

**Charakterisierung  
der CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort  
im Rahmen der Epstein-Barr Virus-  
Infektion *in vitro* und *in vivo***

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München



von

Stefanie Linnerbauer

2010

angefertigt am Helmholtz Zentrum München



Gutachter: 1. PD Dr. Josef Mautner  
2. Prof. Dr. Elisabeth Weiß

eingereicht: 28.12.2010  
Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2011



*„Inmitten der Schwierigkeiten liegt die Möglichkeit.“*

Albert Einstein (1879-1955)



## **EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass ich weder versucht habe, eine Dissertation anderweitig einzureichen bzw. einer Prüfungskommission vorzulegen, noch eine Doktorprüfung durchzuführen.

Die vorliegende Dissertation ist nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden.

München, Dezember 2010

Stefanie Linnerbauer





## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

7-AAD	7-Aminoactinomycin	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
$\alpha$	anti/alpha	g	Gramm
ACV	Aciclovir	GM-	Granulozyten/Monozyten-
ADV	Adenovirus	CSF	Kolonie stimulierender Faktor
AK	Antikörper	GvHD	<i>graft versus host disease</i>
APC	Allophycocyanin	Gy	Gray
APC	<i>antigen presenting cell</i>	h	Stunde(n)
ATG	Antithymozytenglobulin	HCl	Salzsäure
$\beta$	beta	HCV	Hepatitis C-Virus
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat	HEPES	(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl- ethansulfonsäure
BL	Burkitt-Lymphom(zellen)	HHV	Humanes Herpesvirus
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
bzw.	beziehungsweise	HL	Hodgkin-Lymphom
CCR	Chemokinrezeptor	H <sub>2</sub> O	Wasser
CD	<i>cluster of differentiation</i>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
CFSE/	Carboxyfluorescein diacetate	HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
CFDASE	succinimidyl ester	HS	Humanes Serum
CMV	Cytomegalievirus	HSCT	<i>hematopoetic stem cell transplantation</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
CsA	Cyclosporin A	ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
CXCR	Chemokinrezeptor	IE	<i>immediate early antigen</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin	IFN	Interferon
DC	Dendritische Zellen; <i>dendritic cell</i>	Ig	Immunglobulin
DMSO	Dimethylsulfoxid	IL	Interleukin
DNA	<i>2'-deoxyribonucleic acid</i>	IM	Infektiöse Mononukleose
EA	<i>early antigen</i>	i.p.	Intraperitoneal
EBER	<i>EBV encoded RNA</i>	kbp	Kilobasenpaar
EBNA	Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen	KCl	Kaliumchlorid
EBV	Epstein-Barr Virus	KHCO <sub>3</sub>	Kaliumhydrogencarbonat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	l	Liter
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)- N,N'-tetraessigsäure	LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>	LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis-Virus
ELISpot	<i>enzyme linked immunospot assay</i>	LCV	Lymphocryptovirus
EtOH	Ethanol	LFA	<i>lymphocyte function associated antigen</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>	PHA	Phytohämagglutinin
FCS	<i>fetal calf serum</i>	PI	Propidiumiodid
LMP	<i>late membrane protein</i>	PTLD	<i>post-transplant lymphoproliferative disorder</i>
LP	Leader protein		
LT	Lymphotoxin		
M	Mol(ar)		

MA	<i>membrane antigen</i>	RNA	<i>ribonucleic acid</i>
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>	RT	Raumtemperatur
mg	Milligramm	SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>	sek	Sekunde
ml	Milliliter	SOT	<i>solid organ transplantation</i>
min	Minute	T	Tween-20
mind.	mindestens	TBS	<i>Tris buffered saline</i>
mM	Millimol(ar)	TCR	<i>T cell receptor</i>
N	normal	TGF	<i>transforming growth factor</i>
NaCl	Natriumchlorid	Th	T-Helfer-Zellen
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid	TNF	Tumor-Nekrosefaktor
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom	Treg	Regulatorische T-Zellen
NK	Natürliche Killer (Zelle)	üN	über Nacht
nm	Nanometer	VCA	<i>viral capsid antigen</i>
nM	Nanomol(ar)	v.a.	vor allem
NPC	<i>nasopharyngeal carcinoma</i>	x g	x-fache Schwerkraft
OD	Optische Dichte	z.B.	zum Beispiel
p	Passage	%	Prozent
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>	°C	Grad Celcius
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>	γ	Gamma
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>	μg	Mikrogramm
PE	Phycoerythrin	μl	Mikroliter
PFA	Paraformaldehyd	μM	Mikromol(ar)

Im Rahmen der Arbeit verwendete Begriffe aus dem Englischen wurden durch kursive Schreibweise gekennzeichnet.

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY .....</b>	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG.....</b>	<b>5</b>
2.1 DAS EPSTEIN-BARR VIRUS (EBV).....	5
2.1.1 Die Entdeckung von EBV .....	5
2.1.2 Der strukturelle Aufbau von EBV .....	6
2.1.3 Die Infektion mit EBV .....	6
2.1.3.1 Die Primärinfektion .....	7
2.1.3.2 Die latente Infektion und die Etablierung lymphoblastoider Zelllinien .....	8
2.1.3.3 Die vier Latenzformen von EBV .....	8
2.1.3.4 Der lytische Zyklus.....	11
2.2 DIE IMMUNANTWORT GEGEN EBV .....	13
2.2.1 Die humorale Immunantwort gegen EBV .....	13
2.2.2 Die zelluläre Immunantwort gegen EBV .....	14
2.2.2.1 EBV-spezifische CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	14
2.2.2.2 EBV-spezifische CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	15
2.3 EBV-ASSOZIIERTE ERKRANKUNGEN .....	16
2.3.1 Infektiöse Mononukleose .....	16
2.3.2 EBV-assoziierte lymphoproliferative Erkrankungen nach Transplantation.....	17
2.3.2.1 Klinische Symptome und Pathologie .....	17
2.3.2.2 Inzidenz und Risiko .....	18
2.3.2.3 Behandlung.....	19
2.3.3 Weitere EBV-assoziierte Erkrankungen.....	22
2.4 DIE CD4 <sup>+</sup> T-ZELLFAMILIE .....	23
2.4.1 Verschiedene Subpopulationen im Vergleich .....	23
2.4.2 Die CD4 <sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen .....	26
2.4.3 Zytotoxische CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	27
<b>3. FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>28</b>
<b>4. MATERIALIEN .....</b>	<b>29</b>
4.1 CHEMIKALIEN.....	29
4.2 GERÄTE .....	30

4.3	VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	31
4.4	ALLGEMEINE PUFFER UND LÖSUNGEN .....	32
4.5	REAGENZIEN FÜR DIE ZELLKULTUR .....	33
4.5.1	Zellkulturmedien .....	33
4.5.2	Zellen .....	33
4.5.2.1	Lymphoblastoide Zelllinien .....	33
4.5.2.2	T-Zellen .....	36
4.6	IMMUNOLOGISCHE REAGENZIEN .....	37
4.6.1	Medien, Puffer und Lösungen .....	37
4.6.2	Antikörper .....	38
4.6.3	Materialien und Reagenzien für die Histologie .....	40
4.6.4	Inhibitoren .....	40
4.6.5	Zytokine .....	41
4.7	MAUSSTAMM UND TIERHALTUNG .....	41
4.8	SOFTWARE .....	42
<b>5.</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>43</b>
5.1	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN .....	43
5.1.1	Kultivierung von eukaryotischen Zellen .....	43
5.1.1.1	Kultivierung von etablierten Zelllinien .....	43
5.1.1.2	Kultivierung von etablierten T-Zellen .....	43
5.1.1.3	Bestimmung der Zellzahl .....	44
5.1.1.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	44
5.1.2	Isolation von peripheren mononuklearen Zellen aus Vollblut durch <i>Ficoll</i> - Dichtegradienten .....	45
5.1.3	Generierung von PHA-Blasten aus peripherem Blut .....	46
5.1.4	Generierung von T-Zelllinien und Klonen aus humanem Blut .....	46
5.1.4.1	T-Zelllinien .....	46
5.1.4.1.1	T-Zelllinien allgemein .....	46
5.1.4.1.2	Depletierte T-Zelllinien .....	46
5.1.4.1.3	T-Zelllinien mit unterschiedlichen Stimulatorzellen .....	47
5.1.4.2	Generierung unspezifischer CD4 <sup>+</sup> T-Zellklone .....	47
5.1.5	Herstellung von humanem Serum .....	47
5.1.6	Herstellung von Viruskonzentrat .....	48

5.1.6.1 FCS-freies hochkonzentriertes Viruskonzentrat.....	48
5.1.6.2 Zehnfach-Viruskonzentrat.....	48
5.2 IMMUNOLOGISCHE METHODEN.....	49
5.2.1 CFSE-Markierung von Zellen.....	49
5.2.2 Durchflusszytometrie.....	49
5.2.2.1 Nachweis von Oberflächenmarkern und CFSE-markierten Zellen.....	49
5.2.2.2 Nachweis von intrazellulären Proteinen.....	50
5.2.2.2.1 Nachweis von Granzym A und B.....	50
5.2.2.2.2 Bestimmung von CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen in PBMCs.....	51
5.2.3 <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> .....	53
5.2.3.1 Analyse der Zytokinausschüttung von T-Zellen mittels ELISA.....	53
5.2.3.2 Modifizierter ELISA zum Nachweis von Granzym B.....	54
5.2.3.3 Analyse von humanem und murinem Immunglobulin G mittels ELISA.....	54
5.2.4 <i>Enzyme linked immunospot assay</i> .....	55
5.2.5 Magnetische Zellseparation.....	56
5.2.6 Zytokin-Array.....	57
5.2.7 Zytotoxizitätsbestimmung: Calcein-Lyse-Assay.....	59
5.3 METHODEN ZUR DURCHFÜHRUNG DER <i>IN VIVO</i> -ANALYSEN.....	61
5.3.1 Vorbereitung und Injektion von Zellen bei Mausversuchen.....	61
5.3.2 Mykoplasmen-Test.....	61
5.3.3 Gewebeentnahme und- analyse bei SCID-Mäusen.....	62
5.3.3.1 Tötung und Gewebeentnahme.....	62
5.3.3.2 Gewebeaufbereitung.....	62
5.3.3.2.1 Gewebeaufbereitung zur FACS-Analyse.....	62
5.3.3.2.2 Einbettung von Gewebe in Paraffin.....	63
5.3.3.2.3 Kryogewebe.....	63
5.3.3.3 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung.....	64
5.3.3.4 Immunhistochemische Färbungen.....	64
5.3.3.4.1 Färbungen von Kryogeweben.....	64
5.3.3.4.1.1 Einfachfärbungen.....	64
5.3.3.4.1.2 Doppelfärbung.....	65
5.3.3.4.2 Färbungen von Paraffingeweben.....	66
5.3.4 Statistik.....	68

<b>6. ERGEBNISSE.....</b>	<b>69</b>
6.1 PHÄNOTYPISCHE UND FUNKTIONELLE ANALYSE VON EBV-SPEZIFISCHEN CD4 <sup>+</sup> T-ZELLKLONEN.....	69
6.1.1 EBV-spezifische CD4 <sup>+</sup> T-Zellklone wiesen einen Effektor- bzw. Effektor-Gedächtnis-T-Zell-Phänotyp auf.....	69
6.1.2 Die EBV-spezifischen CD4 <sup>+</sup> T-Zellklone konnten aufgrund ihres Zytokinmusters in zwei Gruppen unterteilt werden.....	73
6.1.3 Die T-Zellklone waren unterschiedlich stark zytolytisch.....	75
6.2 ANALYSE DER WIRKSAMKEIT VERSCHIEDENER T-ZELLPOPULATIONEN IN EINEM PTLD-MAUSMODELL.....	78
6.2.1 Induktion PTLD-ähnlicher Tumoren in SCID-Mäusen durch die Injektion von LCL, LCL Z(-) und PBMCs EBV-seropositiver Spender.....	79
6.2.1.1 Histologische Analyse der Tumoren.....	81
6.2.1.2 Phänotypische Analyse der Tumorzellen.....	84
6.2.1.3 Die Erkennung von explantierten Tumorzellen durch CD4 <sup>+</sup> T-Zellklone.....	86
6.2.2 Test verschiedener T-Zellpopulationen <i>in vivo</i> .....	87
6.2.2.1 Test EBV-spezifischer CD4 <sup>+</sup> T-Zellklone <i>in vivo</i> .....	87
6.2.2.1.1 Die T-Zellklone zeigten unterschiedliche therapeutische Wirksamkeit.....	87
6.2.2.1.2 Die übertragenen T-Zellen wanderten in verschiedene Organe ein und überlebten mehrere Tage in der Maus.....	91
6.2.2.2 Vergleichende Analysen LCL-stimulierter T-Zelllinien.....	94
6.2.2.2.1 Therapeutische Wirksamkeit der T-Zelllinien <i>in vivo</i> .....	96
6.2.2.2.2 Die T-Zelllinien FCS, FCS-ACV und HS wiesen unterschiedliche Phänotypen auf.....	98
6.2.2.2.3 LCL-FCS- und LCL-HS-stimulierte T-Zelllinien unterschieden sich in ihren Zytokinmustern.....	100
6.2.2.2.4 Die polyklonalen T-Zelllinien besaßen ein unterschiedlich stark ausgeprägtes Zytotoxizitätspotenzial.....	104
6.2.2.3 CD4 <sup>+</sup> T-Zellen waren in der Tumorabwehr ebenso effektiv wie CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	105
6.2.2.4 Nicht-EBV-Antigene spielten in der T-Zellantwort ebenfalls eine entscheidende Rolle.....	107

6.3 ANALYSE EBV-SPEZIFISCHER CD4 <sup>+</sup> T-ZELLEN IN PERIPHEREM BLUT VON PATIENTEN MIT INFEKTÖSER MONONUKLEOSE UND VON KLINISCH GESUNDEN VIRUSTRÄGERN .....	110
6.3.1 Die CD4 <sup>+</sup> T-Zellantwort gegen EBV-Strukturantigene unterschied sich bei IM-Patienten und klinisch gesunden Virusträgern .....	110
6.3.2 Während der Rekonvaleszenz kam es zu einer Verschiebung der T-Zellspezifitäten .....	113
<b>7. DISKUSSION .....</b>	<b>115</b>
7.1. PROBLEME DER T-ZELLTHERAPIE EBV-ASSOZIIERTER TUMOREN .....	115
7.2 DIE BEDEUTUNG DER CD4 <sup>+</sup> T-ZELLEN IM RAHMEN DER EBV-INFEKTION.....	116
7.2.1 Phänotypische und funktionelle Analyse EBV-spezifischer CD4 <sup>+</sup> T-Zellklone..	116
7.2.2 Funktionelle Besonderheiten EBV-spezifischer CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	118
7.2.3 Die Frequenzen EBV-spezifischer CD4 <sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut EBV-infizierter Personen unterscheiden sich abhängig vom Infektionsstatus .....	123
7.2.4 Wirksamkeit EBV-spezifischer CD4 <sup>+</sup> T-Zellen <i>in vivo</i> .....	125
7.2.4.1 Wirksamkeit EBV-spezifischer CD4 <sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich mit CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	125
7.2.4.2 Die therapeutische Wirksamkeit EBV-spezifischer CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	127
7.2.4.2.1 EBNA1-spezifische T-Zellen beschleunigen das Tumorwachstum <i>in vivo</i> ...	127
7.2.4.2.2 Die Wirksamkeit BLLF1-spezifischer CD4 <sup>+</sup> T-Zellen <i>in vivo</i> .....	128
7.2.4.3 Effektivität der polyklonalen Linien <i>in vivo</i> .....	129
7.2.4.4 Bedeutung von Autoantigenen in der Therapie von PTLDs .....	131
7.3 NEUE ANSÄTZE IN DER PTLD-BEHANDLUNG.....	134
7.4 AUSBLICK.....	135
<b>8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>136</b>
<b>9. TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>138</b>
<b>10. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>139</b>





## 1. ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY

### Zusammenfassung

Die Infektion mit dem onkogenen Epstein-Barr Virus (EBV) wird durch T-Zellen kontrolliert. Um nähere Einblicke in die bislang wenig charakterisierte CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort während der EBV-Infektion zu erhalten, wurden in der vorliegenden Arbeit (1) EBV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen phänotypisch und funktionell *in vitro* charakterisiert, (2) das Tumor-protective Potenzial verschiedener T-Zellpopulationen in einem präklinischen Mausmodell *in vivo* vergleichend evaluiert, sowie (3) die Frequenz Virus-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen in akut und latent EBV-infizierten Personen *ex vivo* analysiert.

Alle *in vitro* durch Einzelzellklonierung generierten, EBV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellklone exprimierten Effektor- bzw. Effektor-Gedächtnis-T-Zellmarker, sezernierten typische Th1- oder Th1/Th2-Zytokine und wiesen unterschiedliche zytolytische Aktivität auf, aufgrund dessen sie in die Gruppe terminal differenzierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen eingeordnet wurden.

Um ihr Tumor-protectives Potenzial zu bestimmen, wurden EBV-spezifische T-Zellen zeitgleich mit autologen, EBV-infizierten B-Zellen in SCID-Mäuse injiziert und die B-Zell-Tumorentstehung analysiert. Trotz ähnlichen Phänotyps erwiesen sich die verschiedenen EBV-spezifischen T-Zellklone als unterschiedlich Tumor-protectiv. Während Strukturantigen-spezifische T-Zellen das Tumorwachstum signifikant verzögerten, führte die Infusion eines Latenzantigen-spezifischen T-Zellklons zu einem beschleunigten Tumorwachstum. Da in den Standardprotokollen zur Herstellung EBV-spezifischer T-Zelllinien für den klinischen Einsatz keine Stimulation von Strukturantigen-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen stattfindet, wurden Stimulationsbedingungen getestet, die eine Expansion dieser T-Zellen ermöglichen und die Expansion FCS-reaktiver T-Zellen unterbinden sollten. Nach vier *in vitro*-Stimulationsrunden wiesen diese Linien ähnliche, therapeutische Wirksamkeit *in vivo* auf. Nach weiteren Stimulationsrunden zeigten dagegen alle T-Zelllinien, deren Stimulatorzellen in FCS-haltigem Medium kultiviert worden waren, zunehmend einen Th2-Phänotyp und eine verminderte therapeutische Wirksamkeit, die wahrscheinlich auf dem Auswachsen FCS-reaktiver T-Zellen beruhte. Die Separation der CD4<sup>+</sup> und der CD8<sup>+</sup> Zellkomponenten aus EBV-spezifischen T-Zelllinien ergab, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen ein ähnlich Tumor-protectives Potenzial wie CD8<sup>+</sup> T-Zellen besitzen. Die größte

therapeutische Effektivität wurde allerdings nach Infusion beider Populationen erzielt, wobei das Mischungsverhältnis dabei unbedeutend war. Interessanterweise zeigten die CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien eine weitaus größere therapeutische Wirksamkeit als die EBV-spezifischen T-Zellklone. Diese Linien enthielten neben Virus-spezifischen auch autoreaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die entscheidend zur antitumoralen Wirkung beitrugen.

In *ex vivo* T-Zell-Frequenzanalysen wurde im Vergleich zu gesunden Virusträgern in Patienten mit akuter infektiöser Mononukleose (IM) ein erhöhter Anteil an Latenzantigen- oder autoreaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen detektiert. Dagegen war der Prozentsatz an Strukturantigen-spezifischen T-Zellen deutlich erniedrigt und erreichte erst während der Rekonvaleszenz das gleiche Niveau wie in gesunden Virusträgern. In EBV-negativen Spendern konnten kaum T-Zellen gegen die erwähnten Antigengruppen nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass durch die EBV-Infektion nicht nur Virus-spezifische, sondern auch autoreaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen induziert werden. Ob die verzögerte Entwicklung Strukturantigen-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen ursächlich zur Entstehung akuter IM beiträgt, oder auch bei asymptomatisch verlaufender Primärinfektion auftritt, und welche Rolle autoreaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Kontrolle der EBV-Infektion spielen, sollen zukünftige Experimente klären.

## Summary

Infections with the oncogenic Epstein-Barr virus (EBV) are controlled by T cells.

In order to gain further insight into the poorly characterized virus-specific CD4<sup>+</sup> T cell response, this study aimed (i) to characterize phenotype and function of EBV-specific CD4<sup>+</sup> T cells *in vitro*, (ii) to assess the tumor-protective capacity of CD4<sup>+</sup> T cells in a preclinical model of PTLD *in vivo* and (iii) to analyze the frequency of virus-specific CD4<sup>+</sup> T cells during acute and chronic phase of infection *ex vivo*.

All EBV-specific CD4<sup>+</sup> T cell clones expressed effector- and effector-memory T cell markers with a Th1- or a mixed Th1/Th2-cytokine profile and variable cytolytic activity. This phenotype is characteristic of terminally differentiated CD4<sup>+</sup> T cells.

To investigate their tumor-protective potential, various EBV-specific T cells were co-injected with autologous, EBV-infected B cells into SCID mice and tumor development monitored. Despite a similar phenotype *in vitro*, EBV-specific T cell clones displayed different tumor-protective potentials *in vivo*. While T cells specific for structural antigens significantly delayed tumor growth, T cells specific for a latent antigen accelerated tumor development. Because currently used protocols to generate EBV-specific T cell lines for clinical application preclude the stimulation of CD4<sup>+</sup> T cells specific for structural antigens, different stimulation conditions were tested to allow for the expansion of these, and to prevent the expansion of FCS-reactive T cells. After four rounds of stimulation, these different T cell lines had similar antitumoral efficacy *in vivo*. After additional rounds of stimulation, all T cell lines stimulated with target cells cultivated in FCS-containing media shifted towards a Th2-phenotyp and displayed a reduced tumor-protective potential, probably due to the outgrowth of FCS-reactive T cells. The separation of the EBV-specific T cell lines into CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> fractions revealed a similar tumor-protective potential of both components. However, the combination of both populations was most efficacious, irrespective of the ratio.

Interestingly, the CD4<sup>+</sup> T cell lines showed higher therapeutic efficacy than the EBV-specific CD4<sup>+</sup> T cell clones. Besides virus-specific, these lines also contained auto-reactive CD4<sup>+</sup> T cells, which critically contributed to the anti-tumor response. In T cell frequency analyses *ex vivo*, an increased percentage of latent antigen- or autoantigen-reactive CD4<sup>+</sup> T cells was detected in patients with acute infectious mononucleosis (IM) as compared to healthy virus-carriers. By contrast, the percentage of structural antigen-specific T cells was significantly reduced in acute IM patients and increased to levels

observed in healthy virus-carriers only during convalescence. In EBV-negative donors, these T cell specificities were barely detectable.

These results indicated that virus-specific as well as auto-reactive CD4<sup>+</sup> T cell responses are elicited following EBV-infection. Whether the delayed development of CD4<sup>+</sup> T cells specific for structural antigens of EBV is responsible for the development of acute IM, or also occurs during asymptomatic primary infection, and whether auto-reactive CD4<sup>+</sup> T cells contribute to the control of EBV-infection, needs to be clarified in future experiments.

## **2. EINLEITUNG**

### **2.1 Das Epstein-Barr Virus (EBV)**

Das Epstein-Barr Virus (EBV), auch humanes Herpesvirus 4 (HHV 4) genannt, gehört zur Gattung der Lymphocryptoviren (LCV), einer Unterfamilie der Gammaherpesviren. Dieser Typus infiziert ausschließlich Primaten, wobei EBV das einzige human-pathogene LCV ist (Kutok and Wang, 2006). EBV ist ein weitverbreitetes Virus. Über 90 % der Weltbevölkerung sind mit EBV infiziert (Cohen, 2000).

EBV weist einen ausgeprägten Tropismus für Epithelzellen und B-Lymphozyten auf. Aber es wurden auch latente Infektionen von T-Zellen und Natürlichen Killer (NK)-Zellen nachgewiesen (Watry et al., 1991, Kanegane et al., 1996).

EBV ist mit der Pathogenese verschiedener maligner, als auch nicht-maligner Erkrankungen assoziiert. 1997 hat die Weltgesundheitsorganisation EBV als Tumovirus klassifiziert (IARC, 1997).

#### **2.1.1 Die Entdeckung von EBV**

Die Entdeckung des Virus ist den Beobachtungen des britischen Chirurgen Denis Burkitt in den späten 1950er Jahren zu verdanken. Der Mediziner beschrieb als Erster einen in Uganda auftretenden Tumor, der später Burkitt-Lymphom genannt wurde (Burkitt, 1958, Burkitt, 1962, Burkitt and O'Connor, 1961).

Er präsentierte im Jahre 1961 seine Beobachtungen in einem Seminar in London, an dem Anthony Epstein, ein Pathologe, teilnahm. Er und seine Kollegen, Bert Achong und Yvonne Barr, untersuchten daraufhin in den folgenden Jahren verschiedene Burkitt-Tumorbiopsien auf der Suche nach einem Krebs-auslösenden Virus. Durch die erfolgreiche Langzeitkultivierung von Tumorzellen konnten sie mithilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen ein Herpesvirus in diesen Zellen detektieren (Epstein et al., 1964). Außerdem konnten die Pathologen nachweisen, dass sich dieses neue Virus deutlich von bislang bekannten Herpesviren unterschied.

### **2.1.2 Der strukturelle Aufbau von EBV**

Das Genom von EBV besteht aus einer 184 kbp langen, linearen, doppelsträngigen DNA (Baer et al., 1984), die für etwa 80-100 virale Proteine kodiert (Kutok and Wang, 2006). An den Enden der linearen DNA befinden sich die *terminal repeats*, repetitive Tandemsequenzen, über die das virale Genom in der infizierten Zelle zu einem Episom geschlossen wird.

Während das EBV-Genom in latent infizierten Zellen episomal vorliegt, ist es während der Replikation linear. Teilweise wurden auch chromosomale Integrationen beschrieben, die möglicherweise für die Entstehung mancher Krebsformen von Bedeutung sind (Young and Rickinson, 2004).

Die DNA wird von einem Nukleokapsid mit 162 Kapsomeren, einer Tegumentschicht, sowie einer äußeren Membranhülle mit viralen Glykoproteinen umgeben (Kieff and Rickinson, 2006).

Die Hauptglykoproteine der Hülle sind: BLLF1 (gp350), BXLF2 (gH), BALF4 (gB), BZLF2 (gp42), BBRF3 (gM), BILF2 (gp78), BLRF1 (gN), BDLF3 (gp150), sowie BKRF2 (gL). Das Tegument bilden folgende Proteine: BPLF1, BOLF1, BBLF1, BGLF2, BSRF1, BVRF1, BGLF1, BGLF4, BNRF1, BLRF2, BRRF2, BDLF2 und BKRF4 (Johannsen et al., 2004).

### **2.1.3 Die Infektion mit EBV**

Ein Hauptmerkmal von Herpesviren ist ihr biphasischer Lebenszyklus, der aus einer lytischen und einer latenten Phase besteht. Die Besonderheit der latenten Infektion ist dabei die Fähigkeit zur Stilllegung (*quiescence*), eine nicht-produktive Infektion, die unauffällig und unbemerkt für das Immunsystem bleibt. Normalerweise folgt der Primärinfektion durch EBV die latente Infektion aus der, erst nach Induktion, eine lytische Infektion hervorgeht.

In den folgenden Abschnitten wird daher zuerst die Primärinfektion mit Manifestation einer latenten Infektion beschrieben, gefolgt von den unterschiedlichen Latenzformen und der Induktion des lytischen Zyklus.

### **2.1.3.1 Die Primärinfektion**

In Entwicklungsländern werden die meisten Kinder bereits innerhalb des ersten Lebensjahres mit EBV infiziert, wobei die Infektion in der Regel klinisch asymptomatisch erfolgt. In entwickelten Ländern erfolgt die Primärinfektion aufgrund der verbesserten sanitären Bedingungen meist erst im Kindes- oder Erwachsenenalter, was mit einem gesteigerten Risiko an einer EBV-assoziierten infektiösen Mononukleose (IM) zu erkranken, einhergeht. IM betrifft meist Individuen, die während oder nach dem zweiten Lebensjahrzehnts mit EBV infiziert werden (Luzuriaga and Sullivan, 2010). Bei einer Primärinfektion im frühen Erwachsenenalter (16-19 Jahre) zeigen mind. 25 % der betroffenen Personen IM-Symptome. Erwachsene erkranken aus unbekanntem Gründen seltener an IM (Henke et al., 1973, Crawford et al., 2006).

EBV wird hauptsächlich durch Speichel übertragen. Nach oraler Transmission repliziert EBV vermutlich zunächst in Rachenepithelzellen. Durch die freigesetzten Viruspartikel werden infiltrierende B-Zellen infiziert. Der B-Zelltropismus wird dabei durch die Spezifität von viralem BLLF1 (gp350) in der Virushülle für den Komplementrezeptor CD21 auf B-Zellen erklärt (Nemerow et al., 1987). Als Korezeptor fungiert ein Komplex aus den drei viralen Proteinen gH-gL-gp42, der an humane HLA-Moleküle der Klasse II bindet (Borza and Hutt-Fletcher, 2002, Kieff and Rickinson, 2006). Das Virion wird anschließend endozytotisch aufgenommen und fusioniert mit der Vesikelmembran, wodurch es zur Freisetzung des Nukleokapsids ins Zytoplasma und zum Transport des EBV-Genoms in den Kern kommt.

Ob dabei Epithel- oder B-Zellen zuerst infiziert werden, ist bislang noch nicht eindeutig geklärt. Lange Zeit wurde vermutet, dass das Epithel im Oropharynx der Ort der ersten Virusproduktion ist, da hohe Titer an freien Viruspartikeln in Rachenspülwasser von IM-Patienten gefunden wurden (Gerber et al., 1972). Ob Epithelzellen die primäre Angriffsstelle des Virus sind, ist aber seit langem umstritten, da Pathologen in IM-Patienten, sowie in gesunden Personen kein Virus in abgestoßenen Tonsilleneithelzellen nachweisen konnten (Bornkamm et al., 2006). 2007 konnten aber erstmals primäre Epithelzellen mit EBV infiziert werden, wobei starke interindividuelle Schwankungen in der Effizienz beobachtet wurden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass EBV bevorzugt differenzierte Epithelzellen infiziert (Feederle et al., 2007).

### **2.1.3.2 Die latente Infektion und die Etablierung lymphoblastoider Zelllinien**

Nach Primärinfektion persistiert EBV lebenslang im infizierten Wirt durch die latente Infektion von B-Zellen. *In vitro* führt die B-Zell-Infektion zum Auswachsen latent infizierter lymphoblastoider Zelllinien (*lymphoblastoid cell lines*; LCL), die als Untersuchungsmodell für EBV-infizierte B-Zellen genutzt werden können (Young and Rickinson, 2004, Pope et al., 1968). Der erste Nachweis EBV-infizierter B-Zellen im Blut gesunder Spender erfolgte durch spontanes Auswachsen solcher LCL aus peripherem Blut *in vitro* kurze Zeit später (Nilsson et al., 1971). Bei LCL trägt jede Zelle mehrere extrachromosomale Kopien des viralen Episoms, exprimiert virale Proteine der Latenzphase III, die im folgenden Abschnitt beschrieben wird, und zeigt eine ausgeprägte Expression der B-Zell-typischen Aktivierungsmarker CD23, CD30, CD39 und CD70 sowie LFA-1, LFA-3 und ICAM1, die normalerweise nicht von ruhenden B-Lymphozyten exprimiert werden (Rowe et al., 1987, Kieff and Rickinson, 2006).

Die Zahl solcher latent infizierten B-Zellen in peripherem Blut gesunder Virusträger variiert je nach Bestimmungsmethode (PCR oder *limiting dilution*) und liegt zwischen 1 in  $10^5$ - $10^6$  B-Zellen (Nilsson, 1971, Lam et al., 1991) und 1-50 in  $10^6$  B-Zellen (Khan et al., 1996) und ist 1000-fach geringer als zum Zeitpunkt akuter IM. Das Reservoir an infizierten B-Zellen im peripheren Blut von gesunden Individuen scheint über die Zeit stabil zu bleiben.

B-Zellen sind absolut notwendig für die Viruspersistenz, was durch Patienten mit X-chromosomaler Hypogammaglobulinämie belegt wird, die keine reifen B-Zellen ausbilden können und auch keine Anhaltspunkte für eine chronische EBV-Infektion zeigen (Faulkner et al., 1999).

### **2.1.3.3 Die vier Latenzformen von EBV**

Die latente Infektion von B-Lymphozyten mit EBV ist durch die Expression weniger viraler Proteine charakterisiert. Von ca. 100 viralen Proteinen werden nur ein bis neun EBV-Proteine exprimiert. Die verschiedenen Expressionsmuster werden in vier Latenzprogrammen zusammengefasst, die für unterschiedliche EBV-Erkrankungen charakteristisch sind (Rowe et al., 1992, Cohen, 2000).



Im **Latenzprogramm 0**, wie auch in allen weiteren Latenzphasen, werden die EBERs (*EBV encoded RNA*), zwei kleine, nicht-kodierende RNAs, exprimiert. Ob zusätzlich auch LMP2 (*late membrane protein 2*) exprimiert wird (Bar-Natan and Nagler, 2006), ist noch nicht endgültig geklärt. Infizierte Gedächtnis-B-Zellen im peripheren Blut von Virusträgern zeigen diesen Phänotyp.

Bei der **Latenzphase I** wird, zusätzlich zu den EBERs, auch EBNA1 (*EBV nuclear antigen 1*) exprimiert. Der Phänotyp der B-Zellen in dieser Latenzform entspricht nicht-aktivierten B-Zellen. Diese Zellen können in zirkulierenden, gerade proliferierenden B-Zellen von klinisch gesunden EBV-seropositiven Individuen detektiert werden. Außerdem sind sie ein charakteristisches Merkmal für EBV-positive Burkitt-Lymphomzellen (BL) (Heslop, 2009).

Im **Latenzprogramm II**, das zuerst in Nasopharynxkarzinomen (*nasopharyngeal carcinoma*; NPC) entdeckt wurde, werden die viralen Proteine EBNA1, LMP1 und -2 exprimiert. Dieser Phänotyp tritt außerdem bei Hodgkin-Lymphomen (HL), T- und NK-Zelllymphomen auf. In B-Zellen des Keimzentrums von Tonsillen gesunder Individuen ist dieser Zelltyp ebenfalls zu finden (Heslop, 2009).

Bei der **Latenzform III** kommt es zur Expression des kompletten Sets an EBV-Latenzproteinen (Rowe et al., 1992). Zellen dieser Latenzphase werden in Patienten mit posttransplant-lymphoproliferativen Erkrankungen (*post-transplant lymphoproliferative disorder*; PTL) und in Patienten mit akuter IM beobachtet (Klein et al., 2007). Außerdem ist diese Latenzform für lymphoblastoide Zelllinien charakteristisch.

**Tabelle 2.1 EBV-Latenzformen und assoziierte Erkrankungen**

EBERs	EBNA1	LMP1	LMP2	EBNA2	EBNA3s + -LP	Latenzprogramm	Vorkommen / assoziierte Erkrankungen
+	-	-	+	-	-	0	Gedächtnis-B-Zellen in peripherem Blut
+	+	-	-	-	-	I	Burkitt-Lymphome
+	+	+	+	-	-	II	Hodgkin-Lymphome
+	+	+	+	+	+	III	PTLD

Die Expression unterschiedlicher Kombinationen an EBV-Latenzproteinen beeinflusst den Phänotyp der infizierten B-Zellen. Um die Entstehung der assoziierten Erkrankungen zu verstehen, werden die Funktionen der Moleküle im Folgenden genauer erläutert:

**EBERs** sind kleine nicht-kodierende RNAs, die in jeder Latenzphase exprimiert werden. Die genaue Bedeutung dieser Moleküle ist nicht bekannt, allerdings wird vermutet, dass sie für die Onkogenese und Resistenz gegen Apoptose wichtig sind (Cohen, 2000).

**EBNA1** ist ein DNA-bindendes nukleäres Phosphoprotein, das an den plasmidalen Replikationsursprung (*origin of plasmid replication*; oriP) von EBV bindet und für die Replikation und die Erhaltung des viralen Episoms benötigt wird (Kieff and Rickinson, 2006).

**LMP1** wirkt als konstitutiv aktiver CD40-Rezeptor, besitzt onkogenes Potential und trägt maßgeblich zur B-Zelltransformation bei (Kaye et al., 1993, Kilger et al., 1998). LMP1 scheint pleiotrope Effekte in den Zellen zu haben: Es induziert die Expression von Oberflächen-Adhäsionsmolekülen (Wang et al., 1990a), die Hochregulierung von anti-apoptotischen Molekülen wie Bcl-2 (Henderson et al., 1991) und stimuliert zusätzlich die Produktion der Zytokine IL-6 und IL-8 (Eliopoulos et al., 1999). LMP1 hat daher einen starken Einfluss auf den B-Zell-Phänotyp.

**LMP2** wird in LMP2A und B unterteilt. Beide Isoformen sind nicht essentiell für die B-Zell-Transformation *in vitro*. LMP2 scheint aber die transformierten Zellen vor Apoptose zu bewahren (Swanson-Mungerson et al., 2010). LMP2A ahmt den B-Zellrezeptor nach und führt dadurch zur Aktivierung der B-Zellen (Caldwell et al., 1998). LMP2B scheint die Empfänglichkeit für eine Induktion des lytischen Zyklus zu regulieren (Rechsteiner et al., 2008).

**EBNA2** ist ein wichtiges Protein für die Transformation der B-Zellen und führt zur Hochregulierung von CD21 und CD23, sowie LMP1 und 2 (Kieff and Rickinson, 2006, Cohen et al., 1989, Wang et al., 1990a, Wang et al., 1990b).

In der **EBNA3**-Familie, bestehend aus EBNA3A, B und C, scheinen EBNA3A und C essentiell für die B-Zell-Transformation *in vitro* zu sein. Außerdem gibt es Anhaltspunkte dafür, dass die Mitglieder der EBNA3-Familie transkriptionelle Regulatoren sind. EBNA3B scheint CD40 zu regulieren und somit zur B-Zellaktivierung beizutragen (Silins and Sculley, 1994). EBNA3C führt zur Hochregulierung von CD21 und LMP1 (Young and Murray, 2003).

**EBNA-LP** (*EBV nuclear antigen leader protein*) ist nicht essentiell für die B-Zelltransformation. Eine bedeutende Rolle scheint es aber für das effiziente Auswachsen der LCL zu haben (Allan et al., 1992) und kann möglicherweise die

EBNA-2-vermittelte transkriptionelle Aktivierung verstärken (Kieff and Rickinson, 2006).

### 2.1.3.4 Der lytische Zyklus

Der lytische Zyklus wird bei infizierten B-Lymphozyten meist aus einer latenten Infektion heraus durch die Expression bestimmter Transkriptionsaktivatoren induziert (Countryman and Miller, 1985). Latent EBV-infizierte B-Zellen gehören den Immunglobulin (Ig) D<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen an (Babcock et al., 1998). Die Differenzierung von B- in Plasmazellen induziert die Virusreplikation (Crawford and Ando, 1986), weshalb vollständig differenzierte Plasmazellen nicht latent mit EBV infiziert sind (Young and Rickinson, 2004). Die Aktivierung des lytischen Zyklus, die daraus resultierende Freisetzung viraler Partikel und die anschließende Neuinfektion von B-Zellen trägt vermutlich wesentlich zur Viruspersistenz bei (Kuppers, 2003).

Wenn Antigen von den B-Zellen über Oberflächen-Ig G erkannt wird, führt dies zur Aktivierung der B-Zellen und zur Migration der Zellen in den Follikel, um ein Keimzentrum zu bilden. EBV-Proteine führen dazu, dass die B-Zellen ohne weitere Signale zu B-Blasten werden und das Keimzentrum gebildet wird (Thorley-Lawson, 2001). Die Zellen proliferieren und es kommt zum Isotypenwechsel, zu Hypermutationen und anschließend zur Bildung von Gedächtnis-B-Zellen.

Im Rahmen der lytischen Reaktivierung wird das EBV-Genom 100-1000-fach amplifiziert und in linearer Form in Nukleokapside eingebaut. EBNA1 ist dabei das einzige Latenzprotein, das auch während des lytischen Zyklus weiter exprimiert wird (Kieff and Rickinson, 2006).

Die in den Latenzphasen nicht-exprimierten Proteine des lytischen Zyklus werden aufgrund ihres zeitlichen Erscheinens in drei Kategorien unterteilt (Hones and Roizman, 1975, Hones and Roizman, 1974):

Sehr frühe (*immediate early*; IE) Antigene sind BZLF1 und BRLF1. Beide gelten als essentielle Transkriptionsaktivatoren für die lytische Infektion, d.h. die Expression dieser Gene führt zur Induktion des lytischen Zyklus (Feederle et al., 2000).

Frühe lytische Antigene (*early antigens*; EA) und ihre Genprodukte sind primär an der Replikation der viralen DNA beteiligt. Dazu gehört beispielsweise BALF5, die virale DNA-Polymerase, sowie BARF1, BMRF1, BHLF1 und BXLF1.

Die späten lytischen Gene werden nach Replikation der viralen DNA exprimiert und werden hauptsächlich für den Zusammenbau der viralen Partikel benötigt. Von den späten lytischen Genen kodieren 28 für Virionproteine. Beispiele hierfür sind BALF4, BBLF1, BCRF1, BGLF1 und BLLF1.

Bei der Freisetzung von EBV aus der Wirtszelle kommt es zur Umhüllung der viralen Partikel mit der zellulären Zytoplasmamembran, in der virale Glykoproteine eingelagert sind. Die Produktion und Freisetzung von Viruspartikeln führt dabei zur Zerstörung der Wirtszelle (Kieff and Rickinson, 2006).

## **2.2 Die Immunantwort gegen EBV**

Die Primärinfektion mit EBV löst im Allgemeinen humorale und zelluläre Immunantworten aus, wodurch die Infektion unter Kontrolle gehalten wird.

### **2.2.1 Die humorale Immunantwort gegen EBV**

Die humorale Immunantwort während der akuten Infektion zeichnet sich durch eine starke IgM- und eine sich entwickelnde IgG-Antwort gegen Nukleokapsid- und Hüllproteine aus. Dabei werden ein deutlich nachweisbarer Titer an Immunglobulin M (IgM)-Antikörper gegen das virale Kapsid-Antigen (*viral capsid antigen*; VCA) sowie steigende Titer an IgG gegen VCA und dem frühen Antigen EA (*early antigen*) detektiert. In der akuten Phase der Infektion zeigt sich bei einigen Patienten außerdem eine IgG-Antwort gegen EBNA2, wohingegen eine EBNA1-Antwort normalerweise nicht in dieser Phase detektierbar ist (Henle et al., 1987). Antikörper gegen LMP1 und 2 sind während der akuten IM nicht und nur in wenigen latent infizierten Personen nachweisbar (Meij et al., 1999, Rowe et al., 1988).

Nach Abklingen der akuten und während der Etablierung der latenten Infektion verschwindet die anti-VCA-IgM-Antwort, während der anti-VCA-IgG-Spiegel bis zu einem gewissen Grad ansteigt und dann über Monate langsam auf ein beständiges Maß absinkt. Die Titer an anti-EA IgG fallen in der Regel stärker als die Titer der anti-VCA IgG und sind in gesunden Virusträgern nicht mehr oder kaum noch zu detektieren (Rickinson and Kieff, 2006, Young and Rickinson, 2004).

Während der latenten Infektion in gesunden, EBV-seropositiven Individuen können IgG-Antikörper gegen BLLF1, EBNA1 und VCA nachgewiesen werden (Rickinson and Kieff, 2006), wobei die Titer interindividuell stark schwanken können, intraindividuell aber meist konstant bleiben. Der Beitrag dieser Antikörper zur Viruskontrolle ist abhängig vom jeweiligen Zielantigen.

Da es sich bei VCA, EA und den EBNAs um intrazelluläre Proteine handelt, spielen Antikörper gegen diese Antigene vermutlich keine entscheidende Rolle in der Infektionsabwehr (Rickinson and Kieff, 2006). Anders bei den anti-MA (*membrane antigen*)- und anti-BLLF1-Antikörpern, da diese Oberflächenmoleküle von spät lytisch infizierten Zellen angreifen und neutralisierend wirken können. Sie scheinen aufgrund

ihrer Wirkfunktion unter anderem einen erneuten Ausbruch der Infektion kontrollieren zu können (Rickinson and Kieff, 2006).

### **2.2.2 Die zelluläre Immunantwort gegen EBV**

Die zelluläre Immunantwort während der akuten Infektion ist charakterisiert durch einen starken Anstieg von NK-Zellen im peripheren Blut. Dabei korreliert die NK-Zellzahl invers mit der Viruslast (Williams et al., 2005). Ob NK-Zellen einen entscheidenden Beitrag zur Kontrolle der EBV-Infektion leisten, ist aber noch nicht endgültig geklärt.

Unumstritten dagegen ist die Bedeutung der antiviralen T-Zellantwort.

#### **2.2.2.1 EBV-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

Während der akuten Infektion kommt es zu einer massiven Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die für die IM-typische Lymphozytose verantwortlich ist (Rickinson and Kieff, 2006). Dabei steigt die Anzahl an EBV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut während der akuten Primärinfektion deutlich an (Rickinson and Kieff, 2006). Der Anteil an Virus-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen fällt in den ersten 1-2 Jahren nach IM von 20-50 % graduell auf 2-5 % ab, wobei die Zusammensetzung der späten Immunantwort stark variieren kann.

Mehrere Jahre nach der akuten Infektion sind ungefähr noch 0,1-1 % aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen EBV-spezifisch. Ähnliche Frequenzen werden auch bei Personen beobachtet, die in ihrer Kindheit eine asymptomatische Serokonversion vollzogen haben (Callan, 2004). Unter den Latenzantigenen scheinen die Proteine der EBNA3-Familie die immundominanten Zielstrukturen der CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu sein. Subdominante Epitope befinden sich in dem viralen Protein LMP2 und teils EBNA1, aber es konnte bislang kaum eine Erkennung von EBNA2, -LP oder LMP1 nachgewiesen werden (Rickinson and Kieff, 2006). Innerhalb der Gruppe der lytischen Antigene richtet sich die Immunantwort hauptsächlich gegen die IE-Antigene, BZLF1 und BRLF1, und gegen eine Untergruppe der frühen Antigene, einschließlich BMLF1, BMRF1, BALF2 und BALF5. Späte lytische Strukturantigene werden hingegen kaum erkannt (Pudney et al., 2005).

### 2.2.2.2 EBV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Lytische Antigene gelten als die wichtigsten Angriffspunkte der Virus-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort: *In vitro* LCL-stimulierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus peripherem Blut von akut oder latent infizierten Spendern sind vorwiegend gegen lytische Antigene gerichtet, kaum aber gegen latente Virusantigene. Unter den lytischen Antigenen stellen Proteine der Virushülle die immundominanten Zielstrukturen dar. Diese werden über die Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Viruspartikeln oder auch durch interzellulären Proteintransfer auf den Oberflächen der Zielzellen präsentiert (Adhikary et al., 2007). Die meisten Virusträger zeigen zudem eine Gedächtnis-T-Zellantwort gegen eines oder mehrere der folgenden latenten Zyklusantigene: EBNA1, -2 oder -3A, -B und -C, aber kaum gegen EBNA-LP, LMP1 oder LMP2A. Die gesamte Antwort von CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist etwa 10-fach geringer als die entsprechende CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort (Rickinson and Kieff, 2006).

Etwa 90–95 % der Weltbevölkerung sind mit EBV infiziert. Trotz der B-zelltransformierenden Eigenschaften des Virus erkranken aber nur wenige an EBV-bedingten Tumoren. Die Bedeutung der T-Zellen für die Viruskontrolle wird durch klinische Daten an Patienten mit eingeschränkter T-Zellfunktion offensichtlich. Nach iatrogen induzierter Immunsuppression, etwa nach Organtransplantation, steigt das Risiko an EBV-assoziiertes Lymphoproliferation zu erkranken mit dem Grad der Immunsuppression. Diese posttransplant-lymphoproliferativen Erkrankungen können durch die Gabe *in vitro* generierter, EBV-spezifischer T-Zellen geheilt werden (Thorley-Lawson, 2005, Rickinson and Kieff, 2006).

Dennoch kommt es bei einem geringen Prozentsatz scheinbar immunkompetenter Individuen zum Auftreten Virus-assoziiertes Erkrankungen. Ob hierfür bislang unentdeckte gebliebene Immundefizienzen des Wirtes oder aber exogene Faktoren eine Rolle spielen, ist bislang nicht geklärt.

## **2.3 EBV-assoziierte Erkrankungen**

### **2.3.1 Infektiöse Mononukleose**

Die IM ist bei klinisch immungesunden Personen eine selbstlimitierende Erkrankung mit unterschiedlich ausgeprägten Symptomen.

Der erste Zusammenhang zwischen EBV und IM konnte durch das Wissenschaftlerpaar Henle hergestellt werden. Sie konnten Serumantikörper gegen EBV im Blut von IM-Patienten nachweisen, die vor der Erkrankung nicht vorhanden waren (Henle et al., 1968).

Die IM hat eine ungewöhnlich lange Inkubationszeit von 5-7 Wochen und ist mit einer charakteristischen Lymphozytose assoziiert, die durch eine Hyperexpansion zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen bedingt wird (Young and Rickinson, 2004). Weitere typische Symptome für die IM sind geschwollene Lymphknoten, Fieber, Pharyngitis sowie Splenomegalie. Die Symptome werden dabei neben der T-Zellproliferation selbst durch Zytokine ausgelöst, die von den aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen sezerniert werden.

Durch die lytische Infektion von Zellen des Oropharynx weisen IM-Patienten selbst mehrere Wochen nach der akuten Erkrankung erhöhte Titer an infektiösem Virus im Rachenspülwasser auf (Fafi-Kremer et al., 2005, Balfour et al., 2005). Zusätzlich sind latent infizierte B-Zellen im Bereich der Tonsillen detektierbar (Young and Rickinson, 2004). Die Detektion von IgM-Antikörpern gegen VCA sowie gegen EA sind ein weiteres Merkmal der akuten Infektion.

Die Frequenz EBV-infizierter B-Zellen in PBMCs von IM-Patienten variiert interindividuell, liegt in den meisten Fällen aber zwischen 10-50 % aller zirkulierenden Gedächtnis-B-Zellen (oder 2-8 % aller B-Zellen). Diese infizierten Zellen sind meistens nicht-proliferativ und befinden sich in einem ruhenden Zustand (Hochberg et al., 2004). Bereits 1-2 Wochen nach akuter IM fällt die Anzahl EBV-infizierter B-Zellen sowie die detektierbare EBV-DNA-Last im Blut stark ab. Allerdings bleiben beide Werte für längere Zeit auf einem höheren Niveau als bei gesunden, EBV-seropositiven Individuen.



## 2.3.2 EBV-assoziierte lymphoproliferative Erkrankungen nach Transplantation

### 2.3.2.1 Klinische Symptome und Pathologie

Bei EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen zeigen sich ähnliche Symptome wie bei akuter Primärinfektion. Sie schließen Fieber, Schwitzen, Unwohlsein, vergrößerte Tonsillen und Lymphadenopathie mit ein. PTLDs können auch weitere Organe mit einbeziehen, wie beispielsweise das Gehirn, Knochenmark, Nieren, Leber, Dünndarm und Milz (Gottschalk et al., 2005).

Die meisten PTLDs sind poly- oder monoklonale Läsionen, treten normalerweise innerhalb des ersten Jahres nach allogener Transplantation auf und weisen meist Zellen mit dem Latenzprogramm III auf (Young et al., 1989).

Sich später entwickelnde Tumoren sind meist heterogener und nur zu 50 % EBV-assoziiert, wobei diese meist monoklonal und teils EBNA2- oder LMP1-negativ sind, was die Vermutung nahelegt, dass solche Tumoren aus EBV-transformierten LCL-ähnlichen Zellen hervorgegangen sein könnten, die aufgrund zusätzlicher zytogenetischer Veränderungen entstanden sind (Young and Rickinson, 2004).

Das Spektrum der PTLDs reicht von polytypischen, lymphoplasmazytoiden B-Zell-Expansionen bis hin zu lethalen, klonalen B-Zellproliferationen (Kutok and Wang, 2006). Diese lymphoiden Proliferationen wurden von der Weltgesundheitsorganisation in die folgenden vier Kategorien unterteilt:

- 1) reaktive, plasmazytische Hyperplasien oder IM-ähnliche lymphoide Hyperplasien
- 2) polymorphe PTLDs: Mischung aus kleinen und großen Lymphozyten und Immunoblasten
- 3) monomorphe PTLDs, die korrespondierend zu B- und T-Zell-NHL sind
- 4) HL und HL-ähnliche PTLDs (Harris et al., 2000)

Zytogenetische Abnormalitäten sind selten in PTLDs. In vereinzelten Fällen wurden Mutationen in *c-myc*, *p53*, *N-ras* und chromosomale Rearrangements nachgewiesen (Hsieh et al., 1999). Punktmutationen und Deletionen in der Promotorregion von *Bcl-6* wurden für ca. 40 % der untersuchten PTLDs (33 PTLDs von denen 30 EBV-positiv waren) beschrieben und scheinen ein Marker für eine schlechte Prognose zu sein, da diese *Bcl-6*-Mutationen nur in PTLDs gefunden wurden, die histologisch als sehr aggressiv klassifiziert wurden (Cesarman et al., 1998).

### 2.3.2.2 Inzidenz und Risiko

Eine erhöhte Inzidenz für Lymphome in immunsupprimierten Transplantationspatienten wurde erstmals 1969 wahrgenommen (Penn et al., 1969). Die Inzidenz von lymphoproliferativen Erkrankungen nach Transplantation beträgt insgesamt 1,0 +/- 0,3 % (Merlo et al., 2010b). Obwohl es in Transplantationspatienten häufig zu einer Reaktivierung von EBV (ca. 68 %) kommt, entwickeln nur eine geringe Anzahl der Patienten PTLDs (Greenfield et al., 2006), die zu über 90 % EBV-positiv sind (Paya et al., 1999).

