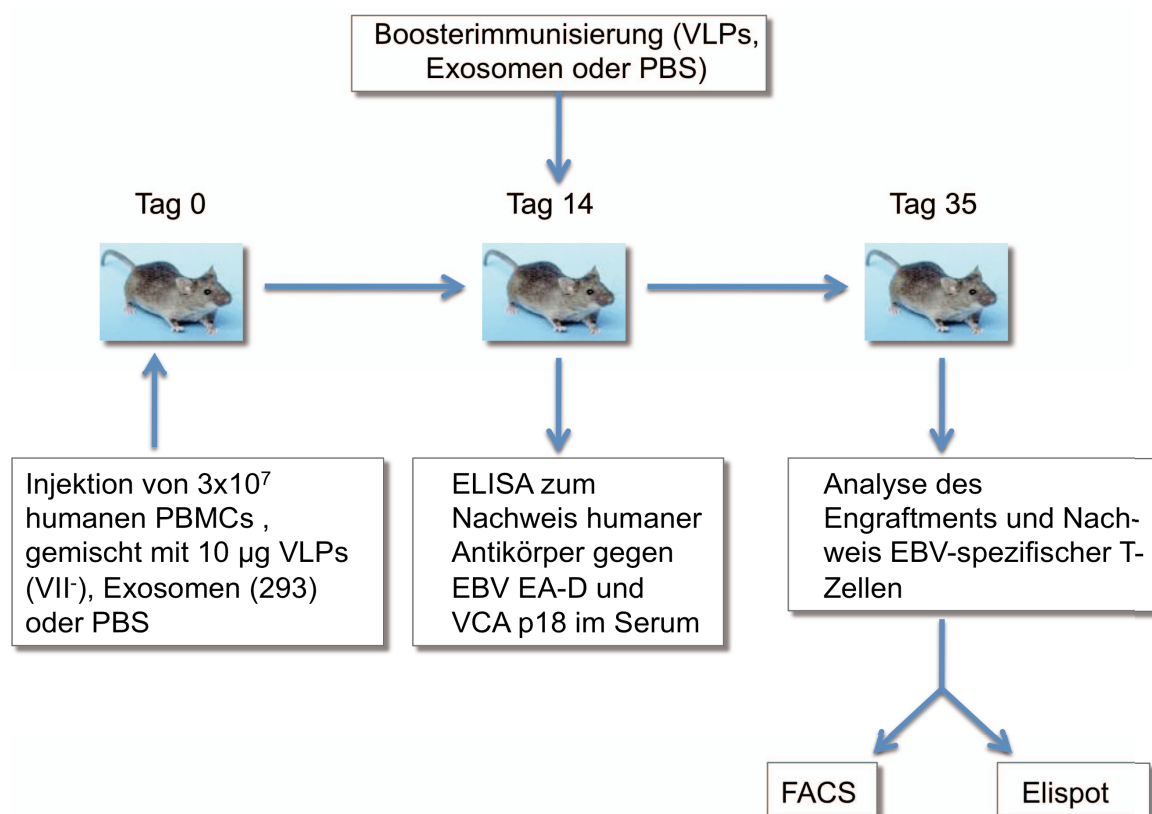


Abb. 4.15: Immunisierungsschema

Rag2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse wurden humane PBMCs injiziert, die entweder nur mit PBS, oder aber mit je $10 \mu\text{g}$ Exosomen oder VLPs versetzt worden waren. Zwei Wochen später wurden die Mäuse auf die Bildung humaner Antikörper gegen EA-D und p18 untersucht und erhielten im Anschluss daran eine zweite Injektion mit Exosomen, VLPs oder PBS. Nach weiteren drei Wochen (Tag 35) wurden die Mäuse eingeschläfert und das Vorhandensein humaner Zellen im Blut, in der Milz, in den Lymphknoten und in der Thymusdrüse untersucht. Mittels eines Elispot-Assays zur Detektion von Interferon- γ wurde ermittelt, ob durch die Immunisierung der Mäuse mit VLPs eine Reaktivierung EBV-spezifischer T-Zellen stattgefunden hatte.

Zuvor wurde den Mäusen Blut abgenommen und mittels eines kommerziellen diagnostischen ELISA-Kits auf humane Antikörper gegen EBV EA-D und VCA p18 analysiert. Solche konnten aber nicht nachgewiesen werden.

Zu diesem Zeitpunkt des Experiments traten die ersten Probleme mit diesem Mausmodell auf. Sie äußerten sich darin, dass einige der Mäuse so schwere Formen von Graft-versus-Host-Disease (GvHD) entwickelten, dass sie innerhalb kürzester Zeit starben oder eingeschläfert werden mussten. Bis zum Ende der Versuchsdauer mussten aus diesem Grund sechs der 15 Mäuse aus dem Experiment herausgenommen werden. Auffallend dabei war, dass fünf dieser Mäuse mit Zellen

des gleichen Spenders (AM, EBV-negativ) transplantiert worden waren. In den PBMCs dieses Spenders musste also in den Mäusen eine vergleichsweise starke xenospezifische Immunreaktion ausgelöst worden sein.

4.2.2.2.1 Analyse des Engraftments der humanen PBMCs

Die verbliebenen neun Mäuse wurden an Tag 35 eingeschläfert und das Blut, die Thymusdrüse, das Knochenmark sowie die Milz der Tiere wurden präpariert. Ersteres wurde abzentrifugiert und das so entstandene Serum ein weiteres Mal auf EBV-spezifische Antikörper untersucht, wovon wiederum keine nachzuweisen waren.

Die aus der Thymusdrüse, aus dem Knochenmark und der Milz gewonnenen Zellen wurden im Durchflusszytometer auf das Vorhandensein humaner Zellen hin untersucht. Als Marker für humane Zellen wurde CD45, für T-Zellen CD3 bzw. CD4 und CD8 und für B-Zellen CD19 verwendet.

a)

PBMC-Spender	Injektion mit	Blut			Thymus		
		humane Zellen insgesamt (%)	davon humane T-Zellen (%)	davon humane B-Zellen (%)	humane Zellen insgesamt (%)	davon humane T-Zellen (%)	davon humane B-Zellen (%)
RZ	PBS	82,2	85,6	n.d.	26,56	93,3	n.d.
	293-Exosomen	59,7	80	n.d.	15,7	94,2	n.d.
	293- Exosomen	35,7	71	n.d.	9,45	98,5	n.d.
	VII⁻-VLPs	69,2	81	n.d.	26,3	97,4	n.d.
MD	PBS	1,68	85	n.d.	5,5	97	n.d.
	293-Exosomen	94,6	99,4	n.d.	66,1	93	n.d.
	293-Exosomen	89,4	98	n.d.	13	89,5	n.d.
	VII⁻-VLPs	70,5	99,8	n.d.	4,43	96,3	n.d.
	VII⁻-VLPs	1,86	100	n.d.	0,56	99,2	n.d.

PBMC-Spender	Injektion mit	Knochenmark			Milz		
		humane Zellen insgesamt (%)	davon humane T-Zellen (%)	davon humane B-Zellen (%)	humane Zellen insgesamt (%)	davon humane T-Zellen (%)	davon humane B-Zellen (%)
RZ	PBS	2,21	95,5	0	86,6	94,1	0
	293-Exosomen	5,29	98,3	0	45,1	95,2	0
	293 Exosomen	1,28	96,5	0	59,9	94,6	0
	VII⁻-VLPs	18,9	95,7	0	68,2	92,3	0
MD	PBS	16,9	99	0	14,8	98,3	0
	293-Exosomen	6,9	99,3	0	96,2	99,7	0
	293-Exosomen	2,71	99,3	0	93,6	99,7	0
	VII⁻-VLPs	0,97	97,2	0	60,8	99,22	0
	VII⁻-VLPs	0,04	100	0	2,7	93,5	0

b)

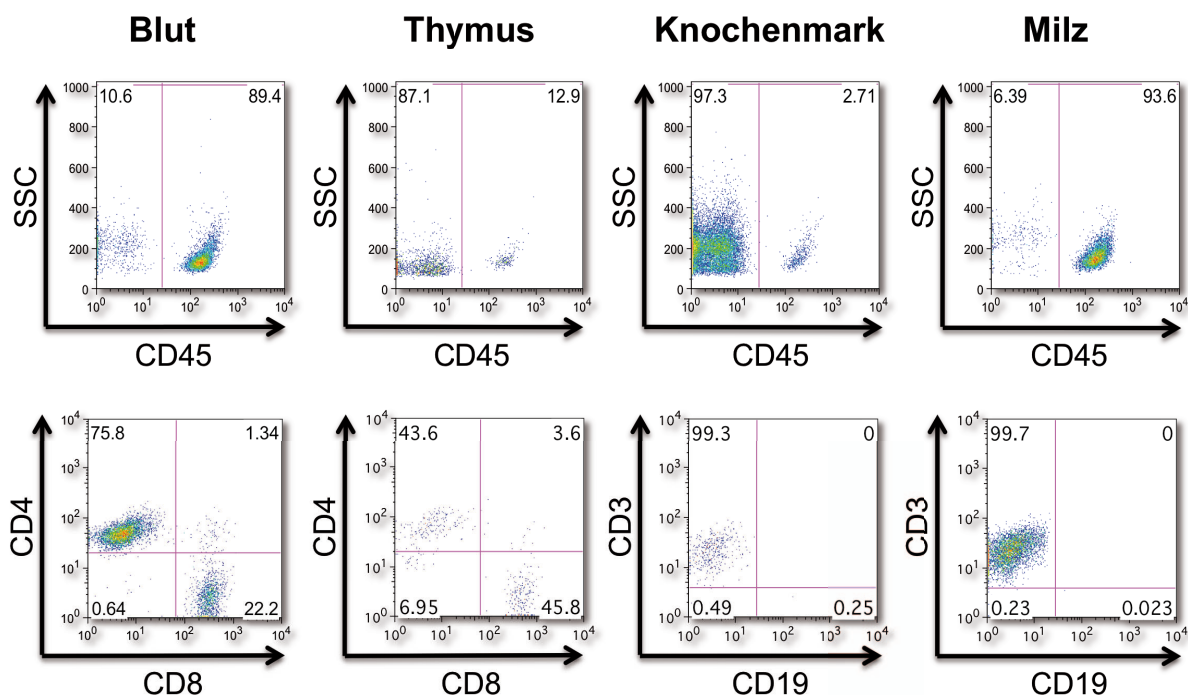


Abb. 4.16: Engraftment von Rag2^{-/-}γ_c^{-/-}-Mäusen mit humanen PBMCs

- a) Immundefizienten Rag2^{-/-}γ_c^{-/-}-Mäusen wurden intraperitoneal PBMCs der EBV-positiven Blutspender RZ und MD, zusammen mit VLPs, 293-Exosomen (jeweils 10 μg) oder PBS, injiziert. Eine Boosterimmunisierung erfolgte zwei Woche später. Nach fünf Wochen wurde der Versuch beendet und verschiedene Organe der Mäuse (Thymusdrüse, Knochenmark, Milz, Blut) auf humane Zellen (CD45), humane B- (CD19) und T-Zellen (CD3 bei Knochenmark- und Milzzellen bzw. CD4 und CD8 bei Blut- und Thymuszellen) analysiert. Die Gesamtheit humaner Zellen (CD45) ist dabei als Prozentsatz aller Zellen des jeweiligen Organs und die B- und T-Zellen als Prozentsatz der humanen Zellen angegeben. Dabei ist klar erkennbar, dass sich die humanen Zellen unterschiedlich effizient in den einzelnen Mäusen angesiedelt hatten.
- b) Beispielhafte Darstellung der FACS-Analyse einer Maus (MD 293), die ein gutes Engraftment von humanen Zellen aufwies.

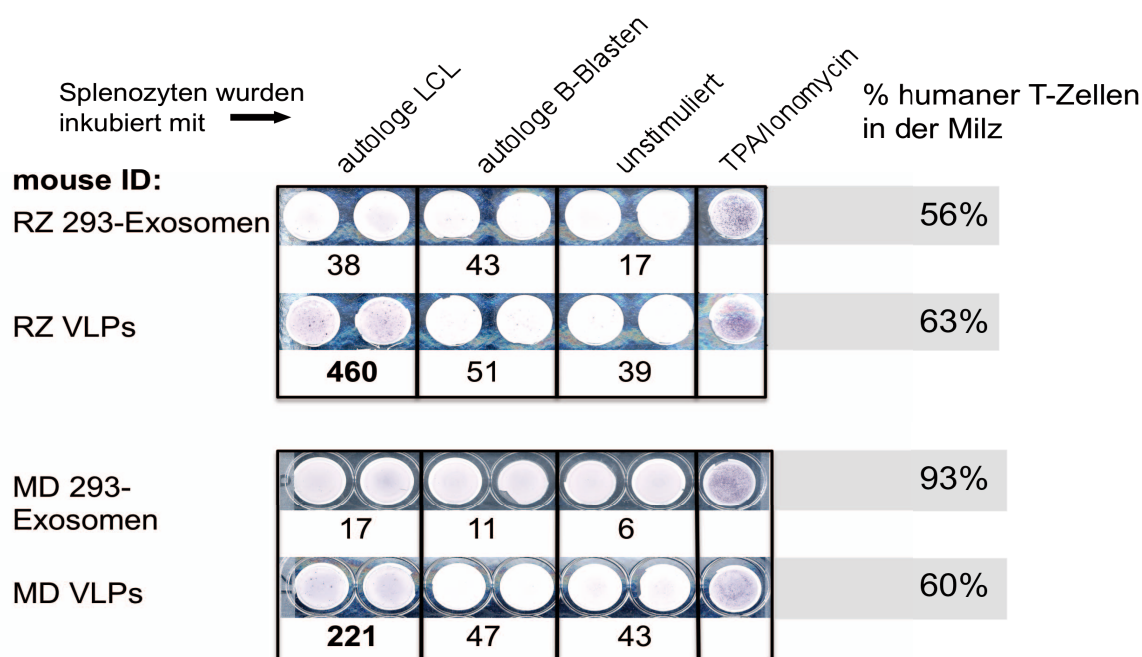
Schnell wurde klar, dass bezüglich des Engraftments mit humanen Zellen sehr große Unterschiede aufgetreten waren. Am effektivsten hatten sich die PBMCs in den Milzen der Mäuse angesiedelt. Sieben der neun analysierten Mäuse wiesen in diesem Organ mindestens 45% an humanen CD45-positiven Zellen auf, zwei sogar über 90%. Auch im Blut war der Anteil humaner Zellen recht hoch. Im Knochenmark hingegen konnten bei allen Mäusen nur sehr wenige humane Zellen nachgewiesen werden (0-18%). Ins Auge fiel außerdem, dass die Effektivität des Engraftments häufig nicht auf alle untersuchten Organe der Maus in gleichem Maße zutraf. So befanden sich bei der Maus mit dem zweitbesten Engraftment in der Milz (MD, 293-

Exosomen, 93% humane Zellen) im Knochenmark nur 2,7% CD45⁺-Zellen, wohingegen eine andere (MD, PBS) 16% humaner Zellen im Knochenmark, dafür aber nur 14% in der Milz aufwies. Insgesamt konnte bei acht der neun Mäuse das Ansiedeln der humanen Zellen als geglückt angesehen werden.

4.2.2.2.2 Analyse der zellulären Immunantwort in Hinsicht auf EBV-spezifische T-Zellen

Um eine erfolgte Reaktivierung EBV-spezifischer T-Zellen in den Mäusen nachzuweisen, wurden jeweils 10⁶ Splenozyten der Mäuse mit 10⁵ LCLs inkubiert, welche von denselben Spendern stammten wie die transplantierten PBMCs. Bei einer durch die Immunisierung erfolgten *in vivo*-Stimulation der vorhandenen EBV-responsiven Gedächtnis-T-Zellen sollten die Mäuse, welchen VLPs injiziert worden waren, nun deutlich stärker auf die Stimulierung mit EBV-positiven LCLs reagieren als Mäuse, die 293-Exosomen oder PBS erhalten hatten. Die Anzahl aktivierter Zellen wurde anhand eines Interferon- γ -spezifischen Elispots bestimmt. Als Negativkontrolle wurden in diesem Fall virusfreie autologe B-Blasten verwendet (Wiesner et al., 2008). Sie befinden sich, ähnlich wie LCLs, in einem aktivierten Zustand, sind aber EBV-negativ. Der auf eine unspezifische T-Zellaktivierung zurückzuführende Hintergrund wurde durch Verwendung unstimulierter Splenozyten ermittelt.

a)



b)

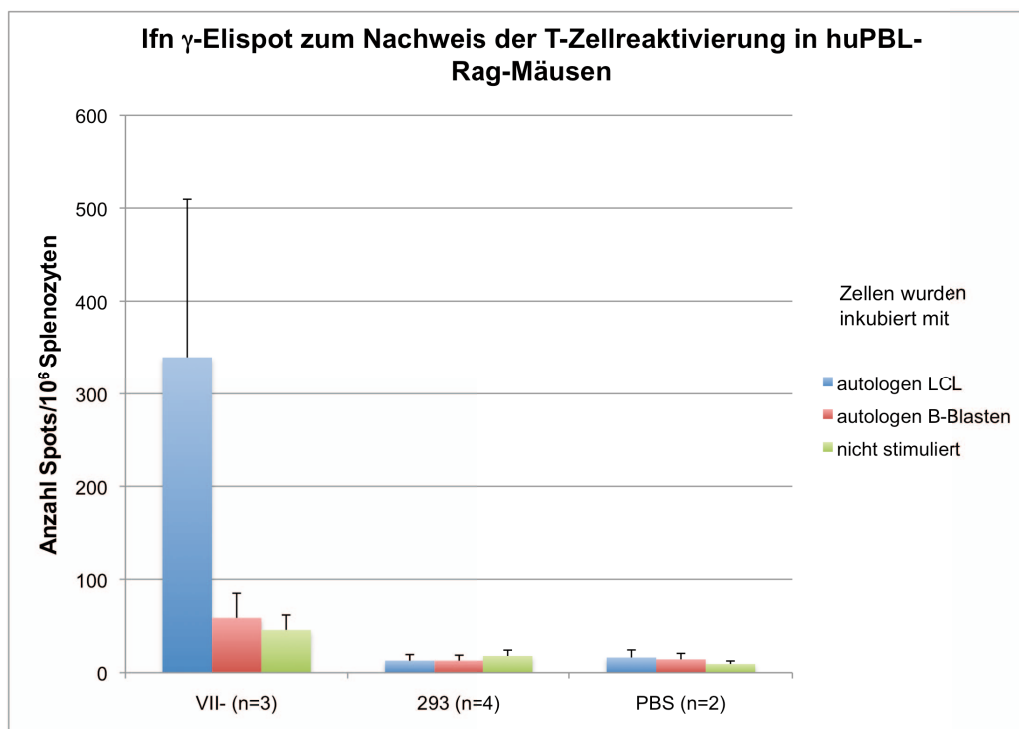


Abb. 4.17: Nachweis einer zellulären EBV-spezifischen Immunantwort in mit Virus-like-Particles immunisierten Rag2^{-/-}γ_c^{-/-}-Mäusen

- a) 10⁶ Splenozyten der wie unter Punkt 3.2.13 beschrieben immunisierten Mäuse wurden mit jeweils 10⁵ autologen LCLs (EBV-positiv) bzw. B-Blasten (EBV-negativ) für 24 h inkubiert und eine erfolgte Reaktivierung anhand der Ausschüttung von Interferon- γ mittels eines Elispot-Assays gemessen. Jeder Spot entspricht dabei einer Zytokin-sekretierenden Zelle. Von jedem Spender werden beispielhaft eine mit VLPs immunisierte (RZ VLP, MD VLP) und eine Kontrollmaus (RZ 293-Exosomen, MD 293-Exosomen) gezeigt, wobei die angegebenen Werte den erhaltenen Spots entsprechen. In den Splenozyten der mit VLPs immunisierten Mäuse wurden vergleichsweise viel mehr T-Zellen durch die Inkubation mit LCLs reaktiviert, erkennbar an der deutlich höheren Anzahl (460 zu 38 bzw. 221 zu 17) im Vergleich zu den Splenozyten aus Mäusen, welchen 293-Exosomen injiziert worden waren. Da diese Reaktivierung nur dann auftrat, wenn die Inkubation mit LCLs, nicht aber mit EBV negativen B-Blasten erfolgte, lässt das den Rückschluss zu, dass die derart stimulierten T-Zellen EBV-spezifisch sind.
- b) In diesem Diagramm wurden alle neun auswertbaren Mäuse erfasst. Es ist klar ersichtlich, dass Splenozyten der mit VLPs immunisierte Mäuse (VII⁻) auf die Inkubation mit autologen LCLs mit Ausschüttung von Interferon- γ reagieren, die Kontrollmäuse (293 bzw. PBS) jedoch nicht.

Die Angabe der prozentualen Anzahl humaner T-Zellen an den Splenozyten der Mäuse lässt unterschiedliche Engraftmentraten erkennen, welche beim Vergleich der Mäuse untereinander mit einkalkuliert werden müssen. Die Auswertung des Elispot-Assays ergab, dass sehr viele T-Zellen reaktiviert wurden, wenn Splenozyten aus Mäusen, welche mit VLPs immunisiert worden waren, mit EBV-positiven LCLs, nicht aber mit EBV-negativen B-Blasten, inkubiert wurden (Abb. 4.17 a und b). Dies

deutete darauf hin, dass die auf diese Weise stimulierten T-Zellen wahrscheinlich EBV-spezifisch waren. Durch die zweimalige Injektion von VLPs, welche viele verschiedene EBV-Proteine aufwiesen, musste bereits in den Mäusen eine Reaktivierung der in den PBMCs enthaltenen EBV-spezifischen T-Zellen und eine daraus resultierende Proliferation der Zellen stattgefunden haben. Dies erklärt die deutlich größere Anzahl an Spots, hervorgerufen durch aktivierte Splenozyten der immunisierten Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen (293 bzw. PBS, Abb. 4.17 b). In diesen sollte durch die Injektion von 293-Exosomen bzw. PBS keine Stimulation von EBV-spezifischen T-Zellen stattgefunden haben und deren Zahl am Versuchsende damit der normalen und schon vor der Immunisierung vorhandenen Zahl an Gedächtnis-T-Zellen entsprechen. Theoretisch hätte also erwartet werden können, dass, wenn Splenozyten dieser Kontrollmäuse mit LCLs inkubiert werden, aufgrund einer Reaktivierung der Gedächtnis-T-Zellen ebenfalls mehr Spots auftreten als nach Inkubation mit B-Blasten. Dieser Unterschied fiel mit 16 (293-Mäuse, inkubiert mit LCLs) zu 13 Spots (293-Mäuse, inkubiert mit B-Blasten) bzw. 16,33 (PBS-Mäuse, inkubiert mit LCLs) zu 14,33 Spots (PBS-Mäuse, inkubiert mit B-Blasten) relativ gering aus. Da für den Elispot mit 10^6 Zellen /Well eine vergleichsweise recht niedrige Gesamtzellzahl eingesetzt worden war und davon durchschnittlich nur 72,3 % (293) bzw. 47,8 % (PBS) humanen Zellen entsprachen, war die darin enthaltene Zahl EBV-spezifischer T-Zellen eventuell einfach zu gering, um im Elispot eine nachvollziehbare Reaktivierung zu detektieren.

4.2.2.3 Untersuchung einer durch Exosomen induzierten Immunantwort im MHV-68-Mausmodell

Zwar konnte schon im Rag-Mausmodell eine effiziente *in vivo*-Immunantwort erreicht werden, allerdings sorgte das häufige Auftreten von *Graft-versus-Host-Disease* bei den Mäusen dafür, dass die Untersuchung von eventuellen Auswirkungen der Immunisierung nicht mehr möglich war. So entwickeln immundefiziente Mäuse nach Transplantation von humanen PBMCs eines EBV-positiven Spenders im Normalfall nach einigen Monaten durch das Auswachsen der darin enthaltenen infizierten B-Zellen EBV-assoziierte Lymphome (Mosier et al., 1989; Mosier, 1990). Da bis zu diesem Zeitpunkt in unserem Versuch aber vermutlich alle Mäuse an GvHD erkrankt wären, wurde der Versuch bereits nach sieben Wochen beendet, so dass letztendlich nicht beurteilt werden konnte, ob die Vakzinierung die Häufigkeit oder den Zeitpunkt des Auftretens der Lymphome beeinflusst hätte.

Die Infektion von Mäusen mit dem murinen Gammaherpesvirus 68 (MHV-68) ist ein häufig verwendetes Modell zur Untersuchung der Pathogenese von Gamma-Herpesviren (Stewart et al., 1999; Stewart et al., 2004). Auch wir wollten es uns nun zunutze machen, um die Auswirkungen einer Vakzinierung mit Virus-like-Particles zu untersuchen. Im Gegensatz zum Rag-Mausmodell, bei dem durch Transplantation von humanen PBMCs die Reaktivierung humaner Zellen untersucht worden war, fand hier die Vakzinierung ganz im homologen System statt. Das MHV-68-Glykoprotein gp150 weist, v. a. in positioneller und struktureller Hinsicht, eine signifikante Homologie zu gp350 aus EBV auf und wurde in Vakzinierungsstudien bereits als Modell verwendet, um eine Voraussage über eine potentielle Schutzwirkung auf gp350-basierender Vakzine treffen zu können (Gillet et al., 2007). Bis vor einigen Jahren waren gp150-spezifische Antikörper, genau wie gp350-spezifische Antikörper, als Basis von antiviralen Vakzinen im Gespräch (Stewart et al., 1999).

In Anbetracht dessen entschieden wir uns dazu, gp150 als Antigen in Exosomen einzubauen und diese für die zuvor angesprochene Vakzinierungsstudie zu verwenden. Nach Klonierung eines Expressionsplasmids, in dem gp150 vom CMV-Promotor exprimiert wird, wurde dieses in 293-Zellen transfiziert und die von den Zellen generierten Exosomen durch Ultrazentrifugation aus dem Zellkulturüberstand angereichert. Im Abstand von zwei Wochen wurden Mäusen zwei mal entweder diese gp150-enthaltenden Exosomen (10 µg/ Maus), oder aber in der Kontrollgruppe 293-Exosomen ohne gp150, intraperitoneal und versetzt mit CpG-Oligodesoxynukleotiden (CpG ODN 1668) als Adjuvans, injiziert. Der Versuch wurde einmal mit einer kleinen (sechs), und bei der Wiederholung mit einer größeren Anzahl an Mäusen (30) durchgeführt. Da die Ergebnisse beider Versuche prinzipiell vergleichbar waren, sie aber aufgrund von relativen Bezügen (z.B. des OD-Werts bei ELISAs) nicht einfach zusammengefasst werden konnten, werden hier beispielhaft nur die Ergebnisse des zweiten, größeren Versuchs gezeigt.

Bei diesem erhielt eine Hälfte der Mäuse Exosomen mit gp150, die andere Hälfte Kontrollexosomen ohne gp150. Am Tag 14 wurde die Vakzinierung wiederholt. Weitere zwei Wochen später wurden 20 der 30 Mäuse (zehn je Gruppe) intranasal mit MHV-68 infiziert. Da die Infektion selbst natürlich letztendlich ebenfalls zur Bildung von MHV-68-spezifischen Antikörpern und T-Zellen führte, wurden zehn Mäuse nicht infiziert. Diese sollten es ermöglichen, den Anteil der allein auf die Immunisierung zurückzuführenden Immunantwort zu bestimmen.

Infiziert man Mäuse intranasal mit MHV-68 führt dies initial hauptsächlich in den Epithelzellen der Lunge zu einer produktiven lytischen Replikation. Hierbei erreichen die pulmonalen Virustiter zwischen Tag fünf und sieben ihren Höhepunkt. Von hier aus gelangt MHV-68 zu den Lymphknoten, wo es zur Infektion von dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen kommt. Anschließend kommt es, ca. zwei Wochen nach Infektion, zur Etablierung einer latenten Infektion, welche in einer massiven Proliferation von B- und T-Zellen resultiert und mit einer transienten Vergrößerung der Milz (Splenomegalie) einhergeht (Sunil-Chandra et al., 1992).

Aufgrund dieses zeitlichen Verlaufs wurden 20 Mäuse am Tag fünf nach Infektion eingeschläfert (33. Versuchstag) und untersucht (Zeitpunkt der lytischen Replikation in der Lunge) und die restlichen zehn am Tag 17 (45. Tag) nach Infektion (Latenzetablierung und Splenomegalie). In den folgenden Abbildungen werden das Immunisierungsschema gezeigt und die Auswertungszeitpunkte und die verwendeten Methoden aufgelistet.