Um PTLDs frühzeitig zu erkennen, wird bei Risikopatienten die EBV-DNA-Last im peripheren Blut mittels PCR-Analysen engmaschig überwacht (Stevens et al., 2001). Allerdings führt nicht jeder Anstieg der Viruslast unweigerlich zum Auftreten einer PTLID, und nicht jede PTLID geht mit steigenden Virustitern einher (Gottschalk et al., 2005, Wagner et al., 2004).

Die Überwachung der EBV-spezifischen T-Zellantwort gilt als weitere Möglichkeit der Risikoeinschätzung, wird bislang aber nicht routinemäßig in der klinischen Diagnostik eingesetzt. Um die Anzahl an aktiven, zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in peripherem Blut zu bestimmen, werden dabei intrazelluläre Zytokinfärbungen, ELISpot, sowie HLA-Klasse I-Peptid-Tetramer-Komplex-Messungen durchgeführt (Gottschalk et al., 2005).

Bei der Analyse der Risikofaktoren/Inzidenz muss zwischen hämatopoetischen Stammzelltransplantationen (*hematopoietic stem cell transplantation*; HSCT) und der Transplantation von soliden Organen (*solid organ transplantation*; SOT) unterschieden werden. Im Allgemeinen wird die Entstehung der PTLIDs durch eine eingeschränkte T-Zellfunktion ermöglicht.

Bei **HSCT-Patienten** wird dies durch eine hochdosierte Chemotherapie und/oder Bestrahlung bedingt, einer eventuell zusätzlichen Depletion von T-Zellen aus dem Transplantat, sowie durch die pharmakologische Immunsuppression, um eine Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (*graft-versus-host disease*; GvHD) zu verhindern. Bei Empfängern von hämatopoetischen Stammzellen korreliert die Inzidenz stark mit der T-Zelldepletion des Spenderpräparats, dem Gebrauch von Antithymozytenglobulin (ATG) zur T-Zelldepletion im Empfänger und der Transplantation von Stammzellen eines nicht-verwandten oder nicht-HLA-identischen Spenders (Landgren et al., 2009).

Die Inzidenz nach HSCT beträgt ca. 1 %, wobei die Mehrheit der Patienten innerhalb des ersten Jahres erkrankt. Die Inzidenz wird zusätzlich signifikant erhöht, wenn eine Immundefizienz vorliegt (Gottschalk et al., 2005) oder mehrere Risikofaktoren zusammentreffen (Landgren et al., 2009).

Bei **SOT-Patienten** ist das Risiko an PTLD zu erkranken stark vom transplantierten Organ, der Dauer der Immunsuppression und der Dosis des jeweiligen Immunsuppressivums abhängig.

Die Inzidenz ist auch hier im ersten Jahr nach Transplantation am höchsten. Die PTLD kann aber durch die andauernde Immunsuppression auch erst Jahre nach Transplantation auftreten. Die Inzidenz ist nach Dünndarmtransplantationen mit ungefähr 20 % am höchsten, gefolgt von Lungen-, Herz-, Leber- und Nierentransplantationen mit 1-10 %. Diese Unterschiede in der Erkrankungswahrscheinlichkeit beruhen möglicherweise auf dem Stärkegrade der Immunsuppression, der je nach Transplantat unterschiedlich ist, sowie dem Anteil an lymphoiden Gewebe, das im Transplantat vorhanden ist (Gottschalk et al., 2005).

Ein hohes Risiko ist außerdem bei EBV-negativen Patienten gegeben, die sich während der immunsuppressiven Behandlung mit EBV anstecken. Da Kinder noch oft EBV-negativ sind, erkranken sie häufiger als Erwachsene.

Bemerkenswerterweise senkt die gleichzeitige Depletion von B- und T-Zellen das Risiko an PTLD zu erkranken (Cavazzana-Calvo et al., 1998).

### 2.3.2.3 Behandlung

Auch bei der Behandlung der PTLD muss zwischen HSCT- und SOT-Patienten unterschieden werden.

Zur Behandlung von **PTLDs nach HSCT** ist eine Reduktion der Immunsuppression vielversprechend, allerdings ist dies früh nach HSCT oft wegen der hohen GvHD-Gefahr nicht möglich. Bei sich später entwickelnden Lymphomen kann eine Reduktion der Immunsuppression aber hilfreich sein (Heslop, 2009). Eine weitere Therapiemöglichkeit ergibt sich durch den Einsatz von Rituximab, einem chimären monoklonalen anti-CD20-Antikörper, der zur Prophylaxe und zur Therapie eingesetzt wird. Die Erfolgsrate variiert je nach Studie zwischen 69 und 100 %. Die Problematik hierbei ist das Auswachsen CD20-negativer Tumorvarianten (Gottschalk et al., 2005).

Zusätzlich können auch die Verabreichung von Virostatika und eine chemotherapeutische Behandlung hilfreich sein.

Eine neue Therapie-Option stellt die zelluläre Immuntherapie dar. Dabei werden den Patienten EBV-spezifische T-Zellen infundiert, die durch wiederholte *in vitro*-Stimulation mit autologen LCL generiert wurden. PTLDs nach HSCT haben ihren Ursprung normalerweise in Spender-B-Zellen. Daher werden meist EBV-spezifische T-Zellen vom Stammzellspender verabreicht. Wenn die Immunrekonstitution der HSCT-Patienten noch nicht abgeschlossen ist, finden die transferierten T-Zellen ein Umfeld vor, das ihre Expansion begünstigt.

Erste Erfolge wurden durch die Verabreichung unmanipulierter Spenderlymphozyten an HSCT-Empfänger bei etablierten PTLDs erreicht, wobei es allerdings zu Komplikationen aufgrund alloreaktiver Zellen in Form von GvHD kam (Papadopoulos et al., 1994, Heslop et al., 1994).

Um Alloreaktivität zu vermeiden, wurden Virus-spezifische T-Zelllinien verwendet. Die T-Zelllinien wurden mithilfe von LCL als Stimulatorzellen generiert, da diese, wie bereits beschrieben, den malignen Tumorzellen phänotypisch ähneln und ebenfalls das komplette Set an Latenzproteinen exprimieren. Die so generierten EBV-spezifischen T-Zelllinien sind polyklonal und beinhalten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in variierenden Verhältnissen und mit unterschiedlichen Spezifitäten (Smith et al., 1995). Die Erkennung unterschiedlicher Antigene durch die oligoklonalen T-Zelllinien vermindert die Gefahr, dass die Tumorzellen der Immunantwort aufgrund von Veränderungen im Antigenmuster entgehen (Gottschalk et al., 2005). In einer multizentrischen klinischen Studie wurden bereits über 100 Risikopatienten nach HSCT prophylaktisch oder therapeutisch mit T-Zelllinien behandelt, wobei keiner der prophylaktisch behandelten Patienten eine PTLD entwickelte und nach therapeutischem Einsatz 80 % der Patienten geheilt werden konnten (Heslop et al., 2010).

Bei **PTLDs nach SOT** wird ebenfalls möglichst zunächst die Immunsuppression reduziert, wodurch es innerhalb von 2-4 Wochen zur Rückbildung des Lymphoms kommen kann. Diese Behandlung ist bei 25-63 % der SOT-Patienten effektiv, birgt aber das Risiko einer Transplantatabstoßung (Gottschalk et al., 2005). Virostatika können verabreicht werden, um die lytische Replikation und die Freisetzung neuer EBV-Partikel zu verhindern. Außerdem kann die chirurgische Entfernung und/oder eine Bestrahlung hilfreich sein. Weitere Behandlungsmethoden sind Zytokintherapien:

Anfangs wurde Interferon alpha ( $\text{IFN}\alpha$ ) aufgrund der proinflammatorischen und antiviralen Aktivität zur Behandlung von PTLDs verwendet. Die Therapie wurde von hohen Abstoßungsraten begleitet (Gottschalk et al., 2005). Als zweites Beispiel kann Interleukin 6 (IL-6) angeführt werden. IL-6 spielt eine wichtige Rolle in der Proliferation und Maturation von B-Zellen und wurde bereits in einer multizentrischen Phase I/II klinischen Studie getestet. Darin wurden 12 SOT-Patienten, die ein PTLD entwickelten, mit anti-IL-6-Antikörper behandelt, wodurch bei fünf Patienten komplette und bei drei Patienten partielle Remissionen erreicht wurden (Haddad et al., 2001).

Außerdem besteht auch bei diesen Patienten die Möglichkeit der Therapie mit den oben genannten anti-B-Zell-Antikörpern. Als letzte Möglichkeit kann die Chemotherapie herangezogen werden (Heslop, 2009).

Bei einer Behandlung mit EBV-spezifischen T-Zellen muss beachtet werden, dass 90 % aller PTLDs nach SOT ihren Ursprung in B-Zellen des Wirts haben (Merlo et al., 2010b), was die Nutzung von Wirts-T-Zellen nötig macht. Aufgrund der Schwierigkeit, EBV-spezifische T-Zelllinien aus EBV-seronegativen Spendern *in vitro* zu generieren (Savoldo et al., 2002), stellen EBV-negative SOT-Patienten, sowie HSCT-Patienten, die Stammzellen eines EBV-negativen Spenders erhalten haben, eine besondere Risikogruppe dar (Gottschalk et al., 2005).

In dieser Situation können EBV-spezifische T-Zelllinien nicht prophylaktisch zur Verfügung gestellt werden. Aufgrund des häufig sehr aggressiven Krankheitsverlaufs bleibt aber nach Serokonversion meist nicht genug Zeit, die T-Zellen zu generieren (Gottschalk et al., 2005). Deshalb wurde eine Bank an allogenen, EBV-spezifischen T-Zelllinien von verschiedenen gesunden Spendern angelegt, die zur Behandlung von Patienten mit zumindest teilweise überlappendem HLA-Genotyp eingesetzt werden können (Wilkie et al., 2004, Sun et al., 2002a). Der therapeutische Nutzen dieser allogenen T-Zellen wurde bereits in einer klinischen Studie Phase II getestet, in der eine Ansprechrate von 52 % erreicht wurde. Besonders Patienten, die T-Zelllinien mit einem höheren Anteil an  $\text{CD4}^+$  T-Zellen erhalten hatten, sprachen gut auf diese Behandlung an (Haque et al., 2007).

Zusätzlich ist die Funktion der T-Zellen nach Transfer in die medikamentös immunsupprimierten Patienten stark eingeschränkt. Deshalb wurden kürzlich T-Zellen generiert, die eine Resistenz gegenüber gängigen Calcineurin-Inhibitoren aufweisen,

ohne den Phänotyp und die funktionellen Eigenschaften der Zellen zu verändern (Brewin et al., 2009, De Angelis et al., 2009).

### **2.3.3 Weitere EBV-assoziierte Erkrankungen**

EBV ist mit mehr als ein Dutzend lymphoider und epithelialer Gewebeerkrankungen in immunkompetenten und –supprimierten Personen assoziiert (Kutok and Wang, 2006).

Zu den Virus-assoziierten B-Zelllymphomen zählen, neben den PTLDs in immunsupprimierten Patienten, auch das Hodgkin- und das Burkitt-Lymphom, die in Patienten ohne apparente Immundefizienz auftreten.

Außerdem wurden Virus-assoziierte T- und NK-Zelllymphome sowie EBV-assoziierte epitheliale Karzinome (nasopharyngeale und gastrische Karzinome) und Leiomyosarkome beschrieben (Kutok and Wang, 2006, Young and Rickinson, 2004).

Neben onkogenen Eigenschaften scheint EBV möglicherweise auch an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie z.B. Multipler Sklerose beteiligt zu sein (Levin et al., 2010, Ascherio and Munger, 2010, Lunemann and Munz, 2007).

## 2.4 Die CD4<sup>+</sup> T-Zellfamilie

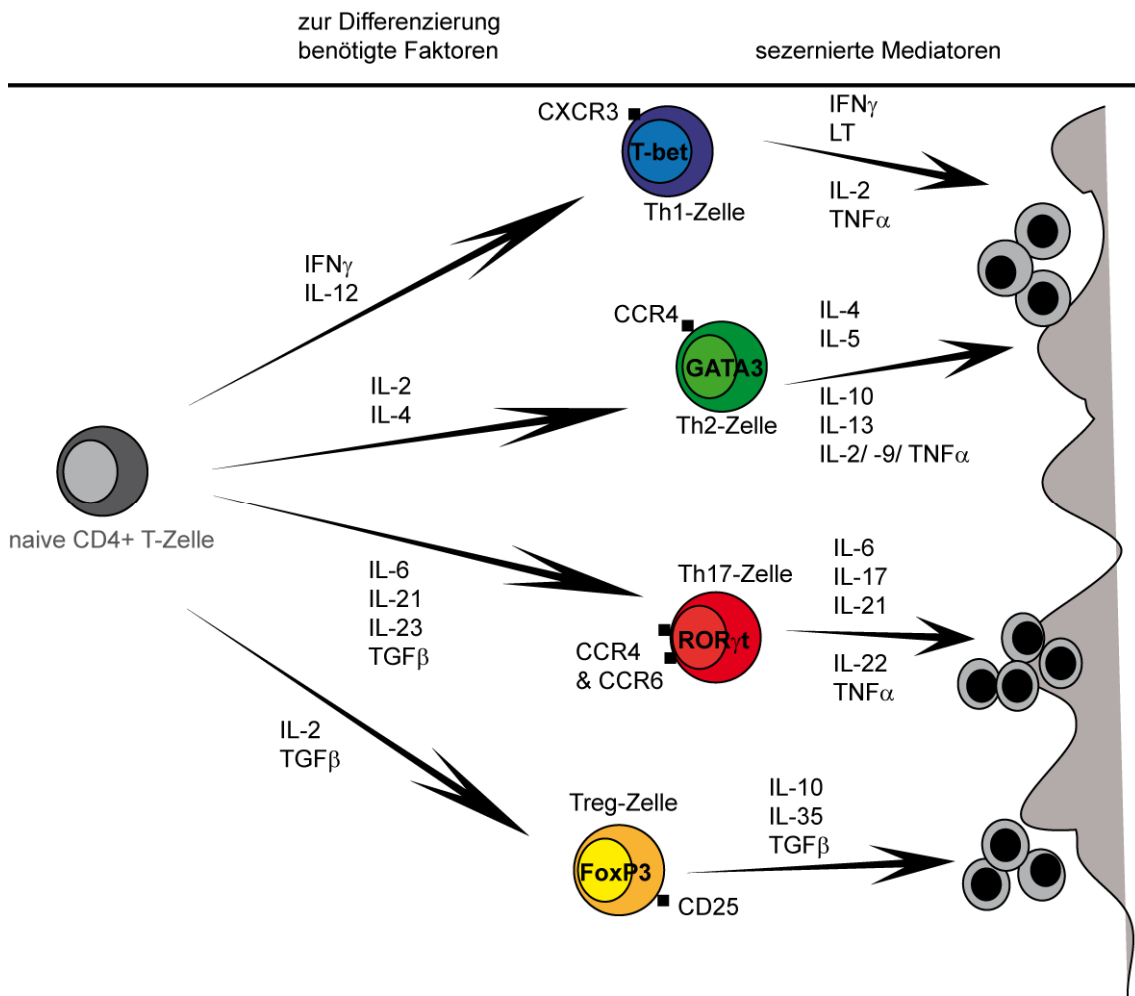
CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation adaptiver Immunantworten. Durch die Sekretion von Zytokinen und die Expression membranständiger Liganden regulieren CD4<sup>+</sup> T-Zellen zelluläre und humorale Immunantworten sowie die Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses. Darüber hinaus können CD4<sup>+</sup> T-Zellen auch direkt immunologische Effektorfunktionen ausüben, beispielsweise in der Erkennung und Zerstörung viral infizierter und transformierter Zellen (Zhu and Paul, 2010).

### 2.4.1 Verschiedene Subpopulationen im Vergleich

Bereits 1986 erfolgte eine erste Unterteilung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in T-Helfer-Zellen 1 und 2 (Th1 und Th2), beruhend auf Beobachtungen im murinen Modell (Mosmann et al., 1986).

In den letzten Jahren wuchs die Anzahl an verschiedenen Subpopulationen rapide an: Hinzu kamen Th17- und regulatorische (Treg) T-Zellen, unterteilt in natürliche und induzierte Treg sowie folliculäre T-Helferzellen (Tfh), Th3-, Th9-, Th22 und T<sub>R</sub>1-Zellen, wobei bislang lediglich die Gruppen Th1, Th2, Th17 und Treg als eigenständige Linien akzeptiert werden. Bei den anderen Subpopulationen herrscht noch Unsicherheit, ob es sich dabei um distinkte Sublinien (Zhu et al., 2010, Trifari et al., 2009) oder um Effektor-T-Zell-Plastizität (Murphy and Stockinger, 2010) handelt. Wie schon 1986 werden die Subpopulationen meist aufgrund ihrer Zytokinproduktion in unterschiedliche Gruppen unterteilt; aber auch Oberflächenmoleküle werden bei der Eingruppierung mit herangezogen.

Für die Differenzierung der T-Zellen in die unterschiedlichen Subtypen sind bestimmte Transkriptionsfaktoren verantwortlich: T-bet für Th1 (Szabo et al., 2000), GATA3 für Th2 (Zheng and Flavell, 1997), ROR $\gamma$ t für Th17 (Ivanov et al., 2006) und FoxP3 für Treg (Fontenot et al., 2003, Hori et al., 2003). Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren in naiven T-Zellen erfolgt vermutlich während der Antigenerkennung und wird zumindest zum Teil durch Zytokine vermittelt. Beispielsweise wird IL-2 und IL-4 zur Differenzierung von Th2-Zellen (Ben-Sasson et al., 1990) und IL-12 normalerweise für die Th1-Zelldifferenzierung benötigt (Hsieh et al., 1993).



**Abbildung 2.1 Naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen differenzieren in Abhängigkeit vom Zytokinmilieu in unterschiedliche Subpopulationen.**

Die Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen in verschiedene Subpopulationen wird durch das Zytokinmilieu während der Antigenerkennung gesteuert. Verschiedene Zytokine führen zur Aktivierung von spezifischen Transkriptionsfaktoren, die wiederum die Sekretion spezifischer Mediatoren und die Funktionen der T-Zellen steuern. In Anwesenheit von IFN $\gamma$  und IL-12 differenzieren naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu Th1-Zellen und sezernieren IFN $\gamma$ , LT und teilweise IL-2 sowie TNF $\alpha$ . Th2-Zellen entstehen aus naiven T-Zellen in Anwesenheit von IL-2 und IL-4, was zur Expression des typischen Rezeptors CCR4 und zur Sekretion der Zytokine IL-4, -5, -10 und -13 führt. Befinden sich naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen in einer IL-6, -21, -23 und TGF $\beta$ -haltigen Umgebung, entstehen Th17-Zellen mit CCR4 und CCR6 als charakteristische Oberflächenmarker und es kommt zur Freisetzung der Zytokine IL-17, -21 und -22. Für die Entwicklung von Treg-Zellen braucht es IL-2 und TGF $\beta$  im Milieu. Dabei kommt es zur Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 in Kombination mit dem Oberflächenmarker CD25 sowie zur Sekretion von IL-10, -35 und TGF $\beta$ .



Außerdem scheint die Stärke der T-Zellstimulation zu einem gewissen Maße die Entwicklung der T-Zellen zu steuern (Boyton and Altmann, 2002).

Das Hauptmerkmal der CD4<sup>+</sup> **Th1**-Zellpopulation ist die Produktion von Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) und Lymphotoxin (LT). Einige produzieren außerdem IL-2 und/oder TNF $\alpha$ . Die Sekretion der genannten proinflammatorischen Zytokine ist Bestandteil der Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene, einschließlich Viren (Stockinger et al., 2004). Ein charakteristisches Oberflächenmolekül dieses Subtypes, das zur Identifizierung herangezogen werden kann, ist der Chemokinrezeptor CXCR3 (Zhu et al., 2010). Die Expression verschiedener Chemokinrezeptoren erklären das unterschiedliche Migrationspotenzial einzelner T-Zellpopulationen.

Im Gegensatz dazu sezernieren **Th2**-T-Zellen kein IFN $\gamma$  oder LT (Zhu et al., 2010), sondern produzieren IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 und manchmal zudem IL-2, TNF $\alpha$  sowie IL-9. Der Oberflächenmarker CCR4 ist ein zusätzliches Kennzeichen dieser T-Zellen (Zhu et al., 2010). Th2-Zellen sind essentiell für die Entstehung einer hoch-affinen Antikörperantwort, die den Wirt vor extrazellulären Infektionen schützt (Stockinger et al., 2004).

Eine weitere, unabhängige Linie stellen die **Th17**-Zellen dar. Nach antigener Stimulation sezernieren sie IL-17, zusätzlich TNF $\alpha$ , IL-6, IL-21 und -22. Charakteristisch für diese Subpopulation ist auch die Expression von CCR4 und CCR6 (Annunziato et al., 2008). Th17-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr extrazellulärer Bakterien und Pilze. Darüber hinaus häufen sich Hinweise darauf, dass diese Zellen in der Entwicklung von Allergien, Autoimmunerkrankungen und in der Entwicklung von chronischen Erkrankungen eine Rolle spielen.

**Treg** sind CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen und werden durch die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 charakterisiert (Fontenot et al., 2003). Sie besitzen eine wichtige Funktion in der Kontrolle der Homöostase und Suppression von Immunreaktionen und werden als Mediatoren der Selbsttoleranz angesehen (Sakaguchi et al., 2010).

### 2.4.2 Die CD4<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen

Die Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Effektor- oder Gedächtnis-Zellen ist eines der Kennzeichen der T-Zell-vermittelten Immunität. Die Antigenerkennung führt zu einer starken Proliferation und Expansion der T-Zellen und zur Differenzierung in Effektorzellen. Während der Kontraktionsphase nach erfolgreicher Pathogenabwehr sterben die meisten Effektorzellen. Lediglich eine Untergruppe an Gedächtnis-T-Zellen überlebt zum Schutz vor weiteren Infektionen mit demselben Pathogen. Entscheidend für die Entwicklung der Gedächtniszellen sind die Konzentration der HLA-Peptid-Komplexe auf Antigen-präsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*; APC), die Dauer der T-Zell-APC-Interaktion, die Dauer der Antigenpersistenz und die Konzentration der kostimulatorischen Moleküle (Kalia et al., 2008).

CD4<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen sind kleine, ruhende Zellen mit aktiviertem Phänotyp, erhöhtem Expansionspotenzial und ausgeprägtem Potenzial zur Zytokinsekretion (Stockinger et al., 2004).

Arbeiten von Lanzavecchia und Kollegen zeigten, dass Gedächtnis-T-Zellen im Menschen in zwei unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden können: den zentralen Gedächtniszellen und den Effektorgedächtniszellen (Sallusto et al., 1999). Diese zwei Populationen unterscheiden sich in ihrer Gewebelokalisation und der Fähigkeit zur Zytokinproduktion. Der Effektor-ähnliche Zelltyp ist in der Peripherie zu finden, während die zentralen Gedächtniszellen vermehrt in lymphoiden Organen anzutreffen sind (Reinhardt et al., 2001).

Als typische Oberflächenmarker von zentralen Gedächtniszellen gelten CD62L und CCR7, was den Eintritt in sekundäre lymphatische Organe ermöglicht. Sie sind hochproliferativ, produzieren IL-2 und differenzieren nach Aktivierung schnell zu Effektorzellen.

Die Effektor-Gedächtnis-T-Zellen exprimieren hingegen CD62L aber nicht CCR7 und sezernieren nur wenig IL-2. Außerdem sind sie, wie bereits erwähnt, bevorzugt in nicht-lymphatischen Geweben vorzufinden. Sie sind mit Effektorfunktionen ausgestattet, zeigen aber eine schwächere Fähigkeit zur Rekonstitution (Masopust et al., 2001, Sallusto et al., 1999, Sallusto and Lanzavecchia, 2009).

### 2.4.3 Zytotoxische CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Traditionell als Helfer angesehen, zeigt sich immer stärker eine eigenständige Rolle der CD4<sup>+</sup> T-Zellen als zytotoxische Effektoren, wobei es sich dabei meist um terminal differenzierte Effektorzellen handelt.

HLA-Klasse II-restringierte CD4<sup>+</sup> Effektorzellen mit zytolytischem Potenzial wurden bereits in den 1970er Jahren beschrieben. In den darauffolgenden Jahren häuften sich Publikationen, die CD4<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellklone gegen Influenza, EBV und andere Viren beschrieben. Allerdings wurden sie lange Zeit als Artefakt der *in vitro*-Kultivierung angesehen. Sie entstehen während akuter, sowie latenter Infektion und es ist anzunehmen, dass sie in der Abwehr von Pathogenen wichtig sind, die die HLA-Klasse I-vermittelte Immunabwehr unterwandern (Brown, 2010).

Zwei dominante Tötungsmechanismen wurden bislang für diese Zellen beschrieben: Bei dem ersten handelt es sich um extrinsische Signalwege der TNF (*tumor necrosis factor*)-Superfamilie mit Zell-Zell-vermittelter Apoptoseinduktion durch die Zytokine TNF $\alpha$ , Fas-Ligand oder TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*). Bei dem zweiten handelt es sich um eine granuläre Exozytose, bei der Perforin und Granzyme von T-Zellen sezerniert werden und Apoptose in den Zielzellen induzieren.

Über welchen dieser beiden Signalwege CD4<sup>+</sup> T-Zellen vornehmlich zytotoxisch wirken, und ob beide Signalwege gleichzeitig oder einzeln in unterschiedlichen CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulationen zur Anwendung kommen, ist momentan noch ungeklärt.

Für die Kontrolle der EBV-induzierten B-Zellproliferation scheint der Fas/Fas-Ligand-vermittelte Lyseweg eine wichtige Rolle zu spielen (Brown, 2010, Nikiforow et al., 2003). Jedoch konnte in anderen Arbeiten gezeigt werden, dass humane, EBV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels Perforin, Granzym B oder auch Granulysin töten (Adhikary et al., 2006, Khanolkar et al., 2001).

### 3. FRAGESTELLUNG

Wie das gehäufte Auftreten EBV-assoziiierter Erkrankungen in Patienten mit eingeschränkter T-Zellfunktion veranschaulicht, wird die Infektion mit dem onkogenen EBV normalerweise durch T-Zellen kontrolliert. In immunsupprimierten Transplantationspatienten kommt es durch die fehlende T-Zellkontrolle deshalb vermehrt zum Auswachsen EBV-positiver Lymphome, die durch die Gabe EBV-spezifischer T-Zellen therapiert werden können. Diese T-Zelllinien werden durch wiederholte Stimulation peripherer T-Zellen mit autologen, EBV-infizierten B-Zellen generiert und enthalten  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellpopulationen in Spender-abhängiger Zusammensetzung. Im Gegensatz zur  $CD8^+$  T-Zellkomponente ist noch wenig über Spezifität und Funktion der enthaltenen  $CD4^+$  T-Zellen bekannt. Dabei wird den  $CD4^+$  T-Zellen ein wichtiger Beitrag zur Viruskontrolle durch die Korrelation zwischen dem Anteil transferierter  $CD4^+$  T-Zellen und der Ansprechrate bei Lymphom-Patienten zugeschrieben. Von einem verbesserten Verständnis der EBV-spezifischen  $CD4^+$  T-Zellantwort wird deshalb ein Beitrag zur Entwicklung wirksamer T-Zell-therapeutischer Ansätze für die Behandlung EBV-assoziiierter Tumoren erwartet.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die  $CD4^+$  T-Zellantwort gegen EBV näher zu charakterisieren. Dazu sollten (1) EBV-spezifische  $CD4^+$  T-Zellklone aus latent infizierten, gesunden Spendern phänotypisch und funktionell charakterisiert, (2) das Tumor-protective Potenzial verschiedener EBV-spezifischer T-Zellpopulationen in einem präklinischen PTLD-Modell *in vivo* analysiert, und (3) die Frequenz Virus-spezifischer  $CD4^+$  T-Zellen im peripheren Blut akut oder latent EBV-infizierter Spender *ex vivo* bestimmt werden.

## 4. MATERIALIEN

### 4.1 Chemikalien

Tabelle 4.1 Chemikalien

Chemikalien	Firma
7-AAD	BD
Calcein AM	Invitrogen
CFSE/CFDASE (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester)	Invitrogen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol absolut	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Glycerin	Merck
Hydrogenperoxid 30 %	Roth
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Methanol	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich
Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
Phytohämagglutinin (PHA)	Murex
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck
Triton X-100	Merck
Salzsäure (HCl; 32 %)	Merck
Xylol	Roth

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Qualität p.A. eingesetzt. Nicht erwähnte Standard-Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Sigma-Aldrich oder Roth verwendet. Weitere Reagenzien wurden von den Firmen Becton-Dickinson (BD), Bio-Rad, GE Healthcare, Integra, Invitrogen, MBI-Fermentas, Millipore, New England Biolabs, Neolab, Perkin Elmer, Promega, Qiagen, Roche und Stratagene bezogen. Einige zusätzliche Bezugsquellen werden auch im Methodenteil aufgeführt.

## 4.2 Geräte

**Tabelle 4.2 Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
Bestrahlungsanlage	Gammacell 40 der Firma AECL mit Cäsium-137 ( $\gamma$ -Strahler)
Brutschrank	Sanyo Mco-17-AI
Cryostat CM1900 UV	Leica
ELISA-Lesegerät	Tecan
FACS Aria	Becton Dickenson
FACS Calibur	Becton Dickenson
Falcon-Roller	Coulter Electronics Limited
Gefrierschrank -80°C	Colora bzw. Thermo
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Kühlschrank	Liebherr
Lichtmikroskop / Axioskop	Zeiss
Luminometer Orion	Berthold Detection Systems
Millipore-Anlage	Millipore
Mikrotom	Sakura
Netzgerät Power PAC 300	Bio-Rad
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld
pH-Messgerät	Knick
Pipetten	Gilson und Rainin
Pipettierhilfe	Integra Biosciences
Schüttelinkubatoren	New Brunswick Scientific
Spektrophotometer	Eppendorf
Sterilbank	BDK
Ultrazentrifuge	Beckman Coulter
UV-Stratalinker 1800	Stratagene
UV-Transluminator	UVP Inc.
Vortexer Genie 2	Scientific Industries
Wallac 1420 multilabel counter Victor <sup>2</sup>	Perkin Elmer
Zentrifugen	Beckman, Eppendorf, Hettich, Sorvall und Thermo

### 4.3 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 4.3 Verbrauchsmaterial/-flüssigkeiten**

<b>Material</b>	<b>Firma</b>
AIM-V	Invitrogen
Amicon Ultra-15 Zentrifugal-Filter-Einheiten	Millipore
<i>Buffy coats</i>	Blutspendezentrale Ulm
ELISA-Platten	Corning Incorporated
<i>Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)</i> Development System Human GM-CSF Human IFN $\gamma$ Human IL-2 Human IL-4 Human IL-10 Human IL-17 Human TNF $\alpha$	R&D Systems
ELIspot <sup>PLUS</sup> <i>Human Granzyme B</i>	Mabtech
ELIspot <i>Human Perforine</i>	Mabtech
Filter 0,45 und 0,22 $\mu$ m	Millipore
Fötales Kälberserum; FCS ( <i>fetal calf serum</i> )	PAA
Fungizone, Amphotericin 250 $\mu$ g/ml	Gibco BRL
Gentamycin	Gibco BRL
HEPES 1 M	Gibco BRL
Humanes Serum	Aus peripherem Blut freiwilliger humanerSpender
Klingen für Cryostat	Leica Microsystems
L-Glutamin, 200 mM	Gibco BRL
Lochplatten	Nunc
Gestopfte Pipettenspitzen	ART Molecular Bio Products
MACS-Separationssäulen LS	Miltenyi Biotec
Natrium-Heparin	Braun
Natriumpyruvat	Gibco BRL
Nicht-essentielle Aminosäuren (NE AA)	Gibco BRL
Proteome Profiler <sup>TM</sup> Human Cytokine Array Panel A Array Kit	R&D Systems
Parafilm „M“	American National Can
Pancoll	Pan Biotech
Polystyren-Zellkulturschalen	BD-Falcon
Reaktionsgefäße (15 und 50 mL)	BD-Falcon und Sarstedt
RPMI 1640	Gibco BRL
Trypsin-EDTA	Gibco BRL
Zellkulturflaschen	Greiner-Bio-One
Zellkulturplatten	BD-Falcon
Zellkulturschalen	Nunc
Ziegenserum	PAA

Nicht angeführte Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Falcon, Nunc, BD, Sarstedt und Greiner bezogen.

### 4.4 Allgemeine Puffer und Lösungen

**Tabelle 4.4 Allgemeine Puffer und Lösungen**

PBS	154 mM NaCl pH 7,4 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBS-T	PBS 0,05 % Tween-20
TBS	50 mM Tris pH 8 137 mM NaCl 2,7 mM KCl
TBS-T	TBS 0,05 % Tween-20

Sämtliche Chemikalien, die für die Herstellung von Puffern und Lösungen verwendet wurden, wurden von Fluka, Merck, Sigma oder Roth in Analysequalität bezogen. Puffer oder Lösungen, die nur bei einer bestimmten Methode zur Anwendung kamen, werden ausschließlich bei der entsprechenden Methode erwähnt und beschrieben.



## 4.5 Reagenzien für die Zellkultur

### 4.5.1 Zellkulturmedien

**Tabelle 4.5 Zellkulturmedien**

Einfriermedium	90 % FCS 10 % DMSO
RPMI 1640-Komplettmedium/ LCL-Medium	RPMI 1640 10 % FCS 1 % Fungizone (Amphotericin) 50 µg/ml Gentamycin 2 mM L-Glutamin 1 mM Na-Pyruvat 1 % nicht-essentielle Aminosäuren
RPMI 1640-Komplettmedium mit Humanserum	RPMI 1640-Komplettmedium 10 % humanes, gepooltes Serum (hitzeinaktiviert) anstelle von 10 % FCS
T-Zell-Medium (+/- Interleukin (IL)-2)	AIM-V 10 % humanes, gepooltes Serum (hitzeinaktiviert) 50 µg/ml Gentamycin 2 mM L-Glutamin 10 mM HEPES optional 10 U/ml IL-2
Waschmedium	RPMI 1640-Medium ohne Zusätze

### 4.5.2 Zellen

#### 4.5.2.1 Lymphoblastoide Zelllinien

LCL sind humane B-Zellen, die durch EBV-Infektion *in vitro* zu kontinuierlich wachsenden Suspensions-Zelllinien transformiert wurden. LCL Z(-) sind ebenfalls humane B-Zellen, die aber mit einer BZLF1-Virus-Deletionsmutante (B95.8 ΔBZLF1) immortalisiert wurden. BZLF1 ist essentiell zur Induktion des lytischen Zyklus. Durch die Deletion des Gens kann keine lytische Replikation in den generierten Zelllinien stattfinden und somit kein Virus freigesetzt werden.

Der HLA-Genotyp ist abhängig vom jeweiligen Spender und wurde bestimmt, um die Zelllinien zur spezifischen Stimulation von T-Zellen einsetzen zu können.

**Tabelle 4.7 HLA-Genotyp der untersuchten Spender**

Spender	HLA-A	HLA-B	HLA-Cw	HLA-DRB1	HLA-DQB1	HLA-DPB1	HLA-DPB	HLA-DPB3, 4, 5
CH	0201, 3201	2705, 5501	0202, 0303	0404, 1302	0302, 0604	0401	0401	DRB3* 0301; DRB4* 01MY
FL	0101; 0302	0801; 2705	0102; 0701	0301; 1101	0201; 0301	0101; 0201	0101, 0201	DRB3* 0101; DRB3* 0202
GB	0101	1501	0304; 0602	1101; 1301	0301; 0603	0401; 0402	0401, 0402	DRB3* 0202
JM	0201; 0301	1529; 5101	1203; 1402	0801; 1301	0402; 0603	0401; 1301	0401, 1301	DRB3* 0101; (DR52)
MF	0101; 0201	1801; 5101	0501; 1502	0801; 1201	0301; 0402	0401	0401	DRB3* 0202
SL	2403; 6802	5201; 5301	0401; 1504	1302; 1501	0602; 0604	0201; 0401	0201, 0401	DRB3* 0301; DRB5* 0101

Außerdem wurden folgende LCL Z(-) zur Stimulation von autologen PBMCs verwendet, wobei hierbei aufgrund des autologen Systems die HLA-Typisierung nicht notwendig war.

**Tabelle 4.8 LCL Z(-) zur Stimulation von PBMCs**

Zelllinie	EBV-Status
LCL Z(-) IM #12	IM-Patient
LCL Z(-) IM #21	IM-Patient
LCL Z(-) IM #25	IM-Patient
LCL Z(-) IM #26	IM-Patient
LCL Z(-) IM #27	IM-Patient
LCL Z(-) IM #28	IM-Patient
LCL Z(-) IM #29	IM-Patient
LCL Z(-) IM #30	IM-Patient
LCL Z(-) IM #32	IM-Patient
LCL Z(-) IM #33	EBV-negativ; gesund

LCL Z(-) IM #35	IM-Patient + EBV-positiv; gesund
LCL Z(-) IM #36	IM-Patient
LCL Z(-) SG	EBV-positiv; gesund
LCL Z(-) SL	EBV-positiv; gesund
LCL Z(-) KB	EBV-positiv; gesund
LCL Z(-) IE	EBV-positiv; gesund
LCL Z(-) KK	EBV-positiv; gesund
LCL Z(-) KD	EBV-negativ; gesund
LCL Z(-)CoHi	EBV-negativ; gesund
LCL Z(-) AR	IM-Patient + EBV-positiv; gesund
LCL Z(-) CaH	EBV-positiv; gesund
LCL Z(-) OW	EBV-positiv; gesund
LCL Z(-) NT	EBV-positiv; gesund
LCL Z(-) UB	EBV-positiv; gesund
LCL Z(-) SH	EBV-positiv; gesund

IM-Patient: zum Zeitpunkt der Blutentnahme, der PBMC-Isolation und der Etablierung der Zelllinien wurden klinische Symptome einer akuten IM-Erkrankung diagnostiziert. Die IM wurde bei allen Patienten durch serologische Analysen bestätigt (EBV-IgM positiv; EBV-EBNA IgG negativ).

EBV-positiv: Es handelt sich hierbei um klinisch gesunde, freiwillige Spender, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme, der PBMC-Isolation und der Etablierung der Zelllinien EBV-seropositiv und somit latent infiziert waren.

EBV-negativ: Es handelt sich hierbei um klinisch gesunde, freiwillige Spender, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme, der PBMC-Isolation und der Etablierung der Zelllinien EBV-negativ waren.

Die LCL und LCL Z(-) wurden als Suspensionskulturen in RPMI 1640-Komplettmedium gehalten, die Zellen in einer Dichte von  $3 \times 10^5$  Zellen/ml ausgebracht und alle 3 bis 4 Tage nach Bedarf in frischem Medium verdünnt.

#### 4.5.2.2 T-Zellen

Für die Untersuchungen standen verschiedene T-Zellklone mit bekannter Spezifität zur Verfügung.

**Tabelle 4.9 T-Zellklone mit bekannter Spezifität**

T-Zellklon	Antigen	Epitop	HLA-Restriktion
EBNA1 1C3	EBNA1	AA <sub>527-541</sub> - AIPQCRLTPLSRLPF-	HLA-DRB1*1301
EBNA1 3E10	EBNA1	AA <sub>481-495</sub> - IAEGLRALLARSHVE	HLA-DQB1*0402
EBNA2 5A11	EBNA2	AA <sub>138-150</sub> - MANYIVRQSRGDRGL-	HLA-DRB1*0801
EBNA3B B9	EBNA3B	AA <sub>139-153</sub> - EFIWMCMTVRHRCQA-	HLA-DRB1*1301
EBNA3C 5H11	EBNA3C	AA <sub>325-339</sub> - ENPYHARRGIKEHVI-	HLA-DRB1*0801
BLLF 1H2	BLLF1	AA <sub>130-144</sub> - VYFQDVFGTMWCHHA-	HLA-DQB1*0402
BLLF 1D6	BLLF1	AA <sub>65-79</sub> - FGQLTPHTKAVYQPR-	HLA-DRB1*1301
GB EBNA1 3G2	EBNA1	AA <sub>514-528</sub> - KTSLYNLRRGTALAI-	HLA-DRB1*1101
BALF4 B5	BALF4	AA <sub>482-496</sub> - AWCLEQKRQNMVLRE	HLA-DPB1*1301
BRLF1 3A10	BRLF1	AA <sub>139-153</sub> - AMYKLLKHSRVRAYT-	nicht bekannt
BALF4 A9	BALF4	AA <sub>576-588</sub> - NEIFLTKKMTEVC-	HLA-DRB1*0801
GB E2 3C7	EBNA2	AA <sub>23-34</sub> -LGNPSSLVIPSN-	HLA-DQB1*0301
GB EBNA3C 3H10	EBNA3C	AA <sub>627-640</sub> - VVRMFMRRERQLPQS-	HLA-DRB1*1101
GB 3B 3F7	EBNA3B	AA <sub>664-676</sub> - PTWAQIGHIPYQP-	HLA-DRB1*1101
BMRF1 D10	BMRF1	nicht bekannt	nicht bekannt
IM1 1G12	BcLF1	AA <sub>62-72</sub> -AIQYVRFLETA-	HLA-DP*0401
JM BNRF1 1H7	BNRF1	AA <sub>548-561</sub> - LGGLNLFVNDLASPV-	HLA-DRB3*0101
BARF1 #11	BARF1	nicht bekannt	nicht bekannt
BZLF1 #8	BZLF1	nicht bekannt	nicht bekannt

Außerdem wurden T-Zelllinien von den Spendern CH, FL, JM, MF und SL, wie unter 5.1.4 beschrieben, oder aber PHA-Blasten des Spenders JM, wie unter 5.1.3 beschrieben, generiert.

Die humanen T-Zellen wurden in T-Zellmedium kultiviert und alle 14 Tage restimuliert.

## 4.6 Immunologische Reagenzien

### 4.6.1 Medien, Puffer und Lösungen

**Tabelle 4.10 Medien, Puffer und Lösungen für immunologische Methoden**

ELISA-Blockpuffer	PBS 1 % BSA 5 % Sukrose 0,05 % NaN <sub>3</sub>
ELISA-Waschpuffer/ PBS-T	PBS 0,05 % Tween-20
Erythrozyten-Lyse-Puffer	500 ml H <sub>2</sub> O 4,46 g NH <sub>4</sub> Cl 0,5 g KHCO <sub>3</sub> → pH einstellen auf 7,5 + 14,5 mg EDTA
FACS-Waschpuffer	PBS, 2 % FCS, 0,05 % NaN <sub>3</sub> oder PBS, 2 % FCS
MACS-Puffer	PBS 1 % BSA 2 mM EDTA
<i>Reagent diluent (RD)</i>	PBS 1 % BSA; sterilfiltriert

## 4.6.2 Antikörper

Tabelle 4.11 Antikörper

<b>Ungekoppelte Antikörper bzw. Antikörper für ELISA, IHC und WB*</b>				
<b>Spezifität</b>	<b>Wirt</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Anwendung</b>	<b>Firma</b>
anti-BZLF1	Maus	IgG2a	FACS; IHC; WB	Argene
Biotin-anti-human IgG	Maus	IgG	ELISA	Jackson Immuno Research
Biotin anti-Maus IgG1	Ratte	IgG1	ELISA	BD Pharmingen
Biotin-anti-Ratte IgG	Ziege	IgG	ELISA	Jackson Immuno Research
Biotin anti-Ratte IgG	Ziege	IgG	IHC	Jackson Immuno Research
Biotin anti-Maus IgG	Ziege	IgG	IHC	Jackson Immuno Research
anti-CD3 (OKT-3)	Maus	IgG2a	Zellstimulation	Janssen Cilag
anti-CD20cy	Maus	IgG2a	IHC	Dako
anti-CD28	Maus	IgG1	Zellstimulation	BD
anti-CD28/CD49d	k.A.	k.A.	Kostimulation	BD
anti-CD45RO	Maus	IgG2a	IHC	Dako
anti-EBNA1	Ratte	IgG2a	IHC	Hybridomüberstand 1H4; E.Kremmer
anti-EBNA2 PE2	Maus	IgG1	IHC	Zur Verfügung gestellt von R. Feederle
anti-BLLF1	Maus	IgG	IHC	Hybridomüberstand 72A1; E.Kremmer
anti-human IgG	Maus	IgG	ELISA	Abcam
anti-LMP1	Maus	IgG1	IHC	Dako
anti-Maus IgG1	Ratte	IgG1	ELISA	BD Pharmingen
<b>Spezielle FACS-Antikörper</b>				
<b>Spezifität</b>	<b>Wirt</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Kopplung</b>	<b>Firma</b>
anti-CCR4	Maus	IgG1	PE	BD Pharmingen
anti-CCR6	Maus	IgG1	PE	BD Pharmingen
anti-CCR7	Ratte	IgG2a	PE	BD Pharmingen
anti-CD3	Maus	IgG1	APC	BD Pharmingen
anti-CD3	Maus	IgG2a	FITC	BD Pharmingen
anti-CD4	Maus	IgG1	FITC	BD Pharmingen
anti-CD4	Maus	IgG1	PE	BD Pharmingen
anti-CD4	Maus	IgG1	PerCP-Cy5.5	BD
anti-CD8	Maus	IgG1	PE	BD Pharmingen
anti-CD11a	Maus	IgG1	PE	ImmunoTools
anti-CD19	Maus	IgG1	FITC	Diatec

anti-CD20	Maus	IgG2b	PE	BD Pharmingen
anti-CD21	Maus	IgG1	PE	BD Pharmingen
anti-CD23	Maus	IgG1	PE	BD Pharmingen
anti-CD25	Maus	IgG2b	PE	ImmunoTools
anti-CD27	Maus	IgG2a	PE	ImmunoTools
anti-CD28	Maus	IgG1	PE	BD Pharmingen
anti-CD38	Maus	IgG1	PE	BD Pharmingen
anti-CD45RA	Maus	IgG2b	FITC	BD Pharmingen
anti-CD56	Maus	IgG1	PE	ImmunoTools
anti-CD57	Maus	IgM	FITC	BD Pharmingen
anti-CD62L	Maus	IgG1	PE	BD Pharmingen
anti-CXCR3	Maus	IgG1	PE	BD Pharmingen
anti-Granzym A	Maus	IgG1	FITC	BD Pharmingen
anti-Granzym B	Maus	IgG1	FITC	BD Pharmingen
anti-human IFN $\gamma$	Maus	IgG2b	FITC	BD
anti-HLA ABC	Maus	IgG2a	PE	ImmunoTools
anti-MHC I-H-2Db	Maus	IgG2a	FITC	Biozol
anti-HLA DR, DP, DQ	Maus	IgG2a	FITC	BD Pharmingen
<b>Isotyp</b>	<b>Kopplung</b>	<b>Anwendung</b>		<b>Firma</b>
Maus IgG1	PE	I-FACS*; FACS		BD Pharmingen
Maus IgG2a	PE	FACS		BD Pharmingen
Maus IgG2b	FITC	FACS		BD Pharmingen
Maus IgG2b	PE	I-FACS; FACS		BD Pharmingen
Ratte IgG2a	PE	FACS		BD
<b>FACS-Kits</b>	<b>Wirt</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Kopplung</b>	<b>Firma</b>
FastImmune anti-hu-IFN $\gamma$ /CD69/CD4/CD3	Maus	IgG2a/IgG1	FITC/PE/PerCP-Cy5.5/APC	BD
<b>Spezielle MACS-Antikörper</b>				
<b>Spezifität</b>	<b>Selektion</b>			<b>Firma</b>
anti-CD4	Positivselektion			Miltenyi Biotec
anti-CD8	Positivselektion			Miltenyi Biotec
anti-CD4	Negativselektion			Miltenyi Biotec

k.A. keine Angabe

\* ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*

IHC: Immunhistochemie

WB: Western Blot

I-FACS: Intrazelluläres FACS

Wenn nicht anders erwähnt, handelte es sich bei allen Antikörpern um Spezifitäten gegen humane Moleküle.

### 4.6.3 Materialien und Reagenzien für die Histologie

**Tabelle 4.12 Materialien und Reagenzien für Histologie/Immunhistochemie**

Reagenzien	Firma
Alkaline Phosphatase Substrate Kit III	Vector Laboratories
Avidin/Biotin Blocking-Kit	Vector Laboratories
BCIP/NBT Alkaline Phosphatase Substrate Kit IV	Vector Laboratories
DAB Substrat	Vector Laboratories
Eosin G	Roth
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Roth
PNA ISH Detection Kit	Dako
Vectastain ABC-AP Kit	Vector Laboratories
Vectastain ABC-HRP Elite Kit	Vector Laboratories

### 4.6.4 Inhibitoren

**Tabelle 4.13 Inhibitoren**

Inhibitoren	Wirkung	Firma
Aciclovir (Acycloguanosin; ACV)	Hemmung der viralen DNA-Synthese	Sigma-Aldrich
Brefeldin A (BFA)	Blockade des Proteintransports vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat	BD
Cyclosporin A (Csa)	Inhibition der Aktivierung und Proliferation von T-Zellen durch die Bindung an Calcineurin	Sigma-Aldrich
BD GolgiStop (Monensin)	Blockade des intrazellulären Proteintransports	BD
<i>Staphylococcus aureus</i> Toxin B (SEB)	Superantigen	Sigma-Aldrich



#### 4.6.5 Zytokine

Tabelle 4.14 Zytokine

Zytokin	Konzentration	Firma
Humanes IL-2 (Proleukin)	1.000.000 U/ml in PBS mit 2 % BSA (sterilfiltriert)	Chiron-Novartis
Humanes IL-4	1.000.000 U/ml in PBS mit 2 % BSA (sterilfiltriert)	ImmunoTools
Humanes TNF $\alpha$	10 $\mu$ g/ml bzw. 160 U/ $\mu$ l in RPMI 1640-Medium mit 0,5 % BSA	R&D System

#### 4.7 Mausstamm und Tierhaltung

Der in den *in vivo*-Versuchen genutzte Mausstamm C.B-17 SCID (*severe combined immunodeficiency*) wurde von Taconic Farms Inc. bezogen und in der Tierhaltung des Hauses unter sterilen Bedingungen gezüchtet und gehalten.

Der Mausstamm besitzt eine 1983 von Bosma und Kollegen entdeckte Spontanmutation in *Prkdc*, die zu einer defekten VDJ-Rekombination bei der B- und T-Zellentwicklung führt. Natürliche Killer-Zellen hingegen sind in ihrer Funktion nicht beeinträchtigt (Bosma et al., 1983, Dorshkind et al., 1985). Aufgrund dieser Mutation können die Tiere lediglich minimale Zahlen von B- und T-Zellen bilden. Sogenannte „leaky“ Tiere besitzen maximal bis zu 15 % der normalen B- und T-Zellzahlen. Durch diese Einschränkung im Immunsystem können transplantierte, humane Zellen nicht abgestoßen werden (Mosier et al., 1988).

Die Haltung der Tiere erfolgte in einem abgeschlossenen, sterilen Raum oder in speziellen IVC (*individual ventilated cages*)-Käfigen. Die Mäuse bekamen autoklaviertes Futter und Wasser. Es wurden, abhängig von der Versuchsdauer, Mäuse im Alter von 8-14 Wochen eingesetzt. Die tägliche Kontrolle der Tiere wurde von speziell ausgebildeten Tierpflegern unter streng hygienischen Bedingungen durchgeführt. Bei Krankheitssymptomen (struppiges Haar, Gewichtsverlust, Nahrungsverweigerung oder Bewegungsunlust) oder bei tastbarem Tumor wurden die Tiere abgetötet und untersucht.

Überlebten Tiere nach Versuchsbeginn mehr als 100 Tage, wurden sie abgetötet und als tumorfrei gewertet.

#### **4.8 Software**

Adobe Illustrator CS3

Adobe Photoshop CS3

AxioVision

CELLQuest Becton Dickinson

Endnote X3

GraphPad Prism 5

Microsoft Excel

Microsoft Word

## 5. METHODEN

### 5.1 Zellbiologische Methoden

#### 5.1.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Alle eukaryotischen Zellen wurden in einem Zellkulturinkubationsschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Zellkulturmedien wurden bei 4°C gelagert und nicht länger als drei Monate genutzt. Bei Zusatz von Serum wurden sie innerhalb von zwei Wochen verbraucht. Serum wurde bei -20°C, andere Zusätze entsprechend den Herstellerangaben gelagert. Arbeiten an den Zellen wurden unter einer Sterilbank unter streng hygienischen Vorschriften ausgeführt.

##### 5.1.1.1 Kultivierung von etablierten Zelllinien

Wenn nicht anders erwähnt, wurden Suspensions-Zelllinien in RPMI 1640-Komplettmedium in Zellkulturflaschen kultiviert und je nach Bedarf alle 3 bis 4 Tage in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:10 (Zellsuspension zu frischem Medium) geteilt.

Zur Generierung verschiedener T-Zelllinien wurden außerdem LCL in RPMI 1640-Komplettmedium mit Humanserum kultiviert.

Zur Inhibition der Virusfreisetzung wurden LCL in RPMI 1640-Komplettmedium mit 200 µM Aciclovir für mind. 14 Tage vor der ersten Stimulation der T-Zellen und im gesamten Verlauf behandelt.

##### 5.1.1.2 Kultivierung von etablierten T-Zellen

Die verwendeten T-Zellklone wurden in 24-Lochplatten in T-Zell-Medium mit 10 U/ml IL-2 und teilweise 10 µg/ml Ciprofloxacin kultiviert. Alle 14 Tage wurden die T-Zellen mit humanen *feeder*-Zellen, bestehend aus bestrahlten (40 Gray) mononukleären Zellen aus peripherem Blut (*peripheral blood mononuclear cells*; PBMCs), (gewonnen aus *Buffy coats* von mindestens drei verschiedenen Spendern) sowie bestrahlten (80 Gray)

autologen LCL als APC in T-Zellstimulationsmedium [IL-2 (10 U/ml) und PHA (250 ng/ml)] restimuliert. Die APC wurden 24-48 h zuvor mit dem für die jeweiligen T-Zellen spezifischen Protein (500 ng/ml) oder Viruskonzentrat, bzw. 2 h vor Restimulation mit spezifischem Peptid (2 µg/ml) beladen, um die Präsentation des gewünschten Antigens zu verstärken. Die beladenen APC wurden vor Einsatz zur T-Zellstimulation mindestens dreimal gewaschen, um Verschleppung von Protein bzw. Peptid zu vermeiden. Nach 3-4 Tagen wurde das Medium größtenteils entfernt und durch frisches T-Zellmedium mit 10 U/ml IL-2 ersetzt.

**T-Zellstimulationsmedium:** T-Zellmedium; 10 U/ml IL-2; 250 ng/ml PHA; +/- 10 µg/ml Ciprofloxacin

### 5.1.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Aus einer homogenen Zellsuspension wurden 10 µl entnommen, 1:1 mit Trypanblau (Invitrogen) vermischt, und 10 µl davon in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Da Trypanblau tote Zellen anfärbt, können diese von lebenden Zellen unterschieden werden. Die Neubauer-Zählkammer besitzt 4 Bereiche mit je 16 Quadranten. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden alle Bereiche ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Die Gesamtzellzahl wurde dann wie folgt errechnet: Zellzahl pro Bereich x 2 (Trypanblau-Verdünnung) x 10<sup>4</sup> (Eichung der Zählkammer) x Volumen (ml) der gesamten Zellsuspension. Vor dem Zählen durchgeführte, weitere Verdünnungen wurden ebenfalls einberechnet. Die Zellen wurden dann über Zentrifugation und Aufnahme in entsprechenden Mengen Medium auf die gewünschte Zellzahl eingestellt.

### 5.1.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst geerntet, und durch Zellzählung die Anzahl der Zellen bestimmt. Eine definierte Menge an Zellen wurde dann zentrifugiert und das erhaltene Pellet in 1,8 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Suspension wurde nachfolgend in 1,8 ml Kryoröhrchen überführt, verschlossen, mehrfach mit Zellstoff

umwickelt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Nach 2–3 Tagen wurden die Röhren in flüssigen Stickstoff zur dauerhaften Lagerung transferiert.

Eingefrorene Zellen wurden zügig aufgetaut und dann sofort in RPMI 1640-Medium ohne Zusätze überführt, um die Zellen von DMSO zu befreien. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in 10 ml neuem Medium aufgenommen und in Zellkulturschalen oder -flaschen ausgebracht. T-Zellen wurden direkt nach dem Auftauen restimuliert.

**Einfriermedium:** 90 % FCS; 10 % DMSO

### **5.1.2 Isolation von peripheren mononuklearen Zellen aus Vollblut durch *Ficoll*-Dichtegradienten**

Zunächst wurde von Spendern venöses Blut entnommen und die Koagulation durch EDTA- (Endkonzentration 1,5 mM) oder Natrium-Heparinzugabe verhindert. Die Spender waren entweder gesunde, freiwillige EBV-positive oder –negative Spender, oder aber Patienten mit IM der Kinderklinik der Technischen Universität München. Alternativ zu frischem peripherem Blut wurden *buffy coats* als Ausgangsmaterial verwendet. Untersuchungen an humanem Material wurden nach Richtlinien der Ethikkommission der Technischen Universität München durchgeführt. Zur Isolation der PBMCs wurde das Blut in einem Verhältnis von 1:1 mit RPMI 1640-Medium verdünnt und je 35 ml davon in einem 50 ml-Reaktionsgefäß mit 13 bis 15 ml einer *Ficoll*-Lösung (Pancoll; Pan) unterschichtet. Nach einer Zentrifugation mit  $750 \times g$  für 30 Minuten, ohne Verwendung der Zentrifugenbremse zum Abstoppen der Zentrifugation, sammelten sich die PBMCs oberhalb der *Ficoll*-Lösung in einem Ring und konnten von den Erythrozyten und weiteren Blutbestandteilen durch Absaugen getrennt werden. Die PBMCs wurden nachfolgend zweimal mit RPMI 1640-Medium gewaschen (Zentrifugation mit  $500 \times g$  für zunächst 10 und dann 5 Minuten), in RPMI 1640-Medium aufgenommen, gezählt und nach Bedarf weiterverarbeitet. Bei der Aufarbeitung der *buffy coats* wurden die PBMCs von mindestens drei verschiedenen Spendern gemischt und vor der weiteren Verwendung mit 40 Gray bestrahlt, danach mit RPMI 1640-Medium gewaschen und in frischem Medium resuspendiert.

### **5.1.3 Generierung von PHA-Blasten aus peripherem Blut**

Aus peripherem Blut isolierte PBMCs wurden in einer Dichte von ca.  $1 \times 10^6$  pro Loch einer 24-Lochplatte (in T-Zellmedium + 25 ng/ml PHA) ausgebracht und alle zwei Wochen mit T-Zellmedium inklusive 25 ng/ml PHA stimuliert. Drei Tage nach (Re-) Stimulation wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden nach Bedarf mit IL-2-haltigem T-Zellmedium geteilt.

### **5.1.4 Generierung von T-Zelllinien und Klonen aus humanem Blut**

#### **5.1.4.1 T-Zelllinien**

##### **5.1.4.1.1 T-Zelllinien allgemein**

EBV-spezifische T-Zelllinien wurden aus PBMCs von gesunden, EBV-positiven Spendern generiert. LCL der Spender wurden als Stimulator- bzw. Antigen-präsentierende Zellen verwendet. Die Linien wurden etabliert (Passage 1) indem  $1 \times 10^6$  mit 80 Gray bestrahlte LCL und  $1 \times 10^6$  isolierte PBMCs des Spenders in 24-Lochplatten in T-Zellmedium ohne IL-2-Zusatz ausgebracht wurden. In den ersten 14 Tagen wurde kein IL-2 zugesetzt, um das Auswachsen unspezifischer T-Zellen zu verhindern. Nach 14 Tagen wurden  $1 \times 10^6$  der auswachsenden T-Zellen 1:1 mit bestrahlten LCL restimuliert (Passage 2) und nach 24-48 h 10 U/ml IL-2 zugesetzt. Je nach Proliferation der Zellen wurden sie in einer Restimulationsphase ein- bis dreimal im Verhältnis 1:1 gesplittet. Die Zellen wurden 14-tägig restimuliert. Ab der 3. Stimulation (Passage 3) wurde die Spezifität der Linien mittels ELISA getestet. Die oben beschriebene Stimulation erfolgte, wenn nicht anders erwähnt, mit LCL, die in Medium mit humanem Serum kultiviert worden waren.

##### **5.1.4.1.2 Depletierte T-Zelllinien**

Um  $CD4^+$ - oder  $CD8^+$ -depletierte T-Zelllinien zu erhalten, wurden die Zellen mittels MACS sortiert und die jeweilige Zellpopulation anschließend sofort restimuliert.

#### **5.1.4.1.3 T-Zelllinien mit unterschiedlichen Stimulatorzellen**

Um den Einfluss verschiedener Kultivierungsstrategien von LCL auf die Spezifität der generierten Linien zu testen, wurden die T-Zellen mit unterschiedlich kultivierten LCL stimuliert. Alternativ zur Standardstimulation wurden T-Zelllinien generiert, die mit LCL in FCS-haltigem Medium oder in Medium mit FCS und zusätzlich Aciclovir als Inhibitor der Virusproduktion stimuliert wurden. Um die Virusfreisetzung bei den letztgenannten LCL zu verhindern, mussten diese für mindestens zwei Wochen alle 2-3 Tage mit 200  $\mu$ M Aciclovir behandelt werden.

#### **5.1.4.2 Generierung unspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellklone**

Zur Generierung unspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellklone wurden zuerst PBMCs aus peripherem Blut mittels *Ficoll* isoliert und die Zellen mit dem Phycoerythrin (PE)-markierten Antikörper anti-human CD4 für 15 min bei 4°C angefärbt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, die Antikörper-markierten CD4<sup>+</sup>-Zellen an dem Zellsortiergerät FACS Aria aus der Gesamtpopulation isoliert und je eine Zelle in ein Loch einer 96-Lochplatte ausgebracht. Die sortierten Zellen wurden daraufhin stimuliert und expandiert.

#### **5.1.5 Herstellung von humanem Serum**

Bei der Herstellung von T-Zellmedium wurde anstelle von FCS humanes, gepooltes Serum verwendet. Von gesunden, freiwilligen Spendern (EBV-positiv und -negativ) wurde peripheres Blut entnommen, in ein 50 ml-Reaktionsgefäß gefüllt, indem es für mindestens 4 h gerann. Anschließend wurde das koagulierte Blut für 20 min bei 1000 x g zentrifugiert, das Serum von den Zellbestandteilen getrennt und in ein frisches Gefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation wurde wiederum das Serum in ein frisches Gefäß überführt und für 30 min bei 56°C im Wasserbad hitzeinaktiviert.

### **5.1.6 Herstellung von Viruskonzentrat**

Zur Herstellung von Viruskonzentrat wurden Zellen der Krallenaffen (*marmoset*)-Linie B95.8 in hoher Zelldichte kultiviert. B95.8-Zellen wurden durch die Infektion von Krallenaffen-PBMCs mit EBV etabliert (Miller et al., 1972).

#### **5.1.6.1 FCS-freies hochkonzentriertes Viruskonzentrat**

Die Herstellung von Viruskonzentrat erfolgte durch die Konzentrierung von B95.8-Zellüberstand. B95.8-Zellen wurden in hoher Dichte kultiviert und das verbrauchte Medium, welches Viruspartikel beinhaltete, gesammelt und bei 4°C gelagert. Vor der Konzentrierung wurden restliche Zellen im Überstand bei 500 x g für 10 min pelletiert und zur kompletten Reinigung von Zellbestandteilen der Überstand mit einem 0,45 µm-Filter sterilfiltriert. Die Virusbestandteile im Überstand wurden anschließend in einer Beckmann-Zentrifuge bei 100.000 x g für 2 h bei 4°C pelletiert und anschließend in sterilem PBS resuspendiert. Gelagert wurde das Viruskonzentrat bei -20°C.

#### **5.1.6.2 Zehnfach-Viruskonzentrat**

Zur Herstellung von Zehnfach-Viruskonzentrat wurden B95.8-Zellen analog zu 5.1.6.1 in hoher Dichte kultiviert, der Überstand gesammelt und in einer Amicon Ultra-15 Zentrifugal-Filter-Einheit für 15-20 min bei 1000 x g auf ein Zehntel des Ausgangsvolumen eingengt. Gelagert wurde das Viruskonzentrat bei -80°C.



## 5.2 Immunologische Methoden

### 5.2.1 CFSE-Markierung von Zellen

Durch das Färben von Zellen mit CFSE konnte einerseits das Proliferationsverhalten der Zellen untersucht werden, andererseits das CFSE-Markieren der Zellen genutzt werden, um das Verhalten der Zellen *in vivo* zu beobachten.

Die CFSE-Färbung erfolgte nach Herstellerangaben (Invitrogen). Zuerst wurde eine 5 mM Stammlösung durch die Zugabe von 18 µl DMSO zu einem Aliquot CFSE hergestellt. Die zu färbenden T-Zellen wurden gesammelt, gewaschen und gezählt.  $1 \times 10^6$  Zellen/ml wurden in 37°C warmen PBS/0,1 % BSA (sterilfiltriert mit 0,22 µm Filter) aufgenommen und 2,5 µM CFSE zugesetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von eiskaltem LCL-Medium abgestoppt. Zum Abschluss der Reaktion wurden die Zellen für 5 min auf Eis gestellt. Danach wurden sie dreimal gewaschen und anschließend stimuliert. Die erfolgreiche Färbung wurde im FACSCalibur überprüft.

**PBS/0,1 % BSA:** PBS; 0,1 % BSA; steril filtriert mit 0,22 µm Filter

### 5.2.2 Durchflusszytometrie

#### 5.2.2.1 Nachweis von Oberflächenmarkern und CFSE-markierten Zellen

Zum Nachweis von Oberflächenproteinen und CFSE-markierten Zellen wurden die Zellen durchflusszytometrisch mit einem FACS (*fluorescence activated cell sorting*) - Gerät (FACSCalibur; BD) analysiert. CFSE-positive Zellen konnten direkt ohne Färbung analysiert werden. Außerdem wurden sowohl Färbungen mit direkt markierten Primärantikörpern, als auch mit ungekoppelten Primär- und Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern durchgeführt. Die Färbungen wurden normalerweise in einer 96-Loch-Rundbodenplatte durchgeführt. Zuerst wurden für jede Färbung  $5 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$  Zellen in FACS-Puffer gewaschen und in 100 µl verdünnter Antikörper-Lösung (1:50 in FACS-Puffer) 15-30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und im Falle eines Fluorochrom-markierten Primärantikörpers direkt für die FACS-Messung vorbereitet. Wurde ein unmarkierter

Primär- und ein sekundärer Fluorochrom-markierter Antikörper zur Färbung eingesetzt, wurde das Verfahren mit einer 1:1000 Verdünnung des Sekundärantikörpers wiederholt. Nach dem Auswaschen des Antikörpers wurde Propidiumiodid (PI) in einer Konzentration von 2 µg/ml zu den gefärbten Zellen gegeben, um tote Zellen detektieren und aus der Messung ausschließen zu können. Tote Zellen nehmen aufgrund ihrer defekten Zellmembran PI auf. Danach wurden die Zellen zur Messung in FACS-Röhrchen überführt. Die Auswertung der FACS Messung erfolgte mit der Software CellQuest.

**FACS-Puffer:** PBS, 2 % FCS, 0,05 % NaN<sub>3</sub> oder PBS, 2 % FCS

### 5.2.2.2 Nachweis von intrazellulären Proteinen

#### 5.2.2.2.1 Nachweis von Granzym A und B

Zur Messung von Granzym A und B mussten die T-Zellen zuvor stimuliert werden. Dazu wurde anti-CD3-Antikörper (OKT-3; 0,3 µg/Loch) über Nacht (üN) in 100 µl PBS/Loch einer 96-Loch-Flachbodenplatte gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde für eine Stunde Blockierungspuffer zugesetzt und anschließend dreimal mit RPMI 1640-Medium gewaschen. Die T-Zellen wurden gewaschen und  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in T-Zellmedium inklusive 10 U/ml IL-2 und 1 µg/ml anti-CD28-Antikörper aufgenommen und 200 µl pro Loch ausgebracht. Die Stimulation der Zellen erfolgte für 24-48 h bei 37°C. Nach Inkubation wurden die Zellen mit PBS + 1 mM EDTA gewaschen und die toten Zellen mit 7-AAD (1:50 in FACS-Puffer) für 20 min auf Eis gefärbt. Danach wurde überschüssiger Farbstoff durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Vor der intrazellulären Färbung wurden die T-Zellen mit 1 % PFA in PBS für 20 min auf Eis fixiert, anschließend mit PBS gewaschen und mit 0,03 % Saponin permeabilisiert. Die Färbung erfolgte mit den Antikörpern anti-Granzym A-FITC, anti-Granzym B-FITC oder Isotyp. Die Antikörper wurden 1:20 in 0,1 % Saponin mit den Zellen gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde überschüssiger Antikörper durch zweimaliges Waschen mit 0,03 % Saponin entfernt. Zum Abschluss

der Färbung wurden die Zellen in 1 % PFA aufgenommen und im FACSCalibur analysiert.

**Blockierungspuffer:** PBS; 1 % BSA; 5 % Sukrose; 0,05 %  $\text{NaN}_3$ ; steril filtriert

**0,03 % bzw. 0,1 % Saponin:** PBS; 0,03 % bzw. 0,1 % Saponin

**1 % PFA:** PBS; 1 % Paraformaldehyd

#### 5.2.2.2.2 Bestimmung von $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{IFN}\gamma$ -produzierenden Zellen in PBMCs

Die Analyse der  $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{IFN}\gamma$ -produzierenden Zellen in PBMCs wurde mithilfe des Kits „CD4 intracellular  $\text{IFN}\gamma$  detection kit, 4-color“ von BD nach Herstellerangaben durchgeführt. PBMCs aus Blut von akut IM-kranken bzw. klinisch gesunden Spendern wurden mittels *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation isoliert und kryokonserviert. Bei Bedarf wurden die Zellen zügig aufgetaut, gezählt, einmal mit RPMI 1640-Medium gewaschen,  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in AIM-V-Medium ohne Zusätze aufgenommen und in einer 48-Lochplatte  $\mu\text{N}$  bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Zusätzlich wurden LCL Z(-)-Zellen des Spenders ebenfalls gezählt, einmal gewaschen und  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in LCL-Medium in derselben 48-Lochplatte kultiviert. Um die Reaktivität der PBMCs gegen Virusstrukturantigene zu testen, wurden  $1 \times 10^6$  Zielzellen mit  $20 \mu\text{l}$  hochkonzentriertem Virusüberstand beladen. Nach ca. 16 h wurden alle Zellen gesammelt und mehrmals mit RPMI 1640-Medium gewaschen.

Zur Bestimmung der  $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{IFN}\gamma$ -produzierenden Zellen wurden folgende Ansätze untersucht:

- a)  $1 \times 10^6$  PBMCs wurden in  $500 \mu\text{l}$  RPMI 1640-Medium aufgenommen und  $5 \mu\text{l}$  CD28/CD49d-Antikörpermix zugesetzt.
- b) als Positivkontrolle wurde zusätzlich zu a)  $1 \mu\text{g/ml}$  SEB zugesetzt.
- c) zur Stimulation der PBMCs wurden zusätzlich zu a) LCL Z(-)-Zellen zugesetzt.
- d) zur Stimulation der PBMCs wurden zusätzlich zu a) LCL Z(-)-Zellen, die mit Virus inkubiert worden waren, zugesetzt.

Nach zweistündiger Inkubation der Zellen bei  $37^\circ\text{C}$  wurde als Golgi-Stop  $25\text{-}30 \mu\text{M}$  Brefeldin A zugesetzt und die Zellen für weitere 4 h inkubiert. Nach abgeschlossener

Stimulation wurden den Zellen 50 µl einer EDTA-Lösung (BD) für 15 min zugesetzt und für 10 Sekunden kräftig gemischt, um adhärente Zellen von dem Inkubationsgefäß zu lösen. Anschließend wurden 5 ml einer *lysis solution* zugesetzt, gemischt und für 10 min inkubiert. Diese Lösung führte einerseits zur Lyse der noch enthaltenen Erythrozyten, andererseits aber auch zur schonenden Fixierung der Zellen. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen direkt in der Lyselösung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zur weiteren Verarbeitung wurden die Zellen zügig aufgetaut und sofort mit 7 ml Waschpuffer für 10 min bei 500 x g gewaschen. Der Überstand wurde verworfen, die PBMCs in 200 µl Waschpuffer aufgenommen und in je zwei neue Reaktionsgefäße aufgeteilt, da bei jeder Messung eine Isotypkontrolle mitgeführt wurde. Vor der Färbung mit Antikörpern mussten die Zellen durch die Zugabe von 500 µl *permeabilisation solution 2* für 10 min erneut fixiert und gleichzeitig permeabilisiert werden. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Zellen mit 2 ml Waschpuffer gewaschen, der Überstand verworfen und direkt auf die Zellen 20 µl Antikörpermix (Ansatz 1: anti-CD3-APC; -CD4-PerCP-Cy5.5; -CD69-PE; -IFN $\gamma$ -FITC; Ansatz 2: CD3-APC; CD4-PerCP-Cy5.5; IgG1-PE; IgG2a-FITC) gegeben. Die Färbung wurde nach 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (RT) durch Zugabe von 5 ml Waschpuffer abgebrochen, die Zellen zentrifugiert und nach dem Waschen in 200 µl 1 % PFA aufgenommen. Bis zur Analyse im FACSCalibur wurden die Zellen bei  $4^{\circ}\text{C}$  im Dunkeln gelagert. Es wurden, soweit möglich, bei jeder Analyse 50.000 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen gemessen. Falls diese Zellzahl nicht erreicht wurde, wurde die gesamte Probe analysiert.

**Waschpuffer:** PBS; 0,5 % BSA; 0,1 % NaN<sub>3</sub>

**1 % PFA:** PBS; 1 % Paraformaldehyd

### 5.2.3 Enzyme-linked immunosorbent assay

#### 5.2.3.1 Analyse der Zytokinausschüttung von T-Zellen mittels ELISA

Für die Bestimmung der Spezifität verschiedener T-Zellen, aber auch zur Charakterisierung verschiedener Zellen, wurden folgende Zytokine mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) untersucht: GM-CSF, IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-17 und TNF $\alpha$ . Alle Zytokine wurden qualitativ und quantitativ mithilfe von R&D System-Kits nach Herstellerangaben bestimmt.

Um eine Antigen-spezifische Zytokinausschüttung der T-Zellen zu erreichen, wurden diese mit APC  $\bar{u}$ N kokultiviert. Die APC wurden zuvor mit spezifischem Peptid (2  $\mu$ M) für zwei Stunden, rekombinantem Protein (500 ng/ml) oder Virus für 24 h in einer 96-Lochplatte in 200  $\mu$ l Volumen beladen und vor Zugabe der T-Zellen dreimal mit Waschmedium gewaschen, um bereits vorhandene Zytokine und überschüssiges Antigen in Form von Peptid oder Protein zu entfernen. Die zu analysierenden T-Zellen wurden im Verhältnis 1:1 zugesetzt und die Zytokinsekretion nach 16-24 h im Überstand mittels ELISA ermittelt.

Dazu wurden 96-Loch-ELISA-Platten (Corning) mit je 100  $\mu$ l/Loch des entsprechenden *capture*-Antikörper (1:180 in PBS) beschichtet und  $\bar{u}$ N bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer mit je 300  $\mu$ l/Loch Blockpuffer für mindestens eine Stunde bei RT geblockt. Nach erneutem dreimaligem Waschen folgte eine zweistündige Inkubation mit je 100  $\mu$ l Kulturüberstand bzw. 100  $\mu$ l einer titrierten Standardreihe. Anschließend wurde der Zellüberstand bzw. der mitgeführte Standard durch mehrmaliges Waschen entfernt und je 100  $\mu$ l/Loch *detection*-Antikörper (1:180 in *reagent diluent*) zugegeben. Nach einer erneuten zweistündigen Inkubation wurden die Platten wiederum dreimal gewaschen und anschließend mit je 100  $\mu$ l/Loch des Streptavidin-HRP-Antikörpers (1:200 in *reagent diluent*) für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen, mit 100  $\mu$ l/Loch Färbelösung versetzt und die Färbereaktion nach 5-10 min, je nach Blaufärbung, mit je 50  $\mu$ l Stopplösung abgestoppt. Die Färbung wurde umgehend bei 450 nm im ELISA-Lesegerät (Tecan) gemessen.

**ELISA-Blockpuffer:** PBS; 1 % BSA; 5 % Sukrose; 0,05 % NaN<sub>3</sub>

**ELISA-Waschpuffer:** PBS; 0,05 % Tween-20

**Reagent diluent:** PBS; 1 % BSA; sterilfiltriert

**Färbelösung:** BD OptEIA Substrat Reagenz A und B (1:1 gemischt)

**Stopplösung:** 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### 5.2.3.2 Modifizierter ELISA zum Nachweis von Granzym B

Für den Nachweis von Granzym B wurden die Reagenzien des ELISpot-Kits „ELISpot<sup>PLUS</sup> for Human Granzyme B“ von MabTech verwendet. Die Durchführung erfolgte wie unter 5.2.3.1 beschrieben. Als *capture*-Antikörper wurde GB10 [1 mg/ml] aus dem ELISpot-Kit (MabTech) in der Endkonzentration 4 µg/ml verdünnt in PBS eingesetzt. Der Detektionsantikörper, GB11 [1 mg/ml], wurde in der Endkonzentration 150 ng/ml verdünnt in *reagent diluent* verwendet.

### 5.2.3.3 Analyse von humanem und murinem Immunglobulin G mittels ELISA

Immunglobuline (Ig) wurden, wenn nicht anders beschrieben, in murinem Serum nachgewiesen. Dazu wurde Herzblut der Maus entnommen und für mehrere Stunden in einem 1,5 ml-Gefäß koaguliert. Nach Zentrifugation (1000 x g; 20 min) wurde das Serum abgenommen und bis zur Verarbeitung bei -20°C gelagert. Für den Nachweis von IgG wurden zunächst entsprechende Löcher einer 96-Loch-ELISA-Platte (Corning) mit einer der folgenden 100 µl *capture*-Antikörper-Verdünnungen *in* beschichtet:

1. Für den Nachweis von humanem IgG: Maus anti-Human IgG (Abcam); 2,5 µg/ml
2. Für den Nachweis von murinem IgG: Ratte anti-Maus IgG1 (BD); 1:100

Nach dreimaligem Waschen mit ELISA-Waschpuffer wurden unspezifische Bindungen in den Löchern durch zweistündiges Blocken mit 300 µl ELISA-Blockpuffer gesättigt. Der Blockpuffer wurde durch dreimaliges Waschen entfernt und 100 µl des in RPMI 1640-Medium verdünnten und titrierten Serums bzw. eine Positivkontrolle (Human- oder Mausserum) sowie bei Nachweis von Maus-IgG ein Standard (gereinigtes Maus IgG1 von BD) für 2 h inkubiert und anschließend erneut dreimal gewaschen, bevor pro

Loch 100  $\mu$ l in *reagent diluent* verdünnter Detektionsantikörper für 2 h zugesetzt wurde:

1. Für den Nachweis von humanem IgG: Biotin-Maus anti-Human IgG (Dianova); 1:2000
2. Für den Nachweis von murinem IgG: Biotin-Ratte anti-Maus IgG1 (BD); 1:500

Um restlichen Antikörper zu entfernen, wurde wiederum dreimal gewaschen und anschließend mit je 100  $\mu$ l/Loch des Avidin-HRP-Antikörpers (1:200 in *reagent diluent*) für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die verwendeten Löcher dreimal mit Waschpuffer gewaschen, mit 100  $\mu$ l/Loch Färbelösung versetzt und die Färbereaktion nach 5-10 min, je nach Blaufärbung, mit je 50  $\mu$ l Stopplösung abgestoppt. Die Färbung wurde umgehend bei 450 nm im ELISA-Lesegerät (Tecan) gemessen.

### **5.2.4 Enzyme linked immunospot assay**

Perforin wurde mittels *enzyme linked immunospot assay* (ELISpot) nachgewiesen. Dazu wurde die im Kit enthaltene Polyvinyl-Difluorid (PVDF)-Membran-Platte zuerst mit 50  $\mu$ l 70 % Ethanol für 2 min behandelt und anschließend 150  $\mu$ l steriles Wasser zugesetzt. Nach fünfmaligem Waschen mit 200  $\mu$ l/Loch Wasser wurden die benötigten Löcher mit je 100  $\mu$ l anti-Perforin-Antikörper Pf-80 (30  $\mu$ g/ml) beschichtet und  $\mu$ N bei 4°C inkubiert. Um nicht gebundenen Antikörper am nächsten Tag zu entfernen, wurden die beschichteten Löcher fünfmal mit 200  $\mu$ l PBS gewaschen. Anschließend wurden unspezifische Bindungen durch mindestens 30-minütige Inkubation mit je 200  $\mu$ l T-Zellmedium pro Loch bei RT gesättigt.

Die Zielzellen wurden währenddessen je nach Bedarf für mindestens zwei Stunden mit 2  $\mu$ M T-Zell-spezifischem Peptid beladen und ungebundenes Peptid anschließend durch dreimaliges Waschen mit RMPI 1640-Medium wieder entfernt.

Nach dem Blockieren unspezifischer Bindungen wurde das T-Zellmedium abgenommen und die Zielzellen mit den zu testenden Effektorzellen in 200  $\mu$ l T-Zellmedium plus IL-2 in den jeweiligen Löchern für 40-48 h bei 37°C inkubiert. Um Verdunstung zu verhindern, wurde die Platte während der Inkubation in Alufolie gewickelt.

Die weiteren Arbeitsschritte wurden unter nicht-sterilen Bedingungen durchgeführt. Zuerst wurden die entsprechenden Löcher fünfmal mit PBS-T gewaschen und dann mit je 100 µl des Detektionsantikörpers Pf-344-Biotin in der Endkonzentration 1 µg/ml verdünnt in PBS inklusive 0,5 % FCS für 2 h bei Raumtemperatur beschichtet. Anschließend wurde erneut fünfmal mit PBS gewaschen und der Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Komplex, 1:1000 verdünnt, für eine Stunde bei Raumtemperatur zugesetzt. Die Entwicklung erfolgte nach wiederholtem Waschen mit BCIP/NBT und wurde durch Waschen der einzelnen Löcher mit Leitungswasser abgestoppt. Nach Trocknen der Platte wurden die einzelnen Löcher und die darin sichtbaren Punkte unter dem Mikroskop ausgezählt.

**PBS-T:** PBS; 0,05 % Tween-20

### 5.2.5 Magnetische Zellseparation

Die magnetische Zellseparation (*magnetic activated cell sorting*; MACS) wurde genutzt, um gewünschte Zellpopulationen aus PBMCs oder anderen Zellgemischen zu isolieren. Dafür wurde auf die magnetische Zellseparation der Firma Miltenyi Biotec zurückgegriffen. Die Aufreinigung erfolgte den Herstellerangaben entsprechend. Die zu sortierenden Zellen wurden zunächst mit 10 ml eisgekühltem MACS-Puffer gewaschen. Pro  $1 \times 10^7$  Zellen wurden diese anschließend mit 80 µl MACS-Puffer und 20 µl Antikörper-gekoppelten MACS-*beads* resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen in MACS-Puffer wurden die Zellen für die nachfolgende Zellseparation in 500 µl Puffer aufgenommen. Für diese wurden MACS-Säulen der Größe LS an den MACS-Magneten angebracht und einmal mit Puffer äquilibriert. Die in 500 µl aufgenommenen Zellen wurden daraufhin auf die Säule gegeben. Nach Einlauf der Flüssigkeit in die Säule wurde dreimal mit je 3 ml kaltem MACS-Puffer gewaschen. Dieser Durchlauf wurde entweder verworfen oder bei Bedarf, z.B. bei der Separation einer T-Zelllinie in  $CD4^+$  und  $CD8^+$  Fraktionen, zentrifugiert und die Zellen in entsprechendem Medium aufgenommen. Die Säule wurde daraufhin von dem Magneten entfernt, die an magnetische *beads* gekoppelten Zellen einmal durch



Durchlauf von 5 ml MACS-Puffer in ein frisches Gefäß eluiert und die möglicherweise noch verbliebenen Zellen mithilfe eines Stempels aus der Säule gespült. Die Zellen wurden abzentrifugiert, mehrmals in Waschmedium gewaschen und nach der Zellzahlbestimmung in entsprechendem Medium aufgenommen.

Die Qualität der Aufreinigung wurde mittels FACS überprüft. Handelte es sich bei den Zellen um T-Zellen, wurden diese im Anschluss direkt stimuliert.

Bei einer MACS-Negativselektion wurden die benötigten Zellen nicht markiert und traten deshalb im Durchlauf aus der Säule aus. Alle nicht-gewünschten Zellen wurden dabei durch magnetische *beads* in der Säule gehalten. Diese Methode wurde verwendet, um eine mögliche Aktivierung der gewünschten Zellpopulation durch die Markierung mit Antikörpern zu vermeiden. Die Negativselektion erfolgte ebenfalls nach Herstellerangaben. Die Zellen wurden zunächst mit 10 ml kaltem MACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Pro  $1 \times 10^7$  verwendeter Zellen wurden 40  $\mu$ l MACS-Puffer und 10  $\mu$ l biotinyliertes Antikörpergemisch zum Pellet hinzugefügt, dieses resuspendiert, für 10 Minuten auf Eis inkubiert, nachfolgend pro  $1 \times 10^7$  Zellen 30  $\mu$ l MACS-Puffer und 20  $\mu$ l anti-Biotin-MACS-*beads* zugesetzt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde einmal mit 10 ml kaltem MACS-Puffer gewaschen, die Zellen pelletiert und, wie zuvor beschrieben, mittels MACS-Säule und MACS-Magnet separiert.

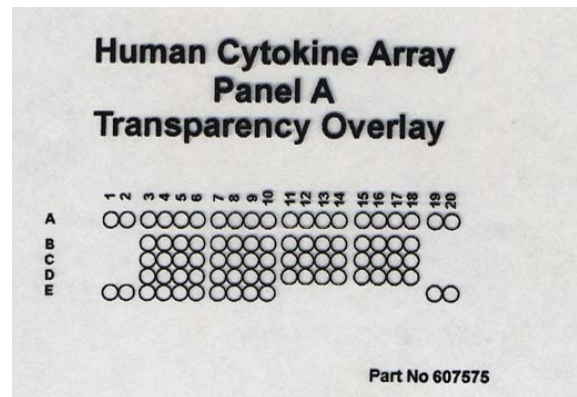
**MACS-Puffer:** PBS; 1 % BSA; 2 mM EDTA

### 5.2.6 Zytokin-Array

Zur Analyse des Zytokin-Profiles der T-Zellklone wurde der „Proteome Profiler™ Human Cytokine Array Panel A Kit“ von R&D Systems nach Herstellerangaben verwendet. Zur Induktion der Zytokinsekretion wurden die T-Zellen mit gebundenem anti-CD3-Antikörper (OKT-3; 5  $\mu$ g/ml) für ca. 12 h in AIM V-Medium unter Zusatz von 25 ng/ml PHA stimuliert.

Zur Vorbereitung der im Kit enthaltenen Membran wurden 2 ml *array buffer 4* in eine Inkubationsschale gegeben und die mit Antikörpern beschichtete Membran für eine Stunde zum Blockieren unspezifischer Bindungen darin geschwenkt. Währenddessen

wurde der Zellüberstand aktivierter T-Zellen gesammelt und davon 750 µl mit 500 µl *array buffer 4* und 250 µl *array buffer 5* auf ein Volumen von 1500 µl aufgefüllt und mit 15 µl *cytokine array panel A detection*-Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Von der blockierten Membran wurde *array buffer 4* nach der Inkubationszeit vollständig abgesaugt und die T-Zellüberstandmischung mit der Membran üN bei 4°C schwenkend inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran aus der Inkubationsschale entfernt und in einem Waschbehälter mit je 20 ml 1 x Waschpuffer dreimal für je 10 min gewaschen. Die Schale wurde zwischenzeitlich mit Wasser gereinigt. Die Membran wurde daraufhin für 30 min in 1500 µl einer Streptavidin-HRP Lösung (verdünnt in *array buffer 5*) inkubiert und anschließend erneut dreimal gewaschen. Anschließend konnten die Zytokine mit Hilfe des ECL-Plus-Detektionssystems (GE Healthcare) und nachfolgender Belichtung eines Röntgenfilms (CEA Medical X-Ray Screen Film Blue Sensitive, Agfa HealthCare) nachgewiesen werden.



**Abbildung 5.1 Zytokin-Array-Auftragungsmuster der Zytokine auf den Membranen.**

Die spezifischen Antikörper wurden in Duplikaten auf die Membran vom Hersteller aufgebracht. Außerdem wurden Positiv- und Negativkontrollen auf der Membran mitgeführt. Die genaue Position der einzelnen Zytokinantikörper kann der Tabelle 5.1 entnommen werden.

Die Analyse der Sekretion verschiedener Zytokine wurde anhand der in Abbildung 5.1 dargestellten Schablone durchgeführt.

Tabelle 5.1 Zytokine und deren Position im Zytokin-Array

Position	Zytokin	Position	Zytokin
A1, A2	Positivkontrolle	C7, C8	IL-13
A3, A4	C (Komplement-Komponente) 5a	C9, C10	IL-16
A5, A6	CD40 Ligand; CD154	C11, C12	IL-17
A7, A8	G-CSF	C13, C14	IL-17E
A9, A10	GM-CSF	C15, C16	IL-23
A11, A12	CXCL1	C17, C18	IL-27
A13, A14	CCL1	D3, D4	IL-32 $\alpha$
A15, A16	sICAM-1; CD54	D5, D6	CXCL10
A17, A18	IFN $\gamma$	D7, D8	CXCL11
A19, A20	Positivkontrolle	D9, D10	CCL2
B3, B4	IL-1 $\alpha$	D11, D12	MIF
B5, B6	IL-1 $\beta$	D13, D14	CCL3
B7, B8	IL-1ra	D15, D16	CCL4
B9, B10	IL-2	D17, D18	Serpin E1
B11, B12	IL-4	E1, E2	Positivkontrolle
B13, B14	IL-5	E3, E4	RANTES; CCL5
B15, B16	IL-6	E5, E6	CXCL12
B17, B18	IL-8	E7, E8	TNF $\alpha$
C3, C4	IL-10	E9, E10	sTREM-1
C5, C6	IL-12 p70	E19, E20	Negativkontrolle

### 5.2.7 Zytotoxizitätsbestimmung: Calcein-Lyse-Assay

Das zytotoxische bzw. lytische Potenzial der T-Zellen wurde mittels Calcein-Lyse-Assay bestimmt. Calcein Acetoxymethylester (AM)-gefärbte Zielzellen wurden hierbei mit Effektorzellen, in diesem Fall T-Zellen, inkubiert und nach einer entsprechenden Inkubationsphase das freigesetzte Calcein, gleichzusetzen der Zelllyse der Zielzellen bzw. der Lyseaktivität der Effektorzellen, fluorometrisch bestimmt (Anregungsmaximum 495 nm; Abstrahlungsmaximum 515 nm).

Um die Hintergrundfluoreszenz zu minimieren, wurden zuerst die entsprechenden Zielzellen durch Ficollisieren von toten Zellen befreit. Nach dreimaligem Waschen mit RPMI 1640-Medium wurden die Zielzellen, wenn beschrieben, für 60 min mit 2  $\mu$ M Peptid beladen. Anschließend wurden diese Zellen für 30 min mit 10  $\mu$ g/ml Calcein

inkubiert. Nach der Calceinfärbung wurden die Zellen dreimal mit Waschmedium gewaschen und  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml resuspendiert. Die zu testenden T-Zellen wurden lediglich gesammelt, gewaschen und gezählt.

Folgende Ansätze wurden in Triplikaten in einer 96-Lochplatte ausgebracht (Volumen pro Loch betrug 200  $\mu$ l):

- 1) Zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz des Mediums wurde in einem Ansatz RPMI 1640-Medium ausgebracht.
- 2) Um die Spontanlyse der Calcein-gefärbten Zielzellen zu bestimmen, wurden pro Loch  $2,5 \times 10^4$  Zielzellen in RPMI 1640-Medium ausgebracht.
- 3) Die Maximallyse der Zielzellen wurde durch Inkubation der Zellen mit 1 % Triton X-100 (Endkonzentration 0,5 % Triton X-100) bestimmt.
- 4) Um die Lysekapazität der Effektorzellen zu bestimmen, wurden  $2,5 \times 10^4$  Calcein-gefärbte Zielzellen mit T-Zellen im Verhältnis 1:1; 1:3; 1:10 und wenn beschrieben auch 1:30 kokultiviert.

Die freigesetzte Fluoreszenz in den einzelnen Ansätzen wurde nach einer Inkubationszeit von 3 h bei 37°C durch die Abnahme und das Überführen von 150  $\mu$ l Zellüberstand in eine neue 96-Lochplatte mittels Wallac 1420 *multilabel counter* Victor<sup>2</sup> (485 nm; 535 nm; 1.0 Sek) bestimmt.

Die Berechnung der Antigen-spezifischen Lyseaktivität der Effektorzellen erfolgte mithilfe folgender Formel:

$$\frac{(\text{gemessene Lyse} - \text{Spontanlyse})}{(\text{Maximallyse} - \text{Spontanlyse})} \times 100 = \text{spezifische Lyse [\%]}$$

Zur Blockierung der Lyse wurden die lytischen Eigenschaften der Effektorzellen inhibiert, indem diese 1 Stunde vor und auch während Kokultivierung mit den Zielzellen mit 25-30  $\mu$ M Brefeldin A oder 4 mM EGTA behandelt wurden. Die Analyse der Zytotoxizität erfolgte wie oben beschrieben.

**1 % Triton X-100:** 1 % Triton X-100 in PBS

### **5.3 Methoden zur Durchführung der *in vivo*-Analysen**

#### **5.3.1 Vorbereitung und Injektion von Zellen bei Mausversuchen**

Die zu injizierenden Zellen wurden gesammelt und zweimal in Waschmedium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen dreimal in sterilem PBS gewaschen und zur Injektion in sterilem PBS aufgenommen, wobei das maximale Volumen pro Injektion jeweils 250 µl betrug und höchstens zwei Injektionen pro Maus erfolgten. Die Zellen wurden bis zur Injektion auf Eis gelagert.

Die Injektion wurde von geschulten Tierpflegern unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

#### **5.3.2 Mykoplasmen-Test**

Vor der Injektion der Zellen in die Mäuse wurden jene stichprobenartig oder bei Verdacht auf Mykoplasmeninfektion überprüft. Dazu wurde das „MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit“ der Firma Lonza nach Herstellerangaben verwendet. Zuerst wurden alle Reagenzien auf Raumtemperatur erwärmt werden. *MycoAlert* Reagenz und *MycoAlert* Substrat wurde in *MycoAlert Assay*-Puffer für 15 min bei RT rekonstituiert. In der Zwischenzeit wurden 2 ml Zellüberstand abzentrifugiert und anschließend 100 µl Zellüberstand in eine Lumineszenz-Platte (Corning) mit 100 µl *MycoAlert* Reagenz vermischt. Nach 5-minütiger Inkubation wurde Wert A durch die Messung in einem Luminometer (Lesezeit 1 sek) bestimmt. Anschließend wurden 100 µl *MycoAlert* Substrat zugefügt und 10 min inkubiert bevor Wert B bestimmt werden konnte. Bei einem Verhältnis Wert A/Wert B  $x < 0,5$  waren die Zellen frei von Mykoplasmen. Bei einem Wert  $0,5 > x < 1$  musste die Messung wiederholt werden. Ein Wert  $x > 1$  war Beleg für eine Bakterieninfektion, und die Zellen wurden in Quarantäne behandelt oder entsorgt.

### **5.3.3 Gewebeentnahme und- analyse bei SCID-Mäusen**

#### **5.3.3.1 Tötung und Gewebeentnahme**

Die Tötung von Mäusen erfolgte nach ethischen und tierrechtlichen Richtlinien durch CO<sub>2</sub>-Inkubation. Nach Feststellung des Todes wurden die Tiere mit 70 % Ethanol desinfiziert und unter einer Sterilbank mit Sezierbesteck geöffnet. Zuerst wurde der Bauchraum inklusive Brustkorb geöffnet und für spätere Untersuchungen Herzblut entnommen. Anschließend wurde der Körper auf Veränderungen untersucht. Es wurden je nach Auffälligkeit Tumor, Leber, Milz, Niere und Lymphknoten entnommen. Die Gewebe wurden entweder direkt zur Analyse mittels FACS weiterverarbeitet, in Stickstoff gefroren oder für Kryo- oder Paraffineinbettung weiterverarbeitet.

#### **5.3.3.2 Gewebeaufbereitung**

##### **5.3.3.2.1 Gewebeaufbereitung zur FACS-Analyse**

Um die Tumorzellen mittels FACS auf unterschiedliche Oberflächenmarker oder auch die T-Zellinfiltration in den Geweben zu untersuchen, wurde das entnommene Gewebematerial zuerst mechanisch zerkleinert und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden einmal mit RPMI 1640-Medium gewaschen, das Zellpellet in 5 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer aufgenommen und für 5 min auf Eis inkubiert, um in der FACS-Analyse störende Erythrozyten aus der Zellsuspension zu entfernen. Das Abstoppen der Lysereaktion erfolgte durch die Zugabe der 10-fachen Menge FACS-Puffer. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert und bei Bedarf die Erythrozyten-Lyse wiederholt oder die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen, gezählt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

**Erythrozyten-Lyse-Puffer:** 500 ml H<sub>2</sub>O; 4,46 g NH<sub>4</sub>Cl; 0,5 g KHCO<sub>3</sub> → pH einstellen auf 7,5; + 14,5 mg EDTA

#### **5.3.3.2.2 Einbettung von Gewebe in Paraffin**

Zur immunhistochemischen Analyse der Gewebe musste das aus der Maus entnommene Gewebe für ca. 24 h in 20-30-fachem Volumen Roti-Histofix 4 % (Roth) fixiert werden. Bei der anschließenden Entwässerung (Verdrängung des Wassers/Formalins durch Alkohol) wurden die Gewebe für je 24 h in 70, 80, 90 und 100 % Ethanol überführt. Danach wurde Xylol als Intermedium genutzt, um den Alkohol aus dem Gewebe zu verdrängen und durch genanntes Lösungsmittel zu ersetzen. Im letzten Schritt wurde das Gewebe in flüssiges Paraffin gegeben, welches das Gewebe für mindestens 24 h durchdringen musste. Das Gewebe wurde abschließend in Einbettkassetten überführt und mit Paraffin aufgegossen. Der gesamte Block musste daraufhin zunächst auf Eis und anschließend auf  $-20^{\circ}\text{C}$  für mindestens 2 h erkalten, bevor die Blöcke bei RT aufbewahrt werden konnten.

Das Schneiden der Gewebe erfolgte an einem Mikrotom der Firma Sakura. Dazu wurden die Blöcke zuerst bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Mit Hilfe eines geeigneten Messers wurden Schnitte einer Dicke von 3-8  $\mu\text{m}$  hergestellt und in einem kalten Wasserbad gesammelt, bevor sie in ein  $55^{\circ}\text{C}$  warmes Wasserbad zum Glätten des Paraffins überführt wurden. Anschließend wurden sie auf Objektträger „SuperFrost Plus“ bzw. „SuperFrost Ultra Plus“ (Gerhard Menzel GmbH) aufgezogen und für 30 min bei  $70^{\circ}\text{C}$  getrocknet.

#### **5.3.3.2.3 Kryogewebe**

Zur Aufbereitung als Kryogewebe wurde das Gewebe direkt nach Entnahme in Schälchen, gefüllt mit Einbettmedium (*Tissue Tek*), eingebettet. Anschließend wurden die Schälchen kurz in flüssigem Stickstoff schockgefroren, in Alufolie gewickelt, in Folie eingeschweißt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Das Schneiden der Gewebe erfolgte an einem Kryostat unter Verwendung spezieller Messer. Die Schnittdicke betrug 3-8  $\mu\text{m}$ . Die Gewebe wurden bei einer Temperatur von  $-16-18^{\circ}\text{C}$  geschnitten und auf Objektträger „SuperFrost Plus“ aufgezogen. Anschließend mussten diese bei RT üN trocknen.

### **5.3.3.3 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung**

Um einen histologischen Überblick der zu färbenden Präparate zu bekommen, wurde die Hämatoxylin- und Eosin-Färbung (kurz: HE-Färbung) angewandt. Dazu wurden die mit Gewebe beschichteten Objektträger für jeweils 5 min in drei unterschiedlichen Gefäßen mit Xylol von Paraffin befreit. Die Rehydrierung erfolgte durch ein jeweils 5-minütiges Bad in 100 %, 100 %, 95 % und 70 % Ethanol und abschließender Rehydrierung im Wasserbad. Die Färbung aller vorhandenen Zellkerne wurde durch ein 5-minütiges Bad in einer Hämatoxylin-Lösung (Hämalaunlösung sauer nach Mayer; Roth) erreicht. Die Färbung wurde durch Spülen der Objektträger in Leitungswasser abgeschlossen, welches zu einer pH-Änderung und zur Bläuung des Schnittes führte. Anschließend erfolgte die Färbung aller zytoplasmatischen Strukturen durch ein 4-minütiges Bad in Eosin. Auch diese Reaktion wurde durch starkes Spülen in Leitungswasser gestoppt. Eine nachfolgende aufsteigende Ethanolreihe (70 %, 95 %, 100 %, 100 %), sowie ein dreifaches Bad in Xylol führte zur erneuten Dehydrierung der Gewebe und ermöglichte nach Einschluss der gefärbten Schnitte mit Roti-Histokit II (Roth) die dauerhafte Lagerung bei Raumtemperatur.

### **5.3.3.4 Immunhistochemische Färbungen**

Bei allen folgenden Färbungen wurden Schnitte mit einer Dicke von 3-8 µm und pro Gewebeschnitt in den folgenden Protokollen jeweils 100 -150 µl Flüssigkeit verwendet.

#### **5.3.3.4.1 Färbungen von Kryogeweben**

##### *5.3.3.4.1.1 Einfachfärbungen*

Nach Scheiden der Gewebe mussten die Objektträger mit aufgezogenen Geweben unN trocknen, damit jegliche Feuchtigkeit verdunsten konnte. Anschließend wurden die Gewebe in 3 % Paraformaldehyd (PFA) für 10 min bei RT fixiert. Zum Beenden der Fixierung wurden die Objektträger kurz mit PBS gespült. Um bei Antikörperinkubationen unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde das Gewebe mit 200 µl Ziegenerum (PAA) für 30 min inkubiert. Wie auch bei den folgenden Schritten erfolgte dies bei RT.



Nach Abklopfen des Serums wurde direkt die entsprechende Verdünnung des Primärantikörpers (anti-BZLF1 1:500; -FITC 1:200; -BLLF1 1:200; -human CD20 1:200 in 1 % BSA-PBS) entweder für 30 min oder üN bei 4°C aufgetragen.

Um restlichen Antikörper zu entfernen, wurden die Schnitte dreimal in Wasser und einmal für 5 min in PBS gewaschen. Ein Block von endogenem Biotin erfolgte mit dem „Avidin/Biotin Blocking Kit“ von Vector Laboratories nach Herstellerangaben. Dieser Schritt ermöglichte die Reduktion unspezifischer Farbentwicklung am Ende der Färbung. Anschließend wurde das Gewebe mit einem Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper (1:200 in 1 % BSA-PBS) für 45 min inkubiert. Zeitgleich musste das Vectastain ABC-AP Kit nach Herstellerangaben angesetzt werden. Dieses Kit enthält einen Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Komplex, der an das Biotin des Sekundärantikörpers bindet. Nach der Antikörperinkubation wurden die Schnitte mit TBS anstelle von PBS, um kein mögliches Substrat für die Alkalische Phosphatase zu liefern, gewaschen. Die Inkubation mit dem ABC-Reagenz erfolgte für 30 min. Anschließend wurde auch dieses mit TBS abgewaschen und die Färbung mit Hilfe eines der folgenden Substrate abgeschlossen:

- *Alkaline Phosphatase Substrate Kit III*
- *BCIP/NBT Alkaline Phosphatase Substrate Kit IV*

Die enzymatische Reaktion wurde abgestoppt, indem die Objektträger in Leitungswasser gespült wurden. Als Gegenfärbung konnten die Schnitte bei Bedarf für 10 - 40 sek mit Hämatoxylin gefärbt werden. Die Schnitte wurden anschließend mit dem Eindeckmedium FluorPreserve Reagenz (Calbiochem) konserviert.

**3 % Paraformaldehyd:** PBS; 3 % Paraformaldehyd

**1 % BSA-PBS:** PBS; 1 % BSA

### 5.3.3.4.1.2 Doppelfärbung

Bei der Doppelfärbung wurde zunächst, wie unter 5.3.3.4.1.1 beschrieben, das erste Zielmolekül angefärbt. Die Entwicklung erfolgte allerdings nicht mit Alkalischer Phosphatase sondern mit *horseradish peroxidase* (HRP). Das Enzym wurde durch Bindung eines Streptavidin-HRP-Komplexes (Vectastain ABC-HRP Elite Kit) über

Biotin an die Antikörper gebunden. Als Substrat wurde DAB (3,3'-Diaminobenzidin) verwendet. Anschließend wurde die Reaktion durch kurzes Waschen in Leitungswasser gestoppt. Danach wurden die Gewebe wieder in PBS gewaschen und die zweite Färbung gestartet. Dafür wurde der zweite Primärantikörper in gewünschter Verdünnung eingesetzt und entweder für 30 min bei RT oder üN bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde ein zweiter Avidin-Biotin-Block, wie bereits beschrieben, durchgeführt. Danach wurden die Schnitte in TBS gewaschen und der zweite sekundäre Antikörper für 45 min bei RT inkubiert. Zeitgleich wurde das ABC-Reagenz mit alkalischer Phosphatase angesetzt. Nach der Antikörperinkubation wurden die Gewebe durch dreimaliges Waschen in TBS von überschüssigem Antikörper befreit und für 30 min bei RT mit ABC-Reagenz behandelt. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS wurde mit dem *Alkaline Phosphatase Substrate Kit III* die Färbung sichtbar gemacht. Das Stoppen der Reaktion erfolgte durch Spülen in Leitungswasser. Da das zweite Substrat zu einer blauen Färbung der Zielstrukturen führte, wurde bei Doppelfärbungen auf eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin verzichtet. Die Objekte wurden sofort eingedeckt.

#### 5.3.3.4.2 Färbungen von Paraffingeweben

Bei der Färbung von Paraffingeweben wurde zuerst, wie bereits unter 5.3.3.3 beschrieben, das Gewebe auf dem Objektträger rehydriert und kurz in TPBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine vom Antikörper abhängige Antigen-Demaskierung (siehe Tabelle 5.2), die zur Freilegung des Antigens führte (durch die Fixierung mit Formalin kam es zur Vernetzung der Oberflächenstrukturen) und somit das Erkennen durch den Antikörper ermöglichte.

**Tabelle 5.2 Färbung von Paraffingeweben: Antigen-Demaskierung**

Antigen-Demaskierung mit	Zeit	Antikörper
Citrat-Puffer	10 min	BLLF1; CD20
Citrat-Puffer	20 min	BZLF1; EBNA2
TE-Puffer	20 min	CD20; CD45RO; EBNA1

Für die Demaskierung wurden die Objektträger komplett mit Flüssigkeit, entweder Citrat- oder TE-Puffer, bedeckt und die Flüssigkeit für 10 bis 20 min in einer

Mikrowelle erhitzt, wobei in den ersten zwei Minuten bei höchster Wattzahl die Puffer zum Kochen gebracht wurden und die restliche Zeit die Flüssigkeit bei niedrigster Wattzahl auf Temperatur gehalten wurde.