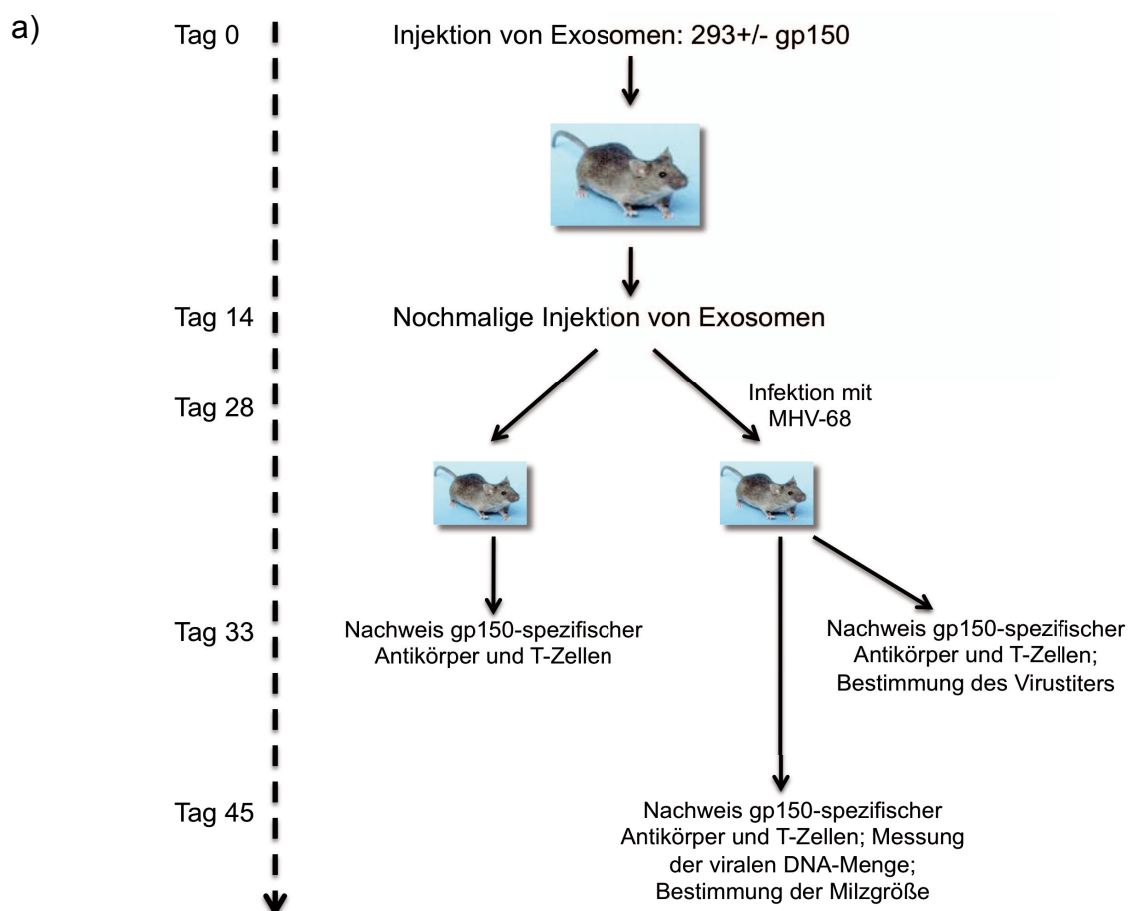


Abb. 4.18 a: Schema des Immunisierungsexperiments von Mäusen mit gp150-Exosomen

b)

	Untersuchtes Material	Was wurde untersucht?	Technik
Tag 28	Blut	gp150-spezifische Antikörper	ELISA
Tag 33	Blut	gp150-spezifische Antikörper	ELISA
	Lungengewebe	Virus Titer	Plaque assay
	Milz	Vorhandensein gp150-reaktiver T-Zellen	Ifn γ -Elispot
Tag 45	Blut	gp150-spezifische Antikörper	ELISA
	Milz	Entwicklung einer Splenomegalie	Milzgröße und -gewicht
	Milz	gp150-reaktive T-Zellen	Elispot
	Milz	Menge viraler DNA	qPCR (TaqMan)

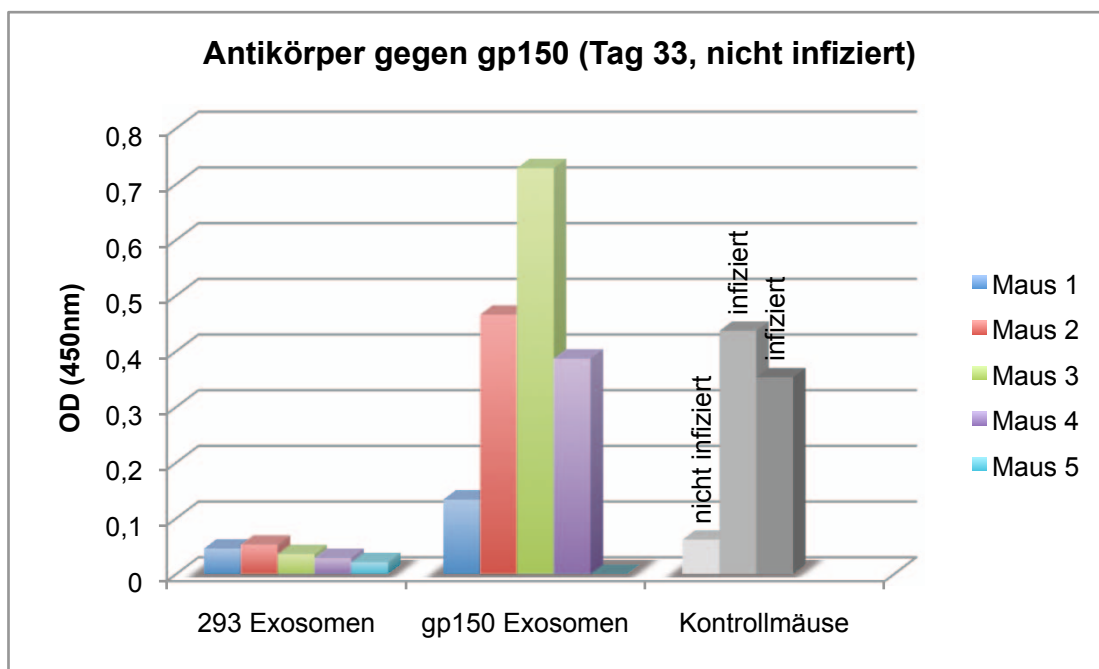
Abb. 4.18 b Auswertung des Immunisierungsexperiments mit gp150-Exosomen

Mäuse wurden mit gp150-Exosomen immunisiert (Kontrollgruppe: 293-Exosomen) und vier Wochen später mit MHV-68 infiziert (a). Fünf bzw. 17 Tage nach Infektion (Tag 33 bzw. 45) wurde jeweils ein Teil der Mäuse eingeschläfert und mit den aufgeführten Methoden auf eine Auswirkung der Vakzinierung hin untersucht (a und b).

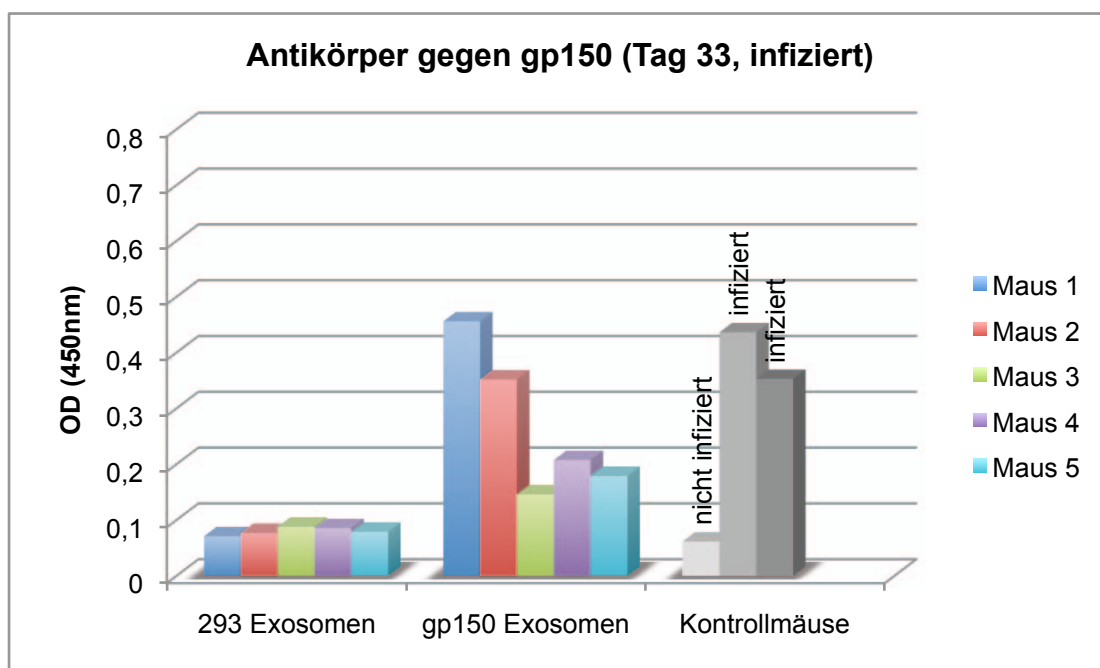
4.2.2.3.1 Untersuchung der humoralen Immunantwort

Fünf Tage nach Infektion wurden die Hälfte der infizierten und alle nicht infizierten Mäuse eingeschläfert und das Blut, die Milzen und die Lungen präpariert. Das Blut wurde abzentrifugiert. Das Serum wurde auf Antikörper gegen gp150 untersucht. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe eines ELISAs. Da gp150 nicht als rekombinantes Protein erhältlich war, wurden die ELISA-Platten mit MHV-68-Viruslysate beschichtet. Der Nachweis der Serumantikörperbindung erfolgte mittels eines HRP-gekoppelten Zweitantikörpers. Als Kontrollen wurden Seren zweier MHV-68-infizierter und einer nicht infizierten Maus herangezogen. Hier war zu beachten, dass sich in den Kontrollseren der infizierten Mäuse natürlich nicht nur gp150-reaktive, sondern Antikörper mit Spezifitäten gegen viele verschiedene MHV-68-Antigene befanden, welche im ELISA ebenfalls detektiert wurden.

a)



b)



c)

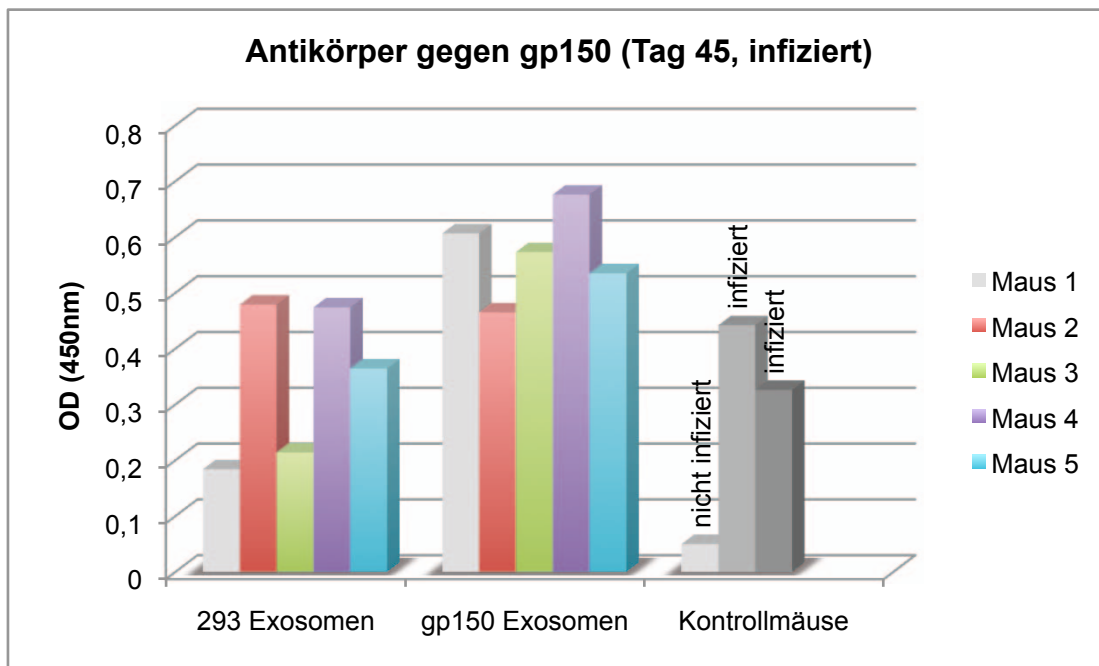


Abb. 4.19: Produktion von Antikörpern in Mäusen nach Immunisierung mit gp150-Exosomen

C57BL/6-Mäusen wurden zweimalig je 10 µg Exosomen injiziert, welche das MHV-Glykoprotein gp150 enthielten. Eine andere Gruppe erhielt Exosomen ohne dieses Antigen. Einen Monat später wurden 20 der 30 Mäuse mit MHV-68 infiziert. Nach 5 Tagen (33. Versuchstag) wurde das Serum der Hälfte der infizierten und aller nicht infizierten Mäuse mit einem ELISA auf das Vorhandensein von gp150-spezifischen Antikörpern untersucht, um den Immunisierungserfolg zu überprüfen.

Erwartungsgemäß konnten in den Seren der Mäuse, die nicht infiziert und denen vorher Kontrollexosomen ohne gp150 injiziert worden waren (Abb. 4.19 a), keinerlei Antikörper gegen gp150 nachgewiesen werden. Aber auch die Antikörper-Titer in den Seren der infizierten Kontrollgruppe am Tag 33 (Abb. 4.19 b) waren nur wenig höher, was vermutlich auf den doch noch recht frühen Zeitpunkt nach der Infektion zurückzuführen war. Dahingegen wiesen alle der neun mit gp150-Exosomen immunisierten Mäuse (die 10. Maus verstarb aus ungeklärten Gründen) Antikörper gegen dieses Glykoprotein auf (Abb. 4.19 a und b). Diese müssen allein auf die Vakzinierung zurückzuführen sein. Wären sie Resultat einer Immunantwort auf die Infektion mit MHV-68, hätten sich die Antikörper auch im Serum der infizierten 293-Mäuse befinden müssen.

Die Antikörperkonzentrationen in den Seren der Mäuse waren größtenteils vergleichbar oder sogar höher als in den Seren der infizierten Mäuse der

Positivkontrolle, obwohl hier nicht die Gesamtheit aller anti-MHV-68-Antikörper, sondern nur die gp150-spezifischen nachgewiesen wurden. Die Immunisierung scheint also sehr effizient gewesen zu sein.

17 Tage nach Infektion mit MHV-68 (Tag 45 des Versuchs) wurden die restlichen Mäuse eingeschläfert und ihr Serum ebenfalls auf Antikörper untersucht. Hier machten sich nun deutlich die Auswirkungen der Infektion bemerkbar. Alle zehn Mäuse wiesen hohe Antikörpertiter auf. Die Mäuse, welche zuvor zweimal mit gp150-Exosomen immunisiert worden waren hatten aber durchgehend höhere Konzentrationen als diejenigen, denen Exosomen ohne MHV-68-Antigen injiziert worden waren. Hier kommt der sogenannte *Recall*-Effekt zum Tragen, da in diesen Mäusen ja schon Memory-B-Zellen für gp150-spezifische Antikörper vorhanden waren und diese sehr schnell auf die erneute Antigenstimulation mit der Produktion von neuen Antikörpern reagieren konnten.

4.2.2.3.2 Untersuchung der zellulären Immunantwort

Der Erfolg der Immunisierung sollte nicht nur in Hinsicht auf die Bildung von Antikörpern, sondern auch in Form von spezifischen T-Zellen untersucht werden. Hierbei wurden die Milzen der Mäuse zerkleinert und die Zellen vereinzelt. Die Reaktivierung MHV-68-spezifischer T-Zellen aus den Splenozyten (10^6 Zellen/Well) erfolgte durch Inkubation mit Exosomen (10 μ g), entweder mit oder ohne gp150, bzw. MHV-68-Viruslysate (10 μ g), welches aus infizierten BHK-21-Zellen gewonnen und mit 0,1% Triton X-100 denaturiert worden war (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Heiko Adler). Die Inkubation der Zellen geschah in Elispot-Platten, die mit Antikörpern gegen murines Interferon- γ beschichtet worden waren, sodass jede stimulierte T-Zelle theoretisch in einem Punkt auf der Membran resultieren sollte.

Am Tag 33 war in den Mäusen, welchen nur Kontrollexosomen injiziert worden waren, keine zelluläre MHV-68-spezifische Immunantwort nachzuweisen, und zwar unabhängig davon, ob die Mäuse mit MHV-68 infiziert waren oder nicht (Abb. 4.20 a und b). Nur Maus fünf (infiziert, Tag 33) zeigte eine schwache Reaktivierung an. Da die Reaktivierung allerdings in allen Wells auftrat, egal, ob die Zellen mit 293-, gp150-Exosomen oder Viruslysate inkubiert worden waren, wird sie auf eine unspezifische, durch die Aufreinigung der Zellen zurückzuführende Stimulation zurückzuführen sein.

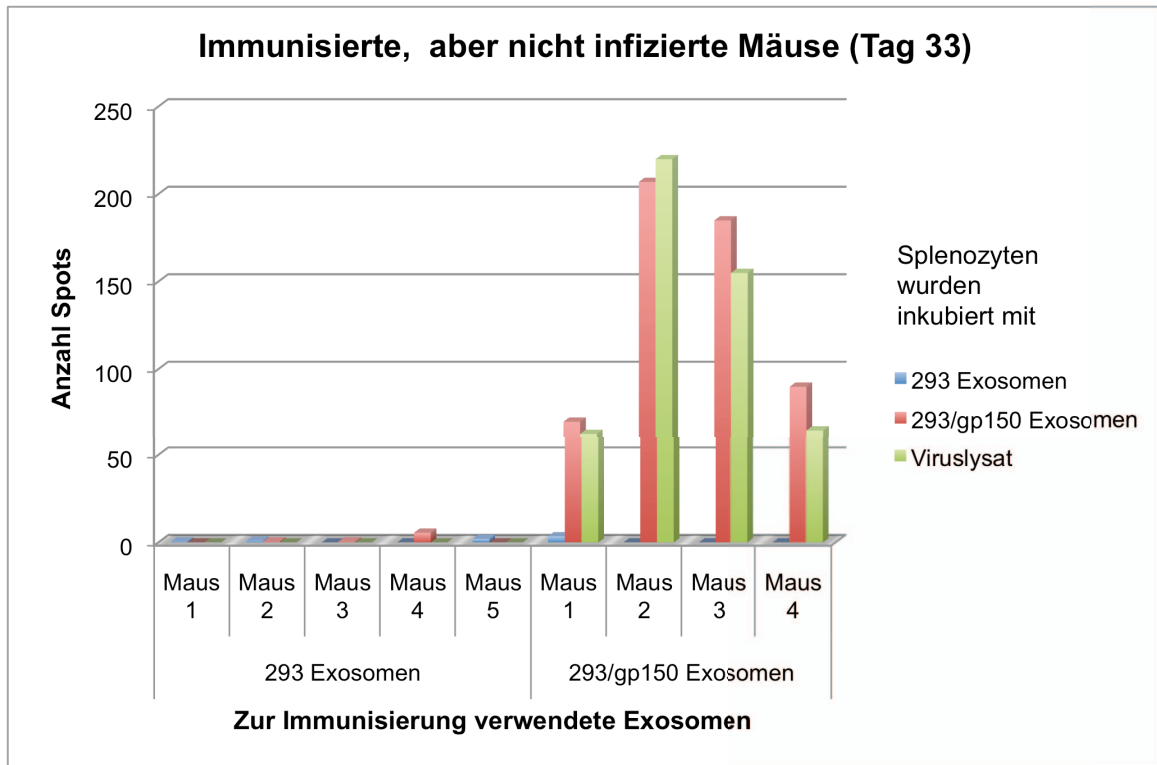
Von den neun Mäusen, die mit gp150-Exosomen immunisiert worden waren, zeigten fünf (alle nicht infizierten und eine der infizierten Mäuse) eine teilweise sehr deutliche Reaktivierung von T-Zellen sowohl nach Stimulation mit gp150-Exosomen, als auch mit Viruslysat (Abb. 4.20 a und b). Darunter befanden sich die vier Mäuse, die am meisten Antikörper produziert hatten. Die restlichen vier Mäuse hatten zwar auch Antikörper im Serum (Abb. 4.19 b), gp150-spezifische T-Zellen konnten in diesem Fall aber nicht nachgewiesen werden. Die Ursache für das Fehlen solcher T-Zellen konnte nicht genau geklärt werden. Ein Fehler bei der Versuchsdurchführung, z. B. durch das Vergessen mehrerer Injektionen, kann ausgeschlossen werden, da alle Mäuse Antikörper aufwiesen. Dass die Infektion mit MHV-68 einen negativen Effekt auf die Effizienz der Immunisierung hatte, ist ebenfalls als sehr unwahrscheinlich anzusehen, gerade auch, weil eine der fünf Mäuse eine sehr starke T-Zellantwort zeigte.

Keine Spots traten auf nach Inkubation mit 293-Exosomen. Dies ließ den Schluss zu, dass sämtliche Spots der immunisierten Mäuse auf gp150-spezifische T-Zellen zurückzuführen waren. In diesen schien also ein effizientes T-Zell-Priming stattgefunden zu haben.

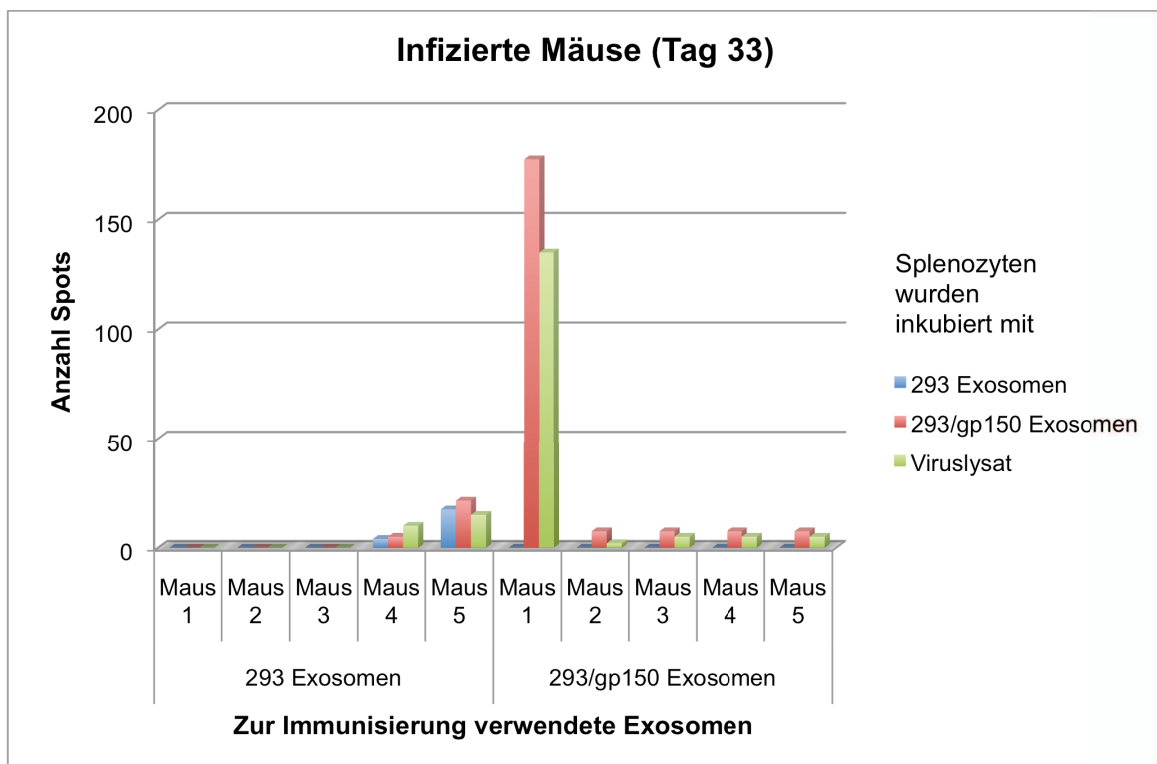
17 Tage nach Infektion (Tag 45 des Versuchs) war bei allen Mäusen, in Übereinstimmung mit der Antikörperbildung, eine starke zelluläre Immunantwort sichtbar (Abb. 4.20 c). Alle zeigten eine große Anzahl von T-Zellen, die auf eine Stimulation mit gp150-tragenden Exosomen und Viruslysat reagierten. Bildet man aus den Mausgruppen den Mittelwert der Anzahl an Spots ergaben sich 334,5 Spots/Maus (293-Exosomen) vs. 374 Spots (gp150-Exosomen) nach Stimulation mit gp150-Exos und 220 Spots/Maus vs. 297 Spots nach Inkubation mit Viruslysat. Die Mäuse, die vorab mit gp150-Exosomen immunisiert worden waren, wiesen also, trotz der MHV-68-Infektion, eine etwas höhere Anzahl an MHV-68- bzw. gp150-spezifischen T-Zellen auf als die Vergleichsgruppe (293-Exosomen). Hierbei fiel auf, dass sich im Elispot durchschnittlich mehr T-Zellen durch Inkubation mit gp150-Exosomen als mit Viruslysat reaktivieren ließen. Dies erscheint auf den ersten Blick unerwartet, da durch das Lysat sowohl gp150-spezifische, als auch T-Zellen mit anderen MHV-68-Reaktivitäten angesprochen werden sollten und deshalb eigentlich eine deutlich stärkere Immunantwort ausgelöst werden sollte als durch die Exosomen, die nur T-Zellen einer Spezifität reaktivieren dürften. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass Exosomen als größere, komplexere und daher

immunologisch wirkungsvollere Partikel die T-Zellen durch eine verbesserte Aufnahme und Präsentation durch APCs effizienter stimulierten als das Viruslysat.

a)



b)



c)

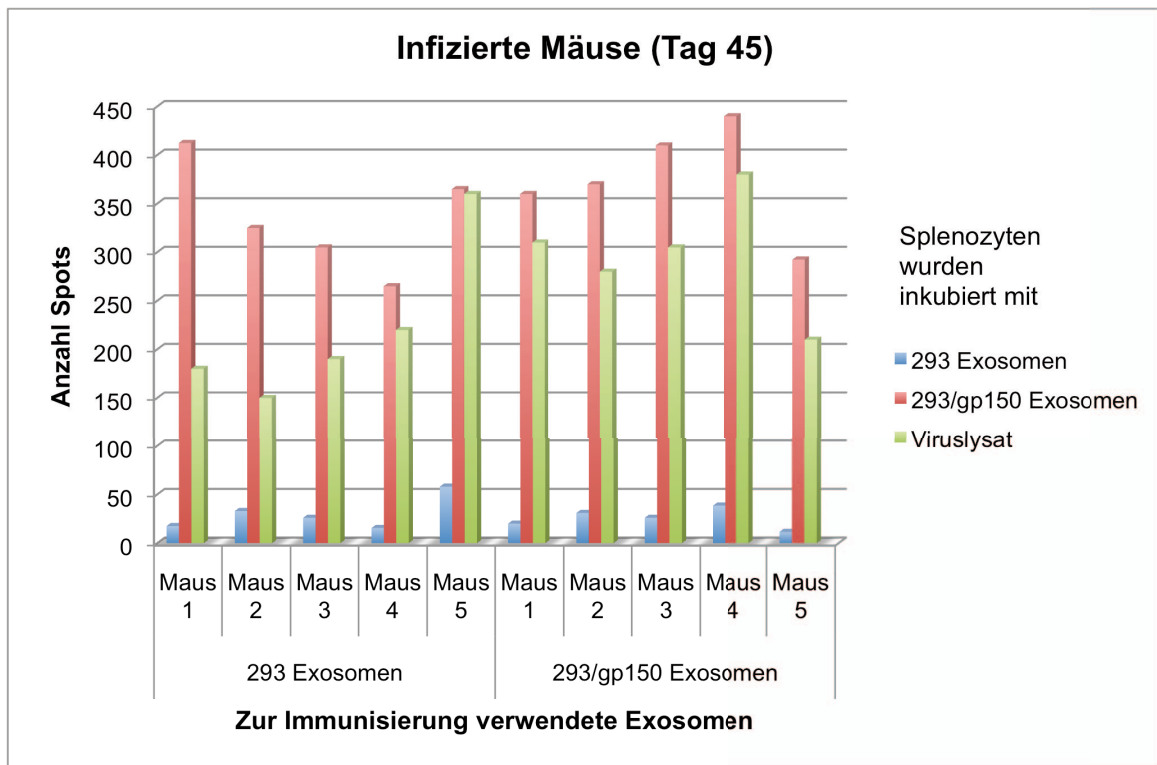


Abb. 4.20: Bildung spezifischer T-Zellen in Mäusen nach Immunisierung mit gp150-Exosomen

Die Milzen der Mäuse wurden präpariert und die Splenozyten mit Hilfe eines Interferon- γ -Elispots auf eine Reaktivierung von T-Zellen hin getestet. Die Stimulation erfolgte durch Inkubation der Zellen mit Exosomen (+/-gp150) bzw. Viruslysate. Während in den Mäusen, denen Kontroll-exosomen (293) injiziert worden war, keine T-Zellreaktivierung erkennbar war, zeigten fünf der neun mit gp150-Exosomen immunisierten Mäuse (alle nicht infizierten und eine der infizierten Mäuse am Tag 33) eine deutliche zelluläre Immunantwort, die nicht auf die Infektion mit MHV-68, sondern allein auf die Vakzinierung zurückzuführen war (Abb. a und b). Die Mäuse, die 17 Tage nach Infektion untersucht wurden (Tag 45), wiesen, als Folge davon, alle eine starke Immunantwort auf. Trotzdem war auch hier noch ein Effekt der zuvor erfolgten Immunisierung sichtbar, da die gp150-Mäuse durchwegs mehr spezifische T-Zellen aufwiesen als die Mäuse der Kontrollgruppe (293-Exosomen, Abb.c).