Anschließend mussten die Objektträger in der erhitzten Flüssigkeit für ca. 30 min abkühlen und wurden dann durch einmaliges Waschen in Wasser von restlichem Puffer befreit. Nach 5-minütigem Waschen in TPBS wurde der Primärantikörper (anti-BZLF1 1:500; -EBNA1 1:100; -EBNA2 1:100; -BLLF1 1:150; -human CD20 1:200; -human CD45RO 1:1000) in der entsprechenden Verdünnung (in BSA-TPBS) für 30 min bei RT oder üN bei 4°C auf die Gewebe gegeben. Um restlichen Antikörper zu entfernen, wurden die Schnitte in Wasser gewaschen. Der nächste Schritt wurde durchgeführt, um mögliche endogene Peroxidasen zu entfernen, die oft in Tumorgewebe zu finden sind und bei der endgültigen Entwicklung der Färbung zu starken Hintergrundfärbungen führen würden. Dazu wurden die Schnitte für 5 min in 3 % Hydrogenperoxid inkubiert und die Reaktion mit Wasser gestoppt. Nach 5-minütigem Waschen in TPBS wurde ein Avidin/Biotin-Block nach Herstellerangaben durchgeführt. Die anschließenden Schritte wurden analog der vorherigen Methode durchgeführt. Anstelle des *ABC-Alkaline Phosphatase-Kits* wurde das *Vectastain ABC-HRP Elite Kit* verwendet. Die Entwicklung der Färbung erfolgte mit dem Substrat DAB nach Herstellerangaben. Die Färbung wurde abgebrochen, indem die Objektträger nach 10 min in Leitungswasser gespült wurden. Eine mögliche Gegenfärbung mit Hämatoxylin (10-40 sek) und anschließendes Spülen in Leitungswasser wurde vor der, wie unter 5.3.3.3 beschriebenen, Dehydrierung und dem Einschluss durchgeführt.

**Citrat-Puffer:** 10 mM NaCitrat; pH 6,0 in H<sub>2</sub>O

**TE-Puffer:** 10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 9,0 in H<sub>2</sub>O

**TPBS:** PBS; 0,05 % Tween-20

**BSA-TPBS:** TPBS; 1 % BSA

**3 % Wasserstoffperoxid:** 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O

### **5.3.4 Statistik**

Bei allen *in vivo*-Analysen wurden die Überlebenskurven mit der Kaplan-Meier-Methode ausgewertet. Die Signifikanz wurde durch den Log-Rank-Test bestimmt. Alle statistischen Auswertungen erfolgten mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 5.

## 6. ERGEBNISSE

### 6.1 Phänotypische und funktionelle Analyse von EBV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellklonen

Die durch LCL-Stimulation *in vitro* generierten EBV-spezifischen T-Zelllinien enthalten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, deren Anteile Spender-abhängig stark variieren können. In der Vergangenheit beschränkte sich die Charakterisierung dieser T-Zelllinien meist auf die CD8<sup>+</sup> T-Zellkomponente. Jüngere Daten weisen aber darauf hin, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen einen wichtigen Beitrag zur Tumorabwehr leisten können. So ergab eine kürzlich durchgeführte klinische Studie, dass PTLD-Patienten ein besseres klinisches Ansprechen zeigten, wenn die infundierten T-Zellen einen höheren CD4<sup>+</sup> T-Zellanteil aufwiesen (Haque et al., 2007).

Um die EBV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort näher zu charakterisieren, wurde zunächst eine phänotypische und funktionelle Analyse von bereits im Labor etablierten, EBV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellklonen durchgeführt. Diese Zellen waren durch die wiederholte Stimulation mit autologen LCL oder EBV-Protein-beladenen Stimulatorzellen aus PBMCs EBV-positiver Spender generiert und durch *limiting dilution* kloniert worden.

Die Analyse von Oberflächenmarkern und Effektorfunktionen sollte Aufschluss darüber geben, ob es sich bei den verschiedenen EBV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen um eine homogene Zellpopulation oder um ein heterogenes Gemisch verschiedener T-Zellsubpopulationen handelte.

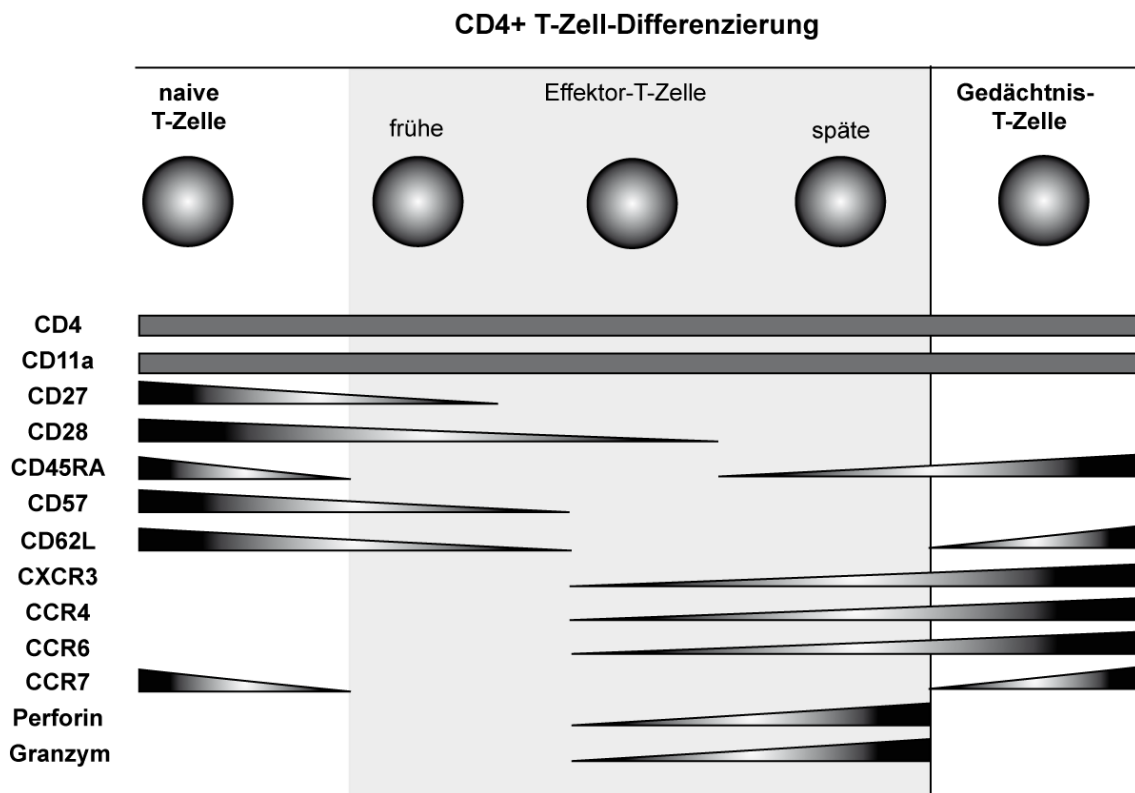
#### 6.1.1 EBV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellklone wiesen einen Effektor- bzw. Effektor-Gedächtnis-T-Zell-Phänotyp auf

Für die phänotypische Charakterisierung der EBV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellklone wurde die Expression der in Abbildung 6.1 gezeigten Oberflächenmarker untersucht.

Als Positivkontrollen dienten CD4 und CD11a, die auf allen CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert werden.

Als Rezeptoren, die mit Aktivierung der Zellen und deren Kostimulation assoziiert sind, wurden CD27, CD28, CD45RA und CD57 analysiert. Die Expression von CD27 und

CD28 nimmt bekanntlich mit der fortschreitenden Differenzierung ab und ist bei terminal differenzierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht mehr auf der Oberfläche nachweisbar (Appay et al., 2008). CD45RA wird nur auf naiven und selten auf terminal differenzierten T-Zellen exprimiert (Appay et al., 2008, Amyes et al., 2005). Die CD57-Expression auf der Zelloberfläche korreliert invers mit der Telomerlänge, die wiederum mit der Anzahl an bisherigen Zellteilungen abnimmt und auf ein vermindertes proliferatives Potenzial der Zellen hinweist (Brenchley et al., 2003).



**Abbildung 6.1 Darstellung der CD4<sup>+</sup> T-Zelldifferenzierung.**

Für die Charakterisierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden unterschiedliche Oberflächenmarker herangezogen. Die Expression der Moleküle ist abhängig vom aktuellen Differenzierungszustand der Zellen. Alle CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimieren CD4 und CD11a auf ihrer Oberfläche. Der Nachweis dieser Proteine diente deshalb als Positivkontrolle. Im Verlauf der Differenzierung nimmt die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD27 und CD28 ab. Auch die Expression von CD45RA nimmt mit fortlaufender Differenzierung ab, wird aber auf terminal differenzierten Zellen teilweise erneut exprimiert. CD57 ist ein Marker für zytotoxische Zellen und charakteristisch für Zellen mit reduziertem Proliferationspotenzial. CD62L in Verbindung mit dem Chemokinrezeptor CCR7 ist ein Kennzeichen für entweder naive oder zentrale Gedächtnis-T-Zellen. Die alleinige Expression von CD62L weist dagegen auf das Vorliegen von Effektor-Gedächtniszellen hin. CXCR3 ist ein Marker für Th1-Zellen und wird erst im Verlauf der Differenzierung hochreguliert. CCR4 gilt als Marker für Th2-Zellen und zusammen mit CCR6 als Marker für Th17-Zellen. Die zytolytischen Moleküle Perforin und die Granzyme sind Kennzeichen von Effektor-T-Zellen.

CD11a, CD62L, CXCR3, CCR4, CCR6 und CCR7 sind Marker, die mit dem *homing*-Potenzial der T-Zellen, sowie mit Chemotaxis und Adhäsionseigenschaften assoziiert sind. CD62L wird von naiven bis frühen Effektorzellen, sowie Gedächtnis-T-Zellen exprimiert. In Kombination mit CCR7 ist dieses Molekül ein Marker für naive oder auch zentrale Gedächtnis-T-Zellen. Letztere zeichnen sich durch eine höhere Sensitivität für antigene Stimulation und einer stärkeren Unabhängigkeit von kostimulatorischen Faktoren sowie einer Hochregulierung von CD40L aus (Sallusto et al., 2004). Eine CD62L-Expression ohne CCR7 kennzeichnet dagegen Effektor-Gedächtniszellen, die zudem verschiedene Oberflächenmarker, die sie zur Migration in unterschiedliche Gewebe befähigen, exprimieren (Sallusto et al., 2004).

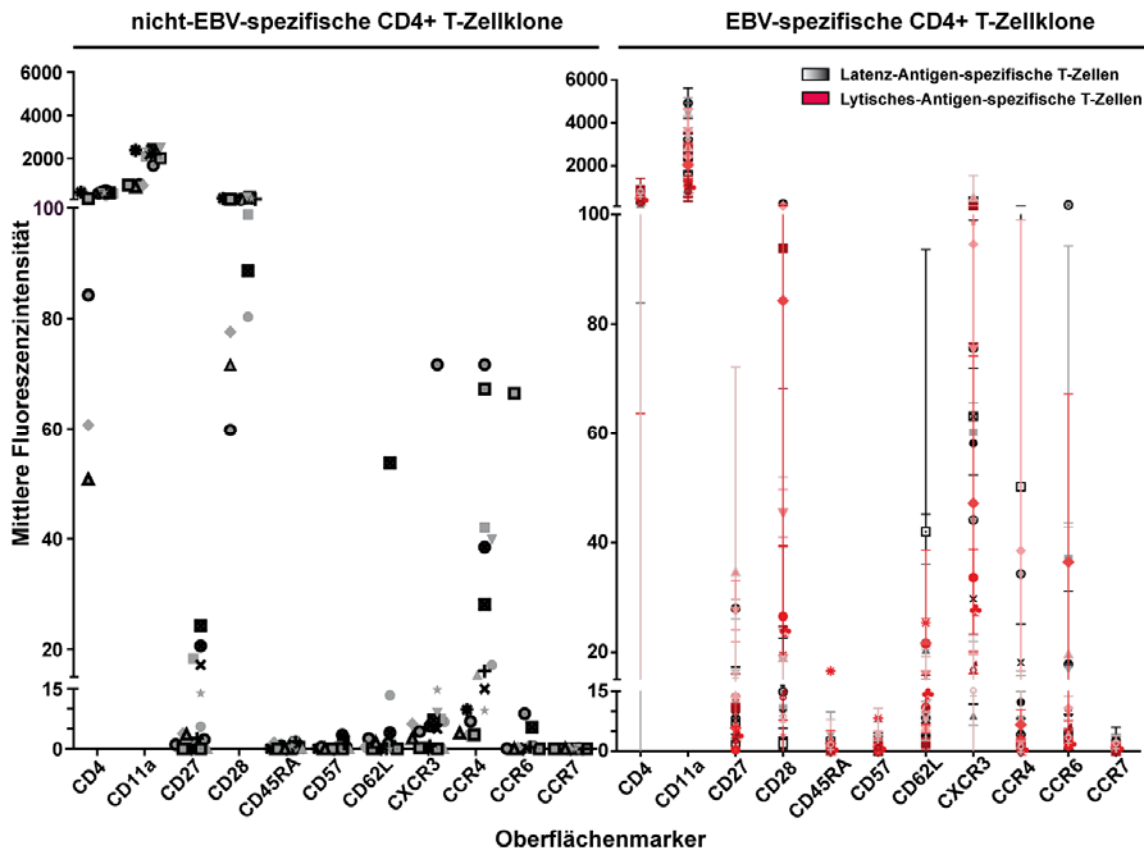
CXCR3 wird von Th1-, CCR4 von Th2-Zellen und CCR4 in Kombination mit CCR6 von Th17-Zellen exprimiert.

Die Expression von Perforin und Granzymen ist ein Charakteristikum für terminal differenzierte Effektorzellen (Appay et al., 2008).

Um zu untersuchen, ob EBV-spezifische T-Zellklone einen charakteristischen Phänotyp aufweisen, wurden nicht-EBV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellklone in diese Analysen mit einbezogen. Diese wurden durch Einzelzellklonierung peripherer CD4<sup>+</sup> T-Zellen etabliert (siehe 5.1.4.2). Die Untersuchung der Oberflächenmarker erfolgte 14 Tage nach Stimulation der T-Zellen mittels Durchflusszytometrie.

Abbildung 6.2 zeigt, dass beide CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulationen CD4 und CD11a exprimierten. Außerdem gab es in beiden Gruppen einzelne Klone, bei denen der Chemokinrezeptor CCR4 auf der Oberfläche nachweisbar war. Keine der beiden T-Zellgruppen exprimierten hingegen CD27, CD45RA, CD57 oder CCR7. Bei der Expression von CD28 unterschieden sich die beiden Populationen allerdings. Dieses kostimulatorische Molekül konnte auf allen nicht-EBV-spezifischen, aber nur auf vereinzelt EBV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellklonen und dann vorwiegend mit geringerer Fluoreszenzintensität detektiert werden. Bei EBV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnten zusätzlich die Oberflächenmarker CD62L, CXCR3 und CCR6 nachgewiesen werden.

Die großen Schwankungen in der Expressionsstärke einzelner Oberflächenmarker bei den EBV-spezifischen T-Zellklonen, dargestellt durch die Standardabweichung, resultierte aus den unterschiedlichen Aktivierungszuständen zum Zeitpunkt der durchflusszytometrischen Analysen.



**Abbildung 6.2 EBV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellklone unterschieden sich von nicht-EBV-spezifischen T-Zellklonen in ihrem Differenzierungsgrad.**

Verschiedene Oberflächenmarker auf EBV-spezifischen oder nicht-EBV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellklonen wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Die Ergebnisse der Untersuchung von 16 nicht-EBV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellklonen (linke Grafik) wurden denen von 20 EBV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellklonen (rechte Grafik) gegenüber gestellt. Beide Gruppen an T-Zellklonen zeigten eine ausgeprägte Expression von CD4 und CD11a, außerdem exprimierten aus jeder Gruppe einzelne Klone den Chemokinrezeptor CCR4 auf ihrer Oberfläche. Beide T-Zellpopulationen exprimierten dagegen kaum CD27, CD45RA, CD57 und CCR7. Im Gegensatz zu den nicht-EBV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellklonen exprimierten EBV-spezifische T-Zellen CD28 nur noch vereinzelt, aber CD62L, CXCR3 und teilweise auch CCR6 verstärkt. Bei den Analysen der nicht-EBV-spezifischen Klone handelte es sich um Einzelbestimmungen. Die EBV-spezifischen Klone wurden in Dreifachbestimmungen charakterisiert. Zur Auswertung wurden die Mittelwerte mit zusätzlicher Standardabweichung aufgetragen. Pro Messung wurden 5.000 lebende Zellen analysiert. Die verschiedenen Symbole repräsentieren jeweils einen individuellen Klon. Bei den EBV-spezifischen T-Zellklonen wurden Latenz-Antigen-spezifische T-Zellen grau/schwarz, Lytisch-Antigen-spezifische T-Zellen rot markiert.

Zusammenfassend konnten die EBV-spezifischen T-Zellklone als Effektor (CD27<sup>-</sup>CD28<sup>+/-</sup>CD62L<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>)- oder Effektor-Gedächtniszellen (CD27<sup>-</sup>CD28<sup>+/-</sup>CD62L<sup>+/-</sup>CCR7<sup>-</sup>) mit unterschiedlich starker Expression von *homing*-Rezeptoren (CXCR3, CCR4, CCR6) charakterisiert werden. Die nicht-EBV-spezifischen T-Zellklone wiesen hingegen einen weniger differenzierten Phänotyp auf. Charakteristisch für EBV-



spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen scheint daher nicht ein spezieller Phänotyp, sondern eine ausgeprägte Differenzierung zu sein.

### **6.1.2 Die EBV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellklone konnten aufgrund ihres Zytokinmusters in zwei Gruppen unterteilt werden**

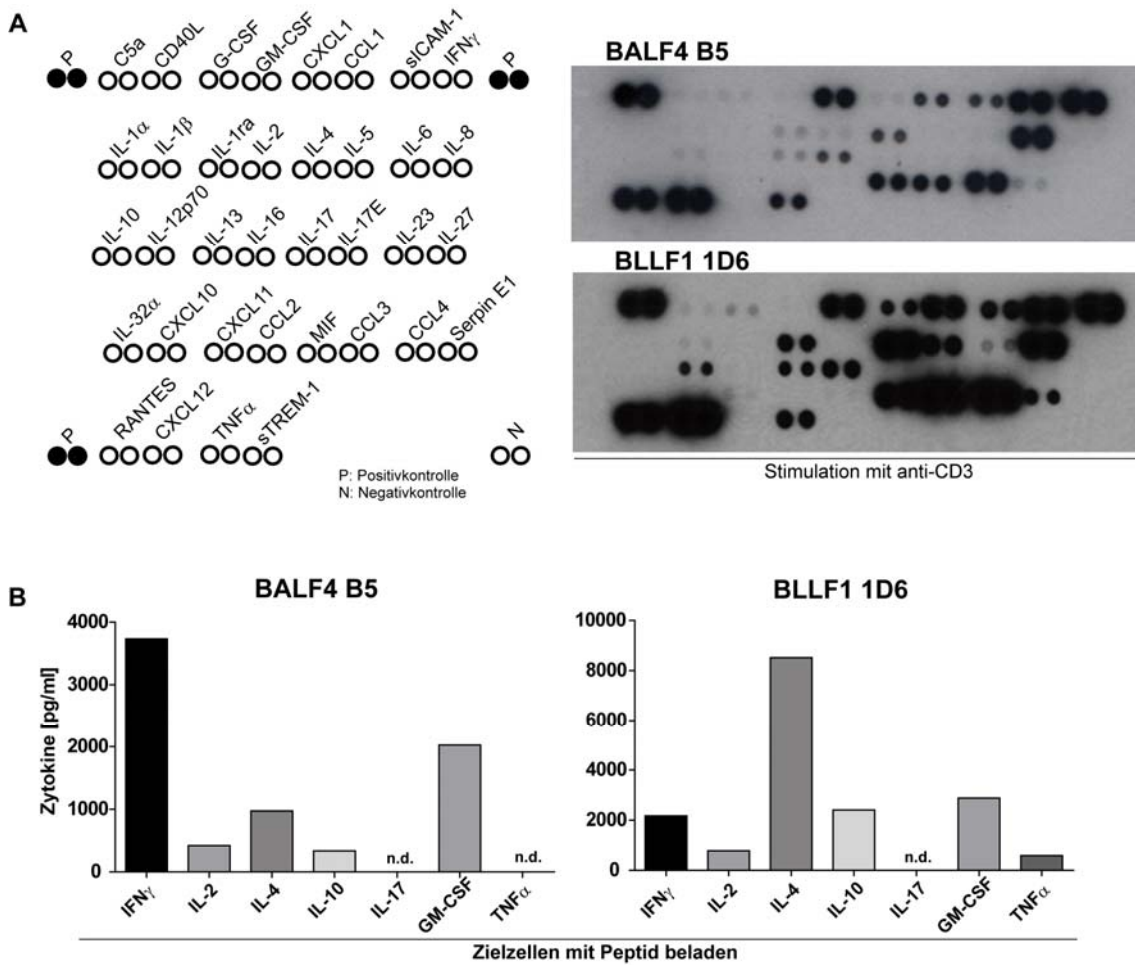
Um die Charakterisierung der EBV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellklone zu vertiefen, wurden die Zellen auch funktional analysiert.

Dafür wurde die Zytokinsekretion nach Stimulation mittels Zytokin-Array (5.2.6 Zytokin-Array) untersucht. Da der Array qualitative, aber keine quantitativen Aussagen über das Zytokinmuster erlaubt, wurden parallel ELISAs (5.2.3.1 Analyse der Zytokinausschüttung von T-Zellen mittels ELISA) von ausgewählten Zytokinen durchgeführt.

Diese Untersuchungen ergaben, dass EBV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellklone aufgrund ihrer Zytokinproduktion in zwei Gruppen unterteilt werden können. Bei der ersten Gruppe handelte es sich um Zellen mit einem typischen Th1-Zytokinsekretionsmuster: Diese Zellen schütteten nach antigener Stimulation große Mengen an IFN $\gamma$ , aber kaum typische Th2-Zytokine aus (Seite 22ff). Die zweite Gruppe der EBV-spezifischen T-Zellklone sezernierte ebenfalls große Mengen an IFN $\gamma$ , aber zusätzlich auch große Mengen an IL-4, dem prototypischen Th2-Zytokin. Sie zeigten daher ein gemischtes Th1/Th2-Zytokinprofil. GM-CSF wird von allen CD4<sup>+</sup> T-Zelluntergruppen produziert und wurde daher als Positivkontrolle mitgeführt. Während die Sekretion von IL-10 und TNF $\alpha$  bei vereinzelt T-Zellklonen in geringen Mengen nachweisbar war, konnte bei keinen Zellen sezerniertes IL-17 detektiert werden.

In Abbildung 6.3 sind exemplarisch die Ergebnisse jeweils eines Klons beider Gruppen dargestellt. BALF4 B5-T-Zellen sezernierten große Mengen an IFN $\gamma$ , aber kaum Th2-Zytokine, insbesondere IL-4, und wurden deshalb der Th1-Gruppe zugeordnet. Dagegen produzierten BLLF1 1D6-T-Zellen neben IFN $\gamma$  auch große Mengen an IL-4. Im Zytokinarray wurden außerdem die typischen Th2-Zytokine IL-5 und IL-13 nachgewiesen. Diese T-Zellen wurden deshalb der Th1/Th2-Gruppe zugeordnet.

Von 10 getesteten Klonen zeigten fünf ein Th1- und fünf ein gemischtes Th1/Th2-Zytokinmuster. Nur wenige der untersuchten Klone sezernierten signifikante Mengen an IL-2.



**Abbildung 6.3 EBV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellklone zeigten ein Th1- oder ein gemischtes Th1/Th2-Zytokinprofil.**

(A) Die T-Zellklone BALF4 B5 und BLLF1 1D6 wurden mit einem anti-CD3-Antikörper (OKT3) stimuliert und der Zellüberstand nach 24 h mittels Zytokin-Array auf die Anwesenheit unterschiedlicher Zytokine untersucht. Die Auftragung der Zytokine auf den Membranen ist schematisch auf der linken Seite dargestellt. Die BALF4 B5 T-Zellen sezernierten nach anti-CD3-Stimulation GM-CSF, CCL-1, sICAM-1, IFN $\gamma$ , IL-4, IL-8, IL-16, MIF, CCL-3, CCL-4, CCL-5 und TNF $\alpha$ . Bei BLLF1 1D6 konnten die Zytokine GM-CSF, CXCL1, CCL-1, sICAM-1, IFN $\gamma$ , IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-13, IL-16, sowie MIF, CCL3, CCL4, Serpin E1, CCL5 und TNF $\alpha$  nachgewiesen werden. (B) Für die Quantifizierung der sezernierten Zytokine wurden die T-Zellen zunächst mit Peptid-beladenen (2  $\mu$ M) Zielzellen kokultiviert und anschließend die Konzentration der angegebenen Zytokine im Überstand mittels ELISA ermittelt. Während beide T-Zellklone große Mengen an IFN $\gamma$  und GM-CSF sezernierten, waren im Überstand von BLLF1 1D6 zusätzlich auch große Mengen an IL-4 nachweisbar. Ähnliche Ergebnisse wurden in jeweils drei unabhängigen Ergebnissen erhalten. n.d.: nicht detektierbar

Da dieses Zytokin hauptsächlich von wenig ausdifferenzierten, teilweise Th1-polarisierten T-Zellen und zentralen Gedächtnis-T-Zellen produziert wird, kann dieses Ergebnis als weiterer Beleg für den in den vorangegangenen Untersuchungen ermittelten, differenzierten Phänotyp der T-Zellen gewertet werden.

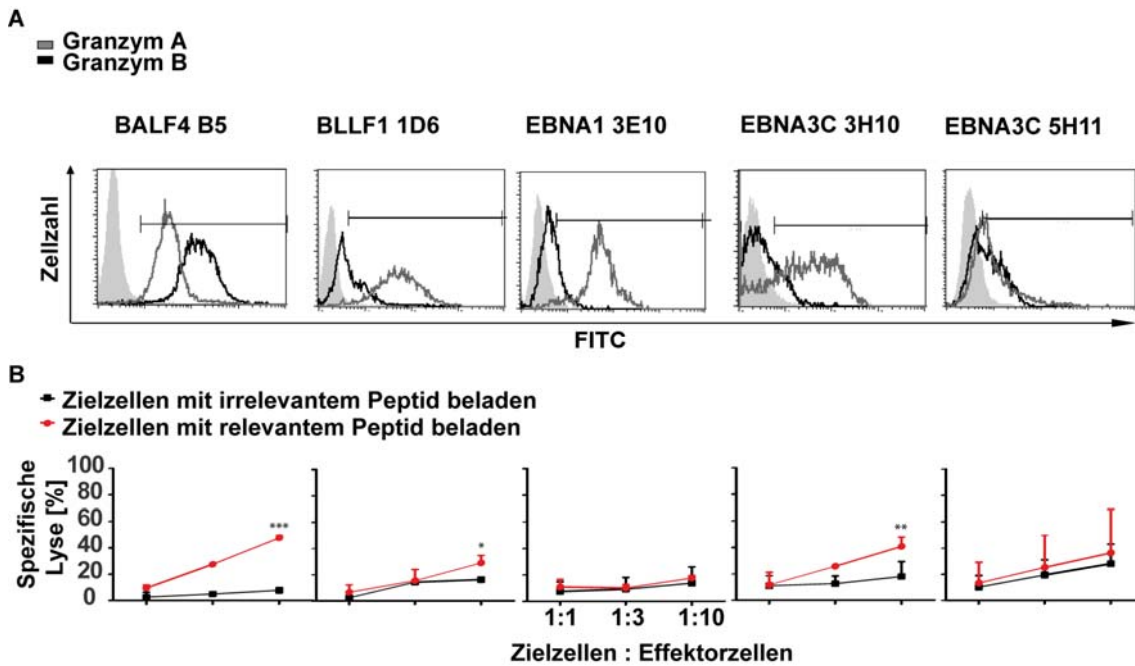
### **6.1.3 Die T-Zellklone waren unterschiedlich stark zytolytisch**

Zytotoxizität, mitunter durch die Expression von Granzymen und Perforin charakterisiert, ist, wie in Abbildung 6.1 gezeigt, ausschließlich bei differenzierten T-Zellen zu finden. Zur weiteren Charakterisierung der Klone wurde daher die Expression von Granzym A und B durchflusszytometrisch nach unspezifischer, die Sekretion von Granzym B nach antigener Stimulation im ELISA sowie Perforin nach antigener Stimulation im ELISpot nachgewiesen.

Außerdem wurde die Antigen-spezifische zytolytische Aktivität mittels Calcein-Lyse-Assay bestimmt. In Abbildung 6.4 wurde in (A) die Expression von Granzym A und B mit der zytolytischen Aktivität der T-Zellen in (B) verglichen. Die Sekretion von Granzym B wurde zusätzlich nach antigener Stimulation im ELISA nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

In den meisten Klonen wurde eine deutliche Fluoreszenzfärbung für Granzym A, aber eine wesentlich geringere für Granzym B beobachtet. Jedoch schien die Expression von Granzym B eher mit der gemessenen Zytotoxizität zu korrelieren. Die höchste Granzym B-Expression wurde bei BALF4 B5 detektiert. Dieser Klon zeigte auch die stärkste lytische Aktivität. Die Granzym B-Expression in EBNA1 3E10 war dagegen kaum nachweisbar, und diese T-Zellen lysierten die Zielzellen nur marginal.

Perforin wurde bei allen untersuchten Klonen im ELISpot nachgewiesen. Dabei war die Perforinausschüttung bei Klon EBNA3C 3H10 im Vergleich zu anderen besonders stark ausgeprägt. Die Menge an freigesetztem Perforin nahm in folgender Reihenfolge ab: EBNA3C 3H10 > EBNA3C 5H11 > EBNA1 3E10 > BALF4 B5 > BLLF1 1D6 (Daten nicht gezeigt) und wies somit keine Korrelation mit der lytischen Aktivität der T-Zellen auf.



**Abbildung 6.4 Die EBV-spezifischen T-Zellklone wiesen Unterschiede in ihrer zytolytischen Aktivität auf.**

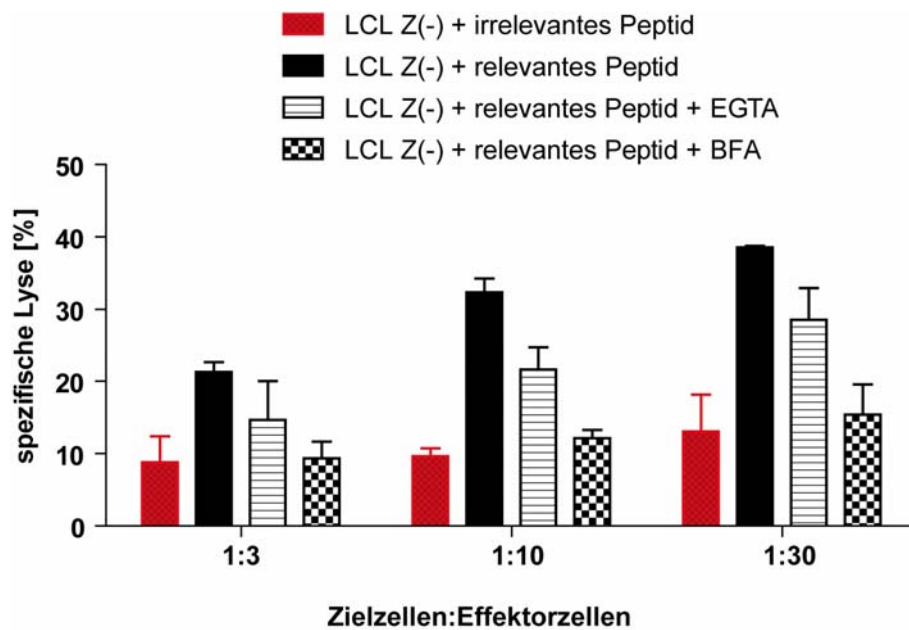
(A) Die Expression der Granzyme A und B wurde nach anti-CD3/ anti-CD28-Stimulation der T-Zellen durch intrazelluläre Färbung im FACS bestimmt. Während bei allen getesteten EBV-spezifischen T-Zellen Granzym A deutlich nachweisbar war, zeigten sich für Granzym B Klon-abhängige Unterschiede. (B) Das lytische Potenzial der T-Zellen wurde durch die Bestimmung der Zytotoxizität im Calcein-Lyse-Assay untersucht. Die Zielzellen wurden entweder mit irrelevantem oder relevantem Peptid beladen, mit Calcein gefärbt und anschließend für 3 h mit den zu testenden T-Zellen im Verhältnis 1:1, 1:3 und 1:10 (Zielzellen zu Effektorzellen) kokultiviert. Die Lyse der mit irrelevantem Peptid beladenen Zielzellen diente der Bestimmung des unspezifischen Hintergrunds (Signifikanz: \*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ; Zwei-Wege ANOVA). Die Experimente wurden jeweils in Triplikaten durchgeführt und mindestens zweimal reproduziert, wobei die Fehlerbalken die Standardabweichung darstellen.

Um zu testen, ob die Zytotoxizität der T-Zellen ausschließlich über die Freisetzung lytischer Granula oder aber auch durch Perforin-unabhängige Mechanismen vermittelt wurde, wurden die T-Zellen 1 h vor und während der gesamten Kokultivierungsperiode mit den Zielzellen mit 4 mM EGTA behandelt. EGTA komplexiert  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die für die Exozytose lytischer Granula benötigt werden. Darüber hinaus wurde durch die Behandlung der T-Zellen mit 25  $\mu\text{M}$  Brefeldin A vor und während der Kokultivierung mit den Zielzellen jeglicher Transport von Proteinen vom Golgi-Apparat zur Zelloberfläche inhibiert und so alle TNF/TNFR-vermittelten Signalwege (TRAIL, FasL) blockiert.

Abbildung 6.5 zeigt exemplarisch das Ergebnis eines solchen Calcein-Freisetzungsexperiments. In diesem Beispiel wurde die lytische Aktivität des T-Zellklons BLLF1

1D6 gegenüber Zielzellen, die mit irrelevantem oder relevantem Peptid beladen worden waren, in Anwesenheit von EGTA oder BFA untersucht.

Die Behandlung der T-Zellen mit EGTA führte zu einer verminderten, aber nicht zu einer kompletten Inhibition der Lyse Antigen-beladener Zielzellen. Darüber hinaus führte die Behandlung der Zellen mit BFA ebenfalls zu einer Reduktion der lytischen Aktivität der T-Zellen.



**Abbildung 6.5 Die Zytotoxizität der BLLF1 1D6-T-Zellen wurde sowohl durch EGTA- als auch durch BFA-Behandlung beeinträchtigt.**

Die Behandlung der BLLF1 1D6-T-Zellen mit 4 mM EGTA oder 25 µM BFA 1 h vor und während der Kokultivierung mit den Zielzellen resultierte in einer verminderten spezifischen Lyse. Durch das Abfangen von Ca<sup>2+</sup>-Ionen hemmt EGTA die Perforin-Granzym-vermittelte Lyse, während BFA den Transport von Proteinen vom Golgi-Apparat zur Zelloberfläche unterbindet und somit TNF/TNFR-vermittelte Signalwege blockiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment (Triplikate; Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar) von zwei unabhängigen Versuchen mit vergleichbarem Ergebnis.

Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die T-Zellen mehrere Tötungsmechanismen besitzen. Dabei scheint das zytotoxische Repertoire der T-Zellen klonabhängig zu variieren. Im Gegensatz zu den BLLF1 1D6-T-Zellen führte die Zugabe von EGTA zu den EBNA3C 3H10-T-Zellen zu einer stärkeren Reduktion an lysierten Zielzellen als die Behandlung mit BFA (Daten nicht gezeigt).

## 6.2 Analyse der Wirksamkeit verschiedener T-Zellpopulationen in einem PTLD-Mausmodell

Um die Wirksamkeit unterschiedlicher CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulationen *in vivo* zu analysieren, wurde auf das in der Literatur gut beschriebene PTLD-SCID-Mausmodell zurückgegriffen. In diesem Modell werden durch die intraperitoneale Injektion von  $>5 \times 10^7$  humaner PBMCs von EBV-positiven Personen PTLD-ähnliche B-Zelllymphome induziert, die durch das Auswachsen einzelner EBV-infizierter B-Zellen in den PBMCs entstehen (Mosier, 1990, Mosier et al., 1992, Mosier et al., 1988). Inzidenz und Latenz der Tumorentstehung unterliegen jedoch großen, Spender-abhängigen Schwankungen (Johannessen and Crawford, 1999). Zudem ist der Bedarf an zu injizierenden Zellen pro Maus relativ hoch.

PTLD-ähnliche Tumoren können in diesen Mäusen auch durch die Injektion von LCL induziert werden (Rowe et al., 1991). Ein Vorteil dieser Variante ist, dass die Tumor-induzierenden LCL in großen Mengen *in vitro* kultiviert werden können und die Tumorentstehung in Bezug auf Inzidenz und Latenz nur geringe Schwankungen aufweist.

In dieser Arbeit wurden PTLD-ähnliche Tumoren in SCID-Mäusen durch die Injektion von  $1 \times 10^7$  LCL oder  $5 \times 10^7$  humanen PBMCs induziert.

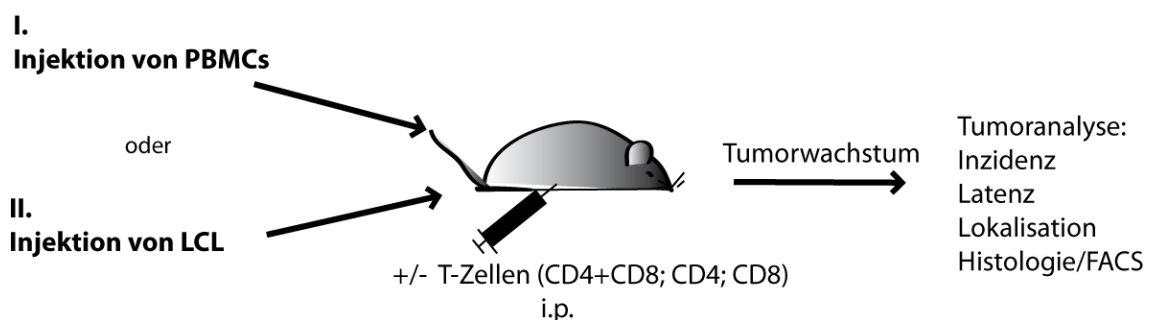


Abbildung 6.6 Schematische Darstellung des PTLD-SCID-Mausmodells.

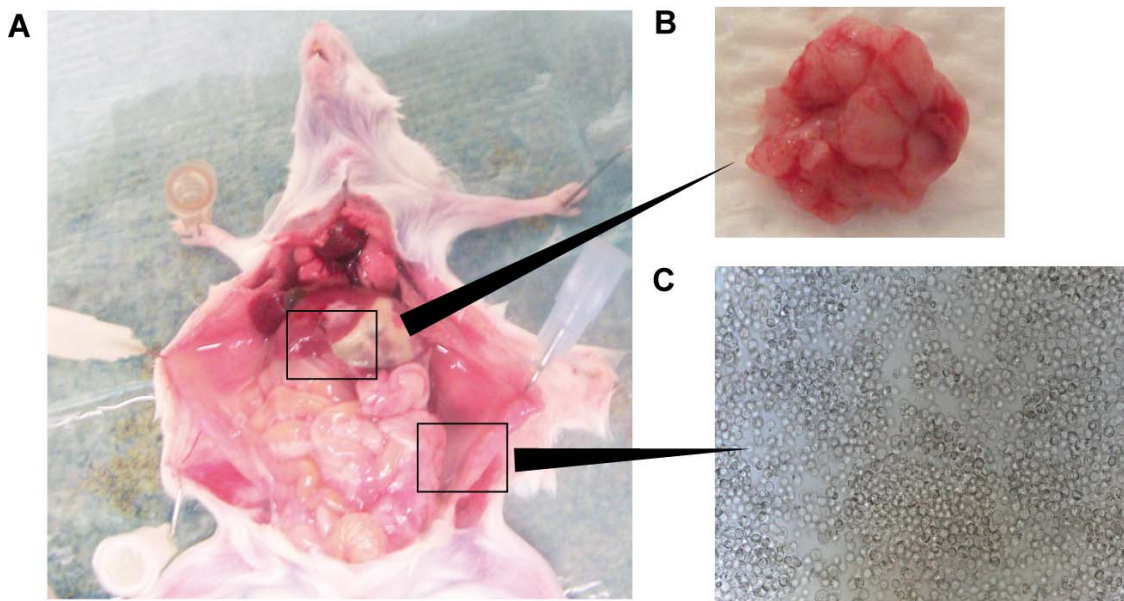
PBMCs oder LCL wurden als Tumor-induzierende Zellen intraperitoneal (i.p.) injiziert. Um die Wirksamkeit verschiedener T-Zellpopulationen auf das Tumorwachstum zu untersuchen, wurden gleichzeitig CD4<sup>+</sup> und/oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen i.p. injiziert und das Tumorwachstum analysiert.

Um eine Tumor-protective Wirkung von T-Zellen zu ermitteln, wurden  $1 \times 10^7$  T-Zellen zeitgleich mit PBMCs bzw. LCL kontralateral injiziert und ihr Effekt auf das Tumorstadium untersucht.

Neben Inzidenz, Latenz und Lokalisation wurden die Tumoren auch immunhistochemisch und als Einzelzellsuspensionen durchflusszytometrisch analysiert.

### 6.2.1 Induktion PTLD-ähnlicher Tumoren in SCID-Mäusen durch die Injektion von LCL, LCL Z(-) und PBMCs EBV-seropositiver Spender

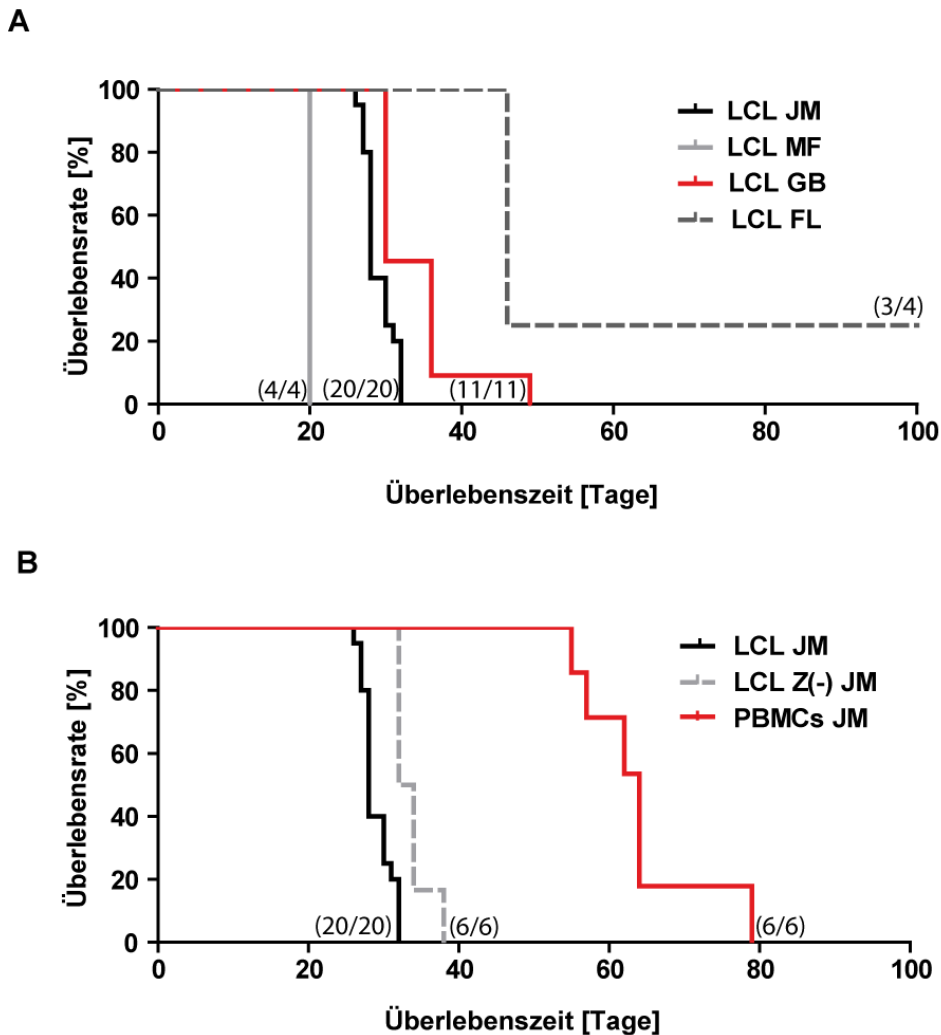
Zur Etablierung des Mausmodells wurden verschiedene LCL, LCL Z(-) und PBMCs EBV-seropositiver Spender intraperitoneal in SCID-Mäuse injiziert und das Tumorstadium analysiert.



**Abbildung 6.7 Entwicklung PTLD-ähnlicher Tumoren in SCID-Mäusen.**

Eine geöffnete Tumor-tragende SCID-Maus (A) mit aufgrund infiltrierender Tumorzellen verfärbter Leber. Unterhalb der Leberlappen ist der Tumor lokalisiert (B); außerdem trat durch die Injektion von LCL dieses Spenders und infolge der intraperitonealen Tumorbildung Ascites im Bauchraum auf, welcher große Mengen an Tumorzellen (C) enthielt (Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme; Vergrößerung 20x).

Nach Injektion von  $1 \times 10^7$  LCL oder auch LCL Z(-) entwickelten Spender-abhängig 75-100 % der Tiere Tumoren. Die Latenzzeiten waren Zelllinien-abhängig und lagen zwischen 19 und 46 Tagen (Abbildung 6.8).



(x/y) x von y Tieren entwickelten Tumoren und wiesen hohe Titer an humanem IgG auf

**Abbildung 6.8 Inzidenz und Latenz der Tumorentstehung nach Injektion von LCL, LCL Z(-) und PBMCs.**

(A) Zur Etablierung des PTLD-Maus-Modells wurden LCL unterschiedlicher Spender an Tag 0 in die Tiere injiziert und Tumor-Inzidenz und -Latenz ermittelt. Mit Ausnahme der LCL eines einzigen Spenders (FL) wurde nach Injektion von  $1 \times 10^7$  LCL eine Inzidenz von 100 % erreicht. Die Latenz lag Spender-abhängig zwischen 19 und 46 Tagen. (B) Die Injektion von LCL, LCL Z(-) oder PBMCs eines individuellen Spenders führte jeweils zum Auswachsen PTLD-ähnlicher Tumoren, jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Wie bei anderen Spendern ebenfalls beobachtet, führten LCL Z(-) im Vergleich zu LCL vom hier dargestellten Spender JM zu einem leicht verzögerten Tumorwachstum. Durch die Injektion von  $5 \times 10^7$  PBMCs pro Maus wurde eine Spender-abhängige Tumor-Inzidenz von durchschnittlich 67 % mit einer durchschnittlichen Latenzzeit von 64 Tagen erreicht.



Die Tumorlokalisation variierte Spender-abhängig, wobei sich die Tumoren normalerweise direkt an der Einstichstelle oder unterhalb der Leber, an der Porta Hepatis, bildeten und oftmals mit gastrointestinalem Gewebe verwachsen waren. Einige LCL führten außerdem zur Ausbildung von Ascites, der oftmals Tumorzellen enthielt. Um zu überprüfen, ob es sich bei den Tumoren um Zellen humanen Ursprungs handelte, wurde der Titer an humanem IgG, welches von den humanen B-Zellen produziert wird, im Serum der Mäuse bestimmt. Wurde in Mäusen optisch kein Tumor detektiert, konnte aufgrund nicht-detektierbarem humanen IgG das Vorhandensein von humanen B-Zellen in diesen Tieren weitgehend ausgeschlossen werden.

Sowohl die Injektion von  $1 \times 10^7$  LCL als auch von LCL Z(-) des jeweils gleichen Spenders führte zum Tumorwachstum, obgleich letzteres durch die Injektion von LCL Z(-) immer leicht verzögert war (Spender JM: LCL 28 Tage; LCL Z(-) 33 Tage; Spender MF: LCL 19 Tage; LCL Z(-) 22 Tage).

Nach Injektion von PBMCs entwickelten Spender-abhängig etwa 67 % der Tiere mit einer Latenzzeit von durchschnittlich 64 Tagen PTLD-ähnliche Tumoren. Auch diese Tumoren waren an der Porta Hepatis lokalisiert, wiesen aber neben B-Zellen auch variable Anteile an humanen T-Zellen auf. Deshalb wurden alle PBMC-induzierten Tumoren durchflusszytometrisch auf das Vorkommen von CD20-positiven, humanen B-Zellen untersucht. Vor weiteren Untersuchungen wurde zusätzlich die Expression von EBV-Proteinen der Latenzphase III immunhistologisch nachgewiesen. Nur Tiere mit PTLD-Tumoren (n = 6) sind in der Graphik dargestellt. Die restlichen Tiere (n = 3) entwickelten neben murinen Thymomen auch EBV-negative B-Zell- oder T-Zelltumoren.

### **6.2.1.1 Histologische Analyse der Tumoren**

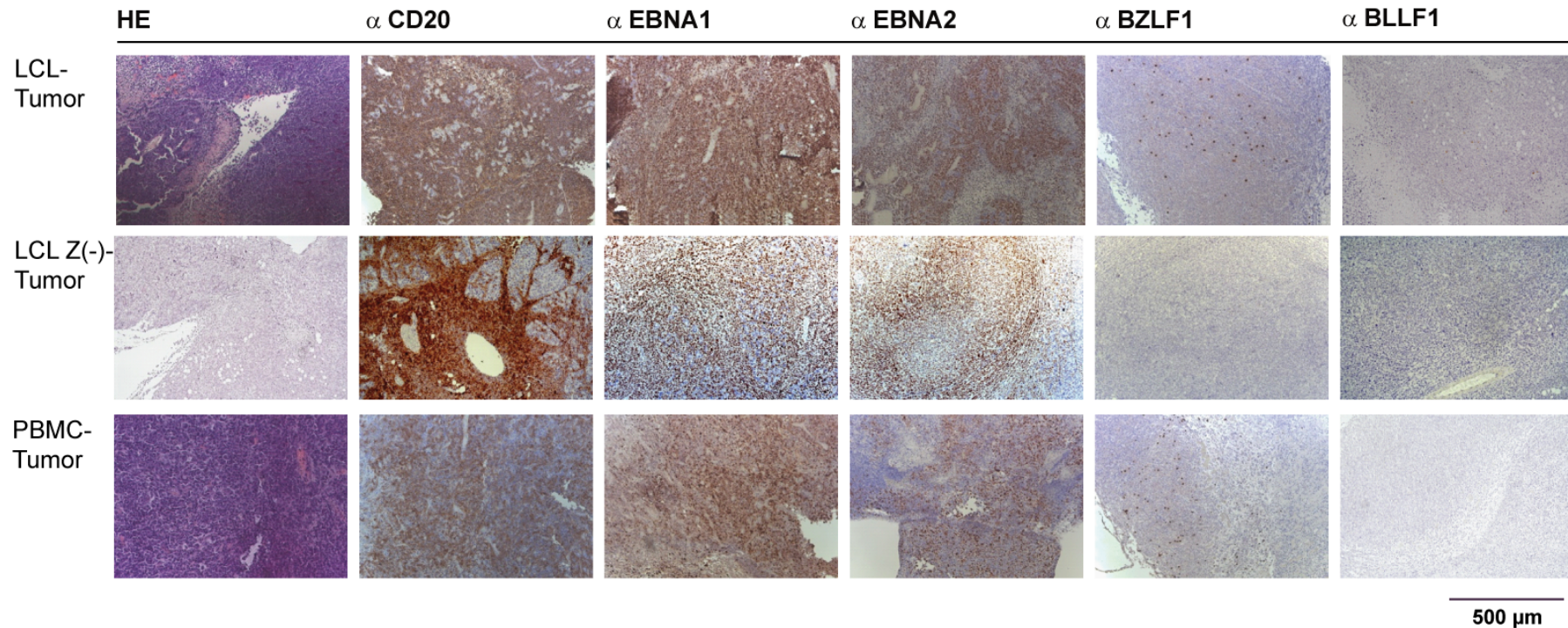
PTLDs werden in der klinischen Diagnostik unter anderem durch immunhistochemische Färbung von CD20 nachgewiesen. CD20-negative Tumoren dieser Entität sind äußerst selten (Gulley and Tang, 2010). Der Nachweis von EBV in diesen Tumoren erfolgt durch *in situ*-Hybridisierung von EBER-RNAs und dem immunhistochemischen Nachweis von EBNA1 in Kombination mit EBNA2 oder LMP1, was bislang nur für PTLDs beschrieben wurde (Delecluse et al., 2007).

Um zu bestätigen, dass es sich bei den ausgewachsenen Tumoren um humane PTLD-ähnliche Lymphome handelte, wurde Gewebe entnommen und immunhistochemisch

untersucht. Die Färbungen wurden, wie auch in der Klinik, an Formalin-fixierten und Paraffin eingebetteten Geweben durchgeführt. Da positive Färbungen der EBV-Proteine EBNA1, EBNA2, BZLF1 und BLLF1 die Anwesenheit von EBER mit einschließen, wurde nach ersten Analysen auf diesen Nachweis verzichtet. In Abbildung 6.9 werden exemplarisch die Ergebnisse der Tumorcharakterisierung für jeden injizierten Zelltyp gezeigt.

Um einen Überblick über die Tumorstruktur zu erhalten und nekrotische Areale zu identifizieren, wurde zuerst eine HE-Färbung durchgeführt. Danach wurde die Expression von humanem CD20 untersucht, um nachzuweisen, dass es sich bei den Tumoren um PTLD-ähnliche B-Zell-Lymphome humanen Ursprungs handelte. Der positive Nachweis der EBNA1- und EBNA2-Proteine bestätigte, dass die EBV-infizierten B-Zellen den Latenztyp III aufwiesen, der für PTLDs charakteristisch ist. Über den Nachweis von BZLF1 und BLLF1 wurde der Anteil an lytisch infizierten Tumorzellen ermittelt.

Wie in Abbildung 6.9 gezeigt, konnte in allen Tumoren CD20, EBNA1 und EBNA2 nachgewiesen werden. PBMC- und LCL-, aber nicht LCL Z(-)-induzierte Tumoren, zeigten außerdem eine vereinzelte BZLF1- und BLLF1-Expression.