4.2.2.3.3 Auswirkung der Immunisierung auf die Replikation und die Latenzentwicklung von MHV-68

Die Immunisierung mit gp150-enthaltenden Exosomen resultierte in allen Mäusen in hohen Antikörpertitern. In einigen Tieren war zudem auch eine ausgeprägte zelluläre Immunantwort nachweisbar. Von den Mäusen, die nach der Immunisierung mit MHV-68 infiziert und fünf Tage später untersucht wurden, war dies nur eine. Bei den am Tag 17 nach Infektion ausgewerteten Mäusen ließ aber die bei mehreren Tieren aufgetretene stärkere T-Zellantwort im Vergleich zur Kontrollgruppe darauf schließen, dass es sich hier nicht um ein Priming, sondern um eine T-Zell-Reaktivierung

handelte. Also sollten die spezifischen T-Zellen auch schon zum Zeitpunkt der Infektion als Resultat der Immunisierung vorhanden gewesen sein.

Um zu überprüfen, ob dies Auswirkungen auf das Ausmaß der Infektion hatte, wurden die pulmonalen Virustiter der am Tag 5 p.i. (33. Versuchstag) eingeschlaferten Mäuse bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt erreichen die Titer aufgrund der initialen produktiven Phase von MHV-68 üblicherweise ihren Höhepunkt (Sunil-Chandra et al., 1992). Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe eines Plaque-Assays. Plaques entstehen durch die lytische Vermehrung von Viren auf adhärenen Zellen (in diesem Fall BHK-21-Zellen) und können, färbt man die Zellen mit einer Kristallviolett-Lösung an, unter dem Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden. Aus der Anzahl der entstandenen Plaques konnte dann der Gehalt an infektiösen Viruspartikeln errechnet werden.

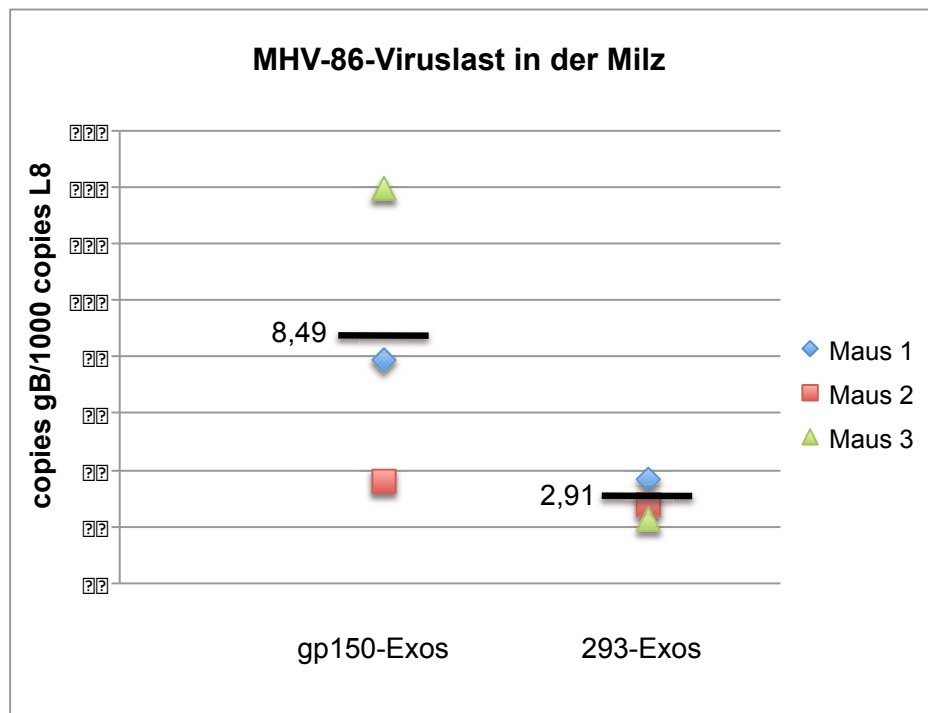
Ebenso wurde die Menge an viraler DNA in den Milzen der Mäuse am Tag 17 p. i. (45. Versuchstag) ermittelt. Dies sollte darüber Aufschluss geben, wie viele latent mit MHV-68 infizierte B-Zellen sich darin befanden. Die Quantifizierung erfolgte mittels Realtime-PCR, wobei die Kopienanzahl der viralen, für gB codierenden DNA bestimmt wurde. Zur Normalisierung wurde das zelluläre ribosomale L8-Gen verwendet.

Die Durchführung sämtlicher nicht-immunologischen Tests dieses Experiments wurde von der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Adler am Helmholtz Zentrum München übernommen.

Obwohl in den Mäusen aufgrund der Immunisierung sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten nachweisbar waren, hatten diese nur sehr wenig bis keinen Effekt auf den Verlauf der Infektion. So fanden sich zwischen den immunisierten und den Kontrollmäusen keine Unterschiede bzgl. der pulmonalen Virustiter (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Untersuchung der Viruslast in der Milz ergab beim ersten Tierversuch eine Reduktion der viralen DNA-Menge um ca. 65 %. Allerdings bestand jede Gruppe nur aus drei Mäusen. Dazu kommt, dass die Viruslast der Mäuse der Kontrollgruppe relativ variabel war. Die könnte z. B. auf eine ineffizient verlaufene Infektion zurückzuführen sein. Da die Mäuse durch Auftropfen von Virussuspension auf die Nase infiziert wurden, kann, im Gegensatz z. B. zu einer subkutanen Infektion, nie ganz sichergestellt werden, dass die gesamte Virenmenge aufgenommen wurde.

a)



b)

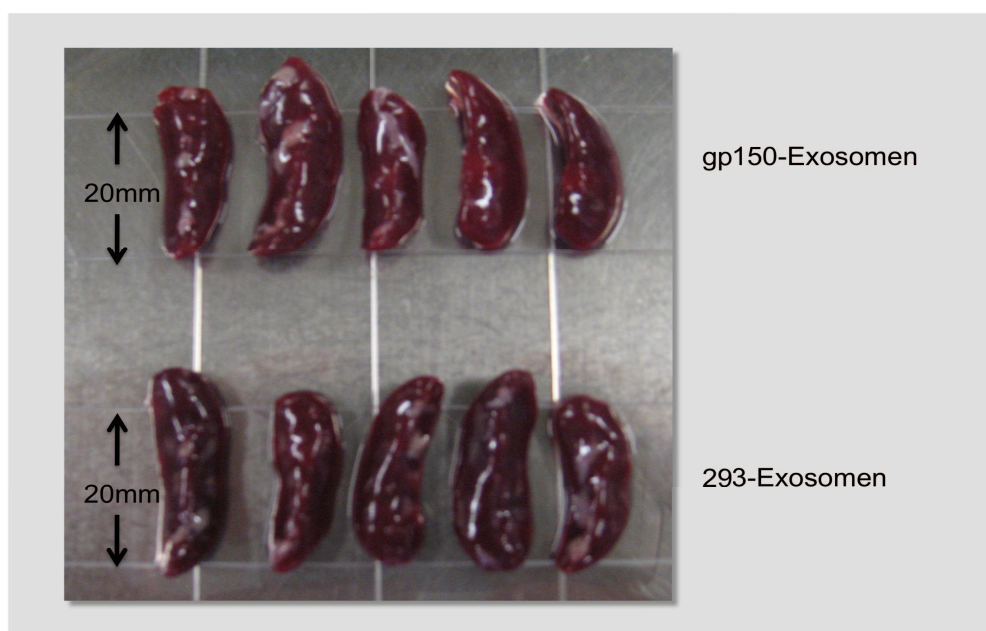


Abb. 4.21: Viruslast in der Milz und Splenomegalie in Mäusen nach Immunisierung mit Exosomen

a) Nachdem Mäusen gp150-tragende (gp150) bzw. Kontrollexosomen (293) injiziert und die Tiere anschließend mit MHV-68 infiziert worden waren, wurde 17 Tage später die Milz-DNA präpariert und die Viruslast ermittelt. Sie wird als Anzahl der viralen gB-Kopien pro 1000 Kopien des zellulären ribosomalen L8-Gens angegeben. In den mit gp150-Exosomen immunisierten Mäusen war die Viruslast (Mittelwert: 2,91), verglichen mit dem Mittelwert in

den Kontrollmäusen (8,49), reduziert. Allerdings war die Anzahl der für diesen Versuch verwendeten Mäuse mit $n=6$ sehr niedrig, sodass sich keine gesicherte und statistisch belastbare Aussage treffen ließ. Auch konnte das Ergebnis in einer Wiederholung des Experiments nicht verifiziert werden.

b) 17 Tage nach Infektion mit MHV-68 wurde die Milzgröße der Mäuse verglichen. Bei der Testgruppe (gp150-Exosomen) wie bei der Kontrollgruppe (293-Exosomen) trat die für eine MHV-68-Infektion typische Splenomegalie auf. Die gp150-spezifische, durch die Immunisierung hervorgerufene Immunantwort in den Mäusen hatte darauf also augenscheinlich keinen Einfluss.

Das Ergebnis der reduzierten Viruslast in der Milz konnte bei der Wiederholung des Vakzinierungsexperiments mit einer größeren Anzahl an Mäusen nicht verifiziert werden. Auch die Vergrößerung der Milz schien durch die Immunisierung nicht beeinflusst worden zu sein. Bei allen infizierten Mäusen war die Splenomegalie stark ausgeprägt, ohne dass ein Unterschied zwischen der Test- und der Kontrollgruppe bestand (Abb. 4.21 b).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Vakzinierung mit Exosomen, welche das virale Antigen gp150 enthielten, zur Induktion einer effizienten humoralen und zellulären Immunantwort in den Mäusen geführt hatte. Diese hatten aber auf den Verlauf einer daraufhin erfolgten MHV-68-Infektion nur geringen bis gar keinen Einfluss. Auf die Gründe für diesen Umstand wird im Diskussionsteil näher eingegangen.

4.3 Exosomen und Virus-like-Particles als Basis eines neuartigen immuntherapeutischen Ansatzes zur Behandlung der chronisch lymphatischen Leukämie

Die chronisch-lymphatische Leukämie (B-CLL) stellt die häufigste aller Leukämieformen dar. Obwohl B-CLL-Zellen tumorassoziierte Antigene exprimieren, welche durchaus Ziele einer T-Zellvermittelten Immunantwort sein können, entziehen sie sich in der Regel der immunologischen Kontrolle. Als eine wichtige Ursache für die gestörte Interaktion zwischen B- und T-Zellen gilt die unzureichende oder gänzlich fehlende Expression des CD40-Liganden (CD40L, CD154) auf den T-Zellen der Patienten (Cantwell et al., 1997; Kipps et al., 2000). Die Interaktion von CD40L mit seinem Rezeptor CD40 ist aber von großer Bedeutung für die Aktivierung spezifischer T-Zellen. Des Weiteren führt die Stimulierung von CD40, welches u. a. von gesunden und malignen B-zellen exprimiert wird, in diesen zur Expression von für eine Immunantwort wichtigen kostimulatorischen und Adhäsionsmolekülen. Dies und die Tatsache, dass CLL-Patienten an einer Immundefizienz ähnlich der bei Personen mit einem genetischen Defekt im CD40L Gen leiden, führte zu der Annahme, dass die Bindung von CD40 an CD40L eine Schlüsselrolle in der T-Zell-B-Zell-Aktivierung spielt und dass die Störung dieser Interaktion ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der B-CLL darstellt.

Folglich wurde schon mehrfach versucht, durch die Übertragung des CD40L auf Leukämiezellen zu erreichen, dass diese sich selbst und gegenseitig stimulieren, dadurch immunogener und für T-Zellen erkennbar werden. Die Versuche, welche unter Zuhilfenahme adenoviraler, adenoassoziiertes, lentiviraler oder Herpes-Simplex-basierter Vektoren stattfanden, haben sich zwar prinzipiell als wirksam erwiesen, die Effekte waren aber nur transient (Bonamino et al., 2004; Chu et al., 2002; Tolba et al., 2001; Wendtner et al., 2002, Wierda et al., 2000). Auch mit EBV-basierten Vektoren wurden *in vitro* schon Erfolge erzielt (Hettich et al., 2006).

Aufgrund dieser Erkenntnisse sollte nun untersucht werden, ob sich auch Exosomen bzw. Virus-like-Particles als Vehikel zum Transfer des CD40L auf B-CLL-Zellen eignen.

4.3.1 Vorversuche mit B-Blasten und PBMCs gesunder Blutspender

4.3.1.1 Der CD40-Ligand wird in Exosomen transportiert und effizient auf B-Zellen übertragen

Zuerst sollte geklärt werden, ob sich der CD40L in Exosomen einbauen und auf B-Zellen übertragen lässt. Aus diesem Grund wurden 293-Zellen mit einem Expressionsplasmid für den humanen CD40L transfiziert, zusätzlich auch in Kombination mit gp350. Nach drei Tagen wurden die generierten Exosomen aus dem Zellkulturüberstand extrahiert und im Dot Blot auf das Vorhandensein der gewünschten Proteine hin untersucht (Abb. 4.22 a). Dabei zeigte sich, dass der CD40L in hoher Konzentration auf den Exosomen vorhanden war. Nachdem dieser Nachweis erbracht war, wurden von den Exosomen jeweils 100 µg mit 5×10^5 B-Blasten inkubiert. Als Negativkontrolle dienten 293-Exosomen ohne CD40L. Nach 24 h wurde die Übertragung des kostimulatorischen Moleküls auf die B-Zellen im Durchflusszytometer analysiert (Abb. 4.22 b). Auch hier konnte wieder der Einfluss von gp350 als ein die Adhäsion an B-Zellen verbesserndes Molekül bestätigt werden. Aber auch jene Exosomen, welche nur den CD40L besaßen, adhärten schon deutlich besser an B-Zellen als normale 293-Exosomen. Vermutlich ist dafür die Interaktion zwischen dem CD40-Rezeptor und dem CD40-Ligand verantwortlich.

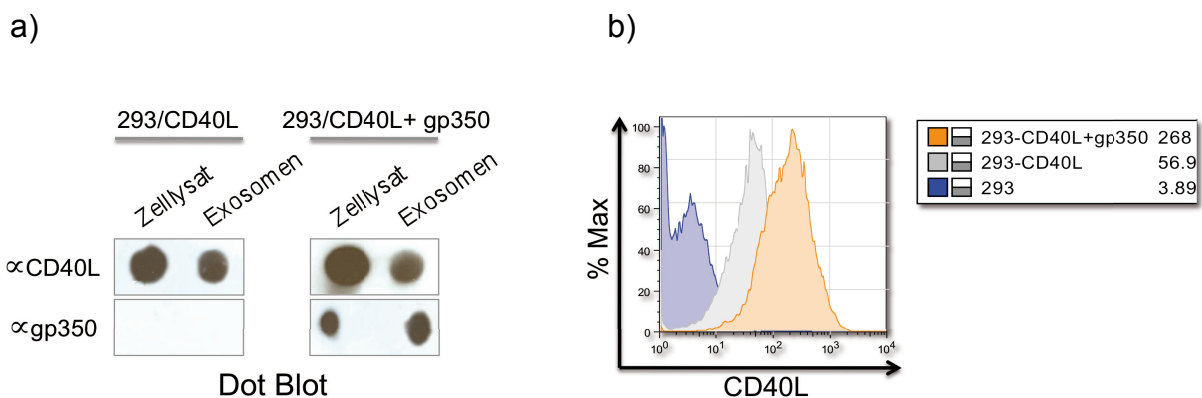


Abb. 4.22: Exosomale Übertragung des CD40L auf B-Blasten

293-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für gp350 und den CD40L transfiziert. Mittels Dot Blots konnte gezeigt werden, dass die produzierten Exosomen diese Proteine in hoher Konzentration enthielten (a). Anschließend wurden die Exosomen, welche den CD40L allein oder in Kombination mit gp350 in ihrer Membran enthielten mit B-Blasten inkubiert. Nach Antikörperfärbung des CD40L und Analyse der B-Blasten im Durchflusszytometer konnte eine effiziente Übertragung des CD40L auf die B-Zellen festgestellt werden. Wie zu erwarten war, wurde diese noch verbessert, wenn zusätzlich gp350 exprimiert wurde.

4.3.1.2 Die Übertragung des CD40L mittels Exosomen und VLPs auf B-Zellen verbessert deren Potential, T-Zellen aus PBMCs zu reaktivieren

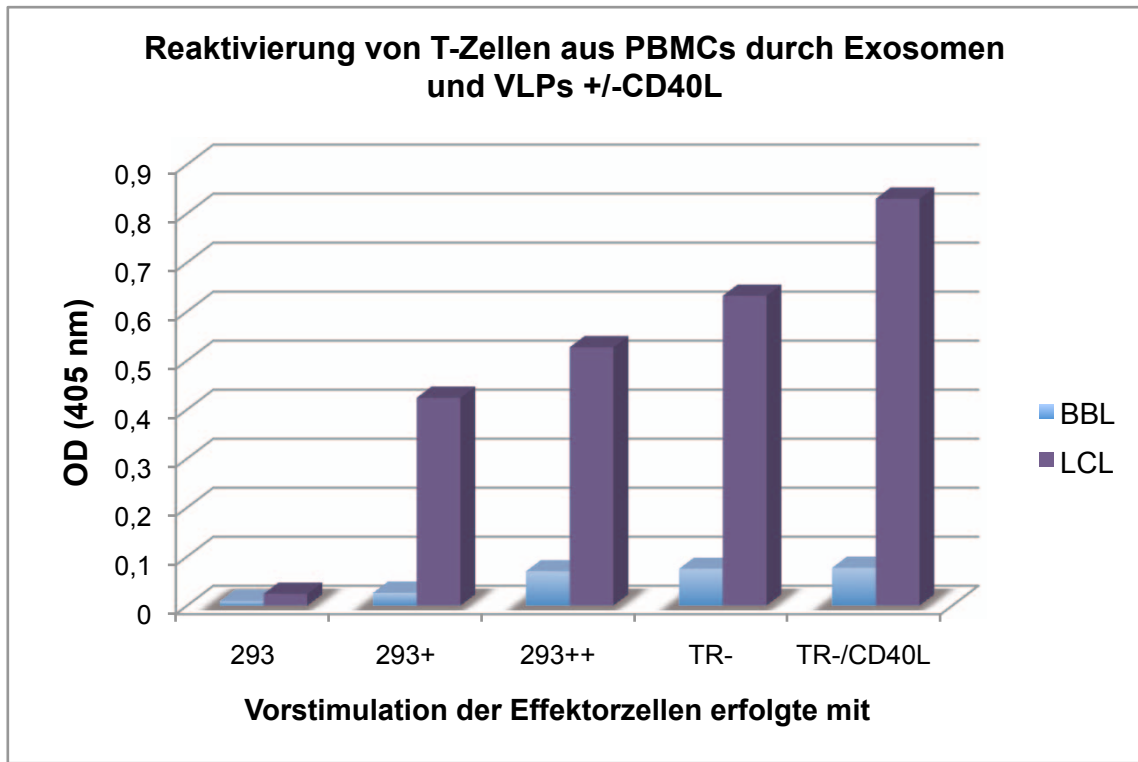
Zur Überprüfung der Funktionalität des CD40L wurde ein Stimulationsexperiment durchgeführt. Hierfür wurden PBMCs (je 5×10^6 pro 24-Well) mit gp350-enthaltenden Exosomen (293+) bzw. Virus-like-Particles (TR⁻, jeweils 50µg/Well) inkubiert oder aber mit Partikeln, welche zusätzlich auch den CD40L exprimierten (293++ bzw. TR⁻/CD40L). Nach drei Stimulationen im Abstand von jeweils vier Tagen (es wurden jedes Mal zusätzlich 1×10^5 bestrahlte frische PBMCs als APC-Quelle zugegeben) wurden die derart vorstimulierten PBMCs als Effektoren in einem ELISA eingesetzt und die T-Zellreaktivierung anhand der Ausschüttung von Inf- γ überprüft. Als Zielzellen wurden autologe LCLs und B-Blasten verwendet. Sowohl Exosomen als auch Virus-like-Particles konnten T-Zellen aus PBMCs stimulieren, so dass EBV-positive LCLs erkannt wurden. Die stärkere Reaktivierung durch VLPs war darauf zurückzuführen, dass diese viele EBV-Proteine besitzen und deshalb T-Zellen unterschiedlicher Spezifitäten aus den PBMCs stimulieren (Abb. 4.23 a).

Diese Versuche wurden mit PBMCs gesunder Blutspender durchgeführt. Die B-Zellen waren aufgrund ihrer Expression aller kostimulatorischen Moleküle also nicht in ihrer Funktion als antigenpräsentierende Zellen eingeschränkt und auch die T-Zellen exprimierten den CD40L in normaler Stärke. Dennoch konnte mit den CD40L-tragenden Exosomen und Virus-like-Particles noch eine deutliche Verbesserung des Stimulationspotentials erreicht werden, was sich in einer gesteigerten Zytokin-Produktion äußerte. Die volle Funktionalität des CD40L nach einer Übertragung mit Hilfe von Exosomen und VLPs scheint also gewährleistet zu sein.

Im Anschluss daran wurde ein Calcein-Freisetzung-Assay zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität der angereicherten T-Zellen durchgeführt. Lebende Zellen nehmen Calcein-AM (Acetoxymethylester), ein Fluoreszein-Derivat, auf und wandeln es in Calcein um. Dieses wird nach Komplexierung von Kalzium-Ionen zu einem grün fluoreszierenden Farbstoff. Werden die Zellen lysiert, wird dieser in den Zellkulturüberstand freigesetzt und kann dort mit Hilfe eines Fluorometer durch Anregung mit Licht der Wellenlänge 405 nm detektiert werden. In diesem Experiment wurden jeweils 5×10^3 PBMCs mit Calcein markiert, mit den jeweiligen Exosomen oder VLPs, die auch schon für die Vorstimulierungen eingesetzt worden waren, beladen (10 µg), und als Zielzellen für die vorstimulierten PBMCs (je 5×10^5 Zellen) verwendet.

Die prozentuale Zellyse wurde anhand der Calceinfreisetzung errechnet, wobei bei unbehandelten Zellen 0% und bei mit 0,2% TritonX-100 inkubierten Zellen 100% Lyse angenommen wurde (Abb. 4.23 b).

a)



b)

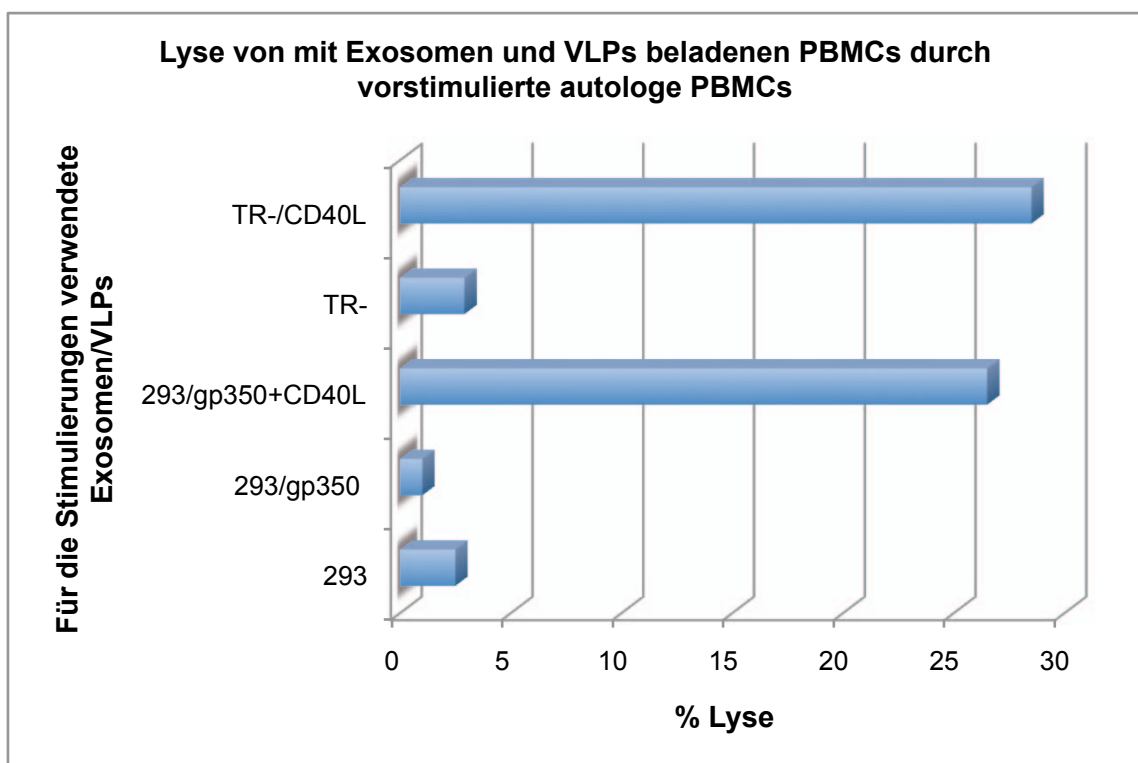


Abb. 4.23: Reaktivierung von T-Zellen aus PBMCs mit CD40L-enthaltenden Exosomen bzw. VLPs und Messung deren zytotoxischer Aktivität (vorherige Seite)

- a) PBMCs eines EBV-positiven Blutspenders wurden dreimalig mit Exosomen bzw. Virus-like-Particles stimuliert. Alle Partikel exprimierten gp350, um die Bindung an B-Zellen in ihrer Funktion als APCs zu verbessern, ein Teil außerdem den CD40L (293+: Exosomen ohne CD40L; 293++: Exosomen mit CD40L; TR-: VLPs ohne CD40L; TR-/CD40L: VLPs mit CD40L). Die Anwesenheit des kostimulatorischen Moleküls steigerte die Reaktivierungseffizienz beträchtlich. Getestet wurde dies durch Inkubation der vorstimulierten Effektorzellen mit EBV-negativen B-Blasten (BBL) bzw. EBV-positiven LCLs, generiert aus den Zellen des Spenders. Die Messung der T-Zellaktivierung erfolgte mittels eines Interferon- γ -ELISAs.
- b) Zum Test der Zytotoxizität der derart stimulierten T-Zellen wurden diese mit Calcein-markierten Zielzellen inkubiert. Dabei handelte es sich um autologe PBMCs, welche mit den gleichen, schon vorher zur dreimaligen Stimulation verwendeten Exosomen oder VLPs beladen worden waren. Durch Messung des in den Überstand freigesetzten Calceins konnte die prozentuale Zelllyse ermittelt werden. Auch hier erwies sich die Anwesenheit des CD40L von Vorteil, zu erkennen an einer effizienteren Lyse der Zielzellen.