**Abbildung 6.9** Histologischer Überblick der im Mausmodell generierten Tumoren.

LCL-, LCL Z(-)- und PBMC-induzierte Tumoren wurden histologisch durch HE-Färbung untersucht. Die Expression von humanem CD20 sowie viralem EBNA1, EBNA2, BZLF1 und BLLF1 wurde immunhistochemisch nachgewiesen (Braunfärbung). Wie für EBV-positive PTLDs mit B-Zellursprung charakteristisch, waren alle Tumoren positiv für humanes CD20 sowie für EBNA1 und EBNA2. Um den Anteil an lytisch infizierten Tumorzellen zu ermitteln, wurde zudem gegen BZLF1 und BLLF1 gefärbt. Bei LCL Z(-)-Tumoren waren diese Färbungen aufgrund der *bzlf1*-Deletion negativ.

### 6.2.1.2 Phänotypische Analyse der Tumorzellen

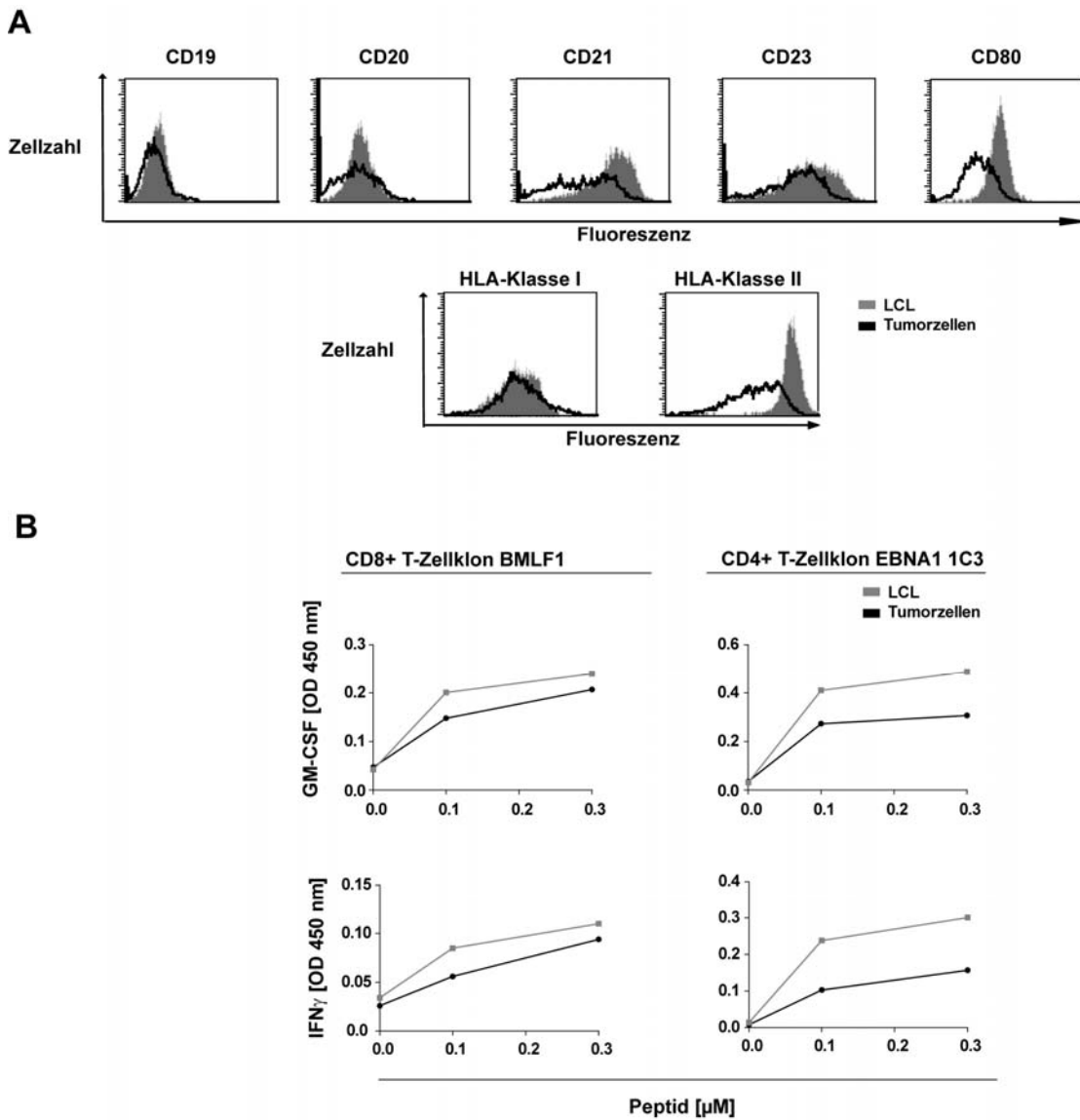
Hinweise in der Literatur auf eine Herabregulation von HLA-Klasse II-Molekülen auf LCL nach Injektion in Mäuse (Merlo et al., 2010a) wurde zum Anlass genommen, das Expressionsmuster der B-Zell-spezifischen Oberflächenmoleküle CD19, CD20, CD21 und CD23 sowie der an der T-Zellaktivierung beteiligten Moleküle CD80, HLA-Klasse I und II auf LCL und LCL-induzierten Tumorzellen vergleichend zu untersuchen.

Während die Expression der Oberflächenmarker CD19 und CD20 annähernd stabil blieb, war die Expression von CD21, CD23 und CD80 auf den explantierten Tumorzellen im Vergleich zu den *in vitro* kultivierten LCL vermindert. Zudem war die Expression von HLA-Klasse II auf Tumorzellen deutlich reduziert, während bei der HLA-Klasse I-Expression kein Unterschied festgestellt werden konnte (Abbildung 6.10A).

Diese verminderte HLA-Klasse II-Expression auf Tumorzellen ging zudem mit einer verminderten CD4<sup>+</sup> T-Zellstimulation *ex vivo* einher. Nach Peptidbeladung bewirkten Tumorzellen im Vergleich zu LCL eine geringere Zytokinausschüttung durch Peptid-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Die Antigen-spezifische Stimulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen hingegen war nicht beeinträchtigt.

Da die Expression der Oberflächenmarker nach Kultivierung der Tumorzellen für wenige Tage *in vitro* wieder das Niveau der LCL erreichte (Daten nicht gezeigt), beruhte diese Herabregulation der Tumorzellen nicht auf der Selektion bestimmter B-Zellphänotypen *in vivo*, sondern auf dem veränderten lokalen Milieu in der Maus.

Expressionsanalysen von PBMC-induzierten Tumorzellen *ex vivo* zeigten gegenüber LCL keine Veränderung der untersuchten Oberflächenmarker (Daten nicht gezeigt).

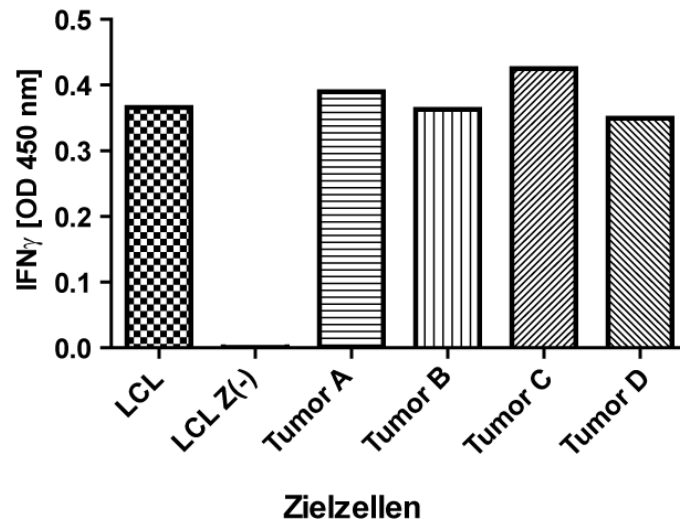


**Abbildung 6.10 Die Tumorzellen unterschieden sich von LCL in der Expression verschiedener Oberflächenmarker und in der Effizienz der Antigen-abhängigen CD4<sup>+</sup> T-Zellstimulation.**

(A) Einzelzellsuspensionen explantierter Tumoren sowie die ursprünglich injizierte LCL wurden durchflusszytometrisch auf die Oberflächenexpression von CD19, CD20, CD21, CD23 und CD80 sowie HLA-Klasse I und II hin untersucht. (B) LCL und Tumorzellen wurden mit steigenden Mengen an Peptiden beladen, anschließend mit Peptid-spezifischen CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen kokultiviert und die Zytokinsekretion der T-Zellen (GM-CSF und IFN $\gamma$ ) mittels ELISA bestimmt. Die reduzierte Expression von HLA-Klasse II-Molekülen auf der Oberfläche der Tumorzellen resultierte in einer verringerten Antigen-abhängigen Stimulation von CD4<sup>+</sup>, aber nicht von CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

### 6.2.1.3 Die Erkennung von explantierten Tumorzellen durch CD4<sup>+</sup> T-Zellklone

Um zu überprüfen, ob EBV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Lage sind, Tumorzellen *ex vivo* zu erkennen, wurde Mäusen Tumorgewebe entnommen, mechanisch zerkleinert und die Zellen direkt als Zielzellen eingesetzt und die IFN $\gamma$ -Sekretion der T-Zellen im ELISA gemessen.



**Abbildung 6.11 Erkennung von BLLF1 auf isolierten Tumorzellen durch BLLF1-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen.**

Explantierte Tumoren wurden mechanisch zerkleinert und Einzelzellsuspensionen hergestellt.  $2 \times 10^5$  dieser Zellen wurden daraufhin mit  $1 \times 10^5$  Zellen des BLLF1-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellklons 1D6  $\ddot{u}$ N kokultiviert und mittels ELISA die IFN $\gamma$ -Sekretion und somit die Antigenerkennung durch die T-Zellen getestet. BLLF1 1D6 T-Zellen erkannten LCL sowie Tumorzellen verschiedener Mäuse (von Tumor A-D) in gleichem Ausmaß.

In Abbildung 6.11 wurde die Erkennung von Tumorzellen durch die EBV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen BLLF1 1D6 im Vergleich zu LCL getestet. Zellen von Tumoren aus vier Mäusen wurden in gleichem Ausmaß wie die zum Tumor autologen LCL erkannt. Obwohl in vorherigen Untersuchungen eine Reduktion der HLA-Klasse II-Expression auf den hier untersuchten Tumorzellen nachgewiesen werden konnte, schien die Erkennung von Tumorzellen durch autologe CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht beeinträchtigt zu sein. In den nachfolgenden Experimenten wurde die Reaktivität verschiedener T-Zellpopulationen *in vivo* getestet.

### **6.2.2 Test verschiedener T-Zellpopulationen *in vivo***

Um die Wirkung verschiedener T-Zellpopulationen in diesem Mausmodell zu untersuchen, wurde zunächst bestimmt, ob T-Zellen unmittelbar nach antigener Stimulation oder am Ende des Stimulationszyklus die größten therapeutischen Effekte zeigten. Dazu wurden polyklonale, EBV-spezifische T-Zellen an Tag 4 oder 11 nach Stimulation zeitgleich mit LCL in die Mäuse injiziert und das Überleben der Tiere beobachtet. Beide T-Zellpopulationen verlängerten das Überleben der Tiere in gleichem Ausmaß, unabhängig vom Aktivierungsstatus der T-Zellen (Daten nicht gezeigt). In allen folgenden Versuchen wurden T-Zellen vier Tage nach Stimulation verwendet.

#### **6.2.2.1 Test EBV-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellklone *in vivo***

Ein *in vitro*-Effekt verschiedener EBV-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellklone gegenüber EBV-infizierten B-Zellen konnte bereits in früheren Studien der Arbeitsgruppe gezeigt werden (Adhikary et al., 2006).

Inwieweit diese T-Zellspezifitäten aber auch *in vivo* eine Rolle spielen, wurde bislang noch nicht detailliert untersucht. Deshalb wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellklone verschiedener Spezifitäten zeitgleich mit autologen LCL oder mit PBMCs in SCID-Mäuse injiziert, das Überleben der Tiere bestimmt und die sich entwickelnden Tumoren immunhistochemisch analysiert.

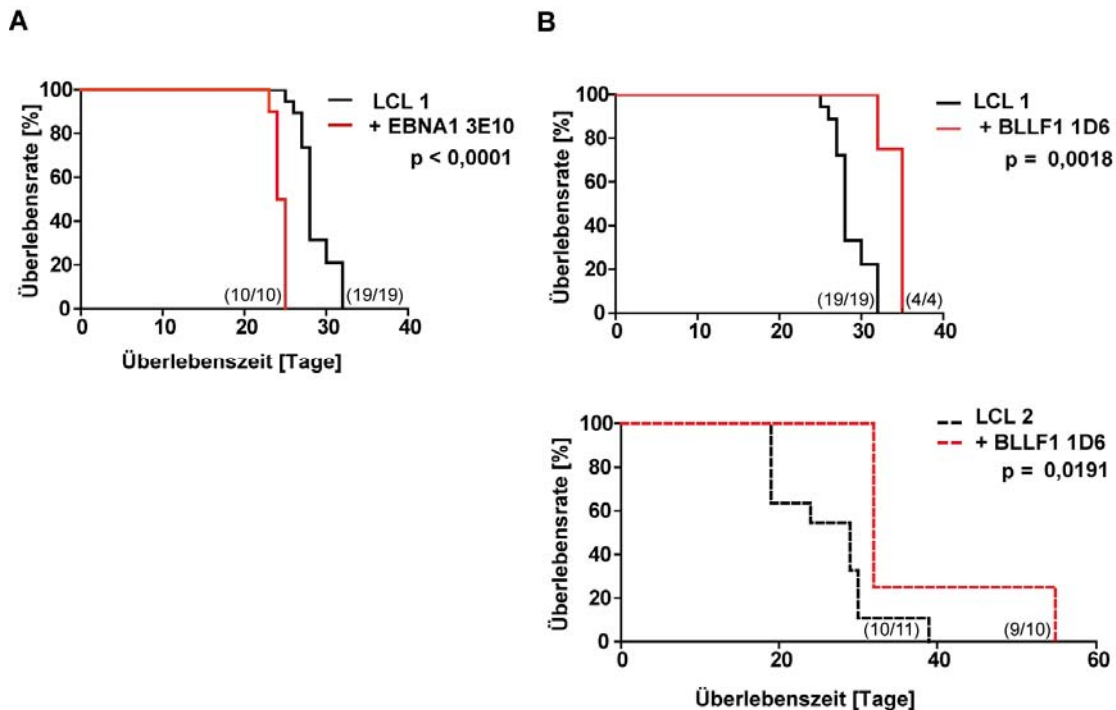
Zuvor wurden, wie bereits unter 6.1 beschrieben, die zu testenden Klone phänotypisch und funktionell untersucht.

##### **6.2.2.1.1 Die T-Zellklone zeigten unterschiedliche therapeutische Wirksamkeit**

Um die Wirksamkeit der erwähnten Klone auch im Tiermodell zu testen, wurden pro Maus  $1 \times 10^7$  T-Zellen zeitgleich mit  $1 \times 10^7$  LCL oder  $5 \times 10^7$  PBMCs desselben Spenders i.p. injiziert und die Dauer bis zur Abtötung der Mäuse aufgrund übermäßigen Tumorwachstums ermittelt.

Die Injektion des EBNA1-spezifischen T-Zellklons EBNA1 3E10 führte *in vivo* in wiederholten Versuchen (2 Versuche; insgesamt 10 Tiere) zu beschleunigtem Tumorwachstum und somit im Vergleich zur PBS-Kontrolle zu einem früheren Sterben

der Tiere. Durchschnittlich mussten die Tiere bereits an Tag 24,5 wegen erkennbarer Tumorerkrankung abgetötet werden.



**Abbildung 6.12 EBV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellklone zeigten unterschiedliche Tumor-protective Wirksamkeit *in vivo*.**

1x10<sup>7</sup> EBV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellklone wurden zeitgleich mit 1x10<sup>7</sup> LCL i.p. in Mäuse injiziert und die protektive Wirkung der T-Zellen auf das Tumorstadium bzw. auf das Überleben der Tiere ermittelt. Die Wirksamkeit des EBNA1-spezifischen T-Zellklons 3E10, sowie des BLLF1-spezifischen T-Zellklons 1D6 wurden dabei untersucht. Die Injektion des EBNA1-spezifischen Klon (A) führte zum beschleunigten Tumorstadium, während der T-Zellklon BLLF1 1D6 (B) eine tumorstadiumsverzögernde Wirkung zeigte. Die Wirksamkeit des Klon BLLF1 1D6 wurde mit unterschiedlichen, autologen LCL (LCL 1 und 2) getestet.

(x/y) x von y Tieren entwickelten Tumoren und wiesen hohe Titer an humanem IgG auf. Die Signifikanz ist durch p-Werte ausgedrückt, wobei p < 0,05 als signifikant gewertet wurde (Log-Rank-Test).

Wurde hingegen der BLLF1-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellklon 1D6 zeitgleich mit LCL injiziert, so überlebten die Mäuse länger (LCL 1: 28 Tage; + BLLF1 1D6: 35 Tage; LCL 2: 26,5 Tage; + BLLF1 1D6: 32 Tage).

Maximal 5 % aller Zellen einer LCL-Kultur treten bekanntermaßen in den lytischen Zyklus ein und setzen Virus frei. Antigene dieser Viruspartikel können dann auf benachbarten LCL präsentiert werden und somit zur Erkennung nicht lytisch infizierter Nachbarzellen durch Strukturantigen-spezifische T-Zellen führen (Adhikary et al.,



2006). Der Klon BLLF1 1D6 wurde in Kombination mit zwei autologen LCL getestet, die eine unterschiedliche lytische Aktivität aufwiesen (LCL 1 und 2). Das Überleben der Tiere konnte in beiden Ansätzen durch den T-Zelltransfer signifikant verlängert werden (Abbildung 6.12 B).

Interessanterweise ergab die immunhistochemische Analyse entnommener Tumorproben von zwei mit BLLF1 1D6-T-Zellen behandelten Tieren eine teilweise oder sogar vollständige Reduktion der Expression von BLLF1 auf den Tumorzellen im Vergleich zu LCL-induzierten Tumoren, die nicht mit BLLF1-spezifischen T-Zellen behandelt worden waren (Abbildung 6.13; 2. Reihe Spalte 2 und 3). Die Analyse einer dritten BLLF1 1D6-behandelten Maus zeigte keine Beeinträchtigung der BLLF1-Expression.

Um zu untersuchen, ob ausschließlich die Expression von BLLF1 beeinträchtigt war, wurden die Gewebe auch mit einem anti-BZLF1-Antikörper angefärbt. Während in einigen Tumorproben die Expression von BLLF1 komplett gestoppt war, schien die Expression von BZLF1 generell leicht reduziert zu sein. Möglicherweise wurde aufgrund der Interaktion der T-Zellen mit den Tumorzellen nicht nur weniger Virus produziert und freigesetzt, sondern auch die Anzahl an Zellen, die lytisch infiziert waren, vermindert.

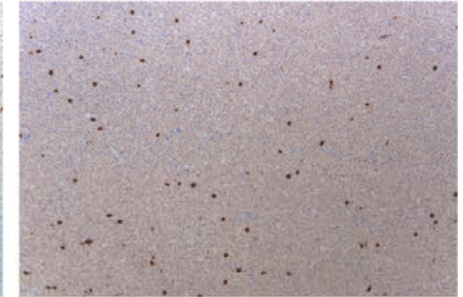
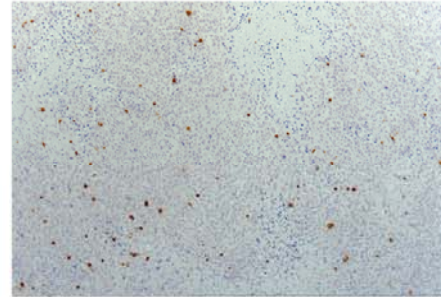
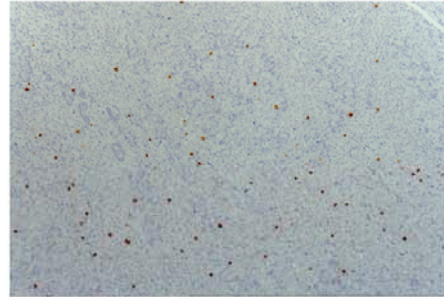
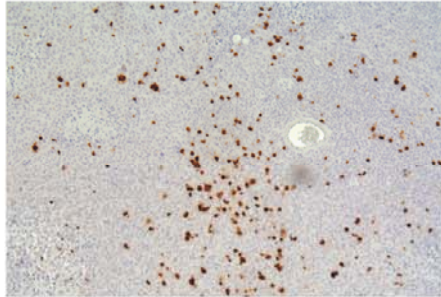
Um diese Resultate in der Klinik-näheren Modellvariante zu bestätigen, wurden humane PBMCs zeitgleich mit einer Linie HS oder mit einem der T-Zellklone, EBNA1 3E10 bzw. BLLF1 1D6, injiziert.

Mäusen, denen eine polyklonale EBV-spezifische Linie zeitgleich mit autologen PBMCs (n = 2) infundiert wurde, entwickelten bis zum Ende des Beobachtungszeitraums von 100 Tagen keine Tumoren. Wurde nur der T-Zellklon BLLF1 1D6 (n = 3) zeitgleich mit den PBMCs verabreicht, wurde in einem Tier ein Tumor-protektiver Effekt beobachtet, der aber in zukünftigen Experimenten noch bestätigt werden muss. Die Injektion von EBNA1 3E10 in drei Tieren führte dagegen bei gleichzeitiger Gabe von PBMCs oder LCL zu einem beschleunigten Tumorwachstum (Daten nicht gezeigt).

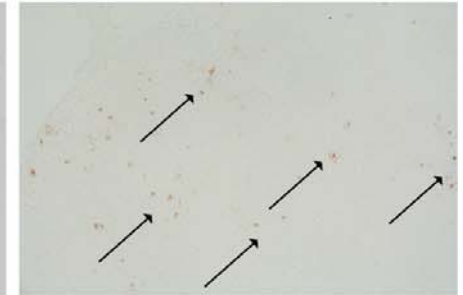
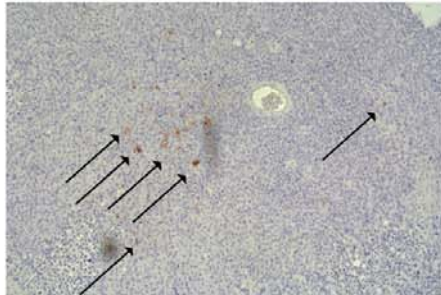
LCL-Tumor

LCL-Tumor + BLLF1 1D6

$\alpha$  BZLF1



$\alpha$  BLLF1



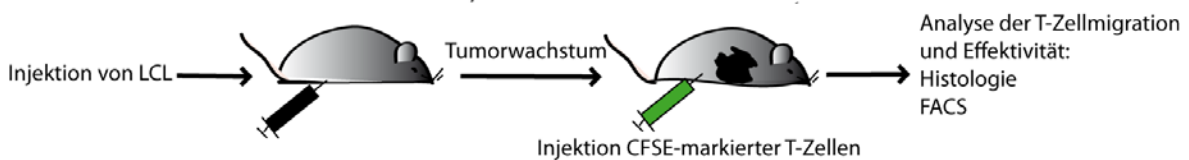
500  $\mu$ m

**Abbildung 6.13** BLLF1 war nach Verabreichung BLLF1-spezifischer T-Zellen bei zwei von drei Tumoren unterschiedlicher Mäuse kaum noch auf Tumorzellen detektierbar.

Mäusen, die LCL und zeitgleich BLLF1 1D6 injiziert bekommen hatten, wurde Tumorgewebe entnommen und immunhistochemisch auf die Expression von BZLF1 und BLLF1 hin untersucht. Im Vergleich zu Tumoren aus Mäusen, denen keine T-Zellen transferiert wurden (links), zeigten die Tumoren mancher Tiere (2 von 3 untersuchten) eine deutliche Reduktion der BLLF1-Expression (Zeile 2; Spalte 2 und 3). Die Expression von BZLF1 schien demgegenüber nur gering erniedrigt. Die BLLF1-Expression auf Tumorzellen der dritten Maus zeigte hingegen keine Beeinträchtigung; das Expressionsniveau war vergleichbar mit dem von Tumorzellen unbehandelter Mäuse. Ausgewählte Regionen BLLF1-positiver Zellen wurden mit Pfeilen markiert.

### 6.2.2.1.2 Die übertragenen T-Zellen wanderten in verschiedene Organe ein und überlebten mehrere Tage in der Maus

Aufgrund der konträren *in vivo*-Effekte der getesteten EBNA1- bzw. BLLF1-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellklone, wurde nachfolgend die Migration der T-Zellen in das Tumorgewebe, sowie die Überlebensdauer der T-Zellen untersucht. Aufgrund der konstanten Latenz bei der Tumorgenerierung durch LCL wurden die folgenden Versuche ausschließlich nach Injektion von LCL durchgeführt. Bei den untersuchten T-Zellen handelte es sich um den EBNA1-spezifischen T-Zellklon EBNA1 3E10, den BLLF1-spezifischen T-Zellklon BLLF1 1D6 sowie um eine polyklonale, EBV-spezifische T-Zelllinie.



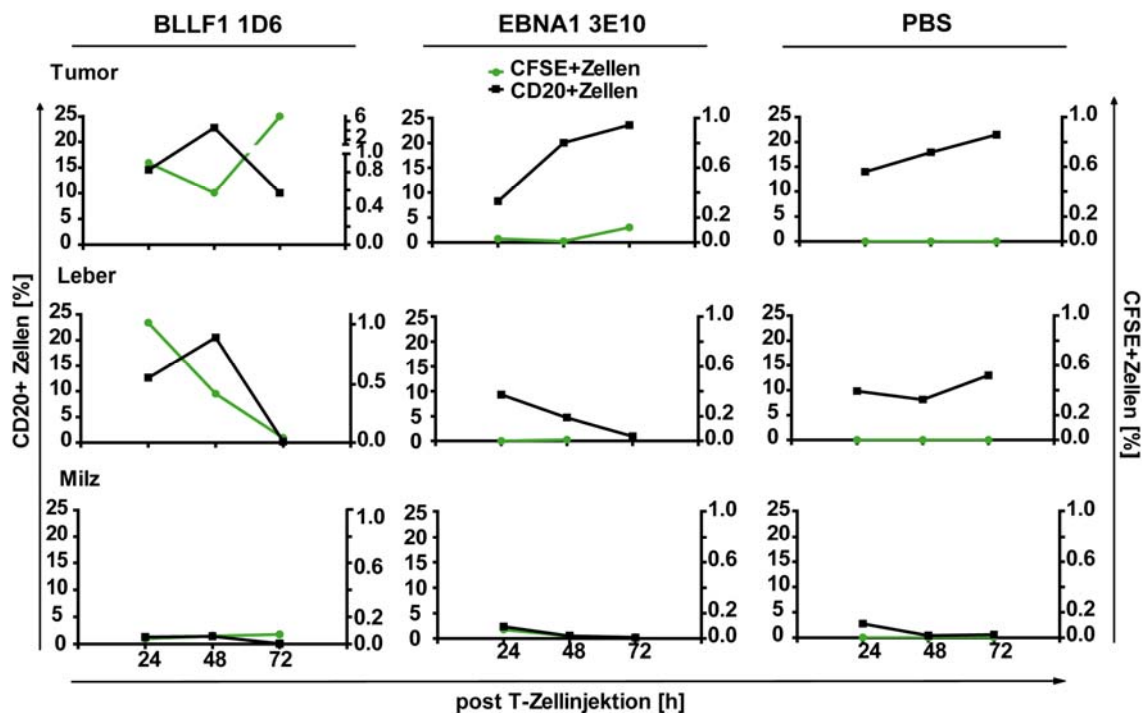
**Abbildung 6.14 Untersuchung der T-Zellmigration im Mausmodell.**

An Tag 0 wurden  $1 \times 10^7$  LCL intraperitoneal (i.p.), an Tag 25  $1 \times 10^7$  CFSE-markierte T-Zellen oder als Negativkontrolle PBS i.p. injiziert und die Mäuse 24, 48, 72 oder 96 h später abgetötet. Tumor, Ascites, Leber, Milz, Niere, Lymphknoten sowie Herzblut wurden entnommen und durchflusszytometrisch auf humane B-Zellen- und CFSE-positive T-Zellen hin untersucht. Zusätzlich wurde Tumorgewebe für immunhistochemische Analysen zum Nachweis der Infiltration CFSE-positiver Zellen entnommen.

Wie in Abbildung 6.14 gezeigt, wurden an Tag 0  $1 \times 10^7$  LCL intraperitoneal injiziert und an Tag 25  $1 \times 10^7$  CFSE-gefärbte T-Zellen ebenfalls i.p. appliziert. Vor Injektion der T-Zellen wurde Serum gewonnen und die huIgG-Titer bestimmt, die bei steigenden B-Zellzahlen mit der Tumorentwicklung korrelieren sollten.

24, 48, 72 oder 96 h nach T-Zellinjektion wurden die Mäuse abgetötet und Gewebe (Tumor, Ascites, Leber, Milz, Nieren, mediastinale Lymphknoten sowie Herzblut) entnommen. Die daraus hergestellten Einzelzellsuspensionen wurden durchflusszytometrisch auf die Anwesenheit von humanen B-Zellen sowie CFSE-markierten T-Zellen hin untersucht.

Um die Infiltration von T-Zellen in das Tumorgewebe zu zeigen, wurden außerdem immunhistochemische Analysen (anti-FITC und anti-CD45RO) der entnommenen Tumoren durchgeführt.



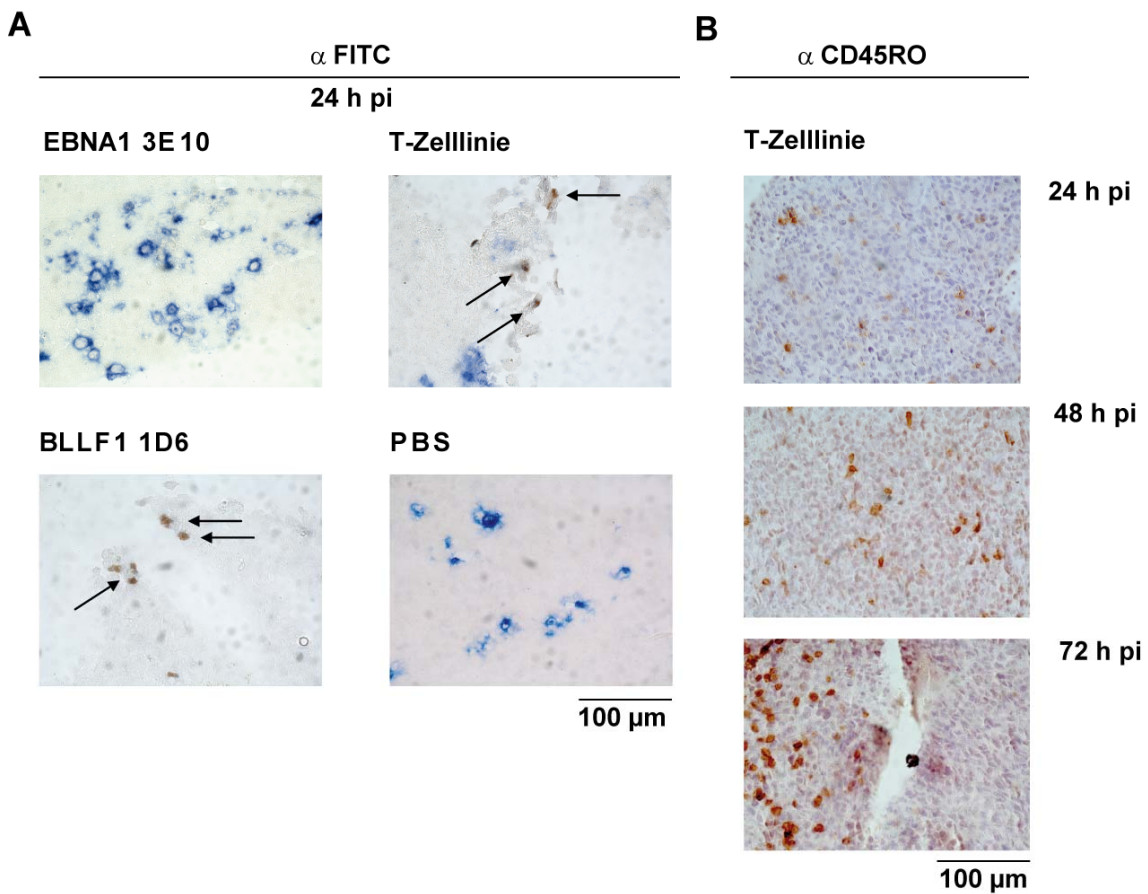
**Abbildung 6.15 Kinetik der Infiltration unterschiedlicher Organe durch EBV-spezifische T-Zellen.**

An Tag 0 wurden pro Maus  $1 \times 10^7$  LCL und an Tag 25 CFSE-markierte BLLF1 1D6-, EBNA1 3E10-T-Zellen oder als Kontrolle PBS injiziert. 24, 48 und 72 h nach T-Zellinjektion wurden die Tiere abgetötet und der Prozentsatz an CD20-positiven Tumorzellen (schwarz) und CFSE-markierten T-Zellen (grün) in Tumorgewebe, Leber und Milz durchflusszytometrisch untersucht. Während BLLF1 1D6 T-Zellen bereits nach 24 h im Tumor detektiert wurden, konnte eine schwache EBNA1 3E10-Infiltration erst nach 72 h beobachtet werden. In der Leber wurde lediglich eine Infiltration BLLF1 1D6-spezifischer T-Zellen detektiert. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt; durchflusszytometrisch wurden 10.000 lebende Zellen gezählt.

Die T-Zellen konnten in Ascites, Blut, Lymphknoten, Leber und den Tumoren nachgewiesen werden. Eine geringe Anzahl an T-Zellen infiltrierte außerdem die Nieren. Dagegen konnten in keinem Experiment CFSE-markierte Zellen in der Milz detektiert werden. In Abbildung 6.15 ist die Kinetik der T-Zellinfiltration für Tumor, Leber und Milz gezeigt. Die injizierten T-Zellen überlebten mindestens 72 h in der Maus. In einer weiteren Analyse wurden CFSE-positive Zellen auch noch nach 96 h detektiert. Während EBNA1-spezifische T-Zellen erst 48-72 h nach Injektion anfangen, in den Tumor einzuwandern, konnten BLLF1 1D6-T-Zellen bereits nach 24 h im

Tumorgewebe nachgewiesen werden. Zudem korrelierte die BLLF1 1D6-T-Zellinfiltration mit der Anzahl der B-Zellen in den Geweben. Eine ähnliche Korrelation wurde für die EBNA1-spezifischen T-Zellen nicht beobachtet.

Diese Ergebnisse konnten durch immunhistochemische Untersuchungen bestätigt werden. In Abbildung 6.16 wurden CFSE-markierte Zellen 24 h nach Injektion in Tumorgewebe nachgewiesen (anti-FITC-Antikörper).



**Abbildung 6.16 T-Zellinfiltration der Tumoren.**

(A) 24 h nach Injektion der T-Zellklone (EBNA1 3E10; BLLF1 1D6), der T-Zelllinie oder PBS wurden die Tumoren entnommen und immunhistochemisch die Infiltration CFSE-markierter Zellen (Braunfärbung) untersucht. CFSE-gefärbte Zellen (anti-FITC-Antikörper) wurden mit Pfeilen markiert. Zusätzlich wurde die Expression von BLLF1 (Blaufärbung) detektiert. (B) Darüber hinaus wurde die Infiltration durch den Nachweis von CD45RO-positiven Zellen (humane T-Zellen; Braunfärbung) gezeigt. Dargestellt ist hier die Infiltration von T-Zellen 24, 48 und 72 h nach Injektion der T-Zelllinie. pi: post Injektion

Zur Analyse der Gewebe wurden 10-15 Serienschnitte (Dicke 3-8  $\mu\text{m}$ ) angefertigt und gefärbt. Bei Mäusen, denen eine polyklonale, EBV-spezifische T-Zelllinie oder der  $\text{CD4}^+$  T-Zellklon BLLF1 1D6 appliziert worden war, konnte eine deutliche Tumordinfiltration nachgewiesen werden. Wurden hingegen EBNA1 3E10-T-Zellen injiziert, so konnten, wie auch in der PBS-Kontrolle, keine Zellen detektiert werden. Um zu bestätigen, dass es sich bei den CFSE-positiven Zellen um humane T-Zellen handelte, wurden die Schnitte zusätzlich auf CD45RO gefärbt.

Dadurch konnten 24, 48 und 72 h nach Injektion T-Zellen im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Allerdings wurden mit dem anti-CD45RO-Antikörper auch Zellen in Tumorschnitten von Mäusen detektiert, die EBNA1 3E10 erhalten hatten, und in deren Tumoren annähernd keine CFSE-positiven Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Diese Diskrepanz beruhte wahrscheinlich auf den unterschiedlichen Einbett- und Konservierungsmethoden der Gewebe, die beiden Färbungen vorausgingen oder auf unterschiedlichen Affinitäten der eingesetzten Antikörper.

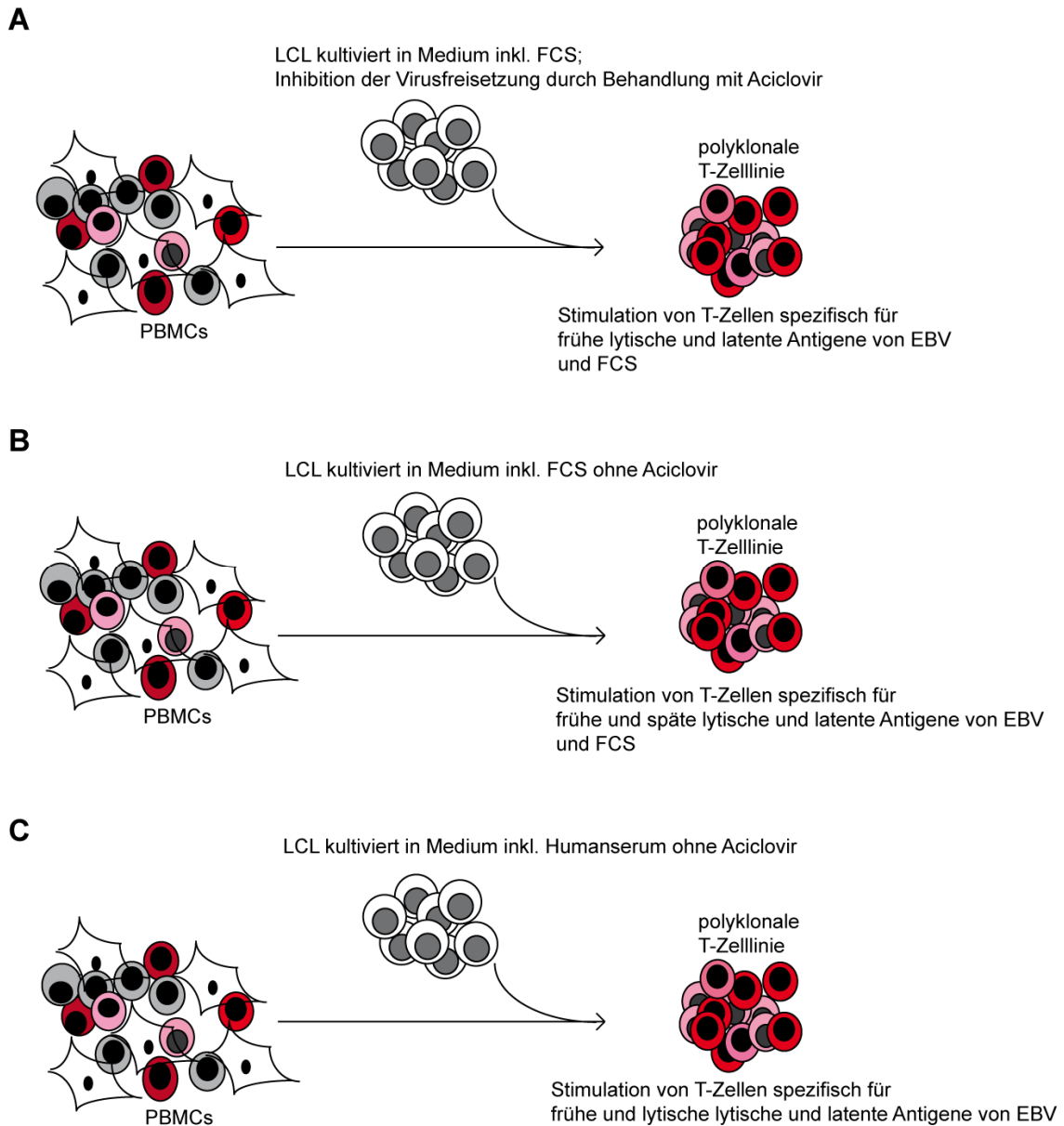
Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass beide T-Zellklone die Tumoren und auch andere Organe Antigen-spezifisch infiltrierten, wobei aufgrund der durchflusszytometrischen und der immunhistochemischen Untersuchungen die BLLF1-spezifischen T-Zellen schneller und in größerer Anzahl einwanderten.

#### **6.2.2.2 Vergleichende Analysen LCL-stimulierter T-Zelllinien**

EBV-spezifische T-Zelllinien werden prophylaktisch und therapeutisch zur Behandlung von PTLDs eingesetzt. Diese Linien werden meist durch wiederholte Stimulation von PBMCs mit autologen LCL generiert (Smith et al., 1995).

Aufgrund essentieller, Spezies-spezifischer Faktoren erfolgt die Kultivierung der humanen T-Zellen in Medien, denen humanes Serum zugesetzt ist. Dagegen erfolgt die Kultur der Stimulator-LCL meist in FCS-haltigem Medium (im Folgenden als LCL-FCS bezeichnet) (Gottschalk et al., 2003, Comoli et al., 2002), was zur Expansion FCS-reaktiver T-Zellen *in vitro* führen kann (Adhikary et al., 2008).

Um die Freisetzung infektiöser Viruspartikel zu verhindern, werden die Stimulatorzellen in den klinischen Protokollen für 14 Tage mit Aciclovir vorbehandelt (Collins, 1983, Bollard et al., 2004).



**Abbildung 6.17 Herstellung von polyklonalen EBV-spezifischen T-Zelllinien unter Verwendung unterschiedlich kultivierter Stimulatorzellen.**

Für den klinischen Einsatz generierte, EBV-spezifische T-Zelllinien werden in der Regel nach dem unter (A) dargestellten Stimulationsprotokoll hergestellt. Als Stimulatorzellen für PBMCs werden dabei autologe LCL eingesetzt, die in FCS-haltigem Medium kultiviert wurden. Zudem werden die Stimulatorzellen mit dem Virostatikum Aciclovir vorbehandelt, um die Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln zu unterbinden. Diese LCL können  $CD4^+$  T-Zellen stimulieren, die gegen FCS, frühe lytische oder Latenzantigene gerichtet sind, aber nicht  $CD4^+$  T-Zellen, die Strukturantigene von EBV erkennen. Um zu untersuchen, ob durch Abwandlung dieses Stimulationsprotokolls therapeutisch wirksamere T-Zelllinien generiert werden können, wurden als Stimulatorzellen LCL eingesetzt, die entweder in FCS- (B) oder Humanserum-haltigem Medium (C) kultiviert worden waren. Da keine Vorbehandlung mit Aciclovir stattfand, sollten in beiden Fällen  $CD4^+$  T-Zellen stimuliert werden, die gegen latente sowie frühe und späte lytische EBV-Antigene gerichtet sind. Darüber hinaus sollte durch die Verwendung von humanem Serum als Mediumzusatz in (C) die Stimulation von FCS-spezifischen T-Zellen unterbunden werden.

Aciclovir wird nach Phosphorylierung durch virale Thymidinkinasen in die virale DNA eingebaut und führt aufgrund einer fehlenden 3'-OH-Gruppe zum Kettenabbruch. Da die Expression der späten lytischen Gene erst nach DNA-Synthese einsetzt, werden keine Viruspartikel gebildet. Dieser Ansatz verhindert nicht nur die Virusproduktion, sondern aufgrund der fehlenden Antigenquelle auch die Stimulation Strukturantigen-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die wesentlich zur Kontrolle der EBV-Infektion *in vitro* beitragen (Adhikary et al., 2007, Adhikary et al., 2006).

Welche T-Zellspezifitäten für die erfolgreiche Behandlung von PTLDs *in vivo* essentiell sind, ist bislang nicht bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb in dem präklinischen Modell untersucht werden, ob die therapeutische Wirksamkeit der EBV-spezifischen T-Zelllinien durch eine unterschiedliche Vorbehandlung der Stimulator-LCL beeinflusst wird. Dazu wurden T-Zelllinien verschiedener Spender in den in Abbildung 6.17 dargestellten Ansätzen generiert. Die Behandlung der LCL mit Aciclovir unterbindet *in vivo* die Stimulation von T-Zellen, die gegen späte lytische EBV-Antigene gerichtet sind (Adhikary et al., 2008).

Um zu untersuchen, ob das therapeutische Potenzial der T-Zelllinien steigt, wenn sie Strukturantigen-spezifische T-Zellen enthalten, wurden T-Zelllinien durch Stimulation mit unbehandelten LCL generiert. Da es in beiden Ansätzen zu einer Reaktivierung FCS-spezifischer T-Zellen kommen kann, wurde zusätzlich eine T-Zelllinie durch Stimulation mit LCL in humanem Serum (LCL-HS) generiert.

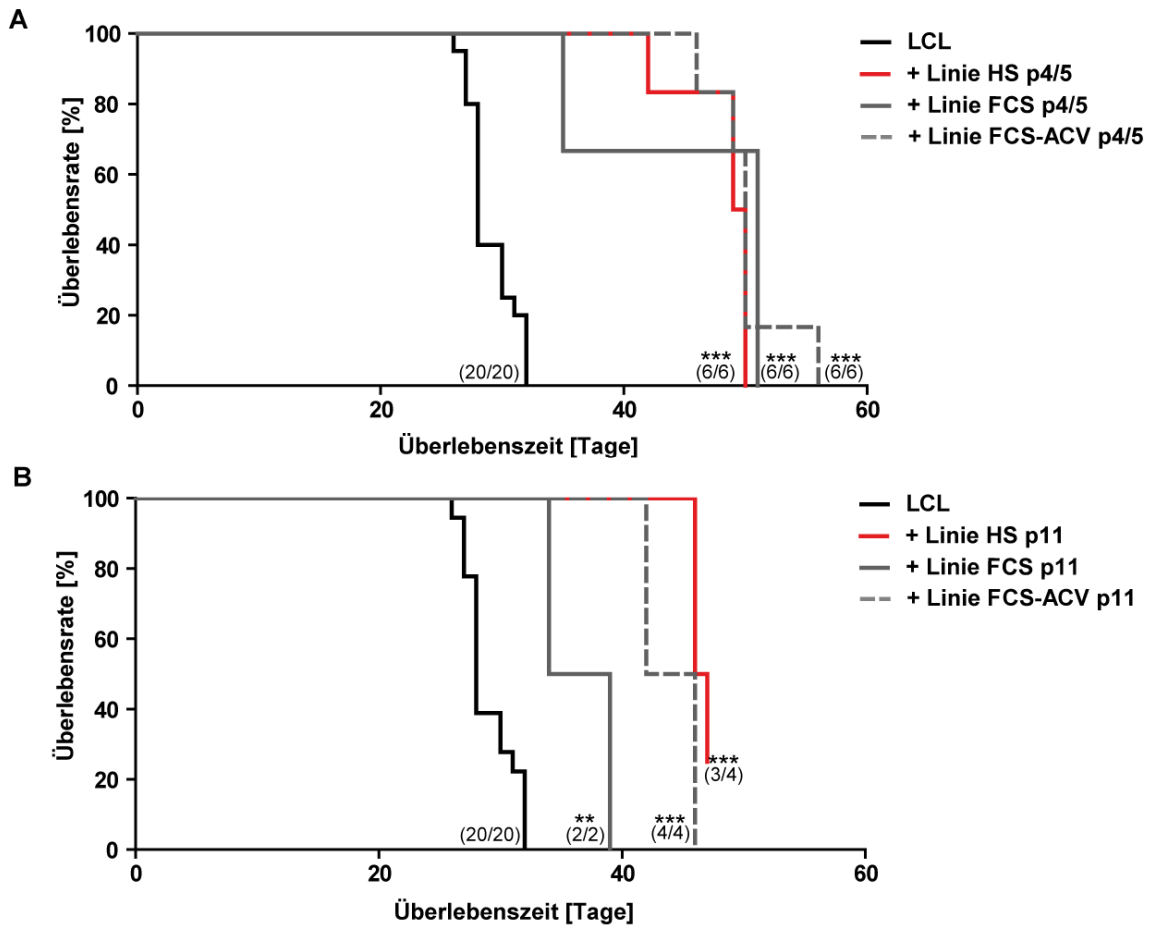
#### **6.2.2.2.1 Therapeutische Wirksamkeit der T-Zelllinien *in vivo***

Zunächst wurden die T-Zelllinien nach 4-5-maliger Passagierung zeitgleich mit autologen LCL, die in FCS-haltigem Medium kultiviert worden waren, in Mäuse injiziert und das Auswachsen der Tumoren analysiert. Wie in Abbildung 6.18(A) gezeigt, führten alle drei T-Zelllinien zum verlängerten Überleben der Tiere, durchschnittlich bis Tag 49,5 (Linie HS), 50 (Linie FCS-ACV) bzw. 51 (Linie FCS).

Um mögliche Effekte von FCS-reaktiven T-Zellen zu detektieren, wurden auch LCL, die in HS kultiviert worden waren, zusammen mit den T-Zelllinien verabreicht. Allerdings mussten bei diesem Versuch auf Anraten der Tierpfleger mehrere Tiere frühzeitig, aber ohne erkennbaren Tumor und mit negativen Ergebnissen für huIgG abgetötet werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der negativen IgG-Werte und des



dadurch ausgeschlossenen Vorkommens von humanen B-Zelltumoren in diesen Tieren, kann wahrscheinlich davon ausgegangen werden, dass die T-Zellen therapeutische Wirksamkeit besaßen und die Mäuse ebenfalls ein verlängertes Überleben gezeigt hätten.



**Abbildung 6.18** Die in den genannten Ansätzen generierten, EBV-spezifischen T-Zelllinien zeigten unterschiedliche therapeutische Wirksamkeit *in vivo*.

Zeitgleich mit  $1 \times 10^7$  LCL (Komplettmedium) wurden  $1 \times 10^7$  T-Zellen der Linien HS, FCS oder FCS-ACV entweder nach kurzzeitiger Kultivierung (Passage 4 bis 5) (A) oder nach insgesamt 11 Stimulationsrunden (p11) (B) adoptiv transferiert. Während T-Zelllinien früher Passage das Überleben der Mäuse signifikant und mit ähnlicher Effizienz verlängerten (A), zeigten sich nach längerer *in vitro*-Kultivierung der T-Zellen deutliche Unterschiede (B). Die Linie HS war in Passage 11 deutlich effektiver als die Linie FCS. Die Linien HS und FCS-ACV waren in Passage 11 ähnlich effektiv und führten zu einem deutlich längerem Überleben der Mäuse als die Linie FCS (Signifikanz: \*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; Log-Rank-Test)

Wurden die T-Zelllinien nach mehreren Stimulationen (Passage 11) *in vivo* getestet, zeigte sich in einem ersten Versuch ein Tumor-fördernder Effekt der T-Zelllinien, die mit LCL in FCS-haltigen Kulturmedium (+/- Aciclovir) stimuliert worden waren. Die Tiere mussten bereits an Tag 25 aus dem Versuch genommen werden (Daten nicht gezeigt). Ein zweiter Versuch zeigte zwar ein verlängertes Überleben der Tiere, aber wie in Abbildung 6.18(B) dargestellt, einen verminderten, antitumoralen Effekt der LCL-FCS-stimulierten gegenüber der LCL-HS-stimulierten T-Zelllinie, was bedeutet, dass offensichtlich nach häufiger LCL-HS-Stimulation therapeutisch besser wirksame Populationen auswachsen als nach häufiger LCL-FCS-Stimulation.

Bemerkenswerterweise führte der Transfer der häufig passagierten T-Zellen FCS-ACV im Gegensatz zu den T-Zelllinien FCS (p11) nur im erstgenannten Versuch zu einem deutlich verkürzten Überleben der Mäuse.

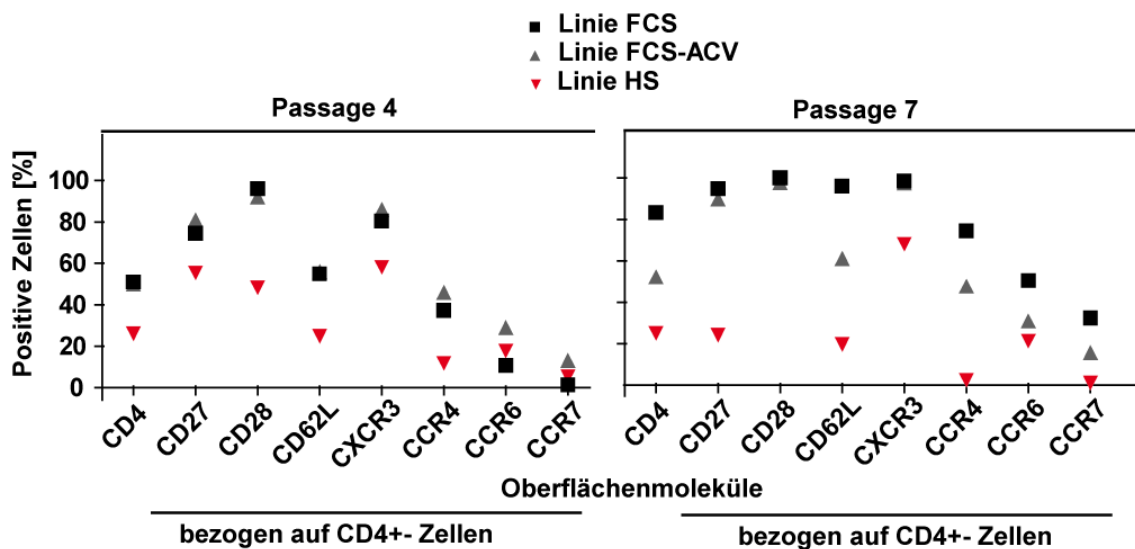
Die verminderte antitumorale Wirkung der Linie FCS beruhte somit wahrscheinlich nicht alleine auf der möglichen Stimulation und Expansion FCS-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen, da diese T-Zellen auch in den Linien FCS-ACV stimuliert worden wären und somit auch diese im Vergleich zur T-Zelllinie HS in beiden Versuchen einen verminderten, antitumoralen Effekt hätten zeigen müssen, sondern womöglich auch auf Unterschieden in Phänotyp und Funktionalität der T-Zellen.