4.3.2 Versuche mit PBMCs von CLL-Patienten

4.3.2.1 Die exosomale Übertragung des CD40-Liganden auf CLL-Zellen führt zu einer verstärkten Expression von Aktivierungsmarkern

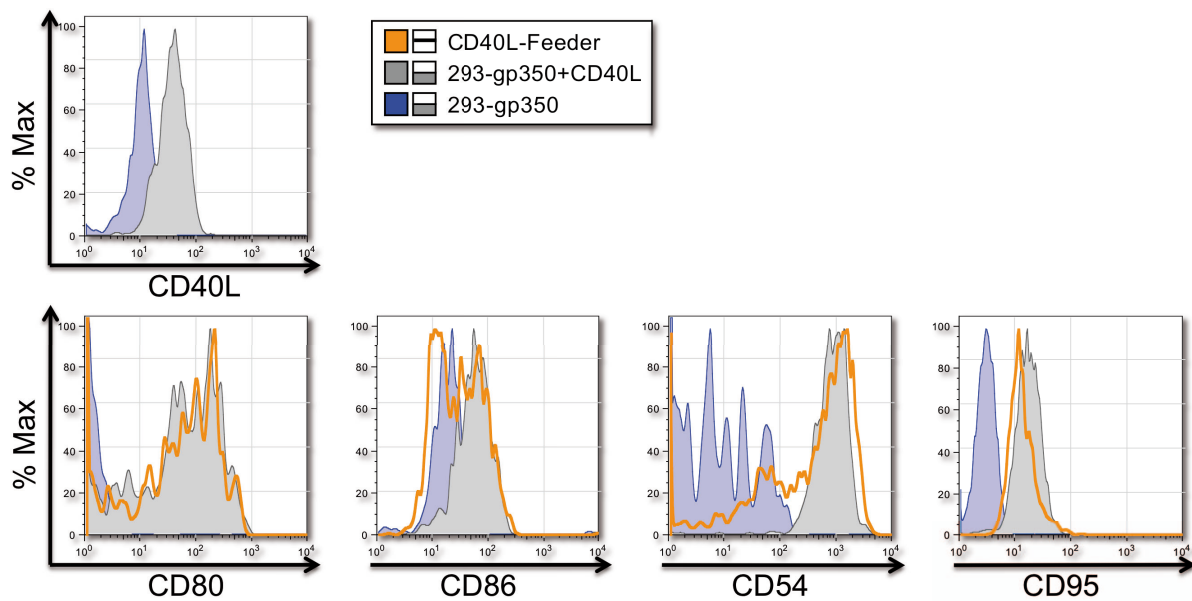
Da in Vorversuchen mit PBMCs gesunder Spender bestätigt werden konnte, dass der CD40L als funktionelles Protein in Exosomen und Virus-like-Particles transportiert wird (Abb. 4.22 und 23), sollte nun untersucht werden, ob sich damit auch B-CLL Zellen stimulieren lassen. PBMCs eines B-CLL-Patienten wurden dafür 24 h lang in einem Volumen von 2ml mit 50 μ g gp350- und CD40L-enthaltenden Exosomen inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer auf die Expression von CD80, CD86, CD54 (ICAM-1) und CD95 (Fas-Rezeptor) untersucht. Zum Vergleich wurden CLL-PBMCs außerdem für den gleichen Zeitraum mit murinen Fibroblasten kokultiviert, welche den humanen CD40L exprimierten (Abb. 4.24 a; Garrone et al., 1995).

Mit dieser Art von Untersuchung ließ sich allerdings nicht feststellen, ob sich die Antikörper-markierten Moleküle auf an die Zelloberfläche gebundenen Exosomen oder aber, nach einer erfolgten Fusion der Partikel mit der Zelle nun in der Membran derselben befanden. CLL-Zellen aus beiden Ansätzen reagierten auf die Stimulation durch den CD40L mit einer verstärkten Expression aller untersuchten Moleküle (Abb. 4.24 a). Die Inkubation mit Exosomen erwies sich dabei als durchaus vergleichbar mit der Inkubation auf Feederzellen. Die Expressionsstärke der kostimulatorischen

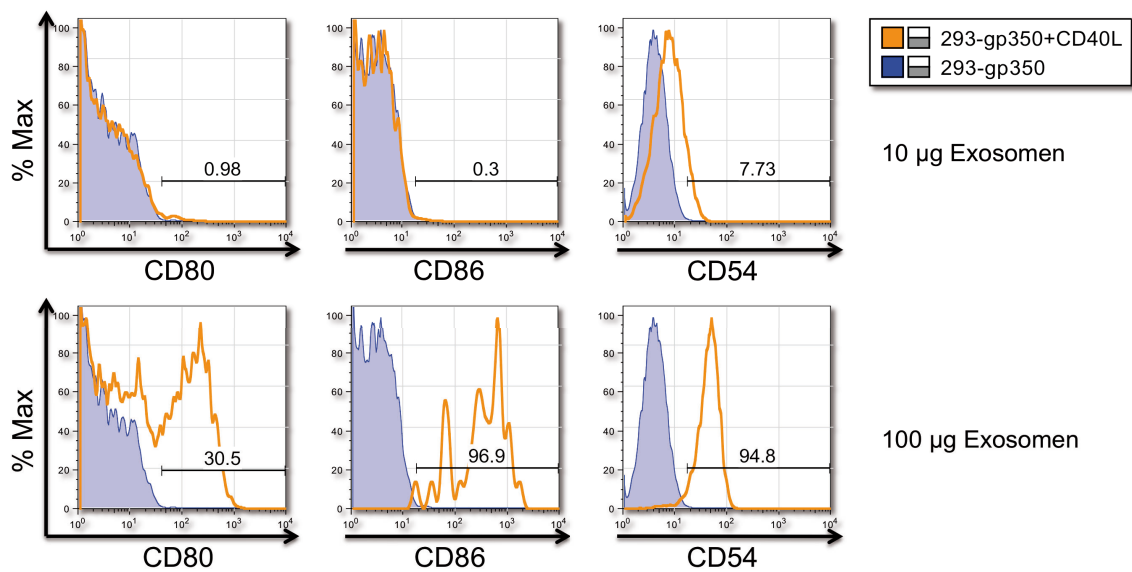
Moleküle war hierbei abhängig von der verwendeten Exosomendosis. Zwar genügten schon 10 μg (in 2 ml Zellkulturmedium), um bei den Zellen (2×10^6 /Well) eine Induktion von ICAM-1 auszulösen, aber erst bei der zehnfachen Menge konnte auch eine deutliche Expressionssteigerung von CD80 und 86 nachgewiesen werden (Abb. 4.24 b).

Bei Inkubation der gleichen Menge Exosomen mit B-Zellen eines gesunden Spenders, die im ruhenden, nicht aktivierten Zustand diese Moleküle nur schwach exprimieren, war ebenfalls eine klare Reaktion sichtbar. Die Leukämiezellen sprachen auf die Stimulation mit den Exosomen aber etwas stärker an als die gesunden PBMCs (Abb. 4.24 c).

a)



b)



c)

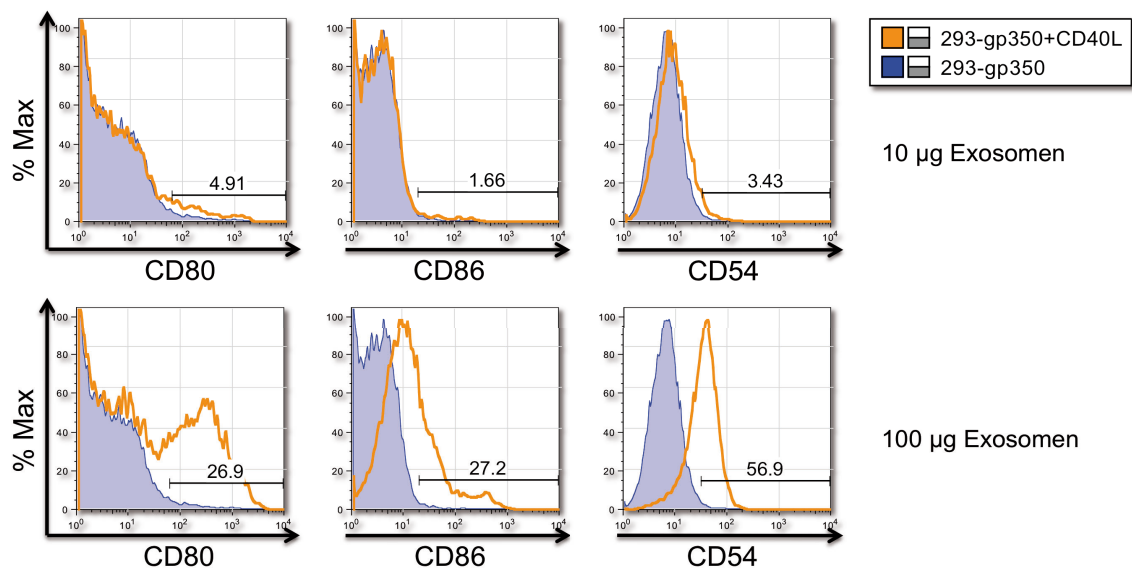


Abb. 4.24: Verstärkte Expression von Aktivierungsmarkern in CLL-Zellen und gesunden B-Zellen nach Stimulation mit CD40-Ligand-enthaltenden Exosomen

PBMCs eines B-CLL-Patienten wurden mit 50 µg gp350 und CD40L-enthaltenden Exosomen (293-gp350+CD40L) inkubiert und nach 24 h im Durchflusszytometer untersucht. Als Negativkontrolle wurden 293-Exosomen verwendet, welche nur gp350 trugen (293-gp350). Für die FACS-Analyse wurden jeweils 3×10^5 Zellen für 20 min mit spezifischen Antikörpern für CD40L, CD80, CD86, CD54 und CD95 inkubiert, gewaschen und anschließend mit fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern markiert. Die angegebenen Zahlen entsprechen dabei den Prozentsätzen der für die untersuchten Parameter positiven Zellen.

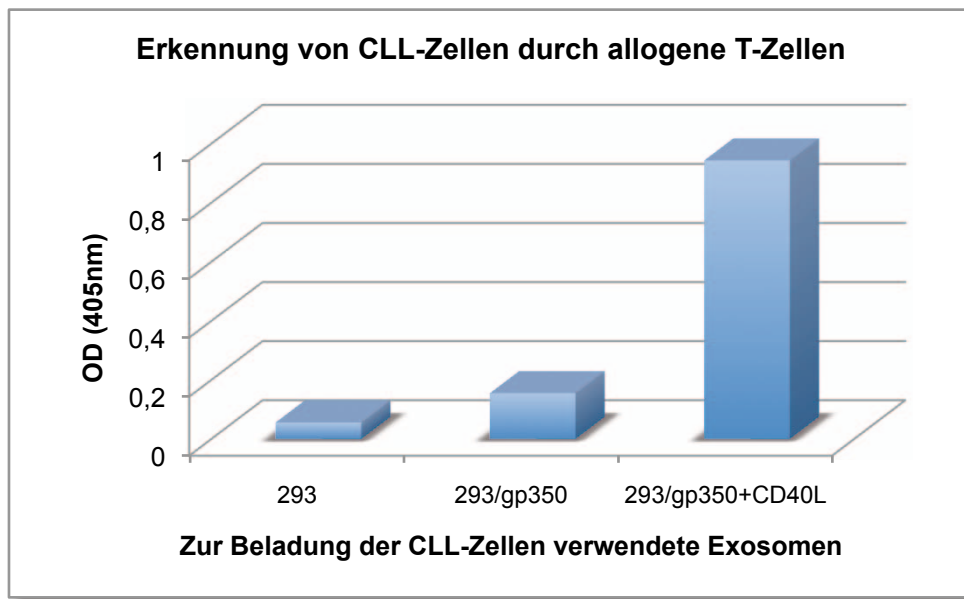
4.3.2.2 Die exosomale Übertragung des CD40-Liganden führt zu einer verbesserten antigenpräsentierenden Funktion der CLL-Zellen

Die Expression von kostimulatorischen Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen ist eine wichtige Voraussetzung für ihre Erkennung durch T-Zellen. Aufgrund der nur sehr schwachen Expression dieser Proteine in B-CLL-Zellen ist es nicht überraschend, dass diese in einer gemischten Lymphozytenreaktion nicht in der Lage sind, selbst allogene T-Zellen zu stimulieren und zur Proliferation zu bringen (Smith et al., 1977). Allerdings ist bekannt, dass CLL-Zellen nach Aktivierung des CD40-Rezeptors und einer daraus resultierenden Hochregulierung der in dem Prozess der Antigenpräsentation wichtigen Moleküle CD80, 86 und 54 eben jene Fähigkeit erlangen (Schultze et al., 1995).

Auch Leukämiezellen, welche mit CD40L-enthaltenden Exosomen stimuliert worden waren, antworteten mit einer verstärkten Expression der kostimulatorischen Moleküle (Abb. 4.24). Um zu testen, ob sie dadurch die Kapazität erworben hatten, allogene T-Zellen anzuregen, wurden sie mit PBMCs eines gesunden Blutspenders inkubiert. Die Stimulation wurde anhand der Sekretion von Interferon- γ mittels eines ELISAs überprüft (Abb. 4.25 a). Um die Fähigkeit der CLL-Zellen, als antigenpräsentierende Zellen zu fungieren, zu untersuchen, wurden sie (jeweils 5×10^4 Zellen), erneut nach Stimulation mit gp350 und CD40L-Exosomen, und außerdem auch mit VLPs, dazu verwendet, einen gp350-spezifischen T-Zellklon zu stimulieren (Abb. 4.25 b). Dies war möglich, weil die HLA-Konstellation des CLL-Patienten übereinstimmte, er also HLA DR13 exprimierte, über das die Präsentation des gp350-Epitops erfolgte.

Sowohl die Stimulation allogener T-Zellen als auch die Reaktivierung des EBV-spezifischen T-Zellklons durch die CLL-Zellen funktionierten effizient. Der stimulatorische Effekt wurde dabei durch den CD40L auf den Exosomen hervorgerufen. CLL-Zellen, die mit Kontrollexosomen inkubiert worden waren, wurden weder von allogener T-Zellen noch von dem gp350-spezifischen T-Zellklon erkannt (b). Zwar hatten in letzterem Versuch auch gp350-Exosomen und VLPs ohne CD40L einen gewissen Effekt. Dieser war aber deutlich schwächer ausgeprägt. Durch die Stimulierung des CD40-Rezeptors durch die CD40L-Exosomen und die daraus resultierende Hochregulierung der für die T-Zellerkennung wichtigen kostimulatorischen und Adhäsionsmoleküle konnten also auch B-CLL-Zellen als immunogene Zellen wirken.

a)



b)

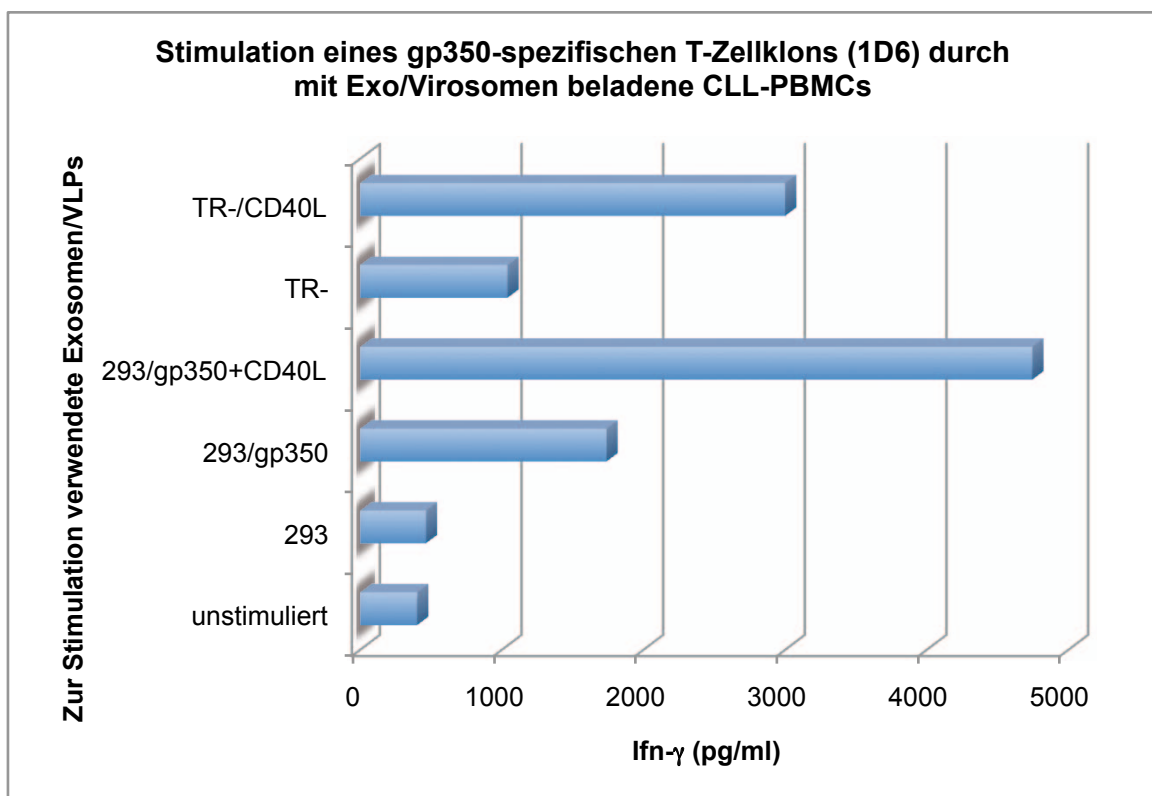


Abb. 4.25: Verbesserte antigenpräsentierende Funktion von CLL-Zellen nach Stimulation mit CD40L-Exosomen

Je Ansatz wurden 5×10^4 PBMCs eines CLL-Patienten für 24 h mit $10 \mu\text{g}$ Exosomen beladen. Diese enthielten CD40L und gp350, nur gp350 oder aber keines der beiden Moleküle in ihrer Membran. gp350 wurde verwendet, um die Exosomen gezielter an die CLL-Zellen zu binden. Anschließend wurden die Zellen mehrmals gewaschen und über Nacht mit jeweils 5×10^4

allogenen T-Zellen kokultiviert (a). In einem weiteren Versuch wurden Exosomen und VLPs (TR⁻) nach Inkubation mit CLL-Zellen zur Stimulierung eines gp350-spezifischen HLA-gematchten T-Zellklons (10^4 Zellen/Ansatz) verwendet (b). Die Messung der freigesetzten Menge an Interferon- γ wurde wieder mit Hilfe eines ELISAs ermittelt.

Durch die beiden vorangegangenen Experimente konnte gezeigt werden, dass die exosomale Stimulation des CD40-Rezeptors auf CLL-Zellen sowohl zu einer gesteigerten Erkennung der Zellen durch allogene T-Zellen als auch zu einer effizienten Aktivierung von spezifischen T-Zellklonen führt. Ob durch die bessere Immunogenität der Leukämiezellen auch eine autologe T-Zellreaktivierung gelingt, sollte im folgenden Versuch geklärt werden. Hierbei sollten zunächst CLL-Zellen über einem Zeitraum von mehreren Tagen mehrfach mit Exosomen stimuliert werden.

Ein dabei auftretendes Problem war die hohe Mortalität der Leukämiezellen. Während CLL-Zellen *in vivo* als apoptoseresistent gelten, sterben sie *in vitro* schon nach wenigen Tagen. Nach fünf bis sechs Tagen waren häufig nur noch sehr wenige Zellen am Leben. Es wurde, wenn möglich, darauf geachtet, die erste Stimulation mit frisch isolierten PBMCs zu machen. Bei den wiederholten Stimulationen wurden dann, neben Exosomen, zum Zweck der Bereitstellung neuer antigenpräsentierender Zellen auch immer wieder CLL-Zellen zugegeben. Diese wurden direkt nach ihrer Isolation in Aliquots eingefroren und zum benötigten Zeitpunkt wieder aufgetaut.

Die Überlebensfähigkeit von B-CLL-Zellen *in vitro* kann durch Kokultivierung mit Feederzellen verbessert werden. Studien weisen darauf hin, dass sich hierfür v.a. mesenchymale Stammzellen (MSCs) oder folliculäre dendritische Zellen (FDCs) eignen (Quiroga et al., 2009). In einem Vorversuch wurden aufgetaute PBMCs eines CLL-Patienten mit einer Zelllinie folliculärer dendritischer Zellen (FDC 1) kokultiviert, nach drei Tagen gezählt und im Durchflusszytometer auf spontane Apoptose hin untersucht (Abb. 4.26). Als Ausgangswert dienten Zellen, die 6 h nach dem Auftauen gemessen wurden (77,8% lebende Zellen). So sollten diejenigen Zellen erfasst werden, die als Folge des Einfrier- und Auftauprozesses Schaden genommen hatten. Bei der Versuchsauswertung am Tag drei zeigte sich dann ein deutlicher Überlebensvorteil der auf den Feederzellen kultivierten Leukämiezellen. Ihre Gesamtzellzahl war kaum reduziert (um 11%) und knapp 70% der Zellen waren vital (negativ sowohl für die Annexin- als auch die Propidiumiodid-Färbung) im Vergleich zu knapp 78% am Beginn des Versuchs. Dieser Wert wurde von den CLL-Zellen

allerdings nur erreicht, wenn das Verhältnis ihrer Gesamtzahl im Vergleich zu den FDCs so niedrig war, dass ein direkter Zell-Zellkontakt möglich war. War dieser Kontakt nicht gegeben, profitierten die Leukämiezellen zwar immer noch von den löslichen Faktoren der Feederzellen und lebten länger, die Sterblichkeit war aber höher (55,9% bzw. 68,9% lebender Zellen zum Zeitpunkt des Messens bei gleichzeitiger Reduzierung der Zellzahl um 14 bzw 11%). Ohne Feederzellen wurden am Tag drei ein Viertel weniger Zellen als zu Versuchsbeginn gezählt. Von den noch vorhanden waren knapp 55% apoptotisch oder bereits tot.

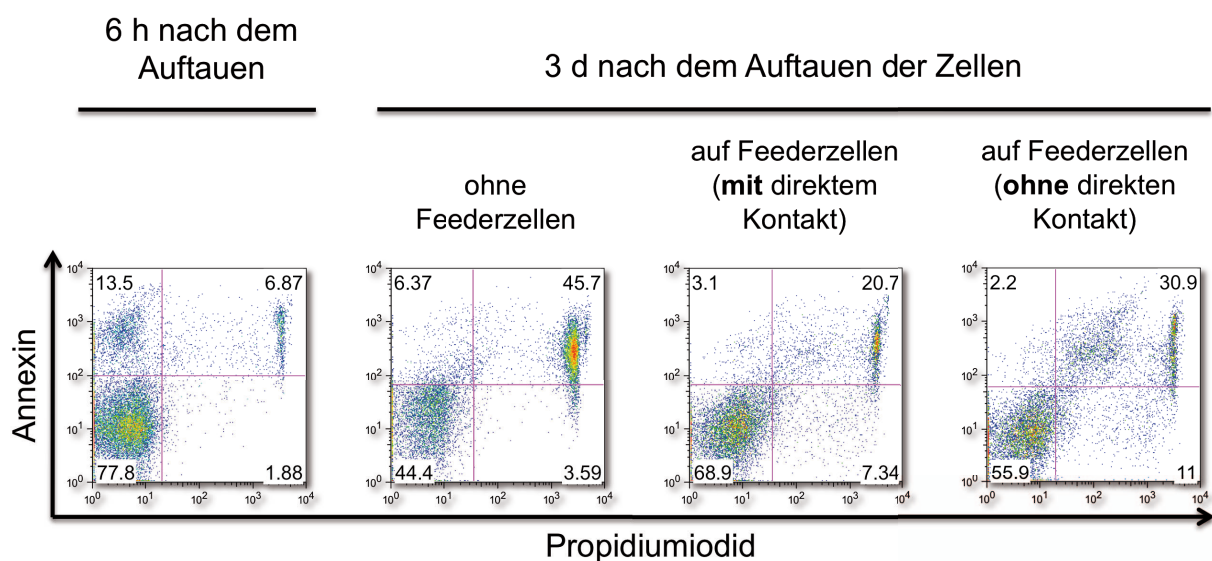


Abb. 4.26: Die Kokultivierung mit FDCs als Feederzellen verlängert das Überleben von CLL-Zellen *in vitro*

6h nach dem Auftauen von PBMCs eines CLL-Patienten wurden diese im Durchflußzytometer auf apoptotische und tote Zellen untersucht. Der Prozentsatz der zu diesem Zeitpunkt lebenden Zellen (77,8%) wurde als Ausgangswert festgesetzt. Die restlichen Zellen wurden für drei Tage in Kultur genommen, wobei ein Teil ohne, und ein anderer Teil auf FDCs kultiviert wurde. Anschließend wurden diese Zellen ebenfalls durchflußzytometrisch gemessen. Dabei trat ein klarer Feedereffekt der folliculären dendritischen Zellen zutage.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden die im Folgenden beschriebenen Stimulationsversuche mit CLL-PBMCs durchgeführt, die in Kokultur mit allogenen FDCs wuchsen. Wir hofften, damit B-CLL-Zellen so zu stimulieren, dass eine autologe Immunantwort erfolgte. Innerhalb von neun Tagen wurden PBMCs eines CLL-Patienten (6×10^6) dreimal entweder mit jeweils 50 μ g Exosomen (293/gp350+CD40L) oder mit Virus-like-Particles (TR/CD40L) stimuliert. Für den Fall, dass die CLL-Zellen durch die mehrtägige *in vitro*-Kultur beeinträchtigt werden und

dadurch in ihrer APC-Funktion eingeschränkt sein sollten, wurden bei der zweiten und dritten Stimulation außerdem frisch aufgetaute autologe CLL-PBMCs zugegeben (5×10^5 Zellen, Abb. 4.27).

Drei Tage nach der dritten Stimulationen wurden die CLL-Zellen, die daraufhin als Effektorzellen bezeichnet wurden, für die Versuchsauswertung vorbereitet. Jeweils die gleiche Anzahl der Zellen wurde mit autologen PBMCs als Targetzellen inkubiert. Diese waren entweder unbeladen oder aber mit 293-Exosomen bzw. den auch schon für die Vorstimulierungen verwendeten Partikeln (293-/gp350-CD40L-Exosomen bzw. TR-/CD40L⁻-VLPs) vorinkubiert worden. Um herauszufinden, ob neben einer Stimulation auch eine Anreicherung von T-Zellen stattgefunden hatte, wurden zum Vergleich auch CLL-PBMCs, welche nicht mit Exosomen bzw. VLPs vorstimuliert worden waren, mituntersucht. Die T-Zell-Reaktivierung wurde 12 h später anhand eines Interferon- γ -ELISAs quantifiziert (Abb. 4.27).

Der Versuch wurde mit Zellen eines EBV-infizierten Patienten mit B-CLL durchgeführt. Außerdem wurde darauf geachtet, dass der Spender noch eine ausreichende Anzahl von T-Zellen im Blut aufwies (in diesem Fall entsprachen sie 14% der Lymphozytenfraktion). Bereits bei den nicht vorstimulierten CLL-PBMCs reagierten die darin enthaltenen T-Zellen auf die Inkubation mit Exosomen und VLPs mit einer Ausschüttung von Interferon- γ . Die CLL-Zellen schienen also als antigenpräsentierende Zellen zu wirken und die Exosomen und VLPs aufnehmen und präsentieren zu können. Die Zytokinsekretion nach Stimulation mit 293/gp350+CD40L-Exosomen sollte v.a. auf gp350- oder aber tumorspezifische T-Zellen zurückzuführen sein.

Die als Antwort auf die Stimulation mit Virus-like-Particles produzierte Interferon-Menge war etwas höher, da hier neben gp350 weitere EBV-Antigene präsentiert werden konnten.

Der gleiche ELISA wurde auch mit den vorbehandelten Zellen durchgeführt, wobei klar ein durch die Vorstimulierungen hervorgerufener Effekt zu sehen war. So konnte nach drei Vorstimulierungen eine deutlich höhere Interferonproduktion gemessen werden. Man kann also davon ausgehen, dass es zu einer Anreicherung spezifischer T-Zellen gekommen war, da für alle Ansätze für diesen ELISA die gleiche Menge von Zellen eingesetzt worden war.

Auffallend war außerdem, dass die Effektorzellen bereits auf Inkubation mit unbeladenen CLL-Zellen mit einer Zytokinausschüttung reagierten (Abb 4.27, erste Spalte). Dies weist darauf hin, dass diese nun als Tumorzellen erkannt wurden und vermutlich durch die vorausgegangenen Stimulationen auch CLL-spezifische T-Zellen angereichert worden waren. Eine noch effizientere Anregung erfolgte, wenn die CLL-Zielzellen mit gp350+CD40L-Exosomen oder VLPs beladen worden waren, da hier natürlich auch die EBV-spezifischen T-Zellen aktiviert wurden.