### **6.2.2.2.2 Die T-Zelllinien FCS, FCS-ACV und HS wiesen unterschiedliche Phänotypen auf**

Bei der phänotypischen Analyse der Linien wurde auf die Oberflächenmarker zurückgegriffen, die bereits in Abschnitt 6.1.1 beschrieben wurden. Um die Entwicklung der unterschiedlichen T-Zelllinien zu beobachten, wurden sie nach kurzzeitiger (Passage 4) und längerfristiger (Passage 7) Kultivierung untersucht.

Im Fall des exemplarisch gezeigten Spenders wurden mehrere T-Zelllinien unabhängig voneinander untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Linien HS immer den geringsten Anteil an CD4<sup>+</sup> T-Zellen enthielten, gefolgt von FCS-ACV und FCS-Linien, wobei der Unterschied oftmals erst in späteren Passagen deutlich wurde. Da der CD4<sup>+</sup> T-Zellanteil der T-Zelllinie HS im Verlauf der Passagierung weiter abnahm, wurde die phänotypische Charakterisierung der T-Zelllinien bereits in Passage 7 durchgeführt. In Passage 11 wurden in der genannten T-Zelllinie lediglich < 10 % CD4<sup>+</sup> T-Zellen gemessen (Daten nicht gezeigt). Ebenso unterschieden sich die Expressionsmuster der

kostimulatorischen Moleküle. In den Linien HS nahm die Expression von CD27 häufig ab, wohingegen sie in den Linien FCS und FCS-ACV noch weiter zunahm. Im Gegensatz dazu stieg die Zahl der CD28-positiven Zellen in allen Linien mit der Anzahl an Stimulationsrunden und erreichte nach sieben Passagen annähernd 100 %. Nach vier Passagen wurde das *homing*-Molekül CD62L von allen T-Zelllinien nur schwach exprimiert. Nach sieben Passagen konnte eine deutlich verstärkte Expression dieses Moleküls auf den Linien FCS und FCS-ACV, nicht aber auf der Linie HS, beobachtet werden.



**Abbildung 6.19** Phänotypische Analyse der unterschiedlich stimulierten T-Zelllinien nach verschiedenen Passagen.

Die Expression verschiedener Oberflächenmarker auf den Zellen der Linien FCS, FCS-ACV und HS wurde durchflusszytometrisch nach vier bzw. sieben Passagen bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert und die Färbungen im FACSCalibur analysiert. Da die T-Zelllinien unterschiedliche Anteile an CD4<sup>+</sup> T-Zellen enthielten, wurden die Werte positiver Zellen auf den Anteil an CD4<sup>+</sup> T-Zellen bezogen. Während die T-Zelllinien nach kurzfristiger Kultivierung sich noch ähnlich verhielten, wurden nach Langzeitkultivierung deutliche Unterschiede beobachtet: Der Anteil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach häufigerer LCL-FCS-Stimulation war deutlich höher als nach kürzerer Passagierung. Ein Passage-abhängiger Unterschied bzgl. des CD4<sup>+</sup> T-Zellanteils konnte für die Linien HS und FCS-ACV nicht beobachtet werden. Linien, die mit LCL in FCS-haltigem Medium stimuliert worden waren, zeigten eine ausgeprägtere Expression von CD27, CD62L und CCR4. Die Expression der Moleküle CXCR3, CCR6 und CCR7 war hingegen nur leicht erhöht.

Das normalerweise auf Th1-Zellen vorkommende CXCR3-Molekül wurde auf allen Linien ähnlich hoch exprimiert. Dagegen konnte die Expression des Chemokinrezeptors CCR4 nur auf T-Zellen der Linien FCS und FCS-ACV detektiert werden, wobei das

Expressionsniveau mit dem im folgenden Abschnitt untersuchten Zytokinmuster der einzelnen Linien korrelierte. Die Expression von CCR6 konnte auf allen, die Expression von CCR7 auf keiner der untersuchten Linien nachgewiesen werden.

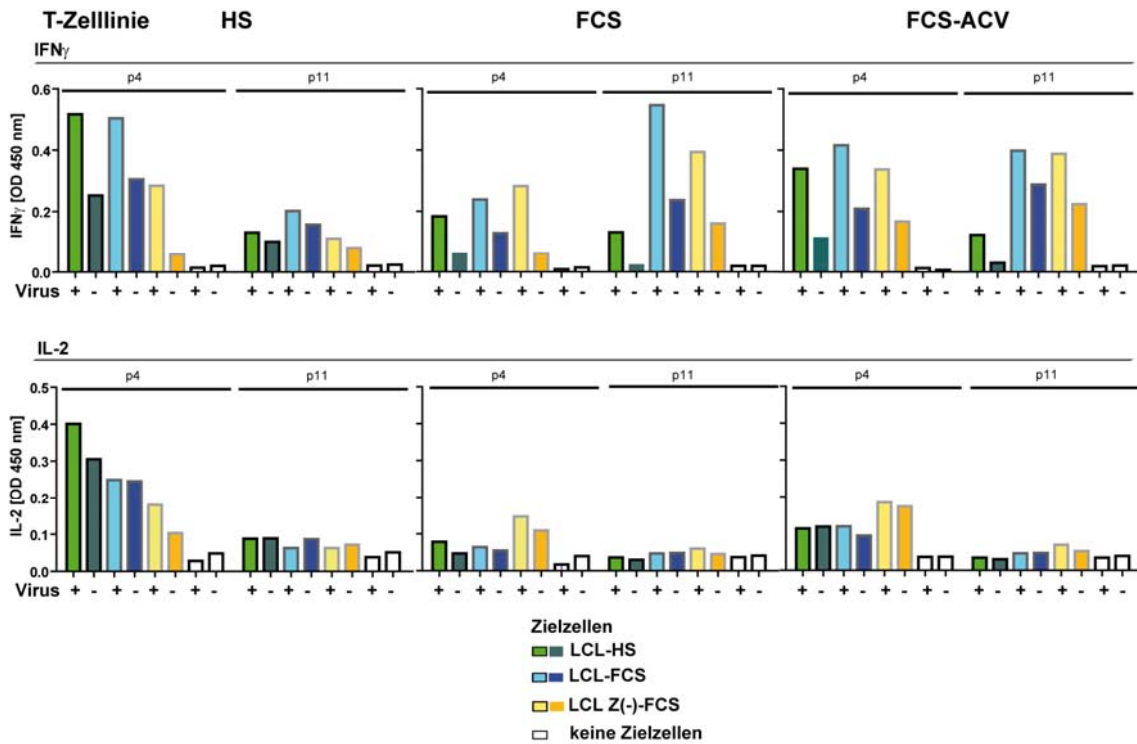
Nur auf T-Zellen, die mit LCL-FCS stimuliert worden waren, konnte eine Expression von CD25 und CD56 nachgewiesen werden, was möglicherweise auf die Expansion von Treg oder Natürlichen Killer-T-Zellen hinweisen könnte (Daten nicht gezeigt).

Ähnliche Ergebnisse wurden in unterschiedlichen Ansätzen und mit verschiedenen Spendern (JM, SL) erhalten. Teilweise konnten bereits in früheren Passagen deutliche Unterschiede im Phänotyp der verschiedenen T-Zelllinien detektiert werden.

#### **6.2.2.2.3 LCL-FCS- und LCL-HS-stimulierte T-Zelllinien unterschieden sich in ihren Zytokinmustern**

Um etwaige Unterschiede in ihren Effektorfunktionen festzustellen, wurden die von den verschiedenen T-Zelllinien sezernierten Zytokine nach antigener Stimulation im ELISA untersucht. Um darüber hinaus Hinweise auf die Antigenpezifität der Linien zu erhalten, wurden unterschiedliche Zielzellen eingesetzt: LCL-HS, LCL-FCS, sowie LCL Z(-), die in FCS-haltigem Medium kultiviert worden waren. Gemessen wurde die Sekretion typischer Th1- (IFN $\gamma$  und IL-2) und Th2-Zytokine (IL-4 und IL-10) (Ruschpler and Stiehl, 2002), sowie GM-CSF, TNF $\alpha$  und IL-17. Zudem wurde ein Teil der Zielzellen mit 10-fach konzentriertem Virusüberstand vorinkubiert, um die Präsentation viraler Strukturantigene zu verstärken. Dabei musste allerdings bedacht werden, dass das Viruskonzentrat auch größere Mengen FCS enthielt.

In Abbildung 6.20 ist die Th1-spezifische Reaktivität der T-Zelllinien gegen die erwähnten Zielzellen aufgetragen. Die Linien wurden nach kurzzeitiger Stimulation (p4) und nach Langzeitkultivierung (p11) getestet.



**Abbildung 6.20 Die verschiedenen T-Zelllinien unterschieden sich in der Sekretion typischer Th1-Zytokine.**

Die Zytokinsekretion der T-Zellen wurde nach Kokultivierung mit verschiedenen Zielzellen im ELISA getestet. Zielzellen [LCL-FCS (blau)- oder -HS (grün) bzw. LCL Z(-)-FCS (gelb)] wurden üN mit FCS-haltigem Viruskonzentrat beladen (+) oder unbehandelt (-) in den Versuch eingesetzt.  $1 \times 10^5$  Zielzellen wurden mit der gleichen Anzahl an T-Zellen für 24 h kokultiviert und anschließend IFN $\gamma$  und IL-2 im Überstand gemessen. T-Zellen früher (p4) und später (p11) Passagen wurden hierbei verglichen. Die Linie HS zeigt ein ausgeprägtes Th1-Zytokinprofil mit deutlicher Sekretion von IFN $\gamma$  und IL-2 nach Passage 4 und vermutlich aufgrund fortschreitender Differenzierung sowie steigender CD8<sup>+</sup> T-Zellanteile eine reduzierte Zytokinsekretion nach Passage 11. T-Zelllinien, die durch Stimulation mit LCL-FCS generiert worden waren, sezernierten kaum IL-2 und nach der elften Passage nur noch IFN $\gamma$  in Antwort auf die Stimulation mit FCS.

Bei der Analyse des Zytokinprofils der T-Zelllinien konnten gleichzeitig die T-Zellreaktivität untersucht werden. Dabei war an der IFN $\gamma$ -Sekretion zu erkennen, dass alle drei T-Zelllinien in Passage 4 bei Viruszugabe deutlich besser reagierten. Unter allen drei Stimulationsbedingungen wurde nach Viruszugabe bei allen Zielzellen, besonders bei LCL Z(-), eine deutlich gesteigerte IFN $\gamma$ -Sekretion beobachtet. Auch wurden LCL unabhängig von ihren Kultivierungsbedingungen (LCL-HS und LCL-FCS) ähnlich gut erkannt. Die Tatsache, dass LCL-HS mit und ohne Viruszugabe ähnlich gut erkannt wurden wie LCL-FCS, sprach dafür dass nicht das FCS im Viruskonzentrat, sondern virale Antigene für die bessere Erkennung verantwortlich waren.

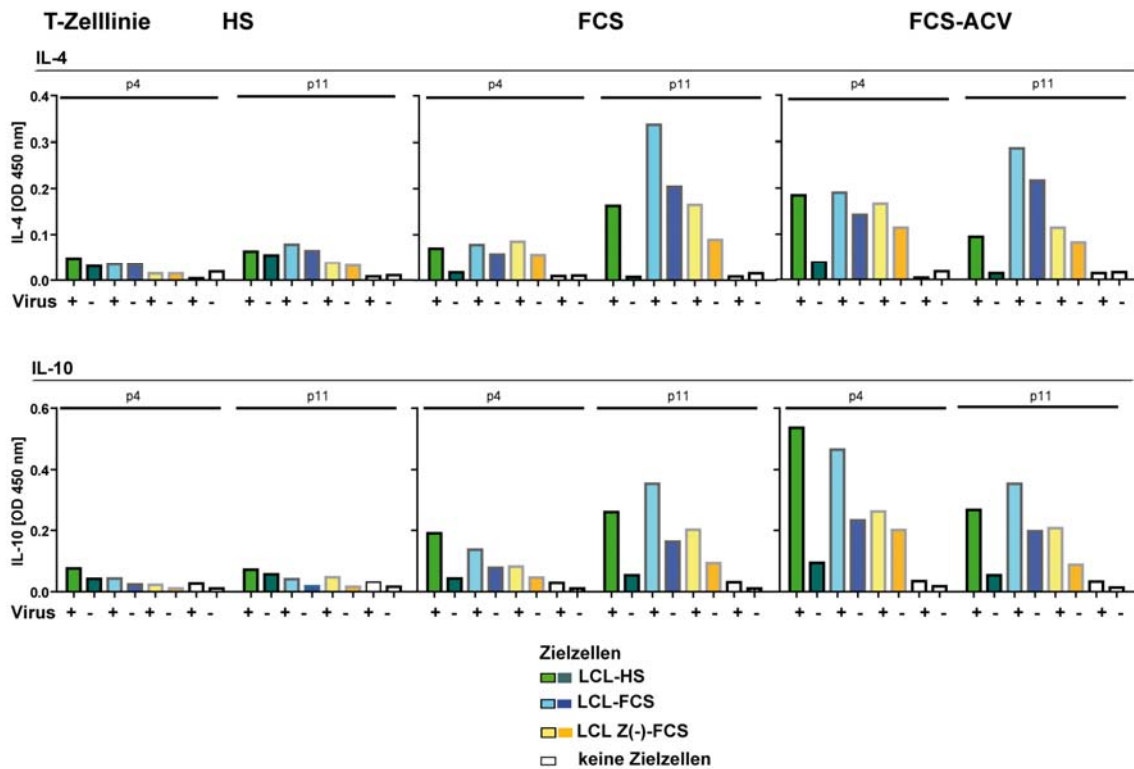
Nach längerer *in vitro*-Kultivierung (p11) kam es zu einer Verschiebung der T-Zellreaktivität und -Spezifitäten. Nach 11 Passagen nahm die sezernierte Zytokinmenge der Linie HS im Vergleich zu Passage 4 ab, was womöglich auf dem, im FACS nachgewiesenen, höherem Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Daten nicht gezeigt) beruhte.

Bei den mit LCL-FCS und LCL-FCS-ACV stimulierten Linien konnte eine deutliche Verschiebung von EBV- zur FCS-Reaktivität beobachtet werden: Lediglich LCL-FCS wurden von den T-Zellen später Passage noch erkannt. Dass die Zugabe von Viruskonzentrat zu einer deutlich verstärkten Zytokinsekretion führte, war wahrscheinlich vor allem durch die konzentrierten FCS-Proteine in diesen Ansätzen zu erklären.

Eine deutliche Sekretion von IL-2 war lediglich in der frühen Passage der Linie HS und nur nach Kokultivierung mit Virus-produzierenden (LCL-HS und LCL-FCS) oder Virus-beladenen (LCL Z(-) + Virus) Zielzellen zu detektieren. Die Abnahme der IL-2-Sekretion nach längerer Stimulation war durch die stärkere Differenzierung dieser Zellen oder aufgrund des erhöhten Anteils an CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Verlauf der Kultivierung zu erklären.

Da die T-Zelllinie HS zu keinem Zeitpunkt Th2-typische Zytokine ausschüttete (siehe Abbildung 6.21), wies sie einen Th1-Phänotyp auf. Bei den T-Zelllinien FCS und FCS-ACV war bereits in frühen Passagen eine Tendenz zur IL-4- und IL-10-Sekretion zu erkennen.

Nach Langzeitkultivierung der T-Zelllinien FCS und FCS-ACV kam es zu einer deutlich verstärkten Sekretion beider Zytokine, die wahrscheinlich auf FCS-reaktive Zellen zurückzuführen war. Dies wurde aufgrund der guten Erkennung von LCL in FCS-haltigem Medium und der fehlenden Erkennung von LCL in HS-haltigem Medium deutlich. Die Sekretion Th2-typischer Zytokine war nach 4 Passagen am ausgeprägtesten bei der Linie FCS-ACV und nach 11 Passagen bei der Linie FCS. Die Veränderung der IL-4- und IL-10-Sekretion korrelierte mit der veränderten Expression von CCR4 (Abbildung 6.19). Während die Expression von CCR4 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen der T-Zelllinie FCS-ACV annähernd konstant blieb, zeigten CD4<sup>+</sup> T-Zellen der T-Zelllinie FCS in Passage 11 eine deutlich verstärkte Expression dieses Oberflächenmarkers.



**Abbildung 6.21 Die Verwendung von LCL-FCS als Stimulatorzellen führte zur Expansion FCS-reaktiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einem Th2-Phänotyp.**

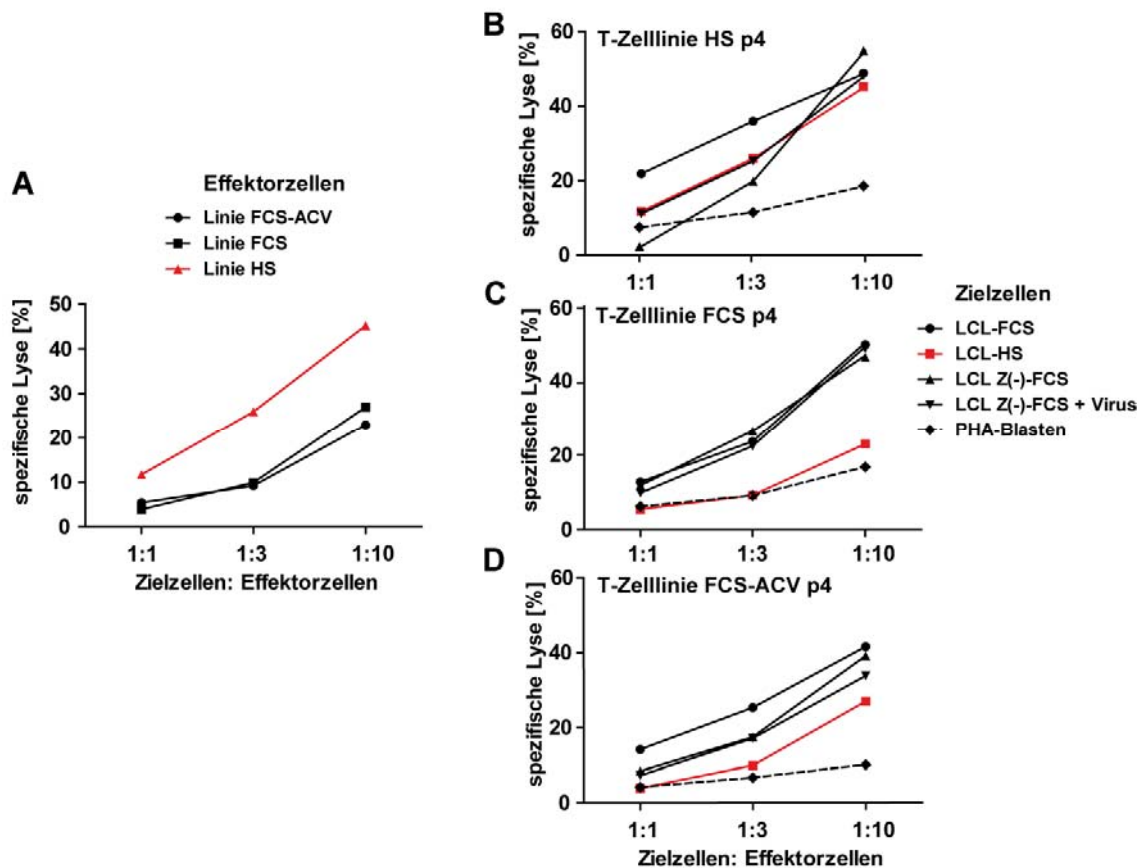
Die Zytokinsekretion der T-Zellen nach antigener Stimulation wurde nach vier bzw. elf Passagen im ELISA getestet. Zielzellen [LCL-FCS (blau) oder -HS (grün) bzw. LCL Z(-)-FCS (gelb)] wurden unN mit FCS-haltigem Viruskonzentrat beladen (+) oder unbehandelt (-) in den Versuch eingesetzt.  $1 \times 10^5$  Zielzellen wurden mit der gleichen Anzahl an T-Zellen für 24 h kokultiviert und anschließend die relative Menge an IL-4 und IL-10 im Überstand bestimmt. Eine Sekretion typischer Th2-Zytokine konnte für T-Zellen der Linie HS nicht nachgewiesen werden. Die Linien FCS und FCS-ACV hingegen zeigten mit steigender Passagenzahl eine deutliche Zunahme der IL-4- und IL-10-Sekretion, die wahrscheinlich auf der Erkennung von FCS beruhte, da LCL-HS ohne Zusatz von FCS-haltigem Viruskonzentrat nicht erkannt wurden.

Ähnliche Ergebnisse wurden mit den T-Zelllinien der Spender MF und SL erhalten. Lediglich der Übergang zu einem Th2-Phänotyp bei LCL-FCS-stimulierten T-Zelllinien war früher (SL) oder später (MF) als bei Spender JM eingetreten. Die Ursache hierfür könnte in einer unterschiedlichen Frequenz FCS-reaktiver-T-Zellen im peripheren Blut dieser Spender liegen.

#### 6.2.2.2.4 Die polyklonalen T-Zelllinien besaßen ein unterschiedlich stark ausgeprägtes Zytotoxizitätspotenzial

Neben der phänotypischen Analyse und der Bestimmung des Zytokinprofils wurde die lytische Aktivität dieser T-Zelllinien untersucht. Dazu wurden unterschiedliche Zielzellen mit Calcein gefärbt und die Fluoreszeinfreisetzung nach Kokultivierung mit den T-Zelllinien gemessen. Als Zielzellen wurden verwendet: LCL-FCS, LCL-HS, LCL Z(-)-FCS mit und ohne Virusbeladung sowie PHA-Blasten.

In Abbildung 6.22(A) wurden die lytischen Aktivitäten der unterschiedlich generierten T-Zelllinien in Passage 4 gegenüber LCL-HS miteinander verglichen.



**Abbildung 6.22 Die T-Zelllinien unterschieden sich in ihrem zytotoxischen Potenzial.**

Die Zytotoxizität der Linien wurde nach vier Stimulationsrunden (p4) mittels Calcein-Freisetzung fluorometrisch bestimmt. (A) Die spezifische Lyse von LCL-HS war bei Zellen der Linie HS am stärksten ausgeprägt. (B-D) Die T-Zelllinien lysierten Zielzellen (LCL-FCS oder -HS, LCL Z(-)-FCS +/- Virus; PHA-Blasten) mit unterschiedlicher Effizienz: PHA-Blasten wurden von keiner Linie lysiert. T-Zellen der Linie HS (B) lysierten alle eingesetzten Zielzellen (PHA-Blasten ausgeschlossen) ähnlich gut. (C) Die Linie FCS erkannte lediglich Zellen, die in FCS-haltigem Medium kultiviert worden waren. Die Zellen der Linie FCS-ACV (D) erkannten die in FCS kultivierten Zielzellen ebenfalls besser als die in HS kultivierten LCL. Allerdings wurden LCL-HS besser erkannt als PHA-Blasten.



Die Linie HS zeigte die stärkste lytische Aktivität, wobei nicht ausgeschlossen werden konnte, dass der darin enthaltene, erhöhte Anteil an  $CD8^+$  T-Zellen hierfür verantwortlich war.

Die Zytotoxizität der unterschiedlichen T-Zelllinien gegenüber verschiedenen Zielzellen (LCL, LCL Z(-), LCL Z(-) + Virus, PHA-Blasten) oder den Kultivierungsbedingungen der Zielzellen (FCS, HS) wurde in (B-D) untersucht.

In keinem der Ansätze wurde eine Reaktion gegen PHA-Blasten festgestellt. Die T-Zelllinie HS erkannte und lysierte alle Zielzellen gleich gut. Dagegen erkannten die Linien FCS und FCS-ACV die Zielzellen in HS deutlich weniger und lysierten die gleichen Zellen in FCS-haltigem Medium signifikant besser, was erneut auf eine starke FCS-Reaktivität hindeutete.

Auch in später Passage (p11; p13) erkannte die T-Zelllinie HS keine PHA-Blasten, während LCL-HS und LCL Z(-) +/- Virus ähnlich gut wie durch T-Zellen aus früher Passage lysiert wurden. LCL in FCS wurden dabei am schlechtesten erkannt. Auch in später Passage lysierte die Linie FCS LCL Z(-)-FCS, beladen mit FCS-haltigem Viruskonzentrat sehr effizient, während LCL-HS kaum lysiert wurden, was erneut eine FCS-Reaktivität der Effektorzellen nahelegte. Die Linie FCS-ACV zeigte in später Passage nur eine geringe Zytotoxizität und die verschiedenen Zielzellen wurden lediglich auf Hintergrundniveau der PHA-Blasten lysiert (Daten nicht gezeigt).

### **6.2.2.3 $CD4^+$ T-Zellen waren in der Tumorabwehr ebenso effektiv wie $CD8^+$ T-Zellen**

LCL-stimulierte T-Zelllinien von verschiedenen Spendern enthalten einen oftmals variierenden Anteil an  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen. Deshalb wurde nachfolgend untersucht, wie sich unterschiedliche  $CD4^+/CD8^+$ -Verhältnisse auf die Tumorabstoßung auswirken.

Dazu wurden T-Zelllinien verschiedener Spender durch die Stimulation von PBMCs mit autologen LCL-HS generiert. Vorangehende Experimente hatten gezeigt, dass diese Stimulationsmethode die Generierung von unerwünschten, FCS-spezifischen T-Zellen weitgehend verhindert.

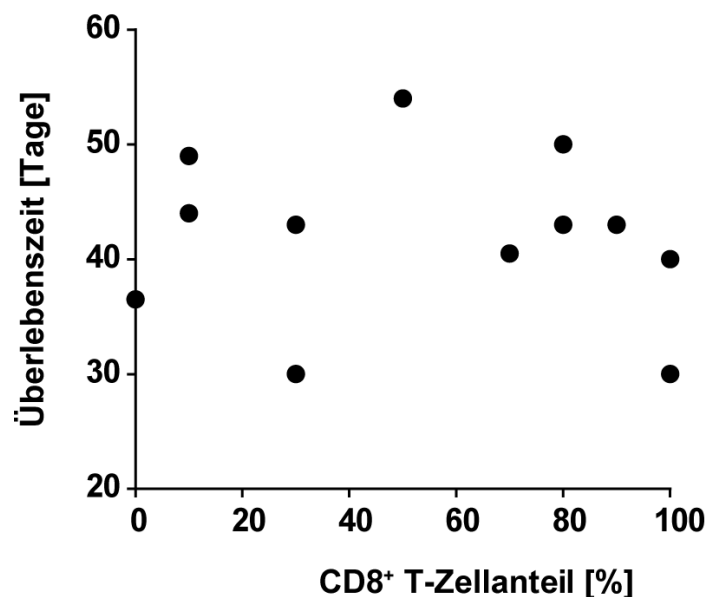
Nach zwei bis vier Stimulationsrunden wurde ein Teil der T-Zellen mittels MACS in  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellpopulationen separiert und getrennt voneinander weiter

stimuliert. Die ursprüngliche T-Zelllinie wurde ebenfalls weiterkultiviert. Der Erfolg der Separation wurde durch FACS-Analyse (anti-CD3, -CD4, -CD8-Antikörper) verifiziert.

Um unterschiedliche  $CD4^+/CD8^+$  T-Zellverhältnisse zu erhalten, wurden die T-Zelllinien zum Zeitpunkt der Injektion in die Mäuse miteinander gemischt.

Bei Spender FL führte die Injektion von T-Zelllinien mit 60 %, 40 % und 20 %  $CD4^+$  T-Zell-Anteil zum Überleben aller Tiere. Lediglich die Injektion einer reinen  $CD8^+$  T-Zellpopulation führte zur Entwicklung einer PTLD. Aber auch diese T-Zellpopulation konnte das Überleben der Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe, der keine T-Zellen injiziert worden waren, verlängern (Daten nicht gezeigt).

In Abbildung 6.23 sind die Überlebenszeiten von Mäusen nach Injektion verschiedener Mischungen der  $CD4^+/CD8^+$  T-Zellen eines zweiten Spenders gezeigt.



**Abbildung 6.23 Das Überleben der Mäuse wurde durch  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen gleichermaßen verlängert.**

An Tag 0 wurden pro Maus  $1 \times 10^7$  in HS kultivierte T-Zellen zusammen mit  $1 \times 10^7$  LCL in die Tiere injiziert und die Effizienz der T-Zellen anhand des Überlebens der Tiere bestimmt. Das Überleben der Mäuse, abgebildet in Tagen, wurde abhängig vom Anteil an injizierten  $CD8^+$  T-Zellen aufgetragen. Die Kreise repräsentieren jeweils das mediane Überleben von Mausgruppen ( $n = 4$ ), denen verschiedene Mischungsverhältnisse injiziert worden waren. Reine  $CD4^+$  T-Zellpopulationen erzielten den gleichen Effekt *in vivo* wie reine  $CD8^+$  T-Zellpopulationen; außerdem konnte kein Mischungsverhältnis gefunden werden, das anderen überlegen war. Allerdings wurde deutlich, dass das Vorhandensein beider Populationen das Überleben der Tiere im Gegensatz zu den reinen T-Zelllinien verbesserte.

In diesem Beispiel verzögerten die T-Zellen das Tumorwachstum, verhinderten es aber nicht, was eine genauere Analyse der therapeutischen Wirksamkeit der unterschiedlichen T-Zellverhältnisse ermöglichte.

CD4<sup>+</sup> T-Zellen erwiesen sich in diesen Experimenten bemerkenswerterweise als ähnlich effizient wie CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Dabei wurde auch deutlich, dass reine CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulationen weniger lebensverlängernd wirkten als die meisten Mischungen. Diese Ergebnisse wurden mit den T-Zelllinien eines dritten Spenders bestätigt. Entscheidend für eine hohe therapeutische Wirksamkeit scheint somit nicht ein bestimmtes CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Mischungsverhältnis, sondern das Vorhandensein beider Populationen zu sein.

### **6.2.2.4 Nicht-EBV-Antigene spielten in der T-Zellantwort ebenfalls eine entscheidende Rolle**

Durch die bisherigen Versuche konnte eine Rolle EBV-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Tumorabwehr *in vivo* gezeigt werden. Ob darüber hinaus auch T-Zellen mit anderen Spezifitäten eine Tumor-protective Funktion haben, sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden.

Von unserer Arbeitsgruppe (Adhikary et al., 2007), sowie von Long und Kollegen (2009) konnte bereits gezeigt werden, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die durch LCL-Stimulation generiert wurden, nicht nur EBV-spezifische, sondern auch Autoantigen-spezifische T-Zellen enthielten. Da im Gegensatz zu den durch LCL-Stimulation generierten CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien, die bislang untersuchten EBV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellklone das Überleben der Mäuse nur im Falle von BLLF1 1D6 verlängerten, stellte sich die Frage, welche T-Zellspezifitäten in den polyklonalen T-Zelllinien hierfür verantwortlich waren.

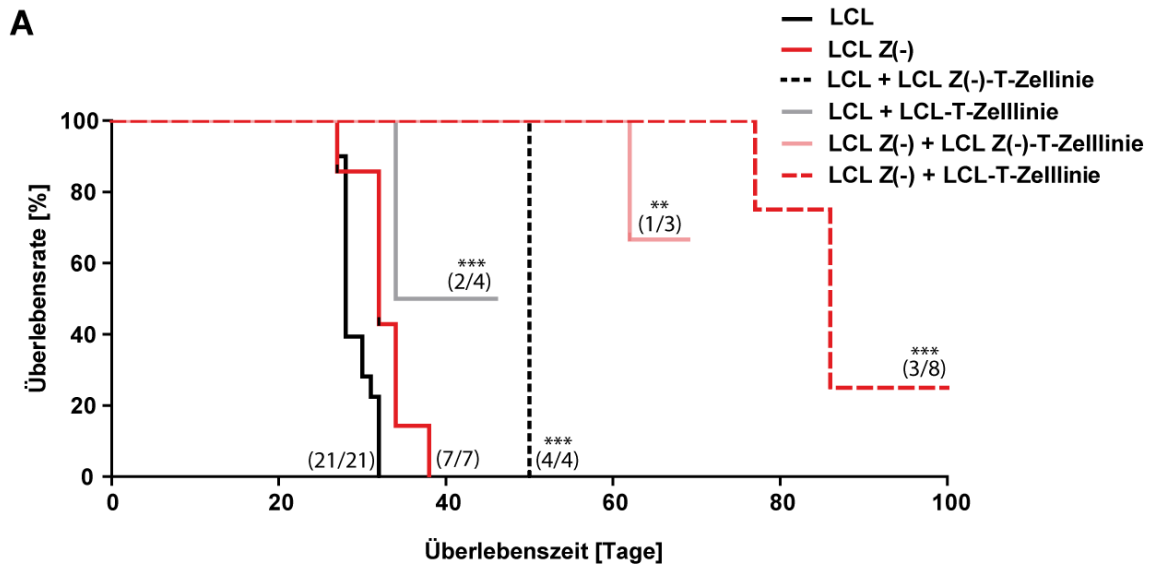
Deshalb sollte eine potenzielle antitumorale Wirkung autoreaktiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen im PTLD-Mausmodell untersucht werden. Dafür wurden T-Zelllinien durch Stimulation mit unterschiedlichen Zielzellen generiert und den Tieren injiziert. Neben LCL-stimulierten T-Zelllinien wurde eine T-Zelllinie durch Stimulation mit LCL Z(-)-Zellen als APC etabliert. Dabei ergaben sich vier verschiedene therapeutische Ansätze: (1) Die CD4<sup>+</sup> T-Zellfraktion (> 95 %) der LCL Z(-)-T-Zelllinie wurde mit LCL in die SCID-Mäuse injiziert und das Überleben der Tiere beobachtet. Außerdem wurden LCL Z(-)-

Zellen anstelle von LCL als Tumor-induzierende Zellen injiziert und vergleichend die Effizienz von zeitgleich injizierten CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulationen getestet, die durch (2) LCL- oder (3) LCL Z(-)- Stimulation generiert worden waren. Als letzte Variante (4) wurden LCL als Tumorzellen und die LCL-stimulierte Linie (> 60 % CD4<sup>+</sup> T-Zellen) zeitgleich injiziert. Alle in diesen Versuchen injizierten LCL oder LCL Z(-) wurden ausschließlich in Medium mit Humanserum kultiviert, um etwaige Effekte FCS-reaktiver T-Zellen ausschließen zu können.

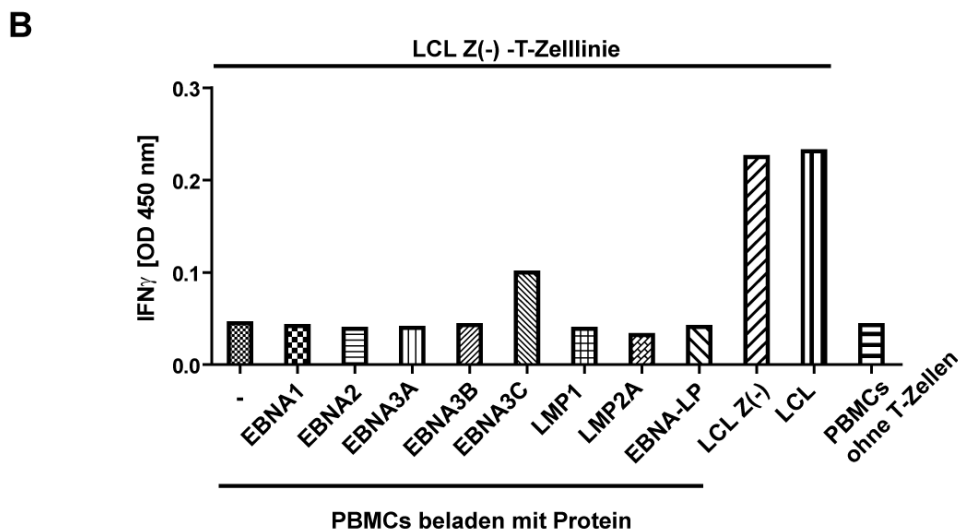
Die Injektion von beiden, LCL- bzw. LCL Z(-) -stimulierten T-Zellen, verzögerte das Wachstum LCL-induzierter Tumoren signifikant (LCL + LCL-Linie: 67,5 Tage; n = 4; LCL + LCL Z(-) -Linie: 50 Tage; n = 4).

Wurden LCL Z(-) zusammen mit LCL-stimulierten T-Zellen appliziert, so überlebten die Tiere in einem Experiment durchschnittlich 86 Tage (3 von 4 Tieren wiesen Tumoren auf) und wurden in einem weiteren ohne Tumornachweis (n = 4) abgetötet (in Abbildung 6.24 wurden beide Versuche vereint). Bei LCL Z(-) in Kombination mit einer LCL Z(-)-stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zelllinie, wurde ein Tier an Tag 62 mit Tumor und zwei weitere ohne Tumoren und lediglich geringen huIgG-Werten an Tag 69 aufgrund subjektiver Entscheidung der Tierpfleger aus dem Versuch genommen (n = 3). Aufgrund des Fehlens bzw. des niedrigen Titers an humanen Ig konnte davon ausgegangen werden, dass diese Tiere keine humanen Tumoren entwickelten.

Um zu untersuchen, ob die LCL Z(-)-stimulierten T-Zelllinien gegen virale Latenzantigene gerichtet waren, wurde die Erkennung von LCL, LCL Z(-), sowie mit EBV-Latenzproteinen beladenen, autologen PBMCs untersucht. Obwohl diese T-Zelllinie LCL und LCL Z(-) gut erkannte, wurde, mit Ausnahme einer schwachen Erkennung von EBNA3C, keine Reaktivität gegenüber Latenzantigenen detektiert. Aufgrund dessen konnte davon ausgegangen werden, dass diese Linie hauptsächlich gegen Autoantigene gerichtet war und diese Autoantigen-spezifischen T-Zellen das protektive Potenzial der Linie *in vivo* bedingten.



(x/y) x von y Tieren entwickelten Tumoren und wiesen hohe Titer an humanem IgG auf



**Abbildung 6.24 LCL- und LCL Z(-)-stimulierte T-Zelllinien verlängerten das Überleben der Tiere.**

(A) An Tag 0 wurden  $1 \times 10^7$  LCL bzw. LCL Z(-) als Tumor-induzierende Zellen zeitgleich mit  $1 \times 10^7$  LCL- oder LCL(-)-stimulierten T-Zelllinien in die Mäuse injiziert und das Tumor-protective Potenzial der T-Zellen anhand des Überlebens der Tiere analysiert. Die Kombination von LCL- und LCL Z(-) - T-Zelllinien mit LCL Z(-) als Tumor-induzierende Zellen zeigten dabei die besten therapeutischen Effekte *in vivo* (Signifikanz: \*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; Log-Rank-Test). (B)  $2 \times 10^5$  autologe PBMCs wurden für 24 h mit EBV-Latenzproteinen beladen, für weitere 24 h mit  $1 \times 10^5$  Zellen der LCL Z(-)-T-Zelllinie kokultiviert und die Antigenerkennung aufgrund der IFN $\gamma$ -Sekretion im ELISA bestimmt. Zur Kontrolle wurde außerdem die Erkennung von LCL Z(-) und LCL abgefragt sowie die Zytokinsekretion von PBMCs ohne Kokultivierung mit T-Zellen gemessen. Sowohl LCL Z(-) als auch LCL wurden von den T-Zellen der LCL Z(-)-Linie erkannt, aber eine Spezifität für latente EBV-Proteine (EBV-Protein-beladene PBMCs wurden mit Ausnahme von EBNA3C-beladenen nicht erkannt) weitestgehend ausgeschlossen. Lediglich EBNA3C wurde von der T-Zelllinie geringfügig erkannt und hatte daher eventuell zur Tumorprotektion beigetragen.

### **6.3 Analyse EBV-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen in peripherem Blut von Patienten mit Infektiöser Mononukleose und von klinisch gesunden Virusträgern**

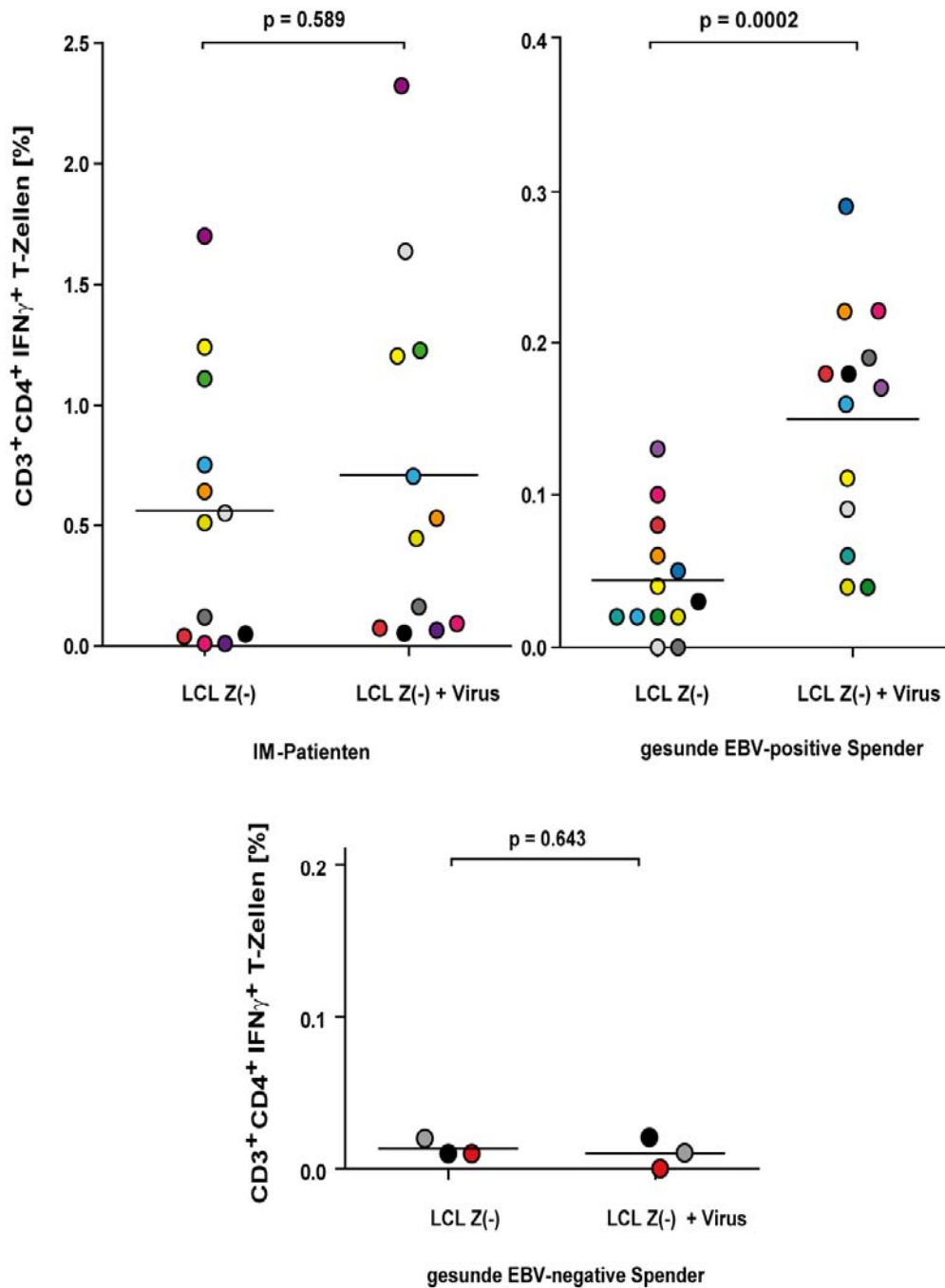
Die bereits in früheren Untersuchungen beschriebene Bedeutung von Strukturantigen-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Kontrolle der EBV-Infektion *in vitro* konnte in dieser Arbeit im murinen Modell *in vivo* untermauert werden. Alle bisherigen Untersuchungen wurden jedoch mit *in vitro* expandierten T-Zellen durchgeführt worden.

Um Einblicke in Frequenz, Funktion und Phänotyp dieser T-Zellen *in vivo* zu erhalten, sollte deshalb eine quantitative Bestimmung Strukturantigen-spezifischer T-Zellen im peripheren Blut von IM-erkrankten Patienten und klinisch gesunden Virusträgern mittels intrazellulärer Zytokinfärbung durchgeführt werden.

#### **6.3.1 Die CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort gegen EBV-Strukturantigene unterschied sich bei IM-Patienten und klinisch gesunden Virusträgern**

Da Strukturantigene nach Rezeptor-vermittelter Aufnahme von Viruspartikeln sehr effizient auf HLA-Klasse II-Molekülen präsentiert werden, wurden Virus-beladene, autologe LCL Z(-) zur Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus peripherem Blut von Patienten mit IM, EBV-seropositiven, klinisch gesunden Spendern, und EBV-negativen, klinisch gesunden Kontrollpersonen eingesetzt. Aufgrund der Deletion des *bzlf1*-Gens werden in LCL Z(-) zwar keine lytischen, aber alle EBV-Latenzproteine exprimiert. Durch die Verwendung von Virus-beladenen im Vergleich mit nicht beladenen LCL Z(-) als Stimulatorzellen konnte somit nicht nur die Frequenz Strukturantigen-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen, sondern auch die Frequenz Latenzantigen- bzw. Autoantigen-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen *ex vivo* ermittelt werden.

Da von IM-Patienten nur kryokonservierte PBMCs zur Verfügung standen, wurde auch das Blut gesunder Spender vor der Verwendung eingefroren und das von BD empfohlene Protokoll der intrazellulären Zytokinfärbung entsprechend modifiziert (siehe 5.2.2.2.2).



**Abbildung 6.25 Die EBV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort in Patienten mit akuter Infektiöser Mononukleose unterschied sich von der in klinisch gesunden Virusträgern.**

Kryokonservierte PBMCs von klinisch gesunden EBV-negativen und -positiven Spendern, sowie von akut IM-kranken Patienten wurden aufgetaut, in Medium bei 37°C inkubiert und am darauffolgenden Tag mit autologen LCL Z(-) bzw. Virus-beladenen LCL Z(-) für 6 h kokultiviert. Anschließend wurden CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ -produzierende Zellen durchflusszytometrisch quantifiziert. IM-Patienten (n = 12) zeigten eine deutlich nachweisbare T-Zellantwort gegen LCL Z(-), wobei keine signifikanten Unterschiede bei Verwendung unbeladener *versus* Virus-beladener Stimulatorzellen detektiert wurden. T-Zellen von klinisch gesunden EBV-seropositiven Spendern (n = 13) zeigten hingegen eine deutlich stärkere Reaktion auf Virus-beladene als auf unbeladene LCL Z(-). In EBV-seronegativen, klinisch gesunden Spendern (n = 3) konnten kaum reaktive T-Zellen gegen LCL Z(-) (+/- Virus) nachgewiesen werden. Die unterschiedlich gefärbten Symbole stehen jeweils für einen individuellen Spender. Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem, unverbundenem t-Test bestimmt. Die Balken zeigen die Mittelwerte an.

Die in Abbildung 6.25 angegebenen Frequenzen der reaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen entsprechen den gemessenen Werten abzüglich der positiven Werte IFN $\gamma$ -produzierender Zellen in unstimulierten PBMCs und der Werte nach Färbung mit Isotyp-Kontrollantikörpern.

Bei der Analyse der CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort in IM-Patienten wurden durchschnittlich 0,5608 % (n = 12) IFN $\gamma$ -positive T-Zellen nach Stimulation mit LCL Z(-) gemessen, wobei der Unterschied zu Virus-beladenen LCL Z(-) hier nicht signifikant war (0,7075 % bei n = 12; p-Wert: 0,5894; zweiseitiger, unverbundener t-Test). Sechs der 12 untersuchten Individuen zeigten keine erhöhte T-Zellantwort gegen lytische Antigene, während bei den restlichen sechs IM-Patienten eine mehr oder minder starke Reaktion gegen diese Antigene beobachtet wurde (Werte allgemein von 0,05 bis 2,32 %). Während zwei der untersuchten Individuen einen sehr ausgeprägten Anstieg der T-Zellantwort gegen lytische Antigene zeigten, konnten bei vier weiteren lediglich Erhöhungen von 0,01-0,12 % detektiert werden.

In gesunden, EBV-seropositiven Individuen (n = 13) wurden LCL Z(-) im Mittel von 0,04385 % der peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkannt. Die Reaktion gegen Virus-beladene und somit Strukturantigene-präsentierende Zielzellen führte im Mittel bei 0,15 % (n = 13) der CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur Ausschüttung von IFN $\gamma$  (p-Wert: 0,0002; zweiseitiger, unverbundener t-Test), wobei einige Spender eine kaum detektierbare, andere hingegen eine deutlich erhöhte CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort auf Virus-beladene LCL Z(-) aufwiesen. Anders als bei den Werten der IM-Patienten konnte unabhängig von der Höhe der Antwort immer eine mehr oder weniger verstärkte T-Zellreaktion auf Virus-beladene verglichen mit unbeladenen LCL Z(-) beobachtet werden, was auf eine CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort gegen virale Strukturantigene in allen gesunden Virusträgern hinwies.

Dagegen konnte in EBV-negativen Spendern erwartungsgemäß keine Strukturantigen-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort nachgewiesen werden, und auch die Zahl der T-Zellen, die gegen unbeladene LCL Z(-) reagierten, war gegenüber der Zahl bei der IM-Patienten und der gesunden Virusträger deutlich vermindert.



### 6.3.2 Während der Rekonvaleszenz kam es zu einer Verschiebung der T-Zellspezifitäten

Die im Vergleich zur latenten Infektion geringere Anzahl an Strukturantigen-spezifischen  $CD4^+$  T-Zellen in peripherem Blut von IM-Patienten deutete darauf hin, dass in dieser Kohorte entweder die Anzahl dieser T-Zellen generell niedriger ist oder sich die  $CD4^+$  T-Zellantwort gegen diese Antigene erst später ausbildet. Beides könnte dafür verantwortlich sein, dass die Primärinfektion in diesen Personen nicht asymptomatisch verläuft. Um diese beiden Möglichkeiten zu untersuchen, wurden PBMCs eines IM-Patienten während der klinisch manifesten Erkrankung sowie einen Monat und vier Monate danach analysiert. Die klinischen Symptome der IM waren zu den beiden letztgenannten Zeitpunkten abgeklungen.

Dieser IM-Patient zeigte im Vergleich zu anderen Patienten mit IM während der akuten Infektion eine relativ geringe  $CD4^+$  T-Zellantwort auf Virus-beladene und unbeladene LCL Z(-) (maximal 0,12 %). Aufgrund der niedrigen Frequenzen reaktiver T-Zellen wurden in diesen Analysen Dreifachbestimmungen durchgeführt.

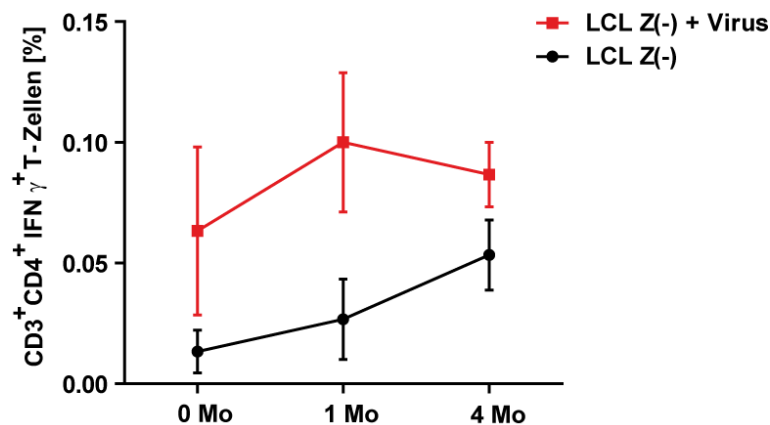


Abbildung 6.26 Die Virus-spezifische  $CD4^+$  T-Zellantwort während und nach akuter IM.

Von einem IM-Patienten wurden kryokonservierte PBMCs während der akuten IM (0 Mo) sowie ein (1 Mo) und vier Monate (4 Mo) nach Primärinfektion archiviert, aufgetaut, in Medium bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert und am darauffolgenden Tag mit autologen LCL Z(-) oder Virus-beladenen LCL Z(-) 6 h kokultiviert. Anschließend wurden die  $CD3^+CD4^+IFN\gamma$ -produzierenden Zellen durchflusszytometrisch quantifiziert. Es wurden für jeden Zeitpunkt Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken gekennzeichnet.

In diesem Patienten war einen Monat nach akuter Infektion der Anteil an CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die reaktiv gegen Strukturantigene waren, im Verhältnis zu denen, die durch LCL Z(-) aktiviert wurden, deutlich erhöht. Vier Monate nach IM hatte die Frequenz dieser T-Zellen wieder leicht abgenommen und lag im Bereich der bei gesunden Virusträgern gemessenen Frequenzen. Somit scheint die niedrige CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort gegen Strukturantigene während akuter Infektion zumindest in diesem IM-Patienten nicht auf eine generell fehlende, sondern einer zeitlich verzögerten Expansion dieser Population zu beruhen.

## **7. DISKUSSION**

Momentane Schätzungen gehen davon aus, dass etwa 15 % aller humanen Krebserkrankungen weltweit durch Viren verursacht werden (Javier and Butel, 2008). Obwohl über 90 % der humanen Bevölkerung mit dem onkogenen Epstein-Barr Virus infiziert sind, treten nur selten EBV-assoziierte Erkrankungen auf, da die Infektion in der Regel erfolgreich durch T-Zellen kontrolliert wird. Diese Einschätzung wird u.a. durch die Beobachtung untermauert, dass EBV-assoziierte B-Zelllymphome vermehrt in immunsupprimierten Patienten auftreten und zum Teil durch die Gabe EBV-spezifischer T-Zellen wieder geheilt werden können (Heslop, 2009, Brenner and Heslop, 2010).