Schlussfolgernd konnte mit diesem Versuch gezeigt werden, dass sich das Verfahren des kombinierten exosomal Transfer eines kostimulatorischen Moleküls (CD40L) und viraler Proteine, die gleichzeitig einen B-Zell-Tropismus vermitteln und als Antigene wirken, als wirksam erwiesen hatte.

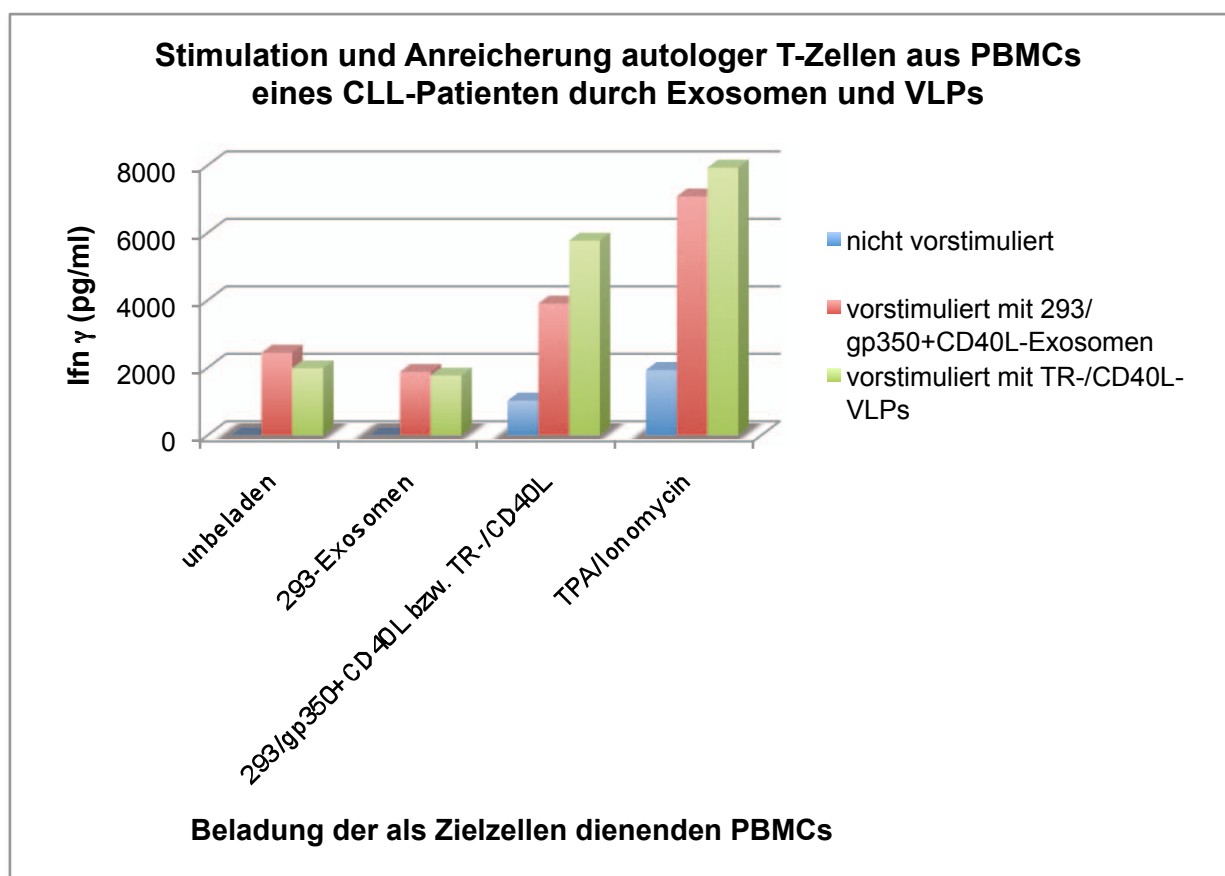


Abb. 4.27: Stimulierung und Anreicherung von CLL- und EBV-responsiven T-Zellen aus CLL-PBMCs

PBMCs eines EBV-positiven CLL-Patienten wurden im Abstand von jeweils drei Tagen dreimal mit Exosomen (293/gp350+CD40L bzw. 293 als Negativkontrolle) oder VLPs (TR-/CD40L) vorstimuliert. Um das Ausmaß der Spontanapoptose der CLL-Zellen zu reduzieren,

wurden sie während der Dauer des Versuchs mit allogenen FDCs (FDC1) als Feederzellen kokultiviert. Am Tag acht nach der ersten Stimulation wurden aufgetaute autologe PBMCs mit 293-Exosomen, 293-/CD40L+gp350-Exosomen oder TR⁻/CD40L-VLPs über Nacht inkubiert, oder aber unbehandelt gelassen. Anschließend wurden sie mit den vorstimulierten Zellen für weitere 12 h kokultiviert und eine Aktivierung von T-Lymphozyten anhand eines Interferon- γ -ELISAs gemessen. Dies wurde auch mit nicht vorstimulierten Zellen unternommen, um eine eventuell erfolgte Anreicherung von T-Zellen bei den vorstimulierten PBMCs feststellen zu können. Dies scheint auch der Fall gewesen zu sein. So konnten bei den vorstimulierten PBMCs als Effektorzellen deutlich mehr T-Zellen reaktiviert werden im Vergleich zu den nicht vorstimulierten PBMCs. Unter den reaktivierten T-Zellen waren nicht nur EBV-spezifische (welche durch präsentierte Antigene von gp350+CD40L-Exosomen und VLPs angeregt wurden), sondern auch solche, die CLL-Zellen erkannten (erste Spalte, „unbeladen“). Durch den Einsatz von Exosomen als Transfervehikel für den CD40L und EBV-Antigene ist *in vitro* also eine effiziente autologe T-Zell-Reaktivierung aus CLL-PBMCs möglich.

5. Diskussion

Die Entdeckung von Vesikeln, die von Retikulozyten während ihrer Reifung zu Erythrozyten freigesetzt werden, und ihre Bezeichnung als Exosomen liegt nun schon über 20 Jahre zurück. Am Anfang eher wenig beachtet, wurde im Laufe der Zeit das Interesse der Forschung an den Partikeln geweckt, von denen man heute weiß, dass sie von fast jeder Zellart sezerniert werden. Morphologisch sind Exosomen mittlerweile gut charakterisiert. Sie besitzen eine leicht "eingedellte", nicht ganz runde Form und eine Größe zwischen 40 und 100 nm. Diese variiert vor allem in Abhängigkeit von der Art der sezernierenden Zellen, ist aber auch innerhalb einer Zellart nicht vollständig homogen, wie in elektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt werden konnte. Exosomen besitzen eine charakteristische Dichte, die sie in Sucrosegradienten bei 1,10-1,19 g/mol und in Iodixanolgradienten bei 1,05-1,07 g/ml flotieren lässt. Auch durch ihren hohen Anteil an Lipiden und exosomalen Markerproteinen setzten sie sich von anderen zellulären Partikeln ab (Raposo et al., 1996; Thery et al., 2002; Thery et al., 2009).

Größeres Interesse der Wissenschaftler haben Exosomen aber erst Anfang der 90er Jahre auf sich gezogen. Bis zu diesem Zeitpunkt herrschte über die Funktion dieser Vesikel ziemliche Unklarheit. Bis heute entdeckt man immer wieder neue Funktionen und Prozesse, an denen sie beteiligt sind. Ein Meilenstein hierbei war die Entdeckung, dass Exosomen aus antigenpräsentierenden Zellen effizient T-Zell-Antworten induzieren können. G. Raposo und ihre Gruppe verwendeten dafür B-Zellen, die nach Endozytose eines hsp-Peptides hsp-haltige Exosomen freisetzen, welche in der Lage waren, einen hsp-spezifischen T-Zellklon zu stimulieren (Raposo et al., 1996).

Bis dahin war angenommen worden, die Hauptfunktion exosomaler Partikel läge in der Ausschleusung nicht mehr von der Zelle benötigter Membranproteine (Johnstone et al., 1987). Dass sie nun auch in immunologischer Hinsicht von Bedeutung zu sein schienen, ließ schon damals auf die Möglichkeit ihrer Anwendung in Immuntherapien hoffen.

Aus diesem Grund sollte im Verlauf dieser Doktorarbeit geklärt werden, ob sich auch das in unserem Labor etablierte 293-Maxi-EBV-System für eine Produktion von rekombinanten Exosomen oder VLPs eignet. Diese könnten einen ersten wichtigen Schritt in die Richtung der Entwicklung eines Impfstoffs gegen das Epstein-Barr Virus bedeuten oder aber in Immuntherapien einen Einsatz finden.

5.1 Herstellung und Analyse von Exosomen und Virus-like-Particles in 293-basierten Zelllinien

Durch die Möglichkeit der homologen Rekombination und die Einführung des bakteriellen F-Faktors kann das Genom von EBV in *E. coli* beliebig genetisch modifiziert werden (Altmann et al., 2005; Brielmeier et al., 1996; Delecluse et al., 1998; Dirmeier et al., 2005; Dirmeier et al., 2003; Kilger et al., 1998; Messerle et al., 1997; Neuhierl et al., 2005; Zimber-Strobl et al., 1996). HEK 293-Zellen, die mit diesem als Maxi-EBV bezeichneten Plasmid (p2089) stabil transfiziert sind, sind nach Induktion in der Lage, infektiöse, eGFP-codierende Viren zu produzieren. Diese zeigen Wildtyp-Eigenschaften und sind in der Lage, B-Zellen zu transformieren.

Nach Deletion der Verpackungssignale wurde daraus die erste EBV-basierte Verpackungszelllinie etabliert (Delecluse et al., 1999). Durch das Fehlen des als *terminal repeats* (TR) bezeichneten DNA-Abschnitts können diese Zellen kein infektiöses Virus mehr freisetzen, obwohl sie alle Proteine zur Verfügung stellen, die zum Zusammenbau viraler Partikel nötig sind. Prinzipiell bedeutete das auch, dass sich diese Zelllinie sehr gut für die Produktion EBV-Antigenhaltiger, DNA-freier Partikel eignen könnte.

Erste Hinweise, dass dies der Fall sein könnte, lieferten Versuche, in denen Überstand der mit BZLF1 induzierten Verpackungszelllinie (293/TR⁻) mit B-Zellen inkubiert wurde. Da sich darin keine infektiösen Viren befinden konnten, überraschte es anfangs, dass die B-Zellen trotzdem eine gewisse, auf eGFP zurückzuführende Grundfluoreszenz aufwiesen (Abb. 4.1 a). Es stellte sich heraus, dass diese aus der Anheftung von eGFP-haltigen Partikeln und damit einem reinen Proteintransfer und nicht aus der Übertragung für GFP codierender DNA resultierte (4.1 c). Aufgrund der Proteine gp350 und gp42 weisen diese Partikel, wie das komplette EB-Virus, einen ausgeprägten B-Zell-Tropismus auf (Abb. 4.5 b). Die Bindung der Partikel an B-Zellen durch Kolokalisation von gp350 mit CD21 auf der Zelloberfläche konnten durch Immunfärbung und Aufnahmen im Konfokalmikroskop bestätigt werden (Abb. 4.5 d).

Auch 293-Zellen produzieren konstitutiv Exosomen. Transfiziert man in diese ein für eGFP codierendes Plasmid in Kombination mit Plasmiden für die viralen Tropismusproteine, binden auch die daraufhin gebildeten Exosomen sehr effektiv an B-Zellen und färben sie grün (Abb. 4.5 a). Der Überstand aus nicht induzierten Verpackungszellen, in denen keine viralen Proteine produziert werden, löst bei B-

Zellen eine nur geringe, aber doch im FACS detektierbare, Fluoreszenz aus, die vergleichbar ist mit einer durch 293/gfp-Exosomen verursachten (Abb. 4.1 a). Durch die Induktion des lytischen Zyklus in TR⁻-Zellen produzieren diese Virus-like-Particles.

Zur Aufkonzentrierung der Partikel aus dem Kulturüberstand wurden zwei in der Literatur beschriebene Methoden adaptiert: die differentielle Ultrazentrifugation und die inverse Filtration. Beide erwiesen sich als funktional und vergleichbar, was die Exosomen- und VLP-Ausbeute betraf, die sich auf durchschnittlich 0,82 mg pro 10⁷ 293-Zellen belief (Abb. 4.3 a). Letztlich entschieden wir uns für die Ultrazentrifugationsmethode, da hier die Kosten für die Aufkonzentration deutlich niedriger lagen. In Experimenten, in denen eine sehr hohe Reinheit der Exosomen- oder VLP-Suspension vonnöten war und eine Kontamination auch von kleinen Proteinmengen ausgeschlossen werden sollte, wurden die Partikel zusätzlich über einen Iodixanolgradienten aufgereinigt (Abb. 4.2). Iodixanol wirkt auch in hohen Konzentrationen nicht toxisch auf Zellen, ist vergleichsweise wenig viskos und im Gegensatz zu Sucrose können damit isoosmotische Lösungen jeder beliebigen Dichte hergestellt werden.

Um die Herstellung der Virus-like-Particles weniger aufwändig zu gestalten, wurde eine Zelllinie (3989) generiert, die auf einem Plasmid die Induktorgene des lytischen Zyklus hinter einem bicistronischen, tet-responsiven Promotor enthielt (4.1.6). Mit dieser war es möglich, nur durch Zugabe von Doxzyzyklin ins Medium den lytischen EBV-Zyklus auszulösen. Die VLP-Produktion konnte so um zwei Tage verkürzt werden und auch die Ausbeute war, wenn auch weiterhin sehr abhängig vom Zustand der Zellen, konstanter, da die Variable der Transfektionseffizienz entfiel.

5.2 Das immunogene Potential von EBV-haltigen, 293-basierten Exosomen und Virus-like-Particles

Über die antigenpräsentierenden Eigenschaften von Exosomen gibt es mittlerweile viel Literatur. Die vielversprechendsten Ergebnisse werden dabei durchweg mit Exosomen aus antigenpräsentierenden Zellen, wie B-Zellen oder dendritischen Zellen, erzielt. Mit ihnen ist sogar eine direkte Stimulierung von T-Zellen möglich (Admyre et al., 2006; Kovar et al., 2006; Raposo et al., 1996; Sprent et al., 2005).

Relativ wenig publiziert wurde bis jetzt über Exosomen aus Epithelzellen. Die meisten Epithelzellarten exprimieren nur MHC Klasse I-Moleküle auf ihrer Oberfläche und gehören damit nicht zu den professionellen APCs. Auch hier gibt es Ausnahmen: So sind Dünndarmepithelzellen in der Lage, MHC Klasse II-Moleküle in vergleichbarer Stärke wie antigenpräsentierende Zellen zu exprimieren. Aus diesen Zellen stammende Exosomen besitzen die Fähigkeit, in Mäusen Immunantworten auszulösen (Büning et al., 2008). Auch aus Nasopharynxkarzinomen konnten schon MHC Klasse II-positive Exosomen isoliert werden (Kerjer-Bibens et al., 2006).

Die Zelllinie HEK 293 exprimiert keine MHC Klasse II-Moleküle, und auch MHC Klasse I-Moleküle werden nur vergleichsweise schwach exprimiert. Auch auf 293-Exosomen und VLPs befinden sich infolgedessen kaum HLA-Proteine (Abb. 4.7 a). Es war deshalb nicht überraschend, dass eine direkte Stimulierung von EBV-spezifischen T-Zellklonen damit nicht gelang (Abb. 4.8), obwohl die Antigene selbst in sehr hoher Konzentration auf der Oberfläche der Partikel vertreten waren (Abb. 4.7 b). Ähnlich wie bei Exosomen aus Zellen solider Tumore ist eine Aufnahme durch APCs und eine darauffolgende Prozessierung und Präsentation der exosomalen bzw. VLP-Antigene nötig, um eine Immunantwort zu induzieren. In meinen *in vitro*-Versuchen konnte ich zeigen, dass sich hierfür B-Zellen sehr gut eignen. Die in den Experimenten verwendeten Mini-LCLs stimulierten CD4⁺-EBV-spezifische T-Zellen effizient und schon nach Vorinkubation mit geringsten Partikelmengen (Abb. 4.9). Der Tropismuseffekt der Exosomen zeigte auch hier eine Wirkung. Exosomen mit gp350 und gp42 riefen bei gleicher Menge gegenüber solchen ohne diese beiden Glykoproteine eine um den Faktor 2 verbesserte Stimulation der T-Zellen hervor (Abb. 4.11).

Eine Reaktivierung EBV-responsiver T-Zellen gelang auch aus PBMCs EBV-positiver Spender (Abb. 4.12). Hier wurden zum ersten Mal VLPs verwendet, die aus der Zelllinie 293/VII⁻, einer Weiterentwicklung der Zelllinie 293/TR⁻, gewonnen worden waren. In dieser sind neben den *terminal repeats* auch die Gene für die Proteine LMP1, EBNA2, BZLF1 und EBNA 3A-C deletiert. Zwar konnte von Feederle et al. (Feederle et al., 2005) gezeigt werden, dass TR⁻-Zellen, wenn in diesen durch BZLF1 der lytische Zyklus ausgelöst wird, keine infektiösen Virionen gebildet werden. Trotzdem könnten bei einer eventuellen Anwendung von VLPs dieser Zelllinie als Vakzin aufgrund der vorhandenen Onkogene Sicherheitsbedenken auftreten. Da die

Zelllinie VII⁻ aufgrund ihrer Deletionen keine viralen Onkogene mehr exprimiert, wäre sie als VLP-produzierende Zelllinie sicherlich besser geeignet. Hinsichtlich der prinzipiellen Eignung von Exosomen und VLPs als Impfstoff gegen EBV war die Reaktivierung EBV-responsiver T-Zellen aus PBMCs ein wichtiger Schritt, da es, verglichen mit einer Stimulation von T-Zellklonen und einer reinen B-Zellpopulation als APCs, der physiologischen Situation, wie sie *in vivo* vorherrscht, deutlich näher kam. So war es nötig, dass Exosomen bzw. VLPs mit hoher Effizienz an die in PBMCs mit einem durchschnittlichen Anteil von 8-15% vertretenen B-Zellen binden und diese, nach Präsentation der partikelassoziierten Antigene vorhandene EBV-spezifische T-Zellen stimulierten. Mit Exosomen beladene APCs resultierten hierbei in einer Zunahme von CD4⁺-T-Zellen, wohingegen durch mit VLPs inkubierte APCs auch CD8⁺-T-Zellen angereichert werden konnten (Abb. 4.12 b). Zumindest *in vitro* schien die Antigenpräsentation ausschließlich durch B-Zellen zu erfolgen (Abb. 4.13). Wahrscheinlich sind *in vivo* jedoch auch dendritische Zellen des peripheren Bluts daran beteiligt.

Ebenso konnte ich zeigen, dass sich mit Virus-like-Particles die Bildung hoher EBV-spezifischer Antikörpertiter in naiven Wirten wie Wildtyp-Mäusen induzieren lässt (Abb. 4.14).

Für eine Infektion mit EBV existiert kein Kleintiermodell, was EBV betreffende *in vivo*-Experimente generell und auch die Evaluierung des Effekts einer Immunisierung mit EBV-Antigen-haltigen Partikeln erschwert. Für solche Zwecke werden daher immundefiziente Mausmodelle verwendet, in denen durch xenogene Transplantation von humanen PBMCs ein zumindest eingeschränkt funktionstüchtiges humanes Immunsystem imitiert werden kann. Neben dem in diesem Bereich bekanntesten SCID-Mausstamm (*severe combined immune deficiency*) gibt es unter anderem das Rag2^{-/-}γc^{-/-}-Mausmodell, welches sich von ersterem dadurch unterscheidet, dass die Mäuse nicht nur keine B- und T-Zellen, sondern auch keine funktionellen NK-Zellen ausbilden können. Mit diesem Mausmodell wurden unsere Versuche durchgeführt. Nach Injektion der PBMCs und einer zweimaligen Immunisierung mit VLPs (Abb. 4.15) konnten einige Wochen später in den Mäusen EBV-spezifische Immunantworten nachgewiesen werden. Die reaktivierten T-Zellen antworteten *ex vivo* auf eine Stimulation durch LCLs mit der Produktion von Ifn-γ (Abb. 4.17).

Antikörper konnten in den Mäusen nicht nachgewiesen werden. Dies war darauf zurückzuführen, dass zum untersuchten Zeitpunkt die Anzahl der humanen B-Zellen in den Mäusen bereits so gering war, dass sie unter die Detektionsgrenze fiel (Abb. 4.16). Dass VLPs potente Induktoren auch des humoralen Immunsystems sind, konnten wir schon vorab in dem Immunisierungsexperiment mit den Wildtyp-Mäusen klären (Abb. 4.14).

Neben den fehlenden B-Zellen traten noch gravierendere Probleme mit diesem Mausmodell auf. In mehr als einem Drittel der Mäuse entwickelte sich eine schwere *Graft-versus-Host-Disease*, die zum Tod der Tiere führte. Das Auftreten der Erkrankung schien in einem Zusammenhang mit bestimmten, nicht bekannten Eigenschaften der Spenderzellen zu stehen. Denn alle Mäuse, die Blutzellen eines bestimmten Spenders erhalten hatten, entwickelten die Krankheit, wohingegen Mäuse, die die Blutzellen eines anderen Spenders erhielten, nicht betroffen waren.

Die unterschiedliche *Engraftmentrate* der humanen Zellen in den Mäusen, die am Versuchsende ausgewertet werden konnten, erschwerte die Evaluation zusätzlich (Abb. 4.16).

Trotz der geringen Zahl an Mäusen zeigte dieser Versuch, dass in 293-Zellen hergestellte EBV-haltige VLPs nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* die Induktion von EBV-spezifischen Immunantworten auslösen können.

Mit einem zweiten Mausversuch konnte gezeigt werden, dass das immunstimulatorische Potential von Exosomen nicht nur für eine Reaktivierung, sondern auch für ein *Priming* von T-Zellen *in vivo* ausreichend ist.

In diesem Versuch wurde ein Tiermodell mit dem EBV-verwandten MHV-68 verwendet, welches häufig herangezogen wird, um γ -herpesvirale Infektionen *in vivo* zu untersuchen (Stewart et al., 1999). Neben einer 80%-igen DNA-Homologie mit EBV, weist MHV-68 auch eine 90%-ige Homologie zu KSHV auf. Mäuse, welche mit MHV-68 infiziert werden, entwickeln zudem Krankheitssymptome, die denen einer infektiösen Mononukleose im Menschen sehr ähneln (Stewart et al., 2004). Für unsere Versuche infizierten wir Mäuse mit Exosomen, die gp150, das MHV-68-Homolog zu gp350 aus EBV, exprimierten. Auch hier kam es in einem Teil der Mäuse zur Induktion spezifischer T-Zellen (Abb. 4.20) und zur Bildung hoher Titer an Antikörpern gegen gp150 (Abb. 4.19). Bei der Untersuchung weiterer Parameter, wie dem Grad der entwickelten Splenomegalie oder der Virustiter in der Lunge konnten

jedoch nur geringe bis keine Unterschiede zur Kontrollgruppe ausgemacht werden. Der einzige Effekt, der festgestellt werden konnte, war eine 65%-ige Reduzierung der viralen DNA-Menge in den Milzen der immunisierten Mäuse (Abb. 4.21). Leider konnte dieses Ergebnis in einer Wiederholung des Versuchs aber nicht reproduziert werden.

Das Ausbleiben einer Schutzwirkung der Immunisierung kann verschiedene Gründe haben. Antikörper stellen eine wichtige Komponente in der antiviralen Immunität dar. Sie neutralisieren Virionen (Zinkernagel und Hengartner, 2006) und vermitteln die Lyse infizierter Zellen (Sissons und Oldstone, 1980). Immunsereen von mit MHV-68 infizierten Mäusen inhibieren die MHV-68-Infektion von Fibroblasten (Stevenson und Doherty, 1998), vermutlich indem sie die Zellbindung blockieren (Gill et al., 2006). Hauptsächliches Zielprotein neutralisierender Antikörper ist gH/gL (Gill et al., 2006). Während dieses *in vivo* aber ein vergleichsweise wenig immunogenes Protein darstellt, wird die Antikörper-Antwort gegen MHV-68 von gp150-spezifischen Antikörpern dominiert. In unserem Versuch wurden Mäuse mit Exosomen immunisiert, welche als Antigen nur gp150 in ihrer Membran trugen. gp150 weist eine signifikante Homologie zu gp350 auf und wird deshalb häufig als Modell zur Untersuchung einer potentiellen Schutzwirkung von gp350 gegen EBV verwendet (Gillet et al., 2007). In jüngsten Untersuchungen konnten allerdings gezeigt werden, dass Antikörper gegen gp150, entgegen der Ergebnisse früherer Studien, keine neutralisierenden Eigenschaften aufweisen (Gill et al., 2006; Stevenson et al., 2009) und sich hierin von gp350-spezifischen Antikörpern unterscheiden. So konnte eindeutig gezeigt werden, dass gB neben gH/gL bei MHV-68 das einzige weitere Zielprotein neutralisierender Antikörper ist (Gillet et al., 2007). Dies könnte erklären, dass trotz hoher gp150-spezifischer Antikörpertiter keine bzw. nur sehr geringe Auswirkungen auf die Virustiter und die Splenomegalie nachweisbar waren (Abb. 4.21).

Auch dass gp150, wie gp350, beteiligt ist an der Bindung und Infektion von B-Zellen, wie von Stewart publiziert (Stewart et al., 2004), scheint nicht zuzutreffen (de Lima et al., 2004; Gill et al., 2007; Gillet et al., 2007). Desweiteren hat die Deletion von gp150 aus dem MHV-68-Genom keinen Einfluss auf die produktive virale Replikation *in vitro* wie *in vivo* (Adler et al., 2000; de Lima et al., 2004).

Aufgrund seiner großen Immunogenität und mit der Absicht, mit gp150 als einem zu gp350 homologen Glykoprotein eine größtmögliche Vergleichbarkeit zu

EBV herzustellen, haben wir uns dennoch dazu entschieden, dieses Protein als MHV-68-Antigen in den Exosomen zu verwenden.

Bei der Entwicklung eines Vakzins gegen MHV-68 bei Mäusen würde eine zusätzliche Expression von weiteren Antigenen, am besten eine Kombination aus latenten wie lytischen Proteinen, die als gute T-Zelltargets bekannt sind, vermutlich deutlich mehr Wirkung zeigen. Bei diesem Versuch sollte aber vor allem die Vergleichbarkeit von gp150 mit gp350 aus EBV im Vordergrund stehen.

5.3 Die Eignung von HEK-basierten Exosomen und Virus-like-Particles als Impfstoff gegen EBV

Die meisten antiviralen Vakzine, die derzeit in Verwendung sind, beruhen auf attenuierten Lebend- oder Totimpfstoffen. Die durch Lebendimpfstoffe, z. B. gegen Masern, Mumps, Röteln, Polio oder Gelbfieber, ausgelösten Immunantworten sind vergleichbar mit denjenigen, die bei einer natürlichen Infektion auftreten. Dadurch besteht meist bereits nach einer einzigen Vakzinierung ein ausreichender Impfschutz. Nicht anwendbar ist eine Lebendimpfung allerdings in immunsupprimierten Personen (Roy und Noad, 2008). Eine wichtige Zielgruppe für eine Impfung gegen EBV sind aber gerade solche Patienten, die aufgrund ihrer fehlenden Immunität einem hohen Risiko ausgesetzt sind, durch EBV verursachte lymphoproliferative Erkrankungen zu entwickeln.

Bis heute existiert kein klinisch anwendbares Vakzin zur Prävention EBV-assoziiierter Erkrankungen, obwohl schon mehrere Versuche unternommen wurden, einen wirksamen Impfstoff zu entwickeln.

Der Fokus lag dabei meist auf gp350, dem Hauptglykoprotein von EBV und primärem Zielprotein neutralisierender Antikörper. Wurde es mit Hilfe rekombinanter viraler Vektoren exprimiert, ließen sich damit sowohl in immunisierten Affen als auch in EBV-seronegativen Personen Immunantworten auslösen (Ragot et al., 1993; Gu et al., 1995; Mackett et al., 1996). Die Wirksamkeit von gp350 als Grundkomponente eines EBV-Vakzins konnte in einer Studie von 2007 ein weiteres Mal bestätigt werden. Hierbei führte der Einsatz eines gp350-Subunit-Vakzins, das zusammen mit dem Adjuvans AS04 verabreicht wurde, zur Verhinderung oder zumindest einer starken

Reduktion der bei Infektiöser Mononukleose auftretenden Symptome (Sokal et al., 2007).