### **7.1. Probleme der T-Zelltherapie EBV-assoziiierter Tumoren**

Trotz der klinischen Erfolge bei der Behandlung EBV-assoziiierter Lymphome in Transplantationspatienten mit EBV-spezifischen T-Zelllinien ist diese Form der Immuntherapie hauptsächlich aus zwei Gründen noch kein fester Bestandteil der klinischen Therapieprotokolle.

Zum einen nimmt die Generierung LCL-stimulierter T-Zelllinien mehrere Wochen in Anspruch, so dass eine Behandlung der oftmals rasch progredierenden Lymphome nur bei prophylaktischer Herstellung möglich ist, was allerdings mit einem hohen logistischen und finanziellen Aufwand verbunden ist. Alternativ wurden deshalb auch EBV-spezifischen T-Zellen von Fremdspendern mit partieller HLA-Übereinstimmung verabreicht, die in einer T-Zellbank vorgehalten werden (Wilkie et al., 2004). Die Verabreichung dieser allogenen T-Zellen verläuft in der Regel komplikationsfrei (Melenhorst et al., 2010). Allerdings persistieren diese allogenen T-Zellen nur kurzzeitig im Empfänger, da sie vom Immunsystem als körperfremd erkannt und eliminiert werden. Deshalb wird durch diese Behandlung keine antivirale Langzeitimmunität etabliert.

Zum anderen werden bei SOT-Patienten und bei Patienten mit EBV-assoziierten Tumoren der Latenzstufen I oder II deutlich geringere Ansprechraten erzielt als bei Patienten nach allogener HSCT-Transplantation bzw. bei Patienten mit EBV-assoziierten Tumoren des Latenzprogramms III. Bei SOT-Patienten wird hierfür die eingeschränkte Funktion der transferierten T-Zellen durch die iatrogene

Immunsuppression der Patienten verantwortlich gemacht. Deshalb gibt es Ansätze, die transferierten, EBV-spezifischen T-Zellen durch genetische Modifikationen resistent gegen die verwendeten Immunsuppressiva zu machen (Haque et al., 2007, Brewin et al., 2009, De Angelis et al., 2009).

Dass bei Tumoren, wie NPC oder HL, bislang nur geringe Ansprechraten erzielt wurden (Comoli et al., 2005, Rooney et al., 1998), beruht womöglich auf einer verminderten Immunogenität dieser Tumoren (Louis et al., 2010, Bollard et al., 2006). So werden Proteine der EBNA3-Familie, die die immundominanten Zielstrukturen der EBV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort darstellen, in diesen Tumoren nicht exprimiert. Eine effektive Behandlung dieser Tumoren setzt die Kenntnis und den gezielten Angriff der relevanten immunologischen Zielstrukturen voraus.

## **7.2 Die Bedeutung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Rahmen der EBV-Infektion**

Lange Zeit wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen nur als Helfer gesehen, die CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterstützen, Pathogene abzuwehren oder B-Zellen anregen, Antikörper zu produzieren. Dieser eingeschränkte Blickwinkel änderte sich einerseits durch die Entdeckung immer neuer CD4<sup>+</sup> T-Zellsubpopulationen, andererseits wird den CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittlerweile auch eine eigenständige Rolle in der Abwehr von Pathogenen aufgrund ihrer direkten Zytotoxizität zugeschrieben. Die EBV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort ist aber noch kaum untersucht.

### **7.2.1 Phänotypische und funktionelle Analyse EBV-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellklone**

Um nähere Einblicke in die Virus-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort zu erlangen, wurden aus EBV-positiven, klinisch gesunden Spendern etablierte, EBV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellklone phänotypisch und funktionell *in vitro* analysiert.

Diese Untersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, ob es sich bei EBV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen um eine homogene Zellpopulation mit definierten Eigenschaften, oder um ein heterogenes Gemisch an T-Zellen handelt.

Die EBV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden aufgrund des Expressionsprofils CD27<sup>-</sup>CD28<sup>+/-</sup>CD62L<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> in die Gruppe der Effektor- oder aufgrund der Expression von CD27<sup>-</sup>CD28<sup>+/-</sup>CD62<sup>+/-</sup>CCR7<sup>-</sup> in die Gruppe der Effektor-Gedächtniszellen eingeordnet. Charakteristisch für EBV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen war auch die fehlende Expression

von CD45RA und CD57. Verschiedene *homing*-Moleküle, wie CXCR3, CCR4 und CCR6, wurden unterschiedlich stark exprimiert. Die als Kontrolle mitgeführten, nicht-EBV-spezifischen T-Zellen aus peripherem Blut des gleichen Spenders wiesen dagegen einen weniger stark differenzierten Phänotyp auf.

Appay beschrieb, dass zytotoxische CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch den Verlust von CD27 und CD28 sowie eine fehlende Expression von CD57 charakterisiert sind (2004). Anhand dieser Oberflächenmarker konnte Appay CD4<sup>+</sup> T-Zellen unterscheiden, die gegen unterschiedliche Pathogene gerichtet waren. EBV-spezifische T-Zellen waren in diesen Untersuchungen hauptsächlich CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD57<sup>-</sup>CCR7<sup>+/-</sup> und Perforin-, Granzym A- und B-negativ. Weiterhin zeichneten sie sich durch eine starke IL-2-Sekretion aus, während CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegen CMV (Cytomegalievirus) stärker differenziert waren, was mit einem Verlust der kostimulatorischen und der Expression zytotoxischer Moleküle, sowie einer reduzierten IL-2- und einer verstärkten IFN $\gamma$ -Sekretion einherging (Appay, 2004, Amyes et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnte diese Klassifizierung EBV-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht bestätigt werden. Die untersuchten T-Zellklone unterschieden sich in ihrem Differenzierungsgrad deutlich von den eben erwähnten und verhielten sich ähnlich wie die CMV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der genannten Studie. Das zusätzlich analysierte Zytokinprofil der T-Zellen, welches durch eine ausgeprägte IFN $\gamma$ - und eine niedrige IL-2-Sekretion gekennzeichnet war, untermauerte den Widerspruch der eigenen Ergebnisse mit denen von Amyes.

Ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte in der verwendeten Methode zur Stimulation EBV-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu sehen sein. Dabei wurde von Amyes et al. (2003) ein kommerziell vertriebenes, nicht näher charakterisiertes Lysat aus EBV-infizierten Zellen als Antigenquelle verwendet. Möglicherweise sind T-Zellen, die allogene Antigene oder Spuren von FCS aus dem Kulturmedium der Produzentenzelllinie erkannten, in die Messung mit eingeflossen. Die verwendeten Lysate enthalten außerdem EBV-Proteine in undefinierten Mengen. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass zur Stimulation der Zellen unphysiologische Proteinkonzentrationen eingesetzt wurden, die zur Aktivierung niedrigaffiner oder kreuzreaktiver T-Zellen führte.

Darüber hinaus hatte die Charakterisierung der EBV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort durch Amyes und Kollegen ergeben, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die gegen lytische Antigene

gerichtet sind, eine stärkere Tendenz zur Expression von CD45RA aufweisen als Latenzantigen-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Amyes et al., 2003). Auch diese Befunde konnten in den eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Ob auch hierfür die Verwendung unterschiedlicher T-Zellstimulationsmethoden ausschlaggebend war, ist momentan noch unklar.

In mehreren murinen T-Zelltransfermodellen wurde beschrieben, dass terminal differenzierte T-Zellen geringere therapeutische Wirksamkeit besitzen als weniger differenzierte Zellen (Berger et al., 2008, Xie et al., 2010). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Effektorzellen, die aus naiven und nicht aus zentralen Gedächtniszellen entstanden, mehr antitumorales Potenzial zeigten (Hinrichs et al., 2010, Hinrichs et al., 2009). Dadurch stellte sich die Frage, ob bzw. welches therapeutische Potenzial terminal differenzierte, EBV-spezifische Effektor- bzw. Effektor-Gedächtniszellen besitzen.

Obwohl bei den, in der vorliegenden Arbeit verwendeten T-Zellklonen eine Abstammung von naiven T-Zellen ausgeschlossen werden konnte, und sie entweder von zentralen oder Effektor-Gedächtnis-T-Zellen abstammten, konnte hier eine therapeutische Wirksamkeit nachgewiesen werden. Ob diese T-Zellklone von zentralen oder Effektor-Gedächtniszellen abstammten, kann aber nicht bestimmt werden, da die untersuchten Zellen 14-tägig stimuliert wurden und der CCR7<sup>+</sup> Phänotyp nach antigener Stimulation und der anschließenden Umwandlung in Effektorzellen sehr schnell verschwindet (Sallusto et al., 2004). Womöglich könnten diese Zellen aber *in vivo* nachgewiesen werden. Ob sie im Vergleich zu naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen ein geringeres therapeutisches Potenzial besitzen, konnte in diesem Modell nicht untersucht werden.

### **7.2.2 Funktionelle Besonderheiten EBV-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Neben der phänotypischen Analyse wurde auch das Zytokinmuster der EBV-spezifischen T-Zellklone untersucht. Auffallend war hierbei, dass die Hälfte der untersuchten Zellklone typische Th1-Zytokine (v.a. IFN $\gamma$ ) sezernierte, während die anderen ein gemischtes Zytokinprofil von Th1- und Th2-Zellen (IFN $\gamma$  und IL-4) aufwiesen. In dieser und auch vorangegangenen Arbeiten dieser Arbeitsgruppe wurden die T-Zellen dabei bewusst unter nicht polarisierenden Bedingungen und unter Zusatz

äußerst geringer IL-2-Konzentration kultiviert, um eine mögliche Selektion oder Polarisierung durch *in vitro*-Bedingungen zu vermeiden. Der Phänotyp der T-Zellen blieb außerdem über Jahre konstant, was eine Veränderung durch die *in vitro*-Kulturbedingungen unwahrscheinlich erscheinen ließ.

Die Einordnung der T-Zellklone in die unterschiedlichen Effektorgruppen erfolgte dabei unabhängig von ihrer lytischen (siehe BLLF1 und BALF4; Abbildung 6.3) oder latenten (EBNA1 3E10: Th1; EBNA3B B9: Th1/Th2) Antigen-spezifität.

Dass ein solches charakteristisches, gemischtes Zytokinprofil bei EBV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen bislang nicht beschrieben wurde, könnte daran liegen, dass häufig eine Antwort gegen IFN $\gamma$  als typisches Zeichen einer Th1-Population gewertet und keine weiteren Zytokine untersucht werden, da ein Ausschluss von gleichzeitiger IL-4-Produktion beschrieben und damit eventuell vorausgesetzt wurde (Mosmann and Sad, 1996). Allerdings muss dabei bedacht werden, dass die strikte Trennung von Th1- und Th2-T-Zellen bzgl. ihrer Zytokinsekretion vorwiegend auf Untersuchungen in murinen Modellen beruht (Mosmann et al., 1986).

Die Rolle der EBV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Th1/Th2-Zytokinprofil in der Immunabwehr ist noch ungeklärt. Angenommen wurde bislang, dass Th1-T-Zellen Regulatoren der zellulären Immunität sind, während Th2-T-Zellen als Wächter der humoralen Immunantwort bezeichnet werden. Das gemischte Zytokinprofil der Klone könnte daher zur Aktivierung der zellulären und gleichzeitig der humoralen Immunantwort führen.

Während Th1-T-Zellen als direkte Effektoren eine Ausbreitung der EBV-Infektion durch die Elimination neu infizierter B-Zellen unterdrücken können, könnten Th1/Th2-T-Zellen über die Stimulation der humoralen Immunantwort zusätzlich zur Produktion Virus-neutralisierender Antikörper beitragen. IgG-Immunantworten sind gegen verschiedene EBV-Proteine gerichtet, und Antikörper gegen virale Glykoproteine sind in allen EBV-infizierten Personen nachweisbar.

Th2-Zytokine, v.a. IL4, induzieren den Isotypenwechsel zu IgG1-, IgG4- und IgE-Antikörpern, während IFN $\gamma$  zur Produktion von Immunglobulinen der Subklassen IgG2 und IgG3 führt (Finkelman et al., 1990, Farrar and Schreiber, 1993).

Interessanterweise konnten bei einer genauen Analyse der humoralen EBV-Antwort in gesunden EBV-positiven Spendern EBNA1-spezifische Antikörper der Isotypen IgG1,

IgG2 und IgG4 nachgewiesen werden (Lunemann et al., 2008). In IM-, sowie NPC-Patienten wurde hingegen eine signifikante Erhöhung von EBV-spezifischen IgG1-Antikörpern, bei NPC- und BL-Patienten eine verringerte Produktion von EBV-spezifischen IgG2-Antikörpern nachgewiesen (Kaschka et al., 1984, Kaschka et al., 1982).

Ob die EBV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einem gemischten Th1/Th2-Zytokinprofil sowohl direkte, zytotoxische als auch indirekte, humorale Immunaufgaben erfüllen, und ob die beschriebene Verschiebung der Ig-Isotypen der EBV-spezifischen IgG-Antikörper in Richtung IgG1 in manchen Tumorpatienten auf einer präferentiellen Aktivierung dieser Zellen beruht, ist momentan noch ungeklärt.

Erste Beschreibungen von T-Zellen mit einem Th1/Th2-Zytokinprofil, oft als Th0-Zellen bezeichnet, gliederten diese Zellen als Vorstufe der Th1- und Th2-T-Zellen ein und bezeichneten sie als schwach differenzierte Zellen (Miner and Croft, 1998). Häufig wurden sie auch als Artefakte der *in vitro*-Kultivierung angesehen, da die ersten Untersuchungen an *in vitro*-stimulierten Linien und Klonen durchgeführt wurden.

Mittlerweile häufen sich aber Publikationen, die solche Zellen im humanen System *in vivo* nachweisen konnten. Sie wurden bislang bevorzugt in Untersuchungen identifiziert, die mit viralen Infektionen im Zusammenhang standen. Beispielsweise wurden Th0-Zellen, die IFN $\gamma$  und IL-4 produzierten, als Bestandteil der Immunantwort gegen das Masernvirus beschrieben. Diese Zellen wurden als Th0-ähnliche (in Bezug auf die zuvor als Vorstufe ausdifferenzierter T-Zellen beschriebenen Th0-Zellen) und multipotente Zellen bzw. als Zellen, die nicht-irreversibel differenziert sind, beschrieben (Howe et al., 2005). Auch nach LCMV (lymphozytäres Choriomeningitis-Virus)-Infektion konnten Zellen gefunden werden, die einen hier als „Th2+1“ bezeichneten Phänotyp aufwiesen (Hegazy et al., 2010). Als Zellen mit unkonventionellem Zytokinprofil wurden sie in einer weiteren Publikation bezeichnet. Hier wurden diese T-Zellen und auch Klone noch 8 Jahre nach Vakzinierung (Peptidvakzinierung bei Krebserkrankung) detektiert (Kyte et al., 2009).

Ob es sich bei den vorliegenden, EBV-spezifischen T-Zellen um ursprünglich Th1- oder Th2-polarisierte T-Zellen handelte, die im Verlauf ihrer Differenzierung die Kapazität weitere Zytokine zu exprimieren, dazugewonnen haben, oder um den Phänotyp einer



eigenständigen, antiviral aktiven T-Zellpopulation, soll in zukünftigen *ex vivo*-Analysen geklärt werden. Dazu soll die IL-4-Sekretion in Frequenzanalysen EBV-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus peripherem Blut EBV-infizierter Individuen mit einbezogen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Charakterisierung der verschiedenen CD4<sup>+</sup> T-Zellklone außerdem gezeigt werden, dass bei allen Zellen die Expression von Granzym A und B sowie Perforin nachweisbar war, allerdings in unterschiedlichem Maße. In zwei näher untersuchten Klonen ergab sich außerdem ein Hinweis darauf, dass mehrere Tötungsmechanismen gleichzeitig genutzt werden können.

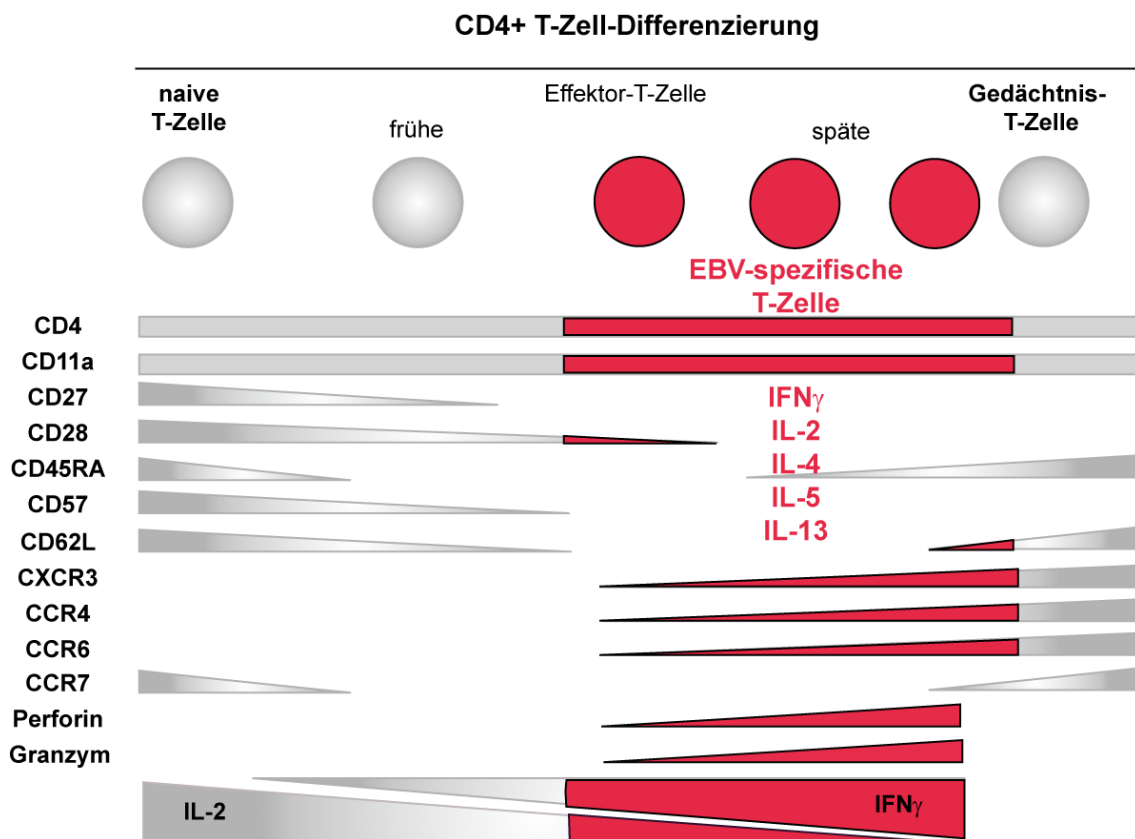
Bislang war unklar, ob EBV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen einen bevorzugten Tötungsmechanismus besitzen, oder ob sie auf unterschiedliche Mechanismen zurückgreifen können. Während einerseits vermutet wurde, dass EBV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen bevorzugt den Fas/FasL-Signalweg nutzten (Nikiforow et al., 2003), beschrieben andere die Perforin/Granzym-vermittelte Zytotoxizität als bevorzugt (Khanolkar et al., 2001). Andere konnten zwar eine HLA-Klasse II-restringierte, Concanamycin A- und EGTA-abhängige Zytotoxizität zeigen, aber lediglich Granulysin, nicht aber die Expression von Perforin nachweisen (Sun et al., 2002b). Allerdings wurden in diesen Arbeiten entweder einzelne T-Zellklone oder klonierte LCL-stimulierte T-Zellen, bei denen keine EBV-Spezifität nachgewiesen wurde, untersucht.

Granzyme können neben Perforin-abhängigen Funktionen auch direkte, Perforin-unabhängige, antivirale Effekte haben. Sie können virale und Wirt-Faktoren, die zur viralen Replikation benötigt werden, spalten oder inaktivieren (Andrade, 2010). T-Zellklone können somit antivirale Aktivität besitzen, ohne zytolytisch zu wirken. Während die Granzym B-vermittelte Toxizität Kaspase-abhängig ist, ist der Granzym A-Signalweg Kaspase-unabhängig. Granzym A aktiviert dabei den Zelltod, der im Mitochondrium beginnt. Der mitochondriale Metabolismus wird dabei unterbrochen und reaktive Sauerstoffmetaboliten (*reactive oxygen species*; ROS) freigesetzt. Am Ende führen diese ROS zu Einzelstrangbrüchen der DNA. Zellen, die gegenüber Kaspasen oder Granzym B aufgrund der Hochregulierung anti-apoptotischer Proteine resistent sind, können daher dennoch anfällig für Granzym A sein (Lieberman, 2010).

Die simultane Anwesenheit mehrerer Tötungsmechanismen sollte daher eine effiziente Eliminierung Virus-infizierter Zellen ermöglichen.

Aufgrund ihrer, zum Teil einzigartigen Zytokinmuster und variablen zytotoxischen Eigenschaften unterscheiden sich EBV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen deutlich von nicht-viralen T-Zellen. Außerdem ähneln sie nicht, wie bislang angenommen, Influenza- oder HCV (Hepatitis C-Virus) -spezifischen T-Zellen (Appay, 2004), sondern terminal differenzierten CMV-spezifischen T-Zellen.

Ein aufgrund dieser Arbeit neu erstelltes Modell zur Eingliederung der EBV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist in Abbildung 7.1 dargestellt.



**Abbildung 7.1 Phänotyp EBV-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen.**

Die EBV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnten als stark differenzierte Effektor- oder Effektor-Gedächtniszellen mit typischem Th1- oder aber einem gemischten Th1/Th2-Zytokinprofil klassifiziert werden. Der EBV-spezifische Phänotyp der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde rot hervorgehoben.

### **7.2.3 Die Frequenzen EBV-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut EBV-infizierter Personen unterscheiden sich abhängig vom Infektionsstatus**

In dieser Arbeit konnte in *ex vivo*-Analysen, in denen PBMCs aus peripherem Blut von IM-Patienten oder aber von EBV-seropositiven, klinisch gesunden Spendern untersucht wurde, gezeigt werden, dass sich die Antwort von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Phase der klinisch manifesten Primärinfektion von der während der klinisch inapparenten Viruspersistenz unterscheidet. Während bei frisch infizierten, IM-erkrankten Individuen die Erkennung verstärkt gegen zelluläre oder latente EBV-Proteine gerichtet war, wobei die Frequenzen der CD4<sup>+</sup> T-Zellen zwischen 0,05 und 2,32 % interindividuell schwankten, zeigten sich EBV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei klinisch gesunden Virusträgern deutlich reaktiv gegen virale Strukturantigene. Während Latenz- und Autoantigene nur mit einer Frequenz von durchschnittlich 0,044 % erkannt wurden, reagierten 0,15 % aller CD4<sup>+</sup> T-Zellen von gesunden Virusträgern auf Strukturantigen-beladene Zielzellen.

Allerdings konnte eine solche Tendenz in verschiedener Ausprägung auch bei der Hälfte aller untersuchten IM-Patienten beobachtet werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass erste Symptome der infektiösen Mononukleose erst mit einer Latenzzeit von 4-6 Wochen auftreten und man daher zum Zeitpunkt der Blutentnahme womöglich bereits mit einer fortgeschrittenen Immunantwort zu rechnen hat. Dies ist auch im Falle des Spenders AR zu beobachten, dessen PBMCs auf T-Zellreaktivität im Verlauf der EBV-Primärinfektion untersucht wurden. In diesem Beispiel wurde zum Zeitpunkt der klinisch manifesten Primärinfektion lediglich eine Frequenz reaktiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen von maximal 0,12 % detektiert, während andere IM-Patienten zum Teil eine Frequenz reaktiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen von >1 % aufwiesen. Womöglich hatte zum Zeitpunkt der Blutentnahme bereits die Entwicklung der Strukturantigen-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort eingesetzt, die im weiteren Verlauf noch zunahm und sich zwischen ein und vier Monate nach Erkrankung auf einem erhöhten Level einpendelte. Bestätigt wurden die Ergebnisse der Frequenzanalyse durch eine ähnliche Studie (Amyes et al., 2003), in der die primäre CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort gegen EBV bei IM-Patienten untersucht und mit 0,04-5,2 % und einem Mittelwert von 1,4 % bestimmt wurde. 4 Monate nach Infektion kam es zu einer mittleren Reduktion um das 4,2-fache. Bei gesunden Spendern konnten sie im Vergleich dazu Frequenzen von 0,05-1,26 % mit einem Mittelwert von 0,34 % bestimmen. Bei dieser Studie wurden allerdings wiederum

Zellysate zur Stimulation EBV-spezifischer T-Zellen verwendet, sodass nicht auszuschließen ist, dass nicht-EBV-spezifische Zellen aktiviert und gewertet wurden. Die Stimulation der PBMCs mit EBV-Peptiden zeigte bei klinisch gesunden Virusträgern eine erhöhte CD4<sup>+</sup> T-Zellreaktion gegen ein BLLF1-Peptid im Vergleich zu einem EBNA3C-Peptid, was, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte auf eine erhöhte T-Zellantwort gegen Strukturantigene während latenter Infektion hinweist.

Bei Precopio und Kollegen wurde eine bereits während IM vorhandene deutliche Antwort von CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegen lytische und latente Antigene detektiert, wobei die Antworten gegenüber einzelnen EBV-Proteinen, insbesondere gegen BZLF1, mit bis zu 1,75 % positiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zur vorliegenden Untersuchung unglaublich hoch erscheinen. Diese hohe Anzahl an positiven Zellen wurde aber womöglich durch den Einsatz zu hoher Proteinkonzentrationen als Stimulatorquelle oder durch die Aktivierung nicht-EBV- und/oder kreuzreaktiver T-Zellen aufgrund bakterieller Verunreinigungen der in *E. coli* hergestellten Proteine erreicht. EBV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen waren in den meisten Individuen bereits 6-12 Monate nach akuter IM nicht mehr detektierbar und auch nicht in gesunden, EBV-positiven Spendern nachweisbar. Allerdings war lediglich die Reaktion der T-Zellen gegen einzelne Antigene (BZLF1, BMLF1, EBNA1 und EBNA3A) gemessen worden (Precopio et al., 2003), die die immundominanten Glykoproteine nicht einschlossen. Da in der vorliegenden Arbeit Frequenzanalysen von Latenz- und Strukturantigen- aber nicht BZLF1-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen durchgeführt wurde, können diese Ergebnisse nicht abschließend bewertet werden.

Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal die CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort gegen die immundominanten lytischen Strukturproteine *ex vivo* detektiert und die Frequenzen abhängig vom Infektionsstatus bestimmt werden. Die im Verlauf der Primärinfektion beobachtete Expansion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die gegen Glykoproteine gerichtet waren, bestätigte *in vitro*-Ergebnisse (Adhikary et al., 2007), die eine Immundominanz viraler Strukturantigene in gesunden EBV-positiven Individuen nachgewiesen hatten.

In der eigenen Studie konnten bei IM-Patienten CD4<sup>+</sup> T-Zellantworten gegen virale Latenz- oder Autoantigene mit einer Frequenz von bis zu 1,7 % detektiert werden. In gesunden Virusträgern war die Frequenz der reaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf maximal 0,13 % reduziert. EBV-reaktive T-Zellen in gesunden, EBV-seropositiven Spendern

wurden auch in einer Studie von Leen und Kollegen untersucht, die in ELISpot-Analysen die Frequenzen einzelner, Peptid-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit 0,005-0,03 % bestimmten (Leen et al., 2001). Da nicht das gesamte Spektrum an Latenzantigenen, sondern lediglich die Antigene EBNA1, EBNA3C, LMP1 und LMP2 abgefragt wurden, und momentan noch unklar ist, wie viele verschiedene Latenzantigene durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen in einem Individuum erkannt werden, ist eine Interpretation dieser Ergebnisse problematisch.

#### **7.2.4 Wirksamkeit EBV-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen *in vivo***

Mit dem gut beschriebenen PTLD-SCID-Mausmodell wurden in der vorliegenden Arbeit die protektiven Wirksamkeiten verschiedener T-Zellpopulationen getestet. Allerdings wurde eine reduzierte HLA-Klasse II-Expression der Tumorzellen in LCL-SCID-Mäusen festgestellt. Dieser Effekt wurde wahrscheinlich durch die veränderte Umgebung in der Maus ausgelöst und scheint nicht auf eine mögliche Selektion eines bestimmten Zelltyps zurückzuführen sein, da eine anschließende *in vitro*-Kultivierung der Zellen den Effekt wieder rückgängig machte. Außerdem wurde der Effekt nicht bei PBMC-induzierten Tumoren beobachtet und ist auch nicht in humanen PTLDs zu erwarten (Merlo et al., 2010a).

##### **7.2.4.1 Wirksamkeit EBV-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

In der vorliegenden Arbeit zeigten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen gleiche therapeutische Wirksamkeit *in vivo*. In früheren Untersuchungen anderer Autoren hatten sich dagegen die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellfraktionen aus LCL-stimulierten T-Zelllinien als unterschiedlich wirksam erwiesen. So konnten die gemischten Linien, ebenso wie eine reine CD8<sup>+</sup>, nicht aber eine reine CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation das Auswachsen von Tumoren in einer tierexperimentellen Studie verhindern (Rencher et al., 1994). Die Spezifität der infundierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde in diesen Versuchen allerdings nicht untersucht. Auch konnte keine spezifische T-Zell-Zytotoxizität nachgewiesen werden. Darüber hinaus betrug die Inzidenz der durch LCL induzierten Tumoren lediglich 50 %.

Bei den Analysen der Wirksamkeit verschiedener T-Zellpopulationen wurden in der eigenen Arbeit nur LCL von Spendern verwendet, die eine Tumor-Inzidenz von mind.

75 % erreichten. Dabei führte die Injektion von verschiedenen CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zellmischungen in einem Spender in jeder Variante (4/6; 6/4; 2/8) zum Überleben der Tiere über den gesamten Beobachtungszeitraum von 100 Tagen. Lediglich eine Population CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen führte zum vorzeitigen Sterben der Tiere. Bei zwei weiteren Spendern führte keine T-Zellkombination zum tumorfreien Überleben der Tiere. Allerdings bewirkte die Injektion verschiedener CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulationen ein verlängertes Überleben der Tiere, was eine vergleichbare protektive Effektivität beider T-Zellpopulationen, sowie eine eigenständige und unabhängige, direkte Rolle der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei der Pathogenabwehr nahe legt. Dass das wirksamste Ergebnis erzielt wurde, wenn beide Populationen vorhanden waren, lässt sich durch die Notwendigkeit von Zytokinen und stimulatorischen Faktoren erklären, die von beiden Seiten geliefert und benötigt werden.

Diese Ergebnisse bestätigen die in einer klinischen Studie gemachten Beobachtungen, dass bereits ein geringer Anteil an CD4<sup>+</sup> T-Zellen in therapeutisch verabreichten T-Zelllinien von mehr als 1 % die Ansprechrate auf die Therapie von 25 auf 78 % erhöht. Eine Erhöhung des CD4<sup>+</sup> T-Zellanteils auf über 5 % führte lediglich zu einem Anstieg um weitere 14 % auf 92 % Ansprechrate (Haque et al., 2007).

Für zukünftige klinische Anwendungen sollte daher auf eine Generierung und Verabreichung von Linien mit gemischten Anteilen geachtet werden.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete ausgeprägte protektive Wirkung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen *in vivo* überraschte, da die Erkennung von HLA-Klasse II-restringierten Antigenen in dem LCL-SCID-Mausmodell aufgrund der bereits erwähnten, deutlich reduzierten HLA-Klasse II-Expression beeinträchtigt war, was auch in einer reduzierten Erkennung von spezifischen Antigenen nach exogener Beladung der Tumorzellen *in vitro* resultierte.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurden ebenfalls CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Fraktionen LCL-stimulierter, EBV-spezifischer T-Zelllinien in einem LCL-SCID-Mausmodell untersucht und eine reduzierte Wirksamkeit der CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet, was mit der reduzierten Expression von HLA-Klasse II-Molekülen auf der Oberfläche der auswachsenden Tumorzellen erklärt wurde (Merlo et al., 2010a). Allerdings wurden die Effektorzellen erst 4 Tage nach LCL-Injektion appliziert. Die Autoren bemerkten, dass die Verabreichung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bereits 6 h nach der Injektion von LCL zu einer vollständigen Tumorabwehr führte. Womöglich

hatte in diesem engeren Zeitfenster die Herabregulierung der HLA Klasse II-Moleküle noch nicht stattgefunden.

#### **7.2.4.2 Die therapeutische Wirksamkeit EBV-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

##### **7.2.4.2.1 EBNA1-spezifische T-Zellen beschleunigen das Tumorwachstum *in vivo***

EBNA1 ist das einzige virale Protein, das in allen EBV-assoziierten, malignen Erkrankungen exprimiert wird. Da Peptide von EBNA1 aufgrund einer repetitiven, internen Abfolge an Glycinen und Alaninen nicht auf HLA-Klasse I-Molekülen präsentiert werden und die Zellen somit unsichtbar für CD8<sup>+</sup> T-Zellen bleiben (Levitskaya et al., 1995, Levitskaya et al., 1997), rückten EBNA1-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den Blickpunkt immuntherapeutischer Ansätze.

EBNA1-spezifische T-Zellen konnten im peripheren Blut gesunder EBV-positiver Individuen nachgewiesen (Munz et al., 2000, Heller et al., 2007, Bickham et al., 2001), und EBNA1-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen von verschiedenen Gruppen isoliert und ihre lytische Aktivität durch Regressionanalysen und Aktivitäten gegen EBV-infizierte Zellen gezeigt werden (Khanna et al., 1995, Nikiforow et al., 2003, Demachi-Okamura et al., 2008).

Überraschenderweise wies in der vorliegenden Arbeit ein EBNA1-spezifischer T-Zellklon *in vivo* tumorwachstumsfördernde Eigenschaften auf. Die behandelten Tiere mussten zeitlich deutlich früher abgetötet werden als Tiere, denen keine T-Zellen verabreicht wurden. Bei diesem Klon handelte es sich um Zellen mit einem unauffälligen Th1-Profil, wie auch von anderen Gruppen beschrieben (Bickham et al., 2001). Auffällig war aber, dass diese EBNA1-spezifischen T-Zellen im Gegensatz zu dem *in vivo* protektiven T-Zellklon BLLF1 1D6 erst 72 h nach T-Zellinjektion im Tumorgewebe nachgewiesen werden konnten. Während ein zweiter EBNA1-spezifischer T-Zellklon keinen Effekt *in vivo* (weder positiv noch negativ) zeigte, konnten ähnliche Tumor-fördernde Eigenschaften auch bei einem BNRF1-, sowie einem EBNA3B-spezifischen T-Zellklon beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die beiden EBNA1-spezifischen Zellklone unterschieden sich nicht in Oberflächenmarkern oder ihrem Zytokinmuster und die Antigenerkennung von exogen beladenen Zielzellen war vergleichbar.

Warum in unseren Untersuchungen die Applikation des EBNA1-spezifischen T-Zellklons einen Tumor-fördernden Effekt zeigte, kann nur vermutet werden.

Entweder exprimierte dieser Klon tumorwachstumsfördernde Faktoren, Zytokine oder auch membranständige Liganden, die bislang *in vitro* nicht untersucht wurden und daher Unterschiede in den verschiedenen T-Zellklonen bisher unentdeckt blieben. Oder die *in vivo*-Effektivität wurden von Faktoren beeinflusst, die nach Injektion durch das Mausmilieu bei diesem, aber nicht oder weniger bei den anderen Klonen in ihrer Expression moduliert werden, wie es auch für das Molekül HLA-Klasse II beobachtet werden konnte.

Diese Ergebnisse waren auch deshalb unerwartet, weil von anderen Autoren in einem murinen BL-Modell eine tumorabwehrende Effektivität EBNA1-spezifischer T-Zellen bereits nachgewiesen worden war. Diese murinen T-Zellen wurden durch Immunisierung der Mäuse mit EBNA1-Peptid-beladenen DCs generiert. Dabei wurde nicht, wie in unseren Untersuchungen T-Zellklone, sondern eine EBNA1-spezifische T-Zelllinie verwendet, in der möglicherweise auch weitere T-Zellspezifitäten vorkamen. Die EBNA1-Expression wurde in diesem Modell durch eine retrovirale Transduktion der BL-Zelllinie verstärkt, wobei das erzielte Expressionsniveau nicht mit dem in humanen BL verglichen wurde (Fu et al., 2004). Somit kann eine unphysiologische Überexpression von EBNA1 und, aufgrund dessen, eine verstärkte Aktivierung EBNA1-spezifischer T-Zellen nicht ausgeschlossen werden. Dass die Überexpression von EBNA1 in Zielzellen zu einer besseren Erkennung durch die EBNA1-spezifischen T-Zellen führt, konnte bereits in vorangegangenen Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt werden (Mautner et al., 2004).

#### **7.2.4.2.2 Die Wirksamkeit BLLF1-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen *in vivo***

Aufgrund der beschriebenen Immundominanz von Strukturantigenen *in vitro* wurden auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die gegen solche Antigene gerichtet sind, *in vivo* getestet. Der adoptive Transfer des T-Zellklons BLLF1 1D6 in zwei unterschiedliche LCL-Tumormodelle (LCL 1 und 2) führte zu einem verlängerten Überleben der Mäuse. Außerdem konnte im Vergleich zu dem EBNA1-spezifischen T-Zellklon eine massive und deutlich schnellere Antigen-spezifische Infiltration der Tumoren nachgewiesen werden.



Aufgrund dieser nachweislichen Effektivität von Strukturantigen-spezifischen T-Zellen ist der Einsatz von virostatistischen Thymidinkinase-Inhibitoren, wie Aciclovir, bei der Generierung von EBV-spezifischen T-Zelllinien besonders problematisch. Durch die Unterdrückung der Virusproduktion wird das Auswachsen solcher T-Zellen unterdrückt. Dass mit Hilfe des BLLF1-spezifischen T-Zellklons kein absolutes Überleben der Mäuse erreicht werden konnte, war zu erwarten, da es durch die Verabreichung von nur einer Spezifität häufig zum Auswachsen Antigen-negativer Tumoren kommen kann, was eine immunhistochemische Analyse in der vorliegenden Arbeit auch bestätigte. Möglicherweise würde eine Applikation von T-Zellklonen verschiedener Spezifitäten die therapeutische Wirksamkeit deutlich erhöhen.

Obwohl generell nur ein kleiner Prozentsatz der LCL spontan in den lytischen Zyklus eintreten, bewirkten die BLLF1-spezifischen T-Zellen ein verzögertes Tumorwachstum. Somit wurden wahrscheinlich mehr als nur die lytisch infizierten Tumorzellen abgetötet. Dies könnte einerseits darauf zurückzuführen sein, dass mehr LCL aufgrund der veränderten Umgebung und dem damit verbundenen Stress in den lytischen Zyklus gegangen waren. Dies konnte aber in histologischen Analysen nicht beobachtet werden. Wahrscheinlicher ist, dass ein Antigentransfer auf benachbarte Zellen stattfand (Adhikary et al., 2007). Diese Vermutung konnte auch in den immunhistochemischen Analysen beobachtet werden, da immer mehrere benachbarte Zellen positive BLLF1-Färbungen zeigten.

#### **7.2.4.3 Effektivität der polyklonalen Linien *in vivo***

Bei der Untersuchung des protektiven Potenzials der Linien, die mit unterschiedlich kultivierten, APC generiert worden waren, ergab sich eine interessante Beobachtung: Während die verschiedenen Linien nach wenigen Passagen ähnlich Tumor-protektiv wirkten, waren nach 11 Stimulationsrunden eindeutige Unterschiede in der *in vivo*-Effektivität der Linien zu erkennen. Im Gegensatz zu der T-Zelllinie HS nahm das protektive Potenzial der LCL-FCS-stimulierten Linien mehr oder weniger stark ab.

Während die Linien in frühen Passagen keine FCS-Spezifität zeigten, wiesen alle Linien, die mit LCL-FCS stimuliert worden waren, nach Langzeit-Kultivierung eine erhöhte FCS-Reaktivität auf. Diese Linien sezernierten zusätzlich vermehrt Th2-Zytokine, einschließlich IL-10. Wurden hingegen LCL-HS als Stimulatoren verwendet,

so zeigten die damit generierten T-Zelllinien eine deutliche und sich im Verlauf verstärkende EBV-Spezifität. Dem IL-10 wurde eine Inhibition der Antigenpräsentation, die Förderung von Transformation und Proliferation von B-Zellen sowie die Unterdrückung der Etablierung des EBV-spezifischen Gedächtnis zugeschrieben (Muti et al., 2005). Für die verminderte therapeutische Wirksamkeit der mit LCL-HS generierten T-Zelllinien könnte somit die vermehrte Ausschüttung von IL-10 verantwortlich sein.

In einer Veröffentlichung von MacArthur und Mitarbeitern wurde die Generierung von EBV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus fötalem Nabelschnurblut beschrieben und gezeigt, dass solche T-Zellen das Auswachsen von LCL verhindern können. Allerdings wurde bemerkt, dass Th2-polarisierte Zelllinien das Auswachsen von LCL 10-fach erhöhen. Diese Zellen zeigten zusätzlich eine geringere zytotoxische Aktivität. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde davon abgeraten, Th2-polarisierte Zellen in der adoptiven T-Zelltherapie bei Menschen einzusetzen (MacArthur et al., 2007).

Um zu untersuchen, ob T-Zellen, die lytische oder latente EBV-Antigene erkennen, bedeutender in der Immuntherapie sind, wurde in der vorliegenden Arbeit eine T-Zelllinie generiert, die anstelle von LCL mit LCL Z(-) stimuliert worden war. Durch den Einsatz von LCL Z(-) konnte die Expansion von T-Zellen, die gegen lytische Antigene gerichtet waren, verhindert werden. Überraschenderweise ergab sich aber *in vivo* kein Unterschied in der Effektivität einer solchen Linie im Vergleich zu einer mittels LCL-Stimulation generierten T-Zelllinie. Dass ein übermäßiger Anteil CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der LCL Z(-)-stimulierten T-Zelllinie den *in vivo* beobachteten Effekt verursachte, konnte ausgeschlossen werden, da die LCL Z(-)-stimulierte T-Zelllinie nach magnetischer Selektion über 95 % CD4<sup>+</sup> T-Zellen enthielt. Die LCL-stimulierte Linie enthielt dagegen nur ca. 60 % CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Für beide Linien wurde außerdem eine Erkennung von viralen Latenzantigenen durch die Beladung von EBV-Proteinen auf autologe PBMCs ausgeschlossen, wodurch die Erkennung zellulärer Strukturen zu vermuten war.

#### 7.2.4.4 Bedeutung von Autoantigenen in der Therapie von PTLDs

Autoantigene sind körpereigene Strukturen, die aufgrund unbestimmter Mechanismen einen antigenen Charakter entwickeln. In vorangegangenen Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe wurden bereits Reaktivitäten von T-Zellen, die mit LCL nach Standardprotokollen generiert worden waren, gegen unbekannte, nicht-virale Zielstrukturen auf LCL beschrieben (Adhikary et al., 2007). Zur Generierung der T-Zelllinien wurden sogenannte mini-LCL verwendet, die mit einem mutierten Virusstamm immortalisiert worden waren und wie LCL Z(-) keine lytischen Zyklusantigene exprimierten (Adhikary et al., 2007). Auch die eigenen Ergebnisse der Analysen der LCL Z(-)-stimulierten T-Zelllinie weist auf zelluläre Zielstrukturen der LCL hin.

Fraglich war nun, um welche Autoantigene es sich handelte, und inwieweit diese bei der antitumoralen Immunantwort eine Rolle spielten. Durch Zellkulturüberstand-Transferexperimente konnte gezeigt werden, dass sowohl zelluläre als auch sezernierte Autoantigene erkannt wurden, und es sich somit wahrscheinlich um mehrere unterschiedliche Antigene handelt (Daten nicht gezeigt).

Warum nach kurzzeitiger Stimulation scheinbar bevorzugt T-Zellen, die gegen Autoantigene gerichtet sind, expandiert wurden, kann möglicherweise aufgrund unterschiedlicher Konzentrationen der zelleigenen oder viralen Molekülen auf den Oberflächen der transformierten Zellen erklärt werden. Warum sich dann die Spezifitäten der T-Zellen im Verlauf der *in vitro*-Kultivierung verschieben, könnte an einer schwankenden Expression der bislang nicht definierten Autoantigene liegen. Da verschiedene EBV-transformierte Zelllinien eines Spenders unterschiedlich stark durch die T-Zellen erkannt wurden, kann außerdem vermutet werden, dass unbestimmte, womöglich zelluläre Faktoren die Produktion und/oder Präsentation bzw. Sekretion der Zielstrukturen beeinflussen. Auch die einzelnen Frequenzen der T-Zellen *in vivo* könnten für diese Beobachtung ausschlaggebend sein. Entweder sind die autoreaktiven T-Zellen häufiger vertreten, und die EBV-spezifischen können erst mit der Zeit aufgrund verstärkter Proliferation hervortreten, oder die autoreaktiven T-Zellen proliferieren zu Beginn verstärkt, obwohl sie nicht unbedingt häufiger *in vivo* auftreten. Möglicherweise haben die EBV-spezifischen T-Zellen aber ein höheres proliferatives Potenzial, da es sich um Effektor- und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen handelt, während der Phänotyp der autoreaktiven T-Zellen noch unbekannt ist.

Es wurde berichtet, dass EBV-spezifische T-Zellen auch durch LCL-Stimulation von T-Zellen aus EBV-negativen Individuen generiert werden können, die entweder ein naives Immunsystem aufweisen, da es sich um Zellen von Nabelschnurblut handelt (Hanley et al., 2009), oder aber die aufgrund fehlender Infektion keine EBV-spezifischen Gedächtniszellen im peripheren Blut haben können (Savoldo et al., 2002, Popescu et al., 2003). Ein Problem dieser bisher publizierten, LCL-stimulierten T-Zelllinien ist wiederkehrend. Die EBV-Spezifität wird meist durch den Nachweis einer IFN $\gamma$ -Sekretion in ELISpot oder ELISA, sowie der lytischen Aktivität gegen LCL als bewiesen angesehen. Allerdings wurde dabei in keiner der bisherigen Publikationen eine signifikante Erkennung viraler Proteine belegt, und somit eine Erkennung autoantigener Proteine nicht ausgeschlossen.

Ein Beispiel sogenannter EBV-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Virus-naiven Individuen ist besonders hervorzuheben. Die effektivsten T-Zellen konnten in diesem Fall nicht mit Antigen-beladenen dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DC), sondern mit LCL generiert werden (Savoldo et al., 2002). Die LCL wurden dabei in FCS-Medium gehalten, was die Generierung von FCS-reaktiven Zellen wahrscheinlich machte. Die „EBV-Spezifität“ wurde den Autoren zufolge durch Stimulation mit autologen LCL im ELISpot und durch Regressionanalysen belegt, indem die T-Zellen das Auswachsen von LCL verhinderten. Allerdings war damit nur bewiesen, dass die T-Zellen LCL erkannten, nicht aber dass sie EBV-spezifisch waren,

Neben Blut von EBV-negativen Spendern wurden auch aus Nabelschnurblut, d.h. aus neonatalen Zellen eines naiven Immunsystems, EBV-spezifische T-Zellen generiert. Eine aktuelle Veröffentlichung beschreibt die Generierung trispezifischer T-Zellen aus diesen naiven T-Zellpopulationen. EBV-infizierte B-Zellen wurden mit einem adenoviralen Vektor, der Antigene von EBV, CMV und Adenovirus (ADV) enthielt, transfiziert und als Antigen-präsentierende Stimulatorzellen eingesetzt. Die Spezifität für CMV- und ADV-spezifische T-Zellen wurde durch die Beladung von PHA-Blasten mit spezifischen Peptiden getestet. Die Reaktion von EBV-spezifischen T-Zellen auf untransfizierte EBV-infizierte B-Zellen wurde als ausreichend für den Nachweis der EBV-Reaktivität angesehen. Interessanterweise konnten keine Reaktivitäten von T-Zellen gegen bekannte immundominante Epitope der Antigene EBNA3, BZLF1 und LMP2 nachgewiesen werden (Hanley et al., 2009), was nahelegt, dass eventuell Autoantigene auf den EBV-infizierten B-Zellen erkannt worden waren.

LCL-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die nicht gegen bekannte EBV-Proteine oder -Peptide reagierten, wurden auch als „neue“ CD4<sup>+</sup> T-Zellreaktivitäten bezeichnet (Gudgeon et al., 2005), wobei mittlerweile beschrieben wurden, dass diese T-Zellen sogenannte, Lymphom-assoziierte Antigene erkennen können. Vermutet wurde, dass es sich dabei um die Erkennung von zellulären Antigenen handelte, die durch die EBV-induzierte Transformation hochreguliert werden und auch in anderen B-Zellerkrankungen vorkommen (Long et al., 2009). Möglicherweise könnten solche autoreaktiven LCL-stimulierten T-Zelllinien somit in verschiedenen malignen B-Zell-Erkrankungen therapeutisch eingesetzt werden.

Da bereits in T-Zelllinien früher Passagen, die aus EBV-positiven Spendern generiert wurden, autoreaktive T-Zellen nachgewiesen werden konnten, aber im Verlauf der FCS-freien Stimulation vermehrt EBV-spezifischen T-Zellen auswuchsen, wäre in diesem Zusammenhang interessant zu untersuchen, wie sich „EBV-spezifische“ LCL-stimulierte Linien, die aus EBV-negativen Spendern generiert wurden, nach FCS-freier Langzeit-Stimulation verhalten.

Da T-Zelllinien normalerweise nach kurzzeitiger Stimulation den Patienten verabreicht werden (Gottschalk et al., 2005), ist zu vermuten, dass diese Linien eine Mehrzahl der in dieser Arbeit nachgewiesenen, autoreaktiven T-Zellen aufweisen und der erzielte *in vivo*-Effekt möglicherweise nicht ausschließlich auf das Vorhandensein EBV-spezifischer T-Zellen zurückzuführen ist. Bisläng wurden dabei aber keine klinische Autoimmunreaktionen beschrieben. Entweder ist die Expression der Autoantigene auf die transformierten Zellen beschränkt, oder eine Schädigung von normalem Gewebe wird *in vivo* durch Toleranzmechanismen verhindert.

### 7.3 Neue Ansätze in der PTLD-Behandlung

In der vorliegenden Arbeit konnte das protektive Potenzial von gegen zelluläre und sezernierte Strukturen gerichteten T-Zellen, sowie das BLLF1-spezifischer T-Zellen *in vivo* gezeigt werden, was in Kombination zu einer Optimierung der aktuell genutzten T-Zelltherapien führen und diese auch auf weniger immunogene, EBV-assoziierte Tumoren anwendbar machen könnte.

In einer kürzlich, in Kooperation mit der eigenen Arbeitsgruppe durchgeführten Studie, in der EBV-Peptid-spezifisch stimulierte T-Zellen zur Behandlung von HSCT-PTLDs eingesetzt wurden, kam es in einem Patienten zu einer starken Expansion BRLF1-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Moosmann et al., 2010). Da es sich bei diesem Protein um ein spätes lytisches Antigen handelte, bekräftigte dieses Resultat die postulierte Bedeutsamkeit der viralen Strukturantigene in der EBV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort.

Da EBV-assoziierte Tumoren eine unterschiedlich ausgeprägte lytische Aktivität zeigen, könnte die Induktion des lytischen Zyklus in den Tumorzellen beispielsweise durch Arginin-Buyrat (Countryman et al., 2008) oder durch Bestrahlung unterstützend wirken. Von Faller und Kollegen wurden bereits EBV-assoziierte Lymphome durch die Induktion des Thymidinkinase-Enzyms mittels Arginin-Butyrat und nachfolgender Gabe von Ganciclovir behandelt (Mentzer et al., 2001, Faller et al., 2001, Perrine et al., 2007).

Auf alle Fälle sollte aber die Verabreichung von T-Zellen mit „falschen“ Spezifitäten vermieden werden, da sie möglicherweise positive Effekte anderer Zellen durch Tumorfördernde Mediatoren reduzieren könnten. Zusätzlich sollte auf die Generierung von T-Zelllinien mit FCS-haltigen LCL bei längerer Kultivierungsdauer und den Transfer reiner CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulationen verzichtet werden.

#### **7.4 Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit wurde die CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort im Rahmen der EBV-Infektion untersucht.

In zukünftigen Untersuchungen soll der beschriebene Phänotyp der EBV-spezifischen T-Zellen auch *in vivo* bestätigt werden. Um Hinweise auf eine mögliche Beteiligung weiterer Subpopulationen an der CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort gegen EBV zu erhalten, sollen diese Analysen auch den Nachweis von IL-4 und eventuell IL-17 miteinschließen. Darüber hinaus soll die Frequenz EBV-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen in PTLD-Patienten *ex vivo* untersucht werden. Quantitative Veränderungen in einzelnen Zellpopulationen könnten eventuell Rückschlüsse auf die Tumor-protective Funktion dieser Zellen erlauben. Des Weiteren sollten die relevanten Autoantigene molekular identifiziert und das Expressionsmuster dieser Moleküle in verschiedenen EBV-assoziierten und EBV-negativen, malignen Erkrankungen analysiert werden. Diese Untersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, bei welchen Erkrankungen eine Immuntherapie mit LCL-stimulierten T-Zelllinien erfolgversprechend sein könnte, und wie die therapeutische Effizienzen der T-Zellpräparate weiter optimiert werden könnten.