Neben der Infektiösen Mononukleose und den von EBV verursachten soliden Tumoren, stellen, gerade in immunsuprimierten Patienten, auftretende lymphoproliferative Krankheiten ein Problem dar. Kommen EBV-negative immunsupprimierte Transplantatempfänger durch ein Spenderorgan zum ersten Mal mit EBV in Kontakt, führt dies aufgrund der nicht vorhandenen Immunität häufig zu einer starken Proliferation der EBV-infizierten B-Zellen. Aber auch bei einer schon bestehenden EBV-Infektion können die EBV-spezifischen T-Zellen, aufgrund ihrer durch die Immunsuppression verminderten Zahl und Aktivität, das Entstehen von Lymphomen oft nicht verhindern. Hier wäre der Einsatz eines Impfstoffs sinnvoll, welcher sowohl vor (ein Teil der Immunität bleibt im Normalfall erhalten) als auch in der Zeit nach der Transplantation eingesetzt wird und speziell und selektiv die EBV-spezifische Immunität stärkt. Eine Ausnahme bilden hier Patienten nach allogener Stammzelltransplantation, die selbst praktisch keinerlei Immunzellen mehr besitzen. Außerdem werden, zur Verringerung der Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer GvHD, häufig die T-Zellen des Spenders depletiert. Hier dauert es unter Umständen 6-12 Monate, bis sich die Zahl der T-Zellen nach der Transplantation wieder erholt hat und eine Immunisierung möglich ist (Lucas et al., 1996; Marshall et al., 2000; Small et al., 1999).

Generell sind Immunisierungen auch während Phasen von Immunsuppression möglich. Der Impferfolg hängt dabei davon ab, wie stark diese ausgeprägt ist. Impfungen gegen bestimmte Erreger wie Tetanus und Diphtherie werden, wenn sie nicht schon erfolgt sind, sogar empfohlen. Die Wirkdauer und auch die Antikörpertiter, die dabei erreicht werden, sind im Vergleich zu gesunden Personen um ca. 50-65% verringert, die Ansprechrate liegt aber bei erstaunlichen 85% (Klinische Nephrologie XXXIV/2005). Kontraindiziert sind allerdings, wie zuvor schon erwähnt, Vakzine, die auf Lebendimpfstoffen beruhen.

Einen sehr sicheren Impfstoff stellen im Allgemeinen Peptidimpfstoffe dar. Auch mit einem auf einem EBNA3C-Peptid basierendes Vakzin konnten Immunantworten in EBV-negativen Menschen ausgelöst werden (Moss et al., 1996). Peptidimpfstoffe sind meist gut verträglich und können kostengünstig hergestellt werden. Man umgeht mit ihnen bewußt das Problem der intrazellulären Kompartimentierung. Ihr Vorteil liegt

darin, dass sie von den Referenzstrukturen direkt präsentiert werden, ohne von der Zelle aufgenommen und verdaut werden zu müssen. So können je nach Auswahl der entsprechenden Peptide CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen stimuliert werden. Dies geschieht durch Beladung der MHC-Moleküle von außen. Trotzdem haben sie sich in der Praxis bis jetzt als nur eingeschränkt erfolgreich erwiesen. Ein Nachteil von peptidbasierten Vakzinen ist ihre relativ schwache Immunogenität. Meist werden sie außerdem sehr schnell wieder abgebaut. Die Präsentation von Peptiden kann des Weiteren nur in Kombination mit ihren jeweiligen HLA-Molekülen erfolgen (Azizi und Diaz-Mitoma, 2007). Nur diejenigen Personen, die dieses Molekül besitzen, sind in der Lage, das Peptid auch dem Immunsystem zu präsentieren. Um nahezu 100% der Bevölkerung in Bezug auf ihre HLA-Moleküle abzudecken, müsste ein Peptidimpfstoff viele verschiedene Peptide mit unterschiedlichen Restriktionen enthalten.

Für eine EBV-Impfung von immunsupprimierten Personen würden deshalb exosomale oder auf VLPs basierende Vakzine ideale Kandidaten darstellen.

Sowohl Exosomen aus dendritischen Zellen als auch aus Tumorzellen werden schon seit einiger Zeit zur Induktion von Immunantworten herangezogen und führten *in vitro* und in Mausversuchen zu guten Ergebnissen. Im Vergleich zu dendritischen Zellen, die in Mäusen höchstens fünf bis sieben Tage überlebten, konnten Exosomen noch nach einigen Wochen nachgewiesen werden (Luketic et al., 2007). Sie besitzen also das Potential, als lang anhaltende Immunstimulatoren *in vivo* wirken zu können.

Zur Therapie von Lungenkrebs-, Kolorektalkrebs- und Melanompatienten wurden Exosomen bereits in klinischen Phasen erprobt und haben sich als wirksam, sicher und gut verträglich erwiesen (Escudier et al., 2005, Morse et al., 2005). Ihre GMP-gerechte Herstellung war problemlos möglich.

Im Gegensatz zu Exosomen aus dendritischen Zellen bedürfen Tumorexosomen und solche aus HEK-Zellen der Aufnahme und Präsentation durch professionelle APCs. Durch die Expression von gp350 und gp42 können Exosomen zielgerichtet an B-Zellen binden und dadurch deutlich effektiver wirken. Neben diesen beiden Glykoproteinen sind noch weitere Moleküle, wie BKRF2 und BXL2, an der Adhäsion und Aufnahme von EBV in ihre Zielzellen beteiligt. Weiterführende Untersuchungen könnten hier Klarheit darüber verschaffen, ob sich mit Hilfe dieser Proteine der Tropismus der Exosomen noch weiter verstärken lässt.

VLPs werden bereits erfolgreich als Impfstoffe eingesetzt, z. B. gegen Hepatitis B oder humane Papillomviren (Roy und Noad, 2008). Es gibt verschiedene Expressionssysteme zur Produktion von VLPs, darunter die rekombinante Herstellung in Hefen (HBV- und HPV-VLPs, McAleer et al., 1992) oder die Infektion von Insektenzellen mit rekombinanten Baculoviren (Ludwig und Wagner, 2007). In den meisten Fällen werden dabei nur wenige oder, wie in oben genannten VLP-Vakzinen, sogar nur ein einziges virales Strukturprotein exprimiert, das sich spontan zu Viruskapsiden zusammensetzt. Die Herstellung der für diese Doktorarbeit verwendeten Virus-like-Particles erfolgte in HEK 293-Zellen. Nach Induktion des lytischen Zyklus setzten mit einem rekombinanten EBV-Genom transfizierte Verpackungszelllinien Virus-like-Particles frei. Aufgrund der Tatsache, dass in diesen die für die viralen Verpackungssignale codierenden Sequenzen durch das Kanamycinresistenzgen ersetzt worden waren, wird die Virus-DNA nicht in die viralen Prokapside verpackt. Die Struktur und die komplexe Proteinzusammensetzung der freigesetzten VLPs, einschließlich der Virushülle, gleicht der von intakten Viren, sie sind aber nicht infektiös (Feederle et al., 2005).

Im Gegensatz zu Peptiden sind Exosomen und Virus-like-Particles schon aufgrund ihrer Größe besser für das Immunsystem erkennbar. Vor allem VLPs tragen viele verschiedene virale Proteine auf und aktivieren das Immunsystem deshalb in einer grösseren Bandbreite. Zudem werden die Antigene in Exosomen und auch in VLPs in ihrer nativen Konformation präsentiert, so dass die gebildeten Antikörper und T-Zellen auch die Antigene auf dem Wildtyp-Virus selbst erkennen (Roy und Noad, 2008).

In meinen *in vitro*-Versuchen konnte ich zeigen, dass VLPs und Exosomen gute Stimulatoren v.a. für CD4⁺-T-Zellen sind. Bei der Behandlung von PTLD kommen häufig EBV-spezifische T-Zellen zum Einsatz, die *in vitro* aus Zellen des Patienten generiert und dann reinfundiert werden (Rooney et al., 1995; Rooney et al., 1998). Gerade CD4⁺-T-Zellen scheinen hier wichtiger zu sein als lange angenommen. So zeigten PTLD-Erkrankungen einen besseren klinischen Verlauf, wenn die transferten T-Zellen eine höhere Proportion an diesen T-Zellen aufwiesen. Außerdem wurden geringe Zahlen endogener EBV-spezifischer CD4⁺-T-Zellen in immunsupprimierten Patienten als Risikofaktor für die Entwicklung einer PTLD identifiziert (Sebelin-Wulf et al., 2007; Haque et al., 2007; Adhikary et al., 2007). Eine

Immunisierung mit EBV-VLPs vor der Transplantation könnte eventuell genau diese Zellpopulation effektiv vergrößern.

Neben CD4⁺-T-Zellen induzierten die von den Verpackungszellen sezernierten VLPs, im Gegensatz zu den Exosomen, auch CD8⁺-T-Zellen (abb. 4.12). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass sie nicht nur Proteine enthielten, die als typische Ziele EBV-spezifischer CD4⁺-T-Zellen gelten, wie z.B. gp350 (Hislop et al., 2007), sondern auch Zielproteine von CD8⁺-T-Zellen, wie die von den späten EBV-Genen BALF4 und BILF2 codierten Strukturproteine gp110 und gp78/55 (Hislop et al., 2007). Es wird davon ausgegangen, daß die Präsentation EBV-haltiger Exosomen als auch Viruslike-Particles vor allem durch B-Zellen erfolgt und die von außen aufgenommen Antigene demzufolge über MHC Klasse II-Moleküle präsentiert werden. So konnte ich in einem Stimulationsexperiment (Abb. 4.13) zeigen, daß nur in Anwesenheit von B-Zellen T-Zellen durch Inkubation von VLPs aus PBMCs reaktiviert werden können. Dieser Versuch wurde allerdings nur einmal durchgeführt. Sinnvoll wäre eine Wiederholung des Experiments unter Einbeziehung verschiedener Blutspender. Vielleicht würde sich dann eventuell doch herausstellen, dass auch EBV-VLPs durchaus durch in den PBMCs enthaltene professionelle APCs wie Makrophagen oder aber Monozyten aufgenommen und ihre Antigene präsentiert werden. Eine weitere Erklärung wäre ein *cross-priming* durch B-Zellen, so dass auch diese die EBV-Antigene über MHC Klasse I-Moleküle präsentierten. In diesem Punkt ist sich die Literatur nicht ganz einig. Keller et al. vertreten die Meinung, dass ein solches nur durch professionelle APCs wie dendritische Zellen erfolgt (Keller et al., 2009). Allerdings konnte gezeigt werden, dass B-Zellen aus Lymphknoten immunisierter Mäusen ohne Zugabe von zusätzlichem Antigen in der Lage waren, die Proliferation OVA-spezifischer CD8⁺-T-Zellen auszulösen. Dabei war die T-Zellproliferation im Vergleich zu derjenigen, die mit DCs als APCs erhalten wurde, nur um den Faktor drei verringert (Hon et al., 2005).

Wie alle Totimpfstoffe haben auch Exosomen und VLPs nur eine begrenzte Wirkdauer und bedürfen nach einigen Jahren einer Auffrischung. Da aber eine Vakzinierung mit Lebendimpfstoffen für immunsupprimierten Patienten nicht geeignet ist, sind sie hier das Mittel der Wahl. Aufgrund der Tatsache, dass die Entwicklung eines Lebendimpfstoffes gegen EBV aufgrund seiner hohen Komplexität schwierig ist und das Vorhandensein mehrerer Onkogene dazu führt, daß ein attenuierter EBV-

Lebendimpfstoff die strengen Sicherheitsbestimmungen von Vakzinen vermutlich nicht erfüllen würde, bieten sich Virus-like-Particles zur Verhinderung von PTLD und sogar als genereller EBV-Impfstoff an. So wäre eine prophylaktische Immunisierung von Personen denkbar, die bis zu einem bestimmten Alter noch EBV-negativ sind, da bei diesen das Risiko, später ein Hodgkin-Lymphom zu entwickeln, deutlich erhöht ist (Goldacre et al., 2009).

Zusammenfassend sind Exosomen und VLPs, die in EBV-positiven HEK 293-Zellen produziert werden, gute Induktoren sowohl humoraler wie auch zellulärer Immunantworten erwiesen. So konnte ich *in vitro* und *in vivo* zeigen, dass sie Virus-spezifische T-Zellen nicht nur reaktivieren, sondern auch zu einem Priming führen können. Das Fehlen eines besser geeigneten Tiermodells macht es aber schwer, zu beurteilen, wie wirksam das Vakzin im Menschen wäre.

5.4 Exosomen und Virus-like-Particles für die Immuntherapie der B-CLL

Trotz bedeutender Behandlungsfortschritte gilt die chronisch-lymphatische B-Zell-Leukämie (B-CLL) nach wie vor als unheilbar (Diehl et al., 1999; Mauro et al., 1999). Mit neuen Medikamenten wie Purinanaloga oder dem monoklonalen Antikörper Rituximab konnten eindrucksvolle Ansprechraten bei der Behandlung von CLL-Patienten erreicht werden (Faderl et al., 2003; McLaughlin et al., 1998). Nach dem Erreichen einer kompletten klinischen und molekularen Remission treten aber trotz allem bei den meisten Patienten Rezidive auf.

Es gibt verschiedene Aspekte, weswegen die CLL einen guten Kandidaten für die Anwendung immuntherapeutischer Behandlungsstrategien darstellt. CLL ist eine Erkrankung mit langsamem Tumorwachstum. Dies lässt genug Zeit für die Induktion von Immunantworten gegen die malignen Zellen durch eine Immuntherapie.

Zwar sind in den Patienten *ex vivo* CLL-spezifische T-Lymphozyten nachweisbar, *in vivo* findet jedoch keine ausreichende tumorgerichtete Immunantwort statt. Als eine wichtige Ursache für die gestörte Interaktion zwischen B- und T-Zellen gilt die unzureichende oder gänzlich fehlende Expression des CD40-Liganden auf den T-Zellen der Patienten (Cantwell et al., 1997; Kipps et al., 2000). Durch die Übertragung von CD40L auf die CLL-Zellen lässt sich eine gegenseitige Stimulierung erreichen, was ihre stimulatorische Kapazität erhöht und sie zu Zielzellen sowohl

allogener (Arditti et al., 2005) als auch autologer Zielzellen werden lässt (Kokhaei et al., 2004). Gleichzeitig wird ihre Sensitivität gegenüber Fas-induzierter Apoptose erhöht (Chu et al., 2002). Die Übertragung des CD40-Liganden erfolgte dabei meist durch *in vitro*-Transduktion mit viralen Vektoren, z. B. mit Adenoviren (Biagi et al., 2005). Diese lassen sich zwar in großer Zahl herstellen, transduzieren aber selbst bei einer hohen MOI CLL-Zellen nur schlecht. Das Verfahren setzt außerdem eine komplexe *ex vivo*-Behandlung der Tumorzellen voraus. Exosomen als Transfervehikel stellen hier eine vielversprechende Alternative dar.

Meine Versuche mit 293-Zellen zeigten, dass CD40L in Exosomen und VLPs transportiert wird. Die Präsenz des CD40L auf Exosomen bewirkt allein schon eine schwache Bindung an B-Zellen, vermutlich durch die Bindung an den CD40-Rezeptor, der er auf diesen Zellen hoch exprimiert ist. Die zusätzliche Präsenz von gp350 verleiht den Exosomen einen noch wesentlich stärker ausgeprägten B-Zell-Tropismus und sorgt für eine deutlich verbesserte Bindung (Abb. 4.22). Durch den exosomalen Transfer von CD40L auf B-CLL-Zellen kommt es zu einer Induktion des Adhäsionsmoleküls CD54, der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, sowie des Fas-Rezeptors CD95, und damit zu einer Erhöhung der Immunogenität dieser Zellen (Abb.4.24).

Trotz einer Reihe von Defekten und Alterationen, die in T-Zellen von CLL-Patienten charakterisiert wurden (Veenstra et al., 1996), konnte ich, genau wie einige weitere Arbeitsgruppen, im Anschluss demonstrieren, dass autologe T-Zell-Antworten gegen CLL-Zellen *in vitro* generiert werden können (Krackhardt et al. 2002). In meinen *in vitro*-Versuchen erkannten diese stimulierten T-Zellen CLL-Zellen mit und ohne EBV-Antigene (Abb. 4.25 und 4. 27). Es scheint also möglich zu sein, dass ein potenter Stimulus und eine gesteigerte Antigenpräsentation die beobachteten T-Zell-Alterationen und mögliche Toleranzmechanismen, die bei CLL-Patienten beschrieben wurden, überwinden können. Die gleichzeitige Übertragung von viralen Antigenen könnte die CLL-Zellen *in vivo* außerdem zu Zielzellen der EBV-spezifischen Immunität machen.

Exosomen und VLPs stellen deshalb neben viralen Vektoren einen neuen und vielversprechenden Ansatz zur Immuntherapie der chronisch-lymphatischen Leukämie dar.

5.5 Ausblick

Rekombinante Exosomen und Virus-like-Particles aus HEK 293-Zellen transportieren effizient EBV-Antigene und können dadurch zur Reaktivierung von EBV-spezifischen T-Zellen führen. Voraussetzung ist ihre Aufnahme, Prozessierung und Präsentation durch antigenpräsentierende Zellen. Aufgrund der in der Membran enthaltenen EBV-Antigene, vor allem gp350, weisen sie einen ausgeprägten B-Zell-Tropismus auf. B-Zellen sind neben dendritischen Zellen die wichtigsten Vertretern antigenpräsentierender Zellen. Es gibt zwei klassische Wege der Antigenpräsentation: Normalerweise werden exogene, also von aussen aufgenommene Antigene, im Kontext von MHC Klasse II-Molekülen präsentiert und spezifisch von CD4⁺-T-Helferzellen erkannt. Über den MHC Klasse I-restringierten Weg hingegen werden endogene Proteine präsentiert. In DCs existiert zusätzlich die Möglichkeit der Kreuz-Präsentierung, die unter bestimmten Umständen dazu führt, dass auch Peptide aufgenommener Antigene über MHC I-Moleküle präsentiert werden und so CD8⁺-T-Zellen stimulieren. Eine derartige Kreuz-Präsentierung kann einen entscheidenden Beitrag leisten zur Induktion zytotoxischer T-Zellen, insbesondere bei nicht replizierenden Antigenträgern, wie Exosomen oder VLPs, die als Impfstoff angewendet werden sollen. In meinen Versuchen konnte ich zeigen, dass zumindest *in vitro* die Präsentation ausschließlich über B-Zellen erfolgt und demzufolge eine Aktivierung hauptsächlich auf CD4⁺-T-Zellen beschränkt bleibt. Ob dies *in vivo* auch der Fall ist oder ob sich dort auch dendritische Zellen daran beteiligen, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen. Für einen eventuellen therapeutischen Einsatz von Exosomen oder VLPs könnte dies ein Nachteil sein, weshalb eine parallele CD8⁺-T-Zellaktivierung anzustreben wäre. Eine Möglichkeit hierfür könnte eventuell der Einsatz von Hitzeschockproteinen (hsp) darstellen. Diese münden nach rezeptorvermittelter Endozytose über nicht vollständig verstandene Mechanismen in den MHC I-Weg ein und transportieren dabei assoziierte oder kovalent gebundene Proteine (Tobian et al., 2004). Es könnte also möglich sein, durch die Herstellung von Exosomen mit Fusionsproteinen, die sich aus hsp70 und EBV-Peptiden zusammensetzen, deren Präsentation im Kontext von MHC I-Molekülen zu veranlassen und so auch eine CD8-vermittelte T-Zellantwort zu induzieren. Dazu gibt es in unserer Arbeitsgruppe bereits erste positive Ergebnisse.

Auch die für den therapeutischen Einsatz bei CLL-Patienten gedachten Exosomen und VLPs können noch weiterentwickelt werden. B-CLL-Zellen sind sehr apoptoseresistent (MacFarlane et al., 2002; Novak et al., 2002). Diese Resistenz lässt sich jedoch durch eine Stimulation des CD40-Rezeptors verringern. Die Zellen werden dann, zeitlich um wenige Tage verzögert, sensitiv gegenüber Fas-vermittelter Apoptose. Wie ich auch in Stimulationsversuchen zeigen konnte, lässt sich dies vermutlich auf die deutlich verstärkte Expression des Fas-Rezeptors zurückführen. Weitere Untersuchungen könnten die Frage klären, ob man mit Exosomen, die den Fas-Ligand tragen, Apoptose in Leukämiezellen auslösen kann und wenn ja, ob für diesen Effekt die beiden akzessorischen Moleküle CD40L und Fas-Ligand gleichzeitig oder besser zeitlich getrennt eingesetzt werden sollten.

Der kombinierte Transfer eines kostimulatorischen (CD40L), eines apoptoseinduzierenden Moleküls (FasL) und viraler Proteine, die gleichzeitig einen Tumortropismus vermitteln und als Antigene fungieren, könnte zu einer wirksamen Therapie der bislang als unheilbar geltenden B-CLL entwickelt werden.

6. Zusammenfassung

EBV ist ein Herpesvirus, welches in über 90% aller Erwachsenen nachgewiesen werden kann und in den wenigsten Fällen Beschwerden verursacht. Unter bestimmten Umständen kann es aber zur Ausbildung einer Infektiösen Mononukleose kommen und auch an der Entstehung einer Reihe von Krebserkrankungen, allen voran die PTLD (*posttransplant lymphoproliferative disease*), das Burkitt- und das Hodgkin-Lymphom, ist EBV ursächlich beteiligt. Trotz zahlreicher Bemühungen und einiger vielversprechender Ansätze ist bis heute kein wirksamer Impfstoff gegen das Epstein-Barr Virus vorhanden.

Im Bereich Exosomen als Mittel zur Induktion von Immunantworten wird seit gut 10 Jahren geforscht und ihre Wirksamkeit konnte bereits in klinischen Studien zur Behandlung mehrerer Krebsarten getestet werden. In dieser Doktorarbeit wurden HEK 293-Zellen und ein auf diesen Zellen basierendes Verpackungssystem für virale Vektoren auf ihre Eignung hin untersucht, rekombinante Exosomen und Virus-like-Particles (VLPs) zu produzieren, welche eventuell als DNA-freies Vakzin gegen EBV eingesetzt werden könnten.

In EBV-positiven Verpackungszelllinien konnte durch Induktion des lytischen EBV-Zyklus die Freisetzung DNA-freier VLPs erreicht werden. Genau wie Exosomen aus 293-Zellen, die zuvor mit Expressionsplasmiden für EBV-Antigene transfiziert worden waren, konnten sie aus dem Zellkulturmedium aufgereinigt werden. Ihr großes immunogenes Potential zeigte sich bei der Reaktivierung von EBV-spezifischen T-Zellklonen und Gedächtnis-T-Zellen aus PBMCs, wo bereits geringe Mengen für eine Stimulation ausreichten. Zu der hohen Effizienz der Partikel trug ihr Tropismus bei, der auf virale Glykoproteine, vor allem gp350, zurückzuführen war. Die Partikel besaßen dadurch eine Affinität zu B-Zellen, über die effizient die Präsentation der Exosomen und Virus-like-Particles erfolgte. Auch in *in vivo*-Versuchen, bei denen mit dem hu-PBMC-Rag-Mausmodell und dem MHV-68-Mausmodell gearbeitet wurde, konnten durch Immunisierung mit Exosomen bzw. Virus-like-Particles virus-spezifische humorale wie zelluläre Immunantworten ausgelöst werden.

In Stimulationsexperimenten von malignen Zellen aus Patienten mit chronisch-lymphatischer B-Zelleukämie (B-CLL) konnte ich weiterhin zeigen, dass Exosomen und VLPs auch als Überträger funktioneller Moleküle wie den CD40L, einem Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor-Familie, fungieren können. Dieser bewirkte in den sonst nicht immunogenen und deshalb vom Immunsystem nicht erkannten CLL-Zellen eine

verstärkte Expression kostimulatorischer, Adhäsions- und apoptoseassoziierter Moleküle. Auf diese Weise war es möglich, autologe Tumor- und EBV-spezifische T-Zellen zu reaktivieren. Exosomen und Virus-like-Particles könnten deshalb bei der Behandlung der B-CLL eine vielversprechende Alternative zur Gentherapie darstellen.

7. Abkürzungen

α	anti
Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
BBLs	B-Blasten
B-CLL	chronisch lymphatische B-Zell-Leukämie
bp	Basenpaare
BSA	Rinderalbuminserum (<i>bovine serum albumin</i>)
ca.	zirka
CD	Oberflächenantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
CMV	Cytomegalovirus
Cy5	Cyanin 5-Farbstoff
DEX	<i>Dendritic Cell derived Exosomes</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EA-D	frühes Antigen D (<i>early antigen D</i>)
EBNA	Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
bzw.	beziehungsweise
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GFP	Grünes fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescence protein</i>)
gp	Glykoprotein
GvHD	<i>Graft versus Host Disease</i>
h	Stunde/n
HBV	Hepatitis B-Virus
HEK 293	humane embryonale Nierenzellen (<i>human embryonic kidney cell</i>)
HL	Hodgkin-Lymphom
H ₂ O	Wasser
HPV	Humanes Papillomvirus

HRP	gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
Ifn- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
LMP	Latentes Membranprotein
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie (<i>lymphoblastoid cell line</i>)
mA	Milliampere
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität (<i>mean fluorescence intensity</i>)
MHV-68	murines Herpesvirus-68
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
OD	optische Dichte
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimin
PI	Propidium-Iodid
p. i.	nach Infektion (<i>post infectionem</i>)
pos	positiv
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	<i>Side Scatter</i>
TEX	<i>Tumour derived Exosomes</i>
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett

UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
VCA	Viruskapsidantigen (<i>virus capsid antigen</i>)
VLP	Virus-like-Particle
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

8. Literatur

1. **Adhikary, D., U. Behrends, R. Feederle, H. J. Delecluse, and J. Mautner.** 2008. Standardized and highly efficient expansion of Epstein-Barr virus-specific CD4+ T cells by using virus-like particles. *J Virol* **82**:3903-11.
2. **Adhikary, D., U. Behrends, A. Moosmann, K. Witter, G. W. Bornkamm, and J. Mautner.** 2006. Control of Epstein-Barr virus infection in vitro by T helper cells specific for virion glycoproteins. *J Exp Med* **203**:995-1006.
3. **Adler, H., M. Messerle, M. Wagner, and U. H. Koszinowski.** 2000. Cloning and mutagenesis of the murine gammaherpesvirus 68 genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *J Virol* **74**:6964-74.
4. **Admyre, C., S. M. Johansson, K. R. Qazi, J. J. Filen, R. Lahesmaa, M. Norman, E. P. Neve, A. Scheynius, and S. Gabrielsson.** 2007. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol* **179**:1969-78.
5. **Admyre, C., E. Telemo, N. Almqvist, J. Lotvall, R. Lahesmaa, A. Scheynius, and S. Gabrielsson.** 2008. Exosomes - nanovesicles with possible roles in allergic inflammation. *Allergy* **63**:404-8.
6. **Altmann, M., and W. Hammerschmidt.** 2005. Epstein-Barr virus provides a new paradigm: a requirement for the immediate inhibition of apoptosis. *PLoS Biol* **3**:e404.
7. **Ambinder, R.** 2003. Infection and lymphoma. *N Engl J Med* **349**:1309-11.
8. **Amerik, A. Y., J. Nowak, S. Swaminathan, and M. Hochstrasser.** 2000. The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways. *Mol Biol Cell* **11**:3365-80.
9. **Amyes, E., C. Hatton, D. Montamat-Sicotte, N. Gudgeon, A. B. Rickinson, A. J. McMichael, and M. F. Callan.** 2003. Characterization of the CD4+ T cell response to Epstein-Barr virus during primary and persistent infection. *J Exp Med* **198**:903-11.
10. **Anagnostopoulos, I., M. Hummel, C. Kreschel, and H. Stein.** 1995. Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus. *Blood* **85**:744-50.
11. **Andre, F., N. E. Scharz, M. Movassagh, C. Flament, P. Pautier, P. Morice, C. Pomel, C. Lhomme, B. Escudier, T. Le Chevalier, T. Tursz, S. Amigorena, G. Raposo, E. Angevin, and L. Zitvogel.** 2002. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet* **360**:295-305.
12. **Andreola, G., L. Rivoltini, C. Castelli, V. Huber, P. Perego, P. Deho, P. Squarcina, P. Accornero, F. Lozupone, L. Lugini, A. Stringaro, A. Molinari, G. Arancia, M. Gentile, G. Parmiani, and S. Fais.** 2002. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med* **195**:1303-16.
13. **Arditti, F. D., S. Aviner, B. Dekel, R. Krauthgamer, J. Gan, A. Nagler, A. Tabilio, M. Martelli, A. Berrebi, and Y. Reisner.** 2005. Eradication of B-CLL by autologous and allogeneic host nonreactive anti-third-party CTLs. *Blood* **105**:3365-71.