## 8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2.1 Naive CD4 <sup>+</sup> T-Zellen differenzieren in Abhängigkeit vom Zytokinmilieu in unterschiedliche Subpopulationen.....	24
Abbildung 5.1 Zytokin-Array-Auftragungsmuster der Zytokine auf den Membranen..	58
Abbildung 6.1 Darstellung der CD4 <sup>+</sup> T-Zelldifferenzierung. ....	70
Abbildung 6.2 EBV-spezifische CD4 <sup>+</sup> T-Zellklone unterschieden sich von nicht-EBV-spezifischen T-Zellklonen in ihrem Differenzierungsgrad.....	72
Abbildung 6.3 EBV-spezifische CD4 <sup>+</sup> T-Zellklone zeigten ein Th1- oder ein gemischtes Th1/Th2-Zytokinprofil. ....	74
Abbildung 6.4 Die EBV-spezifischen T-Zellklone wiesen Unterschiede in ihrer zytolytischen Aktivität auf. ....	76
Abbildung 6.5 Die Zytotoxizität der BLLF1 1D6-T-Zellen wurde sowohl durch EGTA- als auch durch BFA-Behandlung beeinträchtigt.....	77
Abbildung 6.6 Schematische Darstellung des PTLD-SCID-Mausmodells.....	78
Abbildung 6.7 Entwicklung PTLD-ähnlicher Tumoren in SCID-Mäusen.....	79
Abbildung 6.8 Inzidenz und Latenz der Tumorentstehung nach Injektion von LCL, LCL Z(-) und PBMCs. ....	80
Abbildung 6.9 Histologischer Überblick der im Mausmodell generierten Tumoren....	83
Abbildung 6.10 Die Tumorzellen unterschieden sich von LCL in der Expression verschiedener Oberflächenmarker und in der Effizienz der Antigen-abhängigen CD4 <sup>+</sup> T-Zellstimulation.....	85
Abbildung 6.11 Erkennung von BLLF1 auf isolierten Tumorzellen durch BLLF1-spezifische CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	86
Abbildung 6.12 EBV-spezifische CD4 <sup>+</sup> T-Zellklone zeigten unterschiedliche Tumor- protektive Wirksamkeit <i>in vivo</i> .....	88
Abbildung 6.13 BLLF1 war nach Verabreichung BLLF1-spezifischer T-Zellen bei zwei von drei Tumoren unterschiedlicher Mäuse kaum noch auf Tumorzellen detektierbar.	90
Abbildung 6.14 Untersuchung der T-Zellmigration im Mausmodell. ....	91
Abbildung 6.15 Kinetik der Infiltration unterschiedlicher Organe durch EBV-spezifische T-Zellen. ....	92
Abbildung 6.16 T-Zellinfiltration der Tumoren.....	93



Abbildung 6.17 Herstellung von polyklonalen EBV-spezifischen T-Zelllinien unter Verwendung unterschiedlich kultivierter Stimulatorzellen. ....	95
Abbildung 6.18 Die in den genannten Ansätzen generierten, EBV-spezifischen T-Zelllinien zeigten unterschiedliche therapeutische Wirksamkeit <i>in vivo</i> . ....	97
Abbildung 6.19 Phänotypische Analyse der unterschiedlich stimulierten T-Zelllinien nach verschiedenen Passagen. ....	99
Abbildung 6.20 Die verschiedenen T-Zelllinien unterschieden sich in der Sekretion typischer Th1-Zytokine. ....	101
Abbildung 6.21 Die Verwendung von LCL-FCS als Stimulatorzellen führte zur Expansion FCS-reaktiver CD4 <sup>+</sup> T-Zellen mit einem Th2-Phänotyp. ....	103
Abbildung 6.22 Die T-Zelllinien unterschieden sich in ihrem zytotoxischen Potenzial. ....	104
Abbildung 6.23 Das Überleben der Mäuse wurde durch CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen gleichermaßen verlängert. ....	106
Abbildung 6.24 LCL- und LCL Z(-)-stimulierte T-Zelllinien verlängerten das Überleben der Tiere. ....	109
Abbildung 6.25 Die EBV-spezifische CD4 <sup>+</sup> T-Zellantwort in Patienten mit akuter Infektiöser Mononukleose unterschied sich von der in klinisch gesunden Virusträgern. ....	111
Abbildung 6.26 Die Virus-spezifische CD4 <sup>+</sup> T-Zellantwort während und nach akuter IM. ....	113
Abbildung 7.1 Phänotyp EBV-spezifischer CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	122

## 9. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1 EBV-Latenzformen und assoziierte Erkrankungen.....	9
Tabelle 4.1 Chemikalien.....	29
Tabelle 4.2 Geräte .....	30
Tabelle 4.3 Verbrauchsmaterial/-flüssigkeiten.....	31
Tabelle 4.4 Allgemeine Puffer und Lösungen.....	32
Tabelle 5.1 Zytokine und deren Position im Zytokin-Array .....	59

## 10. LITERATURVERZEICHNIS

- ADHIKARY, D., BEHRENDTS, U., BOERSCHMANN, H., PFUNDER, A., BURDACH, S., MOOSMANN, A., WITTER, K., BORNKAMM, G. W. & MAUTNER, J. 2007. Immunodominance of lytic cycle antigens in Epstein-Barr virus-specific CD4<sup>+</sup> T cell preparations for therapy. *PLoS One*, 2, e583.
- ADHIKARY, D., BEHRENDTS, U., FEEDERLE, R., DELECLUSE, H. J. & MAUTNER, J. 2008. Standardized and highly efficient expansion of Epstein-Barr virus-specific CD4<sup>+</sup> T cells by using virus-like particles. *J Virol*, 82, 3903-11.
- ADHIKARY, D., BEHRENDTS, U., MOOSMANN, A., WITTER, K., BORNKAMM, G. W. & MAUTNER, J. 2006. Control of Epstein-Barr virus infection in vitro by T helper cells specific for virion glycoproteins. *J Exp Med*, 203, 995-1006.
- ALLAN, G. J., INMAN, G. J., PARKER, B. D., ROWE, D. T. & FARRELL, P. J. 1992. Cell growth effects of Epstein-Barr virus leader protein. *J Gen Virol*, 73 (Pt 6), 1547-51.
- AMYES, E., HATTON, C., MONTAMAT-SICOTTE, D., GUDGEON, N., RICKINSON, A. B., MCMICHAEL, A. J. & CALLAN, M. F. 2003. Characterization of the CD4<sup>+</sup> T cell response to Epstein-Barr virus during primary and persistent infection. *J Exp Med*, 198, 903-11.
- AMYES, E., MCMICHAEL, A. J. & CALLAN, M. F. 2005. Human CD4<sup>+</sup> T cells are predominantly distributed among six phenotypically and functionally distinct subsets. *J Immunol*, 175, 5765-73.
- ANDRADE, F. 2010. Non-cytotoxic antiviral activities of granzymes in the context of the immune antiviral state. *Immunol Rev*, 235, 128-46.
- ANNUNZIATO, F., COSMI, L., LIOTTA, F., MAGGI, E. & ROMAGNANI, S. 2008. The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *Int Immunol*, 20, 1361-8.
- APPAY, V. 2004. The physiological role of cytotoxic CD4(+) T-cells: the holy grail? *Clin Exp Immunol*, 138, 10-3.

- APPAY, V., VAN LIER, R. A., SALLUSTO, F. & ROEDERER, M. 2008. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A*, 73, 975-83.
- ASCHERIO, A. & MUNGER, K. L. 2010. Epstein-barr virus infection and multiple sclerosis: a review. *J Neuroimmune Pharmacol*, 5, 271-7.
- BABCOCK, G. J., DECKER, L. L., VOLK, M. & THORLEY-LAWSON, D. A. 1998. EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity*, 9, 395-404.
- BAER, R., BANKIER, A. T., BIGGIN, M. D., DEININGER, P. L., FARRELL, P. J., GIBSON, T. J., HATFULL, G., HUDSON, G. S., SATCHWELL, S. C., SEGUIN, C. & ET AL. 1984. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, 310, 207-11.
- BALFOUR, H. H., JR., HOLMAN, C. J., HOKANSON, K. M., LELONEK, M. M., GIESBRECHT, J. E., WHITE, D. R., SCHMELING, D. O., WEBB, C. H., CAVERT, W., WANG, D. H. & BRUNDAGE, R. C. 2005. A prospective clinical study of Epstein-Barr virus and host interactions during acute infectious mononucleosis. *J Infect Dis*, 192, 1505-12.
- BAR-NATAN, M. & NAGLER, A. 2006. Epstein-Barr virus-associated post-transplant lymphoproliferative disorder. *Isr Med Assoc J*, 8, 205-7.
- BEN-SASSON, S. Z., LE GROS, G., CONRAD, D. H., FINKELMAN, F. D. & PAUL, W. E. 1990. IL-4 production by T cells from naive donors. IL-2 is required for IL-4 production. *J Immunol*, 145, 1127-36.
- BERGER, C., JENSEN, M. C., LANSDORP, P. M., GOUGH, M., ELLIOTT, C. & RIDDELL, S. R. 2008. Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *J Clin Invest*, 118, 294-305.
- BICKHAM, K., MUNZ, C., TSANG, M. L., LARSSON, M., FONTENEAU, J. F., BHARDWAJ, N. & STEINMAN, R. 2001. EBNA1-specific CD4+ T cells in healthy carriers of Epstein-Barr virus are primarily Th1 in function. *J Clin Invest*, 107, 121-30.
- BOLLARD, C. M., AGUILAR, L., STRAATHOF, K. C., GAHN, B., HULS, M. H., ROUSSEAU, A., SIXBEY, J., GRESIK, M. V., CARRUM, G., HUDSON, M., DILLOO, D., GEE, A., BRENNER, M. K., ROONEY, C. M. & HESLOP, H. E.

2004. Cytotoxic T lymphocyte therapy for Epstein-Barr virus+ Hodgkin's disease. *J Exp Med*, 200, 1623-33.
- BOLLARD, C. M., GOTTSCHALK, S., HULS, M. H., MOLLDREM, J., PRZEPIORKA, D., ROONEY, C. M. & HESLOP, H. E. 2006. In vivo expansion of LMP 1- and 2-specific T-cells in a patient who received donor-derived EBV-specific T-cells after allogeneic stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma*, 47, 837-42.
- BORNKAMM, G. W., BEHRENDTS, U. & MAUTNER, J. 2006. The infectious kiss: newly infected B cells deliver Epstein-Barr virus to epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 7201-2.
- BORZA, C. M. & HUTT-FLETCHER, L. M. 2002. Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat Med*, 8, 594-9.
- BOSMA, G. C., CUSTER, R. P. & BOSMA, M. J. 1983. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*, 301, 527-30.
- BOYTON, R. J. & ALTMANN, D. M. 2002. Is selection for TCR affinity a factor in cytokine polarization? *Trends Immunol*, 23, 526-9.
- BRENCHLEY, J. M., KARANDIKAR, N. J., BETTS, M. R., AMBROZAK, D. R., HILL, B. J., CROTTY, L. E., CASAZZA, J. P., KURUPPU, J., MIGUELES, S. A., CONNORS, M., ROEDERER, M., DOUEK, D. C. & KOUP, R. A. 2003. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood*, 101, 2711-20.
- BRENNER, M. K. & HESLOP, H. E. 2010. Adoptive T cell therapy of cancer. *Curr Opin Immunol*, 22, 251-7.
- BREWIN, J., MANCAO, C., STRAATHOF, K., KARLSSON, H., SAMARASINGHE, S., AMROLIA, P. J. & PULE, M. 2009. Generation of EBV-specific cytotoxic T cells that are resistant to calcineurin inhibitors for the treatment of posttransplantation lymphoproliferative disease. *Blood*, 114, 4792-803.
- BROWN, D. M. 2010. Cytolytic CD4 cells: Direct mediators in infectious disease and malignancy. *Cell Immunol*, 262, 89-95.
- BURKITT, D. 1958. A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg*, 46, 218-23.
- BURKITT, D. 1962. Determining the climatic limitations of a children's cancer common in Africa. *Br Med J*, 2, 1019-23.

- BURKITT, D. & O'CONOR, G. T. 1961. Malignant lymphoma in African children. I. A clinical syndrome. *Cancer*, 14, 258-69.
- CALDWELL, R. G., WILSON, J. B., ANDERSON, S. J. & LONGNECKER, R. 1998. Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity*, 9, 405-11.
- CALLAN, M. F. 2004. The immune response to Epstein-Barr virus. *Microbes Infect*, 6, 937-45.
- CAVAZZANA-CALVO, M., BENSOUSSAN, D., JABADO, N., HADDAD, E., YVON, E., MOSKWA, M., TACHET DES COMBES, A., BUISSON, M., MORAND, P., VIRION, J. M., LE DEIST, F. & FISCHER, A. 1998. Prevention of EBV-induced B-lymphoproliferative disorder by ex vivo marrow B-cell depletion in HLA-phenotypical or non-identical T-depleted bone marrow transplantation. *Br J Haematol*, 103, 543-51.
- CESARMAN, E., CHADBURN, A., LIU, Y. F., MIGLIAZZA, A., DALLA-FAVERA, R. & KNOWLES, D. M. 1998. BCL-6 gene mutations in posttransplantation lymphoproliferative disorders predict response to therapy and clinical outcome. *Blood*, 92, 2294-302.
- COHEN, J. I. 2000. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*, 343, 481-92.
- COHEN, J. I., WANG, F., MANNICK, J. & KIEFF, E. 1989. Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 9558-62.
- COLLINS, P. 1983. The spectrum of antiviral activities of acyclovir in vitro and in vivo. *J Antimicrob Chemother*, 12 Suppl B, 19-27.
- COMOLI, P., LABIRIO, M., BASSO, S., BALDANTI, F., GROSSI, P., FURIONE, M., VIGANO, M., FIOCCHI, R., ROSSI, G., GINEVRI, F., GRIDELLI, B., MORETTA, A., MONTAGNA, D., LOCATELLI, F., GERNA, G. & MACCARIO, R. 2002. Infusion of autologous Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T cells for prevention of EBV-related lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients with evidence of active virus replication. *Blood*, 99, 2592-8.
- COMOLI, P., PEDRAZZOLI, P., MACCARIO, R., BASSO, S., CARMINATI, O., LABIRIO, M., SCHIAVO, R., SECONDINO, S., FRASSON, C., PEROTTI, C., MORONI, M., LOCATELLI, F. & SIENA, S. 2005. Cell therapy of stage IV

- nasopharyngeal carcinoma with autologous Epstein-Barr virus-targeted cytotoxic T lymphocytes. *J Clin Oncol*, 23, 8942-9.
- COUNTRYMAN, J. & MILLER, G. 1985. Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 4085-9.
- COUNTRYMAN, J. K., GRADOVILLE, L. & MILLER, G. 2008. Histone hyperacetylation occurs on promoters of lytic cycle regulatory genes in Epstein-Barr virus-infected cell lines which are refractory to disruption of latency by histone deacetylase inhibitors. *J Virol*, 82, 4706-19.
- CRAWFORD, D. H. & ANDO, I. 1986. EB virus induction is associated with B-cell maturation. *Immunology*, 59, 405-9.
- CRAWFORD, D. H., MACSWEEN, K. F., HIGGINS, C. D., THOMAS, R., MCAULAY, K., WILLIAMS, H., HARRISON, N., REID, S., CONACHER, M., DOUGLAS, J. & SWERDLOW, A. J. 2006. A cohort study among university students: identification of risk factors for Epstein-Barr virus seroconversion and infectious mononucleosis. *Clin Infect Dis*, 43, 276-82.
- DE ANGELIS, B., DOTTI, G., QUINTARELLI, C., HUYE, L. E., ZHANG, L., ZHANG, M., PANE, F., HESLOP, H. E., BRENNER, M. K., ROONEY, C. M. & SAVOLDO, B. 2009. Generation of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes resistant to the immunosuppressive drug tacrolimus (FK506). *Blood*, 114, 4784-91.
- DELECLUSE, H. J., FEEDERLE, R., O'SULLIVAN, B. & TANIÈRE, P. 2007. Epstein Barr virus-associated tumours: an update for the attention of the working pathologist. *J Clin Pathol*, 60, 1358-64.
- DEMACHI-OKAMURA, A., ITO, Y., AKATSUKA, Y., TSUJIMURA, K., MORISHIMA, Y., TAKAHASHI, T. & KUZUSHIMA, K. 2008. Epstein-Barr virus nuclear antigen 1-specific CD4<sup>+</sup> T cells directly kill Epstein-Barr virus-carrying natural killer and T cells. *Cancer Sci*, 99, 1633-42.
- DORSHKIND, K., POLLACK, S. B., BOSMA, M. J. & PHILLIPS, R. A. 1985. Natural killer (NK) cells are present in mice with severe combined immunodeficiency (scid). *J Immunol*, 134, 3798-801.
- ELIOPOULOS, A. G., GALLAGHER, N. J., BLAKE, S. M., DAWSON, C. W. & YOUNG, L. S. 1999. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase

- pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J Biol Chem*, 274, 16085-96.
- EPSTEIN, M. A., ACHONG, B. G. & BARR, Y. M. 1964. Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet*, 1, 702-3.
- FAFI-KREMER, S., MORAND, P., BRION, J. P., PAVESE, P., BACCARD, M., GERMI, R., GENOULAZ, O., NICOD, S., JOLIVET, M., RUIGROK, R. W., STAHL, J. P. & SEIGNEURIN, J. M. 2005. Long-term shedding of infectious Epstein-Barr virus after infectious mononucleosis. *J Infect Dis*, 191, 985-9.
- FALLER, D. V., MENTZER, S. J. & PERRINE, S. P. 2001. Induction of the Epstein-Barr virus thymidine kinase gene with concomitant nucleoside antivirals as a therapeutic strategy for Epstein-Barr virus-associated malignancies. *Curr Opin Oncol*, 13, 360-7.
- FARRAR, M. A. & SCHREIBER, R. D. 1993. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol*, 11, 571-611.
- FAULKNER, G. C., BURROWS, S. R., KHANNA, R., MOSS, D. J., BIRD, A. G. & CRAWFORD, D. H. 1999. X-Linked agammaglobulinemia patients are not infected with Epstein-Barr virus: implications for the biology of the virus. *J Virol*, 73, 1555-64.
- FEEDERLE, R., KOST, M., BAUMANN, M., JANZ, A., DROUET, E., HAMMERSCHMIDT, W. & DELECLUSE, H. J. 2000. The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operative functions of two transactivators. *EMBO J*, 19, 3080-9.
- FEEDERLE, R., NEUHIERL, B., BANNERT, H., GELETNEKY, K., SHANNON-LOWE, C. & DELECLUSE, H. J. 2007. Epstein-Barr virus B95.8 produced in 293 cells shows marked tropism for differentiated primary epithelial cells and reveals interindividual variation in susceptibility to viral infection. *Int J Cancer*, 121, 588-94.
- FINKELMAN, F. D., HOLMES, J., KATONA, I. M., URBAN, J. F., JR., BECKMANN, M. P., PARK, L. S., SCHOOLEY, K. A., COFFMAN, R. L., MOSMANN, T. R. & PAUL, W. E. 1990. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol*, 8, 303-33.



- FONTENOT, J. D., GAVIN, M. A. & RUDENSKY, A. Y. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 4, 330-6.
- FU, T., VOO, K. S. & WANG, R. F. 2004. Critical role of EBNA1-specific CD4+ T cells in the control of mouse Burkitt lymphoma in vivo. *J Clin Invest*, 114, 542-50.
- GERBER, P., LUCAS, S., NONOYAMA, M., PERLIN, E. & GOLDSTEIN, L. I. 1972. Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis. *Lancet*, 2, 988-9.
- GOTTSCHALK, S., EDWARDS, O. L., SILI, U., HULS, M. H., GOLTSOVA, T., DAVIS, A. R., HESLOP, H. E. & ROONEY, C. M. 2003. Generating CTLs against the subdominant Epstein-Barr virus LMP1 antigen for the adoptive immunotherapy of EBV-associated malignancies. *Blood*, 101, 1905-12.
- GOTTSCHALK, S., ROONEY, C. M. & HESLOP, H. E. 2005. Post-transplant lymphoproliferative disorders. *Annu Rev Med*, 56, 29-44.
- GREENFIELD, H. M., GHARIB, M. I., TURNER, A. J., GUIVER, M., CARR, T., WILL, A. M. & WYNN, R. F. 2006. The impact of monitoring Epstein-Barr virus PCR in paediatric bone marrow transplant patients: can it successfully predict outcome and guide intervention? *Pediatr Blood Cancer*, 47, 200-5.
- GUDGEON, N. H., TAYLOR, G. S., LONG, H. M., HAIGH, T. A. & RICKINSON, A. B. 2005. Regression of Epstein-Barr virus-induced B-cell transformation in vitro involves virus-specific CD8+ T cells as the principal effectors and a novel CD4+ T-cell reactivity. *J Virol*, 79, 5477-88.
- GULLEY, M. L. & TANG, W. 2010. Using Epstein-Barr viral load assays to diagnose, monitor, and prevent posttransplant lymphoproliferative disorder. *Clin Microbiol Rev*, 23, 350-66.
- HADDAD, E., PACZESNY, S., LEBLOND, V., SEIGNEURIN, J. M., STERN, M., ACHKAR, A., BAUWENS, M., DELWAIL, V., DEBRAY, D., DUVOUX, C., HUBERT, P., HURAUULT DE LIGNY, B., WIJDENES, J., DURANDY, A. & FISCHER, A. 2001. Treatment of B-lymphoproliferative disorder with a monoclonal anti-interleukin-6 antibody in 12 patients: a multicenter phase 1-2 clinical trial. *Blood*, 97, 1590-7.

- HANLEY, P. J., CRUZ, C. R., SAVOLDO, B., LEEN, A. M., STANOJEVIC, M., KHALIL, M., DECKER, W., MOLLDREM, J. J., LIU, H., GEE, A. P., ROONEY, C. M., HESLOP, H. E., DOTTI, G., BRENNER, M. K., SHPALL, E. J. & BOLLARD, C. M. 2009. Functionally active virus-specific T cells that target CMV, adenovirus, and EBV can be expanded from naive T-cell populations in cord blood and will target a range of viral epitopes. *Blood*, 114, 1958-67.
- HAQUE, T., WILKIE, G. M., JONES, M. M., HIGGINS, C. D., URQUHART, G., WINGATE, P., BURNS, D., MCAULAY, K., TURNER, M., BELLAMY, C., AMLOT, P. L., KELLY, D., MACGILCHRIST, A., GANDHI, M. K., SWERDLOW, A. J. & CRAWFORD, D. H. 2007. Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood*, 110, 1123-31.
- HARRIS, N. L., JAFFE, E. S., DIEBOLD, J., FLANDRIN, G., MULLER-HERMELINK, H. K. & VARDIMAN, J. 2000. Lymphoma classification--from controversy to consensus: the R.E.A.L. and WHO Classification of lymphoid neoplasms. *Ann Oncol*, 11 Suppl 1, 3-10.
- HEGAZY, A. N., PEINE, M., HELMSTETTER, C., PANSE, I., FROHLICH, A., BERGTHALER, A., FLATZ, L., PINSCHEWER, D. D., RADBRUCH, A. & LOHNING, M. 2010. Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions. *Immunity*, 32, 116-28.
- HELLER, K. N., UPSHAW, J., SEYOUM, B., ZEBROSKI, H. & MUNZ, C. 2007. Distinct memory CD4+ T-cell subsets mediate immune recognition of Epstein Barr virus nuclear antigen 1 in healthy virus carriers. *Blood*, 109, 1138-46.
- HENDERSON, S., ROWE, M., GREGORY, C., CROOM-CARTER, D., WANG, F., LONGNECKER, R., KIEFF, E. & RICKINSON, A. 1991. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell*, 65, 1107-15.
- HENKE, C. E., KURLAND, L. T. & ELVEBACK, L. R. 1973. Infectious mononucleosis in Rochester, Minnesota, 1950 through 1969. *Am J Epidemiol*, 98, 483-90.

- HENLE, G., HENLE, W. & DIEHL, V. 1968. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes- $\gamma$  virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 59, 94-101.
- HENLE, W., HENLE, G., ANDERSSON, J., ERNBERG, I., KLEIN, G., HORWITZ, C. A., MARKLUND, G., RYMO, L., WELLINDER, C. & STRAUS, S. E. 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.
- HESLOP, H. E. 2009. How I treat EBV lymphoproliferation. *Blood*, 114, 4002-8.
- HESLOP, H. E., BRENNER, M. K. & ROONEY, C. M. 1994. Donor T cells to treat EBV-associated lymphoma. *N Engl J Med*, 331, 679-80.
- HESLOP, H. E., SLOBOD, K. S., PULE, M. A., HALE, G. A., ROUSSEAU, A., SMITH, C. A., BOLLARD, C. M., LIU, H., WU, M. F., ROCHESTER, R. J., AMROLIA, P. J., HURWITZ, J. L., BRENNER, M. K. & ROONEY, C. M. 2010. Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood*, 115, 925-35.
- HINRICHS, C. S., BORMAN, Z. A., CASSARD, L., GATTINONI, L., SPOLSKI, R., YU, Z., SANCHEZ-PEREZ, L., MURANSKI, P., KERN, S. J., LOGUN, C., PALMER, D. C., JI, Y., REGER, R. N., LEONARD, W. J., DANNER, R. L., ROSENBERG, S. A. & RESTIFO, N. P. 2009. Adoptively transferred effector cells derived from naive rather than central memory CD8<sup>+</sup> T cells mediate superior antitumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 17469-74.
- HINRICHS, C. S., BORMAN, Z. A., GATTINONI, L., YU, Z., BURNS, W. R., HUANG, J., KLEBANOFF, C. A., JOHNSON, L. A., KERKAR, S. P., YANG, S., MURANSKI, P., PALMER, D. C., SCOTT, C. D., MORGAN, R. A., ROBBINS, P. F., ROSENBERG, S. A. & RESTIFO, N. P. 2010. Human effector CD8<sup>+</sup> T cells derived from naive rather than memory subsets possess superior traits for adoptive immunotherapy. *Blood*.
- HOCHBERG, D., SOUZA, T., CATALINA, M., SULLIVAN, J. L., LUZURIAGA, K. & THORLEY-LAWSON, D. A. 2004. Acute infection with Epstein-Barr virus targets and overwhelms the peripheral memory B-cell compartment with resting, latently infected cells. *J Virol*, 78, 5194-204.

- HONESS, R. W. & ROIZMAN, B. 1974. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J Virol*, 14, 8-19.
- HONESS, R. W. & ROIZMAN, B. 1975. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: sequential transition of polypeptide synthesis requires functional viral polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 1276-80.
- HORI, S., NOMURA, T. & SAKAGUCHI, S. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299, 1057-61.
- HOWE, R. C., OVSYANNIKOVA, I. G., PINSKY, N. A. & POLAND, G. A. 2005. Identification of Th0 cells responding to measles virus. *Hum Immunol*, 66, 104-15.
- HSIEH, C. S., MACATONIA, S. E., TRIPP, C. S., WOLF, S. F., O'GARRA, A. & MURPHY, K. M. 1993. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*, 260, 547-9.
- HSIEH, W. S., LEMAS, M. V. & AMBINDER, R. F. 1999. The biology of Epstein-Barr virus in post-transplant lymphoproliferative disease. *Transpl Infect Dis*, 1, 204-12.
- IARC 1997. Proceedings of the IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Epstein-Barr Virus and Kaposi's Sarcoma Herpesvirus/Human Herpesvirus 8. Lyon, France, 17-24 June 1997. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 70, 1-492.
- IVANOV, II, MCKENZIE, B. S., ZHOU, L., TADOKORO, C. E., LEPELLEY, A., LAFAILLE, J. J., CUA, D. J. & LITTMAN, D. R. 2006. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*, 126, 1121-33.
- JAVIER, R. T. & BUTEL, J. S. 2008. The history of tumor virology. *Cancer Res*, 68, 7693-706.
- JOHANNESSEN, I. & CRAWFORD, D. H. 1999. In vivo models for Epstein-Barr virus (EBV)-associated B cell lymphoproliferative disease (BLPD). *Rev Med Virol*, 9, 263-77.
- JOHANNSEN, E., LUFTIG, M., CHASE, M. R., WEICKSEL, S., CAHIR-MCFARLAND, E., ILLANES, D., SARRACINO, D. & KIEFF, E. 2004.

- Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 16286-91.
- KALIA, V., SARKAR, S. & AHMED, R. 2008. Fine-tuning CD4<sup>+</sup> central memory T cell heterogeneity by strength of stimulation. *Eur J Immunol*, 38, 15-9.
- KANEGANE, H., WANG, F. & TOSATO, G. 1996. Virus-cell interactions in a natural killer-like cell line from a patient with lymphoblastic lymphoma. *Blood*, 88, 4667-75.
- KASCHKA, W. P., HILGERS, R. & SKVARIL, F. 1982. Humoral immune response in Epstein-Barr virus infections. I. Elevated serum concentration of the IgG1 subclass in infectious mononucleosis and nasopharyngeal carcinoma. *Clin Exp Immunol*, 49, 149-56.
- KASCHKA, W. P., KLEIN, G., HILGERS, R. & SKVARIL, F. 1984. Humoral immune response in Epstein-Barr virus infections. II. IgG subclass distribution in African patients with Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *Clin Exp Immunol*, 55, 14-22.
- KAYE, K. M., IZUMI, K. M. & KIEFF, E. 1993. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 9150-4.
- KHAN, G., MIYASHITA, E. M., YANG, B., BABCOCK, G. J. & THORLEY-LAWSON, D. A. 1996. Is EBV persistence in vivo a model for B cell homeostasis? *Immunity*, 5, 173-9.
- KHANNA, R., BURROWS, S. R., STEIGERWALD-MULLEN, P. M., THOMSON, S. A., KURILLA, M. G. & MOSS, D. J. 1995. Isolation of cytotoxic T lymphocytes from healthy seropositive individuals specific for peptide epitopes from Epstein-Barr virus nuclear antigen 1: implications for viral persistence and tumor surveillance. *Virology*, 214, 633-7.
- KHANOLKAR, A., YAGITA, H. & CANNON, M. J. 2001. Preferential utilization of the perforin/granzyme pathway for lysis of Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells by virus-specific CD4<sup>+</sup> T cells. *Virology*, 287, 79-88.
- KIEFF, E. & RICKINSON, A. 2006. Epstein-Barr Virus and its replication. In: KNIPE, D. M. H., PETER M. UND GRIFFIN, DIANE E. (ed.) *Fields Virology*. 5th ed.: Lippincott Williams & Wilkins

- KILGER, E., KIESER, A., BAUMANN, M. & HAMMERSCHMIDT, W. 1998. Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J*, 17, 1700-9.
- KLEIN, E., KIS, L. L. & KLEIN, G. 2007. Epstein-Barr virus infection in humans: from harmless to life endangering virus-lymphocyte interactions. *Oncogene*, 26, 1297-305.
- KUPPERS, R. 2003. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol*, 3, 801-12.
- KUTOK, J. L. & WANG, F. 2006. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol*, 1, 375-404.
- KYTE, J. A., TRACHSEL, S., RISBERG, B., THOR STRATEN, P., LISLERUD, K. & GAUDERNACK, G. 2009. Unconventional cytokine profiles and development of T cell memory in long-term survivors after cancer vaccination. *Cancer Immunol Immunother*, 58, 1609-26.
- LAM, K. M., SYED, N., WHITTLE, H. & CRAWFORD, D. H. 1991. Circulating Epstein-Barr virus-carrying B cells in acute malaria. *Lancet*, 337, 876-8.
- LANDGREN, O., GILBERT, E. S., RIZZO, J. D., SOCIE, G., BANKS, P. M., SOBOCINSKI, K. A., HOROWITZ, M. M., JAFFE, E. S., KINGMA, D. W., TRAVIS, L. B., FLOWERS, M. E., MARTIN, P. J., DEEG, H. J. & CURTIS, R. E. 2009. Risk factors for lymphoproliferative disorders after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*, 113, 4992-5001.
- LEEN, A., MEIJ, P., REDCHENKO, I., MIDDELDORP, J., BLOEMENA, E., RICKINSON, A. & BLAKE, N. 2001. Differential immunogenicity of Epstein-Barr virus latent-cycle proteins for human CD4(+) T-helper 1 responses. *J Virol*, 75, 8649-59.
- LEVIN, L. I., MUNGER, K. L., O'REILLY, E. J., FALK, K. I. & ASCHERIO, A. 2010. Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 67, 824-30.
- LEVITSKAYA, J., CORAM, M., LEVITSKY, V., IMREH, S., STEIGERWALD-MULLEN, P. M., KLEIN, G., KURILLA, M. G. & MASUCCI, M. G. 1995. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature*, 375, 685-8.

- LEVITSKAYA, J., SHARIPO, A., LEONCHIKS, A., CIECHANOVER, A. & MASUCCI, M. G. 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.
- LIEBERMAN, J. 2010. Granzyme A activates another way to die. *Immunol Rev*, 235, 93-104.
- LONG, H. M., ZUO, J., LEESE, A. M., GUDGEON, N. H., JIA, H., TAYLOR, G. S. & RICKINSON, A. B. 2009. CD4+ T-cell clones recognizing human lymphoma-associated antigens: generation by in vitro stimulation with autologous Epstein-Barr virus-transformed B cells. *Blood*, 114, 807-15.
- LOUIS, C. U., STRAATHOF, K., BOLLARD, C. M., ENNAMURI, S., GERKEN, C., LOPEZ, T. T., HULS, M. H., SHEEHAN, A., WU, M. F., LIU, H., GEE, A., BRENNER, M. K., ROONEY, C. M., HESLOP, H. E. & GOTTSCHALK, S. 2010. Adoptive transfer of EBV-specific T cells results in sustained clinical responses in patients with locoregional nasopharyngeal carcinoma. *J Immunother*, 33, 983-90.
- LUNEMANN, J. D., JELCIC, I., ROBERTS, S., LUTTEROTTI, A., TACKENBERG, B., MARTIN, R. & MUNZ, C. 2008. EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2. *J Exp Med*, 205, 1763-73.
- LUNEMANN, J. D. & MUNZ, C. 2007. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 7, 253-8.
- LUZURIAGA, K. & SULLIVAN, J. L. 2010. Infectious mononucleosis. *N Engl J Med*, 362, 1993-2000.
- MACARTHUR, G. J., WILSON, A. D., BIRCHALL, M. A. & MORGAN, A. J. 2007. Primary CD4+ T-cell responses provide both helper and cytotoxic functions during Epstein-Barr virus infection and transformation of fetal cord blood B cells. *J Virol*, 81, 4766-75.
- MASOPUST, D., VEZYS, V., MARZO, A. L. & LEFRANCOIS, L. 2001. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science*, 291, 2413-7.
- MAUTNER, J., PICH, D., NIMMERJAHN, F., MILOSEVIC, S., ADHIKARY, D., CHRISTOPH, H., WITTER, K., BORNKAMM, G. W., HAMMERSCHMIDT,

- W. & BEHREND, U. 2004. Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 evades direct immune recognition by CD4+ T helper cells. *Eur J Immunol*, 34, 2500-9.
- MEIJ, P., VERVOORT, M. B., AARBIOU, J., VAN DISSEL, P., BRINK, A., BLOEMENA, E., MEIJER, C. J. & MIDDELDORP, J. M. 1999. Restricted low-level human antibody responses against Epstein-Barr virus (EBV)-encoded latent membrane protein 1 in a subgroup of patients with EBV-associated diseases. *J Infect Dis*, 179, 1108-15.
- MELENHORST, J. J., LEEN, A. M., BOLLARD, C. M., QUIGLEY, M. F., PRICE, D. A., ROONEY, C. M., BRENNER, M. K., BARRETT, A. J. & HESLOP, H. E. 2010. Allogeneic virus-specific T cells with HLA alloreactivity do not produce GVHD in human subjects. *Blood*.
- MENTZER, S. J., PERRINE, S. P. & FALLER, D. V. 2001. Epstein--Barr virus post-transplant lymphoproliferative disease and virus-specific therapy: pharmacological re-activation of viral target genes with arginine butyrate. *Transpl Infect Dis*, 3, 177-85.
- MERLO, A., TURRINI, R., BOBISSE, S., ZAMARCHI, R., ALAGGIO, R., DOLCETTI, R., MAUTNER, J., ZANOVELLO, P., AMADORI, A. & ROSATO, A. 2010a. Virus-specific cytotoxic CD4+ T cells for the treatment of EBV-related tumors. *J Immunol*, 184, 5895-902.
- MERLO, A., TURRINI, R., DOLCETTI, R., MARTORELLI, D., MURARO, E., COMOLI, P. & ROSATO, A. 2010b. The interplay between EBV and the immune system: a rationale for adoptive cell therapy of EBV-related disorders. *Haematologica*.
- MILLER, G., SHOPE, T., LISCO, H., STITT, D. & LIPMAN, M. 1972. Epstein-Barr virus: transformation, cytopathic changes, and viral antigens in squirrel monkey and marmoset leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69, 383-7.
- MINER, K. T. & CROFT, M. 1998. Generation, persistence, and modulation of Th0 effector cells: role of autocrine IL-4 and IFN-gamma. *J Immunol*, 160, 5280-7.
- MOOSMANN, A., BIGALKE, I., TISCHER, J., SCHIRRMANN, L., KASTEN, J., TIPPMER, S., LEEPING, M., PREVALSEK, D., JAEGER, G., LEDDEROSE, G., MAUTNER, J., HAMMERSCHMIDT, W., SCHENDEL, D. J. & KOLB, H. J. 2010. Effective and long-term control of EBV PTLD after transfer of peptide-selected T cells. *Blood*, 115, 2960-70.



- 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.
- MOSIER, D. E., GULIZIA, R. J., BAIRD, S. M. & WILSON, D. B. 1988. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature*, 335, 256-9.
- MOSIER, D. E., PICCHIO, G. R., KIRVEN, M. B., GARNIER, J. L., TORBETT, B. E., BAIRD, S. M., KOBAYASHI, R. & KIPPS, T. J. 1992. EBV-induced human B cell lymphomas in hu-PBL-SCID mice. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 8, 735-40.
- MOSMANN, T. R., CHERWINSKI, H., BOND, M. W., GIEDLIN, M. A. & COFFMAN, R. L. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 136, 2348-57.
- MOSMANN, T. R. & SAD, S. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*, 17, 138-46.
- MUNZ, C., BICKHAM, K. L., SUBKLEWE, M., TSANG, M. L., CHAHROUDI, A., KURILLA, M. G., ZHANG, D., O'DONNELL, M. & STEINMAN, R. M. 2000. Human CD4(+) T lymphocytes consistently respond to the latent Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA1. *J Exp Med*, 191, 1649-60.
- MURPHY, K. M. & STOCKINGER, B. 2010. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nat Immunol*, 11, 674-80.
- MUTI, G., MANCINI, V., RAVELLI, E. & MORRA, E. 2005. Significance of Epstein-Barr virus (EBV) load and interleukin-10 in post-transplant lymphoproliferative disorders. *Leuk Lymphoma*, 46, 1397-407.
- NEMEROW, G. R., MOLD, C., SCHWEND, V. K., TOLLEFSON, V. & COOPER, N. R. 1987. Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J Virol*, 61, 1416-20.
- NIKIFOROW, S., BOTTOMLY, K., MILLER, G. & MUNZ, C. 2003. Cytolytic CD4(+)-T-cell clones reactive to EBNA1 inhibit Epstein-Barr virus-induced B-cell proliferation. *J Virol*, 77, 12088-104.

- NILSSON, K. 1971. High-frequency establishment of human immunoglobulin-producing lymphoblastoid lines from normal and malignant lymphoid tissue and peripheral blood. *Int J Cancer*, 8, 432-42.
- NILSSON, K., KLEIN, G., HENLE, W. & HENLE, G. 1971. The establishment of lymphoblastoid lines from adult and fetal human lymphoid tissue and its dependence on EBV. *Int J Cancer*, 8, 443-50.
- PAPADOPOULOS, E. B., LADANYI, M., EMANUEL, D., MACKINNON, S., BOULAD, F., CARABASI, M. H., CASTRO-MALASPINA, H., CHILDS, B. H., GILLIO, A. P., SMALL, T. N. & ET AL. 1994. Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med*, 330, 1185-91.
- PAYA, C. V., FUNG, J. J., NALESNIK, M. A., KIEFF, E., GREEN, M., GORES, G., HABERMANN, T. M., WIESNER, P. H., SWINNEN, J. L., WOODLE, E. S. & BROMBERG, J. S. 1999. Epstein-Barr virus-induced posttransplant lymphoproliferative disorders. ASTS/ASTP EBV-PTLD Task Force and The Mayo Clinic Organized International Consensus Development Meeting. *Transplantation*, 68, 1517-25.
- PENN, I., HAMMOND, W., BRETTSCHEIDER, L. & STARZL, T. E. 1969. Malignant lymphomas in transplantation patients. *Transplant Proc*, 1, 106-12.
- PERRINE, S. P., HERMINE, O., SMALL, T., SUAREZ, F., O'REILLY, R., BOULAD, F., FINGEROTH, J., ASKIN, M., LEVY, A., MENTZER, S. J., DI NICOLA, M., GIANNI, A. M., KLEIN, C., HORWITZ, S. & FALLER, D. V. 2007. A phase 1/2 trial of arginine butyrate and ganciclovir in patients with Epstein-Barr virus-associated lymphoid malignancies. *Blood*, 109, 2571-8.
- POPE, J. H., HORNE, M. K. & SCOTT, W. 1968. Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. *Int J Cancer*, 3, 857-66.
- POPESCU, I., MACEDO, C., ZEEVI, A., NELLIS, J., PATTERSON, K. R., LOGAR, A., ROWE, D., REYES, J., RAO, A. S., STORKUS, W. J., FUNG, J. J. & METES, D. 2003. Ex vivo priming of naive T cells into EBV-specific Th1/Tc1 effector cells by mature autologous DC loaded with apoptotic/necrotic LCL. *Am J Transplant*, 3, 1369-77.

- PRECOPIO, M. L., SULLIVAN, J. L., WILLARD, C., SOMASUNDARAN, M. & LUZURIAGA, K. 2003. Differential kinetics and specificity of EBV-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells during primary infection. *J Immunol*, 170, 2590-8.
- PUDNEY, V. A., LEESE, A. M., RICKINSON, A. B. & HISLOP, A. D. 2005. CD8<sup>+</sup> immunodominance among Epstein-Barr virus lytic cycle antigens directly reflects the efficiency of antigen presentation in lytically infected cells. *J Exp Med*, 201, 349-60.
- RECHSTEINER, M. P., BERGER, C., ZAUNER, L., SIGRIST, J. A., WEBER, M., LONGNECKER, R., BERNASCONI, M. & NADAL, D. 2008. Latent membrane protein 2B regulates susceptibility to induction of lytic Epstein-Barr virus infection. *J Virol*, 82, 1739-47.
- REINHARDT, R. L., KHORUTS, A., MERICA, R., ZELL, T. & JENKINS, M. K. 2001. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature*, 410, 101-5.
- RENCHER, S. D., SLOBOD, K. S., SMITH, F. S. & HURWITZ, J. L. 1994. Activity of transplanted CD8<sup>+</sup> versus CD4<sup>+</sup> cytotoxic T cells against Epstein-Barr virus-immortalized B cell tumors in SCID mice. *Transplantation*, 58, 629-33.
- RICKINSON, A. & KIEFF, E. 2006. Epstein-Barr Virus. In: KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. & GRIFFIN, D. E. (eds.) *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- ROONEY, C. M., ROSKROW, M. A., SUZUKI, N., NG, C. Y., BRENNER, M. K. & HESLOP, H. 1998. Treatment of relapsed Hodgkin's disease using EBV-specific cytotoxic T cells. *Ann Oncol*, 9 Suppl 5, S129-32.
- ROWE, M., FINKE, J., SZIGETI, R. & KLEIN, G. 1988. Characterization of the serological response in man to the latent membrane protein and the six nuclear antigens encoded by Epstein-Barr virus. *J Gen Virol*, 69 ( Pt 6), 1217-28.
- ROWE, M., LEAR, A. L., CROOM-CARTER, D., DAVIES, A. H. & RICKINSON, A. B. 1992. Three pathways of Epstein-Barr virus gene activation from EBNA1-positive latency in B lymphocytes. *J Virol*, 66, 122-31.
- ROWE, M., ROWE, D. T., GREGORY, C. D., YOUNG, L. S., FARRELL, P. J., RUPANI, H. & RICKINSON, A. B. 1987. Differences in B cell growth phenotype reflect novel patterns of Epstein-Barr virus latent gene expression in Burkitt's lymphoma cells. *EMBO J*, 6, 2743-51.

- ROWE, M., YOUNG, L. S., CROCKER, J., STOKES, H., HENDERSON, S. & RICKINSON, A. B. 1991. Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoproliferative disease in the SCID mouse model: implications for the pathogenesis of EBV-positive lymphomas in man. *J Exp Med*, 173, 147-58.
- RUSCHPLER, P. & STIEHL, P. 2002. Shift in Th1 (IL-2 and IFN-gamma) and Th2 (IL-10 and IL-4) cytokine mRNA balance within two new histological main-types of rheumatoid-arthritis (RA). *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 48, 285-93.
- SAKAGUCHI, S., MIYARA, M., COSTANTINO, C. M. & HAFLER, D. A. 2010. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*, 10, 490-500.
- SALLUSTO, F., GEGINAT, J. & LANZAVECCHIA, A. 2004. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*, 22, 745-63.
- SALLUSTO, F. & LANZAVECCHIA, A. 2009. Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol*, 39, 2076-82.
- SALLUSTO, F., LENIG, D., FORSTER, R., LIPP, M. & LANZAVECCHIA, A. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401, 708-12.
- SAVOLDO, B., CUBBAGE, M. L., DURETT, A. G., GOSS, J., HULS, M. H., LIU, Z., TERESITA, L., GEE, A. P., LING, P. D., BRENNER, M. K., HESLOP, H. E. & ROONEY, C. M. 2002. Generation of EBV-specific CD4+ cytotoxic T cells from virus naive individuals. *J Immunol*, 168, 909-18.
- SILINS, S. L. & SCULLEY, T. B. 1994. Modulation of vimentin, the CD40 activation antigen and Burkitt's lymphoma antigen (CD77) by the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-4. *Virology*, 202, 16-24.
- SMITH, C. A., NG, C. Y., HESLOP, H. E., HOLLADAY, M. S., RICHARDSON, S., TURNER, E. V., LOFTIN, S. K., LI, C., BRENNER, M. K. & ROONEY, C. M. 1995. Production of genetically modified Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cells for adoptive transfer to patients at high risk of EBV-associated lymphoproliferative disease. *J Hematother*, 4, 73-9.
- STEVENS, S. J., VERSCHUUREN, E. A., PRONK, I., VAN DER BIJ, W., HARMSSEN, M. C., THE, T. H., MEIJER, C. J., VAN DEN BRULE, A. J. & MIDDELDORP, J. M. 2001. Frequent monitoring of Epstein-Barr virus DNA

- load in unfractionated whole blood is essential for early detection of posttransplant lymphoproliferative disease in high-risk patients. *Blood*, 97, 1165-71.
- STOCKINGER, B., KASSIOTIS, G. & BOURGEOIS, C. 2004. CD4 T-cell memory. *Semin Immunol*, 16, 295-303.
- SUN, Q., BURTON, R., REDDY, V. & LUCAS, K. G. 2002a. Safety of allogeneic Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T lymphocytes for patients with refractory EBV-related lymphoma. *Br J Haematol*, 118, 799-808.
- SUN, Q., BURTON, R. L. & LUCAS, K. G. 2002b. Cytokine production and cytolytic mechanism of CD4(+) cytotoxic T lymphocytes in ex vivo expanded therapeutic Epstein-Barr virus-specific T-cell cultures. *Blood*, 99, 3302-9.
- SWANSON-MUNGERSON, M., BULTEMA, R. & LONGNECKER, R. 2010. Epstein-Barr Virus LMP2A Imposes Sensitivity to Apoptosis. *J Gen Virol*.
- SZABO, S. J., KIM, S. T., COSTA, G. L., ZHANG, X., FATHMAN, C. G. & GLIMCHER, L. H. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, 100, 655-69.
- THORLEY-LAWSON, D. A. 2001. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol*, 1, 75-82.
- THORLEY-LAWSON, D. A. 2005. EBV the prototypical human tumor virus--just how bad is it? *J Allergy Clin Immunol*, 116, 251-61; quiz 262.
- TRIFARI, S., KAPLAN, C. D., TRAN, E. H., CRELLIN, N. K. & SPITS, H. 2009. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol*, 10, 864-71.
- WAGNER, H. J., CHENG, Y. C., HULS, M. H., GEE, A. P., KUEHNLE, I., KRANCE, R. A., BRENNER, M. K., ROONEY, C. M. & HESLOP, H. E. 2004. Prompt versus preemptive intervention for EBV lymphoproliferative disease. *Blood*, 103, 3979-81.
- WANG, F., GREGORY, C., SAMPLE, C., ROWE, M., LIEBOWITZ, D., MURRAY, R., RICKINSON, A. & KIEFF, E. 1990a. Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J Virol*, 64, 2309-18.

- WANG, F., TSANG, S. F., KURILLA, M. G., COHEN, J. I. & KIEFF, E. 1990b. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivates latent membrane protein LMP1. *J Virol*, 64, 3407-16.
- WATRY, D., HEDRICK, J. A., SIERVO, S., RHODES, G., LAMBERTI, J. J., LAMBRIS, J. D. & TSOUKAS, C. D. 1991. Infection of human thymocytes by Epstein-Barr virus. *J Exp Med*, 173, 971-80.
- WILKIE, G. M., TAYLOR, C., JONES, M. M., BURNS, D. M., TURNER, M., KILPATRICK, D., AMLLOT, P. L., CRAWFORD, D. H. & HAQUE, T. 2004. Establishment and characterization of a bank of cytotoxic T lymphocytes for immunotherapy of Epstein-Barr virus-associated diseases. *J Immunother*, 27, 309-16.
- WILLIAMS, H., MCAULAY, K., MACSWEEN, K. F., GALLACHER, N. J., HIGGINS, C. D., HARRISON, N., SWERDLOW, A. J. & CRAWFORD, D. H. 2005. The immune response to primary EBV infection: a role for natural killer cells. *Br J Haematol*, 129, 266-74.
- XIE, Y., AKPINARLI, A., MARIS, C., HIPKISS, E. L., LANE, M., KWON, E. K., MURANSKI, P., RESTIFO, N. P. & ANTONY, P. A. 2010. Naive tumor-specific CD4(+) T cells differentiated in vivo eradicate established melanoma. *J Exp Med*, 207, 651-67.
- YOUNG, L., ALFIERI, C., HENNESSY, K., EVANS, H., O'HARA, C., ANDERSON, K. C., RITZ, J., SHAPIRO, R. S., RICKINSON, A., KIEFF, E. & ET AL. 1989. Expression of Epstein-Barr virus transformation-associated genes in tissues of patients with EBV lymphoproliferative disease. *N Engl J Med*, 321, 1080-5.
- YOUNG, L. S. & MURRAY, P. G. 2003. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene*, 22, 5108-21.
- YOUNG, L. S. & RICKINSON, A. B. 2004. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*, 4, 757-68.
- ZHENG, W. & FLAVELL, R. A. 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*, 89, 587-96.
- ZHU, J. & PAUL, W. E. 2010. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res*, 20, 4-12.

ZHU, J., YAMANE, H. & PAUL, W. E. 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev Immunol*, 28, 445-89.

## Herzlichen Dank...

... an alle, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!

... an PD Dr. Josef Mautner und Prof. Dr. Uta Behrends, die mir von Anfang an ihr Vertrauen entgegen gebracht, mich in ihrer Arbeitsgruppe aufgenommen und mich in jeglicher Hinsicht unterstützt haben. Ich danke euch für die Bereitstellung des interessanten Themas.

... an Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß, die sich bereit erklärte, als Zweitgutachterin meine Arbeit zu beurteilen.

... an die gesamte Arbeitsgruppe: Isabella, Karzan, Heike, Max, Frank und Frau Lechner, sowie alle Ehemaligen. Vielen Dank für die schöne und abwechslungsreiche Zeit mit euch!

... dabei besonders an Isabella, Karzan und Max, die mich, wenn nötig, *in vitro* und *in vivo* vertreten haben.

... an Heidi F., die mir die ersten Schritte der Immunhistochemie beigebracht hat.

... an alle freiwilligen Blutspender, ohne die Teile meiner Arbeit nicht möglich gewesen wären.

... an alle ehemaligen und aktuellen Mitarbeiter des Tierstalls, ohne die die Mehrheit meiner Versuche nicht möglich gewesen wäre. Besonderen Dank dabei an Michael H. und Franz L.!

... an meine Familie, die immer mit mir mitgefiebert und mich unterstützt hat.

Zuletzt möchte ich Alex danken, der mich immer unterstützt hat. Ohne dich hätte ich das alles nicht geschafft. Danke dir!



## LEBENS LAUF

LINNERBAUER STEFANIE

\*14. Juli 1983 in Bad Aibling

[stefanie.linnerbauer@helmholtz-muenchen.de](mailto:stefanie.linnerbauer@helmholtz-muenchen.de)

### Promotion

- 01/2008 - 12/2010** Promotion, durchgeführt am Helmholtz Zentrum München am Institut für klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik in der klinischen Kooperationsgruppe „Pädiatrische Tumorimmunologie“  
**Thema: Charakterisierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort im Rahmen der Epstein-Barr Virus-Infektion *in vitro* und *in vivo***

### Berufserfahrung

- 01/2008 - 12/2010** Wissenschaftliche Angestellte, Klinikum rechts der Isar, TUM  
**10/2007 - 11/2007** Wissenschaftliche Angestellte, Max-von-Pettenkofer-Institut, LMU  
**07/2007 - 09/2007** Aushilfe; Micromet Inc., Bereich Target Research, München  
**03/2005 - 07/2006** Werkstudentin; Micromet Inc., Bereich Target Research, München  
**03/2005 - 04/2005** studentische Hilfskraft, Fakultät der Biologie, LMU

### Studium

- 10.09.2007** Diplom der Biologie  
**10/2006 - 07/2007** Diplomarbeit an der LMU München, Department I, Mikrobiologie  
**Thema: Bedeutung der LuxR-homologen Regulatoren Plu0320 und Plu4562 in *Photorhabdus luminescens***  
**10/2002 - 07/2007** Biologiestudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU)  
*Schwerpunkt:* Mikrobiologie  
*Nebenfächer:* Immunologie; Anthropologie und Humangenetik  
*Zusatzfach:* Pharmakologie-Toxikologie

### Schule

- 09/1993 - 06/2002** Gymnasium Bad Aibling