14. **Azizi, A., and F. Diaz-Mitoma.** 2007. Viral peptide immunogens: current challenges and opportunities. *J Pept Sci* **13**:776-86.
15. **Babcock, G. J., L. L. Decker, M. Volk, and D. A. Thorley-Lawson.** 1998. EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* **9**:395-404.
16. **Babst, M.** 2005. A protein's final ESCRT. *Traffic* **6**:2-9.
17. **Babst, M., D. J. Katzmann, E. J. Estepa-Sabal, T. Meerloo, and S. D. Emr.** 2002. Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell* **3**:271-82.
18. **Babst, M., D. J. Katzmann, W. B. Snyder, B. Wendland, and S. D. Emr.** 2002. Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell* **3**:283-9.
19. **Babst, M., T. K. Sato, L. M. Banta, and S. D. Emr.** 1997. Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *EMBO J* **16**:1820-31.
20. **Baer, R., A. T. Bankier, M. D. Biggin, P. L. Deininger, P. J. Farrell, T. J. Gibson, G. Hatfull, G. S. Hudson, S. C. Satchwell, C. Seguin, and et al.** 1984. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* **310**:207-11.
21. **Banchereau, J., F. Bazan, D. Blanchard, F. Briere, J. P. Galizzi, C. van Kooten, Y. J. Liu, F. Rousset, and S. Saeland.** 1994. The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol* **12**:881-922.
22. **Bard, M. P., J. P. Hegmans, A. Hemmes, T. M. Luider, R. Willemsen, L. A. Severijnen, J. P. van Meerbeeck, S. A. Burgers, H. C. Hoogsteden, and B. N. Lambrecht.** 2004. Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions. *Am J Respir Cell Mol Biol* **31**:114-21.
23. **Beatty, W. L., E. R. Rhoades, H. J. Ullrich, D. Chatterjee, J. E. Heuser, and D. G. Russell.** 2000. Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages. *Traffic* **1**:235-47.
24. **Biagi, E., G. Dotti, E. Yvon, E. Lee, M. Pule, S. Vigouroux, S. Gottschalk, U. Popat, R. Rousseau, and M. Brenner.** 2005. Molecular transfer of CD40 and OX40 ligands to leukemic human B cells induces expansion of autologous tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood* **105**:2436-42.
25. **Blaskovic, D., M. Stancekova, J. Svobodova, and J. Mistrikova.** 1980. Isolation of five strains of herpesviruses from two species of free living small rodents. *Acta Virol* **24**:468.
26. **Bonamino, M., M. Serafini, G. D'Amico, G. Gaipa, E. Todisco, S. Bernasconi, J. Golay, A. Biondi, and M. Introna.** 2004. Functional transfer of CD40L gene in human B-cell precursor ALL blasts by second-generation SIN lentivectors. *Gene Ther* **11**:85-93.
27. **Bonnet, M., J. M. Guinebretiere, E. Kremmer, V. Grunewald, E. Benhamou, G. Contesso, and I. Joab.** 1999. Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers. *J Natl Cancer Inst* **91**:1376-81.
28. **Bornkamm, G. W., C. Berens, C. Kuklik-Roos, J. M. Bechet, G. Laux, J.**

- Bachl, M. Korndoerfer, M. Schlee, M. Holzel, A. Malamoussi, R. D. Chapman, F. Nimmerjahn, J. Mautner, W. Hillen, H. Bujard, and J. Feuillard.** 2005. Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res* **33**:e137.
29. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-54.
30. **Brielmeier, M., J. Mautner, G. Laux, and W. Hammerschmidt.** 1996. The latent membrane protein 2 gene of Epstein-Barr virus is important for efficient B cell immortalization. *J Gen Virol* **77** (Pt 11):2807-18.
31. **Brown, K. D., B. S. Hostager, and G. A. Bishop.** 2001. Differential signaling and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) degradation mediated by CD40 and the Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 (LMP1). *J Exp Med* **193**:943-54.
32. **Buhmann, R., A. Nolte, D. Westhaus, B. Emmerich, and M. Hallek.** 1999. CD40-activated B-cell chronic lymphocytic leukemia cells for tumor immunotherapy: stimulation of allogeneic versus autologous T cells generates different types of effector cells. *Blood* **93**:1992-2002.
33. **Buning, J., D. von Smolinski, K. Tafazzoli, K. P. Zimmer, S. Strobel, M. Apostolaki, G. Kollias, J. K. Heath, D. Ludwig, and A. Gebert.** 2008. Multivesicular bodies in intestinal epithelial cells: responsible for MHC class II-restricted antigen processing and origin of exosomes. *Immunology* **125**:510-21.
34. **Burney, K., M. Bradley, A. Buckley, I. Lyburn, A. Rye, and R. Hopkins.** 2006. Posttransplant lymphoproliferative disorder: a pictorial review. *Australas Radiol* **50**:412-8.
35. **Caby, M. P., D. Lankar, C. Vincendeau-Scherrer, G. Raposo, and C. Bonnerot.** 2005. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol* **17**:879-87.
36. **Callan, M. F., N. Annels, N. Steven, L. Tan, J. Wilson, A. J. McMichael, and A. B. Rickinson.** 1998. T cell selection during the evolution of CD8+ T cell memory in vivo. *Eur J Immunol* **28**:4382-90.
37. **Cantwell, M., T. Hua, J. Pappas, and T. J. Kipps.** 1997. Acquired CD40-ligand deficiency in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med* **3**:984-9.
38. **Carbone, A., G. Gaidano, A. Gloghini, A. Ferlito, A. Rinaldo, and H. Stein.** 1999. AIDS-related plasmablastic lymphomas of the oral cavity and jaws: a diagnostic dilemma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **108**:95-9.
39. **Carbone, A., A. Gloghini, D. Serraino, and M. Spina.** 2009. HIV-associated Hodgkin lymphoma. *Curr Opin HIV AIDS* **4**:3-10.
40. **Cardin, R. D., J. W. Brooks, S. R. Sarawar, and P. C. Doherty.** 1996. Progressive loss of CD8+ T cell-mediated control of a gamma-herpesvirus in the absence of CD4+ T cells. *J Exp Med* **184**:863-71.
41. **Chang, L. K., J. Y. Chung, Y. R. Hong, T. Ichimura, M. Nakao, and S. T. Liu.** 2005. Activation of Sp1-mediated transcription by Rta of Epstein-Barr virus via an interaction with MCAF1. *Nucleic Acids Res* **33**:6528-39.

42. **Choquet, S., R. Trappe, V. Leblond, U. Jager, F. Davi, and S. Oertel.** 2007. CHOP-21 for the treatment of post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD) following solid organ transplantation. *Haematologica* **92**:273-4.
43. **Chu, P., D. Deforce, I. M. Pedersen, Y. Kim, S. Kitada, J. C. Reed, and T. J. Kipps.** 2002. Latent sensitivity to Fas-mediated apoptosis after CD40 ligation may explain activity of CD154 gene therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:3854-9.
44. **Clark, E. A., K. H. Grabstein, A. M. Gown, M. Skelly, T. Kaisho, T. Hirano, and G. L. Shu.** 1995. Activation of B lymphocyte maturation by a human follicular dendritic cell line, FDC-1. *J Immunol* **155**:545-55.
45. **Cohen, J. I., C. M. Bollard, R. Khanna, and S. Pittaluga.** 2008. Current understanding of the role of Epstein-Barr virus in lymphomagenesis and therapeutic approaches to EBV-associated lymphomas. *Leuk Lymphoma* **49 Suppl 1**:27-34.
46. **Curtis, R. E., L. B. Travis, P. A. Rowlings, G. Socie, D. W. Kingma, P. M. Banks, E. S. Jaffe, G. E. Sale, M. M. Horowitz, R. P. Witherspoon, D. A. Shriner, D. J. Weisdorf, H. J. Kolb, K. M. Sullivan, K. A. Sobocinski, R. P. Gale, R. N. Hoover, J. F. Fraumeni, Jr., and H. J. Deeg.** 1999. Risk of lymphoproliferative disorders after bone marrow transplantation: a multi-institutional study. *Blood* **94**:2208-16.
47. **Dadgostar, H., B. Zarnegar, A. Hoffmann, X. F. Qin, U. Truong, G. Rao, D. Baltimore, and G. Cheng.** 2002. Cooperation of multiple signaling pathways in CD40-regulated gene expression in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:1497-502.
48. **Dazzi, F., E. D'Andrea, G. Biasi, G. De Silvestro, G. Gaidano, M. Schena, T. Tison, F. Vianello, A. Girolami, and F. Caligaris-Cappio.** 1995. Failure of B cells of chronic lymphocytic leukemia in presenting soluble and alloantigens. *Clin Immunol Immunopathol* **75**:26-32.
49. **de Lima, B. D., J. S. May, and P. G. Stevenson.** 2004. Murine gammaherpesvirus 68 lacking gp150 shows defective virion release but establishes normal latency in vivo. *J Virol* **78**:5103-12.
50. **Delecluse, H. J., I. Anagnostopoulos, F. Dallenbach, M. Hummel, T. Marafioti, U. Schneider, D. Huhn, A. Schmidt-Westhausen, P. A. Reichart, U. Gross, and H. Stein.** 1997. Plasmablastic lymphomas of the oral cavity: a new entity associated with the human immunodeficiency virus infection. *Blood* **89**:1413-20.
51. **Delecluse, H. J., T. Hilsendegen, D. Pich, R. Zeidler, and W. Hammerschmidt.** 1998. Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:8245-50.
52. **Delecluse, H. J., D. Pich, T. Hilsendegen, C. Baum, and W. Hammerschmidt.** 1999. A first-generation packaging cell line for Epstein-Barr virus-derived vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:5188-93.
53. **Depil, S., O. Morales, F. A. Castelli, N. Delhem, V. Francois, B. Georges, F. Dufosse, F. Morschhauser, J. Hammer, B. Maillere, C. Auriault, and V.**

- Pancre.** 2007. Determination of a HLA II promiscuous peptide cocktail as potential vaccine against EBV latency II malignancies. *J Immunother* **30**:215-26.
54. **Diehl, L. F., L. H. Karnell, and H. R. Menck.** 1999. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. The National Cancer Data Base report on age, gender, treatment, and outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* **86**:2684-92.
55. **Dirmeier, U., R. Hoffmann, E. Kilger, U. Schultheiss, C. Briseno, O. Gires, A. Kieser, D. Eick, B. Sugden, and W. Hammerschmidt.** 2005. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus coordinately regulates proliferation with control of apoptosis. *Oncogene* **24**:1711-7.
56. **Dirmeier, U., B. Neuhierl, E. Kilger, G. Reisbach, M. L. Sandberg, and W. Hammerschmidt.** 2003. Latent membrane protein 1 is critical for efficient growth transformation of human B cells by epstein-barr virus. *Cancer Res* **63**:2982-9.
57. **Dogherty, P., T. Einarson, G. Koren, and G. Sher.** 1997. The Effectiveness of Deferiprone in Thalassemia. *Blood* **90**:894a-894.
58. **e.V., D. A. f. K. N.** 2005. *Klinische Nephrologie*, vol. 34. Vandenhoeck und Ruprecht, Göttingen.
59. **Efstathiou, S., Y. M. Ho, and A. C. Minson.** 1990. Cloning and molecular characterization of the murine herpesvirus 68 genome. *J Gen Virol* **71** (Pt 6):1355-64.
60. **Epstein, M. A., B. G. Achong, and Y. M. Barr.** 1964. Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* **1**:702-3.
61. **Escola, J. M., M. J. Kleijmeer, W. Stoorvogel, J. M. Griffith, O. Yoshie, and H. J. Geuze.** 1998. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem* **273**:20121-7.
62. **Escudier, B., T. Dorval, N. Chaput, F. Andre, M. P. Caby, S. Novault, C. Flament, C. Leboulaire, C. Borg, S. Amigorena, C. Boccaccio, C. Bonnerot, O. Dhellin, M. Movassagh, S. Piperno, C. Robert, V. Serra, N. Valente, J. B. Le Pecq, A. Spatz, O. Lantz, T. Tursz, E. Angevin, and L. Zitvogel.** 2005. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J Transl Med* **3**:10.
63. **Faderl, S., D. A. Thomas, S. O'Brien, G. Garcia-Manero, H. M. Kantarjian, F. J. Giles, C. Koller, A. Ferrajoli, S. Verstovsek, B. Pro, M. Andreeff, M. Beran, J. Cortes, W. Wierda, N. Tran, and M. J. Keating.** 2003. Experience with alemtuzumab plus rituximab in patients with relapsed and refractory lymphoid malignancies. *Blood* **101**:3413-5.
64. **Farrell, P. J., D. T. Rowe, C. M. Rooney, and T. Kouzarides.** 1989. Epstein-Barr virus BZLF1 trans-activator specifically binds to a consensus AP-1 site and is related to c-fos. *EMBO J* **8**:127-32.
65. **Feederle, R., C. Shannon-Lowe, G. Baldwin, and H. J. Delecluse.** 2005. Defective infectious particles and rare packaged genomes produced by cells carrying terminal-repeat-negative epstein-barr virus. *J Virol* **79**:7641-7.

66. **Fevrier, B., and G. Raposo.** 2004. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol* **16**:415-21.
67. **Filipazzi, P., R. Valenti, V. Huber, L. Pilla, P. Canese, M. Iero, C. Castelli, L. Mariani, G. Parmiani, and L. Rivoltini.** 2007. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *J Clin Oncol* **25**:2546-53.
68. **Fischer, E., C. Delibrias, and M. D. Kazatchkine.** 1991. Expression of CR2 (the C3dg/EBV receptor, CD21) on normal human peripheral blood T lymphocytes. *J Immunol* **146**:865-9.
69. **Futter, C. E., A. Pearce, L. J. Hewlett, and C. R. Hopkins.** 1996. Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *J Cell Biol* **132**:1011-23.
70. **Garland, S. M., M. Hernandez-Avila, C. M. Wheeler, G. Perez, D. M. Harper, S. Leodolter, G. W. Tang, D. G. Ferris, M. Steben, J. Bryan, F. J. Taddeo, R. Railkar, M. T. Esser, H. L. Sings, M. Nelson, J. Boslego, C. Sattler, E. Barr, and L. A. Koutsky.** 2007. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med* **356**:1928-43.
71. **Garrone, P., E. M. Neidhardt, E. Garcia, L. Galibert, C. van Kooten, and J. Banchereau.** 1995. Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. *J Exp Med* **182**:1265-73.
72. **Garrus, J. E., U. K. von Schwedler, O. W. Pornillos, S. G. Morham, K. H. Zavitz, H. E. Wang, D. A. Wettstein, K. M. Stray, M. Cote, R. L. Rich, D. G. Myszka, and W. I. Sundquist.** 2001. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* **107**:55-65.
73. **Gill, M. B., L. Gillet, S. Colaco, J. S. May, B. D. de Lima, and P. G. Stevenson.** 2006. Murine gammaherpesvirus-68 glycoprotein H-glycoprotein L complex is a major target for neutralizing monoclonal antibodies. *J Gen Virol* **87**:1465-75.
74. **Gillet, L., J. S. May, S. Colaco, and P. G. Stevenson.** 2007. The murine gammaherpesvirus-68 gp150 acts as an immunogenic decoy to limit virion neutralization. *PLoS One* **2**:e705.
75. **Goldacre, M. J., C. J. Wotton, and D. G. Yeates.** 2009. Associations between infectious mononucleosis and cancer: record-linkage studies. *Epidemiol Infect* **137**:672-80.
76. **Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell, and R. Nairn.** 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**:59-74.
77. **Grewal, I. S., and R. A. Flavell.** 1996. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol Rev* **153**:85-106.
78. **Gu, S. Y., T. M. Huang, L. Ruan, Y. H. Miao, H. Lu, C. M. Chu, M. Motz, and H. Wolf.** 1995. First EBV vaccine trial in humans using recombinant vaccinia virus expressing the major membrane antigen. *Dev Biol Stand* **84**:171-7.

79. **Hallek, M.** 2002. [What effects has the presence of prolymphocytes on prognosis and therapy of CLL?]. *Dtsch Med Wochenschr* **127**:464.
80. **Hammerschmidt, W., and B. Sugden.** 1988. Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell* **55**:427-33.
81. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557-80.
82. **Haque, T., G. M. Wilkie, M. M. Jones, C. D. Higgins, G. Urquhart, P. Wingate, D. Burns, K. McAulay, M. Turner, C. Bellamy, P. L. Amlot, D. Kelly, A. MacGilchrist, M. K. Gandhi, A. J. Swerdlow, and D. H. Crawford.** 2007. Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood* **110**:1123-31.
83. **Harding, C., J. Heuser, and P. Stahl.** 1984. Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. *Eur J Cell Biol* **35**:256-63.
84. **Henderson, B. E., E. Louie, J. SooHoo Jing, P. Buell, and M. B. Gardner.** 1976. Risk factors associated with nasopharyngeal carcinoma. *N Engl J Med* **295**:1101-6.
85. **Henle, G., W. Henle, and V. Diehl.** 1968. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **59**:94-101.
86. **Henle, G., E. T. Lennette, M. A. Alspaugh, and W. Henle.** 1979. Rheumatoid factor as a cause of positive reactions in tests for Epstein-Barr virus-specific IgM antibodies. *Clin Exp Immunol* **36**:415-22.
87. **Henle, W., and G. Henle.** 1974. The Epstein-Barr Virus (EBV) in Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *Ann Clin Lab Sci* **4**:109-14.
88. **Henle, W., G. Henle, J. Andersson, I. Ernberg, G. Klein, C. A. Horwitz, G. Marklund, L. Rymo, C. Wellinder, and S. E. Straus.** 1987. Antibody responses to Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen (EBNA)-1 and EBNA-2 in acute and chronic Epstein-Barr virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:570-4.
89. **Hettich, E., A. Janz, R. Zeidler, D. Pich, E. Hellebrand, B. Weissflog, A. Moosmann, and W. Hammerschmidt.** 2006. Genetic design of an optimized packaging cell line for gene vectors transducing human B cells. *Gene Ther* **13**:844-56.
90. **Hicke, L., and R. Dunn.** 2003. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**:141-72.
91. **Hislop, A. D., M. Kuo, A. B. Drake-Lee, A. N. Akbar, W. Bergler, N. Hammerschmitt, N. Khan, U. Palendira, A. M. Leese, J. M. Timms, A. I. Bell, C. D. Buckley, and A. B. Rickinson.** 2005. Tonsillar homing of Epstein-Barr virus-specific CD8⁺ T cells and the virus-host balance. *J Clin Invest* **115**:2546-55.
92. **Hjalgrim, H., J. Askling, K. Rostgaard, S. Hamilton-Dutoit, M. Frisch, J. S.**

- Zhang, M. Madsen, N. Rosdahl, H. B. Konradsen, H. H. Storm, and M. Melbye.** 2003. Characteristics of Hodgkin's lymphoma after infectious mononucleosis. *N Engl J Med* **349**:1324-32.
93. **Hoffman, G. J., S. G. Lazarowitz, and S. D. Hayward.** 1980. Monoclonal antibody against a 250,000-dalton glycoprotein of Epstein-Barr virus identifies a membrane antigen and a neutralizing antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:2979-83.
94. **Hon, H., A. Oran, T. Brocker, and J. Jacob.** 2005. B lymphocytes participate in cross-presentation of antigen following gene gun vaccination. *J Immunol* **174**:5233-42.
95. **Hsieh, W. S., M. V. Lemas, and R. F. Ambinder.** 1999. The biology of Epstein-Barr virus in post-transplant lymphoproliferative disease. *Transpl Infect Dis* **1**:204-12.
96. **Hsu, J. L., and S. L. Glaser.** 2000. Epstein-barr virus-associated malignancies: epidemiologic patterns and etiologic implications. *Crit Rev Oncol Hematol* **34**:27-53.
97. **Huber, V., S. Fais, M. Iero, L. Lugini, P. Canese, P. Squarcina, A. Zaccheddu, M. Colone, G. Arancia, M. Gentile, E. Seregini, R. Valenti, G. Ballabio, F. Belli, E. Leo, G. Parmiani, and L. Rivoltini.** 2005. Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology* **128**:1796-804.
98. **Janz, A., M. Oezel, C. Kurzeder, J. Mautner, D. Pich, M. Kost, W. Hammerschmidt, and H. J. Delecluse.** 2000. Infectious Epstein-Barr virus lacking major glycoprotein BLLF1 (gp350/220) demonstrates the existence of additional viral ligands. *J Virol* **74**:10142-52.
99. **Johnstone, R. M., M. Adam, J. R. Hammond, L. Orr, and C. Turbide.** 1987. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* **262**:9412-20.
100. **Jouve, M., N. Sol-Foulon, S. Watson, O. Schwartz, and P. Benaroch.** 2007. HIV-1 buds and accumulates in "nonacidic" endosomes of macrophages. *Cell Host Microbe* **2**:85-95.
101. **Karajannis, M. A., M. Hummel, I. Anagnostopoulos, and H. Stein.** 1997. Strict lymphotropism of Epstein-Barr virus during acute infectious mononucleosis in nonimmunocompromised individuals. *Blood* **89**:2856-62.
102. **Katzmann, D. J., M. Babst, and S. D. Emr.** 2001. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* **106**:145-55.
103. **Keller, S., C. Rupp, A. Stoeck, S. Runz, M. Fogel, S. Lugert, H. D. Hager, M. S. Abdel-Bakky, P. Gutwein, and P. Altevogt.** 2007. CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. *Kidney Int* **72**:1095-102.
104. **Keller, S. A., C. E. von Allmen, H. J. Hinton, M. Bauer, S. Muntwiler, K. Dietmeier, P. Saudan, and M. F. Bachmann.** 2009. Follicular and marginal zone B cells fail to cross-present MHC class I-restricted epitopes derived from

- viral particles. *J Immunol* **182**:6261-6.
105. **Kempkes, B., D. Pich, R. Zeidler, and W. Hammerschmidt.** 1995. Immortalization of human primary B lymphocytes in vitro with DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:5875-9.
 106. **Kempkes, B., D. Pich, R. Zeidler, B. Sugden, and W. Hammerschmidt.** 1995. Immortalization of human B lymphocytes by a plasmid containing 71 kilobase pairs of Epstein-Barr virus DNA. *J Virol* **69**:231-8.
 107. **Keryer-Bibens, C., C. Pioche-Durieu, C. Villemant, S. Souquere, N. Nishi, M. Hirashima, J. Middeldorp, and P. Busson.** 2006. Exosomes released by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells convey the viral latent membrane protein 1 and the immunomodulatory protein galectin 9. *BMC Cancer* **6**:283.
 108. **Kilger, E., A. Kieser, M. Baumann, and W. Hammerschmidt.** 1998. Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J* **17**:1700-9.
 109. **Kipps, T. J., P. Chu, and W. G. Wierda.** 2000. Immunogenetic therapy for B-cell malignancies. *Semin Oncol* **27**:104-9.
 110. **Kleijmeer, M. J., J. M. Escola, F. G. UytdeHaag, E. Jakobson, J. M. Griffith, A. D. Osterhaus, W. Stoorvogel, C. J. Melief, C. Rabouille, and H. J. Geuze.** 2001. Antigen loading of MHC class I molecules in the endocytic tract. *Traffic* **2**:124-37.
 111. **Koga, K., K. Matsumoto, T. Akiyoshi, M. Kubo, N. Yamanaka, A. Tasaki, H. Nakashima, M. Nakamura, S. Kuroki, M. Tanaka, and M. Katano.** 2005. Purification, characterization and biological significance of tumor-derived exosomes. *Anticancer Res* **25**:3703-7.
 112. **Kokhaei, P., A. Choudhury, R. Mahdian, J. Lundin, A. Moshfegh, A. Osterborg, and H. Mellstedt.** 2004. Apoptotic tumor cells are superior to tumor cell lysate, and tumor cell RNA in induction of autologous T cell response in B-CLL. *Leukemia* **18**:1810-5.
 113. **Kovar, M., O. Boyman, X. Shen, I. Hwang, R. Kohler, and J. Sprent.** 2006. Direct stimulation of T cells by membrane vesicles from antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:11671-6.
 114. **Krackhardt, A. M., S. Harig, M. Witzens, R. Broderick, P. Barrett, and J. G. Gribben.** 2002. T-cell responses against chronic lymphocytic leukemia cells: implications for immunotherapy. *Blood* **100**:167-73.
 115. **Kuppers, R.** 2003. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol* **3**:801-12.
 116. **Levine, P. H., J. P. Lamelin, and D. A. Stevens.** 1978. Cell-mediated immunity, Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma. *IARC Sci Publ*:483-94.
 117. **Levitskaya, J., A. Sharipo, A. Leonchiks, A. Ciechanover, and M. G. Masucci.** 1997. Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:12616-21.

118. **Li, H. Z., H. Y. Gang, Q. M. Sun, X. Liu, Y. B. Ma, M. S. Sun, and C. B. Dai.** 2004. Production in *Pichia pastoris* and characterization of genetic engineered chimeric HBV/HEV virus-like particles. *Chin Med Sci J* **19**:78-83.
119. **Li, Q., S. M. Turk, and L. M. Hutt-Fletcher.** 1995. The Epstein-Barr virus (EBV) BZLF2 gene product associates with the gH and gL homologs of EBV and carries an epitope critical to infection of B cells but not of epithelial cells. *J Virol* **69**:3987-94.
120. **Liu, C., S. Yu, K. Zinn, J. Wang, L. Zhang, Y. Jia, J. C. Kappes, S. Barnes, R. P. Kimberly, W. E. Grizzle, and H. G. Zhang.** 2006. Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function. *J Immunol* **176**:1375-85.
121. **Lockey, T. D., X. Zhan, S. Surman, C. E. Sample, and J. L. Hurwitz.** 2008. Epstein-Barr virus vaccine development: a lytic and latent protein cocktail. *Front Biosci* **13**:5916-27.
122. **Lotz, M., C. D. Tsoukas, S. Fong, D. A. Carson, and J. H. Vaughan.** 1985. Regulation of Epstein-Barr virus infection by recombinant interferons. Selected sensitivity to interferon-gamma. *Eur J Immunol* **15**:520-5.
123. **Lucas, K. G., T. N. Small, G. Heller, B. Dupont, and R. J. O'Reilly.** 1996. The development of cellular immunity to Epstein-Barr virus after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **87**:2594-603.
124. **Ludwig, C., and R. Wagner.** 2007. Virus-like particles-universal molecular toolboxes. *Curr Opin Biotechnol* **18**:537-45.
125. **Luketic, L., J. Delanghe, P. T. Sobol, P. Yang, E. Frotten, K. L. Mossman, J. Gauldie, J. Bramson, and Y. Wan.** 2007. Antigen presentation by exosomes released from peptide-pulsed dendritic cells is not suppressed by the presence of active CTL. *J Immunol* **179**:5024-32.
126. **MacFarlane, M., N. Harper, R. T. Snowden, M. J. Dyer, G. A. Barnett, J. H. Pringle, and G. M. Cohen.** 2002. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in primary B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Oncogene* **21**:6809-18.
127. **Mackett, M., C. Cox, S. D. Pepper, J. F. Lees, B. A. Naylor, N. Wedderburn, and J. R. Arrand.** 1996. Immunisation of common marmosets with vaccinia virus expressing Epstein-Barr virus (EBV) gp340 and challenge with EBV. *J Med Virol* **50**:263-71.
128. **Magott-Procelewska, M.** 2004. Costimulatory pathways as a basic mechanisms of activating a tolerance signal in T cells. *Ann Transplant* **9**:13-8.
129. **Maini, M. K., N. Gudgeon, L. R. Wedderburn, A. B. Rickinson, and P. C. Beverley.** 2000. Clonal expansions in acute EBV infection are detectable in the CD8 and not the CD4 subset and persist with a variable CD45 phenotype. *J Immunol* **165**:5729-37.
130. **Marshall, N. A., J. G. Howe, R. Formica, D. Krause, J. E. Wagner, N. Berliner, J. Crouch, I. Pilip, D. Cooper, B. R. Blazar, S. Seropian, and E. G. Pamer.** 2000. Rapid reconstitution of Epstein-Barr virus-specific T lymphocytes following allogeneic stem cell transplantation. *Blood* **96**:2814-21.

131. **Mauro, F. R., R. Foa, D. Giannarelli, I. Cordone, S. Crescenzi, E. Pescarmona, R. Sala, R. Cerretti, and F. Mandelli.** 1999. Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases. *Blood* **94**:448-54.
132. **McAleer, W. J., E. B. Buynak, R. Z. Maigetter, D. E. Wampler, W. J. Miller, and M. R. Hilleman.** 1992. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. 1984. *Biotechnology* **24**:500-2.
133. **McDyer, J. F., Z. Li, S. John, X. Yu, C. Y. Wu, and J. A. Ragheb.** 2002. IL-2 receptor blockade inhibits late, but not early, IFN-gamma and CD40 ligand expression in human T cells: disruption of both IL-12-dependent and -independent pathways of IFN-gamma production. *J Immunol* **169**:2736-46.
134. **McLaughlin, P., C. A. White, A. J. Grillo-Lopez, and D. G. Maloney.** 1998. Clinical status and optimal use of rituximab for B-cell lymphomas. *Oncology (Williston Park)* **12**:1763-9; discussion 1769-70, 1775-7.
135. **Mellman, I.** 1996. Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**:575-625.
136. **Merlo, A., R. Turrini, R. Dolcetti, P. Zanovello, A. Amadori, and A. Rosato.** 2008. Adoptive cell therapy against EBV-related malignancies: a survey of clinical results. *Expert Opin Biol Ther* **8**:1265-94.
137. **Messerle, M., I. Crnkovic, W. Hammerschmidt, H. Ziegler, and U. H. Koszinowski.** 1997. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:14759-63.
138. **Mignot, G., S. Roux, C. Thery, E. Segura, and L. Zitvogel.** 2006. Prospects for exosomes in immunotherapy of cancer. *J Cell Mol Med* **10**:376-88.
139. **Miyashita, E. M., B. Yang, K. M. Lam, D. H. Crawford, and D. A. Thorley-Lawson.** 1995. A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells in vivo. *Cell* **80**:593-601.
140. **Molesworth, S. J., C. M. Lake, C. M. Borza, S. M. Turk, and L. M. Hutt-Fletcher.** 2000. Epstein-Barr virus gH is essential for penetration of B cells but also plays a role in attachment of virus to epithelial cells. *J Virol* **74**:6324-32.
141. **Moosmann, A., N. Khan, M. Cobbold, C. Zentz, H. J. Delecluse, G. Hollweck, A. D. Hislop, N. W. Blake, D. Croom-Carter, B. Wollenberg, P. A. Moss, R. Zeidler, A. B. Rickinson, and W. Hammerschmidt.** 2002. B cells immortalized by a mini-Epstein-Barr virus encoding a foreign antigen efficiently reactivate specific cytotoxic T cells. *Blood* **100**:1755-64.
142. **Morra, M., D. Howie, M. S. Grande, J. Sayos, N. Wang, C. Wu, P. Engel, and C. Terhorst.** 2001. X-linked lymphoproliferative disease: a progressive immunodeficiency. *Annu Rev Immunol* **19**:657-82.
143. **Morse, M. A., J. Garst, T. Osada, S. Khan, A. Hobeika, T. M. Clay, N. Valente, R. Shreeniwas, M. A. Sutton, A. Delcayre, D. H. Hsu, J. B. Le Pecq, and H. K. Lyerly.** 2005. A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Transl Med* **3**:9.
144. **Mosier, D. E.** 1990. Immunodeficient mice xenografted with human lymphoid

- cells: new models for in vivo studies of human immunobiology and infectious diseases. *J Clin Immunol* **10**:185-91.
145. **Mosier, D. E., R. J. Gulizia, S. M. Baird, S. Spector, D. Spector, T. J. Kipps, R. I. Fox, D. A. Carson, N. Cooper, D. D. Richman, and et al.** 1989. Studies of HIV infection and the development of Epstein-Barr virus-related B cell lymphomas following transfer of human lymphocytes to mice with severe combined immunodeficiency. *Curr Top Microbiol Immunol* **152**:195-9.
 146. **Moss, D. J., C. Schmidt, S. Elliott, A. Suhrbier, S. Burrows, and R. Khanna.** 1996. Strategies involved in developing an effective vaccine for EBV-associated diseases. *Adv Cancer Res* **69**:213-45.
 147. **Mullock, B. M., N. A. Bright, C. W. Fearon, S. R. Gray, and J. P. Luzio.** 1998. Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent. *J Cell Biol* **140**:591-601.
 148. **Murata, K., M. Lechmann, M. Qiao, T. Gunji, H. J. Alter, and T. J. Liang.** 2003. Immunization with hepatitis C virus-like particles protects mice from recombinant hepatitis C virus-vaccinia infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:6753-8.
 149. **Nemerow, G. R., and N. R. Cooper.** 1984. Early events in the infection of human B lymphocytes by Epstein-Barr virus: the internalization process. *Virology* **132**:186-98.
 150. **Neuhierl, B., and H. J. Delecluse.** 2005. Molecular genetics of DNA viruses: recombinant virus technology. *Methods Mol Biol* **292**:353-70.
 151. **Nguyen, D. G., A. Booth, S. J. Gould, and J. E. Hildreth.** 2003. Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *J Biol Chem* **278**:52347-54.
 152. **Niedobitek, G., A. Agathangelou, H. Herbst, L. Whitehead, D. H. Wright, and L. S. Young.** 1997. Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J Pathol* **182**:151-9.
 153. **Novak, A. J., R. J. Bram, N. E. Kay, and D. F. Jelinek.** 2002. Aberrant expression of B-lymphocyte stimulator by B chronic lymphocytic leukemia cells: a mechanism for survival. *Blood* **100**:2973-9.
 154. **Paliard, X., Y. Liu, R. Wagner, H. Wolf, J. Baenziger, and C. M. Walker.** 2000. Priming of strong, broad, and long-lived HIV type 1 p55gag-specific CD8+ cytotoxic T cells after administration of a virus-like particle vaccine in rhesus macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**:273-82.
 155. **Pan, B. T., R. Blostein, and R. M. Johnstone.** 1983. Loss of the transferrin receptor during the maturation of sheep reticulocytes in vitro. An immunological approach. *Biochem J* **210**:37-47.
 156. **Pelchen-Matthews, A., G. Raposo, and M. Marsh.** 2004. Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends Microbiol* **12**:310-6.
 157. **Pisitkun, T., R. F. Shen, and M. A. Knepper.** 2004. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:13368-73.

158. **Pope, J. H., and D. J. Moss.** 1978. Inhibition of Epstein-Barr virus transformation: evidence for a block between EBNA production and cell proliferation. *IARC Sci Publ*:617-22.
159. **Prado, N., E. G. Marazuela, E. Segura, H. Fernandez-Garcia, M. Villalba, C. Thery, R. Rodriguez, and E. Batanero.** 2008. Exosomes from bronchoalveolar fluid of tolerized mice prevent allergic reaction. *J Immunol* **181**:1519-25.
160. **Pulvertaft, J. V.** 1964. Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma). *Lancet* **1**:238-40.
161. **Pype, S., W. Declercq, A. Ibrahimi, C. Michiels, J. G. Van Rietschoten, N. Dewulf, M. de Boer, P. Vandenabeele, D. Huylebroeck, and J. E. Remacle.** 2000. TTRAP, a novel protein that associates with CD40, tumor necrosis factor (TNF) receptor-75 and TNF receptor-associated factors (TRAFs), and that inhibits nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* **275**:18586-93.
162. **Qualtiere, L. F., R. Chase, B. Vroman, and G. R. Pearson.** 1982. Identification of Epstein-Barr virus strain differences with monoclonal antibody to a membrane glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**:616-20.
163. **Quiroga, M. P., K. Balakrishnan, A. V. Kurtova, M. Sivina, M. J. Keating, W. G. Wierda, V. Gandhi, and J. A. Burger.** 2009. B cell antigen receptor signaling enhances chronic lymphocytic leukemia cell migration and survival: specific targeting with a novel Syk inhibitor, R406. *Blood*.
164. **Ragot, T., S. Finerty, P. E. Watkins, M. Perricaudet, and A. J. Morgan.** 1993. Replication-defective recombinant adenovirus expressing the Epstein-Barr virus (EBV) envelope glycoprotein gp340/220 induces protective immunity against EBV-induced lymphomas in the cottontop tamarin. *J Gen Virol* **74** (Pt 3):501-7.
165. **Ranheim, E. A., and T. J. Kipps.** 1993. Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. *J Exp Med* **177**:925-35.
166. **Raposo, G., H. W. Nijman, W. Stoorvogel, R. Liejendekker, C. V. Harding, C. J. Melief, and H. J. Geuze.** 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* **183**:1161-72.
167. **Rickinson, A. B., and D. J. Moss.** 1997. Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu Rev Immunol* **15**:405-31.
168. **Rickinson, A. B., D. J. Moss, and J. H. Pope.** 1979. Long-term C-cell-mediated immunity to Epstein-Barr virus in man. II. Components necessary for regression in virus-infected leukocyte cultures. *Int J Cancer* **23**:610-7.
169. **Rooney, C. M., C. A. Smith, C. Y. Ng, S. Loftin, C. Li, R. A. Krance, M. K. Brenner, and H. E. Heslop.** 1995. Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet* **345**:9-13.
170. **Rooney, C. M., C. A. Smith, C. Y. Ng, S. Loftin, C. Li, R. A. Krance, M. K. Brenner, and H. E. Heslop.** 1995. Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet* **345**:9-13.

171. **Rooney, C. M., C. A. Smith, C. Y. Ng, S. K. Loftin, J. W. Sixbey, Y. Gan, D. K. Srivastava, L. C. Bowman, R. A. Krance, M. K. Brenner, and H. E. Heslop.** 1998. Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* **92**:1549-55.
172. **Roy, M., A. Aruffo, J. Ledbetter, P. Linsley, M. Kehry, and R. Noelle.** 1995. Studies on the interdependence of gp39 and B7 expression and function during antigen-specific immune responses. *Eur J Immunol* **25**:596-603.
173. **Roy, P., and R. Noad.** 2008. Virus-like particles as a vaccine delivery system: myths and facts. *Hum Vaccin* **4**:5-12.
174. **Sambrook, J., Maniatis, T.** 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
175. **Schadlich, L., T. Senger, B. Gerlach, N. Mucke, C. Klein, I. G. Bravo, M. Muller, and L. Gissmann.** 2009. Analysis of modified human papillomavirus type 16 L1 capsomeres: the ability to assemble into larger particles correlates with higher immunogenicity. *J Virol* **83**:7690-705.
176. **Schirmbeck, R., W. Bohm, and J. Reimann.** 1996. Virus-like particles induce MHC class I-restricted T-cell responses. Lessons learned from the hepatitis B small surface antigen. *Intervirol* **39**:111-9.
177. **Schultze, J. L., A. A. Cardoso, G. J. Freeman, M. J. Seamon, J. Daley, G. S. Pinkus, J. G. Gribben, and L. M. Nadler.** 1995. Follicular lymphomas can be induced to present alloantigen efficiently: a conceptual model to improve their tumor immunogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:8200-4.
178. **Sebelin-Wulf, K., T. D. Nguyen, S. Oertel, M. Papp-Vary, R. U. Trappe, A. Schulzki, A. Pezzutto, H. Riess, and M. Subklewe.** 2007. Quantitative analysis of EBV-specific CD4/CD8 T cell numbers, absolute CD4/CD8 T cell numbers and EBV load in solid organ transplant recipients with PLTD. *Transpl Immunol* **17**:203-10.
179. **Segura, E., S. Amigorena, and C. Thery.** 2005. Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses. *Blood Cells Mol Dis* **35**:89-93.
180. **Serafini, P., I. Borrello, and V. Bronte.** 2006. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin Cancer Biol* **16**:53-65.
181. **Shannon-Lowe, C., E. Adland, A. I. Bell, H. J. Delecluse, A. B. Rickinson, and M. Rowe.** 2009. Features distinguishing Epstein Barr virus infections of epithelial cells and B cells: Viral genome expression, genome maintenance, and genome amplification. *J Virol*.
182. **Shapiro, R. S., K. McClain, G. Frizzera, K. J. Gajl-Peczalska, J. H. Kersey, B. R. Blazar, D. C. Arthur, D. F. Patton, J. S. Greenberg, B. Burke, and et al.** 1988. Epstein-Barr virus associated B cell lymphoproliferative disorders following bone marrow transplantation. *Blood* **71**:1234-43.
183. **Shibata, D., and L. M. Weiss.** 1992. Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol* **140**:769-74.

184. **Shimizu, N., S. Sakuma, Y. Ono, and K. Takada.** 1989. Identification of an enhancer-type sequence that is responsive to Z and R trans-activators of Epstein-Barr virus. *Virology* **172**:655-8.
185. **Shinde, S., Y. Wu, Y. Guo, Q. Niu, J. Xu, I. S. Grewal, R. Flavell, and Y. Liu.** 1996. CD40L is important for induction of, but not response to, costimulatory activity. ICAM-1 as the second costimulatory molecule rapidly up-regulated by CD40L. *J Immunol* **157**:2764-8.
186. **Simons, M. J., G. B. Wee, E. H. Goh, S. H. Chan, K. Shanmugaratnam, N. E. Day, and G. de-The.** 1976. Immunogenetic aspects of nasopharyngeal carcinoma. IV. Increased risk in Chinese of nasopharyngeal carcinoma associated with a Chinese-related HLA profile (A2, Singapore 2). *J Natl Cancer Inst* **57**:977-80.
187. **Sissons, J. G., and M. B. Oldstone.** 1980. Killing of virus-infected cells: the role of antiviral antibody and complement in limiting virus infection. *J Infect Dis* **142**:442-8.
188. **Sixbey, J. W., E. H. Vesterinen, J. G. Nedrud, N. Raab-Traub, L. A. Walton, and J. S. Pagano.** 1983. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected in vitro. *Nature* **306**:480-3.
189. **Small, T. N., E. B. Papadopoulos, F. Boulad, P. Black, H. Castro-Malaspina, B. H. Childs, N. Collins, A. Gillio, D. George, A. Jakubowski, G. Heller, M. Fazzari, N. Kernan, S. MacKinnon, P. Szabolcs, J. W. Young, and R. J. O'Reilly.** 1999. Comparison of immune reconstitution after unrelated and related T-cell-depleted bone marrow transplantation: effect of patient age and donor leukocyte infusions. *Blood* **93**:467-80.
190. **Smith, J. B., R. P. Knowlton, and L. S. Koons.** 1977. Immunologic studies in chronic lymphocytic leukemia: defective stimulation of T-cell proliferation in autologous mixed lymphocyte culture. *J Natl Cancer Inst* **58**:579-85.
191. **Sokal, E. M., K. Hoppenbrouwers, C. Vandermeulen, M. Moutschen, P. Leonard, A. Moreels, M. Haumont, A. Bollen, F. Smets, and M. Denis.** 2007. Recombinant gp350 vaccine for infectious mononucleosis: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the safety, immunogenicity, and efficacy of an Epstein-Barr virus vaccine in healthy young adults. *J Infect Dis* **196**:1749-53.
192. **Sprent, J.** 2005. Direct stimulation of naive T cells by antigen-presenting cell vesicles. *Blood Cells Mol Dis* **35**:17-20.
193. **Steven, N. M., N. E. Annels, A. Kumar, A. M. Leese, M. G. Kurilla, and A. B. Rickinson.** 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**:1605-17.
194. **Stevenson, P. G., and P. C. Doherty.** 1998. Kinetic analysis of the specific host response to a murine gammaherpesvirus. *J Virol* **72**:943-9.
195. **Stevenson, P. G., J. P. Simas, and S. Efstathiou.** 2009. The immune control of mammalian gamma-herpesviruses: lessons from Murid Herpesvirus-4. *J Gen Virol*.

196. **Stewart, J. P., N. Micali, E. J. Usherwood, L. Bonina, and A. A. Nash.** 1999. Murine gamma-herpesvirus 68 glycoprotein 150 protects against virus-induced mononucleosis: a model system for gamma-herpesvirus vaccination. *Vaccine* **17**:152-7.
197. **Stewart, J. P., O. J. Silvia, I. M. Atkin, D. J. Hughes, B. Ebrahimi, and H. Adler.** 2004. In vivo function of a gammaherpesvirus virion glycoprotein: influence on B-cell infection and mononucleosis. *J Virol* **78**:10449-59.
198. **Stilgenbauer, S., P. Lichter, and H. Dohner.** 2000. Genetic features of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* **4**:48-72.
199. **Stoorvogel, W., G. J. Strous, H. J. Geuze, V. Oorschot, and A. L. Schwartz.** 1991. Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell* **65**:417-27.
200. **Sugawara, Y., Y. Mizugaki, T. Uchida, T. Torii, S. Imai, M. Makuuchi, and K. Takada.** 1999. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) in hepatocellular carcinoma tissue: a novel EBV latency characterized by the absence of EBV-encoded small RNA expression. *Virology* **256**:196-202.
201. **Sugden, B., J. Yates, and W. Mark.** 1984. Transforming functions associated with Epstein-Barr virus. *J Invest Dermatol* **83**:82s-87s.
202. **Sunil-Chandra, N. P., S. Efstathiou, and A. A. Nash.** 1992. Murine gammaherpesvirus 68 establishes a latent infection in mouse B lymphocytes in vivo. *J Gen Virol* **73 (Pt 12)**:3275-9.
203. **Tao, Q., G. Srivastava, A. C. Chan, L. P. Chung, S. L. Loke, and F. C. Ho.** 1995. Evidence for lytic infection by Epstein-Barr virus in mucosal lymphocytes instead of nasopharyngeal epithelial cells in normal individuals. *J Med Virol* **45**:71-7.
204. **Taylor, D. D., and C. Gercel-Taylor.** 2005. Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects. *Br J Cancer* **92**:305-11.
205. **Taylor, G. S., T. A. Haigh, N. H. Gudgeon, R. J. Phelps, S. P. Lee, N. M. Steven, and A. B. Rickinson.** 2004. Dual stimulation of Epstein-Barr Virus (EBV)-specific CD4⁺ and CD8⁺-T-cell responses by a chimeric antigen construct: potential therapeutic vaccine for EBV-positive nasopharyngeal carcinoma. *J Virol* **78**:768-78.
206. **Thery, C., M. Boussac, P. Veron, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo, J. Garin, and S. Amigorena.** 2001. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* **166**:7309-18.
207. **Thery, C., L. Duban, E. Segura, P. Veron, O. Lantz, and S. Amigorena.** 2002. Indirect activation of naive CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol* **3**:1156-62.
208. **Thery, C., M. Ostrowski, and E. Segura.** 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* **9**:581-93.
209. **Thery, C., L. Zitvogel, and S. Amigorena.** 2002. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* **2**:569-79.

210. **Thompson, M. P., and R. Kurzrock.** 2004. Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res* **10**:803-21.
211. **Thorley-Lawson, D. A., and K. Geilinger.** 1980. Monoclonal antibodies against the major glycoprotein (gp350/220) of Epstein-Barr virus neutralize infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:5307-11.
212. **Tobian, A. A., D. H. Canaday, W. H. Boom, and C. V. Harding.** 2004. Bacterial heat shock proteins promote CD91-dependent class I MHC cross-presentation of chaperoned peptide to CD8+ T cells by cytosolic mechanisms in dendritic cells versus vacuolar mechanisms in macrophages. *J Immunol* **172**:5277-86.
213. **Tokunaga, M., C. E. Land, Y. Uemura, T. Tokudome, S. Tanaka, and E. Sato.** 1993. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma. *Am J Pathol* **143**:1250-4.
214. **Tolba, K. A., W. J. Bowers, S. P. Hilchey, M. W. Halterman, D. F. Howard, R. E. Giuliano, H. J. Federoff, and J. D. Rosenblatt.** 2001. Development of herpes simplex virus-1 amplicon-based immunotherapy for chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **98**:287-95.
215. **Tomkinson, B., E. Robertson, R. Yalamanchili, R. Longnecker, and E. Kieff.** 1993. Epstein-Barr virus recombinants from overlapping cosmid fragments. *J Virol* **67**:7298-306.
216. **Tripp, R. A., A. M. Hamilton-Easton, R. D. Cardin, P. Nguyen, F. G. Behm, D. L. Woodland, P. C. Doherty, and M. A. Blackman.** 1997. Pathogenesis of an infectious mononucleosis-like disease induced by a murine gamma-herpesvirus: role for a viral superantigen? *J Exp Med* **185**:1641-50.
217. **Usherwood, E. J., J. P. Stewart, K. Robertson, D. J. Allen, and A. A. Nash.** 1996. Absence of splenic latency in murine gammaherpesvirus 68-infected B cell-deficient mice. *J Gen Virol* **77** (Pt 11):2819-25.
218. **Valadi, H., K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J. J. Lee, and J. O. Lotvall.** 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* **9**:654-9.
219. **Van den Hove, L. E., S. W. Van Gool, P. Vandenberghe, M. Bakkus, K. Thielemans, M. A. Boogaerts, and J. L. Ceuppens.** 1997. CD40 triggering of chronic lymphocytic leukemia B cells results in efficient alloantigen presentation and cytotoxic T lymphocyte induction by up-regulation of CD80 and CD86 costimulatory molecules. *Leukemia* **11**:572-80.
220. **Veenstra, H., P. Jacobs, and E. B. Dowdle.** 1996. Abnormal association between invariant chain and HLA class II alpha and beta chains in chronic lymphocytic leukemia. *Cell Immunol* **171**:68-73.
221. **Vietheer, P. T., I. Boo, H. E. Drummer, and H. J. Netter.** 2007. Immunizations with chimeric hepatitis B virus-like particles to induce potential anti-hepatitis C virus neutralizing antibodies. *Antivir Ther* **12**:477-87.
222. **Virgin, H. W. t., P. Latreille, P. Wamsley, K. Hallsworth, K. E. Weck, A. J. Dal Canto, and S. H. Speck.** 1997. Complete sequence and genomic analysis of murine gammaherpesvirus 68. *J Virol* **71**:5894-904.
223. **Walling, D. M., W. Etienne, A. J. Ray, C. M. Flaitz, and C. M. Nichols.** 2004.

- Persistence and transition of Epstein-Barr virus genotypes in the pathogenesis of oral hairy leukoplakia. *J Infect Dis* **190**:387-95.
224. **Weinstock, D. M., G. G. Ambrossi, C. Brennan, T. E. Kiehn, and A. Jakubowski.** 2006. Preemptive diagnosis and treatment of Epstein-Barr virus-associated post transplant lymphoproliferative disorder after hematopoietic stem cell transplant: an approach in development. *Bone Marrow Transplant* **37**:539-46.
 225. **Wen, W., D. Iwakiri, K. Yamamoto, S. Maruo, T. Kanda, and K. Takada.** 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**:1037-42.
 226. **Wendtner, C. M., D. M. Kofler, H. D. Theiss, C. Kurzeder, R. Buhmann, C. Schweighofer, L. Perabo, S. Danhauser-Riedl, J. Baumert, W. Hiddemann, M. Hallek, and H. Buning.** 2002. Efficient gene transfer of CD40 ligand into primary B-CLL cells using recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Blood* **100**:1655-61.
 227. **Whiteside, T. L.** 2005. Tumour-derived exosomes or microvesicles: another mechanism of tumour escape from the host immune system? *Br J Cancer* **92**:209-11.
 228. **Wierda, W. G., M. J. Cantwell, S. J. Woods, L. Z. Rassenti, C. E. Prussak, and T. J. Kipps.** 2000. CD40-ligand (CD154) gene therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **96**:2917-24.
 229. **Wiesner, M., C. Zentz, C. Mayr, R. Wimmer, W. Hammerschmidt, R. Zeidler, and A. Moosmann.** 2008. Conditional immortalization of human B cells by CD40 ligation. *PLoS One* **3**:e1464.
 230. **Williams, H., K. McAulay, K. F. Macsween, N. J. Gallacher, C. D. Higgins, N. Harrison, A. J. Swerdlow, and D. H. Crawford.** 2005. The immune response to primary EBV infection: a role for natural killer cells. *Br J Haematol* **129**:266-74.
 231. **Wolfers, J., A. Lozier, G. Raposo, A. Regnault, C. Thery, C. Masurier, C. Flament, S. Pouzieux, F. Faure, T. Tursz, E. Angevin, S. Amigorena, and L. Zitvogel.** 2001. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* **7**:297-303.
 232. **Wolos, J. A., and F. R. Davey.** 1979. Depressed stimulation in the MLR by B lymphocytes on chronic lymphocytic leukemia: failure to demonstrate a suppressor cell. *Clin Immunol Immunopathol* **14**:77-85.
 233. **Yates, J., N. Warren, D. Reisman, and B. Sugden.** 1984. A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**:3806-10.
 234. **Young, L. S., and A. B. Rickinson.** 2004. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* **4**:757-68.
 235. **Yuille, M. R., E. Matutes, A. Marossy, B. Hilditch, D. Catovsky, and R. S. Houlston.** 2000. Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review

- of published studies. *Br J Haematol* **109**:794-9.
236. **Zeidler, R., G. Eissner, P. Meissner, S. Uebel, R. Tampe, S. Lazis, and W. Hammerschmidt.** 1997. Downregulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin-10. *Blood* **90**:2390-7.
237. **Zimber-Strobl, U., B. Kempkes, G. Marschall, R. Zeidler, C. Van Kooten, J. Banchereau, G. W. Bornkamm, and W. Hammerschmidt.** 1996. Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) is not sufficient to maintain proliferation of B cells but both it and activated CD40 can prolong their survival. *EMBO J* **15**:7070-8.
238. **Zinkernagel, R. M., and H. Hengartner.** 2006. Protective 'immunity' by pre-existent neutralizing antibody titers and preactivated T cells but not by so-called 'immunological memory'. *Immunol Rev* **211**:310-9.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Romana Ruiss
Geburtsdatum	11.02.1981
Geburtsort	Aichach
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulischer Werdegang

1987 – 1991	Ludwig-Steub-Grundschule Aichach
1991 – 2000	Deutschherrengymnasium Aichach
Juni 2000	Abitur

Studium

2000-2005	Studium der Biologie an der technischen Universität München
Dez. 2004 – Sept. 2005	Diplomarbeit bei Prof. W. Hammerschmidt in der Abteilung für Genvektoren des Helmholtz Zentrums München
Febr. 2006 – Juni 2009	Promotion in der Abteilung für Genvektoren (Betreuer: Prof. Reinhard Zeidler)

Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei Prof. Reinhard Zeidler für die interessante Aufgabenstellung dieses Projekts, die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für seinen großen Einsatz, die vielen fachlichen Hilfestellungen und seine geduldige Betreuung.

Ebenfalls herzlich bedanken möchte ich mich bei...

Herrn Prof. Wolfgang Hammerschmidt für seine fortwährende wohlwollende Unterstützung, die Förderung meiner Arbeit und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen in der Abteilung Genvektoren.

Frau PD Dr. Bettina Kempkes für ihre hilfreichen Anregungen und die Übernahme des Amts der offiziellen Betreuerin.

Herrn PD Dr. Heiko Adler für seine sofortige Bereitschaft, sein MHV-68-Mausmodell für unsere *in vivo*-Versuche zur Verfügung zu stellen, für die angenehme Zusammenarbeit und die interessanten Diskussionen.

Herrn Prof. Josef Mautner für die freundliche Zurverfügungstellung von LCLs, miniLCLs, T-Zellen und Peptiden und auch sonst jegliche Hilfestellung.

Manuel Deutsch für seine enorme Hilfsbereitschaft, was das Anfertigen von Konfokalaufnahmen betrifft.

Dr. Gilbert Reisbach für seine große Hilfe bei den Rag-Maus-Versuchen und die unzähligen Kuchenspenden.

dem gesamten Vaecgene-Lab, vor allem bei Christina, Andrea, Andreas, Steffi I.,

Steffi A., Simon, Mark und Leah, sei es für die Bereitstellung von T-Zellen, B-Blasten oder Ähnlichem oder aber für unterhaltsame Kaffeepausen.

allen meinen Kollegen aus der Abteilung Genvektoren, vor allem natürlich bei meinen Mitstreitern aus der Genetik-Bay. Martin, Markus, Dagmar, Steffi, Anne, Lisa, Christine, Gilbert, Rosi, Manuel, Eri und Montse – vielen Dank für Eure Hilfsbereitschaft, Eure Unterstützung, für zahlreiche interessante Diskussionen und die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, ohne die alles gar nicht möglich gewesen wäre.